

Thermomonospora curvata 淀粉分支酶的过量表达及其催化反应机理研究

范琴^{1,2}, 谢正军², 金征宇^{1,2}, 田耀旗¹

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122) (2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本文以质粒 pET-22b(+)为载体, *Thermomonospora curvata* 淀粉分支酶基因(*TcSBE*)为客体, 采用构建重组大肠杆菌 BL21(pET-22b(+)-*TcSBE*)的方法, 实现 *TcSBE* 过量表达。目标分支酶经分离纯化, 酶活达 90.28 U/mg, 并分别以长直链淀粉和短直链糊精为底物, 研究了 *TcSBE* 作用淀粉机理。结果表明: *TcSBE* 以链间反应模式催化长直链淀粉生成大分子的支链淀粉和小分子的低聚糖; 以短直链糊精为底物时, *TcSBE* 通过水解作用和转糖基作用同时作用于底物, 反应初期, 水解作用较强, 将底物随机水解成聚合度不等的小分子直链糊精, 所需供体链的最低聚合度 (DP) 为 12, 随着反应的进行, 水解作用不断减弱, 转糖基作用增强, 将 DP 3~8 的短链糊精通过 α -1,6 糖苷键与产物相连接, 使产物中分支侧链含量增加, 反应 12 h 后, *TcSBE* 作用产物的 α -1,6 糖苷键含量达到 0.9 mM。

关键词: 淀粉分支酶; 过量表达; 作用机理; 转糖基反应

文章编号: 1673-9078(2016)6-70-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.012

Overexpression of Starch Branching Enzyme from *Thermomonospora curvata* and Its Catalytic Mechanism Research

FAN Qin^{1,2}, XIE Zheng-jun², JIN Zheng-yu^{1,2}, TIAN Yao-qi¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(2.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A gene (*TcSBE*) encoding starch branching enzyme from *Thermomonospora curvata* was cloned into the plasmid of pET-22b(+) and overexpressed in *Escherichia coli* BL21. The recombinant enzyme was purified and showed a high specific activity to amylose with 90.28 U/mg. The reaction mechanism of *TcSBE* was examined relative to its reaction model and transglycosylation for amylose and linear dextrin. The results indicated that *TcSBE* could catalyze the inter-chain branching of amylose into macromolecular amylopectin and micromolecular oligosaccharides. The enzyme simultaneously catalyzed the hydrolysis and transfer reaction as it was incubated with linear dextrin. The recombinant enzyme cleaved linear dextrin into short chains with different degree of polymerization (DP) at a random mechanism, and the minimal donor chain length was DP 12. As the reaction proceeded, the enzyme exhibited a high transglycosylation activity, and predominantly transferred short chains of DP 3-8 throughout the branching process. After 12 h of incubation, the highly branched product contained 0.9 mM α -1,6 linkages from the enzyme reaction with linear dextrin as the substrate.

Key words: starch branching enzyme; overexpression; catalytic mechanism; transglycosylation

淀粉分支酶 (SBE, EC 2.4.1.18), 是淀粉酶家族 GH13 中的一种糖基转移酶, 它一方面能切断由 α -1,4 糖苷键连接成的主链, 一方面又能将切下的短链通过转糖基作用连接于受体链上, 形成 α -1,6 糖苷键^[1-2]。系列产品如多分支淀粉和多分支环糊精具有显著地增

收稿日期: 2015-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571792)

作者简介: 范琴 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 淀粉资源开发与利用

通讯作者: 田耀旗 (1981-), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 淀粉资源开发与利用

因此, 可利用淀粉分支酶制备高分支化淀粉产品。该稠、抗老化以及包埋小分子物质作用, 在食品和医疗行业用途广泛^[3-4]。

分支酶的来源主要有植物、动物和微生物。目前所发现的淀粉分支酶主要为植物来源, 很难用于工业化生产。微生物来源的淀粉分支酶底物专一性高、酶活力强、分支化度大, 在工业应用中具有无可比拟的优势^[5-6]。然而, 天然菌株的产酶能力较低, 且目前报道的微生物来源的淀粉分支酶都为胞内酶, 存在分离纯化困难等问题^[7]。采用构建基因工程菌的方法获取

微生物来源的分支酶,不仅能够大量表达目的蛋白,还可简化后续酶的纯化分离过程。目前对微生物来源分支酶的主要研究集中在发酵条件探索、酶学性质和产物精细结构研究,而对其作用机理的研究则相对较少^[8-10]。不同微生物来源的分支酶其作用机理不同,作用机理将直接影响淀粉中直链与支链的比例、直链淀粉与支链淀粉的聚合度、重均分子量和数均分子量分布、支链淀粉平均链长和平均分支化度,进而影响淀粉的物化特性和加工特性。本研究通过构建基因工程菌的方法,异源性过量表达来源于 *Thermomonospora curvata* 的淀粉分支酶(TcSBE),通过飞行时间质谱、高效分子排阻色谱和高效阴离子色谱等先进手段,研究其作用淀粉机理,为分支酶在淀粉改性过程中的广泛应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要的材料与仪器

大肠杆菌 BL21 菌株:美国 Invitrogen 公司;质粒 pET-22b(+):美国 Novagen 公司;氨基青霉素:美国 Sigma 公司;蜡质玉米淀粉:杭州普罗星淀粉有限公司;马铃薯直链淀粉:美国 Sigma 公司;异淀粉酶(1000 U/mL):爱尔兰 Megazyme 公司;其他所有试剂均为分析纯。

高速冷冻离心机:型号 BIOFUGEPRIMO R, 美国 Thermo Electron 有限公司;冷冻干燥机:美国 Labconco 公司;双光束紫外可见分光光度计:型号 TU-1901, 北京普析通用仪器有限责任公司;AKTA Purifier 100 蛋白分层析纯化系统:瑞典 GE Healthcare 公司;5 mL 镍金属离子亲和色谱柱(Ni-NTA column):瑞典 GE Healthcare 公司;高效尺寸排阻色谱联合多角度激光检测器和示差检测器(HPSEC-MALLS-RI):LC-10AD 输送泵(日本 Shimadzu 公司);Dawn DSP-F 多角度激光散射仪(美国 Wyatt 公司)、示差折光检测器(Waters 2414 differential refractometer)。激光辅助解析/吸附飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS):德国 Bruker Daltonics 有限公司;配有脉冲电流检测器的高效阴离子交换色谱(HPAEC-PAD):250×4 mm 阴离子交换柱(美国 Spectra-Physics 公司),脉冲电流检测器(Dionex ICS-500)。JYD-650 超声细胞破碎仪:上海三信仪器有限公司;SDS-PAGE 电泳仪:美国 Bio-rad 有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 基因工程菌的构建

来源于 *T. curvata* 的淀粉分支酶基因(TcSBE)已在美国国立生物信息中心(NCBI)中公开(NCBI:YP_003301175.1),利用相关信息合成该基因片段。在基因的5'端融入6个组氨酸标签,并将重组基因克隆到质粒 pET-22b(+),得到重组表达质粒 pET-22b(+)-TcSBE。取 5 μL 重组质粒,导入到感受态大肠杆菌,充分混匀后冰浴 15 min,立即放入 42 °C 恒温水浴锅中加热 90 s,再立即冰浴 5 min。将成功转化后的菌株涂布到含有氨基青霉素的 LB 培养基中,37 °C 过夜培养。挑取基因工程菌至 1L LB 培养基扩大培养 6 h,待菌体密度 OD₆₀₀ 达到 0.6 时加入 1 mM 异丙基-β-D- 硫代吡喃半乳糖苷,28 °C 诱导 4 h。高速冷冻离心(10000 r/min, 4 °C)收集菌体。

1.2.2 TcSBE 的分离纯化及其酶活性测定

收集后的菌体加入悬浮液(50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5)悬浮,用超声细胞破碎仪破碎,破碎后高速冷冻离心(10000 r/min, 4 °C)30 min,取上清液采用 Ni-NTA 亲和层析柱实现含有组氨酸标签重组酶 TcSBE 的分离纯化。进样量:5 mL;流动相 A:平衡缓冲液(500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)、流动相 B:淋洗缓冲液(500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)、流动相 C:洗脱缓冲液(500 mM NaCl, 500 mM 咪唑, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5);流速:2 mL/min,柱温:4 °C;蛋白纯化分析系统:AKTA Purifier 100。采用不连续垂直平板电泳系统对纯化后的目标酶进行纯度和分子量鉴定,分离胶浓度为 15% (g/L),浓缩胶浓度为 5% (g/L),电泳采用 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲体系,考马斯亮蓝 R-250 染色。参照 Takata 等人采用的碘染色法测定纯化后的重组酶酶活性^[7]。分支酶活力以 660 nm 波长的吸光度下降百分率表示,以每降低 1% 碘蓝值为一个活力单位。

1.2.3 TcSBE 作用产物的制备

称取 500 mg 直链淀粉,分散于 100 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8.5)中,配成浓度为 5 mg/mL 的淀粉悬浊液。高温高压(120 °C, 100 kPa)条件下糊化 30 min 后置于 55 °C 水浴锅保温。向糊化后的淀粉溶液中加入纯化后的分支酶液(50.0 U/mg 淀粉),分别反应 4 h、6 h、12 h 和 24 h 后,置于沸水浴中灭酶 10 min,10000 r/min 离心 20 min,保留上清液。将上清液和糊化后的直链淀粉溶液旋转蒸发浓缩后冷冻干燥成粉末,即得 TcSBE 作用直链淀粉产物。

1.2.4 淀粉分子量测定

称取 50 mg TcSBE 作用产物,溶于 10 mL 0.1 mol/L 的 NaNO₃ 溶液,沸水浴 30 min 使其完全溶解,将得到的溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,采用 HPSEC-

MALLS-RI 系统分析产物分子量。进样量: 200 μL ; 流动相: 0.1 mol/L 的 NaNO_3 溶液 (含 0.02% NaN_3), 流速为 0.5 mL/min; 凝胶色谱柱: Shodex OHPak SB-806; 柱温: 35 $^\circ\text{C}$ 。MALLS 的光源气体使用波长为 632.8 nm 的氩气和氦气。采用配套分析软件 Astra version 5.3.4 采集示差折光信号和激光散射信号。

1.2.5 淀粉-碘络合物吸光度测定

称取 50 mg TcSBE 作用产物, 分散于 10 mL 去离子水中, 沸水浴 30 min 使其完全溶解。取 0.1 mL 淀粉溶液, 加入 0.2 mL 碘液 (1 mL 碘液中含有 20 mg KI 和 2 mg I_2), 加去离子水定容至 2 mL, 室温下静置 15 min, 以 0.2 mL 碘液直接加去离子水定容至 2 mL 为空白对照, 采用可见光-紫外光谱仪检测淀粉-碘络合物在 660 nm 处吸光度。

1.2.6 α -1,6 糖苷键含量测定

称取 50 mg TcSBE 作用产物, 分散于 10 mL 去离子水中, 沸水浴 30 min 使其完全溶解。取 1 mL 淀粉溶液, 加入异淀粉酶 (7.50 U/g 淀粉), 45 $^\circ\text{C}$ 反应 12 h。采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定脱支前后溶液中还原性末端含量^[11]。脱支前后还原性末端增加量即为在分支酶作用下产物形成的 α -1,6 糖苷键含量^[12]。

1.2.7 低聚糖分子量测定

采用 MALDI-TOF MS 检测低聚糖混合物的分子量。称取 500 mg 直链淀粉, 分散于 100 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8.5) 缓冲液中, 高温高压 (120 $^\circ\text{C}$, 100 kPa) 下糊化 30 min 后置于 55 $^\circ\text{C}$ 水浴锅保温。向糊化的直链淀粉溶液中加入分支酶液 (50.0 U/mg 淀粉), 55 $^\circ\text{C}$ 反应 12 h, 沸水浴中灭酶 15 min。向酶反应体系中加入 2 倍体积的无水乙醇, 10000 r/min 条件下离心 20 min, 保留上清液。将上清液旋转蒸发浓缩后冷冻干燥成粉末, 即得低聚糖样品。称取适量低聚糖样品, 溶于去离子水中, 配成浓度为 5 mg/mL 的低聚糖溶液。取 10 μL 低聚糖溶液, 加入 10 μL 1% (*mV*) 2,5-二羟基苯甲酸, 充分混匀后采用干滴法将样品与标准品点在同一靶点, 待自然风干至形成共结晶薄膜后至仪器中测定。质谱检测条件: 加速电压 19 kV; 反射电压 16 kV; 飞行管长 1.70 m。

1.2.8 直链糊精及其分支产物的制备

称取 1.00 g 蜡质玉米淀粉, 分散于 100 mL 蒸馏水中, 高温高压 (120 $^\circ\text{C}$, 100 kPa) 蒸煮 30 min 使其糊化, 旋转蒸发浓缩后冷冻干燥成粉末。取 500 mg 糊化后的蜡质玉米粉末, 加入 100 mL 柠檬酸钠缓冲液 (0.1 M, pH 3.5), 沸水浴 30 min 使其完全溶解, 冷却至室温后加入异淀粉酶 (7.50 U/g 淀粉), 在 45 $^\circ\text{C}$ 恒温震荡水浴中反应 12 h。完成水解反应的溶液于沸

水浴中煮沸 15 min 灭酶, 5000 r/min 离心 10 min。取上清液, 旋转蒸发浓缩后冷冻干燥成粉末, 即得直链糊精。称取 400 mg 直链糊精, 分散于 100 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8.5) 缓冲液中, 沸水浴 30 min 使其使其完全溶解, 加入纯化后的分支酶液 (50.0 U/mg 淀粉), 分别反应 4 h、6 h 和 12 h 后, 置于沸水浴中灭酶 10 min, 10000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 旋转蒸发浓缩后冷冻干燥成粉末, 即得直链糊精分支产物。

1.2.9 链长分布测定

称取 10 mg 直链糊精分支产物, 分散于 2 mL 柠檬酸钠缓冲液 (0.1 M, pH 3.5) 中, 沸水浴中加热 30 min 使其完全溶解, 加入异淀粉酶 (7.50 U/g 淀粉), 45 $^\circ\text{C}$ 反应 12 h 后于沸水浴中煮沸 15 min 灭酶, 5000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.45 μm 微滤膜, 采用 HPAEC-PAD 检测产物侧链分布。检测条件: GP40 型梯度泵与 ED40 型脉冲安培检测器, CarboPacPA200 色谱柱; 进样量 25 μL ; 流动相 A 为 150 mM NaOH, 流动相 B 为含 500 mM NaAC 的 NaOH (150mM) 溶液; 流速 1 mL/min。

1.3 实验数据

所有数据均为三次实验的平均值, 误差项为标准偏差; 用 Origin 8.5 软件对数据进行拟合及图形化处理。

2 结果与分析

2.1 TcSBE 的过量表达及分离纯化

采用构建重组大肠杆菌 BL21(pET-22b(+)-TcSBE) 方法过量表达来源于 *T. curvata* 的淀粉分支酶。由于在重组基因中融入了 6 个组氨酸标签的基因片段, 表达的目的蛋白能够被 Ni-NTA 亲和柱保留, 从而实现一步纯化。TcSBE 的亲亲和层析图及凝胶电泳图如下:

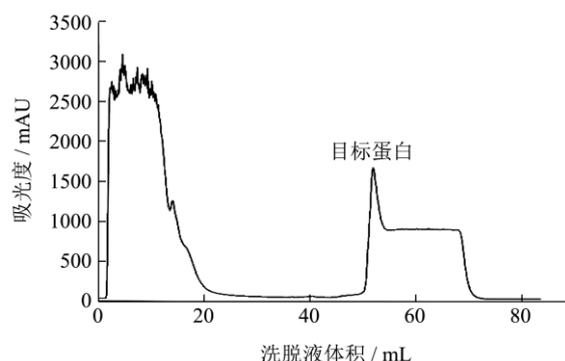


图 1 TcSBE 的 Ni-NTA 亲和层析色谱图

Fig.1 Ni-NTA chromatography of purified TcSBE

由图 1 中可以看出, 经过了预处理的粗酶经过淋

洗缓冲液洗脱后, 不能与柱子填料中的亲和基团整合的杂蛋白均被洗脱下来, 而与 Ni-NTA 柱结合的目的蛋白经洗脱缓冲液洗脱后, 呈现出成分单一的单型峰。采用 SDS-PAGE 电泳对分离纯化后的酶蛋白进行纯度及分子量测定, 结果如图 2 所示。由图中可以看出, 经亲和纯化后 TcSBE 的电泳条带较单一, 结合图 1a 和图 2, 可以看出成功地表达目标酶, 其分子量为 84 KDa, 与 NCBI 数据库查询结果一致。纯化后的 TcSBE 比酶活为 90.28 U/mg。

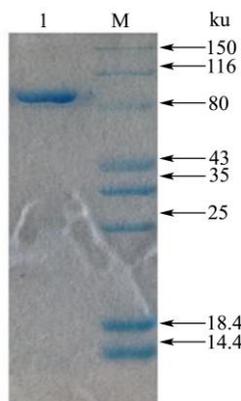


图 2 TcSBE 的凝胶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified TcSBE

注: M.标准蛋白样品; 1.重组酶 TcSBE。

2.2 TcSBE 的反应模式

不同来源的分支酶反应方式各不相同, 其作用产物结构和理化性质亦各不相同。分支酶的反应模式有三种, 分别是链间反应、链内反应和环化反应。大多数分支酶催化底物进行环化反应^[7], 也有少数微生物的分支酶催化底物进行链间反应^[9]。催化底物进行链内反应的微生物还未见报道。

直链淀粉不含分支侧链, 因此可作为探究分支酶反应模式的理想底物。分支酶在链间反应模式下首先将直链淀粉水解为小分子直链糊精, 酶进而通过转糖基作用将水解的小分子物质转移至直链淀粉并形成 α -1,6 糖苷键, 最终形成大分子的分支淀粉和小分子葡聚糖两种产物。图 3 为直链淀粉经 TcSBE 作用不同时间后产物的高效排阻色谱图。由图可知, 直链淀粉经酶作用不同时间后, 产物出峰时间发生了不同程度的位移。反应 4 h 后, 产物出峰时间右移, 分子量从 $5.86E+5$ 降至 $2.27E+3$, 表明经 TcBE 作用后直链淀粉被水解成小分子直链糊精; 6 h 后, 产物出峰时间左移, 且出现双峰, 说明水解产生的直链糊精经过分支酶的转糖基作用, 生成了分子量较大的分支淀粉, 以及含有经水解后未被转移的小分子葡聚糖。反应 12 h 后, 双峰转变成单峰, 产物分子量为 $1.02E+6$, 说明溶液

中分散的小分子直链糊精被转移形成分支侧链, 最终形成了分子量较大的支链淀粉。

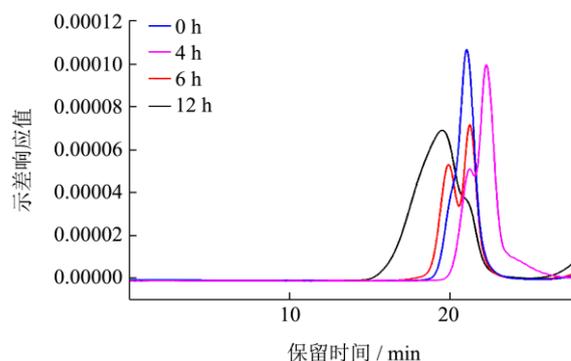


图 3 TcSBE 作用产物的高效分子排阻色谱图

Fig.3 HPSEC analysis of amylose treated by TcSBE with different duration times

为进一步验证 TcSBE 的作用模式, 将酶反应体系上清液中的小分子葡聚糖产物进行质谱分析, 其结果如下图 4 所示:

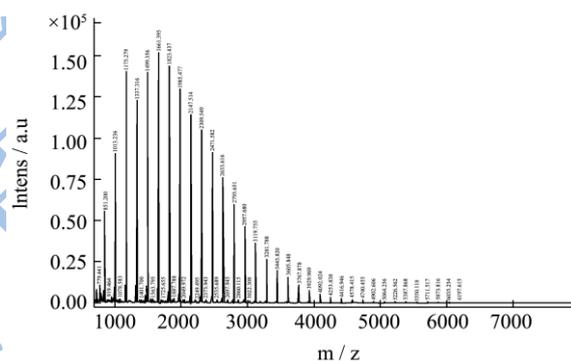


图 4 TcSBE 作用产物中小分子葡聚糖的激光辅助解析/吸附飞行时间质谱图

Fig.4 MALDI-TOF MS analysis of small α -glucan fragments from TcSBE reaction with amylose

由图可知, 飞行时间质谱仪不仅可以检测出某一单种物质的分子量, 而且可以检测出混合物的分子量, 分支酶作用产物中低聚糖分子量分布范围为 $779.441 \sim 6167.615$, 聚合度范围为 DP 5~38。表 1 列出了非环化葡聚糖分子和环化葡聚糖分子的理论分子量以及产物的实测分子量。非环化物质的分子量为 $162n + 18 + 23$ Da, 其中 162 代表葡萄糖残基的分子量, n 为 DP 值, 18 为还原末端残基分子量, 23 表示 Na 离子分子量; 而环化葡聚糖的理论分子量为 $162n + 23$ Da。从表 1 中可以看出, 飞行质谱中所检测到的小分子物质分子量与非环化葡聚糖的理论分子量一致, 说明分支酶催化产生的小分子物质中没有环化物质。为了进一步证明 TcSBE 作用的大分子物质为分支淀粉且没有环化结构的分支环糊精存在, 采用葡萄糖糖化酶对大分子产物其进行水解, 水解后的产物经乙醇沉

淀后无白色絮状沉淀生成。结果表明, TcSBE 作用的分支产物为多分支淀粉, 经葡糖糖化酶水解后被全部降解为葡萄糖, 从而经乙醇作用无白色絮状沉淀产生。以上结论表明, TcSBE 作用直链淀粉的模式为直链淀粉间的链间反应, 产物中大分子物质为多分支淀粉,

小分子物质为直链葡聚糖。相对于 TcSBE 的链间反应模式, 大部分微生物来源的分支酶催化底物进行环化反应, 反应产物为多分支环糊精, 例如 *Bacillus stearothermophilus*^[3], *Bacillus subtilis*^[4] 和 *Aquifex aeolicus*^[7] 等。

表 1 环化和非环化葡聚糖的理论分子量及 TcSBE 作用产物中小分子物质的实测分子量

Table 1 Theoretical molecular masses of cyclic and noncyclic glucans and experimental molecular masses of oligosaccharides from TcSBE reaction with amylose

DP	分子量/u			DP	分子量/u		
	理论值		实测值		理论值		实测值
	低聚糖 (非环化)	低聚糖 (环化)			低聚糖 (非环化)	低聚糖 (环化)	
5	851	833	851.22 ±0.05	22	3605	3587	3605.85 ±0.02
6	1013	995	1013.24 ±0.02	23	3767	3749	3767.88 ±0.01
7	1175	1157	1175.28 ±0.03	24	3929	3911	3929.97 ±0.01
8	1337	1319	1337.32 ±0.04	25	4091	4073	4092.02 ±0.02
9	1499	1481	1499.36 ±0.03	26	4253	4235	4253.84 ±0.02
10	1661	1643	1661.395 ±0.02	27	4415	4397	4416.95 ±0.02
11	1823	1805	1823.44 ±0.03	28	4577	4559	4578.42 ±0.03
12	1985	1967	1985.48 ±0.01	29	4739	4721	4740.46 ±0.05
13	2147	2129	2147.51 ±0.04	30	4901	4883	4902.61 ±0.04
14	2309	2291	2309.55 ±0.03	31	5063	5045	5064.26 ±0.02
15	2471	2453	2471.58 ±0.05	32	5225	5207	5226.56 ±0.02
16	2633	2615	2633.62 ±0.03	33	5387	5369	5387.87 ±0.01
17	2795	2777	2795.65 ±0.02	34	5549	5531	5550.12 ±0.03
18	2957	2939	2957.68 ±0.04	35	5711	5693	5711.52 ±0.04
19	3119	3101	3119.76 ±0.01	36	5873	5855	5873.62 ±0.03
20	3281	3263	3281.79 ±0.03	37	6035	6017	6035.25 ±0.03
21	3443	3425	3443.82 ±0.04	38	6197	6179	6197.62 ±0.02

2.3 TcSBE 的水解作用和转糖基作用

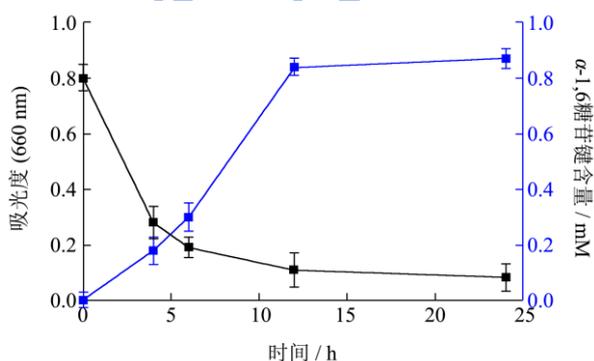


图 5 直链淀粉吸光度和 α -1,6 糖苷键含量随酶作用时间的变化

Fig. 5 Time course experiment of absorption and introduced α -1,6 linkages from TcBE reaction with amylose
通过检测不同反应时间下 TcSBE 作用产物吸光

度和 α -1,6 糖苷键含量表征 TcSBE 水解作用和转糖基作用随时间的变化, 其结果如下图 5 所示。

由图可知, TcSBE 作用直链淀粉 4 h 后, 吸光度迅速从 0.80 降至 0.29, 而 α -1,6 糖苷键增加量仅为 0.05 mM, 说明分支酶的水解作用和转糖基作用同时进行, 且反应初期分支酶主要体现的是水解活性; 随着反应的进行, 吸光度下降速率降低, 而还原末端上升速率增加, 反应 6 h 后, 吸光度和 α -1,6 糖苷键含量分别为 0.19 和 0.30 mM。反应 12 h 后, 侧链含量迅速增至 0.84 mM, 说明反应后期, 转糖基活力增强, 能将反应初期分支酶水解的小分子葡聚糖通过转糖基作用连接于受体链上形成分支。24 h 后吸光度与还原性末端的含量与 12 h 相比, 变化量弱, 说明分支酶作用底物 12 h 即可基本反应完全。

为了进一步阐明 TcSBE 作用淀粉过程中水解作用和转糖基作用随时间的变化, 采用 HPAEC-PAD 分

析分支产物脱支前后链长分布状况。HPAEC-PAD 检测范围为 $DP \leq 60$, 因此采用蜡质玉米脱支后的直链糊精为底物。图 6a 显示制备的直链糊精的 DP 分布范围为 6~60, 其中 DP 10~20 的直链糊精含量居多。反应 4 h 后, $DP \geq 20$ 直链糊精的相对峰面积变化量为负值 (图 6d), 说明该聚合度范围的葡聚糖长链在反应过程中被分支酶水解, 充当供体链。6 h 后, $DP \geq 18$ 的直链糊精的相对峰面积变化量为负值 (图 6g), 12 h 后, $DP \geq 12$ 直链糊精的相对峰面积变化量为负值 (图 6j), 说明 TcSBE 优先水解 $DP \geq 20$ 的长链, 随着反应的进行, 逐渐水解 $12 < DP < 20$ 的中长链, 且分支酶作用底物所需供体链的最低聚合度为 DP 12。图 6d 显示, 反应初期 $DP < 20$ 的侧链含量增加, 且出现了 $3 \leq DP \leq 5$ 的新链长, 随着反应的进行, $DP < 12$ 的相对峰面积变化量为正值 (图 6j), 说明分支酶水解长链 ($DP > 20$), 并将水解的小分子葡聚糖 ($DP < 12$) 通过糖基转移作用转移至受体链上, 并形成 α -1,6 糖苷键。其中, DP 3~8 的侧链增加量最多, 说明分支酶虽然将 $DP > 20$ 的长链随机水解成 DP 不同的短链, 但优先转移 DP 3~8 的侧链形成分支。反应初期, 脱支前的链长分布显示 (图 6b), 经酶作用后大部分 DP 3~20 的葡聚糖是可溶的, 并没有通过转糖基作用连接于受体链上形成 α -1,6 糖苷键。这说明分支酶在作用淀粉过程中, 转糖基作用和水解作用是同时进行的, 且在反应初期, 分支酶的水解活性远高于转糖基活性, 致使分支酶水解的小分子葡聚糖链只有少部分通过转糖基作用形成分支。随着反应的进行, 可溶性低聚糖含量明显减少 (图 6e 和图 6h), 这说明随着反应的进行, 分支酶转糖基活性不断增强, 将水解的短链通过转糖基作用连接于受体链上, 形成分支侧链。大部分微生物来源的分支酶其水解作用和转糖基作用是同时进行, 然而不同微生物来源的分支酶其转糖基强弱随时间变化规律不尽相同, 因此其产物侧链分布亦不同。例如来自于 *A. aeolicus* 的分支酶能以环化反应方式催化支链淀粉生成支链环糊精, 虽然底物的长链含量经分支酶作用后明显减少, 但是其产物的侧链分布无明显变化, 说明其水解活性明显高于转糖基活性^[7]。来自于 *Rhodothermus obamensis* 的分支酶能以链间反应模式作用 DP 6~24 的直链糊精, 该分支酶以 $DP \geq 10$ 的直链糊精为供体链, 并优先转移 $DP \geq 12$ 的直链。反应 24 h 后, 产物中 DP 3~5 的侧链明显增加, 然而增加的大部分短链来自于分支酶的水解作用, 并未通过转糖基作用连接于受体链上, 说明其转糖基作用较弱^[5]。

在早期的研究中, 分支酶主要应用淀粉加工, 如

合成环糊精, 用于改善食品风味^[3]; 提高支链淀粉的分支度, 用于抗老化和增加烘焙食品体积等^[6]。然而, 分支酶在制备慢消化性淀粉中也较好的应用价值。来自 *T.curvata* 的分支酶具有较强的转糖基作用, 并能以链间反应模式作用直链淀粉催化生成富含 DP 3~8 短侧链的多分支淀粉。有研究指出, 提高淀粉分支度, 增加短侧链 ($DP < 13$) 含量可以显著降低淀粉消化率, 增强淀粉的缓释特性^[13], 因此可利用 TcSBE 制备功能性慢消化淀粉。此外, TcSBE 在医药领域也有广泛的应用前景, 富含短侧链的多分支淀粉可作为多肽和蛋白质等活性功能成分的生物可降解包衣载体, 提高药物在小肠中靶向释放的效果和安全性^[14]。

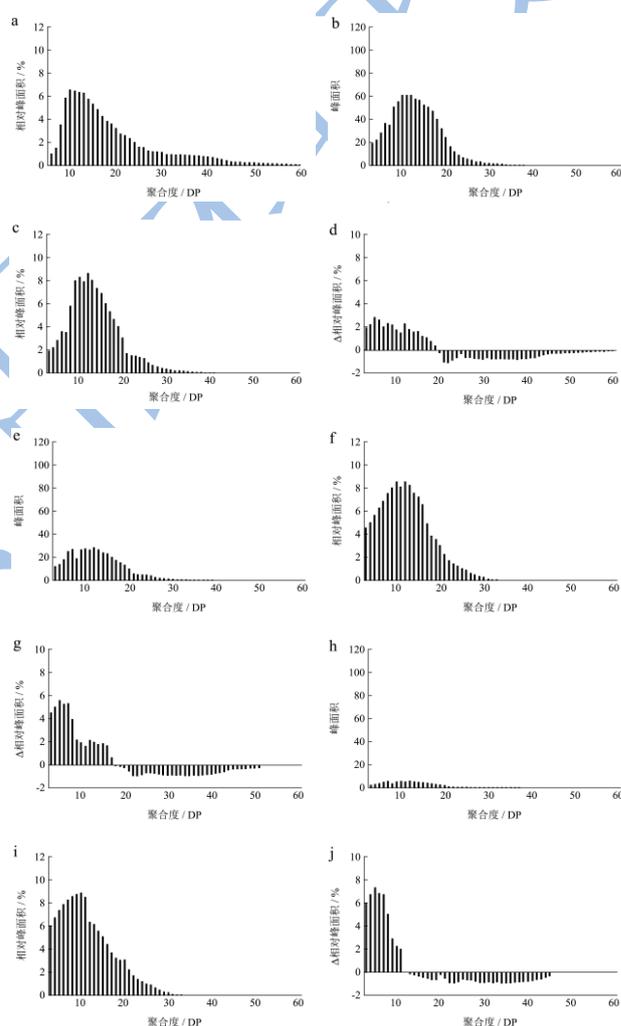


图6 直链糊精经 TcSBE 作用前后的链长分布高效阴离子色谱图
Fig.6 Chain length distribution (CLD) of linear dextrin before and after modification by TcSBE

注: (a) 直链糊精的链长分布; (b) TcSBE 作用 4 h 后产物脱支前链长分布; (c) TcSBE 作用 4 h 后产物脱支后链长分布; (d) (c) 和 (a) 的差异图 (c-a); (e) TcSBE 作用 6 h 后产物脱支前链长分布; (f) TcSBE 作用 6 h 后产物脱支后链长分布; (g) (f) 和 (a) 的差异图 (f-a); (h) TcSBE 作用 12 h 后产物脱

支前链长分布; (i) TcSBE 作用 12 h 后产物脱支后链长分; (j) (i) 和 (a) 的差异图 (i-a)。

3 结论

本文通过构建基因工程菌的方法, 过量表达来源 *T. curvata* 的淀粉分支酶 TcSBE, 并研究了该酶作用淀粉机理。研究表明, TcSBE 对直链淀粉具有较高的亲和性, 能将直链淀粉催化为支链淀粉, 无环化结构的副产物, 酶作用方式为直链淀粉分子间的链间反应。TcSBE 作用淀粉初期, 表现出较强的水解活性, 能将 DP>20 的长链随机水解成 DP 不同的短链, 随着反应的进行, 水解作用减弱, 转糖基活性增强, 大量转移 DP 3-8 的葡聚糖短链并通过 α -1,6 糖苷键连接于受体链上, 形成多分支淀粉, 在制备功能性慢消化淀粉、包埋载体等领域具有潜在应用。

参考文献

- [1] Suzuki R, Koide K, Hayashi M, et al. Functional characterization of three (GH13) branching enzymes involved in cyanobacterial starch biosynthesis from *Cyanobacterium* sp. NBRC 102756 [J]. BBA Proteins & Proteomics, 2015, 1854(5): 476-484
- [2] Tetlow I J, Emes M J. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis [J]. IUBMB life, 2014, 66(8): 546-558
- [3] Takata H, Akiyama T, Kajiura H, et al. Application of branching enzyme in starch processing [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2010, 28(1): 60-63
- [4] Lee C K, Le Q T, Kim, Y H, et al. Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster [J]. J. Agric. Food Chem., 2008, 56(1): 126-131
- [5] Roussel X, Lancelon-Pin C, Viksø-Nielsen A, et al. Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013, 1830(1): 2167-2177
- [6] Wu S P, Liu Y, Yan Q J, et al. Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel glycogen branching enzyme from *Rhizomucor miehei* and its application in wheat breadmaking [J]. Food chemistry, 2014, 159: 85-94
- [7] Takata H, Takaha T, Kuriki T, et al. Properties of branching enzyme from hyperthermophilic bacterium, *aquifex aeolicus*, and its potential for production of highly-branched cyclic dextrin [J]. Journal of Applied Glycoscience, 2003, 50(1): 15-20
- [8] 鲍春辉, 顾正彪, 李才明, 等. 重组大肠杆菌产淀粉分支酶的发酵条件探索 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(15): 155-162
- [9] BAO Chun-hui, GU Zheng-biao, LI Cai-ming, et al. Optimizations of fermentation production of starch branching enzyme in recombinant *Escherichia coli* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 155-162
- [10] Lee Y H, Kim S K, Kim Y H, et al. Characterization of the glycogen branching enzyme from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY₃₄ [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(1): 78-88
- [11] Brummell D A, Watson L M, Zhou J, et al. Overexpression of STARCH BRANCHING ENZYME II increases short-chain branching of amylopectin and alters the physicochemical properties of starch from potato tuber [J]. BMC Biotechnology, 2015, 15(1): 129-143
- [12] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536
- [13] ZHAO Kai, XUE Peng-ju, GU Guang-ye. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method [J]. Food Science, 2008, 29(8): 534-536
- [14] van der Maarel M J E C, Leemhuis H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(1): 116-121
- [15] LI Xingfei, MIAO Ming, Jiang Huan, et al. Partial branching enzyme treatment increases the low glycaemic property and α -1,6 branching ratio of maize starch [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 502-509
- [16] MIAO Ming, JIANG Bo, Steve W C, et al. Slowly digestible starch-a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(12): 1642-1657