

无氧芽孢杆菌源嗜热海藻糖酶Adb1332的异源表达及酶学性质研究

李源栋^{1,2}, 刘秀明^{1,2}, 杜明波¹, 肖冬^{1,2}, 高莉^{1,2}, 杜刚³, 段焰青^{1,2*}

(1.云南中烟新材料科技有限公司, 云南 昆明 650032; 2.云南中烟工业有限责任公司 技术中心, 云南 昆明 650231;
3.云南民族大学 民族医药学院, 云南 昆明 650504)

摘要:为开发耐高温的高效工业生物催化剂, 该研究人工合成无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus* sp.) YHS0032源嗜热海藻糖酶Adb1332基因, 通过基因重组表达技术在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21中对其进行异源表达, 并通过镍柱亲和层析对其纯化后进行酶学性质表征。结果表明, 嗜热海藻糖酶Adb1332属于GH13_29亚家族, 在大肠杆菌中能成功表达, 其最适反应温度为60℃, 在此温度下持续孵育48 h, 相对酶活仍>80%, 且在40~60℃范围内保持高效催化性能; 最适pH为6.0, 在pH 5.5~7.0条件下孵育24 h, 相对酶活维持在40%以上, 显示出广泛的酸碱适应性。此外, 嗜热海藻糖酶Adb1332可耐受体积分数20%甲醇、10%乙醇及10%异丙醇; Fe²⁺、Mn²⁺和Cu²⁺能促进酶活, 而Hg²⁺则抑制酶活; 吐温20能促进酶活, 而十二烷基硫酸钠抑制酶活; 嗜热海藻糖酶Adb1332对海藻糖具有专一性, 酶促反应动力学参数米氏常数(K_m)值为(284.06±28.58), 最大反应速率(V_{max})为(0.30±0.01) mmol/(L·min), 其主要通过氢键与底物连接, 催化位点为天冬氨酸(Asp)193、Asp323和谷氨酸(Glu)248。该研究为海藻糖酶Adb1332在发酵工业中的应用提供了科学依据。

关键词: 无氧芽孢杆菌; 海藻糖酶; 异源表达; 酶学性质

中图分类号: TS261.2 文章编号: 0254-5071(2026)03-0112-07 doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.03.016

引文格式: 李源栋, 刘秀明, 杜明波, 等. 无氧芽孢杆菌源嗜热海藻糖酶Adb1332的异源表达及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2026, 45(3): 112-118.

Heterologous expression and enzymatic characterizations of the thermophilic trehalase Adb1332 from *Anoxybacillus* sp.

LI Yuandong^{1,2}, LIU Xiuming^{1,2}, DU Mingbo¹, XIAO Dong^{1,2}, GAO Li^{1,2}, DU Gang³, DUAN Yanqing^{1,2*}

(1. New Material and Technology of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650032, China;
2. Technical Centre, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China;
3. College of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650504, China)

Abstract: To develop thermotolerance and highly efficient industrial biocatalysts, the thermophilic trehalase Adb1332 gene derived from *Anoxybacillus* sp. YHS0032 was artificially synthesized and heterologous expressed in *Escherichia coli* BL21 through gene recombination expression technology, and its enzymatic properties were characterized after purification by nickel column affinity chromatography. The results demonstrated that the trehalase Adb1332 belonging to GH13_29 was expressed successfully in *E. coli*. The optimum reaction temperature of enzyme was 60℃, the relative enzyme activity was still over 80% after continuous incubation at this temperature for 48 h, and it maintained highly efficient catalytic performance within the range of 40-60℃. The optimal pH was 6.0, the relative enzyme activity remained above 40% after incubation for 24 h under pH 5.5-7.0, demonstrating a wide range of acid-base adaptability. Additionally, the thermophilic trehalase Adb1332 could tolerance methanol 20% (V/V), ethanol 10% and isopropanol 10%. Fe²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺ could enhance enzyme activity, while Hg²⁺ inhibited enzyme activity. Tween 20 could enhance enzyme activity, while sodium dodecyl sulfate inhibited enzyme activity. The thermophilic trehalase Adb1332 was specific to trehalose, the Michael constant (K_m) value of enzymatic reaction kinetic parameters was (284.06±28.58), and the maximum reaction rate (V_{max}) was (0.30±0.01) mmol/(L·min). The enzyme mainly connected to the substrate through hydrogen bonds, the catalytic sites were aspartic acid (Asp) 193, Asp323 and glutamic acid (Glu) 248. This research provided a scientific basis for the application of trehalase Adb1332 in the fermentation industry.

Key words: *Anoxybacillus* sp.; trehalase; heterologous expression; enzymatic property

海藻糖由两个葡萄糖分子以 α, α -1,1糖苷键连接而成, 是一种性质稳定的非还原性糖, 能耐受高温, 无旋光性^[1]。海藻糖作为一种重要的贮藏碳水化合物和能量来源, 广泛分布于除脊椎动物外的昆虫、真菌、细菌以及植物等

众多生物体内^[2]。病原体产生的海藻糖可能导致顽固性生物膜的形成和发展, 使其对微生物杀菌剂的抵抗力增强, 并通过引起多重感染、污染组织植入物和医疗器械对接受手术的患者构成极大威胁^[3]。

收稿日期: 2025-07-07 修回日期: 2025-10-22
基金项目: 云南中烟工业有限责任公司科技项目(2024XL02); 国家自然科学基金(32460631)
作者简介: 李源栋(1985-), 男, 硕士, 研究方向为天然香料开发及应用。
*通讯作者: 段焰青(1973-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为天然香料开发及应用。

海藻糖酶(EC3.2.1.28)是一种葡萄糖苷水解酶,可以催化一分子海藻糖水解释生成两分子葡萄糖^[4]。根据氨基酸序列分析,在碳水化合物活性酶(Carbohydrate-Active enzymes, CAZy)数据库中,海藻糖酶主要归属于糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)第15、37和65家族^[5],这些海藻糖酶催化结构域(catalytic domain, CD)通常具有(α/α)₆桶状结构,并且有两个氨基酸残基[天冬氨酸(aspartic acid, Asp)和/或谷氨酸(glutamic acid, Glu)]在反转机制中起催化残基的作用^[6]。LIN M G等^[7]在GH13家族中也发现来源于地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的海藻糖酶磷酸化酶TreA,通过蛋白质结构分析,确定其催化残基为Asp和Glu。

在发酵工业中,海藻糖是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在乙醇胁迫下产生的重要应激产物,但酿酒酵母不能利用海藻糖,因此添加海藻糖酶可以提高最后的乙醇产量^[8]。DONG L等^[9]在30%的淀粉糖化液中,添加海藻糖酶MthT,使乙醇转化率(乙醇产量/总葡萄糖)从34.38%提高到51.88%。在谷氨酸发酵过程中同样会产生较多的海藻糖,在发酵过程中添加海藻糖酶能通过降低发酵液中海藻糖的浓度,进而提高谷氨酸得率,减小海藻糖对下游谷氨酸提取的影响^[10]。因为海藻糖对发酵过程有显著的负面影响,因此发掘高活性、高稳定性海藻糖酶对于发酵工业意义重大。

目前为止,已分离并表征了源于细菌、真菌、昆虫、古菌等生物的海藻糖酶,但仍不能完全满足生产需求^[3,11]。基于此,本研究以分离自云南洱源牛街热泉的无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus* sp.)YHS0032为研究对象,采用人工合成技术合成其基因组中的嗜热海藻糖酶Adb1332基因,并通过基因重组技术将其在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行异源表达。通过镍柱亲和层析对嗜热海藻糖酶Adb332粗酶液进行分离纯化后,对其酶学性质进行表征,以期对嗜热海藻糖酶Adb1332在发酵工业中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 基因、质粒与菌株

海藻糖酶Adb1332基因:来源于分离自云南洱源牛街热泉的无氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus* sp.)YHS0032的基因组,由上海生工生物技术有限公司合成;大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞、表达质粒pET28a;上海生工生物技术有限公司。

1.1.2 化学试剂

海藻糖(纯度>98%):上海源叶生物科技有限公司;昆布多糖(纯度>96%)、木聚糖(纯度>95%)、水苏糖(纯度>80%)、葡萄糖(分析纯):上海麦克林生化科技股份有限公司;普鲁兰多糖(纯度>98%)、甘氨酸(分析纯)、盐酸(分析纯)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)(分析纯)、硫酸卡那霉素(分析纯):上海阿拉丁生化科技股份有限公司; β -葡聚糖(纯

度>85%):北京普西唐生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(分析纯):北京兰杰柯科技有限公司;Tris(分析纯):上海贝外塔生物科技有限公司;咪唑、氯化钠、柠檬酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)(均为分析纯):北京化工厂;甲醇、无水乙醇、异丙醇(均为分析纯):天津市大茂化学试剂厂;HyPur T Ni-NTA 6FF (His-Tag) 预装重力柱纯化试剂盒:上海生工生物技术有限公司。

1.1.3 培养基

LB液体培养基^[12]:胰蛋白胨10.0 g/L,酵母提取物5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH 7.2, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。LB固体培养基:在LB液体培养基中添加琼脂20 g/L。

1.2 仪器与设备

H2-16KR台式高速离心机:湖南可成仪器设备有限公司;HC-2517高速离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司;JY96-IIN超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物技术有限公司;MZB-25ZS制冰机:长虹美菱股份有限公司;MULTISKAN FC酶标仪:昆明友宁科技有限公司;WB100-1恒温水浴锅:宁波市鄞州群安实验仪器有限公司;DYY-12型电泳仪:北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 海藻糖酶Adb1332氨基酸序列分析

将海藻糖酶Adb1332的氨基酸序列提交至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI),采用蛋白质基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool for proteins, BLASTP)与非冗余蛋白质序列(non-redundant protein sequence, NR)数据库、通用蛋白质知识数据库(universal protein knowledgebase, UniProtKB)和蛋白质数据库(protein data bank, PDB)中的蛋白质氨基酸序列进行序列相似性检索,并基于邻接法(neighbor-joining, NJ)采用MEGA11软件构建系统发育树。

1.3.2 海藻糖酶Adb1332的异源表达

根据参考文献[13],基于*E. coli*表达宿主对海藻糖酶Adb1332基因进行密码子优化,再由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用NdeI和XhoI内切酶将合成的海藻糖酶Adb1332基因与pET28a质粒进行双酶切后连接,并构建重组质粒pET28a-Adb1332。将重组质粒pET28a-Adb1332导入感受态细胞*E. coli* BL21中,加入500 μ L LB液体培养基,于37 °C、180 r/min条件下培养2 h;将培养液涂布于含有50 μ g/mL卡那霉素抗性的LB固体培养基平板上,于37 °C条件下过夜培养。挑取单菌落,接种到含有50 μ g/mL卡那霉素的5 mL LB液体培养基中,于37 °C、220 r/min条件下培养12 h作为种子液。将种子液按3%的接种量接种于含50 μ g/mL卡那霉素的LB液体培养基中,于37 °C、220 r/min条件下培养至OD_{600nm}值为0.6。随后加入150 μ L IPTG诱导剂(0.5 mol/L),于16 °C、220 r/min条件下培养20 h。

发酵液在8 000 r/min条件下离心10 min收集菌体,用无菌水重悬菌体,8 000 r/min离心10 min收集菌体,重复清洗3次,除去残留的还原糖。采用20 mL pH 7.5的非变性裂解液重悬细胞,加入2 μ L溶菌酶(50 mg/mL),混匀,于冰上酶解30 min后,超声破碎细胞(150 W,1 h,开3 s,关6 s),在8 000 r/min条件下离心20 min,收集上清液即为粗酶液。以*E. coli* BL21 pET28a为对照,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测粗酶液。

1.3.3 海藻糖酶Adb1332的分离纯化

选择10 mL镍柱,用结合液(10 mmol/L咪唑的磷酸缓冲液)平衡镍柱,取破碎上清液过柱,以1倍柱体积的结合液洗脱杂蛋白,然后依次用1倍柱体积不同浓度(30、50、100、150、200和250 mmol/L)的咪唑洗脱液洗脱重组蛋白,分别收集不同浓度的洗脱液。将收集到的液体用于酶活检测和SDS-PAGE分析^[14]。不同浓度的咪唑洗脱缓冲液及SDS-PAGE凝胶的配制参照文献[15-16]。

1.3.4 海藻糖酶活力的测定

采用DNS比色法测定海藻糖酶活力^[17]。海藻糖酶活力定义:1 min催化海藻糖水解产生1 μ mol葡萄糖所需要的酶量。

1.3.5 海藻糖酶Adb1332酶学性质研究

温度对海藻糖酶Adb1332活力的影响:在pH 6.0及不同温度(40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C和90 $^{\circ}$ C)条件下测定酶活力,以确定该酶的最适反应温度。将最高酶活力定义为100%,计算相对酶活。将海藻糖酶Adb1332纯酶液在不同温度(40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C和70 $^{\circ}$ C)条件下孵育48 h,分别在1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、36 h和48 h后采用最适条件测定酶活力,并以未进行温度处理酶液的酶活力定义为100%,计算相对酶活,考察该酶的热稳定性。

pH对海藻糖酶Adb1332活力的影响:配制柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(200 mmol/L,pH 3.0~7.0)和甘氨酸-NaOH缓冲液(200 mmol/L,pH 7.5~9.0),在最适温度及不同pH值(4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0和9.0)条件下测定酶活力,以确定该酶的最适反应pH。将最高酶活力定义为100%,计算相对酶活。将海藻糖酶Adb1332纯酶液置于不同pH的(4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0和9.0)缓冲液中,60 $^{\circ}$ C条件下放置24 h后,采用最适条件测定酶活力,并以未进行pH处理酶液的的酶活力定义为100%,计算相对酶活,考察该酶的pH稳定性。

金属离子与化学试剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响:在海藻糖酶Adb1332纯酶液中分别添加终浓度为0.2 mmol/L、1 mmol/L和5 mmol/L的Fe²⁺、Mg²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、K⁺、Hg²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Na⁺和Zn²⁺以及终体积分数为1%、3%、5%和7%的 β -巯基乙醇、SDS、吐温20、尿素,在最适反应条件下测定酶活力,并以不添加金属离子或化学试剂的酶活力定义为

100%,计算相对酶活,考察不同金属离子及化学试剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响。

有机溶剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响:在最适反应条件下,考察不同体积分数(5%、10%、20%、30%和50%)的有机溶剂甲醇、无水乙醇和异丙醇对该酶活力的影响,以不添加有机溶剂的酶活力定义为100%,计算相对酶活,考察该酶对有机溶剂的耐受情况。

底物特异性分析:在最适反应条件下,分别测定海藻糖酶Adb1332对2%的 β -葡聚糖、水苏糖、海藻糖、木聚糖、昆布多糖和普鲁兰多糖溶液的水解能力。以水解海藻糖的酶活力定义为100%,计算水解其他底物的相对酶活。

动力学参数:采用pH 6.0的缓冲液分别配制浓度为1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、70 mmol/L、90 mmol/L、110 mmol/L、130 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L、258 mmol/L、516 mmol/L、775 mmol/L和1 033 mmol/L的海藻糖溶液。在最适反应条件下,测定海藻糖酶Adb1332的活力,并结合葡萄糖标准曲线计算酶的水解反应速率。以底物浓度(x)为横坐标,反应速率(y)为纵坐标,绘制酶促动力学曲线,求米氏常数K_m和最大反应速率V_{max}。

1.3.6 海藻糖酶Adb1332的分子对接

采用LeDock软件预测海藻糖酶Adb1332的催化过程^[18]。将海藻糖与海藻糖酶Adb1332进行分子对接,结果用PyMOL 2.3.0软件进行可视化。

2 结果与分析

2.1 海藻糖酶Adb1332的氨基酸序列分析

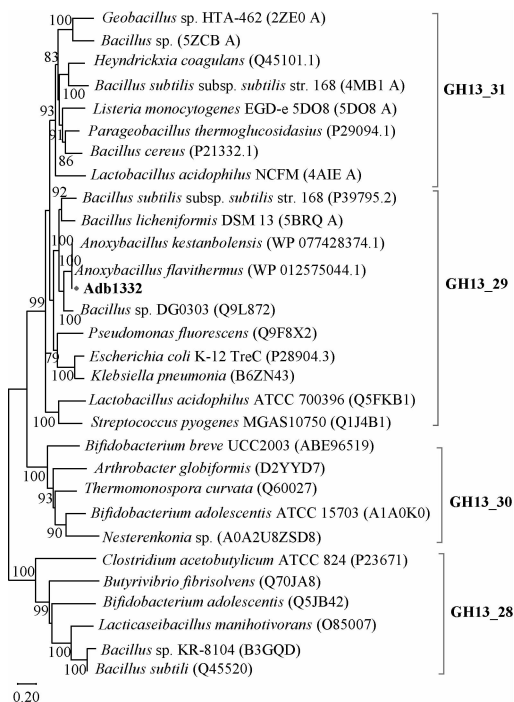


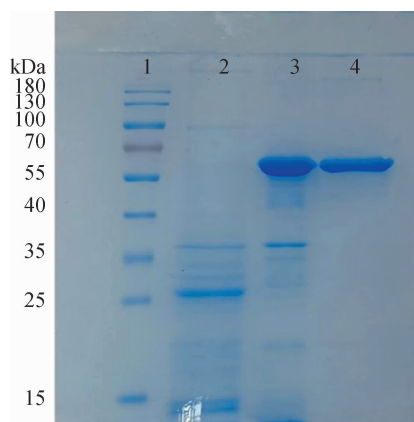
图1 基于氨基酸序列海藻糖酶Adb1332的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of trehalase Adb1332 based on amino acid sequence

基于氨基酸序列海藻糖酶Adb1332的系统发育树见图1。由图1可知,海藻糖酶Adb1332与GH13糖苷水解酶家族29亚家族的氨基酸序列具有最高的相似性且聚为一个分支,表明海藻糖酶Adb1332归属于GH13_29亚家族。

2.2 海藻糖酶Adb1332的异源表达及分离纯化

将粗酶液经Ni柱分离纯化后,采用SDS-PAGE进行检测,结果见图2。由图2可知,与泳道2相比,泳道3在55~70 kDa之间存在一个明显的条带,与海藻糖酶Adb1332的理论分子量66 kDa相符,说明异源表达成功;泳道4在55~70 kDa之间也存在明显的单一条带,说明得到了纯海藻糖酶Adb1332。



1:蛋白Marker;2:*E. coli* BL21 pET28a发酵液;3:粗酶液;4:纯化后的酶液。

图2 海藻糖酶Adb1332的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig. 2 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electropherogram of trehalase Adb1332

2.3 海藻糖酶Adb1332的酶学性质

2.3.1 温度对海藻糖酶Adb1332活力的影响

温度对海藻糖酶Adb1332活力的影响见图3。由图3a可知,在40~90℃范围内,随着温度的升高,海藻糖酶Adb1332活力总体呈现出先升高后下降的趋势;当温度为60℃时,相对酶活最高,说明其最适反应温度为60℃。尽管海藻糖酶Adb1332的最适反应温度低于海洋红嗜热菌(*Rhodothermus marinus*)(88℃)^[19]和嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)(85℃)^[20]来源的海藻糖酶,但仍然高于大多数的酶^[3,21-28],属于典型的耐高温海藻糖酶。

由图3b可知,在40~60℃条件下孵育48 h,海藻糖酶Adb1332的相对酶活>50%。然而,海藻糖酶Adb1332在70℃条件下孵育1 h后,相对酶活迅速下降,相对酶活<30%;在60℃条件下孵育48 h时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活仍>80%,其热稳定性强于嗜热毁丝菌(*Myceliophthora thermophila*)来源的海藻糖酶MthT(60℃孵育3 h后,仅保留60%的相对酶活)^[9]和瘤孢梭孢壳(*Myceliophthora sepeodonium*)来源的海藻糖酶TreM(55℃孵育3 h后,仅保留70%的相对酶活)^[22]。结果表明,海藻糖酶Adb1332显示了良好的热稳定性,具有较强的工业应用潜力^[9,29]。

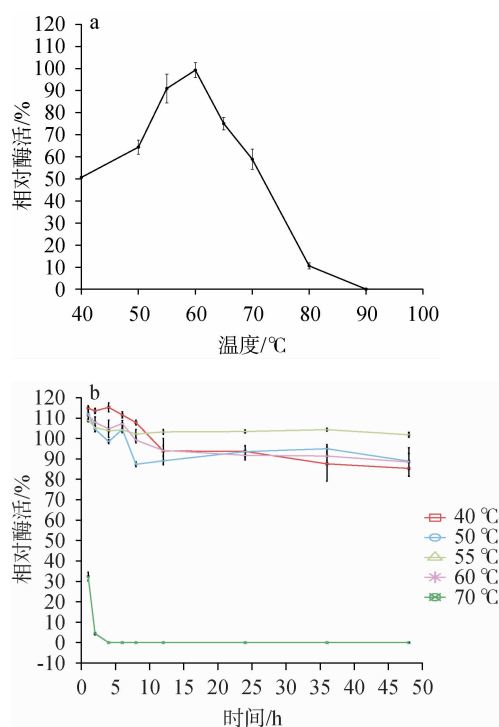


图3 海藻糖酶Adb1332的最适反应温度(a)及温度稳定性(b)
Fig. 3 Optimum reaction temperature (a) and temperature stability (b) of trehalase Adb1332

2.3.2 pH对海藻糖酶Adb1332活力的影响

pH对海藻糖酶Adb1332活力的影响见图4。

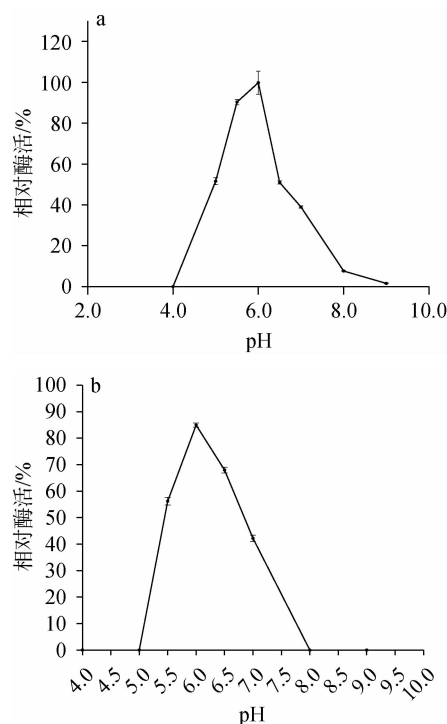


图4 海藻糖酶Adb1332的最适反应pH(a)及pH稳定性(b)
Fig. 4 Optimum reaction pH (a) and pH stability (b) of trehalase Adb1332

由图4a可知,随着pH在4.0~6.0范围内的升高,海藻糖酶Adb1332活力呈先升高后下降的趋势,当pH为6.0时,海藻糖酶Adb1332活力最高,说明海藻糖酶Adb1332的最适pH为6.0。由图4b可知,在温度60℃、pH 6.0条件下孵育24 h,海藻糖酶Adb1332的相对酶活>80%;在温度60℃、pH 5.5~7.0条件下孵育24 h,海藻糖酶Adb1332的相对酶活均>40%,说明海藻糖酶Adb1332在pH 5.5~7.0之间酶活比较稳定。

2.3.3 有机溶剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响

不同有机溶剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响见图5。由图5可知,不同体积分数的有机溶剂对海藻糖酶Adb1332的活力均有抑制作用,且体积分数越大,抑制作用越大。采用5%的甲醇和无水乙醇处理时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活>60%,而采用5%的异丙醇处理时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活<40%;当采用10%的甲醇或无水乙醇处理时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活仍>40%,而分别采用体积分数>20%的甲醇、体积分数>10%的无水乙醇、异丙醇进行处理时,海藻糖酶Adb1332的酶活完全被抑制。结果表明,海藻糖酶Adb1332可分别耐受20%的甲醇、10%的无水乙醇及10%的异丙醇,且海藻糖酶Adb1332在体积分数为10%的甲醇或无水乙醇的环境中,仍保持了40%以上的酶活,使其在乙醇和谷氨酸的发酵等工业生产中具有一定的应用潜力^[9-10]。

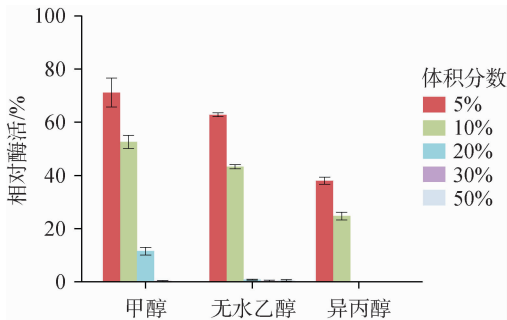


图5 不同有机溶剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响
Fig. 5 Effect of different organic reagents on trehalase Adb1332 activity

2.3.4 金属离子和化学试剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响

不同金属离子和化学试剂对海藻糖酶Adb1332活力的影响见图6。由图6a可知,Hg²⁺对海藻糖酶Adb1332具有明显的抑制作用,当浓度为5 mmol/L时酶几乎失活;当Co²⁺浓度为0.2 mmol/L和1 mmol/L时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活均>100%,而当浓度达到5 mmol/L时,相对酶活明显下降,说明低浓度的Co²⁺会促进海藻糖酶Adb1332的活性,高浓度抑制其活性;Mg²⁺、Ni²⁺、K⁺、Na⁺、Zn²⁺在浓度为0.2~5 mmol/L时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活均保持在90%左右,说明Mg²⁺、Ni²⁺、K⁺、Na⁺、Zn²⁺对海藻糖酶Adb1332的活性

影响较小;Al³⁺在浓度为0.2 mmol/L和1 mmol/L时对海藻糖酶Adb1332的活性影响较小,当浓度达到5 mmol/L时,相对酶活明显上升,说明增加一定浓度的Al³⁺可以促进海藻糖酶Adb1332的活性;Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺在浓度为0.2~5 mmol/L时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活均>100%,有明显的促进作用,说明Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺可以促进海藻糖酶Adb1332的活性。

由图6b可知,吐温20能够促进海藻糖酶Adb1332的活性;SDS对海藻糖酶Adb1332的活力具有明显的抑制作用,当SDS体积分数为1%时,相对酶活力<10%;随着尿素和β-巯基乙醇浓度的升高,对海藻糖酶Adb1332活性的抑制作用越明显,当尿素或β-巯基乙醇的体积分数为7%时,海藻糖酶Adb1332的相对酶活<70%。

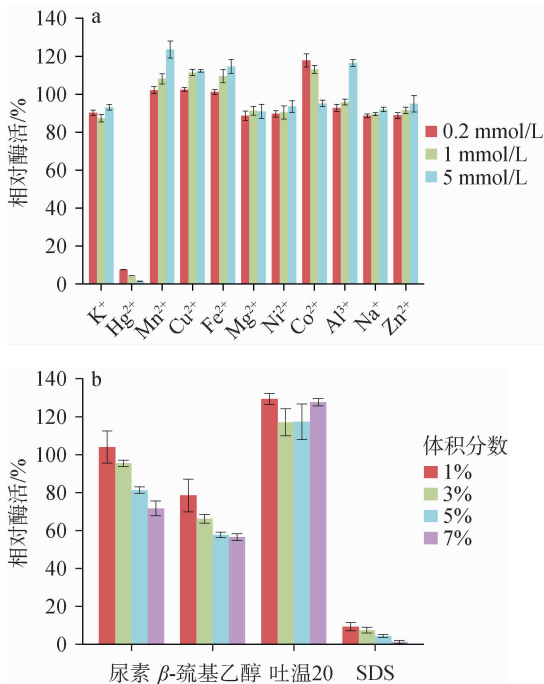


图6 金属离子(a)和化学试剂(b)对海藻糖酶Adb1332活力的影响
Fig. 6 Effect of mental ions (a) and chemical reagents (b) on trehalase Adb1332 activity

综上,Fe²⁺、Mn²⁺和Cu²⁺能促进酶活,浓度≤1 mmol/L的Co²⁺能提高酶活,浓度为5 mmol/L的Al³⁺能提高酶活,而Hg²⁺则抑制酶活,其他金属离子对酶活影响较小。吐温20能提高海藻糖酶Adb1332的酶活,SDS对海藻糖酶Adb1332的酶活具有明显的抑制作用,高浓度的尿素和β-巯基乙醇能抑制海藻糖酶Adb1332酶活。

2.3.5 海藻糖酶Adb1332的底物特异性和动力学研究

在最适反应条件下测定海藻糖酶Adb1332对不同底物的水解效率及酶促反应动力学,结果见图7。由图7a可知,海藻糖酶Adb1332对海藻糖的水解活性最高,对水苏糖具有轻微的水解活性,而对β-葡聚糖、普鲁兰多糖、木聚糖和

昆布多糖几乎没有水解活性。结果表明,海藻糖酶Adb1332对海藻糖具有专一性。由图7b可知,利用米氏方程进行拟合得到米氏常数 K_m 值为 (284.06 ± 28.58) ,表明酶与底物的亲和力较高,最大反应速率(V_{max})为 $(0.30 \pm 0.01) \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

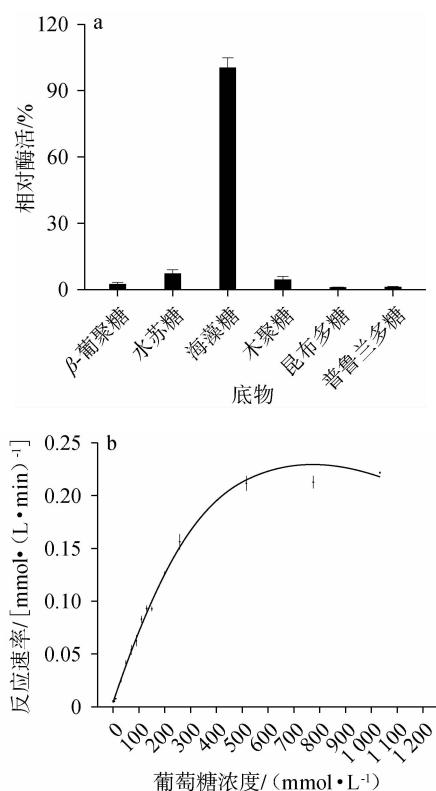


图7 海藻糖酶Adb1332的底物特异性(a)及酶促反应动力学曲线(b)

Fig. 7 Substrates specificity (a) and enzymatic reaction kinetics curve (b) of trehalase Adb1332

2.4 海藻糖酶Adb1332与海藻糖的分子对接

具有最低结合能的海藻糖酶Adb1332与海藻糖的对接模型见图8。

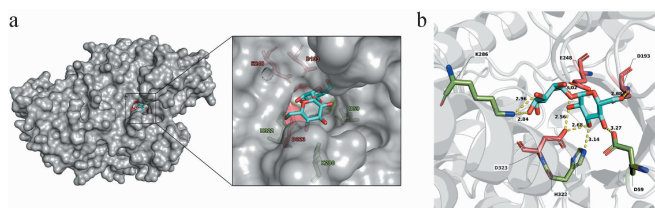


图8 海藻糖酶Adb1332与海藻糖的分子对接结果(a)及作用力(b)

Fig. 8 Molecular docking result (a) and reaction force (b) of trehalase Adb1332 and trehalose

由图8a可知,海藻糖分子对接到海藻糖酶Adb1332的活性口袋中,与天冬氨酸(aspartic acid, Asp)193、Asp323和谷氨酸(glutamate, Glu)248相互作用,催化海藻糖分子水解为2分子葡萄糖。Asp193、Asp323和Glu248三联体构成了海藻糖酶的催化活性位点,在GH13家族中具有高度的保守

性^[7]。Asp193作为亲和催化残基, Glu248作为酸碱催化残基,而Asp323具有稳定酶与底物形成的过渡态复合物的功能,以双交换机制实现底物的催化水解^[7]。由图8b可知, Asp59、组氨酸(histidine, His)332和赖氨酸(lysine, Lys)286与海藻糖通过氢键连接,有助于底物的识别和催化中间体的稳定。

3 结论

本研究首次从云南热泉无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus* sp.) YHS0032中克隆表达新型嗜热海藻糖酶Adb1332 (GH13_29家族), 分子质量为66 kDa。该酶具有高效嗜热性, 最适反应温度为60 $^{\circ}\text{C}$, 在此温度下孵育48 h, 相对酶活仍 $>80\%$, 并在40~60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内维持高催化效率; 其最适pH为6.0, 在pH 5.5~7.0条件下孵育24 h, 相对酶活维持在40%以上, 显示出广泛的酸碱适应性。此外, Adb1332具有良好的有机溶剂耐受性, 可耐受体积分数20%甲醇、10%无水乙醇及10%异丙醇, 且在体积分数为10%甲醇或无水乙醇溶液中相对酶活 $>40\%$, 使其在甲醇或乙醇的工业生产中具有潜在的应用价值。金属离子 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 可明显激活海藻糖酶Adb1332活力, 而 Hg^{2+} 则明显抑制其活力; 吐温20能促进酶活, 而SDS抑制酶活。底物动力学分析证实海藻糖酶Adb1332对海藻糖具有底物专一性, K_m 值为 (284.06 ± 28.58) , V_{max} 为 $(0.30 \pm 0.01) \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 其主要通过氢键与底物连接, 催化位点为天冬氨酸(Asp)193、Asp323和谷氨酸(Glu)248。本研究结果证实了海藻糖酶Adb1332具有在燃料乙醇和谷氨酸发酵应用的潜力, 为生物能源和食品工业提供了高效、稳定的生物催化剂。

参考文献:

- [1] ADHAV A, HARNE S, BHIDE A, et al. Mechanistic insights into enzymatic catalysis by trehalase from the insect gut endosymbiont *Enterobacter cloacae*[J]. *FEBS J*, 2009, 286(9): 1700-1716.
- [2] 王一雯, 马焕, 权淑静, 等. 昆明假单胞菌HL22-2海藻糖合酶基因的克隆、表达及酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 154-159.
- [3] SU C, GONG J S, DONG Q, et al. Efficient production and characterization of a newly identified trehalase for inhibiting the formation of bacterial biofilms[J]. *Int J Bio Macromol*, 2024, 262: 129928.
- [4] GAO H, GONG J S, SU C, et al. Characterization, heterologous expression and engineering of trehalase for biotechnological applications[J]. *SMAB*, 2022, 2(3): 445-460.
- [5] 师东梅, 蒋志洋, 邹雪君, 等. 海藻糖酶结构及其抑制剂的农用活性研究进展[J]. *农药学报*, 2022, 24(5): 1017-1033.
- [6] SAKAGUCHI M. Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(5): 1837-1847.
- [7] LIN M G, CHI M C, NAVEEN V, et al. *Bacillus licheniformis* trehalose-6-phosphate hydrolase structures suggest keys to substrate specificity[J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, 72(1): 59-70.
- [8] 何迎粉, 何荣荣, 刘敦华, 等. 海藻糖与酿酒酵母乙醇耐受性相关性的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(11): 1-4.

- [9] DONG L, LIN X, 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]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2020, 47(1): 133-144.
- [10] 满在伟, 崔慧慧, 李锦, 等. 谷氨酸棒杆菌表达大肠杆菌来源海藻糖酶[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(24): 181-187.
- [11] SHRESTHA P, KARMACHARYA J, KIM K H, et al. Exploration of novel trehalases from cold-adapted *Variovorax* sp. PAMC28711: Functional characterization[J]. **Int J Bio Macromol**, 2024, 271(1): 132503.
- [12] JIRA J, REZEK B, KRIHA V, et al. Inhibition of *E. coli* growth by nanodiamond and graphene oxide enhanced by Luria-Bertani medium[J]. **Nanomaterials**, 2018, 8(140): 1-13.
- [13] BLATTNER F R, PLUNKETT G, BLOCH C A, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12[J]. **Science**, 1997, 277(5331): 1453-1462.
- [14] 高涵. 高活性海藻糖酶的克隆表达及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [15] 申欢欢. 猪圆环病毒 II 型 Cap 蛋白的原核表达、纯化和酶活性探索[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
- [16] 白茹. 白酒酿造用真菌酯化酶的挖掘、表达及催化性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [17] 王俊刚, 张树珍, 杨本鹏, 等. 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J]. 甘蔗糖业, 2008(5): 45-49.
- [18] WANG Z, SUN H, YAO X, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power[J]. **Phys Chem Chem Phys**, 2016, 18: 12964-12975.
- [19] JORGE C D, SAMPAIO M M, HREGGVIDSSON G O, et al. A highly thermostable trehalase from the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*[J]. **Extremophiles**, 2007, 11(1): 115-122.
- [20] MOON J H, LEE W, PARK J, et al. Characterization of a trehalose-degrading enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. **J Biosci Bioeng**, 2016, 122: 47-51.
- [21] ALMEID F M D, BONINI B M, BETON D, et al. Heterologous expression in *Escherichia coli* of *Neurospora crassa* neutral trehalase as an active enzyme[J]. **Protein Expre Purif**, 2009, 65: 185-189.
- [22] DONG L B, YU D, LIN X T, et al. Improving expression of thermostable trehalase from *Myceliophthora sepedonium* in *Aspergillus niger* mediated by the CRISPR/Cas9 tool and its purification, characterization[J]. **Protein Expres Purif**, 2020, 165: 105482.
- [23] WANG Q T, FANG K, QI L, et al. Purification and functional characterization of a soluble trehalase in *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae)[J]. **Insects**, 2022, 13: 867.
- [24] DONG C, FAN Q, LI X, et al. Expression and characterization of a novel trehalase from *Microvirga* sp. strain MC18[J]. **Protein Expres Purif**, 2021, 182: 105846.
- [25] NEYMAN V, FRANCIS F, MATAGNE A, et al. Purification and characterization of trehalase from *Acyrtosiphon pisum*, a target for pest control[J]. **Protein J**, 2022, 41: 189-200.
- [26] WEN Z H, YAN S P, AMUJILATA, et al. Characterization of the trehalase function of *Haemonchus contortus* and its immunomodulatory effect on host PBMCs[J]. **Int J Bio Macromol**, 2025, 309: 143102.
- [27] ZHANG J, YU X, GUAN B, et al. Identification and characterization of a novel cold-adapted GH15 family trehalase from the psychrotolerant *Microbacterium phyllosphaerae* LW106[J]. **Fermentation**, 2022, 8: 471.
- [28] AI D, CHENG S, CHANG H, et al. Gene cloning, prokaryotic expression, and biochemical characterization of a soluble trehalase in *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. **J Insect Sci**, 2018, 18(3): 1-8.
- [29] FEOFILOBA E P, USOV A L, MYSYAKINA I S. Trehalose: chemical structure, biological functions, and practical application[J]. **Microbiol**, 2014, 83(3): 184-194.