

# 毕赤酵母展示海藻糖合成酶及其性质研究

盛敏<sup>1</sup>, 谢定<sup>\*1</sup>, 文李<sup>1</sup>, 焦玲<sup>1</sup>, 姜博<sup>1</sup>, 方芳<sup>1</sup>, 刘雄赳<sup>2</sup>

(1. 长沙理工大学 化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 长沙帅牌油脂有限责任公司, 湖南 长沙 410008)

**摘要:** 利用毕赤酵母表面展示天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 海藻糖合成酶 (Trehalose synthetase, TS, EC 5.4.99.16) 并研究其酶学性质。人工合成酵母内源壁蛋白 (GPI-modified wall proteins, GCW14) 与天蓝色链霉菌海藻糖合成酶组合 DNA (GCW14-TS), 将其亚克隆到 pPIC9k 载体后转化到 GS115 酵母菌中, 成功构建了 pPIC9k-GCW14-TS 载体, 并将 TS 展示在毕赤酵母 GS115 表面, 然后对其酶学性质进行研究。发现其在 30~45 °C 温度范围都能发挥作用, 最适 pH 为 8.5, K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 等金属离子对其有促进作用且重复使用 5 次后仍然可以保持 75% 以上的酶活性。该基因工程菌具有海藻糖合成酶固定化酶性质, 可用于将麦芽糖转化为海藻糖的产业化生产。

**关键词:** 海藻糖合成酶; 毕赤酵母; 全细胞催化剂酶学性质

**中图分类号:** TS 261 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)01—0059—07

## Displaying of Trehalose Synthase Through *Pichia pastoris* and its Enzymatic Properties

SHENG Min<sup>1</sup>, XIE Ding<sup>\*1</sup>, WEN Li<sup>1</sup>, JIAO Ling<sup>1</sup>, JIANG Bo<sup>1</sup>, FANG Fang<sup>1</sup>, LIU Xiongjiu<sup>2</sup>

(1. College of Chemical and Biology, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China; 2. Changsha Handsome Brand Oil Limited Company, Changsha 410008, China)

**Abstract:** The study aimed to display trehalose synthase (TS, EC 5.4.99.16) on the surface of *Pichia pastoris* and investigate its enzymatic properties. Synthesized gene from *Streptomyces coelicolor* trehalose synthase and yeast cell wall protein GCW14 was cloned to pPIC9k carrier and transformed into yeast GS115 and thus the pPIC9k-GCW14-TS carrier was constructed to display TS. Then the properties of the recombinant trehalose synthase were determined. Results showed that the recombinant trehalose synthase possessed the optimal temperature 30~45 °C and pH 8.5, K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> increased its enzymatic capacity and more than 75% of the activity was still remained after it was reused for 5 times. Therefore, this recombinant strain can be repeatedly use as a whole cell catalyst to convert maltose into trehalose.

**Keywords:** trehalose synthase, *Pichia pastoris*, whole cell catalyst enzymatic properties

收稿日期: 2014-11-02

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2015JJ2010); 湖南省 2011 协同创新资助项目; 长沙市重点科技项目(K1205230-11)。

\* 通信作者: 谢定(1962—), 男, 湖南耒阳人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: eslg5148495@126.com

海藻糖 (Trehalose) 是两分子葡萄糖以  $\alpha, \alpha$ -1,1-糖苷键相连而成的非还原性二糖, 由于其具有对生物体优良的抗逆保护作用等优良性能而被誉为“生命之糖”和“二十一世纪的新型糖类”, 在食品、保健、医疗等行业的应用越来越普遍, 因而其大规模制造方法受到广泛关注<sup>[1]</sup>。在海藻糖酶法生产工艺中, 利用海藻糖合成酶将麦芽糖转化成海藻糖的方法具有简单、快速、产业化生产成本低的特点<sup>[2]</sup>, 因此, 近些年越来越多的海藻糖合成酶基因被分离、提纯并在大肠杆菌中进行了表达<sup>[3-5]</sup>。但海藻糖合酶在大肠杆菌细胞内表达后需要破壁取酶, 重组蛋白也易以包涵体的形式存在, 因而存在酶量不够且难以重复利用等不足。近些年, 酵母菌展示技术的应用研究越来越广。利用酵母菌展示酶作催化剂 (也称全细胞催化剂 whole cell catalyst) 可以提高酶的产量, 使用过程中无需分离纯化, 且可重复利用, 因而可以解决上述大肠杆菌细胞内表达该酶的不足。目前应用较多的为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 与毕赤酵母 (*Pichia pastoris*), 这两种表面展示系统是一种新型的真核表达系统, 兼具原核生物易于培养繁殖快和真核生物蛋白翻译后的修饰功能两大系统的优点, 可以高效表达外源蛋白而细胞内蛋白分泌极少, 可以进行高密度发酵, 可用于表达具有生物活性的外源蛋白<sup>[6-8]</sup>。相较于酿酒酵母, 毕赤酵母表达外源蛋白糖基化程度较低, 也具有乙醇氧化酶基因诱导型的强启动子。目前, 已有毕赤酵母成功展示多种酶的报道, 但尚未见毕赤酵母表面成功展示海藻糖合成酶的报道。本研究以毕赤酵母 GS115 作为细胞载体构建酵母表面展示系统展示海藻糖合成酶并初步研究了该全细胞催化剂的酶学性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 GCW14-TS 组合 DNA

根据林影等<sup>[9]</sup> 毕赤酵母内源壁蛋白 (GPI-modified wall proteins, GCW14) 序列以及韦宇拓等<sup>[10]</sup> 的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 海藻糖合成酶 (Trehalose synthase, TS, EC 5.4.99.16) 序列, 设计了酵母内源壁蛋白 (GCW14) 与天蓝色链霉菌海藻糖合成酶组合 DNA (GCW14-TS) 序列, GCW14-TS 序列的 5' 端添加了 *Eco* RI 限制性内切酶位点, 3' 端添加了 *Not* I 位点。 *Eco* RI-GCW14-

TS-*Not* I 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并克隆到 pUC57 载体的多克隆位点上, 命名为 pUC57-GCW14-TS。(6-360bp 为 GCW14, 361-2058bp 为 TS)

GAATTC5' -6gcttactctaactgaacttacacttacgagactac  
catcaccgatgtgtcaccgagctcaccacttactgccagagccaaccacct  
tcgttacaagaacaagaccatcactgtgaccgcccccaaccatttgaccatc  
actgactgtccttgaccatctccaagaccaccaagatcaccactgatgtcc  
accaaccaccactccacccccacaccaccaccactcactgcatctac  
ctctacccagctccaaccactctgtttctaccatctctcaggggtgtgtct  
aaggctggt  
360ATGATCGTCAACGAGCCCGTGCCGGACACCTT  
CGAGGACACCCCGCCAAGGACCGGGACCCGGAC  
TGTTCAAACGAGCCGTCTTCTACGAGGTCCTCGT  
CCGCTCCTTCCAGGACAGCAACGGCGACGGCATC  
GGTGATCTCAAGGGCCTGACCGCCAAGCTGGACT  
ACCTGCAATGGCTCGGCCTGGACTGCCTGTGGCT  
CCCGCCCTTCTTCAAGTCAACCGCTGCGCGACGGCG  
GTTACGACGTCTCCGACTACACCGCCGTGCTGCCG  
GAGTTCCGGCGACCTGGCCGACTTCCGTGGAGTTCGT  
GGACGCGGCGCACCAGCGCGGCATGCGCGTGATC  
ATCGACTTCGTTCATGAACCACACCAGCGACCAGC  
ACCCGTGGTTCCAGGAGTCCCGCAGGAACCCGGA  
CGGCCCTACGGCGACTACTACGTCTGGGCCGAC  
GACGACAAGCAGTTCAGGACGCGCGGATCATCT  
TCGTGACACCGAGGCGTCCAAGTGGACCTACGA  
CCCGGTGCGCAAGCAGTACTACTGGCACCGGTTTC  
TTCTCCACCAGCCGGACCTCAACTACGAGAACCC  
GGTTCGTGACGAGGAGATGATCTCCGCGCTGAAG  
TTCTGGCTGGACCTGGGCATCGACGGTTCGGCT  
GGACGCGGTGCCGTACCTTACCAGGAGGAGGGC  
ACCAACTGCGAGAACCTCCCGCGCACGCACGACT  
TCCTGAAGCGGGTCCGCAAGGAGATCGACGCGCA  
GTACCCGGACACGGTGGTGTGTCGGCCAGGCCAAC  
CAGTGGCCGGAGGACGTGGTTCGACTACTTCGGCG  
ACTACGCGGGCGGGCGGGACGAGTGCCACATGGC  
CTTCCACTTCCCGTTCATGCCCGCATCTTCATGGC  
GGTCAGAAGGAGTCCCGCTACCCGGTCTCCGAA  
ATCCTCGCCAAGACCCCGGCCATCCCGTCCGGCTG  
CCAGTGGGGCATCTTCTGCGCAACCACGACGAG  
CTGACCCTGGAGATGGTACCGACGAGGAACGCG  
ACTACATGTACGCGGAGTACGCCAAGGACCCGCG

CATGCGCGCCAACATCGGCATCCGGCGCAGGCTC  
 GCCCCGCTCCTCGACAACGACCGCAACCAGATCG  
 AGCTGTTACCGCCCTGCTGCTGCCCTGCCGGC  
 TCGCCGATCCTCTACTACGGCGACGAGATCGGCAT  
 GGGCGACAACATCTGGCTCGGGACCGCGACGCC  
 GTGCGCACCCCATGCAGTGGACGCCGACCGCA  
 ACGCGGGCTTCTCGTCTCGACCCGGGCCGCTG  
 TTCCTGCCCACGATCATGGACCCGGTCCACGGTTA  
 CCAGGTGACGAACGTCGAGGCGTCCATGGCCTCG  
 CCCTCCTCCCTGCTGCACTGGACCCGGCGCATGAT  
 CGAGATCCGCAAGCAGAACGTGGCCTTCGGCCTG  
 GGCACCTACACCGAGCTGCCGTCGTTCAACCCTG  
 CCGTCTGGCCTTCCTGCGGAACACGAGGACGA  
 CCTGGTGTGTGCGTCCACAACCTTCTCCCGGTTCC  
 CGCAGCCGACGGAGCTGGACCTCAGCGCCTTCGA  
 CGGACGCCATCCGGTCGAGCTGTTCCGGCGGGTC  
 CGCTTCCCGCGGTCGGTGACCTGCCGTACCTGCT  
 GACCCTGGGCGGTACGGCTTCTACTGGTTCCGCC  
 TGGCAAGGACGCCGCC<sup>2058</sup>-3'GCGGCCGC(2066bp)

### 1.2 主要仪器设备

琼脂糖凝胶电泳仪: DYCP-31DN 型, 北京天  
 池仪诚生物科技有限公司产品; 凝胶成像仪:  
 DOC2000 型, 美国 Bio-Red 公司产品; 恒温摇床:  
 NS-2102C 型, 天津市欧诺仪器仪表有限公司产品;  
 紫外-可见分光光度计: UV2600 型, 上海舜宇恒平  
 有限公司产品。

### 1.3 其它材料和试剂

菌株和质粒: pPIC9K: 购自美国 Invitrogen 公  
 司; 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 宿主菌: 购自中  
 国农业微生物菌种保藏管理中心; 工具酶、试剂与  
 试剂盒: 限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Mlu* I、*Sac* I,  
 T4 DNA 连接酶, DNA Marker: 购自大连宝生物科技  
 有限公司 (takara); 质粒小量提取试剂盒、胶回收试  
 剂盒、PCR 纯化试剂盒: 购自德国 Qiagen 公司产品;  
 PEG3350、LiCl: 购于美国 sigma 公司; 其他试剂为进  
 口分装或国产分析纯。

### 1.4 方法

**1.4.1 pPIC9K-GCW14-TS 载体的构建** 分别将  
 pUC57-GCW14-TS 和 pPIC9K 载体进行 *Eco* RI 和  
*Not* I 双酶切反应, 37 °C 水浴 4 h 后用 1.2 g/dL 琼脂  
 糖凝胶电泳进行鉴定。采用凝胶回收试剂盒对目的  
 基因片段 GCW14-TS 和 pPIC9K 载体片段进行回

收。再用 T4 DNA Ligase 进行连接反应, 22 °C 过夜  
 连接, 将其转化到 DH5a 感受态细胞中, 并涂布在含  
 有 amp 和 kana 抗性的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜  
 培养后挑取克隆进行摇菌培养, 质粒抽提, 并进行  
*Eco* RI 和 *Not* I 双酶切反应, 并用 1.2 g/dL 琼脂糖  
 凝胶电泳鉴定。将阳性克隆命名为 pPIC9K-  
 GCW14-TS。

### 1.4.2 pPIC9K-GCW14-TS 转化到毕氏酵母 GS115

中 按照如下步骤进行: 煮沸 1 mL 鲑鱼精 DNA 5  
 min, 迅速冰浴后以制备单链担体 DNA; 将 pPIC9K-  
 GCW14-TS 用 *Sac* I 内切酶进行线性化处理; 将感  
 受态酵母菌 GS115 离心, 用 Tips 去除残余的 LiCl  
 溶液; 对于每一个转化, 按以下顺序加入:  
 PEG3350, 240 mL; 1 mol/L LiCl, 36 mL; 2 mg/mL 单  
 链 Salmon sperm DNA, 25 mL; 0.1~0.2 mg/mL 质粒  
 DNA, 50 mL; 剧烈旋涡混匀至沉淀菌体完全分布均  
 匀 (约 1 min); 30 °C 水浴孵育 30 min; 42 °C 水浴热  
 休克 20~25 min; 6 000~8 000 r/min 离心收集酵母  
 菌体; 重悬酵母于 1 mL YPD 培养基, 30 °C 摇床孵  
 育; 1~4 h 后, 取 25~100 mL 菌液铺 YD 选择性培养  
 基平板, 于 30 °C 培养 2~3 d 鉴定 (将表达菌株和对  
 照菌株在固体培养基平板, 30 °C 培养至转化子出  
 现)。

### 1.4.3 全细胞催化粗酶液的制备

将毕赤酵母重组菌接种到 YPD 液体培养基中, 30 °C,  
 180 r/min 培养 24 h 进行活化。按体积分数 1% 的接种量转接  
 至新鲜的 BMGY 培养基中, 30 °C, 180 r/min 培养 4~  
 5 d, 每 24 h 添加甲醇进行诱导。收集发酵菌体, 菌  
 泥用 pH 8.0 缓冲液洗涤 3 次。经离心后得湿菌体,  
 将离心后的湿菌体进行称重, 并与本研究前期所采  
 用的重组大肠杆菌同期培养后称重进行比较。取 1  
 g 湿菌体悬浮于 5 mL Tris-HCl 缓冲液中, 制得全细  
 胞催化粗酶液。

### 1.4.4 全细胞催化活力测定

反应条件: 将上述实验获得的粗酶液按体积比 1:1 加入质量分数 10%  
 的麦芽糖溶液, 在 35 °C、180 r/min 反应 20 h, 沸水  
 浴 10 min 灭酶。调节 pH 后, 加入 1 mL 糖化酶, 60 °C  
 保温 14 h, 沸水浴 10 min 灭酶。测定酶活力。酶活力  
 测定 (3,5-二硝基水杨酸法, DNS 法)<sup>[11]</sup>: 葡萄糖标准  
 曲线的绘制: 分别取葡萄糖标准液 (1 mg/mL) 0、0.2、  
 0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 15 mL 刻度试管中, 用蒸馏  
 水补足至 1 mL, 准确加入 DNS 试剂 2 mL, 沸水煮

沸 2 min。冷却至室温后用水补足至 15 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度,并绘制标准曲线。样品液经过适当的稀释,取稀释后的样品液 1.0 mL 于 15 mL 刻度试管中,加入 DNS 试剂 2.0 mL,沸水煮沸 2 min,冷却至室温后用水补足到 15 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度。从葡萄糖标准曲线上查出稀释样品液中的葡萄糖质量浓度,再计算出原样品液的葡萄糖质量浓度。计算出酶活力。

酶活力定义:在上述条件下,每 1 g 湿菌体酶 1 min 催化转化麦芽糖产生 1  $\mu\text{g}$  海藻糖为 1 酶活力单位 A(u)。

$$A = \frac{\Delta x \times 342}{180 \times 2 \times t}$$

式中: $\Delta x$  为葡萄糖差值微克数(空白-酶反应), $\mu\text{g}$ ;  $t$  为时间, min。

#### 1.4.5 全细胞催化剂的性质研究

1) 发酵时间对全细胞催化剂的活性影响 将种子液转移至 BMGY 培养基中培养后加甲醇诱导发酵,分别在 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 后取样,离心制得全细胞粗酶液,将粗酶液按体积比 1:1 加入质量分数 10% 的麦芽糖溶液,在 35  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 反应 14 h,沸水浴 10 min 灭酶。调节 pH 后,加入 1 mL 糖化酶,60  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h,沸水浴 10 min 灭酶。测定酶活力。

2) 温度对全细胞催化剂活性的影响 将菌体重悬于 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液制得粗酶液,分别在 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70  $^{\circ}\text{C}$  下保温 30 min 后,将粗酶液按体积比 1:1 加入质量分数 10% 的麦芽糖溶液,在 35  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 反应 14 h,沸水浴 10 min 灭酶。调节 pH 后,加入 1 mL 糖化酶,60  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h,沸水浴 10 min 灭酶。测定酶活力。为测定其温度的稳定性,将全细胞催化剂粗酶液置于 30, 40, 45, 50  $^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中分别保温 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h 后再按上述方法测定其酶活力。

3) pH 值对全细胞催化剂活性的影响 将菌体分别重悬于 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 的缓冲液后,30  $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min。再以 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤并重悬菌体制得粗酶液将粗酶液按体积比 1:1 加入质量分数 10% 的麦芽糖溶液,在上述反应确定的最适温度下 180 r/min 反应 14 h,沸水浴 10 min 灭酶。调节 pH 后,加入 1 mL 糖化酶,60  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h,沸水浴 10 min 灭酶。测定酶活力。为测定其 pH 值的稳定性,将全细胞催化剂重悬

于 pH 为 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 的缓冲液中,30  $^{\circ}\text{C}$  保温 24 h 后,再以 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤并重悬菌体制得粗酶液,再按上述方法测定其酶活力。

4) 金属离子对全细胞催化剂活性的影响 用去离子水分别配置浓度为 0.01 mol/L 的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等各种金属盐溶液,然后将这些金属盐溶液与同体积的酶反应体系在上述反应确定的最适温度下 180 r/min 反应 14 h,沸水浴 10 min 灭酶。调节 pH 后,加入 1 mL 糖化酶,60  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h,沸水浴 10 min 灭酶。测定酶活力。

5) 全细胞催化剂固定化效果 将使用过的全细胞催化剂用缓冲液洗涤 3 次后并重悬制得粗酶液,重复 1.4.4 的步骤测定全细胞催化剂的活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 pPIC9K-GCW14-TS 载体构建

分别将 pUC57-GCW14-TS 和 pPIC9K 载体进行 *Eco* RI 和 *Not* I 双酶切反应,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 4 h 之后用 1.2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳鉴定。采用胶回收试剂盒回收目的基因片段 GCW14-TS 和 pPIC9K 载体片段(图 1)。之后用 T4 DNA Ligase 进行连接反应,22  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接,之后转化到 DH5a 感受态细胞中,涂布在含有 amp 和 kana 抗性的 LB 固体培养基上进行 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。挑取克隆进行摇菌,质粒抽提,并进行 *Eco* RI 和 *Not* I 双酶切反应,之后用 1.2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将阳性克隆命名为 pPIC9K-GCW14-TS。

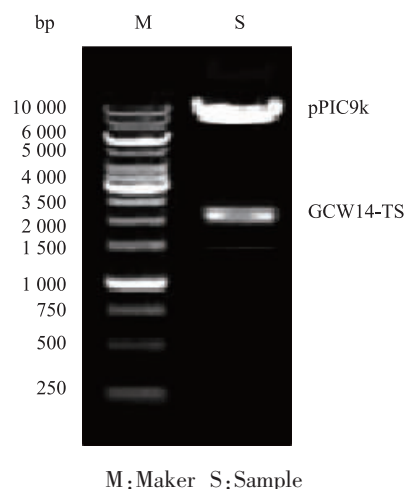


图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis



## 2.2 pPIC9k-GCW14-TS 载体转化到 GS115 的结果

将 pPIC9k-GCW14-TS 质粒转化到毕赤酵母 GS115 感受态的结果如图 2~3。作者所选用的毕赤酵母 GS115 是组氨酸缺陷型菌,因此其在 YD 培养基上是不能生长的,但成功转化了 pPIC9K 的 GS115 酵母菌能在 YD 培养基上生长,因此可以以此鉴定 pPIC9k-GCW14-TS 载体是否成功转入到 GS115 中。

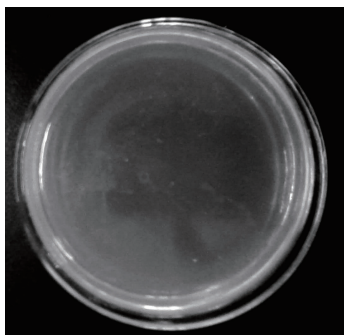


图 2 GS115 感受态细胞的 YD 选择性培养基平板

Fig 2 Competent GS115 without pPIC9K-GCW14-TS could not grow in the YD selected plate

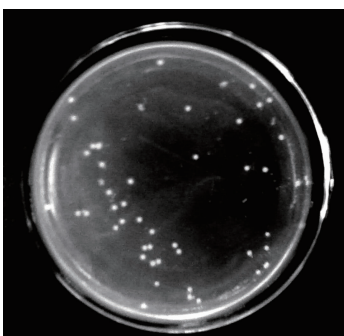


图 3 pPIC9K-GCW14-TS 基因转化到 GS115 感受态细胞中的 YD 选择性培养基平板

Fig 3 Competent GS115 with successfully transformed pPIC9K-GCW14-TS could grow in the YD selected plate because histidine synthase genes were included in pPIC9K

## 2.3 发酵时间对全细胞催化活性的影响

测定不同发酵时间后全细胞催化剂的酶活,如图 4 所示,添加甲醇诱导发酵,随着时间的增加,全细胞催化剂的酶活力会持续增长,但经过 60 h 后酶活力增长变慢并在发酵 72 h 后达到一个最大值并持续保持稳定,可能由于培养基组分的含量以及毕赤酵母菌的生长周期等原因使得全细胞催化剂的酶活力不再增长。

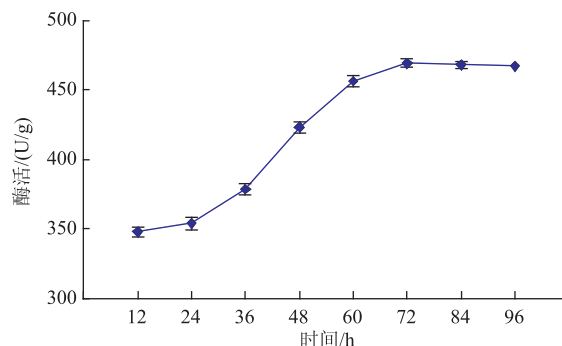


图 4 发酵时间对全细胞催化剂的活性影响

Fig. 4 Effects of fermentation time on the activity of whole-cell catalyst

## 2.4 温度对全细胞催化活性的影响

测定不同温度下全细胞催化剂的酶活,由图 5 可见,该全细胞催化剂最适作用温度为 35 °C,温度 30~45 °C 的温度范围内都能保持 80% 以上的相对酶活力,温度 50 °C 有 71.14% 的酶活性,65 °C 时仍有 38% 的酶活性。分别在 30,40,45,50 °C 保温一定时间后再测定其酶活,如图 6,在 30 至 40 °C 温度范围类全细胞催化剂酶活力持续稳定,在 45 和 50 °C 温度下,随着保温时间的延长,酶活力会有所下降。

## 2.5 pH 对全细胞催化活性的影响

测定不同 pH 值缓冲液条件下的海藻糖合酶酶活绘制曲线图如图 7 所示。该全细胞催化剂最适 pH 为 8.5,在 pH 7.5~9.5 范围内都能保持 70% 以上的酶活力。但 pH 低于 7.0 时,酶活力下降较为缓慢。当 pH 大于 9.5 时酶活力下降得较快,pH 为 10.0 时,酶活力仅为最大值的 48.23%。不同的 pH 缓冲液下保温 24 h 后测定其 pH 值稳定性,如图 8 所示,在 pH 值 7.5~9.5 的范围内具有较高的酶活力。

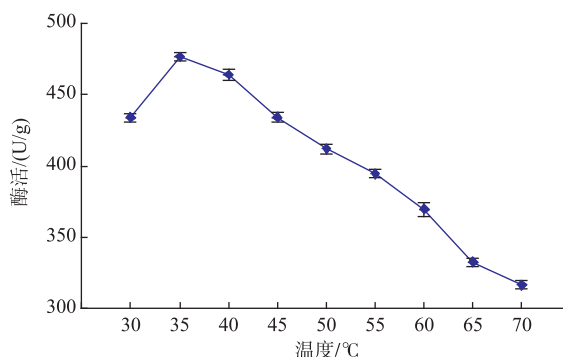


图 5 温度对全细胞催化活性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the activity of whole-cell catalyst

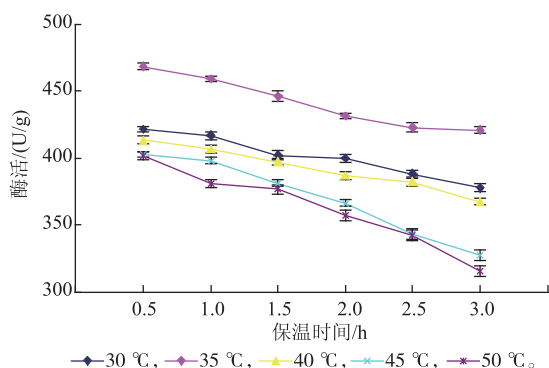


图6 全细胞催化剂的温度稳定性

Fig. 6 Temperature stability of the whole-cell catalyst

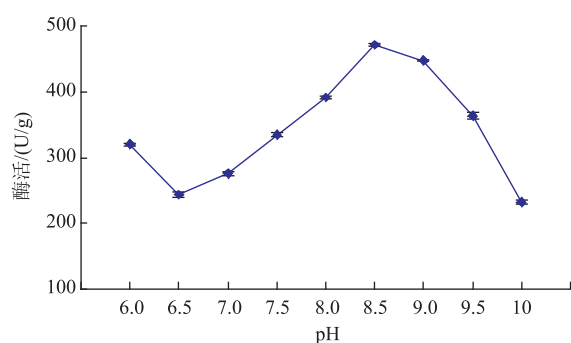


图7 pH值对全细胞催化剂活性的影响

Fig. 7 Effects of pH on the activity of whole-cell catalyst

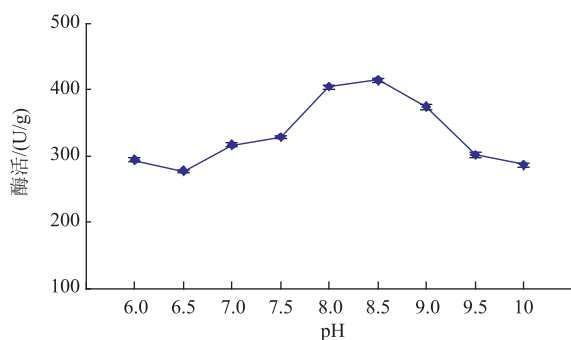


图8 全细胞催化剂的pH值稳定性

Fig. 8 Stability of the activity of whole-cell catalyst with different pH values

### 2.6 金属离子对全细胞催化剂活性的影响

部分金属离子是酶活性中心或辅酶、辅基的组成部分对酶功能有催化作用、结构稳定作用和调节作用,但有些金属离子会对酶产生强的抑制作用,会与酶的必需金属离子竞争争夺结合部位从而影响酶的活性。由表1可知,  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 离子对全细胞催化剂有促进作用,  $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 等重金属离子对该全细胞催化剂有着较强的抑制作用,除了是因为对酶有抑制作用以外有可能也是对酵母菌细胞本身

有抑制作用,  $Na^+$ 离子对全细胞催化剂几乎没有影响。

表1 金属离子对全细胞催化剂活性的影响

Table 1 Effects of metal ions on the activity of whole-cell catalyst

金属离子	浓度/(mol/L)	酶活/(U/g)
None	0.01	474.09
$Na^+$	0.01	462.43
$K^+$	0.01	480.91
$Mg^{2+}$	0.01	501.32
$Zn^{3+}$	0.01	332.26
$Mn^{2+}$	0.01	293.45
$Ca^{2+}$	0.01	416.34
$Cu^{2+}$	0.01	166.45
$Fe^{3+}$	0.01	205.65

### 2.7 全细胞催化剂的固定化效果

游离酶在应用中性质不稳定,对环境较为敏感且在反应中易失活及反应产物难以分离。因此,海藻糖合酶在应用时通常对其加以固定化,酵母表面展示固定海藻糖合酶较之以前的固定化方法具有无需固定化操作以及可重复使用的特性。图6显示了全细胞催化剂的固定化效果,该全细胞催化剂重复使用5次之后仍具有75%以上的相对酶活力。活性降低的原因可能是每次重复洗涤有少量的酵母菌的损失以及回收过程中多次冲洗导致全细胞催化剂活性降低以及反应过程中该全细胞催化剂部分热失活。

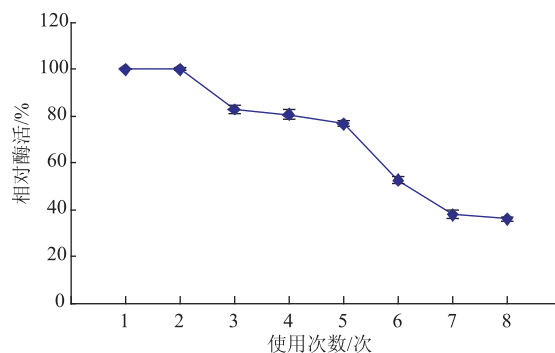


图9 全细胞催化剂的使用次数与相对活性

Fig. 9 Activities of the whole-cell catalyst after repeated uses

## 3 结语

海藻糖具有对生物体优良的抗逆保护作用等

优良性能在食品、医药、化妆品等行业有很大的应用价值。目前海藻糖的主要生产方法是酵母抽提法、酶合成法、基因重组法等。基因重组法是目前应用的较多的一种方法,闫俊艳<sup>[12]</sup>、黄英<sup>[13]</sup>等人将海藻糖合酶基因转入大肠杆菌中进行表达但存在需要破壁取酶、酶量不多以及酶难以重复利用等不足之处<sup>[14]</sup>。王瑞明<sup>[15]</sup>等人将来源于恶臭单胞菌海藻糖合酶基因在毕赤酵母中表达,但目的蛋白滞留在胞内不能分泌表达。作者首次将天蓝色链霉菌海藻糖合酶基因(TS)与毕赤酵母内源壁蛋白GCW14组合DNA转化到毕赤酵母GS115中,通过摇瓶发酵培养使目的蛋白能够在酵母细胞壁上表达。重组的毕赤酵母菌通过高密度发酵后菌体重量上占很大优势,经统计湿菌体重量可达到27.56 g/L,较之本研究前期所培养的重组大肠杆菌湿重比重可达5倍以上,

并且不需要对其进行分离提纯及固定化处理。本文对该全细胞催化剂的酶学性质进行了初步研究发现最适作用温度为35℃,且在30~45℃的温度范围内都能保持80%以上的相对酶活力,在50℃的较高温度仍有71.14%的相对酶活力,50℃保温一定时间后仍具有较高的活性,因此此全细胞催化剂具有良好的温度稳定性。最适pH为8.5,在pH值7.5~9.5的范围内也具有较高的相对酶活力。K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等离子对全细胞催化剂活性有促进作用,但Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>等重金属离子因对酵母菌细胞有抑制作用因而对全细胞催化剂的活性有所影响,但该全细胞催化剂重复使用5次后任然可以保持75%以上活性,这为拓展海藻糖合酶的应用提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] Richards A B, Krakowka S, Dexter L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2002, 40: 871-898.
- [2] Li J Y, Huang R B, Huang Y, et al. Cloning, expression, properties, and functional amino acid residues of new trehalose synthase from *Thermomonospora curvata* DSM 43183[J]. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, 2013, 90: 26-32.
- [3] Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1996, 60(4): 640-644.
- [4] Wei Y T, Zhu Q X, Luo Z F, et al. Cloning, expression and identification of a new trehalose synthase gene from *Thermobifidafuscagenome*[J]. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 2004, 36(7): 477-484.
- [5] Lee J H, Lee K H, Kim C G, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 68(2): 213-219.
- [6] Annie Gai, K Dane Witterup. Yeast surface display for protein engineering and characterization [J]. **Current Opinion in Structure Biology**, 2007, 17: 467-473.
- [7] Eric T. Boder, Maryam Raeeszadeh-Sarmazdeh [J]. Vincent Price. Engineering antibodies by yeast display [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 526: 99-106.
- [8] Yun Liu, Rui Zhang, Zhongshuai Lian, et al. Wright. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014, 106: 17-25.
- [9] 林影, 叶燕锐, 江逢春, 等. 一种毕赤酵母壁蛋白及其构建的表面展示系统和构建方法 [P]. 中国专利, 201110048457.6. 2011-03-01.
- [10] 韦宇拓, 黄日波, 梁甲元, 等. 一种天蓝色链霉菌海藻糖合成酶基因及其应用 [P]. 中国专利, 201010614814.6. 2010-12-30.
- [11] 王蕾, 郑璞. DNS法定量测定海藻糖的研究[J]. *食品科技*, 2004(2): 82-84.  
WANG Lei, ZHENG Pu. The DNS method for quantitative determination of trehalose research[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2004(2): 82-84. (in Chinese)
- [12] 闫俊艳. 浑红红球菌海藻糖合成酶基因的克隆、表达与功能鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [13] 黄英, 林芳, 雷攀先, 等. 玫瑰链霉菌海藻糖合成酶基因克隆、表达及功能鉴定[J]. *生物技术*, 2013, 23(1): 11-15.  
HUANG Ying, LIN Fang, LEI Panxian, et al. The rose *Streptomyces* trehalose synthase gene cloning, expression and function evaluation[J]. **Journal of Biotechnology**, 2013, 23(1): 11-15. (in Chinese)