



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106460023 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580010439.5

(22)申请日 2015.02.26

(30)优先权数据

61/945241 2014.02.27 US

61/945233 2014.02.27 US

62/004300 2014.05.29 US

62/004314 2014.05.29 US

62/004305 2014.05.29 US

62/004308 2014.05.29 US

62/004290 2014.05.29 US

62/004312 2014.05.29 US

(66)本国优先权数据

PCT/CN2015/073269 2015.02.25 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/017648 2015.02.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/130883 EN 2015.09.03

(71)申请人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 K.D.纳盖 E.C.哈戈 J.K.舍蒂

S.M.亨内塞 R.迪科斯莫 L.华

R.拉米雷兹 Z.汤 Z.于

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 唐华东 黄希贵

(51)Int.Cl.

C12P 19/16(2006.01)

C12P 19/12(2006.01)

C12P 19/08(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

C12P 19/18(2006.01)

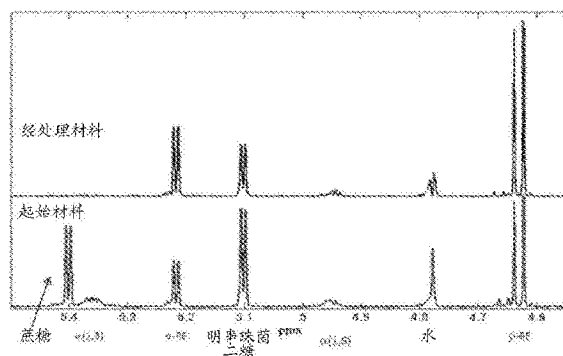
权利要求书2页 说明书62页 附图1页

(54)发明名称

使用 α -葡糖苷酶来酶水解二糖和低聚糖

(57)摘要

本发明公开了一种用于水解糖(二糖或低聚糖)例如明串珠菌二糖中的 α -1,5葡糖基-果糖键的方法。该方法包括使糖与 α -葡糖苷酶例如转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶在合适的条件下接触,在该接触步骤期间,酶水解糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键。该方法用于例如减小分离自葡聚糖合成反应的滤液中明串珠菌二糖的量。



1. 一种使包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键的糖中的 α -1,5葡萄糖基-果糖键水解的方法,其中所述糖为二糖或低聚糖,并且其中所述方法包括:

使所述糖与 α -葡萄糖苷酶在合适的条件下接触,其中所述 α -葡萄糖苷酶水解所述糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

并且其中所述糖的量相较于所述接触之前存在的糖的量减少。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述 α -葡萄糖苷酶是固定的。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述糖为明串珠菌二糖。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中在所述接触步骤之后的明串珠菌二糖的浓度少于在所述接触之前存在的明串珠菌二糖的浓度的50%。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合适的条件包括:

(i) 葡聚糖合成反应,或

(ii) 从所述葡聚糖合成反应获得的级分;

其中所述糖为所述葡聚糖合成反应的副产物。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述葡聚糖合成反应产生至少一种不溶性 α -葡聚糖产物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述级分为所述葡聚糖合成反应的滤液。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述葡聚糖合成反应产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物,其为:

(i) 葡萄糖基转移酶的产物,或

(ii) 葡萄糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用的产物,所述 α -葡聚糖水解酶能够水解具有一个或多个 α -1,3-糖苷键或一个或多个 α -1,6-糖苷键的葡聚糖聚合物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述级分为所述葡聚糖合成反应的色谱级分。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述 α -葡萄糖苷酶为转葡萄糖苷酶或葡萄糖淀粉酶。

11. 一种通过使糖与 α -葡萄糖苷酶接触而产生的组合物,

其中所述糖为二糖或低聚糖并且包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

其中所述酶水解所述糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

并且其中所述组合物包含的糖量相较于所述接触之前存在的糖量减少。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述糖为明串珠菌二糖。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述糖在(i) 葡聚糖合成反应,或(ii) 从所述葡聚糖合成反应获得的级分中;

其中所述糖为所述葡聚糖合成反应的副产物。

14. 一种富集存在于葡聚糖合成反应的级分中果糖的方法,所述方法包括:

(a) 使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡萄糖苷酶在合适的条件下接触,其中所述 α -葡萄糖苷酶水解所述级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键;以及

(b) 从步骤(a)的经水解级分中分离果糖,以获得果糖浓度比步骤(a)的级分的果糖浓度更高的组合物。

15. 一种发酵方法,所述方法包括:

(a) 使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡萄糖苷酶在合适的条件下接触,其中所述 α -葡萄糖苷酶水解所述级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键;

(b) 用微生物发酵步骤 (a) 的级分以获得产物, 其中所述发酵在步骤 (a) 之后或与步骤 (a) 同时进行; 以及

(c) 任选地, 分离 (b) 的产物;

其中相较于对未与所述 α -葡萄糖苷酶接触的葡聚糖合成反应的级分进行发酵的产物收率, (b) 的产物收率增加。

使用 α -葡糖苷酶来酶水解二糖和低聚糖

[0001] 本申请要求美国临时申请61/945,233 (2014年2月27日提交)、61/945,241 (2014年2月27日提交)、62/004,290 (2014年5月29日提交)、62/004,308 (2014年5月29日提交)、62/004,312 (2014年5月29日提交)、62/004,300 (2014年5月29日提交)、62/004,314 (2014年5月29日提交)和62/004,305 (2014年5月29日提交)的权益,所有这些申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于较小的糖聚合物的酶水解领域。具体地,本发明涉及用 α -葡糖苷酶水解包含一个或多个 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖和低聚糖。

[0003] 以电子方式递交的序列表的引用

[0004] 通过EFS-Web以电子方式将序列表的正式文本作为ASCII格式的序列表递交,该文件名称为CL6115USNP_SequenceListing_ST25.txt,创建日期为2015年2月10日,文件大小为266千字节,并且该文件与本说明书同时提交。在这一ASCII格式的文件中包含的序列表为所述说明书的部分并且全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0005] 葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3, α -1,4-葡聚糖葡糖水解酶)是催化水解含有葡萄糖的二糖、低聚糖和多糖的非还原端的 α -1,4和 α -1,6糖苷键两者,每次释放一个葡萄糖单元的外作用酶(1960,Pazur和Ando,J.Biol.Chem.235:297-302)。裂解发生于连接异头碳与氧的糖苷键(1962,Fleetwood和Weigel,Nature 196:984)。 α -1,4- α -1,6和 α -1,3键是仅被葡糖淀粉酶以显著速率水解的键(1957,Barker等人,J.Chem.Soc.4865-4871)。

[0006] 葡糖淀粉酶还能够水解由 α -1,2(例如曲二糖)或 α -1,1(海藻糖)连接的两个葡糖基单元之间的糖苷键。然而,与对具有 α -1,4(麦芽糖)或 α -1,6(异麦芽糖)键的二糖的葡糖淀粉酶活性相比,此种酶活性发生于更低的速率和更加稀释的底物浓度。

[0007] 葡糖淀粉酶已被广泛用于由淀粉产生高葡萄糖浆。高葡萄糖浆可作用于产生各种增值化合物例如燃料乙醇、高果糖玉米糖浆、有机酸、氨基酸和维生素的原料。已从多种微生物、动物核植物中分离出葡糖淀粉酶,并且在微生物中,许多真菌是该酶的良好来源。在真菌生物体例如黑曲霉(*Aspergillus niger*)中产生的葡糖淀粉酶常用于商业应用,例如高葡萄糖浆生产。

[0008] 转葡糖苷酶(EC.2.4.1.24,1,4- α -葡聚糖6- α -葡糖基转移酶)是与 α -D-葡糖-低聚糖一起温育时催化水解和转移反应两者的D-葡糖基转移酶(1951,Pazur和French,J.Amer.Chem.Soc.73:3536)。麦芽糖是用该酶进行转葡糖基化反应的最优选的底物。转移最常发生于H0-6,从而由D-葡萄糖产生异麦芽糖,或由麦芽糖产生潘糖(6-O- α -葡糖基麦芽糖)。转葡糖苷酶也可使葡糖基残基转移至另一个D-葡糖基单元的H0-2或H0-3,以形成曲二糖或黑曲霉糖。该酶可进一步使D-葡糖基单元转移回H0-4,从而改良麦芽糖。

[0009] 由于转葡糖基化反应采用转葡糖苷酶,所以麦芽-低聚糖残基转化为包含较高比

例的由非还原端的 α -D-1,6糖苷键连接的葡糖基残基的异麦芽-低聚糖(IMO)。IMO糖在亚洲用于多种食品和饮料配方。Brier等人(美国专利申请公开2003/0167929)公开了采用转葡糖苷酶由大麦麦芽汁产生IMO。

[0010] Poullose等人(美国专利申请公开2008/0229514)公开了用转葡糖苷酶降解多糖例如黄原胶和瓜尔胶。黄原胶包括纤维素主链,其中另选葡萄糖1,3-连接至包含甘露糖和葡糖醛酸的支链上。瓜尔胶的主链包括每隔一个甘露糖使半乳糖残基 α -1,6-连接到其上的 β -1,4-连接的甘露糖残基。

[0011] Lantero等人(美国专利5770437)公开了用转葡糖苷酶降解蔗糖、松三糖和海藻酮糖。这些糖包括经由1,2-(蔗糖)、1,3-(松三糖)或1,1-(海藻酮糖)键连接至果糖的葡萄糖。

[0012] 虽然已公开了葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶的各种水解活性,但是这些酶通常被视为 α -葡糖苷酶,给予了它们水解两个葡糖基残基之间 α -键的能力。例如,葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶两者均与具有麦芽糖酶活性(水解麦芽糖的两个葡糖基残基之间的 α -1,4糖苷键)相关联,其为 α -葡糖苷酶活性的一种类型。

[0013] 尽管有前述公开,但现已令人惊奇地发现 α -葡糖苷酶例如转葡糖苷酶(EC 2.4.1.24)、葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)及其它 α -葡糖苷酶可水解葡糖基-果糖的 α -1,5糖苷键。本文公开了 α -葡糖苷酶用于降解包含葡糖基- α -1,5-果糖的二糖和低聚糖。

发明内容

[0014] 在一个实施方案中,本发明涉及一种使包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的糖中的 α -1,5葡糖基-果糖键水解的方法,其中所述糖为二糖或低聚糖,并且其中该方法包括:使糖与 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡糖苷酶水解糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键,并且其中糖的量相较于接触步骤之前存在的糖的量减少。

[0015] 在另一个实施方案中,水解方法的 α -葡糖苷酶是固定的。

[0016] 在另一个实施方案中,水解方法的糖为明串珠菌二糖。在另一个实施方案中,在接触步骤之后明串珠菌二糖的浓度少于在接触步骤之前存在的明串珠菌二糖的浓度的50%。

[0017] 在另一个实施方案中,水解方法的合适的条件包括:(i) 葡聚糖合成反应,或(ii) 从葡聚糖合成反应获得的级分;其中糖为葡聚糖合成反应的副产物。在另一个实施方案中,葡聚糖合成反应产生至少一种不溶性 α -葡聚糖产物。在另一个实施方案中,级分为葡聚糖合成反应的滤液。在另一个实施方案中,葡聚糖合成反应产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物,其为:(i) 葡糖基转移酶的产物,或(ii) 葡糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用的产物,该 α -葡聚糖水解酶能够水解具有一个或多个 α -1,3-糖苷键或一个或多个 α -1,6-糖苷键的葡聚糖聚合物。在另一个实施方案中,级分为葡聚糖合成反应的色谱级分,其中葡聚糖合成反应产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物。

[0018] 在另一个实施方案中, α -葡糖苷酶为转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶。在另一个实施方案中,(i) 转葡糖苷酶包含与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列;或者(ii) 葡糖淀粉酶包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种通过使糖与 α -葡糖苷酶接触而产生的组合物,其中糖为二糖或低聚糖并且包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键,其中 α -葡糖苷酶水解糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键,并且其中组合物包含的糖量相较于接触步骤前存在的

糖量减少。

[0020] 在另一个实施方案中,组合物的糖为明串珠菌二糖。例如,组合物中明串珠菌二糖的浓度少于接触之前存在的明串珠菌二糖的浓度的50%。

[0021] 在另一个实施方案中,组合物的糖在(i)葡聚糖合成反应,或(ii)从葡聚糖合成反应获得的级分中;其中糖为葡聚糖合成反应的副产物。在另一个实施方案中,级分为葡聚糖合成反应的滤液或葡聚糖合成反应的色谱级分。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种富集存在于葡聚糖合成反应的级分中果糖的方法,该方法包括:(a)使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡糖苷酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键;以及(b)从步骤(a)的经水解级分中分离果糖,以获得果糖浓度比步骤(a)的级分的果糖浓度更高的组合物。

[0023] 在另一第十三实施方案中,本发明涉及一种发酵方法,该方法包括:(a)使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡糖苷酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键;(b)用微生物发酵步骤(a)的级分以获得产物,其中发酵可在步骤(a)之后或与步骤(a)同时进行;以及(c)任选地,分离(b)的产物;其中相较于对未与 α -葡糖苷酶接触的葡聚糖合成反应的级分进行发酵的产物收率,(b)的产物收率增加。

[0024] 附图和序列简述

[0025] 图1:在用NOVO 188酶水解处理之前(起始材料)和之后(经处理材料)葡聚糖反应滤液材料的 ^1H NMR光谱(参见实施例2-3)。

[0026] 图2:在用TG L-2000转葡糖苷酶水解处理之前(起始材料)和之后(经处理材料)葡聚糖反应滤液材料的 ^1H NMR光谱(参见实施例2-3)。

[0027] 表1核酸和蛋白质序列标识号概述

[0028]

说明	核酸 SEQ ID NO.	蛋白质 SEQ ID NO.
“TGL-2000”，黑曲霉 (<i>A. niger</i>) 转葡萄糖苷酶 (无信号肽的成熟形式)		1 (965 aa)
“GC 321 葡萄糖淀粉酶”，里氏木霉 (<i>T. reesei</i>) 葡萄糖淀粉酶 (TrGA) (无信号肽的成熟形式)		2 (599 aa)
“gtfJ”，唾液链球菌 (<i>Streptococcus salivarius</i>) 葡萄糖基转移酶。相较于 GENBANK 识别号 47527 而言蛋白质的前 42 个氨基酸缺失；包含起始甲硫氨酸。		3 (1477 aa)
“Aclglu1”，棒曲霉 (<i>Aspergillus clavatus</i>) α -葡萄糖苷酶，包括信号肽的全长前体形式。	4 (3147 个碱基)	5 (990 aa)
“Aclglu1”，棒曲霉 α -葡萄糖苷酶，缺少信号肽的成熟形式。		6 (971 aa)
“Nfiglu1”，费氏新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>) α -葡萄糖苷酶，包括信号肽的全长前体形式。	7 (3158 个碱基)	8 (988 aa)
“Nfiglu1”，费氏新萨托菌 α -葡萄糖苷酶，缺少信号肽的成熟形式。		9 (969 aa)
“Ncrglu1”，粗糙脉孢菌 (<i>Neurospora crassa</i>) α -葡萄糖苷酶，包括信号肽的全长前体形式。	10 (3385 个碱基)	11 (1044 aa)
“Ncrglu1”，粗糙脉孢菌 α -葡萄糖苷酶，缺少信号肽的成熟形式。		12 (1022 aa)
“TauSec098”， <i>Rasamsonia composticola</i> α -葡萄糖苷酶，包括信号肽的全长前体形式。	13 (3293 个碱基)	14 (1035 aa)
“TauSec098”， <i>Rasamsonia composticola</i> α -葡萄糖苷酶，缺少信号肽的成熟形式。		15 (1013 aa)
“TauSec099”， <i>Rasamsonia composticola</i> α -葡萄糖苷酶，包括信号肽的全长前体形式。	16 (3162 个碱基)	17 (990 aa)
“TauSec099”， <i>Rasamsonia composticola</i> α -葡萄糖苷酶，缺少信号肽的成熟形式。		18 (973 aa)
“BloGlu1”，长双歧杆菌	19 (1815 个碱基)	20 (604 aa)

[0029]

(<i>Bifidobacterium longum</i>) (长双歧杆菌亚种 JDM301) α -葡糖苷酶 (野生型)。		
“BloGlu1”, 长双歧杆菌 (长双歧杆菌亚种 JDM301) α -葡糖苷酶, 经密码子优化的序列。	21 (1812 个碱基)	
“BloGlu2”, 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶 (野生型)。		22 (604 aa)
“BloGlu2”, 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶, 编码氨基酸序列的经密码子优化的序列。	23 (1812 个碱基)	24 (604 aa)
“BloGlu3”, 长双歧杆菌 (亚种 F8) α -葡糖苷酶 (野生型)	25 (1815 个碱基)	26 (604 aa)
“BloGlu3”, 长双歧杆菌 (亚种 F8) α -葡糖苷酶, 编码氨基酸序列的经密码子优化的序列。	27 (1812 个碱基)	
“BpsGlu1”, 假长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) α -葡糖苷酶 (野生型)。		28 (585 aa)
“BpsGlu1”, 假长双歧杆菌 α -葡糖苷酶, 编码氨基酸序列的经密码子优化的序列。	29 (1755 个碱基)	30 (586 aa)
“BthGlu1”, 嗜热双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium thermophilum</i>) RBL67 α -葡糖苷酶 (野生型)。	31 (1806 个碱基)	32 (601 aa)
“BthGlu1”, 嗜热双歧杆菌 RBL67 α -葡糖苷酶, 经密码子优化的序列。	33 (1803 个碱基)	
“BbrGlu2”, 短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>) α -葡糖苷酶 (野生型)。		34 (662 aa)
“BbrGlu2”, 短双歧杆菌 α -葡糖苷酶, 编码氨基酸序列的经密码子优化的序列。	35 (1812 个碱基)	36 (604 aa)
“BbrGlu5”, 短双歧杆菌 ACS-071-V-Sch8b α -葡糖苷酶 (野生型)。	37 (1821 个碱基)	38 (606 aa)
“BbrGlu5”, 短双歧杆菌 ACS-071-V-Sch8b α -葡糖苷酶, 经密码子优化的序列。	39 (1818 个碱基)	
“Gtf-S”, 链球菌 (<i>Streptococcus</i> sp.) C150 葡糖基转移酶, GENBANK GI No. 321278321。		40 (1570 aa)
“GTF0459”, 链球菌 C150 葡糖基转移酶, GENBANK GI No. 321278321 的 N-末端截短的类型。	41 (4179 个碱基)	42 (1392 aa)
“Gtf-C”, 变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>) MT-4239 葡糖基转移酶,		43 (1455 aa)

[0030]

GENBANK GI No. 3130088。		
“GTF0088BsT1”，变异链球菌 MT-4239 葡糖基转移酶，GENBANK GI No. 3130088 的 N-和 C-末端截短的类型。	44 (2715 个碱基)	45 (904 aa)
“MUT3325”，马尔内菲青霉 (<i>Penicillium marneffei</i>) ATCC 18224 突变酶，GENBANK GI No. 212533325。	46 (1308 个碱基)	47 (435 aa)

具体实施方式

[0031] 所有引用的专利和非专利文献的公开全文以引用方式并入本文。

[0032] 如本文所用,术语“发明”或“本发明所公开的”不旨在限制但一般适用于权利要求中所限定的或本文所述的任何发明。这些术语在本文中可互换使用。

[0033] 除非另外指明,术语“糖”、“糖分子”和“碳水化合物”在本文可互换使用,并且是指二糖或低聚糖。本文“二糖”是指具有通过糖苷键连接的两个单糖的碳水化合物。本文“低聚糖”是指由例如通过糖苷键连接的2至9个单糖组成的碳水化合物。在本文中,低聚糖也可称为“低聚物”。在二糖或低聚糖内所含的单糖可称为例如“单糖单元”或“单体单元”。本文优选的单糖为果糖和葡萄糖。

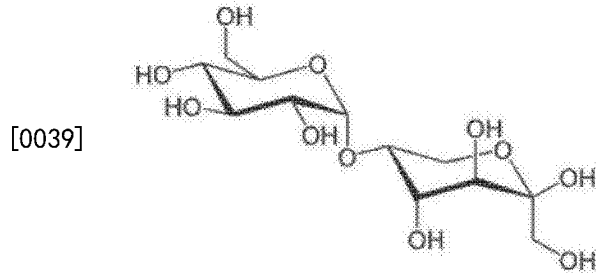
[0034] 术语“糖苷键合”和“糖苷键”在本文可互换使用,并且是指使一个碳水化合物分子与另一个碳水化合物分子连接的一类共价键。

[0035] 本文术语“ α -1,3葡糖基-葡萄糖键”、“ α -1,3葡萄糖-葡萄糖键”和“葡萄糖- α -1,3-葡萄糖”是指两个 α -D-葡萄糖分子之间的 α -1,3-糖苷键。本文术语“ α -1,6葡糖基-葡萄糖键”、“ α -1,6葡萄糖-葡萄糖键”和“葡萄糖- α -1,6-葡萄糖”是指两个 α -D-葡萄糖分子之间的 α -1,6-糖苷键。在某些实施方案中,本文一个或多个 α -1,3葡糖基-葡萄糖键和/或 α -1,6葡糖基-葡萄糖键包含在二糖或低聚糖之内。

[0036] 本文术语“ α -1,5葡糖基-果糖键”、“ α -1,5葡萄糖-果糖键”和“葡萄糖- α -1,5-果糖”是指 α -D-葡萄糖分子与果糖分子之间的 α -1,5-糖苷键。在某些实施方案中,本文 α -1,5葡糖基-果糖键包含在二糖或低聚糖之内。

[0037] 本文的“ α -D-葡萄糖”也可称为“葡萄糖”。

[0038] 包含 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖在本文称为明串珠菌二糖。术语“明串珠菌二糖”和“D-吡喃葡糖基- α (1-5) -D-吡喃果糖”在本文中互换使用。明串珠菌二糖具有以下结构:



[0040] 术语“ α -葡糖苷酶”、“ α -1,4-葡糖苷酶”和“ α -D-葡糖苷葡糖水解酶”在本文中互换使用。 α -葡糖苷酶 (EC 3.2.1.20) (“EC”是指酶识别号) 先前已被鉴定为催化水解释放低聚糖 (例如二糖) 和多糖底物的末端非还原的 (1,4)-连接的 α -D-葡萄糖残基的酶。本文现在公

开的 α -葡糖苷酶还对 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性,并且对 α -1,3和 α -1,6葡糖基-果糖键具有水解活性。转葡糖苷酶和葡糖淀粉酶为具有此类活性的 α -葡糖苷酶的示例。

[0041] 术语“转葡萄糖苷酶”(TG)、“转葡糖苷酶”和“1,4- α -葡聚糖6- α -葡糖基转移酶”在本文中互换使用。转葡糖苷酶(EC 2.4.1.24)先前已被鉴定为与某些 α -D-葡糖-低聚糖一起温育时催化水解和转移反应两者的D-葡糖基转移酶。本文现在公开的转葡糖苷酶还对 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性,并且对 α -1,3和 α -1,6葡糖基-果糖键具有水解活性。

[0042] 术语“葡糖淀粉酶”(GA)、“葡萄糖淀粉酶”和“ α -1,4-葡聚糖葡糖水解酶”在本文中互换使用。葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)先前已被鉴定为催化水解含葡萄糖的二糖、低聚糖和多糖非还原端的 α -1,4和 α -1,6糖苷键两者的外作用酶。本文现在公开的葡糖淀粉酶还对 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性。

[0043] 酶水解为其中在添加要素水的情况下酶促进分子中的键断裂的过程。本文“水解”、“水解的”或“对其水解活性” α -1,5葡糖基-果糖键是指通过 α -葡糖苷酶例如葡糖淀粉酶或转葡糖苷酶来酶水解葡萄糖和果糖之间的 α -1,5糖苷键。此类水解在包含 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖或低聚糖与本文的 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触时发生。因此,本文“水解反应”至少包括:(i)包含 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖或低聚糖,和(ii) α -葡糖苷酶。

[0044] 本文“糖化”是指将糖(二糖或低聚糖)分解成其单糖组分的过程。可在本文水解反应中使糖发生糖化。

[0045] 用于使包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的糖(二糖或低聚糖)与本文的 α -葡糖苷酶接触的“合适的条件”是指支持 α -葡糖苷酶水解糖的一个或多个 α -1,5葡糖基-果糖键的那些条件(例如温度、pH、时间)。合适的条件可包括“水性条件”,例如包括至少20重量%水。水性条件可表现为溶液或混合物。其中使包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的糖与 α -葡糖苷酶接触的溶液或混合物可称为 α -葡糖苷酶反应(例如,转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶反应)。

[0046] 本文“固定的”酶是指结合至惰性不可溶材料的酶。例如美国专利公开5541097公开了用于制备固定酶的方法,其公开内容以引用方式并入本文。

[0047] 术语“葡聚糖”和“葡聚糖聚合物”在本文互换使用,并且是指经糖苷键连接的葡萄糖单体的多糖。本文“ α -葡聚糖”是指葡聚糖聚合物,其包含至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% α -糖苷键。

[0048] 本文“不溶性葡聚糖”是指不溶于水性条件的葡聚糖聚合物。本文不溶性葡聚糖的一个示例是DP为至少8或9的聚 α -1,3-葡聚糖。在某些实施方案中,如当前所公开的葡糖基转移酶反应产生至少一种不溶性葡聚糖产物。

[0049] 术语“可溶性葡聚糖”、“可溶性 α -葡聚糖”、“可溶性纤维”、“可溶性葡聚糖纤维”、“可溶性膳食纤维”等在本文互换使用,以指可溶于水性条件的葡聚糖聚合物。本文可溶性葡聚糖的示例为特定低聚糖,例如DP小于8的聚 α -1,3-葡聚糖,以及在以下提供示例中公开的特定低聚糖。在某些实施方案中,如当前所公开的葡糖基转移酶反应产生至少一种可溶性葡聚糖产物。在某些实施方案中,表征本文可溶性 α -葡聚糖化合物的另一组特征在于:其是(i)水溶性葡萄糖低聚物,具有3或更大的聚合度,(ii)消化抗的(即表现出极慢消化性或没有消化性),在人小肠中吸收极少或不吸收,以及(iii)在下胃肠道中至少部分可发酵的。

可溶性葡聚糖纤维组合物的消化性可例如用AOAC方法2009.01测定。

[0050] 术语“聚 α -1,3-葡聚糖”和“ α -1,3-葡聚糖聚合物”在本文中互换使用。聚 α -1,3-葡聚糖是包含经糖苷键连接在一起的葡萄糖单体单元的聚合物,其中至少约50%的糖苷键为 α -1,3-糖苷键。如本文所用,术语“ α -1,3-糖苷键”是指通过相邻 α -D-葡萄糖环上的碳1和3将 α -D-葡萄糖分子彼此接合的一类共价键。

[0051] 本文葡聚糖的“分子量”可表示为数均分子量(M_n)或重均分子量(M_w)。另选地,分子量可表示为道尔顿、克/摩尔、 DP_w (重均聚合度)或 DP_n (数均聚合度)。用于计算这些分子量测定的各种方法在本领域中是已知的,例如采用高压液相色谱法(HPLC)、尺寸排阻色谱法(SEC)、或凝胶渗透色谱法(GPC)。

[0052] 术语“葡糖基转移酶”、“gtf酶”、“gtf酶催化剂”、“gtf”、“葡聚糖蔗糖酶”等在本文中互换使用。本文活性的gtf酶催化蔗糖底物反应以制得产物葡聚糖和果糖。gtf反应的其它产物(副产物)可包括葡萄糖(在从葡糖基-gtf酶中间复合物水解葡萄糖时得到)、各种可溶性低聚糖(例如 DP_2 - DP_7)和明串珠菌二糖(在葡糖基-gtf酶中间复合物的葡萄糖与果糖连接时得到)。野生形式的葡糖基转移酶通常包含(N-末端方向至C-末端方向)信号肽、可变域、催化域和葡聚糖结合域。根据CAZy(碳水化合物-活性酶)数据库,本文葡糖基转移酶归类为糖苷水解酶家族70(GH70)(Cantarel等人,Nucleic Acids Res.37:D233-238,2009)。

[0053] 本文术语“蔗糖”是指经 α -1,2-糖苷键连接的 α -D-葡萄糖分子与 β -D-果糖分子组成的非还原二糖。蔗糖通常称为食糖。

[0054] 术语“葡聚糖合成反应”、“葡聚糖反应”、“gtf反应”等在本文中互换使用,并且是指通过葡糖基转移酶进行的反应。如本文所用,葡聚糖合成反应通常涉及这样一种溶液:在包含蔗糖和水、以及任选的其它组分的溶液中包含至少一种活性葡糖基转移酶。可在本文葡聚糖合成反应中的其它组分包括例如果糖、葡萄糖、明串珠菌二糖、可溶性低聚糖(例如 DP_2 - DP_7)、以及一种或多种可溶性葡聚糖产物。另外,在一些方面,葡聚糖合成反应可包括一种或多种 α -葡聚糖水解酶。应当理解,某些葡聚糖产物例如聚合度(DP)为至少8或9的聚 α -1,3-葡聚糖是水不溶性的并因此在葡聚糖合成反应中不溶解,而是可以析出溶液。

[0055] 术语“ α -葡聚糖水解酶”和“葡聚糖水解酶”在本文中互换使用,并且是指能够水解 α -葡聚糖低聚物的酶。 α -葡聚糖水解酶可通过其对特定 α -D-糖苷键的内切水解活性来定义。本文 α -葡聚糖水解酶的示例包括葡聚糖酶(EC 3.2.1.11;能够内切水解 α -1,6-连接的糖苷键)、突变酶(EC 3.2.1.59;能够内切水解 α -1,3-连接的糖苷键)和交替聚糖酶(alternanases)(EC 3.2.1.-;能够内切水解裂解交替聚糖(alternan))。各种因素包括但不限于某些 α -葡聚糖内的支化程度、支化类型和相对分支长度,可不利地影响 α -葡聚糖水解酶内切水解一些糖苷键的能力。

[0056] 葡聚糖合成反应的“干固体百分比”是指葡聚糖合成反应中所有糖的重量%。可例如基于用于制备反应产物的蔗糖量来计算gtf反应的干固体百分比。

[0057] 本文的葡聚糖合成反应的“级分”是指葡聚糖合成反应的液体溶液部分。级分可为得自葡聚糖合成反应的部分或全部液体溶液,并且分离自反应中合成的可溶性或不溶性葡聚糖产物。在一些实施方案中,级分可任选的称为“母液”,其中产物为不溶性(固体)葡聚糖产物。级分的一个示例为葡聚糖合成反应的滤液。因为级分可包含溶解的糖例如蔗糖、果糖、葡萄糖、明串珠菌二糖、可溶性低聚糖(例如 DP_2 - DP_7),所以级分可也称为源于葡聚糖合

成反应的“混合的糖溶液”。本文“经水解的级分”是指已经过本文的 α -葡萄糖苷酶处理以水解存在于级分中的明串珠菌二糖和/或低聚糖的级分。

[0058] 术语“滤液”、“葡聚糖反应滤液”、“葡聚糖滤液”等在本文互换使用,并且是指从葡聚糖合成反应中合成的固体葡聚糖产物中过滤出来的级分。本文“经水解的滤液”是指已经过本文 α -葡萄糖苷酶处理以水解存在于滤液中的明串珠菌二糖和/或低聚糖的滤液。

[0059] 术语“按体积计百分比”、“体积百分比”、“体积%”、“v/v%”等在本文互换使用。溶液中溶质的体积百分比可用下式进行测定: $[(\text{溶质体积})/(\text{v溶液体积})] \times 100\%$ 。

[0060] 术语“重量%”、“重量百分比(重量%)”、“重量-重量百分比(重量/重量%)”等在本文互换使用。重量%是指物质在其被包含在组合物、混合物或溶液中时以质量计的百分比。除非另外指明,本文的所有百分比均为重量百分比。

[0061] 如本文所用,“多分散指数”、“PDI”、“非均匀性指数”、“分散性”等是指测量的给定聚合物(例如葡萄糖低聚物,例如可溶性 α -葡聚糖)样品中分子量分布,并且可通过将重均分子量除以数均分子量来计算($PDI = M_w/M_n$)。

[0062] 术语“增加的”、“增强的”和“改善的”在本文互换使用。这些术语是指更大的量或活性,例如稍大于初始量或活性的量或活性、或相较于初始量或活性大大过量的量或活性,并且包括介于其间的所有量或活性。另选地,这些术语可指例如该数量或活性与和它相比较的数量或活性相比,高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。

[0063] 如本文所用,对于多核苷酸或多肽序列,术语“序列同一性”或“同一性”是指在指定的比较窗范围为获得最大对应而比对时两条序列中相同的核酸碱基或氨基酸残基。因此,“序列同一性百分比”或“同一性百分比”指通过比较窗口上比较两个最佳对齐的序列而测得的值,其中在与参考序列(其不包含添加或缺失)进行比较时,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分可包含添加或缺失(即缺口)以实现两个序列的最佳比对。通过以下方式计算这种百分比:确定在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配的位置的数目,将匹配的位置的数目除以比较窗口中位置的总数目,然后将结果乘以100以得到序列同一性百分比。

[0064] 在National Center for Biotechnology Information (NCBI)网站在线可用的Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)算法可例如用于计算本文所公开的两个或更多个多核苷酸序列(BLASTN算法)或多肽序列(BLASTP算法)之间的百分比同一性。另选地,序列间的百分比同一性可使用Clustal算法(例如ClustalW或ClustalV)进行计算。对于使用Clustal比对方法的多重比对,默认值可相当于GAP PENALTY=10、以及GAP LENGTH PENALTY=10。用Clustal方法进行成对比对和蛋白质序列的百分比同一性计算的默认参数可为KTUPLE=1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5、以及DIAGONALS SAVED=5。对于核酸,这些参数可为KTUPLE=2、GAP PENALTY=5、WINDOW=4、以及DIAGONALS SAVED=4。仍另选地,序列之间的同一性百分比可采用EMBOSS算法(例如针(needle))进行,参数为例如GAP OPEN=10,GAPEXTEND=0.5,END GAP PENALTY=false,END GAP OPEN=10,END GAP EXTEND=0.5,采用BLOSUM矩阵(例如BLOSUM62)。

[0065] 本文公开了多种多肽氨基酸序列作为某些实施方案的特征。可使用与本文公开的序列至少约70-85%、85-90%、或90%-95%相同的这些序列的变体。另选地,变体氨基酸序

列与本文公开的序列可具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。本文变体氨基酸序列与公开序列具有相同的功能/活性,或者具有公开序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的功能/活性。

[0066] 如在某些实施方案中所用的术语“分离的”是指与其天然来源完全分离的任何细胞组分(例如分离的多核苷酸或多肽分子)。在一些情况下,分离的多核苷酸或多肽分子是较大组合物、缓冲体系或试剂混合物的一部分。例如,分离的多核苷酸或多肽分子可以异源方式包含在细胞或生物内。另一个示例为分离的 α -葡糖苷酶(例如葡糖淀粉酶、转葡糖苷酶)、或葡糖基转移酶。本文所公开的酶反应(例如 α -葡糖苷酶反应、葡糖基转移酶反应)是合成的、非天然存在的过程。

[0067] 本发明所公开的一些实施方案涉及一种使包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的糖的 α -1,5葡糖基-果糖键水解的方法。糖为二糖或低聚糖。该方法包括使糖与 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触。在接触步骤中, α -葡糖苷酶水解糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键。由于此种水解,糖量相较于接触步骤之前存在的糖量减少。因此,该水解方法或者可替换地称为降低组合物中糖量的方法。

[0068] 显著地,据信 α -葡糖苷酶可水解 α -1,5葡糖基-果糖键先前是未知的。根据该水解方法的 α -葡糖苷酶反应可因此用于从葡聚糖合成反应和/或从其获得的级分中除去包含 α -1,5葡糖基-果糖键的明串珠菌二糖及其它低聚糖副产物。此类去除示出相对于可导致葡聚糖产物降解的副产物去除化学过程(例如酸水解)有所改进。最终,根据以上水解方法处理的葡聚糖反应级分更适于例如下游应用如发酵,因为葡萄糖和果糖单糖的含量在级分中增加。对于下游过程,单糖相较于明串珠菌二糖和低聚糖副产物通常更易处理。

[0069] 在本文的实施方案中使用的 α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.20)水解包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的糖的 α -1,5葡糖基-果糖键。 α -葡糖苷酶先前已被鉴定用于催化水解释放低聚糖(例如二糖)和多糖底物的末端非还原的(1,4)-连接的 α -D-葡萄糖残基。本文现在公开的这些酶还对例如 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性。

[0070] α -葡糖苷酶可得自例如任何来源(例如植物、动物、微生物,如细菌或真菌/酵母),例如下文公开的转葡糖苷酶和/或葡糖淀粉酶可源于其的那些来源。例如, α -葡糖苷酶可为真菌的 α -葡糖苷酶。本文适宜的 α -葡糖苷酶의 其它示例包括在美国专利6355467、5922580、5795766、5763252和8633006中公开的那些,上述文献均以引用方式并入本文。

[0071] 在某些实施方案中, α -葡糖苷酶可以包括SEQ ID NO:5、6、8、9、11、12、14、15、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38的氨基酸序列,或DIAZYME RDF ULTRA(DuPont Industrial Biosciences)的氨基酸序列。另选地, α -葡糖苷酶可包括与SEQ ID NO:5、6、8、9、11、12、14、15、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38或DIAZYME RDF ULTRA的氨基酸序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且对糖的 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性。例如几种前述序列为缺少N-末端信号肽的成熟 α -葡糖苷酶。对于此类序列,应当理解,如果对其进行表达而并不使用信号肽(例如采用其中酶在细胞内表达并获自细胞裂解物的表达系统),则通常加入N-末端起始甲硫氨酸(如果必要的话)(直接地或经由插入异源氨基酸序列例如表位)。

[0072] 转葡萄糖苷酶(EC 2.4.1.24;1,4- α -葡聚糖6- α -葡萄糖基转移酶)可在本文的某些实施方案中用作 α -葡萄糖苷酶,以水解包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键的糖的 α -1,5葡萄糖基-果糖键。此类酶先前已被鉴定为在与特定 α -D-葡萄糖-低聚糖一起温育时催化水解和转移反应两者的D-葡萄糖基转移酶。如本文现在公开的转葡萄糖苷酶还对 α -1,5葡萄糖基-果糖键具有水解活性。

[0073] 本文的转葡萄糖苷酶可来源于任何微生物源,例如细菌或真菌。真菌的转葡萄糖苷酶的示例包括但不限于木霉属(*Trichoderma*)菌种(例如里氏木霉(*T.reesei*))、曲霉属(*Aspergillus*)菌种和新缝匠菌属(*Neosartorya*)菌种(例如*N.fischeri*)的那些。转葡萄糖苷酶可源于其的曲霉属菌种的示例包括但不限于黑曲霉(*A.niger*)、泡盛曲霉(*A.awamori*)、米曲霉(*A.oryzae*)、土曲霉(*A.terreus*)、棒曲霉(*A.clavatus*)、烟曲霉(*A.fumigatus*)和构巢曲霉(*A.nidulans*)。可用于本文的转葡萄糖苷酶的其他示例在Barker等人(1953, *J.Chem.Soc.* 3588-3593);Pazur等人(1986, *Carbohydr.Res.* 149:137-147), Nakamura等人(1997, *J.Biotechnol.* 53:75-84)和美国专利申请公开2008/0229514中有所描述,这些专利均以引用方式并入本文。可用于本文的转葡萄糖苷酶的其他示例是热稳定的那些;美国专利4689296公开了用于制备热稳定性转葡萄糖苷酶的方法,其公开内容以引用方式并入本文。可用于本文的转葡萄糖苷酶的更多示例可为在GENBANK数据库(NCBI)中的任何那些,例如登陆号:D45356 (GID:2645159,黑曲霉)、BAD06006.1 (GID:4031328,泡盛曲霉)、BAA08125.1 (GID:1054565,米曲霉)、XP_001210809.1 (GID:115492363,土曲霉)、XP_001216899.1 (GID:115433524,土曲霉)、XP_001271891.1 (GID:121707620,棒曲霉)、XP_751811.1 (GID:70993928,烟曲霉)、XP_659621.1 (GID:67523121,构巢曲霉)、XP_001266999.1 (GID:119500484,*N.fischeri*)和XP_001258585.1 (GID:119473371,*N.fischeri*),其均以引用方式并入本文。另选地,本文的转葡萄糖苷酶可具有与任何前述公开的转葡萄糖苷酶序列的氨基酸序列有至少90%或95%同一性的氨基酸序列,并且对糖的 α -1,5葡萄糖基-果糖键具有水解活性。当所有前述转葡萄糖苷酶用于本文的水解反应时,优选为缺少N-末端信号肽的成熟形式。

[0074] 在本文的某些实施方案中,转葡萄糖苷酶可包含SEQ ID NO:1(转葡萄糖苷酶L-2000)的氨基酸序列,其为黑曲霉转葡萄糖苷酶(美国专利申请公开2008/0229514)。另选地,转葡萄糖苷酶可包含与SEQ ID NO:1至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且对糖的 α -1,5葡萄糖基-果糖键具有水解活性。任何SEQ ID NO:1或其变体可例如根据美国专利申请公开2008/0229514的公开内容制得,该申请以引用方式并入本文。SEQ ID NO:1为缺少N-末端信号肽的成熟转葡萄糖苷酶。因为SEQ ID NO:1未以甲硫氨酸残基开始,应当理解,如果对其进行表达而并不使用信号肽(例如采用其中酶在细胞内表达并获自细胞裂解物的表达系统),则通常将N-末端起始甲硫氨酸加至SEQ ID NO:1(直接地或经由插入异源氨基酸序列如表位)。

[0075] 葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3; α -1,4-葡聚糖葡萄糖水解酶)可在本文的某些实施方案中用作 α -葡萄糖苷酶,以水解包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键的糖的 α -1,5葡萄糖基-果糖键。该类酶先前已被鉴定为催化水解含葡萄糖的二糖、低聚糖和多糖非还原端的 α -1,4和 α -1,6糖苷键两者的外作用酶。如本文现在公开的葡糖淀粉酶还对 α -1,5葡萄糖基-果糖键具有水解活性。在某些实施方案中, α -葡萄糖苷酶不为葡糖淀粉酶。

[0076] 本文的葡糖淀粉酶可来源于任何微生物源,例如细菌或真菌。细菌的葡糖淀粉酶的示例包括但不限于芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌种(例如嗜碱芽孢杆菌(*B.alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*)、迟缓芽孢杆菌(*B.lentus*)、地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*B.stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*B.thuringiensis*))和链霉菌属(*Streptomyces*)菌种(例如(*S.lividans*))的那些。真菌的葡糖淀粉酶的示例包括但不限于木霉属菌种(例如里氏木霉、长枝木霉(*T.longibrachiatum*)、*T.strictipilis*、棘孢木霉(*T.asperellum*)、康长木霉(*T.konilangbra*)、哈茨木霉(*T.hazianum*))、曲霉属菌种(例如黑曲霉、米曲霉、土曲霉、棒曲霉、构巢曲霉、白曲霉、泡盛曲霉)、根霉菌属(*Rhizopus*)菌种(例如米根霉(*R.oryzae*)、雪根霉(*R.niveus*))、踝节菌属(*Talaromyces*)菌种(例如埃默森蓝状菌(*T.emersonii*)、嗜热放线菌(*T.thermophilus*)、*T.duponti*)、毛霉菌属(*Mucor*)菌种、肉座菌属(*Hypocrea*)菌种(例如*H.gelatinosa*、*H.orientalis*、*H.vinosa*、*H.citrina*)、镰孢属(*Fusarium*)菌种(例如尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)、玫瑰色镰孢(*F.roseum*)、*F.venenatum*)、链孢霉属(*Neurospora*)菌种(例如粗糙链孢霉(*N.crassa*))、腐质霉属(*Humicola*)菌种(例如灰腐质霉(*H.grisea*)、*H.insolens*、柔毛腐质霉(*H.lanuginose*))、青霉属(*Penicillium*)菌种(例如特异青霉(*P.notatum*)、产黄青霉(*P.chrysogenum*))和活性酵母属(*Saccharomycopsis*)菌种(例如扣囊复膜酵母(*S.fibuligera*))的那些。用于本文的这些细菌和真菌葡糖淀粉酶的示例公开于美国专利申请公开2013/0102035中,该文献以引用的方式并入本文。可用于本文的葡糖淀粉酶的其它示例在Svensson等人(1983,*Carlsberg Res.Comm.*48:529-544)、Boel等人(1984,*EMBO J.*3:1097-1102)、Havashida等人(1989,*Agric.Biol.Chem.*53:923-929);美国专利5024941、美国专利4794175、美国专利4247637、美国专利6255084、美国专利6620924、Ashikari等人(1986,*Agric.Biol.Chem.*50:957-964)、Ashikari等人(1989,*Appl.Microbiol.Biotechnol.*32:129-133)、美国专利4863864;美国专利4618579、Houghton-Larsen等人(2003,*Appl.Microbiol.Biotechnol.*62:210-217)和美国专利7413887中有所描述,这些专利均以引用方式并入本文。另选地,本文的葡糖淀粉酶可具有与任何前述公开的葡糖淀粉酶序列的氨基酸序列有至少90%或95%同一性的氨基酸序列,并且对糖的 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性。当所有前述葡糖淀粉酶用于本文的水解反应时,优选为缺少N-末端信号肽的成熟形式。可用于本文的可商购获得的葡糖淀粉酶包括例如OPTIDEX L-400、GC 147、GC 321、G ZYME G990 4X、OPTIMAX 7525、DEXTROZYME、DISTILLASE和GLUCZYME。

[0077] 在本文的某些实施方案中,葡糖淀粉酶可包含SEQ ID NO:2(GC 321)的氨基酸序列,其为里氏木霉葡糖淀粉酶。另选地,葡糖淀粉酶可包含与SEQ ID NO:2至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且对糖的 α -1,5葡糖基-果糖键具有水解活性。任何SEQ ID NO:2或其变体可例如根据美国专利7413887或美国专利申请公开2013/0102035的公开内容制得,这些申请以引用方式并入本文。SEQ ID NO:2为缺少N-末端信号肽的成熟葡糖淀粉酶。因为SEQ ID NO:2未以甲硫氨酸残基开始,应当理解,如果对其进行表达而并不使用信号肽(例如采用其中酶在细胞内表达并获自细胞裂解物的表达系统),则通常将N-末端起始甲硫氨酸加至SEQ ID NO:2(直接地或经由插入异源氨基酸序列如表位)。

[0078] 本文的 α -葡糖苷酶例如转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶可得自商业来源(例如DuPont Industrial Biosciences/Genencor, USA; Megazyme International, Ireland; Amano Enzyme Inc., Japan)。另选地, 此类酶可通过本领域已知的任何方法制得, 例如在美国专利申请公开2008/0229514、美国专利7413887或美国专利申请公开2013/0102035中所描述的, 这些申请以引用的方式并入本文。例如, α -葡糖苷酶可在异源表达系统中重组产生, 例如微生物或真菌异源表达系统。异源表达系统的示例包括细菌(例如大肠杆菌(*E. coli*))、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.))和真核系统。真核系统可采用例如酵母(例如, 毕赤酵母属(*Pichia* sp.))、酵母属(*Saccharomyces* sp.))或真菌(例如, 木霉属, 例如里氏木霉; 曲霉属菌种, 例如黑曲霉)表达系统。SEQ ID NO:1的转葡糖苷酶和SEQ ID NO:2的葡糖淀粉酶以及它们的变体可例如在里氏木霉宿主中表达。

[0079] 当 α -葡糖苷酶用于本文的水解反应时, 优选为缺少N-末端信号肽的成熟形式。用于产生本文的成熟 α -葡糖苷酶的表达系统可采用编码酶的多核苷酸, 该编码酶的多核苷酸还包含编码N-末端信号肽的序列来指导胞外分泌。在此类实施方案中, 在分泌过程期间信号肽从酶上切割下来。信号肽对转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶而言可以是天然的或异源的。另选地, 成熟形式的 α -葡糖苷酶可通过例如采用其中酶在细胞内表达并获自细胞裂解液的表达系统对其进行表达(不使用信号肽)来提供。在任一种情况下(分泌或细胞内表达), 异源氨基酸序列例如表位可任选地包含在 α -葡糖苷酶的N-末端。

[0080] 在某些实施方案中, 可在本文水解反应中通过直接使用表达一种或多种酶的细胞来提供 α -葡糖苷酶。换句话说, 与糖接触的 α -葡糖苷酶可因其由置于用于水解的合适条件下的细胞表达而存在。此类细胞因此可用于代替添加至水解反应的分离的 α -葡糖苷酶制剂。用于该目的的细胞可为例如细菌、酵母或真菌细胞。酵母的示例包括得自以下的那些: 酵母属(例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*))、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、许旺酵母属(*Schwanniomyces*)。可用于本文的其它表达系统公开于美国专利申请公开2013/0323822中, 该申请以引用的方式并入本文。

[0081] 本文的糖包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键。因此, 根据糖的长度, 其可包含例如1、2、3、4、5、6、7或8个 α -1,5葡糖基-果糖键。糖优选包含1、2或3个此类键。

[0082] 因为本文的糖包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键, 所以糖包含至少一个葡萄糖单元和至少一个果糖单元。在某些实施方案中, 本文的糖仅包含葡萄糖和果糖单元。此类组合物可表现为葡聚糖合成反应的二糖和低聚糖副产物。另选地, 除了葡萄糖和果糖之外, 本文的糖还可包含其它单糖, 例如半乳糖、核糖和木糖。

[0083] 本发明公开的在某些实施方案中水解的糖可为低聚糖。本文的低聚糖可具有例如2、3、4、5、6、7、8或9个单糖单元。如在本领域中所理解的, 本文的低聚糖可参照其聚合度(DP)数目——这指定了低聚糖中单体单元的数目。例如, DP3低聚糖具有3个单体单元。因此, 低聚糖可例如为DP3、DP4、DP5、DP6、DP7、DP8或DP9低聚糖。在某些实施方案中, 糖的DP为3至7(即, DP 3-7)。

[0084] 除了至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键之外(需注意, 具有2个单糖单元的低聚糖——即二糖——为明串珠菌二糖, 给出在本文的水解方法中的糖具有至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键), 本文的具有3个或更多个单糖单元的低聚糖还可包含其它键。例如, 在低聚糖中也可

存在 α -1,3、 α -1,6和/或 α -1,4键,其也易于被如本文所示的 α -葡糖苷酶水解。

[0085] 在某些实施方案中,糖仅包含经 α -1,3和/或 α -1,6糖苷键连接的葡萄糖单体。因此,此类低聚糖仅包含 α -1,3葡糖基-葡萄糖键和/或 α -1,6葡糖基-葡萄糖键。此类低聚糖的示例仅包含 α -1,3键或 α -1,6键。在某些实施方案中,低聚糖可包含至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%葡糖基-葡萄糖键。在其它实施方案中,在本文的低聚糖中可存在约75-85%的 α -1,3葡糖基-葡萄糖键和约15-25%的 α -1,6葡糖基-葡萄糖键。另选地,本文的低聚糖可包含任意百分比(介于1%至99%之间的任意整数值的) α -1,3葡糖基-葡萄糖键和任意百分比(介于1%至99%之间的任意整数值的) α -1,6葡糖基-葡萄糖键,只要这些百分比不大于100%即可。任何这些低聚糖可在得自葡聚糖合成反应的级分之中,该葡聚糖合成反应产生例如(i)不溶性 α -葡聚糖(例如聚 α -1,3-葡聚糖),或(ii)可溶性 α -葡聚糖产物。该键含量可表征:(i)单独的各个低聚糖,或(ii)一组低聚糖(即平均键含量)。仅包含经由 α -1,3和/或 α -1,6糖苷键连接的葡萄糖单体的低聚糖可例如为DP2-DP7或DP3-DP7。应当理解,键在低聚糖中的具体分布可根据产生低聚糖副产物的葡聚糖合成反应的条件(例如gtf酶)而变化。还应当理解,键的具体分布对于当前公开的方法并非至关重要的。

[0086] 本文的示例展示了 α -葡糖苷酶(例如转葡糖苷酶和葡糖淀粉酶)可水解(i)包含 α -1,5葡糖基-果糖键的明串珠菌二糖,和(ii)仅包含 α -1,3葡糖基-葡萄糖和/或 α -1,6葡糖基-葡萄糖键的低聚糖两者。因此,可例如在用于水解 α -1,5葡糖基-果糖键、 α -1,3葡糖基-葡萄糖键和/或 α -1,6葡糖基-葡萄糖键的反应中使用 α -葡糖苷酶。

[0087] 本文的糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键可被本文的 α -葡糖苷酶水解。另选地,据信糖的2、3、4、5或更多个 α -1,5葡糖基-果糖键可例如被 α -葡糖苷酶水解。在某些实施方案中,至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的水解可在糖的非还原端发生。例如,其中糖为二糖即明串珠菌二糖,非还原端葡萄糖从果糖上裂解下来,获得游离的葡萄糖和果糖。又如,其中糖为具有 α -1,5连接至果糖的非还原端葡萄糖的低聚糖,据信该葡萄糖可被裂解掉,在低聚糖的非还原端处留下果糖残基。

[0088] 公开的水解方法中糖的量相较于接触步骤之前存在的糖的量减少。该减少起因于糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的水解断裂。在本文水解方法中,接触步骤之后的糖量(例如浓度)可小于接触步骤之前(在使本文 α -葡糖苷酶与糖在合适的条件下接触之前)所存在糖量的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或介于1%至90%之间的任意整数值的)。

[0089] 本发明公开的在某些实施方案中水解的糖为明串珠菌二糖,其为具有 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖。在本文水解方法中,接触步骤之后的明串珠菌二糖的浓度可小于接触步骤之前(在使本文 α -葡糖苷酶与明串珠菌二糖在合适的条件下接触之前)存在的明串珠菌二糖的浓度的约1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或介于1%至90%之间的任意整数值的)。在本文的某些方面,水解方法可替换地称为降低组合物中明串珠菌二糖的量的方法。

[0090] 在本文的水解方法中,可例如使明串珠菌二糖与转葡糖苷酶例如包含SEQ ID NO: 1的转葡糖苷酶(转葡糖苷酶L-2000)接触。在某些实施方案中,完成该方法之后的明串珠菌二糖的浓度可小于初始明串珠菌二糖浓度约1-3%。

[0091] 公开的水解方法中糖的量相较于接触步骤之前存在的糖的量减少。应当理解该比较可按照任何方式进行。例如,可在进行水解方法之前和之后两者测定糖浓度。另选地,除了未将如当前公开的 α -葡萄糖苷酶添加到对照反应之外,可相对于具有相同条件的对照反应进行比较。

[0092] 在某些实施方案中, α -葡萄糖苷酶可以是固定的。可使用本领域已知的任何方法和/或方式来固定酶,例如在美国专利5541097和4713333中公开的那些,这两个专利均以引用方式并入本文。例如,可通过使一种或多种酶与胺反应性材料(例如戊二醛)接触以形成加合物(例如酶-戊二醛加合物),其后将该加合物结合到经聚胺(例如聚乙烯亚胺,如EPOMIN P-1050)处理的固体载体上来固定一种或多种酶。

[0093] 在某些实施方案中,可使 α -葡萄糖苷酶固定到其上的固体载体(固体支持体)可为无机或有机材料。此类材料包括例如 γ -氧化铝、二氧化钛、粒状活性炭、粒状硅藻土、玻璃珠、多孔玻璃、浮岩、硅胶、金属氧化物和氧化铝。

[0094] 聚胺可用于处理固体载体,由此使得固体载体随后暴露于包括酶和胺反应性材料的加合物,导致酶结合至固体载体。可用于本文的聚胺的示例包括:聚乙烯二胺、聚乙烯亚胺(例如聚二亚乙基三胺、聚三亚乙基四胺、聚五亚乙基六胺、聚六亚甲基二胺)、聚亚甲基二乙基胺、聚亚甲基二苯胺、聚四亚乙基五胺、聚亚苯基二胺以及两种或更多种这些聚胺化合物的共混物。优选的聚胺是水溶性的并且/或者具有约500至100,000道尔顿的分子量。可在某些实施方案中使用聚乙烯亚胺例如EPOMIN P-1050。

[0095] 用于制备包含本文的酶的加合物的胺反应性材料可例如为醛、有机卤化物、酸酐、偶氮化合物、异硫氰酸酯和/或异氰酸酯。这些胺反应性材料的示例包括:戊二醛、琥珀醛、对苯二甲醛、二-重氮联苯胺-2,2'-二磺酸、4,4'-二氟-3,3'-二硝基二苯砜、二苯基-4,4'-二硫氰酸酯-2,2'-二磺酸、3-甲氧基二苯基甲烷-4,4'-二异氰酸酯、甲苯-2-异氰酸酯-4-异硫氰酸酯、甲苯-2,-4-二异氰酸酯、重氮联苯胺、重氮联苯胺-3,3'-邻联茴香胺、N,N'-六亚甲基二碘乙酰胺、六亚甲基二异氰酸酯、三聚氯氰、和/或1,5-二氟-2,4-二硝基苯。优选地,胺反应性材料为醛,例如戊二醛。

[0096] 可使与胺反应性化合物加合的 α -葡萄糖苷酶与经聚胺处理的固体载体接触,从而使酶固定在固体载体上。本文固定的酶可用于各种反应器系统中,例如柱(例如填充柱)或搅拌槽反应器,以进行如本文公开的水解反应。

[0097] 用于使本文的糖与本文的 α -葡萄糖苷酶(例如转葡萄糖苷酶或葡萄糖淀粉酶)接触的合适的条件是支持糖的一个或多个 α -1,5葡萄糖基-果糖键被 α -葡萄糖苷酶水解的那些条件。合适的条件的示例公开于以下实施例中。用于使本文的 α -葡萄糖苷酶与糖底物接触的条件(例如温度、pH、时间)也公开于美国专利申请公开2008/0229514、美国专利7413887和美国专利申请公开2013/0102035中(这些专利均以引用方式并入本文),并且也可适用于所公开的水解方法。

[0098] 在公开的水解方法中,二糖和低聚糖通常能够溶于水或水性溶液。因此,使本文的糖与 α -葡萄糖苷酶接触优选在其中溶解糖的合适的水性条件下进行。水性条件可表现为包含至少约20重量%水的溶液或混合物。另选地,本文的水性条件例如为至少约20、30、40、50、60、70、80、85、90或95重量%水(或介于20至95重量%之间的任意整数值)。水性条件还可包括例如合适浓度的缓冲液,例如酸性、中性或碱性缓冲液,并且基于由缓冲液提供的pH范围

来选择。缓冲液/缓冲剂的示例包括柠檬酸盐、乙酸盐(例如乙酸钠)、 KH_2PO_4 、MOPS、CHES、硼酸盐、碳酸钠和碳酸氢钠。

[0099] 本文的水解反应的pH例如可为约3.0至9.0。水解反应pH例如可为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5或9.0。另选地,pH可为约4-5。用于设定pH的技术包括使用例如缓冲液、碱、和/或酸,并且在本领域中是公知的。

[0100] 本文的水解反应的温度例如可为约20℃至约80℃。水解反应温度例如可为约20、30、40、50、60、70或80℃(或介于20至80℃之间的任意整数值)。在某些实施方案中,约60℃、65℃或60-65℃的水解温度是优选的。

[0101] 本文的水解反应可进行例如至少约10分钟至约90小时的时段。水解反应的时间例如可为至少约0.5、1、2、3、4、8、12、16、20、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84或90小时(或介于0.5至72小时之间的任意整数值)。在例如对明串珠菌二糖进行水解的某些实施方案中,水解反应的可例如进行小于4小时(例如0.5-4小时)。实现期望的水解水平所需的时间段将根据所用具体条件来变化,并且本领域技术人员可以理解。例如,使添加至反应或固定到用于反应的固体载体上的酶量增加将减少接触时间。

[0102] 在某些实施方案中,本文的一种或多种 α -葡萄糖苷酶可用于水解反应。例如,转葡萄糖苷酶和葡萄糖淀粉酶两者可用于反应。在本文的水解反应中, α -葡萄糖苷酶的量可例如比任何用于以下实施例(例如实施例2)的量增/减10%至20%(或5%至10%)。另选地,约0.1-0.5体积%或0.1-1.0体积%的 α -葡萄糖苷酶可用于水解反应。仍另选地,本文的 α -葡萄糖苷酶以约、或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15ppm用于水解反应。转葡萄糖苷酶单位(TGU)可例如定义为在以下测定的条件下每分钟产生一微摩尔潘糖的转葡萄糖苷酶的量。转葡萄糖苷酶活性可例如如下测定:将转葡萄糖苷酶引入包含4mM对-硝基苯基- α -葡萄糖苷和1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的100mM乙酸钠缓冲液(pH 4.5)中。在30℃下温育30分钟之后,通过添加等体积的1M碳酸钠终止反应,并记录OD₄₀₅。葡萄糖淀粉酶单位(XU)可例如定义为将产生1g还原糖的葡萄糖淀粉酶的量,计算为在pH 4.2和60℃下每小时来自可溶性淀粉底物(4%DS[取代度])的葡萄糖。

[0103] 在本发明公开的某些实施方案中,水解反应中糖的初始浓度可例如为约1重量%至50重量%。例如,明串珠菌二糖的浓度可为约5、10、15、20、25、30、35或40重量%(或介于5至40重量%之间的任意整数值)。又如,在本文的水解反应中,一种或多种低聚糖(例如DP2、DP3、DP4、DP2-DP7、DP3-DP7)的浓度可为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15重量%。本领域的技术人员认识到,总糖(包括二糖和低聚糖)的浓度可对 α -葡萄糖苷酶的活性有影响;在一些方面,在水解反应中使酶活性最大化的优选的总糖浓度可小于50重量%干固体(DS),最优选的浓度为20-35重量%DS。

[0104] 在某些实施方案中,用于使糖与本文的 α -葡萄糖苷酶接触的合适的条件可包括:(i)葡聚糖合成反应,或(ii)从葡聚糖合成反应获得的级分;其中糖为葡聚糖合成反应的副产物。换句话讲,本文的水解反应可在葡聚糖合成反应的范围中或葡聚糖合成反应的一部分中进行,虽然其通常在后者之中进行。本文的葡聚糖合成反应可例如产生一种或多种不溶性和/或可溶性 α -葡聚糖产物。因此,在本文的一些实施方案中,葡聚糖合成反应可特征化为“ α -葡聚糖合成反应”。

[0105] 葡聚糖合成反应通常涉及这样一种溶液:其包含至少一种蔗糖、水和一种活性葡

糖基转移酶、以及任选的其它组分。可在葡聚糖合成反应中的其它组分包括果糖、葡萄糖、明串珠菌二糖、可溶性低聚糖(例如DP2-DP7)、以及一种或多种可溶性葡聚糖产物。另外,在一些方面,葡聚糖合成反应可包括一种或多种 α -葡聚糖水解酶。应当理解,某些葡聚糖产物例如DP为至少8或9的聚 α -1,3-葡聚糖可以是水不溶性的并因此在葡聚糖合成反应中不溶解,而是可以析出溶液。因此,由本文的葡聚糖合成反应产生的葡聚糖可以是不溶性的。可将本文的 α -葡糖苷酶在葡聚糖合成反应的任何阶段添加至其中,例如在反应初始制备期间或当反应接近完成(例如,完成80至90%)或完成时,其中后两个时间点是优选的。

[0106] 本文的葡聚糖合成反应除了产生葡聚糖产物之外,还可产生副产物例如明串珠菌二糖和/或可溶性低聚糖。在一些方面,葡聚糖为聚 α -葡聚糖。因此,本文的葡聚糖合成反应可例如用于产生聚 α -1,3-葡聚糖或齿斑葡聚糖,其通常在葡聚糖合成反应中与至少一种明串珠菌二糖和/或低聚糖副产物共同产生。

[0107] 在某些实施方案中,葡聚糖合成反应包括产生聚 α -葡聚糖例如 α -1,3-葡聚糖的葡糖基转移酶。可用于本文的此类葡糖基转移酶的示例公开于美国专利7000000和美国专利申请公开2013/0244288、2013/0244287和2014/0087431,这些专利均以引用方式并入本文。

[0108] 本文的葡糖基转移酶可来源于任何微生物源,例如细菌或真菌。细菌葡糖基转移酶的示例为来源于链球菌属(*Streptococcus*)菌种、明串珠菌属(*Leuconostoc*)菌种或乳杆菌属(*Lactobacillus*)菌种的那些。链球菌属菌种的示例包括唾液乳杆菌(*S.salivarius*)、表兄链球菌(*S.sobrinus*)、*S.dentirousetti*、汗毛链球菌(*S.downei*)、变异链球菌(*S.mutans*)、口腔链球菌(*S.oralis*)、解没食子酸链球菌(*S.gallolyticus*)和血链球菌(*S.sanguinis*)。明串珠菌属菌种的示例包括(*L.mesenteroides*)、肠膜明串珠菌(*L.amelibiosum*)、阿根廷明串珠菌(*L.argentinum*)、肉明串珠菌(*L.carnosum*)、嗜柠檬酸明串珠菌(*L.citreum*)、乳脂链球菌(*L.cremoris*)、葡聚糖明串珠菌(*L.dextranicum*)和*L.fructosum*。乳杆菌属菌种的示例包括嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)、德氏乳杆菌(*L.delbrueckii*)、(*L.helveticus*)、瑞士乳杆菌(*L.salivarius*)、干酪乳酸杆菌(*L.casei*)、弯曲乳杆菌(*L.curvatus*)、植物乳杆菌(*L.plantarum*)、清酒乳杆菌(*L.sakei*)、短乳杆菌(*L.brevis*)、(*L.buchneri*)、布氏乳杆菌(*L.fermentum*)和罗伊氏乳杆菌(*L.reuteri*)。

[0109] 本文的葡糖基转移酶可不依赖引物或依赖引物。不依赖引物的葡糖基转移酶不需要存在进行葡聚糖合成的引物。在聚合物合成期间,依赖引物的葡糖基转移酶需要反应溶液中存在充当酶引物的起始分子。如本文所用,术语“引物”是指任何能够用作葡糖基转移酶的引发剂的分子。可用于某些实施方案的引物包括例如葡聚糖及其它碳水化合物基引物,例如水解的葡聚糖。美国专利申请公开2013/0244287(其以引用方式并入本文)公开了将聚 α -1,3-葡聚糖用作起始材料来制备水解的葡聚糖。用作引物的葡聚糖可为例如葡聚糖T10(即具有10kD分子量的葡聚糖)。

[0110] 用于本文的葡聚糖合成反应的葡糖基转移酶可通过在本领域已知的任何方法产生。例如,葡糖基转移酶可在异源表达系统,例如微生物异源表达系统中重组产生。异源表达系统的示例包括细菌(例如大肠杆菌,如TOP10或MG1655;芽孢杆菌属)和真核(例如酵母,如毕赤酵母属和酵母属)表达系统。

[0111] 本文所述葡糖基转移酶可以以任何纯化态(例如纯或不纯的)使用。例如,葡糖基

转移酶在其临用前可以是纯化和/或分离的。不纯的葡糖基转移酶的示例包括细胞裂解液形式的那些。细胞裂解液或提取物可从用于异源表达酶的细菌(例如大肠杆菌)得到。例如,可使用French压碎器对细菌进行破坏。在另选的实施方案中,可用匀浆器(例如APV, Rannie, Gaulin)使细菌匀浆化。葡糖基转移酶通常能够溶于这些类型的制剂中。本文的细菌细胞裂解液、提取物、或均浆例如可以以约0.15-0.3% (v/v) 用于反应溶液,从而由蔗糖产生聚 α -葡聚糖,例如聚 α -1,3-葡聚糖。

[0112] 如果期望,可对本文的葡聚糖合成反应的温度进行控制。在某些实施方案中,反应的温度为约5℃至约50℃。在某些其它实施方案中,温度为约20℃至约40℃。

[0113] 在本文的葡聚糖合成反应中,蔗糖的初始浓度可为例如约20g/L至约400g/L。另选地,蔗糖的初始浓度可为约75g/L至约175g/L、或约50g/L至约150g/L。仍另选地,蔗糖的初始浓度可为例如约40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150或160g/L(或介于40至160g/L之间的任意整数值)。“蔗糖的初始浓度”是指仅在添加所有反应溶液组分(至少水、蔗糖、gtf酶)之后gtf反应溶液中的蔗糖浓度。

[0114] 用于本文的葡聚糖合成反应的蔗糖可以是高纯度的($\geq 99.5\%$)或为任何其它纯度或等级。例如,蔗糖可具有至少99.0%的纯度或者可为试剂级蔗糖。又如,可使用未完全精制的蔗糖。本文的未完全精制的蔗糖是指未加工为精制白蔗糖的蔗糖。因此,未完全精制的蔗糖可为完全未精制的或部分精制的。未精制的蔗糖的示例为“粗蔗糖”(“粗糖”)及其溶液。部分精制的蔗糖的示例未经历一个、两个、三个或更多个结晶步骤。本文的未完全精制的蔗糖的ICUMSA(International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis)可例如大于150。本文蔗糖可来源于任何可再生糖源,例如甘蔗、糖用甜菜、木薯、甜高粱或玉米。可用于本文的适宜形式的蔗糖例如为结晶形式或非结晶形式(例如糖浆、蔗汁、甜菜汁)。未完全精制的蔗糖的另外适宜形式公开于美国申请61/969,958。

[0115] 测定蔗糖ICUMSA值的方法在本领域中是公知的,并且例如由International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis公开为ICUMSA Methods of Sugar Analysis: Official and Tentative Methods Recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA) (H.C.S.de Whalley编辑, Elsevier Pub. Co., 1964), 该文献引用方式并入本文。ICUMSA可例如如由R.J. McCowage, R.M. Urquhart 和 M.L. Burge (Determination of the Solution Colour of Raw Sugars, Brown Sugars and Coloured Syrups at pH 7.0-Official, Verlag Dr Albert Bartens, 2011修订版)所述的ICUMSA方法GS1/3-7测定, 该文献以引用方式并入本文。

[0116] 在某些实施方案中,葡聚糖合成反应的pH可为约4.0至约8.0。另选地,pH可为约4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5或8.0。可以通过添加或掺入合适的缓冲液来调节或控制pH,该缓冲液包括但不限于:磷酸盐、tris、柠檬酸盐、或它们的组合。葡聚糖合成反应的缓冲液浓度可例如为0mM至约100mM、或约10、20、或50mM。

[0117] 在本文的葡聚糖合成反应中产生的聚 α -1,3-葡聚糖可具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或介于50%至100%之间的任意整数值) α -1,3糖苷键。在此类实施方案中,聚 α -1,3-葡聚糖具有少于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或0%(或介于0%至50%之间的任意整数值)的非 α -1,3

糖苷键。

[0118] 本文的聚 α -1,3-葡聚糖优选具有直链的/非支链的主链。在某些实施方案中,聚 α -1,3-葡聚糖不具有分枝点或具有小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%分枝点(作为聚合物中糖苷键的百分比)。分枝点的示例包括 α -1,6分枝点。

[0119] 本文的葡聚糖合成反应中产生的聚 α -1,3-葡聚糖的分子量可测定为数均分子量(M_n)或重均分子量(M_w)。另选地,分子量可按道尔顿或克/摩尔计测定。其也可用来指聚 α -1,3-葡聚糖聚合物的 DP_w (重均聚合度)或 DP_n (数均聚合度)。

[0120] 本文的聚 α -1,3-葡聚糖的 M_n 或 M_w 可为至少约1000。另选地, M_n 或 M_w 可例如为至少约1000至约600000(或介于1000至600000之间的任意整数值)。仍另选地,聚 α -1,3-葡聚糖可具有这样的分子量:至少约100、或至少约100至1000(或介于100至1000之间的任意整数值)的 M_n 或 M_w 。

[0121] 葡聚糖合成反应的级分可构成用于使糖与如当前公开的 α -葡糖苷酶接触的合适的条件。级分可为得自葡聚糖合成反应的部分或全部液体溶液。通常,使级分与反应中合成的一种或多种可溶性或不溶性葡聚糖产物分离。例如,可使级分与一种或多种在其合成期间从溶液析出的不溶于水的葡聚糖产物(例如聚 α -1,3葡聚糖)分离。在本公开的某些优选的实施方案中的级分得自聚 α -1,3-葡聚糖合成反应。

[0122] 在某些实施方案中,级分的体积(在任选地稀释或浓缩级分之前,参见下文)可为从中获取该级分的葡聚糖合成反应的体积的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或介于10%至90%之间的任意整数值)。通常,在产生不溶性葡聚糖(例如聚 α -1,3葡聚糖)的葡聚糖合成反应中,级分将为反应的液体溶液组分的一部分(并非全部)。可在葡聚糖合成反应的任何阶段获得级分,但是优选在反应接近完成(例如大于完成的80%或90%)或完成之后获得。

[0123] 在某些实施方案中,葡聚糖合成反应的级分的示例包括滤液和上清液。因此,在其中合成不溶性葡聚糖产物的那些实施方案中,可使用漏斗、过滤器(例如压滤器)、离心机、或本领域已知的允许从固体中移除一些或全部液体的任何其它方法或设备来从葡聚糖合成反应获得(分离)本文的级分。过滤可例如通过重力、真空、或压滤进行。过滤优选地除去全部或大部分不溶性葡聚糖;可使用平均孔尺寸(例如约40-50微米)足以从液体中移除固体的任何过滤材料(例如滤纸)。级分通常保留全部或大部分其溶解的组分,例如葡聚糖合成反应的副产物。在本文的滤液中,明串珠菌二糖是优选的糖。

[0124] 如果期望,可对本文的级分进行任选地稀释或浓缩。级分的浓缩可采用适于浓缩溶液的本领域已知的任何其它方法或设备进行。例如,可通过蒸发,例如用旋转蒸发仪(例如,设定为约40-50℃的温度)来浓缩级分。在本文的一些方面,可使级分浓缩至这样的体积:约初始级分体积的75%、80%、85%、90%或95%。经浓缩的级分(例如经浓缩滤液)可任选地称为糖浆。

[0125] 级分在一些方面可包含水,该水替代从中获得级分的组合物中存在的水。例如,可在其中初始溶剂被另一种溶剂替代的某些色谱方法中从葡聚糖合成反应分离一种或多种糖副产物(例如结合至柱的糖副产物[由此从初始溶剂中移除]可洗脱到新溶剂中)。

[0126] 在一些方面,可以以这样的方式处理级分:具有以上公开的用于使糖与 α -葡糖苷酶接触的任何合适条件(例如,温度、pH和试剂)。例如,在 α -葡糖苷酶添加至级分之前,可使

级分改变为具有约4至5的pH。又如,关于级分的水解反应的温度可为约55–65℃(例如约60℃)。又如,已浓缩为糖浆的级分可用于水解反应。

[0127] 级分在本文的某些优选的实施方案中得自聚 α -1,3-葡聚糖合成反应;例如级分优选地为滤液。本文的聚 α -1,3-葡聚糖合成反应的级分至少包括水、果糖、以及一种或多种类型的糖(明串珠菌二糖和/或低聚糖,例如DP2–DP7)。可在该类级分中的其它组分例如包括蔗糖(即在gtf反应中未消耗的残余的蔗糖)、一种或多种gtf酶、葡萄糖、缓冲液、盐、FermaSure[®]、硼酸盐、氢氧化钠、盐酸、细胞裂解液组分、蛋白质和/或核酸。最低限度地,得自聚 α -1,3-葡聚糖合成反应的级分的组分包括例如水、果糖、葡萄糖、一种或多种类型的糖(明串珠菌二糖和/或低聚糖,例如DP2–DP7)、以及任选的蔗糖。应当理解,级分的组成部分取决于从中获得级分的葡聚糖合成反应的条件。在包含一种或多种gtf酶的那些级分中,优选地,在本文的水解反应中使用级分之前,此类一种或多种gtf酶失活(例如热失活)。

[0128] 应当理解,在葡聚糖合成反应中经由聚合蔗糖产生的糖副产物的具体分布可基于所用反应条件和gtf酶,尤其是温度和蔗糖浓度而变化。还应当理解,糖在葡聚糖合成反应的级分中的具体组成对于公开的水解方法并非至关重要的。一般来讲,随着蔗糖的量增大,反应对明串珠菌二糖和低聚糖两者的选择性将增大。相反地,随着温度增大,反应对明串珠菌二糖的选择性趋于降低,而对于低聚糖的选择性大体上未受到影响。应当理解,通过将糖的质量除以总溶液重量计算的糖与水的比率即重量%干固体(DS)可通过使水蒸发(优选地在真空下和低于50℃的温度下)或添加水来调节,而大体上不会影响糖在葡聚糖合成反应的级分中的相对分布。还可以通过在实现完全转化(转化为葡聚糖)之前终止gtf反应来增大级分中蔗糖的百分比,该终止通过将pH降低到低于gtf酶的活性范围或通过使gtf酶热失活实现。

[0129] 在某些实施方案中,本文的葡聚糖合成反应可产生一种或多种可溶性 α -葡聚糖产物。可溶性 α -葡聚糖产物(或者“可溶性纤维”)可为:(i) 葡糖基转移酶的直接产物,或(ii) 葡糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用的产物,所述 α -葡聚糖水解酶能够水解具有一个或多个 α -1,3-糖苷键或一个或多个 α -1,6-糖苷键的葡聚糖聚合物。

[0130] 本文的可溶性 α -葡聚糖可包括,例如:

[0131] a) 至少75% α -1,3-糖苷键;

[0132] b) 少于25% α -1,6-糖苷键;

[0133] c) 少于10% α -1,3,6-糖苷键;

[0134] d) 小于5000道尔顿的 M_w ;

[0135] e) 在20℃下,在水中12重量%下,小于0.25帕斯卡秒(Pa·s)的粘度;

[0136] f) 范围为4至40的右旋糖当量(DE);

[0137] g) 小于10%的消化性,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测;

[0138] h) 在25℃下,pH 7水中至少20%(w/w)的溶解度;和

[0139] i) 小于5的多分散指数(PDI)。

[0140] 可如美国申请62/004,290所公开来制备此类可溶性 α -葡聚糖。

[0141] 例如,可溶性 α -葡聚糖纤维组合物可包含至少75%、优选至少80%、更优选至少85%、甚至更优选至少90%、并且最优选至少95% α -(1,3)糖苷键。

[0142] 又如,除了上述 α -(1,3)糖苷键实施方案之外,可溶性 α -葡聚糖纤维组合还可包含少于25%、优选少于10%、更优选5%或更少、并甚至更优选少于1% α -(1,6)糖苷键。

[0143] 又如,除了上述 α -(1,3)和 α -(1,6)糖苷键含量实施方案之外,可溶性 α -葡聚糖纤维组合还可包含少于10%、优选少于5%、并最优选少于2.5%的 α -(1,3,6)糖苷键。

[0144] 又如,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可包含93至97% α -(1,3)糖苷键和少于3% α -(1,6)糖苷键,并且具有对应于3至7混合DP的重均分子量。在另一个实施方案中,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可包含约95% α -(1,3)糖苷键和约1% α -(1,6)糖苷键,并且具有对应于3至7混合DP的重均分子量。在以上实施方案的另一方面,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可包含约1至3% α -(1,3,6)键或优选约2% α -(1,3,6)键。

[0145] 又如,除了以上提及的糖苷键含量实施方案之外,可溶性 α -葡聚糖纤维组合还可包含少于5%、优选少于1%、并且最优选少于0.5% α -(1,4)糖苷键。

[0146] 又如,除了以上提及的糖苷键含量实施方案之外,可溶性 α -葡聚糖纤维组合还可包括小于5000道尔顿、优选小于2500道尔顿、更优选500至2500道尔顿、并且最优选约500至约2000道尔顿的重均分子量(M_w)。

[0147] 又如,除了任何以上特征之外,在20℃下和水中12重量%下,可溶性 α -葡聚糖纤维组合还可包括小于250厘泊(0.25Pa·s)、优选小于10cP(0.01Pa·s)、优选小于7cP(0.007Pa·s)、更优选小于5cP(0.005Pa·s)、更优选小于4cP(0.004Pa·s)、并且最优选小于3cP(0.003Pa·s)的粘度。

[0148] 在某些实施方案中,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可具有小于10%、优选小于9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%消化性的消化性。在另一方面,消化性的相对水平或者也可采用AOAC 2011.25(综合总膳食纤维检测,Integrated Total Dietary Fiber Assay)(McCleary等人,2012,J.AOAC Int.,95(3),824-844)测定。

[0149] 除了任何以上实施方案之外,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可25℃下pH 7水中具有至少20%(w/w)、优选至少30%、40%、50%、60%或70%的溶解度。

[0150] 在一个实施方案中,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可包含的还原糖的含量小于10重量%、优选小于5重量%、并且最优选小于重量1%或更少。

[0151] 在一个实施方案中,可溶性 α -葡聚糖纤维组合可包括少于4千卡/g、优选少于3千卡/g、更优选少于2.5千卡/g、并且最优选约2千卡/g或更少的含热量。

[0152] 又如,本文的可溶性 α -葡聚糖可包括:

[0153] a) 10%至30% α -1,3-糖苷键;

[0154] b) 65%至87% α -1,6-糖苷键;

[0155] c) 少于5% α -1,3,6-糖苷键;

[0156] d) 小于5000道尔顿的重均分子量(M_w);

[0157] e) 在20℃下,在水中12重量%下,小于0.25帕斯卡秒(Pa·s)的粘度;

[0158] f) 范围为4至40、优选10至40的右旋糖当量(DE);

[0159] g) 小于10%的消化性,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测;

[0160] h) 在25℃下,pH 7水中至少20%(w/w)的溶解度;和

- [0161] i) 小于5的多分散指数(PDI)。
- [0162] 可如美国申请62/004,308所公开来制备此类可溶性 α -葡聚糖。
- [0163] 又如,本文的可溶性 α -葡聚糖可包括:
- [0164] a) 25-35 α -1,3-糖苷键;
- [0165] b) 55-75% α -1,6-糖苷键;
- [0166] c) 5-15% α -1,3,6-糖苷键;
- [0167] d) 小于5000道尔顿的重均分子量;
- [0168] e) 在20℃下,在水中12重量%下,小于0.25帕斯卡秒(Pa·s)的粘度;
- [0169] f) 范围为4至40的右旋糖当量(DE);
- [0170] g) 小于10%的消化性,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测;
- [0171] h) 在25℃下,水中至少20%(w/w)的溶解度;和
- [0172] i) 小于5的多分散指数。
- [0173] 可如美国申请62/004,312所公开来制备此类可溶性 α -葡聚糖。
- [0174] 又如,本文的可溶性 α -葡聚糖可包括:
- [0175] a) 至少95% α -1,6-糖苷键;
- [0176] b) 1%或更少的 α -1,3-糖苷键;
- [0177] c) 少于2% α -1,3,6-糖苷键;
- [0178] d) 少于1.5% α -1,4-糖苷键;
- [0179] e) 小于20000道尔顿的重均分子量;
- [0180] f) 20℃下,在水中12重量%下,小于0.25帕斯卡秒(Pa·s)的粘度;
- [0181] g) 范围为1至30的右旋糖当量(DE);
- [0182] h) 小于10%的消化性,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测;
- [0183] i) 在25℃下,pH 7水中至少20%(w/w)的溶解度;和
- [0184] j) 小于5的多分散指数。
- [0185] 可如美国申请62/004,314所公开来制备此类可溶性 α -葡聚糖。
- [0186] 又如,本文的可溶性 α -葡聚糖可包括:
- [0187] a) 范围为:
- [0188] i) 1%至50%的 α -1,3-糖苷键;或
- [0189] ii) 大于10%单但少于40%的 α -1,4-糖苷键;或
- [0190] iii) i) 和ii) 的任何组合;
- [0191] b) 1至50% α -1,2-糖苷键;
- [0192] c) 0-25% α -1,3,6-糖苷键;
- [0193] d) 小于98% α -1,6-糖苷键;
- [0194] e) 小于300kDa的重均分子量;
- [0195] f) 20℃下,在水中12重量%下,小于0.25帕斯卡秒(Pa·s)的粘度;
- [0196] g) 小于20%的消化性,如分析化学师协会(Association of Analytical Communities,AOAC)方法2009.01所测;

[0197] h) 在25℃下,pH 7水中至少20% (w/w)的溶解度;和

[0198] i) 小于26,优选小于5的多分散指数。

[0199] 可如美国申请62/004,305所公开来制备此类可溶性 α -葡聚糖。

[0200] 在某些实施方案中,可溶性 α -葡聚糖为葡糖基转移酶的直接产物。在合适的葡聚糖合成反应中,此类葡糖基转移酶和用于其的条件可如本文所公开的,或如在任何美国专利申请例如62/004,290、62/004,308、62/004,312、62/004,314和/或62/004,305中公开的。

[0201] 可溶性 α -葡聚糖或者也可为例如葡糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用的产物,所述 α -葡聚糖水解酶能够水解具有一个或多个 α -1,3-糖苷键或一个或多个 α -1,6-糖苷键的葡聚糖聚合物。在一些方面,用于产生可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应可包括至少一种葡糖基转移酶和至少一种 α -葡聚糖水解酶两者。在其它方面,葡聚糖合成反应可初始包含一种或多种葡糖基转移酶作为唯一的酶组分。此类反应产生尚未通过 α -葡聚糖水解酶进行修饰的第一 α -葡聚糖。然后,将至少一种 α -葡聚糖水解酶添加至反应合适的时间段,以允许将第一产物修饰为可溶性 α -葡聚糖产物。因此,存在通过其经由葡糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用合成可溶性 α -葡聚糖产物的不同方式。在葡聚糖合成反应期间和/或葡聚糖合成之后,用于进行葡聚糖合成反应(其中包含一种或多种 α -葡聚糖水解酶)的条件可如本文所公开,或如在任何美国专利申请例如62/004,290、62/004,308、62/004,312、62/004,314和/或62/004,305中公开的。

[0202] 本文的 α -葡聚糖水解酶可为例如葡聚糖酶(能够水解 α -1,6-连接的糖苷键;E.C.3.2.1.11)、突变酶(能够水解 α -1,3-连接的糖苷键;E.C.3.2.1.59)、霉菌葡聚糖酶(能够内切水解包含(1-3)-和(1-4)-键两者的 α -D-葡聚糖的(1-4)- α -D-糖苷键;EC 3.2.1.61)、葡聚糖1,6- α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.70)和交替聚糖酶(EC 3.2.1.-;能够内切水解裂解交替聚糖;E.C.3.2.1.-;参见美国专利5786196)。

[0203] 可在某些方面中使用包括SEQ ID NO:47的突变酶。另选地,突变酶可例如包含与SEQ ID NO:47至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同的氨基酸序列,并且具有突变酶活性。

[0204] 如当前所公开的用于产生一种或多种可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应可直接用作其中进行本文的水解反应的合适的条件,其中 α -葡糖苷酶用于水解 α -1,5葡糖基-果糖键。可根据关于产生例如聚 α -1,3-葡聚糖的葡聚糖合成反应的水解处理的任何以上公开的条件进行此类水解。另选地,用于产生一种或多种可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应的级分(例如色谱级分)可用作其中对 α -1,5葡糖基-果糖键进行 α -葡糖苷酶介导的水解的合适的条件。

[0205] 在本文的某些实施方案中,级分可为葡聚糖合成反应的色谱级分。例如,级分可为产生一种或多种如本文公开的可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应的色谱级分。此类反应可在葡聚糖合成期间和/或葡聚糖合成完成之后任选地包括一种或多种 α -葡聚糖水解酶。通常在任何这些类型的实施方案中获得级分,以便使全部或大部分(例如,至少约60%、70%、80%、90%、95%)可溶性 α -葡聚糖产物与产生其的反应组合物分离。一旦与全部或大部分可溶性 α -葡聚糖产物分离,就可使用一种或多种 α -葡聚糖酶使级分经受本文所公开的任何 α -1,5葡糖基-果糖水解脱过程。

[0206] 本文的色谱级分可通常使用适宜类型的液相色谱法获得。液相色谱可例如使用尺

寸排阻色谱法 (SEC)、柱层析、高效液相色谱法 (HPLC)、离子交换色谱法、亲和色谱法、超滤、微滤、或渗析进行。

[0207] 本公开还涉及一种通过使糖与 α -葡糖苷酶(例如转葡糖苷酶或葡糖苷酶)接触而产生的组合物,其中(i)糖为包含至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键的二糖或低聚糖,并且(ii) α -葡糖苷酶水解糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键。以该方式产生的组合物包含的糖量相较于接触之前存在的糖量更少。组合物的示例包括本文公开的那些,例如得自葡聚糖合成反应的经水解的滤液、或用于产生可溶性 α -葡聚糖的葡聚糖合成反应的经水解的级分。以上公开的以及实施例中关于水解方法及其产物的任何特征可表征组合物。组合物的以下特征为示例。

[0208] 在组合物的某些实施方案中, α -葡糖苷酶可包含与SEQ ID NO:5、6、8、9、11、12、14、15、17、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38,或DIAZYME RDF ULTRA (DuPont Industrial Biosciences)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在组合物的某些实施方案中,转葡糖苷酶可包含与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列。在组合物的某些实施方案中,葡糖淀粉酶可包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列。另选地,本文公开的任何 α -葡糖苷酶可用于产生公开的组合物。

[0209] 由本文的水解方法产生的组合物的糖例如明串珠菌二糖的浓度可例如少于糖与 α -葡糖苷酶接触之前存在的明串珠菌二糖的浓度的50%。

[0210] 在本文的某些实施方案中,由水解方法产生的组合物可为葡聚糖合成反应物、或其级分,其中葡聚糖合成反应的副产物与 α -葡糖苷酶接触接触。在该实施方案中,级分可例如为葡聚糖合成反应的滤液、或用于产生可溶性 α -葡聚糖的葡聚糖的合成反应的级分。在该实施方案中,糖可例如为明串珠菌二糖。

[0211] 技术人员应当理解,当前公开的实施方案部分用于糖化以其它方式可能难以分解的二糖和低聚糖。例如,可以利用该特征来实施增强的方法:(i)果糖富集和(ii)发酵。

[0212] 以下实施例6显示,相较于使用未水解的滤液,当使用被 α -葡糖苷酶(转葡糖苷酶)水解的葡聚糖滤液时通过色谱法增强了果糖富集。

[0213] 因此,公开的发明还涉及一种富集存在于葡聚糖合成反应的级分中果糖的方法。该方法包括:(a)使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡糖苷酶(例如转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶)在合适的条件下接触,其中酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键;以及(b)从步骤(a)的经水解级分中分离果糖,以获得果糖浓度比步骤(a)的级分的果糖浓度更高的组合物。

[0214] 公开的例如关于 α -葡糖苷酶(例如转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶)和葡聚糖合成反应的级分的果糖富集方法的特征可根据本文提供的涉及每种这些特征的任何公开内容。

[0215] 分离果糖的步骤(b)可通过本领域的技术人员已知的任何方法进行。例如,可如下实施例中所公开,或根据欧洲专利公开EP2292803B1来使用色谱法,该专利以引用方式并入本文。

[0216] 得自公开的富集方法的具有更高浓度果糖的组合物(例如果糖溶液或果糖糖浆)可具有至少约90、91、92、93、94、95、96、97、98或99重量%果糖。

[0217] 本文的果糖富集方法可比利用未经如当前公开的 α -葡糖苷酶水解的滤液的方法表现地更好。此类增大的性能可根据至少40%、45%或50%的果糖回收百分比来测定。

[0218] 本公开还涉及一种发酵方法,该方法包括:(a)使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡糖苷酶(例如,转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶)在合适的条件下接触,其中 α -葡糖苷酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键;(b)用微生物发酵步骤(a)的级分以获得产物;以及(c)任选地分离(b)的产物。步骤(b)的发酵步骤可在步骤(a)之后或与步骤(a)同时进行。显著地,可例如通过发酵葡聚糖合成反应的经水解的滤液,使用该方法产生乙醇。得自该过程的乙醇收率高于发酵尚未水解的葡聚糖滤液时获得的乙醇收率。

[0219] 关于 α -葡糖苷酶(例如,转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶)、二糖和低聚糖、葡聚糖合成反应的级分、以及合适的接触条件的公开的发酵方法的特征例如可根据本文提供的涉及每种这些特征的任何公开内容。

[0220] 用于本文的发酵方法的微生物可为例如细菌、酵母或真菌。可用于本文的细菌的示例包括乳杆菌属菌种、链球菌属菌种、双歧杆菌属菌种、明串珠菌属菌种、埃希氏菌属(*Escherichia*)菌种(例如大肠杆菌)和芽孢杆菌属菌种。可用于本文的酵母的示例包括酵母属菌种,例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)和贝酵母(*S.bayanus*)。

[0221] 本文的发酵方法可获得产物例如乙醇或酸(例如乳酸)。然而,据信如果期望,可产生其它产物。本领域技术人员应当理解,使用如公开的发酵方法产生特定产物将依赖于各种条件,例如用于发酵的一种或多种微生物。例如,本文的用于发酵的条件可如以下实施例所公开,或者如El-Mansi等人(2006,*Fermentation Microbiology and Biotechnology*,第二版,CRC Press)和Stanbury等人(1999,*Principles of Fermentation Technology*,第二版,Butterworth-Heinemann)所公开,二者均以引用方式并入本文。

[0222] 在本文的发酵方法的某些实施方案中,产物收率高于发酵未经本文的 α -葡糖苷酶水解的葡聚糖滤液时获得的产物收率。该比较可参照例如使用葡聚糖合成反应的未水解级分的对照发酵。本文发酵的产物收率可例如增加至少约10%、20%、40%、60%、80%或100%(或介于10%至100%之间的任意整数值)。此外,由本文的发酵形成产物的速率可增大。

[0223] 以下实施例7显示出,明串珠菌二糖可被提供有包含未水解的葡聚糖滤液的进料的酵母发酵为乙醇。因此,本文进一步公开了一种用微生物将明串珠菌二糖发酵为产物(例如乙醇)的方法。该方法可包括发酵(i)已经或(ii)未经如本文公开的 α -葡糖苷酶水解的葡聚糖滤液。无论明串珠菌二糖是否提供于葡聚糖滤液中或以另一种形式提供(例如半纯化或富集形式),用于发酵串珠菌二糖的方法可包括使微生物(例如酵母,如酿酒酵母)适于利用明串珠菌二糖。此类适应可包括使微生物在明串珠菌二糖和任选的其它糖存在下生长至少2或3个生长周期,其后微生物利用更多明串珠菌二糖来发酵产物。在某些实施方案中,微生物可(i)在包含明串珠菌二糖的第一进料中生长(1个完整周期),(ii)从第一进料中移除,(iii)在包含明串珠菌二糖的第二进料中生长(两个完整周期),(iv)从第二进料任选地移除,以及(v)在第三进料中任选地生长(三个完整周期)。在某些实施方案中,以该方式适应的微生物可增大发酵明串珠菌二糖的能力。

[0224] 以下实施例9显示出,当葡聚糖滤液在被转葡糖苷酶水解的同时被酵母发酵时,存在于葡聚糖滤液中的几乎所有(例如>98%或>99%)明串珠菌二糖可用于被酵母发酵。因此,本文增强的串珠菌二糖发酵方法可包括用 α -葡糖苷酶(例如,转葡糖苷酶或葡糖淀粉酶)水解串珠菌二糖,同时用微生物发酵串珠菌二糖。

[0225] 本文所公开的组合物和方法的非限制性示例包括：

[0226] 1. 一种使包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键的糖中的 α -1,5葡萄糖基-果糖键水解的方法,其中糖为二糖或低聚糖,并且其中所述方法包括：

[0227] 使糖与 α -葡萄糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡萄糖苷酶水解糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

[0228] 并且其中糖量相较于接触之前存在的糖量减少。

[0229] 2. 根据实施方案1所述的方法,其中 α -葡萄糖苷酶是固定的。

[0230] 3. 根据实施方案1或2所述的方法,其中糖为明串珠菌二糖。

[0231] 4. 根据实施方案3所述的方法,其中在接触步骤之后的明串珠菌二糖的浓度少于在接触之前存在的明串珠菌二糖的浓度的50%。

[0232] 5. 根据实施方案1、2、3或4所述的方法,其中合适的条件包括：

[0233] (i) 葡聚糖合成反应,或

[0234] (ii) 从葡聚糖合成反应获得的级分；

[0235] 其中糖为葡聚糖合成反应的副产物。

[0236] 6. 根据实施方案5所述的方法,其中葡聚糖合成反应产生至少一种不溶性 α -葡聚糖产物。

[0237] 7. 根据实施方案6所述的方法,其中级分为葡聚糖合成反应的滤液。

[0238] 8. 根据实施方案5所述的方法,其中葡聚糖合成反应产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物,其为：

[0239] (i) 葡萄糖基转移酶的产物,或

[0240] (ii) 葡萄糖基转移酶和 α -葡聚糖水解酶两者协同作用的产物,所述 α -葡聚糖水解酶能够水解具有一个或多个 α -1,3-糖苷键或一个或多个 α -1,6-糖苷键的葡聚糖聚合物。

[0241] 9. 根据实施方案8所述的方法,其中级分为葡聚糖合成反应的色谱级分。

[0242] 10. 根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中 α -葡萄糖苷酶为转葡萄糖苷酶或葡萄糖淀粉酶。

[0243] 11. 一种通过使糖与 α -葡萄糖苷酶接触而产生的组合物,

[0244] 其中糖为二糖或低聚糖并且包含至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

[0245] 其中酶水解糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键,

[0246] 并且其中组合物包含的糖量相较于接触之前存在的糖量减少。

[0247] 12. 根据实施方案11所述的组合物,其中糖为明串珠菌二糖。

[0248] 13. 根据实施方案11或12所述的组合物,其中糖在(i) 葡聚糖合成反应,或(ii) 从葡聚糖合成反应获得的级分中；

[0249] 其中糖为葡聚糖合成反应的副产物。

[0250] 14. 一种富集存在于葡聚糖合成反应的级分中果糖的方法,该方法包括：

[0251] (a) 使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡萄糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡萄糖苷酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡萄糖基-果糖键；以及

[0252] (b) 从步骤(a)的经水解级分中分离果糖,以获得果糖浓度比步骤(a)的级分的果糖浓度更高的组合物。

[0253] 15. 一种发酵方法,该方法包括：

[0254] (a) 使从葡聚糖合成反应获得的级分与 α -葡糖苷酶在合适的条件下接触,其中 α -葡糖苷酶水解级分内所含的二糖或低聚糖的至少一个 α -1,5葡糖基-果糖键;

[0255] (b) 用微生物发酵步骤(a)的级分以获得产物,其中发酵在步骤(a)之后或与步骤(a)同时进行;以及

[0256] (c) 任选地,分离(b)的产物;

[0257] 其中相较于对未与 α -葡糖苷酶接触的葡聚糖合成反应的级分进行发酵的产物收率,(b)的产物收率增加。

[0258] 实施例

[0259] 所公开的发明将在以下的实施例中进一步阐述。应该理解,尽管这些实施例说明了本发明的某些优选方面,但仅是以例证的方式给出的。通过上述论述和这些实施例,本领域的技术人员可确定本发明的必要特征,并且在不脱离本发明的实质和范围内的前提下,可对本发明进行各种变化和修改以适应多种用途和条件。

[0260] 缩写

[0261] 本文所用一些缩写的含义如下:“g”是指克,“h”是指小时,“mL”是指毫升,“psi”是指磅每平方英寸,“wt%”是指重量百分比,“ μ m”是指微米,“%”是指百分比,“ $^{\circ}$ C”是指摄氏度,“mg”毫克,“mm”是指毫米,“mL/min”是指毫米每分钟,“m”是指米,“uL”是指微升,“mmol”是指毫摩尔,“min”是指分钟,“mol%”是指摩尔%,“M”是指摩尔,“mg/g”是指毫克每克,“rpm”是指转每分钟,“MPa”是指兆帕。

[0262] 一般方法

[0263] 除非另行指出,所有试剂均可购自Sigma-Aldrich (St.Louis,MO)。蔗糖可购自VWR (Radnor,PA)。

[0264] 葡糖基转移酶(gtf)的粗提取物的制备

[0265] 采用异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)-诱导的表达系统在大肠杆菌菌株DH10B中表达唾液链球菌gtfJ酶(SEQ ID NO:3)。相较于唾液链球菌gtfJ氨基酸序列(GENBANK识别号47527),SEQ ID NO:3具有N-末端42个残基缺失,但是包括起始甲硫氨酸。简而言之,大肠杆菌DH10B细胞被转化以由经密码子优化的DNA序列表达SEQ ID NO:3,从而在大肠杆菌中表达gtfJ酶。该DNA序列包括在表达载体pJexpress404[®] (DNA 2.0, Menlo Park CA)中。将转化的细胞接种于初始光密度(OD₆₀₀,在600nm处)为0.025的LB培养基(10g/L胰蛋白胨;5g/L酵母提取物,10g/L NaCl)中,并使其在37 $^{\circ}$ C下于培养箱中生长,同时在250rpm下进行搅拌。当其达到0.8-1.0的OD₆₀₀时,添加1mM IPTG来诱导培养物。将诱导的培养物置于摇动器上并在诱导3小时后收获。

[0266] 通过使培养的细胞在Eppendorf[®]离心机中离心(25 $^{\circ}$ C,16000rpm)收获得到酶GtfJ(SEQ ID NO:3),使细胞重悬于5.0mM磷酸盐缓冲液(pH7.0)中并在冰上冷却至4 $^{\circ}$ C。采用0.1-mm二氧化硅粒珠使用粒打浆机使细胞破碎,然后在4 $^{\circ}$ C和16000rpm下离心以使未破碎细胞和细胞碎片沉淀。使粗提物(包含可溶性GtfJ酶,SEQ ID NO:3)与沉淀分离,并通过Bradford蛋白质测定法分析来测定蛋白质浓度(mg/mL)。

[0267] 如下制备链球菌属C150gtf-S酶(SEQ ID NO:40)。SG1184是枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)表达菌株,其表达截短型式的链球菌属C150(GENBANK[®]GI:

321278321)的糖基转移酶Gtf-S(“GTF0459”)。在aprE启动子作用下将来自大肠杆菌表达质粒pMP79(SEQ ID NO:41)的编码N-末端截短的蛋白质GTF0459(SEQ ID NO:42)的基因克隆到枯草芽孢杆菌整合型表达质粒p4JH的NheI和HindIII位点中并在载体上与枯草芽孢杆菌AprE信号肽融合。首先将构建体转化到大肠杆菌DH10B中并在含氨苄青霉素(100μg/mL)的LB平板上进行选择。然后将经证实的表达GTF0459的构建体pDCQ984转化到包含九个蛋白酶缺失的枯草芽孢杆菌BG6006中(amyE::xylRPxylAcomK-ermC,degUHy32,oppA,ΔspoIIE3501,ΔaprE,ΔnprE,Δepr,ΔispA,Δbpr,Δvpr,ΔwprA,Δmpr-ybfJ,ΔnprB)并在含氯霉素(5μg/mL)的LB平板上选择。使在含有5μg/mL氯霉素的LB平板上生长的菌落在含25μg/mL氯霉素的LB平板上划线接种几次。使所得的枯草芽孢杆菌表达菌株SG1184首先在含25μg/mL氯霉素的LB培养基上生长并然后在含25μg/mL氯霉素的GrantsII培养基中継代培养,在30℃下生长2-3天。在15,000g和4℃下使培养物离心30分钟并使上清液过滤通过0.22-μm滤波器。将过滤后的上清液分成等份并在-80℃冷冻。

[0268] 通过常规的分批补料发酵使表达GTF0459(SEQ ID NO:42)的枯草芽孢杆菌SG1184菌株在深水有氧条件下生长。使用含有0-0.25%固体玉米浆(Roquette)、5-25g/L磷酸钠和磷酸钾、0.3-0.6M硫酸亚铁、氯化锰和氯化钙的溶液、0.5-4g/L硫酸镁和0.01-3.7g/L硫酸锌、硫酸亚铜、硼酸和柠檬酸的溶液的营养培养基。以2-4mL/L添加消泡剂FOAMBLAST 882来控制发泡。当检测不到批量中的初始葡萄糖时,用50%(w/w)葡萄糖进料补加10-L发酵。葡萄糖进料速率在几小时内上升。使发酵控制于30℃和20%D0,并且初始搅拌为750rpm。用50%(v/v)氢氧化铵将pH控制于7.2。在贯穿2-天的发酵运行中,监测发酵参数例如pH、温度、空气流量和D0%。在运行结束时收获得到培养物发酵液并对其进行离心以获得上清液。然后使包含GTF0459(SEQ ID NO:42)的上清液在-80℃下冷冻储存。

[0269] 如下制备变异链球菌MT-4239gtf-C酶(SEQ ID NO:43)。使用经最优化以在枯草芽孢杆菌中表达的密码子合成编码截短型式的葡糖基转移酶(gtf)(在GENBANK®识别为GI:3130088,SEQ ID NO:43;得自变异链球菌MT-4239的gtf-C)的基因并且其由GenScript合成。由GENSCRIPT质粒扩增编码具有N-末端截短和C-末端T1截短的GTF0088BsT1(SEQ ID NO:45)的基因(SEQ ID NO:44),并且在aprE启动子作用下克隆到枯草芽孢杆菌整合型表达质粒p4JH的NheI和HindIII位点中并在载体上与枯草芽孢杆菌AprE信号肽融合。首先将构建体转化到大肠杆菌DH10B中并在含氨苄青霉素(100μg/mL)的LB平板上进行选择。然后将经证实的表达GTF0088BsT1的构建体pDCQ1021转化到包含九个蛋白酶缺失的枯草芽孢杆菌BG6006中(amyE::xylRPxylAcomK-ermC,degUHy32,oppA,ΔspoIIE3501,ΔaprE,ΔnprE,Δepr,ΔispA,Δbpr,Δvpr,ΔwprA,Δmpr-ybfJ,ΔnprB)并在含氯霉素(5μg/mL)的LB平板上选择。使在含有5μg/mL氯霉素的LB平板上生长的菌落在含25μg/mL氯霉素的LB平板上划线接种几次。使所得的枯草芽孢杆菌表达菌株SG1221首先在含25μg/mL氯霉素的LB培养基上生长并然后在含25μg/mL氯霉素的GrantsII培养基中継代培养,在30℃下生长2-3天。在15,000g和4℃下使培养物离心30分钟并使上清液过滤通过0.22-μm滤波器。将过滤后的上清液分成等份并在-80℃冷冻。

[0270] 通过常规的分批补料发酵使表达GTF0088BsT1(SEQ ID NO:45)的枯草芽孢杆菌SG1221菌株在深水有氧条件下生长。使用含有0-0.25%固体玉米浆(Roquette)、5-25g/L磷酸钠和磷酸钾、0.3-0.6M硫酸亚铁、氯化锰和氯化钙的溶液、0.5-4g/L硫酸镁和0.01-3.7g/

L硫酸锌、硫酸亚铜、硼酸和柠檬酸的溶液的营养培养基。以2-4mL/L添加消泡剂FOAMBLAST 882来控制发泡。当检测不到批量中的初始葡萄糖时,用50% (w/w) 葡萄糖进料补加2-L发酵。葡萄糖进料速率在几小时内上升。使发酵控制于30℃和20% DO,并且初始搅拌为400rpm。用50% (v/v) 氢氧化铵将pH控制于7.2。在贯穿2-天的发酵运行中,监测发酵参数例如pH、温度、空气流量和DO%。在运行结束时收获得到培养物发酵液并对其进行离心以获得上清液。然后使包含GTF088BsT1 (SEQ ID NO:45) 的上清液在-80℃下冷冻储存。

[0271] 葡糖基转移酶GTF0459和GTF0088BsT1活性的测定

[0272] 葡糖基转移酶活性测定通过以下过程进行:在存在或不存在25g/L葡聚糖 (MW~1500, Sigma-Aldrich, Cat.#31394) 的情况下,在37℃和125rpm轨道摇动下,用含200g/L蔗糖的25mM或50mM乙酸钠缓冲液 (pH 5.5下) 温育包含GTF酶的1-10% (v/v) 粗蛋白提取物。在1h、2h和3h时取出一份反应混合物的等分试样并在90℃加热5min以使GTF失活。通过在13,000xg下离心5分钟来移除不溶性材料,之后使其过滤通过0.2μm RC (再生纤维素) 膜。在85℃下采用两个串联AMINEX HPX-87C柱通过HPLC分析所得滤液 (Bio-Rad, Hercules, CA) 来定量蔗糖浓度。相对于反应时间绘出各个时间点的蔗糖浓度并由线性曲线的斜率确定初始反应速率。一个GTF活性单位定义为在测定条件下每分钟消耗一微摩尔的蔗糖所需的酶量。

[0273] α-(1,3)-葡聚糖水解酶(突变酶)的粗提取物的制备

[0274] 编码马尔内菲青霉 (*Penicillium marneffeii*) ATCC® 18224™ 突变酶 (GENBANK® 识别为GI:212533325) 的基因由GenScript (Piscataway, NJ) 合成。在CBHI启动子和终止子的控制下,将编码蛋白质序列 (MUT3325; SEQ ID NO:47) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:46) 亚克隆到质粒pTrex3的SacII和AscI限制性位点中,该质粒即设计用于表达里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中的目标基因的载体,采用黑曲霉乙酰胺酶用于选择。通过基因枪注入将所得的质粒转化到里氏木霉中。基因枪转化的具体方法描述于国际PCT专利申请公开W02009/126773 A1,其公开内容以引用方式并入本文。使用具有来自稳定克隆的孢子的1-cm²琼脂棒TRM05-3来接种制备培养基 (以下所述)。在28℃和220rpm下,使培养物在摇瓶中生长4-5天。为了收获得到分泌的蛋白质,首先通过在4000g下离心10分钟移除细胞群,并使上清液过滤通过0.2-μm无菌过滤器。突变酶MUT3325 (SEQ ID NO:47) 的表达通过SDS-PAGE加以证实。

[0275] 以下列出了制备培养基组分。

[0276] NREL-Trich Lactose Defined

配方	量	单位
硫酸铵	5	g
PIPPS	33	g
BD BACTO 酪蛋白氨基酸	9	g
KH ₂ PO ₄	4.5	g
[0277] CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.32	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	g
里氏木霉痕量元素	2.5	mL
NaOH 颗粒	4.25	g
用 50% NaOH 将 pH 调节至 5.5		
定容	920	mL

[0278]	添加至每份等分试样: FOAMBLAST	5	滴
	高压灭菌, 然后添加经过滤灭菌的 20%乳糖	80	mL

[0279] 里氏木霉痕量元素

[0280]	配方	量	单位
	一水合柠檬酸	191.41	g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	200	g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	16	g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.2	g
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.4	g
	H ₃ BO ₃ (硼酸)	0.8	g
	定容	1	L

[0281] 通过在2-L带挡板的烧瓶中用1.0mL的MUT3325表达菌株TRM05-3的冷冻孢子悬液接种0.5L的基本培养基来制备发酵种子培养物(基本培养基由5g/L硫酸铵、4.5g/L磷酸二氢钾、1.0g/L七水硫酸镁、14.4g/L无水柠檬酸、1g/L二水氯化钙、25g/L葡萄糖,以及痕量元素包括0.4375g/L柠檬酸、0.5g/L七水硫酸亚铁、0.04g/L七水硫酸锌、0.008g/L五水硫酸铜、0.0035g/L一水合硫酸锰和0.002g/L硼酸组成,pH为5.5)。在转化到14-L发酵罐中的8L制备培养基之前,使培养物在32℃和170rpm下生长48小时。制备培养基由75g/L葡萄糖、4.5g/L磷酸二氢钾、0.6g/L二水合氯化钙、1.0g/L七水硫酸镁、7.0g/L硫酸铵、0.5g/L无水柠檬酸、0.5g/L七水硫酸亚铁、0.04g/L七水硫酸锌、0.00175g/L五水硫酸铜、0.0035g/L一水合硫酸锰、0.002g/L硼酸和0.3mL/L FOAMBLAST 882组成。

[0282] 对于在34℃和500rpm下于葡萄糖上生长24h的批次,首先运行发酵。在24h结束时,使温度降低至28℃并使搅拌速度增大至1000rpm。然后在0.030g葡萄糖-槐糖固体/g生物质/小时的特定进料速率下,用葡萄糖和槐糖混合物(62%w/w)进料发酵罐。在运行结束时,通过离心移除生物质,并且使用10-kD分子量截留超滤芯(UFP-10-E-35;GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)通过过滤将含有MUT3325突变酶(SEQ ID NO:47)的上清液浓缩约10倍。使浓缩蛋白质于-80℃储存。

[0283] α -葡聚糖水解酶(突变酶)活性的测定

[0284] 使用由远缘链球菌(*Streptococcus sobrinus*) ATCC®33478™产生的分泌的酶来制备测定突变酶活性所需的不溶性齿斑葡聚糖聚合物。具体地,在BHI琼脂板上(Brain Heart Infusion agar, Teknova, Hollister, CA)划线接种一环远缘链球菌ATCC®33478™的甘油原种,并使平板在37℃下孵育2天。用环挑出数个菌落以在初始培养基瓶(得自Teknova)中接种2X 100mL BHI液体培养基,并在37℃下孵育培养物,静态保持24h。通过离心移除所得细胞并使所得上清液过滤通过0.2- μ m无菌过滤器;收集2X 101mL的滤液。向滤液中添加2X 11.2mL的200g/L蔗糖(最终蔗糖20g/L)。在未搅拌情况下,使反应于37℃温育67h。通过在5000xg下离心10min来收集所得多糖聚合物。小心地滗出上清液。用40mL的无菌水将不溶性聚合物洗涤4次。使所得的齿斑葡聚糖聚合物冻干48h。使齿斑葡聚糖聚合物(390mg)悬浮于39mL的无菌水中以制备10mg/mL悬液。通过超声处理(40%幅值直至较大团块消失,总计~10min)均质化齿斑葡聚糖悬液。将匀化的悬液分成等份并在4℃储存。

[0285] 通过在pH 5.5和37℃下用含有0.5mg/mL齿斑葡聚糖聚合物(如上所述制备的)的

25mM KOAc缓冲液温育合适量的酶,开始突变酶测定。在各个时间点,取出等分试样的反应混合物并用等体积的100mM甘氨酸缓冲液(pH 10)淬灭。通过在14,000xg下离心5min移除各个经淬灭样品中的不溶性材料。通过对羟基苯甲酸酞肼溶液(PAHBAH) (Lever M., Anal.Biochem., (1972) 47:273-279) 测定对各个时间点产生的低聚糖和多糖聚合物的还原端进行定量,并且初始速率由时间过程中最初三个或四个时间点的线性曲线图的斜率来确定。通过将10 μ L的反应样品上清液添加至100 μ L的PAHBAH工作溶液中进行PAHBAH测定并在95 $^{\circ}$ C加热5min。通过混合一份试剂A (0.05g/mL对羟基苯甲酸酞肼和5体积%的浓盐酸) 与四份试剂B (0.05g/mL NaOH、0.2g/mL酒石酸钾钠) 来制备工作溶液。记录410nm处的吸光度,并且通过减去适当的背景吸收并使用各种浓度的葡萄糖(作为标准物)产生的标准曲线来计算还原端的浓度。

[0286] 通过HPLC进行反应特征分析

[0287] 从反应中周期性取样并使用配备有折射率检测器的Agilent[®]1260HPLC进行分析。在0.6mL/min的流速和85 $^{\circ}$ C下,使用具有去离子水的Aminex[®]HP-87C柱(BioRad, Hercules,CA)来测定gtf反应中蔗糖、葡萄糖、明串珠菌二糖和果糖的含量。在0.6mL/min的流速和85 $^{\circ}$ C下,使用具有具有去离子水的Aminex[®]HP-42A柱(BioRad)来定量测定gtf反应中可溶性低聚糖副产物(DP2-DP7)。

[0288] 配备有折射率检测器的Dionex[®]UltiMate[™] 3000HPLC(Thermo Scientific)用于包括固定化的酶的样品(实施例4)。在0.3mL/min的流速和85 $^{\circ}$ C下,使用具有去离子水的Phenomenex[®]Rezex[™] calcium monosaccharide柱来分析糖。

[0289] 通过NMR分析低聚糖

[0290] 在使用5-mm低温三联共振脉冲场梯度(PFG)探头的于500MHz(对于¹H)下工作的Agilent DD2光谱仪上采集NMR数据。通过将观测发射器频率小心地置于“普氏(presat)”实验的残余水信号的共振处,并然后使用具有完整相位循环(32多次)和10ms的混合时间的NOESY实验的第一数据片(slice)获得水抑制。一维¹H光谱采集于6410Hz的光谱宽度、5.1s的采集时间、65536个数据点、4s预饱和以及5.85 μ s的90 $^{\circ}$ 度脉冲。使样品温度维持于25 $^{\circ}$ C。通过将50 μ L与450 μ L的D₂O和60 μ L的含12.4mM DSS (4,4-二甲基-4-甲硅烷基戊烷-1-磺酸钠盐)内标的D₂O一起添加至5-mm NMR管中来制备样品,甲基共振设定为0ppm。不同异头键的化学位移定位得自:Goffin等人(2009,Bull Korean Chem.Soc.30:2535-2541。对于 α (1,3)键而言峰分布为5.35ppm,明串珠菌二糖为5.1ppm,并且 α (1,6)键为4.95。对于 α RE还原端(RE)分配为5.2,对于 β RE为4.65。

[0291] 实施例1

[0292] 通过聚合蔗糖制备糖浆

[0293] 该实施例公开了通过在葡聚糖合成反应中采用gtf酶使蔗糖聚合来产生可溶性糖的混合物的一般方式。具体地,制备了葡聚糖合成反应的滤液,然后将其浓缩为糖浆。

[0294] 将蔗糖(3000g)添加至清洁的5-加仑的聚乙稀桶中。将水(18.1L)和Fermasure[™](10mL)添加至桶中,并且通过添加5体积%NaOH和5体积%H₂SO₄将pH调节至7.0。最终体积为约20L,并且如由HPLC所测,蔗糖的初始浓度为152.5g/L。通过添加如在一般方法部分中所述制备的0.3体积%的粗制gtf酶(SEQ ID NO:3)提取物来引发葡聚糖聚合反应。该提取物

包含约2.9mg/mL的蛋白质。使用配备有玻璃轴和PTFE刀片的高架机械马达向反应溶液提供搅拌。

[0295] 在48小时之后，HPLC分析显示，已消耗96%的蔗糖并且认为反应完成。采用325-目钢丝网和40-微米滤纸使用布氏过滤器漏斗过滤移除反应的不溶性聚- α -1,3-葡聚糖产物。然后使用旋转蒸发仪(40-50℃的浴温)将母液(滤液)浓缩至约320g/L糖的总糖浓度。浓缩滤液的组成提供于表2中。

[0296] 表2

[0297] 葡聚糖合成反应的浓缩滤液的组成

[0298]

	蔗糖	明串珠菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总量
g/L	13.5	130.6	25.5	103.8	18.3	28.3	320.1
wt%	4.2	40.8	8	32.4	5.7	8.9	100

[0299] 表2指出葡聚糖合成反应的浓缩滤液包含蔗糖、果糖、葡萄糖、明串珠菌二糖和低聚糖DP2-DP7。

[0300] 实施例2

[0301] 酶对葡聚糖合成反应的滤液中糖水解的影响

[0302] 该实施例测定了各种葡萄糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)、转葡萄糖苷酶(EC 2.4.1.24)、 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)、 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)和葡萄糖苷酶(EC 3.2.1)的活性，目的在于减小葡聚糖合成反应的浓缩滤液中明串珠菌二糖和/或低聚糖副产物的浓度。某些酶例如DIAZYME RDF ULTRA、转葡萄糖苷酶(EC 2.4.1.24)和葡萄糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)均为 α -葡萄糖苷酶，被发现特别有效地降低这些副产物的量，导致经处理滤液中的单糖(葡萄糖和果糖)相应增加。

[0303] 根据实施例1的过程概要首先制得葡聚糖合成反应的滤液并将其浓缩为糖浆。该浓缩滤液的组成提供于表3中。NMR分析显示，存在于糖浆中的 α (1,3)与(1,6)键的比率为78:22。

[0304] 表3

[0305] 葡聚糖合成反应的浓缩滤液的组成

[0306]

	蔗糖	明串珠菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总量
--	----	--------	-----	----	-----	------	----

[0307]

g/L	161	210	93	302	33	61	860
wt%	18.7	24.4	10.8	35.1	3.8	7.1	100.0

[0308] 表3的糖浆用于测试各种酶对葡聚糖合成反应的明串珠菌二糖和低聚糖副产物的水解活性。假定明串珠菌二糖包含特殊键[α (1,5)-葡糖基果糖]并且低聚糖主要包含 α (1,3)和 α (1,6)葡糖基-葡萄糖键，在这些实验开始时何种酶可用于水解这两种副产物这并不是显而易见的。就该分析而言，选择具有不同活性的酶(表4)。

[0309] 表4

[0310] 用于明串珠菌二糖和低聚糖水解的酶评估

[0311]

酶	来源	功能	活性或蛋白质浓度
DIAZYME RDF ULTRA	DuPont IB ^a	1,4- α -葡糖苷酶	710U/g
寡-1,6-葡糖苷酶	Megazyme	1,6- α -葡糖苷酶	320U/mg
SPEZYME FRED	DuPont IB	α -淀粉酶	1-5%
SPEZYME RSL	DuPont IB	α -淀粉酶	1-5%
OPTIMAX L-1000	DuPont IB	支链淀粉酶	1-5%
转葡糖苷酶 L-2000	DuPont IB	转葡糖苷酶	>1700TGU/g
经纯化的转葡糖苷酶 L-2000	DuPont IB	转葡糖苷酶	22.7mg/mL
ACCELLERASE BG	DuPont IB	β -葡糖苷酶	3000U/g
NOVO188	Sigma-Aldrich	β -葡糖苷酶	> 250U/g
SUMIZYME BFS-L	Shin Nihon Chemical	β -葡糖苷酶	100U/g
SUMIZYME BGA	Shin Nihon Chemical	β -葡糖苷酶	2000U/g
ACCELERASE TRIO	DuPont IB	纤维素酶	5-10%
ACCELERASE 1500	DuPont IB	纤维素酶/ β -葡糖苷酶	5-10%/0.5-4%
OPTIDEX L-400	DuPont IB	葡糖淀粉酶	> 350GAU/g
GC 147	DuPont IB	葡糖淀粉酶	400GAU/g
GC 321	DuPont IB	葡糖淀粉酶	> 350GAU/g

[0312] a DuPont Industrial Biosciences

[0313] 用以上各酶来处理表3的糖浆的条件提供于表5(载酶量、时间、温度、pH、糖浓度)中。用水稀释糖浆以达到用于各个水解反应的糖浓度。表5还提供了被每种酶水解的明串珠菌二糖和DP3+(至少DP3-DP7)低聚糖的百分比。DP3+水解百分比计算为 $(1 - (\text{最终糖浆中DP3+低聚糖的重量}\%)) / (\text{初始糖浆中DP3+低聚糖的重量}\%)$ 。相似地,明串珠菌二糖水解百分比计算为 $(1 - (\text{最终糖浆中明串珠菌二糖重量}\%)) / (\text{初始糖浆中明串珠菌二糖重量}\%)$ 。

[0314] 表5

[0315] 通过各种酶水解浓缩滤液中明串珠菌二糖和低聚糖

[0316]

实施例	酶	载酶量 (体积%)	温度 (°C)	时间 (小时)	pH	糖浓度 (g/L) ^a	DP3+ ^b 水 解 (%)	明串珠 菌二糖 水解 (%)
2.1	DIAZYME RDF ULTRA	0.5	60	88	4.0	300	36	13
2.2	寡-1,6-葡 糖苷酶	5	40	72	5.5	400	43	<2
2.3	SPEZYME FRED	0.5	60	66	4.0	280	<2	<2
2.4	SPEZYME RSL	0.5	60	48	4	290	<2	<2
2.5	OPTIMAX L-1000	0.5	60	48	4	290	<2	<2
2.6	TG L-2000	0.25	60	70	4.0	260	54	>98
2.7	TG L-2000	2	60	48	4.5	300	96	>98
2.8	纯化的 TG L-2000	0.5	60	48	4.5	260	56	>98
2.9	ACCELER ASE BG	0.5	60	70	4	300	11	<2
2.10	NOVO 188	0.25	60	70	4	300	49	36
2.11	NOVO 188	5	60	40	5.5	340	93	29
2.12	SUMIZYM E BFS-L	0.5	60	48	4.5	260	55	46
2.13	SUMIZYM E BGA	0.1 wt%	60	48	4.5	260	26	77
2.14	ACCELER ASE TRIO	0.5	60	48	4	290	28	6.6
2.15	ACCELER ASE 1500	0.5	60	66	4	280	26	4
2.16	GC.147	0.5	60	40	4	300	55	12

[0317]

2.17	GC 321	5	60	72	5.5	400	74	64
2.18	OPTIDEX L-400	0.5	60	70	4	300	27	25

[0318] a HPLC测得的糖浓度(蔗糖、葡萄糖、果糖、明串珠菌二糖和低聚糖);记录的值被四舍五入到最接近10g/L增量。

[0319] b DP3+包含DP3-DP7,但也可包含较大的可溶性低聚糖,其在用某些gtf酶产生时具有较高的 α -1,6键与 α -1,3键的比率。

[0320] 表5表明1,4- α -葡糖苷酶和1,6- α -葡糖苷酶显示出部分(实施例2.1)或极少(实施例2.2)水解明串珠菌二糖,但是从低聚糖中释放出一些葡萄糖。 α -淀粉酶(实施例2.3和实施例2.4)的使用显示出对目标化合物的活性极小。相似地,支链淀粉酶(实施例2.5)的使用示出极小的活性。

[0321] 纤维素酶(实施例2.14和2.15)在水解明串珠菌二糖时很大程度上无效,但是水解

一些低聚糖。

[0322] 虽然低聚糖包含 β 键,但令人惊奇地, β -葡糖苷酶也显示出极低(ACCELERASE BG, 实施例2.9)至极高(NOVO 188, 实施例2.10和2.11)的水解转化范围。这些酶的相对功效大幅度变化。在一些情况下,水解的低聚糖的量大大超过(实施例2.11)或接近于(实施例2.12)水解的明串珠菌二糖的百分比。在其它情况下,明串珠菌二糖被 β -葡糖苷酶高度水解,同时低聚糖被中度水解(实施例2.13)。所观察到的 β -葡糖苷酶的结果之间的较高差异表明,在受试 β -葡糖苷酶制剂中存在的其它酶例如葡糖淀粉酶或另一类 α -葡糖苷酶是造成观察到的活性的原因。

[0323] 相反地,表5中的结果表明,转葡糖苷酶(TG L-2000, 实施例2.6)示出水解低聚糖和明串珠菌二糖两者的极高活性。被转葡糖苷酶水解的明串珠菌二糖在某些情况下看起来是定量的,并且在较高的载酶量下大于95%的DP3+材料水解为葡萄糖和DP2(实施例2.7)。使用经纯化型式的转葡糖苷酶显示出类似的活性(实施例2.8),表明所观测的水解归因于转葡糖苷酶而非背景活性。

[0324] 葡糖淀粉酶(实施例2.16-2.18)示出对于明串珠菌二糖和低聚糖的一定范围的活性。仅有一种受试葡糖淀粉酶(实施例2.18)给予明串珠菌二糖和低聚糖两者小于30%的水解。

[0325] 表5中的结果表明, α -葡糖苷酶例如DIAZYME RDF ULTRA、葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶可水解存在于葡聚糖反应滤液中的明串珠菌二糖副产物。 α -葡糖苷酶水解明串珠菌二糖的能力表明这些酶可水解 α -1,5葡糖基-果糖键。在将明串珠菌二糖用作底物而示出以上此种活性时,据信该活性也可扩展到包含 α -1,5葡糖基-果糖键的低聚糖。

[0326] 表5的结果进一步表明, α -葡糖苷酶例如葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶可水解存在于葡聚糖反应滤液中的低聚糖副产物。因为这些低聚糖主要由经 α -1,3和/或 α -1,6键连接的葡萄糖单体单元组成(实施例3),所以表5的数据表明 α -葡糖苷酶可水解 α -1,3葡糖基-葡萄糖和/或 α -1,6葡糖基-果糖键。

[0327] 因为 α -葡糖苷酶通常有效地水解葡聚糖合成反应的明串珠菌二糖和/或低聚糖副产物,所以可单独或组合使用这些酶来降低从包含增加量的单糖和减小量的糖副产物的葡聚糖反应滤液产生高纯度糖浆所需的加工时间。有效的酶组合的示例可为用于水解明串珠菌二糖的转葡糖苷酶例如TG L-2000,和有效地水解低聚糖副产物的葡糖淀粉酶(例如GC 321)。

[0328] 因此, α -葡糖淀粉酶可独立地水解特定糖中的(i) α -1,5葡糖基-果糖键,和(ii) α -1,3和 α -1,6葡糖基-葡萄糖键。

[0329] 实施例3

[0330] 酶水解之前和之后葡聚糖反应滤液组分的键分布的比较

[0331] 该实施例测定转葡糖苷酶(EC 2.4.1.24)和 β -葡糖苷酶(EC 3.2.1.21)对存在于葡聚糖合成反应的浓缩滤液中的明串珠菌二糖和低聚糖副产物的水解活性。发现转葡糖苷酶减少了这些副产物的量,导致经处理滤液中的单糖(葡萄糖和果糖)相应增加。

[0332] 存在于以上葡聚糖合成反应的滤液中的低聚糖副产物包含>90%的葡萄糖-葡萄糖键,如由NMR所测得的(一般方法)。在葡萄糖-葡萄糖键中,约78%代表 α -1,3键并且约22%代表 α -1,6键。

[0333] NMR用于测定水解之后在以上实施例2.11产生的物质的键特征。如图1所示,对应于 α -1,3键的峰降低86%,对应于 α -1,6键的峰仅降低2.3%,并且对应于明串珠菌二糖的峰的峰降低21%。虽然蔗糖几乎定量地被该酶水解,但是Novo 188似乎不能水解 α -1,6键。

[0334] NMR类似地用于测定用TG L-2000 (SEQ ID NO:1) 转葡萄糖苷酶产生的物质的键特征(图2)。将210 μ L的浓缩滤液(得自表3的材料)、300 μ L的D₂O和90 μ L含有12.4mM DSS(作为内标)的D₂O在NMR管中混合,以给出300g/L的总糖浓度并加热至60℃。在60℃热平衡之后获得时间零点光谱(图2中的起始材料),并然后添加0.5体积%的酶。在60℃下,使样品在探头中再平衡并加上垫片,并在分析的几分钟之内进行测量。在用TG L-2000酶(图2中经处理材料)处理10小时之后,对应于 α -1,3键的峰降低41%,对应于 α -1,6键的峰降低36%,并且对应于明串珠菌二糖的峰降低>95%(图2)。观测到 α -还原端和 β -还原端峰两者均增加,这对应于果糖和葡萄糖的增加(图2)。

[0335] 这些结果表明转葡萄糖苷酶可将包含 α -1,3和 α -1,6键的低聚糖转化为葡萄糖并且可将明串珠菌二糖转化为果糖和葡萄糖。因此,转葡萄糖苷酶可水解特定糖中的(i) α -1,5葡糖基-果糖键以及(ii) α -1,3和 α -1,6葡糖基-葡萄糖键。

[0336] 实施例4

[0337] 使用固定化酶水解葡聚糖反应滤液中的明串珠菌二糖和低聚糖

[0338] 该实施例描述了使用固定的葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3)和转葡萄糖苷酶(EC 2.4.1.24)水解存在于获自葡聚糖合成反应的滤液中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。具体地,研究了固定的转葡萄糖苷酶TG L-2000 (SEQ ID NO:1,获自Genencor/DuPont Industrial Biosciences)和固定的葡糖淀粉酶GC-147(获自Genencor/DuPont Industrial Biosciences)对葡聚糖合成反应的滤液中明串珠菌二糖和低聚糖DP2、DP3和HS(高糖,DP4+)水解的影响。

[0339] 根据美国专利5541097中描述的方法对葡糖淀粉酶和转葡萄糖苷酶进行固定,其公开内容以引用方式并入本文。

[0340] 在用于固定葡糖淀粉酶和转葡萄糖苷酶的典型方法中,使约8.0g/批的两批多孔颗粒状硅藻土(EP Minerals,Reno,NV)用蒸馏水水化并然后转移至直径1.5-cm、高度30-cm的玻璃柱反应器中。以约6-7mL/min向上流动泵送水,从而从全部三个柱中除去细粒。通常,在一小时内,水流出物不含细粒。将水从柱排至颗粒状的硅藻土床的顶部并用0.1%w/v聚氮丙啶(PEI,EPOMIN P-1050)水溶液替换。然后向上流动泵送3500mL的PEI溶液并使流出物循环通过床2小时。然后,在室温下,用向上流动的蒸馏水洗涤颗粒状硅藻土床2小时,以除去游离的PEI。这样,获得颗粒状硅藻土-PEI。

[0341] 同时,将具有表4限定的活性的3.5mL葡糖淀粉酶GC-147添加至315mL的0.02M乙酸盐缓冲液(pH 4.5)中。然后,将1.575g的50%w/w戊二醛(Protectol[®]GA-50)缓慢添加至葡糖淀粉酶水溶液中,轻轻混合,并在轻轻搅拌下使戊二醛与葡糖淀粉酶水溶液在20-25℃的温度下反应4小时,其导致形成包含经处理葡糖淀粉酶的经处理酶-戊二醛加合物。使用具有表4限定活性的转葡萄糖苷酶TG L-2000而非葡糖淀粉酶分别重复这些步骤,由此导致形成包含经处理转葡萄糖苷酶的经处理酶-戊二醛加合物。

[0342] 然后,使每种经处理酶-戊二醛加合物在其包含颗粒状硅藻土-PEI载体的自身柱(如上制备)中循环4小时(20-25℃)。用水将过量的经处理加合物从载体中洗出。由此制备

具有固定的葡糖淀粉酶或转葡糖苷酶的柱。

[0343] 将具有表3所限定组成的葡聚糖滤液稀释至180g/L,调节至pH 4.5,并使其通过包含固定化酶的柱。将柱温控制于60℃。在柱平衡16小时之后,在不同流速下定时取样。通过HPLC测定水解反应产物的糖组成(表6)。当每次改变流速设定时,使柱在取样之前再平衡至少1-2个床体积。用实施例2所述的方法计算明串珠菌二糖和低聚糖的水解度。测试三种柱配置:1)固定的葡糖淀粉酶,2)固定的转葡糖苷酶,以及3)在固定的转葡糖苷酶之后固定的葡糖淀粉酶。

[0344] 表6

[0345] 固定的葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶水解低聚糖和明串珠菌二糖的应用

[0346]	固定的酶	平均接触时间 (小时)	DP3+ 水解(%)	明串珠菌二糖 水解(%)
	GC 147	0.7	16	17
	GC 147	1.0	20	22
	GC 147	1.3	25	29
	GC 147	3.0	39	47
	TG L-2000	0.7	28	>95
	TG L-2000	1.0	32	>95
	TG L-2000	1.3	37	>95
	TG L-2000	3.0	47	>95
[0347]	GC 147 + TG L-2000	6.0	55	>95

[0348] 表6表明,随着平均接触时间(定义为标称柱体积除以平均流速)增大,明串珠菌二糖和低聚糖的水解度通常增大。用固定的转葡糖苷酶水解明串珠菌二糖是特别优选的,因为即使使用所测最快流速也未观测到显著差异。虽然各个柱分别示出适当的转化,但是葡糖淀粉酶和转葡糖苷酶的组合给予了低聚糖的最高水解。

[0349] 因此,固定的葡糖淀粉酶或转葡糖苷酶、或这两类固定的酶的使用显示出了水解包含 α -1,3和 α -1,6葡糖基-葡萄糖键的低聚糖以及明串珠菌二糖的有效技术。这些结果符合实施例2的那些。其它 α -葡糖苷酶的固定应当给出类似的结果。

[0350] 实施例5

[0351] 用色谱法从葡聚糖反应滤液中富集果糖

[0352] 该实施例公开了可如何通过色谱法进一步富集葡聚糖反应滤液中的果糖。

[0353] 通常,当通过色谱法分离糖分子时,组分洗脱与分子尺寸负相关,因此首先洗脱出最大的分子。因此,对于葡聚糖合成反应的滤液,首先洗脱出低聚糖,之后是二糖,然后是单糖。采用钠阳离子树脂分离无法充分分离果糖和葡萄糖,并且所有的明串珠菌二糖、蔗糖和DP2被共同洗脱出来。优选使用阳离子为钙的离子交换树脂分离葡萄糖和果糖。

[0354] 根据实施例1的过程概要首先制得葡聚糖合成反应的滤液并将其浓缩为糖浆。该浓缩滤液的组成提供于表7中。

[0355] 表7

[0356] 葡聚糖合成反应的浓缩滤液的组成

[0357]		蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总量
	g/L	126	202	93	295	40	65	821
	wt%	15.4	24.6	11.3	36.0	4.8	7.9	100

[0358] 将表7的糖浆过滤并用非离子交换水稀释至25g干固体/100g溶液,并进料至包含交联的强酸性离子交换树脂(钙形式)的柱中。该柱的物理参数显示在表8中。将稀释的糖浆(15.8L)送入维持于65℃的柱中,此后用流速为30L/小时的水洗脱柱。

[0359] 表8

[0360] 柱的物理参数

[0361]

树脂类型	FINEX CS11GC
离子形式	Ca ²⁺
交联,二乙烯苯%	5.5
粒度(mm)	0.34
床长度(m)	5.0
柱直径(m)	0.225

[0362] 在该分离中,保留于柱中的明串珠菌二糖比蔗糖长,这可能是由于串珠菌二糖与钙阳离子络合,并且事实上与葡萄糖共同洗脱出来。使包含果糖的两个级分分离。在47至120分钟之间洗脱出级分5.1,并且在120至172分钟之间洗脱出级分5.2。在供料于色谱分离的果糖中,95.7%的果糖以>90%纯度分离。如HPLC所测,各个级分(5.1和5.2)中的产物分布显示于表9中。

[0363] 表9

[0364] 包含显著量果糖的色谱级分的产物分布

[0365]

级分	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP3+	其它	总量	回收的 果糖%
5.1	31.9	34.8	20.8	3.9	5.4	4.8	100	3.9
5.2	0.0	1.0	0.8	97.7	0.0	0.6	100	95.7

[0366] 因为用于该分离的进料组合物包含36.0%果糖,所以总共34.5%的总料流以具有>90重量%DS果糖的果糖糖浆回收。如果忽略进料中的蔗糖,则40.7%的糖以具有>90重量%DS果糖的果糖糖浆回收。

[0367] 因此,葡聚糖反应滤液中的果糖可通过色谱法进一步富集。以下实施例6显示出,可使用转葡糖苷酶水解的葡聚糖滤液来增强该过程。

[0368] 实施例6

[0369] 通过色谱法从水解的葡聚糖反应滤液中富集果糖

[0370] 该实施例示出,与从未水解的葡聚糖滤液中分离果糖相比,从低聚糖和明串珠菌二糖已被水解的葡聚糖滤液中分离果糖导致高纯度果糖糖浆的收率增加。

[0371] 通过在60℃和pH 4.5下对已经1体积%转葡糖苷酶TG L-2000 (SEQ ID NO:1) 处理24小时的葡聚糖滤液进行浓缩(在50℃下真空)来制备糖浆。在浓缩过程期间观察到一些低聚糖形成物,其可以是期望的,因为已知转葡糖苷酶在高浓度的单糖下产生低聚糖。糖浆具

有表A所述的最终产物分布。

[0372] 表A

[0373] 在浓缩之前水解的浓缩葡聚糖滤液的组成

[0374]		蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总量
	g/L	3	<10	294	409	73	81	~870
	wt%	0.3	1.1	33.7	47.0	8.4	9.3	100

[0375] 将表A所述的糖浆过滤并用非离子交换水稀释至25.4g DS/100g溶液,并进料至包含交联的强酸性阳离子交换树脂(钙形式)的柱中。柱的物理参数示于表B中。然后将稀释的糖浆(169g)送入维持于65℃的柱中,此后用流速为50mL/min的水洗脱柱。

[0376] 表B

[0377] 柱的物理参数

[0378]

树脂类型	FINEX CS11GC
离子形式	Ca ²⁺
交联,二乙烯苯%	5.5
粒度(mm)	0.34
床长度(m)	1.69
柱直径(m)	0.093

[0379] 使包含果糖的两个级分分离。在73至103分钟之间洗脱出级分6.1,并且在103至120分钟之间洗脱出级分6.2。在供料于色谱分离的果糖中,进料至柱的93.0%的果糖在级分6.2中以>90%纯度分离。如HPLC所测,各个级分(6.1和6.2)中的产物分布显示于表C中。

[0380] 表C

[0381] 包含得自水解葡聚糖滤液的果糖的色谱级分的产物分布

[0382]

级分	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP3+	其它	总量	% 回收的 果糖
6.1	7.7	13.9	63.9	7.3	1.5	5.7	100	5.9
6.2	0.0	0.6	3.0	91.8	0.0	4.6	100	93.0

[0383] 该实施例的分离效率相较于实施例5的减小可归因于柱规模的差异以及样品中更高的葡萄糖级分。即使如此,相较于通过色谱法由未经转葡糖苷酶水解的葡聚糖滤液制备糖浆的实施例5所获得的,该材料的色谱纯化导致高纯度果糖糖浆的收率增加。因为用于该分离的进料组合物包含47%果糖(表A),所以43.7%的总料流以具有>90重量%DS果糖的果糖糖浆回收。此处43.7%回收率显著优于实施例5的34.5%回收率。

[0384] 因此,与从未水解的葡聚糖滤液中分离果糖时相比,从已被转葡糖苷酶水解的葡聚糖滤液中分离果糖导致果糖的收率增加。

[0385] 实施例7

[0386] 通过发酵葡聚糖合成反应的滤液制备乙醇

[0387] 该实施例公开了将葡聚糖滤液酵母发酵为乙醇。

[0388] 通过使膏悬浮于自来水 (2.4L, 在600nm处光密度为65) 中并然后采用LEGEND XTR离心机(Thermo Scientific)在4500g下将酵母膏离心5分钟来洗涤酵母(酿酒酵母)膏(Tonon mill, Brazil)。在滗析上清液之后, 通过再两次离心使酵母细胞重悬和浓缩。在第三次洗涤之后, 通过添加5重量%硫酸将pH调节至2。使用GENESYS 204001分光光度计(Thermo Scientific)测定光密度并通过添加自来水将其调节至100 (在600nm处)。将经调节酵母膏(1.5L)添加至7.5-L BIOFL0310发酵罐容器(New Brunswick)中。将发酵罐设定为维持于30℃的温度, 并在100rpm下搅拌。虽然在发酵期间测定了pH, 但是其不通过添加酸或碱溶液来控制。

[0389] 制备包含酵母提取物(10g/L)、蛋白胨(20g/L)和得自葡聚糖滤液的200g/L糖的进料溶液并用PHOENIX AV-250 PLUS高压釜在121℃下灭菌15分钟。在发酵开始之前, 使进料溶液冷却至25℃(室温)。在684mL/小时速率下将经灭菌进料溶液(3.5L)添加至发酵罐约5小时, 并使发酵进行22小时。

[0390] 在发酵期间定时取样并用GENESYS 20 4001分光光度计分析光密度, 用PAL-3折射计(Atago)分析白利糖度, 用HPLC(一般方法)分析糖和乙醇浓度。这些结果总结于表10中。

[0391] 表10

[0392] 第一乙醇发酵的进料和时程发酵特征

[0393]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	9	70	19	76	7	19	200	0
0	0.2	0.0	0.0	0.1	-	-	-	7
1	<1	18	0.3	<1	-	-	-	15
2	<1	30	0.4	<1	-	-	-	21
3	<1	40	0.0	<1	-	-	-	25
4	<1	46	0.0	<1	-	-	-	28
5	<1	49	0.0	<1	-	-	-	29
6	<1	53	0.0	<1	-	-	-	32
8	<1	53	0.0	<1	-	-	-	33
22	<1	53	0.0	<1	5	18	76	33

[0394] 列出了进料中的以及各个发酵时间点(0-22小时)的乙醇(EtOH)和糖化合物的浓度(g/L)。

[0395] 当发酵结束时, 通过使用LEGEND XTR离心机在4500g下离心5分钟来分离酵母细胞。在滗析上清液之后, 通过再离心两次使酵母重悬和浓缩。在第三次洗涤之后, 通过添加5重量%硫酸将pH调节至2。使用GENESYS 20 4001分光光度计测定光密度并通过添加自来水将其调节至100 (在600nm处)。根据上述相同条件, 使用从先前发酵回收的酵母细胞再进行两次发酵循环, 每次均使用新鲜进料。用第一次和第二次回收的酵母获得的发酵结果分别提供于表11和12中。

[0396] 表11

[0397] 使用第一回收酵母细胞的进料和时程发酵特征

[0398]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	13	69	21	77	7	18	206	0
0	0	4	0	0	-	-	-	5
1	<1	19	0	<1	-	-	-	18
4	<1	35	0	<1	-	-	-	23
4	<1	40	0	<1	-	-	-	26
5	<1	45	0	<1	-	-	-	29
6	<1	53	0	<1	-	-	-	32
7	<1	50	0	<1	-	-	-	32
7	<1	51	0	<1	-	-	-	33
21	<1	42	0	<1	6	18	65	37

[0399] 列出了进料中的以及各个发酵时间点(0-21小时)的乙醇(EtOH)和糖化化合物的浓度(g/L)。

[0400] 表12

[0401] 使用第二回收酵母细胞的进料和时程发酵特征

[0402]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	10	70	19	76	6	19	201	0
0	<1	0	0	<1	-	-	-	11
1	<1	32	0	<1	-	-	-	24
4	<1	40	0	<1	-	-	-	29
4	<1	45	0	<1	-	-	-	31
5	<1	46	0	<1	-	-	-	33
6	<1	45	0	<1	-	-	-	34
6	<1	16	0	<1	-	-	-	48
7	<1	7	0	<1	-	-	-	52
21	<1	5	0	<1	5	16	27	54

[0403] 列出了进料中的以及各个发酵时间点(0-21小时)的乙醇(EtOH)和糖化化合物的浓度(g/L)。

[0404] 在第一次发酵中消耗了极少的明串珠菌二糖,但是酵母细胞经由第二回收开始适应并消耗明串珠菌二糖。在采用回收酵母的三个发酵循环之后,乙醇发酵滴度由33g/L(表10,22小时)增至54g/L(表12,21小时),但是即使在最后一个循环后培养基中还是存在显著量的明串珠菌二糖。

[0405] 因此,葡聚糖滤液可用于发酵过程以产生乙醇。

[0406] 实施例8

[0407] 通过发酵水解的葡聚糖滤液制备乙醇

[0408] 该实施例示出使其中明串珠菌二糖和低聚糖副产物组分先前已被糖化的葡聚糖滤液发酵导致乙醇收率增加。

[0409] 发酵根据实施例7描述的方法进行,但是这里使用先前已经转葡萄糖苷酶(TG L-

2000, SEQ ID NO:1) 处理的葡聚糖滤液。如下制备水解的葡聚糖滤液。将葡聚糖滤液调节至300g糖/L, 然后使用1.0M氢氧化钠和5重量%硫酸将pH调节至4.0。该制剂的最终体积为6.75L。然后使用PHOENIX AV-250PLUS高压釜将滤液在121℃下灭菌15分钟, 然后将温度调节至60℃。使如表4 (135mL) 所述的TG L-2000酶提取物与经灭菌滤液混合, 并在60℃和100rpm下使溶液在培养摇床 (IKA KS4000) 中温育72小时。由此制备了水解的葡聚糖滤液。

[0410] 通过使膏悬浮于自来水 (2.4L, 在600nm处光密度为65) 并然后采用LEGEND XTR离心机在4500g下将酵母膏离心5分钟来洗涤酵母 (酿酒酵母) 膏 (Bom Retiro mill, Brazil)。在滗析上清液之后, 通过再两次离心使酵母重悬和浓缩。在第三次洗涤之后, 通过添加5重量%硫酸将pH调节至4.5, 并且使用GENESYS204001分光光度计测定光密度并通过添加自来水将其调节至100 (在600nm处)。将经调节酵母膏 (1.5L) 添加至7.5-L BIOFLO310发酵罐容器中。将发酵罐设定为保持30℃的温度, 在100rpm下搅拌, 并使用4M氢氧化铵水溶液或5重量%硫酸水溶液使pH维持于4.5。

[0411] 制备包含酵母提取物 (10g/L)、蛋白胨 (20g/L) 和得自经水解的滤液的200g/L糖的进料溶液并用PHOENIX AV-250 Plus高压釜在121℃灭菌15分钟。在发酵开始之前, 使进料溶液冷却至25℃ (室温)。在684mL/小时速率下将经灭菌进料溶液 (3.5L) 添加至发酵罐约5小时, 并使发酵进行22小时。

[0412] 在发酵期间定时取样并用GENESYS 20 4001分光光度计分析光密度, 用PAL-3折射计分析白利糖度, 用HPLC (一般方法) 分析糖和乙醇浓度。这些结果总结于表13中。

[0413] 表13

[0414] 采用经水解葡聚糖滤液的第一乙醇发酵的进料和时程发酵特征

[0415]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	7	4	65	97	11	3	186	0
0	0	0	0	0	-	-	-	7
1	<1	1	<1	<1	-	-	-	20
2	<1	3	<1	<1	-	-	-	32
3	<1	4	<1	<1	-	-	-	40
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	49
5	<1	4	<1	<1	-	-	-	53
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	55
8	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
22	<1	5	<1	<1	8	3	16	54

[0416] 列出了进料中的以及各个发酵时间点 (0-22小时) 的乙醇 (EtOH) 和糖化合物的浓度 (g/L)。

[0417] 当发酵结束时, 通过使用LEGEND XTR离心机在4500g下离心5分钟来分离酵母细胞。在滗析上清液之后, 通过再离心两次使酵母细胞重悬和浓缩。在第三次洗涤之后, 通过添加5重量%硫酸将pH调节至2。使用GENESYS 20 4001分光光度计测定光密度并通过添加自来水将其调节至100 (在600nm处)。根据上述相同条件, 采用从先前发酵回收的酵母细胞再进行两次发酵循环, 每次使用新鲜进料。使用第一次和第二次回收的酵母细胞获得的发酵结果分别提供于表14和15中。

[0418] 表14

[0419] 使用第一回收酵母细胞和经水解葡聚糖滤液的进料和时程发酵特征

[0420]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
------------	----	------------	-----	----	-----	------	----	------

[0421]

进料	7	4	69	104	7	4	194	0
0	<1	0	<1	<1	-	-	-	10
1	<1	7	<1	<1	-	-	-	25
4	<1	5	<1	<1	-	-	-	39
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	45
5	<1	5	<1	<1	-	-	-	51
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
6.2	<1	5	<1	<1	-	-	-	60
7	<1	5	<1	<1	-	-	-	59
21	<1	5	<1	<1	9	5	19	58

[0422] 列出了进料中的以及各个发酵时间点 (0-21小时) 的乙醇 (EtOH) 和糖化合物的浓度 (g/L)。

[0423] 表15

[0424] 使用第二回收酵母细胞和经水解葡聚糖滤液的进料和时程发酵特征

[0425]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	7	4	70	105	7	5	197	0
0	0	0	0	0	-	-	-	10
1	<1	7	<1	<1	-	-	-	25
3.5	<1	5	<1	<1	-	-	-	39
4	<1	4	<1	<1	-	-	-	45
5	<1	5	<1	<1	-	-	-	51
6	<1	5	<1	<1	-	-	-	57
6.2	<1	5	<1	<1	-	-	-	60
7	<1	5	<1	<1	-	-	-	59
21	<1	5	<1	<1	9	5	19	58

[0426] 列出了进料中的以及各个发酵时间点 (0-21小时) 的乙醇 (EtOH) 和糖化合物的浓度 (g/L)。

[0427] 在开始发酵约六小时内,所有发酵基本完成,并且导致57-60.0g/L的乙醇滴度。将这些发酵与实施例7的那些进行比较显示出比与使用未水解的葡聚糖滤液发酵获得的那些相比,葡聚糖滤液在其进行发酵之前水解导致更快和更大的乙醇收率。

[0428] 因此,使其中明串珠菌二糖和低聚糖副产物组分已被糖化的葡聚糖滤液发酵导致乙醇收率以更快的速率增加。该糖化可使用例如转葡糖苷酶进行。

[0429] 实施例9

[0430] 葡聚糖滤液的同步糖化和发酵

[0431] 该实施例公开了包含葡聚糖滤液的进料的同步糖化和发酵可导致增强的发酵特性。

[0432] 通过使膏悬浮于自来水 (2.4L, 在600nm处光密度为65) 并然后采用LEGEND XTR离心机在4500g下将酵母膏离心5分钟来洗涤酵母 (酿酒酵母) 膏 (Bom Retiro mill, Brazil)。在离心上清液之后, 通过再两次离心使酵母细胞重悬和浓缩。在第三次洗涤之后, 通过添加5重量%硫酸将pH调节至4.5, 并且使用GENESYS 20 4001分光光度计测定光密度并通过添加自来水将其调节至100 (在600nm处)。将经调节酵母膏 (1.5L) 添加至7.5-L BIOFL0310发酵罐容器中。将发酵罐设定为保持30℃的温度, 在100rpm下搅拌, 并使用4M氢氧化铵水溶液或5重量%硫酸水溶液使pH维持于4.5。

[0433] 制备包含酵母提取物 (10g/L)、蛋白胨 (20g/L) 和得自葡聚糖滤液的200g/L糖的进料溶液并用PHOENIX AV-250 PLUS高压釜在121℃灭菌15分钟。在发酵开始之前, 使进料溶液冷却至25℃ (室温)。紧接在将溶液添加至发酵罐之前, 将如表4所述的TG L-2000转葡萄糖苷酶 (1% v/v) 添加至经灭菌的进料溶液中。在684mL/小时下将包含TG L-2000酶的进料溶液 (3.5L) 添加至发酵罐约5小时, 并使发酵进行48小时。

[0434] 在发酵期间定时取样并用GENESYS 20 4001分光光度计分析光密度, 用PAL-3折射计 (Atago) 分析白利糖度, 用HPLC (一般方法) 分析糖和乙醇浓度。这些结果总结于表16中。

[0435] 表16

[0436] 葡聚糖滤液的同时糖化和乙醇发酵的进料和时程发酵特征

[0437]

时间 (小时)	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3+	总糖	EtOH
进料	7	82	12	79	6	20	206	0
0	0	0	0	0	0	0	0	2
1	<1	13	<1	3	-	-	-	11
2	<1	21	<1	4	-	-	-	30
3	<1	21	<1	3	-	-	-	38
4	<1	20	<1	3	11	16	50	43
5	<1	14	<1	2	-	-	-	45

[0438]

6	<1	<1	<1	2	-	-	-	59
22	<1	<1	<1	1	-	-	-	62
25	<1	<1	<1	<1	-	-	-	63
27	<1	<1	<1	<1	-	-	-	63
31	<1	<1	<1	<1	-	-	-	57
46	<1	<1	<1	<1	-	-	-	57
48	<1	<1	<1	<1	1	11	12	62

[0439] 列出了进料中的以及各个发酵时间点 (0-48小时) 的乙醇 (EtOH) 和糖化合物的浓度 (g/L)。

[0440] 发酵在6小时内标称地完成, 类似于在发酵步骤之前滤液已被水解的发酵 (实施例8), 并且给出相较于使用未水解滤液 (实施例7) 略微更优异的乙醇滴度 (62g/L)。此外, 6小时消耗了几乎所有的明串珠菌二糖 (将表16与表13-15比较)。如果直接将糖化酶添加至发

醇物,则除了在临发酵前将糖化酶例如TG L-2000添加至包含葡聚糖滤液的进料之外,应当获得类似的结果。

[0441] 因此,包含葡聚糖滤液的进料的同步糖化和发酵可导致增强的发酵特性,例如增大(i) 葡聚糖滤液组分(例如明串珠菌二糖)的消耗和(ii) 乙醇收率和产生速率。

[0442] 实施例10

[0443] 各种 α -葡糖苷酶的制备

[0444] 该实施例公开了制备除了用于一些前述实施例的那些 α -葡糖苷酶(转葡糖苷酶、葡糖淀粉酶、DIAZYME RDF ULTRA)之外的各种 α -葡糖苷酶。测试这些另外的 α -葡糖苷酶对包含 α -1,5葡糖基-果糖键或 α -1,3和/或 α -1,6葡糖基-葡萄糖键的低聚糖的水解活性(在以下提供的实施例11、12、15和16中)。

[0445] 棒曲霉 α -葡糖苷酶(Aclglu1)的发现

[0446] 棒曲霉的菌株被选为可用于各种工业应用的其它酶的可能来源。鉴定于棒曲霉中的一种基因编码 α -葡糖苷酶(称为“Aclglu1”),并且该基因的序列提供于SEQ ID NO:4中。由SEQ ID NO:4编码的对应蛋白质提供于SEQ ID NO:5。Aclglu1属于基于PFAM搜索(pfam.sanger.ac.uk web link)的糖基水解酶家族31。在N-末端,蛋白质(SEQ ID NO:5)具有长度为19个氨基酸的信号肽,如SignalP版本4.0所预测(Nordahl Petersen等人2011, Nature Methods,8:785-786)。信号肽的存在表明Aclglu1为分泌性酶。预测的成熟形式的Aclglu1的氨基酸序列示出为SEQ ID NO:6。

[0447] 棒曲霉 α -葡糖苷酶Aclglu1的表达

[0448] 将合成Aclglu1基因克隆到pTrex3gM表达载体中(描述于美国专利申请公开2011/0136197,其以引用方式并入本文)并且将所得质粒命名为pJG294。Aclglu1基因的序列通过DNA测序加以证实。

[0449] 采用基因枪方法(Te'o VS等人,J Microbiol Methods,51:393-9,2002)将质粒pJG294转化到四重缺失的里氏木霉菌株中(在W005/001036中有所描述)。预测包含SEQ ID NO:6的蛋白质分泌到细胞外培养基中,并且过滤后的培养基用于进行SDS-PAGE和 α -葡糖苷酶活性测定来证实酶表达。

[0450] 费氏新萨托菌(Neosartorya fischeri) α -葡糖苷酶Nfiglu1的发现

[0451] 费氏新萨托菌的菌株被选为可用于各种工业应用的其它酶的可能来源。鉴定于费氏新萨托菌中的一种基因编码 α -葡糖苷酶(称为“Nfiglu1”),并且该基因的序列提供于SEQ ID NO:7中。由SEQ ID NO:7编码的对应蛋白质提供于SEQ ID NO:8。Nfiglu1属于基于PFAM搜索(pfam.sanger.ac.uk web link)的糖基水解酶家族31。在N-末端,蛋白质(SEQ ID NO:8)具有长度为19个氨基酸的信号肽,如SignalP版本4.0所预测(Nordahl Petersen等人2011,Nature Methods,8:785-786)。信号肽的存在表明Nfiglu1为分泌性酶。预测的成熟形式的Nfiglu1的氨基酸序列示出为SEQ ID NO:9。

[0452] 费氏新萨托菌 α -葡糖苷酶Nfiglu1的表达

[0453] 将合成Nfiglu1基因克隆到pTrex3gM表达载体中(描述于美国专利申请公开2011/0136197)并且将所得质粒命名为pJG295。Nfiglu1基因的序列通过DNA测序加以证实。

[0454] 采用基因枪方法(Te'o VS等人,J Microbiol Methods,51:393-9,2002)将质粒pJG295转化到四重缺失的里氏木霉菌株中(在W005/001036中有所描述)。预测包含SEQ ID

NO:9的蛋白质分泌到细胞外培养基中,并且过滤后的培养基用于进行SDS-PAGE和 α -葡萄糖苷酶活性测定来证实酶表达。

[0455] 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) α -葡萄糖苷酶Ncrglu1的发现

[0456] 粗糙脉孢菌的菌株被选为可用于各种工业应用的其它酶的可能来源。鉴定于粗糙脉孢菌中的一种基因编码 α -葡萄糖苷酶(称为“Ncrglu1”),并且该基因的序列提供于SEQ ID NO:10中。由SEQ ID NO:10编码的对应蛋白质提供于SEQ ID NO:11中。Ncrglu1属于基于PFAM搜索(pfam.sanger.ac.uk web link)的糖基水解酶家族31。在N-末端,蛋白质(SEQ ID NO:11)具有长度为22个氨基酸的信号肽,如SignalP版本4.0所预测(Nordahl Petersen等人2011,Nature Methods,8:785-786)。信号肽的存在表明Ncrglu1为分泌性酶。预测的成熟形式的Ncrglu1的氨基酸序列示出为SEQ ID NO:12。

[0457] 粗糙脉孢菌 α -葡萄糖苷酶Ncrglu1的表达

[0458] 将合成Ncrglu1基因克隆到pTrex3gM表达载体中(描述于美国专利申请公开2011/0136197)并且将所得质粒命名为pJG296。Ncrglu1基因的序列通过DNA测序加以证实。

[0459] 采用基因枪方法(Te'o VS等人,J Microbiol Methods,51:393-399,2002)将质粒pJG296转化到四重缺失的里氏木霉菌株中(在W005/001036中有所描述)。预测包含SEQ ID NO:12的蛋白质分泌到细胞外培养基中,并且过滤后的培养基用于进行SDS-PAGE和 α -葡萄糖苷酶活性测定来证实酶表达。

[0460] Rasamsonia composticola α -葡萄糖苷酶TauSec098的发现

[0461] Rasamsonia composticola的菌株被选为可用于各种工业应用的其它酶的可能来源。鉴定于Rasamsonia composticola中的一种基因编码 α -葡萄糖苷酶(称为“TauSec098”),并且该基因的序列提供于SEQ ID NO:13中。由SEQ ID NO:13编码的对应蛋白质提供于SEQ ID NO:14。TauSec098属于基于PFAM搜索(pfam.sanger.ac.uk web link)的糖基水解酶家族31并且包含N-末端CBM 20域。在N-末端,蛋白质(SEQ ID NO:14)具有长度为22个氨基酸的信号肽,如SignalP版本4.0所预测(Nordahl Petersen等人2011,Nature Methods,8:785-786)。信号肽的存在表明TauSec098为分泌性酶。预测的成熟形式的TauSec098的氨基酸序列示出为SEQ ID NO:15。

[0462] Rasamsonia composticola α -葡萄糖苷酶TauSec098的表达

[0463] 合成TauSec098基因由Generay Biotech Co (Shanghai,China) 克隆到里氏木霉表达载体pGXT (pTTT-衍生质粒)中并且将所得质粒命名为pGX256-TauSec098。TauSec098基因的序列通过DNA测序加以证实。

[0464] 采用原生质体转化(Te'o等人,J.Microbiol.Methods 51:393-9,2002)将质粒pGX256-TauSec098转化到四重缺失的里氏木霉菌株中(在W005/001036中有所描述)。在包含作为唯一氮源的乙酰胺的培养基(乙酰胺0.6g/L;氯化铯1.68g/L;葡萄糖20g/L;磷酸二氢钾15g/L;七水硫酸镁0.6g/L;二水氯化钙0.6g/L;硫酸亚铁(II) 5mg/L;硫酸锌1.4mg/L;氯化钴(II) 1mg/L;硫酸锰(II) 1.6mg/L;琼脂20g/L;pH 4.25)上选择转化体。在约1周内出现转化的菌落(约50-100个)。在乙酰胺平板上生长之后,收集转化体的孢子并转移到新乙酰胺琼脂平板中。在乙酰胺平板上生长5天后,将 1×10^8 孢子接种到250-mL摇瓶中的30ml葡萄糖/槐糖确定成分培养基中。使摇瓶在28℃下摇动5天。得自这些培养物的上清液用于证实成熟TauSec098酶(SEQ ID NO:15)的表达(SDS PAGE)和活性。

[0465] Rasamsonia composticola α -葡糖苷酶TauSec099的发现

[0466] *Rasamsonia composticola*的菌株被选为可用于各种工业应用的其它酶的可能来源。鉴定于*Rasamsonia composticola*中的一种基因编码 α -葡糖苷酶(称为“TauSec099”),并且该基因的序列提供于SEQ ID NO:16中。由SEQ ID NO:16编码的对应蛋白质提供于SEQ ID NO:17中。TauSec099属于基于PFAM搜索(pfam.sanger.ac.uk web link)的糖基水解酶家族31。在N-末端,蛋白质(SEQ ID NO:17)具有长度为17个氨基酸的信号肽,如SignalP版本4.0所预测(Nordahl Petersen等人2011,Nature Methods,8:785-786)。信号肽的存在表明TauSec099为分泌性酶。预测的成熟形式的TauSec099的氨基酸序列示出为SEQ ID NO:18。

[0467] Rasamsonia composticola α -葡糖苷酶TauSec099的表达

[0468] 合成TauSec099基因由Generay Biotech Co (Shanghai,China) 克隆到里氏木霉表达载体pGXT (pTTT-衍生质粒) 中并且将所得质粒命名为pGX256-TauSec099。TauSec0998基因的序列通过DNA测序加以证实。

[0469] 采用原生质体转化(Te'o等人,J.Microbiol.Methods 51:393-9,2002) 将质粒pGX256-TauSec099转化到四重缺失的里氏木霉菌株中(在W005/001036中有所描述)。在包含作为唯一氮源的乙酰胺的培养基(乙酰胺0.6g/L;氯化铯1.68g/L;葡萄糖20g/L;磷酸二氢钾15g/L;七水硫酸镁0.6g/L;二水氯化钙0.6g/L;硫酸亚铁(II) 5mg/L;硫酸锌1.4mg/L;氯化钴(II) 1mg/L;硫酸锰(II) 1.6mg/L;琼脂20g/L;pH 4.25) 上选择转化体。在约1周内出现转化的菌落(约50-100个)。在乙酰胺平板上生长之后,收集转化体的孢子并转移到新乙酰胺琼脂平板中。在乙酰胺平板上生长5天后,将 1×10^8 孢子接种到250-mL摇瓶中的30ml 葡萄糖/槐糖确定成分培养基中。使摇瓶在28℃下摇动5天。得自这些培养物的上清液用于证实成熟TauSec099酶(SEQ ID NO:18)的表达(SDS PAGE)和活性。

[0470] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu1的序列

[0471] 从长双歧杆菌亚种-长双歧杆菌JDM301鉴定出 α -葡糖苷酶基因“BloGlu1”。BloGlu1基因(SEQ ID NO:19,GENBANK登录号NC014169.1,140600至142414位的互补序列)的核酸序列和由SEQ ID NO:19编码的假定蛋白(SEQ ID NO:20)的氨基酸序列存在于GENBANK登录号YP_003660432.1中。

[0472] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu1的表达

[0473] 对编码整个BloGlu1蛋白质(SEQ ID NO:20)的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co. (Shanghai,China) 合成(获得SEQ ID NO:21)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BloGlu1。p3JM-BloGlu1质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BloGlu1序列(SEQ ID NO:21)表达。

[0474] 质粒p3JM-BloGlu1用于转化枯草芽孢杆菌细胞(degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr),并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基(MOPS-基确定成分培养基,补充有额外5mM CaCl_2)的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BloGlu1蛋白质(SEQ ID NO:20)。

[0475] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu2的序列

[0476] 从长双歧杆菌鉴定出 α -葡糖苷酶基因BloGlu2。BloGlu2的氨基酸序列(SEQ ID

NO:22) 存在于NCBI数据库 (GENBANK登陆号WP_007054665.10) 中。

[0477] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu2的表达

[0478] 对编码BloGlu2蛋白质的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:23)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BloGlu2。SEQ ID NO:23编码SEQ ID NO:24的氨基酸序列。p3JM-BloGlu2质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BloGlu2序列 (SEQ ID NO:23) 表达。

[0479] 质粒p3JM-BloGlu2用于转化枯草芽孢杆菌细胞 (degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr), 并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基 (MOPS-基确定成分培养基, 补充有额外5mM CaCl_2) 的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BloGlu2蛋白质 (SEQ ID NO:24)。

[0480] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu3的序列

[0481] 从长双歧杆菌亚种-长双歧杆菌F8鉴定出 α -葡糖苷酶基因“BloGlu3”。BloGlu3基因 (SEQ ID NO:25, GENBANK登录号NC_021008.1, 2130627至2132441位) 的核酸序列和由SEQ ID NO:25编码的假定蛋白 (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列存在于GENBANK登录号YP_007768249.1中。

[0482] 长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BloGlu3的表达

[0483] 对编码整个BloGlu3蛋白质 (SEQ ID NO:26) 的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:27)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BloGlu3。p3JM-BloGlu3质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BloGlu3序列 (SEQ ID NO:27) 表达。

[0484] 质粒p3JM-BloGlu3用于转化枯草芽孢杆菌细胞 (degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr), 并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基 (MOPS-基确定成分培养基, 补充有额外5mM CaCl_2) 的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BloGlu3蛋白质 (SEQ ID NO:26)。

[0485] 假长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BpsGlu1的序列

[0486] 从假长双歧杆菌鉴定出 α -葡糖苷酶基因BpsGlu1。BpsGlu1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:28) 存在于NCBI数据库 (GENBANK登陆号WP_022858408.1) 中。

[0487] 假长双歧杆菌 α -葡糖苷酶BpsGlu1的表达

[0488] 对编码BloGlu1蛋白质的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:29)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BpsGlu1。SEQ ID NO:29编码SEQ ID NO:30的氨基酸序列。p3JM-BpsGlu1质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BpsGlu1序列 (SEQ ID NO:29) 表达。

[0489] 质粒p3JM-BpsGlu1用于转化枯草芽孢杆菌细胞 (degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr), 并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基 (MOPS-基确定成分培养基, 补充有额外5mM CaCl_2) 的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BpsGlu1蛋白质 (SEQ ID NO:30)。

[0490] 嗜热双歧杆菌 α -葡糖苷酶BthGlu1的序列

[0491] 从嗜热双歧杆菌RBL67鉴定出 α -葡糖苷酶基因“BthGlu1”。BthGlu1基因(SEQ ID NO:31, GENBANK登录号NC_020546.1, 150690至152495位)的核酸序列和由SEQ ID NO:31编码的假定蛋白(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列存在于GENBANK登录号YP_007592840.1中。

[0492] 嗜热双歧杆菌 α -葡糖苷酶BthGlu1的表达

[0493] 对编码整个BthGlu1蛋白质(SEQ ID NO:32)的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:33)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BthGlu1。p3JM-BthGlu1质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BthGlu1序列(SEQ ID NO:33)表达。

[0494] 质粒p3JM-BthGlu1用于转化枯草芽孢杆菌细胞(degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr),并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基(MOPS-基确定成分培养基,补充有额外5mM CaCl_2)的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BthGlu1蛋白质(SEQ ID NO:32)。

[0495] 短双歧杆菌 α -葡糖苷酶BbrGlu2的序列

[0496] 从短双歧杆菌鉴定出 α -葡糖苷酶基因BbrGlu2。BbrGlu2的氨基酸序列(SEQ ID NO:34)存在于NCBI数据库(GENBANK登陆号WP_003827971.1)中。

[0497] 短双歧杆菌 α -葡糖苷酶BbrGlu2的表达

[0498] 对编码BbrGlu2蛋白质的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:35)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BbrGlu2。SEQ ID NO:35编码SEQ ID NO:36的氨基酸序列。p3JM-BbrGlu2质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BbrGlu2序列(SEQ ID NO:35)表达。

[0499] 质粒p3JM-BbrGlu2用于转化枯草芽孢杆菌细胞(degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr),并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基(MOPS-基确定成分培养基,补充有额外5mM CaCl_2)的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达SEQ ID NO:36。

[0500] 短双歧杆菌 α -葡糖苷酶BbrGlu5的序列

[0501] 从短双歧杆菌ACS-071-V-Sch8b鉴定出 α -葡糖苷酶基因“BbrGlu5”。BbrGlu5基因(SEQ ID NO:37, GENBANK登录号NC_017218.1, 2241075至2242895位的互补序列)的核酸序列和由SEQ ID NO:37编码的假定蛋白(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列存在于GENBANK登录号YP_005583701.1中。

[0502] 双歧杆菌 α -葡糖苷酶BbrGlu5的表达

[0503] 对编码整个BbrGlu5蛋白质(SEQ ID NO:38)的DNA序列进行优化以在枯草芽孢杆菌中表达,然后由Generay Biotech Co.合成(获得SEQ ID NO:39)并插入到p3JM质粒中,导致p3JM-BbrGlu5。p3JM-BbrGlu5质粒包含aprE启动子以驱动最优化的BbrGlu5序列(SEQ ID NO:39)表达。

[0504] 质粒p3JM-BbrGlu5用于转化枯草芽孢杆菌细胞(degUHy32, Δ nprB, Δ vpr, Δ epr, Δ scoC, Δ wprA, Δ mpr, Δ ispA, Δ bpr),并且将转化的细胞涂布在补充有5ppm氯霉素的

Luria琼脂平板上。选择如由PCR和测序所证实的带有具正确插入片段的菌落并使其在具有MBD培养基(MOPS-基确定成分培养基,补充有额外5mM CaCl_2)的250-mL摇瓶中进行发酵,以表达BbrGlu5蛋白质(SEQ ID NO:38)。

[0505] 从表达培养物纯化 α -葡萄糖苷酶

[0506] Ac1Glu1和NcrGlu1

[0507] 采用两个色谱步骤来纯化Ac1Glu1(SEQ ID NO:6)和NcrGlu1(SEQ ID NO:12) α -葡萄糖苷酶两者。对于每一种纯化,浓缩摇瓶的粗发酵液,此后添加硫酸铵至最终浓度为2M。将溶液装载到经20mM Tris(pH 8.0)、2M硫酸铵预平衡的50-mL苯基HP柱。用1M硫酸铵、20mM Tris(pH 8.0)从柱洗脱出目标蛋白质(SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12)。合并相应的级分,用VIVAFLW 200超滤设备(Sartorius Stedim)使其浓缩并经缓冲液交换到20mM Tris(pH 8.0)(缓冲液A)中。将所得溶液施加于经缓冲液A预平衡的40-mL Q HP柱。用含0.3M NaCl的缓冲液A从柱洗脱出目标蛋白质。然后将包含目标蛋白质的级分合并并用10K AMICON ULTRA-15设备浓缩,并在-20℃储存于40%甘油中直至使用。

[0508] NfiGlu1

[0509] 使用两个疏水作用色谱步骤来纯化NfiGlu1 α -葡萄糖苷酶(SEQ ID NO:9)。浓缩摇瓶的粗发酵液,此后添加硫酸铵至最终浓度为1M。将溶液装载到经20mM Tris(pH 8.0)、1M硫酸铵预平衡的50-mL苯基HP柱。使目标蛋白质(SEQ ID NO:9)流动通过柱。合并流出级分,此后添加硫酸铵至最终浓度为2M。将溶液装载到经20mM Tris(pH 8.0)、2M硫酸铵预平衡的相同苯基HP柱上。用1M硫酸铵、20mM Tris(pH 8.0)从柱洗脱出目标蛋白质。然后将包含目标蛋白质的级分合并并用10K AMICON ULTRA-15设备浓缩,并在-20℃储存于40%甘油中直至使用。

[0510] TauSec098和TauSec099

[0511] 经由疏水作用色谱法来纯化TauSec098(SEQ ID NO:15)和TauSec099(SEQ ID NO:18) α -葡萄糖苷酶两者。对于每一种纯化,将硫酸铵添加到7-L发酵罐的约180mL浓缩粗发酵液中至最终浓度为1M。然后将该溶液装载到经20mM乙酸钠(pH5.0)、1M硫酸铵(缓冲液A)预平衡的50-mL HIPREP苯基-FF琼脂糖柱(GE Healthcare)。在用三个柱体积(CV)的相同缓冲液洗涤之后,采用75%、50%和0%缓冲液A各用三个CV逐步洗脱柱,之后用两CV的MILLIQ H_2O 洗脱。通过SDS-PAGE分析所有级分。目标蛋白质(SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:18)主要存在于流出级分中,其采用10KDa AMICON ULTRA-15设备进行浓缩和缓冲液更换以移除过量硫酸铵。在-80℃下,将纯度大于90%的最终产物储存于40%甘油中直至使用。

[0512] BloGlu1、BloGlu2和BloGlu3

[0513] 使BloGlu1(SEQ ID NO:20)、BloGlu2(SEQ ID NO:24)、BloGlu3(SEQ ID NO:26) α -葡萄糖苷酶均以三个步骤纯化。对于每一种纯化,浓缩1-L DASGIP发酵罐的粗发酵液,此后添加硫酸铵至60%饱和度。将溶液在4℃下搅拌1小时,然后在8000 $\times g$ 下离心30分钟。使所得沉淀物重悬于20mM Tris(pH 8.0,缓冲液A)中。将硫酸铵添加到最终溶液中至最终浓度为1M;然后将该制剂装载到经20mM Tris(pH 8.0)、1M硫酸铵(缓冲液B)预平衡的40-mL HiPrepTM苯基-FF柱。在洗涤后,用75%、50%和0%缓冲液B以及 H_2O 各用三个柱体积进行逐步洗脱。所有级分采用SDS-PAGE和活性测定进行分析。合并包含目标蛋白质(SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26)的级分,浓缩并随后装载到经20mM磷酸钠(pH7.0)、

0.15M NaCl预平衡的HiLoad™26/60 Superdex™75柱。然后将包含目标蛋白质的流出级分合并并用10K AMICON ULTRA-15设备浓缩,并在-20℃储存于40%甘油中直至使用。

[0514] BpsGlu1和BthGlu1

[0515] 以两个步骤纯化BpsGlu1 (SEQ ID NO:30) 和BthGlu1 (SEQ ID NO:32) α-葡萄糖苷酶两者。对于每一种纯化,浓缩1-L DASGIP发酵罐的粗发酵液,此后添加硫酸铵至60%饱和度。将溶液在4℃下搅拌1小时,然后在8000×g下离心30分钟。使所得沉淀物重悬于20mM Tris (pH 8.0,缓冲液A) 中。将硫酸铵添加到最终溶液中至最终浓度为1M;然后将该制剂装载到经20mM Tris (pH 8.0)、1M硫酸铵(缓冲液B) 预平衡的40-mL HiPrep™苯基-FF柱。在洗涤后,用75%、50%和0%缓冲液B以及H₂O各用三个柱体积进行逐步洗脱。所有级分采用SDS-PAGE和活性测定进行分析。目标蛋白质(SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:32) 存在于0%缓冲液B洗脱步骤的洗脱物中;合并该洗脱物并用10K AMICON ULTRA-15设备浓缩。在-20℃下,将纯度大于95%的最终产物储存于40%甘油中直至使用。

[0516] BbrGlu2和BbrGlu5

[0517] 以四个步骤纯化BbrGlu2 (SEQ ID NO:36) 和BbrGlu5 (SEQ ID NO:38) α-葡萄糖苷酶两者。对于每一种纯化,浓缩1-L DASGIP发酵罐的粗发酵液,此后添加硫酸铵至60%饱和度。将溶液在4℃下搅拌1小时,然后在8000×g下离心30分钟。使所得沉淀物重悬于20mM HEPES (pH 7.0,缓冲液A) 中。将硫酸铵添加到最终溶液中至最终浓度为1M;然后将该制剂装载到经20mM HEPES (pH 7.0)、1M硫酸铵预平衡的HiPrep™苯基-FF柱上。用0.5M硫酸铵从柱洗脱出目标蛋白质(SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:38)。合并相应的级分,用VIVAFLOW 200超滤设备(Sartorius Stedim) 使其浓缩并经缓冲液交换到缓冲液A中。将所得溶液施加于经缓冲液A预平衡的HiPrep™ Q FF16/10柱。用含有线性梯度的0-0.5 M NaCl的缓冲液A从柱洗脱出目标蛋白质。将包含目标蛋白质的级分合并,浓缩并随后装载到经20mM HEPES (pH7.0)、0.15M NaCl预平衡的HiLoad™26/60Superdex™75柱上。然后将包含目标蛋白质的级分合并并用10K AMICON ULTRA-15设备浓缩,并在-20℃储存于40%甘油中直至使用。

[0518] 因此,表达并纯化了各种其它的α-葡萄糖苷酶。测试这些α-葡萄糖苷酶对α-1,5葡萄糖基-果糖键和α-1,3和/或α-1,6葡萄糖基-葡萄糖键的水解活性(在以下提供的实施例11、12、15和16中)。

[0519] 实施例11

[0520] 测试α-葡萄糖苷酶对各种糖苷键的水解活性

[0521] 该实施例公开了测试α-葡萄糖苷酶是否具有超越先前该类酶(EC3.2.1.20) 相关的水解活性。实施例10的α-葡萄糖苷酶示出对α-1,5葡萄糖基-果糖键以及α-1,3和α-1,6葡萄糖基-葡萄糖键具有水解活性。

[0522] α-葡萄糖苷酶的底物特异性

[0523] 基于当底物与α-葡萄糖苷酶温育时葡萄糖从特定底物(异麦芽糖、麦芽糖、潘糖、明串珠菌二糖或黑曲霉糖) 释放,分析实施例10公开的各个α-葡萄糖苷酶的底物特异性。葡萄糖释放速率使用偶联葡萄糖氧化酶/过氧化物酶(GOX/HRP) 方法(1980,Anal.Biochem.105:389-397) 进行测定。葡萄糖释放定量为偶联GOX/HRP酶与葡萄糖反应所产生的过氧化物对2,2'-连氨基-二3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS) 进行氧化的速率。

[0524] 通过使9mL的底物溶液(水中1%,w/v) 与1mL的0.5M (pH 5.0) 乙酸钠缓冲液和40μL

的0.5M氯化钙在15-mL锥形管中混合制备各个底物溶液。在50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.0)中制备具有ABTS的偶联酶(GOX/HRP)溶液,最终浓度为2.74mg/mL ABTS、0.1U/mL HRP和1U/mL GOX。在MILLIQ水中制出各个 α -葡萄糖苷酶样品和葡萄糖标准的一系列稀释液。对于黑曲霉糖,仅采用一种剂量10ppm来测试 α -葡萄糖苷酶样品,原因是底物溶液的原液有限。将各个 α -葡萄糖苷酶样品(10 μ L)转移到包含90 μ L的在50℃和600rpm下预温育5分钟的底物溶液的新微量滴定板(Corning 3641)中。在摇动(600rpm)下,使反应在50℃下于THERMOMIXER(Eppendorf)中进行10分钟(对于异麦芽糖、麦芽糖、潘糖和黑曲霉糖底物)或60分钟(对于明串珠菌二糖底物)。然后分别将10 μ L的各反应混合物以及10 μ L的系列稀释的标准葡萄糖快速转移到新微量滴定板(Corning 3641)中,然后向其中相应地添加90 μ L的ABTS/GOX/HRP溶液。使用SOFTMAX PRO读板机(Molecular Devices)以11秒间隔在405nm处快速测定包含反应混合物的微量滴定板5分钟。对于各个酶浓度,输出为反应速率 V_0 。使用线性回归来测定曲线 V_0 与酶剂量的斜率。使用式1基于葡萄糖标准曲线计算各个 α -葡萄糖苷酶的比活性:

[0525] 比活性(单位/mg) = 斜率(酶) / 斜率(标准) $\times$ 1000 (1),

[0526] 其中1单位 = 1 μ mol葡萄糖/分钟。

[0527] 对于黑曲霉糖,在10ppm的酶剂量下反应速率值直接用于指示酶活性。

[0528] 使用前述方法,测定各个 α -葡萄糖苷酶对各个底物的特异性。还测定了寡-1,6-葡萄糖苷酶(购自Megazyme,参见表4)和转葡萄糖苷酶(TG L-2000,参见表4)对各个底物的活性。该分析的结果提供于表17中。

[0529] 表17

[0530] 各种 α -葡萄糖苷酶对不同底物的活性

[0531]	酶	SEQ ID NO.	酶活性 (U/mg) , 如测定:				
			异麦芽糖	麦芽糖	潘糖	明串珠菌二糖	黑曲霉糖 ^a
	寡-1,6-葡糖苷酶		118.2	0.0	54.3	1.3	19.6
[0532]	TG L-2000	1	194.0	235.6	127.7	68.9	254.0
	AclGlu1	6	255.7	401.9	180.9	113.7	315.1
	NfiGlu1	9	521.2	360.0	126.9	89.4	264.3
	NcrGlu1	12	282.7	34.9	15.9	61.6	200.4
	TauSec098	15	54.9	123.8	23.8	1.8	305.6
	TauSec099	18	244.0	97.7	50.8	70.6	184.8
	BloGlu1	20	71.1	66.9	23.1	2.5	165.0
	BloGlu2	24	65.9	86.7	19.9	3.5	217.9
	BloGlu3	26	120.1	175.5	31.4	9.0	272.6
	BspGlu1	30	64.2	247.9	60.8	27.3	254.6
	BthGlu1	32	108.3	93.3	21.1	68.4	128.5
	BbrGlu2	36	106.6	167.5	26.9	6.1	258.8
	BbrGlu5	38	925.8	0.0	279.7	2.8	22.1

[0533] a对于黑曲霉糖,以一种剂量(10ppm)使用各个酶。

[0534] 令人感兴趣地,据发现 α -葡萄糖苷酶除了表现出对 α -1,4葡萄糖基-葡萄糖键(麦芽糖)

的水解活性之外,还表现出对 α -1,6葡萄糖基-葡萄糖键(异麦芽糖)、 α -1,3葡萄糖基-葡萄糖键(黑曲霉糖)和 α -1,5葡萄糖基-果糖键(明串珠菌二糖)的水解活性(表17)。

[0535] 因此, α -葡萄糖苷酶具有超越先前EC 3.2.1.20酶相关的水解活性。具体地, α -葡萄糖苷酶对 α -1,5葡萄糖基-果糖键和 α -1,3以及 α -1,6葡萄糖基-葡萄糖键具有水解活性。

[0536] 实施例12

[0537] 用 α -葡萄糖苷酶水解葡聚糖反应滤液中明串珠菌二糖和低聚糖

[0538] 该实施例描述了使用 α -葡萄糖苷酶水解存在于获自葡聚糖合成反应的滤液中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。具体地,研究了实施例10公开的 α -葡萄糖苷酶对不溶性葡聚糖(聚 α -1,3-葡聚糖)合成反应的滤液中明串珠菌二糖和低聚糖DP2、DP3和HS(高糖,DP4+)的水解的影响。

[0539] 用于对 α -葡萄糖苷酶活性进行测试的低聚糖的分离和分析

[0540] 首先根据实施例1制备葡聚糖合成反应的浓缩滤液。

[0541] 简而言之,通过色谱分离从浓缩滤液分离低聚糖,并分析糖苷键特征。采用强酸性阳离子交换树脂的色谱分离用于分离浓缩滤液的低聚糖级分。用于该分离的柱的物理参数如下:FINEX CS11GC,#227树脂; Na^+ 离子形式;5%二乙烯基苯(交联);0.34mm粒度;1.64m床长度;0.093m柱直径。

[0542] 更具体地,使表3所述浓缩的糖溶液(即浓缩滤液)过滤并用自来水稀释至25g干固体/100g溶液。在将该糖溶液添加至柱树脂之前,用六个床体积(BV)的氯化钠溶液(10重量%氯化钠的三个BV,之后5重量%氯化钠的三个BV)洗涤该树脂以将树脂转化为钠形式。然后将糖溶液(0.6L)进料至柱,其后用流速为50L/小时的水洗脱柱。色谱分离的运行条件概述如下:0.6L进料体积(size),25g干固体/100g溶液,65℃柱温,50mL/min流速。在11至21分钟之间洗脱出低聚糖溶液。少量盐——指示传导性增大——同时洗脱出来。通过HPLC分析由此制备的低聚糖级分来确定其产物分布。总之,级分包含>89%的含有三种或更多种己糖单元的低聚糖和少于1.5%的可识别的单糖和二糖。使用薄膜蒸发器(LCI Corporation,Charlotte,NC)将该级分浓缩至317g/L的总干重,之后用ROTAVAPOR(R-151;Buchi,New Castle,DE)进行旋转蒸发。如HPLC所测的浓缩级分的产物分布显示于表18中。

[0543] 表18

[0544] 浓缩低聚糖级分的产物分布

[0545]

	蔗糖	明串珠 菌二糖	葡萄糖	果糖	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	总量
g/L	0.0	2.5	0.0	0.7	31.5	75.9	101.8	62.1	26.9	15.3	316.7
wt%	0.0	0.8	0.0	0.2	9.9	23.9	32.1	19.6	8.5	4.8	100

[0546] 初步筛选对葡聚糖低聚物水解的 α -葡萄糖苷酶

[0547] 分别针对以上制备的纯化低聚糖级分(表18)评估十一种不同 α -葡萄糖苷酶的活性(实施例10)以及两种基准酶即寡-1,6-葡萄糖苷酶(购自Megazyme)和转葡萄糖苷酶(TG L-2000)的活性。在pH 5.0和60℃下,在包含低聚糖底物(2.9%干固体)和2mM氯化钙的溶液中温育各个 α -葡萄糖苷酶(剂量为1mg/mL)。在温育24小时之后,通过添加50 μ L的0.5M NaOH将各个反应淬灭。

[0548] 如下测定经淬灭反应的低聚糖/单糖内容物。用水将各反应的样品稀释5倍以用于HPLC分析。在85℃下使用具有AMINEX HPX-42A柱(300mm×7.8mm)的Agilent 1200系列HPLC系统进行HPLC分离。将样品(10mL)施加于HPLC柱并在0.6mL/min流速下采用等梯度MILLI-Q水作为流动相进行分离。使用折射率检测器来检测低聚糖产物。提供于下表19的数字反映各个DP_n的平均峰面积百分比(由各样品得到,一式两份)作为DPI至DP7的总数的一部分。

[0549] 表19

[0550] 分析用α-葡萄糖苷酶处理之后的葡聚糖滤液低聚糖

[0551]

酶	SEQ ID NO	DP7%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%	DP1%
寡-1,6-葡萄糖苷酶		0.0	0.6	8.7	27.9	21.9	12.2	28.7
TG L-2000	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	97.0
Nfiglu1	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	98.1
Ncrglu1	12	0.0	0.0	0.0	2.8	1.6	7.0	88.6
TauSec098	15	0.0	0.0	0.0	15.3	0.0	4.5	80.2
TauSec099	18	0.0	0.0	0.0	15.7	0.0	0.5	83.7
BloGlu1	20	0.0	0.0	6.7	36.3	35.6	0.0	21.3
BloGlu2	24	0.0	0.7	8.6	31.2	34.9	14.0	10.7
BloGlu3	26	0.0	0.6	8.0	28.4	33.5	13.9	15.6
BspGlu1	30	0.0	0.5	5.2	15.4	16.2	8.2	54.5
BthGlu1	32	0.0	0.0	13.0	12.6	2.0	1.9	70.5
BbrGlu2	36	0.0	0.0	21.5	30.7	24.6	0.0	23.3
BbrGlu5	38	0.0	0.0	8.1	23.8	12.1	15.5	40.5
空白		0.0	0.0	16.2	38.6	30.4	0.0	14.8

[0552] 如在表19中用阴影所表示的,相较于不存在酶的对照反应(“空白”),反应的低聚糖内容物通常偏向更小粒度的糖。这些结果指出,α-葡萄糖苷酶可用于水解在葡聚糖合成反应内所含的低聚糖及其级分。另外,基于低聚糖的键特征(实施例3和4)以及α-葡萄糖苷酶对除α-1,4键(实施例11)之外的各种糖苷键的活性,显而易见的是,α-葡萄糖苷酶可用于分解具有α-1,5葡萄糖基-果糖键和/或α-1,3和α-1,6葡萄糖基-葡萄糖键的低聚糖。表19提供的结果还表明,相较于细菌α-葡萄糖苷酶,真菌α-葡萄糖苷酶对可溶性低聚糖具有更好的水解活性。

[0553] α-葡萄糖苷酶对葡聚糖合成反应的低聚糖产物的水解活性的证实

[0554] 进行了这样一种反应,其包括一种或两种α-葡萄糖苷酶和获自聚α-1,3-葡聚糖合成反应的浓缩滤液(表3)。α-葡萄糖苷酶反应的剂量为4ppm的酶,或者对于共混物,各个酶以1:1的比率使用,最终剂量为4ppm。将浓缩滤液以10%干固体装载于各个反应中。各个反应还包含2mM氯化钙(pH 5.0),并在60℃或65℃下进行。在温育23小时之后,通过添加50μL的0.5M NaOH淬灭反应。

[0555] 如下测定经淬灭反应的低聚糖/单糖内容物。用水将各个反应的样品稀释25倍以用于HPLC分析。在85℃下使用具有AMINEX HPX-42A柱(300mm×7.8mm)的Agilent 1200系列HPLC系统进行HPLC分离。将样品(10mL)施加于HPLC柱并在0.6mL/min流速下采用等梯度MILLI-Q水作为流动相进行分离。使用折射率检测器来检测低聚糖产物。提供于下表20的数

字反映各个DP_n的峰面积平均百分比(来自一式两份各样品)作为总数的一部分。表20所提供的结果通常证实了如上所讨论特定α-葡糖苷酶的活性(关于提供于表19的结果)。

表 20
用 α-葡糖苷酶处理之后分析葡聚糖滤液糖

温度	酶	SEQ ID NO	DP7+%	DP7%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%	明串珠菌二糖%	葡萄糖%	果糖%
60 °C	TG L-2000	1	5.8	0.2	0.4	1.2	1.8	2.0	6.2	0.0	32.0	50.4
	TauSec098	15	5.4	0.0	0.1	0.2	0.3	1.9	3.4	25.4	26.2	37.1
	TauSec099	18	6.0	0.2	0.5	1.2	1.8	2.3	6.8	0.0	30.4	50.8
	TauSec098+	15,										
	TauSec099	18	6.4	0.1	0.1	0.2	0.5	2.2	8.1	0.0	32.4	50.0
	TauSec098+	15,										
	TG L-2000	1	6.3	0.1	0.1	0.2	0.4	1.8	8.1	0.0	32.9	50.1
65 °C	空白		5.4	0.2	0.4	1.0	1.6	2.4	2.9	25.1	22.7	38.2
	TG L-2000	1	6.3	0.1	0.4	1.1	1.7	2.2	6.7	0.0	31.6	49.8
	TauSec098	15	5.8	0.1	0.2	0.2	0.3	1.6	3.3	24.5	27.2	36.7
	TauSec099	18	6.3	0.2	0.5	1.1	1.7	2.1	6.1	0.0	32.3	49.7
	TauSec098+	15,										
	TauSec099	18	6.7	0.0	0.1	0.2	0.4	1.7	7.8	0.0	34.0	49.2
	TG L-2000	1	6.8	0.1	0.2	0.2	0.4	1.8	7.6	0.0	33.9	49.1
	空白		6.0	0.1	0.3	0.9	1.4	2.1	3.0	24.5	23.8	37.7

[0556]

[0557] 因此, α -葡糖苷酶可用于水解存在于获自葡聚糖合成反应例如聚 α -1,3-葡聚糖合成反应的级分(例如滤液)中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。

[0558] 实施例13

[0559] 从gtf-S/MUT3325反座物中分离低聚物/明串珠菌二糖级分

[0560] 将蔗糖(4.50kg)溶解于蒸馏过的去离子水至最终总体积为9.5L,并且在搅拌下,将所得溶液在80℃加热5分钟并然后冷却至47℃。在搅拌下,添加包含0.6g/L的gtf-S酶(GTF0459,SEQ ID NO:42)的500克粗提取物和包含10g/L突变酶(MUT3325,SEQ ID NO:47)的15.0mL粗提取物(参见用于酶制备的一般方法)。在搅拌下,通过缓慢添加37重量% HCl的1:10(v/v)稀释液将所得的混合物的pH立即调节至pH 5.5至pH 6.0。使反应温度和pH分别维持于47℃和pH 5.5-6.0,直至根据HPLC分析蔗糖转化率>95%,此后将反应混合物立即调节至pH 7.0至7.5并加热至90℃20分钟,然后冷却至25℃以立即过滤来移除颗粒和沉淀。使用以下树脂和条件,在IEX/SEC柱层析之前将所得滤液保持在5℃:FINEX CS 11GC SAC (Ca^{2+} 形式),柱i.d=9.3cm,柱床高度1.58m,T=70℃,流速=51mL/min,线性流速=0.44m/h,进料体积=0.6L=171g,进料RI-DS=25.1g/100g,采样间隔=3min。合并在30min至67min之间收集的柱级分,通过蒸发浓缩为66%溶解的固体并且如一般方法中所述通过HPLC进行分析。表21示出由此制备的分离级分的低聚糖和单糖组分。

[0561] 表21

[0562] 得自gtf-S/MUT3325反应的低聚物/明串珠菌二糖级分的分析

[0563]

DP7+ (%DS)	DP6 (%DS)	DP5 (%DS)	DP4 (%DS)	DP3 (%DS)	DP2 (%DS)	蔗糖 (%DS)	明串珠 菌二糖 (%DS)	葡萄糖 (%DS)	果糖 (%DS)
0	1.1	2.9	7.2	16.2	12.7	13.5	30.7	7.9	7.9

[0564] 在该实施例中,葡聚糖合成反应用于产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物。该可溶性产物由均存在于葡糖基转移酶反应的葡糖基转移酶(GTF0459,SEQ ID NO:42)和 α -葡聚糖水解酶(MUT3325,SEQ ID NO:47)两者的协同作用产生。该实施例还示出由葡聚糖合成反应制备的色谱级分。该级分因此用于以下实施例15和16,以测试 α -葡糖苷酶的活性。

[0565] 实施例14

[0566] 从Gtf-C反应物中分离低聚物/明串珠菌二糖级分

[0567] 将蔗糖(4.50kg)溶解于蒸馏过的去离子水至最终总体积为9.5L,并且在搅拌下,将所得溶液在80℃加热5分钟并然后冷却至47℃。在搅拌下,添加包含0.41g/L的gtf-C酶(GTF0088BsT1,SEQ ID NO:45)的500克粗提取物(参见用于酶制备的一般方法)。在搅拌下,通过缓慢添加37重量% HCl的1:10(v/v)稀释液将所得的混合物的pH立即调节至pH 5.5至pH 6.0。使反应温度和pH分别维持于47℃和pH 5.5-6.0,直至根据HPLC分析蔗糖转化率>95%,此后将反应混合物立即调节至pH 7.0至7.5并加热至90℃20分钟,然后冷却至25℃以立即过滤来移除颗粒和沉淀。使用以下树脂和条件,在IEX/SEC柱层析之前将所得滤液保持在5℃:FINEX CS 11GC SAC (Ca^{2+} 形式),柱i.d=9.3cm,柱床高度1.58m,T=70℃,流速=50mL/min,线性流速=0.44m/h,进料体积=0.6L=171g,进料RI-DS=25.8g/100g,采样间隔=3min。合并34min至72min之间收集的柱级分,通过蒸发浓缩为67%溶解的固体并且

如一般方法中所述通过HPLC进行分析。表22示出由此制备的分离级分的低聚糖和单糖组分。

[0568] 表22

[0569] 得自Gtf-C反应的低聚物/明串珠菌二糖级分的分析

[0570]

DP7+ (%DS)	DP6 (%DS)	DP5 (%DS)	DP4 (%DS)	DP3 (%DS)	DP2 (%DS)	蔗糖 (%DS)	明串珠 菌二糖 (%DS)	葡萄糖 (%DS)	果糖 (%DS)
1.2	0.9	1.5	2.6	5.4	13.2	2.5	59.9	6.9	5.7

[0571] 在该实施例中,葡聚糖合成反应用于产生至少一种可溶性 α -葡聚糖产物。该实施例还示出由产生可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应制备的色谱级分。该级分因此用于以下实施例15和16,以测试 α -葡糖苷酶的活性。

[0572] 实施例15

[0573] 用得自Gtf-S/MUT3325和Gtf-C反应的低聚物/明串珠菌二糖级分初步筛选 α -葡糖苷酶

[0574] 该实施例描述了使用 α -葡糖苷酶水解存在于获自产生可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应的色谱级分中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。具体地,对实施例10公开的 α -葡糖苷酶对于实施例13和14所制备的级分中明串珠菌二糖和低聚糖的水解的影响进行了研究。

[0575] 用得自gtf-S/MUT3325(实施例13)和gtf-C(实施例14)反应的低聚物/明串珠菌二糖级分作为底物物质来筛选总共十二种 α -葡糖苷酶和两种基准酶(寡-1,6-葡糖苷酶和TGL-2000转葡糖苷酶)。所有酶(α -葡糖苷酶和基准酶)用量均为相同的蛋白质浓度。在pH 5.5和47℃下,在包含低聚物/明串珠菌二糖底物(10%干固体)和2mM氯化钙的溶液中温育各个 α -葡糖苷酶(剂量为100ppm)。在温育21小时之后,通过添加50 μ L的0.5M NaOH将各个反应淬灭。

[0576] 如下测定经淬灭反应的低聚糖/单糖内容物。使各个反应的样品离心并用水将其中的上清液稀释25倍以用于HPLC分析(一般方法)。记录于表23的百分比反映各个DP_n的平均峰面积百分比(由分析各样品得到,一式两份)作为总数的一部分。结果表明,当与细菌 α -葡糖苷酶比较时,真菌 α -葡糖苷酶对葡聚糖低聚物具有更好的水解活性。

[0577]

表 23

用得自 Gtf-S/MUT3325 和 Gtf-C 反应的低聚物/明串珠菌二糖级分初步筛选 α -葡萄糖苷酶的糖组成分析

底物	酶	SEQ ID NO	DP6+%	DP6%	DP5%	DP4%	DP3%	DP2%	明串珠菌二糖%	葡萄糖%	果糖%
得自 Gtf-C 反应的低聚物/明串珠菌二糖级分	寡-1,6-葡萄糖苷酶		8	0.1	0.2	0.4	1.1	6.8	50.7	19.6	13.1
	TG L-2000	1	0.7	0.1	0.2	0.5	1.1	5.7	3.8	48.6	39.3
	Acglu1	6	0.8	0.1	0.2	0.4	1	4.2	0	51.8	41.6
	Nfglu1	9	0.7	0.1	0.2	0.4	1	3.6	0	52.2	41.7
	Ncrglu1	12	0.7	0	0.2	0.4	1	3.6	4	49.9	40.2
	BloGlu1	20	0.1	0.3	0.4	0.7	0.6	2.9	20.6	40.7	33.6
	BloGlu2	24	0.8	0.2	0.6	1	0.9	4	30.9	34	27.5
	BloGlu3	26	1.1	0.3	0.5	1	1	4	28.8	35.4	28.1
	BspGlu1	30	0.9	0.1	0.1	0.1	0.3	2.5	27.9	39.5	28.7
	BthGlu1	32	0.8	0.2	0.5	0.7	0.7	2.9	28.6	37.1	28.4
	BbrGlu2	36	1.1	0.1	0.6	1.1	1.2	4.7	36.8	30.7	23.7
	BbrGlu5	38	1.4	0.1	0.2	0.5	0.9	4	44.6	29.1	19.4
	TauSec098	15	3.1	0.2	0.4	0.7	1.7	4.9	59.3	17.9	11.8
	TauSec099	18	0.1	0	0.1	0.4	1	3.3	0	51.2	43.6
	空白		1.1	0.3	0.6	1.5	2.9	7.9	65.4	11.7	8.5
得自 Gtf-S/MUT3325 反应的低聚物/明串	寡-1,6-葡萄糖苷酶		10.8	0.8	2.8	7.5	15.7	0	27.8	18.9	15.6
	TG L-2000	1	1.4	0.8	2.7	7.3	13.2	2.3	0	43.8	28.6
	Acglu1	6	1.8	0.8	2.5	6.9	12.3	1.2	0	45.6	29
	Nfglu1	9	1.8	0.8	2.6	7	13.6	0.9	0	44.4	29.1

[0578]

珠菌二糖 级分	Nerglu1	12	2.1	0.7	2.2	6.6	13.9	0	0	45.2	29.3
	BloGlu1	20	3.5	0.7	2.4	6.5	11.7	2.1	14.8	35.6	22.6
	BloGlu2	24	1.5	0.8	2.6	7	14.6	2.8	24.9	28	17.8
	BloGlu3	26	2	0.8	2.5	6.9	14.1	2.9	22.4	29.9	18.6
	BspGlu1	30	1.7	0.6	1.5	3	3.4	2	18.8	48.3	20.8
	BthGlu1	32	1.4	0.7	2.5	6.2	12.2	2.1	16.3	36.7	21.9
	BbrGlu2	36	1.5	0.8	2.6	7	14.7	3	25	28	17.6
	BbrGlu5	38	2.7	0.7	2.5	5.9	17.2	0	23.9	26.6	20.5
	TauSec098	15	2.9	0	0.1	0.3	1.1	3.6	37.1	41.8	13.1
	TauSec099	18	1.4	0.8	2.8	7.6	16.2	0	0	40.8	30.4
	空白		1.4	0.9	3.1	8.7	19.4	0	37.1	15.6	13.8

[0579] 如在表23中用阴影所表示的,相较于不存在酶的对照反应(“空白”),反应的低聚糖内容物通常偏向更小粒度的糖。这些结果指出, α -葡萄糖苷酶可用于水解包含在葡聚糖合

成反应内的低聚糖及其级分,特别是产生可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应的色谱级分。另外,基于低聚糖的键特征(实施例13和14)以及 α -葡糖苷酶对除 α -1,4键(实施例11)之外的各种糖苷键的活性,显而易见的是, α -葡糖苷酶可用于分解具有 α -1,5葡糖基-果糖键也可能具有 α -1,3和 α -1,6葡糖基-葡萄糖键的低聚糖。表23提供的结果还表明,相较于细菌 α -葡糖苷酶,真菌 α -葡糖苷酶对可溶性低聚糖具有更好的水解活性。

[0580] 因此, α -葡糖苷酶可用于水解存在于获自葡聚糖合成反应例如合成可溶性 α -葡聚糖产物的反应的级分(例如色谱级分)中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。

[0581] 实施例16

[0582] 用得自Gtf-S/MUT3325和Gtf-C反应的低聚物/明串珠菌二糖级分选筛 α -葡糖苷酶

[0583] 该实施例根据实施例15,描述了使用 α -葡糖苷酶水解存在于获自产生可溶性 α -葡聚糖产物的葡聚糖合成反应的色谱级分中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。

[0584] 通过分析导致包含相同蛋白质浓度用量的酶的反应的糖组合物评估对于得自gtf-S/MUT3325和gtf-C反应的低聚物/明串珠菌二糖级分(实施例15)最具水解活性的 α -葡糖苷酶。分别在60℃和65℃下,在2mM氯化钙存在下,在pH 5.5下对 α -葡糖苷酶(用量为4ppm;对于共混物,两种酶的比率为1:1并且总用量为4ppm)和低聚物/明串珠菌二糖底物(10%ds)进行温育。在温育23小时之后,通过添加50ul的0.5mM NaOH来淬灭反应。

[0585] 如下测定经淬灭反应的低聚糖/单糖内容物。对得自各个反应的样品进行离心并用水将其中的上清液稀释25倍以用于HPLC分析(一般方法)。记录于表24(下文)的百分比反映各个DP_n的平均峰面积百分比(由分析各样品得到,一式两份)作为总数的一部分。结果表明当在65℃下进行温育时,TauSec098对于水解DP2至DP7低聚物是有效的,并且TauSec099对于明串珠菌二糖的水解优于TG L-2000。TauSec098与TauSec099(或TG L-2000)的共混物有效地水解低聚物和明串珠菌二糖来产生DP1。

[0586] 因此, α -葡糖苷酶可用于水解存在于获自葡聚糖合成反应例如合成可溶性 α -葡聚糖产物的反应的级分(例如色谱级分)中的明串珠菌二糖及其它低聚糖。

[0587]

表 24
用 得 自 Gtf-S/MUT3325 和 Gtf-C 反 应 的 低 聚 物/明 串 珠 菌 二 糖 级 分 选 筛 α-葡 萄 糖 苷 酶 的 糖 组 成 分 析

温 度	底 物	酶	SEQ ID NO	DP7+ (%)	DP7 (%)	DP6 (%)	DP5 (%)	DP4 (%)	DP3 (%)	DP2 (%)	明串珠菌二糖 (%)	葡萄糖 (%)	果糖 (%)
60 °C	得 自 Gtf-C 反 应 的 低 聚 物/明 串 珠 菌 二 糖 级 分	TG L-2000	1	2.5	0.4	0.5	0.9	1.9	5.3	22.9	18.4	21.4	25.8
		TauSec098	15	5.4	0.3	0.5	1.0	1.4	2.6	6.3	71.8	0.0	10.7
		TauSec099	18	2.9	0.3	0.5	1.0	1.9	4.7	23.3	21.5	19.7	24.1
		TauSec098+TauSec099	15, 18	2.7	0.3	0.5	0.9	1.4	3.3	19.9	34.9	18.2	17.8
		TauSec098+TG L-2000	15, 1	2.7	0.3	0.5	0.8	1.4	4.5	23.7	27.1	18.6	20.3
	得 自 Gtf-S/ MUT3325 反 应 的 低 聚 物/明 串 珠 菌 二 糖 级 分	空 白		5.2	0.4	0.6	1.2	1.8	3.2	8.3	70.0	0.0	9.2
		TG L-2000	1	4.1	0.3	1.2	3.2	8.1	17.2	13.2	0.0	27.9	24.8
		TauSec098	15	3.4	0.2	0.0	0.4	1.1	3.5	12.3	32.3	35.3	11.5
		TauSec099	18	4.2	0.0	1.2	3.2	8.2	17.4	15.3	0.0	25.4	25.1
		TauSec098+TauSec099	15, 18	3.5	0.2	0.4	0.9	2.3	6.2	16.8	21.2	31.7	16.9
65 °C	得 自 Gtf-C 反 应 的 低 聚 物/明 串 珠 菌 二 糖 级 分	TauSec098+TG L-2000	15, 1	3.2	0.1	0.3	0.7	2.0	6.0	26.0	17.0	29.1	15.6
		空 白		4.6	0.4	1.2	3.2	7.9	17.5	15.1	36.6	0.0	13.5
		TG L-2000	1	2.5	0.3	0.5	1.0	1.8	4.9	24.9	26.0	17.4	20.8
		TauSec098	15	2.8	0.4	0.5	1.0	1.4	2.6	6.6	73.6	0.0	11.1
		TauSec099	18	2.2	0.3	0.4	1.0	2.0	4.9	23.2	17.4	21.6	27.0
		TauSec098+TauSec099	15, 18	4.5	0.3	0.5	0.9	1.4	3.4	20.3	28.6	20.1	20.1
		TauSec098+TG L-2000	15, 1	5.1	0.3	0.5	0.9	1.2	2.9	21.1	34.4	18.0	15.7
		空 白		7.0	0.4	0.7	1.3	1.8	3.2	7.9	68.4	0.0	9.4

[0588]

得自 Gtf-S/ MUT3325 反应的低聚 物/明串珠 菌二糖级分	TG L-2000	1	2.9	0.2	1.1	3.1	8.1	18.0	11.7	16.5	19.3	19.0
	TauSec098	15	2.6	0.0	0.1	0.3	0.9	3.3	12.0	33.1	36.6	11.1
	TauSec099	18	4.4	0.0	1.2	3.1	7.8	16.1	14.4	0.0	27.4	25.5
	TauSec098+TauSec099	15, 18	3.9	0.2	0.4	0.8	2.1	5.7	16.2	19.4	33.7	17.6
	TauSec098+TG L-2000	15, 1	3.7	0.2	0.3	0.7	1.8	5.0	24.9	20.5	29.4	13.6
	空白		3.1	0.6	1.1	2.5	6.3	13.6	13.0	31.1	17.0	11.8

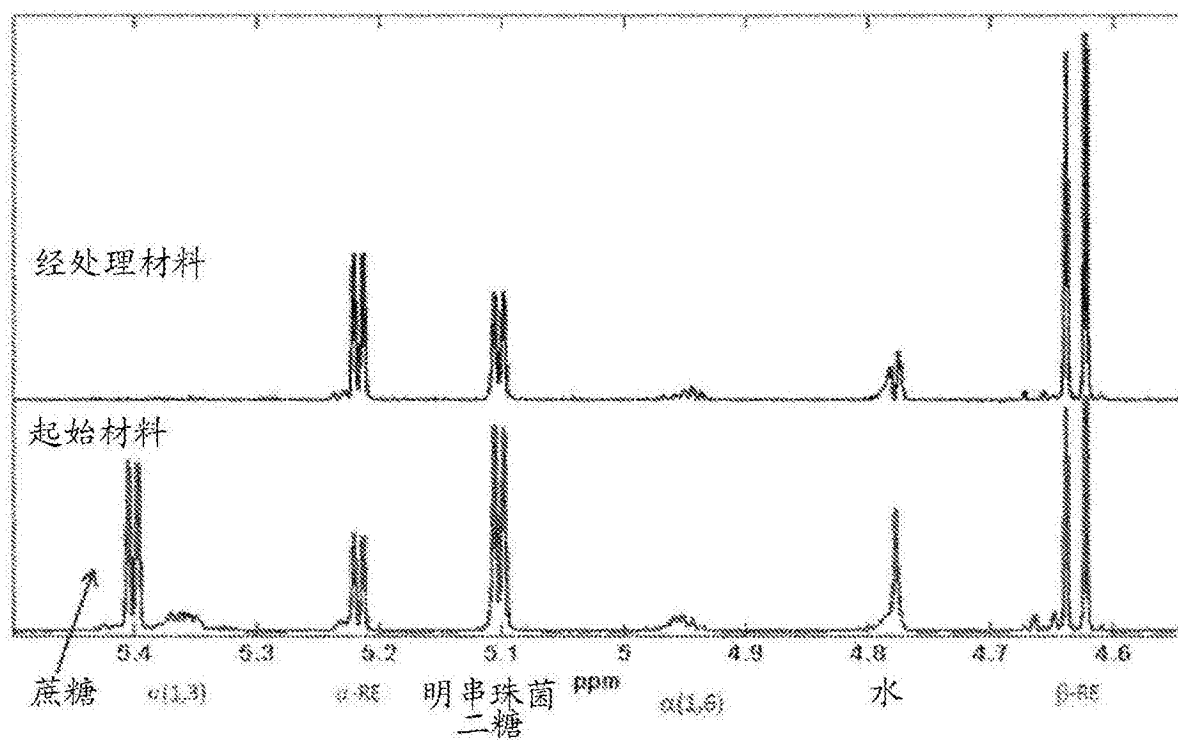


图1

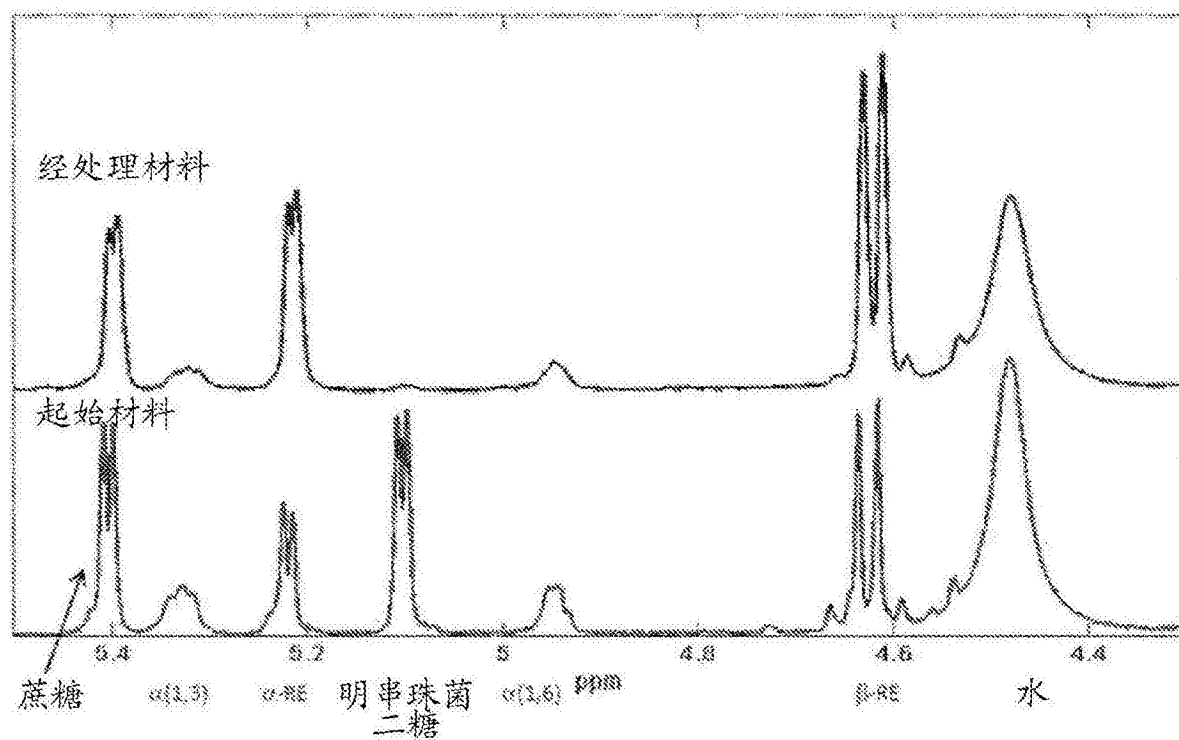


图2