

恶臭假单胞菌透性化细胞海藻糖合酶的酶反应工艺及其特性研究

徐汝意,马春玲,王腾飞,李丕武,王瑞明

(山东省微生物工程重点实验室,山东轻工业学院食品与生物工程学院,山东 济南 250353)

摘要: 用甲苯对恶臭假单胞菌细胞进行透性处理,研究了透性化细胞海藻糖合酶的酶反应工艺及其特性。研究表明,该细胞酶的最适反应条件为 pH7.8,转速 180 r/min,温度为 40 ℃,反应时间为 8 h。透性化细胞海藻糖合酶具有极强的底物特异性,激活离子有 Na^+ 、 K^+ ,重金属离子强烈抑制菌体生长和酶活。

关键词: 透性; 海藻糖合酶; 恶臭假单胞菌; 酶学特性

中图分类号:Q93-3;Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)07-0023-04

Characteristics of Trehalose Synthase from Permeablized *Pseudomonas putida* Cells and Its Enzymatic Reaction Process

XU Ruyi, MA Chunling, WANG Tengfei, LI Piwu and WANG Ruiming

(Shandong Provincial Key Lab of Microbial Engineering, College of Food and Bioengineering, Shandong Polytechnic University, Ji'nan, Shandong 250353, China)

Abstract: Trehalose is a novel functional disaccharide, produced mainly by enzyme method nowadays, while trehalose synthase is a novel enzyme which catalyzes maltose into trehalose by one step. In this study, the characteristics of trehalose synthase from permeablized *Pseudomonas putida* cells and its enzymatic reaction process after permeated by toluene were investigated. The optimum reaction conditions were summed up as follows: pH=7.8, rotating speed=180 r/min, temperature at 40 ℃, and reaction time=8 h. The activity of trehalose synthase could be enhanced by the addition of Na^+ and K^+ , but be inhibited by heavy metal ion. Meanwhile, trehalose synthase presented extremely strong substrate specificity.

Key words: permeability; trehalose synthase; *Pseudomonas putida*; enzymatic properties

目前,海藻糖生产方法主要分为两大类,有微生物抽提法和酶合成法。其中,用淀粉或者麦芽糖等原料酶法生产的海藻糖产量高、成本低,是未来工业化生产的趋势^[1]。本单位已经成功筛选了 1 株高产海藻糖合酶的菌株——恶臭假单胞菌 P06-2,利用该菌株的海藻糖合酶可以将麦芽糖一步转化为海藻糖。

P06-2 菌株的海藻糖合酶属于胞内酶,通常需先将细胞破碎,再经逐级分离纯化后才能使用。由于纯化操作复杂,每步纯化均有不同程度的酶活损失,酶的制备成本高,制约了其工业化应用。采用此技术,利用透性细胞海藻糖合酶生产海藻糖可以克服上述缺点^[2-3]。制备成透性细胞,并通过后期对细胞固定化,可实现连续生产、重

复利用、降低成本,是目前生产海藻糖的一条新途径,有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:恶臭假单胞菌 P06-2 菌株,本实验室选育并保藏。

培养基:葡萄糖 20 g,牛肉膏 10 g, K_2HPO_4 1 g, NaH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,蒸馏水 1000 mL。

培养条件:30 ℃,pH7,摇瓶培养 72 h。

主要试剂:麦芽糖,甲苯等。

主要设备:高效液相色谱仪,视差折光检测器,恒温

基金项目 山东省高新技术自主创新工程专项计划项目(2008Zz29)。

收稿日期:2011-04-01

作者简介 徐汝意(1985-),男,山东济南人,在读研究生,研究方向:微生物酶技术。

通讯作者 王瑞明,博士,教授,山东省微生物工程重点实验室主任,E-mail:ruiming3k@163.com。

优先数字出版时间 2011-04-19,地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110419.1641.003.html?uid=>。

摇床,低温高速离心机。

1.2 方法

1.2.1 透性化细胞海藻糖合酶的制备

培养结束后,所得发酵液于 5000 r/min 离心 20 min,收集菌体;用 0.01 mol/L、pH7.0 的磷酸钠缓冲液洗涤菌体,将菌体配成 20%浓度的菌悬液,加入 2%的甲苯混匀,在 35℃透性处理 2 h,制得透性化细胞海藻糖合酶。

1.2.2 酶活的测定

量取 5 mL 透性化细胞海藻糖合酶,加入 5 mL 10%(w/v)的麦芽糖,40℃、180 r/min 摇床振荡反应 8 h后,混合液于 100℃沸水浴加热 20 min 终止酶反应。待其冷却后,4800 r/min 离心 20 min,取上清液,测定生成的海藻糖含量。

酶活力单位定义:在上述条件下,每 1 h 生成 1 μ mol 海藻糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.3 海藻糖含量的测定

使用高效液相色谱法测定样品中海藻糖的含量。

流动相为乙腈:水=7:3;流速:1 mL/min;层析柱选择氨基柱;选用视差折光检测器。

2 结果与分析

2.1 透性化细胞海藻糖合酶的酶反应工艺

2.1.1 酶反应最适 pH

酶反应温度 40℃,振荡转速 160 r/min,反应 8 h 时,在不同的 pH 下测定透性细胞海藻糖合酶的活性,结果见图 1。

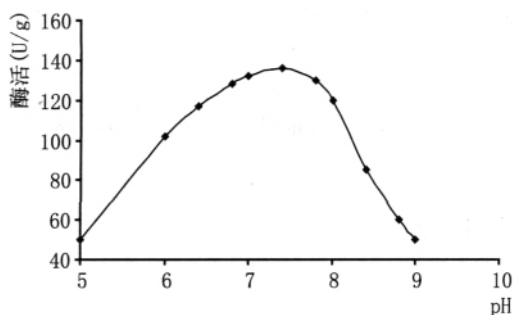


图1 pH对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

由图 1 可见,酶反应的最适 pH 范围为 7.0~8.0, pH7.4 时,酶活达到最大。当 pH<6.8 或 pH>7.8 时,酶活迅速下降。这与哈尔滨工业大学薛璐的研究基本一致^[4]。说明该细胞酶的 pH 耐受范围较窄,在酶反应时应注意控制反应体系的 pH 值。反应最适 pH 为 7.4。

2.1.2 酶反应最佳转速

在酶反应温度 40℃,缓冲液体系 pH7.4 时,分别以不同的振荡转速 80 r/min、100 r/min、120 r/min、140 r/min、160 r/min、180 r/min、200 r/min、220 r/min 反应 8 h,测定透性细胞海藻糖合酶的活力,结果见图 2。

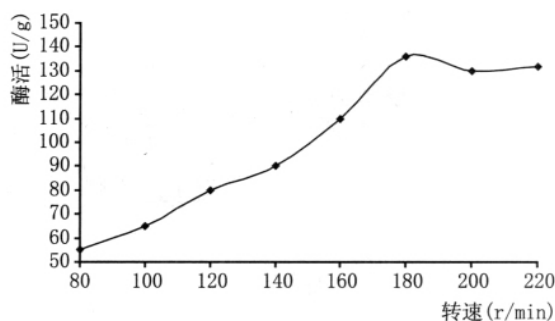


图2 不同转速对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

由图 2 可见,随着振荡转速的提高,透性化细胞海藻糖合酶的活力先升高,后保持不变。这是由于充分振荡有利于透性菌体与麦芽糖的混匀,有利于酶促反应的高效进行。酶解反应转速 180 r/min 时,酶活力最高,故选择 180 r/min 为最佳转速。

2.1.3 酶反应最适温度

在不同温度下测定透性细胞海藻糖合酶的活力,结果见图 3。

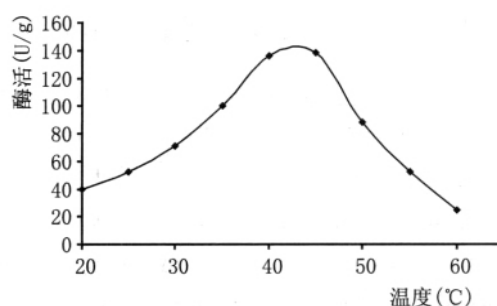


图3 温度对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

由图 3 可见,酶反应的适合温度较广,在 35~45℃间有较高酶活,当温度小于 35℃或大于 45℃时,酶活下降较快,可见该酶适合于中温反应。酶活在 40℃和 45℃时基本相同,工业生产中反应体系温度较高,为了降低冷却水等能源消耗,可以选择 45℃为最适酶反应温度;实验室阶段通过摇床振荡反应,产热小,为了节约能耗,可以选择 40℃为最适酶反应温度。

这与马莺^[2,4]的研究结果不同,她采用冻干的恶臭假单胞菌透性化细胞海藻糖合酶进行反应,指出该细胞酶最佳的反应温度是 35℃,在 40℃酶活较低,45℃时只有最高酶活的 60%。这可能与细胞酶在冻干条件下保存,酶的结构改变有关。

2.1.4 酶反应最适时间

在反应温度 40℃,pH7.4 的磷酸钠缓冲液反应体系下,反应不同的时间,测定透性细胞海藻糖合酶的活力,结果见图 4。

酶促反应一般都是可逆的,反应时间过短,酶活力不能充分的体现,生成物较少;时间过长,目的产物又会逆

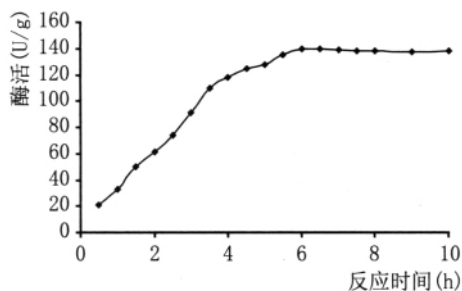


图4 不同酶反应时间对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

向转化成底物。本实验透性细胞海藻糖合酶的活力在0~4 h 间迅速增长,4~6 h 间增长缓慢,6 h 开始趋于平衡,说明此细胞酶的酶解时间比较短,在6 h 就达到酶促反应的平衡。6 h 后酶活稍有下降,经 HPLC 测定,有微量麦芽糖生成,说明了酶促反应的可逆性。选择酶反应最适时间为6 h。

2.1.5 麦芽糖浓度对海藻糖转化率的影响

取5%、10%、15%、20%、25%和30%几个不同浓度的麦芽糖溶液,在上述优化酶反应条件下分别加入等量的透性细胞海藻糖合酶,测定酶活力,结果见图5。

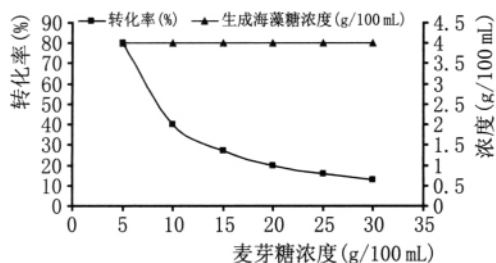


图5 不同麦芽糖浓度对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

图5结果表明,随着麦芽糖浓度的增加,催化生成的海藻糖浓度基本不变,而海藻糖对麦芽糖的转化率逐渐下降。说明该细胞酶产物生成量与底物量关系较小,不论底物浓度多少,产物量变化极小。当麦芽糖浓度升高,海藻糖转化率明显降低,说明透性细胞海藻糖合酶的活力受到底物浓度的明显抑制。

2.1.6 透性化细胞海藻糖合酶的反应工艺条件优化

在转速一定的条件下,对4个影响海藻糖产率的因素,即反应温度(A)、pH 值(B)、反应时间(C)及麦芽糖溶液浓度(D),采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行酶反应工艺条件的优化考察。实验设计及结果见表1和表2。

表1 $L_9(3^4)$ 正交设计

水	因素			
平	A:温度(℃)	B:pH	C:时间(h)	D:麦芽糖溶液浓度(%)
1	40	7.0	6	8
2	42	7.4	7	9
3	45	7.8	8	10

实验数据的方差分析表明,本实验所选用的因素除

表2 酶反应工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验方案及结果

实验号	工艺因素				转化率 (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	57.65
2	1	2	2	2	66.21
3	1	3	3	3	83.72
4	2	1	3	2	81.15
5	2	2	1	3	54.53
6	2	3	2	1	74.72
7	3	1	2	3	53.20
8	3	2	3	1	57.13
9	3	3	1	2	55.46
K1	207.58	192	167.64	189.5	583.77
K2	210.4	177.87	194.13	202.82	
K3	165.79	213.9	222	191.45	
k1	69.19	64	55.88	63.17	
k2	70.13	59.29	64.71	67.61	
k3	55.26	71.3	74	63.81	
R	14.87	12.01	18.12	4.44	

主次 C>A>B>D

麦芽糖溶液浓度外均对海藻糖的转化产率有显著影响。各因素间差异显著。由极差分析可知,各因素对海藻糖产率影响的主次顺序为:C>A>B>D,即反应时间>反应温度>pH>麦芽糖溶液浓度。麦芽糖浓度影响最小,与2.1.5结果相符。根据正交实验确定的最佳反应工艺为: $A_1B_3C_3D_3$,即反应温度为40℃,反应pH 7.8,反应时间为8 h,麦芽糖溶液浓度10%,此时麦芽糖转化率大于80%。

2.2 透性化细胞海藻糖合酶的特性研究

2.2.1 金属离子对酶活的影响

向酶反应体系里分别加入浓度为0.02 mol/L的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} ,测定酶活力,以不加金属离子的透性细胞海藻糖合酶的酶活为对照,测得酶活力为100%,计算相对酶活,结果见图6。

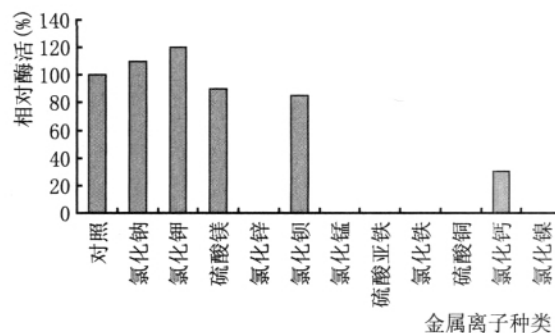


图6 金属离子对透性细胞海藻糖合酶活力的影响

由图6可见,氯化锰、硫酸铜、氯化镍、氯化锌、硫酸亚铁、氯化铁加入酶液后,菌体马上出现变性,产生絮沉,相对酶活为0,说明上述重金属离子对酶活有强烈抑制作用。 Na^+ 、 K^+ 对该细胞酶有激活作用,说明它们可能是酶的活性中心或辅酶、辅基的必要成分; Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活

力有明显抑制作用, Mg^{2+} 微弱抑制该酶的活力。

2.2.2 透性细胞海藻糖合酶的底物特异性研究

将透性细胞海藻糖合酶分别与 5 % 终浓度的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、糊精、可溶性淀粉溶液在最适条件下反应 6 h, 用 HPLC 测定反应混合液中海藻糖的含量, 结果见表 3。

表 3 透性细胞海藻糖合酶的底物特异性 (%)

底物	海藻糖	底物	海藻糖
葡萄糖	0	乳糖	0
果糖	0	糊精	0
麦芽糖	4	可溶性淀粉	0
蔗糖	0		

由表 3 可知, 透性化细胞海藻糖合酶能以麦芽糖为底物, 将其转化为海藻糖, 而对其他 5 种糖类均不起作用, 说明该酶具有极强的底物特异性。另外, 张峻等对亚栖热菌透性化细胞海藻糖合酶的底物特异性进行研究^[5]指出, 该细胞酶对麦芽糖和海藻糖具有部分水解作用, 可以催化 2 种糖转化成葡萄糖。本实验并没有出现类似现象, 这可能由于海藻糖合酶的同源性较差, 不同菌种的性质不同导致。

2.2.3 透性化海藻糖合酶的稳定性

将透性化海藻糖合酶分别置于室温、4 °C、-20 °C 保存。每隔一段时间测定 1 次酶活。观察酶活变化规律, 结果见表 4。

表 4 透性细胞海藻糖合酶的保存稳定性

保存	酶活力 (U/g)				
	0	7 d	14 d	21 d	30 d
室温	140.01	112.46	72.67	52.37	30.64
4 °C	140.01	130.72	117.43	105.29	91.18
-20 °C	140.01	134.39	121.92	112.26	110.52

将透性化海藻糖合酶保存于 -20 °C 时, 30 d 酶活下降不大, 虽然冷冻引起少量酶活的丢失, 但酶活力保存率

仍可达 78.9 %, 保存 7 d 酶活保存率高达 94.1 %。当保存于 4 °C 时, 30 d 酶活力保存率仅为 65.1 %, 保存 7 d, 酶活力保存率达 93.4 %。当置于室温保存时, 透性化海藻糖合酶明显不如前两种条件下稳定, 保存 7 d 酶活力有显著下降, 至 30 d 时酶活已下降很多, 酶活保存率仅为 21.9 %。因此, 透性化海藻糖合酶在室温下保存很不稳定, 应尽量置于低温下保存, 保存时间最好不要超过 7 d。

3 结论

通过对透性细胞海藻糖合酶的酶反应工艺优化并研究了透性细胞海藻糖合酶的性质, 得到了酶催化反应的最适 pH7.8, 最佳转速为 180 r/min, 最适酶反应温度为 40 °C, 最适反应时间为 8 h。

透性细胞海藻糖合酶的激活离子有 Na^+ 、 K^+ , 重金属离子对菌体生长和酶活有强抑制性, Mg^{2+} 有利于菌体生长, 但对菌体酶活有轻微的抑制。透性细胞海藻糖合酶有极强的底物特异性, 只能单一的催化麦芽糖转化为海藻糖。在室温下保存很不稳定, 应尽量置于低温下保存, 保存时间最好不要超过 7 d。

参考文献:

- [1] 尤新. 淀粉精品生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997: 1295-3111.
- [2] 薛璐, 马莺. 透性化海藻糖合酶特性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 26-29.
- [3] 张峻, 陈晓云, 齐欣, 等. 透性化细胞海藻糖合酶的制备及其性质研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2005, 38(5): 93-96.
- [4] Ying Ma, Lu Xue, DaWen Sun, Characteristics of trehalose synthase from permeabilized *Pseudomonas putida* cells and its application in converting maltose into trehalose[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(2): 342-347.
- [5] Yan Zhou, Qipeng Yuan, HuiLing Gao, Production of trehalose by permeabilized *Micrococcus* QS412 cells[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43: 137-141.
- [3] 李华, 刘丽丽, 李娟. 酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离[J]. 酿酒科技, 2008(6): 22-24.
- [4] 金由辛, 等译. 精编分子生物学实验指南[M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008: 1104.
- [5] 王岳五, 译. 酵母解剖[M]. 天津: 南开大学出版社, 1990: 169-180.
- [6] 霍克克, 等译. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2009: 121.
- [7] 王丽丽, 仪宏, 侯建革, 等. 环境诱导酵母产生子囊孢子的营养条件研究[J]. 酿酒, 2003, 30(6): 30-32.
- [8] Schiller M.D., et al. Molec[J]. Gen. Genet. 1977, 156: 71-78.
- [9] 丁友昉, 陈宁. 普通微生物遗传学[M]. 天津: 南开大学出版社, 1990: 193-211.

(上接第 22 页)

不能产孢; 管囊酵母是强烈的同宗结合型菌株, 子囊孢子在培养过程中很容易发生二倍体化, 尝试添加 Triton X-100 或胰蛋白酶处理, 但作用均不明显, 分离不到单倍体。

参考文献:

- [1] Schneider H., Wang P. Y., et al. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*[J]. Biotechnology Letters, 1981, 3: 89-92.
- [2] James Allen P., Zahab Diana M.. A genetic system for *Pachysolen tannophilus*, a pentosefermenting yeast[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128: 2291-2301.