

# 海藻糖的生产方法

刘建龙<sup>1,2</sup>, 王瑞明<sup>3</sup>, 杨连生<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品与生物学院, 广东 广州 510641; 2. 山东省轻工业设计院, 山东 济南 250014;  
3. 山东轻工业学院食品生物工程系, 山东 济南 250014)

**摘要:** 评述了海藻糖的各种生产方法, 包括酵母抽提法、微生物发酵法、酶转化法、基因重组法等, 并列了一些有价值的研究实例。对酵母积累海藻糖的胁迫条件和提取过程, 海藻糖产生菌的分离培养、酶学特性、酶发酵条件, 低聚麦芽糖基海藻糖生成酶和低聚麦芽糖基海藻糖水解酶基因的表达等进行了探讨。指出以淀粉为原料采用酶转化法生产海藻糖是一种较有前途的方法。

**关键词:** 海藻糖; 酵母抽提; 发酵; 酶转化; 基因重组

中图分类号: TQ920; TS245.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2005)01-0023-03

## Preparation methods for trehalose

LIU Jian-long<sup>1,2</sup>, WANG Rui-ming<sup>3</sup>, YANG Lian-sheng<sup>1</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;  
2. Shandong Light Industry Design Institute, Jinan 250014, China;  
3. Department of Food and Bioengineering, Institute of Light Industry of Shandong, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Many kinds of production methods for trehalose such as extraction from yeast, microorganism fermentation, enzymatic synthesis and gene clone are analyzed. Some research examples valuable in application are also cited. The shock conditions of trehalose accumulation by yeast and the optimal extracting process, isolation and culture of strains produced trehalose, enzymatic properties, fermentation conditions, the expression of genes of MTSase and MTHase and so on are discussed. It is pointed out that the enzymatic synthesis of trehalose from starch is a promising way.

**Key words:** trehalose; extraction from yeast; microorganism fermentation; enzymatic synthesis; gene clone

海藻糖 (trehalose) 广泛存在于自然界如动植物及微生物中, 尤其是在酵母、霉菌以及蘑菇等真菌中, 其质量分数可达 15% 以上<sup>[1]</sup>。目前研究较多的是天然存在的  $\alpha, \alpha$  型海藻糖, 它是天然双糖中最稳定的糖类, 只被具有特异性的海藻糖酶所分解。研究表明, 某些物种对外界恶劣环境, 如干旱、高温、脱水、冷冻、高渗透压及毒性物质等, 所表现出来的抗逆耐受力与这些物种体内存在的海藻糖密切相关, 具有独特的不同于其他碳水化合物的生物学特性, 能在上述环境下保护生物体细胞蛋白质、脂肪、糖类、核酸等组分不受损害<sup>[2]</sup>, 可保护 DNA 防止放射线引起的损伤<sup>[3]</sup>, 外源性的海藻糖也能对生物体及生物大分子有着良好的非特异性的保护作用, 因而这使得它有许多用途, 如在医药和微生物学中作细胞防冻剂、诊断试剂和生物产品的稳定剂、化妆品的

有效成分、食品防腐剂、农业上培育抗旱作物等。

随着人们对海藻糖生物特异性功能的不断发现和认识, 国内外对其生产方法, 特别是寻求以原料来源广泛, 高效方便的低成本生产方法的研究日益活跃。目前主要的方法有酵母抽提法、酶合成法、发酵法、基因重组法等。

## 1 酵母抽提法

海藻糖最早的生产方法即是从酵母中采用溶剂抽提法进行提取。酵母海藻糖生物合成途径<sup>[4]</sup>以 6-磷酸葡萄糖和尿苷二磷酸 (UDP)-葡萄糖为底物, 在 6-磷酸海藻糖合成酶催化下形成 6-磷酸海藻糖, 再经 6-磷酸海藻糖磷酸脂酶作用脱去磷酸基, 生成海藻糖; 而海藻糖的分解代谢则是在海藻糖酶 (trehalase) 作用下进行的, 所以海藻糖的生成量是由合

收稿日期: 2004-07-01; 修回日期: 2004-10-12

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金项目 (03BS084)

作者简介: 刘建龙 (1961-), 男, 高级工程师, 在读博士, 曾在德国进修, 主要从事发酵工程技术方面的研究, 0531-8937108, jlong1818@sina.com; 王瑞明 (1962-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物工程技术的研发; 杨连生 (1940-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事碳水化合物和生物化工边缘科学的研究。

成和代谢平衡调节的,并随环境而变化。

1950 年 Laura 首次从各种酵母中制备出海藻糖,并证明了活性干酵母中海藻糖含量较高。Lillie 和 Ringle<sup>[5]</sup>报道了采用三氯乙酸提取海藻糖,Neves 等<sup>[6]</sup>用啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)乙醇提取,先使海藻糖浓缩到体积分数为 20%~30%,再用超滤等方法提纯,浓缩到体积分数为 40%~85%时再结晶,获得较高产量。傅琳琳等<sup>[7]</sup>以啤酒厂废酵母于 80℃下乙醇抽提 1.0~1.5 h,提取液再加 3~5 倍乙醇,海藻糖结晶率在 85%以上。唐传核和葛文光<sup>[8]</sup>从活性干酵母中提取海藻糖的得率为 145 mg/g。李于等<sup>[9]</sup>研究了在 30℃、酵母质量浓度为 70 g/L 条件下,用体积分数 50%的乙醇提取 60 min,海藻糖提取率达 98.81%,采用大孔径阴阳离子交换树脂混合柱纯化提取液,控制流速为 3~6 mL/min、温度为 40℃,经浓缩、结晶,海藻糖纯度在 98%(质量分数)以上。

研究表明,当细胞处于胁迫条件时,胞内海藻糖含量迅速上升。K. Miwako 等<sup>[10]</sup>发现采用高压处理酵母时,海藻糖提取率明显提高。A. O. Joseph 等<sup>[11]</sup>对酵母 *Saccharomyces uvarum* 细胞添加体积分数 10%的乙醇休克和 37℃热休克,海藻糖质量分数由 21℃时的 8.24 mg/g 分别提高到 11.77 mg/g 和 22.47 mg/g。在发酵过程中,严格控制流加的碳氮比,在末期适当提高温度和减少通风量,使酵母呈“饥饿”状态 2~3 h,可使海藻糖质量分数增加到 15%~16%(干计)或更高<sup>[12]</sup>。王兰等<sup>[13]</sup>对面包酵母 BY-11 从营养饥饿入手,仅供给适量的碳源及少量微量元素和维生素,并严格限制氮源,以 3 g/L(干计)接种量,36~37℃振荡培养 3 h,可使酵母积累海藻糖达 0.96 g/L,并在培养基中添加 1.0%~1.5%的 NaCl 以增加渗透压,大大提高了海藻糖含量,为工业化生产提供了可行性。

海藻糖在酵母细胞中主要存在于子囊孢子和细胞质中,破壁提取时会溶出大量的核酸、蛋白质及多糖等内容物,会给分离纯化造成困难。因此,处理时应先采用适宜的渗透细胞技术,使小分子质量的海藻糖通过酵母细胞壁至抽提液,再经脱杂、浓缩、结晶等,将会大大提高海藻糖的纯度。我国年产啤酒 2 500 多万 t,居世界第 2 位,每年可回收废酵母约 50 余万 t,利用这些丰富的酵母资源提取海藻糖,预计将会使生产成本降低。

## 2 发酵法

发酵法的主要步骤是通过采用诱变、细胞融合

或基因重组等方法选育出高产海藻糖的菌株,采用优化培养基和适宜的条件进行发酵,再采用有效分离提取技术对发酵产物进行精制。目前可利用的微生物主要包括酵母、革兰氏阳性菌,特别是微球菌属(*Micrococcaceae*)。某些蘑菇菌所含海藻糖占其干重的 11%~15%,而灰树花(*Grifola frondosa*)中海藻糖含量更高。

中国科学院微生物研究所利用返回式卫星对酵母菌进行诱变育种,经发酵实验获得了海藻糖质量分数达 20%以上的酵母细胞,提取的海藻糖纯度在 98%以上。杨波等<sup>[14]</sup>用聚合酶链反应(PCR)克隆了 1.5 kb 酿酒酵母海藻糖合成酶的基因 TPS1,将该片断联接到 PUC19 载体上,通过转化分别引入海藻糖合成酶基因缺失和缺陷的大肠杆菌 *Escherichia coli* FF4169 和 FF4050,对转化株的质粒 DNA 酶切分析表明,均含有 1.5 kb PCR 克隆片断,此转化株在 0.5 mmol/L NaCl 高渗条件下培养生长良好并能合成海藻糖。章银良等<sup>[15]</sup>采用 5 L 发酵罐,研究在高温、高渗或有毒物胁迫条件下对酿酒酵母海藻糖的积累,海藻糖质量分数由正常情况下的 10%分别提高到 13.3%、12.7%和 14.8%,并认为大规模生产海藻糖最经济有效的方法是在酵母对数生长期提高温度至 40℃。日本的 K. Aisaka 和 T. Masuda<sup>[16]</sup>利用 *Catellatospora ferruginea* 生产海藻糖,产率达 70%,日本味之素株式会社(Ajinomoto Co., Inc)利用一种氨基酸生产菌已实现了工业化生产<sup>[17]</sup>。

曾国驱等<sup>[18]</sup>筛选出了一株球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)E42 菌株,以麦芽糖为碳源,发酵初始 pH 值为 7.0,接种量为 6%,30℃条件下培养 48 h,海藻糖产量在 3.3 g/L 以上,该菌株还可以葡萄糖和蔗糖为碳源。李绩<sup>[19]</sup>对诱变株 L-61 采用流加摇瓶培养,在培养至 11~12 h 时,提高 pH 值到 6.2 并添加 15 g/L NaCl,继续培养到 15 h,酵母海藻糖质量分数平均达 23.1%,海藻糖体积收率为 9.6 g/L,对糖质量得率 13.29%。日本旭化成工业株式会社(Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)<sup>[20]</sup>用灰树花生产海藻糖,以土豆 6%,麸皮浸汁 20%,葡萄糖 1%为培养基(质量分数),25℃下培养,37.5℃处理灰树花菌丝体获得了较高海藻糖含量。

微生物发酵法生产海藻糖具有独特的优越性,因为海藻糖广泛存在于微生物中,微生物易于繁殖并可进行液态深层发酵。该方法的关键在于提高种子活力和产率,特别是如能通过基因工程等手段得到胞外积累海藻糖的菌株进行生产,对于降低生产

成本具有重要意义。

### 3 酶合成法

酶合成法生成海藻糖的生物合成途径有多种,可由淀粉、葡萄糖、麦芽糖、寡糖等生物合成海藻糖,并分别由不同的酶催化。日本的 K. Maruta 等<sup>[21]</sup>从土壤中分离得到能从多种淀粉部分水解产物生成海藻糖的 2 种新酶:一种是低聚麦芽糖基海藻糖生成酶(maltooligosyl trehalose synthase, MTSase),能作用于淀粉的部分分解产物,在其末端生成具有海藻糖结构的非还原性糖质;另一种是低聚麦芽糖基海藻糖水解酶(maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, MTHase),能从上述的非还原性糖质特异性地游离出海藻糖。该方法已投入工业化生产,糖化结束时糖化液中海藻糖的质量分数达 80% 以上,得到了 98% 的含水结晶海藻糖,优于其他酶法生产工艺。

孙长慧<sup>[22]</sup>利用一株产 MTSase 和 MTHase 的微生物(*Micrococcus roseus*) QS-412,以淀粉为原料,在缓冲液浓度 100 mol/L、pH 值 8.0、酶反应温度 30℃ 和底物质量分数 20% 条件下,最佳反应时间为 24 h,得到海藻糖质量浓度为 52.76 g/L,淀粉转化率为 52.7%。赖承兴等<sup>[23]</sup>研究了一株藤黄色微生物(*Micrococcus luteus*)合成 MTSase 和 MTHase 的条件,发现在菌体对数生长期,两者的积累量极少,而在菌体基本停止生长后继续培养 12 h,胞内 2 种酶的含量急剧增加,两酶联合作用的最适条件为:pH 值 6.5,温度 40℃,葡萄糖值 11.6、质量分数 15% 的淀粉水解液。周延等<sup>[24]</sup>利用一株微生物建立了使用粗酶不经纯化直接进行酶反应的工艺,此工艺有可能进一步降低海藻糖的生产成本。

另外,Hiroto 等<sup>[25]</sup>用从马铃薯中得到的 6-葡萄糖磷酸化酶和香菇中得到的海藻糖磷酸化酶处理  $\alpha$ -葡萄糖和磷酸的混合物而得到海藻糖。Yoshida 等<sup>[26]</sup>将从邻单孢菌属(*Pleisomonas*)中提取的麦芽糖磷酸化酶和海藻糖磷酸化酶固定化,以 20% 麦芽糖和 1.0 h<sup>-1</sup>空间流加速率连续化生产海藻糖,产率为 252 mg/(h·g),酶稳定性大大提高,连续化操作的半衰期最长为 164 天。

目前,酶法主要是通过 MTSase 和 MTHase 这 2 种新酶协同作用于淀粉来生产海藻糖,具有原料收率高的优点,目前产率最高可达 82%,为海藻糖工业化生产开辟了新途径。该方法被认为是海藻糖生产方法中最有前途的一种。我国为淀粉生产大国,因而酶法淀粉生产海藻糖意义重大。

### 4 基因重组法

该方法分为两种:一是直接把合成海藻糖酶的基因导入作物中去,在作物中自行积累海藻糖;二是利用工程微生物和酶工程改进海藻糖的生产,提高产量,降低成本。美国 Calgene 公司将葡萄糖转化为海藻糖的基因通过一种细菌导入植物,构建的重组植物具有产生海藻糖的能力,并认为葡萄糖转化为海藻糖完全受有关酶基因的控制。荷兰 Mogen 公司将大肠杆菌的海藻糖合酶导入甜菜、马铃薯中,获得了大量廉价的海藻糖。据有关专利报道,已从嗜热古细菌(*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC 33909 中克隆了耐热酶 MTSase 和 MTHase 的基因,它们在高温下能利用麦芽糖或直链淀粉生产海藻糖,与其他酶系相比,产量及反应速率更高;日本几家公司已研究出利用这一酶系日产 200 kg 海藻糖的设备。上述基因工程菌可常温培养,产酶活力高,具有工业化前景<sup>[27]</sup>。

王绍校等<sup>[28]</sup>克隆了来源于嗜热古菌芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*) B12 的 MTSase 和 MTHase 的基因,并在大肠杆菌中获得了表达,将获得纯化的这 2 种酶分别以麦芽寡糖和淀粉为转化底物,在 pH 值 5.5、60℃ 条件下合成了海藻糖。最近 Schiraldi 等<sup>[29]</sup>将微黄短杆菌中 MTSase 和 MTHase 2 个连续反应的酶基因融合,表达产生了双功能新酶 MTSH,反应速率明显提高,并可大大简化提纯步骤。基因工程技术为开辟海藻糖生产方法提供了新的途径,可以预见将产生明显的经济效益。

### 5 展望

现代生物技术的发展,使上述各种生产方法难以严格区分。但是,应充分利用现代生物技术等手段,继续在以下几个方面进一步深入研究,以期尽快实现国内产业化生产:①菌株选育,如高活力菌株、能分泌胞外海藻糖而直接提取的菌株;②海藻糖积累的胁迫条件及细胞透性化提取技术等;③酶的特性及分离纯化,特别是酶的固定化结合膜分离技术,以实现转化过程连续化和酶的多次重复使用。

### 参考文献

- [1] Van Dijk P, Colavizza D, Smet P, et al. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(1): 109 - 115.
- [2] Attfield P V. [J]. FEBS Letters, 1987, 225(1): 259 - 263.
- [3] Yoshinaga K, Yoshioka H, Kurosaki H, et al. [J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1997, 61(1): 160 - 161.

惊人的技术突破。

### 参考文献

- [1] GB 18350—2001,变性燃料乙醇[S].
- [2] Ladisch M R, Dyck K K. [J]. *Science*, 1979, 205: 898 - 900.
- [3] Black C. [J]. *Chemical Engineering Progress*, 1980, 76(9): 78 - 85.
- [4] 陈敏恒, 从德滋. 化工原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 122 - 124.
- [5] 刘宗宽, 顾兆林, 贺延龄, 等. [J]. *化工进展*, 2003, 22(11): 1147 - 1149.
- [6] Aristovich V Yu, Aristovich Yu V, Sokolov A Yu, *et al.* [J]. *Chemical Engineering Communications*, 2004, 191(6): 844 - 859.
- [7] Agarwal M, Gaikar V G. [J]. *Chemical Engineering Communications*, 1992, 115(1): 83 - 94.
- [8] Carmo M J, Gubulin J C. [J]. *Journal of Chemical Engineering*, 1997, 14(3): 217 - 224.
- [9] Banat F A, Abu Al-Rub F A, Simandl J. [J]. *Separation and Purification Technology*, 2000, 18(2): 111 - 118.
- [10] Abu Al-Rub F A, Banat F A, Jumah R. [J]. *Separation Science and Technology*, 1999, 34(12): 2355 - 2368.
- [11] Ben-Shehail S M. [J]. *Chemical Engineering Journal*, 1999, 74(3): 197 - 204.
- [12] Bindal R C, Misra B M. [J]. *Separation Science and Technology*, 1986, 21(10): 1047 - 1055.
- [13] Kuznicki S M, Bell V A, Nair S, *et al.* [J]. *Nature*, 2001, 412: 720 - 724.
- [14] Ghofar A, Kokugan T. [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(3): 235 - 238.
- [15] Tsui F M, Cheryan M. [J]. *Journal of Membrane Science*, 2004, 237(1-2): 61 - 69.
- [16] Shukla R, Cheryan M. [J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 198(1): 75 - 85.
- [17] 冯海锋, 姜忠义. [J]. *现代化工*, 2003, 23(7): 15 - 19.
- [18] Stefanova M, Simoneit B R T, Stojanova G, *et al.* [J]. *Fuel*, 1995, 74(5): 768 - 778.
- [19] Xu Zhikang, Dai Qingwen, Liu Zhenmei, *et al.* [J]. *Journal of Membrane Science*, 2003, 214(1): 71 - 81.
- [20] Wu Yonglie, Peng Xi, Liu Jingzhi, *et al.* [J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 196(2): 179 - 183.
- [21] Tu Chenyuan, Chen Chiuping, Wang Yichieh, *et al.* [J]. *European Polymer Journal*, 2004, 40(7): 1541 - 1549.
- [22] 吴庸烈, 刘静芝, 彭曦. [J]. *膜科学与技术*, 1998, 18(4): 1 - 4.
- [23] Hassaballah A A, Hills J H. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(6): 598 - 608.
- [24] Beery K E, Ladisch M R. [J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2001, 40(9): 2112 - 2115.
- [25] Vareli G, Demertzis P G, Akrida-Demertzi K. [J]. *Journal of Cereal Science*, 2000, 31(2): 147 - 154.
- [26] Westgate P J, Ladisch M R. [J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 1993, 32(8): 1676 - 1680.
- [27] Hong J, Voloch M, Ladisch M R, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1982, 24(3): 725 - 730.
- [28] 常华, 袁希钢, 曾爱武. [J]. *化工学报*, 2004, 55(2): 309 - 312.
- [29] 梁萌, 张建安, 刘德华. [J]. *酿酒*, 2002, 29(5): 3 - 6.
- [30] Rehar V, Fischbach E R, Apostolopoulos D, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26(5): 513 - 517. ■
- [17] Anon. [J]. *Nikkei Biotechnology*, 1994, 20(6): 7.
- [18] 曾国驱, 黄晓兰, 蔡小伟, 等. [J]. *生物技术*, 2002, 12(3): 15 - 17.
- [19] 李绩. 用酵母菌生产海藻糖的研究. [D]. 天津: 天津轻工业学院, 2002.
- [20] 旭化成工业株式会社. トレハロースの製造方法[P]. JP 特开平6-311891, 1994-11-08.
- [21] Maruta K, Nakada T, Kubota M, *et al.* [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1995, 59(10): 1829 - 1834.
- [22] 孙长慧. 以淀粉为原料酶法制备海藻糖的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2002.
- [23] 赖承兴, 葛宇, 袁勤生, 等. [J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(9): 433 - 436.
- [24] 周延, 袁其朋, 冯金虎, 等. [J]. *现代化工*, 2003, 23(1): 36.
- [25] Hiroto C, Shigeharu F, Masashik K, *et al.* [J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 1996, 43(2): 213 - 222.
- [26] Yoshida M, Nakamura N, Horikoshi K. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22(1): 71 - 75.
- [27] Anon. [J]. *Biotechnology*, 1994, 12(13): 1328 - 1329.
- [28] 王绍校, 吴襟, 高春宵, 等. [J]. *微生物学通报*, 2003, 30(2): 36 - 40.
- [29] Schiraldi C, Di Lernia, De Rosa M. [J]. *Trends Biotechnology*, 2002, 20(10): 420 - 425. ■

(上接第25页)

- [4] Konishi Yutaka, Shindo Kazutoshi. [J]. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1997, 61(3): 439 - 442.
- [5] Lillie S H, Ringle J R. [J]. *Bacterial*, 1980, 143(3): 1384 - 1397.
- [6] Neves M J, Hohmann S, Bell W, *et al.* [J]. *Current Genetics*, 1995, 27: 110 - 122.
- [7] 傅琳琳, 扬一兵, 熊国真, 等. [J]. *江西科学*, 2000, 18(2): 86 - 89.
- [8] 唐传核, 葛文光. [J]. *无锡轻工大学学报*, 1998, 17(3): 36 - 40.
- [9] 李于, 肖冬光, 王兰, 等. [J]. *天津轻工业学院学报*, 1998, 17(3): 36 - 40.
- [10] Miwako K, Maruta K, Kubota M. [J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 1995, 42(3): 237 - 242.
- [11] Joseph A O, Falkinham J. [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1993, 33(11): 113 - 119.
- [12] 莫湘筠. [J]. *食品与发酵工业*, 1993, 12(1): 76 - 78.
- [13] 王兰, 肖冬光, 张正, 等. [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(2): 15 - 19.
- [14] 杨波, 戴秀玉, 周坚. [J]. *遗传学报*, 2001, 28(4): 372 - 378.
- [15] 章银良, 雄卫东, 张璐, 等. [J]. *郑州轻工业学院学报*, 2003, 18(2): 49 - 52.
- [16] Aisaka K, Masuda T. [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 131(8): 47 - 51.