

生物工程

米曲霉果糖基转移酶催化合成蔗糖-6-乙酸酯

毛多斌, 刘国明, 韩亚伟, 杨雪鹏, 陈利平
(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 对来自于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的果糖基转移酶催化蔗糖 (s) 与葡萄糖-6-乙酸酯 (g-6-a) 生成蔗糖-6-乙酸酯 (s-6-a) 的反应进行了研究。考察了底物质量比 $m(\text{g-6-a}):m(\text{s})$ 、反应温度、反应时间、pH、酶的质量浓度对反应的影响。单因素实验结果表明, 最优的催化反应条件为: 反应温度 50 ℃、pH = 6.2、 $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 、反应时间 48 h、酶的质量浓度为 4.0 g/L。在该条件下, g-6-a 的摩尔转化率可达 26.69%。
关键词: 米曲霉; 蔗糖-6-乙酸酯; 果糖基转移酶; 生物工程
中图分类号: TQ033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2010)03-0234-04

Synthesis of Sucrose-6-acetate Catalyzed by Fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae*

MAO Duo-bin, LIU Guo-ming, HAN Ya-wei, YANG Xue-peng, CHEN Li-ping
(Zhengzhou University of Light Industry, School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract The synthesis reaction of sucrose-6-acetate (s-6-a) with sucrose (s) and glucose-6-acetate (g-6-a) catalyzed by fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* was investigated. The effects of mass ratio of reactants $m(\text{g-6-a}):m(\text{s})$, reaction temperature, reaction time, pH, mass concentration of enzyme on the reaction were examined. The one-factor experimental results showed that the optimum yield was obtained at 50 ℃, pH = 6.2, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$, reaction time 48 h and mass concentration of enzyme 4.0 g/L. On this condition the molar convert ratio of g-6-a was 26.69%.
Key words *Aspergillus oryzae*; sucrose-6-acetate; fructosyltransferase; biological engineering
Foundation item: Supported by National Natural Science Foundation of China (Project No. 20676127)

三氯蔗糖是迄今为止人类开发的一种最完美的强力甜味剂, 蔗糖-6-乙酸酯 (s-6-a) 是制备三氯蔗糖的重要中间体, s-6-a 的合成技术是制备三氯蔗糖的关键技术之一。目前, s-6-a 的合成方法包括化学方法和酶法两大类。化学法主要有原乙酸三乙酯法^[1], 二甲氧基乙烯法^[2], 二丁基氧化锡催化法^[3]等。但化学法对反应条件和分离设备提出了非常高的要求。因此, 在化学合成的基础上, 又发展了酶法合成。酶法合成的最大优点在于其高效专一性, 是化学合成法不可比拟的, 它具有广阔的应用前景。早在 1958 年, Duff 等^[4-5]就发现枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 发酵葡萄糖可以得到葡萄糖-6-乙酸酯 (g-6-a), 之后在果糖基转移酶的作用下从蔗糖 (s) 中转移果糖基形成 s-6-a 但产率偏低。后来从枯草杆菌

Subtilis NCIB 11871^[6]中分离得到一种特异性果糖转移酶可以专一地 将 g-6-a 转化为 s-6-a 产率高达 48%。
一直以来, 国内外研究人员从不同菌株中成功地分离出了果糖基转移酶, 如: 节杆菌、枯草杆菌、黑曲霉、出芽短梗霉等, 但从米曲霉中分离出果糖基转移酶则不多见。作者以实验室筛选出来的米曲霉 (*Asp. oryzae*) 果糖基转移酶为生物催化剂, 对 s 与 g-6-a 为底物反应生成 s-6-a 的条件进行了考察。
1 实验部分
1.1 试剂与仪器
米曲霉 (*Asp. oryzae*), 本课题组自制; 果糖基转移酶催化蔗糖 (质量分数 > 99.9%), AR, 购于

Sigma公司; α -6-a 标样 (质量分数 > 96%), 购自加拿大 TRC公司; α -6-a 购于郑州奥利实业公司; 葡萄糖、果糖标样 (质量分数 > 99.9%), 购于 Sigma公司; 蔗果三糖标样 (质量分数 > 96%), 购于 Sigma公司; 柠檬酸-磷酸缓冲液, 本课题组自制。

培英 HZQ-F160 全温振荡培养箱 (上海天呈科技有限公司); JOAN BR4i multifunction centrifuge 离心机 (Thermo Electron Co.); JY92-2D 型超声破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); MSC300 超滤杯 (上海摩速科学器材有限公司); Coolsafe 55-4 型冷冻干燥机 (丹麦 Scanlab 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养

将米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌体接种到查氏培养基中, 28℃ 生化培养箱里培养 24 h。挑取长势良好的单菌落, 接种到马铃薯液体培养基 (马铃薯培养基: 200 g 马铃薯煮沸 30 min 的滤出液, 定容至 1 L, 加入 8 g 葡萄糖, 自然 pH; 121.5℃、0.1 MPa 灭菌 20 min) 中, 170 r/min, 29℃ 恒温振荡培养 48 h。

1.2.2 粗酶的制备

收集菌悬液, 冰浴 30 min 于 4℃, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液和菌丝体。将菌丝体置于柠檬酸-磷酸缓冲液中, 进行后续的超声波破碎。经超声波破碎后, 于 4℃、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 即为胞内粗酶液。将粗酶液用截留分子质量为 30 kD 的超滤膜, 在氮气保护、冰浴条件下于超滤杯中进行超滤。滤后, 酶液-40℃ 预冻 12 h 后, 经冷冻干燥机处理制得干粉状粗酶。4℃ 保存备用。

1.2.3 粗酶酶活的定义

在反应温度 40℃, 柠檬酸-磷酸缓冲液 pH = 6.6 条件下, 每小时转化 1 μ mol α -6-a 所需的粗酶质量为一个活力单位。

1.2.4 反应体系条件

将不同质量比的反应物 α 和 α -6-a 溶于 2 mL 柠檬酸-磷酸缓冲液, 加入粗酶并在不同温度下, 恒温水浴摇床中反应。反应液 100℃ 煮沸 10 min 灭活酶终止反应。

1.2.5 检测与计算方法

检测仪器: Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 2424 ELS Detector。

分析条件: 色谱柱为 Waters Carbohydrate 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm), 流动相为 V(乙腈):V(水) = 75:25 流速 1.0 mL/min, 进样量 15 μ L, 柱温 30℃, 分析时间 40 min 对照品为 α -6-a 标准品。

计算方法: 从反应样品上样后的 HPLC 积分图谱中, 根据不同组分峰的积分面积, 用归一法计算出各个组分的质量分数, 设校正因子为 1。根据反应物 α -6-a 产物 α -6-a 的质量分数可计算得到理论和

实际所生成 α -6-a 的物质的量, 最终算出反应中 α -6-a 的摩尔转化率。公式如下:

$$\alpha\text{-6-a 的摩尔转化率} \% = \frac{n(\alpha\text{-6-a})_{\text{实验值}}}{n(\alpha\text{-6-a})_{\text{理论值}}} = \frac{w(\alpha\text{-6-a})M(\alpha\text{-6-a})}{w(\alpha\text{-6-a})M(\alpha\text{-6-a}) + w(\alpha\text{-6-a})M(\alpha\text{-6-a})} \times 100$$

其中, n : 物质的量; w : 质量分数; M : 摩尔质量。

2 结果与讨论

2.1 反应目标产物的鉴定

将蔗糖-6-乙酸酯、葡萄糖-6-乙酸酯、葡萄糖、果糖、蔗糖、蔗果三糖标准品配制成一定浓度的标准混合溶液 (溶剂为双蒸水), 进行高效液相色谱分析得到混合标样的 HPLC 标准图谱 (图 1)。将反应结束后的样品经过灭酶活、离心等前处理后, 用双蒸水稀释 100 倍后进行高效液相色谱分析得到反应样品的 HPLC 图谱 (图 2)。

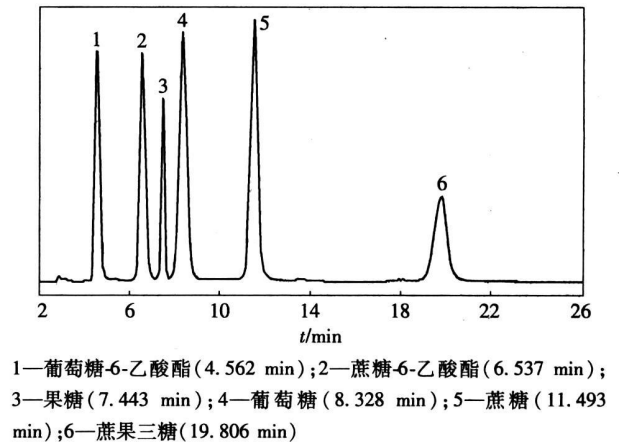


图 1 混合标样的 HPLC 标准图谱
Fig. 1 HPLC of the mixed standard sample

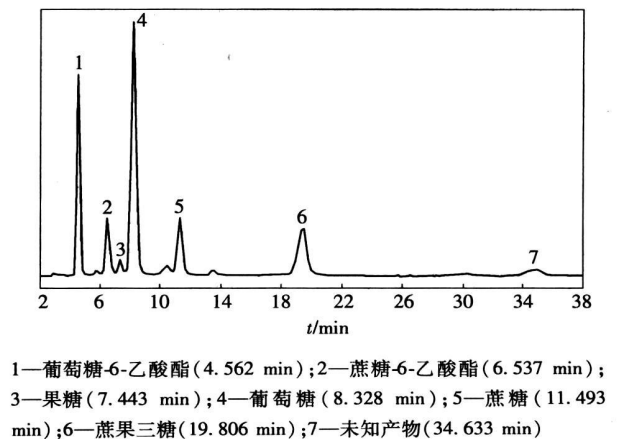
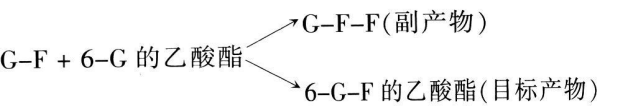


图 2 反应后样品 HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC of the reacted sample

由图 1 可知, 色谱峰 1 葡萄糖-6-乙酸酯标样的保留时间为 4.562 min, 峰 2 蔗糖-6-乙酸酯标样的保留时间为 6.537 min, 峰 3 果糖标样的保留时间为

7.443 min 峰 4 葡萄糖标样的保留时间为 8.328 min 峰 5 蔗糖标样的保留时间为 11.493 min 峰 6 蔗糖三糖标样的保留时间为 19.806 min。在相同色谱条件下,图 2 中色谱峰 1~6 的保留时间分别与图 1 中标样色谱峰 1~6 一致,证明反应后样品中存在葡萄糖-6-乙酸钠、蔗糖-6-乙酸钠、果糖、葡萄糖、蔗糖、蔗糖三糖以及一种未知产物。其中,葡萄糖-6-乙酸钠和蔗糖为未反应完的反应物,果糖和葡萄糖为蔗糖水解产物,蔗糖-6-乙酸钠为目标产物,蔗糖三糖和未知产物为竞争产物。其反应过程可表达为:



2.2 反应时间对反应的影响

在缓冲液 pH = 6.6, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 酶质量浓度 1.5 g/L, 40 °C 的条件下,考察不同反应时间对反应的影响,以 g-6-a 的摩尔转化率为指标,结果见图 3。当反应时间在 12~48 h 时,反应物 g-6-a 的摩尔转化率逐渐上升。当反应时间超过 48 h 后, g-6-a 的摩尔转化率在极小范围内上下波动,并在反应 60 h 时达到最大值,但考虑到生产效率等因素,最适反应时间取 48 h。

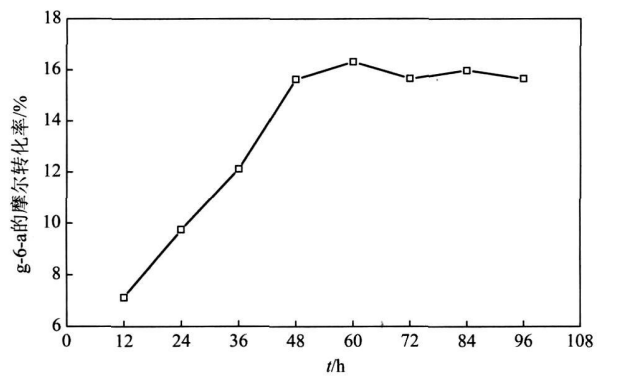


图 3 反应时间对反应的影响

Fig 3 Effect of reaction time on the reaction

2.3 pH 对反应的影响

在反应时间 48 h, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 酶质量浓度 1.5 g/L, 40 °C 条件下,考察了不同缓冲液 pH 对反应的影响,结果见图 4。随着缓冲液 pH 的增大, g-6-a 的摩尔转化率总体波动幅度不大。在 pH = 6.2 时, g-6-a 的摩尔转化率达最高值 13.14%。

2.4 反应物质量比对反应的影响

在缓冲液 pH = 6.6, 酶质量浓度 1.5 g/L, 40 °C、反应 48 h 条件下,考察了不同反应物质量比对反应的影响,结果见图 5。当反应物质量比逐渐增大时(即从 s 过量逐渐变为 g-6-a 过量), g-6-a 的摩

尔转化率显著降低, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 时转化率最高达 14.50%。此结果与郑建仙^[7]等人的研究结果相近。

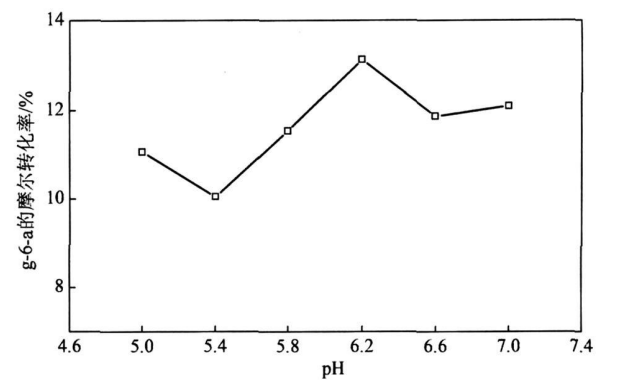


图 4 pH 对反应的影响

Fig. 4 Effect of pH on the reaction

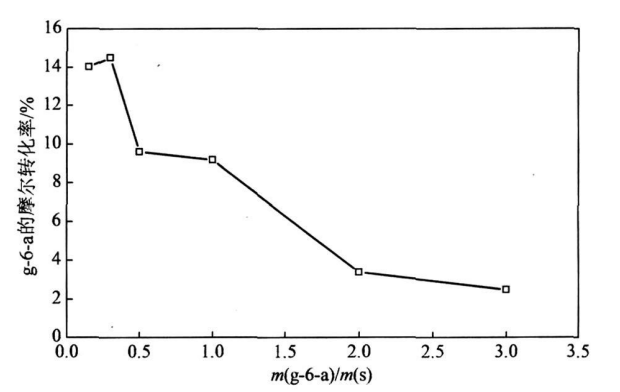


图 5 反应物质量比对反应的影响

Fig. 5 Effect of the mass ratio of reactants on the reaction

2.5 酶质量浓度对反应的影响

在缓冲液 pH = 6.6, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 反应温度 40 °C、反应时间 48 h 的条件下,考察了不同酶质量浓度对反应的影响,结果见图 6。

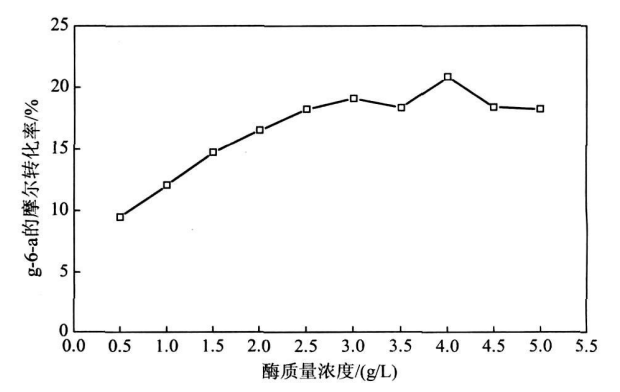


图 6 酶质量浓度对反应的影响

Fig 6 Effect of mass concentration of enzyme on the reaction

随着酶质量浓度的提高,在酶质量浓度为 0.5 g/L 时, g-6-a 的摩尔转化率不断提高,当酶质量

浓度为 3~ 5 g/L 时, g-6-a 的摩尔转化率则是先降后升再降并最终趋于平缓。当酶质量浓度为 4.0 g/L 时, g-6-a 的摩尔转化率达最高值 20.89%。

2.6 反应温度对反应的影响

在缓冲液 pH = 6.2, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 反应时间 48 h 酶质量浓度为 2.5 g/L 的条件下, 考察了不同反应温度对反应的影响, 结果见图 7。当反应温度低于 50℃ 时, 随着反应温度的升高, g-6-a 的摩尔转化率呈现波浪式的上升趋势——先升后降, 然后显著上升; 当反应温度高于 50℃ 后, g-6-a 的摩尔转化率显著降低至 10% 左右且趋于平缓。可能是过高的反应温度使得大部分的酶变性失活所致。此酶在 45~ 50℃ 内活性较好, 最适反应温度取 50℃。

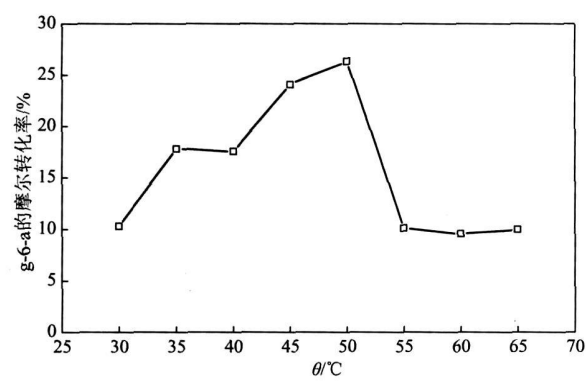


图 7 反应温度对反应的影响

Fig. 7 Effect of reaction temperature on the reaction

3 结论

从各个影响因素来看, 反应时间、酶质量浓度、物料质量比和反应温度四因素对反应的影响较为明显, 而缓冲液 pH 对反应的影响较小, 属于非显著因素。实验结果表明, 反应的最优条件为反应时间 48 h 酶质量浓度 4.0 g/L、缓冲液 pH = 6.2, $m(\text{g-6-a}):m(\text{s}) = 1:3$ 反应温度 50℃, 在此条件下 g-6-a 的摩尔转化率可达 26.69%。

实验过程中所使用的为米曲霉 (*Asp. oryzae*) 果糖基转移酶粗酶。虽然众多文献^[8-13]报道纯酶的活性要比粗酶高, 但对于工业化生产来说粗酶更具优势^[14], 因为粗酶更易于使用且更为经济, 而获得纯酶需要进行一系列纯化工作, 如: 超滤、离子交换柱层析等, 经济成本大幅提高。经初步纯化后, 酶活并未明显提高, 因此从实验实际情况与经济等方面综合考虑后, 此实验过程使用粗酶。

反应过程中, 葡萄糖-6-乙酯在果糖基转移酶的作用下, 以 1[→]2 糖苷键的形式连接上果糖残基生成蔗糖-6-乙酯。利用此酶高效的专一性催化合成蔗糖-6-乙酯是化学合成方法不可比拟的, 同时也为蔗糖酯类的合成提供了思路和途径, 具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Philip J S. Sucrose alkyl 4-6-orthoacylates [P]. US: 4889928, 1989-03-13.

[2] Khan R A, Smith K, Peter A. Process for the preparation of sucrose-6-esters [P]. US: 5440026, 1995-08-08.

[3] Navia Juan L. Process for synthesizing sucrose derivatives by regioselective reaction [P]. US: 4950746, 1990-08-21.

[4] Duff R, Farmer V C. Identification of 6-O-acetyl- α -glucopyranose in *Bacillus megaterium* cultures synthesis of 6-O-acetyl-D-glucopyranose and 6-O-acetyl-D-galactopyranose [J]. *Biochem*, 1958, 70: 515-520.

[5] Duff R, Wobley D M. Metabolism of 6-O-acetyl-D-glucopyranose and other monacetylsugars by strains of *Bacillus megaterium* and other soil organism [J]. *Biochem*, 1958, 70: 520-528.

[6] Rathbone Hacking Cheetham, et al. Novel fructosyltransferase process for the preparation of fructosyl disaccharides and a novel habsucrose [P]. EP: 0130054B1, 1990-03-07.

[7] 郑建仙, 高宛枫, 袁东, 等. 双酶-化学联合法制备三氯蔗糖的探索 [J]. *冷饮与速冻食品工业*, 2002, 8(3): 7-9, 16.

[8] Norio Shim i. Purification and characterization of 6'-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. *Carbohydr Res* 1981, 96: 281-292.

[9] Norio Shim i. Purification and characterization of 1'-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. *Carbohydr Res* 1982, 99: 157-169.

[10] Norio Shim i, Hiroki Kido, Shuhachi Kiriya. Purification and properties of sucrose sucrose 1'- β -fructofuranosylase in onion seeds [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(4): 695-698.

[11] Lania L'Hocine, Wang Zhang, Jiang Bq, et al. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023 [J]. *J Biotechnol* 2000, 81: 73-84.

[12] Sacha A F T van Hijum, Kees Bonting, Marc J E C van der Maarel, et al. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 205: 323-328.

[13] Inaj Ghazi, Lucia Fernandez Arnoja, Humberto Garcia Mellana, et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* [J]. *J Biotechnol* 2007, 128: 204-211.

[14] Jun Yoshikawa, Seigo Amachi, Hirofumi Shinoyama, et al. Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosylase from *Aureobasidium pullulans* [J]. *Biotechnol Lett* 2008, 30: 535-539.