

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT9502

計畫名稱：果糖轉移酵素的基因轉殖、作用機制與應用研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

計畫主持人：江建民

計畫參與人員：謝智宇、蔡東益、陳怡靜、謝宜祐

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系

中華民國96年3月8日

摘要

本計畫我們自一株具果糖轉移能力的麴菌醱酵液中純化酵素，經由離子交換及分子篩層析，我們獲得部份純化的酵素。SDS-PAGE 電泳分析得知其分子量約為 103 KDa。使用 PNGase 對其去除 N-醣基後，酵素仍保有活性，分子量約為 90 KDa。利用經 PNGase 處理過的酵素，比對其活性及對溫度的穩定性，發現其並不會明顯影響活性及穩定度。

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(GF₂, 1-kestose)，或是轉移到蔗果三糖上形成蔗果四糖(GF₃, nystose)，或是轉移到蔗果四糖上形成蔗果五糖(GF₅, 1^F-β-fructofuranosyl nystose)。這類的酵素廣泛存在於植物及微生物中。在植物中主要為 1-SST (sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase, EC 2.4.1.99), 1-FFT (fructan : fructan 1-fructosyltransferase, EC 2.4.1.100)等 [Ritsema and Smeekens, 2003; NCBI]，其轉移作用可以形成巨大的聚果糖產物，分子之糖單元可達數百至數千；而來自微生物的為β-FTase (β-fructosyltransferase, EC 2.4.1.9)，生產的微生物有 *Lactobacillus* [Van Hijum et al., 2002]、*Streptococcus* [Ajdic et al., 2002]、以及 *Aspergillus*等 [Hidaka, et al., 1988; Su, et al., 1990; Rehm, et al., 1998; Heyer and Wendenburg, 2001]，可得到的果寡糖之糖分子單元都在六以內。

這些可以合成聚果糖或是果寡糖的酵素，可能都是由蔗糖水解酵素 invertase (β-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26)所演化而來。過去對於這些酵素的純化及分析，除了來自於細菌者，從真核生物來源的，都顯示是一個具有糖基修飾的蛋白質 [Su, and Sheu, 1993; L'Hocine, et al., 2000; Van Hijum, et al., 2002]，而且同一酵素其糖基修飾的程度也有很大的變化，佔分子全重從 10%~50%都有。它的糖基修飾與結構的穩定性有一些關聯，也與這個酵素在細胞內的位置有關，但是糖基修飾的確切作用並不清楚。從 NCBI 資料庫中，查找果糖轉移酵素(fructosyltransferase)或果糖糖苷水解酵素(fructofuranosidase)，可以得到 469 個基因及 203 個蛋白質 (至 2006 年 2 月)，經比對蛋白質的序列，我們所欲研究的酵素被歸類在糖苷水解酶家族 32 (glycoside hydrolase family 32, GH family 32)之中 [Henrissat, B. and Davies, G., 1997]。

糖基化的可能作用，可能可以從結晶結構上獲得些許訊息，過去這類酵素的

三維結構，在 2003 年以前都沒有文獻報導，這可能是因為有糖基修飾的關係而不容易結晶、或是糖基修飾的程度及糖的序列不易決定。最近在大腸菌及酵母菌的轉殖與成功表達，克服了這個難題，有三個酵素的三維結構被解出來，一個是從耐熱細菌 *Thermotoga maritima* 來的 invertase (PDB code 1UYP) [Alberto et al., 2004]，是個二聚體；一個是麴菌 *Aspergillus awamori* 的 exo-inulinase (PDB code [Negem et al., 2004]，是個單體；另一個是從歐洲植物菊苣 *Cichorium intybus* 來的 fructan 1-exohydrolase IIa (PDB code 1ST8) [Verhaest, 2005]，它是個單體。它們的單體在結構上主要都有二個區塊，N 端較大，為主要催化區，以典型的 5 個 β -折板構成的螺旋槳狀為主，C 端較小，有 β -折板構成像三明治狀，被認為與糖的辨識有關。其中從菊苣 *C. intybus* 得來的 fructan 1-exohydrolase IIa 只有 5 個糖分子，糖基修飾效應並不明顯，而從麴菌 *A. awamori* 得來的 exo-inulinase，其有五個 N-修飾位點(N-glycosylation site)，當有較少(5 個 mannose)時可獲得較佳結晶，若較大量糖基修飾會使得結晶不良。這些資訊並無法對糖基修飾的作用有清楚的描述。

過去對糖基修飾及酵素穩定性的研究，主要是針對 invertase 以溫度、解構劑(denaturant)及有機溶劑為主 [Schulke, N. and Schmid, F.X., 1988; Rodriguez, M., et. Al., 1997]，配合可能利用的糖苷鍵水解酶去除糖基作比較，其結論大致上有糖基的酵素是具有較佳的穩定性，對熱及有機溶劑耐受性較高，有糖基修飾的 invertase 經解構後回覆折疊也較為容易。但是對於果糖轉移酵素的糖基修飾，並沒有相關文獻報導。

我們的研究主要是利用 PNGase 將 N-糖基化的去除，比較其與原酵素活性及穩定性的關係。結果卻顯示其差異不大。

材料與方法

酵素純化：

以含有蔗糖的培養基，於醱酵槽中培養麴菌(4L)，約 2 天達到穩定期時收槽，經過濾後取得醱酵液，經濃縮後以 FPLC (Pharmacia AKTA)層析系統進行層析。各項參數將參考各種層析樹脂的使用手冊。

酵素的糖基去除：純化得到的酵素，可能其分子量是不均勻的，因為糖基的修飾量可能不均勻，麴菌主要是以 N-糖基化，糖多為 manose 形式，經查可利用 endo-H 糖苷鍵水解酶去除這類的糖基修飾，參考 BM 的手冊。

酵素活性檢測：

HPLC 檢測：對於寡糖的檢測參考 Su 和 Sheu 的方法 [Hagihara, et al., 1982; Su and Sheu, 1993]。於 Hitachi HPLC 機器進行。

TLC 檢測：方法參考 Su 等人及 Hirayama 等人的方法 [Hirayama, et al., 1989; Su, et al., 1990]，以甲醇/硫酸/水 (3/6/1, v/v/v)來呈色。

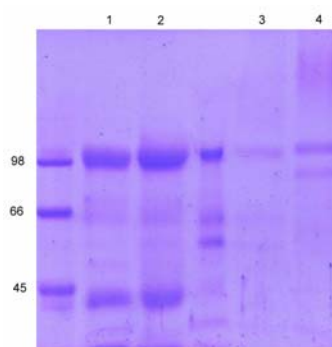
酵素活性的檢測：以不同的 pH 值(採用不同的緩衝溶液)、離子濃度、溫度下進行反應，反應速率及反應終端產物以 HPLC 鑑定及定量檢測。

蛋白質電泳及定量：

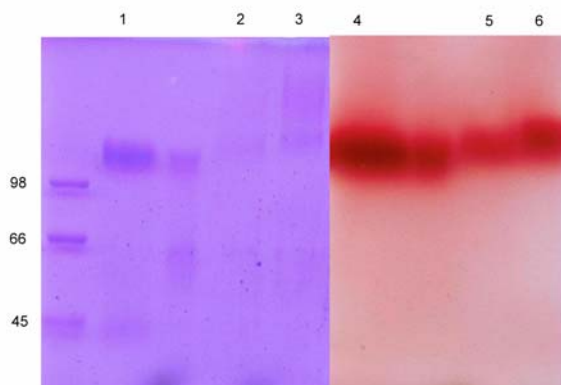
蛋白質的電泳 SDS Polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE)及蛋白質染色參考 Laemmli 的方法 [Laemmli, 1970]，而蛋白質的定量以 Commasiae 法，參考 Bio-Rad 公司的操作手冊。

結果

在本計畫中，經由離子交換層析，我們發現麴菌的胞外醱酵液中，有三個果糖轉移酵素的異構體。如圖一所示，我們發現在麴菌的醱酵液中至少有三種果糖轉移酵素的異構體。分子量大約是



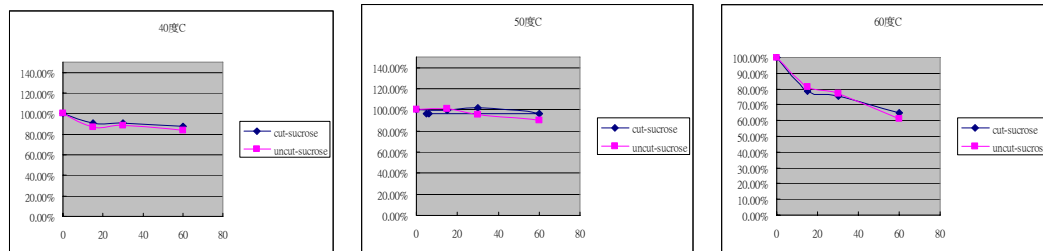
圖一、部份純化的麴菌果糖轉移酵素之 SDS-PAGE，其中 Lane1 及 Lane2 為同一個樣品，Lane3 及 Lane4 為其他兩個樣品。



圖二、麴菌果糖轉移酵素的半原態膠片電泳(Semi-native PAGE)，Lane 1,2,3 分別為三個酵素異構體，Lane 4,5,6 分別為其活性染色

我們也建立了膠片電泳上的活性染色法，如圖二所示，確認這三個蛋白都有活性。

經由 PNGase 酵素去除 N-糖基之後的穩定性比對，如圖三所示。發現去除 N-糖基，對酵素的穩定性並無明顯地影響。



圖三、分別為酵素置於 40°C,50°C,60°C 若干時間，其活性的比對。

綜合以上結果，麴菌果糖轉移酵素的 N-醣基化修飾，對其活性或是對熱的穩定性並無明顯地影響。

參考資料

- 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., Najjar,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.
- Altenbach, D., Nüesch, E., Ritsema, T., Boller, T., Wiemken, A. (2005) "Mutational analysis of the active center of plant fructosyltransferases: *Festuca* 1-SST and barley 6-SFT" *FEBS Lett.* 579, 4647-4653.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2005) "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc. Westin Convention Center Pittsburg, PA, USA.
- Buchner, J.M., Robertson, A.E., Poynter, D.J., Denniston, S.S., and Karls, A.C. "Piv Site-Specific Invertase Requires a DEDD Motif Analogous to the Catalytic Center of the RuvC Holliday Junction Resolvases" *J. Bacteriol.* (2005) 187, 3431-3437.
- Gallagher, J.A., Cairns, A.J., and Pollock, C.J. (2004) "Cloning and characterization of a putative fructosyltransferase and two putative invertase genes from the temperate grass *Lolium temulentum* L." *J. Exp. Bot.* 55, 557-569.
- Hagihara, S., Masuda, K., Komeyama, C., Kanatani, G. and Iwao, U. (1982) "Quantitative

- determination of neosugar in foods.” *Proceedings of Neosugar Conference* pp 41-48. (Hosoya, N., Ed.) Meiji Seika Kaisha, Ltd., Tokyo. (in Japanese).
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997) “Structure and sequence-based on amino acid sequence similarities” *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637-644.
- 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.
- Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. (1988) “A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* 52(5), 1181-1187.
- Hirayama, M., Sumi, N. and Hidaka, H. (1989) “Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* 53(3), 667-673.
- Laemmli, U.K. (1970) “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* 227, 680-685.
- L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., Xu, S. (2000) “Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023” *J. Biotechnol.* 81, 73-84.
- NCBI : National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Politis, E.G., Roth, A.F., Davis, N.G. (2005) “Transmembrane topology of the protein palmitoyl transferase Akr1” *J. Biol. Chem.* 280, 10156-10163.
- Pons, T., Hernandez, L., Batista, F.R., China, G. (2000) “Prediction of a common beta-propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity” *Protein Sci.* 9, 2285-2291.
- Rehm, J., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. (1998) “Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*” *J. Bacteriol.* 180 (5), 1305-1310
- Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003) “Fructans: beneficial for plants and humans” *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 223-230.
- Ritsema, T., Verhaar, a., Vijn, I. and Smeekens, S. (2004) “Fructosyltransferase mutants specify a function for the β -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized” *Plant Mol. Biol.* 54, 853-863.
- Ritsema, T., Verhaar, A., Vijn, I., and Smeekens, S. (2004) “Fructosyltransferase mutants specify a function for the β -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized” *Plant Mol. Biol.* 54, 853-863.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) “The Molecular Cloning” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Su, Y.-C. and Sheu, C.-S. (1993) “Recovery and properties of a fructooligosaccharides-producing

- β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* CCRC 38011" *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* 17(2), 62-69.
- Su, Y.-C., Sheu, C.-S., Chien, J.-Y. and Ma, K.-K. (1990) "Isolation and Identification of microorganisms capable of producing β -fructofuranosidase with transfructosylating activity" *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* 14(2), 114-121.
- Suzuki, Y. and Uchida, K. (1993) "Formation of b-fructosyl compounds of pyridoxine in growing culture of *Aspergillus niger*" *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 875-880.
- Tapernoux-Lüthi, E.M., Böhm, A., and Keller, F. (2004) "Cloning, Functional Expression, and Characterization of the Raffinose Oligosaccharide Chain Elongation Enzyme, Galactan:Galactan Galactosyltransferase, from Common Bugle Leaves." *Plant Physiol.* 134, 1377-1387.
- Uhm, T.-B., Jeon, D.-Y., Byun, S.M., Hong, J.-S. and GrootWassink, J.W.D. (1987) "Purification and properties of b-fructofuranosidase from *Aspergillus niger*" *Biochim. Biophys. Acta* 926, 119-126.
- 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.
- Verhaest, M., Ende, W.V., Roy, K.L., De Ranter, C.J., Laere, A.V., Rabijns, A. (2005) "X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*" *Plant J.* (2005) 41, 400-411.
- 許清森 (1993) "寡糖類之開發與利用" *食品工業* 25, 10-20.