

麦芽糖生物合成海藻糖的途径 及合成条件的研究

刘建龙¹, 谭海刚², 王瑞明², 杨连生¹

(1. 华南理工大学食品与生物学院, 广东广州 510641; 2. 山东轻工业学院食品生物学院, 山东济南 250014)

摘要:由土壤分离出一株能合成海藻糖的菌株 T₀₀₇, 经验证含有特异性地将麦芽糖转化为海藻糖的酶系。对麦芽糖浓度、反应时间、反应温度和反应转速等因素对麦芽糖转化率的影响进行了研究。结果表明, 麦芽糖浓度对转化率影响很微弱; 反应初期, 温度越高, 生成海藻糖的初始速度越快, 但是到反应末期, 反应速度减弱得也越快, 转化率反而不是很高; 反应转速对麦芽糖转化海藻糖有较大影响, 反应的最佳转速为 200r/min。

关键词: 海藻糖, 合酶, 生物合成途径, 麦芽糖

Abstract: A bacterium T₀₀₇, isolated from soil samples, showed the ability to producing trehalose from maltose by trehalose synthase. The reaction conditions for production of trehalose were studied in detail. The effects of the maltose concentration, incubation time and temperature, rotary speed were studied above all. The maltose concentration has very little influence on the conversion ratio. At the beginning of reaction the longer the time and the higher the temperature, the more trehalose. But the overall conversion ratio was less. The rotary speed could affect the conversion ratio of maltose and the best rotary speed was 200r/min.

Key words: trehalose; synthase; biosynthetic pathway; maltose

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2006)05-0161-03

海藻糖是由两分子葡萄糖通过 α -1, 1 糖苷键连接的非还原性双糖, 它对生物体和生物大分子具有非特异性的保护作用。海藻糖有多种生产方法^[1], 近年来酶法合成海藻糖的研究取得很大进展, 在细菌中发现了合成海藻糖的两类新酶系, 一类是海藻糖合酶 (trehalose synthase), 以麦芽糖为底物将其 α -1, 1

糖苷键转化为 α -1, 1 糖苷键生成海藻糖^[2,3]; 另一类是低聚麦芽糖基海藻糖生成酶 (MTSase) 和低聚麦芽糖基海藻糖水解酶 (MTHase), 可联合作用于淀粉直接转化为海藻糖^[4]。我国淀粉资源丰富, 酶法生产海藻糖有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株 T₀₀₇ 本课题组从土壤中自行筛选; 麦芽糖 北京益利精细化学品公司; 甲苯 莱阳精细化工厂; 海藻糖 本实验室从酵母中精制; 产酶培养基 麦芽糖 20g/L, 蛋白胨 5g/L, 牛肉膏 2g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L, K₂HPO₄ 1g/L, NaH₂PO₄ 1g/L, pH7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 生物转化途径验证 将 T₀₀₇ 菌株接 10 瓶, 每瓶含 100mL 产酶培养基, 45℃ 200r/min 摇床培养 96h, 5000r/min 离心 20min 收集菌体。取三份 0.5g 湿菌体分别悬浮于 9.8mL pH7.0 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液中, 加入 0.2mL 甲苯, 35℃ 200r/min 反应 2h。第一份加入 10mL 10% 葡萄糖溶液, 第二份加入 10mL 10% 麦芽糖溶液, 第三份加入 10mL 去离子水, 40℃ 200r/min 反应 10h 后沸水浴 10min 灭酶, 5000r/min 离心 20min 收集上清液。将三份反应液各点样 10 μ L 在薄板上进行定性分析。再将三份反应液各点样 10 μ L 在另一块薄板上, 以标准葡萄糖和从酵母中提取的精制海藻糖为对照, 以加去离子水的那一份做空白, 用薄层层析分离洗脱法定量测定另两份海藻糖的含量, 用 DNS 法测定底物为 5% 葡萄糖溶液和底物为去离子水中的葡萄糖含量。

1.2.2 薄层层析法 (TLC) 海藻糖的定量测定^[5] 硅胶板 8cm×18cm (自制), 展开剂为正丁醇:吡啶:2% 脲水=3:2:1 (v/v)。将从薄层板上划下的含有海藻糖的

收稿日期: 2005-09-14

作者简介: 刘建龙 (1961-), 男, 高级工程师, 在读博士, 主要从事生物发酵技术方面的研究。

作者简介: 山东省中青年科学家奖励基金项目 (03BS084)。

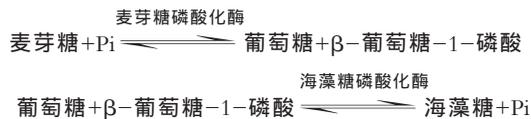
薄层放入 5mL 水中常温洗脱 6h, 将洗脱液定容至 10mL, 取洗脱液 2mL 放入试管中, 加入 8mL 0.2% 硫酸-蒽酮溶液, 沸水浴 2min, 在最大吸收波长下测定洗脱液的吸光值。

2 实验结果

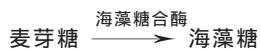
2.1 生物转化海藻糖的途径

以麦芽糖为底物生物合成海藻糖的途径有两条:

a. 通过麦芽糖磷酸化酶和海藻糖磷酸化酶以麦芽糖为底物合成海藻糖^[6]



b. 通过海藻糖合酶以麦芽糖为底物合成海藻糖^[2,3]



利用海藻糖合酶不作用于葡萄糖、麦芽三糖、麦芽寡糖、蔗糖、异麦芽糖、异麦芽寡糖等这一特点, 以葡萄糖、麦芽糖、去离子水为不同的底物, 通过对反应产物的定性定量分析对海藻糖的合成途径进行初步验证, 测定结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 不同底物反应体系的薄层层析定性分析结果

反应体系	薄层层析定性分析结果		
	葡萄糖	麦芽糖	海藻糖
1 底物为 5% 葡萄糖溶液	++	-	+
2 底物为 5% 麦芽糖溶液	+	++	++
3 底物为去离子水	+	-	+

注: - 无; + 有; ++ 大量。

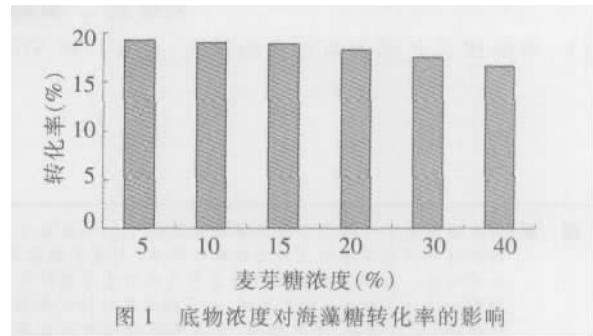
由表 1 和表 2 对反应体系 3 的定性定量分析结果可知, 在细胞的培养过程中胞内积累了部分海藻糖, 在反应过程中一部分海藻糖被海藻糖酶分解生成了葡萄糖。因为海藻糖测定时是以去离子水的那一份作为空白, 故它的测定值为 0。

由表 1 和表 2 对反应体系 1 的定性定量分析结果可知, 在反应过程中胞内积累的一部分海藻糖被海藻糖酶分解生成了葡萄糖。因为在这个反应体系中葡萄糖的含量较高, 抑制了海藻糖的分解, 使它的分解速度低于反应体系 3, 所以可检测到部分海藻糖的存在。但由于在溶液中的葡萄糖量也有少量增加, 可排除由葡萄糖转化生成海藻糖的可能性。由表 1

和表 2 对反应体系 2 的定性定量分析结果可知, 一部分麦芽糖被转化生成了海藻糖。通过对三个反应体系定性定量分析结果可知, 在 T_{007} 中以麦芽糖为底物合成海藻糖的途径是通过海藻糖合酶完成的。

2.2 影响海藻糖转化率的因素

2.2.1 底物浓度对海藻糖转化率的影响 用 pH6.8 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液将麦芽糖配成不同浓度的溶液, 在同样条件下与同体积细胞酶液 (pH6.8 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液中最佳处理条件处理) 作用一段时间, 用薄层层析分离洗脱法测定反应物中海藻糖的含量, 并计算转化率, 结果如图 1 所示。



由图 1 可知, 随底物浓度的不断升高, 海藻糖转化率略有下降, 但总的来说, 底物麦芽糖浓度对转化率影响很微弱, 这与资料上描述的海藻糖合酶转化麦芽糖生成海藻糖的产率高且不受底物麦芽糖浓度的影响基本一致。

2.2.2 反应时间及温度对海藻糖转化率的影响 用 pH6.8 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液将麦芽糖配成 10% 的溶液与等体积细胞酶液 (pH6.8 的 0.02mol/L 磷酸钠缓冲液中最佳处理条件处理) 分别在 32、40℃ 下保温不同时间后, 用薄层层析分离洗脱法测定反应物中海藻糖的含量, 并计算转化率, 结果如图 2

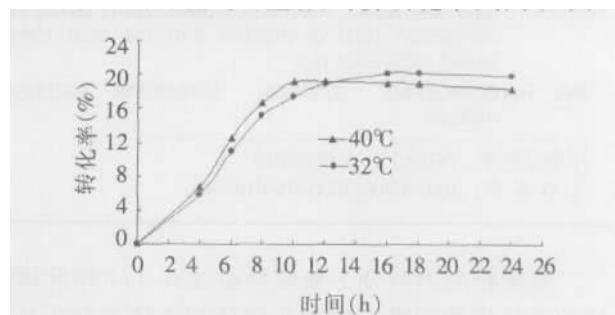


图 2 反应时间、温度对海藻糖转化率的影响

表 2 不同底物反应体系的薄层层析定量分析结果、

反应体系	薄层层析分离洗脱定量分析结果	
	葡萄糖 (溶液中)	海藻糖 (溶液中)
1 底物为 5% (1g) 葡萄糖溶液	1.002g	0.007g
2 底物为 5% (1g) 麦芽糖溶液	-	0.186g
3 底物为去离子水	0.007g	0

注: - 未检测。

所示。

由图2可知,总体上讲,反应的前12h,随反应时间的延长,海藻糖转化率都是不断增加的。无论在哪个反应温度,反应初期是海藻糖合酶与底物麦芽糖的充分接触时期,然后,海藻糖转化率进入一个快速增加期。但在这以后随反应时间的延长,由于底物麦芽糖浓度不断降低,产物海藻糖浓度不断增加,可逆反应趋近于平衡,另外,长时间保温及甲苯与海藻糖合酶接触时间增多,使酶活损失逐渐增大,这些因素共同作用使反应速度逐渐减弱,海藻糖转化率也趋于恒定。在32℃和40℃,海藻糖的最大转化率分别为20.2%和19.1%。反应温度越高,生成海藻糖的初始速度越快,但是到反应末期,反应速度减弱得也越快,海藻糖转化率反而不是很高。这可能是因为在同等时间内在40℃保温酶活的损失率要高于32℃,可逆反应率先趋近于平衡,产物积累减慢造成的。

另外,由图2中可以发现,无论在32℃还是40℃,反应后期,海藻糖转化率都会有微弱的下降,这可能是海藻糖酶对海藻糖分解的结果,而且40℃的分解作用要高于32℃。

2.2.3 反应转速对海藻糖转化率的影响 用pH6.8的0.02mol/L磷酸钠缓冲液将麦芽糖配成10%的溶液与同体积细胞酶液(pH6.8的0.02mol/L磷酸钠缓冲液中最佳处理条件处理)分别在不同反应转速40℃保温10h,用薄层层析分离洗脱法测定海藻糖生成量,并计算转化率,结果如图3所示。

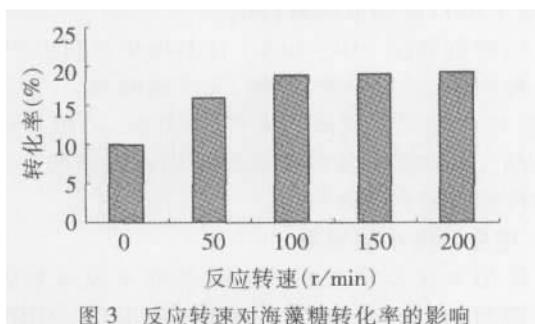


图3 反应转速对海藻糖转化率的影响

由图3可知,反应转速对海藻糖转化率有较大影响,在反应转速为200r/min时,海藻糖转化率达到最高,为19.2%。因为甲苯是通过溶解细胞壁的磷脂层来破坏细胞结构的,破壁后,细胞外形较完整,海藻糖合酶是分布于破壁细胞内和破壁细胞外的。要得到较高的海藻糖转化率就必须使麦芽糖与海藻糖合酶进行充分的接触,另外,在细胞内生成的海藻糖要使它尽快释放到胞外,转动引起的振荡就起了这么一个作用。

3 讨论

通过对所筛选的菌株T₀₀₇细胞酶反应体系定性定量分析研究,确定了该菌株是以麦芽糖为底物通过海藻糖合酶途径合成海藻糖的。对影响海藻糖转化率的因素进行了初步的研究,有关海藻糖较详细的转化机制、菌株酶活力的提高、酶的分离、浓缩、转化反应条件等需进一步研究和优化,而利用固定化酶连续转化海藻糖是下一步尝试的方向。

参考文献:

- [1] 刘建龙,王瑞明,杨连生.海藻糖的生产方法[J].现代化工,2005,25(1):23~25.
- [2] Saito K, Yamazaki H, Ohnishi Y, et al. Production of trehalose synthase from a basidiomycete[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998,50(2):193~198.
- [3] De Smet K A, Weston A, Brown I N, et al. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria[J]. Microbiology, 2002,146:199~208.
- [4] Maruta K, Nakada T, Kubota M, et al. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995,59(10):1829~1834.
- [5] 毛忠贵,朱利丹,邓绍荣.用薄层层析法分析海藻糖[J].无锡轻工业大学学报,1997,16(4):42~44.
- [6] Yoshida M, Nakamura N. Production of trehalose from starch by Maltose Phosphorylase from a strain of plesiomonas[J]. Starch,1997,49(1):29~26.

《食品工业科技》征订启事

凡通过邮局直接汇款至本刊编辑部订阅2006年杂志的读者,将免费获得全年《食品企业采购指南》。

本刊读者服务部随时办理《食品工业科技》的订阅工作,即使错过邮局征订期,本刊也可补寄当年散刊和过期刊合订本。2005年全年216元;2003、2004年全年180元;92、93、94、95年各年合订本,每册40元;96、97、98年各年合订本每年一册,每册50元;99年合订本60元一册;92年增刊20元一册;1995年增刊20元一册;99年增刊30元一册。

2006年《食品工业科技》杂志将超过300页!每册25元,全年300元。

邮局汇款:

地址:北京市永外沙子口路70号 100075

收款单位:《食品工业科技》读者服务部

联系电话:010-67275896

传真:010-87287944

银行汇款:

帐号:0200001509089299183

开户行:工商银行北京崇文区永定门分理处

收款单位:北京市食品工业研究所