

微生物 GH13 家族淀粉脱支酶研究进展

段绪果^{1,2}, 吴敬^{1,2*}

¹江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 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, 无锡 214122

摘要:普鲁兰酶和异淀粉酶都具有典型的(β/α)₇桶状结构,属于GH13家族淀粉脱支酶。GH13家族的淀粉脱支酶能够专一、高效地水解淀粉分支部位的 α -1,6-糖苷键,可以有效提高淀粉原料利用率和生产效率,在淀粉加工工业中具有重要的应用价值,因此近年来对GH13家族淀粉脱支酶的研究逐渐增多。本文系统地综述了微生物来源的GH13家族淀粉脱支酶的国内外研究进展,分别对普鲁兰酶和异淀粉酶的底物特异性及结构基础、研究现状以及应用和研究新趋势进行了阐述。并对GH13家族淀粉脱支酶研究中存在的问题和下一步开发方向提出了见解。

关键词:淀粉脱支酶, 普鲁兰酶, 异淀粉酶, GH13 家族

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)07-0648-09

淀粉是以葡萄糖为基本单位聚合而成的多糖,是自然界中含量最丰富的碳水化合物之一,也是人和动物的主要营养来源。除直接食用外,淀粉还被进一步加工制备成淀粉糖等产品。淀粉糖生产的关键为淀粉链的酶水解。淀粉链主要由 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键连接葡萄糖单元而成。虽然 α -1,6-糖苷键只占总糖苷键的6%左右,却使淀粉链形成分支结构。目前,对于水解 α -1,4-糖苷键的淀粉酶,国内外研究比较成熟,已成功开发了 α -淀粉酶、糖化酶、 β -淀粉酶等产品;然而, α -1,4-糖苷键水解酶不能或只能缓慢切割 α -1,6-糖苷键,虽然后者在淀粉中含量较低,却限制了 α -1,4-糖苷键水解酶的催化效率,并形成无法利用的极限糊精。若在淀粉水解时复配 α -1,6-糖苷水解酶(俗称淀粉脱支酶),可有效提高原料利用率及生产效率。然而,相对于 α -

1,4-糖苷键水解酶,目前国内外对淀粉脱支酶研究大部分未发表。

根据作用方式的不同(表1),淀粉脱支酶分为普鲁兰酶(EC 3.2.1.41,又称为I型普鲁兰酶),淀粉普鲁兰酶(EC3.2.1.41,又称为II型普鲁兰酶),异淀粉酶(EC3.2.1.68)。根据蛋白质结构的异同,这3类淀粉脱支酶分属于2个不同的糖苷水解酶家族。其中普鲁兰酶和异淀粉酶都具有典型的(β/α)₇桶状结构,同属于GH13家族;淀粉普鲁兰酶由于具有典型的(β/α)₇桶状结构而属于GH57家族。其中,GH13家族的淀粉脱支酶分布较广,它们与淀粉水解的关系最为密切,可以专一、高效地切断淀粉中的分支点,在淀粉加工工业中得到了广泛的应用。GH13家族淀粉脱支酶在淀粉加工工业中的应用可以加速后续酶的反应,缩短反应时间,提高淀粉的转

基金项目:国家自然科学基金(30970057,31271813);111工程(111-2-06);江苏省高校研究生研究创新计划资助项目(BE2011711)

*通信作者。Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

作者简介:段绪果(1981-),男,江苏徐州人,博士研究生,主要从事微生物酶工程方面的研究。E-mail: dw5601@163.com

收稿日期:2012-12-09; **修回日期:**2013-02-28

化率,降低其它糖化用酶制剂的使用量,从而达到增加产量、提高设备利用率、降低生产成本的目的。目前, GH13 家族淀粉脱支酶已经广泛地用于生产葡萄糖、果糖、麦芽糖、麦芽糊精、低聚糖等产品^[1]。由于 GH13 家族淀粉脱支酶的重要应用价值,近年来国内外学者把该家族酶的开发研究作为非常重要的研究主题。本文就微生物来源的 GH13 家族淀粉脱支酶的研究进展进行了总结,分别对该家族酶的特点、研究现状以及生产应用和研究新趋势进行了阐述。

表 1. 淀粉脱支酶分类

Table 1. Classification of starch debranching enzymes

Enzyme	Pullulan	Amylopectin	GH Family
pullulanase	b	b	GH13
amylopullulanase	a, b	a, b	GH57
isoamylase	-	b	GH13

a, hydrolysis of α -1, 4-glucosidic linkages; b, hydrolysis of α -1, 6-glucosidic linkages; -, not catalyze the hydrolysis of α -1, 4-glucosidic linkages or α -1, 6-glucosidic linkages.

1 淀粉脱支酶的底物特异性及结构基础

普鲁兰酶和异淀粉酶虽然均能水解 α -1, 6-葡萄糖苷键,但二者底物特异性却有较大的差异(表 1)。普鲁兰酶适宜作用较低分子量糊精,其最小作用单位为麦芽糖基麦芽糖,能够高效地水解普鲁兰多糖(茁霉多糖);但是对大分子支链淀粉底物水解活力较低,对分支密集的糖原(又称肝糖,动物淀粉)几乎没有水解作用。异淀粉酶对大分子量的支链淀粉和糖原表现出较高的水解活力,对低分子量糊精水解活力较低,最小作用单位为麦芽三糖基麦芽四糖,不能水解普鲁兰多糖。2 类酶的底物特征见图 1。本研究考察了重组 *Bacillus* sp. WSH2010-03 普鲁兰酶和重组嗜热单胞菌(*Thermobifida fusca*) 异淀粉酶对 DE 值分别为 5 和 18 的玉米淀粉液化脱支效果的差异。结果显示普鲁兰酶对 DE 值为 18 的淀粉液化脱支效果较好,而异淀粉酶对低 DE 值的底物表现出了更强的水解效率,上述结果与淀粉脱支酶底物特异性相关理论一致。随着研究的深入,人们对淀粉脱支酶底物特异性的认识逐步加深;但是,人们一直困惑于普鲁兰酶和异淀粉酶底物特异性的分子机制。

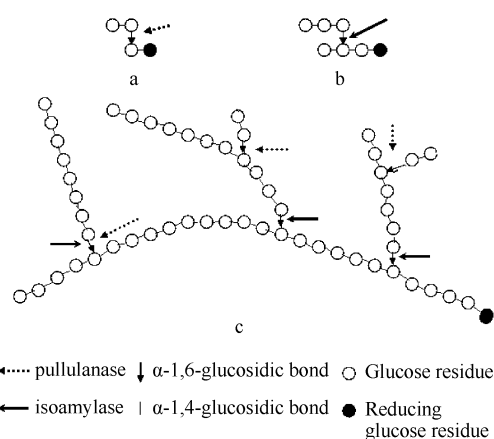


图 1. 普鲁兰酶和异淀粉酶作用底物特征示意图

Figure 1. The schematic and characteristics of substrate of starch debranching enzymes. (a) The minimum substrate for pullulanase: maltosyl maltose; (b) The minimum substrate for isoamylase: maltotriosyl maltotetraose; (c) Hydrolysis of substrate by starch debranching enzymes.

近年来,随着多个淀粉脱支酶的晶体结构被解析,上述问题的答案逐渐清晰。研究表明异淀粉酶三维结构整体上与普鲁兰酶相似,都有典型的 N3、A 和 C 3 个结构域(图 2),底物结合位点和催化中心位于 A 结构域。根据来源的不同,普鲁兰酶比异淀粉酶 N 端多了 2-3 个结构域。以已经解出晶体结构的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) 普鲁兰酶^[2]和酸性普鲁兰芽胞杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*) 普鲁兰酶^[3]为例,二者分别比多支淀粉假单胞菌(*Pseudomonas amyloclavata*) 异淀粉酶^[4]多出了 2 个结构域(N1 和 N2)和 3 个结构域(CBM41、N1 和 N2)。N1 和 N2 结构域可能和 CBM41 结构域的功能类似,它们都具有结合多糖底物的功能,这些结构域可以将普鲁兰酶锚定于淀粉等底物上以利于对底物分支键的水解。而异淀粉酶蛋白分子相对较小,空间位阻也不如普鲁兰酶大,可能更容易作用于糖原等分支密集多糖的分支键。我们在氨基酸序列比对的基础上,分别用与 *Bacillus* sp. WSH2010-03 普鲁兰酶和 *T. fusca* 异淀粉酶氨基酸序列同源性最高的蛋白晶体结构为模板,构建了这 2 个蛋白的结构模型。对比上述 2 个结构模型发现,前者具有 6 个结构域,其 N 端的 CBM41 结构域与其它 5 个结构域之间通过柔性 linker 连接,可能具有较大的摆动性,我们分析认为这与 CBM41 结构域具有锚定淀粉底物的作用有关。而 *T. fusca* 异

淀粉酶模型中的 3 个结构域(N3、A 和 C)之间通过氢键以及疏水相互作用紧密联系在一起,形成 1 个比较紧凑的立体三维结构。此外,对 *K. pneumonia* 普鲁兰酶和 *P. amyloclavata* 异淀粉酶晶体结构中 N3、A、C 区域氨基酸序列比对发现,在氨基酸序列上前者比后者多出 4 个长的插入序列(分别位于 L2、L6b、L6b 和 L8),而异淀粉酶比普鲁兰酶在一级结构水平上多出 2 个长的插入序列(分别位于 L4 和 L7)。而对二者蛋白催化活性位点结构的进一步比对发现,它们在 +2 到 +1 亚位点差异较大,其中最明显的特征是普鲁兰酶活性沟槽有 1 个苯丙氨酸形成的突出物,该突出物可能阻碍了普鲁兰酶与较大分子量支链淀粉的结合,导致普鲁兰酶对分支密集的支链淀粉和糖原水解活性较低^[2]。基于晶体结构揭示淀粉脱支酶底物特异性机制,可为 2 类酶的功能改造提供分子基础。

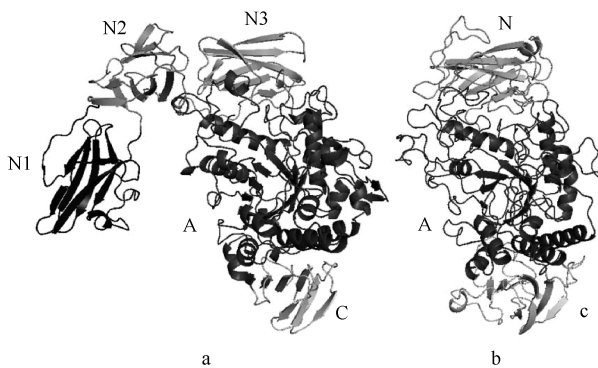


图 2. 淀粉脱支酶的蛋白三维结构

Figure 2. Protein structures of starch debranching enzymes. (a) *B. acidipullulyticus* pullulanase; (b) *P. amyloclavata* isoamylase.

2 普鲁兰酶研究现状

国外关于普鲁兰酶的研究已有 50 多年的历史。目前在植物和微生物中均发现了普鲁兰酶,其中植物普鲁兰酶又称 R 酶或极限糊精酶。由于微生物生产普鲁兰酶具有其独特的优势,早期人们主要筛选产普鲁兰酶的野生菌,包括:常温菌、嗜热菌以及超嗜热菌。常温菌(*Bacillus*, *Micrococcus* 等^[5])来源的普鲁兰酶最适温度一般在 45 – 60℃;嗜热菌(*Thermotoga*, *Anaerobic Bacterium* 等)^[6-7]来源酶最适温度在 75℃ 以上;超嗜热菌(*Thermococcus hydrothermalis* 等)来源酶最适温度超过 90℃^[8]。大

部分普鲁兰酶最适 pH 一般在 5.5 – 7.0,碱性普鲁兰酶最适 pH 为 8.0 – 10.0。

由于天然普鲁兰酶在性质上一般难以满足工业化应用的要求,因此挖掘普鲁兰酶编码基因、解析其晶体结构与功能的关系以及研究酶催化机制等工作自 20 世纪 80 年代以来已成为普鲁兰酶研究领域的主要内容。其中,日本学者在普鲁兰酶的研究中做出了重要贡献。他们于 1985 年鉴定了来源于 *K. pneumoniae* 的普鲁兰酶编码基因,又于 2006 年解析了其晶体结构^[2],这些成果均代表着普鲁兰酶研究领域的首次突破。随着越来越多的普鲁兰酶基因及结构功能的解析^[3],该家族酶的特征也日渐清晰。研究表明,普鲁兰酶蛋白的分子量一般在 75 – 90 kDa,具有 α -淀粉酶家族共有的 I、II、III、IV 4 个保守区域以及特征性的 YNWGYDP 保守氨基酸序列,其中维持催化活力所必须的 1 个谷氨酸残基和 2 个天冬氨酸残基就分别位于 II、III 和 IV 区域中。由于直到 2006 年才完成首个普鲁兰酶晶体结构的解析^[2],基于蛋白结构的酶功能改造目前还鲜有报道。

野生菌产酶能力一般较低,为了促进普鲁兰酶的商业化应用,在普鲁兰酶编码基因破译的基础上,研究者开始尝试采用 DNA 重组技术来提高普鲁兰酶的生产能力。天然普鲁兰酶大多是胞外酶,研究者主要采用大肠杆菌或枯草杆菌作为分泌型表达重组普鲁兰酶的宿主菌。1993 年,Genecor 公司^[9]将 1 种来源于脱支芽胞杆菌(*Bacillus deramificans*)的普鲁兰酶在地衣芽胞杆菌中的重组表达,重组酶最适 pH 为 4.5,最适温度为 60℃,半衰期约 50 h。此后,该公司经过不断改进菌种及发酵工艺,实现了普鲁兰酶的工业化生产,但是其发酵单位一直未见公开报道。尽管普鲁兰酶基因工程菌的构建及表达研究已有近 20 年的时间,除个别研究外,大多数报道的分泌表达水平依然较低:一般低于 100 U/mL,蛋白表达量只有 0.3 mg/mL。为了提高酶的基质分泌水平,对影响其胞外分泌水平的相关机制的研究则显得尤为重要。目前国际上对普鲁兰酶分泌机制的研究不多,主要限于 *K. pneumoniae* 来源的普鲁兰酶分泌组件及机制的研究^[10]。研究发现该菌来源的普鲁兰酶是 1 种脂蛋白,主要定位于细胞表面,由 15 种蛋白组成的复杂信号通路对其分泌进行严格调控。近年来在普鲁兰酶蛋白质工程改造方面也取得

了一些进展,研究主要集中于对普鲁兰酶 N 端部分肽链(主要是 CBM41 结构域)的切除来提高其胞外分泌水平。研究结果主要以专利的形式公布,如:2001 年 Enzyme Bio-Systems 公司在专利中报道了切除长野芽胞杆菌(*Bacillus naganoensis*)来源的普鲁兰酶 N 端 106 个氨基酸可使重组普鲁兰酶胞外分泌水平提高 1.6 倍^[11]。2011 年 Genecor 公司^[12]也在专利中报道了普鲁兰酶在溶液中会随着时间的延长而被蛋白酶从 E99 和 E103 位点降解,这种降解通常发生在第 30 - 50 小时,从而形成 N 端被截断的普鲁兰酶,被截短的普鲁兰酶依然具有脱支活性,但是 50h 以后被截短的普鲁兰酶会被进一步降解而失去活性。在此基础上,发明人构建了 E99Q/E103Q 双突变体以及 N 端 104 个氨基酸删除的普鲁兰酶。发明人推测 E99Q/E103Q 双突变体可能具有更好的稳定性,但是没有给出具体酶的稳定性数据。此外,N 端 104 个氨基酸截短的普鲁兰酶具有比全长蛋白更高的胞外分泌水平,发明人认为这种现象可能与重组酶分子量的减小有关。

我国普鲁兰酶的研究虽晚于国外,但也有 30 多年的历史。早期工作主要围绕菌株的筛选。至 20 世纪 90 年代,我国市场上开始出售进口普鲁兰酶,继而引发了对于普鲁兰酶在淀粉加工中的应用研究,并逐步将普鲁兰酶的应用推广到淀粉糖(葡萄糖、超高麦芽糖浆、低聚糖、环糊精)、酿造(啤酒、黄酒)及其它发酵行业,推动了相关行业的提升。至 2000 年前后随着我国淀粉加工行业的快速发展,企业对普鲁兰酶的需求激增,普鲁兰酶生产菌株的开发逐渐升温。目前,我国科研人员先后在 *Bacillus*、*Thermotoga* 等微生物中筛选到普鲁兰酶,并开展了野生菌的诱变育种、重组菌的构建及发酵条件优化工作,取得了一些较好的结果。早期的研究主要集中在从自然界中筛选能够产生普鲁兰酶的野生菌,并对野生菌的发酵条件进行优化。2001 年,江苏省微生物研究所的唐宝英等^[13]筛选到 1 株耐热酸性普鲁兰酶生产菌 *Bacillus* sp. EM 24-1。2009 年,巩培等^[14]对产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)发酵条件进行了优化,5L 罐发酵产普鲁兰酶达到 54.6 U/mL。但是上述研究的产酶水平依然很低,即使通过发酵优化其产量也难以满足工业化生产的要求。近年来,利用基因工程技术来构建产普鲁兰酶的工程菌的研究逐渐增多,并取得了一定的进展。

2005 年,云南师范大学杨元娟等^[15]将 *B. naganoensis* 普鲁兰酶克隆到毕赤酵母(*P. pastoris*)中表达,普鲁兰酶发酵活力可以达到 350.8 U/mL。刘逸寒等^[16]对枯草芽胞杆菌工程菌株产普鲁兰酶发酵条件进行优化,酶活力最高 20.2 U/mL。

虽然国内目前在普鲁兰酶的结构解析、功能优化及分泌强化方面的研究还鲜有报导,但是随着研究的不断深入,国内学者也将视野渐渐推进,近两年来相继发表了一些关于国外这方面研究进展的综述^[17]。在普鲁兰酶蛋白质工程改造方面,本研究室也开展了一些工作。我们通过对 *Bacillus* sp. 普鲁兰酶序列比对、分子结构模拟及理性分析的基础上,通过定点突变,构建了 1 个普鲁兰酶的突变体。酶学性质研究表明,突变体与野生酶相比,其酶学性质发生了明显变化,突变体最适温度、半衰期和催化效率都得到了不同程度的提高。糖化实验表明,突变体与糖化酶复配糖化得率比对照有所提高,因此推测该突变体可能具有潜在的应用价值。目前虽然我国市场上已经有少量国产普鲁兰酶商品,但是短时间内还不会对国外跨国公司对该产品的垄断局面产生影响。

3 异淀粉酶研究现状

作为另 1 种具有重要工业应用价值的淀粉脱支酶,异淀粉酶的研究在国外已有 60 多年的历史。1951 年,日本学者 Maruo 等^[18]首先发现来源于酿酒酵母中的胞内异淀粉酶。1968 年,Harada 等^[19]首次从细菌 *P. amyloclavata* 中分离到异淀粉酶。此后,人们相继发现芽胞杆菌、放线菌、酵母、古菌等都可以产生异淀粉酶。除了嗜热微生物来源的异淀粉酶最适温度在 75℃ 左右,大多数异淀粉酶的最适温度在 37 - 47℃,50℃ 以上的稳定性较差。此外,大多异淀粉酶最适 pH 在 5.0 左右,且在 pH 4.5 - 6.5 较稳定。由于嗜热菌来源的酶往往具有较高的耐热性,近年来嗜热菌异淀粉酶的研究不断增多。2005 年,Fang Tsuei-Yun 等^[20]报道了 1 种来源于硫化硫矿叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的异淀粉酶,该酶的最适温度达到 75 - 80℃。

1988 年,Amemura 等^[21]首次对多支淀粉假单胞菌 *P. amyloclavata* 异淀粉酶的基因进行克隆和核苷酸序列测定,此后 *E. coli*、气味黄杆菌

(*Flavobacterium odoratum*)、*S. solfataricus* 等来源的异淀粉酶编码基因被相继阐明^[20, 22-23]。1998 年 Katsuya 等^[4]率先解析了来源于 *P. amyloclavata* 的三维晶体结构,发现该酶的 N 端存在 1 种全新的结构域,该结构域中的催化域是 1 个不完整的(β/α)₈ 桶状结构。此后,大肠杆菌 K12 和硫磺硫化叶菌 *S. solfataricus* 异淀粉酶的晶体结构也被解析^[24]。虽然异淀粉酶晶体结构的解析,为研究其催化机理、分子改造和功能优化提供了一定的基础,但是目前还没有关于异淀粉酶的蛋白分子改造方面研究结果的公开报道。

在异淀粉酶的制备方面,早期主要采用自然筛选结合诱变来提高产酶水平。1993 年,台湾学者 Wu 等^[25]以 *P. amyloclavata* SB15(ATCC 21262) 为出发菌株,经过 5 次紫外诱变和 1 次 NTG 诱变,最终筛选到 1 株酶活力比出发菌株提高 22 倍的突变株 WN6410,优化后该突变株在 2.5 L 发酵罐中酶活力可以达到 5100 U/mL。此后,研究者尝试采用 DNA 重组技术来提高异淀粉酶的产酶量,台湾和日本的研究者在这方面开展了较多的工作。这些研究主要集中于 *Bacillus* sp.、*P. amyloclavata* 以及 *F. odoratum* 来源的异淀粉酶的克隆表达。1995 年,台湾学者 Lin Long-Liu 等^[26]首先克隆表达了 *P. amyloclavata* 异淀粉酶,但是重组酶都是包涵体,没有可溶性的重组蛋白。他们对包涵体进行复性,发现复性蛋白的比活力约为 8 360 U/mg。1998 年,该研究小组实现了 *P. amyloclavata* 异淀粉酶在酿酒酵母细胞中的胞外可溶性表达,胞外酶活力达到 86 U/mL^[27]。1999 年,日本的 Abe Jun-Ichi 等^[22]将 *F. odoratum* KU 异淀粉酶编码基因在大肠杆菌中进行表达,摇瓶发酵胞外酶活达到 51.4 U/mL。虽然研究最多的 *P. amyloclavata* 和 *F. odoratum* 异淀粉酶都是胞外酶,但越来越多的报道显示大多数异淀粉酶为胞内酶^[20, 28-31]。由于相对于胞外酶,胞内酶提取工艺复杂、制备成本高、不易规模化生产,因此这方面的研究开发往往被忽视。如何实现胞内异淀粉酶的胞外分泌是 1 个具有挑战性的课题,目前还没有异淀粉酶胞外分泌强化方面的研究报道。

我国关于异淀粉酶的研究起步于 20 世纪 90 年代,开展工作不多。目前为止,发表的文献只有 10 余篇,主要集中于菌株筛选、诱变改良、酶分离纯化以及酶学定性^[32-33]。其中,王武等^[34]首先在 1993

年筛选到 1 株产异淀粉酶的短杆菌 BI25164,经过发酵优化胞外酶活达到 520 U/mL,该酶最适温度 50℃,最适 pH 5.0。此后 10 年左右鲜有异淀粉酶的文献报道,直到 2003 年以后,国内学者又分别筛选到产异淀粉酶的 *Bacillus*、*Thermus* 等微生物,并开展了菌株的诱变改良和发酵优化等工作。本研究室以 *T. fusca* 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 克隆得到了异淀粉酶编码基因。构建得到了产重组异淀粉酶的大肠杆菌,并优化了重组异淀粉酶摇瓶发酵产酶条件,重组菌摇瓶发酵 36 h 胞内酶活力水平达到 879.2 U/mL^[31]。目前,国内在异淀粉酶研究上虽然取得了一定的进展,但是还未实现工业化生产,市场上的商业化产品主要为进口酶制剂。

4 淀粉脱支酶的应用及研究的新趋势

4.1 淀粉脱支酶应用

淀粉作为重要的工业原料,经过深加工可以生产氨基酸、有机酸、酒精和淀粉糖等产品。目前,我国的数个淀粉深加工产品:如味精、柠檬酸、赖氨酸、葡萄糖和麦芽糖等产品的产量已经位居世界第一。但是,相关行业的技术水平仍然较低,普遍存在原料消耗大,能耗高,工业废水排放多等问题。

以其中发展最为迅速的淀粉糖为例,近 10 年来,我国淀粉糖工业获得了高速发展,但也存在很多问题。2000 年,我国淀粉糖产量约为 119 万吨,经过 10 多年的发展,目前我国淀粉糖年总产量已经超过 1070 万吨,仅次于美国。但是,长期以来我国淀粉糖行业的发展很大程度上依赖于国内较低的人力成本、原材料价格以及过去很长一段时间内对于能源消耗问题的忽视。随着国家对节能减排的日益重视以及国外同类高技术优质产品进军国内市场,目前国内淀粉糖产业赖以生存的“传统优势”正在逐渐丧失。上述问题一方面需要通过设备改造、工艺改进来解决;另一方面,随着工业生物技术的进步,尤其是具有新性能淀粉水解酶(包括新型淀粉脱支酶)的出现,为解决上述高能耗、高消耗、高污染等问题提供了新的解决之道。

目前,淀粉脱支酶应用于淀粉加工工业中对改造传统行业以及开发新产品所取得的积极效果已经逐渐显现。常规的淀粉脱支酶的应用主要是普鲁兰酶在淀粉酶解中的应用。以葡萄糖生产为例,单独

使用糖化酶, 底物浓度 34% 时, 葡萄糖值最大为 95.5%, 若要进一步提高葡萄糖值, 需要降低底物浓度; 而利用脱支酶与糖化酶协同作用, 在相同底物浓度下, 葡萄糖值可以达到 97.0%, 原料利用率提高 0.3% - 0.5%, 并且反应时间缩短 15%, 糖化酶用量减少 15%, 每年可节省淀粉原料 3 万余吨。此外, 普鲁兰酶和异淀粉酶在高麦芽糖浆、海藻糖、环糊精、抗性淀粉等淀粉加工领域中的应用价值正在逐渐引起人们的重视。

4.2 具有新性能淀粉脱支酶的开发

由于普鲁兰酶和糖化酶复配制备葡萄糖浆的应用最为广泛, 故适用于和糖化酶复配的普鲁兰酶的开发最多, 且主要集中在满足在 60°C、pH4.5 具有较高催化效率和稳定性的酶学性质要求。这就导致了大多数研究者只片面关注耐热、耐酸普鲁兰酶生产菌株的筛选和基因的解析, 而没有关注到不同淀粉加工产品及淀粉酶需要不同性质的淀粉脱支酶与之协同作用才能达到最佳效果。尤其是近年来一些新的淀粉加工产品及工艺对淀粉脱支酶的性能提出了新的要求, 而单一的耐热、耐酸普鲁兰酶很难满足这种多样的需求。

以 α -环糊精制备为例, 单独采用 α -环糊精葡萄糖基转移酶 (α -CGTase) 转化淀粉来制备 α -环糊精时, 转化率往往只有 40% - 55%。这主要是由于 α -CGTase 不能水解淀粉底物中的 α -1,6-分支键, 最终有大量淀粉底物没有利用引起的。为了解决上述问题, 1997 年 Rendleman^[35] 开发了 1 种利用普鲁兰酶先对淀粉底物进行脱支, 灭酶后再加入 α -CGTase 进行环化制备环糊精的两步法工艺。该工艺可以显著提高环糊精的转化率, 最终的转化率达到 84%。由于该工艺中采用的普鲁兰酶容易受到环糊精的抑制, 脱支反应和环化反应必须分开, 这就导致了底物浓度只有 10%, 而且整个反应的周期长达 7 天。可见两步法工艺效率较低、成本较高, 难以实现工业化应用。分析发现, 普鲁兰酶会受到环糊精的强烈抑制^[36], 因此不适合应用于同步转化工艺中; 而已有的商品化异淀粉酶也难以满足 α -CGTase 对弱酸性 pH 和低温条件的要求, 难以同步协调作用。本研究室对嗜热单胞菌 (*Thermobifida fusca*) 异淀粉酶进行了重组表达及酶学定性, 发现该重组异淀粉酶在 50°C 对支链淀粉具有较强的脱支活性^[31]。进一步研究发现, 其与软化芽胞杆菌 α -CGTase 的最适 pH

一致, 且在 30°C (α -CGTase 转化淀粉制备环糊精的最佳制备温度) 仍然具有较高的催化活性, 因此比较适合与 α -CGTase 复配使用。在此基础上, 首次建立了利用异淀粉酶与 α -CGTase 复配同步转化淀粉制备环糊精的新工艺。结果显示, 在底物浓度为 15% 时, 环糊精总转化率高达 84.6%, 比单独使用 α -CGT 酶时的转化率提高了 31.2%; 反应周期只有 24 h, 明显低于两步法转化工艺的时间, 更具有工业化应用价值。

由此可见, 随着新型淀粉加工产品及工艺的不断涌现, 现代淀粉糖工业对淀粉脱支酶的性能在广度 (如不同淀粉底物^[31, 37], 不同最适作用 pH^[16, 19, 26, 38]、温度^[23]等) 及深度 (如高效性、稳定性等) 上的要求不断提高。因此开发高催化活性、高特异性、高产率的系列淀粉脱支酶将成为淀粉脱支酶研究的新趋势。对淀粉脱支酶的研究视野应进一步拓展, 只有针对特定的淀粉加工过程, 挖掘并优化具有相应酶学性能的脱支酶才能真正解决淀粉质原料有效利用的源头性难题。

5 展望

综上所述, 虽然淀粉脱支酶的研究已有一定的历史, 在菌株筛选、基因克隆表达、结构解析以及高效制备等方面取得了一定的进展, 但是目前淀粉脱支酶研究领域值得注意的问题有: (1) 近年来淀粉加工产品的不断拓展, 衍生了对分别适用于不同加工过程特征 (如底物、温度、pH 等) 的淀粉脱支酶的需求, 这就要求作为辅助用酶的淀粉脱支酶的筛选应与特定淀粉加工过程紧密关联, 根据其复配酶的性质确定所筛酶种。(2) 多年来, 国内外淀粉脱支酶的研究主要集中在可与糖化酶复配的耐热酸性普鲁兰酶, 而对其它性能的脱支酶, 特别是异淀粉酶的研究重视不够。(3) 国内外研究者采用基因工程技术表达重组酶时, 普鲁兰酶的分泌表达效率通常较低, 这种有别于常规的现象是否与其酶蛋白自身特性相关值得进一步探究。(4) 目前发现的异淀粉酶天然条件下大多定位于胞浆, 如何将性能优良的胞内异淀粉酶高效“释放”胞外基质, 以便于大规模工业化生产的新策略及高技术有待开拓。

参考文献

- [1] Zhang HX, Jin ZY. Preparation of resistant starch by

- hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(2):865-867.
- [2] Mikami B, Iwamoto H, Malle D, Yoon HJ, Demirkan-Sarikaya E, Mezaki Y, Katsuya Y. Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 359(3):690-707.
- [3] Turkenburg JP, Brzozowski AM, Svendsen A, Borchert TV, Davies GJ, Wilson KS. Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Proteins*, 2009, 76(2):516-519.
- [4] Katsuya Y, Mezaki Y, Kubota M, Matsuura Y. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 281(5):885-897.
- [5] Devi KP, Yogeewaran G. Co-expression of saccharifying alkaline amylase and pullulanase in *Micrococcus halobius* OR-1 isolated from *Tapioca* cultivar Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, 15(2):223-229.
- [6] Kang J, Park KM, Choi KH, Park CS, Kim GE, Kim D, Cha J. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 48(3):260-266.
- [7] Koch R, Canganella F, Hippe H, Jahnke KD, Antranikian G. Purification and properties of a thermostable pullulanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium, *Fervidobacterium pennavorans* Ven5. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3):1088-1094.
- [8] Rudiger A, Jorgensen PL, Antranikian G. Isolation and characterization of a heat stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2):567-75.
- [9] Philippe D, Antoine A, December. Pullulanase, microorganisms producing the same, method for preparation thereof as well as its use. Europe Patent 0,605,040 A1, 1993.
- [10] Buddelmeijer N, Francetic O, Pugsley AP. Green fluorescent chimeras indicate nonpolar localization of pullulanase secretion components PulL and PulM. *Journal of Bacteriology*, 2006, 88(8):2928-2935.
- [11] Martin TW, Brumm PJ. Pullulanase expression constructs containing α -amylase promoter and leader sequences. US patent: 6300115B1. 2001-10-09.
- [12] Brian S, Miller B. Pullulanase variants with increased productivity. US patent: 7968691. 2011-09-11.
- [13] Tang B, Zhu X, Liu J. Selection of the acid and heat-resistant pullulanase-producing strain and its fermentation conditions. *Microbiology*, 2001, 28(1):39-43. (in Chinese)
唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究. *微生物学通报*, 2001, 28(1):39-43.
- [14] Gong P, Qi W, Du L, Liu Y. Optimization of the fermentation medium for producing pullulanase by *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2009, 24(3):10-12. (in Chinese)
巩培, 戚薇, 杜连祥, 刘伊. 产气气杆菌产普鲁兰酶发酵培养基的优化. *天津科技大学学报*, 2009, 24(3):10-12.
- [15] Xu B, Yang YJ, Huang ZX. Cloning and overexpression of gene encoding the pullulanase from *Bacillus naganensis* in *Pichia pastoris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16(8):1185-1191.
- [16] Liu Y, Bo J, Wang Y, Zhang Z, Wang J, Lu F. Optimization of fermentation conditions for the pullulanase production by engineered *Bacillus subtilis*. *Food Research and Development*, 2012, 33(7):136-140. (in Chinese)
刘逸寒, 薄嘉鑫, 王亚品, 张志萌, 王建玲, 路福平. 枯草芽胞杆菌工程菌株产普鲁兰酶发酵条件的优化. *食品研究与开发*, 2012, 33(7):136-140.
- [17] Jiang N, Song H, Wang P. Pullulanase and the proteins related to its secretion—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(6):725-731. (in Chinese)
姜楠, 宋诙, 王萍. 普鲁兰酶及其分泌相关蛋白的研究进展. *微生物学报*, 2011, 51(6):725-731.
- [18] Maruo B, Kobayashi T. Enzymic scission of the branch links in amylopectin. *Nature*, 1951, 167(4250):606-607.
- [19] Harada T, Yokobayashi K, Misaki A. Formation of isoamylase by *Pseudomonas*. *Applied Microbiology*, 1968, 16(10):1439-1444.
- [20] Fang TY, Tseng WC, Yu CJ, Shih TY. Characterization of the thermophilic isoamylase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2005, 33(3):99-107.
- [21] Amemura A, Chakraborty R, Fujita M, Noumi T, Futai M. Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata* SB-15. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 1988, 263(19):9271-9275.
- [22] Abe J, Ushijima C, Hizukuri S. Expression of the isoamylase gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and identification of essential residues of the enzyme by site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9):4163-4170.
- [23] Krohn BM, Barry GF, Kishore GM. An isoamylase with neutral pH optimum from a *Flavobacterium* species; cloning, characterization and expression of the iam gene. *Molecular and General Genetics*, 1997, 254(5):469-478.
- [24] Woo EJ, Lee S, Cha H, Park JT, Yoon SM, Song HN, Park KH. Structural insight into the bifunctional mechanism of the glycogen-debranching enzyme TreX from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(42):28641-28648.
- [25] Wu DH, Wen CY, Chu WS, Lin LL, Hsu WH. Selection of antibiotic-resistant mutants with enhanced isoamylase activity in *Pseudomonas amyloclavata*. *Biotechnology Letters*, 1993, 15(9):883-888.
- [26] Lin LL, Chu WS. Expression of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase gene in *Escherichia coli* using an inducible T7 phage expression system. *Process Biochemistry*, 1995, 30(6):547-552.
- [27] Chen PH, Lin LL, Hsu WH. Expression of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(8):735-739.
- [28] Seibold GM, Eikmanns BJ. The glgX gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology*, 2007, 153(7):2212-2220.
- [29] Lim WJ, Park SR, Cho SJ, Kim MK, Ryu SK, Hong SY, Seo WT, Kim H, Yun HD. Cloning and characterization of an intracellular isoamylase gene from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 287(2):348-354.
- [30] Ma YJ, Lin LL, Chien HR, Hsu WH. Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31:55-59.
- [31] Duan XG, Chen S, Chen J, Wu J. Enhancing the cyclodextrin production by synchronous utilization of isoamylase and α -CGTase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012; DOI 10.1007/s00253-012-4292-9.
- [32] Xia J, Chen Z, Shangguan J, Tang J, Wang L. The growth and the enzyme production of a isoamylase producing *Thermus* strain. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(5):107-109. (in Chinese)
夏静, 陈朝银, 上官俊龙, 唐嘉, 王磊. 一株产异淀粉酶栖热菌的生长和产酶初步研究. 微生物学杂志, 2005, 25(5):107-109.
- [33] Guo H, Jiang J, Zou D. Optimization of production conditions of the strain producing acidic isoamylase. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(6):185-188. (in Chinese)
郭宏文, 江洁, 邹东恢. 酸性异淀粉酶产生菌的产酶条件优化. 食品工业科技, 2010, 31(6):185-188.
- [34] Wang W, Zhou X. Breeding of *Brevibacterium* isoamylase producer and the enzymatic study. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 1993, 12(3):197-204. (in Chinese)
王武, 周晓宏. 短杆菌异淀粉酶产生菌选育及酶作用性质研究. 无锡轻工业学院学报, 1993, 12(3):197-204.
- [35] Rendleman JA. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1997, 26(1):51-61.
- [36] Yu B, Wang JP, Zhang HX, Jin ZY. Investigation of the interactions between the hydrophobic cavities of cyclodextrins and pullulanase. *Molecules*, 2011, 16(4):3010-3017.
- [37] Ghosh B, Ray RR. Saccharification of raw native starches by extracellular isoamylase of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology*, 2010, 9:224-228.
- [38] Hatada Y, Saito K, Hagihara H, Ozaki K, Ito S. Nucleotide and deduced amino acid sequences of an alkaline pullulanase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp. KSM-1876. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, 1545(1):367-371.

Advances in studying microbial GH13 starch debranching enzyme-A review

Xuguo Duan^{1,2}, Jing Wu^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, ²School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Pullulanase and isoamylase belong to the GH13 family (glycoside hydrolase family 13) with similar sequence, catalytic mechanism and three-dimensional fold ($(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure). Starch debranching enzymes can hydrolyze the α -1,6-glucosidic bonds at the branch sites of starch, and improve raw material utilization and production efficiency in the starch industry. In this review, the substrate specificity, protein structure, advances and new trends in the study of microbial GH13 starch debranching enzyme were systematically introduced. In addition, some opinions on the research status and prospect for starch debranching enzyme were discussed.

Keywords: starch debranching enzyme, pullulanase, isoamylase, GH13 family

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970057, 31271813), by the 111 Project (111-2-06) and by the Research and Innovation Project for College Graduates of Jiangsu Province (BE2011711)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

Received: 9 December 2012/Revised: 28 February 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 7 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2012	月刊	48 - 52	1 - 12
2013	月刊	53	1 - 7