

亚位点-7 处突变对碱性芽胞杆菌 CGT 酶产物特异性的影响

杨冬^{1,2}, 田靖斐^{1,2}, 陈晟^{1,2}, 吴敬^{1,2}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

杨冬, 田靖斐, 陈晟, 等. 亚位点-7 处突变对碱性芽胞杆菌 CGT 酶产物特异性的影响. 生物工程学报, 2012, 28(2): 191-202.

Yang D, Tian JF, Chen S, et al. Effect of mutating subsite-7 on product specificity of cyclodextrin glucoamylase from alkalophilic *Bacillus clarkii*. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 191-202.

摘要: 为了研究来源于碱性芽胞杆菌的 γ -环糊精葡萄糖基转移酶 (CGT 酶) 具有较高产物特异性的作用机理, 对其氨基酸序列和模拟结构进行了分析, 确定其亚位点-7 处氨基酸的缺失可能影响其产物特异性。运用重叠 PCR 的方法, 在其亚位点-7 处添加缺失的 6 个氨基酸, 造成插入突变。将突变基因与 pET-20b (+) 连接并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。以可溶性淀粉为底物进行酶转化, HPLC 分析转化产物中的环糊精含量。结果表明, 相对于野生型 γ -CGT 酶, 突变酶转化生成的 3 种环糊精中, γ -环糊精所占的比例从 76.0% 降至 12.5%, α -、 β -环糊精分别从 8.7% 和 15.2% 提高至 37.5% 和 50%。分析其可能机理为: 与 α -、 β -CGT 酶相比, 野生型 γ -CGT 酶的亚位点-7 处缺失 6 个氨基酸, 该构象为葡萄糖的结合提供了更大的空间, 从而更适合 γ -环糊精的生成; 而在其亚位点-7 处插入 6 个氨基酸, 造成插入突变后, 葡萄糖链结合的空间变小, 这种构象不利于 γ -环糊精的生成。

关键词: 环糊精, 环糊精葡萄糖基转移酶, 产物特异性, 突变

Effect of mutating subsite -7 on product specificity of cyclodextrin glucoamylase from alkalophilic *Bacillus clarkii*

Dong Yang^{1,2}, Jingfei Tian^{1,2}, Sheng Chen^{1,2}, and Jing Wu^{1,2}

Received: July 5, 2011; **Accepted:** October 10, 2011

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP20917), Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (No. SKLF-MB-200802).

Corresponding author: Jing Wu. Tel: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP20917), 食品科学与技术国家重点实验室科研基金 (No. SKLF-MB-200802) 资助。

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To investigate the mechanism of high product specificity of γ -cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364, we aligned protein sequence and structure model, found out that loss of 6 amino acids at subsite -7 probably affected its product specificity. Using overlapping PCR method, we inserted 6 amino acids into subsite -7 of CGTase. The mutant CGTase gene was ligated with pET-20b (+) and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The extracellular recombinant enzyme was used to transform soluble starch into cyclodextrins (CDs). HPLC analysis results show that, compared to wild CGTase, the γ -CDs produced by mutant enzyme decreased from 76.0% to 12.5%, whereas the ratio of α - and β -CDs increased from 8.7% and 15.2% to 37.5% and 50%. The possible mechanism was that, compared to α -, β -CGTase, wild γ -CGTase lacks 6 amino acids in its subsite -7. This conformation provided more space for glucose combination and was thus advantageous for forming γ -CD. When the 6 amino acids were inserted into the subsite -7 of wild γ -CGTase, the space to bind with glucose reduced and consequently resulted in less γ -CD production.

Keywords: cyclodextrin, cyclodextrin glucanotransferase, product specificity, mutant

环糊精是由6个以上葡萄糖链连结而成的环状低聚化合物,根据葡萄糖单元数目的不同,环糊精可以分为 α -、 β -、 γ -、 δ -环糊精等,其中最常见的是聚合度为6、7、8的 α -、 β -、 γ -环糊精。由于环糊精分子具有独特的疏水空腔结构,能包含疏水性客体分子,从而改变客体分子的溶解度、稳定性等物理化学性质,因此在食品、医药、农业等领域具有广泛的应用^[1]。

环糊精葡萄糖基转移酶(CGT酶,EC 2.4.1.19)通过分子内的环化反应能利用淀粉生产环糊精,这是其工业应用的基础^[2]。用CGT酶生产环糊精一个主要的不利条件是所有已知的野生型CGT酶生产的是 α -、 β -、 γ -环糊精的混合物,这给产物的分离纯化带来很大不便。因为要从混合物中分离得到一种纯的环糊精需要通过有机溶剂络合沉淀等一系列的附加步骤,这不仅会大幅度增加生产成本,而且由于有机溶剂的毒性会限制环糊精在食品、医药、化妆品等工业中的使用^[3],因此研究CGT酶的产物特异性的作用机理使其更好地适应环糊精工业化生产的要求具有

重要的意义^[2,4]。

到目前为止,研究者对不同来源的CGT酶进行了大量的定点突变,以期获得具有理想产物特异性的突变体。绝大多数的突变是针对CGT酶活性中心底物结合凹槽附近的氨基酸残基^[5-6]。X-射线衍射研究表明^[7-10],CGT酶活性中心凹槽至少包括9个糖结合位点,标记为+2~-7,每个亚位点能结合一个葡萄糖残基。CGT酶的产物特异性取决于底物结合凹槽处亚位点数目和位置,在亚位点-1和+1之间的键断裂之前底物的非还原末端到达亚位点-6、-7或-8分别对应地生成产物 α -、 β -、 γ -环糊精。研究表明,对底物结合凹槽周围亚位点处的一个或多个重要的氨基酸残基进行取代、插入或者删除等突变会改变CGT酶产物中 α : β : γ 比例^[11-14],暗示了CGT酶的一级结构是决定其产物特异性的主要内在因素。许多研究者对CGT酶产物特异性与其一级结构的相关性进行了大量研究。一些研究证实,亚位点-3和-7附近的氨基酸残基是影响CGT酶产物特异性的关键位点^[11,15-18]。

目前,国内外已对 α 和 β -CGT 酶进行了大量深入的研究,但对 γ -CGT 酶的研究则比较少,目前只发现来源于 *Bacillus firmus* 290-3, *Bacillus* sp. G-825-6, alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364 的 CGT 酶为 γ -CGT 酶,其中来源于 *B. clarkii* 7364 的 γ -CGT 酶由日本科学家首次发现^[19],其通过环化反应转化淀粉的产物主要为 γ -环糊精,它的这种性质使其成为理想的研究 CGT 酶产物特异性的对象。

本实验以 *B. clarkii* 7364 CGT 酶为研究对象,通过对不同来源的 CGT 酶蛋白质序列进行多重序列比对发现,在亚位点-7 处,从 141 位氨基酸开始, γ -CGT 酶缺失了存在于 α 及 β -CGT 酶中的 6 个氨基酸,相应的位置只有 142 位的天冬氨酸,基于以上分析,本研究试图通过重叠 PCR 的方法将 γ -CGT 酶 142 位天冬氨酸用 β -CGT 酶中保守的 6 个氨基酸替换,以探讨该 6 个氨基酸是否是导致 CGT 酶产物特异性产生差异的原因,从而为通过分子改造得到理想产物特异性的 CGT 酶提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

重组质粒 pET-20b/cgt 由本实验室构建并保藏。克隆宿主菌 *E. coli* JM109 和表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 由本实验室保藏。克隆质粒 pMD18T-simple 和表达质粒 pET-20b (+) 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 酶和试剂

质粒小量提取试剂盒购自上海生工生物工程公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产

物纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、primerStarDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,氨苄青霉素、CIAP 购自华美生物工程公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

培养基 LB、TB、SOB 均按 Invitrogen 公司操作手册方法配制。

1.2 方 法

1.2.1 突变体的克隆

根据 *B. clarkii* 7364 γ -CGT 酶基因序列为模板,设计如下 4 条引物(表 1),F 和 R 为基因上下游引物,在引物的末端分别引入酶切位点 *Nco* I (CCATGG) 和 *Eco*R I (GAATCC),Fm 和 Rm 为突变位点的上下游引物。下划线部分为突变位点核酸序列。

表 1 突变引物

Table 1 Mutant primers used in PCR reactions

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F	ATGGCCATGGGAAGTAATGCAACG
Fm	<u>GGCGAAGCCGGGGTTGTCCCTGTCCGC</u> AGGGGAAGTAT
R	GCTCGAATTCGGCCTTCGAAAAC
Rm	<u>GCCGACAGGGACAACCCCGCTTCGCC</u> GAGGATGGTGC

分别以 F/Fm 以及 Rm/R 为引物,扩增出含有突变位点的片段 A 和 B。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物纯化后,作为第 2 次重叠 PCR 的模板。向 PCR 反应体系中加入等摩尔的片段 A

和 B, 不加入引物 F 和 R, 交错延伸 5 个循环, PCR 扩增条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2.5 min; 72 °C 延伸 10 min。然后加入引物 F 和 R, 扩增 30 个循环, PCR 扩增条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物纯化后, 16 °C 连接 pMD18T-simple, 连接产物转化 *E. coli* JM109, 挑取阳性克隆, 双酶切鉴定后, 送上海生物工程有限公司测序。

测序正确的突变体基因双酶切后, 胶回收得到目的基因片段, 16 °C 连接表达载体 pET-20b(+), 转化 *E. coli* JM109, 提取质粒, 双酶切鉴定阳性克隆。

鉴定正确的表达质粒热激转化 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单菌落接种 LB 培养基, 保存菌种。

1.2.2 突变体的胞外表达

种子培养: 将保藏的菌种接入装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 接种量为 0.1%, 回旋式摇床转速 200 r/min, 培养温度为 37 °C, 培养 8 h。

发酵培养: 将培养好的种子培养液按 5% (V/V) 的接种量, 接种至装有 100 mL TB 培养基的 500 mL 三角瓶中进行发酵培养, 开始培养温度为 37 °C, 摇床转速 200 r/min, 当菌体培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 添加 IPTG 至 0.01 mmol/L, 迅速转至 25 °C 摇床, 继续诱导 72 h。

各培养基中使用前添加 100 mg/L 氨苄青霉素。

1.2.3 突变体的纯化

含有突变质粒的基因工程菌培养 72 h 后的发酵液在 12 000 r/min 下离心 20 min 除去菌体, 获得上清液。上清液经过 70% (W/V) 硫酸铵沉淀过夜后, 沉淀物用适量缓冲液 A (50 mmol/L

NaCl, pH 10.0) 溶解, 并在缓冲液 A 中透析过夜, 得到 Ni 柱亲和层析的上样样品。Ni 亲和柱用缓冲液 A 平衡后上样, 然后分别用缓冲液 A、含 0~480 mmol/L 咪唑的缓冲液 A、含 480 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱, 分步收集。含 CGT 酶的组分在 50 mmol/L NaCl (pH 10.0) 中透析过夜, 纯化的重组 CGT 酶在 -80 °C 保存。

1.2.4 酶活测定

甲基橙法测定 α -环化活力的方法如下^[20]: 取适当稀释的酶液 0.1 mL, 加入装有 0.9 mL 预先用 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0) 配制的 3% (W/V) 可溶性淀粉溶液的试管中, 在 40 °C 下反应 10 min 后, 加入 1.0 mL 1.0 mol/L 的盐酸停止反应, 再加入 1.0 mL 用 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液配制的 0.1 mmol/L 甲基橙, 在 20 °C 下保温 20 min, 在 505 nm 下测定吸光度。对应 α -环糊精标准曲线计算出环糊精浓度, 一个酶活单位 (U) 定义为在上述条件下每分钟生成 1 μ mol 的 α -环糊精所需的酶量。

酚酞法测定 β -环化活力的方法如下^[21]: 取适当稀释的酶液 0.1 mL, 加入装有 0.9 mL 预先用 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0) 配制的 3% (W/V) 可溶性淀粉溶液的试管中, 在 40 °C 下反应 10 min 后, 加入 3.5 mL 30 mmol/L NaOH 和 0.5 mL 由 5 mmol/L Na_2CO_3 溶液配制的 0.02% (W/V) 酚酞停止反应, 在室温下保温 20 min, 在 550 nm 下测定吸光度。一个酶活单位定义为在上述条件下每分钟生成 1 μ mol β -环糊精所需的酶量。

溴甲酚氯法测定 γ -环化活力的方法如下^[22]: 取适当稀释的酶液 0.1 mL, 加入装有 0.9 mL 预先用 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH

10.0) 配制的 3% (W/V) 可溶性淀粉溶液的试管中, 在 40 °C 下反应 10 min 后, 加入 50 μ L 1.0 mol/L 的盐酸停止反应, 再加入 2 mL 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.2) 和 100 μ L 5 mmol/L 溴甲酚氯溶液, 在室温下保温 20 min, 在 630 nm 下测定吸光度。一个酶活单位定义为在上述条件下每分钟生成 1 μ mol γ -环糊精所需的酶量。

1.2.5 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定使用 Bradford 法, 使用牛血清蛋白作为标准品^[23]。

1.2.6 突变体的结构模拟

野生和突变 CGT 酶的理论结构通过 SWISS-MODEL 蛋白模拟在线服务器 (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) 进行同源模拟获得^[24-26]。

1.2.7 产物特异性分析

采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定。配制 5% (W/V) 可溶性淀粉溶液作为底物, 5 g 淀粉溶解在 90 mL 50 mmol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (野生型 pH 为 10.0, 突变体 pH 为 9.0) 中, 定容至 100 mL, 在沸水中煮沸 30 min。加入一定量的野生型和突变体 CGT 酶使反应体系中酶活为 0.2 U/mL, 置于 50 °C、200 r/min 摇床中反应 12 h, 隔时间取样 600 μ L, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 500 μ L, 加 5 μ L 糖化酶 (70 U/mL), 在 30 °C 糖化 1 h, 10 min 煮沸灭活, 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清 0.45 μ m 超滤膜过滤后取 20 μ L 上机分析。采用 HPLC 进行产物分析的色谱条件是: Waters 600HPLC 色谱仪, Waters 自动进样器, 色谱柱 Lichrosorb NH₂ (4.6 mm×150 mm), Waters 2410 示差检测器; 流动相 (V/V) 为 70% 乙腈水溶液, 流速 0.8 mL/min; 柱温 30 °C。

2 结果与分析

2.1 γ -CGT 酶产物特异性位点分析

来源于 *B. circulans* 251 的 β -CGT 酶与麦芽九糖抑制剂的复合结构表明, 在 β -CGT 酶中, 亚位点-7 处氨基酸与作为中间产物还原末端的第 9 个葡萄糖通过氢键相互作用 (图 1), 对其进行空间定位, 其后这个葡萄糖会在其他氨基酸的作用下发生空间偏移, 与亚位点-1 处的葡萄糖相互作用形成 α -1,4 糖苷键, 环化产物形成, 因此亚位点-7 处的相关氨基酸对 CGT 酶的产物特异性起着非常关键的作用^[7-9]。

利用 EBI (www.ebi.ac.uk) 的在线 clustalw2 工具, 对不同来源 CGT 酶氨基酸序列进行多重序列比对。其中来源于 *Thermoanaerobacter* sp. ATCC53、*T. thermosulfurigenes* EM1、*B. stearothermophilus* strain NO₂ 的 CGT 酶主要产物为 α -环糊精, 而来源于 *B. firmus* 290-3、*Bacillus* sp. G-825-6、*B. clarkii* 7364 的 CGT 酶主要产生 γ -环糊精, 其余均以产生 β -环糊精为主 (图 2)^[2,5]。

多重序列比对结果表明, γ -CGT 酶在亚位点-7 处只有 142 位天冬氨酸的存在, 缺失另外 6 个存在于 α 及 β -CGT 酶中的氨基酸。

通过 SWISS-MODEL 蛋白模拟在线服务器, 以来自 *Geobacillus stearothermophilus* CGT 酶的结构为模板 (PDB 编号: 1CYG), 成功模拟得到野生型 γ -CGT 酶的结构, 与已经解析出的 CGT 酶晶体结构相比, γ -CGT 酶的整体结构并没有大的变化, 整个酶分子同 β -CGT 酶一样由 5 个结构域组成, 主链的空间走向也基本一致, 但在亚位点-7 处, 局部结构发生了比较明显的变化 (图 3), 由于亚位点-7 处 6 个氨基酸的缺失, 使得此

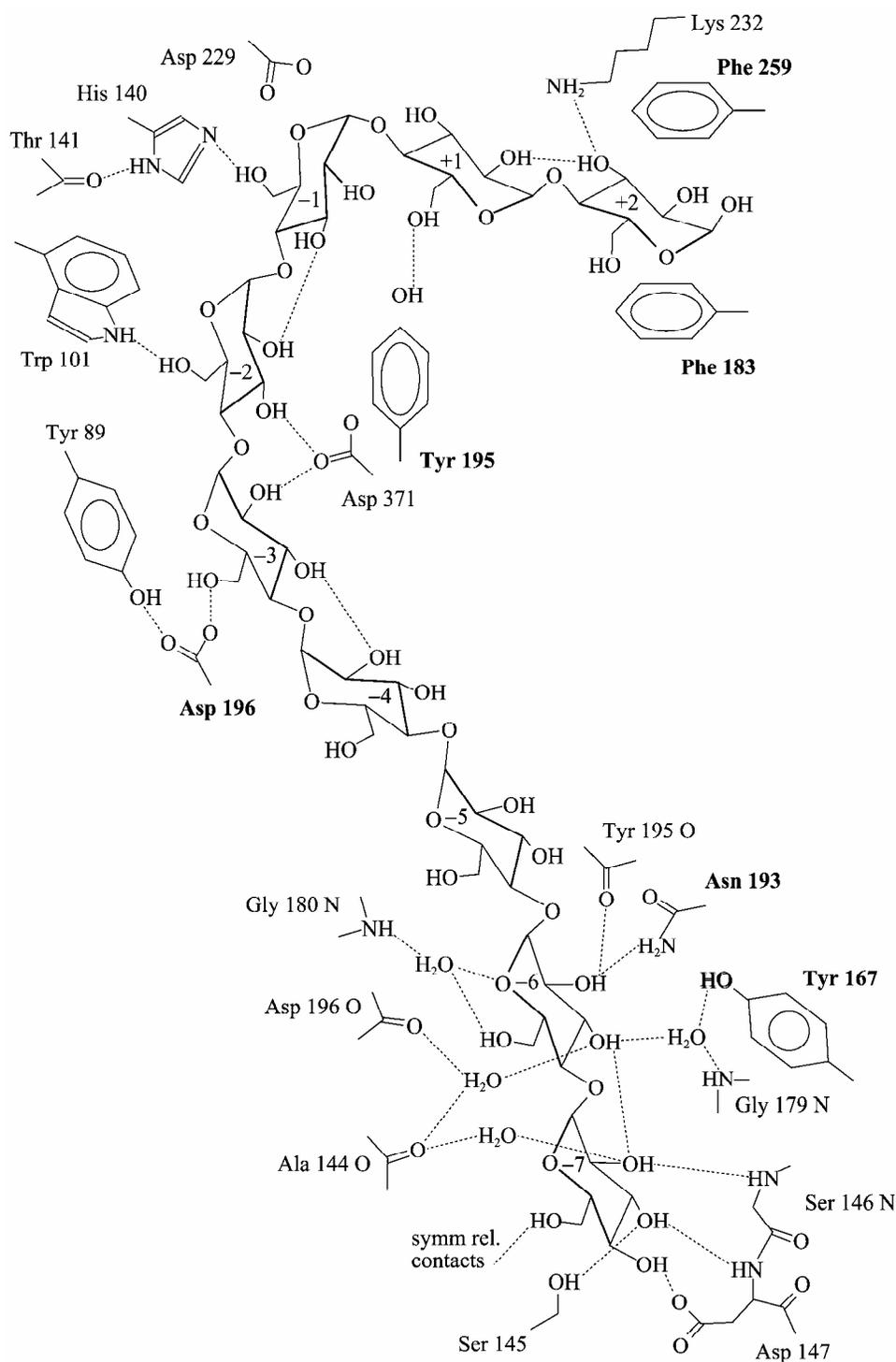


图 1 来源于碱性芽胞杆菌 251 的 CGT 酶与麦芽九糖抑制剂在活性位点上相互作用示意图^[8]

Fig. 1 Schematic representation of the interactions of *B. circulans* strain 251 CGTase with a maltononaose substrate at the active site^[8].

<i>T. thermosulfurigenes</i> EM1	HTSPASETDPPTYAENGRLYDNG 162
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. ATCC53	HTSPASETDPPTYGENGRLYDNG 162
<i>B. stearothermophilus</i> strain NO2	HTSPASETNPSPYMEGRLYDNG 157
<i>Bacillus circulans</i> 251	HTSPASSDQPSFAENGRLYDNG 161
<i>Bacillus</i> sp. strain 1011	HTSPASSDDPSFAENGRLYDNG 161
<i>Bacillus</i> sp. strain B1018	HTSPASSDQPSFAENGRLYDNG 161
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. strain 38	HTSPASSDDPSFAENGRLYDNG 161
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. strain 17	HTSPASLDQPSFAENGRLYDNG 161
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	HTSPVD-----IEDGALYDNG 149
<i>Bacillus firmus</i>	HTSPVD-----IENGALYDNG 149
<i>Bacillus clarkii</i>	HTSPVD-----IEDGALYDNG 152
	**** * : *****

图 2 不同来源 CGT 酶的多重序列比对结果

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of CGTase.

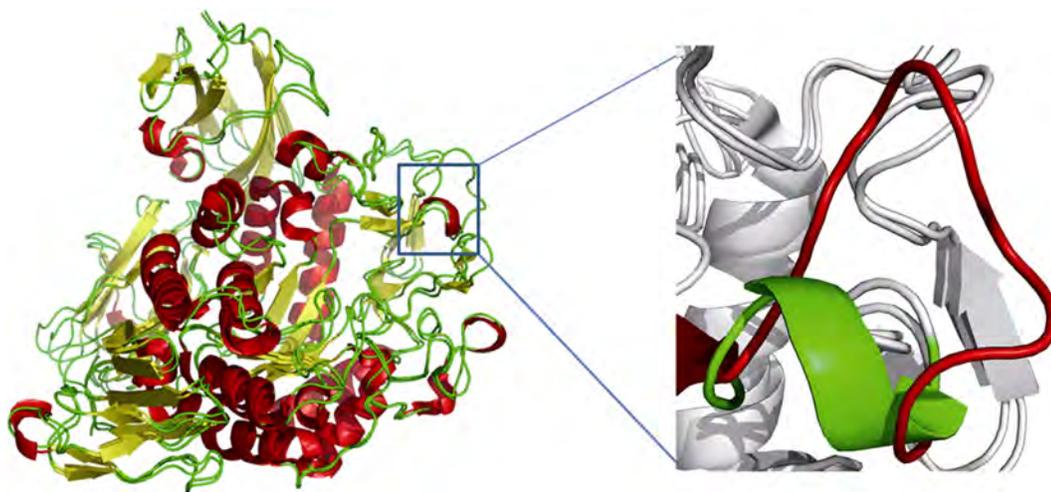


图 3 β -CGT 酶晶体结构与模拟 γ -CGT 酶结构对比

Fig. 3 Alignment of γ -CGTase model structure with β -CGTase crystal structure.

位置的氨基酸链变短, 而该结构构象的变化有可能是导致 γ -CGT 酶具有较高的产物特异性的原因。因此, 本研究拟在 γ -CGT 酶亚位点-7 处通过突变将 142 位天冬氨酸用来源于 β -CGT 酶的保守氨基酸 SSDDPF 替换, 来探讨这种插入突变对其

产物特异性的影响。

2.2 突变体的克隆表达

通过 overlapPCR 扩增出突变基因。突变基因连接 pMD-18T 后进行测序, 突变位点正确突变。将突变基因克隆至 pET-20b(+), 转化大肠杆

菌 BL21 (DE3), 挑取阳性克隆进行培养, SDS-PAGE 鉴定发现, 突变体成功表达 (图 4)。粗酶液经 Ni-柱纯化, 得到电泳纯蛋白 (图 5)。检测纯化后突变酶和野生酶的环糊精形成活力, 结果表明, 相对于野生酶, 突变酶的 γ -环糊精形成活力从 14.1 U/mg 降至 1.3 U/mg, α 和 β -环糊精形成活力均有小幅度提高, 其中, α -环糊精形成活力从 0.4 U/mg 升高至 2.4 U/mg, 而 β -环糊精形成活力从 2.5 U/mg 升高至 3.1 U/mg, 但 6 个氨基酸的插入突变导致总的环化活力降低 (表 2)。

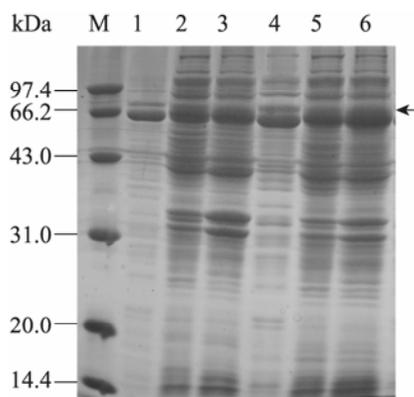


图 4 野生型和突变体 CGT 酶的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the wild type and mutant CGTase. M: protein marker; 1: wild type supernatant fractionation; 2: wild type periplasmic fractionation; 3: wild type inclusion body; 4: mutant supernatant fractionation; 5: mutant periplasmic fractionation; 6: mutant inclusion body.

表 2 来源于 *B.clarkii* 7364 的野生和突变 CGT 酶的环糊精形成比活力

Table 2 Cyclodextrin forming specific activities of the wild-type and mutant CGTases from *B. clarkii* 7364

Enzyme	α -cyclodextrin forming specific activity (U/mg)	β -cyclodextrin forming specific activity (U/mg)	γ -cyclodextrin forming specific activity (U/mg)	Total (U/mg)
Wild-type	0.4	2.5	14.1	17.0
Mutant	2.4	3.1	1.3	6.8

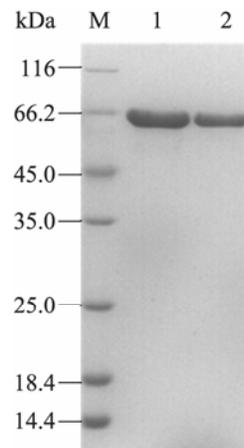


图 5 纯化后野生型和突变 CGT 酶的 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purification of wild type and mutant CGTase. M: protein marker; 1: wild type; 2: mutant.

2.3 突变体的最适温度和最适 pH

为了确定酶转化的最佳反应条件, 考察了突变体的最适温度 and pH。如图 6 所示, 野生型和突变体的最适温度均为 50 °C, 当温度升高至 60 °C 时, 突变体酶活下降较快, 70 °C 时野生型酶活下降至原来的 50%, 突变体已基本失活。

与野生型相比, pH 对突变体的影响不是很大 (图 7), 在酸性条件下, 突变体和野生型酶活都较低, 碱性条件下, 二者的酶活开始随 pH 的升高而增大, 但突变体的最适 pH 为 9, 而野生型为 10, pH 为 11 时, 野生型和突变体的活性都有所下降, 但都可保持 80% 的活力。

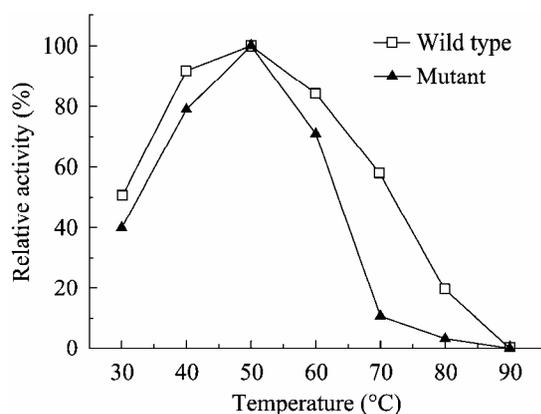


图 6 温度对野生型和突变体活力的影响
Fig.6 Effect of temperature on the wild type and mutant γ -CGTase.

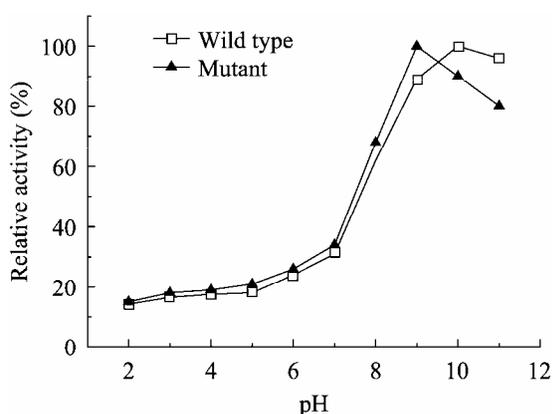


图 7 pH 对野生型和突变体活力的影响
Fig.7 Effect of pH on the wild type and mutant γ -CGTase.

2.4 突变体的产物特异性

在野生酶和突变酶各自的最适温度和 pH 下进行酶转化淀粉生产环糊精实验, 从图 8 可知, 野生酶转化淀粉生产环糊精中 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精之比为 1.2 : 2.1 : 10.5, 其中 γ -环糊精占 76%, α -环糊精、 β -环糊精分别占

8.7% 和 15.2%。突变酶转化淀粉生产环糊精中 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精之比为 1.5 : 2 : 0.5, 其中 γ -环糊精所占比例缩减为 12.5%, α -环糊精、 β -环糊精分别提高至 37.5% 和 50%。突变酶 γ -环糊精的产量降低, 而 α -环糊精和 β -环糊精的产量有所升高, 与预期结果一致。但相对于野生酶, 突变酶的总转化率从 13.7 g/L 降至 4 g/L。

2.5 作用机理分析

在 β -CGT 酶中, γ -CGT 酶所缺失的 6 个氨基酸位于底物结合沟槽的末端, 与其他一些氨基酸残基共同构成了亚位点-7, 与葡萄糖链末端的第 9 个葡萄糖残基结合相互作用, 对其进行空间定位。在 γ -CGT 酶中添加这 6 个氨基酸, 造成插入突变后, 酶转化淀粉生成的环糊精中 γ -环糊精所占比例明显降低。对比 β -CGT 酶以及模拟的突变前后 γ -CGT 酶的晶体结构发现 (图 9), 在亚位点-7 处, β -CGT 酶环状结构较大, 未突变前 γ -CGT 酶环状结构较小, 而添加 6 个氨基酸后, γ -CGT 酶原来较小的环状结构变大, 其空间走向与 β -CGT 酶基本一致。进一步分析这种亚位点-7 处环状结构的变化发现, 突变前, γ -CGT 酶较小的环状结构使得底物结合凹槽空间变大, 从而为较长葡萄糖链的结合提供了足够的空间, 因此这种构象更适合于大的 γ -环糊精的生成。突变后, 这 6 个氨基酸会与相应的葡萄糖残基相互作用, 从而限制了葡萄糖链的结合, 使得葡萄糖链结合的空间位阻变大, 其所能结合的空间变小, 从而限制了较长葡萄糖链的结合, 因此这种构象不利于大的 γ -环糊精的生成。

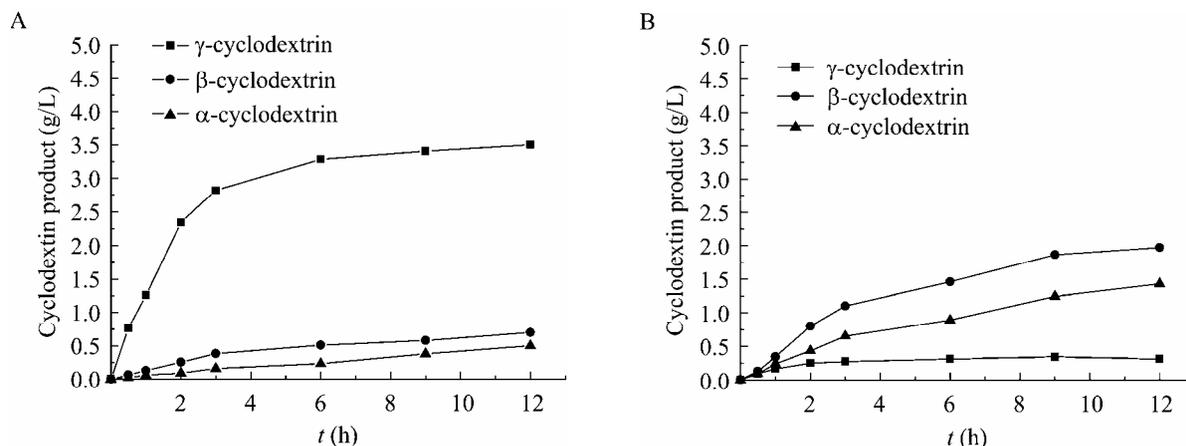


图 8 野生型 (A) 和突变 (B) CGT 酶分别作用于 5% (W/V) 可溶性淀粉的环糊精形成过程

Fig. 8 Courses of formation of CDs from 5% (W/V) soluble starch by wild-type and mutant CGTase, respectively. (A) Wild-type CGTase. (B) Mutant CGTase.



图 9 β-CGT 酶晶体结构 (红色) 与野生 γ-CGT 酶 (绿色) 和突变 γ-CGT 酶 (黄色) 模拟结构对比

Fig. 9 Alignment of wild type (green) and mutant γ-CGTase (yellow) model structure with β-CGTase (red) crystal structure.

3 结论

本实验初步探讨了亚位点-7 处的氨基酸残基对 γ-CGTase 酶产物特异性产生影响的规律和机理。在 γ-CGT 酶亚位点-7 处中添加 6 个在 α-、β-CGT 酶中保守的氨基酸, 造成突变酶转化淀粉生成的环糊精中 γ-环糊精所占的比例下降了

63.5%, 而 α-环糊精、β-环糊精分别提高了 28.8% 和 34.8%。由此确定 γ-CGT 酶亚位点-7 处氨基酸的缺失是其 γ-环糊精形成的关键构象, 并从其蛋白质的三维结构进行了一定的理论解释。这为进一步确定 CGT 酶的产物特异性与其结构的相关性, 为进一步阐明 CGT 酶的催化反应机理奠定了基础, 同时也为构建具有理想产物特异性的 CGT 酶突变体提供了依据。

REFERENCES

- [1] Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*, 2004, 39(9): 1033-1046.
- [2] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 85(4): 823-835.
- [3] Jacob A, Rendleman J. Enhanced production of cyclomaltooctaose (γ-cyclodextrin) through selective complexation with C12 cyclic compounds. *Carbohydr Res*, 1992, 230: 343-359.
- [4] Li ZF, Wang M, Wang F, et al. γ-Cyclodextrin: a

- review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 77(2): 245–255.
- [5] van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543(2): 336–360.
- [6] van der Veen BA. Engineering reaction and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251[D]. Groningen: University of Groningen, 2000.
- [7] Uitdehaag JCM, Mosi R, Kalk KH, et al. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(5): 432–436.
- [8] Strokopytov B, Knegtel RM, Penninga D, et al. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltonaose inhibitor at 2.6 angstrom resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*, 1996, 35(13): 4241–4249.
- [9] Uitdehaag JC, Kalk KH, van Der Veen BA, et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34868–34876.
- [10] Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, et al. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry*, 1999, 38(26): 8385–8392.
- [11] van der Veen BA, Uitdehaag JC, Dijkstra BW, et al. The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 implications for product inhibition and product specificity. *Eur J Biochem*, 2000, 267(12): 3432–3441.
- [12] Kim YH, Bae KH, Kim, TJ, et al. Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem Mol Biol Int*, 1997, 41(2): 227–234.
- [13] Parsiegla G, Schmidt AK, Schulz GE. Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the γ -cyclodextrin production. *Eur J Biochem*, 1998, 255(3): 710–717.
- [14] Wind RD, Uitdehaag JC, Buitelaar RM, et al. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5771–5779.
- [15] Hirano K, Ishihara T, Ogasawara S, et al. Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 70(2): 193–201.
- [16] Penninga D, van der Veen BA, Knegtel RM, et al. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *J Biol Chem*, 1996, 271(51): 32777–32784.
- [17] Sin KA, Nakamura A, Masaki H, et al. Replacement of an amino acid residue of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus ohbensis* doubles the production of γ -cyclodextrin. *J Biotechnol*, 1994, 32(3): 283–288.
- [18] Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom HJ, et al. Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry*, 1995, 34(10): 3368–3376.
- [19] Takada M, Nakagawa Y, Yamamoto M. Biochemical and genetic analyses of a novel γ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *J Biochem*, 2003, 133(3): 317–324.
- [20] Lejeune A, Sakaguchi K, Imanaka T. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal Biochem*, 1989, 181(1): 6–11.
- [21] Mäkelä M, Korpela T, Laakso S. Colorimetric determination of beta-cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein. *J Biochem Biophys Meth*, 1987,

-
- 14(2): 85–92.
- [22] Kato T, Horikoshi K. Colorimetric determination of γ -cyclodextrin. *Anal Chem*, 1984, 56(9): 1738–1740.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248–254.
- [24] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [25] Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D230–D234.
- [26] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.