

Koho JP 1983, 58 47, 689.

Tokkyo Koho JP 1985, 60 156, 385.

[30] Arai T, Tamura S, Katsumata H, et al. Jpn Kokai

# 海藻糖的生物合成和相关酶的特性

张红缨 刘洋 张今

(吉林大学酶工程国家重点实验室 长春 130023)

关键词 海藻糖, 葡萄糖-6-磷酸, 海藻糖-6-磷酸

分类号 Q93-936

海藻糖<sup>[1]</sup> (trehalose)是一种由两个葡萄糖分子通过 $\alpha, \alpha$ -1,1糖苷键连接成的非还原性二糖。海藻糖广泛分布于微生物、植物、动物体内,其含量随生物所处生活环境而变化,是一种典型的代谢应激物。

海藻糖不仅可以作为碳源和能源,而且还具有保存生物活力的特殊功能,使生物在许多不利情况(高温、脱水、冷冻等)下,维持细胞膜和蛋白质的稳定,由此可以使食品保鲜,可防止由白蛋白导致的疫苗血源污染,若取代白蛋白,应用于各类疫苗、诊断用品、各种酶、蛋白质、细胞因子、干扰素等,于室温保存数年不失效,并且其价格低廉,故具有应用于食品、化妆品和医药工业的巨大潜力。因此作为天然生物保护剂<sup>[7]</sup>,它的应用可能导致生物制品业的重大革新(解决冷链问题),将会带来巨大的经济效益和社会效益。目前,世界各国对此极为关注和重视,对海藻糖的理论研究和应用开发都取得了可喜的进展。

## 1 海藻糖-6-磷酸合酶和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶<sup>[3]</sup>

大肠杆菌和酵母菌可利用海藻糖-6-磷酸合酶(OtsA, trehalose-6-phosphate synthase, EC 2.4.1.15)和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(OtsB, trehalose-6-phosphate phosphatase, EC 3.1.3.12)合成海藻糖。

大肠杆菌中此二酶(OtsA, OtsB)的基因(*ots*)已被克隆<sup>[1]</sup>,它们构成一个操纵子*otsBA*,二基因重叠23bp,并由*rpoS*基因编码的 $\sigma^{38}$ 因子激活而启动<sup>[4]</sup>。OtsB和OtsA的分子量分别为29.1ku和53.6ku,它们与酵母TPS蛋白具有较多的同源性<sup>[5]</sup>。

酵母菌中此二酶是由三个肽链组成的复合体,相

应的基因已被克隆<sup>[6]</sup>。TPS1基因编码56ku的海藻糖-6-磷酸合酶,其参与葡萄糖调节、海藻糖的代谢及100ku蛋白的折叠,TPS2基因编码100ku的海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶。TPS3基因编码130ku蛋白,该亚基似乎涉及复合体的聚集,三个蛋白基因都含有GAANNITC和C<sub>4</sub>T热休克单元<sup>[7]</sup>,这是热诱导提高酶活性的遗传基础。这三个基因的表达均受葡萄糖的阻遏。

## 2 海藻糖酶

海藻糖酶(trehalase, EC 3.2.1.28)也存在于各种生物。从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中曾得到两种海藻糖酶<sup>[8]</sup>,"中性海藻糖酶"(存在于胞质)和"酸性海藻糖酶"(存在于空泡中)。前者可被cAMP辅助的磷酸化而激活,最适pH为7.0,后者为4.5。

海藻糖酶是水解酶,水解海藻糖成两分子葡萄糖。不同来源(酵母菌、大肠杆菌和兔小肠)的该酶顺序比较说明,其中存在四个高度保守区(多于11个氨基酸残基)<sup>[9]</sup>。兔小肠海藻糖酶的动力学和抑制实验表明,在该酶的不同区域,存在三个活性部位基团,其中位于第二个结构域的His可能涉及催化反应。

中性海藻糖酶的基因(NTH1)已被克隆<sup>[10]</sup>,在肽链的N端区存在两个可能的磷酸化位点:Arg<sup>17</sup>ArgLysSer<sup>20</sup>(Ser<sup>20</sup>被磷酸化)和Arg<sup>80</sup>ArgGlySer<sup>83</sup>(Ser<sup>83</sup>被磷酸化),其磷酸化参与调节细胞响应不同环境下的海藻糖浓度。

## 3 海藻糖合酶

在脂肪杆菌(*Pimelobacter* sp.) R48<sup>[11]</sup>和恶臭假单

1997-06-02收稿

胞菌 *Pseudomonas putida* H262<sup>[12]</sup> 以及一些嗜热菌 (*Thermus*) 菌株中, 发现了一个新酶——海藻糖合酶 (trehalose synthase)。它能将麦芽糖转化成海藻糖, 但不作用于葡萄糖、麦芽三、四、五糖、麦芽寡糖、新海藻糖、曲二糖、黑曲霉二糖、异麦芽糖、海藻寡糖、蔗糖、松二糖、异麦芽寡糖和乳糖。水生嗜热菌 (*Thermus aquaticus*) ATCC33923<sup>[13]</sup> 和嗜中温脂肪杆菌 R48 中的这个酶的性质有所不同 (表 1)。

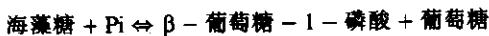
表1 脂肪杆菌R48和嗜热菌ATCC33923的  
海藻糖合酶性质

	ATCC33923	R48
分子量(u)	105,000	62,000
pI	4.3	4.6
最适温度(℃)	65	20
最适pH	6.5	7.5
pH稳定性/80℃	5.5~9.5	6.0~9.0
热稳定性(℃)	<80	<30
抑制剂	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> ,	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> ,
产率	Zn <sup>2+</sup> , Tris 80%~82% (30~40℃)	Zn <sup>2+</sup> , Tris 81.8%(5℃), 80.9%(15℃), 76.7%(25℃)

表 1 结果表明, 该酶还具有微弱的水解作用, 其水解活性随温度升高而加强, 致使海藻糖产率下降, 但较高的催化产率说明, 反应倾向于海藻糖的合成。它具有较严格的底物专一性, 只作用于麦芽糖。麦芽糖价格便宜, 酶反应简单, 使用耐热酶可避免工业生产中杂菌的污染。这是适于工业生产的理想途径。

#### 4 海藻糖磷酸化酶

海藻糖磷酸化酶 (trehalose phosphorylase, EC 2.4.1.64)<sup>[14]</sup> 存在于 *Euglena gracilis*, *Flammulina velutipes*, *Bradyrhizobium japonicum* 中, 催化下列可逆反应:



来自 *Pichia* 酵母<sup>[15]</sup> 和 *Plesimonas* 中的这种酶, 最适 pH 分别为 6.3 和 7.0, 后者分解反应的最适温度是 50℃, 合成反应的最适温度为 50~55℃, 来自 *Micrococcus varians* 39 的该酶 (M. W. 105ku) 对底物海藻糖、磷酸、葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖的  $K_m$  分别为 10、3.1、38 和 23mM,  $k_{cat}$  值对正逆反应分别是 200s<sup>-1</sup> 和 660s<sup>-1</sup>。比较海藻糖酶和海藻糖磷酸化酶的  $K_m$  和  $K_i$ , 可以发现海藻糖酶对海藻糖和抑制剂具有更高的亲和性, 说明两酶可能具有不同的底物结合位点和作用

机制。在生理条件下, 上述反应是双向而行, 从其  $K_m$  和  $k_{cat}$  很难断定其生理作用, 其  $\Delta G'$  (4.4kJ/mol, pH7.0, 25℃) 说明, 此平衡倾向于海藻糖合成, 然而这还要决定于生理条件下的底物浓度。

#### 5 糖基转移酶和淀粉酶

1993年, 在日本群馬县酸性温泉中分离到一种嗜超高温古细菌——硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) KM1<sup>[16]</sup>。该菌可利用淀粉产生海藻糖。从该菌分得一种新型葡糖基转移酶 (1,4- $\alpha$ -葡聚糖 1- $\alpha$ -葡糖基转移酶) 和一种淀粉酶。两种酶 (M. W. 76ku) 和 61ku) 最适 pH 为 5.0~6.0 和 4.5~5.5, 最适温度为 70~80℃ 和 70~85℃。在 85℃ 保温 6h, 活力分别保持 91% 和 100%。两个酶联合作用从麦芽寡糖和淀粉合成海藻糖。这是一种酶法从淀粉合成海藻糖的新途径, 从麦芽寡糖 (DP3-7) 合成海藻糖的产率是 36%~67%。以淀粉为底物时, 可达 83.5%。

已知有四类催化淀粉转糖基作用的酶, 视形成  $\alpha$ -1,2 键、 $\alpha$ -1,3 键、 $\alpha$ -1,4 键或  $\alpha$ -1,6 键而定, 而催化合成含  $\alpha$ -1,1 键的寡糖 (包括海藻糖) 的酶尚属首例。该酶的作用机制是将麦芽寡糖水解产生的葡糖基转移到麦芽寡糖还原末端葡萄糖的 C1-OH 位, 产生带  $\alpha$ -1,1 键的葡糖基海藻糖。大于麦芽三糖 (DP3) 的寡糖可通过转糖基作用转变成相应的葡糖基海藻糖。反应是一种分子内的转糖基作用。

KM1 的淀粉酶是内切型淀粉酶, 很像  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[17]</sup>, 但具有完全不同于其它  $\alpha$ -淀粉酶的底物特异性和水解方式。该酶只水解各种葡糖基海藻糖中与海藻糖相邻的  $\alpha$ -1,4-糖苷键, 产生  $\alpha$ -海藻糖和聚合单位少了两个葡糖基的麦芽寡糖。这类酶系统在硫化叶菌科, 如硫化叶菌属中分布相当普遍。

#### 6 麦芽寡糖基海藻糖合酶和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶<sup>[18]</sup>

麦芽寡糖基海藻糖合酶 (maltooligosyltrehalose synthase, TreY) 和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶 (maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, TreZ) 是在节杆菌 *Arthrobacter* sp. Q36 中发现的两个新酶。也存在于 *Brevibacterium helvolum*, *Micrococcus roseus*, *Sulfolobus acidocaldarium* 等菌中。TreY 催化麦芽糊精转变成麦芽寡糖基海藻糖, 这是一个分子内转糖基化作用, 形成  $\alpha$ -1,1-糖苷键。TreZ 水解上述反应的产

物,断裂麦芽寡糖基和海藻糖之间的 $\alpha$ -1,4-糖苷键。此二酶的基因已被克隆在pBRT4质粒上并测序,从而推演出其氨基酸顺序。TreY(85,3ku)含775个氨基酸残基,TreZ(65,7ku)含598个氨基酸残基,两个酶的基因(*treY*, *treZ*)构成一个操纵子(*treYZ*),并有一个核苷酸重叠。目前关于TreY和TreZ的专一性识别和作用机制还不清楚。

综上所述,自然界中存在多种海藻糖合成途径。在一种生物中是否同时存在一种以上的途径尚未确定,但是从微生物处于逆境(高温、高渗、冷冻、干燥等)时,体内海藻糖含量迅速上升的情况分析,似乎有这种可能性。已确定的海藻糖生物合成途径为海藻糖的应用提供了依据。荷兰植物生物技术公司利用大肠杆菌的海藻糖合酶基因导入甜菜、马铃薯中,在获得大量价廉的海藻糖同时,增强了植物的抗旱性和耐寒性。用生物工程生产海藻糖将会展现诱人的前景。其中利用微生物水解淀粉和麦芽糖生产海藻糖,可能是短期见效的可行途径。

### 参 考 文 献

- [1] Elbein A D. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1974, 30:227
- [2] Van Laere A. *FEMS Microbiol Rev*. 1989, 63:201.
- [3] Kaasen I, Fálkenberg P, Styrvold O B *et al.* *J Bacteriol*, 1992, 174:889.
- [4] Aronis R H, Klein W, Lange R *et al.* *J Bacteriol*, 1991, 173:7918.
- [5] Kaasen I, McDougall J, Strom A R. *Gene*, 1994, 145:9.
- [6] Vuorio O E, Kalkkinen N, Londesborough J. *Eur J Biochem*, 1993, 216:849.
- [7] De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J *et al.* *Eur J Biochem*, 1994, 219:179.
- [8] Yokoigawa K, Murakami Y, Kawai H. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59:2143.
- [9] Su Z H, Sato Y, Yamamshita O. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1173:217.
- [10] Kopp M, Nwaka S, Holzer H. *Gene*, 1994, 150:403
- [11] Nishimoto T, Nakano M, Nakada T *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60:640.
- [12] Nishimoto T, Nakano M, Ikengami S *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59:2189.
- [13] Nishimoto T, Nakano M, Chaen H *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60:835.
- [14] Kizawa H, Miyagawa K I, Sugiyama Y. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59:1908.
- [15] Schick I, Haltrich D, Kulbe K D. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43:1008.
- [16] Kato M, Miura Y, Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60:546.
- [17] Kato M, Miura Y, Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60:921.
- [18] Maruta K, Hattori K *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1289:10.