微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(1):6 - 12;4 January 2009
ISSN 0001 - 6209;CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

海藻糖合酶的分子生物学研究进展

朱玥明[1],张峻[2],邢来君[1],李明春[1]*
([1]南开大学微生物学系,分子微生物学与技术教育部重点实验室,天津 300071)
([2]天津市林业果树研究所,天津 300112)

摘要 海藻糖合酶能够将麦芽糖转化为海藻糖,在海藻糖的工业生产中具有十分重要的意义。本文从海藻糖合酶的基因克隆、基因工程应用、结构和催化机制的研究以及其在微生物体内的功能等方面讨论了海藻糖合酶的研究进展。

关键词:海藻糖;海藻糖合酶;α - 淀粉酶家族;催化机制;C 端结构域;代谢途径
中图分类号:Q933 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2009)01-0006-07

1 概述

海藻糖是由两分子葡萄糖以 1,1-糖苷键连接而成的非还原性双糖,广泛存在于细菌、酵母、丝状真菌、植物、昆虫、无脊椎动物等生物体体内[1]。海藻糖对生物体具有非常重要的生物学意义,它是能源和碳源的储备物[2],是蛋白质和生物膜分子在脱水、高温、氧自由基、低温等恶劣环境中的稳定剂和保护剂[3],是信号传感复合物和生长调控因子[4],还是某些细菌细胞壁的组分之一[5]。由于海藻糖具有甜度适中,性质稳定,不易分解,无还原性等特殊性质,以及其保护生物大分子(生物膜、蛋白质、DNA)免受干燥、高温、低温、过氧等环境压力破坏的独特功能,因此该双糖的应用价值十分巨大,已经被广泛应用于食品加工业、医药业、农业、生化制品业和化妆品产业中[6-7]。

海藻糖在生物体内的合成途径主要有以下 5 种:(1) TPS/TPP 途径,亦称为 OtsA/OtsB 途径:该途径由 6-磷酸海藻糖合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase,TPS)催化尿苷二磷酸葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖,再在 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶(Trehalose-6-phosphate phosphatase,TPP)作用下生成海藻糖。该途径在自然界中分布最为广泛,在真核生物、真细菌和古生菌中都有发现[8-10]。(2) TreS 途径:由海藻糖合酶(Trehalose synthase,TreS)催化麦芽糖分子内部发生重排反应,将 α,α-1,4-糖苷键连接的麦芽糖转化为 α,α-1,1-糖苷键连接的海藻糖。到目前为止只在真细菌中发现该途径[11]。(3) TreY/TreZ 途径:由麦芽寡糖基海藻糖合成酶(Maltooligosyltrehalose synthase,TreY)催化麦芽糊精形成麦芽寡糖基海藻糖,然后由麦芽寡糖基海藻糖水解酶(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase,TreZ)水解麦芽寡糖基海藻糖形成海藻糖。该途径主要存在于细菌和古生菌中[12-15]。(4) TreT 途径:由海藻糖葡糖基转移合成酶(Trehalose glycosyltransferring synthase,TreT)催化 NDP-葡萄糖(ADP-,UDP-和 GDP-葡萄糖)和葡萄糖聚合生成海藻糖。该途径主要存在于古生菌中[16-18]。(5) TreP 途径:由海藻糖磷酸化酶(Trehalose phosphorylase,TreP)催化 D-葡萄糖与 1-磷酸葡萄糖合成海藻糖。该途径存在于某些真菌

基金项目:天津市应用基础研究计划重点项目(06YFJZJC02100)
* 通信作者。Tel:+86-22-23508506;Fax:+86-22-23508800;E-mail:nklimingchun@yahoo.com.cn
作者简介:朱玥明(1982 -),天津人,博士研究生,研究方向为微生物分子生物学。E-mail:zymxiaozhu@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-09-24;修回日期:2008-10-27

中[19-20]。对 TreP 的研究只局限于体外试验,其在活细胞体内的功能还不确定。海藻糖在生物体内的分解代谢主要由海藻糖酶(Trehalase, TreH)介导,催化海藻糖生成葡萄糖。

2　海藻糖合酶基因

在海藻糖的工业生产中,海藻糖合酶与其它海藻糖合成酶相比具有更大的优势,只需要一种酶一步反应就能够获得海藻糖,而且其生产原料为更加廉价的麦芽糖。因此,各国科学家更加关注海藻糖合酶,并对其进行了更为深入的研究。早在 1995 年,日本的 Nishimoto 等从脂肪杆菌属的 *Pimelobacter* sp. R48 中最早发现并提纯了海藻糖合成酶[21]。随后不久,Tsusaki 等人利用放射性探针筛选基因组 DNA 文库的方法,分别从 *Pimelobacter* sp. R48[22] 和水生栖热菌(*Thermus aquaticus* ATCC33923)[23] 中克隆得到了海藻糖合酶的基因。这是最早的对海藻糖合酶基因的报道,从而揭开了海藻糖合酶研究的序幕。

随后,在分枝杆菌中也发现了海藻糖合酶的存在。De Smet 等人克隆并在大肠杆菌中异源表达了结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的海藻糖合酶,并对其反应的最适条件做了研究[24]。Pan 等分离纯化了耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的海藻糖合酶,并通过 Q-TOF MS 技术获得了该酶的部分氨基酸序列。通过这些已知氨基酸序列在 *M. smegmatis* 基因组中的对比分析,得到了该海藻糖合酶的 ORF 区[25]。

韩国的 Lee 等人利用大肠杆菌 *malPQ* 缺陷菌株和 MacConkey 培养基,对施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri* CJ38)的基因组文库进行筛选,得到了海藻糖合酶的基因,并将其成功表达于大肠杆菌中[26]。进一步的研究显示,该酶是一种新型海藻糖合酶,在其反应过程中不会生成葡萄糖副产物,很适合应用于海藻糖的工业生产。

台湾的 Chen 等从嗜热嗜酸的干热嗜酸菌(*Picrophilus torridus*)中克隆得到了海藻糖合酶,该酶对酸性和高温环境都有一定的耐受性,在 pH 5.0 和 60℃下仍然具有很高的活性[27]。

我国的黄日波等人先后从褐色喜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)[28]、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)[29] 和耐放射异球菌(*Deinococcus radiodurans*)[30] 中克隆得到了海藻糖合酶的基因,通过这些基因在大肠杆菌中的异源表达,将其应用于海藻糖的酶法生产中,并取得了较好的成果。本实验室已经克隆得到了红色亚栖热菌(*Meiothermus ruber*)的海藻糖合酶基因,并将其异源表达于大肠杆菌中[31],目前正在测定该酶的相关特性。表 1 中列举了目前已经纯化或异源表达的海藻糖合酶及其相关特性。

表 1　已纯化或异源表达的海藻糖合酶及其相关特性

Table 1　List of trehalose synthase that have been purified or heterologously expressed and their properties

Resources	Numbers of amino acid residues	Optimum temperature/℃	Optimum pH	Thermo-stability/℃	pH stability	Enzyme activity/(U/mg)	Maximum yield of trehalose/%	Ref.
Pimelobacter sp. R48	573	20	7.5	30	6.0-9.0	17	82 (5℃)	[21]
Mycobacterium tuberculosis	601	NA	6.0	NA	NA	NA	NA	[24]
Mycobacterium smegmatis	593	NA	7.0	NA	NA	NA	50	[25]
Pseudomonas stutzeri CJ38	689	35	8.5-9.0	30	6.0-9.0	79.2	75 (15℃)	[26]
Thermobifida fusca	610	25	6.5	NA	NA	NA	60	[28]
Deinococcus radiodurans	553	15	6.5	40	5.5-8.0	NA	92 (5℃)	[31]
Picrophilus torridus	558	45	6.0	60	5.0-7.5	80	71 (20℃)	[27]
Thermus aquaticus ATCC 33923	963	65	6.5	80	5.5-9.5	134	81 (40℃)	[33]
Thermus thermophilus	965	65	6.5	80	6.0-9.0	NA	80 (30℃)	[32]
Meiothermus ruber *	962	55	6.5	60	4.5-10.0	-	-	[31]

NA: not available. * some data about the enzymatic properties is being tested.

3　海藻糖合酶的作用机制

由于尚未得到海藻糖合酶的蛋白晶体结构,目前对海藻糖合酶作用机制的研究仅仅局限于理论推测阶段。日本的 Nishimoto 等首先证明了海藻糖合酶的催化反应是分子内的重排过程,而不是分子之间的反应[33]。他们利用麦芽糖作为底物,并同时在反应体系中加入 ^{14}C 标记的葡萄糖,试验结果显示,并没有具有放射性的海藻糖或麦芽糖的生成。随后,韩国的科学家通过电喷雾质谱法进一步证明了

这点[34]。

通过已报道的海藻糖合酶氨基酸序列的比对分析发现,海藻糖合酶具有α-淀粉酶家族酶类所具有的四个保守区:分别是I XDXXXNH,II GXRXDXXZZ,III XXX(G/A)EZZZ,IV XXBBHD(X为疏水性氨基酸残基,B为亲水性氨基酸残基,Z为影响酶反应特异性的氨基酸残基)。据此推测,海藻糖合酶是α-淀粉酶家族成员之一。属于α-淀粉酶家族的酶类具有相似的催化机制[35],在II区和III区中存在酶催化反应的活性中心:III区中的Glu为质子供体,将一个质子传递给底物1,4-糖苷键中的O原子;II区的Asp为亲核试剂,攻击底物糖分子中的异头中心碳原子,使C1-O键断裂。而I区和IV区中的His介导底物和酶分子的结合,如图1所示。

		I	II	III	IV
		DXXXNH	GXRXDXX	G/AEZZZ	XXBBHD
TreS	*T. aquaticus*	(96)ELVLNH(101)	(193)GFRLDAI(199)	(239)AEVNM(243)	(301)FIRNHD(306)
	Pimelobacter sp.	(103)DFVMNH(108)	(201)GFRLDAV(207)	(246)YEANQ(250)	(317)FLRNHD(322)
	P. torridus	(101)DLVLNH(106)	(199)GFRADAV(205)	(244)AEANQ(248)	(306)FLRNHD(311)
	M. tuberculosis	(136)DLVMNH(141)	(234)GFRLDAV(240)	(279)AEANQ(283)	(345)FLRNHD(350)
	D. radiodurans	(101)DLVTNH(106)	(205)GFRVDAV(211)	(250)AEANQ(254)	(314)FLRNHD(319)
	T. fusca	(128)DLVMNH(133)	(226)GFRLDAV(232)	(271)SEANQ(275)	(337)FLRNHD(342)
	P. stutzeri	(149)DIVPAH(154)	(290)VLRLDAN(296)	NO	(398)ALQNHD(403)
TreY	*Arthrobacter sp.*	(87)DIVPNH(92)	(233)GLRIDHP(239)	(263)IEKIL(267)	(478)TLSTHD(483)
	S. acidocaldarius	(85)DIVPNH(90)	(224)GYRIDHI(230)	(254)VEKIL(258)	(438)ATSTHD(443)
α-Amy	*C. flavus*	(144)DVVVNH(149)	(235)GLRIDSL(243)	(263)GEVFN(267)	(327)FLENQD(332)
	A. oryzae	(117)DVVANH(122)	(202)GLRIDTV(208)	(250)GEVLD(254)	(292)FVENHD(297)

图1　海藻糖合酶和某些α-淀粉酶家族酶类所具有的四个保守区及其催化和底物结合位点

Fig.1　Four conserved amino acid sequences of trehalose synthase and some α-amylase family enzymes and their putative catalytic and substrate-binding residues. The catalytic and substrate-binding residues are in box.

根据α-淀粉酶家族酶类的催化机制,研究人员推测海藻糖合酶通过催化两次取代反应完成麦芽糖和海藻糖的相互转变过程。首先,麦芽糖分子与酶的催化部位相结合,酶活性中心的Glu将一个质子传递给1,4-糖苷键中的O原子,与此同时Asp攻击C1-O-C4中的C1原子,形成鎓盐离子的过渡态。从而发生第一次取代反应,使麦芽糖分子中C1-O键的断裂,产生β-葡糖基-酶的中间体。在此之后,酶的构象会发生变化,使得另一个游离的葡萄糖分子的相对位置发生改变,其C1-OH正好能够亲核攻击葡萄糖基-酶中间体上的C1原子,发生第二次取代反应,产生α,α-1,1-海藻糖(图2a)。某些海藻糖合酶,如Thermus caldophilus GK24的海藻糖合酶,将麦芽糖转化为α,α-海藻糖的同时还会有少量的α,β-海藻糖(约3%)生成[34],这说明在β-葡糖基-酶的中间体形成后,酶分子可以改变为另一种构象,使得游离的葡萄糖分子在酶活中心内部以另一种空间位置发生第二次取代反应(图2b)。如果水分子进入酶活中心,并作为亲核试剂优先攻击β-葡糖基-酶的中间体上的碳原子,则会形成副产物葡萄糖,即发生双糖的水解(图2c)。本实验室通过定点突变的方法将红色亚栖热菌的海藻糖合酶分子中的催化位点Glu和Asp突变为丙氨酸,结果显示突变酶几乎没有活性,证明了这些位点对酶活的重要性。

海藻糖合酶催化麦芽糖和海藻糖相互转化的可逆反应,麦芽糖和海藻糖都可以作为海藻糖合酶的底物。Pan等通过对耻垢分枝杆菌海藻糖合酶催化机制的研究,提出该海藻糖合酶可能具有两个不同的底物结合位点,分别结合麦芽糖和海藻糖[25]。因为在高浓度无放射性标的海藻糖存在下,该酶仍能以[14C]标记的麦芽糖为底物,生成具有放射性的海藻糖。如果麦芽糖与海藻糖结合位点相同,高浓度的海藻糖会竞争性结合于酶活中心,从而阻遏麦芽糖与酶的结合。海藻糖合酶以麦芽糖为底物涉及α-1,4糖苷键的断裂,而以海藻糖为底物需要α-1,1糖苷键的断裂,其酶催化机制可能并不相同,这也说明在海藻糖合酶可能存在两个底物结合位点,分别结合麦芽糖和海藻糖。研究还发现,额外的葡萄糖会抑制海藻糖合酶的活性,在反应体系中加入50 mmol/L的葡萄糖会使海藻糖合酶的活性降低75%[25],这从一个侧面证明了葡萄糖基-酶是海藻糖合酶转化反应的中间体的假设。最新的报道中,Pan等发现来自耻垢结核杆菌的海藻糖合酶同时具有海藻糖合酶和淀粉酶的活性,该酶具有两个不同的活性位点,一个位点催化麦芽糖和海藻糖之间的相互转化,另一

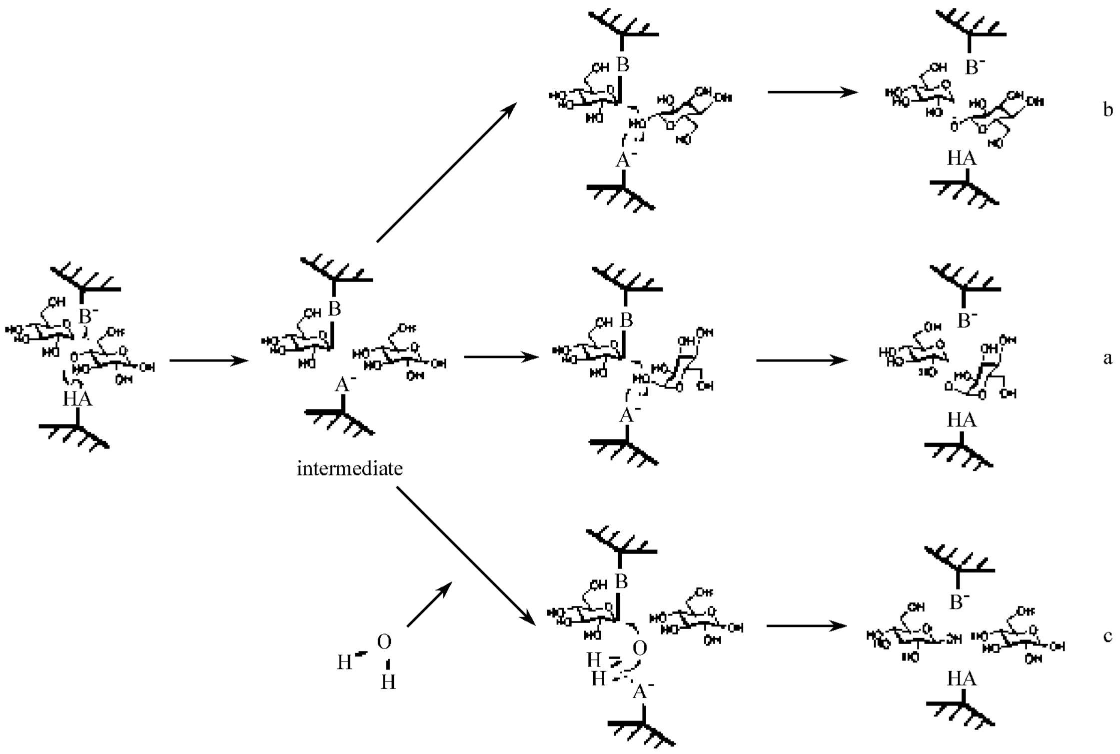

图 2　推测的海藻糖合酶的作用机制

Fig.2　Possible catalytic mechanism of trehalose synthase. HA and B- mean an acid group and a nucleophilic group of the enzyme. a：formation of α,α-trehalose；b：formation of α,β-trehalose；c：hydrolysis.

个位点表现出淀粉酶的活性，可将糖原水解为麦芽糖[36]。

另外，值得一提的是，属于 α-淀粉酶家族的 TreY 的催化和底物结合位点与海藻糖合酶是一致的（如图 1），其催化机制与海藻糖合酶十分相似，同样需要两次取代反应完成底物 α-1,4-糖苷键的断裂和 α-1,1-糖苷键的生成。由于已经获得嗜酸热硫化叶菌（Sulfolobus acidocaldaricus）的 TreY 蛋白晶体结构[37]，目前对该酶的催化机制的研究已经比较透彻[38] 在 Glu255（质子供体）和 Asp228（亲核攻击）的共同作用下，位于-1 和 + 1 位的两个葡萄糖基之间的 α-1,4-糖苷键被切断，然后位于 + 1 位的葡萄糖分子随着酶构象的变化发生旋转，并与位于 − 1 位葡萄糖基形成 α-1,1-糖苷键，从而形成产物。这也从一个侧面证明了目前所推测的海藻糖合酶催化机制的正确性。

4　嗜热菌海藻糖合酶的结构特点

从表 1 中可以看出，来源于嗜热菌的海藻糖合酶具有较高的最适反应温度和很强的热稳定性，其蛋白的分子量也较其他细菌中的海藻糖合酶大很多。通过氨基酸序列的比对可以看出，来源于嗜热菌的海藻糖合酶比其他海藻糖合酶具有一个多余的 C 端结构域。Wang 等通过实验证明了这种 C 端结构域能够增加海藻糖合酶的热稳定性，并降低反应中副产物葡萄糖的生成[32]。通过对嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus*）海藻糖合酶的 C 端结构域缺失体酶活性质的研究，发现 C 端结构域的缺失不会影响酶的活性，但是酶的最适温度和热稳定性都有所降低。而将耐放射异球菌的海藻糖合酶与该 C 端结构域的融合表达后，酶的最适温度和稳定性都被显著提高了。此外，C 端结构域可以使酶的构象发生一定程度的变化，产生更为牢固紧密的构象，使得水分子难以进入活性中心，从而降低了副产物葡萄糖的生成。

本实验室克隆得到的海藻糖合酶来源于亚栖热菌属的嗜热菌，该酶由 962 个氨基酸组成，推测分子量为 110 kDa。序列分析显示，该酶同样具有 C 端结构域，将其缺失突变后，酶活几乎没有变化，但酶的最适反应温度由 55℃降低为 25℃，而在 50℃以上时酶会失活（数据尚未发表）。

由于具有很高的热稳定性，嗜热菌的海藻糖合酶在海藻糖的工业生产中具有更为重要的意义。从表 1 中可以看出，海藻糖合酶在较低的温度下，将麦芽糖转化为海藻糖的转化率才能达到最大。来源于栖热菌属的海藻糖合酶在 30℃ ~ 40℃时的转化率

最大,这使得海藻糖的酶法生产中的温度更易于控制,可以在一定程度上降低成本。

5 海藻糖合酶在生物体内的作用

通过对已经纯化或异源表达的海藻糖合酶(表1)特性的研究,发现在细胞体外海藻糖合酶的可逆反应是向着有利于生成海藻糖的方向进行的,那么细胞体内的情况是否也如此呢?

随着对海藻糖合成途径研究的深入,发现某些细菌体内具有两条或3条海藻糖合成途径。如嗜热栖热菌[39]、费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)[40]具有TPS/TPP和TreS两条途径,而类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)[41]、谷氨酸棒杆菌[42]、结核分枝杆菌[24]、游动放线菌[43](*Actinoplanes* sp.)和大多数根瘤菌[44]具有TPS/TPP、TreY/TreZ和TreS 3条途径。这些细菌能够在环境压力下积累海藻糖,保护细胞大分子不被破坏;而在环境压力结束后,其胞内积累的海藻糖会被迅速分解,从而恢复正常生长。

Cardoso等详细研究了费氏丙酸杆菌的两条海藻糖合成途径的生物学功能[40]。通过Western blotting实验发现,在高渗、超氧和酸性等外界环境压力下,TPS和TPP蛋白的合成水平明显提高,而TreS蛋白的合成量没有变化或略有降低。这说明在外界压力下,海藻糖主要是由TPS/TPP途径合成,而TreS的作用是将细胞内积累的大量的海藻糖转化为麦芽糖。在麦芽糖葡糖基转移酶的作用下,麦芽糖被合成为麦芽寡糖基多糖,并释放出葡萄糖。葡萄糖被磷酸化后进入糖酵解途径。

Makihara等通过构建类球红细菌不同海藻糖合成酶基因的缺失突变体,研究了每个途径在海藻糖代谢过程中的作用[41]。Δ*tps*和Δ*treY*突变体在高盐浓度(3% NaCl)下的海藻糖合成能力都有降低,而Δ*tps*突变体海藻糖合成能力的降低更为显著。这说明在高渗环境中,海藻糖主要是由TPS/TPP途径合成,而TreY/TreZ途径也有一定的辅助作用。海藻糖的合成是由两条途径协同完成的。但是,Δ*tps*Δ*treY*的双突变体不能合成海藻糖,这说明高渗环境中海藻糖的合成并不是由TreS途径完成的;而且缺失了treS基因的突变体(Δ*treS*,Δ*tps*Δ*treS*,Δ*treY*Δ*treS*)胞内的海藻糖含量比野生型菌株略高,从而推测该菌也是通过TreS途径降解海藻糖的。在移除高渗的环境压力后,ΔtreS突变菌株的胞内仍然有大量的海藻糖,并表现出明显的生长缓慢现象。这些结果说明大量的海藻糖对细菌的生长有一定的毒性作用,因此海藻糖的分解代谢对细胞的生长具有非常重要的作用,而TreS的重要功能就是通过将海藻糖转化为麦芽糖而使胞内的海藻糖迅速消失。同样,谷氨酸棒杆菌在高渗环境中,也能在胞内积累大量的海藻糖,只不过其海藻糖的合成是由TreY/TreZ途径完成的,并不需要TPS/TPP途径;而TreS的作用是代替海藻糖酶分解胞内积累的海藻糖[42]。

由此我们可以得出结论,在多条海藻糖合成途径共存的细菌中,海藻糖的合成过程主要是由TPS/TPP途径或TreY/TreZ途径或两条途径协同作用完成的。而这些细菌都缺少海藻糖酶,TreS途径的作用就是环境压力消失后,将胞内积累的大量海藻糖转化为麦芽糖,从而降低海藻糖对细胞生长的影响。

6 展望

由于目前尚未得到海藻糖合酶的蛋白晶体结构,对其催化机制的研究只限于理论推测水平。通过氨基酸序列的比对分析以及定点突变技术,仅仅预测出其酶活中心具有催化功能的相应氨基酸,但对其底物识别以及结合的具体机制尚不是很清楚。随着蛋白结晶技术的发展,相信在不久的将来我们会得到海藻糖合酶的蛋白晶体结构,并对其催化机制作出更深入的解释。另外,海藻糖合酶已经被广泛应用于海藻糖的工业生产,并大大降低了海藻糖生产的成本,但如何进一步提高海藻糖合酶的酶活力和转化率仍然是目前研究的热点。利用生物信息学的知识,通过饱和突变或定点突变技术对海藻糖合酶基因进行遗传学改造,改变酶活性中心附近以及与热稳定性相关的氨基酸序列,极有可能获得酶活更高和稳定性更高的海藻糖合酶。本实验室目前正在进行这方面的研究。

参考文献

[1] Elbein AD, Pan YT, Pastuazak I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17R-27R.

[2] Thevelein JM. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*, 1984, 48(1): 42-59.

[3] Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science*, 1984, 223: 701-703.

[4] Muller J, Wiemken A, Aeschbacher R. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science*, 1999, 147: 37-47.

[5] Lederer E. Cord factor and related trehalose esters. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1976, 16(2): 92-106.

[6] Schiraldi C, Di Lernia I, De Rose M. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(10): 420-425.

[7] Satpathya GR, Töröka Z, Balia R, et al. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. *Cryobiology*, 2004, 49(2): 123-136.

[8] Reinders A, Bürckert N, Hohmamm S, et al. Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in Saccharomyces cerevisiae and their function during heat shock. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(2): 687-695.

[9] Giæver HM, Styrvold OB, Kaasen I, et al. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6): 2841-2849.

[10] Siebers B, Tjaden B, Michalke K, et al. Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of Thermoproteus tenax by use of genomic and biochemical data. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(7): 2179-2194.

[11] Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6: 109.

[12] Carpinelli J, Krämer R, Agosin E. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 72(3): 1949-1955.

[13] Maruta K, Hattori K, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1289(1): 10-13.

[14] Maruta K, Hattori K, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(4): 717-720.

[15] Maruta K, Hattori K, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1291(3): 177-181.

[16] Kouril T, Zaparty M, Marrero J, et al. A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*: the unidirectional TreT pathway. *Archives of Microbiology*, 2008, 190(3): 355-369.

[17] Qu Q, Lee SJ, Boos W. TreT, a Novel Glycosyltransferring Synthase of the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus litoralis. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(46): 47890-47897.

[18] Ryu SI, Park CS, Cha J, et al. A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: molecular cloning and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 329(2): 429-436.

[19] Eis C, Watkins M, Prohaska T, et al. Fungal trehalose phosphorylase: kinetic mechanism, pH-dependence of the reaction and some structural properties of the enzyme from *Schizophyllum commune*. *Biochemical Journal*, 2001, 356(3): 757-767.

[20] Wannet WJ, Op den Camp HJ, Wisselink HW, et al. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1425(1): 177-188.

[21] Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(4): 640-644.

[22] Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1290(1): 1-3.

[23] Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from Thermus aquaticus ATCC 33923. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1334(1): 28-32.

[24] De Smet KA, Weston A, Brown IN, et al. Three pathways for trehalose biosynthesis in *mycobacteria*. *Microbiology*, 2000, 146(1): 199-208.

[25] Pan YT, Koroth Edavana V, Jourdian WJ, et al. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression and properties of the enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(21): 4259-4269.

[26] Lee JH, Lee KH, Kim CG, et al. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in Escherichia coli for the production of trehalose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2): 213-219.

[27] Chen YS, Lee GC, Shaw JF. Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(19): 7098-8104.

[28] Wei YT, Zhu QX, Luo ZF, et al. Cloning, expression and identification of a new trehalose synthase gene from *Thermobifida fusca* genome. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(7): 477-484.

[29] **韦宇拓，黄日波，蒙健宗，等．谷氨酸棒杆菌海藻糖合成酶基因及海藻糖制造方法．中国：** 200410013006.9. 2005.

[30] **韦宇拓，黄日波，蒙健宗，等．耐放射性异常球菌海藻糖合成酶基因及海藻糖制造方法．中国：** 200410013008.8. 2005.

[31] Zhu Y, Zhang J, Wei D, et al. Isolation and identification of a thermophilic strain producing trehalose synthase from geothermal water in China. *Bioscience Biotechnology and*

Biochemistry, 2008, 72(8):2019 – 2024.

[32] Wang JH, Tsai MY, Chen JJ, et al. Role of the C – terminal domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(9):3435 – 3443.

[33] Nishimoto T, Nakada T, Chaen H, et al. Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(5):835 – 839.

[34] Koh S, Kim J, Shin HJ, et al. Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus GK*24 trehalose synthase. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(12):1339 – 1343.

[35] MacGregor EA, Janecek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α – amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1546(1):1 – 20.

[36] Pan YT, Carroll JD, Asano N, et al. Trehalose synthase converts glycogen to trehalose. *FEBS Journal*, 2008, 275 (13):3408 – 3420.

[37] Kobayashi M, Kubota M, Matsuura Y. Refined structure and functional implications of trehalose synthase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Applied Glycoscience*, 2003, 50(1):1 – 8.

[38] Kato M, Takehara K, Kettoku M, et al. Subsite structure and catalytic mechanism of a new glycosyltrehalose producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum *sulfolobus solfataricus* KM1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(2):319 – 326.

[39] Silva Z, Alarico S, Nobre A, et al. Osmotic adaptation of Thermus thermophilus RQ – 1: a lesson from a mutant deficient in the synthesis of trehalose. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(20):5943 – 5952.

[40] Cardoso FS, Castro RF, Borges N, et al. Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology*, 2007, 153(1):270 – 280.

[41] Makihara F, Tsuzuki M, Sato K, et al. Role of trehalose synthesis pathways in salt tolerance mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *Archives of Microbiology*, 2005, 184(1):56 – 65.

[42] Wolf A, Krämer R, Morbach S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology*, 2003, 49 (4): 1119 – 1134.

[43] Lee JS, Hai T, Pape H, et al. Three trehalose synthetic pathways in the acarbose – producing *Actinoplanes* sp. SN223/29 and evidence for the TreY role in biosynthesis of component C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(5):767 – 778.

[44] McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, et al. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Applied and Environment Microbiology*, 2007, 73(12):3984 – 3992.

Progress on molecular biology of trehalose synthase——A review

Yueming Zhu[1], Jun Zhang[2], Laijun Xing[1], Mingchun Li[1,*]

([1] Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

([2] Tianjin Institute of Forest and Pomology, Tianjin 300112, China)

Abstract:Trehalose synthase inverts maltose into trehalose, and plays a very important role in trehalose industrial production. Here we reviewed the recent progress on studies of molecular biology including the cloning of trehalose synthase gene, gene engineering application, structure and catalytic mechanism and the role of the enzyme in vivo.

Keywords: trehalose; trehalose synthase; α-amylase family; catalytic mechanism; C-terminal domain; metabolic pathway

(本文责编 :张晓丽)

Supported by the Tianjin Natural Science Foundation (06YFJZJC02100)

* Corresponding author. Tel: + 86-22-23508506; Fax: + 86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

Received:24 September 2008/ Revised:27 October 2008