

• 工业生物技术 •

## 杓兰果胶杆菌海藻糖酶的克隆表达及应用

高涵<sup>1,2</sup>, 龚劲松<sup>1,2</sup>, 汪子凯<sup>1,2</sup>, 苏畅<sup>1,2</sup>, 许正宏<sup>3</sup>, 史劲松<sup>2</sup>

1 江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

高涵, 龚劲松, 汪子凯, 苏畅, 许正宏, 史劲松. 杓兰果胶杆菌海藻糖酶的克隆表达及应用. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4658-4668.

GAO H, GONG JS, WANG ZK, SU C, XU ZH, SHI JS. Cloning, expression and properties of trehalase from *Pectobacterium cypripedii*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4658-4668.

**摘 要:** 海藻糖酶在工业发酵和食品医药等领域应用广泛, 我国缺乏性能优良工业品种的海藻糖酶, 同时应用研究领域还不够深入。本研究从自然界筛选获得一株产酸性海藻糖酶的杓兰果胶杆菌 (*Pectobacterium cypripedii*), 克隆获得其海藻糖酶基因 *PCTre*, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 体系中实现了重组表达, 在 5 L 发酵罐上 28 h 产酶达到 4 130 U/mL。酶学性质研究显示, *PCTre* 能特异性水解海藻糖, 最适反应温度和 pH 分别是 35 °C 和 5.5, 在 pH 4.0、4.5、5.0 处理 8 h 后残余酶活仍超过 80%, 表现出良好的耐酸性。同时该酶还显示出优良的有机溶剂耐受性, 在 20% (V/V) 乙醇溶液中处理 24 h 仍能保留 60% 的酶活。进一步在含有 20% (V/V) 乙醇和 7.5% 海藻糖的模拟发酵体系中, 当添加 500 U/L *PCTre*, 可在 16 h 内完全水解海藻糖, 具有良好的应用于工业乙醇发酵的潜力。

**关键词:** 海藻糖酶; 海藻糖; 杓兰果胶杆菌; 乙醇耐受性

Received: March 4, 2022; Accepted: July 26, 2022; Published online: September 1, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21978116)

Corresponding author: SHI Jinsong. E-mail: shijs@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (21978116)

# Cloning, expression and properties of trehalase from *Pectobacterium cypripedii*

GAO Han<sup>1,2</sup>, GONG Jinsong<sup>1,2</sup>, WANG Zikai<sup>1,2</sup>, SU Chang<sup>1,2</sup>, XU Zhenghong<sup>3</sup>, SHI Jinsong<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Trehalase is widely used in industrial fermentation, food, medicine and other fields. There is a lack of industrial varieties of trehalase with excellent performance in China. Moreover, the applied research on trehalase was not well conducted. In this study, a strain of *Pectobacterium cypripedii* was screened from nature, and the gene *PCTre* encoding an acidic trehalase was cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The highest enzyme activity reached 4130 U/mL after fermenting in a 5 L fermenter for 28 h. The enzymatic properties study showed that PCTre hydrolyzed trehalose specifically. The optimum pH and temperature were 5.5 and 35 °C, respectively. 80% of the enzyme activity was retained after being treated at pH 4.0, 4.5, and 5.0 for 8 h, showing good acid tolerance. Moreover, it has good tolerance to organic solvents, 60% enzyme activity was retained after being treated with 20% (V/V) ethanol solution for 24 h. Furthermore, trehalose could be completely hydrolyzed within 16 h in a simulated fermentation system containing 20% (V/V) ethanol and 7.5% trehalose, with 500 U/L PCTre added. This indicated a good application potential for industrial ethanol fermentation.

**Keywords:** trehalase; trehalose; *Pectobacterium cypripedii*; ethanol tolerance

海藻糖是由两个葡萄糖分子以  $\alpha, \alpha$ -1-1 糖苷键构成的非还原性糖, 性质稳定。海藻糖酶 (trehalase) 可将其水解为葡萄糖, 在食品医药、发酵工业等领域应用广泛<sup>[1-3]</sup>。酵母具有利用糖质原料合成海藻糖的能力, 在高浓度糖质底物发酵体系中酵母甚至能够合成 4% 以上的海藻糖, 成为发酵液中残糖的主要部分, 导致原料利用率下降。为此, 杜邦公司在 2016 年推出 Synerxia 发酵技术, 其核心创新是在酶制剂中加入了海藻糖酶, 宣称可降低糖耗并增产乙醇 2%。诺维信公司也在 2017 年推出了含海藻糖酶的全新淀粉酶产品, 其目标是降低二糖残留值 70%, 此举进一步推动了海藻糖酶的应用。目前, 在超高浓度 (very high gravity, VHG) 乙

醇发酵技术中, 糖质/淀粉质原料的添加量高达 27%, 产物乙醇的最终浓度达到 15%–18%<sup>[4]</sup>, 高浓度乙醇和低 pH 环境对海藻糖酶的酶学性能提出了更高的要求。近年来国内外学者已寻找到一些酸性海藻糖酶基因<sup>[5-7]</sup>, 但仍需在新酶基因筛选、酶工程改造以及应用的稳定性和耐受性等方面加强研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

克隆菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、表达质粒 pET-3b、pET-28a、pMA5 和表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Rosetta

(DE3)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 均为实验室保藏。

### 1.1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10 (固体平板加入琼脂粉 20)。

Terrific broth (TB) 培养基 (g/L): 蛋白胨 12, 酵母提取物 24, 甘油 5,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  12.54,  $KH_2PO_4$  2.31。

筛选培养基 (g/L): 海藻糖 15, 胰蛋白胨 5, KCl 1,  $KH_2PO_4$  1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5,  $CaCO_3$  1, pH 7.0; 固体培养基在其中加入琼脂 20 g/L。

### 1.1.3 主要仪器和试剂

一步重组克隆试剂盒 ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit 购自 Vazyme 公司, 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。高效液相色谱 1220 Infinity II 购自 Agilent 公司, 液相色谱柱 Dikma CarboPac  $Ca^{2+}$  (300 mm×8.8 mm, 6  $\mu m$ ) 购自 Dikmatech 公司。酵母提取物分别购自安琪酵母股份有限公司、国药集团化学试剂有限公司、杭州百思生物技术有限公司、上海麦克林生化科技有限公司、赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司、乐斯福 (明光) 有限公司。

## 1.2 野生菌筛选

在江苏省无锡市长广溪湿地公园选取采样点, 提前 10 d 内采用海藻糖驯化 2 次。将采集的土壤样品悬液培养, 取上清进行筛选。

挑选平板菌株分别接种于液体筛选培养基培养 36 h, 通过测定海藻糖酶活筛选产酶菌株。提取野生菌基因组, 以通用引物 27F 和 1492r (表 1) 扩增 16S rDNA 并测序, 与 GenBank 中已有的序列比对, 进行菌种鉴定。

## 1.3 海藻糖酶基因克隆和序列分析

从 NCBI 中获取菌株的基因组信息, 经分析后设计引物 F1 和 R1, 从野生菌 A4 扩增出编码海藻糖酶的基因 *PCTre*。回收扩增产物, 同时线性化 pET-3b、pET-28a、pMA5 质粒, 并用一步重组克隆试剂盒将 PCR 扩增产物和线性化质粒连接, 转化到 *E. coli* JM109 中, 涂布于带有 Amp 抗性的 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 分别获得海藻糖酶表达载体 pET3b-*PCTre*、pET28a-*PCTre*、pMA5-*PCTre*, 取单菌落进行菌落 PCR 鉴定并进行 DNA 测序验证。

*PCTre* 特性分析、序列及结构分析使用的数据库或软件主要包括: ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、PredictProtein (<https://open.predictprotein.org/>)、ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)。

## 1.4 海藻糖酶的异源表达与纯化

将海藻糖酶表达载体 pET3b-*PCTre* 和 pET28a-*PCTre* 分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* Rosetta(DE3) 中, 表达载体 pMA5-*PCTre* 转入 *B. subtilis* WB600 中, 挑取单菌落于 10 mL LB 培养基中培养, 以 2% 的接种量接种到 30 mL LB 培养基中, 37 °C 培养 36 h 进行组成型表

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20
1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	19
F1	TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG <u>ATT AAT ACT AAC CAC CAG CAA AAT AAT GT</u>	50
R1	GCT TTG TTA GCA GCC GGA TCC <u>TCA ATC CGC CAG CAA ATG C</u>	40

Homologous sequences are underlined.

达, 其中 pET-28a 载体需采取 20 °C IPTG 诱导 2–4 h。结束后, 离心收集菌体, 超声破碎, 取上清进行酶活测定和 SDS-PAGE 分析。将上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜, 镍柱纯化海藻糖酶蛋白。

## 1.5 酶学性质研究

### 1.5.1 酶活测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 比色法测定。参照文献[8], 待测酶液适当稀释后, 取 150  $\mu\text{L}$  进行测定, 37 °C 反应 15 min, 加入 DNS 试剂显色, 沸水浴终止反应, 冷却后使用酶标仪在 540 nm 处测量吸光值。

海藻糖酶酶活 (1 U) 定义为上述实验条件下, 1 mL 的酶液每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量, 测定均重复 3 次。

### 1.5.2 海藻糖酶底物特异性研究

分别以 10% 的蔗糖、麦芽糖、乳糖和海藻糖作为底物, 测定海藻糖酶对双糖的催化活性。

### 1.5.3 最适 pH 和 pH 稳定性测定

用不同 pH 的磷酸缓冲液代替去离子水稀释酶液, 测定酶的最适 pH; 将酶液置于不同 pH 的缓冲液中, 30 °C 处理 1 h, 测定酶活, 以不同 pH 条件下最初的酶活为参照, 绘制 pH 稳定性曲线。

### 1.5.4 最适温度和温度稳定性研究

改变酶活测定方法中的反应温度, 选取 25–70 °C 范围内的 10 个点分别测定酶活, 以最高酶活作为对照绘制酶的温度影响曲线; 选取不同的温度先孵育 1 h, 再进行酶活测定, 考察不同温度条件下稳定性。上述反应体系 pH 为 5.5, 其余条件均同 1.5.1 方法。

### 1.5.5 金属离子对酶活的影响

配制  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Li}^{+}$  等金属离子溶液, 分别配制最终浓度为 1、5、

10 mmol/L 反应体系, 检测不同金属离子对酶活的影响。

### 1.5.6 有机溶剂和表面活性剂对酶活的影响

分别配制甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、乙腈、丙酮溶液和吐温 40 (Tween-40)、吐温 80 (Tween-80)、曲拉通 100 (Tritonx-100)、曲拉通 114 (Tritonx-114)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、甘油、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 和二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液, 配制最终浓度为 1%、5%、10% 的反应体系, 考察上述试剂对酶活性的影响。

## 1.6 乙醇发酵模拟体系的应用评价

以含有 15%–20% 乙醇、15% 葡萄糖、10% 淀粉、5%–10% 海藻糖的 pH 4.0 溶液体系模拟 VHG 乙醇发酵体系<sup>[9]</sup>, 添加不同浓度的海藻糖酶 PCTre, 维持体系温度 30 °C, 考察体系中海藻糖的水解程度, 评估 PCTre 在乙醇工业发酵中的应用潜力。

## 1.7 水解酵母提取物中的海藻糖研究

取不同公司的酵母提取物配制成 5% 溶液, 加入 PCTre, 在 37 °C、pH 5.5 条件下水解 60 min, 测定海藻糖含量。确定酶解提取物最适宜的温度、pH、酵母提取物浓度、加酶量和水解时间。

## 1.8 发酵罐产酶

活化重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET3b-PCTre, 挑取单菌落接种到一级种子培养基中培养 12 h, 以 2% 的接种量接种到二级种子培养基中并培养 10–12 h, 再以 10% 的接种量接种 5 L 发酵罐 (采用 TB 培养基, 装液量为 3 L)。初始培养温度 37 °C、pH 7.2, 搅拌转速 300–600 r/min, 采取通气与搅拌联动控制, 溶氧水平不低于 30%。每隔 4 h 取样检测

菌浓度 ( $OD_{600}$ ) 和海藻糖酶酶活。发酵 8 h 后, 流加甘油进行补料发酵。发酵过程中流加氨水和磷酸, 控制 pH 为 7.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 产海藻糖酶的野生菌筛选

从土壤中分离出一株产海藻糖酶的野生菌 (编号为 A4), 其菌落呈乳白色小圆形, 边缘整齐, 无芽孢, 触酶检测阴性, 甲基红试验和伏普试验阳性, 可水解葡萄糖、蔗糖和淀粉, 不利用乳糖, 能利用柠檬酸盐。革兰氏染色阴性 (图 1A)。该菌株的 16S rDNA 序列长度为 1 408 bp, 经 BLAST 比对与 *Pectobacterium* 属 (GenBank 登录号: JF430157.1、HM013841.1 等) 的序列同源性大于 99%。结合形态特征和生理生化特性, 将其鉴定为杓兰果胶杆菌 (*Pectobacterium cypripedii*)。

### 2.2 海藻糖酶基因的克隆与序列分析

从 A4 基因组中扩增获得 *PCTre* 编码序列, 其序列全长为 1 659 bp, 共编码 552 个氨基酸, 含一段长度为 27 个氨基酸的信号肽 (1-27)。ExPASy 预测其分子量为 63 kDa, 等电点 pI 为 5.58。PCTre 与来自潘氏泛酸菌 (*Pantoea cypripedii*) 的海藻糖酶 TreF (GenBank 登录

号: MBP2194980.1) 的最大相似性只有 86.5%, 存在 70 个差异位点。

### 2.3 海藻糖酶 PCTre 的异源表达与纯化

不同的表达体系对 PCTre 的表达水平有较大的差异 (表 2), 其中 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*PCTre* 无特征蛋白, *E. coli* BL21/pET3b-*PCTre* 酶活最高, 达到 289 U/mL。SDS-PAGE 结果表明 PCTre 的蛋白大小为 63 kDa 左右, 与理论值一致。尽管 pET-3b 载体中表达的蛋白条带较浅 (图 2A), 但酶活很高, 高于 pMA5 和 pET-28a 载体表达水平 (图 2B、2C)。推测由于 pET-28a 是诱导型表达载体, 其表达速度过快影响了蛋白的正确折叠, 导致非活性表达。

通过镍柱亲和层析纯化获得了条带单一的目的蛋白 (图 2D), 蛋白比酶活为 1 251 U/mg。目前报道的重组海藻糖酶, 基本低于 1 000 U/mg<sup>[3,7,9]</sup>, 杓兰果胶杆菌海藻糖酶显示出良好的开发潜力。

### 2.4 海藻糖酶酶学性质分析

#### 2.4.1 酶的催化特性研究

动力学研究显示, 杓兰果胶杆菌海藻糖酶 PCTre 的  $K_m=0.12$  mmol/L,  $V_{max}=1.51$  mmol/min (图 3)。与其他海藻糖酶的动力学参数相比 (表 3), PCTre 具有良好的底物亲和力。

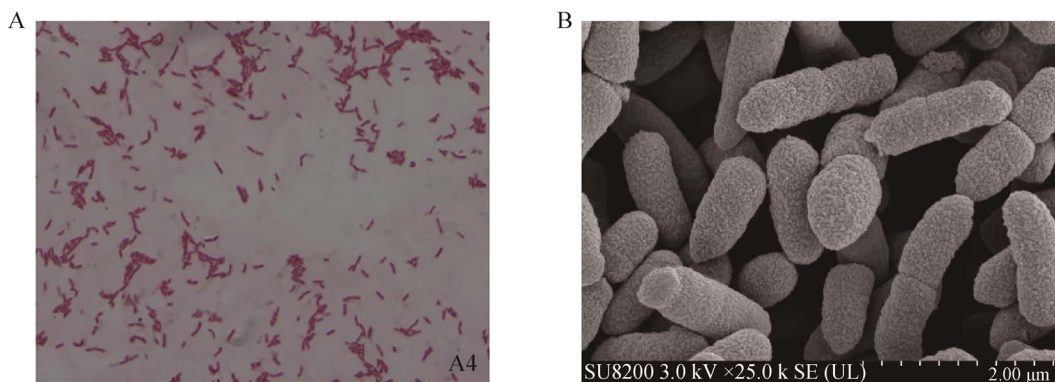


图 1 野生菌 A4 的革兰氏染色 (A) 和扫描电镜形态 (B)

Figure 1 Gram staining (A) and strain morphology under scanning electron microscope (B) of A4.

表 2 海藻糖酶基因的克隆与表达

Table 2 Trehalase gene cloning and expression

Expression system	Trehalase activity (U/mL)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET3b- <i>PCTre</i>	289
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28a- <i>PCTre</i>	—
<i>E. coli</i> Rosetta/pET3b- <i>PCTre</i>	22
<i>E. coli</i> Rosetta/pET28a- <i>PCTre</i>	19
<i>B. subtilis</i> WB600/pMA5- <i>PCTre</i>	18

—: not detected.

底物专一性实验表明, *PCTre* 具有高度底物特异性, 只作用于海藻糖, 可作为工具酶用于海藻糖的酶法检测, 这也是国际上海藻糖酶另一个研究热点<sup>[10]</sup>。

#### 2.4.2 最适 pH 和 pH 稳定性研究

海藻糖酶 *PCTre* 的最适 pH 为 5.5, 但在 pH 4.0–6.0 范围内相对酶活力有 80% 以上 (图 4A), 属于酸性海藻糖酶类型。将 *PCTre* 于 pH 4.0、

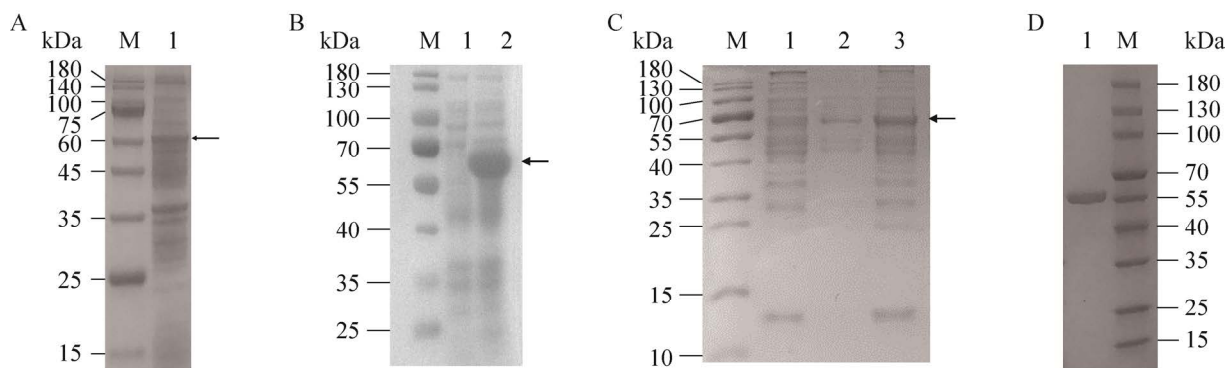
图 2 海藻糖酶 *PCTre* 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the trehalase *PCTre*. (A) M: marker; lane 1: crude extract of *E. coli* BL21(DE3)/pET3b-*PCTre*. (B) M: marker; lane 1: crude extract of blank control; lane 2: crude extract of *E. coli* Rosetta(DE3)/pET28a-*PCTre*. (C) M: marker; lane 1: crude extract of blank control; lane 2: fermentation supernatant of *B. subtilis* WB600/pMA5-*PCTre*; lane 3: crude extract of *B. subtilis* WB600/pMA5-*PCTre*. (D) M: marker; lane 1: purified *PCTre*.

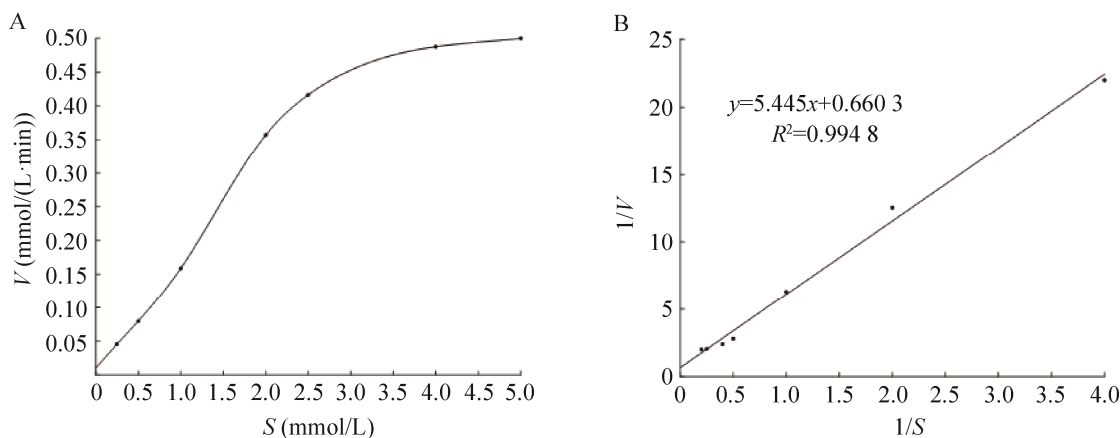
图 3 *PCTre* 动力学参数

Figure 3 The steady-state kinetic constants of *PCTre*. (A) Michaelis-Menten equation of *PCTre*. (B) Lineweaver-Burk of *PCTre*.

表 3 不同来源海藻糖酶的动力学参数比较

Table 3 Comparison of kinetic parameters of trehalase from different sources

Trehalase	Sources	pH	$K_m$ (mmol/L)	$V_{max}$ (mmol/mg)	References
ReATMLp	<i>Metarhizium Anisopliae</i>	6.0	2.60	0.31	[6]
TreZ	<i>Zunongwangia</i> sp.	6.0	0.99	0.17	[8]
treA	<i>Bispora</i> sp. MEY-1	4.0	0.67	119.00	[5]
treE	<i>Enterobacter cloacae</i> strain AR0002	6.0	3.33	0.45	[11]
PCTre	<i>P. cypripedii</i>	5.5	0.12	1.51	This study

4.5、5.0 酸性缓冲液中处理 8 h (图 4B), 剩余酶活超过 80%, 说明 PCTre 具有较高的 pH 稳定性。已报道的海藻糖酶大部分最适 pH 在中性或中性偏碱, 如来自昆虫的甜菜夜蛾海藻糖酶最适 pH 为 9.15<sup>[12]</sup>; 来源于微小杆菌属 (*Exiguobacterium* sp.) 的海藻糖酶最适 pH 为 8.0<sup>[13]</sup>。已发现的酸性海藻糖酶主要来自古菌或真菌, 如嗜酸古菌 (*Thermoplasma volcanium*)<sup>[14]</sup>、嗜酸热硫化叶菌 (*Sulfolobus*

*acidocaldarius*)<sup>[5]</sup>和真菌光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)<sup>[7]</sup>等能够产生一些酸性海藻糖酶, 但比酶活或重组表达后酶活均较低。

#### 2.4.3 最适温度和温度稳定性研究

PCTre 在 35 °C 条件下酶活最高 (图 5A), 在 25–50 °C 下相对酶活超过 60%; 在不同温度下保温 1 h, 将其分别置于 30 °C、35 °C、40 °C 条件下, PCTre 在 8 h 内仍保留 80% 以上的活力, 16 h 内保留 50% 以上的活力 (图 5C)。

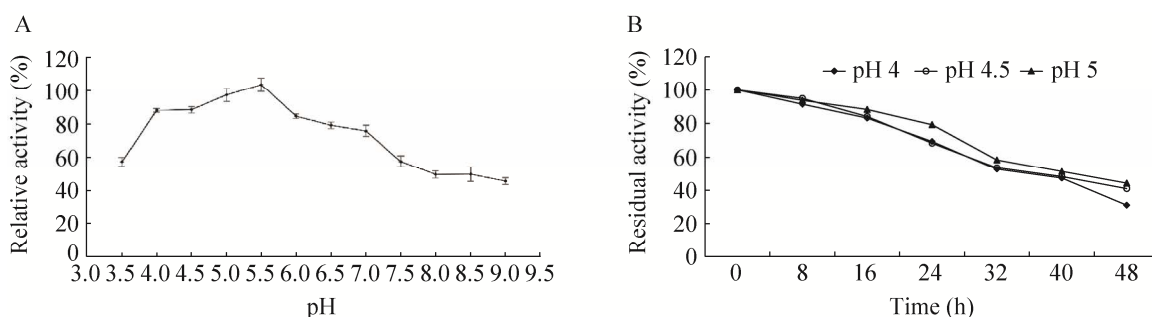


图 4 pH 对 PCTre 酶活力 (A) 及其稳定性 (B) 的影响

Figure 4 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of recombinant PCTre.

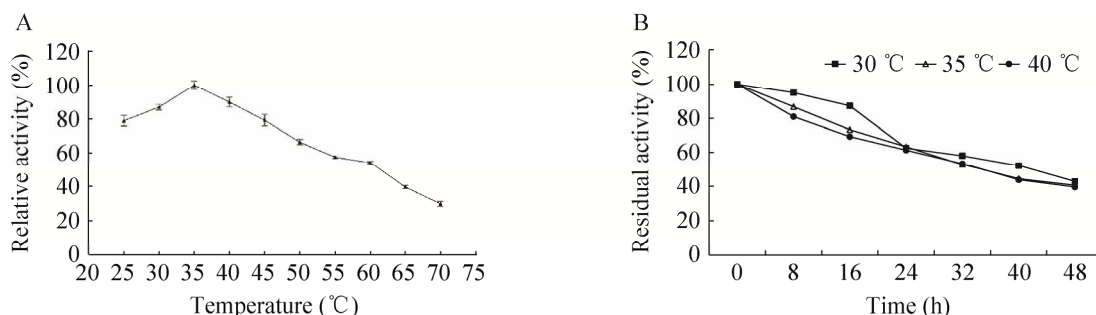


图 5 温度对 PCTre 酶活力 (A) 及其稳定性 (B) 的影响

Figure 5 Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of recombinant PCTre.



#### 2.4.4 金属离子对海藻糖酶活性的影响

不同浓度的  $\text{Mn}^{2+}$  离子对酶活均有较为明显的促进作用, 5 mmol/L 和 10 mmol/L 浓度的  $\text{Mn}^{2+}$  处理下相对酶活超过 240% (图 6), 与董良波研究的海藻糖酶 MthT 性质类似<sup>[3]</sup>; 此外,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  的对酶活具有较强的抑制作用。

#### 2.4.5 有机溶剂和表面活性剂对海藻糖酶活性的影响

PCTre 对有机溶剂具有良好的耐受性, 即使在 10% 的丙酮体系中, 其相对酶活也接近 60%; 在 10% 的乙醇体系中, 其相对酶活接近 90% (图 7A)。表面活性剂等试剂品种对酶的活

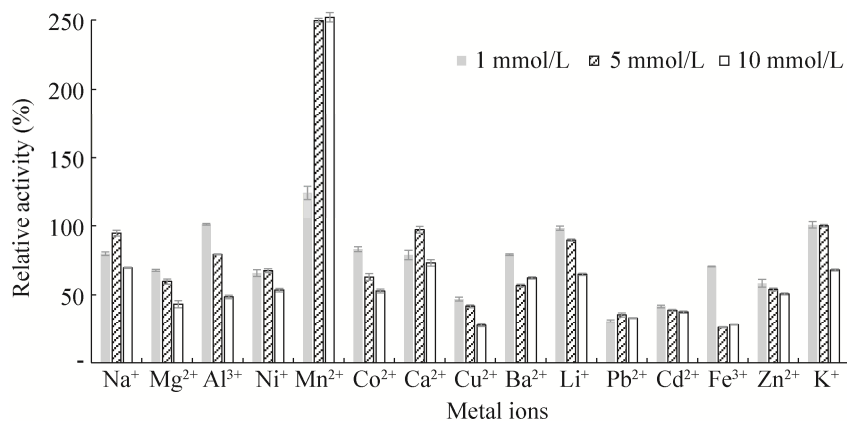


图 6 金属离子对 PCTre 酶活的影响

Figure 6 Effect of metal ions on the activity of recombinant PCTre.

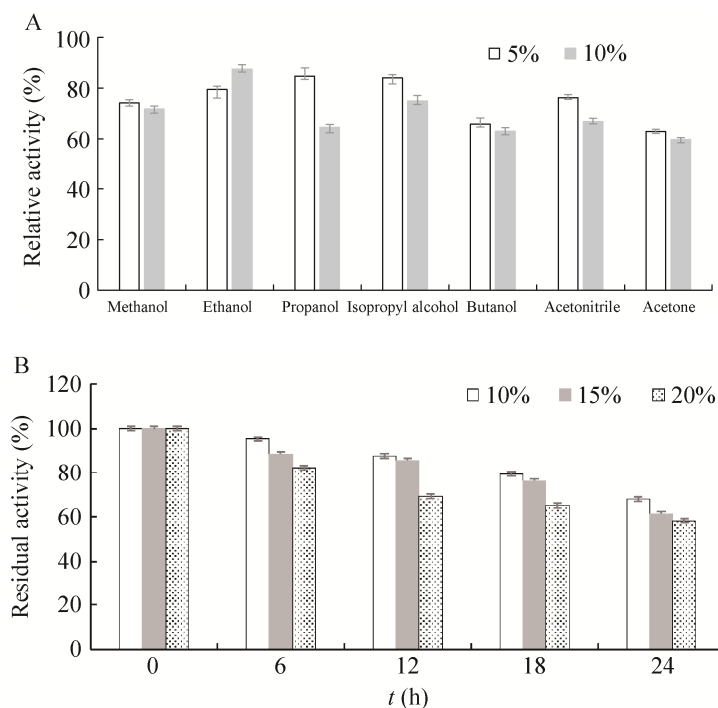


图 7 有机溶剂对 PCTre 酶活的影响 (A) 以及乙醇对 PCTre 酶活的影响 (B)

Figure 7 Effect of organic solvents (A) and ethanol (B) on the activity of recombinant PCTre.



性影响差异较大, 且对浓度比较敏感, 如曲拉通 X-114、吐温-40 对酶活均有显著提升, 0.5% 吐温-40 能使海藻糖酶相对酶活达到 178.7%。SDS、DTT、EDTA 等试剂在本实验浓度下对酶活均存在一定的抑制作用 (图 8)。

郭婷婷也探究了有机溶剂对座壳孢菌海藻糖酶的影响, 发现甲醇、戊醇、丙酮、二氧六环均能激活该酶<sup>[15]</sup>, 但海藻糖酶在高浓度乙醇体系下的耐受性研究尚未见报道。考虑到海藻糖酶的产业应用导向, 本文进一步在 10%、15%、20% 乙醇体系对 PCTre 活性进行评价 (图 7B)。研究显示, 12 h 后 PCTre 仍可保留 70% 以上的酶活, 24 h 后剩余酶活也超过了 60%。

PCTre 显示出十分良好的乙醇耐受性。通常, 亲水性溶剂容易破坏酶分子表面的水化层导致酶活性降低<sup>[16-17]</sup>, 而 PCTre 的耐受性可能与其蛋白表面上较多的极性氨基酸有关。初步

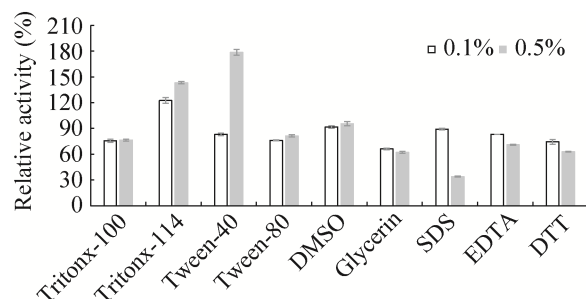


图 8 部分试剂对 PCTre 酶活的影响  
Figure 8 Effect of some reagents on the activity of recombinant PCTre.

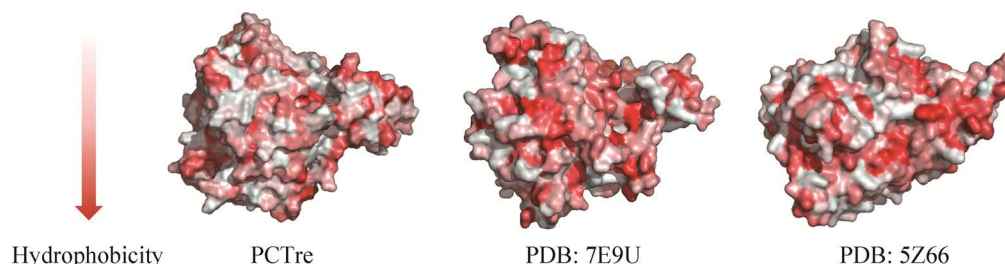


图 9 PCTre 表面氨基酸分析  
Figure 9 Surface amino acid analysis of PCTre.

结构分析表明, PCTre 中的表面极性氨基酸远多于其他海藻糖酶 (图 9), 互相形成了大量氢键有利于紧密结合水分子, 维持表面水化层, 这是保持良好稳定性的一个重要理论基础<sup>[18]</sup>。

## 2.5 在乙醇发酵 VHG 模拟体系中的应用

VHG 乙醇发酵时, 发酵液中葡萄糖浓度通常超过 20%, 发酵后期乙醇浓度超过 12%, 甚至达到 18%。在高渗和高浓度乙醇的环境压力下, 且发酵液 pH 值在 4.5 以下, 耐受性不良的海藻糖酶发挥的作用有限<sup>[19]</sup>。本实验在含有 5% 海藻糖和 15% 乙醇的模拟乙醇发酵 VHG 体系条件下, 当添加 500 U/L PCTre 时, 可在 12 h 内完全水解海藻糖; 当乙醇浓度提高到 20% 时, 使用 1 000 U/L 的加酶量也可以在 16 h 内完全水解海藻糖 (图 10)。实际生产环境中, 酵母合成的海藻糖是逐步的, 乙醇的浓度也是逐渐增加的, 因此杓兰果胶杆菌海藻糖酶有望在工业乙醇发酵中发挥潜力。

## 2.6 酶法水解酵母提取物含有的海藻糖

酵母能够合成大量海藻糖, 通常酵母提取物中含有 5%–12% 的海藻糖成分<sup>[20]</sup>。尽管海藻糖是一种可供利用的良好碳源, 在某种程度上还具有细胞保护功能。但在一些对培养基中碳源种类和含量有严格限制的情况下, 需要尽可能剔除这些海藻糖成分或将其转化为葡萄糖, 避免对产物代谢的干扰<sup>[21]</sup>。国际上有多家公司已采用水解法生产低含量或无海藻糖成分的醇

母粉产品。本研究尝试使用 PCTre 酶液处理不同来源的酵母提取物，结果见表 4。在 pH 5.5、36 ℃、样品浓度 5%条件下，加酶量仅需要 20 U/g，20 min 就可以快速水解其中的海藻糖。

2.7 罐上产酶特性

采用分批发酵，在 8 g/L 甘油为碳源的发酵

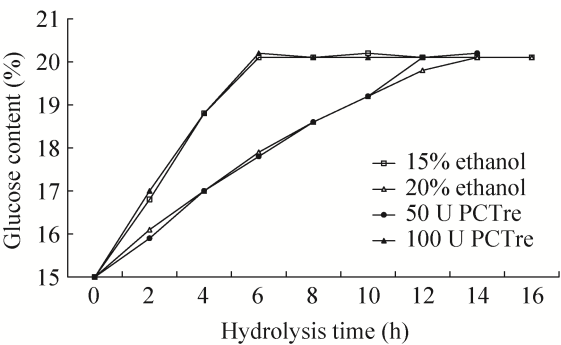


图 10 PCTre 在模拟乙醇发酵环境中水解海藻糖  
Figure 10 Hydrolysis of trehalose by PCTre in a simulated ethanol fermentation.

表 4 海藻糖酶对酵母提取物中海藻糖的水解作用  
Table 4 Hydrolysis of trehalose in yeast extract by PCTre

Yeast extract	Trehalose content (%)	Trehalose content after hydrolysis (%)
Procelys 870	2.70	0.00
Procelys 880	5.64	0.00
Procelys 7	8.42	0.02
OXOID	2.10	0.00

培养基中，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET3b-*PCTre* 生长良好，20 h 后  $OD_{600}$  达到 17.3，随后进入稳定期；酶活在 28 h 达到 2 150 U/mL，36 h 后逐渐下降 (图 11A)。当采用补料发酵方式时，发酵 32 h 时得到最高  $OD_{600}$  值为 74.2；发酵 28 h 时得到最高酶活为 4 130 U/mL，是分批发酵得到的最高酶活的 1.92 倍 (图 11B)。目前重组海藻糖酶的高酶活表达主要见于真核表达体系，如来源于嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、瘤孢梭孢壳 (*Myceliophthora sepedonium*) 的海藻糖酶基因 *MthT* 和 *TreM* 在黑曲霉中得到表达<sup>[3]</sup>，但其发酵周期较长。目前大部分研究仍处于实验水平。

3 结论

本文筛选获得一株产海藻糖酶的野生菌，通过形态学和分子生物学鉴定其为杓兰果胶杆菌 (*Pectobacterium cypripedii*)，克隆了该菌株的海藻糖酶编码基因 *PCTre* 并在大肠杆菌体系实现了异源表达，酶活为 289.40 U/mL，蛋白分子量为 63 kDa。5 L 罐上发酵，28 h 时酶活可达到 4 130 U/mL。酶学性质研究表明，PCTre 能够在酸性条件下发挥良好的水解作用，反应最适 pH 为 5.5，最适温度为 35 ℃。PCTre 具有

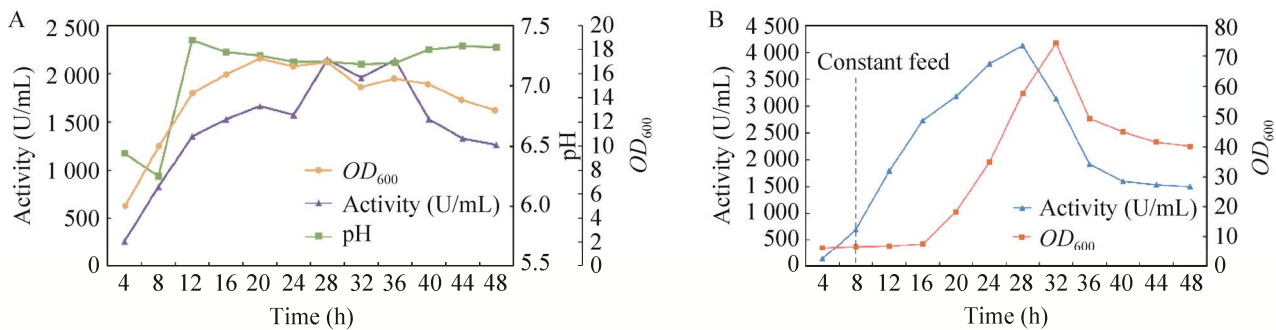


图 11 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET3b-*PCTre* 发酵过程曲线  
Figure 11 Fermentation curve of *E. coli* BL21(DE3)/pET3b-*PCTre* batch fermentation (A) and fed-batch fermentation with constant feeding rate (B).

良好的热稳定性, 并能够耐受有机溶剂, 在乙醇体系下酶活能维持较长时间。在模拟乙醇发酵环境中, PCTre 可在 12 h 内完全水解 5% 的海藻糖, 预期在乙醇发酵工业中有较好的潜力。

## REFERENCES

- [1] Kozlov AI, Balanovsky OP, Vershubskaya GG, et al. Genetically determined trehalase deficiency in various population groups of Russia and neighboring countries. *Vopr Pitan*, 2021, 90(5): 96-103.
- [2] García MD, Argüelles JC. Trehalase inhibition by validamycin A may be a promising target to design new fungicides and insecticides. *Pest Manag Sci*, 2021, 77(9): 3832-3835.
- [3] 董良波. 高活力海藻糖酶基因的挖掘及其在黑曲霉中的高效表达研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.  
Dong LB. Screening of highly active trehalase genes and its high level expression in *Aspergillus niger*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [4] Puligundla P, Smogrovicova D, Mok C, et al. A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. *Renew Energy*, 2019, 133: 1366-1379.
- [5] Yuasa M, Okamura T, Kimura M, et al. Two trehalose-hydrolyzing enzymes from Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* exhibit distinct activities and affinities toward trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(10): 4445-4455.
- [6] Dong LB, Lin XT, Yu D, et al. High-level expression of highly active and thermostable trehalase from *Myceliophthora thermophila* in *Aspergillus niger* by using the CRISPR/Cas9 tool and its application in ethanol fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47(1): 133-144.
- [7] Zilli DMW, Lopes RG, Alves SL Jr, et al. Secretion of the acid trehalase encoded by the *CgATH1* gene allows trehalose fermentation by *Candida glabrata*. *Microbiol Res*, 2015, 179: 12-19.
- [8] 程启朋. 海洋细菌 *Zunongwangia* sp. 海藻糖酶酶学分析及体外定向进化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.  
Cheng QP. Characterization and directed evolution of trehalase from marine bacterium *Zunongwangia* sp.[D] Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [9] Gao H, Gong JS, Su C, et al. Characterization, heterologous expression and engineering of trehalase for biotechnological applications. *Syst Microbiol Biomanufacturing*, 2022, 2(3): 445-460.
- [10] Hayner GA, Khetan S, Paulick MG. Quantification of the disaccharide trehalose from biological samples: a comparison of analytical methods. *ACS Omega*, 2017, 2(9): 5813-5823.
- [11] Adhav A, Harne S, Bhide A, et al. Mechanistic insights into enzymatic catalysis by trehalase from the insect gut endosymbiont *Enterobacter cloacae*. *FEBS J*, 2019, 286(9): 1700-1716.
- [12] 潘湛清. 甜菜夜蛾海藻糖酶和几丁质酶在昆虫细胞中的表达[D]. 广州: 中山大学, 2010.  
Pan ZQ. Expression of trehalose and chitinase from *Spodoptera exigua* in insect cells[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010 (in Chinese).
- [13] Ghadikolaei KK, Shojaei M, Ghaderi A, et al. Biochemical properties of Glu-SH<sub>3</sub> as a family 13 glycoside hydrolase with remarkable substrate specificity for trehalose: implications to sequence-based classification of CAZymes. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 603: 1-9.
- [14] Sakaguchi M, Shimodaira S, Ishida SN, et al. Identification of GH15 family thermophilic archaeal trehalases that function within a narrow acidic-pH range. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(15): 4920-4931.
- [15] 郭婷婷. 座壳孢菌海藻糖酶的纯化及酶学性质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.  
Guo TT. Purification and enzymatic characterization of *Aschersonia* trehalase[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese).
- [16] Micaêlo NM, Soares CM. Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. *FEBS J*, 2007, 274(9): 2424-2436.
- [17] Liu Y, Zhang X, Tan H, et al. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. *Process Biochem*, 2010, 45(7): 1176-1180.
- [18] Cui HY, Stadtmüller THJ, Jiang QJ, et al. How to engineer organic solvent resistant enzymes: insights from combined molecular dynamics and directed evolution study. *ChemCatChem*, 2020, 12(16): 4073-4083.
- [19] 黄江, 李阳源, 周银华, 等. 一种海藻糖酶及其载体与应用: CN 110713996B. 2019-10-17.  
Huang J, Li YY, Zhou YH, et al. A trehalase and its vector and application: CN 110713996B. 2019-10-17.
- [20] Mosser M, Kapel R, Chevalot I, et al. Fractionation of yeast extract by nanofiltration process to assess key compounds involved in CHO cell culture improvement. *Biotechnol Prog*, 2015, 31(4): 875-882.
- [21] 张雅娴. 海藻糖对酿酒酵母细胞生长代谢和增殖周期的调控[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.  
Zhang YX. Evaluation of yeast growth, carbon metabolism and cell cycle under trehalose addition[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)