

葡聚糖蔗糖酶及其家族在结构与功能上的研究进展

黎志德, 刘桂云, 常国伟, 梁达奉, 黄曾慰*

(广东省科学院生物与医学工程研究所, 广东省酶制剂与生物催化工程技术研究中心, 广东广州 510316)

摘要: 葡聚糖蔗糖酶是一类从蔗糖合成具有不同结构和物理化学性质的 α -葡聚糖的酶工具。这些 α -葡聚糖在食品、医学和生物材料等方面具有多种商业应用价值, 特别是用于开发填充型甜味剂、益生元和面团改良剂。糖苷水解酶第 70 家族的其他亚家族的发现将反应底物扩展到淀粉和糊精, 丰富了产物中糖苷键的种类和组成方式, 扩大了合成新型 α -葡聚糖的范围。序列比对和构象分析结果表明: 通过对关键氨基酸残基进行突变或修饰, 可有效改变产物的糖苷键构成、分子量和支化程度; GtfB、GtfC 和 GtfD 是 GtfA 亚家族和糖苷水解酶第 13 家族的进化中间产物。该综述介绍了 α -葡聚糖的分类和常见的糖苷水解酶第 70 家族成员, 对酶构效关系方面的关键进展进行分析, 并展望通过酶工程技术去理性设计更高效、更稳定、更个性化的 α -葡聚糖合成工具。

关键词: α -葡聚糖; 葡聚糖蔗糖酶; 蛋白质结构; 生物合成

文章编号: 1673-9078(2023)12-336-344

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0486

Research Advances in Structural and Functional Properties of Glucansucrases and their Families

LI Zhide, LIU Guiyun, CHANG Guowei, LIANG Dafeng, HUANG Zengwei*

(Institute of Biological and Medical Engineering, Guangdong Academy of Sciences, Guangdong Province Enzyme Preparation and Biocatalysis Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510316, China)

Abstract: Glucansucrases are promising enzymatic tools for the synthesis of α -glucans with different structural and physicochemical properties from sucrose. These α -glucans have been found to have a variety of commercial applications in food, medicine, and biomaterials, particularly in the development of filled sweeteners, prebiotics, and dough improvers. The discovery of other subfamilies of the glycoside hydrolase family 70 (GH70) extended the reaction substrate to starch and dextrin, increased the variety and composition of glycosidic bonds in the product, and developed the scope for synthesizing novel α -glucans. Based on sequence comparisons and conformational analysis, it was found that the glycosidic bond composition, molecular weight, and degree of branching of the products were altered by mutation or modification of key amino acid residues. GtfB, GtfC and GtfD are evolutionary intermediates of dextransucrase (GtfA) and GH13. This paper introduces the classification of α -glucan and common GH70 members, analyzes key advances in enzyme conformational relationships, and outlines the rational design of more efficient, stable, and diverse α -glucan synthesis tools using enzyme engineering techniques.

Key words: α -glucan; glucansucrase; protein structure; biosynthetic

引文格式:

黎志德, 刘桂云, 常国伟, 等. 葡聚糖蔗糖酶及其家族在结构与功能上的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 336-344

LI Zhide, LIU Guiyun, CHANG Guowei, et al. Research advances in structural and functional properties of glucansucrases and their families [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 336-344

葡聚糖是一类结构多样的天然产物, 普遍存在于细菌、真菌以及植物等生命体中^[1]。 α -葡聚糖因具有

收稿日期: 2023-04-25

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB21220054); 广东省科学院发展专项资金项目(2022GDASZH-2022010110)

作者简介: 黎志德(1987-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: lzdandyoli@hotmail.com

通讯作者: 黄曾慰(1984-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zengwei.huang@qq.com

稳态调节肠道菌群的特性, 被认为是一种重要的膳食补充剂^[2]。因此, 关于如何高效精准合成 α -葡聚糖的研究被愈发重视, 以葡聚糖蔗糖酶为代表的糖苷水解酶第 70 家族则是众多生物合成工具中的佼佼者。此家族催化产物难以化学合成, 具有结构和生理功能多样等特点, 同时由于不需加入昂贵的 UDP-葡萄糖, 相较于其他合成工具, 在生产成本上呈现明显优势^[3-5]。

葡聚糖蔗糖酶(Glucansucrases, GSs)又被称为葡萄糖基转移酶(Glucosyltransferase, Gtf), 是糖苷

水解酶第 70 家族的首个成员,由乳酸菌分泌并可以催化蔗糖合成 α -葡聚糖。葡聚糖蔗糖酶被划分为 GtfA、GtfB、GtfC 和 GtfD (Glucosyltransferase A/B/C/D) 四个亚家族。它们在蛋白质结构上均以 4 个保守氨基酸序列作为活性基序,由 Asp、Glu 和 Asp 组成催化残基^[6],反应过程中包含供体糖链中 α -糖苷键的断开^[7,8]及酶-糖基中间体的形成^[9]。在碳水化合物活性酶数据库分类系统中,由于糖苷水解酶第 13、17 和 70 家族在功能,活性位点和蛋白序列的相似性,三者都被划分到 GH-H 超家族^[10]。本研究团队在利用葡聚糖蔗糖酶生产特定分子量 α -葡聚糖有一定研究基础,在此论文中将主要阐述葡聚糖蔗糖酶及其家族蛋白结构和功能之间的联系,并展望在食品、医学和生物材料中应用的潜力。

1 α -葡聚糖的结构及合成酶

葡聚糖蔗糖酶及其家族成员可将蔗糖或淀粉类底物转化为由 α -D-吡喃葡萄糖单体构成的多糖。这些酶多数来源于明串珠菌属、链球菌属、乳杆菌属和魏斯氏菌属,少数来源于嗜果糖乳酸菌属,酒球菌属和肠球菌属^[11,12]。多数菌株只分泌一种葡聚糖蔗糖酶,少数能产生多种,如肠膜明串珠菌 NRRL B-1299^[13-15]。同一菌株内不同的葡聚糖蔗糖酶可产生多种产物^[16]或协同生成单一产物^[15]。不同菌株的分泌条件各异,如链球菌为组成型表达^[17],明串珠菌受到蔗糖特异性诱导表达^[18-20]。不同的酶和反应条件,可产生糖苷键组成、分子量和分支程度各异的 α -葡聚糖,结构差异导致了理化性质和生理活性的多样性。一般而言,可以根据 α -葡聚糖主链上主要的糖苷键类型,分为四类: Dextran、Mutan、Reuteran 和 Alternan。

1.1 主要由 α -1,6 键连接为主要构成的 Dextran

Dextran,又名右旋糖酐,是水溶性 α -葡聚糖,主要通过 α -1,6 糖苷键连接形成长度和排列不一的糖链,糖链间由 α -1,2, α -1,3 和 α -1,4 糖苷键连接。相关合成酶首先在明串珠菌中发现,被命名为右旋糖酐蔗糖酶^[21],后续在链球菌属^[22]、乳杆菌属^[23]和魏氏菌属^[24]等菌种中均有发现。

葡聚糖蔗糖酶各家族成员中,右旋糖酐蔗糖酶是被鉴定最多,研究最为广泛的,催化产物由占多数的 α -1,6 糖苷键和少量 α -1,3 糖苷键组成,以线性结构为主,如最常见的商业化菌株 *Leuconostoc mesenteroides* NRRB-512F,可将蔗糖转化为由 95%的 α -1,6 糖苷键和 5%的 α -1,3 糖苷键连接组成的右旋糖酐,相对分子质量可达 1 000 ku^[25]。少数菌株催化产物具有高度支

化结构,如 *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299,所生成的右旋糖酐中除占主要的 α -1,6 糖苷键外,还包含约 30%的 α -1,2 及少量 α -1,3 糖苷键^[26]。该菌株分泌的六种葡聚糖蔗糖酶,分别命名为 DSR-A、DSR-B、DSR-E、DSR-M、DSR-P 和 BRS-A。其中 DSR-A、DSR-B、DSR-P 和 DSR-M 的催化产物以 α -1,6 糖苷键连接为主^[13-15],DSR-E 和 BSR-A 则催化生成 α -1,2 糖苷键分支。DSR-E 有两个具备完整催化活性及高度区域特异性的催化结构域,并通过葡聚糖结合结构域连接^[27]。第一催化结构域(CD1)合成以 α -1,6 键为主的线性葡聚糖链,第二催化结构域(CD2)通过合成 α -1,2 糖苷键来修饰葡聚糖受体形成分支^[27]。BSR-A 与 DSR-E 的第二催化结构域具有显著的序列同源性,催化生成 α -1,2 糖苷键分支的反应特异性和高效的催化活性^[15,28,29]。*Leuconostoc citreum* NRRL B-742 合成产物具有由 α -1,6 糖苷键连接的主链和单个 α -1,3 糖苷键接枝组成的梳状结构^[30]。后续研究通过序列比对分析,鉴定出一种可在高 α -1,3 糖苷键含量葡聚糖链中建立分支的葡聚糖蔗糖酶,并命名为 BSR-B。此类具有相似分支特异性的葡聚糖蔗糖酶在欺诈骗明串珠菌和昆氏乳杆菌等菌株分布较为普遍^[31,32]。

1.2 由 α -1,3 键连接为主要构成的 Mutan

Mutan,又名变聚糖,是不溶于水的 α -葡聚糖,主链中由大于 50%的 α -1,3 糖苷键和少量的 α -1,6 键连接组成。合成 Mutan 的突变蔗糖酶主要存在于链球菌中,如 *Streptococcus mutans* GS5,同时在乳酸杆菌和明串珠菌中也有发现^[33]。变形链球菌和远缘链球菌将蔗糖转化为不溶性葡聚糖是龋齿发生的关键步骤^[33,34]。

1.3 由 α -1,4 键构成主链, α -1,6 键连接支链的 Reuteran

Reuteran,又名罗伊糖,是水溶性 α -葡聚糖,通过单个 α -1,6 糖苷键桥接各段 α -1,4 糖苷键组成的糖链。罗伊糖蔗糖酶,又名 4,6- α -葡萄糖基转移酶,主要存在于罗伊氏乳杆菌中,催化产物由数量不一的 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键连接构成^[35-37]。被研究最多的是益生菌 *Lactobacillus reuteri* 121,能合成由 α -1,4 糖苷键连接主链, α -1,6 键连接单个分支和短链的罗伊糖,三者比例为 52:15:37,相对分子质量可达 40 000 ku^[23]。

1.4 由 α -1,3 键和 α -1,6 键交替连接构成的 Alternan

Alternan,又名交替糖,是水溶性 α -葡聚糖,由 α -1,6 与 α -1,3 糖苷键交替连接主链,并由 α -1,6 糖苷键连接

短分支组成。交替糖蔗糖酶在明串珠菌和变异链球菌中均有发现，首次发现于 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1335，催化产物由 46.9% 的 α -1,6 和 35.0% 的 α -1,3 糖苷键连接^[38]。交替糖蔗糖酶具有两种催化反应模式，一种是聚合反应，即以蔗糖为唯一底物将葡萄糖残基从蔗糖分子上转移生成链聚合物；另一种是受体反应，即将蔗糖的葡萄糖残基转移到其他受体分子上生成低聚合度的糖链^[39]。交替糖因其独特键型，在具有较右旋糖酐更高水溶性和更低固有粘度的同时，还具备较高抗水解性和益生元活性^[40,41]。

2 糖苷水解酶第 70 家族各亚家族成员的结构和功能特性

按照合成产物中糖苷键的差异，葡聚糖蔗糖酶 GtfA 亚家族主要包括右旋糖酐蔗糖酶 (Dextranucrase, DS, EC 2.4.1.5)、变聚糖蔗糖酶 (Mutansucrase, MS, EC 2.4.1.125) 和交替葡聚糖蔗糖酶 (Alternansucrase, AS, EC 2.4.1.140) 等，均对蔗糖有催化活性^[42]。糖

苷水解酶第 70 家族中除葡聚糖蔗糖酶亚家族 GtfA 以外，还有一类具有 4,3/6- α -葡萄糖基转移活性的成员，即 GtfB、GtfC 和 GtfD，这三个亚家族成员又被统称为 α -GTase，对蔗糖没有活性，对淀粉/糊精底物表现出歧化活性^[43]，可生成由 α -糖苷键连接的寡糖和多糖，部分产物为可溶性膳食纤维且具有益生元潜力^[44-46]。

α -GTase 酶的微生物起源、结构域、反应和产物特异性不同于葡聚糖蔗糖酶，但具有较高的序列相关性^[47]。有研究通过代表性家族成员全序列比对，以及对部分 GtfB、GtfC 和 GtfD 的序列预测，以 *Lactobacillus reuteri* 121 GtfB, *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC 和 *Azotobacter chroococcum* GtfD 作为查询序列进行 BLAST 分析后构建系统发育树，发现三个亚家族酶学性质上呈现的葡聚糖蔗糖酶/ α -淀粉酶中间特性也体现在它们在系统发育树上所处位置。此外，由于糖苷水解酶第 13 和 70 家族成员在结构和催化机制上有一定相似性，如 α -保留的双置换催化机制以及 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构，因此推测 α -GTase 可能进化自一种属于糖苷水解酶第 13 家族的 α -淀粉酶^[48,49]。

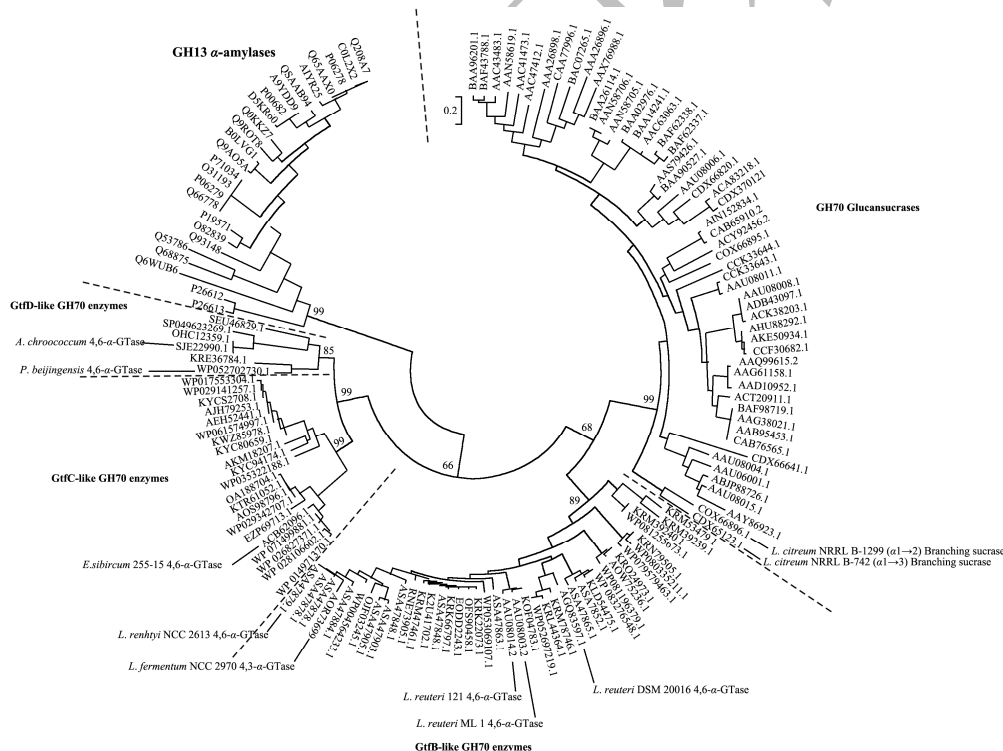


图 1 糖苷水解酶第 13 和 70 家族之间蛋白序列的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of protein sequences between families GH13 and 70

2.1 糖苷水解酶第 70 家族 GtfA 亚家族

因为葡聚糖蔗糖酶的大分子结构（分子量约在 120~200 ku）导致适合 X-衍射研究的晶体难以生成，所以目前仅有四个糖苷水解酶第 70 家族成员的晶体结构被确定，并阐明其结构域组成^[50]。其中对 α -GTase

的结构与功能关系和产物特异性的了解更为有限，已报道一种仅包含供体亚位点的 3D 结构 (*Lactobacillus reuteri* 121GtfB- Δ NAV)。Vujičić-Žagar 等^[6]率先通过截短 *Lactobacillus reuteri* 180 的葡聚糖蔗糖酶 N-末端 745 个残基后获得高分辨率晶体结构，即 Gtf180- Δ N，并对 α -葡聚糖的催化合成机制进行详细阐述。后续研

究中通过类似方法,在保留全部催化功能前提下,截断约240到840个N-末端残基后获得多个葡聚糖蔗糖酶的蛋白质结构^[51,52]。研究发现被截断的N-末端可能是细胞壁附着域,且在不同蛋白之间存在显著的长度和结构差异^[47];不同蛋白的催化活性部分在结构上高度相近,且与糖苷水解酶第13家族有相似保守基序^[53,54]。在糖苷水解酶第13和70家族中,催化核心都由可叠加的结构域A、B和C构成,结构域A具有一个带有催化三元组的TIM桶或 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构和保守基序I-IV。这些基序包含催化残基及底物结合残基,被视为与酶功能密切相关的特异性序列指纹^[55-57]。此结构首先在糖苷水解酶第13家族中被发现,然后在葡聚糖蔗糖酶也发现类似结构。两者差异在于前者的保守基序顺序为I-II-III-IV,葡聚糖蔗糖酶的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶是循环排列,保守基序I位于结构域A的C末端部分。葡聚糖蔗糖酶中催化核心包括了结构域IV和V。其中结构域V对糖链延长非常重要。如 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 DSR-S的结构域V若连续缺失会导致合成效率降低和产物分子量的减少^[49];通过截断Gtf180- Δ N的远端结构域V也可使产物分子量减少^[58]。由于结构域V包含葡聚糖结合口袋,并随着围绕结构域IV和V间的铰链移动而改变位置^[59],表明两者通过将结合的中间体移离或移向活性中心来辅助多糖的合成。葡聚糖蔗糖酶具有一种不同寻常的“U型折叠”结构域,其中5个结构域中的4个(除结构域C以外)是由两组不连续的多肽链片段够成。这种独特的结构域被认为是由糖苷水解酶第13家族的 α -淀粉酶通过基因复制的进化途径产生^[6]。

通过葡聚糖蔗糖酶的结构及其酶-供体底物-受体底物复合物证实了糖苷水解酶第13和70家族具有相似的催化机制。即供体底物蔗糖的 α -1,2-糖苷键首先在酶的亚位点-1和+1间被裂解,并在亚位点-1形成葡萄糖基-酶的中间体。然后通过转糖基化或聚合反应,将糖基部分转移到正在生长的葡聚糖链上的非还原糖端;或通过受体反应或水解反应,将糖基部分转移到麦芽糖或水分子等受体底物上^[9,60]。Gtf180- Δ N与麦芽糖复合物的晶体结构表明,亚位点+1和+2与受体底物相互作用的残基分别来自保守基序II、III和IV,以及结构域B等非保守区域^[6]。通过诱变试验证实受体结合亚位点+1和+2上的残基共同形成的物理化学微环境决定了糖苷键连接特异性^[60,61],说明通过改变有限数量的残基就足以使葡聚糖蔗糖酶呈现不同的特异性,从而实现对 α -葡聚糖糖苷键比例的控制。对保守基序IV下游的亚位点+2残基进行突变会显著改变糖苷键的连接比例^[23,36,49,62],进一步突变保守基序II

能合成天然产物中不存在的 α -1,4糖苷键或减少分支数量^[23,63-65]。因此可通过部分或完全堵塞Gtf180形成分支所需的+1亚位点上方的沟槽,可使合成产物中分支减少;相反,对在螺旋 α 4亚位点+2附近的一些残基进行突变会产生超支化聚合物^[65,67,68];另有报道称,相关位点的突变会导致多糖相对分子量改变^[69,70],通过突变亚位点+1和+2的受体结合残基,可改变酶对糖链生长中受体底物链的亲和力,显著影响多糖与低聚糖合成比例^[61,71]。

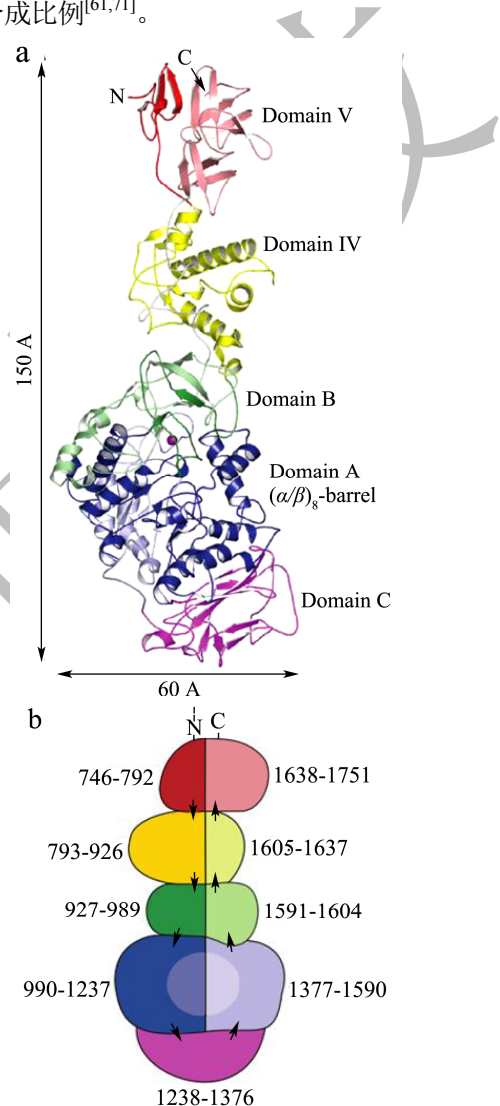


图2 Gtf180- Δ N的结构

Fig.2 Overall structure of Gtf180- Δ N

注:(a) Gtf180- Δ N的晶体结构;(b)多肽“U型折叠”过程示意图。结构域A、B、C、IV和V分别用蓝色、绿色、品红、黄色和红色表示,N端和C端分别用深色和浅色表示。

2.2 糖苷水解酶第70家族GtfB亚家族

GtfB亚家族是糖苷水解酶第70家族中首个与淀粉转化相关的亚家族,仅在乳酸菌中发现,目前已报道几种具有不同的反应和产物特异性的成员,如

Lactobacillus reuteri 121 GtfB 4,6- α -GTase, *Lactobacillus fermentum* NCC 2970 4,3- α -GTase 和 *Limosilactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB 4,6- α -GTase。

Lactobacillus reuteri 121 GtfB 4,6- α -GTase 是首个被报道具有淀粉转化能力的糖苷水解酶第 70 家族成员,其基因序列与葡聚糖蔗糖酶 GtfA 具有高度一致性,但蔗糖转化活性较低^[72]。同时对低聚麦芽糖和淀粉表现出明显的水解/转糖基活性,可通过裂解 α -1,4 糖苷键后合成 α -1,6 糖苷键,实现将 α -1,6 葡聚糖短链连接到低聚麦芽糖或淀粉片段的非还原端,最终生成被称为 IMMPS (IsoMalto/Malto-Polysaccharides) 的水溶性淀粉衍生物。*Lactobacillus reuteri* 121 GtfB 4,6- α -GTase 首选底物是具有较长 α -1,4 糖苷键连接片段和较少 α -1,4/ α -1,6 分支点的糖链,产物具有更高的 α -1,6 糖苷键比例。突变其转糖基化活性的关键位点,可使其转化为只具有水解活性的 α -淀粉酶。其作用受体亚位点+2 与配体的直接作用,是 α -1,6 转糖基活性的关键位点^[50,73,74]。

Lactobacillus fermentum NCC 2970 4,3- α -GTase 与 *Lactobacillus reuteri* 121 GtfB 4,6- α -GTase 有 70% 的序列相同,差异集中在保守基序 II 和 IV。这些差异使其以直链淀粉和麦芽七糖为底物时,呈现 4,3- α -葡萄糖苷转移酶活性;以马铃薯 V 型直链淀粉为底物时,产物变成通过单一的 α -1,3 糖苷键线性或分支连接低聚麦芽糖片段组成。此前未见葡聚糖蔗糖酶催化合成类似产物的报道,而且从地衣和真菌中分离含有相同的连接类型的多糖主要由 α -1,3 糖苷键连接且不存在 α -1,4 分支点,因此推测 GtfB 形成支链 α -葡聚糖是与其开放的活性位点结构有关^[75]。

Limosilactobacillus reuteri NCC 2613 GtfB 与大多数合成线性 IMMPS 的 GtfB 亚家族成员不同,当以马铃薯 V 型直链淀粉为底物时,产物是由聚合度 2 到 7 的低聚麦芽糖链组成,并通过 α -1,4 糖苷键连接主链, α -1,6 糖苷键连接分支。这是首次发现乳酸菌将直链淀粉衍生为支化 α -葡聚糖,其反应特异性与在非乳酸菌中发现的 GtfD 亚家族成员类似。在三维结构模型中,*Limosilactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB 环 A1 和 B 较 *Lactobacillus reuteri* 121 GtfB 短 7 个和 16 个残基,且不含供体底物结合亚位点,因此推测更开放的活性位点结构将促使更多分支结构生成^[76]。

2.3 糖苷水解酶第 70 家族 GtfC 亚家族

糖苷水解酶第 70 家族 GtfC 亚家族成员在非乳酸菌中发现,包括多种可适应极端温度的细菌,如厚壁菌门杆菌纲的 *Exiguobacterium*、*Bacillus* 和

Geobacillus, 均为低 G+C 含量的革兰氏阳性菌^[9,77]。

Exiguobacterium sibiricum 255-15 是嗜冷性非孢子形成细菌,从距今约 200~300 万年历史的西伯利亚古冻土中分离^[78,79]。*Geobacillus* sp. 12AMOR1 是嗜热细菌,从深海高温沉积物样本中分离^[80]。*Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC 的氨基酸序列与 GtfB 亚家族相近,然而 GtfC 亚家族缺乏葡聚糖蔗糖酶和 GtfB 亚家族位于保守基序 I-IV 的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶圆形排列。GtfC 亚家族与 α -淀粉酶的核心结构域 A-C 类似,但结构域 B 插入一段葡聚糖蔗糖酶特有的结构域 IV。GtfC 酶缺失在葡聚糖蔗糖酶和 GtfB 亚家族中典型的 N-末端可变区和远端结构域 V,并可能在 C-末端存在一到两个功能未知的 Ig2 基序。GtfC 亚家族独特结构域表明,可能存在 α -淀粉酶前体中插入结构域 IV 的相关事件,进一步体现了两个糖苷水解酶家族间的进化路径。*Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC 酶具有与 *Lactobacillus reuteri* 121 GtfB 相似的 4,6- α -葡萄糖基转移酶活性,可以裂解淀粉类底物的 α -1,4 键并连续合成的 α -1,6 键。其产物是被称作 IMMOS (IsoMalto-Malto/Oligosaccharides) 的衍生物,且不会进一步聚合。IMMOs 中 α -1,6 糖苷键比例与底物聚合度呈正相关,约有 33%、44% 和 52% 的 α -1,6 糖苷键存在于以麦芽六糖、麦芽七糖和 V 型直链淀粉为底物的反应产物中。

2.4 糖苷水解酶第 70 家族 GtfD 亚家族

糖苷水解酶第 70 家族 GtfD 亚家族在多种与植物相关的细菌中发现,且在以马铃薯淀粉、直链淀粉和聚合度 4 至 7 的低聚甘露糖等淀粉类为底物时表现出 4,6- α -葡萄糖基转移酶活性^[81,82]。GtfD 在进化路径上与 GtfC 密切相关,都具有 α -淀粉酶的折叠结构。但 GtfD 在其微生物起源上有所不同,它不仅存在于芽孢杆菌和圆褐固氮菌等革兰氏阳性菌中,也存在于如洋葱假单胞菌和弗拉特氏菌等革兰氏阴性菌中。

来源于 *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 和 *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 的 GtfD 与直链淀粉反应时没有形成连续的 α -1,6 糖苷键,而是形成由单个 α -1,6 键和 α -1,4 或 α -1,6 键连接的分支,产物高度支化。这两种 GtfD 酶合成产物分子量存在明显差异, α -1,6 糖苷键节点数量和 α -1,4 键连接片段长度也不一样,在液相色谱图上分别为单峰 (13 000 ku) 和双峰 (27 000 ku, 19 ku) 分布^[81,83]。来源于 *chroococcum* 和 *Paenibacillus beijingensis* 的 GtfD 可将小麦淀粉转化为抗性淀粉,结构与以蔗糖为底物的 *Lactobacillus reuteri* 121 GtfA 的催化产物类似^[81,84]。

3 结论与展望

综上所述,通过葡聚糖蔗糖酶及其家族的基因数据挖掘和蛋白结构分析,可以发现其产物特异性是由受体结合亚位点的各氨基酸残基间相互作用决定,关键位点的变化往往能显著改变催化产物的糖苷键组成、分子量和支化程度。从糖苷水解酶第13家族的 α -淀粉酶,到糖苷水解酶第70家族的GtfD、GtfC和GtfB亚家族,最后到具有催化蔗糖活性的葡聚糖蔗糖酶(GtfA),各亚家族成员蛋白结构与功能的逐渐演化印证了它们在进化路径上的相互关系,同时也展现了通过酶工程技术改造现有酶工具生产各类新型 α -葡聚糖的潜力。可见研究如何通过酶制剂催化合成或改造碳水化合物,调控催化产物的理化性质和加工特性,将是葡聚糖蔗糖酶用于食品生产或直接作为食品添加剂应用的关键。但是,由于目前对各活性位点间的相互影响机制,糖链延长阶段的反应机理,特别是当中间产物超出催化结构域,甚至与远端结构域结合时的反应机制依然缺乏了解,因此继续深入研究相关课题,并基于已知结构与功能去理性设计更稳定、更高效和更具操控性的葡聚糖蔗糖酶,将是未来食品酶工程的重要方向和挑战之一。

参考文献

- [1] 苏玉宵,丁长河.多糖的功能性研究[J].粮食与油脂,2022,35(4):35-38.
- [2] Miao M, Xuaj, Jiang B, et al. Elucidating molecular structure and prebiotics properties of bioengineered α -D-glucan from *Leuconostoc citreum* SK24.002 [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54: 227-233.
- [3] 花敬涵,张洪斌,胡雪芹,等.一种有效合成低聚糖的右旋糖酐蔗糖酶[C]//第十一届中国酶工程学术研讨会论文摘要集.武汉:中国学术期刊电子出版社,2017:183.
- [4] Isabella A, Gabeille P, Sandrine M, et al. Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis [J]. Carbohydrates in Sustainable Development I, 2010, 294: 25-48.
- [5] Xu L J, Qi T T, Xu L, et al. Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds [J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2016, 35(1): 1-23.
- [6] Vincent, Hemalatha G R, Elodie D, et al. The carbohydrate active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(D1): D490-D495.
- [7] Andreja V, Tjaard P, Slavko K, et al. Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(50): 21406-21411.
- [8] 张九花,刘祥芳,黎志德,等.产右旋糖酐肠膜明串珠菌发酵培养基的优化[J].食品工业科技,2020,41(3):146-152.
- [9] Meng X F, Gangoiti J, Bai Y X, et al. Structure - function relationships of family GH70 glucansucrase and 4,6- α -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2681-2706.
- [10] Mark R. S, Etienne G J D, Corinne R, et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: Towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins [J]. Protein Engineering Design & Selection Peds, 2006, 12: 555-562.
- [11] Colbysm, Mclaughlin E, Ferretti J J, et al. Effect of inactivation of Gtf genes on adherence of *Streptococcus downei* [J]. Oral Microbiology and Immunology, 1999, 14(1): 27-32.
- [12] Jens W, Clarissa S, Diane M L, et al. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract [J]. Microbiology, 2008, 154: 72-80.
- [13] Vincent M, Rene-Marc W, Magali R, et al. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α -(1-6) and α -(1-3) linkages [J]. Gene, 1996, 182(1-2): 23-32.
- [14] Vincent M, Magali R, Pierre M, et al. Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a α -(1-6) glucan [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 159(2): 307-315.
- [15] Dephine P, Marlene V, Lisa U, et al. Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 - identification of three novel α -transglucosylases [J]. Febs Journal, 2015, 282(11): 2115-2130.
- [16] Gregory L C, John F R. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1 goes to 6), (1 goes to 3)-alpha-D-glucan [J]. Carbohydrate Research, 1982, 101(1): 57-74.
- [17] Clarissa S, Jens W, Gerald W Tannock, et al. Sucrose utilization and impact of sucrose on glucosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri* [J]. Systematic & Applied

- Microbiology, 2007, 30(6): 433-443.
- [18] Doman K, John F R. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases [J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(8): 659-664.
- [19] Yan M H, Han J, Xu X F, et al. GSY, a novel glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, mediates the formation of cell aggregates in response to oxidative stress [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 38122.
- [20] 唐华英,罗欣锦,张云野,等.假肠膜明串珠菌GX-3产胞外多糖条件优化及其理化性质研究[J].中国乳品工业,2022,50(8):15-26.
- [21] Hehre E J, Sugg J Y. Serologically reactive polysaccharides produced through the action of bacterial enzymes: I. dextran of *Leuconostoc mesenteroides* from sucrose [J]. Journal of Experimental Medicine, 1942, 75(3): 339.
- [22] Nobuhiro H, Howard K K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* GtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis [J]. Infection & Immunity, 1989, 57(7): 2079-2085.
- [23] Sander S V L, Slavko K, Ineke H V G, et al. Structural Analysis of the α -D-glucan (ESP180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase Gtf180 enzyme [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343: 1237-1250.
- [24] Hee-Kyoung K, Jong-Suk O, Doman K. Molecular characterization and expression analysis of the glucansucrase DSRWC from *Weissella cibaria* synthesizing a $\alpha(1\rightarrow6)$ glucan [J]. Fems Microbiology Letters, 2009, 292(1): 33-41.
- [25] Emanuele Z, Debroah M W, Aidan C, et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(3): 1121-1135.
- [26] Mikihiro K, Kazuo M. Structural characteristics of dextrans synthesized by dextransucrases from *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-1299 [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1977, 41(10): 1931-1937.
- [27] Sophie B, Marguerite D, Emeilne F, et al. Molecular characterization of DSR-E, an α -1, 2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(20): 5753-5761.
- [28] Emeilne F, Sophie B, Audrey A, et al. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextransucrase and their involvement in the formation of highly α -1,2 branched dextran [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(1): 296-303.
- [29] Yoann B, Tjaard P, Yannick M, et al. Functional and structural characterization of $\alpha(1\rightarrow2)$ branching sucrose derived from DSR-E glucansucrase [J]. J. Biol. Chem., 2012, 287: 7915-7924.
- [30] Fred K S, Roger D K, Edward C M C, et al. Structural analysis of *Leuconostoc* dextrans containing 3-O- α -D-glucosylated α -D-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch-point positions, by methylation and by ^{13}C -NMR spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 1979, 74(1): 41-62.
- [31] Marlene V, Marion C, Yoann B, et al. Characterization of the first $\alpha(1\rightarrow3)$ branching sucrases of the GH70 family [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(14): 7687-7702.
- [32] Li X D, Wang X F, Meng X F, et al. Structures, physico-chemical properties, production and (potential) applications of sucrose-derived α -D-glucans synthesized by glucansucrases [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 249(1): 116818.1-12.
- [33] Florian W W, Viktoria M D, Daniel M, et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir [J]. Food Microbiology, 2010, 27(5): 672-678.
- [34] 崔雨.淀粉与糖的交互致龋作用初探[D].上海:上海交通大学,2018.
- [35] Slavko K, Geel-Schutteng H, Maarel M J E C V D, et al. Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase [J]. Microbiology, 2004, 150: 2099-2112.
- [36] Slavko K, Ineke G.H. V G, Elly J, et al. Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase [J]. Biochemistry, 2005, 44(25): 9206-9216.
- [37] 岑秋宇,庞日朝,胡晓敏,等.罗伊乳杆菌对肠屏障功能调节作用的研究进展[J].中国全科医学,2022,25(15):1918-1922.
- [38] Fred R S, Roger D K, Stephen H B, et al. High-temperature enhancement of ^{13}C -NMR chemical-shifts of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis [J]. Carbohydrate Research, 1979, 68(1): 123-140.
- [39] 戴悦,吴丹,郑璞,等.交替糖蔗糖酶在毕赤酵母中的重组表达、酶学性质及转化反应研究[J].食品与发酵工业,2022,48(17):29-34.
- [40] Timothy D L, Melinda S N, Jeffrey A A, et al. Characterization of a novel modified alternan [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(1): 107-113.
- [41] 朱洁.*Leuconostoc citreum* 交替糖蔗糖酶同源表达、发酵优化及制备交替糖的研究[D].无锡:江南大学,2019.

- [42] MANON M, GIANLUCA C, Clairel M, et al. Bacterial α -glucan and branching sucrases from GH70 family: discovery, structure-function relationship studies and engineering [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1607.
- [43] Slavko K, Pieter G, Sander S V L, et al. 4, 6- α -Glucanotransferase, a novel enzyme that structurally and functionally provides an evolutionary link between glycoside hydrolase enzyme families 13 and 70 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 8154-8163.
- [44] Hans L, Justyna M D, Monique E, et al. Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fibre made via enzymatic conversion of starch [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(49): 12034-12044.
- [45] Bai Y X, Markus B, Rachel D K, et al. *Lactobacillus reuteri* strains convert starch and maltodextrins into homoexopolysaccharides using an extracellular and cell-associated 4, 6- α -glucanotransferase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(14): 2941-2952.
- [46] Gu F J, Klaudyna B, Bernadette R, et al. *In vitro* fermentation behaviour of isomalto/malto-polysaccharides using human faecal inoculum indicates prebiotic potential [J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2018, 62(12): 1-16.
- [47] Hans L, Tjaard P, Justyna D, et al. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications [J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163(2): 250-272.
- [48] Joana G, Sarah F C, Lisa M, et al. Synthesis of novel α -glucans with potential health benefits through controlled glucose release in the human gastrointestinal tract [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(1): 123-146.
- [49] Claire M, Gilles J, Emeline F, et al. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(42): 31254-31267.
- [50] 姜雅文. *Limosilactobacillus reuteri* 121 4,6- α -葡萄糖基转移酶 GtfB 催化产物键型特异性机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [51] Keisuke I, Sohei I, Tatsuro S, et al. Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 408(2): 177-186.
- [52] TJAARD P, ANDREJA V, Slavkol K, et al. Structure of the α -1,6/ α -1,4-specific glucansucrase GtfA from *Lactobacillus reuteri* 121 [J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2012, 68(12): 1448-1454.
- [53] E Ann M, Hans M J, Birte S. A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases [J]. *FEBS Letters*, 1996, 378(3): 263-266.
- [54] Wang C, Zhang H B, Li M Q, et al. Functional analysis of truncated and site-directed mutagenesis dextransucrases to produce different type dextrans [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 102: 26-34.
- [55] Hijum S A Ft V, S Kralj, Ozimekl K, et al. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(1): 157-176.
- [56] Stefan J, Marek G. Remarkable evolutionary relatedness among the enzymes and proteins from the alpha-amylase family [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 2707-2725.
- [57] Flor D M G, Salvador M, Clarita O. Structure-function relationship studies of multidomain levansucrases from *Leuconostocaceae* family [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 889.
- [58] Meng X F, Justyna M D, Tjaard P, et al. Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99: 5885-5894.
- [59] Tjaard P, Andreja V, Slavkol K, et al. Flexibility of truncated and full-length glucansucrase GTF180 enzymes from *Lactobacillus reuteri* 180 [J]. *FEBS J*, 2014, 281: 2159-2171.
- [60] Meng X F, Tjaard P, Justyna M D, et al. Characterization of the functional roles of amino acid residues in acceptor-binding subsite +1 in the active site of the glucansucrase GTF180 from *Lactobacillus reuteri* 180 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290: 30131-30141.
- [61] Meng X F, Justyna M D, Tjaard P, et al. Residue Leu940 has a crucial role in the linkage and reaction specificity of the glucansucrase GTF180 of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* 180 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(47): 32773-32782.
- [62] Atsunari S, Yoshio J N, Hidehiko M, et al. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(16): 4845-4850.
- [63] Hee K K, Atsuo K, Doman K. Bioengineering of *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrases that gives selected bond formation for glucan synthesis and/or acceptor-product synthesis [J]. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry, 2011, 59(8): 4148-4155.
- [64] Humeyra İ, Mustafa O Y, Christopher S, et al. Characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus Reuteri* E81 and production of malto-oligosaccharides [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2019, 37(6): 421-430.
- [65] Karan W, Thassanai S, Surasak C, et al. Unravelling regioselectivity of *Leuconostoc citreum* ABK-1 alternansucrase by acceptor site engineering [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3229.
- [66] Meng X F, Justyna M D, Tjaard P, et al. Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(14): 5885-5894.
- [67] Meng X F, Justyna M D, Tjaard P, et al. Synthesis of new hyper-branched α -glucans from sucrose by *Lactobacillus reuteri* 180 glucansucrase mutants [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(2): 433-442.
- [68] Meng X F, Justyna M D, Martin T, et al. Characterization of the glucansucrase gtf180 W1065 mutant enzymes producing polysaccharides and oligosaccharides with altered linkage composition [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 81-90.
- [69] Sander S V L, Slavkol K, Wieger E, et al. Structural characterization of bioengineered α -D-glucans produced by mutant glucansucrase GTF180 enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180 [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(3): 580-588.
- [70] Nirali D, Sandesh J M, Rekha S Singhal. Food polysaccharides: A review on emerging microbial sources, bioactivities, nanoformulations and safety considerations [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 8(3): 171.
- [71] Meng X F, Tjaard P, Justyna M D, et al. Structural determinants of alternating ($\alpha 1 \rightarrow 4$) and ($\alpha 1 \rightarrow 6$) linkage specificity in reuteransucrase of *Lactobacillus reuteri* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35261.
- [72] Slavko K, Geel-Schutteng H V, Raghaoui H, et al. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 6) glucosidic bonds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4283-4291.
- [73] 蒋彤. *Lactobacillus reuteri* 121 葡萄糖基转移酶 GtfBdN 作用支链淀粉机制及其改性淀粉产物性质研究[D].无锡:江南大学,2022.
- [74] Bai Y X, Joana G, Bauke W D, et al. Crystal structure of 4, 6- α -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from α -amylases in oral bacteria [J]. Structure, 2017, 25(2): 231-242.
- [75] Joana G, Sander S V L, Gerrit J G, et al. 4,3- α -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-15.
- [76] Joana G, Sander S V L, Meng X F, et al. Mining novel starch-converting glycoside hydrolase 70 enzymes from the Nestlé culture collection genome database: The *Lactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-16.
- [77] Joana G, Tjaard P, Lubbert D, et al. The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC enzyme representing a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6- α -glucanotransferase enzymes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 82(2): 756-766.
- [78] Debora R, Natalia I, He Z L, et al. Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: A genome and transcriptome approach [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 1-17.
- [79] López María Castillo, Galán Beatriz, Carmona Manuel, et al. Xerotolerance: A new property in *Exiguobacterium* genus [J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2455.
- [80] Wissuwa Juliane, Stokke Runar, Fedøy Anita-Elin, et al. Isolation and complete genome sequence of the thermophilic *Geobacillus* sp. 12AMOR1 from an Arctic deep-sea hydrothermal vent site [J]. Standards in Genomic Sciences, 2016, 11(1): 1-12.
- [81] Joana G, Lisa L, Sander S V L, et al. Characterization of the *Paenibacillus beijingensis* DSM 24997 GtfD and its glucan polymer products representing a new glycoside hydrolase 70 subfamily of 4, 6- α -glucanotransferase enzymes [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0172622.
- [82] Yang W K, Sheng L F, Su L Q, et al. Directed mutation of two key amino acid residues alters the product structure of the new 4,6- α -glucanotransferase from *Bacillus sporothermodurans* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(48): 14680-14688.
- [83] Joana G, Sander S V L, Christina V, et al. The gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside hydrolase family 70 4,6- α -glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2016, 1860(6): 1224-1236.
- [84] 盛露菲,杨卫康,吴敬,等.发酵乳杆菌来源4,6- α -葡萄糖基转移酶的酶学表征及产物性质鉴定[J].生物工程学报,2021, 37(12):4363-4372.