DOI:10.13344/j.microbiol.china.2003.06.016

海藻糖合成酶活性受固定化处理过程影响的研究*

冯金虎[1]　袁其朋[1]**　周　延[1]　钱忠明[2]

(北京化工大学化学工程学院　北京　100029)[1]

(香港理工大学应用生物及化学科技学系　香港)[2]

摘要：在麦芽糖苷基海藻糖合成酶（MTSase）和麦芽糖苷基海藻糖水解酶（MTHase）双酶的作用下，淀粉可转化为海藻糖，但是其转化率较低。文中采用多种固定化载体进行酶固定化研究，发现通过经戊二醛与壳聚糖交联后的载体与酶液作用，可吸附与海藻糖合成无关的杂酶和杂质，从而提高海藻糖合成酶的活性。通过比较固定化过程中与反应条件中多个因素的影响，得到了如下最佳作用条件：将酶液与经 3%戊二醛交联 18h 后的滤纸作用 18h，再与 10%的淀粉溶液反应 9h，与未经固定化作用比较，海藻糖的产率提高 10 倍，达到 27.22g/L，转化率从 5.33%提升到 54.43%。

关键词：海藻糖、固定化、MTSase、MTHase、酶活活性

中图分类号：Q814.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654（2003）06-0065-06

THE EFFECT OF IMMOBILIZATION PROCESS TO THE ACTIVITY OF MTHASE AND MTSASE

FENG Jin-hu[1]*　YUAN Qi-Peng[1]　ZHOU Yan[1]　QIAN Zhong-Ming[2]

(*School of Chemical Engineering , Beijing University of Chemical Technology , Beijing* 100029) [1]

(*Department of Chemistry Science and Applied Biology, Hong Kong Polytechnic University, HK*)[2]

Abstract: Amylum can be transformed into trehalose on the action of the MTSase and MTHase, however, the percentage of transformation is low. The research on the enzyme immobilization through four kinds of immobilization carrier is described in this paper. The result shows that the carriers, which are put into with enzyme liquid and crossbonded with chitosan and glutaraldehyde at first, can adsorb many enzymes independent from this process of trehalose synthesizing, consequently, the enzyme activity is increased sharply. By comparing with the influence of the immobilizing process and some factors in the reaction conditions, such optimize condition can be reached: the time for carrier crossbonding with glutaraldehyde is 18hours , the time with enzyme is another 18hours , and the time of reaction with amylum (10%) is 9hours. The result of the content of trehalose can reach 27.22g/L and the percentage of transformation can reach 54.43%, which previously is 2.67g/L and 5.33% respectively before dealt with by carriers.

Key words: Trehalose, Immobilization, MTSase, MTHase, Enzyme activity

海藻糖（α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside，trehalose），是由两分子葡萄糖以 α，α-1，1 糖苷键连接而成的非还原双糖。它有 3 种光学异构体：α，α 型、α，β 型和 β，β 型，通常所说的海藻糖是 α，α 型，构象式如图 1[1]：

在自然界中，海藻糖不仅是一种碳水化合物的存储物质，而且是一种能使动物组织免受物理和化学损伤的保护剂；同时，海藻糖具有高含水特性能保护生物膜的完整性。当今，海藻糖作为一种添加剂、稳定剂和甜味剂已经广泛应用于食品、化妆品和医药工业[2~4]。

* 北京化工大学郑煤基金资助项目（No.2000168）

* * 联系人　E-mail：qpyuan@sina.. com，Tel：010 ~ 64437610

收稿日期：2002-12-30，**修回日期**：2003-02-20

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本实验室主要以淀粉为原料酶法制备海藻糖，基本的酶反应机理如下：

麦芽低聚糖 $\xrightarrow[\text{麦芽低聚海藻糖合成酶（MTSase）}]{}$ 麦芽低聚糖海藻糖 (1)

麦芽低聚糖海藻糖 $\xrightarrow[\text{麦芽寡糖基海藻糖水解酶（MTHase）}]{}$ 海藻糖 + 麦芽低聚糖 (2)

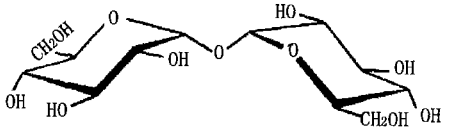

图1 α，α型海藻糖构象式

为了提高酶的重复利用率，降低成本，本实验尝试用多种固定化载体固定 MTHase 和 HTSase，但是研究表明，这些载体不能很好的固定海藻糖合成酶（MTSase 和 MTHase），但经固定化处理后的酶液海藻糖合成能力有大幅度提高，说明了此过程对酶活有较大的影响，同时发现固定化过程中杂酶受到了抑制，从而间接达到了纯化酶的目的。

本文给出了固定化过程中戊二醛质量分数、戊二醛与载体交联时间、酶反应时间以及反应温度等各个影响因素的对海藻糖合成酶活力的影响，并确定了优化条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：微球菌（*Micrococcus roseus*）本实验室自筛保存。

1.1.2 主要试剂：壳聚糖为实验室自制，D261 树脂为南开大学化工厂生产，海藻糖标准品购自 Sigma 公司，其他试剂均为分析纯。

1.2 方法[5]

1.2.1 载体制备方法：载体 I：将 3g 壳聚糖溶于 200mL 冰醋酸中，用纱布过滤。将预先烘干的滤纸置于其中浸泡 12h，烘干。将经壳聚糖涂层过的滤纸在室温下浸泡于戊二醛溶液中，交联一定时间，再用去离子水洗去多余的戊二醛。载体 II：将硅胶（100目）加至含 3%壳聚糖的 1%冰醋酸中溶液中，搅拌过夜，过滤后用 1%的 NaOH 中和，水洗至中性，加入适量戊二醛溶液，室温搅拌 6h，水洗至溶液无戊二醛为止，得颗粒状固定化酶载体。载体 III：直接将 2%壳聚糖溶解到 1%的冰醋酸中，然后加入 6mol/L 的 NaOH 中和，得壳聚糖凝胶，然后加入 3%的戊二醛，得到固定化载体。载体 IV：将 D261（大孔弱碱性阴离子树脂）经过缓冲溶液预处理，然后烘干待用。

1.2.2 海藻糖合成酶的释放：将所得发酵液以10,000 r/min 离心 5min，菌体以质量分数 40%悬浮于 0.1M 离子强度的磷酸缓冲溶液（pH 为 8.0），以体积分数为 3%的甲苯 25℃下处理 1h。

1.2.3 交联方法：破碎后的细胞10,000 r/min 离心，取细胞碎片，与载体 I、II 和 III 在 30℃下交联一段时间，然后用载体和残酶液分别进行反应。

1.2.4 反应方法：将酶液与 10%淀粉溶液在一定温度下反应一定时间。反应结束后，将反应液煮沸杀酶 10min，经10,000 r/min 离心，测定海藻糖质量分数。

1.2.5 分析方法：HPLC 法。色谱条件：色谱柱（ZORBAX-NH_2 柱）；柱温 35℃，流动相为乙腈 - 水（78:22），流速为 1mL/min，折光检测器。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果与讨论

2.1 不同载体的固定化效果

由于壳聚糖及其衍生物具有亲合蛋白的化学结构和性质，并且来源丰富，加工工艺简单、安全无毒等特性，目前已经作为一种优良的载体广泛应用于固定化酶，而且已经成功应用于多种酶（包括葡萄糖异构酶等）的固定化，而 Masahiro Yoshida[6] 也成功利用树脂固定化上了海藻糖磷酸化酶和麦芽糖磷酸化酶。因此本文也选择壳聚糖（载体 I、II、III）和树脂（IV）作载体。

将载体 I、II、III 与 IV 与破碎后的细胞碎片进行交联处理之后，再将所得固定化酶和残液再分别与 10% 的淀粉溶液反应在 45℃下反应 6h，结果如表 1。

表 1　不同载体反应结果比较

载体编号	固定化条件		固定化		残酶液	
	戊二醛交联时间/h	酶交联时间/h	ρ麦芽糖/（g/L）	ρ海藻糖/（g/L）	ρ麦芽糖/（g/L）	ρ海藻糖/（g/L）
空白	/	/	/	/	2.03	2.67
I	6	6	3.40	0.19	0.87	15.18
II	6	6	9.19	0	3.08	0
III	6	6	3.53	0	6.84	12.25
IV	0	12	10.66	0	0.44	8.05

从表 1 可以看出，4 种载体对海藻糖合成酶的固定化效果均不明显，但经载体 I、III 和 IV 的处理之后的残酶液与淀粉溶液反应，海藻糖质量分数却提高较多。载体 I 使海藻糖质量分数从 2.67g/L 提高到 15.18g/L；载体 III 则使海藻糖质量分数提高到 12.26g/L；载体 IV 提高到 8.05g/L。同时，实验结果也表明，载体 II 和载体 IV 对麦芽糖合成酶有较强的固定化作用，前者使麦芽糖质量分数从 2.03g/L 可以上升到 9.19g/L，后者则上升为 10.59g/L，不过经 II 处理后的残酶液几乎没有海藻糖合成，这说明海藻糖合成酶固定上了，但可能由于硅胶表面的特性而无法进行海藻糖合成反应。从载体 IV 的作用效果来看，其与 I 具有类似的吸附作用，但其海藻糖合成酶酶活提高效果不如载体 I 明显。而经载体 III 处理过的残酶液虽然海藻糖收率提高，但麦芽糖收率也很高。因此，比起载体 I 来，载体 II 、III 和 IV 对海藻糖合成酶酶活的影响不如载体 I 明显。

虽然固定化效果不佳，但在固定化过程中却看到了残酶液中海藻糖质量分数地异常提高，因此，我们决定考察载体 I 固定化处理过程中各条件以及同 10% 淀粉溶液反应中各个因素对酶活的影响，来确定其使整个酶反应条件得以优化。这些因素包括交联剂（戊二醛）的浓度、交联时间（包括戊二醛交联时间和酶交联时间）、反应温度以及反应时间等。

2.2 各种条件对酶活的影响

2.2.1 戊二醛体积浓度的优化：用体积分数分别为 0（即空白）、1%、3%、5%、7%、9% 戊二醛活化已经壳聚糖涂层的滤纸 12h，然后再与细胞碎片交联 12h，取出滤纸，将细胞碎片在 45℃下与 10% 淀粉液反应 6h。结果如图 2。

由图 2 可以看出，在戊二醛体积分数为 3% 时，得到的海藻糖质量分数最高

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

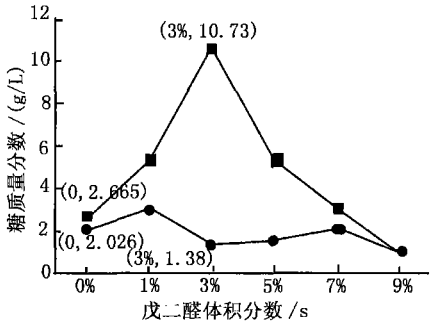

图2 不同戊二醛体积分数的影响

-■- 海藻糖质量分数,-●- 麦芽糖质量分数

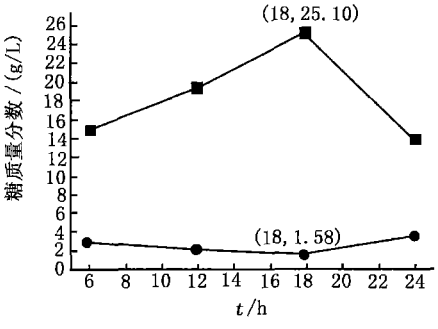

图3 不同酶交联时间的影响

-■- 海藻糖质量分数,-●- 麦芽糖质量分数

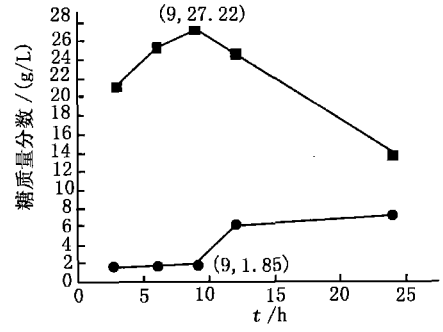

图4 酶反应时间的影响

-■- 海藻糖质量分数,-●- 麦芽糖质量分数

(10.73g/L)，此时，麦芽糖的质量分数却达到了最低（1.38g/L）；而随着戊二醛浓度的继续增高，海藻糖质量分数在逐渐降低。

因此，将3%浓度选为最佳的戊二醛浓度。

2.2.2 戊二醛交联时间影响：将经壳聚糖涂层后的滤纸在3%戊二醛中分别浸泡6、12、18、24h，并分别与10%的淀粉液在45℃下反应6h和12h，可以发现，在戊二醛交联18h的情况下，海藻糖质量分数达到最高，分别达到了15.19g/L和14.50g/L。而此时麦芽糖质量分数只有0.89g/L和0.95g/L。该结果表明一定的交联时间既使戊二醛充分发挥了去除海藻糖合成酶抑制剂和杂酶的作用，又将其毒性降低到最低。因此，得出最佳戊二醛交联时间为18h。

2.2.3 反应温度的影响：由于反应温度对酶反应的酶活和反应体系均有影响，因而继续考察反应温度的影响。将反应温度调整到30、35、40、45、50℃，戊二醛浓度为3%，交联时间为18h，酶交联时间为18h，反应时间为6h。根据实验结果可以看出，当40℃时，所得的海藻糖质量分数提高到19.32g/L，比起空白（海藻糖浓度2.67g/L）提高了约6倍。此时，麦芽糖质量分数虽然达到了2.10g/L，与空白（麦芽糖浓度2.06g/L）比较，麦芽糖的质量分数没有明显提高。因此，温度对酶活影响较大，确定最佳反应温度为40℃。

2.2.4 酶交联时间的确定：以3%戊二醛活化滤纸，交联18h。反应条件同前。具体结果见图3。

由图3可以看出，在与酶交联18h以后，所得海藻糖质量分数达到最大（25.10g/L），而此时，麦芽糖的质量分数也达到最低（1.58g/L）。因此，得出最佳酶交联时间为18h。

2.2.5 反应时间的影响：将滤纸同戊二醛（3%）的交联时间确定为18h，分别同酶交联18h，在40℃下分别反应3h、6h、9h、12h和24h，结果如图4。

从图4中可以看出：1）在反应9h时，海藻糖质量分数达到最大值（27.22g/L）。但是随着反应继续，海藻糖质量分数减少。2）麦芽糖随着反应时间的继续，其质量分数总体趋势是增加的。但在海藻糖质量分数最高（即27.22g/L）时，麦芽糖质量分数都处于较低的水平。因此，得出最佳反应时间为9h。

2.2.6 工业化条件确认：根据前面的实验结果，可得最佳的反应条件：酶液与3%戊

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二醛交联 18h，经壳聚糖涂层的滤纸载体反应 18h 后再与 10%的淀粉溶液反应 9h。在该条件下进行多次对比试验，所得海藻糖质量分数都保持在 27g/L 左右，转化率保持在 54%左右，而且主要杂质麦芽糖的含量一致都保持在较低水平。因此，该条件不但基本达到海藻糖工业化生产的要求，（国内尚未有相当的工业化报道）而且为海藻糖的分离纯化打下了良好的基础。

2.2.7 戊二醛单独作用的影响：由上面的实验结果可以看出，戊二醛在其中可能起着一定的作用，因此，我们在酶液中加入不同浓度下的戊二醛，并与空白作比较，以发现戊二醛具体的作用。在细胞破碎甲苯破碎 1h 之后，各取 20mL 酶液，分别加入 5%（体积比）各体积分数的戊二醛，30℃（空白最佳反应温度）下反应 18、24 和 36h。所得数据如表 2。

表 2　戊二醛对酶活的单独影响

戊二醛浓度	ρ海藻糖 (g/L)		
	18 (h)	24 (h)	36 (h)
0.5%	14.97	16.30	14.06
1%	16.33	16.87	14.96
2%	12.49	13.28	11.96
3%	12.11	13.10	9.47
5%	8.57	9.61	8.95
空白	11.24	12.18	5.88

从上表可以看出，与空白比较，在戊二醛浓度较低的条件（从 0.5 到 3%）下，酶活都有一定提高，并且在 1%时，海藻糖质量分数达到了最大，从 12.18g/L 提高到 16.87 g/L，并且反应了 36h 之后，酶活依然可以达到 14.96g/L，而此时，空白中的海藻糖含量已经从 11.24 g/L 下降到 5.88g/L，损失了一半。但在 5%时，酶活却有很大的损失，说明此体积分数下，戊二醛对海藻糖合成酶的毒性较大。实验结果表明戊二醛具有保护酶活性的性质，并且较低浓度的戊二醛能够提高海藻糖合成酶的酶活，这正是固定化过程使残酶液的酶活有较大提高的原因。

通过以上实验结果，我们认为：1）戊二醛对酶的活性有一定的刺激作用或保护作用；2）戊二醛促进了酶释放；3）涂层后的滤纸吸附了酶的抑制剂和某些杂酶。第一点已经得到了证实，而后面的原因都需要通过实验进一步分析和研究。

3　结论

通过比较 4 种不同载体的作用效果，发现其固定化作用虽不明显，却使残酶液合成酶活力异常提高；在确定酶液同载体 I 作用后，可使海藻糖的质量分数达到最高，并使麦芽糖质量分数保持在较低水平，达到了酶纯化的目的。通过优化各个条件，得到最佳作用条件为：酶液与 3%戊二醛交联 18h 的载体反应 18h，再与 10%的淀粉溶液反应 9h，海藻糖的质量分数可提高到 27.22g/L，转化率上升到 54.43%，麦芽糖的质量分数降低，为 1.85g/L，符合工业化生产的需要并为下一步海藻糖的分离纯化打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] Toshiyuki S. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1998, **72** (8): 915 ~ 922.
[2] Nielsen K. Immunoassay, 1995, **16** (2): 183 ~ 197.
[3] Koichi Y, I liroe Y. Biosci Biotech Biochem, 1997, **61** (1): 160 ~ 161.
[4] 张海平，杨　静，段作营，等．中国食品添加剂，2000；**2**：61 ~ 65.
[5] 陈鹏声，居乃琥，陈石根．固定化酶理论与应用．北京：北京轻工业出版社，1987.
[6] Masahiro Y. Enzyme Bicrob Technol, 1998, vol. **22**: 71 ~ 75.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www,cnki.net