

文章编号:1673-1689(2006)02-0052-04

一株曲霉果糖转移酶的发酵条件及转果糖基活性

王立梅, 周惠明

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 对一株曲霉果糖转移酶菌株的产酶培养条件进行了研究。确定了最佳培养基组成: 初始蔗糖质量浓度 15~18 g/dL, 氮源为酵母膏, K_2HPO_4 对果糖转移酶的产生具有明显的促进作用, 添加 0.2 g/dL CMC 能够使果糖转移酶活力提高到原来的 1.3 倍, 在 pH 5.5, 30 °C 条件下, 果糖转移酶最高酶活力为 30.42 U/mL。HPLC 分析结果表明, 转糖基产物为总质量的 55.8%。

关键词: 果糖转移酶; 转糖基; 酶活力; 生物量

中图分类号: TS 201.25

文献标识码: A

Study on Fermentation Conditions for the Production of Fructosyltransferase and Transfructosylation from *Aspergillus niger*

WANG Li-mei, ZHOU Hui-ming

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The optimal conditions for fructosyltransferase production from *Aspergillus sp.* were investigated. The initial concentration of sucrose was 15~18 g/dL. Yeast extract was the best nitrogen source. K_2HPO_4 was effective in increasing enzyme production. The enzyme activity was increased 30% by addition of 0.2 g/dL of CMC in the medium. The highest fructosyltransferase activity was 30.42 U/mL at pH 5.5 and 30 °C. Fructooligosaccharides was 55.8% of the total products.

Key words: fructosyltransferase; transfructosylation; enzyme activity; biomass

低聚果糖是由蔗糖和 1~3 个果糖基通过 β -2,1 键结合而成的寡糖。低聚果糖具有低热值、预防龋齿、增殖肠道内的双歧杆菌、调节机体免疫力等生理功能, 被广泛应用于食品、饲料和医药工业, 是一种重要的保健型添加剂^[1]。

低聚果糖是果糖基转移酶通过催化蔗糖水解并将果糖基转移到蔗糖分子的果糖残基 C₁ 位置上而合成的。能够催化此类反应的酶有果糖转移酶 (FTase, EC2.4.1.9) 和 β -D-呋喃果糖苷酶 (FFase,

EC3.2.1.26)。据报道, 发酵生产果糖基转移酶常用的微生物菌种有黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*)、节杆菌 (*Arthrobacter sp.*) 和酵母等^[2-5]。采用物理化学复合方法诱变一株黑曲霉, 获得了一株高产果糖基转移酶的突变株 JN19。研究了该突变菌株的发酵条件, 并对其转果糖基活性进行了初步探讨。

收稿日期: 2005-04-25; 修回日期: 2005-06-10.

基金项目: 江苏省科技计划项目 (2001BA501A18).

作者简介: 王立梅 (1964-), 女, 吉林长春人, 食品科学博士研究生, 副教授.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 蔗糖三糖;Sigma Co, Ltd 产品;葡萄糖氧化酶;保定长城临床试剂有限公司产品。

1.1.2 菌种 曲霉(*Aspergillus sp*)JN19, 作者所在实验室分离保藏。

1.1.3 培养基

1) 斜面培养基:马铃薯琼脂培养基。

2) 种子培养基:NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 蔗糖 30 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

3) 基础培养基:蔗糖 150 g, 酵母膏 15 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

4) 产酶培养基:蔗糖 150 g, 酵母膏 10 g, NaNO₃ 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, CMC 2 g, 水 1 000 mL, pH 值 5.5。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备 用无菌生理盐水将斜面孢子洗下, 调节孢子浓度至 10⁷ 个/mL, 接种到 40 mL 培养液, 接种体积分数 10%, 28 ℃ 下振荡培养 72 h, 超声波破碎(4 ℃) 细胞: 超声波破碎 5 s, 停 3 s, 破碎总时间 20 min。8 000×g 冷冻离心, 上清液为粗酶液。

1.2.2 酶活力的测定 取适当稀释的粗酶液 0.5 mL 与 25% 的蔗糖溶液(用 pH 5.0, 0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸盐缓冲液配制) 2 mL 混合均匀, 45 ℃ 下酶解 1 h, 100 ℃ 煮沸 15 min 终止酶解反应^[4]。果糖基转移酶活通过测定酶解过程中所释放出的葡萄糖(G)和还原糖(R)含量, 按照下式计算酶解过程中所产生的果糖量(F)和被转移的果糖(F')量。

$$F = R - G$$
$$F' = G - F = 2G - R$$

在相同条件下, 以加入失活酶液的蔗糖溶液作为对照。在上述条件下, 以每分钟转移 1 μmol 果糖所需的酶量为一个果糖转移酶活力单位。

1.2.3 糖的测定 还原糖采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法, 葡萄糖采用葡萄糖氧化酶法。

1.2.4 薄板层析 按上述制备的酶解液进行薄层层析, 采用 ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ 硅胶板(MADCHERY-NAGEL Co, Ltd), 展开剂为正丁醇:吡啶:水体积比为 6:4:3, 展开两次, 显色剂为 0.5% α-萘酚乙醇溶液。

1.2.5 HPLC 色谱 色谱仪为美国 Waters 公司 600 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Hypersil NH2 柱

(250 mm×4.6 mm), 填料粒度 5 μm, 柱温保持在 30 ℃, 流动相为体积分数 75% 的乙腈, 流速 1 mL/min, Waters2410 型示差折光检测器。酶解产物进样前用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 发酵条件对果糖基转移酶活的影响

2.1.1 初始碳源质量浓度对菌体产酶的影响 配制不同蔗糖质量浓度的种子培养基, 接种量为 10⁶ 个/mL, 培养 72 h, 结果见图 1。由图 1 可见, 随着蔗糖质量浓度的增加, 菌株的果糖转移酶活力及生物量均呈上升趋势, 当蔗糖质量浓度大于 15 g/dL 时, 果糖转移酶活力增长速度减慢。当蔗糖质量浓度为 9 g/dL 时, 黑曲霉的生物量达到最高, 然后缓慢下降, 当蔗糖质量浓度大于 18 g/dL 时, 生物量迅速下降, 表明蔗糖质量浓度过高会抑制该菌体生长。因此蔗糖质量浓度控制在 15~18 g/dL 有利于果糖转移酶的产生。

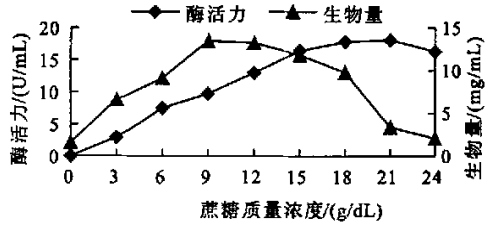


图 1 初始碳源质量浓度对酶活力及生物量的影响

Fig. 1 Effects of initial concentration of carbon source on FTase production and biomass from *Aspergillus sp.*

2.1.2 氮源对菌体产酶的影响 以蔗糖为碳源, 在种子培养基中分别加入不同氮源, 测定不同的氮源对果糖转移酶的影响, 结果见表 1。实验发现, 酵母膏为 JN19 的最佳氮源, 这一结果与 Chen 报道相一致, Chen^[6]认为酵母膏中丰富的氮源及生长因子可以促进果糖转移酶的产生。尿素对微生物的生长及酶的产生均有抑制作用。

表 1 不同氮源对菌株酶活和生物量的影响

Tab. 1 Effects of various nitrogens on FTase production and biomass from *Aspergillus sp.*

氮源	相对酶活/%	生物量/(mg/mL)
酵母浸膏	109.35	14.76
蛋白胨	88.60	15.20
大豆蛋白	67.40	11.15
尿素	15.96	8.80
(NH ₄) ₂ SO ₄	50.10	20.55
NH ₄ NO ₃	62.63	14.60

2.1.3 金属离子对菌体产酶的影响 在基础培养基中分别加入 0.05% 的金属离子, 以未加金属离子的培养基为对照, 测定金属离子对 JN19 果糖转移酶酶活力及菌体生长的影响, 结果见表 2。由表 2 可以看出, 培养基中添加 K_2HPO_4 对果糖转移酶的产生具有明显的促进作用, Jung^[7] 报道 K_2HPO_4 能够促进 *Aureo-basidium pullulans* 果糖转移酶的产生, 因为 K_2HPO_4 是一种缓冲试剂, 能够维持培养基 pH 值稳定, 因此有利于微生物生长和产酶, 而 $MgSO_4$ 改变了细胞膜的渗透性, 但在本实验中, 添加 $MgSO_4$ 对果糖转移酶酶活力影响不大。 $CuSO_4$ 和 $FeSO_4$ 对该菌株果糖转移酶酶活力具有抑制作用。

表 2 不同金属离子对酶活和生物量的影响

Tab. 2 Effects of various cations on FTase production and biomass from *Aspergillus sp.*

金属离子	相对活性/%	生物量/(mg/mL)
未加金属离子	100	12.07
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	101.50	12.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0	5.60
$MnSO_4 \cdot H_2O$	28.07	15.50
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.58	12.90
K_2HPO_4	118.01	16.10
KCl	87.29	15.25
$CaCl_2$	24.17	13.55
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	31.70	9.00

2.1.4 添加剂对菌体产酶的影响 据报道, 聚合物和表面活性剂的添加有助于酶的产生^[6]。如表 3 所示, 聚乙烯醇和 CMC 均会促进果糖转移酶的产生, 当 CMC 的含量为 0.2 g/dL 时, 果糖转移酶的产量明显增加, 是不加 CMC 的 1.3 倍, 继续增加其用量, 对酶活影响不显著。

表 3 不同添加剂对酶活的影响

Tab. 3 Effects of various additives on FTase production and biomass from *Aspergillus sp.*

添加 量/%	相对酶活/%			
	吐温-80	EDTA	聚乙烯醇	CMC
0	100	100	100	100
0.1	95.61	26.75	98.12	115.18
0.2	46.76	12.34	102.29	131.20
0.5	—	—	65.48	133.17

2.1.5 初始 pH 值对菌体产酶及生长的影响 利用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调整发酵培养基的初始 pH 值, 摇床培养 3 d, 观察初始 pH

值对微生物生长和产酶影响, 结果见图 2。从图 2 可以看出, pH 值对酶的生产 and 微生物的生长影响很大。在酸性条件下, 该菌株产酶能力较弱, 微生物生长也受到影响; 偏酸条件下 (pH 5~6), 该菌株产酶能力最强, 最适初始 pH 值为 5.5, 菌体生长也比较旺盛, 生物量达到最高; pH 值大于 6.5, 酶活力明显下降, 菌体生长受到抑制。

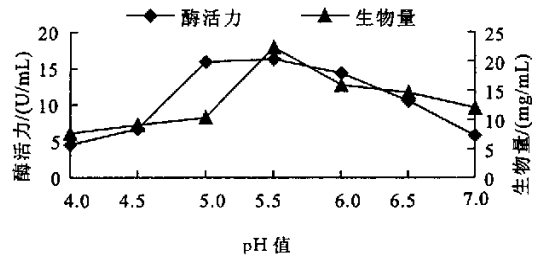


图 2 pH 值对酶活力及生物量的影响

Fig. 2 Effects of initial pH on FTase production and biomass from *Aspergillus sp.*

2.2 发酵产酶及转糖基产物分析

2.2.1 产酶曲线 菌株在上述培养条件下发酵 6 d, 测定不同培养条件下的菌体生长量和果糖转移酶的活力, 结果见图 3。从果糖转移酶的合成进程曲线中可以看出, 菌株在优化的培养条件下, 从 24 h 开始, 培养液中果糖转移酶活力开始升高, 在 96 h 酶活达到最大值 (30.42 U/mL), 然后开始缓慢下降。24 h 内菌体生长缓慢, 然后迅速生长, 72 h 后进入平稳生长状态, 至 144 h 菌体生物量变化不大。

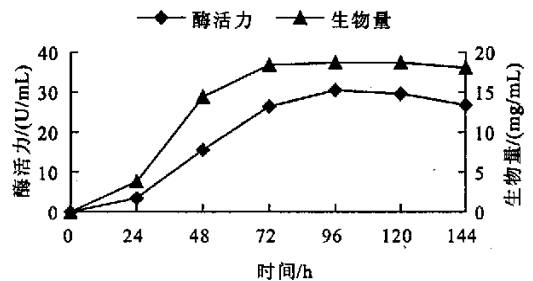


图 3 *Aspergillus sp.* 的生长曲线及产酶曲线

Fig. 3 The curve of growth and FTase production from *Aspergillus sp.*

2.2.2 黑曲霉果糖转移酶转糖基产物的分析 转糖基反应产物的 HPLC 分析见图 4。由图 4 可知, 峰 1 和峰 2 分别是底物蔗糖的水解反应产物果糖和葡萄糖, 说明粗酶液具有水解特性, 可能含有 β -D-呋喃果糖苷酶, 将底物蔗糖水解为葡萄糖和果糖。峰 3 为底物蔗糖, 峰 4 为蔗果三糖, 峰 5 是蔗果四糖, 峰 6 和 7 是其它低聚果糖产物。根据峰面积计算, 黑曲霉果糖转移酶转糖基产物中总低聚果糖的质量分数为 55.8%。

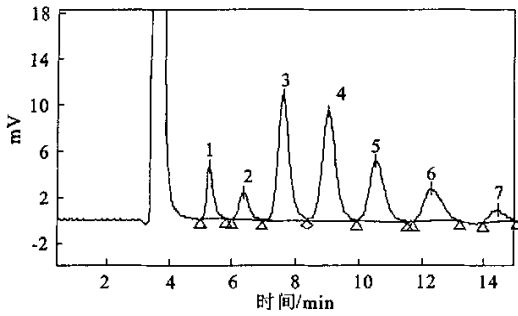


图4 转糖基产物的HPLC图谱

Fig. 4 HPLC spectrum of transfructosylation product by FTase from *Aspergillus sp.*

3 结 语

作者分析了不同培养条件对曲霉果糖转移酶的生产 and 微生物生长的影响。结果表明,蔗糖初始质量浓度为15~18 g/dL,酵母膏为氮源有助于黑曲霉果糖转移酶的生产,培养基中添加 $MgSO_4$ 和 K_2HPO_4 可以促进果糖转移酶的产生,而 $CuSO_4$ 和 $FeSO_4$ 对酶有抑制作用。在优化的培养条件下,果糖转移酶活力最高达到 30.42 U/mL, HPLC 分析表明,转果糖基的主要产物为蔗果三糖、蔗果四糖和其它低聚糖,占总质量的 55.8%。

参考文献:

- [1] Spiegel J E, Rose R, Karabell P, et al. Safty and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients[J]. *Food Technol*, 1994, 48: 85-89.
- [2] Yun J W. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 19: 107-117.
- [3] Hidaka H, Hirayama M, Sumi N. A fructo-oligosaccharides producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611[J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 1181-1187.
- [4] Fujita K, Hara K, Hashimoto H, et al. Transfructosylation catalyzed by β -Fructofuranosidase from *Arthrobacter sp. K-1* [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(10): 2655-2661.
- [5] Kim B W, Kwon H J, Park H Y, et al. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6 [J]. *Bioprocess Engineering*, 2000, 23: 11-16.
- [6] Chen W Ch, Liu Chi-hsien. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18: 153-160.
- [7] Jung K H, Lim J Y. Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* [J]. *Biotechnology Letters*, 1987, 9: 703-708.

(责任编辑:李春丽)