

综述

右旋糖酐蔗糖酶及其分子改造

张心钰, 张宇馨, 蔡宝红, 张洪斌, 杨静文*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230000)

摘要: 右旋糖酐蔗糖酶是一种以蔗糖为底物合成右旋糖酐的聚合酶。该酶及其催化产物在医药、食品、化工等工业领域具有重要的应用价值与广泛的工业用途, 因此近年来对右旋糖酐蔗糖酶的研究逐渐增多。本文结合文献及本实验室研究成果, 对右旋糖酐蔗糖酶的研究进展及其工业应用进行综述, 并对当前有关该酶研究的热点和重点以及未来的研究趋势提出了见解。

关键词: 右旋糖酐蔗糖酶; 右旋糖酐; 分子改造

Dextran sucrose and its molecular modification

ZHANG Xinyu, ZHANG Yuxin, CAI Baohong, ZHANG Hongbin, YANG Jingwen*

(School of Food and Biotechnology, Hefei University of Technology, Hefei 230000, China)

Abstract: Dextran sucrose is a polymerase that synthesizes dextran using sucrose as a substrate. The enzyme and its catalytic products have wide industrial applications in industries such as medicine, food and chemical industry. Therefore, in recent years, researches on dextran sucrose have gradually increased. Based on research of our laboratory and others, this work reviews the research progress and industrial applications of dextran sucrose, and insights were put forward on the current hotspots and focuses of research on this enzyme, as well as future research trends.

Key Words: dextran sucrose; dextran; molecular modification

右旋糖酐蔗糖酶(EC 2.4.1.5)又称葡萄糖基转移酶, 来自糖苷水解酶家族70(glycoside hydrolase 70, GH70)^[1], 也称为蔗糖-6-葡萄糖基转移酶。右旋糖酐蔗糖酶可以催化葡聚糖的形成, 葡聚糖是适用于具有线性骨架的聚葡聚糖的总称, 其线性骨架含有至少50%的d-吡喃葡萄糖基残基。这种葡聚糖主要由 $\alpha(1,6)$ 糖苷键连接的葡聚糖形成的直链组成, 会含有以 $\alpha(1,2)$ 、 $\alpha(1,3)$ 和 $\alpha(1,4)$ 键连接的支链^[2,3]。葡聚糖蔗糖酶来源广泛, 并且能够以蔗糖为底物合成相对分子质量不同的葡聚糖和功能性低聚糖, 利用蔗糖合成多种线性和支链 α 葡聚糖。这些

聚合物在糖苷键的类型、支链的程度和空间排列、分子大小和物理化学性质方面有所不同。相较于动植物来源的右旋糖酐蔗糖酶, 微生物分泌的右旋糖酐蔗糖酶具有低成本、易获取等优点。

右旋糖酐支链的键型主要取决于右旋糖酐蔗糖酶的来源, 右旋糖酐蔗糖酶主要来源于乳酸菌属(*Lactic acid bacteria*, LAB), 包括*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Streptococcus*和*Weissella*^[4,5]。乳酸菌为革兰氏阳性菌, 菌落较小, 有些菌株可形成荚膜, 最佳生长温度为25 °C^[6], 广泛应用在乳制品中。作为公认安全的菌株, 乳酸菌产生的右旋糖

收稿日期: 2024-04-28

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(2308085MC110)

第一作者: E-mail: 1292846896@qq.com

*通信作者: E-mail: jwyang@hfut.edu.cn

酐蔗糖酶相对分子质量为120 000~200 000,是目前生产 α -葡聚糖和低聚糖的主要来源菌株^[7]。葡聚糖及低聚糖作为潜在的益生元,因卓越的生理功能被广泛应用于食品、医疗、化工等领域。然而,天然菌株葡聚糖蔗糖酶产量低、活性较弱,制约了其在多种领域中的广泛应用,因此开发新技术和新方法来提高葡聚糖蔗糖酶的产量和活性是目前研究的热点。肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)作为*Leuconostoc*的主要种属,包含三个亚种:肠膜明串珠菌肠膜亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)、肠膜明串珠菌乳脂亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*)和肠膜明串珠菌右旋葡聚糖亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*)及*Ln. mesenteroides* subsp. *suionicum*。本课题组自2001年开始研究右旋糖酐蔗糖酶,涉及其结构、催化机理、分子改造及催化反应等。本综述整理了相关的文献及本实验室的研究结果,并对当前有关该酶研究的热点和重点以及未来的研究趋势提出了见解。

1 右旋糖酐蔗糖酶概述

右旋糖酐蔗糖酶是一种以蔗糖为底物合成右旋糖酐的聚合酶。该酶及其催化产物在医药、食品、化工等工业领域具有重要的应用价值与广泛的工业用途。因此,对右旋糖酐蔗糖酶的研究逐渐增多。本节主要对右旋糖酐蔗糖酶的研究现状、结构以及催化机理进行概述。

1.1 右旋糖酐蔗糖酶研究现状

2007年,农万廷^[8]克隆表达肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*)右旋糖酐蔗糖酶基因,获得产酶工程菌株。2009年,Ah-Rum等^[9]用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统克隆柠檬明串珠菌HJ-P4右旋糖酐蔗糖酶基因,分离纯化得到高活性的右旋糖酐蔗糖酶。该方法的建立不仅为解析右旋糖酐蔗糖酶的作用机理提供了理论基础,还为提高右旋糖酐的产量和纯度提供了技术支持。2015年,张舟^[10]利用同源重组的方法构建了肠膜明串珠菌右旋糖酐蔗糖酶基因失活菌株。目前,分子生物学和基因工程技术以及比较基因组学等方法被广泛应用于LAB的

研究,为提高LAB右旋糖酐产量及人工合成右旋糖酐提供了有效的理论基础和技术手段^[11]。

右旋糖酐蔗糖酶在高浓度蔗糖条件下产生右旋糖酐,右旋糖酐具有良好的商业价值,在各个领域受到广泛关注。当前获得右旋糖酐的主要方法是酶法合成和菌株直接发酵。虽然国内外对右旋糖酐及右旋糖酐蔗糖酶的微生物来源、结构和催化反应机制有了一定的研究成果,但研究仍主要集中在产糖产酶菌株的分离筛选,右旋糖酐和右旋糖酐蔗糖酶的分离纯化、结构鉴定,以及右旋糖酐的应用等方面^[10,12]。体外酶法合成右旋糖酐可以节约成本、简化生产工艺,不仅可以提高蔗糖利用率及产物生成量,还可以定向改造产物的生成,合成多种益生元,从而逐渐成为研究重点。天然右旋糖酐蔗糖酶产量较低、稳定性差,不能满足工业右旋糖酐生产的需求。基因工程法获得的重组右旋糖酐蔗糖酶虽然可以弥补产量上的不足,但是与天然右旋糖酐相比,重组酶合成的右旋糖酐在结构和功能上存在较大差异。因此,为了提高右旋糖酐的产量,定向合成不同功能特性的右旋糖酐,明确右旋糖酐蔗糖酶催化机理及蔗糖代谢的相关调控基因显得至关重要。

1.2 右旋糖酐蔗糖酶结构

右旋糖酐蔗糖酶能够以蔗糖为底物合成不同相对分子质量的 α -葡聚糖。不同来源的右旋糖酐蔗糖酶的结构具有高度的相似性。同糖苷水解酶13(glycoside hydrolase 13, GH13家族)类似, GH70家族的酶体系构架含有 $(\beta/\alpha)_8$ 管状结构,合成的多糖一般有两个特点:相对分子质量大小基本在106 000以上;糖单元通过不同的共价键连接在一起,如 α -1,6、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,2等。由 α -1,6键连接的多糖称为右旋糖酐,能够合成右旋糖酐的右旋糖苷蔗糖酶主要存在于*Leuconostoc*中,其中*Ln. mesenteroides*葡萄糖蔗糖酶能够催化合成由 α -1,6糖苷键连接的葡萄糖。来自肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的右旋糖酐蔗糖酶由1 527个氨基酸构成,具有该酶的典型结构^[13]。这种酶可以分解成四个不同的结构域(图1),分别为信号肽、可变区、催化区和C端葡聚糖结合区^[14,15]。

其中,N端信号肽区的存在是革兰氏阳性细菌

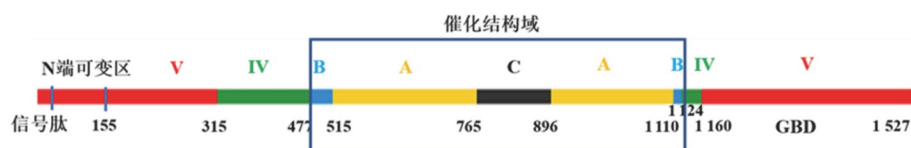


图1 来自肠膜状明串珠菌的右旋糖酐蔗糖酶的预测结构域线性示意图

的一个典型特征。大多数葡聚糖蔗糖酶分子的末端都有一个由32~38个氨基酸组成的信号肽。这个区域是高度保守的, 不同来源的葡聚糖蔗糖酶的释放模式几乎相同。

可变区的长度为123~129个氨基酸。因为这个区域具有较高的变异性, 推测可能含有葡聚糖蔗糖酶特有的序列。紧接在信号肽之后的未受保护区域称为高可变区。来自*L. mesenteroides* 0326的右旋糖酐蔗糖酶高度保守的可变区截短不会导致酶活性发生任何显著变化。该区域在酶促反应中的功能尚未确定^[14]。

催化区域长为800~1 000个氨基酸, 负责蔗糖结合、果糖单元的分离和糖基转移。催化核心由三个结构域组成, 类似于糖苷水解酶家族13 (GH13)酶中的A、B和C结构域。其次, 附加到核心域的是两个额外的域, 称为IV和V(图1)。

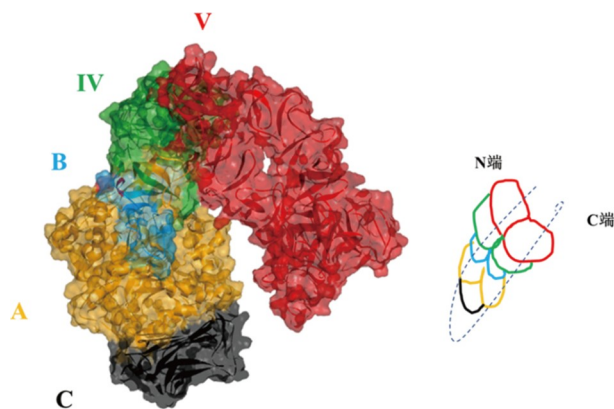
C末端结构域长为400~500个氨基酸(V域), 由一系列同源的直接重复的葡萄糖基结合单元组成, 用于葡聚糖结合和链式生长反应^[16]。

A、B、IV和V结构域由多肽链的两个不连续片段构成, 因此多肽遵循U形路线。从N端到C端, 多肽链依次组成结构域B、A、C、A、B、IV和V(图2)。研究表明, 右旋糖酐合成发生在两个不同的区域。第一个区域负责催化糖基单元

(催化区域)的转移, 另一个区域位于C末端, 负责葡聚糖链延长(葡聚糖结合区域)。因此, 截短葡聚糖结合区域可以在不阻止糖基转移的情况下缩短聚合物的链长^[14,17]。

1.3 右旋糖酐蔗糖酶催化机理

对于葡聚糖蔗糖酶的催化机制, 研究者们一直持有不同的观点。有研究基于右旋糖酐蔗糖酶的催化反应提出了双位点插入机制, 也叫做还原端延伸机制, 在该机制中存在两个活性位点, 一个位点形成葡萄糖基-酶中间体^[6], 另一个位点形成糖链-酶中间体。糖链-酶中间体中的C1位会攻击葡萄糖基的C6位, 形成 α -1,6糖苷键, 从而使糖链得到延伸。但该机制并没有探明如何利用氨基酸残基进行催化反应。随着研究的不断深入, 研究人员对这一机制进行了更新和补充, 重点关注氨基酸残基, 主要是亲和性残基、酸碱催化残基和过渡态稳定残基。右旋糖酐蔗糖酶是以蔗糖为底物, 将其分子中的D-葡萄糖基转移到受体分子上, 合成右旋糖酐或者受体糖苷, 并同时有副产物果糖的生成^[18]。由于GH70家族的酶催化结构域高度保守, 右旋糖酐蔗糖酶的作用机理同GH70家族大部分酶相同(图3)——双置换机制^[19]。右旋糖酐蔗糖酶的结构域A表现为一个 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构。三个催化残基(亲核: 天冬氨酸; 酸/碱: 谷氨酸; 稳定过渡态: 天冬氨酸)位于结构域A和B表面的口袋状空腔处。在这种机制中, 底物结合在子位点-1和+1中; 它的-1位的葡萄糖基环采用扭曲的半椅式构象; 其葡萄糖基2OH和3OH基团与过渡态稳定残基氢键合(D662, 以*L. mesenteroides*来源的dexYG为例)。质子化的酸/碱残基(E589)将其质子提供给糖苷氧; 同时, 底物的异头碳C1原子受到亲核残基(D551)的一个羧基氧的攻击, 导致通过类氧碳离子过渡态形成共价 β -葡萄糖基酶中间体, 该中间体状态为蔗糖(α 1- β 2)配糖键打开^[1]。酸/碱催化残基(E589)使果糖基基团质子化, 从而释放果糖并激活受体分子的活性。第二步, 葡萄糖基转移到非还原端



红色: V域; 绿色: IV域; 蓝色: B域; 黄色: A域; 黑色: C域

图2 右旋糖酐蔗糖酶预测结构域的三维结构示意图

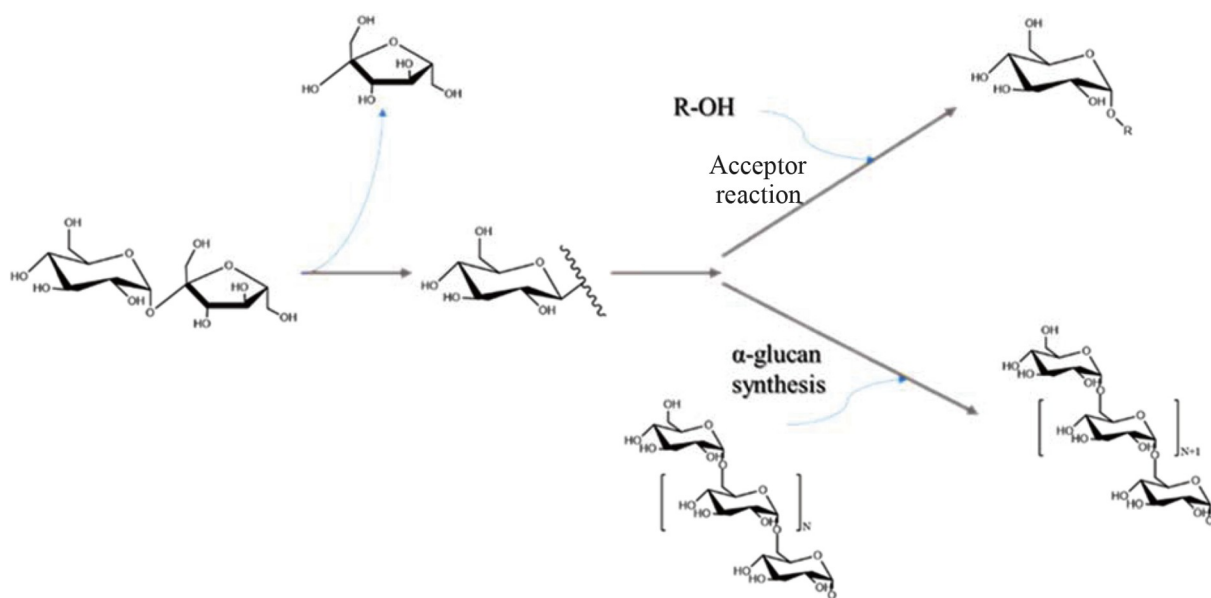


图3 右旋糖酐蔗糖酶催化机制示意图

的 α 异形态保留受体上。GH70家族酶的活性位点在子位点-1外被Q666、N937、D984“封锁”。由于这个特性，右旋糖酐蔗糖酶在每个反应循环中只能转移单个葡萄糖部分^[1]。葡萄糖基转移后的产物可进一步作为受体接受来自活性中心的另一葡萄糖基，合成低聚葡聚糖或葡聚糖多糖^[18]。

2 右旋糖酐蔗糖酶的分子改造

由于右旋糖酐蔗糖酶合成的右旋糖酐是丰富的可再生资源^[14]，右旋糖酐及其衍生物在食品系统与制药工业中被广泛评价和应用(功能食品、功能药物与药用前体等)^[1,20-23]。其不同功能是由于右旋糖酐的相对分子质量不同而决定的。然而，原始未修饰的右旋糖酐蔗糖酶催化产生的右旋糖酐通常相对分子质量大、粘度高。所以右旋糖酐蔗糖酶在应用中还需要解决一些问题，包括产物特异性、酶活性及其稳定性等。目前，对右旋糖酐蔗糖酶的研究主要有(表1)：(1)对右旋糖酐蔗糖酶分子结构模拟分析基础上，进行了一系列的截短突变与插入突变，探索酶分子区域与催化功能的关系，揭示了该酶的转糖基功能，并发现转糖基功能控制区域^[14,24-26]；(2)对活性位点与转糖基区域进行深入研究，并且发现了该酶的苷键控制结构区域^[17,27]，获得了能合成高枝化右旋糖酐的正突变酶^[15]；(3)在获得能合成高分子右旋糖酐的正突变

酶基础上，研究了酶催化产物右旋糖酐分子链增长机制^[28-33]，以提高其应用价值；(4)与天然酶比较，突变后的重组酶表现出较高的催化活力，有的甚至改变了性质，并伴随物质产生^[3,34]；(5)对右旋糖酐蔗糖酶的结构域改造大多通过截短进行，也有研究通过融合特异性结构域使其变得容易纯化与固定化，但很少有研究进行结构域融合来改变其特性；(6)通过与右旋糖酐酶进行共固定化来合成低聚糖，但产物相对分子质量并不均一^[35]。目前对右旋糖酐蔗糖酶的融合改造、稳定性及定向合成产物相对分子质量的研究较少。而该酶的稳定性及产物相对分子质量特异性的研究对其工业应用有巨大意义。

3 右旋糖酐蔗糖酶的应用

右旋糖酐具有安全、无毒、生物相容性好等多种优点，已被广泛应用于医药、工业、食品、色谱分析等多个领域。右旋糖酐蔗糖酶对右旋糖酐的生产至关重要，无论是传统的肠膜状明串珠菌发酵生产，还是正处于研究阶段的右旋糖酐蔗糖酶合成。另外，右旋糖酐酶可以直接加入发酵食品中改善产品结构，因此微生物产右旋糖酐蔗糖酶及相关酶学性质等研究很有必要。本节从肠膜状明串珠菌入手，对右旋糖酐蔗糖酶参与右旋糖酐的合成、右旋糖酐蔗糖酶糖基化修饰非糖底物

表 1 右旋糖酐蔗糖酶的分子改造

来源	改造方法	结果及意义
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 0326	对C端 V 域进行一系列截短、对与底物、受体有相互作用的氨基酸位点进行突变	截短 V 域消除了右旋糖酐蔗糖酶合成高相对分子质量右旋糖酐的能力; 发现了转糖基功能区域并提高了转糖基能力(转糖基活性提高了26%); 合成小分子糖(2017年)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 0326	对在A552和V553、D662和S663之间同时插入突变	通过结构分析, 在A552-V553位点和D662-S663位点之间插入氨基酸, 获得产生高枝化右旋糖酐的正突变酶, 插入的突变中 α (1-4)糖苷键的比例增加了50%, 但酶活下降了50%(2018年)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 0326	对脯氨酸和赖氨酸的进行单点、双点以及三点突变	通过对酶序列的一致性分析、分子模拟结合实验筛选获得了活性提高2.86倍和35℃热稳定性提高7.4倍的双突变(2018年)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 0326	突变N555位点	通过对酶序列的一致性分析、分子模拟结合实验筛选得到N555位点的突变, 获得了适合二糖苷转移的突变体(转化率为原始酶的3.3~3.46倍)(2021年)
<i>Lactobacillus reuteri</i> 180	对W1065进行随机突变	证明了残基W1065对转糖基能力的重要性(改变键型特异性), W1065F产物中的 α -(1,6)键下降到49%, α -(1,3)键比例从33%增加到45%(2016年)
<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1229	对N端与C端的 V 域进行系列截短	确定了决定糖链延伸的糖链结合口袋, 揭示了聚合过程中结构域 V 和催化位点之间的相互作用(2017年)
<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1229	突变Trp624位点	通过Trp624的突变证明了此位点对产物链延长的重要性, 由于突变造成的活性位点与进入的受体无效相遇, 导致了产物相对分子质量变小(产物减小到2.4 kDa)(2019年)
<i>Streptococcus mutans</i>	对N端与C端的 V 域进行截短	通过对截短酶与MD模拟结合揭示了 V 域的功能(2019年)
Lactic acid bacteria	截短糖链结合域的重复序列与结构域融合	截短糖链结合域并融合一个碳水化合物结合模块(CBM2a)来进行纯化与固定化(活性保持不变)(2021年)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F	与右旋糖酐酶共固定化于环氧-琼脂糖载体	通过双酶共固定化合成低聚糖(DP<5), 并且酶活性在60天内保留70%以上(2019年)

进行探索研究。

3.1 参与右旋糖酐的合成

近年来, 酶法制备右旋糖酐主要是分别采用产右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶的菌株发酵, 制备的右旋糖酐用于生物医药、新药研发等新兴领域^[36]。传统的发酵工艺不便于新产品的分离纯化, 导致产品的产率低下, 产业化生产右旋糖酐陷入困境^[37]。野生型右旋糖酐蔗糖酶催化的直接产物右旋糖酐通常具有较高的相对分子质量和粘度, 不适合作为治疗剂进入人体^[38]。为了获得食品级与临床级右旋糖酐, 通常采用高相对分子质量右旋糖酐酸解或发酵的方法^[13,39]。这些方法得到的右旋糖酐相对分子质量分布广泛且不均匀, 需要通过乙醇分级醇沉或者分子筛才能得到纯产物^[24,31,40]。总的来说, 这些方法对环境不友好, 昂贵且耗时。因此, 右旋糖酐蔗糖酶可以根据生产需要进行修饰。例如, 截短*L. mesenteroides* 0326来源的右旋糖酐蔗糖酶得到相对分子质量约为5 000 Da的产物, 但其产物相对分子质量分布较广, 并且会产生较多双糖^[14]。目前很多低聚糖的催化合

成是基于右旋糖酐蔗糖酶的转糖基功能, 以蔗糖为供体, 异麦芽糖或麦芽糖为糖受体进行合成^[41]。还有研究根据右旋糖酐蔗糖酶催化位点周围的残基特征以及与产物的结合方式改变产物, 通过定点诱变精细调控酶活性中心, 将产物转移到低相对分子质量(24 000 Da)^[31]。此外, 通过右旋糖酐酶对高相对分子质量右旋糖酐糖链上的 α -(1,6)键进行随机水解, 也可以生成低相对分子质量多糖。基于右旋糖酐蔗糖酶与右旋糖酐酶存在顺序级联催化的关系(聚合与水解), 有报道研究了右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶协同催化低相对分子质量右旋糖酐的生成^[42]。Gan等^[43]虽然通过右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶协同催化得到了均一相对分子质量的主要产物(如5 241 Da), 但仍有中等相对分子质量的副产物(19 374 Da、8 295 Da)。Sharma等^[44]通过右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶共固定化催化得到低聚异麦芽糖(DP3-7), 但聚合程度不均匀。

对于以上情况, 研究人员开发了利用右旋糖酐酶和旋糖酐蔗糖酶联合使用制备所需相对分子质

量的药用右旋糖酐的方法^[45]。使用将右旋糖酐酶和右旋糖酐蔗糖酶融合的新方法,从而使用一步酶法制得右旋糖酐^[46](图4)。由于酶对底物的特异性水解,能得到相对分子质量分布集中的高品质右旋糖酐,产品达到较高产率。此外,酶法催化条件的进行很大程度降低了实验操作成本,实验更加容易操作和进行,有助于实现低相对分子质量、中相对分子质量右旋糖酐的生产工艺发展和进一步研究扩大^[47]。例如,右旋糖酐相对分子质量在1 000 Da及以下即为低聚异麦芽糖。获得相对分子质量集中的并且生理活性较好的低微相对分子质量右旋糖酐难度很大。当前的工业生产中,以淀粉为原料获取低聚异麦芽糖,经过4~5步酶法才可获得低聚异麦芽糖并且产率较低(约49%)^[29,32]。本课题组根据酶级联原理,将右旋糖酐蔗糖酶和右旋糖酐酶融合为一种新型的酶^[48]。此酶的分子内通道效应应有两种作用:聚合和水解。以蔗糖为底物,一步酶法合成低微相对分子质量右旋糖酐^[49]。此方法更简洁、环保、能耗更低,更有利于生产。

3.2 糖基化修饰非糖底物

在右旋糖酐蔗糖酶转糖基功能的研究中,黄酮类化合物因在自然界中存在广泛,成为常用的糖基受体底物^[50,51]。茶素没食子酸酯对预防与衰老相关的疾病(如神经退行性疾病、肥胖性疾病以及癌

性)具有显著作用^[52-54],但由于水溶性极差,限制了其在药物、食品及化妆品中的应用。Kim等^[55]利用来自*Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4的右旋糖酐蔗糖酶合成了九种茶素没食子酸酯糖苷,与原料相比,糖苷产物水溶性至少提高49倍,自由基清除活性及络氨酸酶抑制活性均保留在50%以上,抗褐变能力大幅增强,但是每种糖苷产物产率只有2.2%~22.6%。Nam等^[56]也研究了来自*L. mesenteroides*的右旋糖酐蔗糖酶对没食子酸的糖基化作用,其糖苷产物抗脂质过氧化作用增强了31%,对络氨酸酶显示出更强的抑制作用;同时,与没食子酸或熊果苷相比,具有更强的抗衰老活性,但是转化率仅为35.7%。除了黄酮类化合物之外,Nam等^[57]以来自*L. mesenteroides*的右旋糖酐蔗糖酶以蔗糖为底物合成绿原酸葡萄糖苷,与绿原酸相比,合成的绿原酸糖苷的水溶性增加了65%,抗褐变性增加了2倍,但是转化率仅为44%。Li等^[41]和Nam等^[58]利用来自*L. mesenteroides*的右旋糖酐蔗糖酶分别合成了咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的糖苷产物,与受体底物相比,糖基化产物咖啡酸-3-O- α -D-吡喃葡萄糖苷的水溶性提高3倍,抗脂质过氧化作用提高了1.66倍,对结肠癌细胞生长的抑制作用增强15%,耐褐变性增强11.5倍,转化率可达到47%,咖啡酸苯乙酯两种糖基化产物的水溶性分别提高了35倍和90倍。

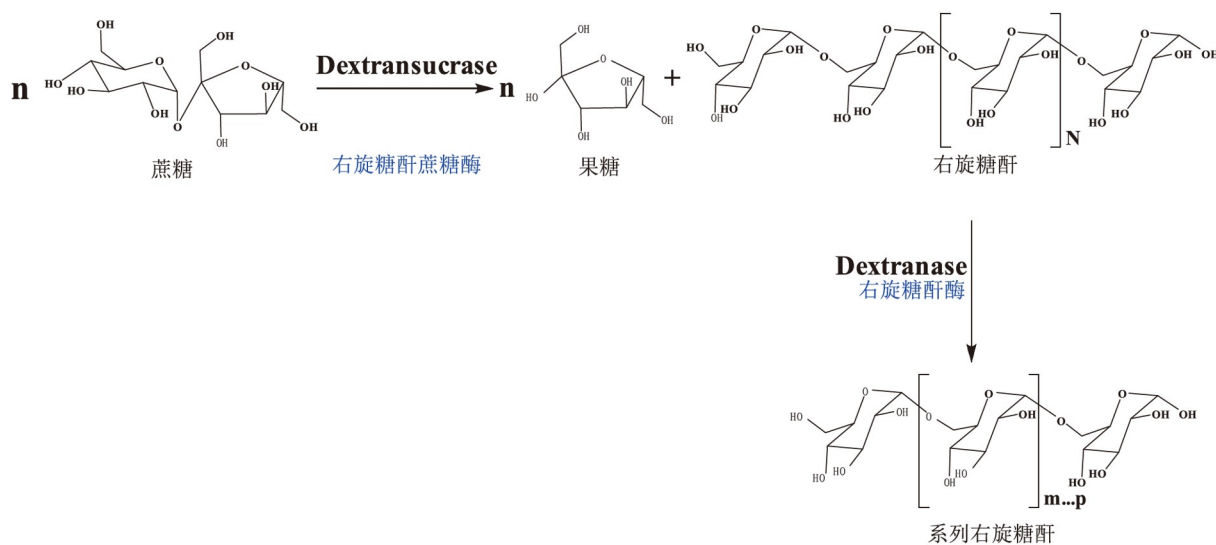


图4 右旋糖酐蔗糖酶合成右旋糖酐示意图

4 展望

由于不同相对分子质量右旋糖酐的重要价值, 右旋糖酐蔗糖酶已经得到不断的开发与应用。近年来, 国内外对右旋糖酐蔗糖酶的研究主要集中在酶的催化合成及酶基因改造方面, 通过右旋糖酐蔗糖酶催化反应, 可以生产具有良好生物活性及高利用价值的糖类化合物。右旋糖酐蔗糖酶的分子改造不仅可以提高蔗糖利用率及产物产量, 还可以对产物进行定向改造。为了使右旋糖酐蔗糖酶更好地应用于基因工程及发酵工程领域, 还要从以下方面对右旋糖酐蔗糖酶进行深入研究: (1)对右旋糖酐蔗糖酶的结构以及其催化作用域精确分析, 为实现工业化生产提供依据; (2)探究右旋糖酐蔗糖酶产糖类化合物与肠道益生功能之间的关系, 从不同糖苷键类型的角度来研究其对肠道益生功能的影响; (3)将右旋糖酐蔗糖酶通过分子生物技术和化学修饰等手段进行改造, 不断构建外源高效表达体系, 从而使其高效表达, 加深对右旋糖酐蔗糖酶基因功能的认识, 从而方便人们更好地开发右旋糖酐蔗糖酶的商业价值。

参考文献

- [1] Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, et al. Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol*, 2013, 163(2): 250-272
- [2] Ben Imeddourene A, Esque J, André I, et al. Combining multi-scale modelling methods to decipher molecular motions of a branching sucrose from glycoside-hydrolase family 70. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201323
- [3] Zhang Y, Yang J, Yu X, et al. Engineering *Leuconostoc mesenteroides* dextranase by inserting disulfide bridges for enhanced thermotolerance. *Enzyme Microb Tech*, 2020, 139: 109603
- [4] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (Database): D233-D238
- [5] André I, Potocki-Véronese G, Morel S, et al. Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis. *Top Curr Chem*, 2010: 25-48
- [6] Rather SA, Majeed A, Singh L, et al. Effect of dextranase antibodies on biofilm formation and certain cariogenic activities in *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol*, 2023. doi: 10.1099/jmm.0.001696
- [7] Moon H, Kim M. Enzymatic synthesis of Artemisia capillaris-derived prebiotic oligosaccharide using *Leuconostoc mesenteroides* MKSR dextranase and its potential health functional effects. *Food Biosci*, 2024, 59: 103873
- [8] 农万廷. 肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)葡聚糖蔗糖酶基因的克隆与表达[D]. 南宁: 广西大学, 2007
- [9] Ah-Rum Y, So-Ra L, Myoung-Uoon J, et al. Cloning of dextranase gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and its high-level expression in *E. coli* by low temperature induction. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(8): 829-835
- [10] 张舟. 明串珠菌乙酸激酶和葡聚糖蔗糖酶基因失活的研究[D]. 天津: 河北工业大学, 2015
- [11] 秦晓萌, 张远森, 柳陈坚, 等. 乳酸菌胞外多糖生理功能及合成途径的研究进展. *食品工业科技*, 2015, 36(14): 389-393, 399
- [12] Zhao D, Jiang J, Du R, et al. Purification and characterization of an exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* L2. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139: 1224-1231
- [13] Zhang H, Hu Y, Zhu C, et al. Cloning, sequencing and expression of a dextranase gene (dexYG) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30 (8): 1441-1446
- [14] Wang C, Zhang H, Li M, et al. Functional analysis of truncated and site-directed mutagenesis dextranases to produce different type dextrans. *Enzyme Microb Tech*, 2017, 102: 26-34
- [15] Chen Z, Ni D, Zhang W, et al. Lactic acid bacteria-derived α -glucans: from enzymatic synthesis to miscellaneous applications. *Biotechnol Adv*, 2021, 47: 107708
- [16] Parlak M, Ustek D, Tanriseven A. Designing of a novel dextranase efficient in acceptor reactions. *Carbohydrate Res*, 2014, 386: 41-47
- [17] Li QP, Wang C, Zhang HB, et al. Designing of a novel dextranase efficient in synthesizing oligosaccharides. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 696-703
- [18] 李梦绮. 右旋糖酐蔗糖酶的分子改造及其热稳定性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019
- [19] Uitdehaag JCM, Mosi R, Kalk KH, et al. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(5): 432-436
- [20] Esawy MA, Gamal AA, Helal MMI, et al. Enzymatic synthesis using immobilized enterococcus faecalis esawy dextranase and some applied studies. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 56-62
- [21] Leathers TD, Bischoff KM. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnol*

- Lett, 2011, 33(3): 517-523
- [22] Baruah R, Maina NH, Katina K, et al. Functional food applications of dextran from *Weissella cibaria* RBA12 from pummelo (*Citrus maxima*). *Int J Food Microbiol*, 2017, 242: 124-131
- [23] Zhang Y, Li D, Yang N, et al. Comparison of dextran molecular weight on wheat bread quality and their performance in dough rheology and starch retrogradation. *LWT*, 2018, 98: 39-45
- [24] Meng X, Pijning T, Tietema M, et al. Characterization of the glucansucrase GTF180 W1065 mutant enzymes producing polysaccharides and oligosaccharides with altered linkage composition. *Food Chem*, 2017, 217: 81-90
- [25] Wang C, Chen S, Zhang H, et al. Characterization of the inserted mutagenesis dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* 0326 to produce hyperbranched dextran. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 584-590
- [26] Yu X, Yang J, Ding X, et al. Analysis of the effect of N555 mutations on the product specificity of dextranase using caffeic acid phenethyl ester as an acceptor substrate. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(20): 5774-5782
- [27] Münkler F, Fischer A, Wefers D. Structural characterization of mixed-linkage α -glucans produced by mutants of *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 dextranase. *Carbohydrate Polym*, 2020, 231: 115697
- [28] Li R, Zhang H, Hu X, et al. An efficiently sustainable dextran-based flocculant: synthesis, characterization and flocculation. *Chemosphere*, 2016, 159: 342-350
- [29] Claverie M, Cioci G, Vuillemin M, et al. Investigations on the Determinants Responsible for Low Molar Mass Dextran Formation by DSR-M Dextranase. *ACS Catal*, 2017, 7(10): 7106-7119
- [30] Li R, Zeng T, Wu M, et al. Effects of esterification on the structural, physicochemical, and flocculation properties of dextran. *Carbohydrate Polym*, 2017, 174: 1129-1137
- [31] Claverie M, Cioci G, Guionnet M, et al. Futile encounter engineering of the DSR-M dextranase modifies the resulting polymer length. *Biochemistry*, 2019, 58(25): 2853-2859
- [32] Osorio MI, Zúñiga MA, Mendoza F, et al. Modulation of glucan-enzyme interactions by domain V in GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *Proteins*, 2019, 87(1): 74-80
- [33] Zeng T, Hu X, Wu H, et al. Microwave assisted synthesis and characterization of a novel bio-based flocculant from dextran and chitosan. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 760-768
- [34] Li M, Zhang H, Li Y, et al. The thermotolerant effects of site-directed mutagenesis of proline and lysine on dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* 0326. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 1641-1649
- [35] Erhardt FA, Kügler J, Chakravarthula RR, et al. Co-immobilization of dextranase and dextranase for the facilitated synthesis of isomaltoligosaccharides: preparation, characterization and modeling. *Biotech Bioeng*, 2008, 100(4): 673-683
- [36] 宋丹丹. 右旋糖酐酶与右旋糖酐蔗糖酶的共固定化和右旋糖酐发酵生产中酶解新工艺的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013
- [37] 李梦琦, 张洪斌. 右旋糖酐蔗糖酶的分子改造及其枝化度与热稳定性研究[C]//中国微生物学会酶工程专业委员会, 湖北大学, 武汉新华扬生物股份有限公司, 安琪酵母股份有限公司. 第十一届中国酶工程学术研讨会论文摘要集, 2017
- [38] Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, et al. *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Tech & Biotech*, 2010, 80(8): 845-860
- [39] Miao M, Bai A, Jiang B, et al. Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from *Leuconostoc citreum* SK24.002. *Food Hydrocolloids*, 2014, 36: 265-272
- [40] Li X, Wang X, Meng X, et al. Structures, physicochemical properties, production and (potential) applications of sucrose-derived α -D-glucans synthesized by glucanases. *Carbohydrate Polym*, 2020, 249: 116818
- [41] Li Y, Liu L, Yu X, et al. Transglycosylation improved caffeic acid phenethyl ester anti-inflammatory activity and water solubility by *Leuconostoc mesenteroides* dextranase. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(16): 4505-4512
- [42] 张宇琪, 张洪斌, 甘微苇, 等. 右旋糖酐酶研究进展. *生物工程学报*, 2015, 31(5): 634-647
- [43] Gan W, Zhang H, Zhang Y, et al. Biosynthesis of oligodextrans with different Mw by synergistic catalysis of dextranase and dextranase. *Carbohydrate Polym*, 2014, 112: 387-395
- [44] Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, et al. Alginate-pectin co-encapsulation of dextranase and dextranase for oligosaccharide production from sucrose feedstocks. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2019, 42(10): 1681-1693
- [45] 吴昊. 低分子右旋糖酐的酶法制备、氧化修饰及其与铁离子的络合研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021
- [46] 甘微苇. 右旋糖酐蔗糖酶与右旋糖酐酶协同催化制备低聚右旋糖酐与低聚糖的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015
- [47] 吴定涛. 高产右旋糖酐酶菌株的筛选及酶学性质和酶的应用研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013
- [48] 张九花, 常国伟, 马步, 等. 右旋糖酐制备及其应用研究进展. *甘蔗糖业*, 2018(2): 52-58
- [49] 王雅洁. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶表达条件优化及其催化合成右旋糖酐的研究[D]. 合肥: 合肥工业大

学, 2009

- [50] Bertrand A, Morel S, Lefoulon F, et al. *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. *Carbohydrate Res*, 2006, 341(7): 855-863
- [51] Trautner S, Lackner J, Spendelhofer W, et al. Quantification of the vulcanizing system of rubber in industrial tire rubber production by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Anal Chem*, 2019, 91(8): 5200-5206
- [52] Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2500-2505
- [53] Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(2): 176-187
- [54] Cai EP, Lin JK. *Epigallocatechin Gallate* (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic β cells. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(20): 9817-9827
- [55] Kim J, Nguyen TTH, Kim NM, et al. Functional properties of novel epigallocatechin gallate glucosides synthesized by using dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(48): 9203-9213
- [56] Nam SH, Park J, Jun W, et al. Transglycosylation of gallic acid by using *Leuconostoc glucansucrase* and its characterization as a functional cosmetic agent. *AMB Expr*, 2017, 7(1): 224
- [57] Nam SH, Ko JA, Jun W, et al. Enzymatic synthesis of chlorogenic acid glucoside using dextransucrase and its physical and functional properties. *Enzyme Microb Tech*, 2017, 107: 15-21
- [58] Nam SH, Kim YM, Walsh MK, et al. Synthesis and functional characterization of caffeic acid glucoside using *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(13): 2743-2750