

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 8 月 24 日 (24.08.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/155404 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 19/08* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/114438
- (22) 国际申请日: 2022 年 8 月 24 日 (24.08.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202210155835.9 2022 年 2 月 21 日 (21.02.2022) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 柏玉香(BAI, Yuxiang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。董晶晶(DONG, Jingjing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。金征宇(JIN, Zhengyu); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。王艳丽(WANG, Yanli); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。纪杭燕(JI, Hangyan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡

湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 李晓晓(LI, Xiaoxiao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

- (74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501 林娟, Heilongjiang 150028 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

(54) Title: GTFB ENZYME WITH 4,3/6- α -GLUCOSYLTRANSFERASE ACTIVITY

(54) 发明名称: 一种具有 4,3/6- α -葡萄糖基转移酶活性的 GtfB 酶

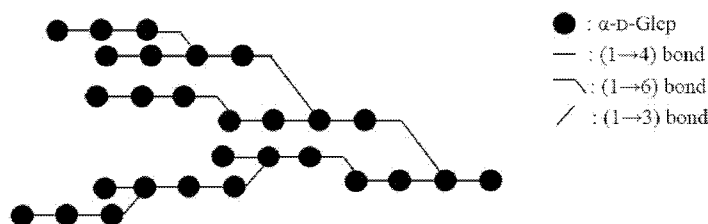


图 6

(57) Abstract: The present invention provides a GtfB enzyme with 4,3/6- α -glucosyltransferase activity and belongs to the technical field of starch modification. An α -glucan with alternating (α 1 $\rightarrow$ 4) and (α 1 $\rightarrow$ 6) and accompanied by (α 1 $\rightarrow$ 3,4) and (α 1 $\rightarrow$ 4,6) branches is prepared. Meanwhile, a method for preparing a highly branched and low molecular polymer by using amylose as a substrate is provided.

(57) 摘要: 一种具有 4,3/6- α -葡萄糖基转移酶活性的 GtfB 酶, 属于淀粉改性技术领域。制备了一种 (α 1 $\rightarrow$ 4) 和 (α 1 $\rightarrow$ 6) 交替并伴有 (α 1 $\rightarrow$ 3,4) 和 (α 1 $\rightarrow$ 4,6) 分支的 α -葡聚糖。同时提供了一种以直链淀粉为底物制备的高支化且低分子量聚合物的方法。



WO 2023/155404 A1

IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种具有 4,3/6- α -葡萄糖基转移酶活性的 GtfB 酶

技术领域

本发明涉及一种具有 4,3/6- α -葡萄糖基转移酶活性的 GtfB 酶，属于淀粉改性技术领域。

背景技术

α -葡聚糖是由若干个葡萄糖以 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 或 α -1,6 糖苷键连接而成的寡/多糖。 α -葡聚糖在分枝程度、分子质量和构象方面的差异可以导致 α -葡聚糖表现出不同的功能性质，从而具有多种多样的工业应用前景。例如，由乳酸菌(LAB)合成的 α -葡聚糖在健康和食品行业中可用作增稠剂、增稠剂和乳化剂。

GtfB 酶(EC 2.4.1.-)是一种以麦芽糖糊精/淀粉为底物，合成 α -葡聚糖的糖基转移酶，属于糖基水解酶 GH70 家族的亚家族。目前报道的 GtfB 酶主要展现 4,6- α -葡萄糖基转移酶活性，能够切断麦芽糖糊精/淀粉的(α 1 $\rightarrow$ 4)糖苷键，合成(α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键。迄今只有来自发酵乳杆菌 NCC 2970 的 GtfB 酶展现 4,3- α -葡萄糖基转移酶活性，可以切断麦芽糖糊精/淀粉的(α 1 $\rightarrow$ 4)糖苷键，合成(α 1 $\rightarrow$ 3)糖苷键。缺乏能够合成多种糖苷键组合的新型 GtfB 酶限制了以淀粉为底物合成结构不同的 α -葡聚糖。因此，缺乏能够合成多种糖苷键组合的新型 GtfB 酶，限制了以淀粉为底物合成不同结构的 α -葡聚糖。

发明内容

本发明披露序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶，能够切断麦芽糖糊精或淀粉的(α 1 $\rightarrow$ 4)糖苷键，合成(α 1 $\rightarrow$ 3)和(α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键，可以用于合成具有(α 1 $\rightarrow$ 4)、线性(α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键、(α 1 $\rightarrow$ 3,4)分支糖苷键和(α 1 $\rightarrow$ 4,6)分支糖苷键的 α -葡聚糖。

所述序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶来自罗伊氏乳杆菌 N1，我们将其命名为 N1 GtfB 酶，底物和产物特异性实验分析的结果表明 N1 GtfB 酶具有 4,3/6- α -葡聚糖转移酶活性，能够以淀粉为底物合成具有(α 1 $\rightarrow$ 4)和(α 1 $\rightarrow$ 6)交替，并伴有(α 1 $\rightarrow$ 3,4)和(α 1 $\rightarrow$ 4,6)分支的 α -葡聚糖。迄今为止，该活性未在任何 GtfB 酶中被报道，同时该键型组合的 α -葡聚糖未在任何野生型葡聚蔗糖酶(GSs)或 GtfB 酶中被合成。该产物的特异性扩大了 α -葡聚糖的多样性，这为以淀粉合成新型葡聚糖开辟了新的前景。

本发明披露了 GtfB 酶在制备 α -葡聚糖中的应用，包括如下步骤：

- (1) 以淀粉或糊精为底物，溶解淀粉或糊精，
- (2) 添加 GtfB 酶，催化底物生成 α -葡聚糖；

所述 GtfB 酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 α -葡聚糖具有(α 1 $\rightarrow$ 4)、线性(α 1 $\rightarrow$ 6)

糖苷键、($\alpha 1 \rightarrow 3,4$)分支糖苷键和($\alpha 1 \rightarrow 4,6$)分支糖苷键。

所述 GtfB 酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，是来自罗伊氏乳杆菌 N1 的新型 GtfB，我们将其命名为 N1 GtfB 酶。

在本发明的某些实施方式中，包括如下步骤：

- (1) 以淀粉为底物时，将直链淀粉先用氢氧化钠溶液溶解，再用盐酸中和后，加缓冲液，
- (2) 再添加 N1 GtfB 酶催化底物改性，得到合成的 α -葡聚糖。

在本发明的某些实施方式中，包括如下步骤：

- (1) 以糊精为底物时，加缓冲液，
- (2) 再添加 N1 GtfB 酶催化底物改性，得到合成的 α -葡聚糖。

在本发明的某些实施方式中，所述淀粉为直链淀粉，底物浓度为 0.6%；所述糊精为麦芽七糖，底物浓度为 1%。

在本发明的某些实施方式中，所使用的缓冲液可以是 10 ~ 50 mM、pH 4 ~ 6 的缓冲液，例如 25 mM、pH 为 6 的醋酸钠缓冲液。

在本发明的某些实施方式中，所述 N1 GtfB 酶催化底物改性的反应温度为 37 ~ 40 °C，24 h ~ 48 h，例如 37 °C、24 h。

在本发明的某些实施方式中，N1 GtfB 酶的添加量为 12-20 U/g 干基淀粉或糊精。

本发明通过底物和产物特异性实验分析，发现 N1 GtfB 酶具有 4,3/6- α -葡聚糖转移酶活性，能够以淀粉为底物合成具有($\alpha 1 \rightarrow 4$)和($\alpha 1 \rightarrow 6$)交替，并伴有($\alpha 1 \rightarrow 3,4$)和($\alpha 1 \rightarrow 4,6$)分支的 α -葡聚糖。迄今为止，该活性未在任何已报道的 GtfB 酶中发现，且该键型组合的 α -葡聚糖产物未在任何野生型葡聚蔗糖酶 (GSs) 或 GtfB 酶中被合成。

本发明的方法以淀粉或糊精为底物，经 N1 GtfB 酶改性后，合成一种结构独特的 α -葡聚糖。该产物中的同时存在($\alpha 1 \rightarrow 4$)、($\alpha 1 \rightarrow 6$)、($\alpha 1 \rightarrow 3,4$)和($\alpha 1 \rightarrow 4,6$)四种糖苷键。该产物的特异性扩大了 α -葡聚糖的多样性，为以淀粉合成新型葡聚糖开辟了新的前景，提供了新的思路。

附图说明

图 1 为实施例 1 中 N1 GtfB 酶的底物特异性分析。G1 代表葡萄糖，G2-G8 分别代表麦芽糖至麦芽八糖，AML 和 AMP 分别代表直链淀粉和支链淀粉。

图 2 为实施例 2 中以分别以麦芽七糖和直链淀粉为底物反应 24 h 反应所得产物分子量分布图。G7 代表麦芽七糖，amylose 代表直链淀粉。

图 3 为实施例 3 中 N1 GtfB 酶和直链淀粉反应 24 h 反应所得产物分子量 ^1H NMR 图。

图 4 为实施例 4 中 N1 GtfB 酶分别改性麦芽七糖和直链淀粉实时合成的寡糖情况。G1 为

葡萄糖, G2-G7 分别麦芽糖至麦芽七糖, IsoG2、IsoG3 和 Panose 分别为异麦芽糖、异麦芽三糖和潘糖。

图 5 为实施例 6 中 N1 GtfB 酶改性直链淀粉合成的产物二维核磁谱图 (^1H - ^1H COSY 和 ^{13}C - ^1H HSQC)。

图 6 为实施例 7 中构建的 N1 GtfB 酶改性直链淀粉产物的结构模型。

具体实施方式

来自罗伊氏乳杆菌 N1 的 GtfB 酶的制备及纯化:

人工合成核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的编码 N1 GtfB 酶的基因片段, 以 pET-15b 构建重组质粒, 利用 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株进行表达。将其置于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下培养, 直至 OD600 值为 0.4-0.6。取出后, 冰浴 15 min, 加入异丙基硫代半乳糖苷至终浓度为 1 mM, 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 的条件下培养 20 h 诱导产酶。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 的条件下离心 10 min, 收集菌体。按照 1 g 菌体溶于 10 mL 25 mM Tris-HCl (250 mM NaCl, pH 8) 将菌体重悬, 于冰浴中超声破碎 20 min。破碎后的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 的条件下离心 30 min, 收集上清液即为粗酶液。利用镍亲和层析对粗酶液进行纯化, 依次用 20 mM Tris-HCl (250 mM NaCl, pH 8) 和含有不同浓度咪唑的 20 mM Tris-HCl (250 mM NaCl, pH 8) 进行洗脱, 收集每部分的流穿液, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳条带验证。

N1 GtfB 酶的比酶活的检测计算:

准确称量 100 mg 直链淀粉溶于 2 mL 的 2 mol/L 的 NaOH 溶液中, 待直链淀粉完全溶解后加入适量的 1M 的 HCl 调节 pH 至 7, 再补足去离子水定容至 10 mL, 配置成 1% 的直链淀粉溶液。250 μL 的 0.25% 的直链淀粉溶液, 加入纯化的 N1 GtfB 酶 (终浓度为 90 nM) 用 pH 6 的缓冲液 (25 mM Tris-HCl) 补足至 1 mL, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。分别在 1、2、4、6、8 min 取出 100 μL 反应液, 分别加入 50 μL 0.4 M 的 NaOH 溶液中进行碱灭活, 然后加入 50 μL 0.4 M 的 HCl 溶液进行酸中和。取上述混合液 150 μL 与预先配制好的 15 μL 的碘溶液 (将 0.2 g I_2 和 2 g KI 溶解在 100 ml 蒸馏水中以制备 20 倍浓缩液, 使用前稀释 20 倍) 进行显色反应, 测量反应液在 660 nm 处吸光值。

酶活力定义: 每分钟消耗 1 mg 直链淀粉所需的酶定义为 1 U。

实施例 1: 利用 N1 GtfB 酶分别催化麦芽低聚糖、直链淀粉和支链淀粉并分析 N1 GtfB 酶的底物特异性

(1) 利用 N1 GtfB 酶催化麦芽低聚糖

① 将麦芽低聚糖（G3-G7）溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中，配制成 1%（即 1 g/100mL）的溶液，

② 加入 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。

（2）利用 N1 GtfB 酶催化直链淀粉

直链淀粉和支链淀粉在反应前提前需要进行预处理。

① 直链淀粉需先进行碱溶（NaOH, 1M），再进行酸中和，然后加入醋酸钠缓冲液（pH 6、25 mM），配制成 0.6%（即 0.6 g/100mL）的溶液，

② 再加 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。

（3）利用 N1 GtfB 酶催化支链淀粉

① 支链淀粉则是溶于醋酸钠缓冲液（pH 6、25 mM），配制成 0.6%（即 0.6 g/100mL）溶液，涡旋后进行糊化处理，然后冷却至 37 °C，

② 加入 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。

反应结束后，利用薄层色谱（TLC）监测反应中麦芽低聚糖合成情况。测定结果如图 1 所示。N1 GtfB 酶能够作用于 $\text{DP} \geq 3$ 的麦芽糊精和淀粉类底物，当底物为麦芽糊精时，产物中合成了大量 $\text{DP} \geq 2$ 的寡/多糖及其微量的葡萄糖，当底物为直链淀粉和支链淀粉时，产物中合成的寡/多糖的量要明显小于以麦芽糊精为底物时产生的量。总的来说，改性产物中均生成了一系列较底物更短和更长的寡糖/多糖，表明 N1 GtfB 酶对 $\text{DP} \geq 3$ 的糊精或淀粉类底物同时具有水解酶和转糖基酶(歧化)活性。

实施例 2：利用 N1 GtfB 酶分别催化麦芽七糖、直链淀粉并分析产物的分子量

（1）利用 N1 GtfB 酶催化麦芽七糖

① 将麦芽七糖溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中，配制成 1% 的溶液，

② 加入 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。

（2）利用 N1 GtfB 酶催化直链淀粉

① 将直链淀粉先进行碱溶（NaOH, 1 M），再进行酸中和，然后加入醋酸钠缓冲液（pH 6、25 mM），配制成 0.6% 的溶液，

② 再加 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。

终止反应后，进行冻干处理，得酶合成的改性产物。将冻干样品用超纯水配制成 5 mg/mL，利用高效凝胶渗透色谱监测反应中产物分子量的情况。测定结果如图 2 所示。麦芽七糖和直链淀粉经 N1 GtfB 修饰后的分子量分别为 $3.4 \times 10^3 \text{ Da}$ 和 $5.7 \times 10^3 \text{ Da}$ ，麦芽七糖的分子量较酶处理前的 $1.2 \times 10^3 \text{ Da}$ 有了明显增大，直链淀粉分子量较酶处理前的 $5.7 \times 10^3 \text{ Da}$ 略微减少，

但产物分子量数量级都在 10^3 Da, 这说明 N1 GtfB 酶在反应过程中展现出显著的转糖基活力。

实施例 3: N1 GtfB 酶催化直链淀粉并分析产物的一维核磁氢谱

① 将直链淀粉先进行碱溶 (NaOH, 1M), 再进行酸中和, 然后加入醋酸钠缓冲液 (pH 6、25 mM), 配制成 6 mg/mL 的溶液。

② 加入 N1 GtfB 酶, 使其终浓度 20 μ g/mL, 在 37 $^{\circ}$ C、pH 6.0 条件下反应 24 h, 沸水浴终止反应, 冻干。

取 20 mg 冻干样品, 加入 1 mL D_2O , 煮沸 1 h, 立即冻干。冻干后再加入 1 mL D_2O , 煮沸 1 h, 立即冻干备用。最后此样品溶于 D_2O , 在沸水浴中煮 1 h, 然后在 AVANCE -600 MHz 光谱仪(Bruker, Germany)上记录一维核磁共振氢谱结果, 测试探针温度为 65 $^{\circ}$ C。在 δ 5.40-5.35 ppm 处的存在 5 个分裂峰, 表明在(-) α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-结构中至少存在 5 个不同结构单元。在 δ ~ 4.97 ppm 的两个分裂峰, 表明在(-) α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)-结构中存在至少存两个不同结构单元。 $R\alpha$ (δ 5.237 ppm)和 $R\beta$ (δ 4.653 ppm)代表 4-取代还原末端葡萄糖的异头氢信号。 $G\alpha$ (δ 5.231 ppm)和 $G\beta$ (δ 4.640 ppm)是游离葡萄糖的异位信号。 δ 3.40 ~ 3.45 ppm 之间的 t4 信号佐证了 (α 1 $\rightarrow$ 4,6)分支的存在。总的来说, ^1H NMR 的结果清楚地证实了产物中存在(α 1 $\rightarrow$ 6)键。

实施例 4: N1 GtfB 酶分别改性麦芽七糖和直链淀粉实时合成的寡糖分析

(1) 利用 N1 GtfB 酶催化麦芽七糖

① 将麦芽七糖溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中, 配制成 1%的溶液,

② 加入 N1 GtfB 酶, 使其终浓度为 20 μ g/ mL, 于 37 $^{\circ}$ C下反应 24 h, 沸水浴终止反应。

(2) 利用 N1 GtfB 酶催化直链淀粉

① 将直链淀粉先进行碱溶 (NaOH, 1M), 再进行酸中和, 然后加入醋酸钠缓冲液 (pH6、25mM), 配制成 0.6%的溶液,

② 再加 N1 GtfB 酶, 使其终浓度为 20 μ g/ mL, 于 37 $^{\circ}$ C下反应 24 h, 沸水浴终止反应。

用高压阴离子色谱 (HPAEC-PAD) 分别记录反应 0min、10min、1h、24h 时合成的寡糖的情况。用商业标准低聚糖鉴定了合成产物谱峰的性质。如图 4 所示, 当底物在 24h 后几乎耗尽时, 异麦芽糖和潘糖的合成明显表明(α 1 $\rightarrow$ 6)键的形成。同时图中可见, 产物中还存在了一些系列出峰时间不符合麦芽低聚糖的寡/多糖的峰, 这说明这些产物中可能含有(α 1 $\rightarrow$ 3)或 (α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键。N1 GtfB 酶改性直链淀粉的情况与改性 G7 大致相同, 仅仅只是产量相对较小。

实施例 5: 利用 N1 GtfB 酶改性直链淀粉过程中实时产物的甲基化分析

N1 GtfB 酶改性直链淀粉的方法与实施例 2 的 (2) 相同, 改性反应结束后, 将反应液直接进行冻干处理, 备用。取 20 mg 冻干样品在 60 $^{\circ}$ C下溶于 20 mL DMSO 中, 然后加入 20 mL

溶于 DMSO 的 NaOH 溶液反应 1 h，再逐滴滴加 CH₃I 液体在室温下甲基化反应 2 h。反应结束后，甲基化产物用 1000 Da 透析袋进行透析，然后用氯仿萃取，硫酸钠除水，再进行氮吹干。接着依次用三氟乙酸(2 M)水解，用 NaBH₄ 还原，然后用乙酸酐和吡啶(1:1)乙酰化。最后用 GC-MS 分析甲基化糖产物。将得到的离子片段与 CCRC 光谱数据库-PMAA 进行比较，以确定糖苷键的类型和比例。如表 1 所示，甲基化糖产物的分子碎片峰片段验证了(α1→6)、(α1→3,4)和(α1→4,6)糖苷键的存在。4-取代、6-取代、3,4-二取代和 4,6-二取代葡萄糖基的摩尔百分比为 53：8：6：12。

表 1 GC-MS 分析甲基化糖产物

洗脱时间 (min)	甲基化糖产物	糖苷键类型	摩尔百分比 (%)	分子碎片峰 (m/z)
9.60	1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol	α-D-Glcp-(1→	20.5	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145*, 161, 205*
12.61	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol	→4)-α-D-Glcp-(1→	53.0	71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 173*, 233*
13.24	1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	→6)-α-D-Glcp-(1→	7.9	71, 87, 101, 117, 129, 161, 173*, 189*, 233*
14.66	1,3,4,5-tetra-O-acetyl-2,6-di-O-methyl-D-glucitol	→3,4)-α-D-Glcp-(1→	6.3	87, 117, 129, 143, 159*, 171, 185, 203, 305*
16.26	1,4,5,6-tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-D-glucitol	→4,6)-α-D-Glcp-(1→	12.3	87, 99, 101, 117, 161, 129, 159, 201*, 261*

*分子碎片是不同甲基化糖产物的 GC-MS 特征片段。

实施例 6：N1 GtfB 酶改性直链淀粉合成的产物二维核磁谱图分析

N1 GtfB 酶改性直链淀粉以及核磁谱图测定前样品前处理方法的方法与实施例 3 中相同。

通过 ^1H NMR、2D ^1H COSY 和 2D ^{13}C - ^1H HSQC 谱结果分析改性产物中的不同糖基结构单元。如图 5 和表 2 所示, 产物中存在 7 个不同取代的葡萄糖单元, 即 A: $-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$; B: $-(1\rightarrow3,4)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$; C: $\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$; D: $-(1\rightarrow6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$; E: $-(1\rightarrow4,6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$; F: $-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4,6)-$; G: $-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow6)-$ 。

表 2 N1 GtfB 改性直链淀粉产物中结构单元的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移

Residue	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
A	5.40	3.63	3.97	3.65	3.85	3.87	3.77
$-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$	100.7	72.3	74.1	77.8	72.0	61.3	
B	5.40	3.68	3.85	3.66	3.85	3.87	3.77
$-(1\rightarrow3,4)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$	100.6	71.3	80.0	77.8	72.0	61.3	
C	5.40	3.59	3.70	3.43	3.76	3.85	3.81
$\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$	100.7	72.4	73.6	70.0	73.6	61.4	
D	5.36	3.58	3.70	3.51	3.92	4.01	3.75
$-(1\rightarrow6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$	100.9	72.4	73.7	70.2	72.3	66.8	
E	5.35	3.64	3.97	3.66	4.03	3.94	3.97
$-(1\rightarrow4,6)\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)-$	100.6	72.4	74.2	77.8	71.2	68.2	
F	4.97	3.59	4.01	3.68	3.86	3.85	3.81
$-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4,6)-$	99.0	72.6	74.4	78.2	71.2	61.3	
G	4.97	3.60	4.01	3.65	3.86	3.85	3.81
$-(1\rightarrow4)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow6)-$	98.8	72.5	74.3	78.3	71.2	61.3	

实施例 7: 构建 N1 GtfB 酶改性直链淀粉产物的结构模型

结合实施例 3、实施例 6 的一/二维核磁, 高压离子色谱实时检测寡糖结果以及甲基化实验结果, 确定了 N1 GtfB 酶改性产物所包含的键型类型和比例, 从而构建了相应的产物结构模型, 结果如图 6 所示。

对比例 1:

将实施例 1 中的底物分别调整为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、异麦芽糖、异麦芽三糖、黑曲霉糖或潘糖，其余反应条件或者参数与实施例 1 一致。具体的，是分别将这些底物溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中，分别配制成 1% 的溶液，加入 N1 GtfB 酶，使其终浓度为 (20 $\mu\text{g/mL}$)，于 37 °C 下反应 24 h，沸水浴终止反应。反应结束后，利用薄层色谱 (TLC) 监测反应情况，发现 N1 GtfB 酶对葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、异麦芽糖、异麦芽三糖、黑曲霉糖、潘糖无活性。

对比例 2:

将实施例 2 中的加酶处理调整为无酶处理。其余反应条件或者参数与实施例 2 一致。具体地，是将麦芽七糖溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中，配制成 1% 的溶液，于 37 °C 下保温 24 h。直链淀粉则是先进行碱溶 (NaOH, 1M)，再进行酸中和，然后加入醋酸钠缓冲，配制成 0.6% 的溶液，于 37 °C 下保温 24 h。

分别利用高效凝胶渗透色谱监测反应中产物分子量的情况。测定结果如图 2 所示。麦芽七糖和直链淀粉的分子量分别为 $1.2 \times 10^3 \text{ Da}$ 和 $5.7 \times 10^3 \text{ Da}$ ，

对比例 3:

将实施例 4 中的加酶处理调整为无酶处理。其余反应条件或者参数与实施例 4 一致，具体地，是将麦芽七糖溶于 pH 6、25 mM 的醋酸钠缓冲体系中，配制成 1% 的溶液，于 37 °C 下保温 24 h。直链淀粉则是先进行碱溶 (NaOH, 1 M)，再进行酸中和，然后加入醋酸钠缓冲，配制成 0.6% 的溶液，于 37 °C 下保温 24 h。

分别利用高压离子色谱监测样品中寡糖的情况。结果中可见麦芽七糖标品中含一定量的麦芽五糖和麦芽六糖，而直链淀粉标品中寡糖含量很少。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1. GtfB 酶在制备 α -葡聚糖中的应用，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 以淀粉或糊精为底物，溶解淀粉或糊精，

(2) 添加 GtfB 酶，催化底物生成 α -葡聚糖；

所述 GtfB 酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，所述 α -葡聚糖具有(α 1 $\rightarrow$ 4)、线性(α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键、(α 1 $\rightarrow$ 3,4)分支糖苷键和(α 1 $\rightarrow$ 4,6)分支糖苷键。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述淀粉包括支链淀粉、直链淀粉，所述糊精包括麦芽糊精、麦芽低聚糖（聚合度 ≥ 3 ）。

3. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 以直链淀粉为底物，将淀粉先用碱溶解，再用酸中和，加缓冲液，

(2) 再添加氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶进行改性，得到合成的 α -葡聚糖。

4. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 以支链淀粉为底物，向淀粉中加缓冲液，

(2) 再添加氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶进行改性，得到合成的 α -葡聚糖。

5. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 以糊精为底物，加缓冲液，

(2) 再添加氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶进行改性，得到合成的 α -葡聚糖。

6. 根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，加入缓冲液后，底物浓度为 0.6%~1.0%。

7. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，加入缓冲液后，底物浓度为 0.6%~1.0%。

8. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，加入缓冲液后，底物浓度为 0.6%~1.0%。

9. 根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，所使用的缓冲体系浓度是 10 ~ 50 mM、pH 4 ~ 6 的缓冲液，包括 25 mM、pH 为 6 的醋酸钠缓冲液。

10. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所使用的缓冲体系浓度是 10 ~ 50 mM、pH 4 ~ 6 的缓冲液，包括 25 mM、pH 为 6 的醋酸钠缓冲液。

11. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所使用的缓冲体系浓度是 10 ~ 50 mM、pH 4 ~ 6 的缓冲液，包括 25 mM、pH 为 6 的醋酸钠缓冲液。

12. 根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，反应的温度为 37 ~ 40 °C，24 h ~ 48 h。

13. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，反应的温度为 37 ~ 40 °C，24 h ~ 48 h。

14. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于，反应的温度为 37 ~ 40 °C，24 h ~ 48 h。

15. GtfB 酶的应用，其特征在于，所述 GtfB 酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，能够切断麦芽糖糊精或淀粉的(α 1 $\rightarrow$ 4)糖苷键，合成(α 1 $\rightarrow$ 3)和(α 1 $\rightarrow$ 6)糖苷键。

16. 氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的 GtfB 酶或其合成的 α -葡聚糖在食品、保健品、饮料、医药和饲料添加剂方面的应用。

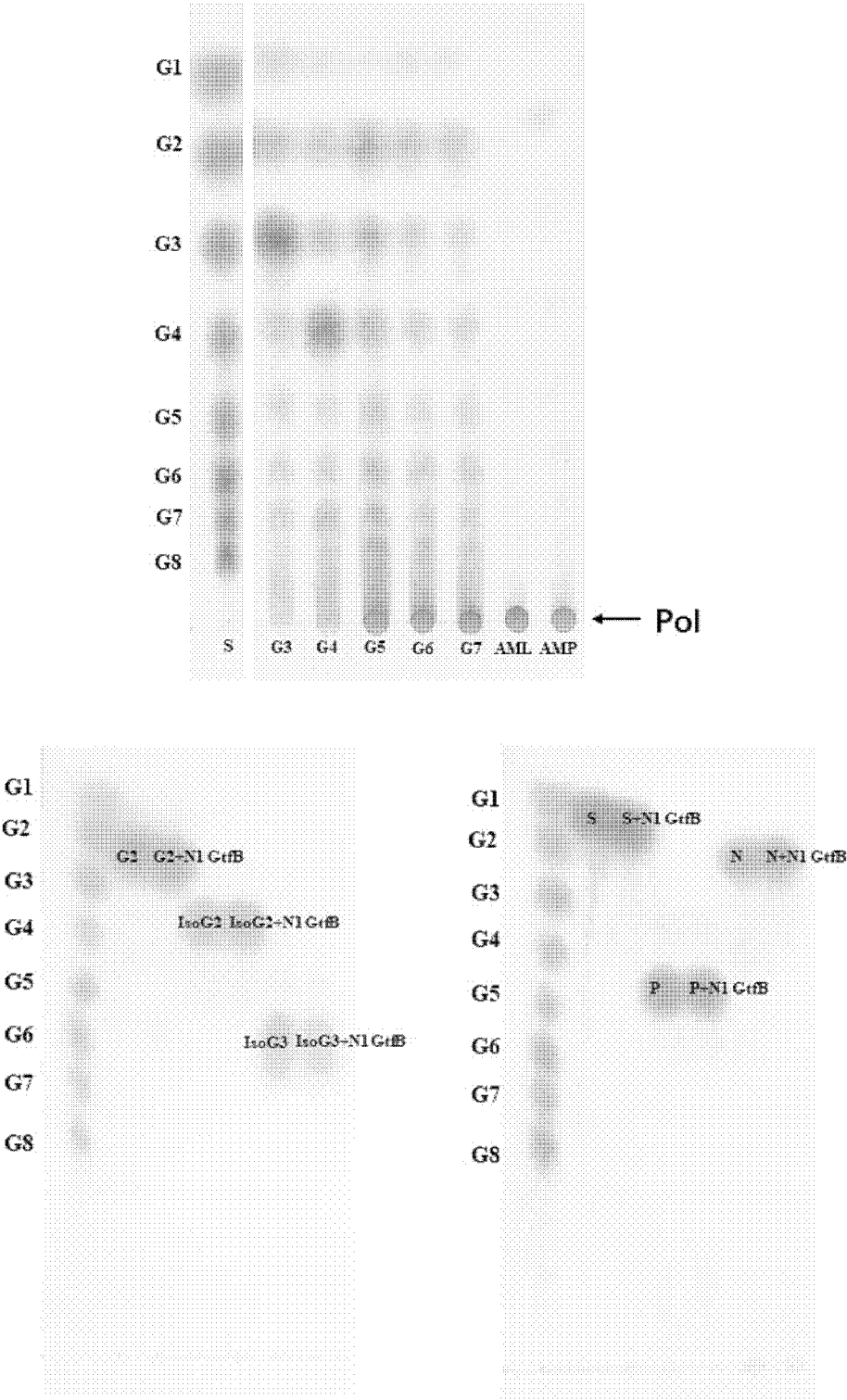


图 1

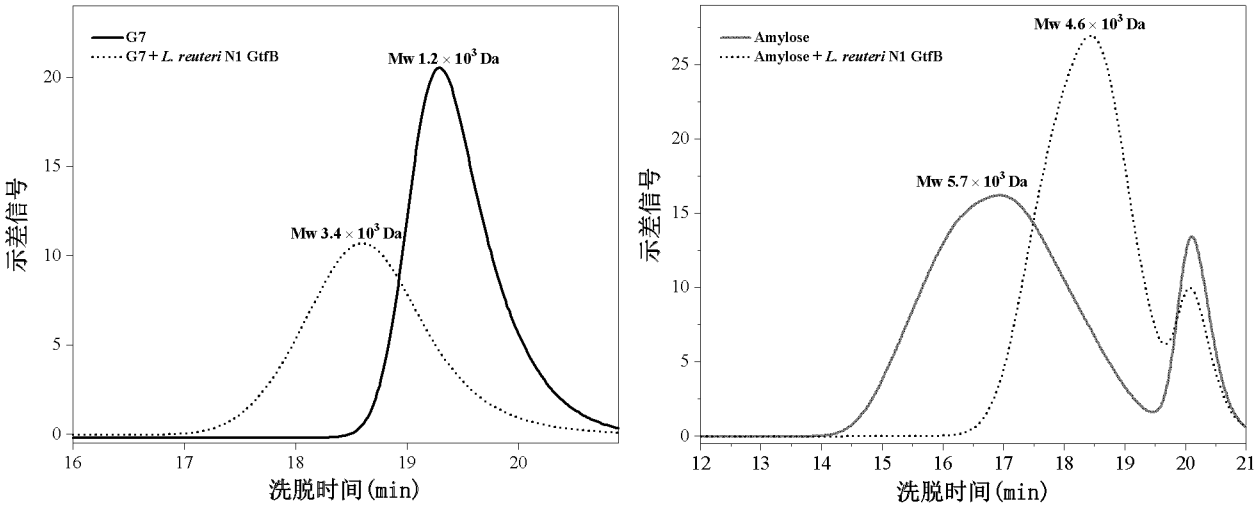


图 2

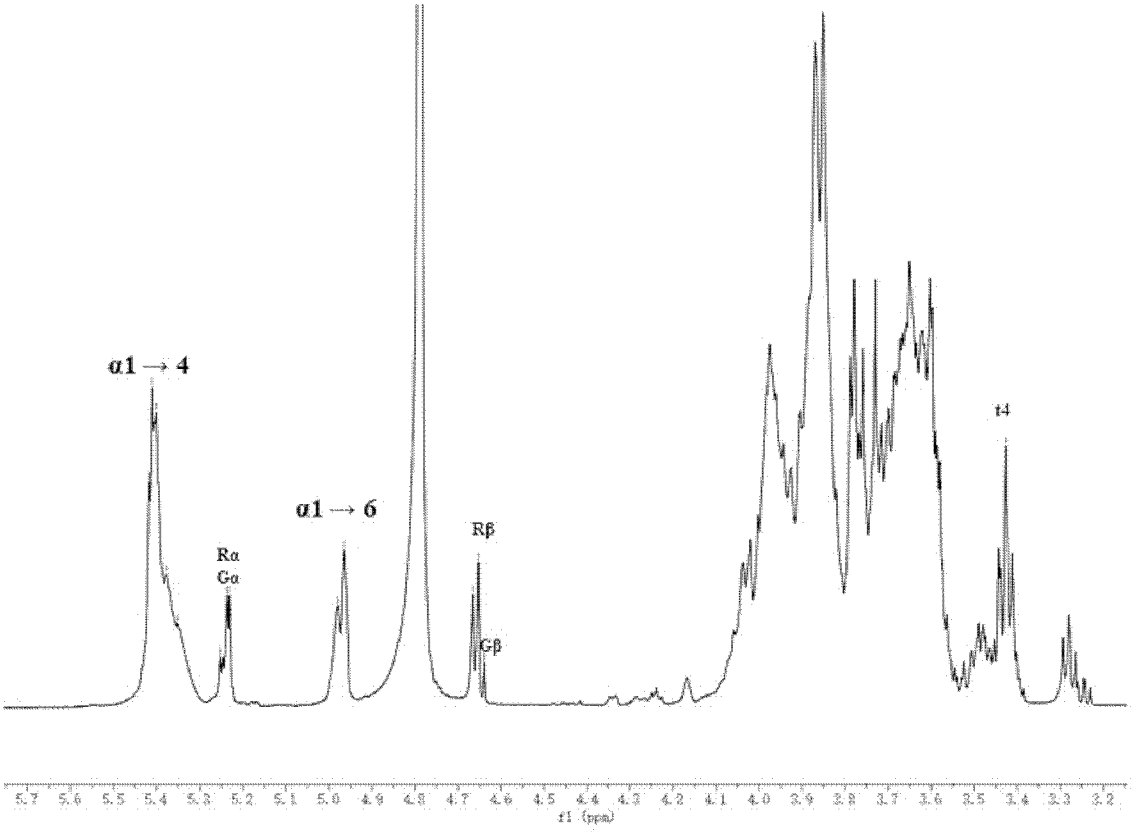


图 3

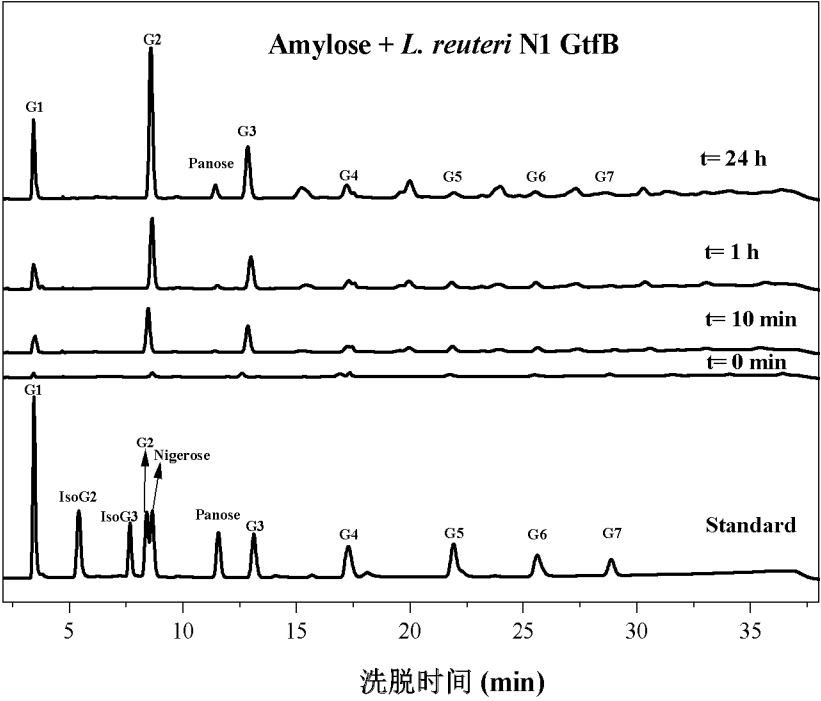
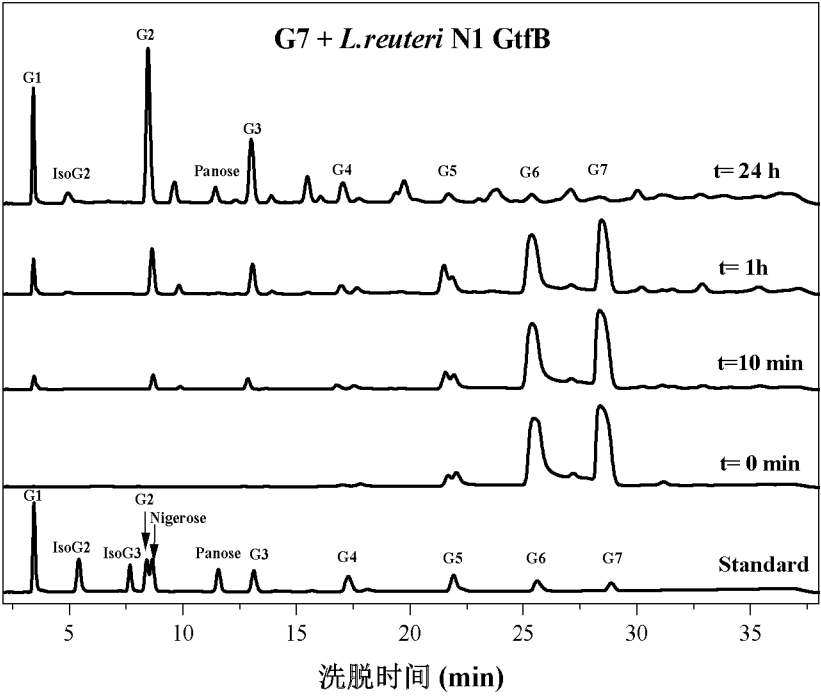


图 4

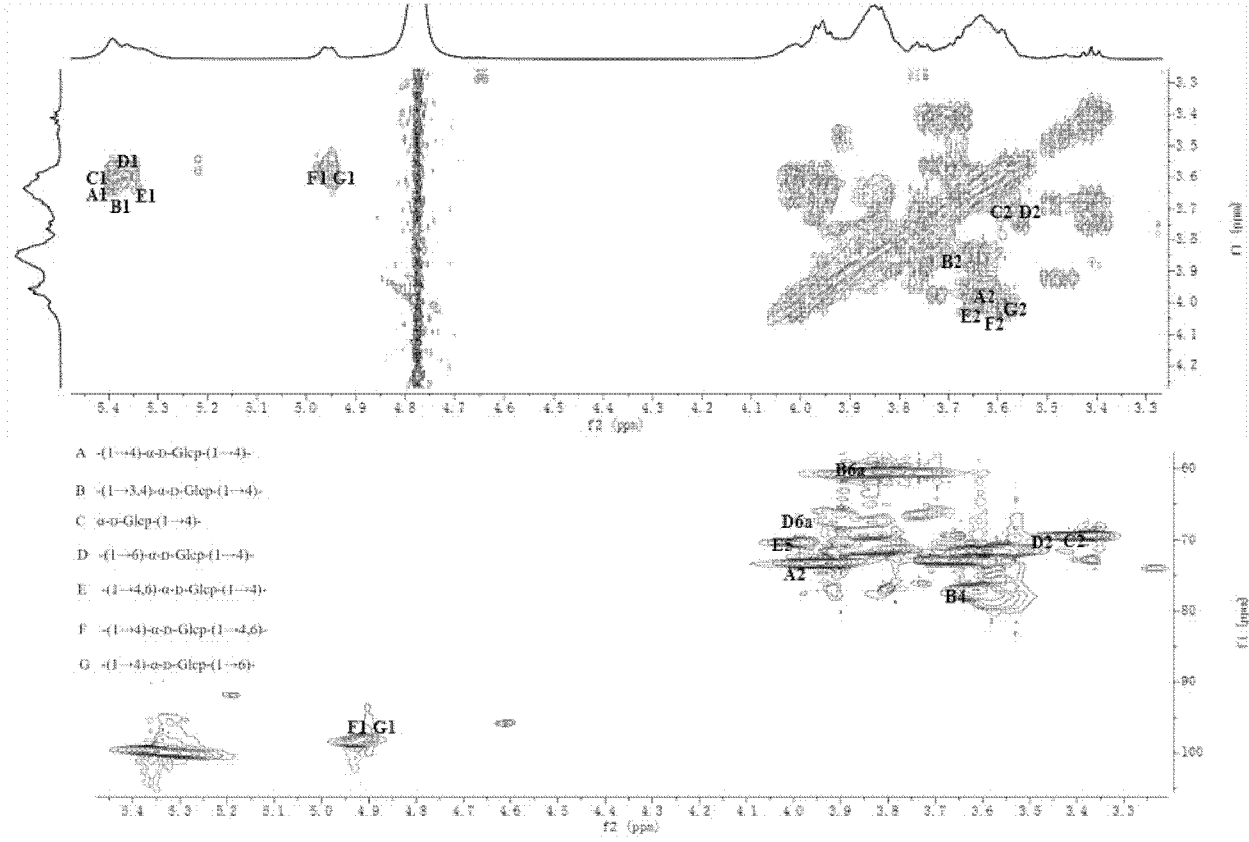


图 5

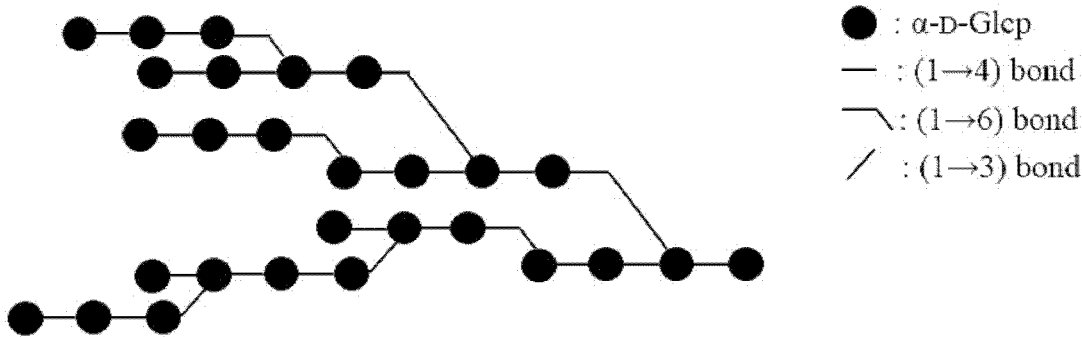


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/18(2006.01)i; C12P 19/08(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N,C12P,C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 4, 3/6- α -葡萄糖基转移酶, 淀粉改性, α -葡聚糖, (α 1 $\rightarrow$ 3, 4) 分支, (α 1 $\rightarrow$ 4, 6) 分支, 糊精, 催化, glucosyltransferase, starch modified, dextran, branched, dextrin, catalysis, SEQ ID NO.1**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114540323 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 27 May 2022 (2022-05-27) claims 1-10, and description, paragraphs 7-13, and embodiments	1-16
A	CN 113981024 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 28 January 2022 (2022-01-28) entire document	1-16
A	CN 113981022 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 28 January 2022 (2022-01-28) entire document	1-16
A	EP 0327391 A2 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 09 August 1989 (1989-08-09) entire document	1-16
A	JP 09234073 A (NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE) 09 September 1997 (1997-09-09) entire document	1-16
A	CN 112708649 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 27 April 2021 (2021-04-27) entire document	1-16
A	CA 2174116 A1 (DANISCO) 20 April 1995 (1995-04-20) entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2022

Date of mailing of the international search report

25 November 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114438

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6087559 A (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 11 July 2000 (2000-07-11) entire document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114438

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

[1] The actually submitted sequence listing is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/114438

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114540323	A	27 May 2022	None			
CN	113981024	A	28 January 2022	None			
CN	113981022	A	28 January 2022	None			
EP	0327391	A2	09 August 1989	DE	68928271	D1	02 October 1997
				US	5118622	A	02 June 1992
				KR	890013059	A	21 September 1989
				JP	H01199577	A	10 August 1989
				CA	1336509	C	01 August 1995
JP	09234073	A	09 September 1997	JP	H09234073	A	09 September 1997
CN	112708649	A	27 April 2021	None			
CA	2174116	A1	20 April 1995	JP	H09505988	A	17 June 1997
				NZ	275423	A	19 December 1997
				CN	1510106	A	07 July 2004
				AU	7937994	A	04 May 1995
				JP	2005133102	A	26 May 2005
				RU	2140988	C1	10 November 1999
				BR	9407838	A	13 May 1997
				WO	9510616	A2	20 April 1995
				CN	1137294	A	03 December 1996
				EP	0723593	A1	31 July 1996
				AT	305518	T	15 October 2005
				GB	9605417	D0	15 May 1996
				DE	69434497	D1	09 February 2006
US	6087559	A	11 July 2000	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/114438

A. 主题的分类

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12P 19/18(2006.01)i; C12P 19/08(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, C12P, C07H

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge:4, 3/6- α -葡萄糖基转移酶, 淀粉改性, α -葡聚糖, (α 1 $\rightarrow$ 3, 4) 分支, (α 1 $\rightarrow$ 4, 6) 分支, 糊精, 催化, glucosyltransferase, starch modified, dextran, branched, dextrin, catalysis, SEQ ID NO.1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114540323 A (江南大学) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 权利要求1-10, 说明书7-13段, 实施例	1-16
A	CN 113981024 A (江南大学) 2022年1月28日 (2022 - 01 - 28) 全文	1-16
A	CN 113981022 A (江南大学) 2022年1月28日 (2022 - 01 - 28) 全文	1-16
A	EP 0327391 A2 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 1989年8月9日 (1989 - 08 - 09) 全文	1-16
A	JP 09234073 A (農林水産省食品総合研究所長 等) 1997年9月9日 (1997 - 09 - 09) 全文	1-16
A	CN 112708649 A (江南大学) 2021年4月27日 (2021 - 04 - 27) 全文	1-16
A	CA 2174116 A1 (DANISCO) 1995年4月20日 (1995 - 04 - 20) 全文	1-16

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年10月25日

国际检索报告邮寄日期

2022年11月25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

吕健

电话号码 86-(10)-53962098

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 6087559 A (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 2000年7月11日 (2000 - 07 - 11) 全文	1-16

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/114438

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114540323	A	2022年5月27日	无			
CN	113981024	A	2022年1月28日	无			
CN	113981022	A	2022年1月28日	无			
EP	0327391	A2	1989年8月9日	DE	68928271	D1	1997年10月2日
				US	5118622	A	1992年6月2日
				KR	890013059	A	1989年9月21日
				JP	H01199577	A	1989年8月10日
				CA	1336509	C	1995年8月1日
JP	09234073	A	1997年9月9日	JP	H09234073	A	1997年9月9日
CN	112708649	A	2021年4月27日	无			
CA	2174116	A1	1995年4月20日	JP	H09505988	A	1997年6月17日
				NZ	275423	A	1997年12月19日
				CN	1510106	A	2004年7月7日
				AU	7937994	A	1995年5月4日
				JP	2005133102	A	2005年5月26日
				RU	2140988	C1	1999年11月10日
				BR	9407838	A	1997年5月13日
				WO	9510616	A2	1995年4月20日
				CN	1137294	A	1996年12月3日
				EP	0723593	A1	1996年7月31日
				AT	305518	T	2005年10月15日
				GB	9605417	D0	1996年5月15日
				DE	69434497	D1	2006年2月9日
US	6087559	A	2000年7月11日	无			