

α -转移葡萄糖苷酶粗酶液的酶学性质

毕金峰¹, 魏宝东²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所 农业部农业核技术与农产品加工重点实验室, 北京 100094;

2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 用实验室制备的 α -转移葡萄糖苷酶粗酶液进行酶反应, 反应至一定时间后, 生成较高含量的低聚异麦芽糖。该粗酶液的最适 pH 值为 5.0, 最适反应温度为 55℃, 不同金属离子对粗酶液酶活的影响不同。正交试验确定粗酶液的最佳反应 pH 值为 5.15, 温度为 55℃, 反应时间为 3h。

关键词: α -转移葡萄糖苷酶; 粗酶; 性质

The Impurified Enzyme Properties of Alpha-transglucosidase

BI Jin-feng¹, WEI Bao-dong²

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology and Agro-Food Processing of MOA, Beijing 100094, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: There was a high isomaltooligosaccharide concentration in reaction solution after a period of catalytic reaction by impurified enzyme of α -transglucosidase. The optimum pH value and temperature of the impurified enzyme were 5.0 and 55℃ respectively. The effect of different metal ions on enzyme activity was different. The results of orthogonal experiment showed that the optimum catalytic reaction conditions were pH 5.15, 55℃ and 3h (reaction time).

Key words: α -transglucosidase; coarse enzyme; property

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0075-04

α -转移葡萄糖苷酶(α -transglucosidase E.C.2.4.1.24)又称 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase E.C.3.2.1.20), 它可以从低聚糖类底物的非还原性末端切开 α -1,4糖苷键, 释放出葡萄糖, 或将游离出的葡萄糖残基以 α -1,6糖苷键转移到另一个糖类底物上, 从而得到非发酵性的低聚异麦芽糖(以下简称IMO, 主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等)、糖脂或糖肽等。该酶既具有水解能力, 又具有转移能力, 故对其命名说法不一^[1~4]。 α -转移葡萄糖苷酶在自然界中分布广泛, 种类繁多, 性质各异, 几乎存在于所有生物体内, 在人类的糖原降解及动物、植物和微生物的糖类代谢方面具有重要的生理功能。它作为工业化生产IMO的关键酶制剂备受国内外食品工业界的重视。与日本相比, 我国的研究工作还处于起步阶段, 主要集中在 α -转移葡萄糖苷酶生产菌株的筛选方面, 对于其性质、化学结构、催化机制等方面的报道较少。目前, 国外生产的 α -转移葡萄糖苷酶大部分为纯酶, 国内研究主要以粗酶液为主^[5~8]。

通过对实验室制备的 α -转移葡萄糖苷酶粗酶液的酶学性质研究, 可为该酶分离提纯, 探讨其最佳催化条件, 降低IMO的生产成本提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶制剂: α -转移葡萄糖苷酶粗酶液(以下简称U酶, 为试验室所选育的一株曲霉菌株在最佳培养条件下生长、在最适条件下制取的酶液)。

1.1.2 纯品麦芽糖: 上海生工生物工程有限公司, AMRESCO分装。

1.1.3 纸层析显色剂: 显色剂A为二苯胺, 称4g溶于100ml丙酮中; 显色剂B为苯胺, 吸4ml溶于100ml丙酮中, A+B+20ml 85%磷酸混合而成, 该显色剂现用现配。

1.2 试验方法

收稿日期: 2003-09-04

作者简介: 毕金峰(1970-), 男, 副教授, 博士后, 主要从事食品化学与生物技术研究。

1.2.1 相对酶活测定方法

国际酶学委员会规定：在一定条件下(pH 值、温度、离子强度等)，1min 内将 $1\mu\text{g}$ 分子的底物转化为产物的酶量定为一个国际单位(I.U.)。本试验用直接滴定法测定 α -转移葡萄糖苷酶作用于一定浓度的底物(麦芽糖)生成产物还原糖的量，用消耗反应液体积来间接反映 α -转移葡萄糖苷酶的酶活，即相对酶活。通过试验证明用直接滴定法测还原糖所消耗的酶反应液体积来反映酶活与定量测定结果趋势一致。可以说明消耗的反应液体积越多，反应液中还原糖含量越低，则在单位时间内 α -转移葡萄糖苷酶水解底物(麦芽糖)的能力越差，即相对酶活越低；反之相对酶活越高。

1.2.2 还原糖测定方法 直接滴定法。

1.2.3 纸层析法

点样量为 $1.5\mu\text{l}$ 。展开剂为正丁醇:吡啶:水 = 6:4:3；层析条件：在室温条件下，上行展开 12~15h，风干后再展开一次；显色条件为 $70\sim 80^\circ\text{C}$ 烘箱中烘烤 5~10min。

2 结果与分析

2.1 U 酶反应时间试验

吸取 4ml 20% 麦芽糖，加入 4ml pH5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液，在 55°C 条件下保温 5min 后，加入 U 酶液 4ml 进行酶反应，分别在不同反应时间灭酶，测定相对酶活，结果见图 1。可见 U 酶在反应 6h 后，耗糖体积变化不显著。从纸层析结果也可看出，产物中只含有大量葡萄糖和少量异麦芽糖。该酶在反应 1h 时麦芽糖已基本消失。测定酶活力一般应在反应初速度时间内，确定 1h 为酶反应时间，进行其它酶学性质研究。

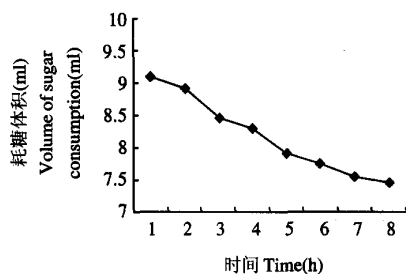


图 1 U 酶反应时间曲线

Fig. 1 Curves of reaction time of enzyme U

2.2 底物浓度对酶活力的影响

本试验以底物浓度一定，通过改变反应酶液浓度的方法来间接衡量底物浓度对该酶活力的影响。按表 1 配制酶反应液。

表 1 酶反应液组成 (ml)

Table 1 Composition of reaction solution (ml)

处理号 Treatments	1	2	3	4	5	6
20% 麦芽糖 20% Maltose	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
U 酶液 Enzyme U	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
HAc-NaAc	2.75	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5

按相对酶活测定方法测定酶活，结果见图 2。说明麦芽糖底物量一定时，酶浓度越低，产物中还原糖量越少，当加酶量 $\geq 2.0\text{ml}$ (5 号处理) 以后，酶量再增加对产物中还原糖量的多少影响不大。在此条件下，确定加入 1~2ml 的 U 酶液较为合适。

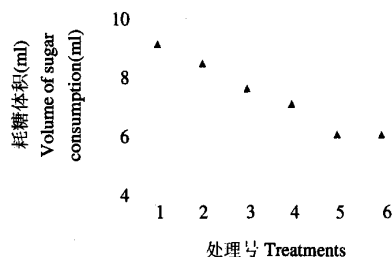


图 2 底物浓度对相对酶活的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on relative enzyme activity

2.3 最适温度

取若干试管，各加入 1ml 20% 麦芽糖和 1ml pH 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲液，分别在不同的温度下保温 5min 后，再各加入 U 酶液 1ml，反应 1h 后灭酶，测糖，结果见图 3。表明 U 酶的最适温度为 55°C 、 65°C 时酶活降低， 75°C 时酶已经失活。

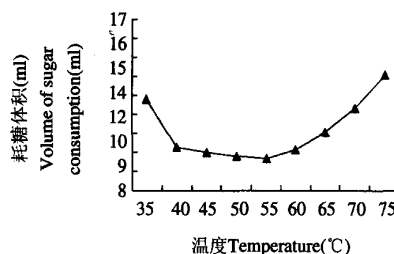


图 3 U 酶的最适温度

Fig. 3 Optimum temperature for enzyme U

2.4 温度稳定性

吸取 U 酶液若干份，分别在不同温度下保温 0.5h 和 1.0h，冷却至室温，从中吸取 1ml 作为新的反应酶液，测定相对酶活。用不进行温度处理的待测酶液作对照(25°C)，结果见图 4。可见经过高温处理，酶活均有不同程度的损失。保温时间越长，酶活损失越多。

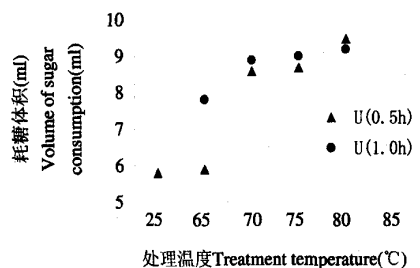


图4 U酶的温度稳定性
Fig.4 The temperature stability of enzyme U

2.5 最适 pH 值

用 U 酶液在不同 pH 值的缓冲液中进行催化底物反应，测定相对酶活，结果见图 5。并分别进行点样纸层析，结果见图 6。可见 U 酶最适 pH 值为 5.0。纸层析结果也非常明显，pH4.0~5.0 时，麦芽糖水解彻底，pH7.0~8.0 时，酶活降低，产物中麦芽糖层析点较大。

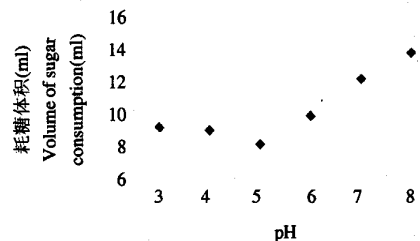
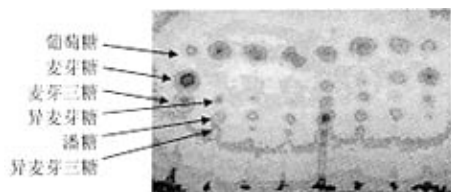


图5 U酶的最适 pH 值
Fig.5 Optimum pH value for enzyme U



注：由左至右为 CK、pH3、pH4、pH5、CK₁₀₀₋₅₀、pH6、pH7、pH8 条件下处理反应的结果。

图6 U酶最适 pH 值反应纸色谱

Fig.6 Paper chromatogram on reaction of optimum pH value for enzyme U

2.6 pH 值稳定性

U 酶液用不同 pH 值的缓冲液提取制得，再进行不同处理的酶反应试验，结果见图 7。可知该酶在 pH2.0~6.0 条件下具有较高稳定性，pH 值 7.0、8.0 时酶活力有一定程度的下降。

2.7 金属离子对酶活的影响

本试验选择六种离子对 α - 转移葡萄糖苷酶粗酶液的激活与抑制作用进行研究。取某种激活剂或抑制剂，

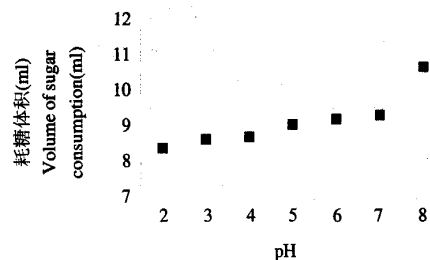


图7 U酶的 pH 值稳定性
Fig.7 pH value stability of enzyme U

用 U 酶液配成 3、5、7、9、15、20 μmol/L 不同浓度的金属离子 - 酶溶液，在室温下放置 1h，再作为待测酶液，测定相对酶活。对照(CK)为未处理的 U 酶液在同一条件下进行反应，测定结果见表 2。看出不同浓度金属离子对酶活的影响不同，Cu²⁺、Al³⁺、Fe³⁺、Mg²⁺对 U 酶有一定的激活作用，Co²⁺、Ag⁺略有抑制作用。

表2 金属离子对 U 酶相对酶活的影响(耗糖体积: ml)

Table 2 Effect of metal ions on relative activity of enzyme U (ml)

金属离子 Metal ions	浓度(μmol/L)Concentration						CK
	3	5	7	9	15	20	
Mg ²⁺	4.28	4.23	4.35	4.20	4.43	4.44	4.43
Co ²⁺	4.45	4.58	4.63	4.50	4.63	4.60	4.43
Cu ²⁺	5.58	6.08	6.20	5.87	6.17	6.35	6.73
Al ³⁺	4.35	4.37	4.33	4.23	4.10	4.38	4.40
Fe ³⁺	4.63	4.55	4.53	4.53	4.52	4.33	5.05
Ag ⁺	4.50	4.49	4.60	4.57	4.54	4.78	4.43

2.8 正交试验

选择反应时间、温度、pH 值三个主要因素对酶活力的影响进行正交试验，设计见表 3，按常规方法测定相对酶活，统计分析结果见表 4。

由表 4 可知，U 酶的影响因素是 pH 值>时间>温度，最佳处理为 A₃B₂C₂，即反应时间为 3h，温度为 55℃，pH 值为 5.15。

3 结 论

表3 正交因素水平表

Table 3 Factors and levels designed in orthogonal experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	1	2	3
时间 Time(h)	1	2	3
温度 Temperature(°C)	50	55	60
pH 值 pH value	4.15	5.15	6.15

注：pH5.15 为原酶液的 pH 值。

表4 U酶反应试验设计及结果统计分析表

Table 4 Table of experimental design and statistics analysis on enzyme U

处理号 Serial number of treatment	时间(h) Time	温度(°C) Temperature	pH 值 pH value	耗糖体积(ml) Volume of sugar consumption(ml)
1	1(1)	50(1)	4.15(1)	10.03
2	1(1)	55(2)	5.15(2)	9.30
3	1(1)	60(3)	6.15(3)	11.35
4	2(2)	50(1)	5.15(2)	9.30
5	2(2)	55(2)	6.15(3)	9.98
6	2(2)	60(3)	4.15(1)	8.50
7	3(3)	50(1)	6.15(3)	10.25
8	3(3)	55(2)	4.15(1)	8.50
9	3(3)	60(3)	5.15(2)	8.35
K ₁	30.70	29.58	27.02	
K ₂	27.77	27.75	26.93	
K ₃	27.10	28.20	31.58	
k ₁	10.22	9.86	9.01	
k ₂	9.26	9.25	8.93	
k ₃	9.03	9.40	10.53	
R	1.19	0.61	1.60	

酶学性质研究表明, U酶的最适 pH 值为 5.0, 在偏酸性环境中酶活力损失较小, 在中性、偏碱性条件下不利于酶活的保持。U酶的最适温度为 55℃, 在 75℃时失活。 α -转移葡萄糖苷酶属于键专一性酶, 具有广泛的底物专一性。不同金属离子对酶活的影响不同。正交试验确定 U酶的最佳反应时间为 3h, 温度为 55℃, pH 值为 5.15。

参考文献:

- [1] Ganghofner D, Kellermann J, Staudenbauer W L, et al. Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and an alphasglucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62(2): 302-308.
- [2] Krohn B M, Lindsay J A. Purification and characterization of a thermostable alpha-glucosidase from a *Bacillus subtilis* high-temperature growth transformant[J]. *Current Microbiology*, 1991, 22(4): 273-278.
- [3] Kow Jen Duan, Dey Chyi Sheu, Ming Tse Lin, et al. Reaction mechanism of isomaltooligosaccharides synthesis by alpha-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*[J]. *Biotechnology Letters*, 1994, 16(11): 1151-1156.
- [4] Kita A, Matsui H, Somoto A, et al. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1992, 55(9): 2327-2335.
- [5] 金其荣, 王晓晴. α -葡萄糖苷酶的初步研究及其在异麦芽低聚糖浆生产中的应用[J]. *食品科学*, 1995, 16(4): 20-24.
- [6] 岳振峰, 陈小霞, 彭志英. α -葡萄糖苷酶研究现状及进展[J]. *食品与发酵工业*, 2000, 26(3): 63-67.
- [7] 陈必成, 扈芝香. 转移葡萄糖苷酶(transglucosidase E.C.2.4.1.24)生产异麦芽糖的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1999, 25(4): 1-4.
- [8] 岳振峰, 彭志英, 郑卫平. 固定化酶法生产低聚异麦芽糖的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(3): 6-9.

信息

英研究人员称豆腐将成为外科修复材料新宠

据海外媒体报道, 英国研究人员称, 深受素食主义者喜爱的豆腐不久将被用来帮助患者恢复受损的骨骼和组织。

现在, 英国国家科学、技术与艺术捐赠基金委员会已增加 30 万美元的投入, 对以豆腐为主要成分的生物材料进行研究。负责此项研究的是布赖顿大学的马泰奥·桑廷博士。

目前, 许多用于组织再生的材料是用动物提取的, 这些材料成本高昂, 并且还可能会传播疾病。而脱脂豆腐则源于成本低廉的天然产品, 它可以促进新骨骼的生长, 并且完全可以实现生物降解。

豆腐富含蛋白质, 因此常常被素食主义者用以代替肉食。研究人员希望, 以豆腐为主要成分的生物材料能够促进人体在外科手术后迅速恢复。他们说, 牙科医生能够利用这种材料治疗牙周病, 因为它可以使受损或植入的牙齿周围的骨骼实现再生。除可充当骨骼填充物外, 这种生物材料还可以用在伤口包扎等其它方面。

现在, 有了英国国家科学、技术与艺术捐赠基金委员会提供的资金, 研究人员将与专业的医疗人员共同工作, 为外科手术研制出具有针对性的各种制剂。