

文章编号:1673-1689(2006)06-0034-03

一株产海藻糖合成酶嗜中温芽孢杆菌的 鉴定及其酶学性质

尚宏丽, 陈红漫*

(沈阳农业大学 生物技术学院, 辽宁 沈阳 110160)

摘 要: 由长白山温泉附近土壤中筛选得到产海藻糖合酶菌株, 为革兰氏阳性菌, 具有芽孢和鞭毛, 其最适生长温度为 55 ℃, 对这一菌株进行生理生化指标测定。进一步对该菌株所产海藻糖合酶的酶学性质进行研究, 酶反应最适作用 pH 值为 7.0, 在 pH 6.6~7.4 时该酶稳定, 最适作用温度为 35 ℃, 在 25~45 ℃ 时该酶可稳定保存。

关键词: 海藻糖; 芽孢杆菌; 酶学性质

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Studies on Screening of Trehalose Synthase-Producing Strain and Its Enzymology Properties

SHANG Hong-li, CHEN Hong-man*

(College of Biotechnology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A strain of trehalose synthase-producing thermophilic was isolated from the soil of hot springs of changbai Mountain. The cells were gram-positive sporulating and motile. The optimum temperature for growth was 55 ℃, The trehalose synthase produced by the strain properties were as follows: The optimum pH value was 7.0, this enzyme also exhibited a good pH adapt ability and stability, more 80% of the highest level was maintained at the range of pH 6.6~7.4. The optimum reaction temperature was 35 ℃, higher ractivity was maintained at the range of 25~40 ℃.

Key words: trehalose; *Bacillus* sp.; enzymology properties

海藻糖是一种稳定的非还原性双糖。广泛存在于微生物及低等沙漠植物中。海藻糖是在环境胁迫的条件下产生的一种应激代谢物。其对生物膜、蛋白质及核酸在逆境下(如高温、高盐、干旱重金属、离子污染、冷冻和辐射)具有保护作用^[1]。当细胞处于以上这些逆境时,胞内海藻糖的含量迅速

上升,保护多种生物大分子,从而保护生命本身^[2]。海藻糖在分子生物学、医学、食品、化妆品、农业等领域有着广泛的应用。20 世纪 90 年代后期,各国科学家致力于开发海藻糖生产技术,但海藻糖无法化学合成,生物法制备包括天然植物或藻类中直接提取法、酶促转化法和微生物发酵法,其中利用来

收稿日期:2005-07-07; 修回日期:2005-11-07.

基金项目:辽宁省自然科学基金项目(2040515).

作者简介:尚宏丽(1977—),女,辽宁辽阳人,理学硕士;*为通讯作者.

源于微生物的酶转化海藻糖最具工业优势。迄今为止的研究表明,与海藻糖合成相关的酶系主要有 5 种类型:1) 海藻糖-6-磷酸合成酶及海藻糖-6-磷酸酯酶;2) 海藻糖磷酸化酶;3) 糖基转移酶和淀粉酶;4) 麦芽寡糖基海藻糖合酶及麦芽寡糖基海藻糖合酶;5) 海藻糖合酶途径。前 4 种途径都需要两步以上的反应,而海藻糖合酶可通过转糖基作用直接将麦芽糖转化为海藻糖,是工业酶法生产海藻糖的首选途径。本研究旨在对已经筛选出嗜中温产海藻糖合酶的菌株进行初步鉴定,并对该酶稳定性、最适作用温度等方面进行研究,为快速工业化生产海藻糖提供理论基础及试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要仪器设备

麦芽糖(分析纯),糊精(分析纯),蛋白胨,牛肉膏,以上试剂均为沈阳化学试剂三厂产品,HITA-CHI-SCR20BC 高速冷冻离心机,JEOL-100 型透射电子显微镜,AGILENT1100 高效液相色谱仪。

1.2 培养基

1.2.1 筛选平板及斜面培养基(组分 g/dL) 麦芽糖 0.5,糊精 2,蛋白胨 0.5,牛肉膏 0.5,K₂HPO₄ 0.1,NaH₂PO₄ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.05,NaCl 5 以上,CaCl₂ 0.1,琼脂 2;pH 7.2。

1.2.2 产酶培养基(组分 g/dL) 麦芽糖 2,蛋白胨 0.5,牛肉膏 0.2,K₂HPO₄ 0.1,NaH₂PO₄ 0.1,MgSO₄ 0.05;pH 7.2。

1.3 培养条件

将分离和保藏的菌株经过活化培养后,以体积分数 15%接种于发酵培养基中,置于 140 r/min 摇床上 35℃培养 48 h,将发酵液以 3 500 r/min 离心 15 min,收集菌体,弃去上清液,菌泥用 10 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液洗涤 2~3 次后,取 1 g 湿菌体悬浮于 5 mL,10 mmol/L pH 7.0 的缓冲液中,加入 0.2 mL 甲苯,35℃水浴振荡 10 h 进行破壁,将破壁后菌液以 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液为粗酶液,进行酶活力的测定。海藻糖合酶反应条件:粗酶液按体积分数 1:1 与 10%麦芽糖混合于 35℃反应 20 h,沸水浴煮 10 min 灭酶活,终止反应,12 000 r/min 离心 15 min,上清液经过 HPLC 进行检测反应液中海藻糖的量。

酶活力的测定:反应体系中每小时产生 1 mg 海藻糖所需要酶量定义为 1 个酶活力单位。

2 结果与分 析

2.1 产海藻糖合酶菌株的初步鉴定

作者所在实验室中保存长白山温泉附近土样,在 55℃以上的条件下筛选分离得到一株产海藻糖合酶菌株,该菌在筛选培养基上为白色单细胞集群,表面湿润,粘稠易于挑起,革兰氏染色为阳性,有芽孢产生,通过电镜照片可观察到有鞭毛、芽孢、杆菌。根据其 主要生理生化指标初步认定该菌是芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)一种,其主要特征见表 1 和图 1。

表 1 菌株的主要特征
Tab. 1 Major characteristics of the strain

理化实验	结果	理化实验	结果
接触酶	+	柠檬酸盐还原	+
葡萄糖产酸	+	明胶水解	+
淀粉水解	-	(M,R)甲基红实验	+



放大 48 000 倍

图 1 菌株电镜照片

Fig. 1 The transmission electron microscopic photo of the strain

2.2 海藻糖合酶酶学性质研究

2.2.1 温度对酶活力的影响 温度对酶活力的影响见图 2。

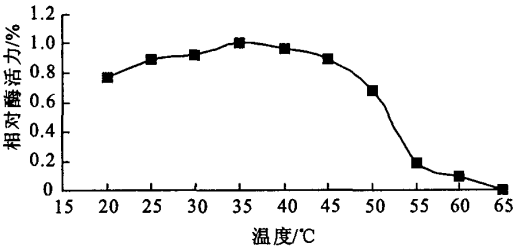


图 2 温度对海藻糖合酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on trehalose synthase activity

结果表明,该菌所产海藻糖合酶最适作用温度

为25~45℃,最适反应温度35℃。

2.2.2 温度对酶稳定性的影响 温度对酶稳定性的影响见图3。

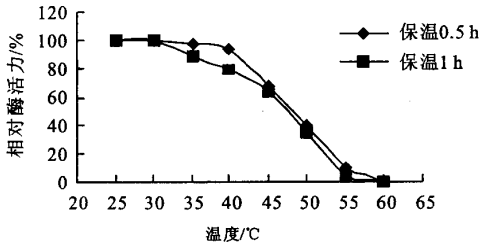


图3 温度对酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the trehalose synthase stability

结果表明,该菌所产海藻糖合酶在25~40℃可以稳定保存,高于45℃时,酶活力损失较多,当温度高于45℃时,0.5 h后酶的活力几乎全部丧失。

2.2.3 pH值对酶活力的影响 pH值对酶活力的影响见图4。

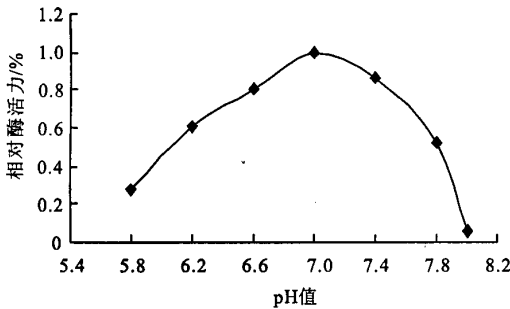


图4 pH值对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on trehalose synthase activity

结果表明,pH值对该菌所产海藻糖合酶的活力影响较大,当pH值为7.0时酶活力最高。

2.2.4 pH值对酶稳定性的影响 pH值对酶稳定性的影响见图5。

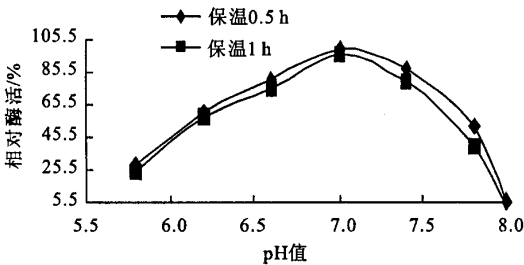


图5 pH值对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the trehalose synthase stability

结果表明,该酶在pH 6.6~7.4之间稳定,pH值过高或过低对酶活力影响很大。

3 讨论

1) 本研究筛选分离得到这株产海藻糖合酶菌株适宜在55℃条件下生长,利用该菌进行从麦芽糖转化生成海藻糖可以避免杂菌的污染,适宜工业化生产海藻糖,该酶的底物作用专一性强,只要一步反应,而且反应流程短,易调节,且麦芽糖价格便宜,更易于工业化生产海藻糖。

2) 本研究筛选的海藻糖合酶性质有其独特之处。该酶最适作用pH值为7.0,与前人报道基本相符^[3],但在pH 6.6~7.4之间均保持较高的活性,相当于最适pH值下活性的85%以上,该合酶反应最适温度为35℃,该温度与前人报道^[3]有所不同,在25~40℃该合酶且可以稳定保存,与文献报道^[4~6]有所不同,这与该合酶来源纯度及其测定体系不相同有关。

3) 通过海藻糖合酶学性质研究,对该酶的分离纯化和活性保护有一定的指导意义,作者将进一步对该菌株基因全序列进行测定,与报道过的相应菌株的序列进行比较,进一步对该菌株进行鉴定。

4 结论

1) 近些年来大量的研究集中于海藻糖合酶产生菌的筛选及其发酵条件的研究,对相应的酶学性质研究报道较少,本研究正好弥补这方面的空白。

2) 作者从长白山附近土壤筛选产海藻糖合酶菌株,该菌株在筛选培养基上为白色细胞集团,表面湿润,粘稠易挑起,革兰氏阳性,有芽孢,鞭毛,杆菌。经过生理生化指标的测定,可初步定为 *Bacillus* sp.

3) 对该菌株产的海藻糖合酶学性质研究得出,该酶最适作用温度为35℃,该酶在25~45℃时可以保持酶活性的85%以上,最适作用pH值为7.0,在pH 6.6~7.4时,该酶仍可以稳定保存。

(下转第41页)

期可达120 d(信噪比保留70%以上)。图6显示的是GICA检测试剂条的信号强度随热处理(56℃)时间的变化。加入保护剂后,在高温(56℃)放置20 d抗体探针的信号强度仍可保留70%以上,而对照放置10 d,信号强度降低至40%以下。

3 结 论

1) 研究建立了一种快速、简易的检测食品中AFB₁的纳米金标免疫层析检测方法。在进行测定时无需分离步骤,不需加入任何试剂,方法简便快捷,10 min内即可得到结果。利用金溶胶产生的信号颜色深浅,可进行定性或定量检测。

2) 当检测质量分数为1.0 μg/kg AFB₁的标准溶液时,检测带的信号差异非常明显,检测时间为10 min之内。方法的稳定性良好,试剂条常温保存期为120 d。

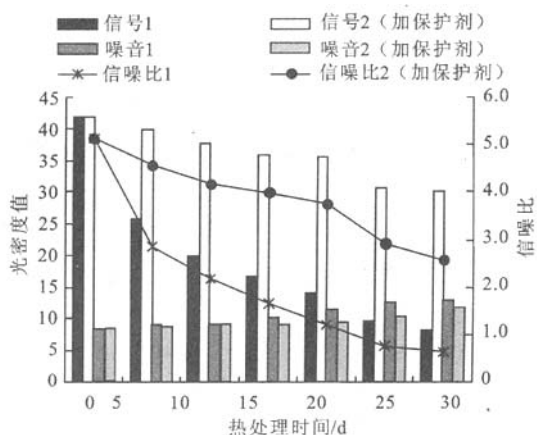


图6 金标免疫层析试剂条的热稳定性(56℃)

Fig. 6 Thermal stability of the immunochromatographic strip(56℃)

参考文献:

- [1] Richard J L, Payne G A. Mycotoxins: risks in plant, animal and humans[M]. Iowa: Council of Agricultural Science and Technology(CAST), 2003; 139-199.
- [2] Chu Fan-shen. Mycotoxins[M]. NY: Academic Press, 2002.
- [3] Chu Fan-shen, Bhatnagar D. Mycotoxins[M]. Basel: Marcel Dekker, 2004; 325-342.
- [4] Horwitz W. Official Methods of Analysis of AOAC International[M]. [S. l.]: AOAC International, 2000.
- [5] Gilbert J. Overview of mycotoxin methods, present status and future needs[J]. *Nat. Toxins*, 1999, 7: 347-352.
- [6] Chu Fan-shen. Immunochemical methods for mycotoxin analysis: from radioimmunoassay to biosensors[J]. *Mycotoxins*, 2004, 54: 1-14.
- [7] Paek S H, Lee C W, Yook S H, et al. Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*[J]. *Anal Lett*, 1999, 32: 335-360.
- [8] Horton J K, Swinburne S, Sullivan M J. A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin[J]. *J Immuno Method*, 1991, 140: 131-134.
- [9] Richard J, Cole Joe W. Dorner. Extraction of aflatoxin from naturally contaminated peanuts and solvent/peanut rations [J]. *J AOAC*, 1994, 77(6): 1509-1511.
- [10] 袁易全, 陈思忠. 近代超声原理与应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 1996; 134.
- [11] 赵晓联, 赵春城, 陆茂林, 等. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素B₁误差分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2001(11): 87-93.

(责任编辑: 秦和平, 杨萌)

(上接第36页)

参考文献:

- [1] 陈红漫, 祝令香, 董志杨. 酿酒酵母海藻糖-6-磷酸合成酶基因克隆及植物表达载体的构建[J]. *微生物学报*, 2001, 41(1): 409-411.
- [2] 张红缨. 海藻糖生物合成和相关的酶学特性[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 236-238.
- [3] 陈炜, 何秉旺. 酶法合成海藻糖研究的新进展[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(3): 164-166.
- [4] Roser B. Trehalosedrying-a novel replacement for freeze drying[J]. *Biopharm*, 1991, 4(8): 47-53.
- [5] 曾国驱. 海藻糖产生菌筛选及其发酵条件的研究[J]. *生物技术*, 2002, 12(3): 28-31.
- [6] 荣绍丰. 一株转化淀粉或麦芽糖寡糖生成海藻糖的菌株 D-97 的鉴定[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(2): 57-60.

(责任编辑: 李春丽)