

酶法合成海藻糖研究的新进展

陈 炜 何秉旺

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 海藻糖, 酶法合成, 底物

分类号 Q93-936

海藻糖(trehalose)是由两个葡萄糖残基经 α -1,1键连接的非还原二糖,广泛存在于细菌、酵母、真菌、藻类、昆虫中^[1]。海藻糖具有独特而令人感兴趣的生物学功能。例如可以保护蛋白质、生物膜及敏感细胞的细胞壁免受干旱、冷冻、渗透压的变化等造成的伤害,用作不稳定药品、食品和化妆品的稳定剂,多种食品和药品的甜味剂,种子的包衣,冷冻干燥菌株的保护剂^[2]等,最近报道海藻糖可保护DNA防止放射线引起的损伤^[3]。海藻糖来源目前主要从酵母中提取,但收率较低,成本高,限制了其应用。

以往的研究表明,海藻糖在真菌和细菌中的合成主要是通过海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose 6-phosphate synthase)和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(trehalose 6-phosphate phosphatase)的途径^[1,4]。

海藻糖-6-磷酸合成酶的底物专一性强,只能以葡萄糖-6-磷酸作为葡萄糖基受体,UDP-葡萄糖,UDP-葡萄糖,或ADP-葡萄糖为葡萄糖基给体。这个酶反应系统需要高能化合物的UDP-葡萄糖和葡萄糖-6-磷酸作为合成起始底物,因此不适合工业生产。以往还进行了一些酶法合成海藻糖的研究,如用麦芽糖磷酸化酶(maltose phosphorylase)和海藻糖磷酸化酶(trehalose phosphorylase)从麦芽糖经两步反应合成海藻糖^[5],该方法较上一个方法的优点是不需要高能化合物的UDP-葡萄糖,但两步反应从平衡常数计算,理论转化率仅为64%,实际上从麦芽糖到海藻糖的最终转化率约60%,从生产上说这样的收率是不理想的,该方法未见实用化。还有研究海藻糖磷酸化酶的逆向催化反应,用 β -葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖合成海藻糖^[6],但 β -葡萄糖-1-磷酸比海藻糖价格还贵,因此该方法生产上不可行。

近年来有关酶法合成海藻糖的研究很活跃,在细菌中发现了合成海藻糖的两类新酶系。一类是海藻糖合

酶,以麦芽糖为底物经分子内转糖基作用转化为海藻糖。另一类是新型葡萄糖基转移酶和新型 α -淀粉酶联合作用,以淀粉或淀粉水解物或寡糖为底物生成海藻糖。这两种方法所用的底物便宜易得,收率高,有应用前景。下面介绍这两类新的海藻糖合成酶系的研究概况。

1 海藻糖合酶以麦芽糖为底物合成海藻糖

Nishimoto等发现脂肪杆菌(*Pimelobacter* sp.) R48中的一种新酶能将麦芽糖转化为海藻糖^[7]。它不同于以前报道的麦芽糖磷酸化酶,除去反应混合物中的磷酸盐不影响反应。进一步研究表明这种新酶是分子内转糖基酶,将麦芽糖的 α -1,4糖苷键转化成 α -1,1糖苷键。脂肪杆菌海藻糖合酶的分子量为62ku,等电点pI为4.6,最适反应温度20℃,最适pH为7.5,在pH6.0~9.0,30℃保温60min酶稳定。 Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} 和Tris抑制酶活,其它一些金属离子,EDTA和二硫苏糖醇不影响酶活力^[8]。

多种细菌中都有海藻糖合酶,如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)等^[7]。水生栖热菌的海藻糖合酶分子量105ku,等电点为4.3,最适pH为6.5,最适反应温度65℃。在pH5.5~9.5间酶稳定。在80℃,pH7.0,保温60min酶稳定。同脂肪杆菌海藻糖合酶相似, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} 能使酶失活,EDTA和二硫苏糖醇对酶活无影响^[9]。水生栖热菌的海藻糖合酶的热稳定性好,有利于酶的保存,在较高温度反应可防止杂菌污染,更适合于工业生产。

海藻糖合酶的底物专一性强,只作用于麦芽糖生成海藻糖及从海藻糖生成麦芽糖,前者的反应明显优于后者。对其它糖如葡萄糖,麦芽三糖,麦芽四糖,麦芽五糖,麦芽

1997-04-07收稿

寡糖,蔗糖,松二糖,新海藻糖,曲二糖,黑曲霉二糖,异麦芽糖,海藻寡糖,异麦芽寡糖和乳糖等都不起作用^[8,9]。

海藻糖合酶催化麦芽糖到海藻糖的收率高,栖热水生菌海藻糖合酶在 30~40℃ 合成率为 80%~82%^[9],脂肪杆菌海藻糖合酶在 5℃, 15℃, 和 25℃ 合成海藻糖的产率分别为 81.8%, 80.91% 和 76.7%^[8]。海藻糖合酶可能有弱的水解作用,温度提高水解作用加强,使产率下降。这个酶反应简单,底物麦芽糖价格便宜,适合于工业生产海藻糖。

2 新型葡糖基转移酶和新型 α -淀粉酶联合作用从淀粉或淀粉水解物生成海藻糖

Maruta 等报道,在节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 36 中发现两个同海藻糖合成相关的酶可将麦芽寡糖转化为海藻糖^[10]。这两个相关的酶纯化后^[11],只用其中的一个酶都不能从麦芽寡糖生成海藻糖。进一步研究反应机制表明反应分为两步。第一种酶催化麦芽寡糖还原端的葡糖基和相邻的葡糖基间的 α -1,4 葡糖苷键转化成为 α -1,1 葡糖苷键,从麦芽寡糖生成麦芽寡糖基海藻糖,是一种分子内转糖基酶,他们称为麦芽寡糖基海藻糖合酶 (maltooligosyl trehalose synthase, MTSase)。第二种酶专一水解麦芽寡糖基海藻糖的麦芽寡糖基和海藻糖基间的 α -1,4 葡糖苷键,得到海藻糖和比相应底物少两个葡萄糖单位的麦芽寡糖,称麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶 (maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, MTHase)^[11]。

麦芽寡糖基海藻糖合酶的底物特异性是,麦芽糖不能作底物,对麦芽三糖的作用较差,对麦芽三糖以上的麦芽寡糖都可以作用。对麦芽四糖,五糖,六糖,七糖的 k_m 值分别为 22.9mmol/L, 8.7mmol/L, 1.4mmol/L 和 0.9mmol/L。酶分子量 81ku,等电点 pI 为 4.1。以直链淀粉为底物用上述两种酶联合作用,海藻糖收率可达 80% 以上。海藻糖合成收率同链长的有关。两种酶联合作用可以循环作用于底物,每次从麦芽寡糖生成海藻糖和少两个葡萄糖单位的麦芽寡糖^[11]。除节杆菌外,在多株保藏和分离的细菌中都发现了这两种酶,如微黄短杆菌 (*Brevibacterium helvolum*),根瘤细菌 (*Rhizobium*),水生黄杆菌 (*Flavobacterium aquatile*) 等。这样就提出了一个在细菌中合成海藻糖的新酶系和新途径,同已知的系统相比较这个系统的特点是海藻糖的合成不依赖于磷酸盐^[11]。

Kato 等发现超嗜热嗜酸性古细菌,硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) KM1 的无细胞匀浆物可将可溶性淀粉转化为海藻糖^[12],进一步研究发现两个同海藻糖

合成相关的酶,并对这两个酶进行了分离纯化、作用机制及酶的性质研究^[12]。第一个酶,催化麦芽寡糖转化为相应的葡糖基海藻糖(这里葡糖基海藻糖是指海藻糖单位作为末端的大于三个葡萄糖单位的寡糖)。用³H-标记和¹⁴C-NMR光谱分析表明,第一种酶将麦芽寡糖基转移到麦芽寡糖还原末端葡糖基的 C1-OH 位置,是一种分子内转糖基酶。酶的分子量 76ku,等电点为 6.1,在 pH5.0~6.0 和 70~80℃ 活力最高,在 85℃ 保温 6h 仍有 91% 酶活力。三个葡萄糖单位以上的麦芽寡糖都可以作为底物,但五个葡萄糖单位以上的寡糖更好些,而麦芽糖,异麦芽糖,异麦芽三糖,异麦芽四糖,异麦芽五糖和潘糖都不能作为底物^[13]。另一个酶,水解葡糖基海藻糖生成海藻糖和麦芽寡糖。该酶水解葡糖基海藻糖仅切割相邻于 α -1,1 键的 α -1,4 键,纯化的酶分子量为 61ku,在 pH4.5~5.5, 75~85℃ 保温 6h 保留 100% 活力。该水解酶的作用方式是内切型的,葡糖基海藻糖和麦芽寡糖都可作为底物,但前者优于后者 15 倍,是一种新型 α -淀粉酶,但不同于一般的 α -淀粉酶,对葡糖基海藻糖的特异性强。

硫矿硫化叶菌的新型葡糖基转移酶和新型 α -淀粉酶联合作用于寡糖或直链淀粉生成海藻糖的收率随链长增加而增加。DP3 为 36%, DP7 为 67%, DP17 为 83%。用淀粉经普鲁兰酶脱支后作底物,海藻糖收率达 81.5%。淀粉价格便宜,两种合成海藻糖相关的酶的热稳定性很好,可望成为工业生产海藻糖的新途径。

上述两种海藻糖合成相关的酶广泛存在于硫化叶菌科 (*sulfolobaceae*) 中,特别是硫化叶菌属^[12],检测的硫化叶菌菌株都有这两种酶。

3 海藻糖合成相关酶基因的序列分析及氨基酸序列特征

根瘤菌 M-11 中两个海藻糖合成相关的酶, MTSase 和 MTHase 的基因已在大肠杆菌中克隆和序列分析^[15],从氨基酸序列推导出的分子量分别为 85ku 和 65ku,均与 SDS-PAGE 测定的结果相近。两个基因有各自的可能的核糖体结合位点和翻译起始序列。两个基因有一个核苷酸序列的重叠区,表明在一个操纵子上。DNA 印迹分析表明这两个基因在基因组 DNA 上是单拷贝的。

硫矿硫化叶菌 KM1 和嗜酸热硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) ATCC33909 的新型葡糖基转移酶和新型 α -淀粉酶的基因也已克隆、表达和序列分析^[17,18]。其新型葡糖基转移酶的氨基酸分别为 720 和 728 个,推测的

分子量为 86ku 和 85ku; 新型 α -淀粉酶的氨基酸分别为 558 和 556 个, 推测的分子量分别为 65ku 和 64ku, 都同根瘤菌 M-11 的两个酶的大小接近。硫化叶菌这两个酶的基因都带有自己的启动子, 同根瘤菌中的情况(在一个操纵子上)不同。嗜酸热硫化叶菌的两个酶同毓矿硫化叶菌的酶的氨基酸同源性分别为 50% 和 59%。尽管氨基酸序列的同源性较低, 但酶的性质很接近。基因工程菌株可以在常温培养, 产酶活力高, 有工业应用前景。

上述的三个菌株的两种酶其氨基酸序列尽管同 α -淀粉酶有很大区别, 但都存在 α -淀粉酶家族(包括 α -淀粉酶, 普鲁兰酶, 环状糊精葡萄糖转移酶, 淀粉脱支酶等)的几个保守的同源区, 已知这些保守区域同 α -淀粉酶家族的酶的催化活性和同底物结合相关^[16], 推测这两个海藻糖合成相关的酶有同 α -淀粉酶相似的(α/β)桶状的三级结构。

参 考 文 献

- [1] Elbein A D. *Adv Carbohydr Chem*, 1974, 30: 227~256.
- [2] Leslie S H. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(10): 3592~3597.
- [3] Yoshinaga K, Yoshioka H, Kurosaki H *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 60(1): 160~161.
- [4] Killick K A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1979, 196(1): 121~133.
- [5] Murao S, Nagano H, Ogura S *et al.* *Agric Biol Chem*, 1985, 49(7): 2113~2118.
- [6] Marechal L R, Belocopitow E. *J Biol Chem*, 1972, 247: 3223.
- [7] Nishimoto T, Nakano M, Ikegami S *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59(11): 2189~2190.
- [8] Nishimoto T, Nakano M, Nakada T *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(4): 640~644.
- [9] Nishimoto T, Nakada T, Chaen H *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(5): 835~839.
- [10] Maruta K, Nakada T, Kubota M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59(10): 1829~1834.
- [11] Maruta K, Nakada T, Kubota M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59(12): 2210~2214.
- [12] Kato M, Miura Y, Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(3): 540~550.
- [13] Kato M, Miura Y, Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(5): 921~924.
- [14] Kato M, Miura Y, Kettoku M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(5): 925~928.
- [15] Maruta K, Hattori K, Nakada T *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(4): 717~720.
- [16] Jespersen M H, MacGregor A E, Sierks R M, *et al.* *Biochem J*, 1991, 280: 51~55.
- [17] Kobayashi K, Kato M, Miura Y *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(11): 1882~1885.
- [18] Kobayashi K, Kato M, Miura Y *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(10): 1720~1723.