

# 海藻酸锶凝胶固定化含海藻糖合酶细胞的研究

张 峻, 陈晓云, 陈 颖, 齐 欣, 魏雪生  
(天津市园艺工程研究所, 天津 300384)

**摘 要:** 含有海藻糖合酶的亚栖热菌 CBS-01 菌株细胞经过透性化处理后, 以海藻酸锶凝胶对透性化细胞进行了固定化, 当加酶量为 12U/g 海藻酸钠时, 所得固定化细胞的载酶量可达 6U/g 海藻酸钠。细胞固定化后, 最适酶反应 pH 值由 6.5 升至 7.0, 最适酶反应温度未变, 为 60℃, 但热稳定性有所提高, 70℃保温 60min 时, 固定化细胞的残存酶活为 60%, 而未固定化细胞的残存酶活约 30%。间歇反应时, 固定化细胞催化麦芽糖转化为海藻糖的转化率可达 60%, 重复使用 10 次, 仍可保持约 70% 的酶活。

**关键词:** 亚栖热菌; 海藻糖合酶; 固定化; 海藻酸盐

Immobilization of Permeabilized *Meiothermus* sp. Cells Containing Trehalose Synthase by  
Entrapment in Strontium Alginate Beads

ZHANG Jun, CHEN Xiao-yun, CHEN Ying, QI Xin, WEI Xue-sheng  
(Tianjin Horticultural Engineering Institute, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** Permeabilized cells containing trehalose synthase from *Meiothermus* sp. CBS-01 was entrapped in strontium alginate beads. The immobilization capacity reached 6 units/g-alginate when the enzyme loading was 12 units/g-alginate. The optimum temperature was not affected by immobilization, and was 60 °C, but the optimum pH was shifted from 6.5 to 7. The enzyme in alginate entrapped cells was more stable at 70 °C for 60 min with 60% of its original activity remained, whereas the enzyme in free cells retained 30% of activity. In batch manner, the immobilized cells could be continually reused 10 times with 30% loss of the enzyme activity, and a maximum conversion yield of 60% trehalose could be reached.

**Key words** *Meiothermus* sp.; trehalose synthase; immobilization; alginate

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0332-04

海藻糖对生物膜和生物大分子具有良好的非特异性保护作用, 在医药、生物技术、食品、化妆品、农业等领域拥有广阔的应用前景<sup>[1-2]</sup>, 其生产技术的研究和开发一直是人们关注的焦点。20 世纪 90 年代初, 海藻糖的制备方法主要是提取法和微生物发酵法, 但随着一些可生成海藻糖的新型酶制剂的发现, 酶催化法成为研究的热点<sup>[3]</sup>。本实验室曾利用自行筛选出的一株嗜热菌——亚栖热菌 CBS-01 菌株, 制备出含有海藻糖合酶活性的透性化细胞, 利用该透性化细胞可催化麦芽糖转化为海藻糖, 并且酶在细胞中具备良好的温度和 pH 稳定性, 如 60℃保温 60min 时, 酶活无损失, 50℃保温 60min 时, 可稳定的 pH 范围为 pH4.5~10, 较常温菌种所产酶更具有工业应用优势<sup>[4]</sup>。但由于 CBS-01 菌株的产酶水平较低, 酶的制备成本高, 限制了该酶的工业化应用。

因此, 本实验采用海藻酸盐凝胶包埋法对该透性化细胞进行了固定化, 以提高酶的利用率, 使其易于和产物分离, 降低其使用成本, 同时对所得固定化生物催化剂的性质及重复使用性能进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

亚栖热菌 CBS-01 菌株分离自吉林长白山温泉。

摇瓶产酶培养基(g/L): 多蛋白胨 5, 酵母膏 1, NaNO<sub>3</sub> 0.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.1, pH7.5。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 微生物培养

将已活化的 CBS-01 菌种接入已灭菌的摇瓶产酶培养

收稿日期: 2007-03-16

作者简介: 张峻(1968-), 男, 副研究员, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: junzhang68@126.com

基中, 50~55℃, 200r/min, 摇瓶培养36h, 离心, 清洗后得湿菌体, 备用。

### 1.2.2 透性化细胞的制备

取部分湿菌体, 悬浮于水中(每克湿菌体加10ml水), 加入2%甲苯, 50℃搅拌处理20min, 离心后去除上清, 所得沉淀清洗后即得透性化细胞。

### 1.2.3 海藻酸盐凝胶微球的制备

取一定浓度的海藻酸钠溶液滴入一定浓度的不同盐溶液中, 所得凝胶微球固化一定时间, 分离、洗涤。

### 1.2.4 透性化细胞的固定化

取一定浓度的海藻酸钠溶液与一定量透性化细胞混合, 滴入一定浓度的盐溶液中, 所得凝胶微球固化一定时间, 分离、洗涤, 即得固定化细胞。

### 1.2.5 固定化效果的评价

凝胶微球的耐盐能力以在0.1mol/L的磷酸盐缓冲液中凝胶颗粒开裂及溶解的时间进行评价。固定化细胞的酶活回收率以固定化细胞的表现酶活与固定化时所用细胞的酶活的比值表示。固定化细胞催化麦芽糖转化为海藻糖的转化率(%)=(反应终止时海藻糖浓度×100)/反应起始时麦芽糖浓度。

### 1.2.6 酶活分析

取1ml适当稀释的细胞悬浮液(或一定量固定化细胞)加入到1ml以10mmol/L、pH7.0的磷酸缓冲液配制的20%(W/V)的麦芽糖溶液中, 混匀后, 将该混合物溶液于60℃保温60min, 然后于100℃加热10min中止酶反应。反应混合物冷却后, 离心, 取上清液, 用HPLC测定生成的海藻糖含量。酶活力单位定义为: 在上述反应条件下, 每分钟形成1μmol海藻糖所需的酶量为1单位。

### 1.2.7 高效液相色谱检测

色谱柱: Hypersil NH<sub>2</sub>, 4.6mm×250mm, 填料粒径5μm; 检测器: 示差折光检测器; 流动相: 乙腈:水=75:25(W/V); 柱温: 室温; 进样量: 20μl; 流速: 1.0ml/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化细胞的制备

#### 2.1.1 金属离子对海藻糖合酶活性的影响

在以海藻酸盐凝胶包埋固定化酶时, 所用胶凝离子不应该对酶活有抑制作用。因此, 本研究首先考察了钙、锶、钡、钴等常用海藻酸钠的胶凝离子对海藻糖合酶活性的影响, 结果见图1。

由图1可见, 2.5mmol/L的Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>对海藻糖合酶有抑制作用, Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>在5mmol/L时对酶活无影响, 浓度为2.5mmol/L时对酶活有一定激活

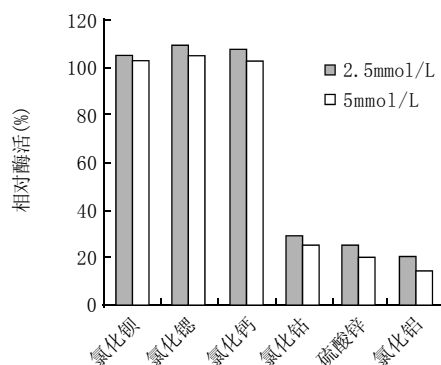


图1 不同金属离子对海藻糖合酶活性的影响

Fig.1 Effects of metal ions on activity of trehalose synthase

作用。因此, 以海藻酸盐凝胶包埋固定化海藻糖合酶时, 可选用Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>作为胶凝离子。

#### 2.1.2 海藻酸盐凝胶微球的耐盐能力

配制不同浓度的海藻酸钠溶液, 分别滴入不同浓度的胶凝离子溶液中, 所得凝胶微球浸入pH6.98、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液中, 50℃、100r/min, 观察凝胶微球的耐盐能力。

由表1可知, 海藻酸钠浓度较高时, 以CaCl<sub>2</sub>为胶

表1 不同条件制备的海藻酸盐凝胶微球的耐盐能力  
Table 1 Stability of alginate beads in phosphate buffer

胶凝剂种类	胶凝剂浓度(%)	海藻酸钠浓度(%)	耐盐性能
CaCl <sub>2</sub>	1	2	1h时微球全融
		4	微球变小, 24h时微球全部破裂
	3	2	1h时微球全融
		4	微球变小, 24h时微球全部破裂
BaCl <sub>2</sub>	1	2	微球变大, 24h时微球大部分未破裂, 但无韧性
		4	微球变大, 3h时微球大部分破裂
	3	2	微球变大, 24h时微球大部分未破裂, 但无韧性
		4	微球变大, 3h时微球大部分破裂
SrCl <sub>2</sub>	1	2	微球尺寸基本未改变, 24h时微球未破裂, 略有韧性
		4	微球变大, 3h时微球少部分破裂
	3	2	微球尺寸基本未改变, 24h时微球未破裂, 略有韧性
		4	微球变大, 3h时微球少部分破裂

凝剂制出的凝胶微球耐盐性提高, 但以BaCl<sub>2</sub>和SrCl<sub>2</sub>为胶凝剂制出的凝胶微球耐盐性反而下降。海藻酸钠浓度为2%, 以1%~3%的SrCl<sub>2</sub>为胶凝剂时制出的凝胶微球耐盐性最好。

#### 2.1.3 酶与载体比例对固定化效果的影响

取一定浓度的海藻酸钠溶液与不同浓度的透性化细胞混合, 使海藻酸钠终浓度为2%, 以3%的SrCl<sub>2</sub>为胶

凝剂制备不同含酶量的固定化细胞, 结果见表 2。

表 2 酶与载体比例对固定化效果的影响

Table 2 Effects of enzyme loading on immobilization efficiency

固定化时的加酶量 (U/g海藻酸钠)	固定化细胞的酶活 回收率(%)	固定化细胞的载酶量 (U/g海藻酸钠)
4	80	3.2
8	65	5.2
12	50	6
16	36	5.76

由表 2 可见, 当加酶量 $\leq 12$  U/g 海藻酸钠时, 随着用酶量的增加, 所得固定化细胞的载酶量也增加, 最高可达 6 U/g 海藻酸钠。当加酶量 $> 12$  U/g 海藻酸钠(如 16 U/g)时, 可能由于覆在海藻酸盐凝胶微球表面的细胞较多, 或传质效果较差的原因, 所得固定化细胞的酶活回收率较低, 载酶量也下降。

## 2.2 固定化生物催化剂的性质

### 2.2.1 pH 值对固定化细胞中海藻糖合酶活性的影响

取一定量固定化细胞, 在不同 pH 条件下测海藻糖合酶活性, 与游离细胞相比较, 结果见图 2。

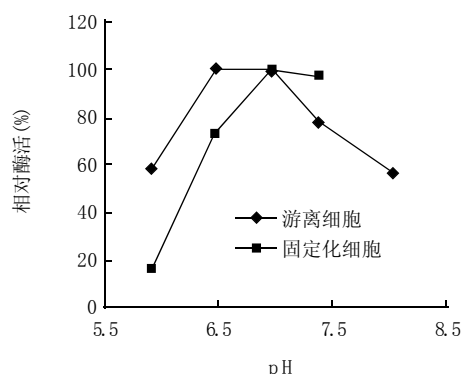


图 2 pH 值对游离细胞及固定化细胞中酶活性的影响

Fig.2 pH dependence of trehalose synthase activities in free and immobilized cells

由图 2 可见, 亚栖热菌 CBS-01 菌株的透性化细胞固定化后, 海藻糖合酶的最适反应 pH 值由 6.5 左右升至 7.0 左右。

### 2.2.2 最适反应温度及热稳定性

取一定量固定化细胞, 在不同温度下测酶活, 以确定最适反应温度, 结果见图 3。由图 3 可见, 固定化细胞中海藻糖合酶的最适反应温度为 60℃, 与未固定化时相同<sup>[4]</sup>。

取一定量固定化细胞, 于不同温度下保温 60 min, 冷却后检测残留酶活性, 以确定固定化细胞中海藻糖合酶的热稳定性, 并与游离细胞相比较, 结果见图 4。

由图 4 可见, 细胞固定化后酶的热稳定性有所提高, 虽然游离细胞及固定化细胞中的海藻糖合酶在温度

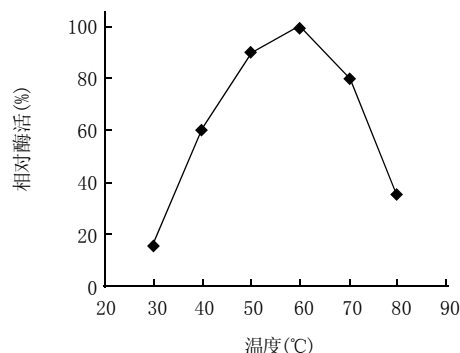


图 3 温度对固定化细胞中酶活性的影响

Fig.3 Temperature dependence of trehalose synthase activity in immobilized cells

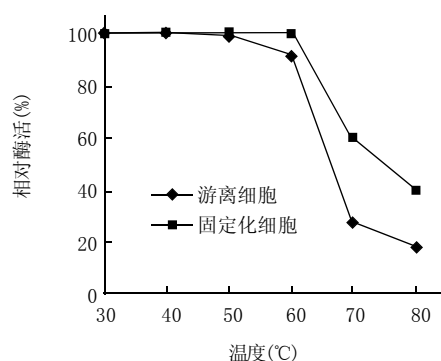


图 4 游离细胞及固定化细胞中酶的热稳定性

Fig.4 Thermostability of trehalose synthase in free and immobilized cells

高至 60℃ 时均稳定, 但在 70℃ 保温 60 min 时, 固定化细胞中海藻糖合酶的残存酶活为 60%, 而游离细胞的残存酶活仅约 30%。

### 2.2.3 固定化细胞的转化率

于 1% 麦芽糖溶液中, 加入固定化细胞, 加酶量为 4 U/g 底物, 50℃, pH 7.0 的条件下进行酶促反应, 定时取样, 检测样品中海藻糖的生成量, 计算转化率, 其结果见图 5。

由图 5 可见, 在上述条件下, 转化反应进行到 50 h

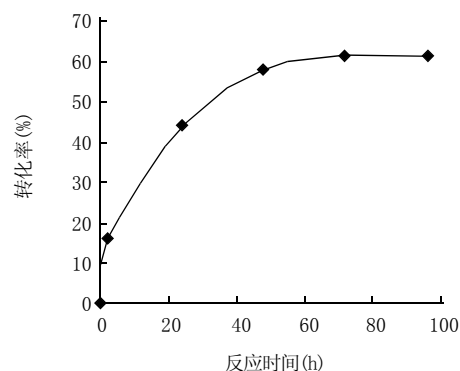


图 5 固定化细胞的反应进程

Fig.5 Time course of reaction by immobilized cells

左右时转化率约60%，继续进行反应，转化率也无明显提高，说明转化反应已达到平衡，即固定化细胞催化麦芽糖转化为海藻糖的转化率可达60%。

### 2.3 固定化细胞的重复使用性能

于1%麦芽糖溶液中，加入固定化细胞，加酶量为4U/g底物，50℃，pH7.0的条件下酶促反应2h，检测海藻糖的生成量，计算转化率，过滤回收固定化细胞，以0.1%的SrCl<sub>2</sub>清洗后重新进行反应，如此反应10批次，结果见图6。

由图6可见，在上述反应条件下，固定化细胞重

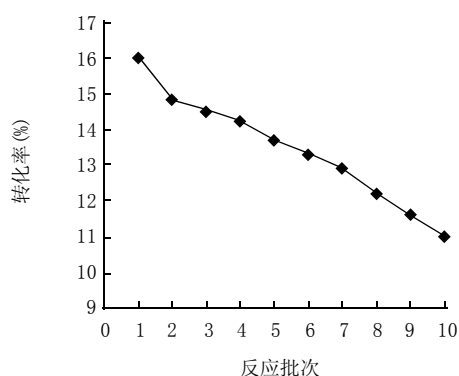


图6 固定化细胞的重复使用性能

Fig.6 Reusability of immobilized cells

复使用10次，仍可保持约70%的活力。

## 3 讨论

目前国内外市场上均无海藻糖合酶商品出售，产酶菌种为各个研究小组自行筛选或通过生物信息及分子生物学的方法构建而得<sup>[5-7]</sup>，使得固定化海藻糖合酶的研究受到酶原料来源的限制，相关研究报道很少。王俊曾以壳聚糖为载体，采用戊二醛交联法对来源于食尼古丁节杆菌的海藻糖合酶进行了固定化，所得固定化酶的转化率为39.4%，25℃时重复利用10批可保持35%的转化率<sup>[8]</sup>。丁振等人以细菌纤维素为载体，以木醋杆菌M12菌株的海藻糖合酶为酶源，采用吸附-交联的方法获得了固定化海藻糖合酶，所得固定化酶的最适pH值为7.4，最适作用温度为45℃，40℃重复使用6次后，剩余酶活力约87%左右<sup>[9]</sup>。本实验制备的固定化细胞具备良好的热稳定性和重复使用性能，50℃重复使用10次，仍可保持约70%的海藻糖合酶活性，这样在实际生产中，可选用较高的酶反应温度，不易染菌。

海藻酸盐凝胶包埋法固定化生物催化剂具有材料无毒、易得，操作简单、条件温和，可有效保持生物

催化剂的活性，形成的凝胶颗粒传质阻力小等优点，是迄今研究较多的固定化方法之一<sup>[10]</sup>。但海藻酸钙凝胶颗粒机械强度较低，在磷酸盐溶液中稳定性较差，因此，海藻酸盐包埋法如能与其他固定化方法相结合，取长补短，将会得到更广泛的实际应用。相关研究正在进行中。

## 4 结论

4.1 Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>在5mmol/L时对海藻糖合酶活性无影响，浓度为2.5mmol/L时对酶活有一定激活作用，因此以海藻酸盐凝胶对含有海藻糖合酶的细胞进行包埋固定化时，可选用Ba<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>作为胶凝离子。其中，海藻酸钠浓度为2%，以1%~3%的SrCl<sub>2</sub>为胶凝剂时制出的凝胶微球耐盐性最好。

4.2 固定化时，当所用细胞的酶活与海藻酸钠的比例为12:1(U/g)时，所得固定化细胞的载酶量最大，可达6U/g海藻酸钠。

4.3 细胞固定化后最适酶反应pH值由6.5升至7.0，最适酶反应温度为60℃，与游离细胞相同。细胞固定化后酶的热稳定性有所提高，70℃保温60min时，残存酶活为60%，而未固定化细胞的残存酶活仅约30%。

4.4 固定化细胞催化麦芽糖转化为海藻糖的转化率可达60%。

4.5 固定化细胞具备良好的重复使用性能，重复使用10次，仍可保持约70%的酶活。

## 参考文献:

- [1] CROWE J H, CROWE L M, OLIVER A E, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state[J]. Cryobiology, 2001, 43: 89-105.
- [2] MOFFAT A S. Finding new ways to protect drought-stricken plants[J]. Science, 2002, 296: 1226-1229.
- [3] SCHIRALDI C, ISADELLA D L, MARIO R D. Trehalose production: exploiting novel approaches[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(10): 420-425.
- [4] 张峻, 陈晓云, 齐欣, 等. 透性化细胞海藻糖合酶的制备及其性质研究[J]. 南开大学学报, 2005, 38(5): 93-96.
- [5] 徐骥, 高媛, 段作营, 等. 极地微生物产海藻糖合成酶菌株的筛选[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 15-18.
- [6] 薛璐, 马莺. 透性化细胞海藻糖合酶特性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 26-29.
- [7] 韦宇拓, 黄日波, 蒙健宗. 谷氨酸棒杆菌海藻糖合成酶基因及海藻糖制造方法: 中国, CN 1563371A[P]. 2005-01-12.
- [8] 王俊. 以壳聚糖为载体固定化海藻糖合成酶[J]. 化工进展, 2004, 23(10): 1117-1120.
- [9] 丁振, 刘建龙, 王瑞明. 细菌纤维素固定化海藻糖合酶的研究[J]. 中国酿造, 2006(9): 19-23.
- [10] SKJAK-BRAEK G, SMIDSDROD O. Alginate as immobilization matrix for cells[J]. Tibtech, 1990(8): 71-77.