嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

果糖轉移酵素特性分析研究
(分析方法的建立)

計畫類別： ☒個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號： CNBT94-10

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

計畫主持人： 張竣凱

共同主持人： 江建民

計畫參與人員：謝智宇、謝宜祐

執行單位： 嘉南藥理科技大學 生物科技系

中華民國九十五年二月二十七日

摘要

本計畫的目的是建立以 HPLC 及 TLC 之快速分析技術，來分析果糖轉移酵素的活性與功能。實驗的結果顯示：由 TLC 的方法，可以檢定反應液是否含有三糖或是四糖，可快速確認具有酵素活性的部份或是成功的轉殖株；由 HPLC 的方法，可以定出反應液中葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、蔗果四糖的含量，使我們可以據此來分析反應速率。本計畫已完成方法的建立。

前言

果糖轉移酵素是主要參與轉移反應的酵素，它將蔗糖中果糖與葡萄糖之糖苷鍵切斷，然後轉移果糖到另一個蔗糖分子上形成蔗果三糖(GF_2, 1-kestose)，或是轉移到蔗果三糖上形成蔗果四糖(GF_3, nystose)，或是轉移到蔗果四糖上形成蔗果五糖(GF5, 1^F-β-fructofuranosyl nystose)。在植物中主要為 SST, SFT, FFT 等(Ritsema and Smeekens, 2003; NCBI)，其轉移作用可以形成巨大的聚果糖，分子之糖單元可達數百至數千；而來自微生物的有 *Lactobacillus*, (Van Hijum et al., 2002)、*Streptococcus* (Ajdic et al., 2002)、以及 *Aspergillus* (Hidaka, et al., 1988; Rehm, et al., 1998; Heyer and Wendenburg, 2001)等，可得到的寡糖之糖分子單元都在六以內。雖然有許多的酵素被找到(102 genes and 114 proteins from NCBI database)，但是這個酵素是如何進行果糖轉移的機制並不清楚，目前也尚未有蛋白質結構被發表。我們期望能夠自麴菌或是轉殖的大腸菌中獲得這個轉糖酵素，因此，有必要建立起快速的分析方法，來檢測酵素的活性。

我們這個計劃的目的，是建立 TLC(薄層色層分析)及 HPLC(高效液相層析)的方法，快速檢測這個酵素的活性，以利將來純化這個酵素。

實驗材料與方法

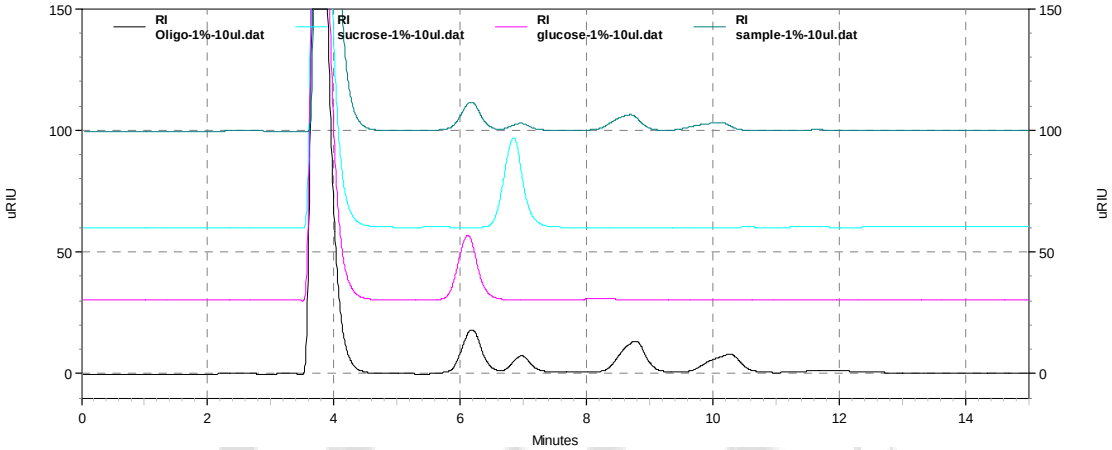
TLC 檢測寡糖參考 Su 等人及 Hirayama 等人的方法(Hirayama, et al., 1989; Su, et al., 1990)，以 Silica 60 F254 板 (Merck) 進行，展開液為丙酮/水(87/13,v/v)，展開二次，再以 甲醇/硫酸/水 (3/6/1, v/v/v)來呈色。

HPLC 的固定相採 $5NH_2$-MS 管柱(Nacalai Tesque, Japan)，移動相以 乙腈/水 (80/20,v/v)，管柱溫度設於 40℃，偵檢器採用 RI 偵檢器 (Hitachi, Japan)。

結果與討論

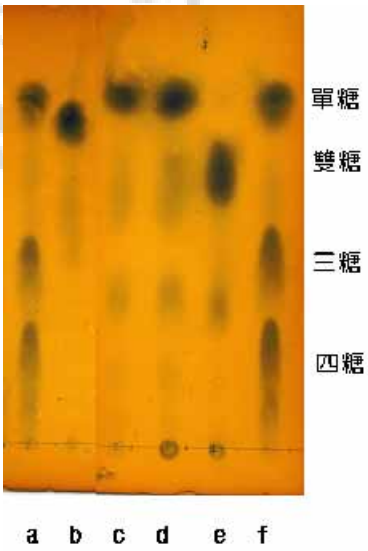
在本計畫中，我們已建立了 TLC 及 HPLC 的快速檢測方法，有利於酵素的純化實驗繼續進行。

圖一為利用 HPLC 來測測酵素反應，可以明顯測得葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、蔗果四糖。並可利用面積來定量。



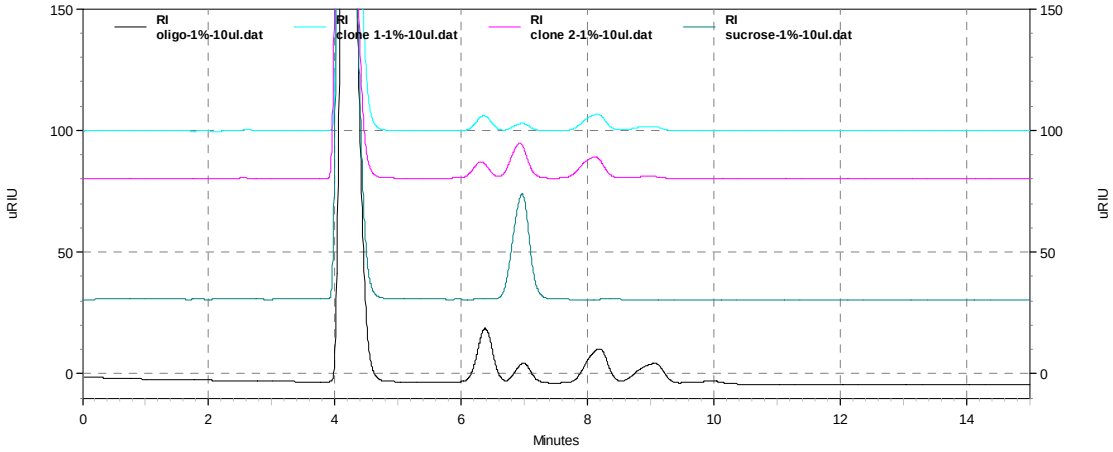
圖一、利用 HPLC 檢測酵素活性，由下而上分別是 果寡糖標準液、葡萄糖、蔗糖、及麴菌酵素反應液。

圖二為 TLC 的快速檢測，可以快速確認糖轉移酵素的反應。



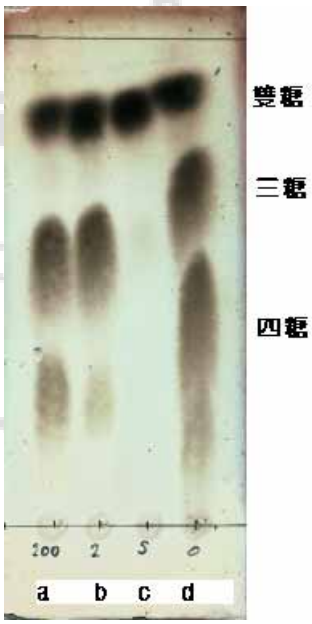
圖二、利用 TLC 檢測酵素反應，a:麴菌酵素反應、b:蔗糖、c:葡萄糖、d:果糖、e:麥芽糖、f:果寡糖標準液

圖三是利用建立的 HPLC 方法來檢測基因轉殖的大腸菌是否具有糖轉移酵素活性。



圖三、利用 HPLC 檢測酵素活性。由下而上分別是 果寡糖標準液、蔗糖、轉殖株 2ml 以 IPTC 引發表達後反應及轉殖株 200ml 以 IPTC 引發表達後反應。

圖四為利用 TLC 方法對轉殖株進行反應檢測。



圖四、利用 TLC 檢測酵素反應，a:轉殖株 200ml 以 IPTC 引發表達後反應、b: 轉殖株 2ml 以 IPTC 引發表達後反應、c:蔗糖、d:果寡糖標準液。

在這個研究中，二位專題學生學習了如何先建立檢測方法的技術，並利用建立的方法檢測酵素活性。

參考資料

1. Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003) “Fructans, beneficial for plants and humans” *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 223-230.

2. Van Hijum, S.A.F.T., Van Geel-Schutten,G.H., Rahaoui,H., Van Der Maarel,M.J.E.C. and Dijkhuizen,L. (2002) “Characterization of a Novel Fructosyltransferase from Lactobacillus reuteri That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides” *Appl. Environ. Microbiol*. 68 (9), 4390-4398.
3. Ajdic,D., McShan,W.M., McLaughlin,R.E., Savic,G., Chang,J., Carson,M.B., Primeaux,C., Tian,R., Kenton,S., Jia,H., Lin,S., Qian,Y., Li,S., Zhu,H., Najar,F., Lai,H., White,J., Roe,B.A. and Ferretti,J.J. (2002) “Genome sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (22), 14434-14439.
4. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. (1988) “A fructooligosaccharide-producing enzyme from I*aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* 52(5), 1181-1187.
5. Heyer,A.G. and Wendenburg,R. (2001) “Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of Aspergillus sydowi IAM 2544” *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 363-370.
6. Hirayama, M., Sumi, N. and Hidaka, H. (1989) “Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* 53(3), 667-673.
7. Su, Y.-C., Sheu, C.-S., Chien, J.-Y. and Ma, K.-K. (1990) “Isolation and Identification of microorganisms capable of producing b-fructofuranosidase with transfructosylating activity” *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* 14(2), 114-121.