



引用格式:魏涛,赵彩梦,郝未未,等.果糖基转移酶 AoFT 在毕赤酵母中的表达与纯化及其酶学性质研究[J].轻工学报,2020,35(3):1-10.

中图分类号:TS41⁺3 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.03.001

文章编号:2096-1553(2020)03-0001-10

果糖基转移酶 AoFT 在毕赤酵母中的表达与纯化及其酶学性质研究

Expression and purification of fructosyl transferase AoFT in *Pichia pastoris* and study on its enzymatic properties

魏涛^{1,2},赵彩梦¹,郝未未¹,黄申¹,毛多斌^{1,2}

WEI Tao^{1,2}, ZHAO Caimeng¹, JIA Weiwei¹, HUANG Shen¹, MAO Duobin^{1,2}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南省食品生产与安全协同创新中心,河南 郑州 450001

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China

摘要:利用基因工程技术方法,将构建的重组质粒 pPICZ α A-AoFT 线性化后,经电转化导入毕赤酵母 X33 (*Pichia pastoris* X33) 中,构建重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33,实现果糖基转移酶 AoFT 在毕赤酵母中的表达,进而研究纯化后的果糖基转移酶 AoFT 的酶学性质.结果表明:pPICZ α A-AoFT/X33 随发酵时间的增加而快速繁殖,菌体 OD_{600} 值于发酵时长 120 h 时达到峰值,此时发酵液胞外总蛋白质量浓度为 1.64 mg/mL;纯化后的果糖基转移酶 AoFT 的比活力为 71.4 U/mg,产率达 70.6%;PNGase F 酶切反应证实纯化后的果糖基转移酶 AoFT 发生了 N-糖基化反应;果糖基转移酶 AoFT 的最适反应温度为 45 °C,最适缓冲体系为醋酸钠缓冲液(pH 值为 4.5~6.0);金属离子 Mn^{2+} , Ca^{2+} 对果糖基转移酶 AoFT 具有激活作用,而 Al^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 和 EDTA 对果糖基转移酶 AoFT 具有抑制作用;表面活性剂 SDS,吐温 20 和 Triton X-100 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性影响较小,还原剂 DTT 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性具有明显的抑制作用,酶抑制剂 PMSF 低浓度时对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性无显著影响,高浓度时可使酶活性降低;果糖基转移酶 AoFT 对有机溶剂乙醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、正丁醇、正己烷和甲苯具有较强的抗性.

关键词:

果糖基转移酶;
毕赤酵母;表达;
纯化;酶学性质

Key words:

fructosyl transferase;
Pichia pastoris;
expression;
purification;
enzymatic property

收稿日期:2019-12-12

基金项目:国家自然科学基金项目(21406210);河南省高校科技创新人才项目(18HASTIT040);河南省留学人员科技活动项目(2019-3)

作者简介:魏涛(1980—),男,河南省卫辉市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术.

Abstract: Using genetic engineering techniques, the recombinant plasmid pPICZ α A-AoFT was linearized, and then electroporated into *Pichia pastoris* X33 to construct recombinant *Pichia pastoris* engineering strain pPICZ α A-AoFT/X33 and achieve the recombinant fructosyl transferase AoFT in *Pichia pastoris*. Furthermore, the enzymatic properties of the purified fructosyl transferase AoFT were studied. The results showed that the pPICZ α A-AoFT/X33 multiplied rapidly with the increase of fermentation time. The OD_{600} value of the cell reached a peak at 120 h, and the total protein concentration of the extracellular protein in the fermentation broth was 1.64 mg/mL. The specific activity of the purified fructosyl transferase AoFT enzyme was 71.4 U/mg, and the yield was 70.6%. The peptide N-glycosidase F digestion reaction confirmed that the purified fructosyl transferase AoFT had some N-glycosylation sites. The optimal reaction temperature of fructosyl transferase AoFT was 45 °C, and the optimal buffer system was sodium acetate buffer (pH value was 4.5 ~ 6.0). Metal ions Mn^{2+} and Ca^{2+} could activate fructosyl transferase AoFT, while Al^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} and EDTA could inhibit fructosyl transferase AoFT. Surfactants (SDS, Tween-20 and Triton X-100) had little effect on the activity of fructosyl transferase AoFT, while the reductant DTT had obvious inhibition effect on the activity of fructosyl transferase AoFT. The low concentration of PMSF had no significant effect on the activity of fructosyl transferase, but the high concentration could reduce the activity. The activity of fructosyl transferase AoFT showed strong resistance to organic solvents (ethanol, DMSO, dimethylformamide, n-butanol, n-hexane and toluene).

0 前言

三氯蔗糖是食品加工过程中常用的甜味剂,其甜度为蔗糖的500倍左右,同时具有良好的物理、化学性质,被广泛应用于酒类、饮料、焙烤食品、蜜饯类食品等生产行业^[1-3].在已有的三氯蔗糖合成工艺中,蔗糖-6-乙酸酯S6A (sucrose-6-acetate)是合成过程中重要的中间体之一^[4].近年来,利用果糖基转移酶生物酶法催化合成S6A已成为国内外业界研究热点^[5-6].该方法以葡萄糖-6-乙酸酯G6A (glucose-6-acetate)和蔗糖为反应底物,经果糖基转移酶转糖基作用生成S6A和葡萄糖.酶法制备S6A具有反应效率高、副产物少、易于纯化等优势,具

有广阔的应用前景.

毛多斌等^[7]从米曲霉ZZ-01 (*Aspergillus oryzae* ZZ-01)筛选得到新型果糖基转移酶AoFT,该酶转果糖基活性较强,能够将蔗糖分子中的果糖基残基转化到底物G6A中,进而合成S6A,反应式如图1所示.但目前该酶的制备方法存在分离纯化较多、蛋白得率较低、尤其是用大肠杆菌表达的蛋白无法直接应用于食品行业等问题,亟待改进.毕赤酵母表达系统对营养要求低,具有低成本、培养密度大等优势,是制备食品酶制剂的重要方法之一^[8-13].基于此,本文拟将来源于米曲霉的果糖基转移酶AoFT基因在毕赤酵母X33 (*Pichia pastoris* X33)中表达,并对所得重组蛋白果糖基转移酶AoFT进行酶

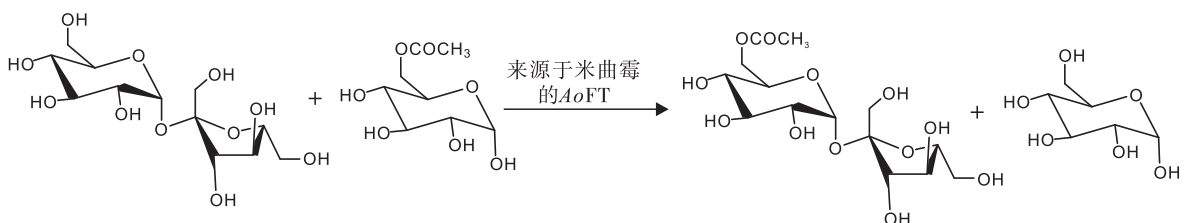


图1 来源于米曲霉的果糖基转移酶AoFT催化反应式

Fig. 1 Catalytic reaction of fructosyl transferase AoFT from *Aspergillus oryzae*

学性质研究,以期为果糖基转移酶 AoFT 的制备与应用提供一种新方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株与质粒

重组质粒 pET22b-AoFT, *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,郑州轻工业大学食品与生物工程学院实验室保存;载体 pPICZ α A,毕赤酵母 X33 (*Pichia pastoris* X33),购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I, DNA 聚合酶,日本宝生物(大连)公司产;博来霉素(Zeocin),上海索宝生物科技有限公司产;多功能 DNA 纯化回收试剂盒、普通质粒抽提试剂盒(TIANprep Midi Plasmid Kit)和酵母 DNA 小量提取试剂盒,美国 Omega 公司产;肽 N-糖苷酶 F(PNGase F),美国 Novagen 公司产;酵母膏、蛋白胨,英国 Oxoid 公司产;NaCl,葡萄糖, K_3PO_4 , K_2HPO_4 , 生物素,无氨基酵母氮源(YNB),甘油,甲醇,乙醇,二甲基甲酰胺,丙酮,正丁醇,氯仿,二甲基亚砷,正己烷,丙醇,甲醛,甲苯,柠檬酸钠,醋酸钠,磷酸钠,Tris-HCl,乙二胺四乙酸(EDTA),吐温 20,聚乙二醇辛基苯甲醚(Triton X-100),十二烷基硫酸钠(SDS),二硫苏糖醇(DTT),苯甲基磺酰氟(PMSF),均系上海生工生物工程股份有限公司产。

1.1.3 培养基

LB 培养基:酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,去离子水定容至 1000 mL。

YPD 培养基:酵母膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,去离子水定容至 1000 mL。

BMGY 培养基:酵母膏 10 g,蛋白胨 20 g, 100 mmol K_3PO_4 (pH 值为 6.0),生物素 0.000 4 g, YNB13.4 g,甘油 10 g,去离子水定

容至 1000 mL。

BMMY 培养基:酵母膏 10 g,蛋白胨 20 g, 100 mmol K_3PO_4 (pH 值为 6.0),甲醇 5 g,生物素 0.000 4 g, YNB 13.4 g,去离子水定容至 1000 mL。

以上培养基于 121 $^{\circ}C$ 条件下灭菌 20 min,其中生物素、YNB 和甲醇于过滤膜除菌后再添加。

1.1.4 仪器与设备

核酸电泳仪,美国 Thermo 公司产;WD-9403D 型紫外仪,北京市六一仪器厂产;HH-S 型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂产;QYC 系列空气摇床,上海福玛实验设备有限公司产;N&DN 系列超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司产;Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司产;1525 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 的构建

将重组质粒 pET22b-AoFT 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切,得到目的基因 AoFT;将纯化后的目的基因 AoFT 与经相同酶切的 pPICZ α A 载体相连接,构建重组质粒 pPICZ α A-AoFT;将重组质粒 pPICZ α A-AoFT 转移至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,在含有博来霉素(Zeocin)抗性的 LB 平板上涂布;进行菌落 PCR 阳性克隆后,提取其重组质粒,并进行双酶切和单酶切验证;在重组质粒 pPICZ α A-AoFT 酶切位点经限制性内切酶 *Sac* I 线性化后,经电转化导入毕赤酵母 X33 中,构建重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33,采用菌落 PCR 验证阳性克隆。阴性对照为毕赤酵母基因组 DNA 模板扩增结果,阳性对照为 pPICZ α A-AoFT 质粒模板扩增结果。

1.2.2 果糖基转移酶 *AoFT* 在毕赤酵母中的表达与纯化

将重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZ α A-*AoFT*/X33 在含有 Zeocin 抗性的 YPD 平板上划线复壮,于 30 ℃ 条件下培养 2~3 d,再转接到含 Zeocin 抗性的 YPD 液体培养基中,于 30 ℃ 条件下培养 16 h;取 500 μ L 含重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZ α A-*AoFT*/X33 的 YPD 液体培养基,接种于 50 mL BMGY 液体培养基中,培养至 OD_{600} 值为 1.6~2.0 时,取 2 mL 含重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZ α A-*AoFT*/X33 的 BMGY 液体培养基接种于 200 mL BMMY 培养基中,并添加质量分数为 3% 的甲醇用于诱导表达,培养 144 h. 其间每隔 24 h 取样 1 次,测定菌体 OD_{600} 值和胞外总蛋白质量浓度. 通过离心发酵液,获得粗酶液,再经硫酸铵(65% 饱和度)沉淀、镍柱亲和层析^[14-16] 纯化步骤,获得重组蛋白果糖基转移酶 *AoFT*.

1.2.3 果糖基转移酶 *AoFT* 的肽 N-糖苷酶 F (PNGase F) 酶切反应

取 10 μ g 果糖基转移酶 *AoFT* 溶于适量去离子水中,加入 1 μ L 10 \times 糖蛋白变性缓冲液,煮沸 10 min 使糖蛋白变性,然后加入 2 μ L 10 \times Glycobuffer 2, 1~2 μ L PNGase F 和 2 μ L 质量分数为 10% 的 NP-40,于 37 ℃ 条件下保持 1 h,终止反应,取样进行蛋白电泳(SDS-PAGE)检测.

1.2.4 果糖基转移酶 *AoFT* 酶活性的测定

果糖基转移酶 *AoFT* 酶活性的测定方法^[17-18] 如下:将 0.1 g 蔗糖和 0.05 g G6A 溶于 1 mL 的醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 值为 5.5)中,配成反应底物;取 40 μ L 反应底物,加 20 μ L 果糖基转移酶 *AoFT*,用超纯水稀释至 600 μ L,于 45 ℃ 条件下水浴 24 h,通过煮沸终止反应;采用 HPLC 方法检测反应产物,详见文献[19].

1.2.5 果糖基转移酶 *AoFT* 的酶学性质研究

1.2.5.1 最适反应温度确定与热稳定性分析

以醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 值为 5.5)为缓冲体系,每隔 5 ℃ 为一个测量点,将一定量的果糖基转移酶 *AoFT* 分别于 20 ℃, 25 ℃, 30 ℃, 35 ℃, 40 ℃, 45 ℃, 50 ℃, 55 ℃, 60 ℃, 65 ℃ 和 70 ℃ 条件下,水浴 24 h,测定各个温度下果糖基转移酶 *AoFT* 的相对酶活,定其最适反应温度;将一定量的果糖基转移酶 *AoFT* 分别于 20 ℃, 30 ℃, 40 ℃, 50 ℃, 60 ℃, 70 ℃ 和 80 ℃ 条件下水浴 1 h,测定各个温度下果糖基转移酶 *AoFT* 的相对酶活,分析其热稳定性.

1.2.5.2 最适 pH 缓冲体系确定与 pH 稳定性分析

在 45 ℃ 条件下,配制如下 pH 缓冲体系:柠檬酸钠缓冲液(pH 值为 3.0~4.0)、醋酸钠缓冲液(pH 值为 4.5~6.0)、磷酸钠缓冲液(pH 值为 6.5~8.0)和 Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 8.5~9.0),测定不同 pH 缓冲体系下果糖基转移酶 *AoFT* 的相对酶活,确定其最适 pH 缓冲体系;将一定量的果糖基转移酶 *AoFT* 分别加入上述不同 pH 缓冲体系中,置于室温下 1 h 后,测定各个 pH 缓冲体系下果糖基转移酶 *AoFT* 的相对酶活,分析其 pH 稳定性.

1.2.5.3 金属离子和 EDTA 对果糖基转移酶 *AoFT* 酶活性的影响

以醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 值为 5.5)为缓冲体系,分别加入终浓度为 5 mmol/L 的金属离子(Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+)和 EDTA,于 45 ℃ 条件下,测定各实验组果糖基转移酶 *AoFT* 的相对酶活.

1.2.5.4 表面活性剂、还原剂和酶抑制剂对果糖基转移酶 *AoFT* 酶活性的影响

以醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH 值为 5.5)为缓冲体系,分别加入不同体积分数(1%, 5%)的表面活性剂(吐温 20, Triton X-100 和 SDS),不同浓度(0.5 mmol/L 和 5.0 mmol/L)的还原剂 DTT 和

酶抑制剂 PMSF,测定各实验组果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活。

1.2.5.5 有机溶剂对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响 分别在甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺、丙酮、正丁醇、氯仿、二甲基亚砷、正己烷、丙醇、甲醛和甲苯中加入等体积的果糖基转移酶 AoFT,混合处理 2 h 后,测定各实验组果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 的构建结果

重组质粒 pPICZ α A-AoFT 经限制性内切酶 *Sac* I 线性化后,结果如图 2 所示,其中, M 表示 DNA Marker, 1 和 2 表示重组质粒 pPICZ α A-AoFT 线性化。从图 2 中可见约 5000 bp 的片段,与预期线性化片段大小一致。验证重组质粒 pPICZ α A-AoFT 导入毕赤酵母 X33 后的阳性克隆电泳图如图 3 所示,其中, M 表示 DNA Marker, 1 表示阳性对照, 2 表示阴性对照, 3 表示重组 DNA。由图 3 可以看出,条带 3 约 1872 bp,较明亮,即重组 DNA 的浓度比较高,表明重组质粒 pPICZ α A-AoFT 已成功导入毕赤酵母 X33。

2.2 重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 的生长状况

重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33

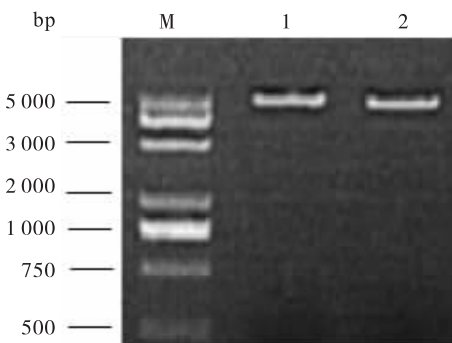


图 2 重组质粒 pPICZ α A-AoFT 线性化

Fig. 2 Linearization of recombinant plasmid pPICZ α A-AoFT

的生长曲线和发酵液胞外总蛋白质量浓度随时间变化曲线分别如图 4 和图 5 所示。由图 4 可以看出,重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 随发酵时间的增加而快速繁殖,菌体 OD_{600} 值于 120 h 时达到峰值,此时发酵液胞外总蛋白质量浓度达到 1.64 mg/mL(见图 5)。

2.3 果糖基转移酶 AoFT 在毕赤酵母中的表达 镍柱亲和层析纯化后的重组蛋白果糖基转移酶 AoFT 电泳图如图 6 所示,其中, M 表示蛋白 Marker, 1 和 2 表示浓度为 500 mmol/L 的咪唑洗脱样品, 3 和 4 表示浓度为 50 mmol/L 的

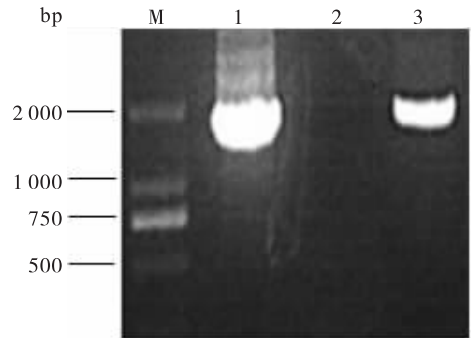


图 3 验证重组质粒 pPICZ α A-AoFT 导入毕赤酵母 X33 的阳性克隆电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram to verify that the recombinant plasmid pPICZ α A-AoFT was successfully introduced into the positive clone of *Pichia pastoris* X33

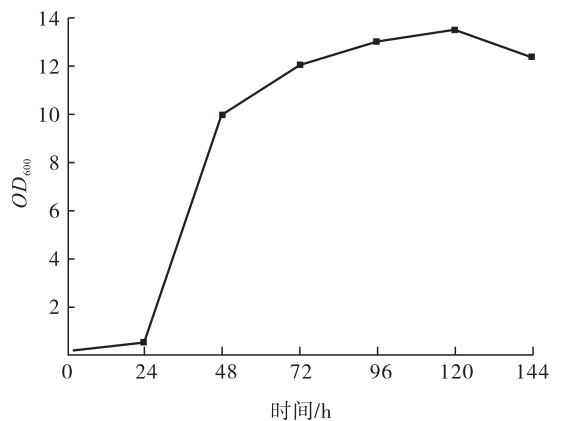


图 4 重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of recombinant *Pichia pastoris* engineering strain pPICZ α A-AoFT/X33

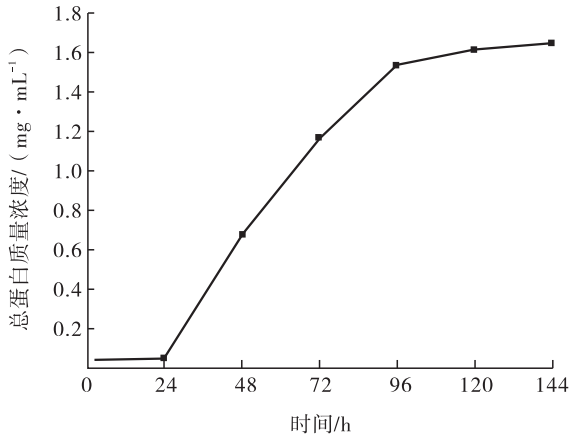


图5 发酵液胞外总蛋白质量浓度随时间变化曲线

Fig. 5 Time-varying curve of the total protein concentration of the extracellular protein in the fermentation broth

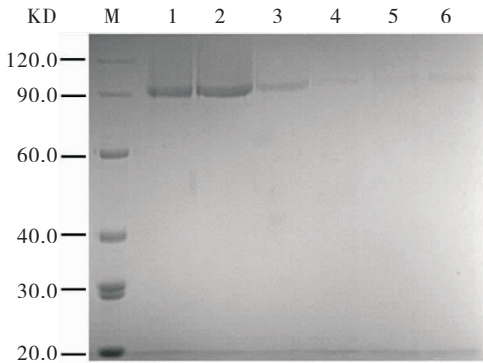


图6 重组蛋白果糖基转移酶 AoFT 的电泳图

Fig. 6 Electrophoretogram of the recombinant fructosyl transferase AoFT

咪唑洗脱样品,5 表示流出样品,6 表示上样样品.由图 6 可以看出,重组果糖基转移酶 AoFT 的纯度和浓度较高,分子量大小约为 90.0 KD.果糖基转移酶 AoFT 的纯化结果见表 1.由表 1 可知,重组毕赤酵母基因工程菌 pPICZαA-AoFT/X33 经诱导表达的粗酶液总蛋白质量为 164.0 mg,比活力为 5.9 U/mg;此粗酶液经硫酸铵盐析沉淀后,得到的总蛋白质量为 93.0 mg,比活力为 9.4 U/mg;再经镍柱亲和层析后,果糖基转移酶 AoFT 的比活力大幅提高至 71.4 U/mg,产率达 70.6%.

表 1 果糖基转移酶 AoFT 的纯化结果

Table 1 Purification of the fructosyl transferase AoFT

步骤	总蛋白质量/mg	总酶活/U	比活力/(U · mg ⁻¹)	纯化倍数	产率/%
粗酶液	164.0	973	5.9	1	100.0
硫酸铵盐析沉淀	93.0	874	9.4	1.6	89.8
镍柱亲和层析	9.6	687	71.4	12.1	70.6

2.4 果糖基转移酶 AoFT 的 PNGase F 酶切反应结果

PNGase F 几乎能水解糖蛋白中全部的 N-连聚糖^[20-21].经重组毕赤酵母工程菌 pPICZαA-AoFT/X33 表达的果糖基转移酶 AoFT 的分子量为 90.0 KD,而天然 AoFT 的分子量为 67.0 KD,据此可推测重组蛋白果糖基转移酶 AoFT 发生了翻译后的糖基化作用,因此需要通过 PNGase F 酶切反应^[22]来验证.果糖基转移酶 AoFT 的 PNGase F 酶切电泳图如图 7 所示,其中,M 表示 Marker,1 表示果糖基转移酶 AoFT,2 表示 PNGase F 酶切结果,3 表示 PNGase F.由图 7 可以看出,果糖基转移酶 AoFT 酶切后的分子量与天然状态下的果糖基转移酶 AoFT 的分子量相符,上述推测得以证实.

2.5 果糖基转移酶 AoFT 的酶学性质研究结果

2.5.1 最适反应温度与热稳定性

反应温度对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的

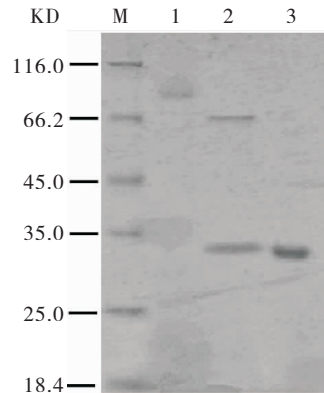


图7 果糖基转移酶 AoFT 的 PNGase F 酶切电泳图

Fig. 7 The enzyme digestion electrophoretogram of fructosyl transferase AoFT by PNGase F

影响如图 8 所示. 由图 8 可以看出,果糖基转移酶 AoFT 的最适反应温度为 45 °C,将该温度对应的相对酶活定义为 100%,当反应温度为 30 ~ 60 °C 时,相对酶活均保持良好. 果糖基转移酶 AoFT 的热稳定性如图 9 所示. 由图 9 可以看出,在 20 ~ 60 °C 温度范围内,处理 1 h 后的果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活均保持中上的水平,由此可知,AoFT 的热稳定性较好,反应温度范围较广.

2.5.2 最适 pH 缓冲体系与 pH 稳定性 pH 值对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响如图 10 所示. 由图 10 可以看出,当 pH 值在 4.5 ~ 7.0 范围内时,果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活较高,而醋酸钠缓冲液的 pH 值为 4.5 ~ 6.0,故最适 pH 缓冲体系为醋酸钠缓冲液. 果糖基转移酶 AoFT 的 pH 稳定性如图 11 所示. 由图 11 可以看出,当 pH 值为 4.0 ~ 7.0 时,果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活均较高,表明在该 pH 值范围内,果糖基转移酶 AoFT 的 pH 稳定性较高,由此可知,果糖基转移酶 AoFT 属于酸性酶,具有一定的耐酸性.

2.5.3 金属离子和 EDTA 对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

金属离子和 EDTA 对果糖基转移酶 AoFT

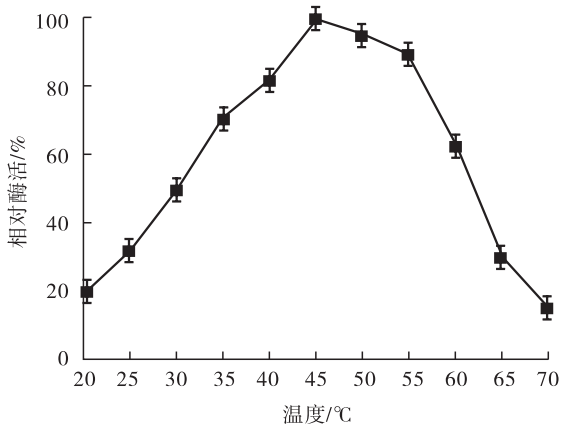


图 8 反应温度对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Fig. 8 Effect of reaction temperature on activity of fructosyl transferase AoFT

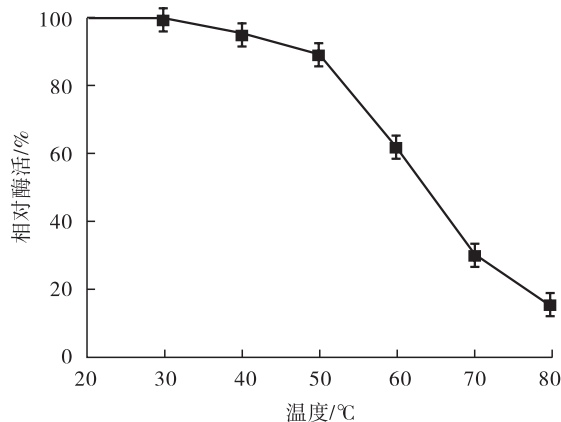


图 9 果糖基转移酶 AoFT 的热稳定性

Fig. 9 Thermal stability of the fructosyl transferase AoFT

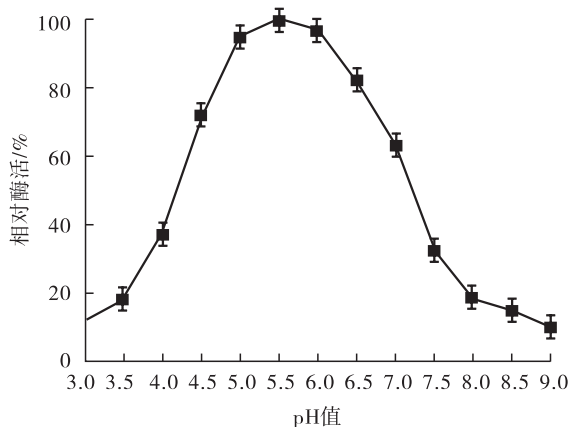


图 10 pH 值对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Fig. 10 Effect of pH value on the activity of fructosyl transferase AoFT

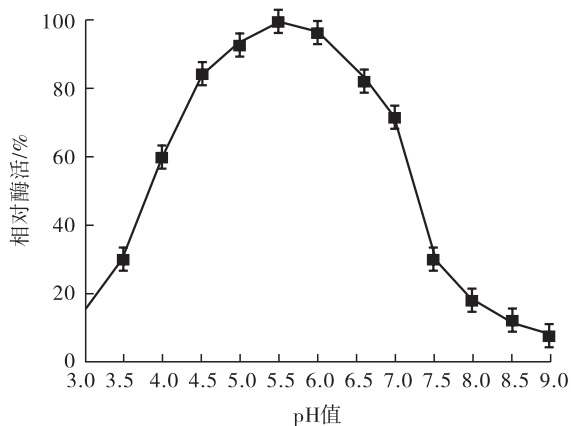


图 11 果糖基转移酶 AoFT 的 pH 稳定性

Fig. 11 pH stability of the fructosyl transferase AoFT

酶活性的影响见表2。由表2可知, Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 能够激活果糖基转移酶 AoFT, 使其相对酶活分别提高 21% 和 13%; Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} 和 Ni^{2+} 能够抑制果糖基转移酶 AoFT, 使其相对酶活分别降至原来的 23%, 43%, 72% 和 32%; EDTA 也能抑制果糖基转移酶 AoFT, 使其相对酶活降低 26%。

2.5.4 表面活性剂、还原剂和酶抑制剂对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性的影响

表面活性剂对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性的影响见表3。由表3可知, 不同体积分数的 SDS, Triton X-100 和吐温 20 对果糖基转移酶 AoFT 的相对酶活影响均较小, 表明果糖基转移酶 AoFT 对表面活性剂具有较强的抗性。还原剂和酶抑制剂对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性的影响见表4。由表4可知, 浓度分别为 0.5 mmol/L 和 5.0 mmol/L 的还原剂 DTT 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性均有抑制作用, 使其相对酶活分别降低 38% 和 76%; 低浓度(0.5 mmol/L) 酶抑制剂 PMSF 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性无显著影响, 但高浓度(5.0 mmol/L) 酶抑制剂 PMSF 可使果糖基转移酶 AoFT 的酶活性降低 25%。

表2 金属离子和 EDTA 对

果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ions and EDTA on the enzymatic activity of fructosyl transferase AoFT

实验组	浓度/(mmol · L ⁻¹)	相对酶活/%
对照	0	100
K ⁺	5	101 ± 2
Na ⁺	5	95 ± 3
Mg ²⁺	5	98 ± 3
Mn ²⁺	5	121 ± 5
Ca ²⁺	5	113 ± 5
Al ³⁺	5	23 ± 2
Zn ²⁺	5	43 ± 4
Fe ²⁺	5	72 ± 2
Ni ²⁺	5	32 ± 3
EDTA	5	74 ± 1

2.5.5 有机溶剂对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

有机溶剂对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响见表5。由表5可知, 甲醇、甲醛和氯仿能够

表3 表面活性剂对

果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Table 3 Effect of surfactants on the enzymatic activity of fructosyl transferase AoFT %

实验组	体积分数	
	1%	5%
对照	100	100
SDS	105	103
吐温 20	92	102
Triton X-100	83	96

表4 还原剂和酶抑制剂对

果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Table 4 Effect of reducing agents and inhibitors on the enzymatic activity of fructosyl transferase AoFT %

实验组	浓度	
	0.5 mmol/L	5.0 mmol/L
对照	100	100
DTT	62	24
PMSF	103	75

表5 有机溶剂对果糖基转移酶 AoFT 酶活性的影响

Table 5 Effect of organic solvents on the enzyme activity of the fructosyl transferase AoFT

实验组	体积分数/%	相对酶活/%
对照	—	100
甲醇	50	82 ± 2
乙醇	50	107 ± 4
丙酮	50	114 ± 3
二甲基亚砜	50	103 ± 3
二甲基甲酰胺	50	95 ± 5
正丁醇	50	92 ± 4
甲醛	50	62 ± 2
正己烷	50	102 ± 3
甲苯	50	93 ± 2
丙醇	50	113 ± 5
氯仿	50	73 ± 4

抑制果糖基转移酶 AoFT,其相对酶活分别降低了 18%、38% 和 27%;丙酮和丙醇能够激活果糖基转移酶 AoFT,其相对酶活分别提高了 14% 和 13%;而乙醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、正丁醇、正己烷和甲苯对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性的影响较小. 这表明果糖基转移酶 AoFT 对有机溶剂(乙醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、正丁醇、正己烷和甲苯)具有较强的抗性.

3 结论

本研究利用基因工程技术方法,将重组质粒 pPICZ α A-AoFT 经电转化导入毕赤酵母 X33 (*Pichia pastoris* X33) 中,构建了重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33,实现了果糖基转移酶 AoFT 在毕赤酵母中的表达,同时研究了纯化后的果糖基转移酶 AoFT 的酶学性质. 结果表明:重组毕赤酵母工程菌 pPICZ α A-AoFT/X33 随发酵时间的增加而快速繁殖,菌体 OD_{600} 值于发酵时长 120 h 时达到峰值,此时发酵液胞外总蛋白质量浓度为 1.64 mg/mL;纯化后的果糖基转移酶 AoFT 的比活力为 71.4 U/mg,产率达 70.6%;PNGase F 酶切反应证实纯化后的果糖基转移酶 AoFT 发生了 N-糖基化反应;果糖基转移酶 AoFT 的最适反应温度为 45 °C,最适缓冲体系为醋酸钠缓冲液(pH 值为 4.5 ~ 6.0);金属离子 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 对果糖基转移酶 AoFT 具有激活作用,而 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 对果糖基转移酶 AoFT 具有抑制作用;表面活性剂 SDS,吐温 20 和 Triton X-100 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性影响较小,还原剂 DTT 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性具有明显的抑制作用,低浓度的酶抑制剂 PMSF 对果糖基转移酶 AoFT 的酶活性无显著影响,但高浓度的酶抑制剂 PMSF 可使酶活性降低;果糖基转移酶 AoFT 对有机溶剂乙醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、正丁醇、正己烷和甲苯具有较强的抗性. 该研究

结果有望解决果糖基转移酶 AoFT 制备中存在的分离纯化较多、蛋白得率较低等问题,为低成本制备食品酶制剂提供一种新的思路,为食品酶技术和生物催化提供数据和参考.

参考文献:

- [1] 成纪予,王莹莹,黄悦刚. 三氯蔗糖的应用及其研究进展[J]. 杭州食品科技,2004(2):5.
- [2] 林洪,李华,李韶雄,等. 三氯蔗糖[J]. 精细与专用化学品,2002,10(18):26.
- [3] 董海. 三氯蔗糖的开发前景及研究现状[J]. 河南化工,2001(7):1.
- [4] 李斐卿. 蔗糖-6-乙酯的合成及发展前景[J]. 商情,2012(30):137.
- [5] 钱俊青,李尚谦,仲翔,等. 表面活性剂存在下两相体系酶法催化合成蔗糖-6-乙酯[J]. 食品科学技术学报,2015,33(4):22.
- [6] DUFF R B, FARMER V C. Identification of 6-O-acetyl-d-glucopyranose in *Bacillus megaterium* cultures; Synthesis of 6-O-acetyl-d-glucopyranose and 6-O-acetyl-d-galactopyranose [J]. *Biochemical Journal*, 1958, 70(3):515.
- [7] 毛多斌,刘国明,韩亚伟,等. 米曲霉果糖基转移酶催化合成蔗糖-6-乙酯[J]. 精细化工,2010(3):234.
- [8] MA X, YAO B, ZHENG W, et al. Comparative study on characterization of recombinant B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin (rLTB) prepared from *E. coli* and *P. Patoris* [J]. *Journal Microbiology & Biotechnology*, 2010, 20(3):550.
- [9] 范翠英,冯利兴,樊金玲,等. 重组蛋白表达系统的研究进展[J]. 生物技术,2012(2):77.
- [10] 高炳森,长孙东亭,罗素兰,等. 毕赤酵母表达体系中重组蛋白的分离纯化[J]. 生物技术通报,2009(3):33.
- [11] ALVARO-BENITO M, POLO A, GONZALEZ B, et al. Structural and kinetic analysis of *Schwan-*

- niomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(18):13930.
- [12] LAMMENS W, ROY K L, YUAN S G, et al. Crystal structure of 6-SST/6-SFT from *Pachysandra terminalis*, a plant fructan biosynthesizing enzyme in complex with its acceptor substrate 6-kestose[J]. Plant Journal, 2012, 70:205.
- [13] 王玉海, 岳娟, 王鹏, 等. 编码米曲霉果糖基转移酶基因在大肠杆菌中的重组表达[J]. 现代食品科技, 2014(9):67.
- [14] 李扬. 酵母 GS115 中镍柱亲和层析结合蛋白的鉴定[D]. 汕头: 汕头大学, 2013.
- [15] LAMBERTI A, SANGES C, LONGO O, et al. Analysis of nickel-binding peptides in a human hepidermoid cancer cell line by Ni-NTA affinity chromatography and mass spectrometry[J]. Protein & Peptide Letters, 2008, 15(10):1126.
- [16] PORATH J, OLIN B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions[J]. Biochemistry, 1983, 22(7):1621.
- [17] WEI T, YU X, WANG Y, et al. Purification and evaluation of the enzymatic properties of a novel fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae*: A potential biocatalyst for the synthesis of sucrose 6-acetate[J]. Biotechnol Lett, 2014, 36:1015.
- [18] WEI T, HUANG S, ZANG J, et al. Cloning, expression and characterization of a novel fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* ZZ-01 for the synthesis of sucrose 6-acetate[J]. Catalysts, 2016, 6(5):67.
- [19] 郑未未. 米曲霉果糖基转移酶 AoFT 基因的原核和真核表达及酶学性质研究[D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2016.
- [20] MALEY F, TRIMBLE R B, TARENTINO A L, et al. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases[J]. Analytical Biochemistry, 1989, 180(2):195.
- [21] PLUMMER T H, TARENTINO A L. Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*[J]. Glycobiology, 1991, 1(3):257.
- [22] 毛银平, 巩新, 唱韶红, 等. 过表达 N-糖基转移酶的糖基工程酵母构建[J]. 军事医学, 2015(8):602.