

嗜热放线菌海藻糖合成酶在地衣芽孢杆菌中的异源表达

李由然^{1,2}, 王珊瑛^{1,2}, 杨韵霏^{1,2}, 顾正华^{1,2},
张 梁^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 石贵阳^{*1,2}

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 海藻糖合成酶可将麦芽糖异构化为海藻糖, 是海藻糖酶法生物转化的中心酶制剂。为了实现海藻糖合成酶在食品安全型表达宿主中高效生产, 进而应用于食品级海藻糖的酶法合成, 构建了革兰氏阳性菌重组表达质粒并转化入地衣芽孢杆菌。重组质粒携带了来自于嗜热放线菌 *Thermomonospora curvata* 海藻糖合成酶的编码基因, 在地衣芽孢杆菌木糖异构酶启动子及其阻遏蛋白的介导下表达, 胞内海藻糖合成酶发酵活力为 12.1 U/mL。考察了不同培养条件对重组菌生长和产酶的影响, 结果显示质量分数 4% 的麦芽糊精和质量分数 0.4% 的豆饼粉分别为产酶适宜的碳源和氮源; 菌体培养 10 h 后加入终质量浓度为 1 g/dL 的诱导剂, 于 37 °C 诱导 12 h 后重组菌产酶最高达到 23.7 U/mL。

关键词: 海藻糖合成酶; 嗜热放线菌; 地衣芽孢杆菌; 诱导表达

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1148—08

Heterologous Expression of Trehalose Synthase from a Thermophilic Actinomyces in *Bacillus licheniformis*

LI Youran^{1,2}, WANG Shanying^{1,2}, YANG Yunfei^{1,2}, GU Zhenghua^{1,2},
ZHANG Liang^{1,2}, DING Zhongyang^{1,2}, SHI Guiyang^{*1,2}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Trehalose synthase could transform maltose to trehalose via isomerization, which is a crucial enzyme in the process of trehalose biotransformation with enzymatic method. Recombinant expression plasmid was constructed in order to effectively produce food-grade trehalose synthase in food safety host. The plasmid harbored a trehalose synthase encoding gene from *Thermomonospora curvata*, which was expressed under the control of a xylose operon from *Bacillus megaterium*. The enzyme activity yield of intracellular trehalose synthase reached to 12.1 U/mL after fermentation when expressed by xylose isomerase promoter and its repressor protein in *Bacillus licheniformis*. Furthermore, the effect of different cultural conditions on the enzyme production was

收稿日期: 2015-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401674); 江南大学自主科研重点项目(JUSRP51503)。

作者简介: 李由然(1985—), 男, 河南郑州人, 工学博士, 讲师, 主要从事发酵工程研究。E-mail: liyouran@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 石贵阳(1963—), 男, 浙江绍兴人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程研究。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

investigated and the optimal condition was determined with 4% maltodextrin, 0.4% soybean powder, and 1% inducer added after 10 h incubation. The maximal yield was 23.7 U/mL after 12 h induction at 37 °C. The study would contribute to the industrial application of trehalose synthase from both theoretical and experimental aspects.

Keywords: Trehalose synthase, *Thermomonospora curvata*, *Bacillus licheniformis*, inducible expression

海藻糖是麦芽糖的同分异构体,它由两分子葡萄糖通过 α -1,1-糖苷键相连而成。海藻糖是化学性质最为稳定的糖,不具有还原性,不易被酸水解; α -葡萄糖苷酶也无法水解其糖苷键。结晶海藻糖的熔点为 97 °C,当温度进一步升高,它通常所结合的二个水分子会与之逐步分离,直至 130 °C 完全脱水并重新凝固;无水海藻糖的熔点为 203 °C^[9]。海藻糖最为引人注目的方面在于其对生命过程稳定性的维持作用,这一作用广泛存在于不同物种;其中对高温,严寒和脱水的抵御作用尤为突出。经过多年探索,研究者们已初步揭示了海藻糖这些功能的内在机理。分子模型显示,海藻糖在脱水和冷冻过程中可以代替原本结合于不同生物结构的水分子,从而维持生物大分子的稳定性,避免不可逆变性^[13]。另一方面,对水合作用的研究表明,由于其特殊的分子结构,海藻糖较其他寡糖有更高的水合能力,这有助于固定磷脂双分子膜周围的水分子以及在脱水过程中直接与极性生物大分子建立新的连接^[14-15]。基于以上生物特性,海藻糖具有广泛应用。如在食品领域可作为理想的保鲜剂;在保健品领域可作为活菌制剂的保护剂;在医药领域可用来保藏血浆和疫苗等生物活性物质。

海藻糖的早期生产主要从干酵母中提取,由于含量低,提取工艺复杂,这样获得的海藻糖成本极高,使其应用仅局限于特殊领域^[8]。之后出现了发酵法,基因重组法,化学合成法和酶转化法,其中酶转化法具有转化率高,转移性强,作用温和,无污染等优点,因而被认为是最具发展潜力的海藻糖工业生产方法^[2]。用海藻糖合成酶通过转苷作用将廉价易得的麦芽糖转化生成海藻糖是酶转化法的重要途径之一。目前,已从 *Thermomonospora curvata*, *Thermobifida fusca*, *Pimeleobacter* sp., *Thermus aquaticus*, *Pseudomonas putida* 和 *Pseudomonas stutzeri* 等菌株中克隆和鉴定出海藻糖合成酶基因 TreS,并在大肠杆菌中实现了异源表达^[1-4]。其中来自 *Thermomonospora curvata* 的海藻糖合成酶不仅可以

转化麦芽糖生成海藻糖(转化率 70%),当以蔗糖为底物时还可以生成海藻酮糖(转化率 80%),同时该酶的稳定性极高,在 4 °C 下保存一年几乎不损失酶活^[3]。由于野生菌的产酶量极低,大肠杆菌重组酶又不适合用于食品行业,这一性能优良的新型酶制剂难以获得广泛的应用。作为另一大类表达宿主,芽孢杆菌类细菌是诸如酶制剂以及生物杀虫剂等工业产品的重要生产菌株。其中又以地衣芽孢杆菌尤为突出,这是因为它能够高效合成蛋白,同时培养条件又较为简单。自 1972 年起,它就已经被安全地用于淀粉酶的大规模工业生产。作者所在研究室前期在工业生产菌株的基础上构建了一株淀粉酶和蛋白酶缺失的地衣芽孢杆菌表达宿主 BL002。作者将 *Thermomonospora curvata* 的海藻糖合成酶基因 TreS 在芽孢杆菌诱导型启动子的介导下转化入于 BL002 中,实现了其在地衣芽孢杆菌中的功能表达,这是该基因首次在芽孢杆菌类宿主中的表达研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

Thermomonospora curvata JCM 3096: 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。*Bacillus megaterium* CICIM B1514,表达宿主菌 BL002,大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒 pHY300-PLK: 作者所在研究室保藏。芽孢杆菌转化用培养基按照文献^[16]配制。大肠杆菌/芽孢杆菌生长培养基 TB 和筛选培养基 TBT(含四环素)按照文献^[5]配制。芽孢杆菌发酵培养基 (/L): 200 g 葡萄糖,70 g 豆饼粉,7 g 玉米浆。重组大肠杆菌培养基中添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素,重组芽孢杆菌转化子培养基中添加 20 μ g/mL 四环素。

1.2 主要试剂

重组质粒构建过程中所使用的各种限制性内切酶,T4DNA 连接酶:Thermo Fisher 公司产品;DNA 聚合酶:TAKARA(大连)有限公司产品;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒以及核苷酸片段纯化试剂盒:

Axygen(美国)生物技术有限公司产品;新霉素和壮观霉素:生工公司(上海)产品;其它所使用的药品和试剂均购自国药集团化学试剂(上海)有限公司。

1.3 重组表达质粒的构建

首先提取 *Bacillus megaterium* CICIM B1514 基因组 DNA,使用 pfu DNA 聚合酶及引物 BmP-F(5'-GCCAGATCTTAATACTTATAGGGGT -3') 和 BmP-R (5'-CGCCCCGGGTGTGATTTCCCCCTTT-3')扩增获得启动子序列 Pb。反应条件:94 °C 预变性 5 min 后进入下一循环:95 °C 变性 10 s,54 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。扩增产物纯化后经 *Bgl*II 和 *Bam*HI 双酶切,连接至同样酶切的载体 pHY300-PLK 上,获得重组质粒 pHY-Pb。然后提取 *Thermomonospora curvata* JCM 3096 的基因组 DNA,使用 pfu DNA 聚合酶及引物 TreS-F (5'-TTAAGATCTACCGGGGACCCCATCCCC -3') 和 TreS-R(5'-CTTCGCCGTCTGCCGGGT-3')扩增获得 TreS。反应条件:94 °C 预变性 5 min 后进入下一循环:95 °C 变性 10 s,57 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。PCR 产物经试剂盒纯化后克隆至载体 pMD18-T-simple 送样测序。提取验证无误的转化子后用 *Bam*HI 和 *Sma*I 双酶切并胶回收基因片段,再亚克隆至经同样酶切的载体 pHY-Pb 上,从而获得表达质粒 pHY-Pb-TreS。

1.4 地衣芽孢杆菌的原生质体制备及转化

将过夜培养的地衣芽孢杆菌 BL002 接种于 25 mL 416# 培养基中(接种量 3%),于 37 °C,200 r/min 培养 8 h。冷冻离心(2 000 g,8 min)收集菌体,用 10 mL SMMP 重悬,加溶菌酶至终质量浓度为 100 μ g/mL,37 °C,100 r/min 培养至 85%的细胞变为原生质体。离心收集制备好的原生质体,加入 1~5 μ g 的质粒及等体积的缓冲液,再加入 1.5 mL 质量分数 40% PEG6000,轻轻颠倒混匀后,加 5 mL SMMP 混匀;4 °C,2 000 g 离心 8 min,弃上清后再加入 500 μ L 的 SMMP,30 °C,100 r/min 培养 130 min,37 °C 继续培养 48~72 h 后验证长出的转化子。

1.5 重组海藻糖合成酶的诱导表达

过夜培养携带表达质粒 pHY-Pb-TreS 的重组地衣芽孢杆菌作为种子,以体积分数 3%的接种量接种于装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶

中,首先在 37 °C,250 r/min 条件下培养 6 h;接着,加入木糖至终质量浓度为 1 g/L 继续培养 24 h。发酵结束后离心收集菌体,经磷酸-柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L,pH 6.0)重悬后用超声波破碎细胞(功率为 400 W,每破碎 1 s 停 3 s,共破碎 10 min)。细胞破碎液经高速离心(10 000 g,20 min)后取上清液即为酶液。

1.6 海藻糖合成酶活力检测

向 100 μ L 使用 20 mmol/L pH 6.5 的磷酸缓冲液配制的质量分数 10%麦芽糖溶液中加入 100 μ L 稀释至合适浓度的酶液,于 40 °C 反应 2 h。使用沸水浴终止反应后使用高效液相系统 HPLC 测定海藻糖含量。检测条件为:层析柱,XBridge Amide 氨基柱(美国 Waters);流动相, v (乙腈): v (水)=80:20;流量 0.8 mL/min;示差检测器。酶活定义为每小时生成 1 μ mol 海藻糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.7 重组酶的分离纯化

重组海藻糖合成酶的分离纯化分三步进行。粗酶液首先经硫酸铵分级沉淀浓缩除杂,所获得的蛋白沉淀用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液重悬后上样至连接于 AKTA Purifier 100 层析系统的疏水柱 HiTrap Phenyl FF (high sub,GE,瑞典),A 液为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0);B 液为 A 液中加入 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。层析方法为在 20 个柱体积的时间内从体积分数 100%的 B 液变化至 0%B 液,流量 1 mL/min,使用紫外检测器在 260 nm 的波长下检测蛋白的分离情况。所收集的活性组分再上样至 Sephacryl S-200 分子筛凝胶柱(GE,瑞典),缓冲液为 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5),其中加入 0.1 mol/L 的 NaCl 以防止非特异性吸附,流量为 0.5 mL/min,所获得活性组分即为纯酶。

1.8 不同温度对酶活力和酶稳定性的影响

以麦芽糖为底物分别在 10~70 °C 检测重组酶纯酶活力,考察不同作用温度对酶活的影响。进一步地,将酶液分别在 10~70 °C 下保温 1 h 后使用标准条件测定残余酶活,考察重组海藻糖合成酶在不同温度下的稳定性。

1.9 不同 pH 对酶活力和酶稳定性的影响

分别在不同 pH 的缓冲体系下(pH 4.0~5.8 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液,pH 5.8~7.8 0.05 mol/L 磷酸缓冲液,pH 7.8~9.0 Tris-HCl 缓冲液)检测重组海藻糖合成酶纯酶的活力,考察不同作用温度对酶活的影响。

响。进一步地,将酶液分别在不同 pH 的缓冲体系中于室温(20 ℃)保温 1 h 后使用标准条件测定残余酶活,考察重组海藻糖合成酶在不同 pH 下的稳定性。

1.10 不同化学物质对酶活力的影响

为了探索重组海藻糖合成酶的激活剂及抑制剂,在酶液中加入不同的化学物质后,于室温静置 10 min,再于标准条件下测定酶活。

1.11 重组酶的动力学参数测定

使用不同浓度的麦芽糖(2~10 mg/mL)作为底物在标准条件下反应,检测产物生成量从而计算重组海藻糖合成酶的动力学参数 K_m 和 V_{max} 。

1.12 重组酶的底物特异性与水解产物分析

在标准条件下使用重组海藻糖合成酶作用于不同的底物,包括麦芽糖,海藻糖,可溶性淀粉,糊精,乳糖,麦芽三糖。使用 HPLC 连接氨基柱 Waters XBridge Amide 分析产物,所用层析条件同活力检测。

2 结果与讨论

2.1 重组表达质粒的构建

以 *Bacillus megaterium* CICIM B1514 基因组 DNA 为模板,使用引物 BmP-F 和 BmP-R 扩增获得的产物大小为 1.4 kb,与 NCBI 上登记的木糖异构酶启动子连同其调控原件的大小一致。将其连接至穿梭克隆载体 pHY300-PLK。接下来以 *Thermomonospora curvata* JCM 3096 的基因组 DNA 为模板,使用引物 TreS-F 和 TreS-R 扩增获得大小为 1.8 kb 的产物,与预期大小一致。将其连接至克隆载体 pMD18-T-simple,测序结果表明所获得片段的核苷酸序列与 NCBI 中来自 *Thermomonospora curvata* DSM 43183 的海藻糖合成酶基因同源性为 100%。然后,将已验证的编码基因片段从克隆载体上经 *Bam*HI 和 *Sma*I 双酶切并胶回收后连入载体 pHY-Pb。所获得重组质粒经 *Bam*HI 和 *Bgl*II 双酶切后在电泳上显示出 3.2 kb 和 4.8 kb 的 DNA 片段,表明重组质粒 pHY-Pb-TreS 构建成功(图 1)。

2.2 重组表达质粒在地衣芽孢杆菌 BL002 中的表达

地衣芽孢杆菌的细胞壁由一层肽聚糖组成,适合使用原生质体转化的方式导入外源 DNA。将宿主菌培养至对数后期(8 h)时用溶菌酶制备原生质体,结果显示在 100 μ g/mL 的酶质量浓度条件下处理 30 min 时原生质体数最高,达到 10^{10} 个/mL,此时的原生质体形成率超过 80%,且再生率达到 17%。在

此条件下,质粒 pHY-Pb-TreS 对地衣芽孢杆菌的转化率为 15 cfu/ μ gDNA。该转化率低于电击转化所得到的转化率^[1],但获得阳性转化子的几率远高于电击转化方法(>90%),可减少后期验证的工作量。

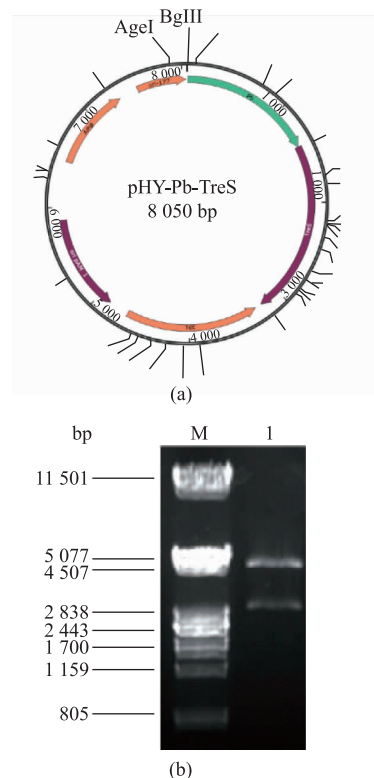


图 1 海藻糖合成酶重组表达质粒的构建

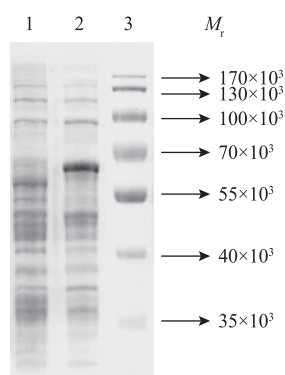
Fig. 1 Construction of trehalose synthase expression plasmid

将阳性转化子接种于发酵培养基中 250 r/min 培养 6 h,加入终质量浓度为 1 g/L 的木糖继续培养 24 h。发酵结束时的菌体量($A_{600\text{nm}}$)为 26.3。收集菌体破碎后,上清液中海藻糖合成酶活力为 12.1 U/mL,携带空载体的宿主菌株 BL002 胞内未检测到酶活,SDS-PAGE 显示重组蛋白的亚基相对分子质量大小约为 70 000(图 2(a)),与根据氨基酸序列计算得到的理论大小 69 000 相符。

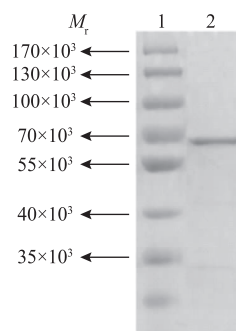
2.3 重组酶的分离纯化

为了研究重组海藻糖合成酶的酶学性质,首先需要对粗酶纯化,分 3 步分离得到重组酶纯酶,纯化结果如表 1 和图 2(b)所示。首先采用盐析处理粗酶液。高浓度的盐离子在溶液中可以破坏蛋白质表面的水化膜,与蛋白质竞争水分子从而降低其溶解度。由于各种蛋白质的溶解度不同,可以控制溶液中的盐浓度而分离不同蛋白质。盐析通常使用硫酸

铵,这是因为其对多数蛋白质的活力没有影响,同时溶解度大,温度系数小。通过预实验,确定的除杂条件为质量分数 35%饱和度的硫酸铵,重组酶的收集条件为质量分数 80%饱和度的硫酸铵。盐析回收的酶经缓冲液重悬后直接上样至疏水层析柱在高盐浓度条件下富集,再通过盐浓度逐渐降低的线性梯度进行洗脱。所获得的活性组分经冷冻干燥浓缩后在上样至凝胶分子筛层析,最终获得了电泳纯的重组海藻糖合成酶,比酶活为 9.39 U/mg,收率为 47.8%。



1. 原始菌; 2. 重组菌; 3. Marker
(a)菌体破碎上清液的SDS-PAGE图谱



1. Marker; 2. 纯化后的重组酶
(b)纯化后重组酶的SDS-PAGE图谱

图 2 重组酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE chromatogram of the recombinant enzyme

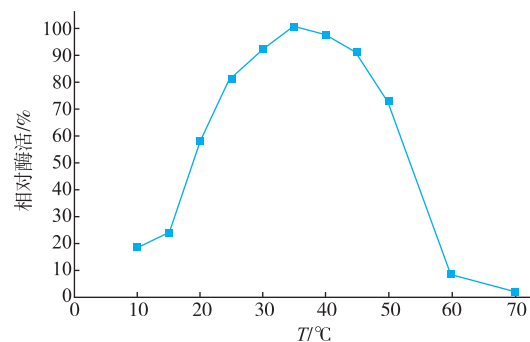
表 1 重组海藻糖合成酶的分离纯化结果

Table 1 Results of the purification of recombinant trehalose synthase

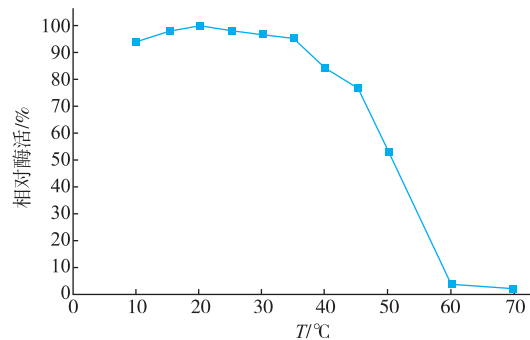
纯化步骤	总蛋白质量/mg	总活力/U	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	收率/%
粗酶液	630±31	1210±19	1.9±0.5	1	100
盐析	441±12	1094±43	2.5±0.2	1.3	90.4
疏水层析	98±4	847±21	8.6±1.5	4.5	70.0
凝胶层析	62±3	578±12	9.3±0.9	4.9	47.8

2.4 重组酶的温度适应性

在 10~70 °C 的范围内研究了纯化后的重组海藻糖合成酶的最适作用温度和温度稳定性。以最适温度下或稳定性最高温度下的酶活为 100% 作图,结果如图 3 所示。重组酶的最适作用温度为 35 °C,且当温度低于 15 °C 或高于 50 °C 时活力大幅度减弱。其在 40 °C 以下具有较高的稳定性,保温 1 h 后仍能保留 80% 以上的酶活。而在 60 °C 以上的环境中保温 1 h 酶活几乎全部丧失。日本林原酶制剂公司是国际上海藻糖生物转化领域的先行者,许多微生物海藻糖合成酶都由其筛选并报道。根据其发表的研究论文,大多数细菌来源的海藻糖合成酶最适作用温度均在 30 °C 左右,仅有少数放线菌或古细菌来源的海藻糖合成酶的最适作用温度高于 60 °C^[2,4]。尽管在许多领域高温酶因其生物转化过程的高效率和高稳定性备受青睐,但是林原公司最终选择了一株来自细菌的低温海藻糖合成酶进行海藻糖的工业化生产。这是由于低温酶较高温酶的副产物(葡萄糖)较少,在产物提纯的工艺方面具有显著优势。



(a)最适作用温度



(b)热稳定性

图 3 温度对重组酶活力和热稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activity and stability of purified recombinant enzyme

2.5 重组酶的 pH 适应性

在 pH 4~9 的范围内研究了纯化后的重组海藻糖合成酶的最适作用温度和温度稳定性。以最适温度下或稳定性最高温度下的酶活为 100% 作图,结果如图 4 所示。重组酶的最适作用 pH 为 6.5,且在 pH 6.5~7.5 的范围内均能显示出最高活力,在 pH 5 以下或 pH 8 以上的环境中酶活下降显著。同时,重组酶在 pH 5.5~8.0 的条件下较为稳定,保温 1 h 后仍能保留 80% 以上的酶活。该酶的以上特性与已报道的微生物海藻糖合成酶的 pH 适应性无显著差异。

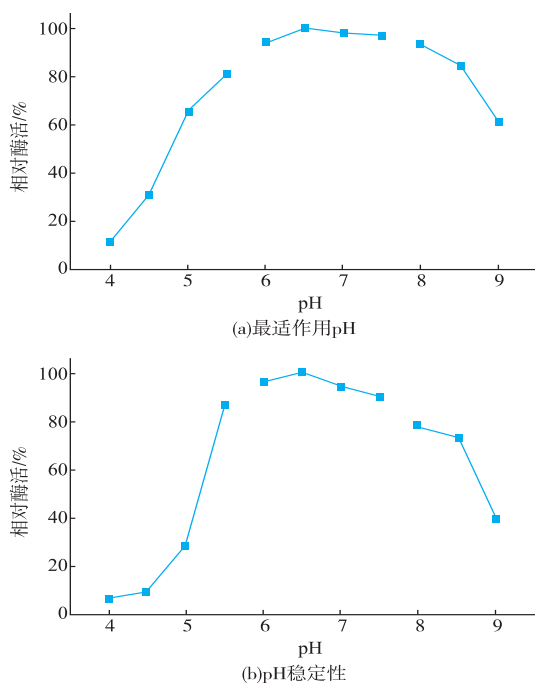


图 4 pH 对重组酶活力和热稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity and stability of purified recombinant enzyme

2.6 不同化学物质对酶活力的影响

不同化学物质对重组海藻糖合成酶纯酶活力的影响如表 2 所示。 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 K^+ 等金属阳离子对酶具有显著的激活作用,最高可达对照组酶活的 131%;而 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等重金属离子则可以完全抑制酶活。由于 EDTA 可与碱金属及大部分过渡金属络合成稳定的螯合物,通常可作为鉴定金属酶的化学试剂;本研究中,EDTA 的添加对酶活无影响,表明该海藻糖合成酶的催化无需金属离子作为辅基。同时,柠檬酸盐和常用的蛋白酶抑制剂 PMSF 对酶活无影响,SDS 和脲可不同程度地抑制酶活。

表 2 化学物质对重组海藻糖合成酶活力的影响

Table 2 Effect of different reagents on the activity of purified recombinant trehalose synthase

化学物质	浓度/(mmol/L)	相对酶活/% ^a
对照	—	100
Li^+	0.5	94.9±2.0
	5	91.3±1.4
Mg^{2+}	0.5	101.1±2.2
	5	104.4±1.1
Zn^{2+}	0.5	46.4±3.7
	5	18.9±0.1
Ca^{2+}	0.5	101.0±2.2
	5	103.4±3.9
Mn^{2+}	0.5	118.0±3.7
	5	131.4±2.1
Fe^{3+}	0.5	101.1±0.2
	5	109.2±0.4
Na^+	0.5	100.8±2.3
	5	100.7±2.1
K^+	0.5	101.6±2.7
	5	115.2±1.0
Co^{2+}	0.5	101.3±1.2
	5	102.3±3.1
Sn^{2+}	0.5	82.4±4.4
	5	52.3±2.4
Cu^{2+}	0.5	ND [*]
Hg^{2+}	0.5	ND
EDTA	0.5	100.9±4.2
	5	98.9±2.7
柠檬酸	0.5	99.1±2.9
	5	91.7±3.5
SDS	30	58.9±2.2
PMSF	5	97.3±2.8
脲	2 000	2.8±0.2

*ND, 未检测到酶活

2.7 重组酶的动力学参数测定

Thermomonospora curvata 来源的海藻糖合成酶催化了麦芽糖和海藻糖之间的可逆反应,同时还具备催化蔗糖生成海藻酮糖的能力。因此分别选取了麦芽糖、海藻糖和蔗糖作为底物,测定了该重组酶的动力学参数,结果如表 3 所示。结果显示该酶以麦芽糖为底物时的 K_m 值约为以海藻糖或蔗糖为底物时的一半,表明其对麦芽糖的亲和力远大于另两种底物。同时,以麦芽糖为底物时的最大反应速率 V_{max} 也较海藻糖或蔗糖为大。

表 3 重组酶的动力学参数

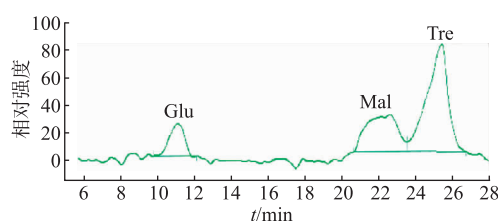
Table 3 Kinetic parameters of recombinant trehalose synthase on different substrates

底物	K_m /(mmol/L)	V_{max} /(U/mg)
麦芽糖	121±2	1 366±11
海藻糖	265±6	497±14
蔗糖	240±5	504±17

2.8 重组酶的底物特异性及水解产物分析

使用纯化后的重组海藻糖合成酶分别于最适条件下作用于 1% 的麦芽糖,海藻糖,可溶性淀粉,糊精,乳糖,麦芽三糖,2 h 后取反应液上样至 HPLC 分析水解产物。结果显示,该海藻糖合成酶仅可以麦芽糖或海藻糖为底物,催化这两种二糖之间的可逆转化,而对其它所选底物无作用。进一步定量分析的结果显示(图 5),该酶作用于最适底物麦芽糖,达到平衡后反应液中含有质量分数 65% 的海藻糖,质量分数 23% 的麦芽糖以及质量分数 12% 的副产物葡萄糖。已报道的用于海藻糖生物转化的微生物酶主要分两种类型。第一类以脂肪杆菌属(*Pimelobacter. sp*)来源的海藻合成酶为代表^[6-7],其特征是催化麦芽糖和海藻糖之间的可逆转化,而对聚合度大于二的麦芽寡糖无作用;第二类是以嗜酸

热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)等古细菌来源的麦芽寡糖基海藻糖合成酶(malto-oligosyltrehalose synthase)^[10],其特征是作用于聚合度 3 及以上的麦芽寡糖,通过转糖基作用将末端的 α -1,4 键转化为 α -1,1 键而形成海藻糖基麦芽寡聚糖。嗜热放线菌来源的海藻糖合成酶属于第一类海藻糖合成酶,该酶经纯化后作用于麦芽糖,在生成海藻糖的同时还释放出少量葡萄糖,Nisshimoto 认为这一类海藻糖合成酶还具有微弱的水解酶活力,因此会水解部分麦芽糖生成葡萄糖^[12],且这一水解酶活力会随温度升高而增加。



Glu, 葡萄糖; Mal, 麦芽糖; Tre, 海藻糖

图 5 重组海藻糖合成酶作用于麦芽糖底物的水解产物分析
Fig. 5 HPLC analysis of the recombinant trehalose synthase acting on maltose

参考文献:

- [1] 罗锋,段绪果,宿玲恰,等. *Thermobifida fusca* 海藻糖合成酶基因的克隆表达及发酵优化[J]. 中国生物工程杂志,2013,33(8):93-99.
- LOU Feng, DUAN Xuguo, SU Lingqia, et al. Cloning, expression and fermentation optimization of *Thermobifida fusca* trehalose synthase gene in *E. coli*[J]. **China Biotechnology**, 2013, 33(8):93-99. (in Chinese)
- [2] 梁甲元. 海藻糖合成酶活性中心的定点突变及其制备海藻酮糖的研究[D]. 南宁:广西大学,2013.
- [3] Liang J, Huang R, 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.
- [4] 刘俊梅,李琢伟,聂海彦,等. 水生栖热菌 FL-03 海藻糖合酶基因克隆及原核表达[J]. 食品科技,2011,36(7):7-10.
- LIU Junmei, LI Zhuowei, NIE Haiyan, et al. Cloning of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* FL-03 and prokaryotic expression[J]. **Food Science and Technology**, 2011, 36(7):7-10. (in Chinese)
- [5] 李永仙,郑飞云,李崎,等. 重组大肠杆菌 BL21(DE3)-pET28a(+)-bgl 诱导表达 β -葡聚糖酶的条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(2):250-255.
- LI Yongxian, ZHENG Feiyun, LI Qi, et al. Optimization of fermentation conditions of recombinant *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-bgl producing β -glucanase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2):250-255. (in Chinese)
- [6] 李镭,丁宏标,余晓斌,等. 耻垢分枝杆菌海藻糖合成酶基因 TreS 的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报,2007(6):69-73.
- LI Lei, DING Hongbiao, YU Xiaobin, et al. Cloning and expression of treS gene from *Mycobacterium smegmatis* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007(6):69-73. (in Chinese)
- [7] 尚宏丽,陈红漫. 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[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(6):34-36.
- SHANG Hongli, CHEN Hongman. Studies on screening of trehalose synthase-producing strain and its enzymology properties[J].

- Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(6):34-36. (in Chinese)
- [8] ELBEIN A D, PAN Y T, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. **Glycobiology**, 2003, 13(4):17R-27R.
- [9] 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(7):871-898.
- [10] GUEGUEN Y, ROLLAND J L, SCHROECK S, et al. Characterization of the maltotriose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2001, 194(2):201-206.
- [11] XUE G P, JOHNSON J S, DALRYMPLE B P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1999, 34(3):183-191.
- [12] NISHIMOTO T, NAKANO M, NAKADA T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp R48[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1996, 60(4):640-644.
- [13] LESLIE S B, ISRAELI E, LIGHTHART B, et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995, 61(10):3592-3597.
- [14] KAWAI H, SAKURAI M, INOUE Y, et al. Hydration of oligosaccharides: Anomalous hydration ability of trehalose [J]. **Cryobiology**, 1992, 29(5):599-606.
- [15] CROWE J H, CARPENTER J F, CROWE L M, et al. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules[J]. **Cryobiology**, 1990, 27(3):219-231.
- [16] THORNE C B, STULL H B. Factors affecting transformation of *Bacillus licheniformis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1966, 91(3).

会 议 信 息

会议名称(中文):第六届全国植物蛋白质研究大会

所属学科:动植物微生物学,细胞生物学

开始日期:2016-12-17

结束日期:2016-12-20

所在城市:海南省 海口市

主办单位:中国植物学会

协办单位:中国细胞学会染色质与蛋白质组专业委员会

承办单位:海南大学 中国热带农业科学院 海南师范大学

主题:从组学到蛋白质生物学功能研究

会议主席:朱玉贤 中国科学院院士 武汉大学(国内主席) Steven Briggs 美国科学院院士 加州大学(国际主席)

联系人:王丹

E-MAIL:plantprotein_wd@163.com

会议网站: <http://www.plantprotein.org.cn/>

会议背景介绍:随着人类基因组及各种生物基因组计划的完成,生物学研究随之从基因组研究时代进入后基因组时代即蛋白质组研究时代,功能蛋白的深入研究,是后基因组时代的重要研究方向。人类蛋白质组草图的完成,掀起了蛋白质组及蛋白功能研究的新热潮,这也将是全球科学家关注的新焦点和新热点。无论是那种研究技术,最终的研究目标都聚焦在蛋白生物学功能,整合各种生物学研究技术,深入解析蛋白质的结构和功能将是近年研究重点和难点。植物组学研究已经得到了人们的关注,各种植物全基因组测序的完成,为植物蛋白质组展开提供了条件。在蛋白质研究飞速发展的今天,拟召开为期3天的第六届全国植物蛋白质研究大会,以及为期7天的第二届植物蛋白质组最新研究技术免费培训班。大会的主题是从组学到蛋白功能,内容将会包括基因组、转录组、蛋白质组、代谢组及生物信息等研究内容。我们热烈邀请国内外从事植物蛋白质研究专家学者,冬季汇聚海南,进行深度学术交流,共同探讨植物蛋白质合作发展大计。