

透性化海藻糖合酶的研究

薛璐¹ 马莺²

1(哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 哈尔滨, 150001)

2(东北农业大学食品学院, 哈尔滨, 150030)

摘要 海藻糖是一种新型食品添加剂, 目前其主要生产方法是利用微生物酶法合成。文章研究了在不易破壁取得胞内酶的情况下, 采用渗透处理细胞技术生产透性化细胞酶的方法, 获得较高酶活力。

关键词 海藻糖, 海藻糖合酶, 透性化处理

非还原性二糖海藻糖(trehalose)是一种极好的天然干燥剂和保鲜剂, 也是一种新型功能性低聚糖。它在医药、食品等领域都有着广泛的应用前景。1995年, 日本林原生化研究所报道, 首次发现了能将麦芽糖直接转化为海藻糖的海藻糖合酶。该酶反应流程短, 易调控, 而且不需要磷酸盐共存, 海藻糖的产率高且不受底物麦芽糖浓度的影响。因而这种酶在海藻糖的工业生产中有着良好的应用前景^[1, 2, 5, 6]。

海藻糖合酶属胞内酶, 需破壁后经多步分离纯化才能获取较高酶活力的海藻糖合酶制剂, 而且在每步纯化操作中, 都不可避免地导致酶蛋白部分变性失活, 造成总活力的损失。采用渗透处理细胞技术生产透性化细胞海藻糖合酶的研究有望克服以上缺点。渗透细胞技术是指在不破坏细胞整体内部有机系统的前提下改变细胞膜的通透性, 使得低分子量物质能够自由进出细胞的技术。综合文献报道, 常见的渗透处理细胞方法有抗菌素法、去垢剂法、有机溶剂法、螯合剂法等^[9]。本研究采用渗透细胞技术研究高活力的透性化海藻糖合酶。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 恶臭假单胞杆菌 H76。

培养基: 营养培养基。

培养条件: 29℃, 摇瓶培养 48 h。

主要试剂: 麦芽糖、甲苯、CCl₄、无水乙醇、CTAB、SDS、EDTA、OP-100。

主要设备: 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、示差检测器、摇瓶培养箱、医用离心机等。

1.2 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。色谱条件为: 流动相, V(乙腈): V(水) = 70:30; 层析柱, 糖分析专用柱(美国 Waters 公司); 流速, 1 mL/min; 进样量, 15 μL。

1.3 酶活力测定方法

透性化海藻糖合酶与 10% 麦芽糖溶液于 40℃ 水浴 20 h。离心取上清液, 加糖化酶水解剩余麦芽糖, 然后测定样品中海藻糖的含量。酶活力单位定义为: 上述反应条件下, 每小时转化生成 1 mg 海藻糖所需的透性化细胞酶量为 1 单位。

2 结果与讨论

2.1 最佳渗透试剂的选择

本试验设计了 10 组不同配比的渗透试剂, 试剂与试验结果列于表 1。

比较经这 10 种试剂处理后的细胞酶活力发现 2% 甲苯与 0.2% EDTA 的作用效果

第一作者: 博士研究生。

收稿时间 2001-06-09, 改回时间 2001-12-05

最好,酶活力可达 81.48u,2% 甲苯与 0.2% OP-100 的作用效果次之,酶活力可达 74.04u。其酶活力远高于单独使用其中的任何一种试剂。而使用 CCl₄、SDS、CTAB 处理的效果均不理想。通过扫描电镜拍摄的照片(图 1)我们可以看到,以 2% 甲苯 + 0.2% EDTA 处理后的细胞并未破裂,仍保持完整的细胞形态。

表 1 不同试剂渗透细胞效果的比较

透性化试剂	温度 /℃	时间 /min	酶活力 /U
对照	30	30	0.81
2% 甲苯	30	30	24.20
2% CCl ₄	30	30	15.32
2% 甲苯 + 10% 乙醇	30	30	42.87
2% 甲苯 + 0.2% EDTA	30	30	81.48
2% 甲苯 + 0.2% OP-100	30	30	74.04
2% CCl ₄ + 10% 乙醇	30	30	17.85
0.2% EDTA	30	15	31.84
0.2% SDS	25	15	12.42
0.2% CTAB	4	15	4.05
0.2% OP-100	30	15	3.61



图 1 透性化恶臭假单胞杆菌细胞的扫描电镜照片

2.2 最佳渗透条件的选择

选择 2% 甲苯 + 0.2% EDTA 为最佳的渗透试剂与等量细胞混合,分别在 25、30、35、40 和 45℃ 振荡 0.5 h 至 1 h,于冰水浴中冷却后测定细胞酶活力,列于表 2 中。

比较表 2 的数据发现,随着处理温度的升高,酶活力不断提高。在 35℃ 时达到最高,而且只需处理 0.5 h 即可获得较高酶活力。此后随温度升高,酶活力会有所下降,这可能是由于在较高的温度下,渗透试剂对酶

有破坏或抑制作用的原因。故选择 35℃ 振荡 0.5 h 为最佳处理条件。

表 2 不同处理条件的比较

处理方法	酶活力/U
25℃,1h,振荡	72.84
30℃,1h,振荡	90.27
35℃,0.5h,振荡	92.44
40℃,1h,振荡	86.31
45℃,1h,振荡	69.33

2.3 渗透恶臭假单胞杆菌细胞最佳浓度的确定

向 10 mL 渗透试剂(2% 甲苯 + 0.2% EDTA)中分别加入不同质量的湿细胞,在 35℃ 渗透处理后,测定所得细胞酶的活力。结果见表 3。

表 3 渗透处理不同浓度细胞的比较

细胞用量/g	酶活力/U
0.1	80.25
0.2	89.17
0.3	90.25
0.4	92.29
0.5	95.42
0.6	93.47
0.7	88.54
0.8	87.06
0.9	82.54
1	81.96

表 3 结果表明,当细胞与渗透试剂比例为 0.5g:10 mL 时所得透性化细胞海藻糖合酶活力最高。当低于或高于这个比例时,渗透试剂不能很好地脱除恶臭假单胞杆菌细胞组成物,因而透性化细胞海藻糖合酶的活力不高。所以,细胞的最好处理浓度应为 0.05 g/mL 渗透试剂。经渗透处理后的透性化细胞海藻糖合酶的活力可达原细胞的 117.8 倍。

3 结 论

对于破壁较困难的恶臭假单胞杆菌可采用渗透处理的方法来获得胞内酶活力。经本试验研究,确定了一条制取冻干透性化细胞海藻糖合酶的工艺:湿菌体与渗透试剂(2%

甲苯 + 0.2% EDTA)按 0.05g/mL 的比例混合 → 35℃ 振荡 0.5h → 冰水浴中冷却 → 离心 → 以磷酸钠缓冲液洗 1~2 次 → 离心 → 成品。

参 考 文 献

- 1 尤 新主编. 淀粉糖品工业手册. 北京:中国轻工业出版社,1997
- 2 尤 新主编. 功能性发酵食品. 北京:中国轻工业出版社,1999
- 3 戴秀玉等. 微生物学通报,1995,22(2):102~103

- 4 李皓明,高 蓝. 食品与发酵工业,1994,20(4):49~51
- 5 陈 炜,何秉旺. 微生物学报,1998,25(3):164~166
- 6 Nishimoto T et al. Biosci. Biotech. Biochem., 1995,59(11):2189~2190
- 7 Yoshikawa et al. Biosci. Biotech. Biochem., 1994,58(7):1226~1230
- 8 葛文光等. 食品科学,1998,19(5):21~24
- 9 Hansruedi Felix. Analytical Biochem., 1982,120:211~234

Studies on Trehalose Synthase Synthesis in Permeabilized Cells

Xue¹ Lu Ma² Ying

(¹ Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, 150001)

(² Food College, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

ABSTRACT Trehalose is a natural functional disaccharide. Trehalose could be widely used in foodstuff, pharmaceuticals, cosmetic, and agriculture. Trehalose's uses are restricted due to the difficulty in its production. The permeabilization of *Pseudomonas putida* cells in relation to trehalose synthase activity was studied using different organic solvents and detergents. The performance of these solvents was dependent on the incubation temperature, treatment time, and the concentration of cells. Maximum enzyme activity was achieved with 2% toluene and 0.2% EDTA, at 35℃, 0.5h. The expression of intracellular trehalose synthase activity was increased 117.8-fold with respect to untreated cells.

Key words trehalose, trehalose synthase, permeabilized treatment

啤酒工业迎入世今年启用新算法

据中国酿酒工业协会消息,重新修订《全国啤酒工业主要经济技术统一计算方法》已报经国家统计局认可,该算法暂由中国酿酒工业协会发布,将于2002年1月1日起在全国啤酒行业试行。

原有的《全国啤酒工业主要经济技术指标统一计算方法》从1990年发布实施以来,对行业统计和信息交流发挥了重要的作用。但是近年来我国啤酒工业的工艺装备发生了巨大变化,原方法已不适应啤酒行业的发展,同时,我国加入WTO后,啤酒工业的统计数据需要与国际接轨,因此对原有计算方法进行修订十分必要。修订后的计算方法对啤酒产量的计算单位、行业内部考核的主要经济指标的计算依据进行了调整,并增加了财务状况指标。新的统一计算方法采用了国际统一的计量单位,同时,从单一的生产统计扩大为企业状况的综合统计,既体现了与国际市场的接轨,又可准确地反映啤酒企业的生产和经营情况,有利于企业之间的互相比较和进行管理。