

海藻糖微生物酶法合成机制的研究*

王绍校¹ 吴 襟^{2**} 高春霄² 陈 萌² 蔡同一¹ 张树政²

(中国农业大学食品学院 北京 100094)¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 来源于嗜酸热古菌芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12 的麦芽寡糖基海藻糖合酶 (MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶 (MTHase) 基因在大肠杆菌中获得表达。将获得纯化的两个酶, 分别以麦芽寡糖和淀粉为转化底物, 在 pH5.5, 60℃ 条件下合成海藻糖。从反应产物分析结果可知, 两个酶合成海藻糖时能利用的最小底物是麦芽四糖, 海藻糖产率与麦芽寡糖链长正相关。同时还发现两个酶都具有轻微的 α -1, 4-葡萄糖苷酶活性, 能在麦芽寡糖还原末端水解 α -1, 4 糖苷键, 生成葡萄糖分子, 其反应最小底物分别是麦芽三糖和四糖。推测海藻糖合成酶可能有两个不同的催化活性中心。

关键词: 海藻糖, 麦芽寡糖基海藻糖合酶, 麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解酶, 合成, 淀粉

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0036-05

* 国家“863”课题资助项目 (No. 2001AA214141)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA214141)
微生物资源国家重点实验室课题资助项目 (No. 021024)

** 联系人

收稿日期: 2002-04-10, 修回日期: 2002-05-31

STUDY ON SYNTHESIS OF TREHALOSE BY A NOVEL MICROBIAL ENZYMATIC SYSTEM

WANG Shao-Xiao¹ WU Jin^{2*} GAO Chun-Xiao² CHEN Meng² CAI Tong-Yi¹ ZHANG Shu-Zheng²^(School of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094)¹^(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080)²

Abstract: The genes of maltotigosyl trehalose synthase (MTSase) and maltotigosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase) from *Sulfolobus shibatae* B12 were expressed in *E. coli*. Trehalose was synthesized from starch by purified MTSase and MTHase at pH 5.5 and 60°C. Based on a detailed analysis of the reaction products, it was verified that the minimal maltotigosaccharide as substrates for the enzymes were maltotetraose in the reaction. The yield of trehalose increased with substrate length. At the same time, low α -1, 4 glycosidase activity were found in two enzymes, which hydrolyzed α -1, 4 glycosidic linkage of the reducing end of maltotigosaccharide or starch. Glucoses were produced as by-products. The minimal maltotigosaccharide as substrates for glycosidases were maltotriose and maltotetraose in the hydrolysis reaction, respectively. It was presumed there were two different active centers in the MTSase.

Key words: Trehalose, MTSase, MTHase, Synthesis, Starch

海藻糖 (trehalose), 是一种由两个葡萄糖残基经 α -1, 1 糖苷键连接而成的非还原二糖, 具有很高的稳定性, 对多种生物大分子和细胞膜有显著的保护作用, 用途十分广泛。如海藻糖可以用来替代血浆作为疫苗等生物制品的稳定剂, 使生物制品能在常温存放, 大大节省了其冷藏费用。海藻糖还具有适宜的甜度和低还原性, 不会与蛋白发生美拉德 (Maillard) 反应, 产生糠醛等影响食品味道的成分, 因此可作为一种优良的食品添加剂。海藻糖的良好保湿性能, 可用于皮肤化妆品, 作为洁肤剂、皮肤保湿剂、紫外吸收剂, 也被用于制药, 作为药物糖衣和外伤治疗膏药的保湿剂。^[1,2]

海藻糖的制备方法目前主要有微生物抽提法、发酵法和酶法。酶法主要是通过 MTSase 和 MTHase 的协同作用, 直接水解淀粉生产海藻糖。该方法是至今各种海藻糖生产方法中最有发展前途的一种^[1]它的出现为海藻糖的大规模工业化生产奠定了可靠基础。

本实验室已克隆了芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12 的 MTSase 和 MTHase 的基因并在大肠杆菌中进行了表达, 对两种重组酶进行纯化后, 作用于淀粉, 得到了海藻糖。由于 MTSase 和 MTHase 的基因来源于嗜酸热古菌, 两个酶具有很好的耐热耐酸性, 可以在较高的温度和较低的 pH 值条件下催化反应, 能防止生产中淀粉的老化、杂菌的污染, 增加了反应底物浓度, 加快了反应速度, 提高了生产效率, 在未来有很好的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养方法

产 MTSase 的 BL21 和 MTHase 的 DH53 基因工程菌均为本实验室构建。构建方法和培养方法分别见文献 [4, 5]。

1.2 主要试剂

葡萄糖为北京化工厂产品, 海藻糖、麦芽糖、麦芽三、四、五、六、七糖、直链淀粉、支链淀粉为美国 SIGMA 公司产品, 麦芽糊精为北京酱油厂产品、普鲁兰酶为诺维信公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 酶活力的测定: MTSase: 测定方法见文献^[4], MTHase: 测定方法见文献 [5]。

STUDY ON SYNTHESIS OF TREHALOSE BY A NOVEL MICROBIAL ENZYMATIC SYSTEM

WANG Shao-Xiao¹ WU Jin^{2*} GAO Chun-Xiao² CHEN Meng² CAI Tong-Yi¹ ZHANG Shu-Zheng²^(School of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094)¹^(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080)²

Abstract: The genes of maltotigosyl trehalose synthase (MTSase) and maltotigosyl trehalose trehalohydrolase (MTHase) from *Sulfolobus shibatae* B12 were expressed in *E. coli*. Trehalose was synthesized from starch by purified MTSase and MTHase at pH 5.5 and 60°C. Based on a detailed analysis of the reaction products, it was verified that the minimal maltotigosaccharide as substrates for the enzymes were maltotetraose in the reaction. The yield of trehalose increased with substrate length. At the same time, low α -1, 4 glycosidase activity were found in two enzymes, which hydrolyzed α -1, 4 glycosidic linkage of the reducing end of maltotigosaccharide or starch. Glucoses were produced as by-products. The minimal maltotigosaccharide as substrates for glycosidases were maltotriose and maltotetraose in the hydrolysis reaction, respectively. It was presumed there were two different active centers in the MTSase.

Key words: Trehalose, MTSase, MTHase, Synthesis, Starch

海藻糖 (trehalose), 是一种由两个葡萄糖残基经 α -1, 1 糖苷键连接而成的非还原二糖, 具有很高的稳定性, 对多种生物大分子和细胞膜有显著的保护作用, 用途十分广泛。如海藻糖可以用来替代血浆作为疫苗等生物制品的稳定剂, 使生物制品能在常温存放, 大大节省了其冷藏费用。海藻糖还具有适宜的甜度和低还原性, 不会与蛋白发生美拉德 (Maillard) 反应, 产生糠醛等影响食品味道的成分, 因此可作为一种优良的食品添加剂。海藻糖的良好保湿性能, 可用于皮肤化妆品, 作为洁肤剂、皮肤保湿剂、紫外吸收剂, 也被用于制药, 作为药物糖衣和外伤治疗膏药的保湿剂。^[1,2]

海藻糖的制备方法目前主要有微生物抽提法、发酵法和酶法。酶法主要是通过 MTSase 和 MTHase 的协同作用, 直接水解淀粉生产海藻糖。该方法是至今各种海藻糖生产方法中最有发展前途的一种^[1]它的出现为海藻糖的大规模工业化生产奠定了可靠基础。

本实验室已克隆了芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12 的 MTSase 和 MTHase 的基因并在大肠杆菌中进行了表达, 对两种重组酶进行纯化后, 作用于淀粉, 得到了海藻糖。由于 MTSase 和 MTHase 的基因来源于嗜酸热古菌, 两个酶具有很好的耐热耐酸性, 可以在较高的温度和较低的 pH 值条件下催化反应, 能防止生产中淀粉的老化、杂菌的污染, 增加了反应底物浓度, 加快了反应速度, 提高了生产效率, 在未来有很好的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养方法

产 MTSase 的 BL21 和 MTHase 的 DH53 基因工程菌均为本实验室构建。构建方法和培养方法分别见文献 [4, 5]。

1.2 主要试剂

葡萄糖为北京化工厂产品, 海藻糖、麦芽糖、麦芽三、四、五、六、七糖、直链淀粉、支链淀粉为美国 SIGMA 公司产品, 麦芽糊精为北京酱油厂产品、普鲁兰酶为诺维信公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 酶活力的测定: MTSase: 测定方法见文献^[4], MTHase: 测定方法见文献 [5]。

普鲁兰酶：0.5mL 2%的普鲁兰溶液 (pH6.0) 在 40℃ 预热 5min，加入预先稀释好的酶液 0.5mL，40℃ 反应 30min 后 DNS 法测还原糖。—活力单位为每分钟转变 1μmol 葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.3.2 酶的纯化：基因工程菌 DL21 和 DH53 培养结束后，发酵液分别离心，去掉培养上清液，将获得的菌体中加入少量缓冲液后经超声破碎，高速离心去沉淀；上清液在 70℃ 水浴中加热 30min 后再次离心，弃去热变性蛋白沉淀，收集上清，用 VIVAFL0W50 超超滤膜包进行超滤，浓缩液上 DEAE-Sepharose FAST FLOW 离子交换柱和 Sephacryl S-200 分子凝胶过滤柱等步骤进行分离纯化，分别获得下面试验用的 MTSase 和 MTHase。

1.3.3 糖的分析方法：(1) 还原糖的测定：用 Somogyi-Nelson 方法测定^[6]。(2) 糖的高压液相分析法 (HPLC)：Waters™ 600Controller，Waters410 RI 检测仪，TL-9900 色谱数据工作站软件，色谱柱：REZEX RNM CARBOHYDRATE，流动相：水，流速：0.6mL/min，柱温：80℃；进样量：5μL。(3) 糖反应产率 (w/w) = 反应后溶液中该糖含量/反应前溶液中底物淀粉含量 × 100%，溶液中海藻糖、葡萄糖含量的测定方法见文献 [7]。(4) 糖的硅胶板薄层色谱分析法 (TLC)：展开剂为 正丁醇：冰醋酸：水 = 2：1：1，上行展开 2 次。显色剂为 4g 二苯胺和 4mL 苯胺溶于 200 mL 丙酮和 20 mL 85% 磷酸的混合液。硅胶板浸泡显色剂后，在烤箱中 90℃ 烘 10 ~ 15min 可见层析结果。

2 结果与讨论

分别以 1% 浓度的葡萄糖、海藻糖、麦芽糖、麦芽寡糖 (三、四、五、六、七糖)、直链淀粉、支链淀粉溶液为底物，在 pH 5.5 的条件下加入各种酶 60℃ 保温反应一段时间后，用 HPLC 和 TLC 方法检测酶的水解反应产物并测定溶液中糖含量。结果见表 1 和图 1。

表 1 酶对各种寡糖的水解反应

底物	酶	TLC 标号	产物 (反应产率)
葡萄糖	MTSase + MTHase		葡萄糖
海藻糖	MTSase + MTHase		海藻糖
麦芽糖	MTSase + MTHase	1	麦芽糖
麦芽三糖	MTSase	12	葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖
	MTHase	7	麦芽三糖
	MTSase + MTHase	2	葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖
麦芽四糖	MTSase	14	葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、海藻糖基麦芽四糖
	MTHase	8	葡萄糖、麦芽三糖、麦芽四糖
	MTSase + MTHase	3	葡萄糖、麦芽糖、海藻糖 (47%)、麦芽三糖
麦芽五糖	MTSase	16	葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、海藻糖基麦芽四糖、海藻糖基麦芽五糖
	MTSase + MTHase	4	葡萄糖、麦芽糖、海藻糖 (41%)、麦芽三糖
麦芽六糖	MTSase + MTHase	5	葡萄糖、麦芽糖、海藻糖 (60%)、麦芽三糖
麦芽七糖	MTSase + MTHase	6	葡萄糖、麦芽糖、海藻糖 (57%)、麦芽三糖

MTSase 0.1U/mL, MTHase 1U/mL, 反应 12 h

在本实验中，涉及到许多糖组份的定性或定量测定，一次性将它们完全区分清楚有一定难度；如在 HPLC 方法中，REZEX RNM CARBOHYDRATE 柱只能对小于三糖的糖分子有分离测定作用，三糖以上的则分离效果差；TLC 方法对几种麦芽寡糖有一定的分离效果，但很难定量；而通过两种方法同时测定，再参考终反应液中还原糖含量的测

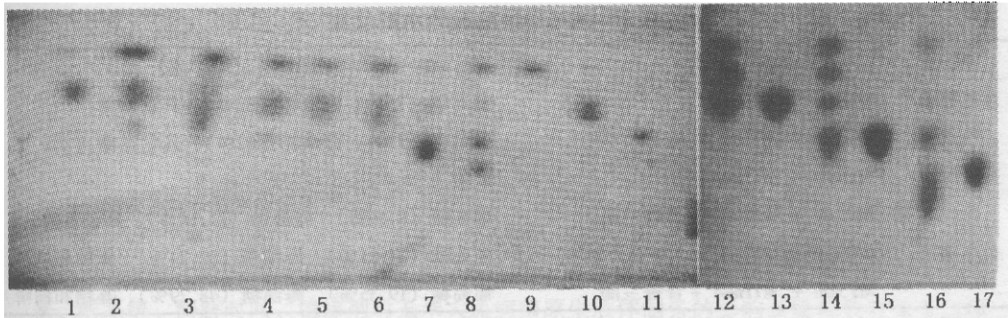


图 1 酶对各种寡糖催化反应的 TLC 结果

9~11: 0.5%葡萄糖、0.5%麦芽糖、0.5%麦芽三糖标样,

13, 15, 17: 0.5%麦芽三糖、1%麦芽四糖、1%麦芽五糖标样, 其它标号见表 1

定, 就能对测定体系中众多的糖组份有一个准确的分析结果。

据日本 Masaru K 等人报道^[3], 来自硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) KM1 的 MTSase 和 MTHase 利用麦芽寡糖产生海藻糖的机制可能如图 2 所示: 首先由 MTSase 以链长不小于三的麦芽寡糖为底物, 通过分子内转糖基作用将其还原末端的 α -1, 4 糖苷键转化为 α -1, 1 糖苷键, 形成麦芽寡糖基海藻糖, MTHase 再进一步水解与 α -1, 1 糖苷键相邻的 α -1, 4 糖苷键生成海藻糖和比初始糖链少两个葡萄糖残基的麦芽寡糖。表 1 的结果也清楚地证明了这一结论, MTSase 和 MTHase 中任何一种酶都不能单独反应生成海藻糖。但与 KM1 不同的是, B12 的两个酶合成海藻糖时所利用的最小底物是麦芽四糖, 而不是麦芽三糖, 这与报道的芝田硫矿硫化叶菌和硫矿硫化叶菌各自的代谢特点有吻合之处^[8]。表 1 的结果还显示, B12 的 MTSase 和 MTHase 都具有轻微的 α -1, 4-葡萄糖苷酶活性, 能水解寡糖还原末端的 α -1, 4 糖苷键, 生成葡萄糖和小分子的麦芽寡糖, 这可能是海藻糖合成过程中葡萄糖产生的主要来源。该催化过程中, MTSase 和 MTHase 能利用的最小底物是分别是麦芽三糖和麦芽四糖。由于 B12 MTSase 两个反应中所结合底物和催化产物的差异, 推测 B12 的 MTSase 可能存在竞争性的两个不同催化活性中心。

由表 1 结果还可以看出, MTSase 和 MTHase 转化麦芽寡糖生成海藻糖的产率有随寡糖链增长而增加的趋势, 同时, 偶数残基麦芽寡糖的海藻糖产率又要高于奇数残基寡糖的产率。这主要是由于麦芽五糖、七糖反应过程中生成了不能被转化为海藻糖的麦芽三糖的缘故。

不加普鲁兰酶时, 直链淀粉的海藻糖产率为 82%, 麦芽糊精的海藻糖生成率仅为 32% 而支链淀粉没有任何海藻糖和葡萄糖生成, 表明 MTSase 和 MTHase 只能作用于 α -1, 4 糖苷键的还原末端, 对 α -1, 6 糖苷键不能作用。这是因为支链淀粉中只有很少的还原末端暴露在外, 其余皆为非还原末端。当反应体系中加入普鲁兰酶时, 由于普鲁兰

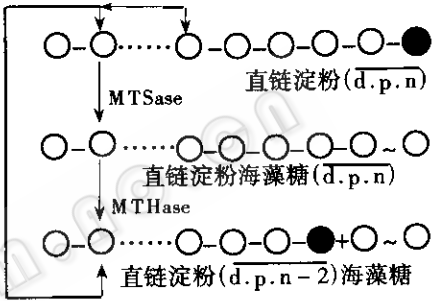


图 2 由淀粉通过 MTSase 和 MTHase 生成海藻糖示意图

○ 葡萄糖残基, ● 葡萄糖残基还原末端
- α -1,4 葡萄糖苷键, ~ α -1,1
- 葡萄糖苷键, d.p.n: 聚合度

表 2 酶对各种淀粉的水解反应

底物	酶	产物 (反应产率)
直链淀粉	MTSase + MTHase	葡萄糖 (7%)、海藻糖 (82%)、其它寡糖
	MTSase + MTHase + 普鲁兰酶	葡萄糖 (7%)、海藻糖 (82%)、其它寡糖
支链淀粉	MTSase + MTHase	淀粉
	MTSase + MTHase + 普鲁兰酶	葡萄糖 (8.19%)、海藻糖 (71.14%)、其它寡糖
麦芽糊精	MTSase + MTHase	葡萄糖 (14.11%)、海藻糖 (32.24%)、寡糖和糊精
	MTSase + MTHase + 普鲁兰酶	葡萄糖 (19.35%)、海藻糖 (48.29%)、寡糖和糊精

MTSase: 0.1U/mL, MTHase: 1U/mL, 普鲁兰酶 0.16U/mL, 反应 12 h

酶的去分支作用,使支链淀粉都变成直链淀粉,淀粉中大量的还原末端暴露出来,促进了海藻糖的产量大大增加,其产率达到了 70% 以上。而同时麦芽糊精的海藻糖产率前后却提高不大,这是因为一方面糊精的淀粉链长较短,副反应产物含量高;其次反应中生成了极限麦芽糊精,上面 α -1, 6 糖苷键的短分支侧链较多,普鲁兰酶不能作用,从而使 MTSase 和 MTHase 水解反应不能达到完全。

如何提高海藻糖产率,是酶法生产海藻糖技术的一个重要研究内容。由上文可知,淀粉链越长海藻糖产率会越高;但由于淀粉链越长,也越容易产生凝沉,形成不溶性沉淀,同样会降低海藻糖的产率。因此掌握好底物淀粉分子的最佳聚合度是关键。此外,由于 MTSase 和 MTHase 水解副反应的存在,产物中有一定量的葡萄糖生成,也降低了海藻糖的产率。因此如何抑制副反应的发生,减少葡萄糖的生成,也是提高海藻糖转化率的重要关键。

参 考 文 献

[1] Masaru K, Yutaka M, Masako K, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1996, 60 (3): 546 ~ 550.
[2] Iqbal S B, Randal M H, Jack M W. Plant Physiol, 1985, 78: 430 ~ 432.
[3] Masaru K, Yutaka M, Masako K, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1996, 60 (5): 921 ~ 924.
[4] 陈 炜, 刘 莉, 孙培钰, 等. 微生物学报, 2000, 40 (1): 57 ~ 61.
[5] 刘 莉, 陈 炜, 金 城. 微生物学报, 2000, 40 (3): 324 ~ 326.
[6] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 14 ~ 15.
[7] 王绍校, 吴 襟, 陈 萌, 等. 食品工业杂志, 2002, (8): 17 ~ 19.
[8] Dennis W G. J Bacteriol, 1989, 171 (12): 6710 ~ 6719.

·稿件规范化与标准化·

阿 拉 伯 数 字 的 使 用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括 9 以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材,两种商品等。4 位以上 (含 4 位) 的数字,采用三位分节法,节和节之间空开 1/4 格的间距。