

编者按:面对新一轮科技革命和产业变革加速向传统食品行业渗透的大趋势,坚持科技创新是引领食品产业结构稳步度过深度调整期的核心引擎。食品与生物在科学、技术、产业等领域全方位、多层次的交叉与融合,是提升食品科学内涵,突破未来食品科学技术瓶颈的重要手段,也是新时代背景下践行“大食物观”,构建多元化食物供给体系的重要途径。为促进生物技术和食品相关产业的交叉融合,推进我国大健康产业发展,本刊开设“食品生物技术”特约专栏,将连续刊载该领域的最新科研成果。

(本刊主编:中国工程院院士陈坚)

源于类芽胞杆菌的低聚糖脱支酶底物特异性及其应用研究

孔昊存^{1,2,3}, 张笑², 李才明^{1,2,3}, 班宵逢^{1,2}, 顾正彪^{1,2}, 李兆丰^{1,2,3*}

¹江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室 江苏无锡 214122

²江南大学食品学院 江苏无锡 214122

³宜兴食品与生物技术研究院 江苏宜兴 214200)

摘要 脱支酶是淀粉深加工产业的常用酶制剂,然而传统脱支酶难以完全满足淀粉糖绿色生产及副产物综合利用的需求,因此有必要挖掘适合的新型脱支酶。本研究筛选并构建来源于类芽胞杆菌 STB16 的低聚糖脱支酶基因(*oga*)的枯草芽孢杆菌表达系统,实现低聚糖脱支酶的异源表达,并探究重组酶的酶学性质和底物特异性。结果表明,枯草芽孢杆菌发酵上清液的酶活力可达 162.33 U/mL,重组酶的最适反应温度 50 °C、最适反应 pH 值 6.0,且专一地作用于底物中聚合度为 1 的分支的 α -1,6-糖苷键。相比于其它类型的脱支酶(底物转化率低于检出限),重组低聚糖脱支酶对异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等异麦芽低聚糖具有更彻底的水解能力,底物转化率达 97.4%~100%,且产物为葡萄糖,因此更适合用于处理葡萄糖母液,可使一次母液、二次母液和色谱分离尾液中葡萄糖含量分别提升 3.6%,12.7%和 34.4%。相关研究结果可为新型脱支酶的开发和利用奠定理论基础,也为淀粉糖加工副产物的综合利用提供重要参考。

关键词 低聚糖脱支酶; 酶学性质; 底物特异性; 淀粉糖; 葡萄糖母液

文章编号 1009-7848(2024)03-0001-16 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.03.001

淀粉糖是以淀粉或含淀粉的谷物、薯类等粮食为原料,经酸法、酶法或酸酶法制备的糖类制品,主要包括麦芽糊精、麦芽糖浆、结晶葡萄糖、果葡糖浆等^[1]。近年来,伴随着淀粉深加工以及淀粉酶制剂行业的科技进步和人们消费结构的变化,淀粉糖市场规模逐步扩大,产量大幅增加,已成为淀粉深加工的支柱产品,也成为食糖市场的重要补充,被广泛应用于食品、医药、造纸等诸多行业。

目前普遍采用双酶法生产淀粉糖,以结晶葡萄糖为例,先用 α -淀粉酶将淀粉液化,继而用葡萄糖淀粉酶将液化产物糖化成单个分子的葡萄糖,再经浓缩、结晶、分离与包装等工艺制成结晶葡萄糖^[2]。淀粉是 α -D-吡喃葡萄糖经 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键聚合而成的一种高分子碳水化合物,液化酶和糖化酶主要作用于淀粉的 α -1,4-糖苷键,对 α -1,6 糖苷键的水解效率很低,会造成目标产物得率低、副产物比例高等问题^[3-4],因此淀粉糖的酶法生产中常会添加脱支酶辅助糖化。

脱支酶是一类能够专一、高效水解淀粉及相关多糖中 α -1,6-糖苷键的水解酶。根据底物特异性和催化模式,脱支酶主要分为 4 类^[5]:异淀粉酶(isoamylase, EC 3.2.1.68)、普鲁兰酶(pullulanase, EC 3.2.1.41/142)、淀粉 α -1,6 葡糖苷酶(amylo-

收稿日期: 2023-12-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272263); 国家自然科学基金青年科学基金项目(32302011); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20221074)

第一作者: 孔昊存,男,博士,助理研究员

通信作者: 李兆丰 E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

α -1,6-glucosidase, EC 3.2.1.33) 和低聚糖脱支酶 (oligo-1,6-glucosidase, EC 3.2.1.10)。其中, 异淀粉酶和普鲁兰酶已被广泛研究, 其结构特征、分子机制和应用场景等都有详细报道^[6-7], 如普鲁兰酶常被用于淀粉糖生产的糖化工艺, 以提高原料转化率和目标产物纯度。

目前, 发生复合反应和底物转化不彻底仍是淀粉糖产业面临的主要难题。以结晶葡萄糖为例, 其生产过程中会产生大量副产物, 包括: 麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖、异麦芽三糖等小分子糖类。这些副产物聚合度较低, 常用的普鲁兰酶难以将其进一步水解, 最终残留在母液中^[8]。目前在淀粉糖工业中, 每生产 100 万 t 结晶葡萄糖, 大约产生 20 万 t 葡萄糖母液, 这些废液经济价值较低, 如不加以利用就会造成资源浪费、污水处理成本增加等问题^[9]。为了满足淀粉糖产业对脱支酶的多样化需求, 有必要挖掘适合作用于低聚糖的新型脱支酶, 实现高效分泌表达, 进而探究其催化特性和底物识别规律。

低聚糖脱支酶属于糖苷水解酶家族 13 (glycoside hydrolase 13, GH 13), 其底物结合凹槽较其它脱支酶更小, 可容纳小分子底物, 如异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等, 并水解其 α -1,6-糖苷键; 通常情况下, 随着底物聚合度的增加, 低聚糖脱支酶的作用效率下降^[10]。然而, 目前已发掘的低聚糖脱支酶种类较少, 且催化特性和工业应用场景不明确。基于此, 本研究筛选获得一种水解活力高、热稳定性强的低聚糖脱支酶, 该酶基因 (*oga*) 来源于类芽胞杆菌 (*Paenibacillus* sp.) STB16, 进而通过构建枯草芽孢杆菌表达系统实现其异源表达, 并对重组酶的酶学性质和底物特异性进行研究, 探究其在葡萄糖母液中应用的可行性, 相关结果可为新型脱支酶的挖掘和应用提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600、大肠杆菌 (*E. coli*) JM109、类芽胞杆菌 STB16、大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pP43NMK, 均保藏于本实验室。带有类芽胞杆菌 STB16 天然低聚糖脱支酶 (NCBI 登录号: CDN44965.1) 编码基因的载体

PUC57-*oga* 委托深圳华大基因公司合成。

卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)、蛋白分子质量标准 (14.4~116 ku)、快速 DNA 连接试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶配制试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 超级感受态细胞制备试剂盒、普鲁兰多糖、右旋糖苷, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 异麦芽糖 (isomaltose, IG2) 标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 异麦芽三糖 (isomaltotriose, IG3)、异麦芽四糖 (isomaltotetraose, IG4)、异麦芽五糖 (isomaltopentaose, IG5)、潘糖 (panose, P) 标准品、对硝基苯 α -D-葡萄糖苷 (p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, pNPG)、对硝基苯酚 (p-nitrophenyl, pNP), 上海麦克林生化科技有限公司; 葡萄糖 (glucose, G1)、麦芽糖 (maltose, G2)、麦芽三糖 (maltotriose, G3)、麦芽四糖 (maltotetraose, G4)、麦芽五糖 (maltopentaose, G5) 标准品, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氢氧化钠溶液 (色谱纯)、乙酸钠 (色谱纯), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 蜡质玉米淀粉, 嘉吉亚太食品系统 (北京) 有限公司; 木薯淀粉, 广西红枫淀粉有限公司; 不同葡萄糖值 (dextrose equivalent, DE) 麦芽糊精, 罗盖特 (中国) 精细化工有限公司; 结晶葡萄糖一次母液、二次母液, 由山东西王糖业有限公司提供; 色谱分离尾液, 厦门象屿集团有限公司。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 仪器与设备

ProFlex™ PCR 仪, 美国 ABI 公司; Mini-Sub Cell GT 核酸电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; ZQZY-70BS 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 3K15 台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma Zentrifugen 离心机公司; AKTA prime™ plus 蛋白质纯化系统, 美国 GE 公司; Mini-PROTEIN Tetra 蛋白电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; WD-9413B 凝胶成像分析仪, 北京六一生物科技有限公司; AKTA prime™ plus 蛋白质纯化系统, 美国通用电气公司; T-6V 紫外-可见分光光度计, 南京菲勒仪

器有限公司;SW22 恒温水浴摇床,德国 JULABO 有限公司;ICS-5000 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器 (high performance anion exchange chromatography equipped with pulse amperometric detector,HPAEC-PAD),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Waters 1525EF 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography,HPLC) 仪,美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 *oga* 的克隆、表达及酶纯化 以质粒 pP43NMK 作为模板,设计两端引物 L₁ (5'-CAC CACCACCACCTAAGCTTAACAGGACACCG - 3') 及 F₂ (5'-AAATGGAAATAGAAGCATGTG TACATTTACC-3')(由苏州金唯智生物科技有限公司合成),经 PCR 扩增后得到 *oga* 基因及 pP43NMK 载体线性片段。使用同源重组方法将目的基因与载体片段进行连接。连接体系为 2 μL 目的基因片段,1 μL pP43NMK 载体片段,4 μL 5 × CE II Buffer,2 μL Exnase II,11 μL 无菌超纯水,充分混匀后于室温下孵育 30 min。

连接完成后将重组质粒转化克隆宿主大肠杆菌 JM109 中培养富集,提取质粒测序验证。将测序正确的表达载体 pP43NMK/*oga* 转化进表达宿主枯草芽孢杆菌 WB600 中,得到能够表达 BmMFA 的基因工程菌枯草芽孢杆菌 WB600(pP43NMK/*oga*)。

将活化后的基因工程菌枯草芽孢杆菌 WB600(pP43NMK/*oga*)按照接种量 4% (体积分数)接种到含 10 μg/mL 卡那霉素的 TB 发酵培养基(酵母粉 24 g/L,胰蛋白胨 12 g/L,甘油 5 g/L, K₂HPO₄ 16.432 g/L,KH₂PO₄ 2.314 g/L,pH 7.0)中,于 25 °C、200 r/min 条件下培养 96 h。将发酵结束的菌液在 4 °C、10 000 r/min 下离心 20 min,收集上清液即得重组低聚糖脱支酶粗酶液。

采用镍柱对重组低聚糖脱支酶进行纯化。平衡液(A液,pH 7.5)为 500 mmol/L NaCl + 50 mmol/L Tris-HCl + 20 mmol/L 咪唑,洗脱液(B液,pH 7.5)为 500 mmol/L NaCl + 50 mmol/L Tris-HCl + 500 mmol/L 咪唑。使用 0.45 μm 的水系膜过滤粗酶液,使用 5~6 个柱体积的 A 液平衡镍柱。将待纯化的粗酶液以 2 mL/min 的流速上样,使目

的蛋白结合到柱上。然后,用 A 液冲洗平衡镍柱,再用 60%的 B 液将吸附的目的蛋白洗脱下来。根据洗脱峰收集对应洗脱液,进行 SDS-PAGE 验证和酶活测定。将纯化后的酶液置于透析袋中,在 4 °C 条件下用 pH 6.0 的 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液进行过夜透析,并保存在 -80 °C 超低温冰箱中。

1.3.2 低聚糖脱支酶的酶活测定 吸取 800 μL pNPG 底物 (10 mmol/L) 和 150 μL 磷酸缓冲液 (500 mmol/L,pH 6.0)于离心管中,混匀后 50 °C 保温,加入 50 μL 稀释后的待测酶液,在 50 °C 反应 5 min,加入 1 mL Na₂CO₃ 溶液 (1 mol/L) 终止反应,于 410 nm 处测定吸光值。酶活定义为:在上述条件下,每分钟水解生成 1 μmol 的 pNP 为 1 个酶活力单位。以高温灭活的酶液作为空白对照。

1.3.3 重组低聚糖脱支酶的酶学性质测定 为测定重组低聚糖脱支酶的最适反应温度,分别在温度 30~80 °C 测定纯酶的活力,以酶活力最高者定义为 100%。

为测定重组低聚糖脱支酶的热稳定性,将纯酶分别置于温度 45~60 °C 保温不同时间,取出后迅速冷却,在标准条件下测定残余酶活,以未保温时的酶活力定义为 100%。

为测定重组低聚糖脱支酶的最适 pH 值,分别在不同 pH 值的柠檬酸钠缓冲液 (500 mmol/L,pH 3.0~6.0)、磷酸缓冲液 (500 mmol/L,pH 6.0~8.0) 和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (500 mmol/L,pH 8.0~11.0) 中测定纯酶的活力,以酶活力最高者定义为 100%。

为测定重组低聚糖脱支酶的 pH 稳定性,将纯酶分别于上述缓冲液中 4 °C 保温 3 h,在标准条件下测定残余酶活,以未保温时的酶活力定义为 100%。

为测定金属离子及 EDTA 对重组低聚糖脱支酶活力的影响,在底物溶液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子和 EDTA,以未添加金属离子和 EDTA 时的酶活力定义为 100%。

1.3.4 底物类型对酶活力的影响 以木薯淀粉、蜡质玉米淀粉、不同 DE 值麦芽糊精、右旋糖苷 20、右旋糖苷 40、右旋糖苷 70、低聚异麦芽糖、糖原、普鲁兰多糖等为底物,配制 1 mg/mL 的底物溶液,添加低聚糖脱支酶、普鲁兰酶或异淀粉酶分别

于最适反应温度反应 5 min 后,采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定产物中的还原糖(以葡萄糖计)含量^[11]。以单位时间内的还原糖(以葡萄糖计)增量为指标,计算不同脱支酶对不同底物的水解活力,以酶活力最高者定义为 100%。

1.3.5 链长分布分析 称取 10.0 mg DE 16 麦芽糊精,用 50 mmol/L 不同 pH 值的醋酸钠缓冲液配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,沸水浴加热 30 min 使底物充分糊化。将样品溶液置于对应温度水浴保温 15 min 后,分别添加 70 U/mg 的异淀粉酶(pH 3.5, 40 °C)、100 U/mg 的普鲁兰酶(pH 4.5, 40 °C)、50 U/mg 的低聚糖脱支酶(pH 6.0, 50 °C),恒温反应 24 h。脱支结束后,沸水浴 30 min 终止反应。将反应液 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上层清液稀释一定倍数后,经 0.22 μm 水系滤膜过滤,采用 HPAEC-PAD 分析不同聚合度(degree of polymerization, DP)链段的出峰面积,色谱条件参照文献[12]的方法。

1.3.6 β-淀粉酶水解率测定 以 DE 16 麦芽糊精为底物,利用不同脱支酶水解 24 h,沸水浴 30 min 终止反应后,将反应产物冷冻干燥,得到脱支样品。准确称取 10.0 mg 脱支样品,用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 5.5)制成 5 mg/mL 的样品溶液,沸水浴加热 30 min 使样品充分糊化。将样品溶液置于 50 °C 水浴保温 15 min 后,添加 70 U/mg 的 β-淀粉酶,维持 50 °C 恒温反应 24 h。反应结束后,沸水浴 30 min 终止反应。反应液 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上层清液稀释一定倍数后,经 0.22 μm 水系滤膜过滤,采用 HPAEC-PAD 分析麦芽糖含量。β-淀粉酶水解率的计算方法和色谱条件参照文献[13]的方法。

1.3.7 反应产物组成分析 分别配制终质量浓度为 1 mg/mL 的 IG2~IG5、P、G2~G5 标准溶液,添加低聚糖脱支酶、普鲁兰酶或异淀粉酶,分别于最适反应温度反应 24 h 后,沸水浴加热 30 min。反应液 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上层清液稀释一定倍数,经 0.22 μm 水系滤膜过滤,采用 HPAEC-PAD 分析,根据标准品的出峰时间和出峰面积,对反应前、后产物中的不同组分进行定性和定量分析。色谱条件参照文献[12]的方法。

1.3.8 重组低聚糖脱支酶处理葡萄糖母液 以结

晶葡萄糖的一次母液、二次母液、色谱分离尾液为原料,加入低聚糖脱支酶进行处理,于 50 °C 反应 24 h 后,沸水浴加热 30 min。反应液 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上层清液稀释一定倍数后,经 0.22 μm 水系滤膜过滤,采用 HPLC 分析,根据标准品的出峰时间和出峰面积,对反应前、后产物中的不同组分进行定性和定量分析。

HPLC 分析条件:色谱柱为 Hypersil APS2,流动相为 70%(体积分数)乙腈溶液,色谱柱温度 30 °C,检测流速 1.0 mL/min。

1.4 数据处理与分析

试验结果为 3 次平行试验的平均值,用平均值±标准偏差表示。采用 Microsoft Office Excel 2016 软件进行数据的初步处理,采用 SPSS 20.0 版本中的单因素方差分析比较组间的统计学差异。当 $P < 0.05$ 时,认为组间差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 低聚糖脱支酶在枯草芽孢杆菌中的异源表达与分离纯化

枯草芽孢杆菌 WB600 是一种食品级表达系统,无致病性,培养发酵条件简单,菌体易于生长繁殖,是低聚糖脱支酶异源表达较为理想的系统。已将目的基因 *oga* 克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pP43NMK 中,将序列测序正确的质粒转化进枯草芽孢杆菌 WB600,获得基因工程菌枯草芽孢杆菌 WB600(pP43NMK/*oga*)。

将基因工程菌枯草芽孢杆菌 WB600(pP43NMK/*oga*) 经种子培养后接种到 TB 发酵培养基中,于 25 °C、200 r/min 条件下培养 96 h,在 4 °C、10 000 r/min 离心收集发酵上清液(即粗酶液),测定其催化活力可达到 162.33 U/mL,发酵上清液中蛋白含量为 609.55 mg,比活力达 10.68 U/mg。结合 SDS-PAGE 分析结果,表明 *oga* 基因在枯草芽孢杆菌中成功分泌表达至胞外。与其它表达系统(如大肠杆菌)相比,所得重组蛋白便于直接纯化得到高纯度且稳定的目的蛋白,不易造成目的蛋白的损失,因而更具优势。由于重组低聚糖脱支酶在 C-末端连接有 6 × His-tag,酶蛋白表面的组氨酸标签能与 Ni²⁺ 发生配位相互作用,可以采用镍柱对粗酶液进行纯化。图 1c 和图 1d 分别为低聚糖脱支酶的纯化图谱和 SDS-PAGE 验证

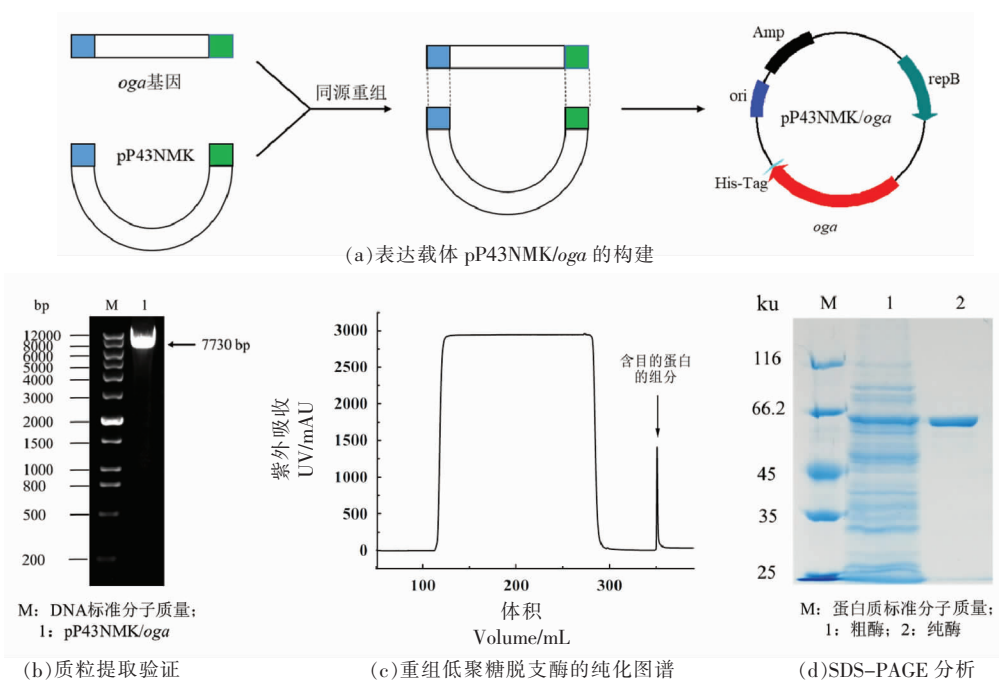


图 1 低聚糖脱支酶在枯草芽孢杆菌 WB600 中的异源表达与分离纯化

Fig.1 Heterologous expression of oligo-1,6-glucosidase in *B. subtilis* WB600 and purification of the recombinant oligo-1,6-glucosidase

表 1 低聚糖脱支酶的纯化结果

Table 1 Purification result of oligo-1,6-glucosidase

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白含量/mg	比酶活力/U·mg ⁻¹	纯化倍数	回收率/%
发酵液	6 511.66	609.55	10.68	1	-
镍柱	4 534.33	11.98	378.49	35.43	69.63

结果。经镍柱纯化的低聚糖脱支酶条带单一,分子质量与理论分子质量接近。测定纯化前、后低聚糖脱支酶的酶活与蛋白浓度(表 1),纯酶的比酶活可达 378.49 U/mg, 纯化倍数 35.43, 回收率 69.63%。

2.2 重组低聚糖脱支酶的酶学性质

2.2.1 最适反应温度和热稳定性

最适反应温度和热稳定性是评价淀粉酶应用性能的重要指标,尤其是在淀粉糖的酶法生产工艺中,较高的反应温度抑制淀粉类原料的回生并能防止生产过程中微生物的污染。目前报道的低聚糖脱支酶的最适温度范围较广,如来源于黄热芽孢杆菌(*B. flavo-caldarius*) KP1228 的低聚糖脱支酶最适反应温度可达 85 °C^[14], 而来源于西伯利亚微小杆菌(*Exiguobacterium sibiricum*) 的低聚糖脱支酶最适反

应温度仅为 25 °C^[10]。为确定本文中低聚糖脱支酶的最适反应温度,分别在温度 30~80 °C 范围测定纯酶的活力。

如图 2a 所示,低聚糖脱支酶的活力随温度的升高先增加后下降,在 50 °C 时酶活最高,在温度 45~55 °C 条件下能达到最高酶活的 85% 以上。当温度超过 55 °C 后,低聚糖脱支酶的酶活力迅速下降,65 °C 时仅约 20% 的相对活力,80 °C 时低聚糖脱支酶基本失活。

为了探究低聚糖脱支酶的热稳定性,将纯酶分别置于 45, 50, 55 °C 或 60 °C 恒温水浴锅中保温,每隔一定时间取出少量酶液测定残余酶活。如图 2b 所示,低聚糖脱支酶在 45 °C 保温时,酶活力稳定,并随时间的延长酶活力有稍许增加,这主要是由于在适温孵育的过程中,蛋白之间作用力(静

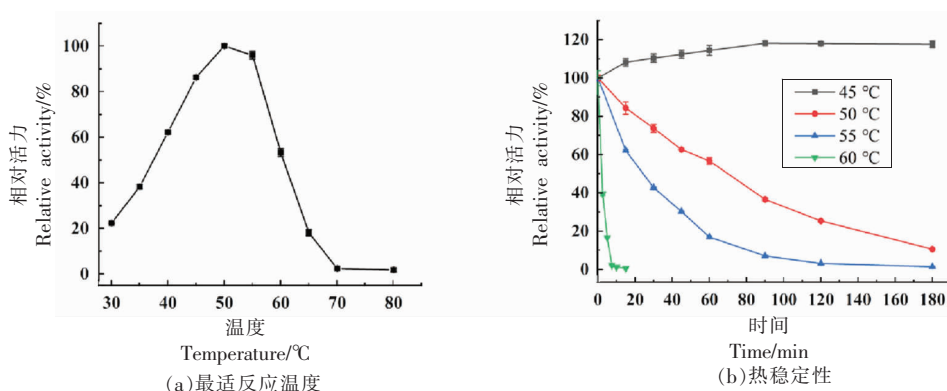


图2 重组低聚糖脱支酶的最适反应温度和热稳定性

Fig.2 The optimal reaction temperature and thermostability of the recombinant oligo-1,6-glucosidase

电相互作用和范德华力)发生变化,蛋白的氨基酸结构轻微调整,催化中心的灵活度变高,引起的酶活增加。随着温度的进一步提高,低聚糖脱支酶的稳定性逐渐变差,在50℃和55℃保温时,酶活力逐渐降低,说明蛋白开始出现变性,半衰期分别约70 min和25 min。在60℃保温时,低聚糖脱支酶活性急剧下降,半衰期小于2 min,在15 min内接近完全失活。上述结果表明,重组低聚糖脱支酶在温和条件下具有良好的催化活性,而不适合在高温下反应。

2.2.2 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性 大多数低聚糖脱支酶都在弱酸或中性下表现出最高酶活,如:来源于热葡萄糖苷地芽孢杆菌(*B. thermoglucosidasius*) KP1006 的低聚糖脱支酶的最适 pH 值为 5.0~6.0^[15],来源于蕈状芽孢杆菌(*B. mycooides*) 的低聚糖脱支酶在 pH 6.5 时表现出最高酶活^[16],来源于酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 的低聚糖脱支酶的最适 pH 值在 7.0~7.5 之

间^[17]。为了确定本文中低聚糖脱支酶的最适 pH 值,分别在 pH 3.0~11.0 范围测定纯酶的活力。

如图 3a 所示,低聚糖脱支酶在 pH 6.0 时酶活力最高,在 pH 5.0~7.5 之间保持 80% 以上酶活力。在 pH < 5.0 和 pH > 9.0 的条件下,酶活力迅速下降。值得注意的是,低聚糖脱支酶在甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中的酶活力相比其在相同 pH 值的磷酸缓冲液中更高,推测可能是甘氨酸促进低聚糖脱支酶结构的稳定。

分别用上述不同 pH 值的缓冲液稀释纯酶,在 4℃ 保温 3 h 后测定残余酶活,以确定低聚糖脱支酶的 pH 稳定性。如图 3b 所示,低聚糖脱支酶在 pH < 5.0 时基本失去活性,在 pH 5.0~11.0 条件下能维持初始活性,说明其在弱酸及碱性环境下低聚糖脱支酶具有良好的稳定性,可适应大多数淀粉或低聚糖底物的酶法转化工艺,因此具有良好的应用潜力。

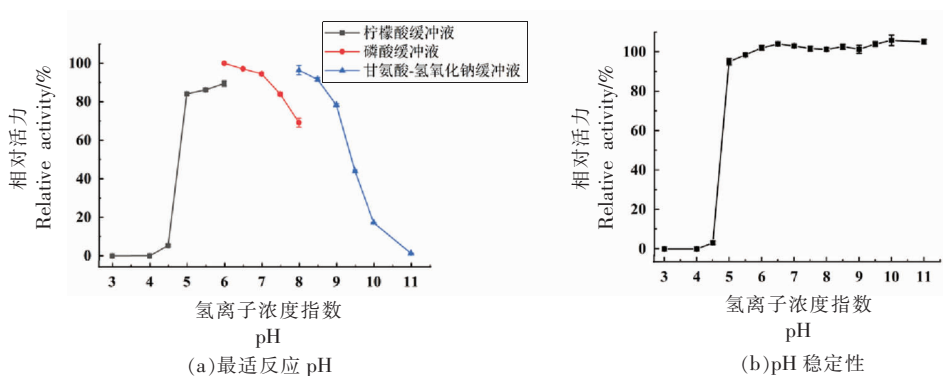


图3 重组低聚糖脱支酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

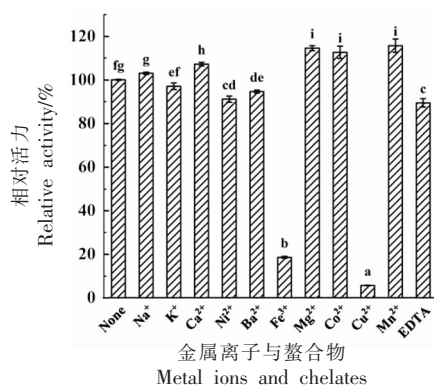
Fig.3 The optimal reaction pH value and pH stability of the recombinant oligo-1,6-glucosidase

2.2.3 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响 一些金属离子可作为酶的辅助因子, 从而影响酶的活力^[18]。例如:多数淀粉酶的蛋白结构中包含了 Ca^{2+} 结合位点, 因此 Ca^{2+} 是维持多数淀粉酶构象稳定和催化功能的重要组成部分。为测定金属离子和 EDTA 对酶活力的影响, 在底物溶液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的金属离子和 EDTA。结果如图 4 所示, 不同金属离子对低聚糖脱支酶活性的影响各不相同, 1 mmol/L Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 对低聚糖脱支酶的活力有激活作用, 提高程度在 12.63%~15.66%, 这些特定的离子可能是酶活性中心的组成成分, 也可作为电子供体或受体, 从而稳定酶分子构象或加速酶促反应。相反, K^+ 、 Ni^{2+} 、 Ba^{2+} 对酶活力有轻微的抑制作用, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力有显著的抑制作用, Cu^{2+} 存在时低聚糖脱支酶的活力几乎完全丧失。类似的, 2 mmol/L 的 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) DG0303 和凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*) ATCC7050 来源的低聚糖脱支酶活力的抑制程度分别达到 71%, 98%^[19] 和 86%, 96%^[20], 表明这些重金属离子与酶蛋白结合会破坏蛋白的活性构象, 从而降低其催化活性。此外, 低聚糖脱支酶的相对活力在 1 mmol/L EDTA 条件下出现约 10% 的降低, 表明该酶的活性在一定程度上依赖于金属辅因子。

2.3 重组低聚糖脱支酶对不同类型底物的催化能力

2.3.1 底物类型对酶活力的影响 根据结构和催化模式差异, 脱支酶主要分为 4 类: 普鲁兰酶、异淀粉酶、淀粉 α -1,6 葡糖苷酶和低聚糖脱支酶, 其中, 底物特异性是影响不同类型脱支酶应用性能的重要属性^[5]。为了明确重组低聚糖脱支酶的底物特异性, 选择淀粉、麦芽糊精、右旋糖苷和异麦芽低聚糖等不同类型、不同分子质量的底物, 探究底物类型对重组低聚糖脱支酶水解活力的影响, 结果如图 5 所示。

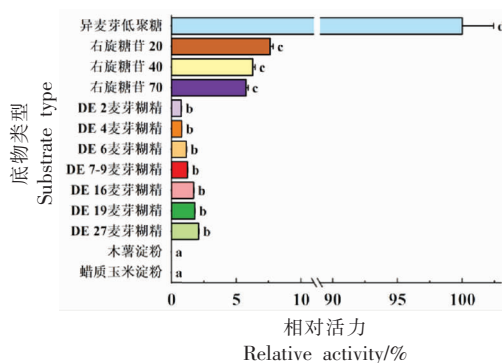
低聚糖脱支酶对不同底物的水解活力相差很大, 在多种类型的底物中, 低聚糖脱支酶对异麦芽低聚糖表现出最高的水解活力, 而对木薯淀粉、蜡质玉米淀粉没有表现出酶活力, 表明其对分子质量较大且支链结构较长的底物无水解作用。以异麦芽低聚糖为底物时的酶活力为 100%, 低聚糖脱



注: 不同字母的数据之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 4 金属离子及 EDTA 对重组低聚糖脱支酶活性的影响

Fig.4 Effects of metal ions and EDTA on the activity of the recombinant oligo-1,6-glucosidase



注: 不同字母的数据之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 底物类型对重组低聚糖脱支酶活力的影响

Fig.5 Effects of substrate type on the activity of the recombinant oligo-1,6-glucosidase

支酶对麦芽糊精类底物的相对活力在 0.76%~2.09% 之间, 并随麦芽糊精 DE 值的增加, 低聚糖脱支酶的相对活力增大。麦芽糊精是淀粉经 α -淀粉酶部分水解的产物, 且分子质量、分支长度随 DE 值增加而降低^[11]。低聚糖脱支酶对麦芽糊精类底物有微弱的水解作用, 表明低聚糖脱支酶更倾向于作用低分子质量、短分支的底物。

右旋糖苷是由葡萄糖基通过 α -1,6-糖苷键连接构成的分支葡聚糖, 以右旋糖苷为底物时, 低聚糖脱支酶能作用于主链上的 α -1,6-糖苷键水解生成葡萄糖。相比于麦芽糊精中大部分糖苷键仍为 α -1,4-糖苷键 (α -1,6-糖苷键比例约 4%)^[21], 右旋糖苷中 α -1,6-糖苷键占主导地位, 给低聚糖

脱支酶提供了更多可作用的位点。因此低聚糖脱支酶作用于右旋糖苷的相对活力比麦芽糊精高,在 5.76%~7.61%之间。而低聚糖脱支酶作用于右旋糖苷的活力仍远低于作用于异麦芽低聚糖的活力,主要是由于右旋糖苷的相对分子质量较大,远大于异麦芽低聚糖。

为进一步探究低聚糖脱支酶与其它类型脱支酶底物特异性的差异,以普鲁兰多糖、糖原、蜡质玉米淀粉、木薯淀粉、DE 2 麦芽糊精、DE 6 麦芽糊精、DE 16 麦芽糊精为底物,分别添加异淀粉酶、普鲁兰酶、低聚糖脱支酶对底物进行酶解处理,结果见表 2。

普鲁兰酶对不同底物的水解效率相差很大,对普鲁兰多糖表现出最高活力,而对糖原几乎无

水解活力,对蜡质玉米淀粉和木薯淀粉的相对活力仅 20%左右,说明普鲁兰酶对分子质量较大、分支较长的底物水解效率较低。异淀粉酶对糖原的水解效率最高,对蜡质玉米淀粉和木薯淀粉的水解效率次之,对普鲁兰多糖无水解作用,表明异淀粉酶适合作用于分子质量大且分支较长的底物。与普鲁兰酶和异淀粉酶相比,低聚糖脱支酶对普鲁兰多糖、糖原、蜡质玉米淀粉和木薯淀粉均无水解活力,仅能水解麦芽糊精类底物,且随麦芽糊精 DE 值的增加相对活力增大,表明低聚糖脱支酶不能作用于含有长分支的大分子底物,更倾向于作用短分支的小分子底物,具有与普鲁兰酶和异淀粉酶完全不同的底物特异性。

表 2 底物类型对不同脱支酶活力的影响

Table 2 Effects of substrate type on the activity of different debranching enzymes

底物	相对活力/%		
	普鲁兰酶	异淀粉酶	低聚糖脱支酶
普鲁兰多糖	100 ± 0.86 ^f	ND [*]	ND [*]
糖原	1.35 ± 0.95 ^a	100 ± 1.52 ^f	ND [*]
蜡质玉米淀粉	20.46 ± 1.00 ^b	83.94 ± 1.85 ^e	ND [*]
木薯淀粉	21.26 ± 1.19 ^b	74.93 ± 1.22 ^d	ND [*]
DE 2 麦芽糊精	40.88 ± 1.10 ^c	67.83 ± 1.05 ^e	55.68 ± 2.32 ^a
DE 6 麦芽糊精	56.83 ± 1.90 ^c	61.60 ± 1.68 ^b	79.17 ± 1.93 ^b
DE 16 麦芽糊精	54.19 ± 0.88 ^d	55.96 ± 2.05 ^a	100 ± 3.96 ^c

注: *ND, 未检测到活性; 同一列中不同字母的数据具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3.2 产物的链长分布分析 不同 DP 值的葡聚糖链因羟基的含量不同,故在流动相中所带电荷数不同,与色谱柱的亲和能力不同,可采用 HPAEC-PAD 准确分离并定量检测^[22]。以 3 种脱支酶均可作用的 DE 16 麦芽糊精作为代表性底物,采用低聚糖脱支酶、普鲁兰酶和异淀粉酶分别处理,测定反应产物中不同 DP 值葡聚糖链的峰面积,根据峰面积推测各 DP 值葡聚糖链的变化,结果如图 6 和表 3 所示。

麦芽糊精经过 α -淀粉酶水解,本身存在不同 DP 值的线性葡聚糖链,即空白对照。不同 DP 值链段的含量与峰面积成正比,经过普鲁兰酶和异淀粉酶的脱支后,产物中产生更多的线性链段,使得对应 DP 值链段的峰面积增加。其中,普鲁兰酶作

用后,产物中各 DP 值葡聚糖链峰面积的增幅最大,说明普鲁兰酶对麦芽糊精的作用效率较高。与普鲁兰酶和异淀粉酶相比,低聚糖脱支酶作用于麦芽糊精后只有 DP 1 的峰面积显著增多,即葡萄糖含量显著增多,而其它 DP 值链段含量与空白对照无显著差异,这一结果表明低聚糖脱支酶可以特异性识别并作用麦芽糊精中 DP 值为 1 的分支。

2.3.3 产物的 β -淀粉酶水解率分析 β -淀粉酶可从底物的非还原末端水解 α -1,4-糖苷键产生麦芽糖,而不能水解或跨越 α -1,6-糖苷键,因此 β -淀粉酶对含分支底物的水解率有限^[23]。脱支酶可将底物的 α -1,6-糖苷键水解,产生的 DP>3 的线性葡聚糖链可被 β -淀粉酶完全水解,从而引起脱支产物的 β -淀粉酶水解率增加^[24]。以 DE 16 麦

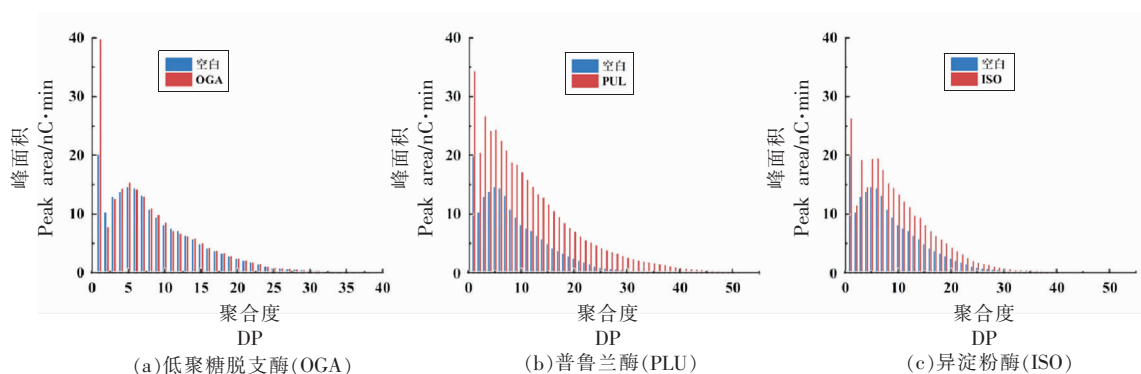


图 6 不同脱支酶处理对 DE 16 麦芽糊精链长分布的影响

Fig.6 Effects of treatments by different debranching enzymes on the chain length distribution of DE 16 maltodextrin

表 3 不同脱支酶处理对 DE 16 麦芽糊精链长分布的影响

Table 3 Effects of treatments by different debranching enzymes on the chain length distribution of DE 16 maltodextrin

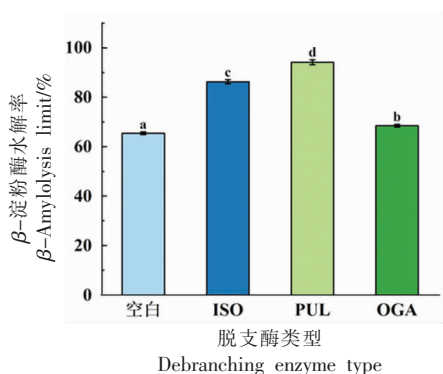
	峰面积/nC·min				
	DP 1	DP 2~12	DP 13~24	DP 25~36	DP \geq 37
空白对照	20.04 \pm 0.12 ^a	121.43 \pm 2.25 ^a	38.88 \pm 0.78 ^a	4.74 \pm 0.34 ^a	0.33 \pm 0.08 ^a
低聚糖脱支酶	39.76 \pm 0.21 ^d	119.74 \pm 3.50 ^a	39.45 \pm 0.89 ^a	4.80 \pm 0.17 ^a	0.44 \pm 0.12 ^a
普鲁兰酶	34.33 \pm 0.47 ^c	223.20 \pm 2.73 ^c	101.88 \pm 1.45 ^c	30.66 \pm 0.79 ^c	8.27 \pm 0.23 ^c
异淀粉酶	26.23 \pm 0.38 ^b	167.67 \pm 2.86 ^b	66.23 \pm 1.21 ^b	9.58 \pm 0.53 ^b	1.27 \pm 0.19 ^b

注:同一列中不同字母的数据具有显著性差异($P < 0.05$)。

芽糊精作为代表性底物,采用低聚糖脱支酶、普鲁兰酶和异淀粉酶分别处理,测定反应产物的 β -淀粉酶水解率,结果如图 7 所示。

未脱支的 DE 16 麦芽糊精(空白组)的 β -淀粉酶水解率为 65.47%。经普鲁兰酶处理后,产物的 β -淀粉酶水解率显著提高,达到 94.16%,说明

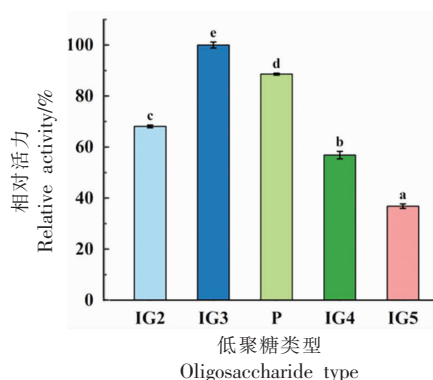
脱支产生的 DP>3 的线性葡聚糖链较多。经异淀粉酶处理后,产物的 β -淀粉酶水解率达到 86.26%。与普鲁兰酶和异淀粉酶相比,低聚糖脱支酶作用于麦芽糊精后,产物的 β -淀粉酶水解率仅为 68.51%,说明低聚糖脱支酶处理产生的线性葡聚糖链很少。考虑到低聚糖脱支酶以 DE 16 麦



注:不同字母的数据之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

图 7 不同脱支酶处理对 DE 16 麦芽糊精的 β -淀粉酶水解率的影响

Fig.7 Effects of treatments by different debranching enzymes on the degree of β -amylolysis limit of DE 16 maltodextrin



注:不同字母的数据之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

图 8 低聚糖结构对重组低聚糖脱支酶活力的影响

Fig.8 Effects of oligosaccharide structure on the activity of the recombinant oligo-1,6-glucosidase

芽糊精为底物时具有酶活力,推测低聚糖脱支酶作用于DE 16 麦芽糊精主要产生葡萄糖,其无法被 β -淀粉酶水解,因此产物的 β -淀粉酶水解率提升幅度很小。这一结果与链长分布的分析一致,进一步佐证:低聚糖脱支酶可以特异性识别并作用麦芽糊精中DP值为1的分支。

麦芽糊精是淀粉经 α -淀粉酶部分水解的产物,是一个混合体系,包含多分支的极限糊精、不同DP值的线性葡聚糖链和异麦芽低聚糖^[12]。其中,含有DP 1的分支的组分主要是异麦芽低聚糖。从图5可知,低聚糖脱支酶对异麦芽低聚糖的酶活力最强,与上述推测吻合。

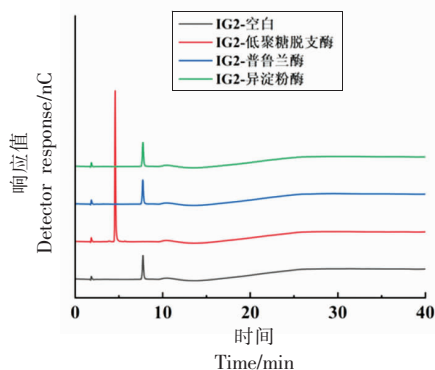
2.4 重组低聚糖脱支酶对不同结构低聚糖的催化能力

2.4.1 酶活力分析 异麦芽低聚糖是一个混合物,其中含有异麦芽糖(IG2)、异麦芽三糖(IG3)、异麦芽四糖(IG4)、异麦芽五糖(IG5)以及潘糖(P)等不同结构的组分^[25]。为进一步探究低聚糖脱支酶对不同低聚糖的催化能力,分别以IG2~IG5和

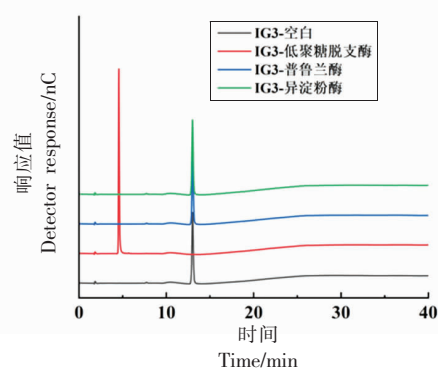
P为底物,测定低聚糖脱支酶的水解活力,结果如图8所示。在5种不同结构的异麦芽低聚糖中,低聚糖脱支酶对IG3的水解活力最高,其次为P,相对活力为88.59%,对IG2、IG4和IG5的活力依次降低,相对活力分别为68.26%、56.98%和36.90%。

2.4.2 产物组成分析 为进一步探究低聚糖脱支酶与普鲁兰酶、异淀粉酶底物特异性的差异,以IG2~IG5和P为底物,分别添加异淀粉酶、普鲁兰酶、低聚糖脱支酶对底物进行酶解处理24 h,并采用HPAEC-PAD分析产物组成,结果如图9和表4所示。

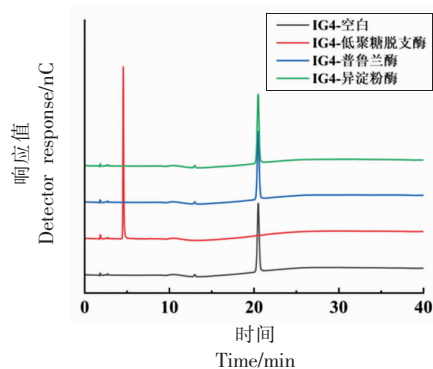
IG2~IG5分别由2~5个葡萄糖单元通过 α -1,6-糖苷键连接,经低聚糖脱支酶处理24 h后的产物以葡萄糖为主,在94%以上,表明IG2~IG5的 α -1,6-糖苷键可被低聚糖脱支酶充分水解。此外,P是由3个葡萄糖单元通过一个 α -1,6-和一个 α -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖,低聚糖脱支酶只能作用于P的 α -1,6-糖苷键,因此酶解产物为



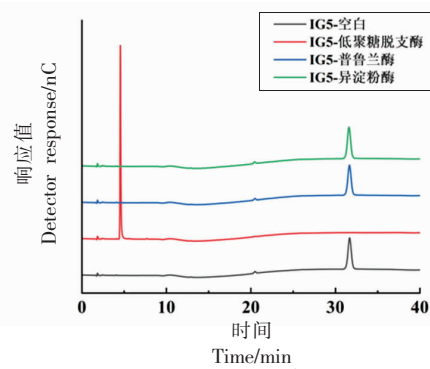
(a) 异麦芽糖(IG2)



(b) 异麦芽三糖(IG3)



(c) 异麦芽四糖(IG4)



(d) 异麦芽五糖(IG5)

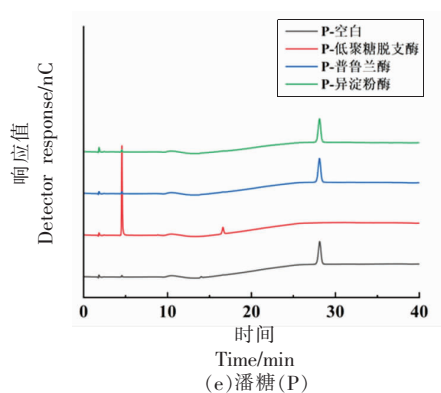


图 9 异麦芽低聚糖经不同脱支酶处理前、后的 HPAEC-PAD 色谱图

Fig.9 HPAEC-PAD chromatograms of isomaltooligosaccharides before and after hydrolysis by different debranching enzymes

表 4 异麦芽低聚糖经重组低聚糖脱支酶处理后的产物分析

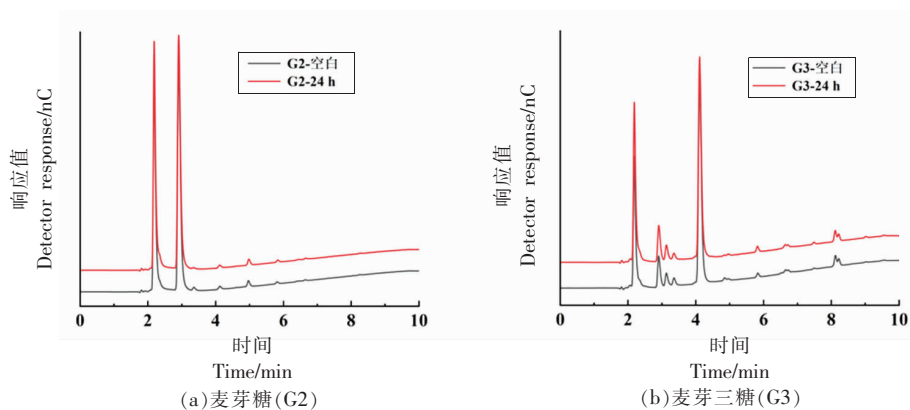
Table 4 Products analysis of isomaltooligosaccharides hydrolyzed by the recombinant oligo-1,6-glucosidase

底物	产物	百分含量/%	转化率/%
IG2	G1	100	98.35 ± 0.03
IG3	G1	96.28 ± 0.18	100
	IG2	3.72 ± 0.18	
P	G1	35.80 ± 0.09	100
	G2	64.20 ± 0.09	
IG4	G1	96.55 ± 0.19	97.44 ± 0.14
	IG2	3.45 ± 0.19	
	IG3	ND*	
IG5	G1	94.35 ± 0.32	97.38 ± 0.24
	IG2	3.36 ± 0.18	
	IG3	1.75 ± 0.10	
	IG4	0.54 ± 0.03	

注: *ND, 未测得; 同一列中不同字母的数据具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

葡萄糖和麦芽糖。与低聚糖脱支酶相比, 异淀粉酶、普鲁兰酶无法作用于 IG2~IG5 及 P, 反应前、后产物组成无变化, 也未检测到葡萄糖生成, 表明两种脱支酶对异麦芽低聚糖无水解作用。这主要是因为异麦芽低聚糖由 α -1,6-糖苷键连接, 其分支点处只含有一个葡萄糖残基, 而异淀粉酶和普鲁兰酶需要侧链处至少含有两个葡萄糖残基, 才能识别底物并催化水解反应^[5,26]。

为探究低聚糖脱支酶是否有 α -1,4-糖苷键的水解活力, 以麦芽糖 (G2)、麦芽三糖 (G3)、麦芽四糖 (G4)、麦芽五糖 (G5) 等不同 DP 值的直链麦芽低聚糖为底物, 添加低聚糖脱支酶对底物进行酶解处理 24 h, 并采用 HPAEC-PAD 分析产物组成。如图 10 所示, 反应前、后产物组成无明显变化, 说明低聚糖脱支酶不能作用于由 α -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖底物。



(a) 麦芽糖 (G2)

(b) 麦芽三糖 (G3)

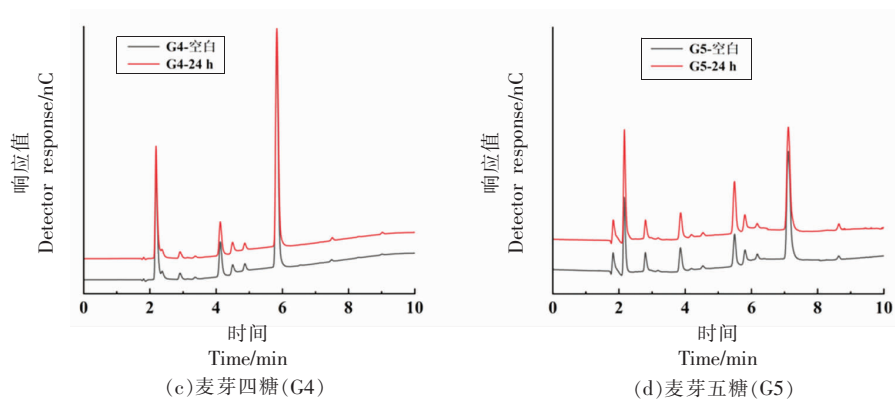


图 10 麦芽低聚糖经重组低聚糖脱支酶处理前、后的 HPAEC-PAD 色谱图

Fig.10 HPAEC-PAD chromatograms of maltooligosaccharides before and after hydrolysis by the recombinant oligo-1,6-glucosidase

2.5 重组低聚糖脱支酶的催化模式分析

综合上述试验内容,推测低聚糖脱支酶的催化模式和底物特异性示意图见图 11。从水解糖苷键的类型来看,低聚糖脱支酶只能作用于 α -1,6-糖苷键连接而成的异麦芽低聚糖,而不能作用于 α -1,4-糖苷键连接而成的麦芽低聚糖。此外,对于一个 α -1,4-和一个 α -1,6-糖苷键连接的潘糖,低聚糖脱支酶只水解其中的 α -1,6-糖苷键,所得产物为葡萄糖和麦芽糖。说明低聚糖脱支酶专一地作用于低聚糖的 α -1,6-糖苷键,对 α -1,4-糖苷键无水解活力。从底物分子质量和分支长

度来看,低聚糖脱支酶对淀粉底物的水解活力很低,对麦芽糊精底物的水解活力随麦芽糊精 DE 增大(即分子量减小)而增大,并只能作用于麦芽糊精中 DP 1 的分支,产物为葡萄糖。与低聚糖脱支酶相比,普鲁兰酶能高效作用于普鲁兰多糖、麦芽糊精等底物中不同长度的分支,产物为不同 DP 值的线性葡聚糖链,而对高分子质量、长分支底物的水解效率较低^[27]。异淀粉酶倾向于水解糖原、支链淀粉等大分子底物中的长分支,对 DP < 4 的链段水解效率低,能水解 DP > 70 的超长链段,产物以线性长链为主^[28]。

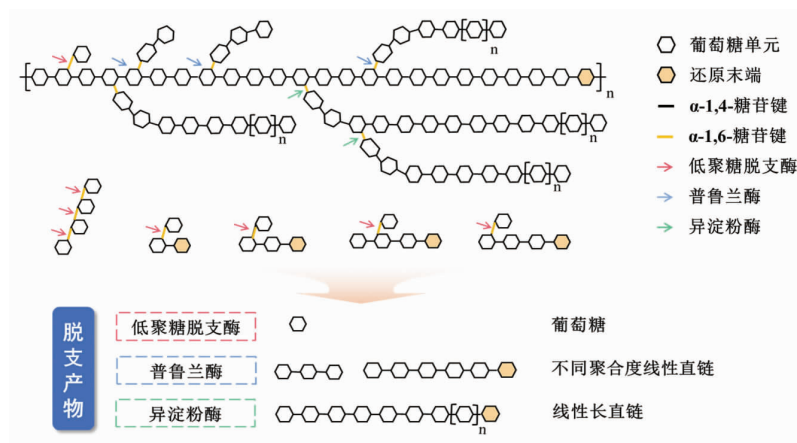


图 11 不同脱支酶的催化模式示意图

Fig.11 Schematic illustration of catalytic models of different debranching enzymes

2.6 重组低聚糖脱支酶在葡萄糖母液中的应用

在结晶葡萄糖生产工艺中,葡萄糖降温结晶,从晶浆中分离出晶体后的剩余部分称为葡萄糖母

液。若对母液进行再次结晶,可以得到二次母液、三次母液^[8]。葡萄糖母液中含有大量麦芽糖、异麦芽低聚糖等副产物,葡萄糖含量较低,再次结晶较

大,限制了母液的高值化利用^[29]。

本研究发现,低聚糖脱支酶能够水解异麦芽低聚糖的 α -1,6-糖苷键,产生葡萄糖,因此具有应用于葡萄糖母液,将副产物进一步水解成葡萄糖的潜力。分别以一次母液、二次母液、色谱分离尾液(二次母液经过色谱分离后的剩余部分)为原料,采用低聚糖脱支酶处理 24 h,分析处理前、后葡萄糖母液的组分变化,结果如图 12 和表 5 所示。

低聚糖脱支酶处理,作用于母液中的异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖,使其水解生成葡萄糖,经酶

处理后,母液中异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等副产物占比降低,葡萄糖占比增加。此外,随着进一步结晶和色谱分离,二次母液、色谱分离尾液中的葡萄糖占比下降,异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等副产物占比增加,低聚糖脱支酶处理的效果更为明显。尤其对于色谱分离尾液,低聚糖脱支酶处理后,葡萄糖含量的增幅最大,提高了 14.95%。高纯度的葡萄糖可以扩大母液利用范围,使母液更具有工业应用价值^[30]。

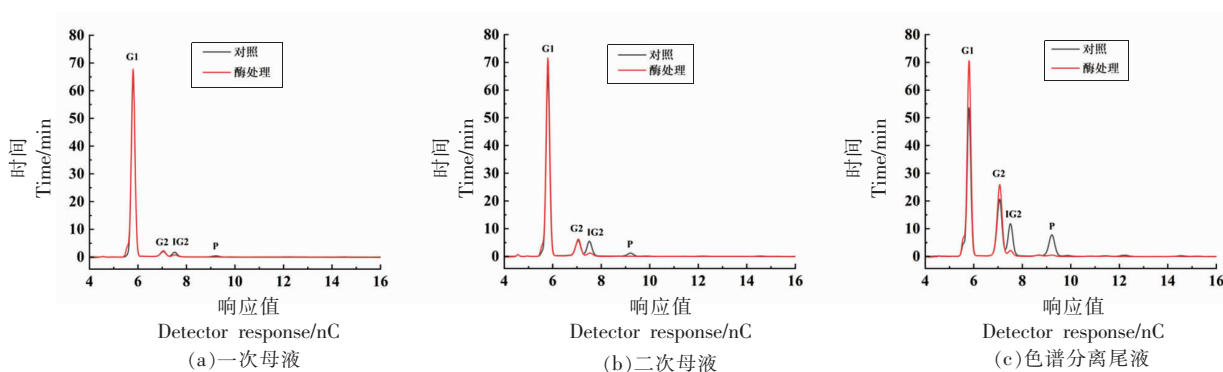


图 12 葡萄糖母液经重组低聚糖脱支酶处理前后的 HPLC 色谱图

Fig.12 HPLC chromatograms of mother liquor of glucose before and after hydrolysis by the recombinant oligo-1,6-glucosidase

表 5 葡萄糖母液经重组低聚糖脱支酶处理前、后的组成分析

Table 5 Analysis of mother liquor of glucose before and after hydrolysis by the recombinant oligo-1,6-glucosidase

样品		相对含量/%						
		G1	G2	IG2	G3	P	IG3	其它
一次母液	对照	85.33	4.96	6.56	0.28	2.49	0.32	0.06
	酶处理	88.40	6.04	4.69	0.49	0.29	-	0.09
二次母液	对照	73.41	13.11	9.85	0.28	2.43	0.31	0.61
	酶处理	82.72	13.89	2.73	0.27	0.25	-	0.14
尾液	对照	43.44	27.87	13.54	0.62	10.23	0.59	3.70
	酶处理	58.39	34.98	2.94	0.95	0.94	0.04	1.77

3 结论

本研究实现了来源于类芽胞杆菌 STB16 的低聚糖脱支酶基因在枯草芽孢 WB600 系统中的分泌表达,并对其酶学性质和底物特异性进行研究。结果显示,重组低聚糖脱支酶的最适反应温度为 50 ℃,最适反应 pH 值为 6.0,具有相对较宽的 pH 值应用范围。重组低聚糖脱支酶对 α -1,4-糖苷键

无水解活力,只能专一地作用于底物中 DP 1 分支的 α -1,6-糖苷键,产物为葡萄糖。与其它类型的脱支酶相比,重组低聚糖脱支酶对异麦芽低聚糖具有较高的水解活力,更适合用于处理葡萄糖母液中的异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等副产物。经低聚糖脱支酶处理后的母液中葡萄糖含量大幅提升。相关研究结果可为低聚糖脱支酶的挖掘和

工业化应用提供参考。

参 考 文 献

- [1] 姚宇晨, 徐光辉, 杨钊, 等. 淀粉糖行业发展趋势分析及展望[J]. 农产品加工, 2021(21): 77-82.
YAO Y C, XU G H, YANG Z, et al. Analysis and prospect of the development trend of starch sugar industry [J]. Farm Products Processing, 2021 (21): 77-82.
- [2] LI Z X, KONG H C, LI Z F, et al. Designing liquefaction and saccharification processes of highly concentrated starch slurry: Challenges and recent advances[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(3): 1597-1612.
- [3] 雷英杰, 于孝民, 任元元, 等. 玉米淀粉糖化反应影响因素研究[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(3): 48-54.
LEI Y J, YU X M, REN Y Y, et al. Study on the influencing factors of corn starch saccharification reaction[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(3): 48-54.
- [4] 李文钊, 盛永吉, 皮冬伟, 等. 淀粉糖生产线糖化液组分变化和关系研究[J]. 当代化工, 2022, 51(9): 2183-2188.
LI W Z, SHENG Y J, PI D W, et al. Study on variation and relationship of saccharification liquid components in starch sugar production line [J]. Contemporary Chemical Industry, 2022, 51(9): 2183-2188.
- [5] XIA W, ZHANG K, SU L Q, et al. Microbial starch debranching enzymes: Developments and applications[J]. Biotechnology Advances, 2021, 50(1): 107786.
- [6] LIU G D, HONG Y, GU Z B, et al. Pullulanase hydrolysis behaviors and hydrogel properties of debranched starches from different sources [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45(1): 351-360.
- [7] MØLLER M S, HENRIKSEN A, SVENSSON B. Structure and function of α -glucan debranching enzymes[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2619-2641.
- [8] 杨荣玉. 结晶葡萄糖母液综合利用技术研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014: 1-8.
YANG R Y. Study on comprehensive utilization technique for separating crystalline mother liquor of glucose [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2014: 1-8.
- [9] 王洪, 喻书文, 张福安. 结晶葡萄糖母液对赖氨酸发酵过程的影响[J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(3): 184-188.
WANG H, YU S W, ZHANG F A. Effect of crystallization mother liquor of glucose on lysine fermentation process[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2018, 47(3): 184-188.
- [10] BERLINA Y Y, PETROVSKAYA L E, KRYUKOVA E A, et al. Engineering of thermal stability in a cold-active oligo-1,6-glucosidase from *Exiguobacterium sibiricum* with unusual amino acid content[J]. Biomolecules, 2021, 11(8): 1229.
- [11] KONG H C, ZOU Y Y, GU Z B, et al. Liquefaction concentration impacts the fine structure of maltodextrin [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 123(1): 687-697.
- [12] KONG H C, YU L X, GU Z B, et al. Fine structure impacts highly concentrated starch liquefaction process and product performance[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 164(1): 113347.
- [13] KONG H C, YU L X, GU Z B, et al. An innovative short-clustered maltodextrin as starch substitute for ameliorating postprandial glucose homeostasis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(1): 354-367.
- [14] KASHIWABARA S I, MATSUKI Y, KISHIMOTO T, et al. Clustered proline residues around the active-site cleft in thermostable oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus flavocaldarius* KP1228 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(6): 1093-1102.
- [15] SUZUKI Y, YUKI T, KISHIGAMI T, et al. Purification and properties of extracellular α -glucosidase of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, 1976, 445(2): 386-397.
- [16] DONG Z X, HAO X M, POKHREL D S, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of two novel oligo-1,6-glucosidases from *Bacillus mycoides* and *Thermomyces lanuginosus* [J]. Starch - Stärke, 2018, 70(1/2): 1700093.
- [17] YAMAMOTO K, NAKAYAMA A, YAMAMOTO Y,

- et al. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(16): 3414–3420.
- [18] ITOH S, TANIGUCHI M, TAKADA N, et al. Effects of metal ions on the electronic, redox, and catalytic properties of cofactor TTQ of quinoprotein amine dehydrogenases [J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(49): 12087–12097.
- [19] PARK J S, KIM I L, LEE Y E. Purification and characterization of a *Bacillus* sp. DG0303 thermostable α -glucosidase with oligo-1,6-glucosidase activity[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998, 8(3): 270–276.
- [20] SUZUKI Y, TOMURA Y. Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase [J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 158(1): 77–83.
- [21] 常江涛, 刘洁, 刘亚伟. 糯性低葡萄糖当量麦芽糊精的制备及结构表征[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(4): 70–76, 84.
CHANG J T, LIU J, LIU Y W. Preparation and structure characterization of low dextrose equivalent maltodextrin from waxy rice starch [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 43(4): 70–76, 84.
- [22] KOCH K, ANDERSSON R, ÅMAN P. Quantitative analysis of amylopectin unit chains by means of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 800(2): 199–206.
- [23] BIJTTEBIER A, GOESAERT H, DELCOUR J A. Amylase action pattern on starch polymers[J]. Biologia, 2008, 63(6): 989–999.
- [24] 张雨桐, 张彦军, 徐飞, 等. 不同淀粉脱支酶对菠萝蜜种子淀粉分子结构的影响及糊化特性研究[J]. 热带作物学报, 2019, 40(1): 150–157.
- ZHANG Y T, ZHANG Y J, XU F, et al. Effect of different starch debranching enzymes on the molecular structure of jackfruit seed starch and pasting properties [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(1): 150–157.
- [25] ZHAO N N, XU Y S, WANG K, et al. Synthesis of isomalto-oligosaccharides by *Pichia pastoris* displaying the *Aspergillus niger* α -glucosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(43): 9468–9474.
- [26] 张群. 淀粉脱支酶的制备和应用[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(4): 448.
ZHANG Q. Preparation and application of starch debranching enzyme[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(4): 448.
- [27] REDDY C K, LEE D J, LIM S T, et al. Enzymatic debranching of starches from different botanical sources for complex formation with stearic acid [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89(1): 856–863.
- [28] WANGPAIBOON K, CHAROENWONGPAIBOON T, KLAEWKLA M, et al. Cassava pullulanase and its synergistic debranching action with isoamylase 3 in starch catabolism [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14(1): 1114215.
- [29] 陈贵锐. 葡萄糖母液色谱分离填料的合成及其分离性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
CHEN G R. Synthesis and separation property research on chromatographic packing material for separating mother liquor of glucose[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.
- [30] XI S X, KONG H C, BAN X F, et al. Bifunctional mutant of oligo-1,6-glucosidase for the production of glucose from glucose mother liquor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(35): 13035–13042.

Studies on Substrate Specificity and Application of an Oligo-1,6-glucosidase from *Paenibacillus* sp. STB16

Kong Haocun^{1,2,3}, Zhang Xiao², Li Caiming^{1,2,3}, Ban Xiaofeng^{1,2}, Gu Zhengbiao^{1,2}, Li Zhaofeng^{1,2,3*}

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

²School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

³Yixing Institute of Food and Biotechnology Co., Ltd., Yixing 214200, Jiangsu

Abstract Debranching enzymes are commonly used enzymes in the starch deep processing industry. However, traditional

debranching enzymes are unable to fully meet the requirements of green production of starch sugars and comprehensive utilization of by-products. Therefore, it is necessary to explore suitable new types of debranching enzymes. This study screened an oligo-1,6-glucosidase gene (*oga*) from *Paenibacillus* sp. STB16 and constructed its *Bacillus subtilis* expression system. This system achieved heterologous expression of the oligo-1,6-glucosidase. The enzymatic properties and substrate specificity of the recombinant oligo-1,6-glucosidase were explored. The results showed that the enzyme activity of the fermentation supernatant of *B. subtilis* could reach 162.33 U/mL. The recombinant oligo-1,6-glucosidase had the optimum reaction temperature at 50 °C and optimum reaction pH at 6.0. It specifically acted on the α -1,6-glycosidic bonds of branches with degree of polymerization of 1. Compared to other types of debranching enzymes (substrate conversion rate under the detection limit), the recombinant oligo-1,6-glucosidase exhibited stronger hydrolytic activity towards isomaltose, isomaltotriose, and panose. The substrate conversion rate reach 97.4%–100%, with glucose as the product. Therefore, it is more suitable for treating glucose mother liquor. The glucose content in the first mother liquor, second mother liquor and tail liquor of chromatographic separation was significantly increased by 3.6%, 12.7% and 34.4%, respectively. The research results provide a theoretical basis for the development and utilization of new types of debranching enzymes, and also serve as an important reference for the comprehensive utilization of by-products in starch sugar processing.

Keywords oligo-1,6-glucosidase; enzymatic properties; substrate specificity; starch sugar; glucose mother liquor