

HPLC/RI 与 HPLC/ESI-MS 方法研究细菌 D-97 酶合成海藻糖的过程

荣绍丰¹, 张海平¹, 段作营¹, 杨 静¹, 毛忠贵¹, 戴 军²

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 中国发酵工业协会功能性低聚糖检测室, 江苏 无锡 214036)

摘要 通过高效液相色谱/示差折光检测系统(HPLC/RI)分析可获得细菌 D-97 利用糊精或淀粉水解物合成海藻糖的基本生物学信息,包括微生物培养碳源对细菌 D-97 胞内海藻糖合成酶系的影响以及该酶系利用不同种类或不同分子链长度的麦芽寡糖合成海藻糖的能力及作用过程。采用 HPLC 与 RI 及电喷雾电离质谱(ESI-MS)联用并结合其他生物学手段对由细菌 D-97 获得的纯酶组分(酶 A)作用产物进行定量和定性分析,从而基本明确了 D-97 胞内酶合成海藻糖的过程。

关键词 高效液相色谱 示差折光检测 电喷雾电离质谱 海藻糖 寡糖

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)03-0197-05

Study on the Production of Trehalose by Bacterium D-97 Endocellular Enzymes Using HPLC/RI and HPLC/ESI-MS

RONG Shao-feng¹, ZHANG Hai-ping¹, DUAN Zuo-ying¹,
YANG Jing¹, MAO Zhong-gui¹, DAI Jun²

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Laboratory of
Functional Oligosaccharides Analysis, Ferment Industry Association of China, Wuxi 214036, China)

Abstract: The mechanism in which trehalose is produced from dextrin or starch hydrolyzate by endocellular enzymes of bacterium D-97 can be elucidated by high performance liquid chromatography (HPLC) with differential refraction detection (RI) basically, including the effect of the different carbon sources on the endocellular trehalose-producing enzymes in bacterium D-97 and the possibility or ability of the endocellular enzymes to produce trehalose using maltooligosaccharides of different chain lengths. After purification of endocellular enzymes of bacterium D-97, two enzymes (called Enzyme A and Enzyme B) related to trehalose synthesis were found. The unknown oligosaccharides produced by Enzyme A were analyzed with the HPLC/RI and HPLC/ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry). The results showed the relative molecular masses of the unknown oligosaccharides were the same as those of the enzymatic reaction substances (maltotriose, maltotetraose and maltopentaose) respectively. In combining with other results of biological experiments, these unknown oligosaccharides had been identified basically. There was no reduction power in these unknown oligosaccharides and only one trehalose residue existed in the molecular chain of these unknown oligosaccharides.

Key words: high performance liquid chromatography; differential refraction detection; electrospray ionization mass spectrometry; trehalose; oligosaccharide

海藻糖(trehalose, α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside)是由两个吡喃环葡萄糖分子以 α , α -1,1 键联结而成的双糖,其分子结构对称,无半缩醛基,因此它既无还原性也无变旋光性。它广泛分布于自然界,诸如微生物(尤其是极端微生物)及动植

物中。最新研究表明它对生物体的染色体、蛋白质、生物膜等具有非特异性保护作用^[1-3],如添加海藻糖的许多医药制品(小儿麻痹症口服疫苗)可由原来的低温保存变为常温保存,从而使生物药品的储存方式发生重大鼓变。目前海藻糖越来越广泛地应用

于食品工业、农业、医药工业及分子生物学领域^[4]。

本研究室由大量土样中筛选到一株细菌 D-97, 经培养、破壁获得胞内酶, 该胞内酶可利用淀粉或麦芽寡糖合成海藻糖, 其产率较高。为研究该菌株的胞内酶合成海藻糖的基本过程与作用机制, 需对酶反应过程中的海藻糖及一些酶反应中间产物进行系统的定量和定性分析。对于糖的分析检测, 传统的纸色谱和薄层色谱^[5]分辨率和准确度均较差, 高效液相色谱法(HPLC)定量准确, 简便快速, 但细菌 D-97 酶法合成海藻糖这个较为复杂的生物转化过程中会产生多种结构相似的糖组分, 仅用 HPLC 对这些未知糖组分定性困难。我们经过采用多种品牌与型号的氨基柱进行分离实验, 选定 ZORBAX NH₂ 和 Spherisorb S5NH₂ 作为分析柱, 并以 HPLC 与 ESI-MS(电喷雾电离质谱)及 RI(示差折光检测)联用技术对上述酶转化过程及作用机制进行了系统的定量、定性分析研究, 取得较理想的结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

细菌 D-97(本实验室由土样中筛选得到)。

1.2 糖

除葡萄糖、麦芽糖外, 麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、异麦芽糖和海藻糖等均购自 Sigma 公司。

1.3 微生物的培养

D-97 的液体产酶培养基包括麦芽糖 3.0%, 蛋白胨 0.05%, 酵母膏 0.01%, K₂HPO₄ 0.05%, NaH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.04%, pH 7.2。旋转式摇床 200 r/min 培养 40 h~48 h。

1.4 菌体收集和粗酶制备

离心机以 3 500 r/min 收集菌体, 离心时间 30 min 收集的菌体采用 30 mmol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH 6.4)洗涤 2~3 次, 再离心收集菌体。上述菌体于冰箱冻融后超声破壁 1 h, 将破壁后的菌液以 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 而后向该上清液缓慢加入(NH₄)₂SO₄ 至 60% 饱和度, 得到的蛋白沉淀物溶于 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲溶液(pH 6.4)透析(10KD 透析袋)24 h。上述过程保持在 4℃~10℃ 完成。

1.5 酶反应底物麦芽寡糖的制备

用 50 U/g~60 U/g 的 α -高温淀粉酶(杰能科公司)处理玉米淀粉, 再加入普鲁兰酶(Novo Nordisk A/S)于 60℃ 脱枝处理该底物 3 h, 取样测葡萄糖值(DE 值)并微滤(孔径 0.22 μ m)后用作酶反应底物。

1.6 酶反应及酶活定义

将“1.4”节制备的胞内酶液与酶反应底物混匀, 缓冲体系采用柠檬酸缓冲液(pH 6.4)或磷酸缓冲液(pH 6.4)40℃~45℃, 100 r/min 振荡 24 min, 酶转化结束后灭酶, 微滤, 取样进行 HPLC 分析。在剩余滤液中加入糖化酶处理, 于 60℃ 水浴振荡 24 h 完全糖化, 灭酶除蛋白后采用高速离心, 再经微滤后作 HPLC 检测。在上述酶反应温度下, 1 h 生成 1.0 mg 海藻糖的酶量为一个酶活单位。

1.7 HPLC/RI 分析

仪器: Waters600, 主要由 Waters600 泵、2410 示差折光检测器、M32 工作站及 7725 进样阀组成。色谱条件: 色谱柱 Waters Spherisorb S5NH₂(4.6 mm i.d. × 150 mm)和 Agilent ZORBAX NH₂(4.6 mm i.d. × 250 mm) 流动相乙腈-水的体积比为 75:25 或 72:28, 流速、柱温为 1.0 mL/min 和 30℃。

1.8 HPLC/ESI-MS 分析

仪器: Waters Platform LCZ2000HPLC/ESI-MS。色谱条件: 色谱柱 Agilent ZORBAX NH₂ 流动相为乙腈-水(72:28, 体积比), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30℃。质谱条件: (1)ESI⁺ 离子源温度 120℃, 脱溶温度 250℃, 毛细管电压 4.20 kV, 锥孔电压 108 V, 扫描质量范围 200 u~1 000 u。(2)ESI⁻ 离子源温度 120℃, 脱溶温度 250℃, 毛细管电压 3.57 kV, 锥孔电压 84 V, 扫描质量范围 200 u~1 000 u。柱后流出物导入离子源速率 5 μ L/min。

2 结果与讨论

2.1 HPLC/RI 研究不同微生物培养碳源对海藻糖合成酶系的影响

微生物培养过程分别采用麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、糊精和淀粉水解物作为培养碳源, 离心收集的各类菌体等湿重破壁, 对应的各酶液分别加入到已制备好的酶反应底物(直链麦芽寡糖)中, 直链麦芽寡糖分为 3 个质量浓度水平, 即 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 酶反应结束后 HPLC 检测海藻糖的含量并计算得到相对酶活(见表 1)。

表 1 不同碳源对海藻糖合成酶系的影响
Table 1 Effect of different carbon sources on the activity of trehalose-producing enzymes

Content (g/L)	Maltose	Glucose	Sucrose	Lactose	Dextrin	Starch hydrolyzate
20	1.00	1.12	0.07	0.02	1.30	1.39
40	1.74	1.28	0.09	0.04	1.41	1.29
60	1.29	1.18	0.09	0.01	1.46	1.23

Note: The enzyme activity in this table is the relative activity using the enzyme activity for 20 g/L maltose (5.10 U) as calculation standard.

表 1 数据显示 , 麦芽糖、淀粉水解物、糊精及葡萄糖均可作为菌株 D-97 的良好产酶培养碳源 , 而蔗糖和乳糖对菌株海藻糖合成酶系影响显著 , 其酶活力很低 , 不适合做菌株的产酶培养碳源。

采用上述 6 种碳源对细菌 D-97 培养结束后 , 我们对离心除去菌体的胞外液及菌体破壁后胞内液也进行了 HPLC 分析 , 目的是为了测定胞内液和胞外液中是否存在海藻糖。最后只在糊精和淀粉水解物培养的菌体胞内发现了海藻糖的存在 , 对应的胞外液中未检测到海藻糖 ; 同时在以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖及乳糖作为碳源培养的菌体胞内和胞外均未检测到海藻糖 , 说明该菌株不具备将这 4 种糖转化为海藻糖的能力。

将 6 种碳源培养获得的菌体胞外液分别与处理好的酶反应底物 (直链麦芽寡糖) 反应 , 酶反应结束后加入糖化酶处理 , 进行 HPLC 分析均未检测到海藻糖 , 说明细菌 D-97 的海藻糖合成酶系不能被分泌到胞外 , 菌体培养结束后并未出现菌体自溶现象。

在其他的酶转化实验中 , 我们分别采用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、麦芽三糖和麦芽五糖作为酶反应底物 , 将已证明含有海藻糖合成酶系的细胞破壁酶液分别加入上述酶反应底物中 , 液相色谱检测表明前 4 种糖均不能被转化为海藻糖 ; 麦芽三糖虽然可被转化为海藻糖 , 但得率较低 ; 以麦芽五糖为酶反应底物则有很好的转化 , 海藻糖的生成量较大 , 这一点将在本文后面进行详细说明。

综合上述实验结果可知 , 糊精或淀粉水解物至少部分被完整地转运到菌体细胞内 , 其中很大一部分寡糖分子链的聚合度 (DP 值) 大于 3 , 这些分子链较长的寡糖在胞内酶的作用下被转化成海藻糖 , 有趣的是这种非还原性的双糖 (海藻糖的 DP 值为 2) 却不被转运到胞外 , 同时胞内海藻糖的合成酶系也不能通过菌体细胞壁到达胞外 , 因此存在于胞外的寡糖也就不能被合成海藻糖。

2.2 纯品麦芽寡糖作为酶反应底物合成海藻糖的过程研究

采用 Sigma 公司生产的麦芽五糖作为细菌 D-97 胞内酶的反应底物 , HPLC/RI 分析 (见图 1) 表明麦芽五糖被酶解的终产物主要是二糖 (海藻糖和麦芽糖) 和三糖 (麦芽三糖) , 麦芽四糖可被看作是酶反应的副产物。当 1 mol 的麦芽五糖在酶的作用下生成 1 mol 的二糖 (海藻糖和麦芽糖) 和 1 mol 的麦芽三糖以后 , 生成的麦芽三糖可进一步解聚为二糖 (海藻糖和麦芽糖) 和单糖 (葡萄糖) , 但很显然麦芽三糖不能较彻底地完成上述反应 , 依然大量地存在于酶反应液中。

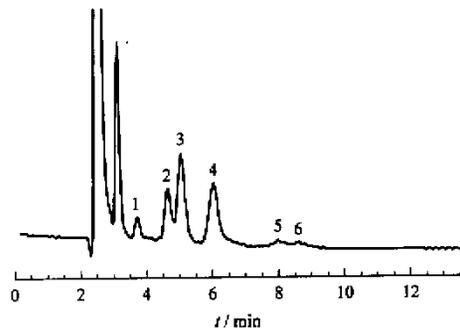


图 1 以麦芽五糖为底物细菌 D-97 胞内酶反应后的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of maltopentaose reacted by the endocellular enzymes of bacterium D-97

Column : Waters Spherisorb S5NH₂.

1. glucose ; 2. maltose ; 3. trehalose ; 4. maltotriose ; 5. maltotetraose ; 6. unknown oligosaccharide (called oligosaccharide IV).

以 Sigma 公司生产的麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖混合物作为酶反应底物 , 控制加酶量和酶反应时间 (10 h) , HPLC 分析 (见图 2) 显示酶反应终产物有未知寡糖 III (峰 5) 存在 , 该寡糖与麦芽三糖紧靠在一起 , 另外 HPLC/RI 分析也发现与麦芽四糖和麦芽五糖相邻的两种未知寡糖出现 , 分别见图 1 和图 4 , 我们称之为寡糖 IV 和寡糖 V 。上述酶反应过程中间产物的存在 , 提示我们 D-97 胞内海藻糖合成酶系很可能非单一酶组成。

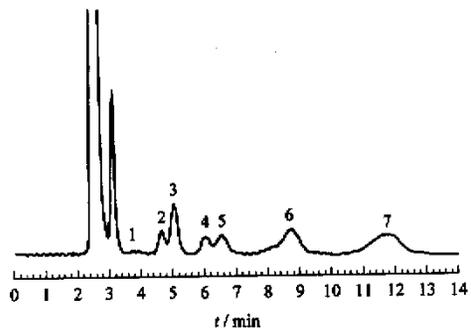


图 2 麦芽三糖、麦芽四糖和麦芽五糖混合物酶反应后 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of maltotriose , maltotetraose and maltopentaose reacted by the endocellular enzymes of bacterium D-97

Column : Waters Spherisorb S5NH₂.

1. glucose ; 2. maltose ; 3. trehalose ; 4. maltotriose ; 5. unknown oligosaccharid (called oligosaccharide III) ; 6. unknown oligosaccharid (called oligosaccharide IV) ; 7. unknown oligosaccharid (called oligosaccharide V).

总体而言 , 由麦芽五糖酶反应合成海藻糖的基本方式是一种解聚作用 , 但这种解聚过程不是由单一酶组分完成的。采用柠檬酸缓冲溶液与磷酸缓冲溶

液分别作为酶反应的缓冲体系,海藻糖的生成量并无显著差异,表明该菌株胞内酶对磷酸盐无依赖性。上面这些实验结果都说明细菌 D-97 胞内海藻糖合成酶系不同于一些海藻糖合成的磷酸化酶类,诸如海藻糖-6-磷酸合成酶(EC2.4.1.15)、海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(EC3.1.3.12)或者麦芽糖磷酸化酶(EC2.4.1.8)、海藻糖磷酸化酶(EC2.4.1.64),这些磷酸化酶类是以葡萄糖或麦芽糖为底物转化合成海藻糖,反应过程需要磷酸盐的存在,而并非是一种麦芽寡糖的解聚过程。

2.3 酶反应产生的寡糖中间体的纯化及相关酶学实验

通过凝胶色谱、离子交换色谱和疏水色谱,菌株 D-97 胞内的海藻糖酶系可被纯化至电泳纯,实验发现有两种酶参与海藻糖的合成反应,本文中我们将其称为酶 A 和酶 B。采用 Superdex75 凝胶色谱柱对菌株 D-97 胞内酶进行部分纯化后,酶 A 和酶 B 所在位点见色谱图(图 3),有关酶 A 和酶 B 的纯化电泳图、相对分子质量及其性质等将另文发表。

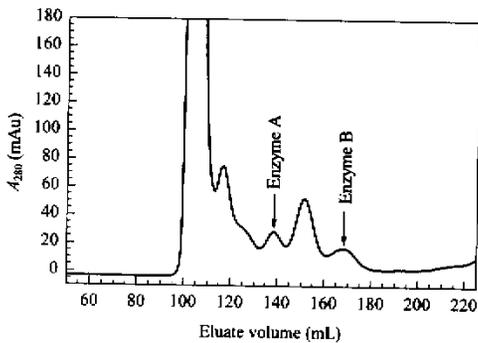


图 3 细菌 D-97 胞内酶经凝胶柱 Superdex75 部分纯化的色谱图

Fig.3 Gel chromatogram of endocellular enzymes of bacterium D-97 from the Superdex75 column

为更好地将五糖分开,我们对几种品牌的氨基柱进行了对比实验,发现使用 Agilent ZORBAX NH₂ 色谱柱,流动相乙腈-水的体积比为 72:28 时,色谱柱对五糖的选择性分离较好。但需说明的是,对同一酶反应样品的 HPLC 分析表明:采用该色谱柱(图 4)与 Waters Spherisorb S5NH₂ 柱分析(图 2),未知寡糖 V 与麦芽五糖的出峰顺序相反,只是此条件下对双糖(如麦芽糖和海藻糖)的分离效果略差。下面的实验检测数据均为使用该色谱柱分析得到的。以麦芽五糖作为酶 A 的反应底物,酶反应结束后做液相色谱分析(见图 4),发现只出现两个寡糖峰,保留时间为 20.446 min 的物质是麦芽五糖,它与麦芽五糖标准样的出峰时间完全一致,而 19.588

min 出现的为一种未知的寡糖,我们称之为寡糖 V;这两种寡糖的浓度比值会随着酶反应条件(如加入酶量、底物浓度或反应时间等)的改变而发生变化。在这两种寡糖的混合物中加入糖化酶处理,最后会水解为两种糖——海藻糖和葡萄糖,表明此寡糖 V 分子链具有海藻糖残基,也就是说该寡糖 V 除具有葡萄糖单体间的 α -1,4 键连接方式,还存在 α -1,1 键的连接。寡糖 V 与麦芽五糖混合物(寡糖 V 的质量浓度为混合物总质量浓度的 52.4%,按照麦芽五糖标样外标法计算)的还原性只有等量麦芽五糖的 46.1%,表明寡糖 V 已经不具有还原性末端。

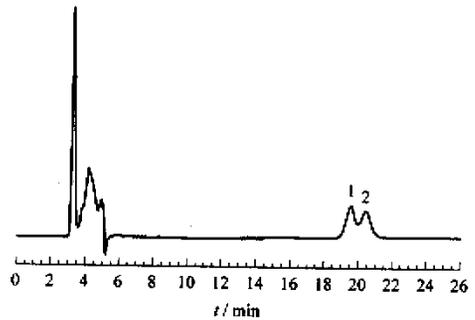


图 4 酶 A 作用于麦芽五糖酶反应后的 HPLC 检测图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of maltopentaose converted by the enzyme A

Column: Agilent ZORBAX NH₂.

1. maltopentaose, the retention time is 20.446 min; 2. unknown oligosaccharid(called oligosaccharide V), the retention time is 19.588 min.

图 4 中两种寡糖混合样加入糖化酶(糖化酶为 Novo Nordisk A/S 生产,其中加有 α -1,6 解枝酶)水解处理,HPLC/RI 的检测图谱只出现两个物质峰,即葡萄糖和海藻糖(图略)。通过外标法计算出葡萄糖和海藻糖的含量,再与图 4 中寡糖 V 与麦芽五糖的含量进行对照计算。由于麦芽五糖全部被降解为葡萄糖,所以海藻糖仅由寡糖 V 降解而得,葡萄糖则是麦芽五糖和寡糖 V 共同贡献产生的。最终计算出海藻糖与寡糖 V 的质量浓度比约为 40%((0.79 g/L)/(2.06 g/L))。

酶 B 作用于上述酶 A 产生的混合寡糖底物后,HPLC 的检测图谱基本同图 1,表明它也是一种水解酶类,但它的作用方式不同于淀粉酶和糖化酶。酶 A 作用于麦芽五糖生成的含有海藻糖残基的寡糖 V 可进一步被酶 B 水解游离出海藻糖,同时生成麦芽三糖或麦芽糖。由于寡糖 V 的出峰位置介于麦芽四糖和麦芽五糖之间,单从 HPLC 的结果还无法确定它是四糖还是五糖,需通过液质联用对其相对分子质量进行测定,从而确定其分子链长度,并结合上述实验结论判断寡糖 V 分子链上 α -1,1 键数量。

2.4 HPLC/ESI-MS 测定麦芽五糖产生的寡糖 V

首先收集少量图 4 中的寡糖 V, 然后进行 HPLC/ESI-MS 分析, 色谱柱为 Agilent ZORBAX NH₂。图 5 为寡糖 V 的总离子流色谱图。

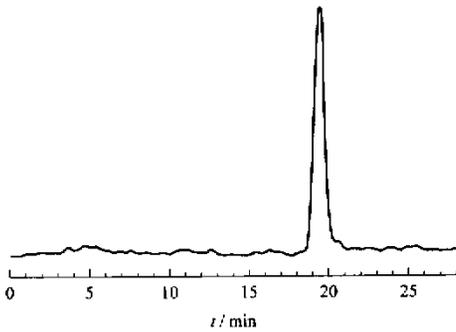


图 5 HPLC/ESI-MS 分析寡糖 V 的总离子流色谱图
Fig. 5 Total ion current chromatogram of oligosaccharide V by HPLC/ESI-MS

图 6 是寡糖 V 的 HPLC/ESI-MS 正负离子质谱图。寡糖 V 的正离子质谱图分别给出了 m/z 为 851.6 的 $[M+Na]^+$ 分子离子峰和 867.4 的 $[M+K]^+$ 分子离子峰, 而寡糖 V 的负离子质谱图给出了 m/z 为 827.5 的 $[M-H]^-$ 分子离子峰, 表明该寡糖 V 是一种五糖, 其相对分子质量与麦芽五糖 ($M_r = 828$) 相同。

采用 HPLC/ESI-MS 检测, 图 2 中的中间产物寡糖 III (峰 5) 的相对分子质量也被测定出来, 它与麦芽三糖的相对分子质量 ($M_r = 486$) 相同, 是一种三糖。用糖化酶对其酶解, 实验表明它的分子链上同样具有海藻糖残基, 该寡糖也无还原性。

综上所述, 我们认为酶 A 能够将聚合度 ≥ 3 的麦芽寡糖转化为与各对应相对分子质量和分子链长相同的寡糖中间体, 并且这些寡糖中间体含有海藻糖残基。对 HPLC/ESI-MS 分析结论与“2.3”节中寡糖 V 的酶解实验结果进行综合分析, 由于海藻糖 (由寡糖 V 降解产生) 与寡糖 V 的浓度比约为 40%, 因此二者的物质的量比为 1:1, 说明寡糖 V 只有一个海藻糖残基, 即它分子链上的 4 个连接键中只有 1 个 $\alpha-1, 1$ 键存在。另外, 酶 A 对麦芽五糖作用后几乎只发现麦芽五糖和五糖中间产物存在 (见图 4), 说明寡糖 V 是由酶 A 对麦芽五糖分子内转移糖基产生的, 寡糖 V 不具有还原性末端正是由于麦芽

五糖的异头碳位发生分子内转移, 所有葡萄糖单体的 C1 均被连接成键造成的。

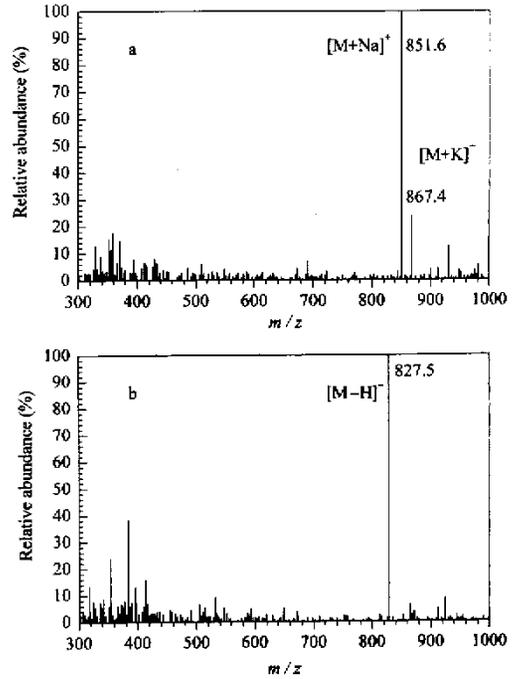


图 6 酶 A 作用于麦芽五糖生成的未知五糖的 HPLC/ESI-MS 正负离子图谱

Fig. 6 HPLC/ESI-MS spectra of unknown oligosaccharide from enzymolysis of maltopentaose by enzyme A
a. positive ion mode; b. negative ion mode.

参考文献 :

- [1] Crowe J H, Crowe L W, Carpenter J F, *et al.* Biochem J, 1987, 242: 1
- [2] Kaasen I, Alkenberg P F, Styrvold O, *et al.* Journal of Bacteriology, 1992, 174: 889
- [3] Yoshinaga K, Yoshioka H, Kurosaki H, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(1): 160
- [4] RONG Shao-feng, ZHANG Hai-ping, DUAN Zuo-ying, *et al.* Progress in Biotechnology, 2001, 21(2): 54
荣绍丰 张海平, 段作营, 等. 生物工程进展, 2001, 21(2): 54
- [5] MAO Zhong-gui, ZHU Li-dan, DENG Shao-rong. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1997, 16(4): 42
毛忠贵 朱利丹, 邓绍荣. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(4): 42