

# 嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的制备及其应用综述

陆勇, 吴宗帅, 胡钟毓, 李学红

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**针对目前国内外关于嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的制备及应用进展进行了综述:主要采用基因克隆至常温宿主细胞中,通过宿主细胞的过量表达来完成制备,其应用主要体现在淀粉的优化改性、大环糊精的制备以及功能成分的糖基化修饰等方面.未来研究将集中于酶的多功能催化机制,同时拓展糖基化改性功能成分的种类及转糖基类型.

**关键词:**嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶;淀粉优化改性;糖基化改性

**中图分类号:**Q555<sup>+</sup>.4 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2012.05.002

## Review of research advances on preparation and applications of amyloamylases from *thermus scotoductu*

LU Yong, WU Zong-shuai, HU Zhong-yu, LI Xue-hong

(College of Food and Bioeng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The production of amyloamylases and its promising applications were reviewed. The preparation was carried out through gene cloning to normal temperature host cell and the host cell excessive expression and the application reflected in modification of starches, production of large-ring cyclodextrins and transglycosylation of some functional ingredients, etc. It was further pointed out that the future research will focus on multifunctional catalytic mechanism of the enzyme and increasing the varieties of glycosylation reactions as well as their functional products.

**Key words:** amyloamylases from *thermus scotoductu*; starch optimization modification; transglycosylation modification

## 0 引言

麦芽糖转葡萄糖基酶属于 $\alpha$ -淀粉酶超级家族第13组,是生物体内重要的淀粉代谢酶之一.麦芽糖转葡萄糖基酶主要催化葡萄糖链段在 $\alpha$ -葡聚糖分子内或分子间的转移,完成转糖基反应.此外,该酶还显示较低的水解葡萄糖苷键活性,因此也可以被

看成是一种多功能酶<sup>[1-2]</sup>.随着生物技术的发展,目前麦芽糖转葡萄糖基酶的规模制备已成为可能,又由于嗜热酶在工业应用中具有诸多的优势,近年来具有高耐热性的麦芽糖转葡萄糖基酶得到广泛的研究与开发,其催化功能及在实际领域的潜在应用越来越受到人们的关注.本文就嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的制备及应用进展进行综述.

收稿日期:2012-03-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31171757)

作者简介:陆勇(1969—),男,上海市人,郑州轻工业学院工程师,主要研究方向为食品化工.

## 1 嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的制备

嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶主要来源于生长于极端环境中的微生物,如广泛分布在温泉、堆肥、地热区土壤、火山地区以及海底火山地等地的一些细菌及古细菌中<sup>[3]</sup>。通常此酶在原有微生物体内含量很低,直接提取难以满足研究和应用需求,所以目前其制备途径主要是通过将嗜热酶基因克隆到大肠杆菌、枯草杆菌等常温宿主细胞中,通过宿主细胞的过量表达来完成。

例如,将水生栖热菌中的麦芽糖转葡萄糖基酶基因克隆在大肠杆菌中,可得到高产该耐热酶的菌株,再通过常规发酵培养即可实现酶的大量制备。该酶具有很高的转糖基活性和较低的水解活性,最适温度为 75 °C,即使在 80 °C 时仍保持催化活力的稳定<sup>[4]</sup>。将来源于超嗜热古菌的麦芽糖转葡萄糖基酶基因 *gtpK* 在大肠杆菌上过量表达,获得的酶同样具有高转糖基活性,最适温度可达 100 °C<sup>[5]</sup>。为确保获得的酶的安全性,还有报道将水生栖热菌的麦芽糖转葡萄糖基酶基因克隆到较为安全的枯草杆菌宿主细胞中,利用双启动子手段获得高产耐热转移酶的菌株<sup>[6]</sup>。此外,将嗜热高温球菌、海栖热孢菌中的麦芽糖转葡萄糖基酶基因高水平表达在 *E. coli* 细胞中,分别获得了耐热及高转移酶活性麦芽糖转葡萄糖基酶的高产菌株<sup>[7-8]</sup>。

区别于  $\alpha$ -淀粉酶家族其他成员,麦芽糖转葡萄糖基酶的应用价值在于其转糖基活性,因此高转移酶活性和低水解酶活性是希望拥有的酶催化特性。在新菌株的开发中,采用易错 PCR 手段对麦芽糖转葡萄糖基酶基因进行改变,敲除编码水解活性的基因片段,可获得丧失水解活性的耐热转移酶。研究表明这种只有转糖基活性的酶作用于底物,具有糖基转移反应效率高、转糖基化产物累积多的优势<sup>[9]</sup>。

## 2 嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶在食品工业上的应用

### 2.1 优化淀粉的分子结构

嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶可以催化葡萄糖链段在 1,4- $\alpha$ -葡聚糖分子内或分子间的转移反应,具有歧化和环化的双功能机制,如果将其应用于淀

粉,可以改变淀粉的分子链结构、调整链的长度,实现淀粉的结构及理化特性的优化。研究表明,对于同时含有直链和支链的天然淀粉分子,麦芽糖转葡萄糖基酶的歧化反应占主导作用,以调整直链淀粉与支链淀粉比例及支链侧长度为主。例如,将工程菌耐热麦芽糖转葡萄糖基酶作用于大米淀粉,可以将大米淀粉中直链淀粉含量从 30% 降至 23% 左右,离子色谱分析结果显示支链淀粉侧链长度分布范围变宽,聚合度为 1—8 的较短分支和聚合度 > 19 的较长分支数量增加,特别是出现一些超长支链,同时有少量不同聚合度环状葡聚糖生成。经麦芽糖转葡萄糖基酶处理后的大米淀粉,其淀粉糊黏度下降、透明度上升,凝胶时间减短,最终的凝胶强度增加,且酶处理大米淀粉凝胶在 4 ~ 70 °C 间显示了良好的热可逆性,冻融稳定性也大为提高<sup>[10-13]</sup>。

利用耐热麦芽糖转葡萄糖基酶处理马铃薯淀粉,发现直链淀粉部分链段被部分转移至支链淀粉上,改性后的淀粉在浓度大于 3% 时凝胶表现热可逆特性<sup>[14]</sup>。利用该酶处理玉米淀粉,结果表明淀粉的糊化和凝胶温度下降,直链淀粉-脂类包合物的熔点峰消失,同时淀粉老化速度减缓<sup>[15]</sup>。将来自海栖热孢菌的耐热麦芽糖转葡萄糖基酶作用于生玉米淀粉,在淀粉颗粒保持完整的情况下可以使淀粉分子量降低,颗粒表面直链淀粉量减少、支链淀粉短分支侧链增加,同时酶处理淀粉的熔点范围变宽,结晶度降低、淀粉水溶性及糊透明度上升,加热冷却实验表明该玉米淀粉凝胶具有很好的热可逆性<sup>[16]</sup>。

### 2.2 制备较高聚合度范围的环状糊精

当淀粉底物含有较多直链淀粉时,麦芽糖转葡萄糖基酶以催化环化反应为主,产物为聚合度(DP)十几至上百范围的环状糊精。目前,克隆耐热微生物中麦芽糖转葡萄糖基酶基因而开发出来的一些基因工程菌株,其产生的嗜热酶可以转化直链淀粉生成主要聚合度为 22—50 的大环糊精混合物。例如,来源于水生栖热菌的麦芽糖转葡萄糖基酶作用于马铃薯直链淀粉,可以产生聚合度主要为 23—26 的大环糊精,产率达到 85% 以上。日本学者通过生物技术手段将栖热菌的麦芽糖转葡萄糖基酶基因中的水解基因剔除,用丧失水解酶活的新酶作用于直链淀粉,结果使大环糊精的转化率几乎达

到 100%<sup>[9]</sup>。

大环糊精具有不同于常见小环糊精的独有特性,诸如可包埋大分子化合物、在水中有很高的溶解性以及乳化特性等,预计在未来食品领域是一种不可多得的新型绿色品质改良剂<sup>[17-18]</sup>。

### 2.3 用于高分支淀粉丛的制备

高分支淀粉丛具有高水溶性、抗老化和低消化性等特点,是一种理想的功能性食品添加成分。研究表明,麦芽糖转葡萄糖基酶具有缓慢水解支链淀粉中 B2 链的作用,从而使小分支淀粉丛彼此分开游离、淀粉分子量大大降低,与此同时该酶的转糖基功能还可以对分支链长度进行调整,这就为高分支淀粉丛的制备提供了很好的途径。例如,以蜡质玉米或蜡质大米淀粉为原料,利用该酶可先使淀粉转化成小的分支淀粉丛,然后利用麦芽糖基酶对分支侧链进行水解或糖基转移优化,就可得到高度分支化的淀粉丛产品<sup>[19]</sup>。

同样,利用麦芽糖转葡萄糖基酶还可用于制备糖原。先使用异淀粉酶将淀粉去分支为短链直链淀粉,然后利用 4- $\alpha$ -糖基转移酶的转糖基作用将直链淀粉的短链适当延长,再利用淀粉分支酶的  $\alpha$ -1,6-糖苷键的生成功能将适当长度的直链淀粉合成糖原。研究表明,该途径是目前最有效的糖原制备方法,而且通过调整 3 种酶的作用条件,还可以将所得糖原的分子量控制在  $3.0 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$  范围内<sup>[20]</sup>。

### 2.4 用于改善淀粉基食品的品质

面包加工过程中加入适量水生栖热菌麦芽糖转葡萄糖基酶处理,由于酶的歧化反应及限量水解导致体系低聚麦芽糖含量增多,酵母发酵速度加快,更多二氧化碳的产生使面包体积显著地增加。扫描电子显微镜观察发现,酶处理面包的微观结构显示为更加规律的多孔网状结构。由于直链淀粉含量的降低,酶处理面包在储藏期间老化速率明显减缓<sup>[21]</sup>。

年糕是由糯米及大米粉经混合调制、蒸熟而制成的一种传统食品,口感香甜滋润,耐贮藏。年糕在贮存期间容易发生老化而导致食用品质下降。在年糕加工过程中加入适量嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶处理,质构分析结果显示,年糕的硬度、胶着性和咀嚼性变化不大,但黏度显著降低。结构分析发现,年

糕中直链淀粉含量下降,支链淀粉侧链长度分布范围变宽,而低聚麦芽糖含量增加,同时分子量显著下降。通过对年糕贮藏实验结果表明,酶处理可显著降低年糕在冷藏期间老化的发生<sup>[22]</sup>。

此外,嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶处理的淀粉还可以作为脂肪替代物添加至蛋黄酱中,生产低脂蛋黄酱产品。有研究显示,将该酶处理后的大米淀粉制成 15% 的淀粉糊并辅以 0.1% 的黄原胶添加到蛋黄酱中,产品体系的动态流变性、黏度、稳定性、色泽及扫描电镜结果与对照组非常相似,可替代蛋黄酱中 50% 的油脂而对产品的品质不造成不良影响<sup>[23]</sup>。

### 2.5 用于功能组分的糖基化改性

嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶具有切断和生成  $\alpha$ -1,4 糖苷键的能力,实现葡糖基的转移,而且该酶表现为对于  $\alpha$ -1,4 糖苷键的专一性,而对于受体专一性不强。因此,许多具有生理功能成分可以通过嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶进行糖基化改性,以提高其理化和功能性质。

**2.5.1 异黄酮类功能成分的糖基化改性** 异黄酮糖苷具有抗氧化、抗癌和预防心血管疾病等诸多功能,目前得到开发的主要有大豆异黄酮、葛根素、染料木素等的葡萄糖苷。这些化合物通常水溶性较低,实际应用受到限制。研究表明,通过转糖基反应增加异黄酮糖苷糖基数量,可显著提高它们的水溶性<sup>[24]</sup>。

例如,水生栖热菌麦芽糖转葡萄糖基酶能够以可溶性淀粉为供体,将淀粉中的葡萄糖片段转移到染料木苷的葡糖基上,再利用  $\beta$ -麦芽糖酶水解糖苷上的转移糖链,可得到比原来多 1 或 2 个葡糖基的染料木苷衍生物,后者在水中溶解度分别比染料木苷提高了 3 600 倍和 44 000 倍<sup>[25]</sup>。生物活性研究表明,染料木苷糖衍生物具有与染料木苷同样的对金属硫蛋白基因和 6-磷酸脱氢酶基因转录的调控作用,还原能力甚至还略微增强<sup>[26]</sup>。同样,利用麦芽糖转葡萄糖基酶还可以制备葛根素的糖基衍生物,其水溶性可增加 100 倍以上,拥有与葛根素相同的抗氧化能力,能有效降低机体低密度脂蛋白的氧化<sup>[27-28]</sup>。

**2.5.2 甜菊甙的糖基化改性** 甜菊糖是一种天然的甜味剂,是从甜叶菊叶子中提取的 8 种双萜糖苷

的混合物,其中的甜菊糖中的甜菊苷和甜菊双糖 C 苷约占 80%,有一定的苦味,严重影响甜叶菊糖的味质.为此,利用糖基化反应对甜菊苷结构进行改造,可有效改善甜菊糖的甜味特征.例如,以玉米淀粉为供体,利用麦芽糖转葡萄糖基酶的转糖基作用,可以将淀粉中葡糖链片段转移至甜菊糖分子上,获得葡萄糖基和麦芽糖基甜菊糖,产物中两者的比例分别为 66% 和 24%,转化率接近 100%<sup>[29]</sup>.经糖基化改性后的甜菊糖其不良甜质得到有效改善.

**2.5.3 抗坏血酸的糖基化改性** 抗坏血酸的性质很不稳定,容易被热和氧化剂破坏.利用麦芽糖转葡萄糖基酶的转糖基作用,可以在 L-抗坏血酸的 C2 位接入  $\alpha$ -D-葡萄糖基团,转化率达 60%<sup>[30]</sup>.抗坏血酸糖苷具有体外性质稳定、体内抗氧化活性高的特点,不仅可应用于食品中,应用于化妆品中还具有美白、促进胶原蛋白生成等多种功效.

### 3 结语

目前,我国对嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的研究还处于起步阶段,主要为酶的基因克隆和实验室水平的初步制备.而日本、德国和韩国等已基本能够实现该酶的高效表达与规模制备,在酶的应用方面也取得了积极的研究成果.

未来关于嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶的研究,应主要集中于酶的多功能催化机制.通过研究淀粉底物结构对酶催化功能的影响,来揭示酶的多功能催化机理,实现酶法对淀粉分子结构的定向控制转化,达到淀粉结构的最优化改造以及大环糊精制备的产率提高.同时拓展糖基化改性功能成分的种类及转糖基类型,为嗜热麦芽糖转葡萄糖基酶这一新型的酶制剂在实际领域的开发应用起积极的促进作用.

### 参考文献:

[1] Imamura H, Fushinobu S, Jeon B S, et al. Identification of the catalytic residue of *Thermococcus litoralis* 4- $\alpha$ -glucanotransferase through mechanism-based labeling [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(41): 12400.

[2] Takara T, Yanase M, Takata H, et al. Cyclic glucans produced by the intramolecular transglycosylation activity of potato D-enzyme on amylopectin [J]. *Biochem Biophys Res*

*Comm*, 1998, 247: 493.

- [3] 李淑彬,陆广欣,林如妹,等.嗜热菌-工业用酶的新来源[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(7): 67.
- [4] Yoshinobu T, Kazutoshi F, Takeshi T. *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose [J]. *Applied and Envir Microbiology*, 1999, 65(3): 910.
- [5] Yoshihisa T, Shinsuke F, Masahiro T, et al. Cloning and expression of the 4- $\alpha$ -glucanotransferase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and characterization of the enzyme [J]. *J of Fermentation and Bioeng*, 1997, 83(6): 540.
- [6] Kang H K, Jang J H, Shim J H. Efficient constitutive expression of thermostable 4- $\alpha$ -glucanotransferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26: 1915.
- [7] Imamura H, Jeon B S, Wakagi T. High level expression of *Thermococcus litoralis* 4- $\alpha$ -glucanotransferase in a soluble form in *Escherichia coli* with a novel expression system involving minor arginine tRNAs and GroELS [J]. *FEBS Letters*, 1999, 457(3): 393.
- [8] Kim K Y, Kim C H. Expression of *Thermotoga maritima* 4- $\alpha$ -glucanotransferase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme [J]. *Agric Chem Biotechnol*, 2004, 47(3): 133.
- [9] Kazutoshi F, Hiroataka M, Yoshinobu T, et al. Use of random and saturation mutageneses to improve the properties of *Thermus aquaticus* amyloamylase for efficient production of cycloamyloses [J]. *Applied and Envir Microbiology*, 2005, 71(10): 5823.
- [10] Lee K Y, Kim Y R, Park K H, et al. Effects of  $\alpha$ -glucanotransferase treatment on the thermo-reversibility and freeze-thaw stability of a rice starch gel [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63: 347.
- [11] Lee K Y, Kim Y R, Park K H. Rheological and gelation properties of rice starch modified with 4- $\alpha$ -glucanotransferase [J]. *Int J of Biological Macromolecules*, 2008, 42(3): 298.
- [12] Cho K H, Auh J H, Ryu J H. Structural modification and characterization of rice starch treated by *Thermus aquaticus* 4- $\alpha$ -glucanotransferase [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23: 2403.
- [13] Mun S H, Kim Y L, Kang C G. Development of reduced-fat mayonnaise using 4- $\alpha$  GTase-modified rice starch and xanthan gum [J]. *Int J of Biological Macromolecules*,

2009,44(5):400.

- [14] Marc J E C, Isabelle C, Euverink G W, et al. A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch[J]. *Starch*, 2005, 57: 465.
- [15] Park J H, Park H K. Physicochemical properties of enzymatically modified maize starch using 4- $\alpha$ -glucanotransferase[J]. *Food Sci and Biotech*, 2007, 16(6):902.
- [16] Oh E J, Choi S J, Lee S J. Modification of granular corn starch with 4- $\alpha$ -glucanotransferase from *Thermotoga maritima*: Effects on structural and physical properties[J]. *J of Food Sci*, 2008, 73(3):C158.
- [17] Ueda H. Physicochemical properties and complex formation abilities of large-ring cyclodextrins[J]. *J of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 44: 53.
- [18] Kin L L. Large cyclodextrins[J]. *J of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 43:1.
- [19] Lee C K, Le Q T, Kim Y H. Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(1):126.
- [20] Kajiura H, Kakutani R, Akiyama T, et al. A novel enzymatic process for glycogen production[J]. *Biocatal Biotransform*, 2008, 26:133.
- [21] Shim J H, Seo N S, Roh S A, et al. Improved bread-baking process using *Saccharomyces cerevisiae* displayed with engineered cyclodextrin glucanotransferase[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:4735.
- [22] Seo N S, Roh S A, Auh J H, et al. Structural characterization of rice starch in rice cake modified by *Thermus scoto-ductus* 4- $\alpha$ -glucanotransferase (TS $\alpha$ GTase)[J]. *J of Food Sci*, 2007, 72(6):C331.
- [23] Mun S, Kim Y L, Kang C G, et al. Development of reduced-fat mayonnaise using 4- $\alpha$ -GTase-modified rice starch and xanthan gum[J]. *Int J of Biological Macromolecules*, 2009, 44: 400.
- [24] 方继前, 郭亚平, 谢练武. 生物转化法定向结构改造难溶性药物[J]. *现代化工*, 2010, 30(8):32.
- [25] Li D, Roh S A, Shim J H, et al. Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16):6516.
- [26] Chung M J, Kang A Y, Lee K M, et al. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein expression and scavenge free radicals[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 3819.
- [27] Li D, Park S H, Shim J H, et al. In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase[J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339: 2789.
- [28] Chung M J, Sung N J, Park C S, et al. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice[J]. *European J of Pharmacology*, 2008, 578: 159.
- [29] Abelyan V A, Balayan A M, Ghochikyan V T. Transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40(2):129.
- [30] Markosyan A A, Abelyan L A, Adamyan M O. Transglycosylation of L-ascorbic acid[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43(1):36.

(上接第7页)

- [42] Shen W W, Xiong H M, Xu Y, et al. ZnO-poly(methyl methacrylate) nanobeads for enriching and desalting low-abundant proteins followed by directly MALDI-TOF MS analysis[J]. *Anal Chem*, 2008, 80:6758.
- [43] Tang J, Liu Y C, Qi D W, et al. On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis[J]. *Proteomics*, 2009(9):5046.
- [44] Jiang X N, Jiang X G, Han G H, et al. Optimization of filtering criterion for SEQUEST database searching to improve proteome coverage in shotgun proteomics[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007(8):323.
- [45] Jiang X N, Han G H, Feng S, et al. Automatic validation of phosphopeptide identifications by the MS<sup>2</sup>/MS<sup>3</sup> target-decoy search strategy[J]. *J Proteome Res*, 2008(7):1640.
- [46] Jiang X N, Dong X L, Ye M L, et al. Instance based algorithm for posterior probability calculation by target-decoy strategy to improve protein identifications[J]. *Anal Chem*, 2008, 80:9326.
- [47] Han G H, Ye M L, Jiang X N, et al. Comprehensive and reliable phosphorylation site mapping of individual phosphoproteins by combination of multiple stage mass spectrometric analysis with a target-decoy database search[J]. *Anal Chem*, 2009, 81:5794.
- [48] Jiang X N, Ye M L, Han G H, et al. Classification filtering strategy to improve the coverage and sensitivity of phosphoproteome analysis[J]. *Anal Chem*, 2010, 82:6168.