

文章编号 1672-6634(2024)02-0080-09

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023120006

环糊精糖基转移酶 JSL-1 的鉴定及功能研究

李茹, 丁欣杰, 商金海, 秦林雪, 魏 铠, 王 月, 李 攀

(聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059)

摘 要 环糊精糖基转移酶(Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)可以通过环化反应催化淀粉及其衍生物生成环糊精(Cyclodextrin, CDs)。研究通过基因工程技术手段,成功获得东洋芽孢杆菌 *Bacillus toyonensis* P18 中环糊精糖基转移酶 JSL-1 蛋白,探讨其产物特异性及酶学性质。同时,将 JSL-1 基因超表达至日本晴水稻中,研究环糊精糖基转移酶 JSL-1 对水稻淀粉质量的影响。结果表明,JSL-1 主要催化淀粉生成 α -CD,其最适反应 pH 和最适反应温度分别是 8.0 和 50 °C。随着 JSL-1 表达水平的增加,水稻中直链淀粉含量及老化程度下降,透光率及冻融稳定性增加,有利于提高水稻的食味品质以及外观品质等特性。总之,对环糊精糖基转移酶 JSL-1 的研究有利于环糊精生产工艺的改良以及水稻品质的提升。

关键词 环糊精糖基转移酶;产物特异性;酶学性质;转基因水稻;淀粉特性

中图分类号 Q943.2

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Identification and Functional Study of Cyclodextrin Glycosyltransferase JSL-1

LI Ru, DING Xinjie, SHANG Jinhai, QIN Linxue,
WEI Kai, WANG Yue, LI Pan

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) can catalyze starch and its derivatives to produce cyclodextrin (CDs) through cyclization reaction. In this study, the cyclodextrin glycosyltransferase JSL-1 protein in *Bacillus toyonensis* P18 was successfully obtained by means of genetic engineering technology to explore its product specificity and enzymatic properties. Meanwhile, the JSL-1 gene was overexpressed into *Nipponbare rice* to study the effect of cyclodextrin glycosyltransferase JSL-1 on rice starch quality. The results showed that JSL-1 mainly catalyzed starch to produce α -CD, and its optimum reaction pH and temperature were 8.0 and 50°C, respectively. With the increase of JSL-1 expression level, the amylose content and aging degree in rice decreased, and the light transmittance and freeze-thaw stability increased, which was beneficial to improve the eating quality and appearance quality of rice. In conclusion, the study of cyclodextrin glycosyltransferase JSL-1 is beneficial to the improvement of cyclodextrin production technology and the improvement of rice quality.

收稿日期:2023-12-06

基金项目:国家自然科学基金项目(32001982);山东省自然科学基金资助项目(ZR2021MC062)资助

通信作者:李攀,女,汉族,博士,研究方向:微生物与生化药学,E-mail:lipan@luc.edu.cn.

Key words cyclodextrin glycosyltransferase; product specificity; enzymatic properties; transgenic rice; starch characteristics

环糊精糖基转移酶(Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)是 α -淀粉酶家族的成员之一,属于水解酶类。CGTase具有多种功能,可以催化水解反应、环化反应、歧化反应以及偶合反应^[1]。然而CGTase通常显示出较小的水解活性,主要催化环化、偶联和歧化这三种反式糖基化反应^[2]。环化反应在工业上常用于环糊精的生产,是CGTase的特征性反应,通过催化淀粉类底物,将直链糖的还原性末端与非还原性末端通过 α -1,4-糖苷键首尾相连形成环状的环糊精分子(Cyclodextrin, CD)^[3]。大多数CGTase由各种微生物在细胞内产生,主要来源为芽孢杆菌^[4]。

常见的环糊精分子有 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)以及 γ -环糊精(γ -CD),分别具有6、7、8个葡萄糖基^[5]。环糊精具有亲水性表面以及独特的疏水性空腔,能够溶于水,且承载疏水性的客体分子,进而改变客体分子的溶解性、稳定性等物理化学性质。因此,在化妆品、制药、食品、化学工业等领域都具有广泛的应用^[6,7]。 α -CD具有相对较小的内腔和对酶水解的高抗性,在食品工业中有着广泛的应用^[8]。由于 α -CD产量低、价格高,其市场占有率远低于其他CD^[9]。目前,通过新酶筛选以及蛋白质工程,提高CGTase的生产性能,有望降低 α -CD的生产成本,从而获得更实惠的 α -CD^[10]。

水稻是人类最主要的粮食作物之一,在解决全球粮食短缺问题中起着十分重要的作用^[11]。随着生活质量不断提升,人们在饮食上的要求也逐渐提高,优质大米越来越受到消费者的认可和欢迎。目前我国大力推进优质水稻品种的培育和种植,旨在培育更优质、更受市场欢迎的水稻^[12]。淀粉是水稻的主要组成部分,包括直链淀粉和支链淀粉,约占水稻干重的70%~80%,其中直链淀粉是影响水稻营养价值和品质的重要因素。一般来说,水稻中直链淀粉含量越低,水稻的外观品质以及食味品质越好^[13,14]。直链淀粉含量在5%~15%的水稻属于低直链淀粉水稻,食品风味最佳,广受消费者喜爱;直链淀粉含量在15%~20%之间的水稻食味品质较好,也是市面上最常见的水稻种类;而直链淀粉含量大于20%的水稻食味品质较差^[15]。因此,进一步深入研究水稻直链淀粉的影响因素及其作用机制,有利于水稻品质的改善,同时对优质稻米品种培育以及水稻经济价值的提高都具有重要的意义。

本研究通过克隆*B. toyonensis* P18中环糊精糖基转移酶基因JSL-1,构建原核表达载体及植物过表达载体,获得纯化酶蛋白及JSL-1转基因水稻株系,对其酶活力、产物特异性、酶学性质以及JSL-1与水稻淀粉品质的关系进行了研究,为JSL-1的工业化生产以及稻米品质的改良提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

根癌农杆菌EHA105菌株、野生型日本晴水稻由本实验室保存;重组质粒pGEX4T/cgt由本实验室构建。大肠杆菌感受态细胞DH5 α 、BL21(DE3)均购自赛默飞世尔科技公司;原核表达载体pGEX4T购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;植物双元表达载体pCAMBIA3300购自长沙艾碧维生物科技有限公司;限制性内切酶BamH I、Xho I、Sac I、Sal I购自上海赛默飞世尔科技公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp⁺)、卡那霉素(Kan⁺)购自北京索莱宝科技有限公司;His 标签蛋白纯化试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Agilent Zorbax NH₂液相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)购自苏州创谱科学仪器有限公司;大米直链淀粉标准品购自中国水稻研究所;色谱级乙腈分析试剂购自广州市浩盈化工科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯购自国药集团化学试剂有限公司;引物合成和DNA测序服务由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.2 仪器与设备

Arhat 96 梯度PCR仪购自上海创未生物技术有限公司;LDZM-60KCS立式压力蒸汽灭菌锅购自上海申安医疗器械厂;XM-1000T一体式超声波细胞破碎仪购自小美超声仪器(昆山)有限公司;DC-0506低温恒

温槽购自江苏天翎仪器有限公司;K2025 高效液相色谱系统购自海能未来技术集团股份有限公司;Bio-TekELX800 酶标仪购自山东博科再生医学有限公司;JJ-2 高速组织捣碎匀浆机购自上海达洛科学仪器有限公司;5810R 高性能通用台式离心机购自赛默飞世尔科技(上海)有限公司;T700AS 紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司;CL-60T 超声波清洗机购自济南通海机械设备有限公司;PHS-3C pH 计购自上海精密科学仪器有限公司;BJPX-SGT10 恒温摇床购自济南泰医生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 pGEX4T-JSL-1 原核表达载体构建及重组菌鉴定。JSL-1 基因序列可从 NCBI 数据库中查阅,登录号为 CP064876.1,由南京金斯瑞生物科技有限公司完成基因合成。根据 JSL-1 全长 cDNA 序列设计引物,正向引物序列 5'-tccgcgtggatccccgaattcATGAAAGAAAAAGATAGGCTTAAATTTAG-3'(含有 *EcoR* I 酶切位点);反向引物序列 5'-gatgcggccgctcgagtcgacTTAAGTCTCAACCAGGATAGTTTTTTT-3'(含有 *Sal* I 酶切位点)。以 pGEX4T 为蛋白表达载体,酶切后载体片段与 JSL-1 全长序列进行连接,得到重组质粒 pGEX4T-JSL-1,通过热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,涂布至含 Amp⁺ 的抗性 LB 培养基,于 37℃ 恒温培养箱放置过夜,挑选阳性克隆并提取质粒进行酶切验证,随后送至北科基因检测(山东)有限公司测序,测序正确的质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞,37℃ 放置过夜,挑取单菌落再次验证后进行保菌^[16]。

1.3.2 蛋白表达与纯化。将含有重组质粒的大肠杆菌 BL21 按 1% 的接种量接种于 5 mL 含 50 μ g/mL Amp⁺ 抗性的 LB 培养基中,37℃,200 r/min 震荡,过夜培养。随后以 2% 的接种量接种到 50 mL 含 100 μ g/mL Amp⁺ 的 LB 培养基中,37℃,200 r/min 震荡培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.8 左右。加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行诱导,20℃,200 r/min 继续培养 24 h 后,低温高速离心机预冷至 4℃,取诱导结束的菌液 9 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。用 10 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体,随后置于冰浴上超声,使细胞破碎,12 000 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片,转移上清即粗酶液于新的预冷的离心管。然后按照 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书进行操作,粗酶液过镍柱纯化得到纯化酶液^[17]。

1.3.3 酶环化活力测定。参考李晓涵^[18]的方法测定 JSL-1 的酶活力。pH8.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液体系中依次加入纯化的酶液 10 μ L、0.2 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 0.2 mL、0.2% 可溶性淀粉溶液 0.2 mL,充分混匀后于 40℃ 水浴锅内水浴加热 10 min,然后加入 0.5 mol/L 醋酸溶液 0.5 mL 终止反应,最后加入 0.05 g/L 碘液 4 mL 进行显色。空白组将淀粉溶液替换为等量缓冲液,对照组将酶液替换为等量缓冲液。700 nm 波长处测定各组吸光度,以吸光度下降 10% 所需要的酶量作为一个酶活力单位,酶活力计算公式如酶活力(U/mL)=[(a-b)/(0.1×a)]×100,其中 a 为对照组减去空白组的吸光度差值;b 为实验组减去空白组的吸光度差值。

1.3.4 产物特异性分析。取 1 mL 纯化酶液与 1 mL 1.0% 可溶性淀粉溶液混合,40℃ 水浴加热进行催化反应,每隔 10 min 取出 200 μ L 的反应液,煮沸 10 min,从而使酶失活。使用 0.22 μ m 的滤膜进行过滤,最终样品中 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精的含量通过高效液相色谱进行分析。液相检测器为示差折光检测器,使用 Agilent Zorbax NH₂ 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);70% 的乙腈溶液作为洗脱液,洗脱速度设置为 1.0 mL/min,进样量 20 μ L,柱温设置为 30℃^[2]。

1.3.5 最适 pH、最适温度测定。最适 pH 测定:为了测定 JSL-1 的最适 pH,配制摩尔浓度为 0.05 mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,利用酸度计调节缓冲液至不同 pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0),在不同 pH 的反应体系中分别进行酶促反应,测定 JSL-1 的酶活力,将最高酶活力定为 100%,分别计算各体系中 JSL-1 的相对酶活力,从而确定最适反应 pH 值^[19]。

最适温度测定:在最适 pH 条件下,分别将不同反应体系置于 20、30、40、50、60、70℃ 进行酶促反应,测定 JSL-1 的酶活力,将酶活性最高者定义为 100%,计算相对酶活力,从而确定该酶的最适温度^[20]。

1.3.6 转基因水稻的获取。稻米中淀粉含量是影响稻米品质的重要因素,为了进一步探讨 JSL-1 与稻米淀粉的

关系,参考温莉娟^[21]的博士毕业论文进行转基因水稻的获取。首先,构建正义表达载体,以获取的 JSL-1 基因为模板进行基因扩增。正向引物为 5'-caggtcgactctagaggatccATGAAAGAAAAAGATAGGCTTAAATTTAG -3'(含有 *Bam*H I 酶切位点),反向引物为 5'-cgatcggggaaattcgagctcTTAAGTCTCAACCAGGATAGTTTTTT -3'(含有 *Sac* I 酶切位点)。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 对目的基因及植物双元载体 pCAMIBA3300 进行双酶切。将载体和目的片段相连接并鉴定出正确的阳性克隆质粒,然后采用电转化法将质粒转化到根癌农杆菌 EHA105 菌株中,然后侵染野生型日本晴水稻胚性愈伤组织,选择相对表达量较高的愈伤组织进行下一步实验^[22,23]。经三代培养获得纯合转基因水稻。

1.3.7 稻米淀粉提取。称取 10 g 稻米,干燥后置于 0.14% 亚硫酸氢钠水溶液中,固液比为 1:5,浸泡过夜。研磨稻米至糊状,于 200 目尼龙网过滤后收集到 15 mL 离心管,冲洗尼龙网两次,将冲洗的溶液也加入离心管,3 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液。超纯水吹打沉淀,使得沉淀悬浮,3 000 r/min 再次离心 20 min,弃上清。重复上一步骤三次,将沉淀置于烘箱中快速烘干,粉碎机粉碎后过 100 目筛,即得水稻淀粉^[24,25]。

1.3.8 直链淀粉含量测定。绘制标准曲线:四个标准直链淀粉含量分别为 1.5%、10.4%、17.5%、26.5%。准确称取四种直链淀粉标准品各 100 mg,各标准品中依次加 95% 的无水乙醇 1 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 9 mL,煮沸 20 min 至样品完全溶解,冷却后定容至 100 mL。分别吸取 5 mL 改性淀粉样品溶液,依次加入 1 mol/L 冰醋酸 1 mL 和 0.2% 的稀碘液 2 mL,定容至 100 mL,静置 20 min 后,在 620 nm 处测吸光度。以四个直链淀粉浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

含量测定:准确称取各株系水稻淀粉样品各 100 mg,操作步骤同上。根据各样品测得的吸光度和直链淀粉标准曲线,计算直链淀粉含量^[26,27]。

1.3.9 淀粉透光率、冻融稳定性及淀粉糊老化程度测定。淀粉透光率测定:首先配制 1% 的水稻淀粉溶液:准确称取 0.2 g 水稻淀粉,加入 20 mL 蒸馏水并混匀,恒温水浴锅 95 °C 振荡 20 min 用于淀粉糊化,取出后静置冷却 30 min,620 nm 处测吸光度,4 °C 放置 24 h,620 nm 处再次测定吸光度^[28]。

淀粉冻融稳定性测定:取淀粉透光率测定时处理的淀粉糊,分装至做好标记的离心管中,称量离心管和淀粉糊的质量,放入冰箱中,-20 °C 冷冻 24 h 后取出,室温下解冻后进行离心,设置为 3 000 r/min,离心 20 min 后去水并称量沉淀的质量,然后计算析水率^[29]。析水率按公式进行计算:析水率=(糊重-沉淀)/糊重×100%。

淀粉糊老化程度测定:取处理后的淀粉糊进行分装,并做好标记,放入 4 °C 冰箱中,每隔一定时间取出,记录上清液的体积,直至上清液体积不再发生变化,根据上清液的体积变化率反应水稻淀粉老化程度^[30]。

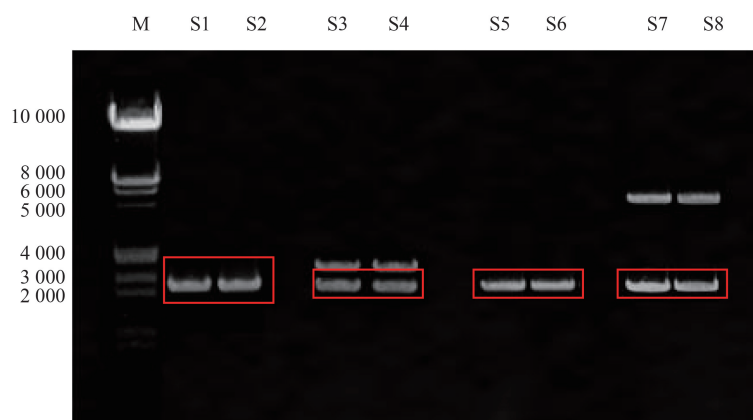
1.4 数据分析

所有实验均进行三次独立的生物学重复,数据统计及图表绘制均利用 Microsoft Office Excel 2010 完成。差异显著 * $P < 0.05$,差异极显著 ** $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 重组 JSL-1-pGEX4T 表达载体构建

结果如图 1 所示,泳道 S1 与 S2 在 2085 bp 处有显示条带,将其进行胶回收后,连接到中间载体 PBSK 中,送测序,发现 100% 测序正确,表明 JSL-1 基因被成功克隆。为了将其连接到原核表达载体 pGEX4T 中,我们将 JSL-1-PBSK 进行双酶切后,泳道 S3 与 S4 在 2 958 bp 与 2 085 bp 各有一条带,其中 2 958 bp 为 PBSK 载体条带,2 085 bp 为基因 JSL-1 片段。将泳道 S3、S4 中 2 085 bp 胶回收,经过基因重组后,连接到 pGEX4T 中,菌液 PCR 验证,泳道 S5 与 S6 在 2 085 bp 处有显示条带。提取 JSL-1-pGEX4T 重组质粒,进行双酶切,泳道 7 与 8 在 4 969 bp 与 2 085 bp 各有一条带,其中 4 969 bp 为 pGEX4T 载体条带,2 085 bp 为基因 JSL-1 片段,表明挑取的 JSL-1-pGEX4T-BL21 重组菌株为阳性,重组质粒 JSL-1-pGEX4T 已成功转化到感受态细胞 BL21(DE3)中。



注:泳道 M 为 DNA marker;泳道 S1、S2 为基因 JSL-1 PCR 扩增条带;泳道 S3、S4 为质粒 JSL-1-PBSK 双酶切片段;泳道 S5、S6 为 PCR 扩增 JSL-1-pGEX4T 阳性菌液;泳道 S7、S8 为 JSL-1-pGEX4T 重组质粒双酶切片段。红色方框中为目标片段 JSL-1。

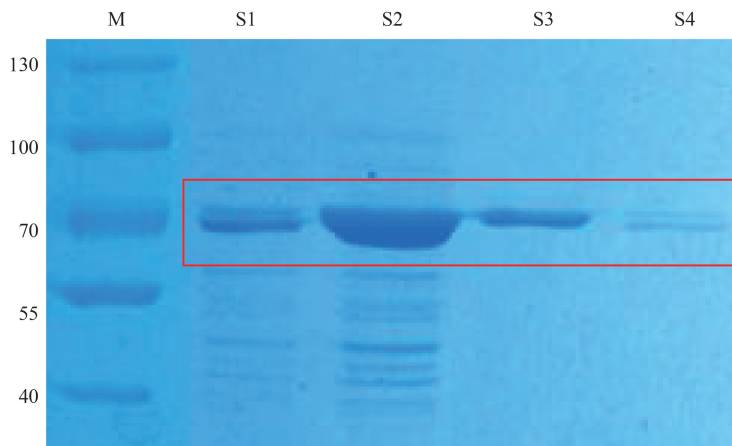
Note: lane M is DNA marker; lanes S1 and S2 are gene JSL-1 PCR amplification bands; lanes S3 and S4 are plasmid JSL-1-PBSK double enzyme section; lanes S5 and S6 are PCR amplification of JSL-1-pGEX4T positive bacterial fluids; lanes S7 and S8 are double enzyme section of JSL-1-pGEX4T recombinant plasmid. The target fragment JSL-1 is shown in the red box.

图 1 重组 JSL-1-pGEX4T 表达载体构建

Fig. 1 Construction of recombinant JSL-1-pGEX4T expression vector

2.2 重组 JSL-1-pGEX4T 蛋白表达和纯化

为了获得重组 JSL-1-pGEX4T 蛋白,经过反复摸索,发现在诱导温度为 20 ℃,IPTG 浓度为 1.0 mmol/L,诱导时间为 24 h 时,目的蛋白条带为 68.6 kDa(泳道 S2),未诱导对照组无明显蛋白条带(泳道 S4),表明 JSL-1 基因诱导表达成功(图 2)。



注:泳道 M 为蛋白 marker;泳道 S1 为诱导温度 20 ℃,IPTG 浓度 1.0 mmol/L,诱导时间 3 h;泳道 S2 为诱导温度 20 ℃,IPTG 浓度 1.0 mmol/L,诱导时间 24 h 时;泳道 S3 为诱导温度 20 ℃,IPTG 浓度 0.5 mmol/L,诱导时间 24 h;泳道 S4 为诱导温度 20 ℃,IPTG 浓度 0.0 mmol/L,诱导时间 24 h。红色方框为目标蛋白 JSL-1。

Note: lane M is the protein marker; lane S1 is the induction temperature 20 ℃, IPTG concentration 1.0 mmol/L, induction time 3 h; lane S2 is the induction temperature 20 ℃, IPTG concentration 1.0 mmol/L, induction time 24 h; lane S3 is the induction temperature 20 ℃, IPTG concentration 0.5 mmol/L, induction time 24 h; lane S4 is the induction temperature 20 ℃, IPTG concentration 0.0 mmol/L, induction time 24 h. The red box shows the target protein JSL-1.

图 2 重组 JSL-1-pGEX4T 蛋白表达和纯化

Fig. 2 Expression and purification of recombinant JSL-1-pGEX4T protein

2.3 产物特异性分析

通过分析环糊精糖基转移酶 JSL-1 与 1% 可溶性淀粉反应产物的类型及生成量,从而确定该酶的产物特异性。由图 3 可知,该酶的主要产物为 α -CD,在 60 min 时产量达到最高,约为 1.05 g/L,随后 α -CD 的产量随着时间推移而呈现下降趋势。 β -CD 和 γ -CD 为该酶催化生成的次产物,且 β -CD 产量高于 γ -CD 的产

量。反应进行到 60 min 时,淀粉环化率约为 33%,其中产生的 α -CD 占总 CD 的 67%。说明环糊精糖基转移酶 JSL-1 主要催化淀粉进行环化反应生成 α -CD。

2.4 JSL-1 最适 pH 及最适温度

pH 对于酶催化活性有较强的影响。在 pH 4.0~12.0 的范围内测定 JSL-1 的最适反应 pH,从图 4(a)中可以看到,在 pH 4.0~8.0 的范围内,JSL-1 酶活力不断上升,随后酶活力随着 pH 的升高而不断降低。JSL-1 的最适 pH 为 8.0,在此 pH 下 JSL-1 催化淀粉生成环糊精的能力最强,即环化能力最强。

在最适 pH 条件下,在 20~70 °C 的范围内测定 JSL-1 的最适反应温度。从图 4(b)中可以得知,在 20~50 °C 温度范围内,酶活力随着温度的上升而增加,随后 JSL-1 的酶活力随着温度的上升而逐渐下降,最终失活,这表明温度过高不利于 JSL-1 进行环化反应。50 °C 时酶活力达到最大,为该酶最适反应温度,且在 45~60 °C 范围内均有较高的相对酶活力,相对酶活力保持在近 80% 以上。

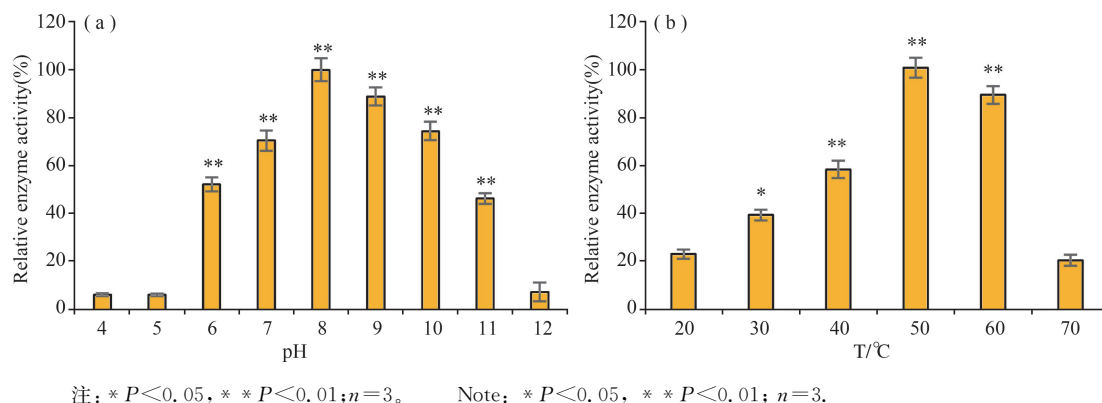


图 4 不同 pH(a)、温度(b)对酶活力的影响

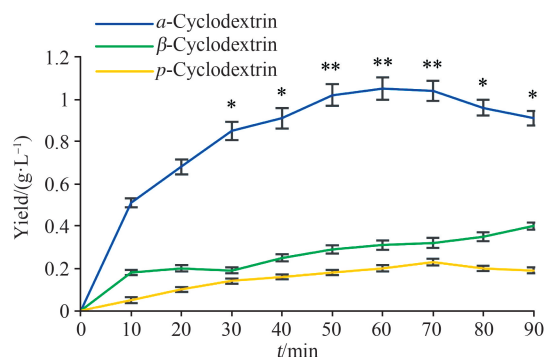
Fig. 4 Effects of pH (a) and temperature (b) on enzyme activity

2.5 JSL-1 转基因水稻获取

构建好植物过表达载体后通过农杆菌转化法侵染日本晴水稻,卡那霉素三代筛选获得转基因纯合水稻株系。对各转基因水稻株系通过 qRT-PCR 验证 JSL-1 基因的相对表达水平(图 5),并选择 JSL-1 表达量较低的 OE3 株系、表达量适中的 OE7 株系、以及表达量较高的 OE12 株系进行下一步研究。

2.6 直链淀粉含量测定

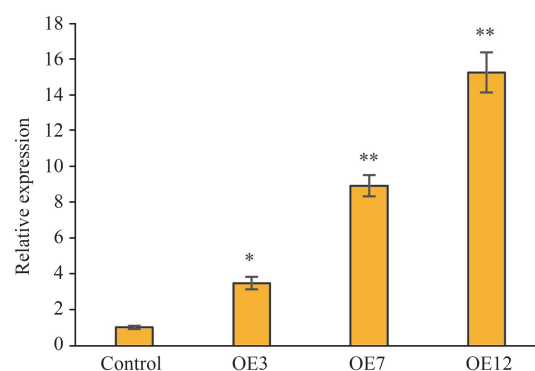
直链淀粉标准曲线绘制结果如图 6(a)所示,标准曲线回归方程为 $y=0.013\ 3x+0.066\ 6$,线性相关系数为 $R^2=0.998\ 9$,其中 x 代表直链淀粉含量(%), y 代表 620 nm 处的吸光度(Abs),从图中可以看出,吸光度和直链淀粉含量具有良好的线性关系。各株系直链淀粉含量如图 6(b)所示,其中野生型水稻的直链淀粉含量达到 18.2%,OE3 直链淀粉含量为 14.7%,OE7 直链淀粉含量为 12.8%,OE12 直链淀粉含量为 10.9%。随



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

图 3 JSL-1 以淀粉为底物进行环化反应过程中 CD 产量变化
Fig. 3 Changes of CD production during cyclization of JSL-1 with starch as substrate

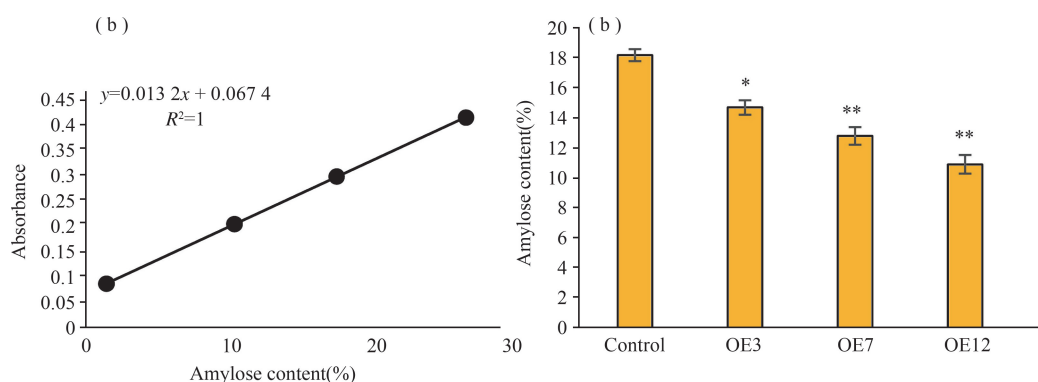


注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

图 5 各株系 JSL-1 基因相对表达水平
Fig. 5 Relative expression level of JSL-1 gene in each strain

着 JSL-1 基因表达水平上升,直链淀粉含量下降,逐渐向低直链淀粉水稻发展。可能是由于环糊精糖基转移酶 JSL-1 发生环化反应,催化水稻中的直链淀粉生成环糊精,而造成水稻中直链淀粉含量下降。



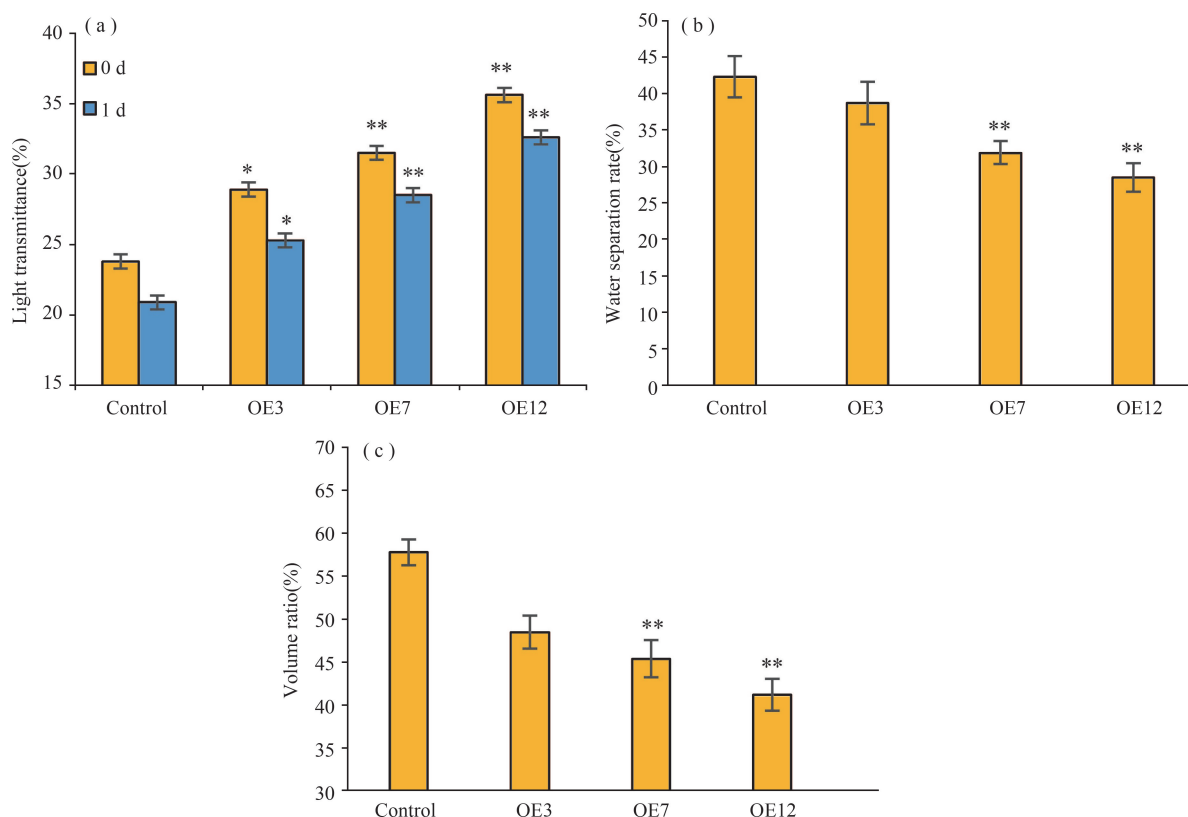
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$. Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$.

图 6 直链淀粉标准曲线(a)及各株系直链淀粉含量(b)测定

Fig. 6 Determination of amylose standard curve (a) and amylose content of each strain (b)

2.7 淀粉透光率、冻融稳定性、老化程度测定

用淀粉透光率来表示转基因水稻淀粉的透明度,结果如图 7(a)所示。随着 JSL-1 基因表达量的增加,淀粉的透光率也增加。淀粉的透光率受直链淀粉含量影响,直链淀粉含量越高,淀粉容易发生凝沉从而造成透光率下降^[31]。淀粉透光率越高,淀粉亮度越好。因此,随着 JSL-1 基因表达量增加,水稻淀粉溶液外观品质越好。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$. Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$.

图 7 各株系淀粉透光率(a)、析水率(b)、体积比(c)分析

Fig. 7 Analysis of light transmittance (a), water separation rate (b) and volume ratio (c) of starch in each strain

如图 7(b)所示,转基因水稻淀粉冻融稳定性用淀粉的析出率来表示,析出率越高代表淀粉冻融稳定性越差。随着 JSL-1 基因表达量的上升,淀粉析出率下降。也就是说淀粉冻融稳定性随着 JSL-1 基因的表达

量的增加而增加。通过以往的研究可知,淀粉冻融稳定性增加,可以提高水稻在低温储存中的稳定性,以及其加工食品冷藏时的稳定性。因此提高水稻中 JSL-1 的表达量有利于水稻淀粉在低温中保存。

各株系水稻淀粉上清液体积比如图 7(c) 所示,转基因水稻淀粉老化程度用淀粉上清液体积比来表示,体积比越高代表淀粉老化程度越高。随着 JSL-1 基因表达量的增加,上清液的体积比减小,淀粉老化程度下降。这与 JSL-1 基因表达量对淀粉透光率以及冻融稳定性影响结果相一致。老化是淀粉最常见的性质之一,也是导致食品老化的重要原因,老化后的淀粉会变浑浊,严重影响食品的外观品质,存放质量以及口感风味等。因此,JSL-1 基因表达量越高,越有利于水稻淀粉及其加工食品货架期的延长。

3 结论

本研究克隆了来源于 *B. toyonensis* P18 环糊精糖基转移酶基因 JSL-1,并对其功能进行了初步研究。结果表明 JSL-1 主要催化直链淀粉生成 α -CD,该酶最适 pH 为 8.0,最适温度为 50 °C。由于环糊精在食品、药品、化妆品等多个领域有着广泛的应用,因而对 JSL-1 的产物特异性及酶学性质具有一定研究意义。在转基因水稻株系中,随着 JSL-1 基因表达水平的增加,水稻中直链淀粉含量增加,水稻淀粉透光率、冻融稳定性增加,水稻淀粉老化程度下降。已有研究表明,水稻中直链淀粉含量与水稻的食味品质成负相关,决定系数高达 92%。因此 JSL-1 转基因水稻不仅可以提高水稻的食味品质,同时可以改善水稻的外观品质以及冷藏存储的稳定性。对环糊精糖基转移酶 JSL-1 的一系列研究为将来提高催化产物的专一性以及环糊精的生产工艺的改良奠定了基础,同时对低直链淀粉水稻的育种提供了优质的基因资源,为水稻品质的改良提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] LIM C H, RASTI B, SULISTYO J, et al. Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources[J]. Heliyon, 2021, 7(2): e06305.
- [2] 李晓涵,郭姣梅,宋凯,等. Bacillus sp. Y112 环糊精葡萄糖基转移酶位点 R81 定点突变提高产物特异性[J]. 食品科学,2021, 42(10): 133-138.
- [3] SAINI K, GUPTA R. Cell surface expression of γ -CGTase from *Evansella caseinilytica* on *E. coli*: Application in the enzymatic conversion of starch to γ -cyclodextrin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 159: 110066.
- [4] THIEMANN V, DONGES C, PROWE S G, et al. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(2/3): 226-235.
- [5] 孙涛,江波,潘蓓蕾. 环糊精葡萄糖基转移酶的生产及其在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 387-392.
- [6] HAO J H, HUANG L P, CHEN X T, et al. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by strain Y112 [J]. Protein Expression and Purification, 2017, 140: 8-15.
- [7] LIU J Y, TIAN B R, LIU Y M, et al. Cyclodextrin-containing hydrogels: a review of preparation method, drug delivery, and degradation behavior[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13516.
- [8] PETITJEAN M, GARCIA-ZUBIRI I X, Isasi J R. History of cyclodextrin-based polymers in food and pharmacy: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(4): 3465-3476.
- [9] LI Z F, LI B, GU Z B, et al. Extracellular expression and biochemical characterization of alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(7): 886-892.
- [10] TAO X M, SU L Q, WANG L, et al. Improved production of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO2 in *Escherichia coli* via directed evolution[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 173-185.
- [11] ZHANG J T, TIAN H Q, SHI H, et al. Increased greenhouse gas emissions intensity of major croplands in China: implications for food security and climate change mitigation[J]. Global Change Biology, 2020, 26(11): 6116-6133.
- [12] 徐春春,纪龙,陈中督,等. 2021 年我国水稻产业形势分析及 2022 年展望[J]. 中国稻米, 2022, 28(2): 16-19.
- [13] BUTARDO V M J, SREENIVASULU N, JULIANO B O. Improving rice grain quality: state-of-the-art and future prospects[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.), 2019, 1892: 19-55.
- [14] TAPPIBAN P, YING Y N, XU F F, et al. Proteomics and post-translational modifications of starch biosynthesis-related proteins in de-

- veloping seeds of rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5901-5925.
- [15] 毛兴学,郑晓钰,孙炳蕊,等.应用 CRISPR/Cas9 技术创制低直链淀粉含量水稻种质[J].植物遗传资源学报,2022,23(2): 583-591.
- [16] LI X H, SUN J J, WANG W, et al. Site-saturation mutagenesis of proline 176 in Cyclodextrin Glucosyltransferase from *Bacillus* sp. Y112 effects product specificity and enzymatic properties[J]. Process Biochemistry, 2020, 94: 180-189.
- [17] ZHENG J Z, LI X Q, WU H W. High-level extracellular secretion and characterization of the thermophilic β -cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* in *Escherichia coli*[J]. 3 Biotech, 2019, 9(10): 372-382.
- [18] 李晓涵. 海洋环糊精葡萄糖基转移酶异源表达、纯化结晶及产物专一性分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- [19] 陶志杰, 杨静文, 王清晨, 等. γ -环糊精葡萄糖基转移酶的酶学性质及其产物特异性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 25-32.
- [20] 张兴荣, 李峰, 贺连智, 等. 高产 β -环糊精葡萄糖基转移酶菌株的筛选, 产酶条件优化及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(11): 85-91.
- [21] 温莉娴. 低草甘膦残留的抗草甘膦转基因水稻培育[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [22] SONG K, SUN J, WANG W, et al. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase my20 in *Escherichia coli* and its application in 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 664339.
- [23] GUO D S, LING X T, ZHOU X, et al. Evaluation of the quality of a high-resistant starch and low-glutelin rice (*Oryza sativa* L.) generated through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(36): 9733-9742.
- [24] 沈泓, 姚栋萍, 吴俊, 等. 灌浆期不同时段高温对稻米淀粉理化特性的影响[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(4): 377-387.
- [25] 臧倩, 王光华, 张明静, 等. 有机无机肥料及抽穗期气温升高对水稻籽粒淀粉合成相关酶活性及淀粉品质形成的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(10): 2072-2083.
- [26] ZHOU W L, QI Z Y, CHEN J, et al. Rooting ability of rice seedlings increases with higher soluble sugar content from exposure to light[J]. PLoS One, 2020, 15(10): e0241060.
- [27] MAN J M, YANG Y, ZHANG C Q, et al. Structural changes of high-amylose rice starch residues following in vitro and in vivo digestion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 9332-9341.
- [28] 王英俊, 周浓, 郭汉文, 等. 海红米淀粉的提取工艺及其性质研究[J]. 农产品加工, 2022, 554(12): 34-37+45.
- [29] WANG L L, GONG Y, Li Y X, et al. Structure and properties of soft rice starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 10-16.
- [30] 李学红, 陈智静, 陆勇, 等. β -环糊精对小麦淀粉理化性质和凝胶质构性质的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(12): 237-240.
- [31] YANG Z L, HAO H N, WU Y W, et al. Influence of moisture and amylose on the physicochemical properties of rice starch during heat treatment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 656-662.
- [32] ZHAI Y H, XING J L, LUO X H, et al. Effects of pectin on the physicochemical properties and freeze-thaw stability of waxy rice starch[J]. Foods, 2021, 10(10): 2419-2429.

(责任编辑:刘庆松)