

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

盛露菲^{1,2}, 杨卫康^{1,2}, 吴敬^{1,2}, 陈晟^{1,2}

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 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

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. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4363-4372.

Sheng LF, Yang WK, Wu J, et al. Characterization and identification of *Lactobacillus fermentum* 4,6- α -glucosyltransferase and its products. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4363-4372.

摘要: 4,6- α -葡萄糖基转移酶 (4,6- α -GTs) 能以直链淀粉为底物合成含 $\alpha(1-6)$ 键的 α -葡聚糖, 在酶法合成膳食纤维中具有很大的应用潜力。根据 4,6- α -GTs 氨基酸序列中的保守区段设计引物, 从发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* 基因组中 PCR 扩增得到一条假定 GTFB-like 4,6- α -GTs 基因 (命名为 *gtf16*), 构建重组质粒 pET15b-*gtf16* 并在宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 成功表达, 纯化后对其进行酶学表征。结果表明, 该酶最适 pH 为 5.0, 最适温度为 40 °C。通过薄层色谱、NMR 光谱、水解酶水解等检测手段对 Gtf16 酶转化产物进行系统的表征, 发现其产物具有以下特征: 与已报道的来源于罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 121 菌株的 4,6- α -葡萄糖基转移酶-GtfB 与直链淀粉作用后的产物异麦芽寡糖结构类似; 产物键型中 $\alpha(1-6)$ 键占比可达 75%, 产物平均分子量为 23 793 Da; 产物被消化酶水解后得到的抗消化成分含量可达 88.22%。

关键词: 4,6- α -葡萄糖基转移酶, 克隆表达, 酶学性质, 异麦芽寡糖

Characterization and identification of *Lactobacillus fermentum* 4,6- α -glucosyltransferase and its products

Lufei Sheng^{1,2}, Weikang Yang^{1,2}, Jing Wu^{1,2}, and Sheng Chen^{1,2}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 4,6- α -glucosyltransferases (4,6- α -GTs), which converts amylose into $\alpha(1-6)$ bonds-containing α -glucan, possesses great application potential in enzymatic synthesis of dietary fiber. Primers were designed according to the conserved motifs existing in the amino acid sequence of 4,6- α -GTs, and used to amplify a putative GTFB-Like 4,6- α -GTs gene (named as *gtf16*)

Received: December 11, 2020; **Accepted:** March 18, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31972032).

Corresponding author: Sheng Chen. Tel/Fax: +86-510-85326653; E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31972032) 资助。

from the genomic DNA of *Lactobacillus*. The *gtf16* gene was cloned into the plasmid pET15b, expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), followed by purification and characterization. The optimum pH and the optimum temperature of the purified enzyme were 5.0 and 40 °C, respectively. The biotransformation product of this enzyme was systematically characterized by thin-layer chromatography, NMR spectroscopy, and hydrolysis reaction. The Gtf16-catalyzed product shows a similar structure to that of the isomalto/malto-polysaccharide (IMMP), which is the amylose-derived product catalyzed by GtfB from *Lactobacillus reuteri* 121. Moreover, The Gtf16-catalyzed product contains up to 75% of $\alpha(1-6)$ bonds and has an average molecular weight of 23 793 Da. Furthermore, the content of the anti-digestive components was 88.22% upon hydrolysis with digestive enzymes.

Keywords: 4,6- α -glucosyltransferases, recombinant expression, enzymatic properties, isomalto/malto-polysaccharide

4,6- α -葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.-, 4,6- α -GTs)属于糖苷水解酶 70 家族,该家族的酶可以利用蔗糖或淀粉为底物合成多种结构的 α -葡聚糖^[1]。目前已经被报道发现的 4,6- α -GTs有 10 种,主要由荷兰的格罗宁根大学Lubbert Dijkhuizen团队最先发现并研究的^[2]。

根据 4,6- α -GTs序列、结构与功能的不同,可分为GTFB-like、GTFC-like、GTFD-like三种亚家族。其中GTFB-like亚家族中的酶具有典型的“U型折叠”结构,除了结构域C之外其余 4 个结构域(A、B、IV、V)均由两个不连续区段构建而成,GTFB-like亚家族催化结构域中的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构被循环转置,导致其保守基序的顺序为II-III-IV-I;GTFC-like亚家族的氨基酸序列结构与 α -淀粉酶类似,4个保守基序的顺序为I-II-III-IV,GTFD-like亚家族的氨基酸序列结构与GTFC-like亚家族一样,但是两者合成的产物结构完全不同^[1,3-4]。

4,6- α -GTs能够利用麦芽寡糖和直链淀粉合成两种不同结构类型的 α -葡聚糖。一种是由连续 $\alpha(1-4)$ 键连接的还原端部分和连续 $\alpha(1-6)$ 键连接的非还原端部分组成的线性产物,这种类型的 α -葡聚糖主要由GTFB-like和GTFC-like亚家族的4,6- α -GTs合成,如*Lactobacillus reuteri* 121 GtfB和西伯利亚微小杆菌*Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC^[2,4-5]。4,6- α -GTs合成的另一种结构类型的 α -葡聚糖则是由聚合度为 2-5 的麦芽寡糖以 $\alpha(1-6)$ 键连接形成的线性或带分支产物,合成这种类型产物的 4,6- α -GTs来源于GTFD-like和

GTFB-like亚家族,如褐球固氮菌*Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 GtfD^[6-7]。由于4,6- α -GTs合成的两种结构类型的 α -葡聚糖产物对糖苷水解酶具有不同程度的抗性,可抵抗人胃肠道的消化而进入结肠,促进肠道益生菌的生长,因此4,6- α -GTs具有将淀粉修饰成可溶性缓慢消化的膳食纤维的潜力^[8]。

本研究以实验室前期筛选得到的一株乳酸菌基因组为模板,PCR扩增获得目的基因并将其在大肠杆菌中异源表达。通过对Gtf16和已被发现的GH70中的葡聚糖蔗糖酶(GSs)和4,6- α -GTs进行氨基酸序列系统进化树分析,以及对其与直链淀粉作用后的产物进行系统的鉴定,确定该酶为一种新型的4,6- α -GTs,且在酶法制备可溶性膳食纤维工艺上具有一定的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用菌株均由本实验室保藏;质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根科技(北京)有限公司;细菌基因组提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;限制酶购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR所用试剂盒和一步克隆试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;直链淀粉购自Sigma-Aldrich公司;Ni-NTA柱及填料购自美国GE公司;葡萄糖测定试剂盒购自上海荣盛生物药业有限公司;其他常用试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 基因筛选

实验室前期筛选得到的乳酸菌按照细菌基因组提取试剂盒提取全基因组,根据 4,6- α -GTs 的保守基序 I 和 II 设计简并引物(F: 5'-TGAYGGY TTCCGRRTWGATGC-3'; R: 5'-RCCRATCATYTG RTTCATMACAATATC-3'),具体引物设计中涉及的序列信息如表 1 所示,再将获得的PCR产物胶回收连接T载体后送至天霖生物科技有限公司测序,将获得的基因片段在NCBI数据库中用BLAST进行同源性分析,再根据数据库中的序列设计两端引物获得全长目的基因(F: 5'-CGCGGCAGCCA TATGATGTTCAACTTAAATTTTACAATCTGC-3'; R: 5'-TTAGCAGCCGATCCTTACTAATCGTCTT CAATATTAGCATAATAATCA-3')。共选取 39 个 GH70 中已经表征的蛋白序列,对于GH70 中的 GSs,选取的 29 个序列与目标序列同源性都在 35%以上;剩余的 10 个蛋白序列是目前已经报道的 4,6- α -GTs,通过Mega 7 软件对它们进行氨基酸序列系统进化树分析以确定目标蛋白与GH70 这两大类酶的亲缘性关系。进化树中涉及的蛋白信息如表 2 所示。

1.3 重组质粒的构建、表达与纯化

通过一步克隆连接试剂盒将目的基因与 pET-15b 相连以构建重组质粒 pET15b-*gtf16*, 测序验证正确后将重组质粒热激转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)。

将上述含有重组质粒的菌落接种到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的条件下培养 10 h,按 5% (V/V) 的接种量转接至含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素 TB 培养基中,并在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的摇床中培养至 OD_{600} 达到 0.6,在培养基中加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG),终浓度为 0.08 mmol/L,再将其置于 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 的摇床中诱导产酶。

继续培养 24 h 后停止摇瓶发酵,发酵液以 8 000 r/min 离心 30 min,弃上清,收集菌体,将收集到的菌体重悬于 0.2 mol/L Na_2HPO_4 /0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.0),用高压匀浆机进行细胞破碎,将所得液体以 12 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片,获得含有 Gtf16 蛋白的上清液后将其上样到 Ni-NTA 柱上进行纯化。纯化步骤:第一步,分别用含有 15、30、45 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓

表 1 引物设计中涉及的序列信息

Table 1 Sequences used for primer design

NCBI accession numbers	Conserved motifs	Amino acid sequences	Nucleotide sequences (5'-3')
AOR73699.1	Motif I	DIVMNQMIG	GATATTGTTATGAACCAGATGATTGGC (4 339-4 365 bp)
AAU08014.2		DIVMNQMIG	GATATTGTTATGAATCAAATGATCGGT (4 409-4 435 bp)
ABQ83597.1		VMNQMIG	GTGATGAATCAGATGATTGGT (3 655-3 675 bp)
AAU08003.2		DIVMNQMIG	GATATTGTTATGAATCAGATGATTGGT (4 438-4 464 bp)
ASA47879.1		DIVMNQMIG	GATATTGTTATGAACCAGATGATTGGC (3 292-3 318 bp)
AOR73699.1	Motif II	GNFDGFRIDAAD	GGTAATTTTGATGGTTTCCGGATTGATGCTGCTGAT (2 935-2 970 bp)
AAU08014.2		GNFDGFRVDAAD	GGTAATTTTGATGGTTTCCGAGTTGATGCTGCTGAT (2 992-3 027 bp)
ABQ83597.1		GNFDGFRVDAAD	GGTAATTTTGATGGTTTCCGGTAGATGCTGCAGAT (2 230-2 265 bp)
AAU08003.2		GNFDGFRVDAAD	GGTAATTTTGATGGCTTCCGAGTTGATGCTGCTGAT (3 022-3 057 bp)
ASA47879.1		GNFDGFRIDAAD	GGTAATTTTGACGGTTTCCGGATTGATGCTGCTGAT (1 900-1 935 bp)

Note: the position of the sequence in its nucleotide sequence is in the brackets.

表 2 进化树所涉及蛋白信息

Table 2 Proteins used for constructing the phylogenetic tree

NCBI accession numbers	Bacterial strains	Enzymes
ASA47863.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	4,6- α -glucosyltransferase (GtfI6)
KRM39240.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> DSM 20655	4,6- α -glucosyltransferase (GtfX)
KRM39239.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i> DSM 20655	4,6- α -glucosyltransferase (GtfY)
ASA47879.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> NCC 2613	4,6- α -glucosyltransferase (GtfB)
ABQ83579.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	4,6- α -glucosyltransferase (GtfW)
AAU08014.2	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	4,6- α -glucosyltransferase (GtfB)
AAU08003.2	<i>Lactobacillus reuteri</i> ML1	4,6- α -glucosyltransferase (GtfML4)
ASA47903.1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4,6- α -glucosyltransferase (GtfB)
WP_052702730.1	<i>Paenibacillus beijingensis</i>	4,6- α -glucosyltransferase (GtfD)
AJE22990.1	<i>Azotobacter chroococcum</i> NCIMB 8003	4,6- α -glucosyltransferase (GtfD)
ACB62096.1	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15	4,6- α -glucosyltransferase (GtfC)
CCK33644.1	<i>Lactobacillus animalis</i> TMW 1.971	Dextranucrase (Gtf1971)
CCK33643.1	<i>Lactobacillus curvatus</i> TMW 1.624	Dextranucrase (Gtf1624)
AAU08006.1	<i>Lactobacillus parabuchneri</i> 33	α -1,6-glucosyltransferase (GTF33)
AAU08011.1	<i>Lactobacillus sakei</i> KG15	Glucansucrase (GTF-Kg15)
AIM52834.1	<i>Leuconostoc citreum</i> ABK-1	Alternansucrase
ACY92456.2	<i>Leuconostoc citreum</i> B/110-1-2	Dextranucrase (DSR-F)
BAF96719.1	<i>Leuconostoc citreum</i> HJ-P4	Dextranucrase (DS; LcDS)
ACA83218.1	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	Dextranucrase (DexT; LCK_01394)
CDX66641.1	<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299	Dextranucrase
AAB95453.1	<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299	Dextranucrase
ACT20911.1	<i>Leuconostoc lactis</i> EG001	Glucansucrase
ABC75033.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 0326	Dextranucrase (DexYG)
AAU08015.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	Reuteransucrase (GtfA)
AAAY86923.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Reuteransucrase (GtfO)
ABP88726.1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> TMW 1.106	Dextranucrase (Gtf106A)
AAC63063.1	<i>Streptococcus downei</i> MFE 28	α -1,3-glucosyltransferase (GtfI)
AAC41413.1	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25975	α -1,6-glucosyltransferase (GtfM)
ABF85832.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299CB4	Dextranucrase (DsrBCB4)
CAB76565.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1355	Dextranucrase (DsrC)
AAG38021.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742CB	Dextranucrase (DsrB742)
AAS79426.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IBT-PQ	Dextranucrase (DsrP)
AFP53921.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KIBGE-IB-22	Dextranucrase (DsrN)
AAQ98615.2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L0309	Dextranucrase (DsrX)
AAG61158.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LCC4	Dextranucrase (DsrD)
AAD109521.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F	Dextranucrase (DsrS)
BAA90527.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F	Dextranucrase (DsrT)
AAU08008.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> KG3	α -1,6-glucosyltransferase (GtfKg3)
AAA26898.1	<i>Streptococcus downei</i> MFE 28	Dextranucrase (GtfS)
AHU88292.1	<i>Weissella confusa</i> VTT E-90392	Dextranucrase (Wc392-DSR)

冲液 (50 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 进行梯度洗脱以除去杂蛋白;第二步,用含有 300 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 洗脱目的蛋白,所有缓冲液先置于 4 °C 预冷。将收集含目的蛋白的洗脱液用 50 kDa的超滤管进行超滤浓缩并除去洗脱液中高浓度的咪唑,并用柠檬酸缓冲液进行置换。用SDS-PAGE 验证纯化效果。

1.4 酶学性质的测定

1.4.1 酶活测定方法

碘试剂:用适当的蒸馏水将 2.6 g I_2 和 26 g KI 溶解,并将其转移到 100 mL容量瓶中定容,4 °C 保存,使用前用蒸馏水以 1:260 的比例稀释。

在 40 °C 条件下,以直链淀粉 (0.125%, W/V) 为底物,在 0.2 mol/L Na_2HPO_4 /0.1 mol/L柠檬酸缓冲液 (pH 5.0) 中测定酶活力。将 180 μ L直链淀粉在 40 °C 的恒温水浴锅中温浴 10 min,然后加入适当稀释的 20 μ L酶液,反应 6 min。立即加入 100 μ L NaOH (0.4 mol/L) 使酶失活终止反应,随后加入 100 μ L HCl (0.4 mol/L) 进行中和,取 200 μ L反应液加入到 3 800 μ L碘试剂中,振荡混匀并放于暗处显色 5 min后,从中取出 200 μ L液体置于 96 孔板中,并在 660 nm下测吸光值 OD_{660} 。以 5 个不同浓度的标准品 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL) 制作直链淀粉的标准曲线。一个单位酶活力定义为每分钟消耗 1 mg直链淀粉所需的酶量^[9-10]。

1.4.2 最适温度与最适pH

将直链淀粉分别在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C下温浴,按照上述方法测定Gtf16 在不同温度下的酶活,将最高酶活定义为 100%。

分别配置pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的直链淀粉,在最适温度下按照上述方法测定不同 pH下的酶活,将最高酶活定义为 100%。

1.4.3 底物特异性测定

分别用 25 mmol/L的葡萄糖、麦芽低聚糖 (DP 2-7)、蔗糖、异麦芽二糖、异麦芽三糖、黑

曲霉二糖及潘糖作为底物研究该酶的底物特异性。将过量的Gtf16 与上述各底物在 37 °C 孵育 10 h 后,煮沸 10 min 使酶失活终止反应。所有反应均在pH 5.0 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 /0.1 mol/L柠檬酸缓冲液中进行,通过薄层色谱法 (TLC) 分析每种底物下酶反应产物的组成^[4]。

薄层色谱的流动相按照正丁醇:乙酸:水 (2:1:1, V/V/V) 的配比混合制成;显色剂:在纯乙醇中加入 5%的浓硫酸。将混合的标准品 (G1-G7) 和 20-30 μ g的反应混合物分别点样在 TLC板上,将板在流动相中展开 8-10 h,当流动相靠近TLC薄板顶部时将其取出,待其自然干燥后再放于流动相中进行二次展开以便产物分离。待TLC板完全干燥后放于显色剂溶液中并使点样面与显色剂充分接触,之后取出TLC板并在 95 °C 的烘箱中放置 20 min以观察显色结果。

1.5 酶转化产物结构测定

酶转化方法:将直链淀粉 (0.6%, W/V) 与过量的Gtf16 在 40 °C、pH 5.0 条件下孵育 24 h后,将反应混合物煮沸 10 min以终止反应。混合物以 12 000 r/min转速离心 30 min,将获得的上清液冷冻干燥,最终得到 α -葡聚糖产物混合物。

产物分子量测定:用高效凝胶色谱法 (HPGFC) 测定酶转化产物的分子量,高效凝胶色谱仪为Waters 1525,采用ULtrahydrogel™ Linear (300 mm \times 7.8 mm i.d. \times 2) 凝胶柱,柱温 45 °C,流动相 0.1 mol/L $NaNO_3$,流速 0.9 mL/min,标准品分子量:180、2 700、9 750、36 800、135 350 Da。

产物核磁共振 (NMR) 鉴定:将上述冷冻干燥产物称取 40 mg,加入 500 μ L含有 0.03%三甲基硅烷磷酸酯 (0.03% TMSP) 的重水 (D_2O) 完全溶解样品。在AVANCE III 400 MHz数字NMR 光谱仪 (Bruker Biospin International AG) 上于 60 °C检测样品的一维核磁共振 (NMR) 氢谱。其中 0.03% TMSP是作为校准化学位移 (δ) 的标准品。最后通过在 δ 5.39 和 δ 5.00 处的信号峰面积的

积分来估算 $\alpha(1-4)$ 和 $\alpha(1-6)$ 键的占比。

1.6 产物对水解酶抗性的研究

将直链淀粉预先由Gtf16 处理, 处理条件按1.5 所述。将 α -葡聚糖产物混合物(预先溶于pH 5.0 的0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/0.1$ mol/L柠檬酸缓冲液至终浓度为5 mg/mL) 分别与过量的高温 α -淀粉酶、普鲁兰酶和右旋糖酐酶混合, 并于37 °C 孵育12 h, 将直链淀粉、普鲁兰多糖、右旋糖酐在相同条件下分别用 α -淀粉酶、普鲁兰酶和右旋糖酐酶处理后的产物作为各个酶的阳性对照。加入高温 α -淀粉酶的反应混合物用200 μL 2 mol/L HCl 来终止反应, 加入普鲁兰酶和右旋糖酐酶的反应混合物通过煮沸10 min 终止反应。反应结束后将反应混合物离心, 取上清液通过TLC对产物进行分析。

1.7 产物的体外抗消化实验

消化酶的制备: 将2 g猪胰腺胰酶(Sigma Aldrich) 置于24 mL蒸馏水中充分振荡10 min, 1 500 r/min离心15 min, 将20 mL上清液转移至50 mL离心管中, 然后加入0.4 mL葡萄糖苷酶和3.6 mL蒸馏水充分混合^[11]。

取4 mL酶转化产物在37 °C下温浴10 min, 加入750 μL 的消化酶, 20 min和120 min后分别取样1 mL, 100 °C灭活。灭活样品通过12 000 r/min离心10 min后用葡萄糖试剂盒测葡萄糖含量。其中快速消化淀粉(Rapidly digestible starch, RDS)表示0–20 min内被消化的淀粉, 慢消化淀粉(Slowly digestible starch, SDS)表示20–120 min内被消化的淀粉, 抗性淀粉(Resistant starch, RS)表示120 min内不能被消化的淀粉^[12], 根据标准葡萄糖溶液与葡萄糖测定试剂盒测得的标准曲线 $y=0.849 2x+0.000 2$ ($R^2=0.999 9$, y : OD值; x : 葡萄糖浓度g/L) 及底物浓度得到各组分计算公式如下(其中OD前的5代表稀释倍数):

$$\text{RDS}(\%)=(5\text{OD}_{505-20 \text{ min}}-\text{OD}_{505-0 \text{ min}})/5.095 2\times 100;$$

$$\text{SDS}(\%)=(5\text{OD}_{505-120 \text{ min}}-5\text{OD}_{505-20 \text{ min}})/5.095 2\times 100;$$

$$\text{RS}(\%)=100-\text{RDS}-\text{SDS}。$$

2 结果与分析

2.1 GH70 系统进化树分析及重组质粒的构建、表达与纯化

由简并引物PCR获得的基因片段(1 440 bp)通过BLAST比对发现, 该基因片段与数据库中的基因(GenBank登录号: KY595735.1) 同源性高达100%, 在根据数据库基因序列设计两端引物PCR获得的全长基因约4 300 bp, 它所编码的蛋白序列与数据库中已提交的未表征蛋白假定的GTFB序列一致(GenBank 登录号: ASA47863.1), 通过对目标蛋白与GH70 家族的两大类酶的氨基酸序列进行系统进化树分析发现(图1), 图中展现了两个不同分支: 一个分支主要是GH70 的葡聚糖蔗糖酶(Glucansucrases, GSs), 其中主要包括交替糖蔗糖酶(Alternansucrase)、右旋糖酐蔗糖酶(Dextranase)、变聚糖蔗糖酶(Mutansucrase); 另一个分支主要是4,6- α -GTs, 包含GTFB-like亚家族和GTFC/D-like亚家族两类; 这两个分支最主要的区别表现在催化功能和序列结构上: 在催化功能上, 两者受体底物结合亚位点-1 和-2 中的氨基酸残基不同造成其利用的底物不同, 葡聚糖蔗糖酶利用蔗糖为底物, 4,6- α -GTs对蔗糖表现出无活性, 对淀粉和麦芽低聚糖表现活性。在序列结构上, GTFB-like亚家族的酶与葡聚糖蔗糖酶表现出一致性, 它们催化结构域中的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构都被循环转置, 保守基序是按照II-III-IV-I 排列的; 而GTFC/D-like亚家族酶催化结构域中的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构未被循环转置, 保守基序是按照I-II-III-IV 正常排列的。目标序列在进化树中是位于GTFB-like亚家族, 与其序列同源性最高的达80.59%^[2-3]。

为了进一步确定该酶的性质, 对目的基因进行表征。将获得的目的基因与pET15b载体通过一步克隆连接试剂盒进行连接并转入*E. coli* JM109,



图 1 GH70 系统进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of representative GH70 protein sequences. The Gtf16 is highlighted in black.

将测序正确的重组质粒 pET15b-*gtf16* 转入 *E. coli* BL21(DE3)。将重组菌进行摇瓶发酵, 获得的粗酶液用镍柱纯化, SDS-PAGE 结果见图 2, 在 102 kDa 附近出现单一蛋白条带, 具体纯化数据如表 3 所示。

2.2 重组蛋白的酶学性质

2.2.1 最适温度及最适 pH

为测定重组 Gtf16 的酶学性质, 分别在不同温度和不同 pH 条件下测定酶活, 结果显示 Gtf16 的最适温度为 40 °C (图 3A), 最适 pH 为 5.0 (图 3B)。当温度从 25 °C 升高至 40 °C 时, Gtf16 的酶活迅速上升, 当温度升高至 50 °C 时, 酶活迅速下降。Gtf16 在 pH 4.0–6.0 范围内比较稳定, 可以保留 80% 以上的酶活。

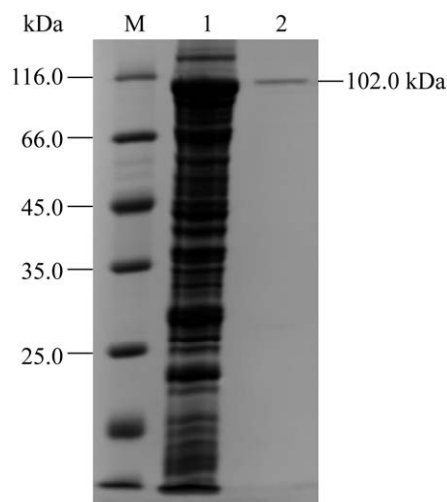


图 2 重组 Gtf16 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant Gtf16. M: marker; 1: crude enzyme; 2: purified enzyme.

表 3 重组蛋白Gtf16 的纯化结果

Table 3 Purification of the recombinant Gtf16

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
Rude enzyme	1 150.20	46.80	0.04	1.00	100.00
Ni-NTA	3.15	1.65	0.52	13.00	3.53

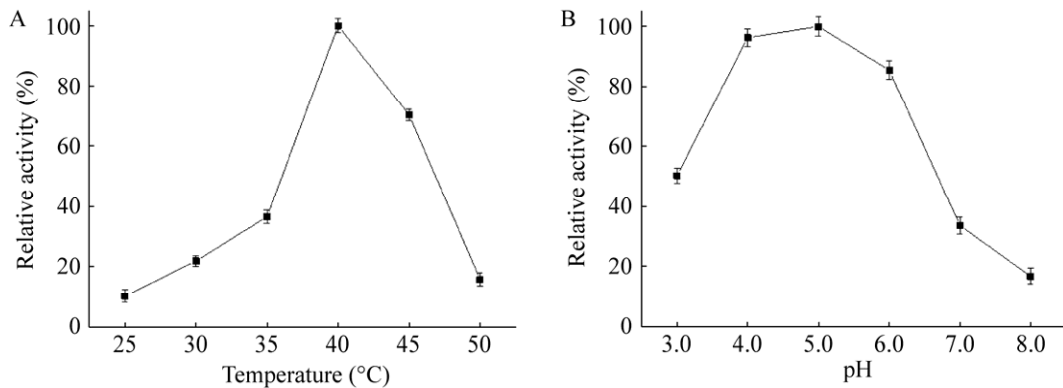


图 3 温度和pH对重组蛋白Gtf16 的影响

Fig. 3 Effect of temperature (A) and pH (B) on the recombinant Gtf16.

2.2.2 底物特异性分析

为了探究Gtf16 可以单独利用的寡糖类型,将纯酶分别与不同寡糖单独温浴一定时间,通过薄层色谱分析产物的组成。当薄层色谱中显示反应混合物中有出现小于或大于底物聚合度的糖时,就可认为Gtf16 可单独利用该糖发生水解或转苷反应。从图 2 可看出,该酶无法以单独的葡萄糖和麦芽糖作为底物,但是当该酶单独以麦芽三糖及更大聚合度的糖 (G4、G5、G6、G7) 作为底物时,发现有小于和大于该聚合度的糖出现,这说明它可以利用这些糖发生水解和转苷反应。当Gtf16 以麦芽六糖为底物时,在 origin 处出现了多聚合度的糖链,说明它可以利用麦芽六糖生成较大分子量的聚合物。另外,Gtf16 无法利用蔗糖、异麦芽二糖、异麦芽三糖、黑曲霉二糖及潘糖发生水解或转苷反应 (图 4)。

2.3 酶转化产物结构测定

产物的分子量大小由HPGFC测定,结果显示在 19.5 min 时出现一个单峰,产物的平均分子量 $M_w=23\ 793\ \text{Da}$ (图 5A)。

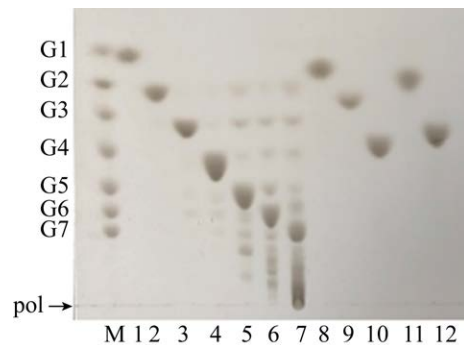


图 4 Gtf16 底物特异性分析

Fig. 4 Substrate specificity of the recombinant Gtf16. M: G1-G7; 1: G1; 2: G2; 3: G3; 4: G4; 5: G5; 6: G6; 7: G7; 8: sucrose; 9: isomaltobiose; 10: isomaltotriose; 11: nigerose; 12: panose.

为了进一步鉴定产物键型,通过NMR- ^1H 鉴定发现,在 $\delta\ 5.39$ 与 $\delta\ 5.00$ 两个信号处出现分别对应产物中 $\alpha(1-4)$ 键和新形成的 $\alpha(1-6)$ 键的特征峰^[13],未出现其他新键型的峰,证明产物中有较高含量的 $\alpha(1-6)$ 键,按照峰面积积分可算得其大约占 75% (图 5B)。

4,6- α -GTs与直链淀粉作用会产生两种不同类型的产物: I型为非还原端带有连续 $\alpha(1-6)$ 键的

线性产物, 这种产物无法被 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解, 但可以被右旋糖酐酶水解; II型为多个 $\alpha(1-4)$ 键连接的葡萄糖单元以 $\alpha(1-6)$ 键交替连接形成的带分支产物, 可以被 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解, 不被右旋糖酐酶水解。Gtf16的酶转化产物不能被 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解但可以被右旋糖酐酶水解(图5C), 可确定其产物类型为I型, 与文献中报道的*Lactobacillus reuteri* 121 GtfB的产物结构类似^[4]。

2.4 酶转化产物的体外抗消化实验

为进一步探究酶转化产物在人体内的抗消化行为, 模拟人体胃肠道的消化环境, 用猪胰腺胰酶和葡萄糖苷酶的混酶在37℃消化酶转化产物, 通过生成的葡萄糖量与底物含量的占比来换算抗消化的含量(表4)。由表4可知, 相比于对照组未处理的直链淀粉, 实验组的酶转化产物中快速消化(RDS)和缓慢消化(SDS)的成分大幅降低, 同时抗消化含量(RS)提高了72.58%, 达到了88.22%, 说明经该酶处理过的直链淀粉中抗消化成分的含量有了显著提高。

3 讨论

本研究通过对Gtf16与GH70中部分GSs和目前已报道的所有4,6- α -GTs进行系统进化树分析及其酶转化产物的性质鉴定, 确定Gtf16为新的4,6- α -GTs, 为新型4,6- α -GTs的发现提供了新的思路和方法。同时与GTFB-like亚家族其他的酶相比, 该酶的产物分子量较大, 研究表明, 高分子量的产物通常具有更好的饱腹感和降糖降脂功效, 因此该酶的产物在保健食品领域具有良好的应用价值。该酶最适温度为40℃, 最适pH为5.0, 可以单独利用聚合度大于2的麦芽寡糖, 与其他4,6- α -GTs一样无法单独利用蔗糖、异麦芽二糖、异麦芽三糖、黑曲霉二糖以及潘糖。以直链淀粉为底物的酶转化产物分析结果表明: 产物结构类型为I型; 能以直链淀粉为底物生成非还原端带有连续 $\alpha(1-6)$ 键的线性异麦芽寡糖; 产物键型中

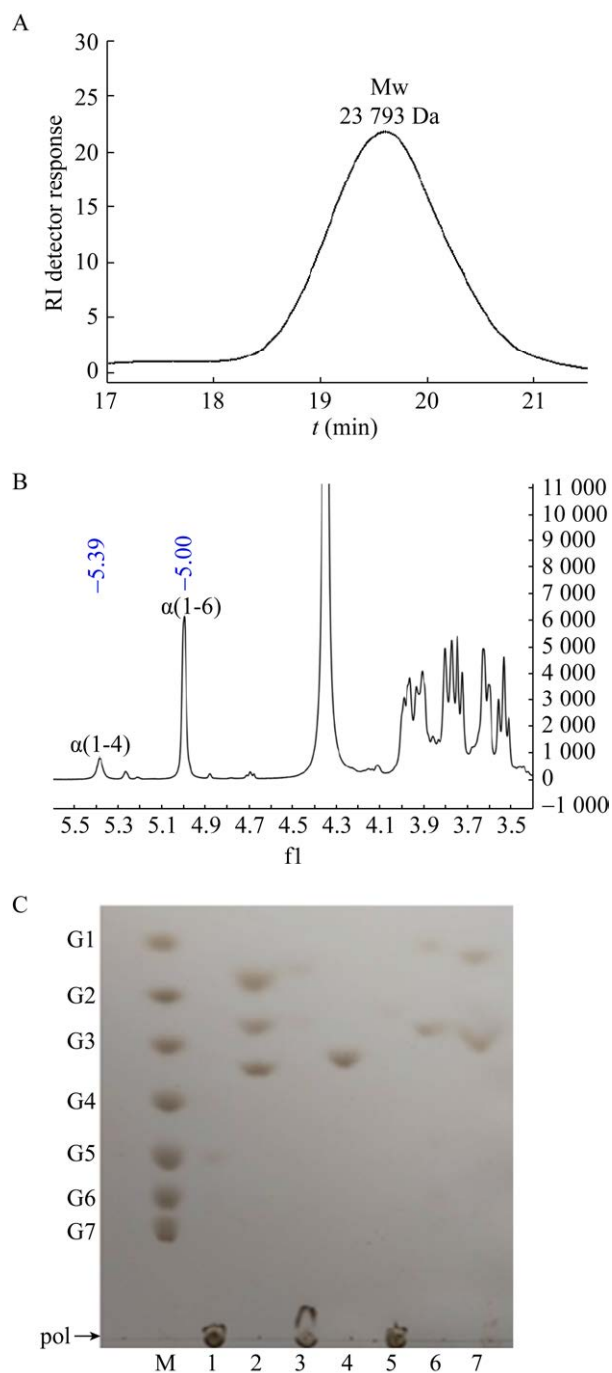


图5 酶转化产物结构测定

Fig. 5 Structure analysis of the Gtf16-catalyzed product. (A) The molecular weight of product. (B) ¹H NMR analysis of product. (C) TLC analysis of the resistance of the product to hydrolase. M: marker G1–G7; 1: Gtf16 polysaccharide; 2,4,6: positive control for α -amylase (amylose), dextranase (dextran) and pullulanase (pullulan) digestion; 3,5,7: Gtf16 polysaccharide for α -amylase, dextranase, pullulanase digestion.

表 4 猪胰腺胰酶和葡萄糖苷酶消化酶转化产物结果
Table 4 The profile of different components after digestion

	RDS (%)	SDS (%)	RS (%)
Control	62.87	21.49	15.64
Treatment	10.50	1.28	88.22

$\alpha(1-6)$ 键占比达 75%，产物经混酶消化后抗消化成分的含量可达到 88%。

4,6- α -GTs 可将淀粉修饰为可溶性抗消化的碳水化合物或膳食纤维，而这种抗消化的成分不会在小肠内被消化，而是作为结肠微生物的碳源物质被利用，利用这一特性可以有效降低人体进食后的血糖水平^[11,14]，通常认为这种低血糖指数的碳水化合物对人类健康有积极影响，并且对于患有糖尿病或糖尿病前期的病人可能尤其重要。本研究获得的 Gtf16 处理过的直链淀粉中抗消化成分的含量较高，这为 4,6- α -葡萄糖基转移酶在医药及功能性食品方面的应用前景提供了重要依据^[8]。

REFERENCES

- [1] Gangoiti J, Pijning T, Dijkhuizen L. Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α -glucans from starch and sucrose. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 196-207.
- [2] Kralj S, Grijpstra P, van Leeuwen SS, 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. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(22): 8154-8163.
- [3] Meng XF, Gangoiti J, Bai YX, et al. Structure-function relationships of family GH70 glucansucrase and 4,6- α -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(14): 2681-2706.
- [4] Gangoiti J, Pijning T, Dijkhuizen L. The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GtfC enzyme represents a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6- α -glucanotransferase enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(2): 756-766.
- [5] Dobruchowska JM, Gerwig GJ, Kralj S, et al. Structural characterization of linear isomalto-/malto-oligomer products synthesized by the novel GTFB 4,6- α -glucanotransferase enzyme from *Lactobacillus reuteri* 121. *Glycobiology*, 2012, 22(4): 517-528.
- [6] Gangoiti J, Lamothe L, van Leeuwen SS, 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. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0172622.
- [7] Gangoiti J, van Leeuwen SS, Vafiadi C, 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. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(6): 1224-1236.
- [8] Leemhuis H, Dijkman WP, Dobruchowska JM, et al. 4,6- α -glucanotransferase activity occurs more widespread in *Lactobacillus* strains and constitutes a separate GH70 subfamily. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(1): 181-193.
- [9] Bai YX, van der Kaaij RM, Leemhuis H, et al. Biochemical characterization of the *Lactobacillus reuteri* glycoside hydrolase family 70 GTFB type of 4,6- α -glucanotransferase enzymes that synthesize soluble dietary starch fibers. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(20): 7223-7232.
- [10] Kopachena B, Lunday D, Miskevich F. Kinetic analysis of amylase using quantitative benedict's and iodine starch reagents. *J Chem Educ*, 2008, 85(3): 401.
- [11] Jo AR, Kim HR, Choi SJ, et al. Preparation of slowly digestible sweet potato Daeyumi starch by dual enzyme modification. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 164-171.
- [12] Leemhuis H, Dobruchowska JM, Ebbelaar M, et al. Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(49): 12034-12044.
- [13] Gangoiti J, van Leeuwen SS, Meng XF, et al. Mining novel starch-converting glycoside hydrolase 70 enzymes from the nestle culture collection genome database: the *Lactobacillus reuteri* NCC 2613 GtfB. *Sci Rep*, 2017, 7: 9947.
- [14] Ao ZH, Simsek S, Zhang GY, et al. Starch with a slow digestion property produced by altering its chain length, branch density, and crystalline structure. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4540-4547.

(本文责编 郝丽芳)