

文章编号:1009-038X(2004)03-0015-04

极地微生物产海藻糖合成酶菌株的筛选

徐 骥¹, 高 媛¹, 段作营¹, 陈 波², 俞 勇², 毛忠贵^{1*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 中国极地研究中心, 上海 200129)

摘 要: 来源于极地的微生物经过筛选, 得到能产海藻糖合成酶的耐冷菌株 S1 和 S2, 分别用 TLC、DNS 和 HPLC 的方法确证其酶反应的产物为海藻糖。以质量分数 1% 麦芽糖为底物, S1 粗酶液能将麦芽糖转化为海藻糖, 并且没有明显的葡萄糖生成, 在 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液下 15 ℃ 反应 48 h, 经过 HPLC 测定转化率最高达到 75.2%。

关键词: 海藻糖合成酶; 极地微生物; 耐冷菌; 海藻糖; 麦芽糖

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Screening of Strains Producing Trehalose Synthase from Microorganism in Polar Region

XU Ji¹, GAO Yuan¹, DUAN Zuo-ying¹, CHEN Bo², YU Yong², MAO Zhong-gui^{1*}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Polar Research Institute, Shanghai 200129, China)

Abstract: Two strains, S1 and S2, which can produce trehalose synthase, were screened from microorganism in polar region. The product of enzymatic reaction was identified to be trehalose by the method of TLC, DNS and HPLC. The crude enzyme of S1 was mixed with 1% maltose solution, then the mixture was subject to an enzymatic reaction at 15 ℃ and pH 7.0 for 48 h. The conversion rate of maltose into trehalose was 75.2%, which was equivalent to the report of Hayashibara Co., Japan.

Key words: trehalose synthase; polar microorganism; psychrotrophs; trehalose; maltose

海藻糖是由 2 个吡喃环葡萄糖分子以 $\alpha, \alpha-1, 1$ 键构成的非还原性双糖, 目前在食品工业、农业、医药工业以及分子生物学等领域有广泛的应用。目前海藻糖生产方法主要为酶法转化, 海藻糖合成酶是其中一类比较有应用价值的酶, 它能以麦芽糖为底物, 一步将麦芽糖转化为海藻糖, 是一类非磷酸化酶^[1]。

低温微生物在地球上分布广泛, 尤其在极地地区。在这些低温微生物中, 最适生长温度 ≤ 15 ℃, 上限生长温度 ≤ 20 ℃, 下限生长温度 ≤ 0 ℃ 的微生物称为专性嗜冷菌 (Psychrophiles); 对于那些能在 ≤ 5 ℃ 条件下生长, 不论其最适及上限生长温度的微生物称为耐冷菌 (Psychrotrophs)。低温微生物相对于常温菌和嗜热菌的酶具有其特殊性: 热敏感,

收稿日期: 2003-09-15; 修回日期: 2003-10-13。

作者简介: 徐骥 (1978-), 男, 江苏常州人, 生物化工硕士研究生; * 通讯作者。

最适反应温度较低,酶分子结构一般具有较高的柔性,一般具有较高的 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 值, K_m 值较低,对底物的亲和力较强,提高了对底物的利用效率.这些特性使低温菌在低温条件下能保持正常的代谢活动^[2~6].

普遍认为,海藻糖是生物体在极端环境下为抵抗不良生存环境而产生的应激产物.国内外对海藻糖合成酶的研究主要集中在常温菌和嗜热菌中,对极端低温环境中微生物产海藻糖合成酶的报道研究较少.极地微生物种类繁多,本实验研究了从极地微生物中筛选得到产海藻糖合成酶的菌株^[1,7~10].

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 由中国极地研究中心提供从南极采集的 60 株菌样.

1.1.2 试剂和仪器 葡萄糖、麦芽糖为上海化学试剂公司生产,海藻糖购自日本林原公司,色谱用的标样均购自 Sigma Chemical Co..

1.2 方 法

1.2.1 微生物的培养 筛选培养基(质量分数/%) : 麦芽糖 2, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.1, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 柠檬酸三钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 自然 pH 值. 摇床 200 r/min, 15 °C 培养 60 h.

1.2.2 菌体收集和粗酶制备 10 000 g 离心 10 min 收集菌体, 采用 50 mmol/L 的磷酸缓冲(pH 7.0)洗涤 2~3 次, 按每 1 g 湿重细胞加 10 mL 的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)进行悬浮, 超声破壁后 10 000 g 离心 10 min 收集上清液.

1.2.3 酶反应 将粗酶液和质量分数 2% 的麦芽糖溶液等体积混合, 15 °C 150 r/min 振荡 48 h, 反应结束后密闭沸水浴 10 min, 冷却后 12 000 r/min 离心取上清液, 微滤后测定.

1.2.4 薄层色谱(TLC)检测 方法参见文献[11], 其中麦芽糖标样的质量浓度为 1 g/dL, 海藻糖标样的质量浓度为 2 g/dL.

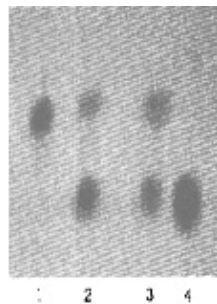
1.2.5 3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原糖测定 方法参见文献[12].

1.2.6 HPLC 检测 高效液相色谱仪, 主要由 Waters510 泵、2410 示差折光检测器、740 积分仪以及 7725 进样阀组成. 色谱条件: 使用 Waters Spherisorb S 5NH₂ (4.6 mm×150 mm), 流动相为 V(乙腈): V(水) = 72 : 28, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C.

2 结果与分析

2.1 TLC 法对产海藻糖合成酶菌的初步筛选

TLC 法主要依据不同的糖在硅胶薄层上随溶剂展开有不同的迁移率进行鉴别, 适合本实验中对产海藻糖合成酶菌的初步筛选. 实验中使用硫酸-甲醇显色剂, 通过显色时海藻糖位置斑点的深浅进行选择. 经过该方法选择后, 发现大部分极地微生物菌都有将麦芽糖转化为另外一种糖的能力, 该糖与海藻糖标准样有着相同的迁移率. 从 60 株原始菌中最终得到 2 株理想的菌株 S1 和 S2, 其 TLC 结果见图 1.



1. 麦芽糖标样; 2. S1 酶反应样品; 3. S2 酶反应样品; 4. 海藻糖标样

图 1 S1 和 S2 酶反应的 TLC 图

Fig. 1 The TLC analysis of enzymatic reaction sample of S1 and S2

从 TLC 分析可以看出, 2 株菌的酶反应后生成一种糖, 该糖和海藻糖标样有着相同的迁移率. 从图 1 中可以看出, S1 的反应结果中大部分为该糖, 有少量麦芽糖残.

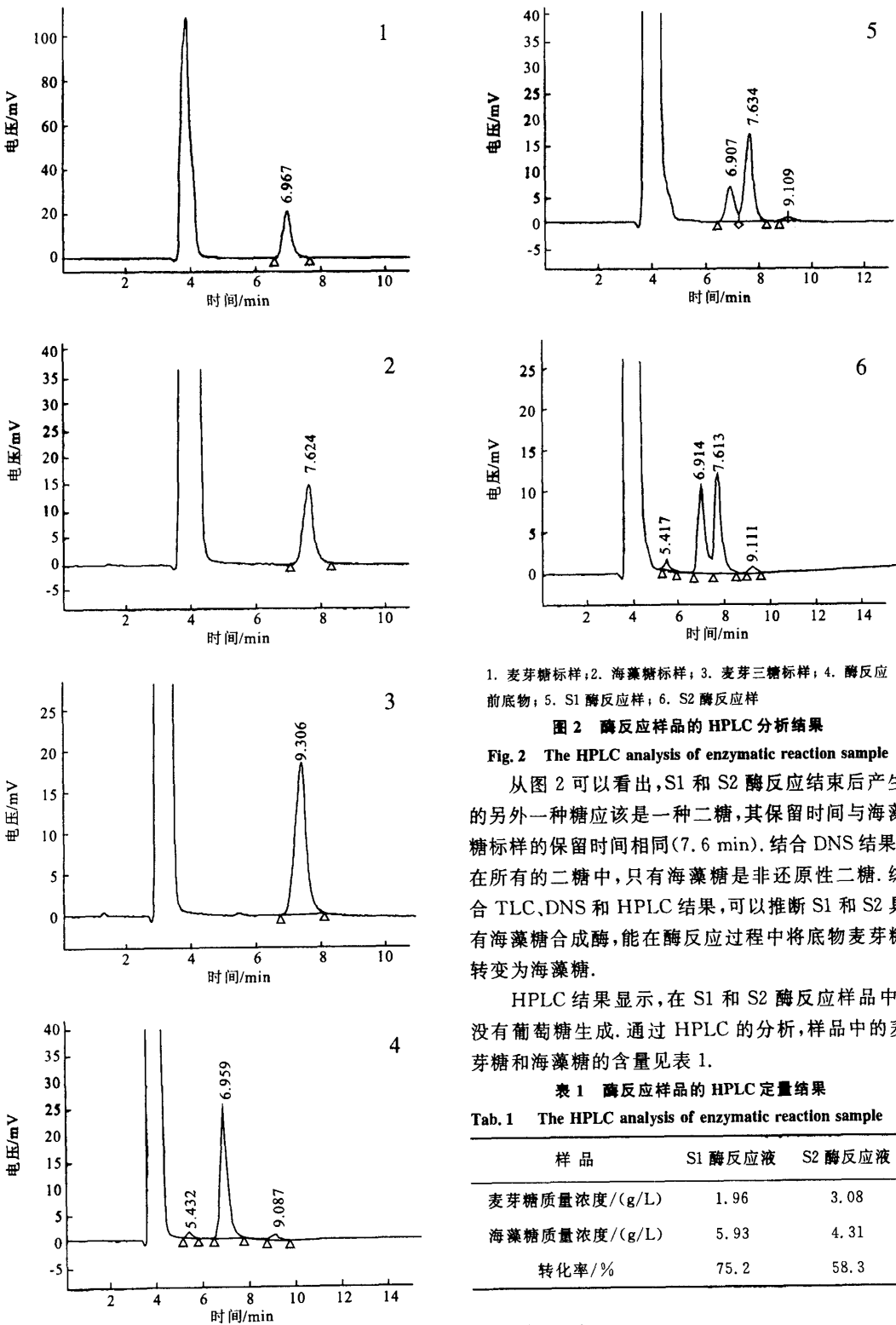
2.2 DNS 法对酶反应结果的分析

根据 TLC 初步筛选结果, 进一步以 S1 和 S2 为对象, 采用 DNS 方法对 2 个酶反应样品进行分析. S1 菌株的酶反应液中, 还原糖的质量浓度(g/dL)从反应前的 0.968 降至反应后的 0.293, S2 菌株的酶反应液中, 还原糖的质量浓度(g/dL)从反应前的 0.968 降至反应后的 0.462.

DNS 测定的是反应体系中的还原糖. 实验结果发现, 酶反应前后的还原糖含量降低, 结合 TLC 结果可以推测, 酶反应结果生成的物质可能是一种非还原性糖.

2.3 HPLC 对酶反应结果的分析

将 S1, S2 酶反应液和酶反应前的样品分别经过 HPLC 检测, 对照标样, 结果见图 2.



1. 麦芽糖标样; 2. 海藻糖标样; 3. 麦芽三糖标样; 4. 酶反应前底物; 5. S1 酶反应样; 6. S2 酶反应样

图 2 酶反应样品的 HPLC 分析结果

Fig. 2 The HPLC analysis of enzymatic reaction sample

从图 2 可以看出, S1 和 S2 酶反应结束后产生的另外一种糖应该是一种二糖, 其保留时间与海藻糖标样的保留时间相同(7.6 min). 结合 DNS 结果, 在所有的二糖中, 只有海藻糖是非还原性二糖. 综合 TLC、DNS 和 HPLC 结果, 可以推断 S1 和 S2 具有海藻糖合成酶, 能在酶反应过程中将底物麦芽糖转变为海藻糖.

HPLC 结果显示, 在 S1 和 S2 酶反应样品中, 没有葡萄糖生成. 通过 HPLC 的分析, 样品中的麦芽糖和海藻糖的含量见表 1.

表 1 酶反应样品的 HPLC 定量结果

Tab. 1 The HPLC analysis of enzymatic reaction sample

样 品	S1 酶反应液	S2 酶反应液
麦芽糖质量浓度/(g/L)	1.96	3.08
海藻糖质量浓度/(g/L)	5.93	4.31
转化率/%	75.2	58.3

3 结 论

自然界中由 2 个吡喃环葡萄糖分子以 α -葡萄

糖苷键连接而成的双糖有5种,除海藻糖和麦芽糖外还有曲二糖($\alpha, \alpha-1, 2$ 键)、黑曲二糖($\alpha, \alpha-1, 3$ 键)和异麦芽糖($\alpha, \alpha-1, 6$ 键)。在筛选野生菌中,酶反应产物的正确鉴定非常重要。实验综合 TLC、HPLC 和 DNS 3 种方法对多株极地微生物的酶反应液糖组分进行分析,结果表明,极地细菌 S1 可以合成一种将麦芽糖转化为海藻糖的海藻糖合成酶。据文献报道,该酶还可以催化上述反应的逆反应,即将海藻糖转化为麦芽糖。因此,实验以海藻糖为底物,进行了进一步的酶反应实验验证。TLC 结果显示,有少量麦芽糖形成,用 DNS 法测定,有质量分数 19% 的海藻糖转化成了麦芽糖,这也进一步证明了 S1

菌具有产生海藻糖合成酶的能力。日本林原公司报道从菌株 *Pimelobacter sp.* R48 纯化得到的海藻糖合成酶在底物质量分数为 2.5%、酶反应温度在 20℃、反应时间 48 h 下,转化率为 77.0%,并且伴随有质量分数 5.9% 的葡萄糖生成^[9]。将 S1 与其比较,发现 S1 的粗酶在 15℃ 下 75.2% 的转化率与之接近,但并没有明显的葡萄糖生成。根据文献^[10]报道,海藻糖合成酶的转化率与酶反应温度呈反比,温度越低转化率越高。鉴于 S1 属于耐冷菌,其低温生物学属性将非常有利于进一步研究海藻糖合成酶。

参考文献:

- [1] 荣绍丰,张海平,段作营,等.合成海藻糖的新型非磷酸化酶[J].生物工程进展,2001,21(2):54-57.
- [2] 辛明秀,马延和.嗜冷菌和耐冷菌[J].微生物学通报,1996,26(2):155-156.
- [3] Feller G, Zekhnini Z, Lamotte-Brasseur J, et al. Enzymes from cold-adapted microorganisms[J]. *Eur J Biochem*. 1997, 244:186-191.
- [4] 辛明秀,周培瑾.低温微生物研究进展[J].微生物学报,1998,38(5):400-403.
- [5] 唐兵,唐晓峰,彭珍荣.嗜冷菌研究进展[J].微生物学杂志,2002,22(1):51-53.
- [6] 张晓军,姚檀栋,马晓军.极地深层冰川微生物研究的现状与意义[J].极地研究,2000,12(4):269-274.
- [7] 薛璐,马莺.透性海藻糖合酶的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(1):16-18.
- [8] 谢慧敏,张红缨.长白山天池水中一株产海藻糖菌种的鉴定[J].吉林大学自然科学学报,1999,(3):77-80.
- [9] Tomoyuki Nishimoto, Masayuki Nakano, Tetsuya Nakada, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Primelobacter sp.* R48 [J]. *Biosci Biotech Biochem*. 1996,60(4):640-644.
- [10] Tomoyuki Nishimoto, Hiroto Chaen, Toshiyuki Sugimoto, et al. Maltose-trehalose converting enzyme, and preparation and uses thereof[P]. 美国专利:USP 6090792, 2000-07.
- [11] 毛忠贵,朱利丹,邓绍荣.用薄层层析法分析海藻糖[J].无锡轻工大学学报,1997,16(4):42-44.
- [12] 北京大学生物化学教研室.生物化学实验指导[M].北京:人民教育出版社,1979.

(责任编辑:杨勇)