

# $\alpha$ -环糊精糖基转移酶活性区域突变提高选择形成 $\gamma$ -环糊精能力

谢婷<sup>1,2</sup>, 岳洋<sup>1,3</sup>, 宋炳红<sup>1</sup>, 钞亚鹏<sup>1</sup>, 钱世钧<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 工业酶国家工程实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191

谢婷, 岳洋, 宋炳红, 等.  $\alpha$ -环糊精糖基转移酶活性区域突变提高选择形成 $\gamma$ -环糊精能力. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1234-1244.

Xie T, Yue Y, Song BH, et al. Increasing of product specificity of  $\gamma$ -cyclodextrin by mutating the active domain of  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus macerans* sp. 602-1. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1234-1244.

**摘要:** 探讨 $\alpha$ -环糊精糖基转移酶 (CGT 酶) 活性区域-3 亚位点 (47 位赖氨酸残基), -7 亚位点 (146~152 位氨基酸残基) 以及环化中心位点 (195 位酪氨酸残基) 对其催化底物形成 $\gamma$ -环糊精 (CD) 能力的影响。将 $\alpha$ -CGT 酶相应位点分别进行如下突变: K47T, Y195I, 以及 146~152 位氨基酸残基替换为异亮氨酸 (命名为 $\Delta 6$ ), 并在大肠杆菌 BL21 中实现异源活性表达。以可溶性淀粉作为底物进行转化, 利用 HPLC 分析各种突变酶的催化产物中 3 种环糊精产量和比例。结果表明, 和野生酶相比, 所有突变酶的淀粉水解活性和环糊精总生成量都有不同程度的下降。在产物的组成方面, 突变酶 Y195I 的催化产物中,  $\alpha$ -CD 的含量由 68% 降为 30%,  $\beta$ -CD 由 22.2% 提高为 33.3%; 而 $\gamma$ -CD 由 8.9% 提高为 36.7%, 含量提高了 4 倍, 取代 $\alpha$ -CD 成为产物中的主要成分; $\gamma$ -CD 的实际产量为 1.1 g/L, 是野生酶 (0.4 g/L) 的 3 倍。突变酶 K47T 和 $\Delta 6$  的转化产物中 $\alpha$ -CD 比例有不同程度下降, 但仍然是产物中的主要组分,  $\beta$ -和 $\gamma$ -CD 的比例都有所增加。由此可见, 活性区域中 195 位氨基酸对于 $\alpha$ -CGT 酶的活力和催化选择性具有重要的影响, Y195I 突变体酶最有利于选择性形成 $\gamma$ -CD。纯化后突变酶 Y195I 的酶学性质试验表明, 其最适反应温度和野生酶相同, 但最适反应 pH 有所提高, 且比野生酶具有更好的 pH 稳定性。因此, 突变酶 Y195I 具有生产制备 $\gamma$ -CD 的潜力。

**关键词:**  $\alpha$ -环糊精糖基转移酶,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, 突变, 产物选择性

**Received:** April 21, 2013; **Accepted:** May 14, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31171643).

**Corresponding author:** Yapeng Chao. Tel: +86-10-64807435; E-mail: chaoyp@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 31171643) 资助。

# Increasing of product specificity of $\gamma$ -cyclodextrin by mutating the active domain of $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus macerans* sp. 602-1

Ting Xie<sup>1,2</sup>, Yang Yue<sup>1,3</sup>, Binghong Song<sup>1</sup>, Yapeng Chao<sup>1</sup>, and Shijun Qian<sup>1</sup>

1 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 School of Biological Science and Medical Engineering, Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100191, China

**Abstract:** We studied the mutation effect of subsites -3(Lys47), -7(146-152), and cyclization center (Tyr195) in active domain on product specificity of  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase ( $\alpha$ -CGTase) from *Paenibacillus macerans* sp. 602-1. The Lys47 was replaced by Thr47 and Tyr195 by Ile195, and the amino acids from 146 to 152 were replaced by Ile (named as  $\Delta 6$ ). All these mutant  $\alpha$ -CGTases were actively expressed in *E. coli* BL21. Compared with the wild-type  $\alpha$ -CGTase, the starch-degrading activities of all the mutant enzymes were declined. For mutant Y195I, the percentage of  $\alpha$ -CD was decreased from 68% to 30%, and  $\beta$ -CD was raised from 22.2% to 33.3%. Interestingly,  $\gamma$ -CD was increased from 8.9% to 36.7% and became the main product, while the actual yield was increased from 0.4 g/L to 1.1 g/L. Mutant K47T and  $\Delta 6$  still produced  $\alpha$ -CD as main product though the percentage of  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD increased. Purified Y195I CGTase showed similar optimum temperature with the wild-type  $\alpha$ -CGTase, but its optimum pH shifted from 5.0 to 6.0 with better pH stability. In summary, mutant Y195I CGTase has the potential to produce  $\gamma$ -CD as the main product.

**Keywords:**  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, mutation, product specificity

环糊精糖基转移酶 (Cyclodextrin glycosyl transferase, CGTase) (EC 2.4.1.19) 是一种来自细菌的胞外酶, 属于  $\alpha$  淀粉酶家族 (家族 13)<sup>[1]</sup>。CGT 酶能催化淀粉和其他  $\alpha$ -1,4-葡聚糖生成非还原性的麦芽低聚糖即环糊精 (Cyclodextrins 简称 CDs)。

环糊精是由 6 到多个葡萄糖单元以 ( $\alpha$ -1,4) 糖苷键相连的环状低聚糖, 3 种主要类型是  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD<sup>[2-3]</sup>。环糊精的外缘 (Rim) 亲水而内腔 (Cavity) 疏水, 因此与许多疏水客体化合物或功能基团形成包合物从而改变其物理或化学性质<sup>[4-5]</sup>。环糊精这种特性使其在食品、医药、农业、化妆品、化学环保等领域有广泛的

应用<sup>[6-10]</sup>。与  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 相比,  $\gamma$ -CD 具有内腔大, 水溶性好, 以及毒副作用小的特性, 因此它在许多行业尤其食品和医药领域有更大的潜在应用<sup>[11]</sup>。但是现在市场上的环糊精主要是  $\beta$ -CD 和部分  $\alpha$ -CD,  $\gamma$ -CD 的低产量和高成本使得它的市场份额很小<sup>[12]</sup>。

目前已有的野生 CGT 酶的转化产物都是 3 种 CD 的混合物, 并以主要产物命名为  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -CGT 酶<sup>[13]</sup>。其中  $\gamma$ -CGT 酶种类很少, 而且环化能力有限, 如克氏芽孢杆菌 *Bacillus clarkii* strain 7364 的  $\gamma$ -CGT 酶降解糊化淀粉生成环糊精的转化率为 13.7%,  $\gamma$ -CD 产量最高为 0.8 g/L<sup>[14-15]</sup>。

因此, 对 CGT 酶进行突变改造以期提高其

催化形成  $\gamma$ -CD 的能力是该领域重要研究方向之一。序列比对和结构分析表明,  $\alpha/\beta$ -CGT 酶和  $\gamma$ -CGT 酶在决定产物选择性的位点主要有两处不同, 分别是-7 亚位点 (145-152) 和-3 亚位点 (47) (按照环状芽胞杆菌 *Bacillus circulans* 251 CGT 酶的序列顺序)。在  $\alpha/\beta$ -CGT 酶中分别是 SSTDPSFA/SSDQPSFA (-7) 和 K/R (-3), 而在  $\gamma$ -CGT 酶中分别是 DI (-7) 和 T (-3)<sup>[14-15]</sup>。-3 亚位点的改造有来自芽胞杆菌 *Bacillus* sp. G1 的  $\beta$ -CGTase, 在发生 K43T (对应 *Bacillus circulans* 251  $\beta$ -CGT 酶的 47 位) 突变后,  $\gamma$ -CD 的比例从 10% 提升至 39%<sup>[16]</sup>。针对-7 亚位点的改造有来自 *B. circulans* strain 8 的  $\beta$ -CGT 酶, 其 145~151 位氨基酸突变为 Asp 后  $\gamma$ -CD 的产量提高 1 倍<sup>[17]</sup>。同时来自 *B. clarkii* 7364 的  $\gamma$ -CGT 酶的 142 位 Asp 突变为  $\beta$ -CGT 酶中保守的 6 个氨基酸后,  $\gamma$ -CD 降低了 63.5%, 而  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 分别提高了 28.8% 和 34.8%, 证明-7 亚位点对产物选择性十分重要<sup>[18]</sup>。针对 195 位的改造有 *Bacillus circulans* 251  $\beta$ -CGT 酶的突变体 Y195L, 其产物中  $\alpha$ -CD 由 13% 降为 0,  $\beta$ -CD 由 64% 增加到 86%,  $\gamma$ -CD 则由 23% 降低到 14%, 即  $\beta$ -CD 的产物选择性有所提高,  $\gamma$ -CD 的选择性有所下降<sup>[19]</sup>。以上研究大都是基于对  $\beta$ -CGT 酶进行的改造。以  $\alpha$ -CGT 酶为

材料向  $\gamma$ -CGT 酶的改造, 使其产物选择性由六元环的  $\alpha$ -CD 直接向八元环的  $\gamma$ -CD 转移, 而不是七元环的  $\beta$ -CD, 这在已往尚未见报道, 而且对于进一步揭示环糊精糖基转移酶催化的分子机理、定向改造酶蛋白的催化选择性具有借鉴意义。

本研究以源于软化芽胞杆菌 *Paenibacillus macerans* sp. 602-1 的一种  $\alpha$ -CGT 酶为材料, 通过比对 3 种酶蛋白的序列异同, 以及已有对  $\beta$ -CGT 酶的改造经验, 确定若干可能有助于形成  $\gamma$ -CD 的潜在位点。本文拟对这些位点或区域进行如下改造: K47T (-3 亚位点), Y195I (环化中心), 146 位以异亮氨酸取代 146~152 的 6 个氨基酸 (简称为  $\Delta 6$ , -7 亚位点), 以探讨这些位点对  $\alpha$ -CGT 酶产物特异性的影响。为从蛋白结构层面揭示 CGT 酶的产物选择性的影响因素, 以及实现  $\gamma$ -CGT 酶的人工改造提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株

表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 和克隆宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自全式金公司(北京); pET-22b/*cgt* 由本实验构建并保藏; 表 1 中列出了本实验中所用到的菌株和质粒。

表 1 实验菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristic description	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	For the host of plasmids	This laboratory
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	The expression strain for pET-22b/ <i>cgt</i>	This laboratory
Plasmids		
pET-22b(+)	Amp <sup>r</sup> , for construction of the recombinant expression vector	This laboratory
pET-22b/ <i>cgt</i>	Amp <sup>r</sup> , for expression of the wild-type CGTase gene	This laboratory

### 1.1.2 试剂

*Taq* 聚合酶和质粒提取试剂盒购自天根公司(北京)。T4 多聚核苷酸激酶, *Taq* DNA 连接酶和 *Dpn* I 购自 NEB 公司。Ni-NTA 镍亲和层析柱和凝胶层析柱 S-100 购自 GE Healthcare。蛋白分子量标准购自 Fermentas, 引物合成及测序由擎科兴业公司(北京)完成。其他的试剂均为国产分析纯。

### 1.2 突变方法

以 pET-22b/*cgt* 质粒为模板进行突变, 用 DNAMAN 软件设计引物(表 2), 突变引物用 T4 多聚核苷酸激酶进行磷酸化, 突变 PCR 体系如下: 10×*Taq* 缓冲液 2.5  $\mu$ L, *Taq* 酶 1  $\mu$ L, 10×*Taq* DNA 连接酶缓冲液 2.5  $\mu$ L, *Taq* DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L, 磷酸化引物 1  $\mu$ L, *Dpn* I 1  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 65  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 65  $^{\circ}$ C 8 min, 30 个循环; 75  $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物加入 *Dpn* I 酶 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h。PCR 合成双链扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 52  $^{\circ}$ C 1 min, 70  $^{\circ}$ C 1 min, 共 2 个循环。

突变酶 $\Delta$ 6 的构建按照 TaKaRa MutanBEST Kit 的方法进行。PCR 产物加入 1/10 体积的 3 mol/L 的醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, -20  $^{\circ}$ C

过夜。沉淀产物转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于含 Amp 的 LB 平板上培养, 从平板上挑取单菌落过夜培养后, 提取质粒, 测序分析突变结果。正确的表达质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单菌落接种 LB 培养基, 保存菌种。

### 1.3 培养条件

从平板上挑取单菌落接入装有 5 mL LB 培养基(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)中, 200 r/min、37  $^{\circ}$ C 培养 12 h。将培养好的种子培养液按 2% (V/V) 的接种量, 接种至装有 50 mL TB 培养基(含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)中进行发酵培养, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养菌体至  $OD_{600}$  为 0.6~0.8 时冰上冷却, 添加 IPTG 至终浓度 0.01 mmol/L。转至 16  $^{\circ}$ C 摇床, 24 h 后加入氯化钙和甘氨酸至终浓度分别为 20 mmol/L 和 150 mmol/L 继续诱导 72 h。

### 1.4 突变酶 Y195I 的纯化

将发酵液于 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 30 min, 上清液先经 20% (W/V) 硫酸铵沉淀 6 h, 12 000 r/min 离心除去部分杂蛋白, 再经 70% (W/V) 硫酸铵沉淀过夜。12 000 r/min 离心, 沉淀物用适量缓冲液 A (10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.0) 溶解, 并在缓冲液 A 中

表 2 定点突变引物序列

Table 2 Primers used in the site directed mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
K47T-F	CGTTCAGCGGCGACCGATCCAATTTGACG	29
Y195I-F	ATTGAAGACGGTATTTACAAGAACCTCATC	30
$\Delta$ 6-F	ATCGAGAACGGTGCCTGTATGATAAC	27
$\Delta$ 6-R	GTCGGCCGGAGACGTGTGGTTG	22

透析过夜。12 000 r/min 离心除去不溶沉淀, 得到镍柱亲和层析的上样样品。镍亲和柱用缓冲液 A 平衡后上样, 然后分别用缓冲液 A、B (20 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0)、C (300 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0) 洗脱, 分步收集。含 CGT 酶的组分用聚丙烯酰胺葡聚糖 S-100 凝胶层析进一步纯化, 以缓冲液 D (10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.5) 进行洗脱, 含 CGT 酶的组分超滤浓缩。纯化后的野生和重组 CGT 酶在  $-80^\circ\text{C}$  保存。

### 1.5 酶活力和蛋白测定

酶活力测定参考淡家林等的方法进行<sup>[20]</sup>。0.2% 菱糊牌可溶性淀粉 0.4 mL,  $40^\circ\text{C}$  预热 15 min, 加入适当稀释的酶液 0.1 mL, 对照在加酶之前加入 1.5 mL 0.1 mol/L HCl,  $40^\circ\text{C}$  保温 10 min, 样品管加入 1.5 mL 的 HCl 终止反应。样品管和对照管分别加入 3 mL 1 mol/L  $\text{I}_2\text{-KI}$  及 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  摇匀, 700 nm 波长测定吸光值。在上述条件下, 每分钟减低 10% 吸光度所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

蛋白含量的测定方法根据 Bradford<sup>[21]</sup>的方法进行, 使用牛血清蛋白 (BSA) 作为标准品。

用 12% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE<sup>[22]</sup> 对酶蛋白的表达和纯化情况进行鉴定和检测。

### 1.6 环糊精生成能力和产物选择性分析

以 1% (W/V) 可溶性淀粉作为底物, 1 g 淀粉溶解在 90 mL 100 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 6.5) 中, 定容至 100 mL, 煮沸 10 min。以 400 U/g 淀粉比例加入野生酶和突变酶, 置于

$40^\circ\text{C}$ 、150 r/min 摇床中反应 50 h, 隔一定时间取样。样品于 12 000 r/min 离心 30 min, 上清 0.45  $\mu\text{m}$  超滤膜过滤后取 20  $\mu\text{L}$  上机分析。采用 HPLC 进行产物分析的条件是: Waters 600 HPLC 色谱仪, Waters 手动进样器, 色谱柱 Lichrosorb  $\text{NH}_2$  (4.6 mm $\times$ 150 mm), Waters 2414 示差检测器; 流动相 (V/V) 为 70% 乙腈水溶液, 流速 1 mL/min; 柱温  $40^\circ\text{C}$ 。分别制作  $\alpha\text{-CD}$ 、 $\beta\text{-CD}$  和  $\gamma\text{-CD}$  的标准曲线, 并根据峰面积和标准曲线计算各环糊精的实际产量。

### 1.7 突变体酶蛋白建模

将野生和突变 CGT 酶序列发送至 SWISS-MODEL 蛋白建模工作站 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>), 理论结构通过同源模拟获得<sup>[23-25]</sup>。

### 1.8 酶学性质测定

取适量稀释后的酶液分别在  $30\sim 80^\circ\text{C}$  的水浴中与底物反应 10 min, 测定酶活力, 以确定其最适反应温度。取适量酶液分别在  $30\sim 80^\circ\text{C}$  的水浴中保温 30 min, 测定剩余酶活以确定酶的热稳定性。

取适量稀释后的酶液分别在  $50^\circ\text{C}$  水浴、pH 3~10 的 pH 条件下与底物反应 10 min, 测定酶活力, 确定其最适作用 pH。取适量酶液在  $4^\circ\text{C}$ 、不同 pH 条件下保温 16 h, 测定剩余酶活以确定酶的 pH 稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变酶基因获得和异源表达

以野生型质粒为模板扩增出含突变基因的质粒后进行测序, 目标位点正确突变。将

pET-22b(+) 质粒,野生酶和突变酶重组质粒分别转化 *E. coli* BL21 (DE3),挑取阳性克隆。经验证后的突变重组菌在 TB 培养基中诱导表达,收集发酵上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。以 *E. coli* BL21/pET-22b(+) 空载体表达产物为对照,从电泳图谱的结果可以看出有明显的目的条带,分子量约为 75 kDa (图 1),说明目的蛋白得到了有效的表达。对突变 CGT 酶的粗酶液活力和比活力进行分析,初步确定突变酶的淀粉水解能力都有所下降 (表 3)。

## 2.2 突变体酶的环糊精生成能力和选择性分析

转化体系含 1%的可溶性淀粉,突变酶粗酶液 40 °C 转化 24 h 后,测定  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -CD 的含量 (表 4)。突变酶 K47T 和野生酶的环糊精产量相似,都是 4 g/L 左右,其他两种突变酶的环糊精量有不同程度的下降。

突变酶 K47T 的  $\alpha$ -CD 由 68.9% 降为 57.1%, $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD 分别由 22.2% 和 8.9% 增加为 31% 和 11.9%。可见 47 位的突变使得  $\beta$ -和  $\gamma$ -CD 产量和产物比例提高,但是提高的幅度不大, $\alpha$ -CD 仍然是主要产物。

突变酶 Y195I 的 CD 总产量下降了约 30%,为 3 g/L。其中, $\alpha$ -CD 由 68.9% 降为 30%, $\beta$ -CD 由 22.2% 提高到 33.3%; $\gamma$ -CD 由 8.9% 增加到

36.7%,成为主要产物,生成量达到 1.1 g/L,是野生酶 (0.4 g/L) 的 3 倍。可见该 195 位的突变对 CD 产量和产物选择性影响显著。

突变酶 $\Delta$ 6 导致总 CD 产量下降 54%,为 2.1 g/L, $\alpha$ -CD 由 68.9% 降为 47.6%,仍是主要产物, $\beta$ -和  $\gamma$ -CD 分别由 22.2% 和 8.9% 增加为 33.3% 和 19.0%。

由此可见,突变酶 Y195I 具有了与野生 CGT 酶明显不同的催化选择性特征,特别是由以六元环  $\alpha$ -CD 为主产物直接过渡到八元环  $\gamma$ -CD 为主

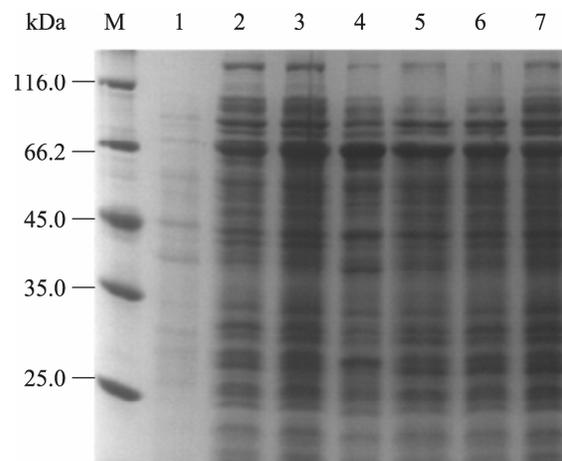


图 1 野生酶和突变酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the crude enzymes of the wild-type and the mutant CGTases. M: protein marker; 1: negative control (pET-22b); 2: WT; 3: K47T; 4: Y195I; 5:  $\Delta$ 6; 6: Y195I/ $\Delta$ 6; 7: K47T/Y195I.

表 3 野生和突变 CGT 酶活力分析

Table 3 Enzymatic and specific activities of the wild-type and the mutant CGTases

Mutant	Enzymatic activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)
WT	3 209	0.345	9 301
K47T	3 534	0.530	6 668
Y195I	510	0.501	1 018
$\Delta$ 6	2 676	0.375	7 136

表 4 野生和突变 CGT 酶转化可溶性淀粉结果

Table 4 Conversion of soluble starch with the wild-type and the mutant CGTases

Mutants	Total yield of cyclodextrins (g/L)	Product percentage (%)		
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
WT	4.5	68.9	22.2	8.9
K47T	4.2	57.1	31.0	11.9
Y195I	3.0	30.0	33.3	36.7
$\Delta 6$	2.1	47.6	33.3	19.0

产物, 而不是七元环  $\beta$ -CD, 这在已有研究中未见报道。另外, 虽然在  $\beta$ - $\gamma$ -CGT 酶突变研究中, -3 亚位点和-7 亚位点对  $\gamma$ -CD 的形成有重要作用, 但对  $\alpha$ -CGT 酶做类似的突变后并未发现有同样的效果, 即  $\gamma$ -CD 在产物中的地位没有显著改变。这也暗示 3 种酶活性域中的对应亚位点的功能可能并不完全相同。为此, 进一步构建了双突变酶 K47T/Y195I 和 Y195I/ $\Delta 6$ , 以观察对形成  $\gamma$ -CD 的选择性的影响。结果发现, 双突变酶 K47T/Y195I 和 Y195I/ $\Delta 6$  的淀粉水解能力比单突变体酶进一步降低, 转化能力很弱, 研究的意义不大。

### 2.3 突变酶 Y195I 的酶学性质

野生酶和突变酶 Y195I 的粗酶液经镍柱亲和层析和凝胶过滤层析纯化后, 得到电泳纯蛋白(图 2)。

野生酶和突变酶的最适反应温度都是 60 °C, 当温度高于 60 °C 时酶活力下降显著(图 3A)。在 20 °C、30 °C 和 40 °C 保温 16 h 后两者保留了 50% 以上的活力, 保存温度高于 40 °C 后酶活显著下降(图 3B)。

野生酶和突变酶的最适反应 pH 分别是 5.0 和 6.0(图 3C), 并且都在 pH 6.5 最稳定(图 3D), 突变酶在 pH 6.0~7.5 的范围内保留了 60% 以上的活力。而野生酶在 pH 6.0 和 7.5 时酶活力不足 50%, 说明突变酶比野生酶具有更好的 pH 稳定性。

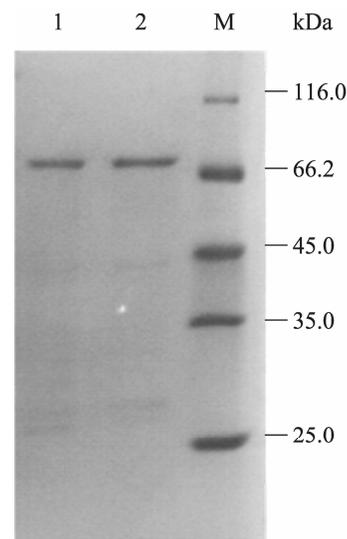


图 2 纯化后野生和突变 CGT 酶的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified wild-type and mutant CGTases. M: protein marker; 1: wild-type; 2: mutant Y195I.

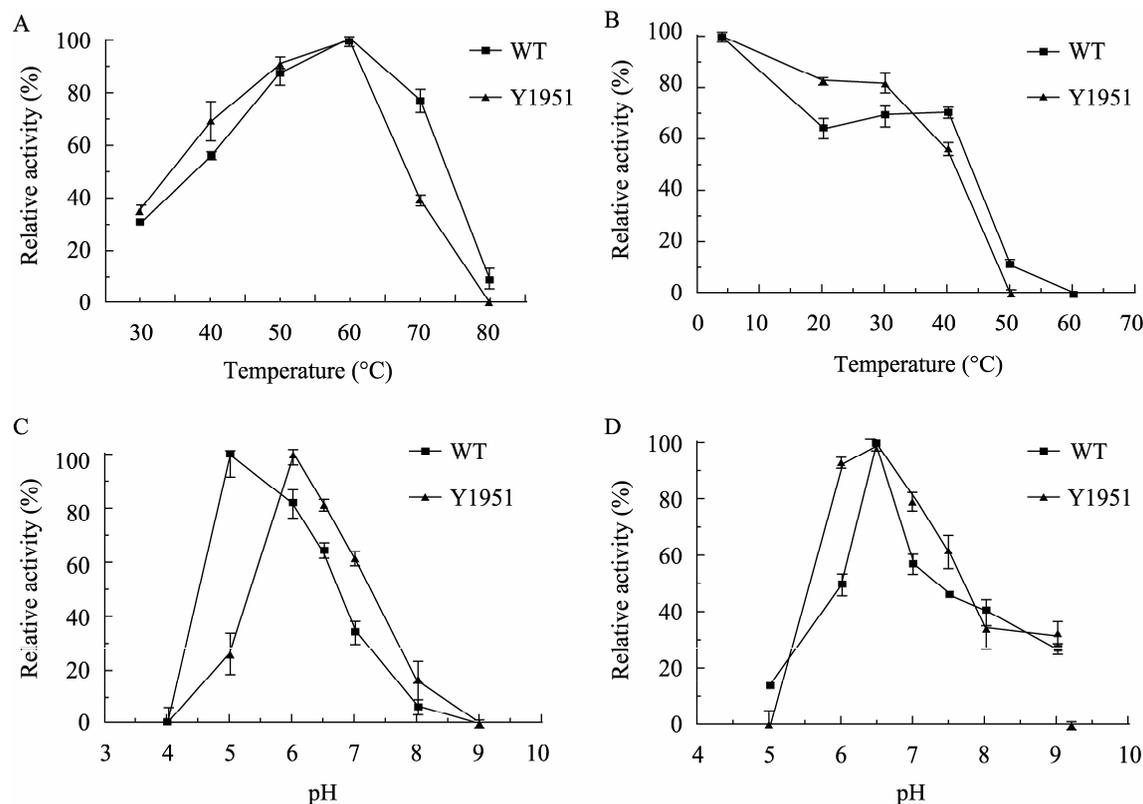


图3 野生酶和突变酶 Y195I 的酶学性质 (A) 最适温度 (B) 温度稳定性 (C) 最适 pH (D) pH 稳定性

Fig. 3 Characteristics of the wild-type and mutant Y195I CGTases. (A) The effect of temperature on enzyme activities. (B) Thermostability of the enzymes. (C) The effect of pH on enzyme activities. (D) The pH stability of the enzymes. All experiments were performed in triplicate.

纯化的野生酶和突变酶 Y195I 在 40 °C 水浴中进行转化淀粉生产环糊精实验, 从图 4 可以看到环糊精量在反应 30 h 后达到最大。从图 4A 可知, 野生酶转化淀粉生产环糊精中  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD 之比为 7.7:2.5:1,  $\alpha$ -CD 是主要产物。而突变酶 Y195I 的转化产物  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD 之比为 1:1.1:1.2 (图 4B),  $\gamma$ -CD 成为了主要产物, 突变酶的催化选择性发生了很大的转变, 产物中  $\gamma$ -CD 的产量大大提高。但相对于野生酶, 突变酶的总转化率从 4.5 g/L 降至 3 g/L。

## 2.4 作用机理分析

根据 SWISS-MODEL 模拟的三维结构模型

可以看到, 突变酶 Y195I 的催化中心没有因为 195 位氨基酸的变化而发生显著的结构变化 (图 5C), 故可以认为突变酶特性的一系列改变不是由空间结构变化直接导致。突变酶环糊精的总生成量下降可能因为 195 位的芳香族氨基酸 Tyr 比 Ile 更有利于形成环糊精; 其次 195 位的 Tyr 可以排斥活性中心的水分子从而减少水解反应但增加环化反应。催化选择性的变化可能是 195 位氨基酸的侧链类型影响产物环糊精的大小<sup>[11]</sup>。当 Tyr 突变为 Ile 后, 195 位氨基酸的侧链变短 (图 5C), 原来 Tyr 位于催化中心的中轴作用被削弱, 主要产物变成  $\gamma$ -CD。突变酶 K47T 的  $\beta$  和

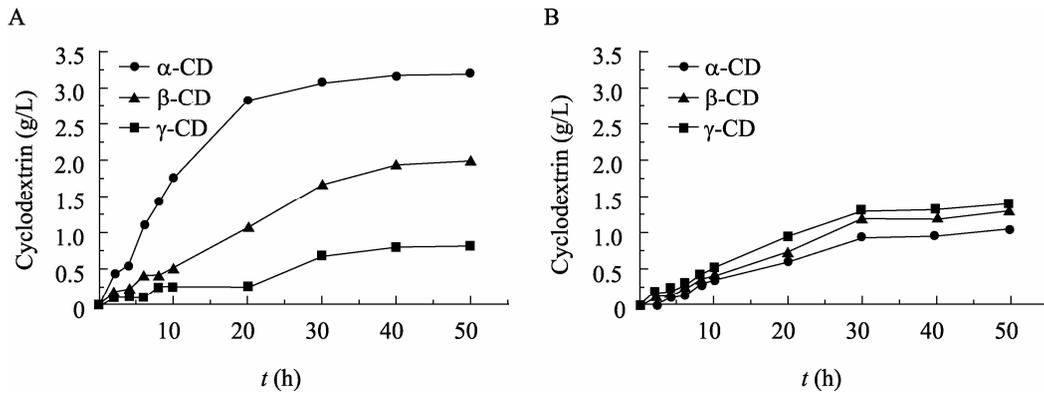


图 4 野生型 (A) 和突变 (B) CGT 酶分别作用于 1% (W/V) 可溶性淀粉的环糊精形成过程

Fig. 4 Courses of formation of CDs from 1% (W/V) soluble starch by the wild-type and mutant Y195I CGTases. (A) Wild-type CGTase. (B) Mutant Y195I CGTase.

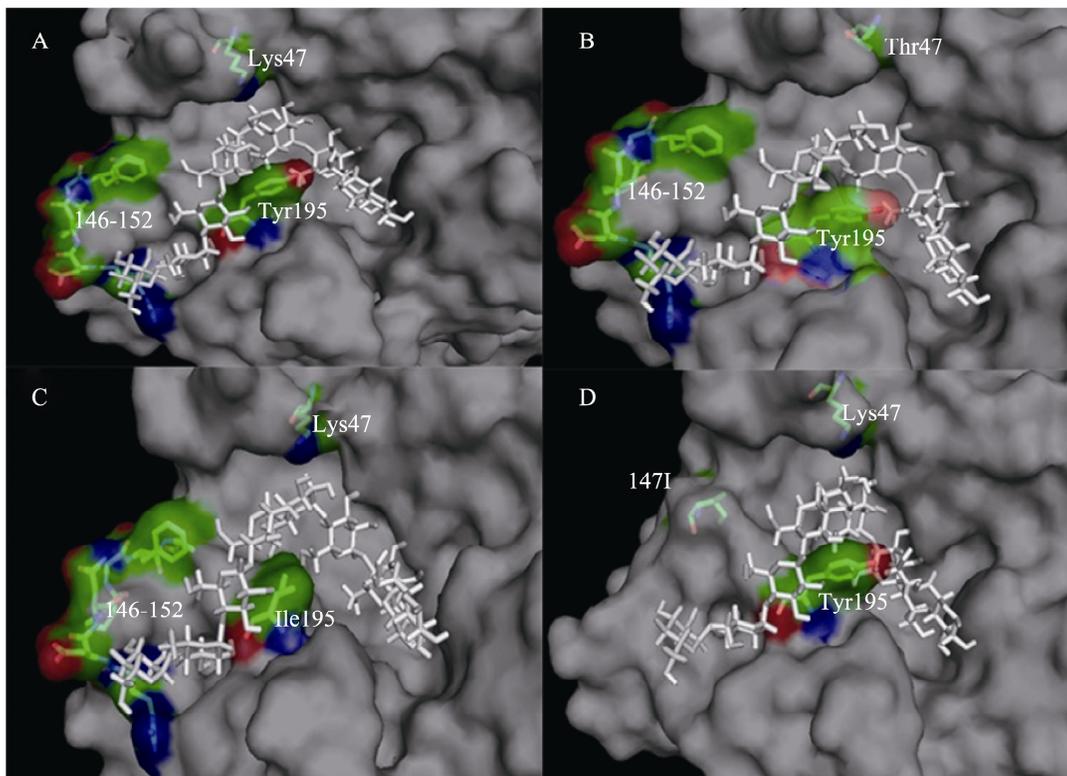


图 5 野生酶和突变酶模拟结构对比

Fig. 5 Structure model alignment of the wild-type and mutant CGTases combined with glycosaminoglycan chain. (A) WT. (B) K47T. (C) Y195I. (D)  $\Delta 6$ .

$\gamma$ -CD 比例都有所升高, 但  $\alpha$ -CD 仍是主要产物。从图 5B 看到 47 位赖氨酸被苏氨酸取代后-3 位点处的空腔有所增大, 更有利于  $\beta$ -和  $\gamma$ -CD 的形成。突变酶 $\Delta 6$  的  $\beta$  和  $\gamma$ -CD 比例也有所升高, 可能是因为异亮氨酸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, 一定程度上更适合  $\beta$ -和  $\gamma$ -CD 的生成。

可见, -3 和-7 亚位点对软化类芽胞杆菌的  $\alpha$ -CGT 酶的催化选择性有一定的影响, 使  $\beta$  和  $\gamma$ -CD 比例提高, 但是并没有达到改变催化选择性的效果。而在突变酶 Y195I 的 CD 产物中  $\alpha$ -CD 的比例由 68% 降至 30%,  $\gamma$ -CD 的比例达到 36.7%, 产物催化选择性发生了显著改变。有趣的是来自 *B. subtilis* strain 313 的  $\gamma$ -CGT 酶是已报道唯一的 195 位是 Leu 的 CGT 酶。所以 Y195I 的突变对于  $\alpha$ -CGT 酶的催化选择性机理研究具有重要意义。

### 3 结论

酶蛋白活性区域 195 位氨基酸对于  $\alpha$ -CGT 酶的活力和催化选择性具有重要作用。当 195 位 Tyr 突变为 Ile 时产物选择性发生了彻底的转变, 主要产物由  $\alpha$ -CD 转变成为  $\gamma$ -CD, 因此突变酶 Y195I 具有生产  $\gamma$ -CD 的潜力。突变酶的最适反应温度和热稳定性与野生酶相似, pH 稳定性较野生型更好。而-3 和-7 亚位点对  $\alpha$ -CGT 酶的催化选择性的影响并不显著。下一步工作将通过对突变酶晶体的结构解析进一步揭示其产物选择性变化的机理。

### REFERENCES

- [1] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, 280(2): 309–316.
- [2] Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc Biochem*, 2004, 39(9): 1033–1046.
- [3] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 1743–1754.
- [4] Singh MR, Sharma R, Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Adv*, 2002, 20(5): 341–359.
- [5] Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Akademiai Kiado Budapest*, 1982: 277–289.
- [6] Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 2045–2076.
- [7] Gao S, Wang L. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing Kexue Jinzhan*, 1998, 6(4): 80–86 (in Chinese).  
高士祥, 王连生. 环糊精在环境科学中的应用. *环境科学进展*, 1998, 6(4): 80–86.
- [8] Szejtli J. Cyclodextrins in food, cosmetics and toiletries. *Starch*, 1982, 11(34): 379–385.
- [9] Buschmann HJ, Schollmeyer E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J Cosmetic Sci*, 2002, 53(3): 185–192.
- [10] Vavia PR, Adhage NA. Inclusion complexation of nimesulide with  $\beta$ -cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999, 25(4): 543–545.
- [11] Li ZF, Wang M, Wang F, et al.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 245–255.
- [12] Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*, 2004, 76(10): 1825–1846.
- [13] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 85(4): 823–835.

- [14] Takada M, Nakagawa Y, Yamamoto M. Biochemical and genetic analyses of a novel  $\gamma$ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *J Biochem*, 2003, 133(3): 317–324.
- [15] Van der Veen BA, Uitdehaag J, Dijkstra BW, et al. The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *European J Biochem*, 2003, 267(12): 3432–3441.
- [16] Goh KM, Mahadi NM, Hassan O, et al. A predominant  $\beta$ -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *J Mol Catal B: Enzy*, 2009, 57(1): 270–277.
- [17] Parsiegla G, Schmidt AK, Schulz GE, et al. Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the  $\gamma$ -cyclodextrin production. *European J Biochem*, 1998, 255(3): 710–717.
- [18] Yang D, Tian JF, Chen S, et al. Effect of mutating subsite -7 on product specificity of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus clarkia*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(2): 191–202 (in Chinese).  
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.
- [19] 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.
- [20] Dan JL, Xu CX, Ren YE. Studies on the conditions of cyclodextrin glucosyl-transferase production and enzyme properties of *Bacillus macerans* D20. *Acta Microbiol Sin*, 1988, 28(2): 136–142 (in Chinese).  
淡家林, 徐纯锡, 任永娥. 软化芽胞杆菌 D20 产环糊精葡糖基转移的条件和酶性质. *微生物学报*, 1988, 28(2): 136–142.
- [21] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(2): 248–254.
- [22] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [23] 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.
- [24] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [25] Guex N, Peitsch MC. SWISS - MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714–2723.

(本文责编 郝丽芳)