

新型基因重組*Picrophilus torridus* 海藻糖合成?之生化特性與滲透性細胞技術之研究 = Permeabilized cells and biochemical chara

劉書銘、張淑微

E-mail: 354787@mail.dyu.edu.tw

摘要

海藻糖合成?(Tase)是目前合成途徑中,最便利、簡單的合成途徑,利用麥芽糖當作基質,將麥芽糖的兩個葡萄糖鍵結,1-4轉變成海藻糖的,1-1鍵結,獲得單一的海藻糖分子,古生菌*Picrophilus torridus*有著嗜酸以及耐熱且好氧的特性,使用PCR技術在大腸桿菌上大量表現重組酵素。另外測試滲透性細胞技術之可行性,利用有機溶劑進行前處理使得細胞膜具有通透性之功能,微生物細胞具通透性伴隨著海藻糖合成?而有活性,可直接簡化海藻糖生產步驟、增加使用性、減少生產成本進一步應用於工業生產上。本篇研究使用PTTS-D41P(*Picrophilus torridus* trehalose synthase -D41P),為PTTS新型突變株,根據文獻利用蛋白質工程-點突變技術,將胺基酸序列第41個位置的天門冬胺酸置換成脯胺酸使之熱穩定性提升,使在工業生產、商業販售提高競爭力。

關鍵詞:海藻糖、海藻糖合成?、通透性細胞、*Picrophilus torridus*

目錄

1. 緒言	1	
2. 文獻回顧	2	
2.1 海藻糖之介紹	2	
2.1.1 海藻糖性質與結構	2	
2.1.2 海藻糖之功能	3	
2.1.3 海藻糖之製造	4	
2.1.4 海藻糖之應用和發展	7	
2.2 酵素	7	
2.2.1 酵素之介紹	7	
2.2.2 點突變技術	9	
2.3 滲透性細胞	10	
2.4 相關研究	11	
2.4.1 海藻糖合成?	11	
2.4.2 點突變	13	
2.4.3 滲透性細胞	14	
2.5 研究目的	14	
3. 材料與方法	15	
3.1 實驗材料	15	
3.1.1 儀器設備	15	
3.1.2 藥品	15	
3.1.3 菌株	16	
3.2 實驗流程	17	
3.2.1 酵素反應	17	
3.2.2 滲透性細胞反應	18	
3.2.3 實驗架構	19	
3.3 菌株培養	20	
3.4 酵素取得	20	
3.5 蛋白質定量測定	21	
3.6 細胞通透性處理	23	
3.7 聚丙烯醯胺膠體電泳	24	
3.8 酵素動力學	25	
3.9 酵素分析	27	
3.10 滲透性細胞分析	27	
3.11 糖類分析	27	
4. 結果與討論	29	
4.1 酵素反應	29	
4.1.1 SDS-PAGE蛋白質分析	29	
4.1.2 PTTS-D41P與PTTS-N503P之酵素對反應溫度的影響	29	
4.1.3 PTTS-D41P與PTTS-N503P之酵素對反應時間的影響	29	
4.1.4 PTTS-D41P與PTTS-N503P之酵素對反應溫度之熱穩定性的影響	30	
4.1.5 PTTS-D41P與PTTS-N503P之酵素對反應環境pH值的影響	30	
4.1.6 PTTS-D41P與PTTS-N503P之酵素對pH穩定性的影響	31	
4.2 滲透性細胞反應	31	
4.2.1 反應時間與濃度	31	
4.2.2 重複使用性	31	
4.2.3 保存再利用性	32	
4.2.4 掃描式電子顯微鏡下觀察的菌體	32	
5. 結論	33	
5.1 結論	33	
參考文獻	35	
附錄	60	
圖目錄	圖1 自然界存在之海藻糖異構物	42
圖2 海藻糖之三種合成途徑	43	
圖3 聚丙烯醯胺膠體蛋白質分析	44	
圖4 不同反應溫度下對PTTS-D41P與PTTS-N503P催化生成海藻糖反應之影響	45	
圖5 不同反應時間下對PTTS-D41P與PTTS-N503P催化生成海藻糖反應之影響	46	
圖6 熱穩定性對於PTTS-D41P與PTTS-N503P催化轉化海藻糖反應之影響	47	
圖7 不同pH環境下對於PTTS-D41P與PTTS-N503P催化轉化海藻糖反應之影響	48	
圖8 pH耐受性對於PTTS-D41P與PTTS-N503P催化轉化海藻糖反應之影響	49	
圖9 不同甲苯濃度對於PTTS滲透性細胞催化轉化海藻糖之影響	50	
圖10 滲透性細胞PTTS對於重複使用之海藻糖催化轉化的影響	51	
圖11 滲透性細胞PTTS與PTTS-N503P於4 保存使用次數對海藻糖催化轉化的影響	52	
圖12 滲透性細胞PTTS之SEM結構表面圖	53	
圖13 滲透性細胞PTTS-N503P之SEM結構表面圖	54	
圖14 蛋白質胺基酸序列比對	55	
表目錄	表1 海藻糖的特性	56
表2 不同來源之海藻糖生成?之生化特性	57	
表3 蛋白質純化表PTTS-D41P	58	
表4 蛋白質純化表PTTS-N503P	59	
表5 動力學參數分析	60	

參考文獻

- 1.王詩涵。2009。以碎米水解液為碳源生產海藻糖合成?之研究:32。國立中興大學暨應用生物科技學系碩士論文。台中,台灣。
- 2.井瑞潔、王騰飛、王瑞明。2008。海藻糖合?研究進展。中國釀造。15:1-4。
- 3.朱伶翌。2005。Deinococcus radiodurans海藻糖合?與*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* -澱粉?重組融合蛋白之生化特性分析:22。國立台灣海洋大學生物科技研究所碩士論文。基隆,台灣。
- 4.林孟甄。2004。水稻海藻糖?之基因選殖與蛋白質表現:37。東海大學食品科學研究所碩士論文。台中,台灣。
- 5.周欣宏。2007。新型基因重組*Picrophilus torridus*海藻糖合成?-蛋白質工程及其固定化酵素之最適化反應條件研究:31。國立海洋大學生物科技研究所碩士學位論文。基隆,台灣。
- 6.周延、張懷、袁其朋、馬潤宇。2007。QS412透性化細胞產海藻糖特性研究。北京化工大學學報。34:3.300-303。
- 7.胡慧芳、馬有會。2007。海藻糖的最新研究進展。遼寧農業職業技術學院學報。9:4. 26-28。
- 8.韋航、馬少敏、張雲光、梁樹華。2010。海藻糖的?轉化法生產技術。安徽農業科學。38:22. 12016-12018。
- 9.張巍馨。2008。利用酵素以稻米為基質生產海藻糖:33-39。國立中興大學食品暨應用微生物科技學系碩士論文。台中,台灣。
- 10.張玉華、凌沛學、籍保平。2005。第8-13頁。海藻糖的研究現況與應用前景。食品與藥品7:3。
- 11.陳怡珊。2006。*Picrophilus torridus* 海藻糖合?基因在大腸桿菌之選殖、表現及其重組蛋

白質之生化特性分析:18-19。國立陽明大學生化暨分子生物研究所碩士論文。台北,台灣。12.高惠玲、袁其朋、周延、錢忠明。2004。用透性化細胞技術合成海藻糖。微生物學通報, 31:3. 92-96。13.彭亞鋒、周耀斌、李勤、薛峰、馮俊。2009。第65-69頁。海藻糖的特性及其應用。中國食品添加劑。14.彭志英。2004。食品酵素學。第10-17頁。九州圖書文物有限公司。台北,台灣。15.楊平、李敏惠、潘克儉、王玉明、蘇曉慶。2006。海藻糖的生物合成與分解途徑及其生物學功能。生命的化學, 26:3. 233-236。16.齊向輝,陳華友,蒙健宗,侯守海,梁淑華,徐虹,黃日波。2009。海藻糖在生物組織器官保護方面的新應用。安徽農業科學, 33:16729-16732。17.劉曉娟、田強、王成福。2008。海藻糖的功能及在食品中的應用。中國食物與營養。第一期。18.劉占磊、黃叢林、張秀海、?忠義。2009。海藻糖的應用及其合成?TPS在植物轉基因中的研究進展。中國農學通報, 25:6. 54-58。19.聶凌鴻、寧正祥。2001。海藻糖的生物保護作用。生命的化學, 21:3. 206-209。20.Bengoechea, J.A., Diaz, R., Moriyon, I. 1996. Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides. *American Society for Microbiology*, 64, 4891-4899。21.Cabib, E., Leloir, L.F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 231, 259-275。22.Chen, Y.S., Lee, G.C., Shaw, J.F. 2006. Gene cloning expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7098-7104。23.Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Journal of Science*, 223, 701-703。24.Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 17-27。25.Garraa, G., Riva, S. 2008. Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. Weinheim, Germany: Wiley-Verlag。26.George, A., Somkuti, M.E., Dominiecki, Steinberg, D.H., 1996. Sensitivity of *Streptococcus thermophilus* to chemical permeabilization. *Journal of Current Microbiology*, 32, 101-105。27.Gomes, F.C.O., Pataro, C., Guerra, J.B., Neves, M.J., Correa, S.R., Moreira E.S.A., Rosa, C.A. 2002. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 399-406。28.Green, J.L., Angell C.A., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *Journal of Physical Chemistry*, 93, 2880-2882。29.Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., Levine, F. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology*, 18, 168-171。30.Hansruedi, F., 1982. Permeabilized cells. *Analytical Biochemistry*, 120, 211-234。31.Hardy, F., Vriend, G., Veltman O.R., Vinne, B.V.D., Eijssink, V.F.H. 1993. Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines. *FEBS Letters*, 317, 89-92。32.Harding, T.S., 1923. History of trehalose, its discovery and methods of preparation. *Sugar*, 25, 476-478。33.Helander, I.M., Alakomi H.L., Kala, K.L., Koski, P. 1997. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 143, 3193-3199。34.Higashiyama, T., 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1263-1269。35.Laura, C.S., Richtmyer, N.K., Hudson, C.S. 1950. The preparation of trehalose from yeast. *Journal of the American Chemical Society*, 72, 2059-2061。36.Lemieux, R.U., Bauer, H.F., 1953. A chemical synthesis of D-trehalose. *Canadian Journal of Chemistry*, 32, 340-344。37.Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597。38.Ma, Y., Xue, L., Sun, D.W. 2006. Characteristics of trehalose synthase from permeabilized *Pseudomonas putida* cells and its application in converting maltose into trehalose. *Journal of Food Engineering*, 77, 342-347。39.Manera, A.P., Kuhn, G., Polloni, A., Marangoni, M., Zobot, G., Kalil, S.J., Oliveira, D.D., Treichel, H., Oliveira, J.V., Mazutti, M.A., Mauger, F. 2011. Effect of compressed fluid treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of α -galactosidase. *Food Chemistry*, 125, 1235-1240。40.Maruta, K., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. 1995. Formation of Trehalose from Maltooligosaccharides by a Novel Enzymatic System. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 59, 1829-1834。41.Masui, A., Fujiwara, N., Imanaka, T. 1994. Stabilization and rational design of serine protease AprM under highly alkaline and high-temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3579-3584。42.Nakada, T., Maruta, K., Tsusaki, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. 1995. Purification and Properties of a Novel Enzyme, Maltooligosyl Trehalose Synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 59, 2210-2214。43.Ramon, S., Macia, C.F.A., Moreno, V. 1999. Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae*, 78, 261-269。44.Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Berendsen, W.D.H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 871-898。45.Schiraldi, C., Di Lernia I., De Rosa M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20, 420-425。46.Suzuki, T., Tanaka, K., Kinoshita, S. 1969. The Extracellular Accumulation of Trehalose and Glucose by Bacteria Grown on n-Alkanes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33, 109-195。47.Timasheff, S.N., 1993. The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These Processes?, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22, 67-97。48.Wu, T.T., Lin, S.C., Shaw, J.F. 2011. Integrated process for the purification and immobilization of recombinant trehalose synthase for trehalose production. *Process Biochemistry*, 46, 1481-1485。49.Zhou, Y., Yuan, Q., Gao, H., Ma, R.Y. 2006. Production of trehalose by permeabilized *Micrococcus* QS412 cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 137-141。