

海藻糖合成双酶体系酶性质 及酶反应条件的研究

周 延 袁其朋 冯金虎 马润宇
(北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

摘要:通过对自筛出的一株微球菌(*Micrococcus roseus*)进行海藻糖合成酶的性质及海藻糖合成的酶反应条件的研究,建立了使用粗酶不经纯化,直接进行酶反应的工艺流程,此工艺有可能进一步降低海藻糖的成本。研究得到了酶反应的一系列优化条件:20%细胞悬液,25℃下用3%甲苯处理1h;然后在100 mmol/L缓冲液中,pH值8.0、30℃下与5%淀粉液化液进行酶反应24h,得到海藻糖转化率达75%。研究了该酶体系的性质,发现该反应体系不存在底物和产物抑制,但存在对其产生抑制的金属离子,同时发现海藻糖对该酶体系有异常的激活作用。

关键词:海藻糖;酶法合成;淀粉

中图分类号:TQ929.2

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2003)01-33-94

Study on enzymatic properties and reaction conditions in trehalose synthesis

ZHOU Yan, YUAN Qi-peng, FENG Jin-hu, MA Run-yu

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Studies on properties and reaction conditions of fucose ligase were made with a kind of *Micrococcus roseus* which was cultivated and chosen. The technology that was likely to cut down the cost of trehalose was established as crude enzyme can directly react without being purified. Enzymatic reaction conditions in a buffer system were optimized: 20% of cell suspension was treated with 3% of methylbenzene for 1 h at 25°C, then suspension reacted with 5% of starch in a 100 mmol/L (pH 8.0) buffer solution at 30°C. The highest conversion rate from 5% of starch to trehalose reached 75%. It's discovered that there is no substrate or product inhibition in the reaction, yet some metal ions exist that have inhibition to it. The exceptional activation of the enzymes was discovered as the trehalose was added.

Key words: trehalose; synthesis by enzymatic method; starch

海藻糖是由两个葡萄糖分子通过半缩羟基缩合而成,广泛分布于海藻、酵母、霉菌、昆虫、高等植物体内,能保护生物细胞和生物活性物质在恶劣环境下活性免遭破坏^[1];在强辐射条件下,可以保护细胞中DNA分子免受损害^[2],而且这种保护是非特异性的。因此海藻糖在医药、食品、农业、化妆品等方面具有广阔的应用前景^[3]。

早期,海藻糖主要从酵母中提取,成本高,限制了海藻糖应用。以淀粉为原料酶法生产海藻糖为海藻糖生产开辟了一条新的途径^[4-5],使其生产成本

从200美元/kg降至3美元/kg,也为海藻糖的大规模工业化生产提供了可能性,同时廉价海藻糖的产生也将会极大推动相关产业的发展。

国内对酶法合成海藻糖的研究处于起步阶段,主要集中在菌种筛选和代谢研究方面。本研究室自2000年以来,进行了海藻糖合成酶的菌种筛选,并对自筛出的一株微球菌(*Micrococcus roseus*)进行了海藻糖合成酶的性质及酶反应条件较系统的研究,建立了使用粗酶不经纯化,直接进行酶反应的工艺流程,这一流程有可能带来海藻糖成本的进一步下降;

收稿日期:2002-09-09

作者简介:周延(1972-),女,硕士,讲师;马润宇(1945-),男,博士,教授,博导,主要从事生物化工、制药方面的研究,通讯联系人,010-64434775。

同时在酶性质的研究中,笔者还发现了海藻糖对该酶系异常的激活作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

海藻糖, Sigma 公司; α -淀粉酶, 无锡酶制剂厂; HPLC 分析试剂为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.2 分析方法

1.2.1 海藻糖的分析方法(HPLC 法^[7])

岛津 LA-10vp HPLC, ZORBAX-NH₂ 柱(150 cm), 柱温 20℃, 流动相为乙腈-水(体积比 80:20), 流速 1 mL/min; 示差折光检测器。

1.2.2 双酶体系的酶活测定及定义

取 10 mL 酶液, 加 5 mL 质量分数为 2% 的淀粉液化液(淀粉液化度值为 10%; 淀粉液化度是淀粉中还原糖与总糖含量的比值), 45℃ 酶解 20 min 用 HPLC 法测海藻糖。酶活单位定义如下: 在上述反应条件下每分钟释放 1 μ mol 的海藻糖所需的酶量为一个单位(U)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种培养

菌种为本实验室自行筛选。

培养基: 斜面培养基为可溶性淀粉 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L; 摇瓶培养基为葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 20 g/L, 蛋白胨 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, pH 值为 8(经优化)。

发酵培养过程为: 先将细菌由斜面培养基接种于种子摇瓶培养基, 30℃, 140 r/min, 培养 18 h。以 5% 的接种量接入发酵培养基, 30℃, 140 r/min, 培养 72 h。

1.3.2 海藻糖合成酶的释放

将上述发酵液以 10 000 r/min 离心 5 min, 菌体以质量分数 20% 悬浮于一定离子强度的磷酸缓冲液中, 以体积分数 3% 的甲苯 25℃ 下处理 1 h, 进行海藻糖合成酶的释放。

1.3.3 海藻糖的酶法合成反应

在带塞三角瓶中, 将 10 mL 上述经细胞破碎的酶液与 10 mL 质量分数为 5% 的液化淀粉液(液化度约为 38%) 混合, 于一定温度下, 振荡反应一段时间。取出, 沸水浴 10 min 杀酶, 离心测样。

1.4 实验内容

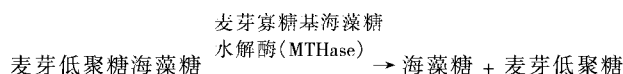
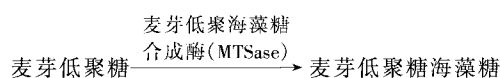
以双酶体系的初始酶活考察酶反应最佳 pH 值、温度、离子强度及最佳温度下酶活的稳定性; 考察不同底物(液化淀粉)浓度及添加产物(海藻糖)对

初始酶活的影响; 考察 EDTA 及紫外线对酶活的影响; 酶法合成海藻糖工艺条件的初步确定。

2 结果与讨论

2.1 菌种

自筛的菌种经鉴定为一微球菌 (*Micrococcus roseus*), 据报道其所产海藻糖合成相关酶为麦芽低聚海藻糖合成酶(MTSase)和麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase)。两者均为胞内酶, 其合成海藻糖的酶反应式为:



据此确定了以液化淀粉为原料进行海藻糖酶法合成的路线。

2.2 海藻糖合成酶性质的研究

2.2.1 以双酶体系的初始酶活考察酶反应最佳 pH 值、温度、离子强度

为了确定双酶体系作用的最佳条件, 分别选取各种 pH 值、反应温度、缓冲液浓度测定初始酶活, 结果见图 1、图 2、图 3。可以看到, 在 pH 值 8、离子强度 100 mmol/L、40℃ 下初始酶活最高。

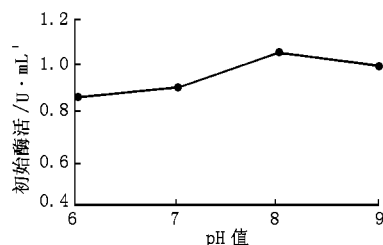


图 1 pH 值对初始酶活的影响

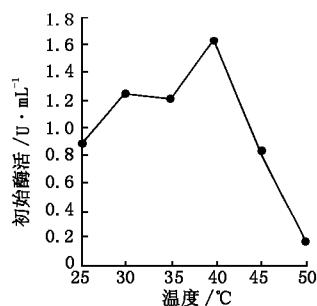


图 2 温度对初始酶活的影响

2.2.2 最佳温度下酶活的稳定性

在最佳酶反应温度下, 考察振荡与静止条件下细胞破碎液保温不同时间后的酶活变化情况。

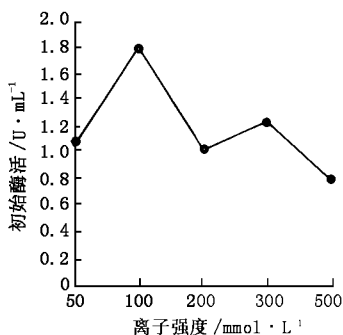
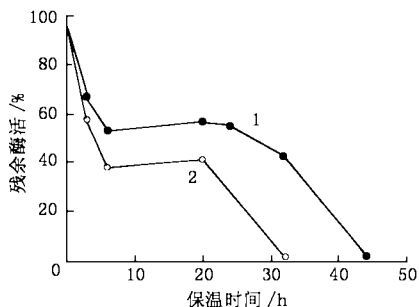


图3 离子强度对初始酶活的影响

由图4可见,酶的失活比较迅速。6 h后酶活已经损失近半,这表明细胞破碎液中可能存在蛋白酶或使酶快速失活的物质。振荡与静止下酶活的差异并不大,说明在该体系中振荡剪切力并不是造成酶活损失的主要原因。该曲线并不符合酶的一般失活曲线,这是因为采用的甲苯破碎方法并没有完全使细胞破碎,而是造成了细胞通透性的变化,胞内的酶是逐步释放到细胞外,造成了细胞对酶活的保护作用。酶活的变化是溶液中酶的失活和细胞内酶释放的综合结果。



1—静置保温;2—搅拌 100 r/min,保温

图4 40℃下细胞破碎液的保温试验

2.2.3 底物浓度及产物对初始酶活的影响

选择底物质量分数为5%、10%、15%、20%,测定细胞破碎后上清液中初始酶活,结果见图5,可见初始酶活随着底物浓度的升高而升高,表明该反应不存在底物抑制。

选择在反应体系中添加不同浓度的海藻糖量(0.1、0.2、0.3 mol/L),测定细胞破碎后上清液中初始酶活,结果见图6。初始酶活随着海藻糖添加量的增加而有大幅度的增长。当海藻糖添加量达到0.3 mol/L时,酶活提高了40倍以上。这种酶活的异常提高,可能是由于海藻糖对该双酶体系具有激活作用或抗抑制剂的作用。

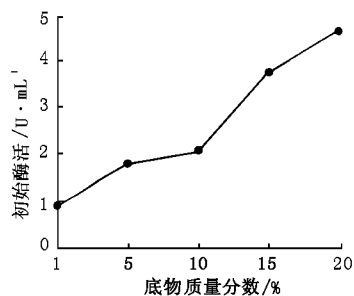


图5 底物浓度对初始酶活的影响

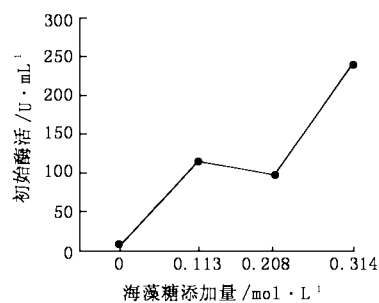


图6 添加海藻糖对初始酶活的影响

2.2.4 考察 EDTA 对酶活的影响

为了考察是否存在金属离子对酶活的抑制作用,在细胞破碎后上清液中添加不同浓度的EDTA,结果见图7,表明与不添加EDTA时相比,当EDTA质量分数低于1%时,酶活提高到原来的2.5~3倍,说明体系中存在抑制酶活性的金属离子。另外过高浓度的EDTA对酶的活性也有抑制作用。

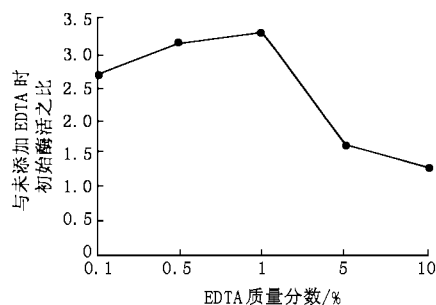


图7 EDTA 的添加对初始酶活的影响

2.2.5 紫外线照射对酶活的影响

由于酶反应时间高于10 h时,反应液中的杂菌生长明显且消耗海藻糖,考虑使用紫外线进行灭菌,因此考察了紫外线照射对细胞破碎后上清液中酶活的影响,结果见图8,表明紫外线照射时间低于20 min时,酶活基本没有损失,因此可以考虑使用紫外线进行灭菌。

2.3 酶法合成海藻糖工艺条件的确定

2.3.1 酶法合成海藻糖温度的选定

经过上述对海藻糖合成酶性质的研究,通过考察初始酶活,初步确定了酶反应的优化条件为 pH 值为 8、100 mmol/L、40℃。但同时注意到 40℃ 下酶的迅速失活,而在实际酶法合成中必然应以淀粉的高转化率(即一定时间内酶活的积分量)来作为工艺条件确定的标准。因此使用质量分数为 5% 的淀粉液化液,缓冲液 pH 值为 8,浓度为 100 mmol/L,分别在不同温度下进行了酶反应,结果(见图 9)在 30℃ 下淀粉的转化率最高。

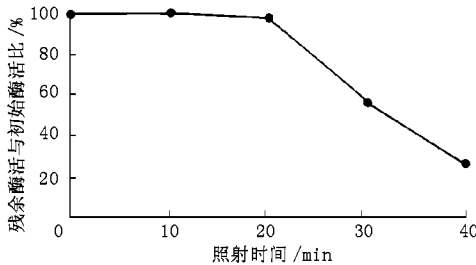


图 8 紫外线照射对酶活的影响

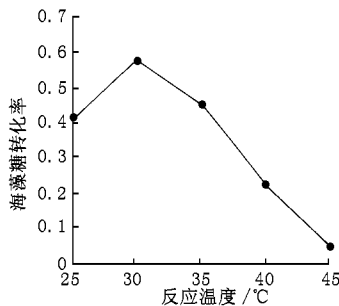


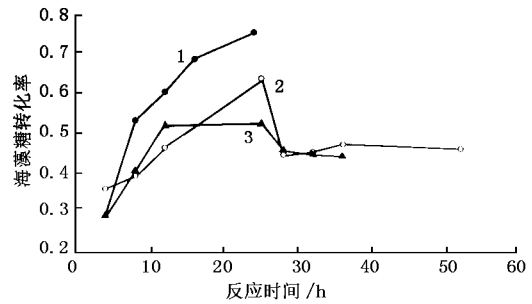
图 9 不同温度下淀粉转化率的变化

2.3.2 淀粉浓度和反应时间对海藻糖合成的影响

在确定酶反应温度之后,又考察了使用不同淀粉浓度下淀粉转化率随时间的变化情况(见图 10)。结果表明,淀粉转化率均在 24 h 附近达到最大,这与酶的失活有关。同时海藻糖产量随淀粉浓度的增大而增大,质量分数 20% 时海藻糖最高质量浓度达

到 53 g/L;但淀粉转化率随淀粉浓度的升高而降低,质量分数 5% 时转化率达到 75%。

由此确定了酶法合成海藻糖的工艺条件为:pH = 8,100 mmol/L 缓冲液,30℃ 下反应 24 h。



淀粉质量分数:1—5%;2—15%;3—20%

图 10 不同淀粉浓度反应的时间进程

3 结论

通过实验,得到了优化后的酶反应条件:在 100 mmol/L 缓冲液中,pH = 8,30℃ 下与 5% 淀粉液化液进行酶反应 24 h,得到最高海藻糖转化率达 75%。EDTA 试验表明该酶体系存在对其有抑制作用的金属离子。同时还发现该反应不存在底物与产物抑制,而且海藻糖的存在对该酶体系具有异常的激活作用。

参考文献

- [1] 杨琳,王金发.[J].生物学通报,1999,34(2):11-14.
- [2] Canrinci P,Nishiyama Y,Westover A, et al.[J].Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(2):520-524.
- [3] 尤新.功能性发酵制品[M].北京:中国轻工业出版社,2000.
- [4] Toshiyuki,Sugimoto, et al.[J].Nippon Nogeikagaku Kaishi,1998,72(8):915-922.
- [5] Yoshida M,Nakamura N,Horikoshi K.[J].Enzyme and Microbial Technology,1998,22:71-75.
- [6] 余俊棠,唐孝宜.生物工艺学[M].上海:华东理工大学出版社,1991.
- [7] 刘传斌,云战友,等.[J].食品与发酵工业,1998,24(5):40-42.

《现代化工》在 2001 年《EI》光盘数据库中的收录情况

据《中国科技期刊研究》2002 年第 5 期报道,2001 年美国《工程索引(EI)》光盘数据库收录中国科技期刊共有 113 种,论文数为 9346 篇,其中《现代化工》排在第 7 位,收录论文数为 211 篇。