

研究报告

嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 中麦芽寡糖基海藻糖合酶的酶学性质

崔云前¹ 杨少龙¹ 吕珊珊² 蔡成固¹ 刘波^{2*}

(1. 齐鲁工业大学生物工程学院 山东 济南 250353)

(2. 齐鲁工业大学食品科学与工程学院 山东 济南 250353)

摘要:【目的】克隆表达嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 中的 ST0929 基因, 并测定其酶活性。【方法】根据 ST0929 基因设计引物进行 PCR 扩增, 将这段基因克隆到 pET-15b 质粒上, 重组质粒导入大肠杆菌 BL21 细胞中表达。亲和层析纯化酶蛋白, 并测定其酶活性。【结果】SDS-PAGE 分析表明其分子量大约为 83 kD。酶学性质研究表明该酶的最适温度为 75 °C, 最适 pH 为 5.0, 具有很强的热稳定性和 pH 稳定性。该酶还能对多种金属离子和有机溶剂具有一定的耐受性。底物特异性研究发现该酶能够利用麦芽糊精作底物, 而不能利用壳寡糖、麦芽糖等。【结论】通过以上酶学性质的研究, 说明这种来源于超嗜热古菌的麦芽寡糖基海藻糖合酶在工业生产海藻糖领域具有一定的应用前景。

关键词: 古菌, *Sulfolobus tokodaii*, 麦芽寡糖基海藻糖合酶, 酶学性质, 海藻糖

Characterization of a maltooligosyl trehalose synthase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7

CUI Yun-Qian¹ YANG Shao-Long¹ LÜ Shan-Shan² CAI Cheng-Gu¹ LIU Bo^{2*}

(1. College of Biotechnology, Qilu University of Technology, Ji'nan, Shandong 250353, China)

(2. College of Food Science and Technology, Qilu University of Technology, Ji'nan, Shandong 250353, China)

Abstract: [Objective] To clone the gene ST0929 encoding maltooligosyl trehalose synthase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7 and characterize the enzyme. [Methods] The ST0929 gene was amplified by PCR based on *Sulfolobus tokodaii* strain 7 ST0929 gene sequence and cloned into the expression vector pET-15b. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21. After induced by IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactoside), the bacterial pellet was sonicated and purified by affinity chromatography. The enzymatic properties were then measured. [Results] SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the enzyme was about 83 kD. The optimal temperature was at 75 °C and pH at 5.0. Moreover, the enzyme exhibited notable pH and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31271118)

*Corresponding author: E-mail: ertrdfgg@aliyun.com

Received: December 16, 2015; **Accepted:** March 01, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 10, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31271118)

*通讯作者: E-mail: ertrdfgg@aliyun.com

收稿日期: 2015-12-16; 接受日期: 2016-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-10

thermal stability and was resistant to additives and metal ions. Substrate specificity analysis showed that the enzyme could use maltodextrin and maltooligosaccharide as substrates but could not use maltose, chitooligosaccharide. [Conclusion] The recombinant enzyme described in this study suggest its potential in industrial production of trehalose.

Keywords: Archaeon, *Sulfolobus tokodaii*, Maltooligosyl trehalose synthase, Enzymatic properties, Trehalose

海藻糖是由两个葡萄糖分子以 α -1,1-糖苷键相连的非还原性双糖,这种糖在自然界中广泛存在,植物、动物、真菌和细菌中均有发现。海藻糖具有抗压、抗干旱、抗高温、抗碱和抗渗透压作用,被广泛应用于食品、农业及生物技术领域。比如,海藻糖可为细胞提供保护层或稳定细胞,也可作为食品或化妆品的添加剂^[1]。同时,海藻糖还能够保护哺乳动物眼睛免受由干燥和氧化引起的干眼症的困扰^[2]。

麦芽寡糖基海藻糖合酶(Maltooligosyl trehalose synthase, MTSase)参与催化麦芽寡糖生成海藻糖,其反应主要是先由 MTSase 催化转糖基反应将麦芽寡糖的还原性末端由 α -1,4-糖苷键转化为 α -1,1-糖苷键,然后麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶(Maltooligosyl trehalose hydrolase, MTHase)将麦芽寡糖末端的海藻糖切下,生成海藻糖和少两个葡萄糖分子的麦芽寡糖。Lama 等首先报道了来源于嗜热微生物硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的麦芽寡糖基海藻糖合酶系能够从淀粉中催化生成海藻糖^[3]。紧接着,许多科研工作者又从多种不同的古菌中克隆鉴定了这种麦芽寡糖基海藻糖合酶系,如嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)和芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)^[4-5]。而且,分别编码 MTSase 和 MTHase 的基因能够融合在一起,并在大肠杆菌中进行表达,从而表现为一种双功能酶^[6]。另一方面,来源于嗜热菌 *Thermus caldophilus* GK24 的一种海藻糖合酶(Trehalose synthase)能够直接将麦芽糖转化为海藻糖^[7],这一途径也是当前研究的热点之一。应用这种超嗜热性的酶生产海藻糖具有加快化学反应的进程,减少反应液中杂菌污染以及以淀粉为底物降低生产成本的优越性^[8-10]。在本文中,我们克隆了来源于超嗜热古菌(*Sulfolobus*

tokodaii strain 7)中编码麦芽寡糖基海藻糖合酶的基因(ST0929),并且以 pET-15b 为载体在大肠杆菌 BL21 细胞中表达,并鉴定了其酶学性质。本实验结果为将来在生物工程领域应用该嗜热酶来生产海藻糖提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、酶和药品

大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 和 pET-15b 质粒购自 Novagen 公司;限制性内切酶和其它分子生物学用酶均购自 TaKaRa 公司;*S. tokodaii* strain 7 麦芽寡糖基海藻糖合酶基因由北京中美泰和生物技术公司合成;亲和层析柱及填料购自美国 GE Healthcare 公司;麦芽五糖购自东京化学品公司;3,5-二硝基水杨酸购自国药集团化学试剂有限公司;其余化学药品购自上海生工生物工程公司且为分析级。

1.2 MTSase 基因的克隆和表达

根据在线密码子优化(Codon adaptation tool)软件(<http://www.jcat.de/>)对编码 MTSase 的基因 ST0929 (BAB65941)进行适当密码子优化,设计引物:有义链 5'-ATTGAACCTCGAGATGAAGTTACTT TCAACCTATAG-3',反义链 5'-GCGAGGATCCTAT TTAACAAGAATTAAGGTAATTTATC-3',下划线分别代表 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点。PCR 扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 0.5 min,46 °C 32 s,72 °C 2.5 min,32 个循环;72 °C 10 min。PCR 得到的目的基因用 *Xho* I 和 *Bam*H I 限制酶消化后克隆到 pET-15b 质粒上,将重组的质粒命名为 pET-15b-ST0929,并通过 DNA 测序验证序列的正确性。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 细胞中,挑取单克隆于终浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素和 34 mg/L

氯霉素的 LB 液体培养基(g/L, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氧化钠 10.0, pH 7.0^[11])中培养过夜。培养过夜的细菌按 1:100 接种至新的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.5, 加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG、16 °C 诱导 12 h, 诱导完成后 6 000 r/min 离心 15 min 收集菌体细胞。

1.3 麦芽寡糖基海藻糖合酶的纯化

收集到的菌体在 6 mL 的破壁缓冲液(5 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 0.5 mol/L 的氯化钠, pH 7.4)中重悬, 超声(200 W 15 min, 超声 5 s, 间隔 5 s)破碎细胞, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 上清即为粗酶液, 粗酶液先经过 0.22 μ m 的滤膜过滤, 接着进行亲和层析纯化, 亲和层析首先用 Binding buffer (20 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 0.5 mol/L 氯化钠, pH 7.4)平衡, 最后用 Elution buffer (200 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 0.5 mol/L 的氯化钠, pH 7.4)冲洗目的蛋白。SDS-PAGE 检测目的蛋白, 并用 BSA 法测其浓度^[12]。

1.4 酶活测定

该酶催化分子内的转糖基反应, 将麦芽寡糖的还原性末端转化为非还原性末端, 因此可检测反应体系中还原性糖含量的变化来指示酶活力的大小^[13]。标准条件下酶活测定体系为: 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 5.0), 0.1%的麦芽五糖和适量的酶液, 总反应体系为 1 mL。反应条件为 75 °C 10 min。剩余的还原糖量用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定。以不同浓度的麦芽五糖绘制标准曲线, 1 U 酶活定义为每 min 转化 1 μ mol 麦芽五糖所用的酶量。酶活性测定做 3 个平行, 取平均值。酶活单位用 U/mg 表示。

1.5 最适温度和最适 pH 分析

将反应体系置于不同的温度梯度(55–95 °C, 间隔 5 °C)中反应, 其它条件按标准方法测定。将温度梯度中所对应的最高酶活性定义为 100% (0.46 U/mg)。

将反应体系置于不同的 pH 梯度(pH 4.0–9.0, 间隔 1.0)中反应, 其它条件按标准方法测定。其中

pH 4.0–5.0 为柠檬酸-磷酸缓冲液; pH 6.0–7.0 为磷酸钠缓冲液, pH 8.0–9.0 为 Tris-HCl 缓冲液。将不同 pH 梯度所对应的最高酶活定义为 100% (0.54 U/mg)。

1.6 温度稳定性和 pH 稳定性分析

将纯化的酶液(0.48 U/mg)置于不同的温度(75、85、95 °C)条件下, 孵育 10 h。每 2 h 测定一次酶活, 剩余酶活性在标准条件下测定。

将纯化的酶液(0.4 U/mg)置于不同的 pH (pH 3.0、4.0、10.0、11.0)条件下孵育 10 h, 每 2 h 测定一次酶活, 剩余酶活性在标准条件下测定。

1.7 MTSase 的底物特异性

以麦芽五糖、麦芽糊精、麦芽糖、壳寡糖为底物来测定 MTSase 的底物特异性。以上底物均具有还原性, 因此可用 DNS 法测定。以上底物的终浓度均为 0.1%。麦芽糊精是一种混合物, 分子量大小不均一, 因此可用加入酶与不加入酶反应体系的吸光度的变化来测定该酶是否能够利用麦芽糊精。除作用底物不同外, 酶活测定方法与标准条件下的酶活性测定方法相同。

1.8 不同金属离子及一些添加物对酶活的影响

为探究不同金属离子对酶活性的影响, 在标准反应体系中分别加入以下金属离子: K^+ 、 NH_4^+ 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} , 终浓度 10 mmol/L, 75 °C、pH 5.0 反应 10 min, 测定酶活性。对照组为不加金属离子的粗酶液, 粗酶液的酶活为 0.53 U/mg。

为探究不同有机添加物对酶活性的影响, 加入以下物质进行考察: 甘露醇、山梨醇、EDTA、甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和丙酮。其中甘露醇、山梨醇和 EDTA 的终浓度为 10 mmol/L, 甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇和丙酮的终浓度为 10% (体积比)。75 °C 反应 10 min, 测定剩余酶活性。对照组为不加有机溶剂的粗酶液, 粗酶液的酶活为 0.53 U/mg。

2 结果与分析

2.1 MTSase 基因的克隆

以 *S. tokodaii* strain 7 的麦芽寡糖基海藻糖合酶基因 ST0929 为模板进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 1

所示。PCR 扩增得到与预期大小相符的目的片段 (2 115 bp)。ST0929 基因的 PCR 产物用 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切后连接到经同样双酶切的 pET-15b 上。连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 筛选重组质粒, 并经双酶切及测序验证。测序验证正确后的重组质粒转入大肠杆菌 BL21 细胞中, 表达重组蛋白, 蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳图如图 2 所示。

2.2 序列比对分析

S. tokodaii strain 7 的麦芽寡糖基海藻糖合酶基

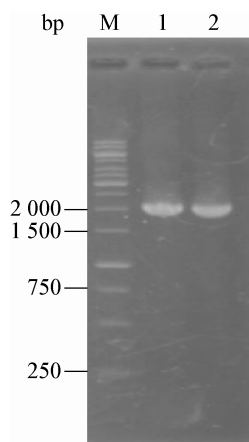


图 1 麦芽寡糖基海藻糖合酶基因的克隆

Figure 1 Cloning of the MTSase gene

注: 1, 2: PCR 产物; M: DNA 分子量标准。

Note: 1, 2: Product by PCR amplification; M: 1 kb DNA marker.

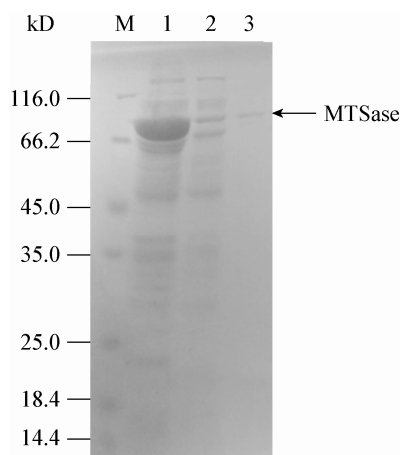


图 2 纯化 MTSase 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purified MTSase

注: 1: 总蛋白; 2: 上清蛋白; 3: 亲和层析纯化后蛋白; M: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Crude extract; 2: Soluble fraction; 3: Purified enzyme after Ni-NTA affinity chromatography; M: The molecular weight markers.

因编码 704 个氨基酸, 通过软件 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 计算其分子量大约为 83.6 kD, pI 值为 5.93。这种古菌来源的 MTSase 与同样是古菌 *S. acidocaldarius* (BAA11865)、*S. solfataricus* (BAA11008)、*S. shibatae* (AAM81591)、冰岛硫化叶菌 (*Sulfolobus islandicus*) (ACP54490) 来源的 MTSase 分别有 54%、53%、53% 和 52% 的相似性。Kobayashi 等^[14]首先解析了来源于 *S. acidocaldarius* 的麦芽寡糖基海藻糖合酶的结构, 并且提出了其可能的酶学催化机制。Kubota 等^[15]进一步提出来源于 *S. acidocaldarius* 的 MTSase 中带有 3 个羧基的氨基酸残基 D228、E255 和 D443 对其酶的催化作用是密切相关的。相关学者通过计算机模拟的方法确定了来源于 *S. solfataricus* ATCC 35092 中的麦芽寡糖基海藻糖合酶中与底物结合和选择相关的残基是 P402 和 A406^[16]。通过对以上物种来源的 MTSase 进行氨基酸序列比对, 发现它们在催化位点处的序列是相当保守的, 可以推断它们催化底物的机理是大致相同的。SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/signalP) 和 TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) 软件对古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 进行序列分析, 发现其没有信号肽和跨膜结构域, 表明其是一种胞内蛋白。

2.3 最适温度与最适 pH

从图 3A 看出酶活性的最适温度为 75 °C。在 50–95 °C 时, 其剩余酶活性依然保留最高酶活性的 60%。在 60–90 °C 时, 其剩余酶活性也能够达到其最适酶活性的 80%。说明该酶是一种极端嗜热酶。从图 3B 中看出, 酶的最适 pH 为 5.0。当 pH 为 4.0 时, 酶活性非常低, 只相当于最适酶活性的 8% 左右, 表明该酶不适合在酸性条件下进行催化。当 pH>9.0 时, 其酶活性只相当于最适酶活性的 20%。

2.4 温度稳定性与 pH 稳定性

将该酶置于 75 °C 和 85 °C 孵育 10 h 后, 该酶的活性几乎没有变化。即使将该酶置于 95 °C 的高温中孵育 8 h, 其酶活性也保留了最初酶活性的 60% (图 4A)。这表明该酶具有较好的温度稳定性。

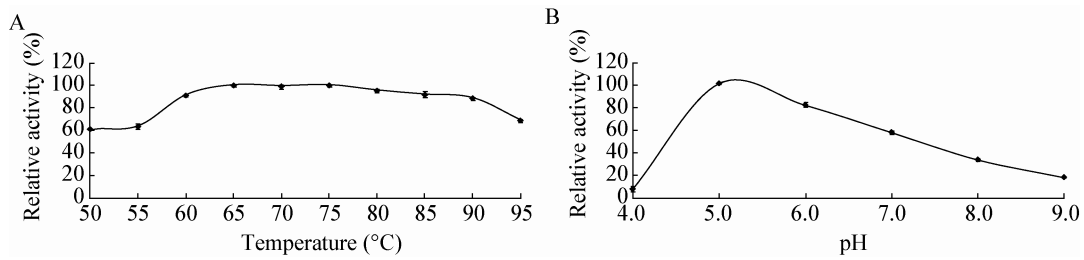


图 3 温度(A)和 pH (B)对 MTSase 活性的影响

Figure 3 Effects of temperature and pH on the MTSase activity

注: A: 最适温度曲线; B: 最适 pH 曲线.

Note: A: The optimum temperature curve; B: The optimum pH curve.

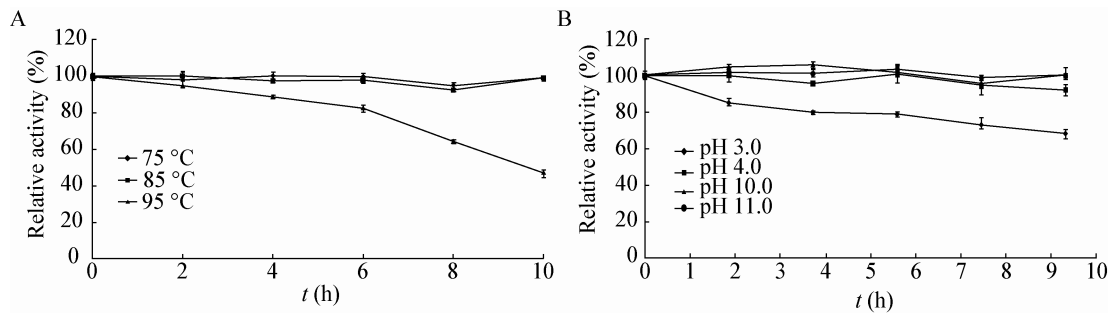


图 4 酶的温度和 pH 稳定性

Figure 4 Thermostability and pH stability of the MTSase

注: A: 酶的温度稳定性; B: 酶的 pH 稳定性.

Note: A: The thermostability curve; B: The pH stability curve.

当将酶置于 pH 10.0 和 pH 11.0 的环境中孵育 10 h 后, 该酶的活性几乎没有变化。此外, 将酶放在 pH 3.0 和 pH 4.0 的环境中孵育 10 h, 其剩余酶活性也分别能够达到最初酶活性的 65%和 90% (图 4B)。这表明, 该酶能够适应不同酸碱的环境条件。

2.5 MTSase 的底物特异性

通过对麦芽五糖、麦芽糊精、麦芽糖和壳寡糖等底物的特异性研究, 我们发现加入纯化的 MTSase 酶液后, 与不加酶液的反应体系相比, 麦芽五糖与麦芽糊精溶液的吸光度明显变小, 而加入酶液后的麦芽糖和壳寡糖的吸光度与不加酶液的相比并没有明显的变化, 表明古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 能够利用麦芽五糖和麦芽糊精, 但不能利用麦芽糖和壳寡糖。

2.6 金属离子及一些添加物对酶活性的影响

通过实验发现, 加入 KCl、CaCl₂、ZnSO₄、EDTA、甘露醇对酶的活性没有影响, 分别为最适酶活性的 102%、106%、98%、98%、97%。(NH₄)₂SO₄ 的加入能够轻微抑制酶的活性, 保留了最适酶活性的 88%。MgSO₄、CuSO₄、NiSO₄ 的加入能够抑制酶的活性, 分别保留了初始酶活性的 62%、55%和 30%。另一方面, 该酶能够在一些有机添加物的存在下表现出一定的酶活力。有机溶剂甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、正丁醇和山梨醇能够对酶活性有一定的抑制作用, 分别保留最适酶活性的 89%、59%、54%、71%、47%和 91%。以上结果表明来源于 *S. tokodaii* strain 7 的 MTSase 能够在高浓度金属离子或者有机添加剂的存在下表现出一定的酶活性。不同金属离子及一些添加物对酶活性的影响如图 5 所示。

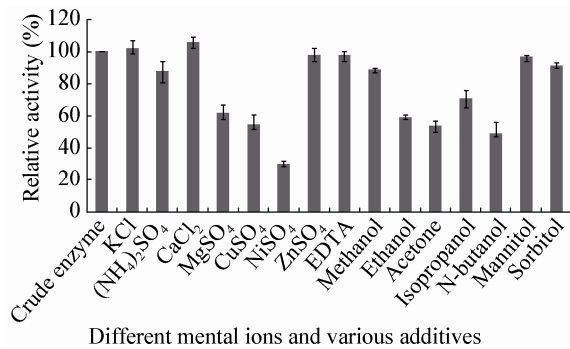


图5 金属离子及一些添加物对酶活的影响
Figure 5 Effects of mental ions and various additives on MTSase activity

3 讨论

在本研究中,我们从嗜热古菌 *S. tokodaii* strain 7 中克隆表达了一种麦芽寡糖基海藻糖合酶,并鉴定了其酶学性质。我们分别对 *S. tokodaii*、*S. acidocaldarius*、*S. shibatae*、*S. solfataricus* 和 *Arthrobacter* sp. Q36 来源的 MTSase 进行了酶学性质的比较,酶学性质比较结果如表 1 所示。

通过对不同物种来源的 MTSase 进行酶学性质比较,发现在最适反应温度方面,古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 与 *S. acidocaldarius*、*S. solfataricus* 来源的 MTSase 有相同的反应温度和 pH,但比 *S. shibatae* 和 *Arthrobacter* sp. Q36 来源的 MTSase 的最适反应温度分别高 5 °C 和 35 °C。在热稳定性方面,*S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase

在 85 °C 孵育 2 h,其酶活性几乎没有变化,即便是将此酶置于 95 °C 中 2 h,其剩余酶活性也保留了最初酶活性 80%以上。相比而言,*S. acidocaldarius* 来源的 MTSase 置于 90 °C 中 1 h,其酶活性就只保留了最初酶活性的 70%,而 *S. shibatae*、*S. solfataricus* 来源的 MTSase 分别置于 95 °C 和 85 °C 中 2 h 后,其酶活性只有最初酶活性的 40%和 56%。*Arthrobacter* sp. Q36 来源的 MTSase 更是在 60 °C 孵育 2 h 后,其酶活性完全丧失。这说明古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 的热稳定性是非常强的。在 pH 稳定性上,古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 比表 1 中其它物种来源的 MTSase 具有更广的 pH 稳定性范围。在金属离子抑制方面,古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 能够被 Mg²⁺、Cu²⁺和 Ni²⁺抑制,但不被 Zn²⁺抑制。而 *S. solfataricus* 来源的 MTSase 能够被 Cu²⁺和 Zn²⁺抑制,*Arthrobacter* sp. Q36 来源的 MTSase 能够被 Cu²⁺和 Hg²⁺所抑制。综上所述,古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 具有良好的酶学性质。

在前期的蛋白原核表达过程中,经过诱导得到的酶蛋白全部以包涵体的形式存在或可溶性蛋白的表达量很低。通过尝试多种诱导条件,获得了部分可溶的酶蛋白。*S. solfataricus* 来源的 MTSase 也部分以包涵体的形式存在^[18]。在接下来的工作中,可以通过尝试更换原核表达载体和包涵体复性的方法来增加可溶性蛋白的含量^[20]。但是,从另一方

表 1 不同物种来源 MTSase 的酶学性质比较
Table 1 Comparison of the enzymatic properties of MTSase from different sources

来源 Sources	最适温度 Optimum temperature	最适 pH Optimum pH	温度稳定性 Thermostability	pH 稳定性 pH stability	金属离子抑制 Mental ion inhibition
<i>S. tokodaii</i> ^a	75	5.0	95 °C 2 h (>80%) 85 °C 2 h (~100%)	4.0–11.0	Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺
<i>S. acidocaldarius</i> ^[4,17]	75	5.0	90 °C 1 h (~70%)	NR ^b	Cu ²⁺ , Hg ²⁺
<i>S. shibatae</i> ^[5]	70	4.5	95 °C 2 h (~40%) 80 °C 2 h (>80%)	4.5–9.5	NR
<i>S. solfataricus</i> ^[18]	75	5.0	85 °C 2 h (~56%) 80 °C 2 h (~96%)	4.5–11.0	Cu ²⁺ , Zn ²⁺
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36 ^[19]	40	7.0	60 °C 1 h (0%)	6.0–9.5	Cu ²⁺ , Hg ²⁺

注: a: 本文研究的内容; b: 文献中缺少相关资料。

Note: a: This study; b: Not record in the published literature.

面讲,古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 与其它来源的 MTSase 相比,表现出了更好的酶学性质(表 1)。这主要体现在最适温度、温度稳定性和 pH 稳定性上。通过对以上 5 种来源的 MTSase 进行氨基酸序列比对,发现虽然古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 与其余 4 种来源的 MTSase 的氨基酸同源性只有 50%以上,但是这 5 种来源的 MTSase 在催化位点处的序列是相当保守的,可以推断这种酶的催化机理是大致相同的。从酶学性质方面讲,哪些氨基酸决定了古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 具有如此酶学性质,尤其是在热稳定性方面表现出众的原因仍然是一个值得研究的方向。通过对底物特异性的研究发现,古菌 *S. tokodaii* 来源的 MTSase 不能利用麦芽糖、壳寡糖,但能利用低成本的麦芽糊精来生产海藻糖。总而言之,作为海藻糖合成途径中的一个关键酶^[19],古菌 *S. tokodaii* strain 7 来源的 MTSase 具有高最适温度,优良的温度稳定性和 pH 稳定性以及在酶法生产海藻糖的工业生产中提高反应速率、避免微生物污染的风险等优势^[10],因此这种极端嗜热酶有望应用于生物工程领域生产海藻糖。

参 考 文 献

- [1] Feofilova EP, Usov AI, Mysyakina IS, et al. Trehalose: chemical structure, biological functions, and practical application[J]. *Microbiology*, 2014, 83(3): 184-194
- [2] Luyckx J, Baudouin C. Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology[J]. *Clinical Ophthalmology*, 2011, 5: 577-581
- [3] Lama L, Nicolaus B, Trincone A, et al. Starch conversion with immobilized thermophilic archaeobacterium *sulfolobus solfataricus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(6): 431-432
- [4] Gueguen Y, Rolland JL, Schroeck S, et al. Characterization of the maltooligosyl trehalose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 194(2): 201-206
- [5] Lernia ID, Morana A, Ottombrino A, et al. Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch[J]. *Extremophiles*, 1998, 2(4): 409-416
- [6] Seo JS, An JH, Cheong JJ, et al. Bifunctional recombinant fusion enzyme between maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase of thermophilic microorganism *Metallosphaera hakonensis*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(9): 1544-1549
- [7] Koh SK, Shin HJ, Kim JS, et al. Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(8): 757-761
- [8] Kato M. Trehalose production with a new enzymatic system from *Sulfolobus solfataricus* KM1[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1999, 6(3): 223-233
- [9] Kobayashi K, Komeda T, Miura Y, et al. Production of trehalose from starch by novel trehalose-producing enzymes from *sulfolobus solfataricus* KM1[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(3): 296-298
- [10] Lévêque E, Janeček Š, Haye B, et al. Thermophilic archaeal amyolytic enzymes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(1): 3-14
- [11] Li ZY, Rong Z, Wang Z, et al. cloning, expression and characterization of a novel esterase (E2q) from a marine bacterium *Altererythrobacter luteolus* SW109^T[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1051-1059 (in Chinese)
李正阳, 戎振, 王昭, 等. 来源于海洋细菌 *Altererythrobacter luteolus* SW109^T 的新型酯酶 E2q 的克隆表达及其酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1051-1059
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428
- [14] Kobayashi M, Kubota M, Matsuura Y. Refined structure and functional implications of trehalose synthase from *sulfolobus acidocaldarius*[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2003, 50(1): 1-8
- [15] Kubota M, Maruta K, Fukuda S, et al. Structure and function analysis of malto-oligosyltrehalose synthase[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2001, 48(2): 153-161
- [16] Tseng WC, Lin CR, Hung XG, et al. Identification of substrate-binding and selectivity-related residues of maltooligosyltrehalose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 56: 53-59
- [17] Nakada T, Ikegami S, Chaen H, et al. Purification and characterization of thermostable maltooligosyl trehalose synthase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(2): 263-266
- [18] Fang TY, Hung XG, Shih TY, et al. Characterization of the trehalosyl dextrin-forming enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092[J]. *Extremophiles*, 2004, 8(4): 335-343
- [19] Nakada T, Maruta K, Tsusaki K, et al. Purification and properties of a novel enzyme, Maltooligosyl Trehalose Synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(12): 2210-2214
- [20] Bao YF, Ying LF, Jiang L. Research progress in renaturation of inclusion body protein[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, 40(2): 84-88 (in Chinese)
包义风, 应莲芳, 蒋琳. 包涵体蛋白复性技术研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2012, 40(2): 84-88