对一株藤黄微球菌合成海藻糖能力的鉴定

欧阳立明[1*] 王善利[1] 施超欧[2] 张惠展[1] 袁勤生[1]

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)[1]
(华东理工大学分析测试中心 上海 200237)[2]

摘要：报道了一株藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）具有产酶能力，可以淀粉糊精为底物合成海藻糖，从还原糖含量变化、纸层析和高效阴离子交换-脉冲安培法检测几方面对酶反应予以证实。

关键词：海藻糖，藤黄微球菌，高效离子色谱
中图分类号：Q93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2004）04-0049-04

Identifying of the Ability of Trehalose Synthesis by Enzyme from *Micrococcus luteus*

OUYANG Li-Ming[1*] WANG Shan-Li[1] SHI Chao-Ou[2] ZHANG Hui-Zhan[1] YUAN Qin-Sheng[1]

(*State Key Laboratory of Bioreactor and Engineering ECUST*, *Shanghai* 200237)[1]
(*Analysis and Research Center ECUST*, *Shanghai* 200237)[2]

Abstract: A strain of *Micrococcus luteus* was reported, which can produce enzyme to synthesize trehalose using starch dextrin as substrate. Identifying the enzyme reaction from the following aspects: the content variety of reduction sugar; paper chromatography and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection (HPAE-PAD).

Key words: Trehalose, *Micrococcus luteus*, High performance ionic chromatography (HPIC)

海藻糖是两个葡萄糖分子以 α-1，1 键连接形成的非还原性二糖，广泛存在于微生物、低等动植物体内。海藻糖的存在赋予这些生物以抗干旱、抗高温、抗冷冻的抗逆特性。此外，海藻糖通过外加的方式同样能对生物体和生物大分子起着良好的非特异性保护作用。因此，海藻糖在医药、食品、化妆品、农业等方面具有广阔的应用前景。

海藻糖的生物合成途径可以按以葡萄糖、麦芽糖和淀粉部分水解物作为底物分为 3 类，而其中以淀粉部分水解物作为底物生产海藻糖因为与传统的酵母提取法相比具有大幅降低成本的优势，所以最具有工业生产的意义，已成为海藻糖工业生产的主要工艺之一。这种方法的关键是寻找海藻糖合成能力较强的菌株，或者用基因工程对野生菌株进行改造以提高合成能力。目前已证明具有以淀粉部分水解物为底物生成海藻糖的微生物涉及节杆菌[1]、微球菌[2]和硫化叶菌等古细菌[3,4]属，其合成途径均在麦芽糖寡糖基海藻糖合成酶（MTSase）和麦芽糖寡糖基海藻糖水解酶（MTHase）的双酶体系下完成，其反应过程如下[3]：

麦芽低聚糖（Gn）$\xrightarrow{\text{MTSase}}$麦芽糖寡糖基海藻糖（$G_{n-2}\cdot T$）$\xrightarrow{\text{MTHase}}$海藻糖（T）+ 麦芽低聚糖（$G_{n-2}$）

其中，Gn 表示有 n 个葡萄糖残基的麦芽低聚糖，T 为海藻糖基，G_{n-2}表示葡萄糖残

* 联系人 Email：ouyanglm@eyou.com
收稿日期：2003-09-12，**修回日期**：2003-11-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

基数目为n-2的麦芽低聚糖。

日本林原公司自1995年将自主筛选到的一株节杆菌用于海藻糖酶法工业生产，使海藻糖价格由200美元/kg降至2美元/kg，并成为全球最大的海藻糖供应商。为了开发具有自主知识产权的生产菌株，国内外相关机构都在寻找新的微生物资源；而克隆相关酶基因，进行基因工程改造，也是一条极具希望的途径。为了从一株野生藤黄微球菌出发克隆MTSase和MTHase基因，本文首先对该菌株的海藻糖合成能力进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、材料、仪器

麦芽糊精（DE12～14，上海融氏企业有限公司），糖化酶Dextrozyme® GA（NOVOZYME，可外切α-1，4和α-1，6葡萄糖苷键），海藻糖（林原生化有限公司），Trypepton，Yeast Extract（Oxoid. Ltd. England）；其他试剂为国产分析纯。烟台产HS-GF254（10×20cm）硅胶板，新华一号滤纸。上海产Unico7200型分光光度计。

1.2 细菌培养

Micrococcus luteus（IFO3064）由本室袁勤生教授惠赠。培养基：胰蛋白胨10 g，酵母提取物10 g，NaCl 5 g，定容至1 L，pH7.0。

1.3 粗酶液提取

菌种在种子培养基中30℃下活化培养20 h，以4%接种量接种于产酶培养基，30℃培养36 h，3,600 r/min离心30min获取菌体，然后按湿菌体2倍质量加入磷酸缓冲液（pH7.0）重悬，置冰浴中超声破碎（工作4 s，间歇4 s，工作功率400 W，80次），12,000 r/min离心15 min，收集上清液为粗酶液，4℃保存。

1.4 酶反应过程中糖含量的变化

将等体积的10%麦芽糊精与上述方法提取的粗酶液混合，置37℃水浴条件下反应，分别于0、1、2、5、7、13、19h时取样，按1%量加入糖用活性炭随即高速离心进行脱色处理，Somogyi-Nelson法测定上清液还原糖和总糖。

1.5 酶促生成海藻糖的底物种类验证

分别以10%麦芽糖，10%麦芽糊精和10%葡萄糖溶液各1 mL为底物，分别加入1 mL粗酶液和1 mL磷酸缓冲液（pH7.0），37℃反应2 h，100℃灭活10 min，按1%量加入糖用活性炭随即高速离心进行脱色处理，Somogyi-Nelson法测定上清液还原糖。

1.6 Somogyi-Nelson法测定还原糖和总糖

参见文献[5]。

1.7 糖化酶处理

将酶反应产物或者1%麦芽糊精溶液用1 mol/L HCl调pH至4.0，加入2%（v/v）糖化酶Dextrozyme® GA，60℃反应20 h。

1.8 纸层析

展开完全后，晾干，将滤纸在显色剂A液中迅速浸没，随即晾干，再于显色剂B液中迅速浸过，即可显色。展开剂为正丁醇:丙酮:水:乙酸 = 10:3:6:2（v/v），显色剂A液：$AgNO_3$的水-丙酮饱和溶液，水:丙酮 = 1:200；B液：将1 g NaOH溶于100 g乙醇水溶液中，乙醇:水 = 1:1（wt/wt）。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.9 高效离子色谱

美国 Dionex 600 离子色谱仪，Chromeleon 6.4 色谱工作站，ED50 脉冲安培检测器，GP50 四元梯度泵，L20 柱箱。

色谱柱 CarboPac PA10（4 × 250 mm），阴离子捕获柱 IonPac ATC-3（9 × 24 mm），流速 1.0 mL/min，柱温为室温，进样量 25 μL，流动相为 20 mmol/L NaOH。样品为淀粉糊精粗酶液反应产物经糖化酶处理后的产物，标准品浓度为 30 mg/mL，样品和标准样稀释 500 倍后进样。

2 结果

2.1 粗酶液作用于麦芽糊精后，还原糖和总糖含量的变化

分别于反应 0、1、2、5、7、13、19h 取样测定还原糖和总糖（图 1）。总糖没有明显变化，一直维持在约 32 mg/mL（31.60 ~ 32.38 mg/mL），而还原糖在反应后明显下降，2 h 时达到最低值，但随后有所回升，推测与该双酶体系的循环作用特点有关，说明两酶作用有次序性，在反应初期，MTSase 的酶活力要强于 MTHase。而后，主导酶出现更替。随反应时间延长，两酶活力逐渐降低，体系中的还原糖含量也趋于稳定。

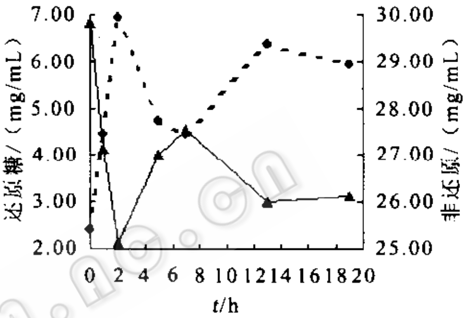

图 1　酶反应过程中还原糖含量的变化

—▲— 还原糖含量变化，—◆— 非还原糖含量变化

2.2 酶促生成海藻糖的底物种类验证

分别以 10% 麦芽糖溶液（M）、10% 葡萄糖溶液（G）和 10% 麦芽糊精溶液（D）为底物，加入等体积酶液后，立即沸水浴 10 min 灭活或反应 2 h，分别测定还原糖的含量变化，结果见图 2。由图可见，麦芽糖、葡萄糖溶液在反应前后还原糖含量均无明显变化，说明这二者均不能作为酶反应的底物；只有麦芽糊精溶液在反应前后还原糖含量发生明显变化，说明酶液的确可利用麦芽糊精作为底物。

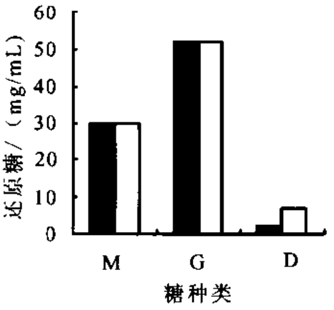

图 2　不同种类糖与酶液反应前后的还原糖变化

■酶反应 2h 后，□沸水浴 10min

2.3 产物鉴定

在确认酶反应的发生和还原糖含量变化之后，需要对反应产物进行鉴定。将 10% 麦芽糊精与粗酶液等体积混合，37℃下反应过夜，对产物进行以下处理和鉴定。

2.3.1 纸层析：结果见图 3。酶反应产物中含有与海藻糖标准品迁移位置相应的斑点，而从原点开始的一串较长的斑点则可能是反应过程中产生的一系列含有糖残基数目不同的麦芽寡糖基海藻糖和麦芽低聚糖（3 号层析道）。当其被糖化酶处理后，即只有葡萄糖和海藻糖的斑点痕迹（4 号层析道）。作为对照的麦芽糊精因为含有不同长度的糖链，也呈现出长线状斑迹（6 号层析道），而经糖化酶处理后绝大部分糖链转化为葡萄糖，另外残留少量的麦芽糖（5 号层析道）。葡萄糖、海藻糖、麦芽糖的 R_f 值见表 1。

2.3.2 高效阴离子交换色谱：结果见图 4。图 4 中，A 为海藻糖标准品，出峰时间在 2.60 min；B 为葡萄糖标准品，出峰时间在 8.20 min；C 为样品，从出峰时间可判断峰 1

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

为海藻糖，峰 2 为葡萄糖。

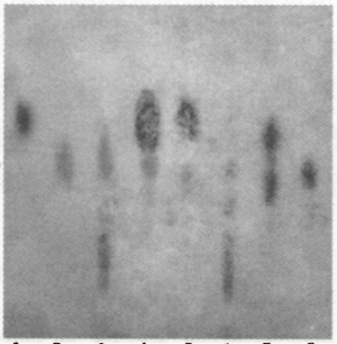

图 3 酶反应产物的纸层析

1 葡萄糖 (30mg/mL×0.2μL)，2 海藻糖 (30mg/mL×1μL)，3 酶反应产物 (4μL)，4 酶反应产物经糖化酶处理，5 1%麦芽糊精经糖化酶处理 (2μL)，6 1%麦芽糊精溶液 (3μL)，7 葡萄糖、海藻糖、麦芽糖的混合糖 (浓度分别为 30、150、30mg/mL，点样 0.2μL)，8 麦芽糖 (30mg/mL×0.3μL)

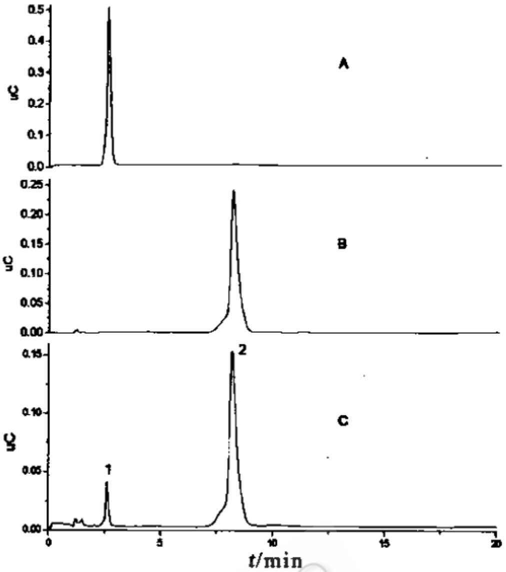

图 4 葡萄糖、海藻糖标准品和样品色谱图

表 1 葡萄糖、海藻糖、麦芽糖的 R_f 值

	葡萄糖	海藻糖	麦芽糖
R_f	0.37	0.30	0.28

3 讨论

目前已证明具有以淀粉部分水解物为底物生成海藻糖的微生物涉及节杆菌、微球菌、根瘤菌等属，本文所报道的藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) (IFO3064) 在国内尚未见正式文献报道。在海藻糖产生菌的分析鉴定过程中，需要对海藻糖含量进行快速测定。我们根据海藻糖没有还原性的特点，采用 Somogyi-Nelson 法比色分析产物还原糖和总糖的变化，可间接反映出反应进行过程中总糖和海藻糖的消长变化，具有方便快速，重复性好的优点。平面色谱方法定性比较方便，但不能准确定量，适于工业化大规模检测。HPLC，HPIC 可以精确定性和定量，但对设备和分析经验要求较高。

参 考 文 献

[1] Maruta K, Hattori K, Nakada T, *et al*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) /General Subjects, 1996, **1289** (1): 10～13.

[2] 周 延，袁其朋，冯金虎，等. 现代化工，2003，**23** (1)：33～36.

[3] Masaru K, Yutaka M, Masako K, *et al*. Biosci Biotech Biochem, 1996, **60** (5): 921～924.

[4] Maruta K, Mitsuzumi H, Nakada T, *et al*. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, **1291**: 177～181.

[5] 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.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn