技术与方法

用透性化细胞技术合成海藻糖

高惠玲[1] 袁其朋[1]* 周 延[1] 钱忠明[2]

(北京化工大学生命科学与技术学院 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：建立了一种渗透处理微球菌细胞的方法，得到的透性化细胞可多批使用并能长时间保持胞内酶的活力，极大地提高了单位菌体的利用率，降低了成本，为海藻糖实现工业化开辟了新的思路。实验结果表明：菌悬液用5%（v/v）甲苯处理40 min，得到的菌体即为透性化细胞，再以10%淀粉液化液为底物进行海藻糖转化实验，转化率可达70%；该透性化细胞至少可连续进行6批酶反应（12 h/批），酶活基本保持稳定。

关键词：透性化细胞，海藻糖，胞内酶，合成
中图分类号：Q93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2004）03-0092-05

Trehalose Production by Permeabilized Cells

GAO Hui-Ling[1] YUAN Qi-Peng[1]* ZHOU Yan[1] QIAN Zhong-Ming[2]

(*Department of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing* 100029)[1]
(*Department of Chemistry Science and Applied Biology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong*)[2]

Abstract: A permeabilization method of *Micrococcus* cells has been established. The obtained permeabilized cells could be used for several batches and in the mean time the intracellular enzymes still keep high activity. This method will undoubtedly increase the productivity of the cells and cut down the cost; therefore, it will be a promising way in the trehalose industrialization. The experiment shows: after being treated with 5% (v/v) methylbenzene for 40min, the cells in suspension were converted into permeabilized cells, then the latter acted on 10% liquefied starch to produce trehalose, the conversion ratio could reach 70%. The permeabilized cells could be used at least for 6 batchs (12h per batch) and the intracellular enzyme activity kept steady.

Key words: Permeabilized cells, Trehalose, Intracellular enzyme, Sgnthesize

海藻糖是一种广泛存在于细菌、酵母、真菌、昆虫中的非还原性二糖，由于其独特的生理功能而在世界范围内引起了广泛关注，应用前景十分广阔。目前，海藻糖多采用酶法合成[1]，在日本已实现了工业化；而我国对海藻糖的研究尚属起步阶段，研究单位虽多，但至今仍无工业化成功的相关报道。

海藻糖合成酶有多种，均为胞内酶，如按传统提取工艺，需将细胞破碎后经逐级分离纯化才能获得高活力的酶，由于每步纯化均伴随不同程度的酶活损失，最终将造成总活力的损失，而且操作复杂、耗费巨大，效率低下，制约了其在工业生产中的应用。而采用渗透细胞技术，在不破坏细胞整体内部有机系统的前提下改变细胞壁和膜

* 联系人 Tel：010-64437610，E-mail：yuanqp@mail.buct.edu.cn
收稿日期：2003-08-25，修回日期：2003-10-08

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

的通透性，使得低分子量底物能自由进出细胞的技术则有望克服这些缺点[2]。得到的透性化细胞可以被看作一种不溶性的酶源，与传统方法固定化的酶有相似的用途，但其制备过程简单得多，成本也减少得多。

自 2000 年以来，本研究室就开始了酶法生产海藻糖的研究，目前已建立了一种使用透性化细胞直接进行酶催化生产海藻糖的工艺流程。这种方法不但最大限度地保留了酶活力，而且经多批使用仍能保持高酶活。对透性化细胞的多批使用国内目前没有相似报道，这一方法为海藻糖的早日大规模生产开创了新的思路，具有重要的工业应用前景。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

海藻糖为 Sigma 产品；α 淀粉酶为无锡酶制剂厂生产；HPLC 分析用试剂为色谱纯；其它试剂均为分析纯试剂。

1.2　分析方法

1.2.1　海藻糖的分析方法 – HPLC 法[3]：岛津 LA – 10vp HPLC，ZORBAX-NH2 柱（150 cm），柱温 20℃，流动相：乙腈 – 水（80：20），流速 1 mL/min；示差折光检测器。

1.2.2　细胞组成脱出情况检测：考马斯亮兰法分析总蛋白含量[4]。

1.3　实验方法

1.3.1　菌种培养：(1) 供试菌株：实验室自筛一株微球菌（*Micrococcus roseus*）经诱变获得的高产菌株。据报道该菌的海藻糖合成酶为麦芽寡糖基海藻糖合成酶（MTSase）和麦芽寡糖基海藻糖水解酶（MTHase），经实验证实[5]，并据此确定了以液化淀粉为底物酶法合成海藻糖的实验路线。MTSase 和 MTHase 均为胞内酶，其合成海藻糖的酶反应式为：

$$\text{麦芽低聚糖} \xrightarrow{(\text{MTSase})} \text{麦芽低聚糖海藻糖}$$

$$\text{麦芽低聚糖海藻糖} \xrightarrow{(\text{MTHase})} \text{麦芽糖} + \text{海藻糖}$$

(2) 培养基：斜面培养基：酵母提取物 5 g，蛋白胨 10 g，NaCl 10 g，琼脂 15 g，定容至 1 L，pH 7.0。摇瓶培养基：葡萄糖 20 g，玉米浆 20 g，蛋白胨 5 g，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，定容至 1 L，pH 自然，0.7×10^5 Pa 灭菌 30 min。

(3) 发酵培养：将菌由斜面培养基接种于种子培养基，30℃，170 r/min，培养 20 h。以 5% 的接种量接入摇瓶培养基，30℃，170 r/min，培养 72 h。

1.3.2　透性化细胞的制备：将发酵液 5,000 r/min 离心 10 min，菌体以 30% 浓度悬浮于一定离子强度和 pH 值的磷酸缓冲液，加入 5%（v/v）甲苯水浴振荡 40 min，离心后去除上清即得。

1.3.3　海藻糖酶法合成：将透性化细胞配成 30% 的悬液，加入等体积的 10% 的淀粉液化液，30℃振荡反应 12 h，取样，离心，测上清液中海藻糖含量。

2　结果与分析

2.1　透性化细胞形成条件考察

2.1.1　最佳渗透剂选择：常见细胞渗透处理方法有物理法（低温冷冻、脱水干燥和超声波处理）和化学法（抗菌素法、去垢剂法、有机溶剂法、螯合剂法等）。物理法是使

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

细胞膜和细胞壁的结构产生破坏，细胞因膜/壁结构性损伤而提高通透性；而化学法的渗透机理是试剂透过细胞壁与细胞膜的脂质体进行内反应，破坏膜的结构和脂质体的流动性，使细胞膜失去原有的对胞内外物质传递的调控能力，改变了通透性[6]。

由于物理法在工业生产操作上有一定难度，本实验中，我们选择了更易放大的化学溶剂法，选取常用的有机试剂（甲苯、氯仿、戊二醛）及非离子型表面活性剂（吐温80及Span-20），对细胞进行透性化处理，离心后得透性化细胞，将之用于酶反应，通过海藻糖的产量比较渗透剂的效果表1。

表1 不同渗透剂渗透结果对比表

渗透剂	用量（v/v）	温度（℃）	时间（min）	海藻糖含量（mg/mL）
甲苯	2%	30	60	15.82
CCl_4	2%	30	40	0
戊二醛	2%	30	40	1.29
吐温80	2%	30	60	9.97
Span-20	2%	30	60	11.32

表1结果表明，各种渗透试剂均可增加细胞通透性，其中，甲苯的效果最好，反应体系中海藻糖含量可达15 mg/mL；吐温80和Span-20次之；CCl_4和戊二醛对细胞破坏作用较大，使酶基本失活。因此，下面实验中选择甲苯为渗透剂。

2.1.2 渗透剂用量考察：在细胞悬液中分别加入2%、5%、10%、15%（v/v）甲苯，水浴振荡60 min。离心分离。得到的上清液测总蛋白含量，同时得到的透性化细胞进行酶反应测海藻糖含量，用以考察甲苯用量对细胞通透性改变及对双酶酶活的影响图1。

由图1可以看出，5%甲苯处理后的细胞溶出蛋白最多，继续增加甲苯对蛋白溶出量影响不大；甲苯增加到15%后，总蛋白量反而减少，这可能是由于过量的甲苯使部分蛋白变性，同时稀释了菌悬液的缘故。海藻糖含量的变化趋势基本与总蛋白溶出量的走势相似，用5%甲苯处理的透性化细胞得到的海藻糖含量最高，可达21.26 mg/mL，继续增加甲苯用量，海藻糖含量有所下降，可见过量甲苯对酶有不良影响。

2.1.3 处理时间考察：用5%甲苯处理细胞悬液，时间分别为30、40、60、90 min，测酶反应后的海藻糖含量（图2）。

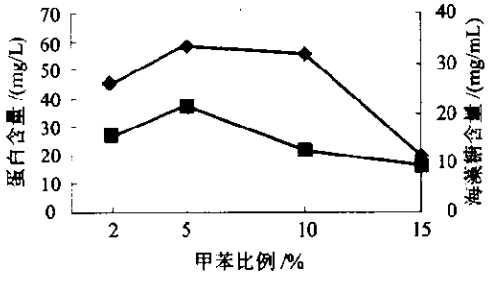

图1 不同甲苯用量对细胞的影响

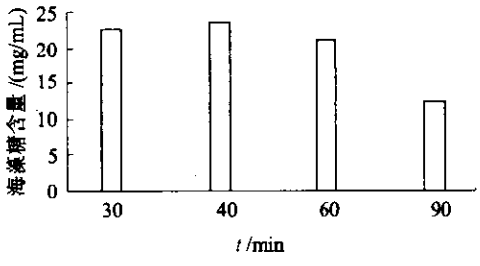

图2 不同处理时间对细胞的影响

结果发现，甲苯破碎40min时的细胞产海藻糖最多，达到了23.69mg/mL，继续延长时间效果反而不理想。因此我们选择40min为最佳渗透时间。

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

2.2 透性化细胞与上清及混合悬液对海藻糖产率的影响

将细胞悬液按上述方法进行渗透处理，离心分离，取等体积的上清液、透性化细胞（透性化细胞加缓冲液配成 30% 悬液）和未离心的混悬液分别加入淀粉液化液进行酶反应，测海藻糖含量（图 3）。

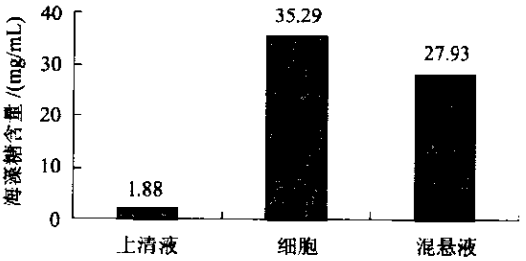

图 3　透性化细胞与上清及混悬液对比

结果显示，上清液中双酶很少，大部分仍留在透性化细胞内；混悬液体系中的海藻糖的转化率比纯透性化细胞体系中略低，分析认为可能是细胞在渗透处理时有一些杂蛋白、糖等释放出来，干扰了酶反应。用纯透性化细胞进行酶反应，海藻糖含量为 35.29 mg/mL，转化率达到了 70.58%。

2.3 透性化细胞使用参数的初步确定

2.3.1 反应时间考察：用透性化细胞进行酶反应，分别在 2、4、6、8、12、18、24 h 取样，考察不同反应时间的海藻糖含量（图 4）。

结果表明，反应到 2h 海藻糖含量就已经达到了 30.26 mg/mL，延长反应时间海藻糖含量会增加，但增势较缓，酶反应于 12 h 时达到最大 37.62 mg/mL，比 2h 时提高了 19.6%。但大生产时，考虑到单位时间产出率，并不一定选 12 h 作为反应时间。

2.3.2 使用批次考察：为了考察胞内酶活的保持能力，我们把透性化细胞反复多批使用，考察每批反应体系中的海藻糖含量，每批反应 12 h，共考察 6 批，结果如图 5 所示。

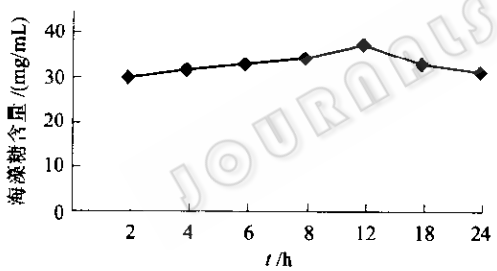

图 4　透性化细胞反应时间的影响

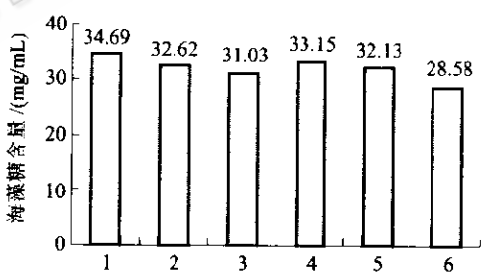

图 5　透性化细胞使用批次考察

按优化后方法得到的透性化细胞至少可反复使用 6 批（共 72 h），海藻糖含量平均达 32.03 mg/mL。前 5 批，胞内双酶酶活并未随批次的增加明显下降，批的转化率基本保持在 60% 以上，第 6 批略低，但也达到了 57%。

我们认为酶活保持时间长的最主要原因就是细胞对酶的保护作用。透性化细胞的细胞壁和细胞膜基本保持完整，甲苯只是在上面“打洞”，并没有破坏其基本结构。因此，细胞膜和细胞壁对胞内酶具有很强的保护和屏蔽作用，首先它可以避免外界环境改变或机械力（如多次离心及长期搅拌）对酶的伤害，其次它还能减少有机试剂及其它杂蛋白与酶接触的机会，降低了酶变性失活可能性。酶在细胞内，底物通过细胞壁及膜进入胞内与酶结合成酶—底物复合物，完成催化反应，产物海藻糖溶出到胞外。当然，还有一种可能就是这种透性化细胞起到一种缓释的作用，使胞内酶并非一次性地，而是分批释放到胞外，在胞外催化底物生成海藻糖。分析认为前者可能性较大。后续实验仍在进行中。

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

本实验由于选定反应时间较长，所以考察的批次不够多。如果缩短反应时间，透性化细胞还可以进行更多批反应，其利用率就会进一步提高，这对其工业化是非常有利的。

3 结论

建立了用一株自筛微球菌的透性化细胞催化海藻糖合成反应的工艺流程。用甲苯做为透性化试剂，反应条件温和，且易于工业化放大，获得的透性化细胞拥有较高酶活。细胞经透性化处理后，虽改变壁和膜的通透性，但整体结构完整，底物既可以进入细胞，保证了胞内酶的催化作用的充分发挥，同时，细胞结构对酶还具有相当的保护作用，延长了酶的使用寿命，而透性化细胞则可多批反应。透性化细胞法生产海藻糖，无疑为海藻糖的大规模工业化生产提供了新的思路和可能。

参考文献

[1] 张红缨，刘 洋，张 今．微生物学通报，1998，25 (4)：236～238.

[2] Flore M V, Veget C E, Ertola R J. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 340～346.

[3] 刘传斌，云战友，鲁济肯，等．食品与发酵工业，1998，24 (5)：40～42.

[4] Bradford M. Anal Biochem, 1976, 72: 248～254.

[5] Toshiyuki．化学工业，1999，6：57～65.

[6] Deeleire M, De Cat W, Van Huynh N. Enzyme Micro Technol, 1987, 9 (6): 300～302.

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