



研究报告

蔗糖富集环境中蔗糖磷酸化酶的酶学性质研究与改造

何贺贺^{1,2} 尹钰¹ 屈潇毅^{1,2} 赵英丽¹ 林厚民¹ 韦宇拓^{1,2} 黄日波¹ 杜丽琴^{*1,2}

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室 广西大学生命科学与技术学院 广西 南宁 530005

2 广西生物炼制重点实验室 广西 南宁 530007

摘要:【背景】蔗糖富集土壤是蔗糖磷酸化酶的重要来源之一。此酶能以较廉价的蔗糖为底物进行转葡萄糖基反应,改善受体底物的理化性质,因而具有重要的应用价值。【目的】研究蔗糖富集土壤中蔗糖磷酸化酶的酶学性质和转糖苷活性,为其更优质的改造提供材料和理论基础。【方法】将宏基因组中获得的蔗糖磷酸化酶基因克隆到表达载体上构建重组大肠杆菌,诱导表达并进行镍亲和层析纯化蛋白。以蔗糖为底物测量重组酶的基本酶学性质,研究其对糖类底物的转糖苷活性。通过底物通道分析,利用反向 PCR 技术对其第 155 位点进行饱和突变,并测定突变体基本酶学性质和转糖苷活性。【结果】纯化的酶蛋白分子量大小约为 56 kD,活性状态时以三聚体形式存在。在以蔗糖为底物时,最适温度和最适 pH 值分别为 55 °C 和 6.5; K_m 和 V_{max} 值分别为 23.1 ± 2.4 mmol/L 和 407.9 ± 8.5 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$,对第 155 位点进行了定点饱和突变,获得了部分酶学性质或转糖苷活性改善的突变体。【结论】宏基因组中蔗糖磷酸化酶的研究丰富了酶学数据,并通过分子改造获得了部分性质更优的突变体,为转糖苷活性关键氨基酸的研究和该酶的工业应用奠定了基础。

关键词: 蔗糖磷酸化酶, 酶学性质, 分子改造, 转糖苷

Enzymatic properties and modification of sucrose phosphorylase from the metagenome of sucrose-enriched environment

HE He-He^{1,2} YIN Yu¹ QU Xiao-Yi^{1,2} ZHAO Ying-Li¹ LIN Hou-Min¹ WEI Yu-Tuo^{1,2}
HUANG Ri-Bo¹ DU Li-Qin^{*1,2}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China

2 Guangxi Key Laboratory of Bio-refinery, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: [Background] The metagenome of sucrose-enriched soil is one of the important sources of sucrose phosphorylase. The enzyme has important applications in industries, as it can catalyze transglycosylation reaction to improve the properties of the receptors using cheap sucrose. [Objective] The properties and transglycosylation activity of sucrose phosphorylase isolated from the metagenome were studied, providing foundation and research materials for better modification. [Methods] A gene

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21566003); Natural Science Foundation of Guangxi Province (2018GXNSFAA138103)

*Corresponding author: Tel: 86-771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

Received: 23-10-2018; Accepted: 19-02-2019; Published online: 16-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(21566003); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA138103)

*通信作者: Tel: 0771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-23; 接受日期: 2019-02-19; 网络首发日期: 2019-04-16

encoding sucrose phosphorylase from metagenomic library was cloned into the expression vector pSE380, and the recombinant strain was constructed. Then, the target protein was purified by nickel affinity chromatography. The properties were determined using sucrose as substrate, and transglycosylation activities of the carbohydrate receptors were also investigated. After protein modeling and substrate channel were analyzed, the site-saturation mutagenesis at the amino acid 155 was performed by reverse PCR. The enzymatic properties and transglycosylation activity of the mutants also were studied in detail. **[Results]** The molecular weight of purified protein is about 56 kD. And the recombinant protein exists in the form of a trimer in the active state. The optimum temperature and pH value were 55 °C and 6.5, respectively; K_m and V_{max} value were 23.1 ± 2.4 mmol/L and 407.9 ± 8.5 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ using sucrose as substrate. Among the site-directed saturation mutants of the amino acid 155, some mutants showed improved enzymatic properties or transglycosylation activities. **[Conclusion]** The study of sucrose phosphorylase from the metagenomics enriched the enzymatic data. The mutants with better properties were obtained, which provides theoretical foundation for researching on key amino acids related to transglycosylation and the applications of sucrose phosphorylase.

Keywords: Sucrose phosphorylase, Enzymatic properties, Molecular modification, Transglycosylation

蔗糖是一种可再生的能源物质, 存量大且易于获得, 因而被广泛利用。蔗糖磷酸化酶因具有以蔗糖为底物的转糖苷反应而受到关注, 转糖苷反应是将其中的葡萄糖基转移到其它化合物上的一类反应, 能够显著改善受体化合物的理化性质, 对拓宽其使用范围至关重要^[1]。

蔗糖磷酸化酶 (Sucrose phosphorylase, EC 2.4.1.7) 属于糖基水解酶 13 家族^[2]。目前蔗糖磷酸化酶的来源包括肠膜明串珠菌^[3]、青春双歧杆菌^[4]、巨大芽孢杆菌^[5]、长双歧杆菌^[6]、嗜糖假单胞菌^[7]和变异链球菌^[8]等。蔗糖磷酸化酶能以蔗糖 (Sucrose)、葡萄糖-1-磷酸 (α -D-glucose-1-phosphate)、吡喃葡萄糖氟化物 (α -D-glucopyranosyl fluoride) 作为转糖苷反应中葡萄糖基的有效供体, 以无机磷酸、水及含有酚羟基、醇羟基或羧基的物质^[9]作为受体, 可以催化合成木糖醇^[10]、抗坏血酸^[11]、儿茶素^[12]、咖啡酸^[13]和对苯二酚^[14]等物质的衍生物, 从而提高热稳定性、水溶性、光敏感性及降低毒性, 可以使产物在化妆品、食品及医药行业得到更为高效的应用。此外, 蔗糖磷酸化酶也可用于临床分析中检测无机磷酸盐含量^[15], 以及用于酶电极特定检测溶液中的蔗糖浓度^[16-18]。

本课题组从广西武鸣糖厂周围蔗糖富集土壤的宏基因组文库中已经筛选获得了 3 个新的蔗糖水

解酶类^[19-21]。本研究又从该文库中获得了一个蔗糖磷酸化酶基因, 构建了重组大肠杆菌菌株, 纯化了重组酶, 研究了酶学性质及转糖苷活性, 并对编码序列的第 155 位氨基酸进行定点饱和突变, 获得了部分性质改善的突变体。

1 材料与方法

1.1 文库、菌株和载体

实验室构建来自蔗糖富集土壤的宏基因组文库, 大肠杆菌菌株 XL1-Blue、XL10-Gold 及载体 pSE 380 均为本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶、DNA 连接酶、限制性内切酶, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒, BioFlux 公司; Ni-NTA (镍亲和层析填料), Qiagen 公司; 标准蛋白质样品 Ferritin horse (M_r 450 000)、Catalase bovine (M_r 240 000)、Albumin bovine (BSA) (M_r 67 000)、Albumin egg (M_r 45 000)、Myoglobin equine (M_r 17 800), SERVA 公司; 蜜二糖、蔗糖、葡萄糖等其它糖类试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司; 酶标仪, BioTek 公司; 超声波破碎仪, 宁波新芝生物科技公司; 凝胶过滤色谱检测系统

(GPC), Waters 公司。

1.3 蔗糖磷酸化酶基因 *Bspase* 的扩增

从宏基因组文库中筛选并克隆得到一个蔗糖磷酸化酶基因, 进行测序后将其序列进行 BLAST 比对分析。设计 PCR 扩增引物: *Bspase*-1: 5'-CACGAATTCATGCACCACCACCACCACAGAACAAGTTCAGCTGATCACC-3'; *Bspase*-2: 5'-CACAAAGCTTTCAGCTCGCCTGCATGACG-3'。在上游引物 *Bspase*-1 中引入 *EcoR* I 酶切位点(下划线所示), 在目的基因的 N 端加上 6 个组氨酸标签(斜体部分); 在下游引物 *Bspase*-2 中引入 *Hind* III 酶切位点(下划线所示)。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 98 °C 10 s, 49 °C 15 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系(25 μ L): ddH₂O 7.75 μ L, 2 \times PrimeSTAR buffer 12.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, DNA 模板(20 ng/ μ L) 0.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.25 μ L。

将 PCR 产物经纯化和酶切处理后, 连接至 pSE380 表达载体并转化至大肠杆菌 XL1-Blue 中。经过测序验证, 将构建的重组质粒命名为 pSE-*Bspase*。

1.4 重组菌株诱导表达与重组蛋白纯化

将测序正确的重组菌株接种于 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 20 °C、180 r/min 诱导 22 h。收集菌体并使用超声仪破碎菌体(超声时间 15 min、工作时间 5 s、间歇时间 5 s、功率 300 W), 13 000 r/min 离心 30 min 后将含有重组蛋白的上清进行镍亲和层析(Ni-NTA)纯化。对于纯化得到的重组酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(SDS-PAGE)和凝胶过滤色谱分析(GPC)。

GPC 条件: 色谱柱: PROTEIN KW-803; 检测器: Model 2998 photodiode array detector; 检测波长: 280 nm; 流动相: pH 6.5 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(加入 100 mmol/L Na₂SO₄); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C。

1.5 重组蛋白 *Bspase* 的酶学性质研究

酶的标准反应方法: 170 μ L 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液与 20 μ L 10% 蔗糖溶液混匀, 于水浴锅中预热 2 min, 加入 10 μ L 适当稀释的纯酶液精确反应 20 min, 加入 400 μ L 的 DNS 终止反应。沸水浴 5 min, 冷却至室温后取 200 μ L 反应液至 96 孔酶标板中, 读取 OD_{540} 数值。

蔗糖磷酸化酶的活力单位(U)定义为: 在最适的酶反应条件下, 每分钟水解蔗糖释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量。蛋白含量测定以牛血清蛋白为标准品, 参照汪家政等的 Bradford 方法^[22]进行。

1.5.1 *Bspase* 的最适 pH 和最适温度的测定

(1) 最适 pH 的测定: 在 37 °C 条件下, 于 pH 4.0–8.0 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中测定 *Bspase* 的最适 pH, 以相对酶活力最高的 pH 为 *Bspase* 的最适 pH。

(2) 最适温度的测定: 在最适 pH 条件下, 于不同温度(30–70 °C)条件下测定 *Bspase* 的最适温度, 以相对活力最高的温度为 *Bspase* 的最适温度。

1.5.2 *Bspase* 的 pH 稳定性和热稳定性的测定

(1) pH 稳定性的测定: 将重组酶放置于不同 pH (4.0–8.0)条件下的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中, 4 °C 保存 24 h。以 4 °C 保存在洗脱缓冲液中的纯酶为对照, 在 pH 6.5 和 55 °C 条件下测定 *Bspase* 的残余活力, 计算不同 pH 保存下 *Bspase* 的相对酶活力, 绘制出 *Bspase* 的 pH 稳定性图。

(2) 热稳定性的测定: 将纯酶分别在 30–70 °C 恒温水浴锅中保存 1 h。以 4 °C 储存的纯酶为对照, 在 pH 6.5 和 55 °C 条件下测定 *Bspase* 的残余活力, 计算不同温度保存下 *Bspase* 的相对酶活力, 绘制出 *Bspase* 的热稳定性图。

1.5.3 *Bspase* 的 K_m 和 V_{max} 值的测定

将蔗糖溶于 pH 为 6.5 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中配制成不同浓度的蔗糖溶液(3–585 mmol/L), 在 pH 6.5 和 55 °C 条件下测定重组酶对不同浓度蔗糖的水解活力, 用典型的

米氏方程求出 Bspase 的 K_m 和 V_{max} 值。

1.5.4 金属离子对 Bspase 酶活力的影响

将重组酶与终浓度为 5 mmol/L 的金属离子 Na^+ 、 Ag^+ 、 K^+ 、 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^+ 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 在 pH 6.5 和 55 °C 条件下进行反应。以不添加金属离子为对照, 测定金属离子对酶活力的影响。

1.5.5 有机溶剂对 Bspase 酶活力的影响

在 55 °C 和 pH 6.5 条件下, 分别测 5%、10%、15%、20%、25%、30% 的二甲基亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、乙醇、异丙醇和正丁醇对酶活力的影响。以不添加有机溶剂的反应作为对照, 计算不同有机溶剂及不同浓度对酶活力的影响。

1.6 重组蛋白 Bspase 转糖苷活性的检测

分别以 4%蔗糖和 15%葡萄糖-1-磷酸为糖苷供体, 将纯化的蔗糖磷酸化酶和终浓度分别为 5%的 D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-甘露糖醇、L-鼠李糖、D-山梨糖醇、L-山梨糖、D-木糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、蜜二糖、纤维二糖、异麦芽糖、棉子糖、木糖醇共 200 μ L, 在 pH 6.5 的缓冲液中 45 °C 反应 12 h。将反应物在沸水中煮沸 10 min 终止反应, 室温冷却, 对其反应产物进行 HPLC 分析。

糖醇类物质的转糖苷产物 HPLC 检测条件: 仪器为安捷伦 1100 色谱仪; 检测器: 示差折光检测器; 色谱柱: AlltimaAminoZ 氨基柱(4.6 μ m \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈:水(75:25, 体积比); 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 °C。

转化率的计算: 实验组受体底物的减少量与对照组受体底物量的比值。

1.7 蔗糖磷酸化酶 Bspase 的分子改造

以来自 *Bifidobacterium adolescentis* 的蔗糖磷酸化酶(PDB 代码为 1R7A, 蛋白序列一致性为 85.69%)为模板, 使用 SWISS-MODEL 软件对蔗糖磷酸化酶 Bspase 进行同源建模; 并用 Caver 软件对建模结果的底物通道进行分析, 找到了可能与转糖

苷活性相关的第 155 位氨基酸残基, 运用反向 PCR 技术进行定点的饱和突变改造(下划线为所选突变点)。引物设计为 T155-1: 5'-TGGGTCNNNTTCACG CCGCAGCAGGTC-3'; T155-2: 5'-CGTGANNNG ACCCACACCAAGCGGGT-3'。以重组质粒 pSE-Bspase 为模板, PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 57 °C 15 s, 72 °C 5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系(25 μ L): ddH₂O 15.25 μ L, 5 \times PrimeSTAR buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, DNA 模板(40 ng/ μ L) 0.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.25 μ L。PCR 产物中加入 *Dpn* I 酶消解质粒模板, 胶回收后转入大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* XL10- Gold 中, 经过测序获得正确突变体。

突变体的诱导与纯化同重组菌株(1.4), 酶学性质测量同以 15%的葡萄糖-1-磷酸为糖苷供体的转糖苷活性检测(1.5.1-1.5.3 与 1.6)。

2 结果与分析

2.1 蔗糖磷酸化酶基因 Bspase 的扩增与重组酶的表达纯化

从宏基因组文库中筛选克隆了蔗糖磷酸化酶基因 Bspase, 并进行 BLAST 比对分析。发现与来自 *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis AD011 的蔗糖磷酸化酶基因具有 100%的序列一致性。于是以亚克隆子 pUC-SP 为模板, 以 Bspase-1、Bspase-2 为引物成功扩增了蔗糖磷酸化酶完整的开放阅读框(Open reading frame, ORF)。将构建成功的重组质粒 pSE-Bspase 转入到 *E. coli* XL1-Blue 中进行诱导表达, 并用镍亲和层析 Ni-NTA 进行蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 分析。结果表明重组蛋白在约 56 kD 有明显的蛋白质特征条带出现(图 1A), 与理论分子量一致。

对重组蛋白进行的 GPC 分析如图 1B 所示, Bspase 的保留时间为 11.183 min。根据标准蛋白线性回归方程计算出 Bspase 的分子量为 155 kD, 结合酶蛋白单体分子量, 推测在活性状态下 Bspase 是以三聚体形式存在。

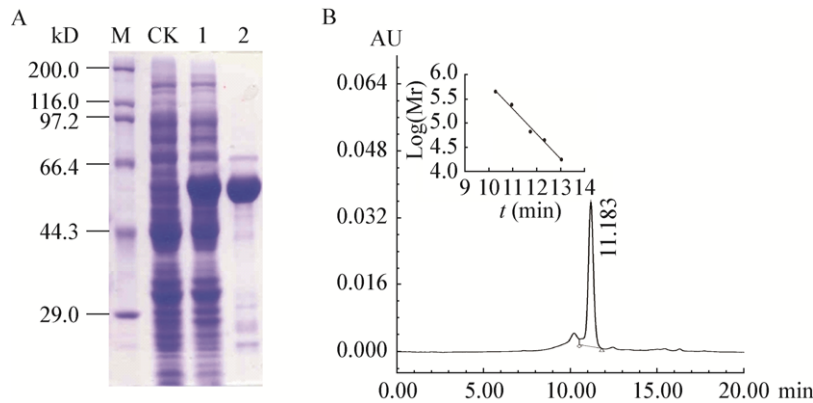


图1 重组蛋白 Bspase 的 SDS-PAGE (A)和 GPC 分析(B)

Figure 1 SDS-PAGE (A) and GPC analysis (B) of recombinant protein Bspase

注: M: 标准蛋白 Marker; CK: 导入 pSE380 的诱导菌体; 1: 导入 pSE-Bspase 的诱导菌体; 2: 纯化酶 Bspase.

Note: M: Standard protein marker; CK: Protein of *E. coli* XL1-Blue/pSE380 with induction; 1: Protein of *E. coli* XL1-Blue/pSE-Bspase with induction; 2: Purified protein Bspase.

2.2 重组酶的酶学性质研究

2.2.1 pH 和温度对于重组酶的影响

蔗糖磷酸化酶 Bspase 的最适 pH 值为 6.5, 在 pH 5.0–7.5 能保持 50% 以上的酶活力。在 pH 4.0–8.0 酶活力比较稳定, 能保持 90% 以上的活力(图 2A)。Bspase 最适温度为 55 °C, 在 35–65 °C 能保持

50% 以上的酶活力。在 30–65 °C 稳定性较高, 能保持 60% 以上的酶活力, 70 °C 时酶的稳定性迅速下降(图 2B)。

2.2.2 重组酶 K_m 、 V_{max} 的测定

利用软件 GraphPad Prism 5 通过双倒数作图法拟合出 Bspase 的 K_m 和 V_{max} 值, Bspase 的 K_m 为 23.1 ± 2.4 mmol/L, V_{max} 值为 407.9 ± 8.5 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ (图 3)。

2.2.3 金属离子对 Bspase 酶活力的影响

如图 4 所示, 重金属离子 Ag^+ 、 Hg^{2+} 使酶失活, Cu^{2+} 能明显抑制重组酶的酶活力, 而 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 对重组酶有不同程度的激活作用, 其中 Mn^{2+} 最为明显, 提高了约一半的酶活力; Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 对酶活力不造成明显影响。

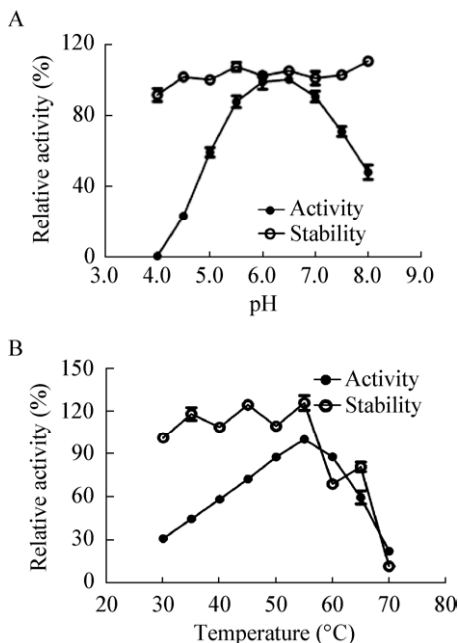


图2 pH (A)和温度(B)对重组酶活力的影响

Figure 2 Effect of pH (A) and temperature (B) on recombinant enzyme activity

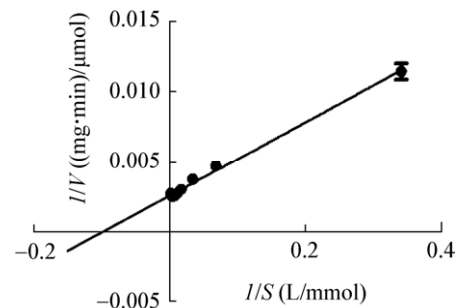


图3 Bspase 的 K_m 和 V_{max} 值

Figure 3 K_m and V_{max} values of Bspase

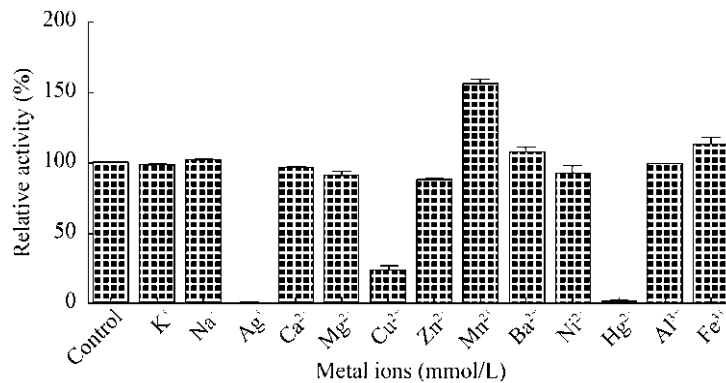


图4 金属离子对蔗糖磷酸化酶 Bspase 酶活力的影响

Figure 4 Effect of metal ions on the recombinant Bspase enzyme activity

2.2.4 有机溶剂对 Bspase 酶活力的影响

如图5所示,重组酶活力随有机溶剂浓度升高总体呈下降趋势。但较低浓度的DMSO能轻微激活酶活,而10%及更高浓度则导致了酶不同程度的失活现象。相比于DMSO,其他有机溶剂的抑制效应更为明显,10%的DMF、甲醇、乙醇、异丙醇即明显抑制酶活力,使得酶活力降至60%以下。正丁醇是此酶的强变性剂,10%的浓度已经使酶完全失去活力。

2.3 Bspase 转糖苷活性的测定

当以终浓度5%糖醇类为糖基受体,以终浓度4%蔗糖为供体底物时,Bspase对D-阿拉伯糖、D-葡萄糖、L-山梨糖具有转糖苷反应。以终浓度15%葡萄糖-1-磷酸为供体底物时,Bspase对D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖醇、L-鼠李糖、D-山梨糖醇、L-山梨糖、D-

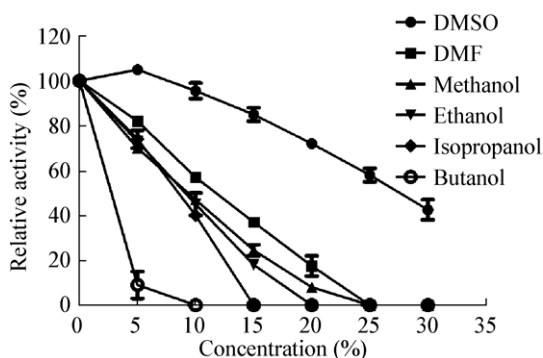


图5 有机试剂对 Bspase 酶活力的影响

Figure 5 Effect of organic agents on the Bspase enzyme activity

木糖、木糖醇均具有转糖苷活性反应,并且对L-山梨糖和D-木糖有两个转糖苷产物生成。Bspase对各底物的转化率见表1。

以终浓度15%葡萄糖-1-磷酸为供体底物时,具有转糖苷活性的底物范围稍多于以4%蔗糖为供体底物,其中以对L-阿拉伯糖活性最为显著,具有73.7%的转化率。

表1 Bspase 转糖苷反应的转化率分析

Table 1 Analysis conversion rate of transglycosylation of Bspase (%)

受体 Receptor	供体 Donor	
	Sucrose	α -Glc-1-P
D-Arabinose	17.0	8.3
L-Arabinose	—	73.7
D-Fructose	—	2.9
D-Galactose	—	11.0
D-Glucose	4.2	1.7
D-Mannose	—	—
D-Mannitol	—	10.0
L-Rhamnose	—	1.3
D-Glucitol	—	13.5
L-Sorbose	14.7	4.6
D-Xylose	—	21.7
D-Xylitol	—	24.2
D(+)-Cellobiose	—	—
Isomaltose	—	—
Lactose	—	—
Maltose	—	—
Melibiose	—	—
Raffinose	—	—
Trehalose	—	—
Turanose	—	—

注: —: 无转糖苷活性。

Note: —: No transglycosylation activity.

2.4 蔗糖磷酸化酶 Bspase 的分子改造

以 *Bifidobacterium adolescentis* 中蔗糖磷酸化酶的 3D 结构(2GDV)为模板建立了 Bspase 的蛋白质三维模型, 并使用 Caver 软件对建模结果的底物通道进行分析(图 6A、6B), 逐一分析通道周围的氨基酸残基, 发现其中 155 位点的苏氨酸与通道距离较近(图 6C 中上方的桔色球)。可以认为这个氨基酸位点对底物通道可能具有较为明显的阻碍效应, 于是对该位点进行饱和突变改造, 期望能把底物通道的阻碍效应去除, 获得酶学性质改善或对糖醇类底物

转糖苷活性有提高的突变体。

2.4.1 突变体的酶学性质测定

对于得到的全部突变体按照方法 1.5 中酶的标准反应方法进行初步筛选, 根据体系 OD_{540} 的读数, 剔除没有酶活或者酶活力很低的突变体。经过初步检测, 剔除了突变体 T155K、T155N、T155L、T155P 和 T155W, 将其它 14 个酶活力较高的突变体进行后续实验。

对于酶活力基本参数的测定结果如图 7 所示, 图中红与黑色横线为野生酶的相关参数, 以

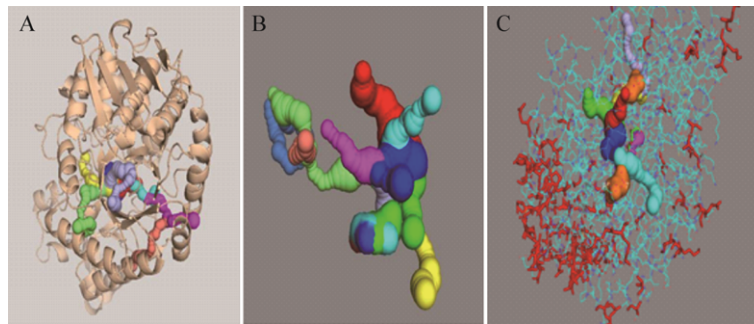


图 6 Bspase 的底物通道(A、B)与周围氨基酸(C)分析

Figure 6 Analysis of substrate channel (A, B) and amino acids around (C) for Bspase

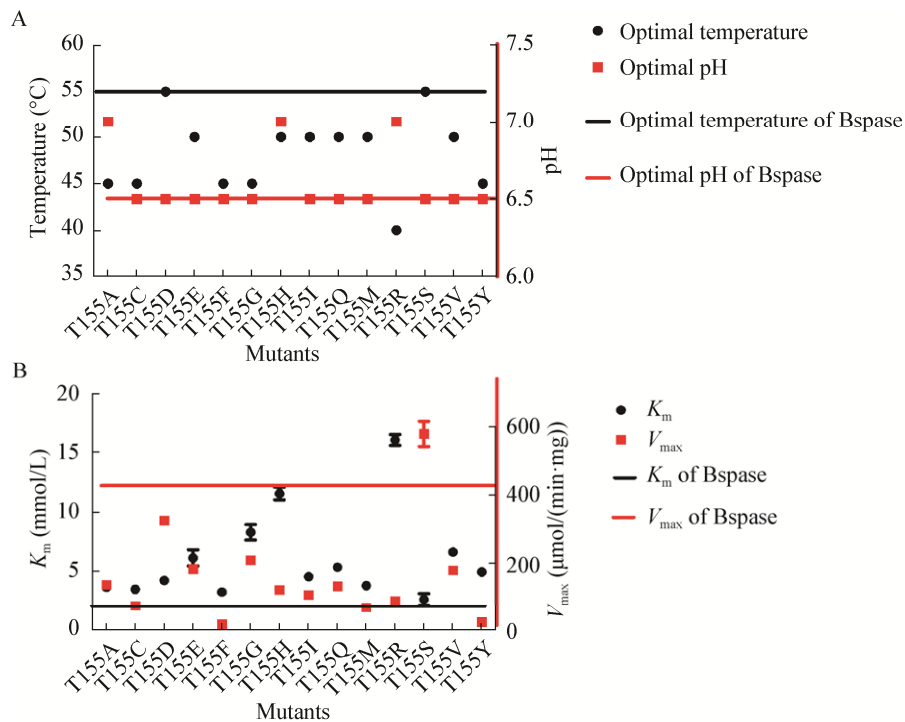


图 7 突变体的最适温度和最适 pH (A)及 K_m 、 V_{max} 值(B)

Figure 7 The optimal temperature, optimum pH (A) and K_m , V_{max} value (B) of mutants

示参照。在突变酶中,仅 T155D 和 T155S 的最适温度与野生酶 Bspase 相同,其余突变酶的最适反应温度相比野生酶都有不同程度的降低。大多数突变酶的最适 pH 与野生酶保持相同。对于酶动力学参数的变化表现为:突变酶的 K_m 除 T155S 变化较小外,其余突变体较野生酶相比均发生了较为明显的变化。突变酶 V_{max} 值相比于野生酶 Bspase 也都有了很大程度的改变,其中 T155S 突变体获得约 0.42 倍的提高,其他突变体则都有不同程度的降低。

2.4.2 突变体的转糖苷活性检测

以终浓度 15% 的葡萄糖-1-磷酸为葡萄糖基供体,5% 的各种糖醇类为受体进行转糖苷反应,HPLC 检测其反应产物,结果如表 2 所示。大部分突变体仍保持着与野生酶基本一致的活性底物范围,其中

T155D 和 T155S 突变体保留着完全相同的转糖苷性质。

同等条件下,以产物峰面积大小作为判断酶转糖苷活性强弱标准。突变体 T155A、T155E、T155F、T155G、T155H、T155I 和 T155V 对 D-果糖的转糖苷活性有所上升,其中 T155F 突变体提高到原有的 1.3 倍;T155V 对 L-阿拉伯糖的转糖苷活性有所上升;T155A、T155F、T155G 和 T155M 在以 L-山梨糖为受体底物时,生成的第一个转糖苷产物的量都有微弱的提高。

突变体 T155A、T155D、T155G、T155H、T155I、T155M 和 T155Q 对 L-阿拉伯糖的转糖苷活性基本不变;T155C、T155D、T155M、T155Q 及 T155R 对 D-果糖的转糖苷活性基本不变;T155V 对 D-木糖的转糖苷活性基本不变。除此之外,突变体对各

表 2 Bspase 及其突变体转糖苷产物的 HPLC 分析

Table 2 The HPLC analysis of transglycosylation products of Bspase and its mutants

Item	Bspase	T155A	T155C	T155D	T155E	T155F	T155G	T155H	T155I	T155M	T155Q	T155R	T155S	T155V	T155Y
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Mannitol	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Rhamnose	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Sorbose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
D-Glucitol	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isomaltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +: 一个转糖苷产物; ++: 两个转糖苷产物; -: 无转糖苷活性。

Note: +: One transglycoside product; ++: Two transglycoside products; -: No transglycosylation activity.

个受体底物的转糖苷活性都有不同程度的下降,也有部分突变体对一些受体底物失去了原本所具有的转糖苷活性。

3 讨论与结论

酶分子底物通道的研究对于底物特异性、酶活力及产物类型等都具有重要的影响意义,很多研究人员通过对底物通道的研究取得了显著的成果^[23-25]。本文对蔗糖磷酸化酶 Bspase 底物通道附近的第 155 位的苏氨酸进行饱和突变,获得了部分性能改善的突变体,其中 T155S 突变体最大反应速度得到了提高。通过分析发现,苏氨酸(Thr)和丝氨酸(Ser)是仅有的两个 R 基含有羟基的氨基酸,二者结构相近,但丝氨酸较前者在主链上缺少一个甲基,这一定程度上减少了空间位阻。此外,苏氨酸(Thr)中的羟基是仲醇,形成氢键的能力较弱,而丝氨酸(Ser)中的羟基是伯醇,更易于与其他基团形成更稳定的氢键以稳定酶分子的空间构象,这也许是其反应速度得到提高的潜在原因。

研究转糖苷活性时发现,蔗糖磷酸化酶在突变前后对于二糖和三糖都没有表现出转糖苷活性,一定程度上表明了二糖和三糖并不适宜作为该酶的受体,Kitao 等报道的来自肠膜明串珠菌的蔗糖磷酸化酶也发现了类似性质^[10],这可能是由于二糖和三糖相对骨架较大,其反应基团较难嵌入活性口袋靠近催化残基所致。值得注意的是,当 Kitao 以 20% 的葡萄糖-1-磷酸为供体,以 20% 的 D-阿拉伯糖(单糖)为受体进行作用时,同样不具有转糖苷活性。但在本研究中同种供体条件下, Bspase 对 D-阿拉伯糖具有转糖苷活性,并且其突变体依然保持此活性,这一特性使得该蔗糖磷酸化酶具备一定的应用潜力。

总结以往的改造经验,仅通过单点的突变期望获得对于大多数底物都有转糖苷效果改善的突变体往往是不理想的。因为不同的底物往往具备不同的空间构象,根据酶的诱导契合效应原理,底物与酶发生作用时会发生一定程度的形变,这种形变掺

杂在酶分子自身的形变中就会变得异常的错综复杂,难免产生由于键位、键长、极性和折叠等因素不适而造成底物活力减少甚至失去活力的现象。因此,要想提高对于特定底物的转化效率,经过对底物的针对性分析后打造一个特定的分子改造方法不失为一个好的策略,而且在作用底物过程中借助响应面方法来评判酶反应环境的 pH、温度、供受体浓度等因素的相互影响,使它们之间互相协调和平衡以达到一个更优的作用效果也显得至关重要。

REFERENCES

- [1] Aerts D, Verhaeghe TF, Roman BI, et al. Transglucosylation potential of six sucrose phosphorylases toward different classes of acceptors[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(13): 1860-1867
- [2] Sprogø D, van Den Broek LAM, Mirza O, et al. Crystal structure of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*[J]. Biochemistry, 2004, 43(5): 1156-1162
- [3] Kagan BO, Latker SN, Zfasman EM. Phosphorolysis of saccharose by cultures of *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Biokhimiya, 1942, 7: 93-108
- [4] van Den Broek LAM, van Boxel EL, Kievit RP, et al. Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(2): 219-227
- [5] Li QL, Zhang XY, Yao PJ, et al. Separation and identification of sucrose phosphorylase in *Bacillus megaterium* NCIB 8508[J]. Chemistry & Bioengineering, 2010, 27(12): 61-64 (in Chinese)
李群良, 张欣英, 姚评佳, 等. 巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* NCIB 8508 蔗糖磷酸化酶的分离鉴定[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(12): 61-64
- [6] Kullin B, Abratt VR, Reid SJ. A functional analysis of the *Bifidobacterium longum* *cscA* and *scrP* genes in sucrose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 975-981
- [7] Silverstein R, Voet J, Reed D, et al. Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1967, 242(6): 1338-1346
- [8] Russell RR, Mukasa H, Shimamura A, et al. *Streptococcus mutans* *gtfA* gene specifies sucrose phosphorylase[J]. Infection and Immunity, 1988, 56(10): 2763-2765
- [9] Hou GW, Ma JF, Sui SS, et al. Research progress on production and application of sucrose phosphorylase[J]. China Brewing, 2010(6): 17-20 (in Chinese)
侯顾伟, 马江锋, 隋姗姗, 等. 蔗糖磷酸化酶制备及应用的研究进展[J]. 中国酿造, 2010(6): 17-20

- [10] Kitao S, Sekine H. Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(12): 2011-2014
- [11] Gudimich R, Nidetzky B. Walking a fine line with sucrose phosphorylase: efficient single-step biocatalytic production of L-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18(14): 1387-1390
- [12] Kitao S, Ariga T, Matsudo T, et al. The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(12): 2010-2015
- [13] Nam SH, Kim YM, Walsh MK, et al. Synthesis and functional characterization of caffeic acid glucoside using *Leuconostoc mesenteroides* dextranase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(13): 2743-2750
- [14] Yu SH, Wang YC, Tian YQ, et al. Highly efficient biosynthesis of α -arbutin from hydroquinone by an amylosucrase from *Cellulomonas carboniz*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 68: 93-99
- [15] Tedokon M, Suzuki K, Kayamori Y, et al. Enzymatic assay of inorganic phosphate with use of sucrose phosphorylase and phosphoglucomutase[J]. *Clinical Chemistry*, 1992, 38(4): 512-515
- [16] Birnberg PR, Brenner ML. A one-step enzymatic assay for sucrose with sucrose phosphorylase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 142(2): 556-561
- [17] Kogure M, Mori H, Ariki H, et al. Determination of sucrose using sucrose phosphorylase in a flow-injection system[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 337(1): 107-111
- [18] Maestre E, Katakis I, Domínguez E. Amperometric flow-injection determination of sucrose with a mediated tri-enzyme electrode based on sucrose phosphorylase and electrocatalytic oxidation of NADH[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16(1/2): 61-68
- [19] Du LQ, Pang H, Hu YY, et al. Expression and characterization in *E. coli* of a neutral invertase from a metagenomic library[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(3): 419-428
- [20] Du LQ, Yang H, Huo YL, et al. A novel sucrose phosphorylase from the metagenomes of sucrose-rich environment: isolation and characterization[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(9): 2871-2878
- [21] Du LQ, Pang H, Wang ZL, et al. Characterization of an invertase with pH tolerance and truncation of its N-terminal to shift optimum activity toward neutral pH[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62306
- [22] Wang JZ, Fan M. *Protein Methods*[M]. Beijing: Science Press, 2000: 42 (in Chinese)
汪家政, 范明. *蛋白质技术手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 42
- [23] Hsu JS, Yang YB, Deng CH, et al. Family shuffling of expandase genes to enhance substrate specificity for penicillin G[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 6257-6263
- [24] Zhang JH, Dawes G, Stemmer WPC. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(9): 4504-4509
- [25] Kim YW, Choi JH, Kim JW, et al. Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4866-4874