

重组 4- α -糖基转移酶转化淀粉制备大元环糊精的条件优化

朱 荣^{1,2}, 宿玲恰^{1,2}, 吴 敬^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 4- α -糖基转移酶能够以淀粉为底物通过分子内转糖基作用制备大元环糊精。本研究成功构建了产超嗜热菌 *Aquifex aeolicus* 来源的 4- α -糖基转移酶重组菌的 *E.coli* BL21 (DE3)/pET-24a(+)-AaAM。对重组菌进行摇瓶发酵, 培养 27h 破壁上清酶活达到 0.99 U/mL。以马铃薯淀粉为底物, 对酶转化生成大元环糊精进行了条件优化。结果表明, 在底物质量浓度为 1 g/dL 时, 经异淀粉酶脱支预处理后, 调节初始 pH 为 7.0, 反应温度为 75 $^{\circ}\text{C}$, 加酶量为 20 U/g, 在 10 h 时大元环糊精的转化率达到最高 24.8%, 为大元环糊精的工业生产奠定了基础。

关键词: 4- α -糖基转移酶; 大元环糊精; 酶转化; 条件优化

中图分类号: Q 814.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)12-1248-07

Optimization of Cycloamylose Preparation by Recombinant 4- α -Glucanotransferase

ZHU Rong^{1,2}, SU Lingqia^{1,2}, WU Jing^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 4- α -glucanotransferase can catalyze intramolecular glucan transfer reactions of amylose to produce cycloamylose. In this study, a recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/pET-24a(+)-AaAM derived from *Aquifex aeolicus* was constructed for intracellular production of 4- α -glucanotransferase. The AaAM produced in culture medium activity was 0.99 U/mL after 27 h in shake flask. Furthermore, the condition for cycloamylose preparation with potato starch by this enzyme was optimized. The optimized conditions for the conversion as follows: substrate concentration was 1 g/dL debranched potato starch, the initial pH was 7.0, the reaction temperature was 75 $^{\circ}\text{C}$, 4- α -glucanotransferase concentration was 20 U/g starch. Under this conditions, the

收稿日期: 2016-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31425020, 31571776, 31501419); 中国博士后基金项目(2015M580390); 江苏省自然科学基金项目(BK20140142)。

* 通信作者: 吴 敬(1969—), 女, 江苏镇江人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品酶工程方面的研究。

E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 朱荣, 宿玲恰, 吴敬. 重组 4- α -糖基转移酶转化淀粉制备大元环糊精的条件优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1248-1254.

cycloamylose yield is 24.8% for 10 h, which paved the way for industrial production of cycloamylose.

Keywords: 4- α -glucanotransferase, cycloamylose, enzyme conversion, optimal conditions

环糊精(cyclodextrin, CD)是葡萄糖单元通过 α -1,4糖苷键连接而成的环状糊精,常见的是聚合度为6、7、8的环状糊精,即 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精,而大元环糊精(cycloamylose, CA)是指聚合度在9至几百的环状糊精^[1]。大元环糊精具有大小不一、结构各异的疏水空穴,其环状结构存在不稳定性 and 多变性,可随客体分子、溶剂的变化发生改变,可用于包合成分复杂、分子大小各异的混合物^[3]。大元环糊精的结构具有多样性,其固体状态和在溶剂里的状态可能具有不同的立体结构。它对蛋白质有重折叠作用,能促使变性的酶重新正确折叠,并恢复其活性^[3]。在食品领域,大元环糊精可作为食品的回生抑制剂、风味物质的缓释剂。在化学工业中,其高水溶性、低黏度等特性使其能和乙醇、去垢剂等分子更好地形成包合物。在医药领域,大元环糊精可以与布洛芬等药物发生相互作用,稳定药物。因此,大元环糊精在生物、食品、化学、医药等领域都有着广泛的应用前景^[1]。

4- α -糖基转移酶(4- α -glucanotransferase, EC 2.4.1.25)是一种多功能酶,具有环化、偶合、歧化和水解四种活力,它通过分子内转糖基作用(环化反应)生产大元环糊精^[4]。该酶可分为两大类,一类是来源于微生物的4- α -糖基转移酶,如酿酒酵母中的糖原脱支酶^[5],芽孢杆菌中的环糊精葡萄糖基转移酶^[6]以及麦芽糖转糖基酶^[4]。另一类是来源于植物的4- α -糖基转移酶,如马铃薯组织中的D-酶^[6]。国外对4- α -糖基转移酶的研究主要集中在克隆表达新的基因,并研究其酶学性质和晶体结构^[8]。Terada等在*E.coli*中成功克隆表达了来自*Thermus aquaticus* ATCC33923的麦芽糖转糖基酶基因(MalQ基因),将获得的酶作用于直链淀粉,证实了该酶能催化分子内的糖基转移而生成大元环糊精^[4],并研究了该基因中与水解活性相关的位点,探究其对环化活性及转化率的影响^[8]。而国内的研究工作起步比较晚,王兴水教授等已在大肠杆菌中克隆表达来自于*Streptomyces* ssp. ST66的麦芽糖转糖基酶基因,并优化了其产酶条件^[13]。目前大元环糊精的生产仍处于利用直链淀粉为底物的实验室少量

制备阶段,而直链淀粉价格昂贵,不利于大规模的生产及其在相关领域的应用。许燕以1 g/dL高直链玉米淀粉为底物,经异淀粉酶脱支预处理后,在二甲亚砜反应体系中,用*Thermus aquaticus* ATCC 33923来源的4- α -糖基转移酶与脱支后的底物进行转化反应,将大元环糊精的最大转化率由24.55%提高到45.58%^[14]。由于高直链玉米淀粉价格相对于普通淀粉较贵,研究出以天然淀粉原料为底物制备大元环糊精,能大大降低生产成本,具有重要实际应用价值。作者以普通马铃薯淀粉为底物,经过异淀粉酶脱支预处理,利用*Aquifex aeolicus*来源的4- α -糖基转移酶制备大元环糊精,显著提高了转化率。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

嗜嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)基因组、*E.coli* JM109、*E.coli* BL21(DE3):为作者所在实验室保存;克隆载体pMD18-T[®] Simple vector:购自TaKaRa公司;表达载体pET-24a(+):购自Novagen公司。

1.2 培养基

LB种子培养基(g/L):酵母粉5,蛋白胨10,氯化钠10;卡那霉素(Kan)终质量浓度为30 μ g/mL。

TB发酵培养基(g/L):酵母粉24,蛋白胨12,磷酸二氢钾2.31,磷酸氢二钾12.54,甘油5;卡那霉素(Kan)终质量浓度为30 μ g/mL。

1.3 试剂与仪器

异淀粉酶、普鲁兰酶粗酶液:由作者所在实验室制备并保存,酶活力分别为3 000、1 200 U/mL。大元环糊精标样、根霉*Rhizopus* sp.来源糖化酶Amyloglucosidase:购买于sigma公司,酶活力约为36 U/mg。

酵母粉、蛋白胨:购自英国Oxoid公司;玉米淀粉、木薯淀粉、马铃薯淀粉:均为市售食品级淀粉;PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒:购于天根生化科技有限公司;卡那霉素、氨苄霉素:购于生工生物工程有限公司;PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶、核酸限制性内切酶、T4 DNA连接酶、核酸相对分子质量标准、琼脂糖、蛋白质相对分子

质量标准:购自宝生物工程(大连)公司;其他试剂:购自国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪、凝胶成像仪和蛋白质电泳仪:购自美国 Bio-Rad 公司;DYY-6C 型核酸电泳仪:购于北京六一仪器厂;细胞破碎仪:购自浙江宁波新芝生物科技股份有限公司;紫外可见光分光光度计:购于日本 Shimadzu 公司;高效液相色谱仪:购自美国 Agilent 公司;TSKgel 凝胶色谱柱 SuperMultipore PW-N:购自日本 TOSOH 公司。

1.4 工程菌的构建

1.4.1 AaAM 基因的克隆 以实验室保存的 *Aquifex aeolicus* 基因组为模板,设计引物,正向和反向引物序列分别为 5'-GCCGCCATATGAGATTG GCAGGTATTTTA-3' 和 5'-GGCCCAAGCTTAAAC TTCTCTTCCGTAAAT-3',酶切位点分别为 Nde I 和 Hind III,通过 PCR 扩增获得目的基因 AaAM。

PCR 反应体系(50 μ L):蒸馏水(已灭菌)33.5 μ L,5 $\times$ PS Buffer 10 μ L,dNTPs 4 μ L,模板 1 μ L,正反引物各 0.5 μ L,DNA 聚合酶 0.5 μ L。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 110 s,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4.2 表达载体 pET-24a(+)-AaAM 的构建 PCR 产物纯化后连接至载体 pMD18-T[®],连接产物转化入 *E.coli* JM109 感受态细胞,在 LB 琼脂平板(含 100 μ g/mL Amp)上于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜。挑取单克隆在 LB 液体培养基(含 100 μ g/mL Amp)中培养 8~10 h,抽提质粒得 pMD18-T[®]-AaAM,并双酶切和测序鉴定。序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。

pMD18-T[®]-AaAM 与表达载体 pET-24a(+) 分别经 Nde I 和 Hind III 双酶切和胶回收后,用 T4 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物转入 *E.coli* JM109,在 LB 琼脂平板(含 30 μ g/mL Kan)上于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜。挑取单克隆在 LB 液体培养基(含 30 μ g/mL Kan)中培养 8~10 h,抽提质粒 pET-24a(+)-AaAM 并进行双酶切验证,验证正确后转入 *E.coli* BL21(DE3)中,37 $^{\circ}$ C 培养 8 h,保存菌种,即得到重组基因工程菌 *E.coli* BL21/pET-24a(+)-AaAM。

1.5 摇瓶发酵生产 4- α -糖基转移酶 AaAM

将于-80 $^{\circ}$ C 保藏的重组菌 *E.coli* BL21/pET-24a(+)-AaAM 以 2% 的接种体积分数接种至 LB 培

基,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 8 h 后,以 5% 的接种体积分数转接至 TB 培养基,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 2 h 后加入 0.05 mmol/L IPTG 诱导,降温至 25 $^{\circ}$ C 进行重组蛋白的诱导表达,每隔 5 小时取样、离心收集菌体,用 50 mmol/L Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 6.6)悬浮菌体,超声破碎后离心得破壁上清液,即为 4- α -糖基转移酶 AaAM 粗酶液。

1.6 4- α -糖基转移酶 AaAM 活性测定

分别取 0.25 mL 的底物(0.5%可溶性淀粉溶液)、0.05 mL 的 1 g/dL 麦芽糖溶液和 0.6 mL、0.05 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 6.6)于试管中,70 $^{\circ}$ C 水浴预热 10 min。加入 0.1 mL 稀释的酶液,振荡混匀,反应 10 min,沸水浴 15 min 终止反应^[10]。向上述反应体系中加入 10 mL 碘液(0.2% KI+0.02% I₂),混匀,在 620 nm 下测量其吸光值。酶活单位定义:在酶活测量体系下,每分钟降解 1 mg/mL 淀粉所需的酶量^[15]。

1.7 淀粉脱支反应

用 0.05 mmol/L、pH 6.6 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制 1 g/dL 马铃薯淀粉溶液 70 $^{\circ}$ C 加热糊化 10 min;加入一定量的脱支酶,充分混匀后在适宜温度下于水浴摇床反应一段时间;反应结束后,沸水浴 30 min 灭酶。

1.8 大元环糊精的制备以及含量测定^[14]

用 0.05 mmol/L、pH 6.6 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制 1 g/dL 马铃薯淀粉溶液 70 $^{\circ}$ C 加热糊化 10 min;加入一定量的 4- α -糖基转移酶 AaAM,充分混匀后在 70 $^{\circ}$ C 水浴摇床中 200 r/min 反应一段时间;反应结束后,沸水浴 30 min 灭酶,在反应液中加入 50 U/g 糖化酶、50 U/g 异淀粉酶和 50 U/g 普鲁兰酶^[19],充分混匀后在 40 $^{\circ}$ C 水浴摇床中反应 10 h;反应结束后,沸水浴 30 min 灭酶,将反应液 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经过滤膜过滤(0.45 μ m)后用 HPLC 分析。

绘制大元环糊精标准曲线:称取大元环糊精标准品,配制成相应的质量浓度(0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.15、0.2 g/dL)溶液,经过超滤膜过滤(0.45 μ m)备用。根据大元环糊精质量浓度和峰面积之间的关系得大元环糊精标准曲线,用于后续制备的大元环糊精的定量分析。

转化率 = $\frac{\text{生成的大元环糊精的质量数}}{\text{淀粉底物质量数}} \times 100\%$ 。

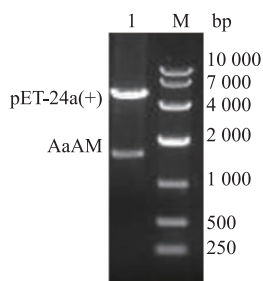
1.9 HPSEC 体积排阻色谱法定量分析大元环糊精

利用 HPSEC 体积排阻色谱法测量大元环糊精的色谱条件是^[14]:日立 Hitachi 色谱仪, Super Multipore PW-N(6.0 mm $\times$ 150 mm)凝胶色谱柱,日立 L-2490 示差检测器,流动相 0.05 mmol/L pH 6.6 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液,流速 0.3 mL/min;柱温设定为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 重组菌 *E.coli* BL21/pET-24a (+)-AaAM 的构建

2.1.1 重组质粒 pET-24a(+)-AaAM 的构建 以实验室保存的 *Aquifex aeolicus* 基因组为模板,通过 PCR 扩增获得 AaAM 基因片段,其大小经凝胶电泳验证为 1.5 kb。将所得基因片段与克隆载体相连得到重组质粒 pMD18-T[®]-AaAM,测序获取基因序列,所得 AaAM 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 中 *Aquifex aeolicus* 来源的 4- α -糖基转移酶基因序列同源性 100%^[16]。将表达载体 pET-24a(+)和重组质粒 pMD18-T[®]-AaAM 双酶切、纯化回收后连接,转入 *E.coli* JM109,培养重组菌并抽提质粒进行双酶切验证。如图 1 所示,在 5 300 bp 和 1 500 bp 附近有明显条带,条带大小与预期相符,表明重组表达载体 pET-24a(+)-AaAM 构建成功。



M: 10 000 bp DNA Ladder Marker; 1: 重组质粒 pET-24a(+)-AaAM

图 1 重组质粒 pET-24a(+)-AaAM 酶切验证

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid pET-24a(+)-AaAM

2.1.2 重组菌 *E.coli* BL21/pET-24a (+)-AaAM 的构建及培养 将重组质粒 pET-24a(+)-AaAM 转化入宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3), 构建重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET-24a(+)-AaAM。重组菌经 LB 培养后转接至 TB 培养基, 并加入 IPTG 诱导, 每隔 5 小

时取样离心收集菌体, 经超声破碎后得粗酶液测定酶活, 酶活随时间变化的曲线见图 2。随着时间的推移, 重组 4- α -糖基转移酶 AaAM 酶活不断增加, 诱导 27 h 达到最高酶活 0.99 U/mL, 继续增加诱导时间, 酶活呈下降趋势。蛋白质电泳 SDS-PAGE 结果见图 3。在 4- α -糖基转移酶 AaAM 理论相对分子质量 60 000 处出现一条蛋白质条带, AaAM 在 *E.coli* BL21(DE3) 中成功表达。

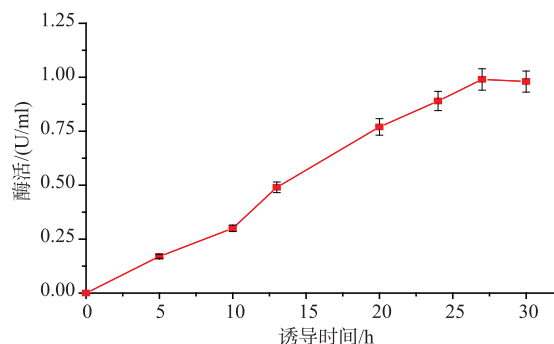
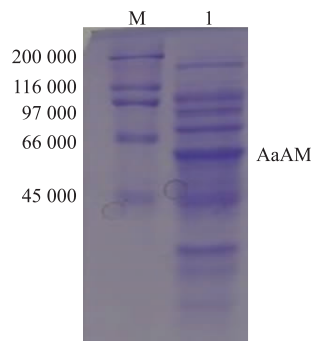


图 2 重组菌在摇瓶发酵中的产酶曲线

Fig. 2 Fermentation process of the recombinant *E. coli* BL21(DE3) in shake flask



M: protein marker; 1: supernatant of *E.coli*

图 3 4- α -糖基转移酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the AaAM

2.2 重组 4- α -糖基转移酶制备大元环糊精工艺优化

2.2.1 4- α -糖基转移酶加酶量对大元环糊精转化率的影响 4- α -糖基转移酶是一种多功能型酶, 具有环化、偶合、歧化和水解四种活力, 其相互作用与反应体系中的加酶量有关, 因此大元环糊精的转化率会受加酶量的影响^[17]。作者以 1 g/dL 的马铃薯淀粉为底物, 用 pH 6.6 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液对淀粉在 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热糊化 10 min, 加入不同量的 AaAM, 加酶量分别为 1、5、10、20、50、80、100 U/g 底物, 探

究其大元环糊精转化率的影响。反应完成后,加入根霉来源的糖化酶、异淀粉酶、普鲁兰酶处理未反应的底物,产物用 HPSEC 法进行定量检测。如图 4 所示,随着加酶量的增大,大元环糊精转化率也逐渐增大,在加酶量 20 U/g 底物时转化率达到最大,为 14.8%,之后加酶量增加,转化率呈下降趋势。分析可能的原因是,加酶量增大,水解和偶合反应加剧,已生成的大元环糊精转化为其他产物,因此转化率降低。考虑到经济性因素,选择加酶量为 20 U/g。

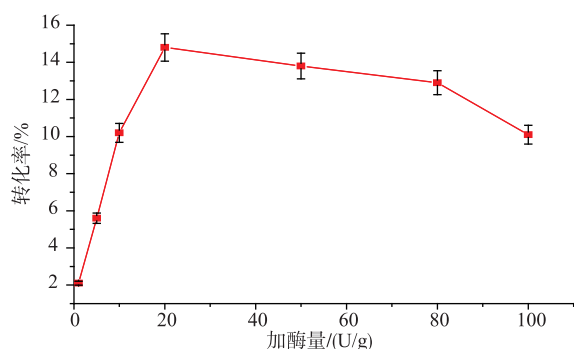


图 4 加酶量对酶转化的影响

Fig. 4 Effect of enzyme dosage on the enzymatic conversion

2.2.2 不同底物利用不同脱支酶先脱支再加入 4- α -糖基转移酶对大元环糊精转化率的影响 作者以 1 g/dL 的四种常见淀粉:马铃薯淀粉、可溶性淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉为底物,并采用 50 U/g 异淀粉酶、50 U/g 普鲁兰酶分别先对淀粉进行脱支预处理,脱支反应完成后灭活脱支酶,再加入 20 U/g 的 4- α -糖基转移酶 AaAM 制备大元环糊精。从图 5 可以看出,经脱支处理的淀粉底物酶转化效率提高,异淀粉酶脱支预处理后转化效率优于普鲁兰酶。其中以脱支处理后的可溶性淀粉为底物时,反应转化率最高达到 25.8%,而未经脱支处理的可溶性淀粉转化率为 15.6%,提高了 1.65 倍;脱支后的马铃薯淀粉转化率为 23.6%,相对于未经脱支处理的可溶性淀粉转化率为 14.8%,提高了 1.59 倍,脱支后的木薯淀粉和玉米淀粉的转化率相对较低,为 19% 左右。造成这种现象可能的原因是不同淀粉的空间结构以及直链和支链淀粉的组成比例不同^[18]。考虑到马铃薯淀粉价格低廉,为降低生产成本,选择其作为底物。

2.2.3 初始 pH 对大元环糊精转化率的影响 pH 变化可以影响酶活性中心基团的解离程度,进而影响酶分子与底物分子的结合,使转化效率发生改

变。作者用 pH 6.6 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液对淀粉在 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热糊化 10 min,加入 50 U/g 异淀粉酶脱支预处理,灭活脱支酶后,用 NaOH 和稀盐酸调节 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,加入 20 U/g 的 4- α -糖基转移酶 AaAM 制备大元环糊精。从图 6 可以看出,在 pH 为 4.0 时,大元环糊精的转化率只有 10.9%,可能是在偏酸性条件下,相当一部分酶失活;随着 pH 的升高,大元环糊精的转化率逐渐升高,当 pH 为 7.0 时,大元环糊精转化率最高,达到 24.2%,与文献报道 4- α -糖基转移酶 AaAM 最适 pH 6.6 接近^[16];当 pH 继续升高时,大元环糊精的转化率下降。

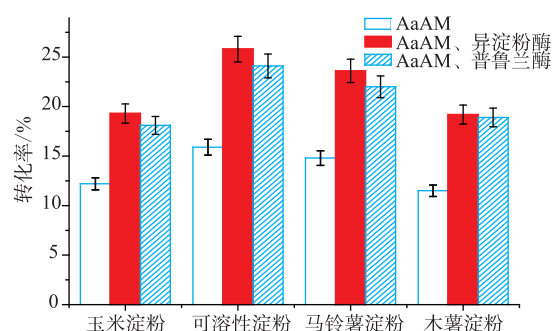


图 5 淀粉种类对酶转化的影响

Fig. 5 Effect of different sorts of starches on the enzymatic conversion

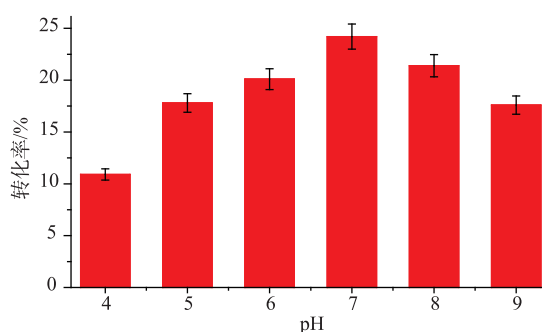


图 6 反应 pH 对酶转化的影响

Fig. 6 Effect of pH on the enzymatic conversion

2.2.4 反应温度对大元环糊精转化率的影响 温度对酶的稳定性及催化速率有显著影响,本研究考察了不同温度对 AaAM 制备大元环糊精的影响。脱支后调节淀粉溶液 pH 为 7.0, AaAM 加酶量为 20 U/g,分别在 60、65、70、75、80、85 $^{\circ}\text{C}$ 反应制备大元环糊精,结果见图 7。在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,转化率较低为 11.9%,随着温度的升高,大元环糊精转化率逐渐提

高;在 75 °C 下,大元环糊精的转化率达到最大值 24.8%;温度继续升高,大元环糊精的转化率下降,在 85 °C 时转化率降为 19.6%。根据文献报道,AaAM 最适温度为 90 °C,但在此温度下,转化率降低,这可能是由于温度较高时,酶的热稳定性变差^[16]。综合以上因素,选用 75 °C 的作为后续研究的反应温度。

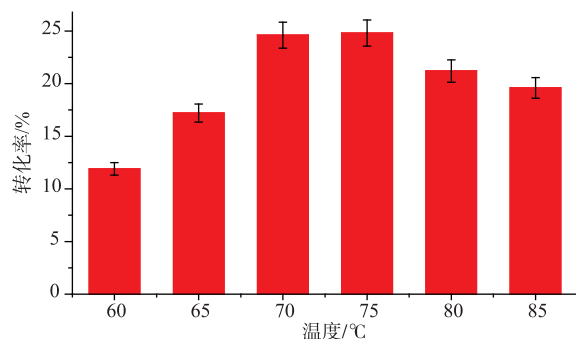


图 7 反应温度对酶转化的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the enzymatic conversion

2.2.5 反应时间对大元环糊精转化率的影响 在利用 4- α -糖基转移酶制备大元环糊精过程中,随着反应时间的延长,酶反应体系内的小分子糖类物质增加,促进了 4- α -糖基转移酶偶合作用而减弱了其环化活性,使得大元环糊精的转化率降低^[12]。本研究在脱支后调节淀粉溶液 pH 为 7.0,AaAM 加酶量为 20 U/g,在 75 °C 下反应制备大元环糊精。每隔 3 小时取样测定生成的大元环糊精产量。在酶转化反应前期,随着反应时间的增加,大元环糊精转化率一直上升至 10 h 左右达到最高转化率 24.8%,之后转化率呈明显下降趋势,见图 8。为节约成本,增加生产强度,反应时间应定为 10 h。

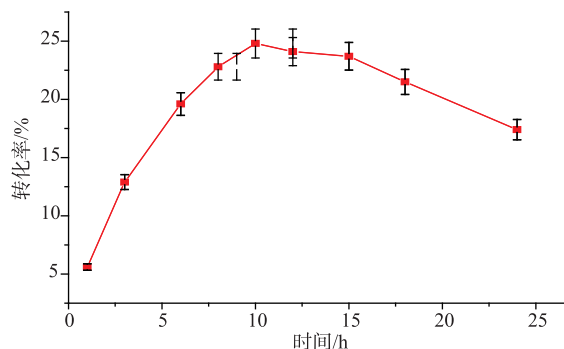


图 8 反应时间对酶转化的影响

Fig. 8 Effect of time on the enzymatic conversion

3 结 语

目前大元环糊精的制备仍处于实验研究阶段,多以直链淀粉为底物,价格昂贵,并未实现商品化。关于利用天然淀粉制备大元环糊精的研究,许燕等使用经异淀粉酶脱支处理的 1 g/dL 高直链玉米淀粉,在二甲亚砜反应体系中与 *Thermus aquaticus* ATCC 33923 来源的 4- α -糖基转移酶进行转化反应,将大元环糊精的最大转化率由 24.55% 提高到 45.58%^[14]。本研究中将来源于嗜嗜热菌 *Aquifex aeolicus* 的基因 AaAM 在大肠杆菌中经过克隆表达,成功构建了表达 4- α -糖基转移酶 AaAM 的重组菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET-24a(+)-AaAM,摇瓶发酵酶活最大为 0.99 U/mL。作者使用价格低廉的马铃薯淀粉,经过优化加酶量、与不同脱支酶复配、优化初始 pH、反应温度、反应时间,在底物质量浓度为 1 g/dL 时,先经过 50 U/g 底物异淀粉酶脱支预处理,灭活脱支酶后,调节初始 pH 为 7.0,在 75 °C 下加入 20 U/g 底物的 4- α -糖基转移酶 AaAM 时,在 10 h 时大元环糊精的转化率达到最高 24.8%,为大元环糊精的工业生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] TOMOHIRO E, HARUHISA U. Large ring cyclodextrins - recent progress[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 29: 27-38.
- [2] WANG Shuixing, GUO Yong, XU Yang. Cycloamylose and its application prospective in food industry[J]. *Food and Machinery*, 2006, 22(2): 113-116. (in Chinese)
- [3] WANG Shuixing, GUO Yong, LI Yanping. Novel annular starch—the latest research progress of cycloamylose[J]. *Cereal and Feed Industry*, 2006, 9(3): 23-26. (in Chinese)
- [4] YOSHINOBU T, KAZUTOSHI F, TAKESHI T. *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amylomaltase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 910-915.

- [5] MICHIO Y,HIROKI T,AKESHI T. Cyclization reaction catalyzed by glycogen debranching enzyme (EC 2.4.1.25/EC 3.2.1.33) and its potential for cycloamylose production[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2002,68 (9):4233-4239.
- [6] YOSHINOBU T,HARUYO S,TAKESHI T. Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferases[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2001,67(4):1453-1460.
- [7] TAKESHI T,MICHIO Y,HIROKI T. Potato D-enzyme catalyzes the cyclization of amylose to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1996,271(6):2902-2908.
- [8] INGO P,KOJI T,YOSHINOBU T. Crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalysing the production of large cyclic glucans[J]. **Journal of Molecular Biology**,2000,296:873-886.
- [9] HIROMI I,SHINYA F. Crystal structures of 4- α -glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor [J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2003,278(21):19378-19386.
- [10] WIRAYA S,AREEYA P. A novel amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the large-ring cyclodextrin products[J]. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**,2011,70:369-375.
- [11] KAZUTOSHI F,HIROTAKE M,YOSHINOBU T. Protein engineering of amylomaltase from *Thermus aquaticus* with random and saturation mutageneses[J]. **Biologia Bratislava**,2005,16:97-102.
- [12] KAZUTOSHI F,HIROTAKE M,YOSHINOBU T. Use of random and saturation mutageneses To Improve the properties of *Thermus aquaticus* amylomaltase for efficient production of cycloamyloses[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2005,71(10):5823-5827.
- [13] WANG Shuixing, FJ Jinheng, GONG Yan. MalQ gene cloning from *Streptomyces* ST66 and the original nuclear fusion expression [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**,2007,15(6):1024-1028.(in Chinese)
- [14] XU Y,ZHOU X,BAI Y X. Cycloamylose production from amylo maize by isoamylase and *Thermus aquaticus* 4- α -glucanotransferase[J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,102:66-73.
- [15] MINSU K,JUNHYUCK J,YOUNGWAN K. Overproduction of a thermostable 4- α -glucanotransferase by codon optimization at N-terminus region[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2013,93:2683-2690.
- [16] SHAKHAWAT H B,MOTOMITSU K. A cycloamylose-forming hyperthermostable 4- α -glucanotransferase of *Aquifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2003,22:45-53.
- [17] WANG Ning, WU Dan, CHEN Sheng, et al. Preparation of α -cyclodextrin by mutation Y89D of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. **Food Science**,2011(3):165-170.(in Chinese)
- [18] 王磊. *Bacillus clarkii* 7364 γ -环糊精葡萄糖基转移酶的重组表达及其应用[D]. 无锡:江南大学,2010.
- [19] TAKESHI T,MICHIO Y. Cyclic glucans produced by the intramolecular transglycosylation activity of potato D-enzyme on amylopectin[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,1998,247:493-497.