



研究报告

基于分子动力学模拟的高 γ -环糊精专一性环糊精糖基转移酶理性改造范婷文^{1,2,4} 范耿文³ 侯艾琦¹ 陈倩媚² 钞亚鹏^{*2} 孙艳^{1,4}

1 北京航空航天大学生物与医学工程学院 生物力学与力生物学教育部重点实验室 北京 100191

2 中国科学院微生物研究所 传感技术联合国家重点实验室 北京 100101

3 华北电力大学控制与计算机工程学院 北京 102206

4 北京航空航天大学生物医学工程高精尖创新中心 北京 102402

摘要:【背景】环糊精糖基转移酶的分子动力学模拟较传统基因改造而言能有效提高改造效率,减少盲目性。【目的】探究环糊精糖基转移酶的催化专一性机理,为获得产 γ -环糊精专一性更高的环糊精糖基转移酶提供高效突变菌株方法。【方法】通过分子对接和分子动力学模拟,获得3种产物类型CGTase与底物的对接模拟结构,并通过定点突变实验进行验证。【结果】分子动力学模拟结果显示 α -和 β -CGTase与十糖链在酶蛋白S1区域呈现闭合的形态,而 γ -CGTase和十糖链在S1区域呈现更易于生成 γ -环糊精的张开形态;3种CGTase与十糖链在相同位置存在氢键的氨基酸共有17个相对应位点,其中14个位点的氨基酸种类一致,不一致的3个氨基酸对应 α -CGTase位点分别为Y89、D234和Y262。本研究对Y262位点进行定点突变和产物专一性实验,结果显示经过分子动力学预测的Y262L有助于提高产 γ -CD专一性,从野生酶的13.7%提高到39.9%, γ -环糊精产物比例提高了3倍。【结论】分子动力学模拟结果对于指导环糊精糖基转移酶的专一性内在机理具有一定的正向指导意义。

关键词: 环糊精, 环糊精糖基转移酶, 分子动力学模拟, 产物专一性, 催化机理

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31671792, 31171643)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-64807428; E-mail: chaoy@sun.im.ac.cn

Received: 01-02-2020; **Accepted:** 06-04-2020; **Published online:** 09-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31671792, 31171643)

***通信作者:** Tel: 010-64807428; E-mail: chaoy@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2020-02-01; **接受日期:** 2020-04-06; **网络首发日期:** 2020-05-09

Rational engineering of high γ -cyclodextrin specific cyclodextrin glycosyltransferase based on molecular dynamics simulation

FAN Ting-Wen^{1,2,4} FAN Geng-Wen³ HOU Ai-Qi¹ CHEN Qian-Mei² CHAO Ya-Peng^{*2}
SUN Yan^{1,4}

1 Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

2 State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 School of Control and Computer Engineering, North China Electric Power University, Beijing 102206, China

4 Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 102402, China

Abstract: [Background] Compared with traditional genetic modification, molecular dynamics simulation of cyclodextrin glycosyltransferase can effectively improve the transformation efficiency and reduce blindness. **[Objective]** To explore the catalytic specificity mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase, and to provide an efficient mutation method for obtaining cyclodextrin glycosyltransferase with higher specificity for producing γ -cyclodextrin. **[Methods]** Through molecular docking and molecular dynamics simulation, the docking simulation structures of three product types of CGTase and substrate were obtained, and verified by site-specific saturation mutation experiment. **[Results]** The results of molecular dynamics simulation showed that α - and β -CGTase and decarbose chains appeared closed in S1 region, while γ -CGTase and decarbose chains appeared more open in S1 region. There are seventeen corresponding sites in the three CGTase and ten sugar chain amino acids with hydrogen bonds at the same position, of which the amino acid types at fourteen sites are consistent. The corresponding α -CGTase sites of the three inconsistent amino acids were Y89, D234 and Y262, respectively. This study conducted site-directed mutagenesis and product specificity experiments on the Y262 locus. Y262L predicted by molecular dynamics was helpful to increase the specificity of γ -CD production, from 13.7% of the wild enzyme to 39.9%, and the percentage of γ -cyclodextrin products increased by three times. **[Conclusion]** The results of molecular dynamics simulation have positive significance for guiding the specificity mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase.

Keywords: Cyclodextrin, Cyclodextrin glucosyltransferase, Molecular dynamics simulation, Product specificity, Catalytic mechanism

环糊精(cyclodextrin)是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, EC 2.4.1.19)作用下生成的一系列环状低聚糖的总称,在医药业、食品、电化学分析、农业等行业具有广泛的应用^[1-3],主要由 CGTase 催化产生,但常得到是由 α -、 β -和 γ -CD 三种环糊精组成的混合物,如何提高 CGTase 产物专一性是生产中亟待解决的课题。研究者们大多使用的突变方法是易错 PCR 方法^[4-5],以及通过总结文献找出的特定位点进行尝试性的定点突变以及饱和突变^[6]。研究证明使用点突变的方法虽然能达到一定的效果^[7],但效率仍不高。

分子动力学主要优势就是把大量的实验数据统一进行归纳分析,找出其中关键的有规律特征,深化了对物质的性质-结构关系以及化学物理变化动态演化过程的认识^[8-11]。如今,在化学、物理学、生命科学等多个领域的科学家都在研究通过模拟计算指导实验,以减少实验的盲目性,节约成本和时间^[12-13]。CGTase 是一类以淀粉为底物偶联水解和环化过程的复杂催化反应,应用已有技术模拟其催化过程有一定的难度。有研究学者使用分子动力学研究了环糊精糖基转移酶的热稳定性^[14-15],但是对于用分子动力学探究 CGTase 催化专一性机理的研究不多。本实验利用分子动力学模拟实验,通过

模拟比较 3 种代表类型的环糊精糖基转移酶与底物的对接方式,预测 CGTase 口袋附近的重要位点,并指导定点突变对酶蛋白进行改造。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *Bacillus* sp. 602-1、重组质粒 pET-22b(+)-cgt、携带该质粒的 *Escherichia coli* BL21 和 *E. coli* DH5 α 均由本实验室构建并保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

快速定点突变试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;引物、质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒,北京擎科生物科技有限公司;限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶,北京全式金生物技术公司; α -CD、 β -CD、 γ -CD 标准品,美伦生物技术公司。高效液相色谱仪, Waters 公司;PCR 仪, Biometra 公司;恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司。LB 培养基、TB 培养基,北京酷来搏科技有限公司。

1.2 环糊精糖基转移酶与底物的分子对接与动力学模拟

将蛋白质与小分子糖链利用 AutDock 软件进行柔性对接,得到最初的对接位相结构。在对接中,将产生至少 30 个对接结果,挑选能量最好的位相进行提取,用于后续的分子动力学分析。用 AMBER 14 软件做分子动力学模拟实验,整个蛋白体系都采用 gaff 和 ff14SB 力场,以蛋白为中心,加 10 Å 的立方水盒子,加 Na⁺使体系呈电中性,保存拓扑和坐标文件,然后进行模拟^[16]。通过限制蛋白体系使整个体系水分子能量最小化。采用郎

之万控温和各向同性的 Berendsen 控压方法分别达到平衡体系升温过程和升压平衡过程。最后采用无限自由模拟阶段进行动力学模拟,控压控温方法与前一步一致,范德华能和短程静电能的截断距离为 10 Å,采用 Particle mesh ewald (PME)方法计算长程静电能。

1.3 基于模拟结果的定点突变

使用快速定点突变试剂盒进行实验,设计的引物信息见表 1。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times Fast Alteration Buffer 10 μ L, Fast Alteration DNA Polymerase (1 U/ μ L) 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L) 各 2 μ L, Template DNA 1 μ L, 超纯水补足至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 5 min。进行定点突变实验之后将 PCR 反应产物加入 1 μ L 的 *Dpn* I, 37 $^{\circ}$ C 进行消化实验 1.5 h。加入 350 mL 的 LB 培养基于 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 1 h, 使菌体复苏, 然后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。待菌落长出后, 进行突变克隆筛选。

1.4 突变体酶的诱导表达

从平板上挑取单菌落接入 5 mL LB 培养基中(含 100 μ L/mL 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 12 h。将培养好的种子培养基按照 1% (体积比)接种量接入 50 mL TB 培养基(含 100 μ L/mL 氨苄青霉素)中进行发酵培养, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.6–0.8 时在冰上冷却 10 min, 添加 IPTG 至终浓度为 0.01 mmol/L, 转至 16 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养, 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, 继续诱导培养 72 h。

表 1 突变体 Y262L 引物设计

Table 1 Primers of Y262L mutant

Primer	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)	(G+C)mol%	<i>T</i> _m	Gene <i>T</i> _m
Y262L-Forward	GGAATGGCTCCTTGGCGCGGATCAAACC	28	61	73.3	62.0
Y262L-Reverse	CCAAGGAGCCATTCCCCGAACGTAAATACCG	31	55	71.7	63.6

注: 带下划线的序列表示突变氨基酸的编码序列。

Note: Underlined sequences denote the coding sequence of the mutated amino acid.

1.5 突变体酶的酶活测定

将试管放入 40 °C 水浴锅中进行预热, 每支试管加入 0.4 mL 的 0.25% (质量体积比) 淀粉溶液在 40 °C 水浴锅中静置 10 min; 在对照组中加入 1.5 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液; 实验组和对照组均加入 0.1 mL 已经稀释的酶液, 40 °C 静置 10 min; 取出试管向实验组中加入 1.5 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液以终止反应。实验组和对照组同时加入 3 mL 1 mmol/L 的 I_2 -KI 以及 5 mL 蒸馏水, 摇匀。样品在 700 nm 波长的分光光度计下测定吸光度值, 对照蒸馏水调零, 计算酶活性。酶活性=[(对照组-实验组)/对照组] \times 100 \times 稀释倍数。

1.6 突变体酶的产物专一性测定

配制质量分数为 1% 的可溶性淀粉, 加入 400 U/g 突变酶, 在 40 °C 水浴锅中转化 24 h 后, 将样品煮沸 10 min 后终止反应, 在 12 000 r/min 下离心 10 min。将上清液收集并用 0.22 μ m 的滤膜过滤, 用高效液相色谱检测: 色谱柱: Supersil NH2 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μ m); 流动相: 乙腈/水 (65/35, 体积比); 柱温: 40 °C; 样品室温度: 4 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μ L; 分析时间: 20 min。

2 结果与分析

2.1 分子动力学模拟

实验选取产 α -、 β -和 γ -环糊精专一性最高的环糊精糖基转移酶结构作为代表。3 种结构分别经过以下处理: α -环糊精的 PDB 号为 3WMS, 菌种为 *Paenibacillus macerans*, 用 Pymol 进行突变将 Y167 点的加入 3 个组氨酸; β -环糊精的 PDB 号为 1DTU, 菌种为 *Bacillus circulans*, 用 Pymol 进行突变将 P146 变为 S146、将位点 Y89 位点变为 F89; γ -环糊精的 PDB 号为 4JCM, 菌种为 *Bacillus clarkii*。

将处理完成的环糊精转移酶与十糖链进行分子对接以及分子动力学模拟, 图 1 显示了 3 种复杂度的均方根偏差(root mean square deviation,

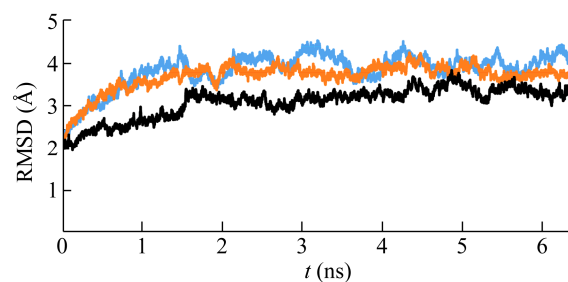


图 1 分子动力学模拟轨迹在 6 ns 内的 RMSD 值

Figure 1 The RMSD values obtained during 6 ns of molecular dynamic simulation for complex

注: 蓝色: α -CGTase; 红色: β -CGTase; 黑色: γ -CGTase.

Note: Blue: α -CGTase; Red: β -CGTase; Black: γ -CGTase.

RMSD)值随时间的变化是通过分子动力模拟获得的。在经过 2 ns 的模拟时间后, 这 3 种配合物的结构是稳定的, 达到平衡后, 每种配合物的平均 RMSD 波动值分别为 3.0、3.5 和 3.5 Å。基于最终的 6 ns MDs 轨迹, 从复杂的最终平均结构的最后 1 ns 轨迹中提取每个复杂结构的 1 000 张快照。最后选取模拟结果如图 2 所示, 其中图 2A 和图 2B 的环糊精糖基转移酶和十糖链在 S1 区域呈现 Closed 的形态, 图 2C 的环糊精糖基转移酶和十糖链在 S1 区域呈现更易于生成 γ -环糊精的 Open 形态。模拟得出 α -CGTase、 β -CGTase 和 γ -CGTase 与糖链对接体系的吉布斯自由能分别为 -14.26、-12.13 和 -15.36 kcal/mol, 表明 γ -CGTase-糖链体系的结合能最高。

经过分析 α -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用, 由于环糊精糖基转移酶的氨基酸与糖链间的氢键结构复杂, 将十糖链分成 3 部分进行分析, 以便分析清楚每一个氨基酸的氢键作用, 即 S10-S8 区域、S7-S4 区域和 S3-S1, 如图 3 所示。通过分析得出, 产 α -CD 最多的环糊精糖基转移酶与十糖链间重要作用力的氨基酸分别是 R146、D147、H168、D145、N195、G182、Y89、W101、D374、H140、Y197、H235、K234、W261、Q267、Y262、E260、D331、H330、D374 和 R378 等。

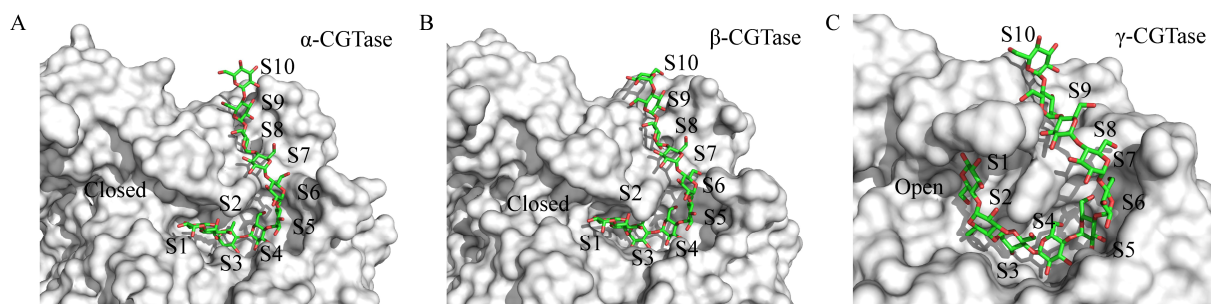


图2 三种环糊精糖基转移酶与十糖链的分子对接和分子动力学模拟结构的概览

Figure 2 Molecular docking and molecular dynamics simulation of three cyclodextrin glycosyltransferases with decasaccharide chains

Note: A: α -CGTase; B: β -CGTase; C: γ -CGTase.

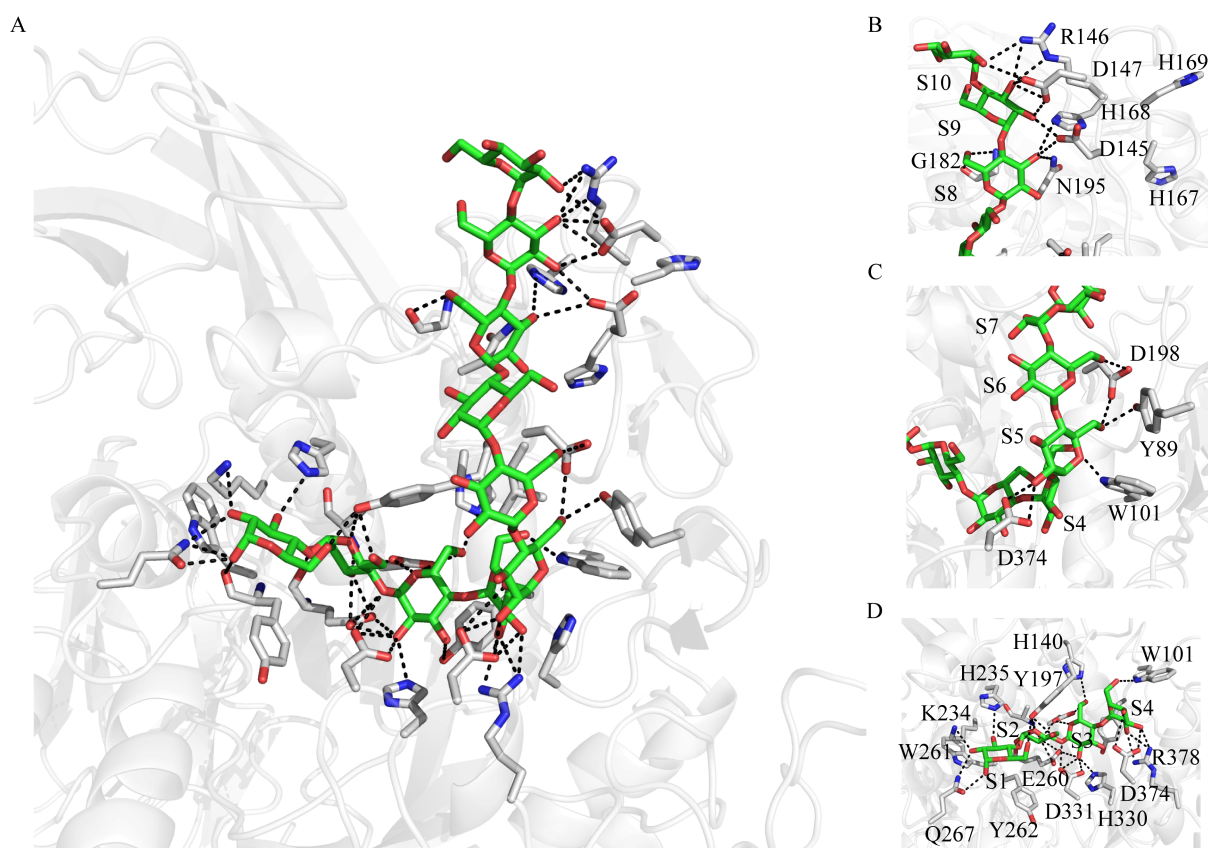


图3 α -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用三维立体图

Figure 3 Three dimensional diagram of interaction between α -CGTase and decasaccharide chain

注: A: 十糖链和 α -CGTase 氨基酸之间的氢键图; B: 糖链中的 S10-S8 与 α -CGTase 氨基酸之间的氢键放大图; C: S7-S4; D: S3-S1.

Note: A: Hydrogen bond diagram between decasaccharide chain and α -CGTase amino acids; B: Enlarged diagram of hydrogen bond between S10-S8 and α -CGTase amino acids in sugar chain; C: S7-S4; D: S3-S1.

经过分析 β -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用, 由于环糊精糖基转移酶的氨基酸与糖链间的氢键结构复杂, 将十糖链分成两部分进行分析, 以便于分析清楚每一个氨基酸的氢键作用, 即 S10-S7 区域和 S6-S1 区域, 如图 4 所示。通过分析得知, 产 β -CD 最多的环糊精糖基转移酶与十糖链间重要作用力的氨基酸分别是 H177、S146、N178、Y167、N193、G180、Y195、H140、D196、H233、K232、F259、D328、H327、R375、D371、H98、N94、F89 等。

经过分析 γ -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用, 由于环糊精糖基转移酶的氨基酸与糖链间的氢键结构复杂, 将十糖链分成两部分进行分析, 以便分析清楚每一个氨基酸的氢键作用, 即 S10-S6 区域和 S5-S1 区域, 如图 5 所示。通过分析得知, 产 γ -CD 最多的环糊精糖基转移酶与十糖

链间重要作用力的氨基酸分别是 G166、G168、D169、Y182、W94、H83、D138、H133、F170、S171、H220、A219、F246、E244、H313、R361、H91、D357 等。

通过将 3 种环糊精糖基转移酶的所有氢键进行重合, 选取 3 种 CGTase 氨基酸与十糖链在相同位置都存在氢键的氨基酸, 如图 6 所示。经过分析得出 3 种 CGTase 与十糖链重合的位置共有 17 个位点, 其中 14 个位点上的氨基酸种类一致, 3 个位点上的氨基酸种类不一致。对应氨基酸一致的 14 个位点对应 α -CGTase 位点为 H98、Y100、W101、H140、H169、G182、N195、Y197、D198、D231、H235、E260、H330 和 R378, 对应氨基酸不一致的 3 个位点对应 α -CGTase 位点为 Y89、D234 和 Y262。可以通过表 2 直观看出 3 种环糊精糖基转移酶之间的氨基酸位置关系。

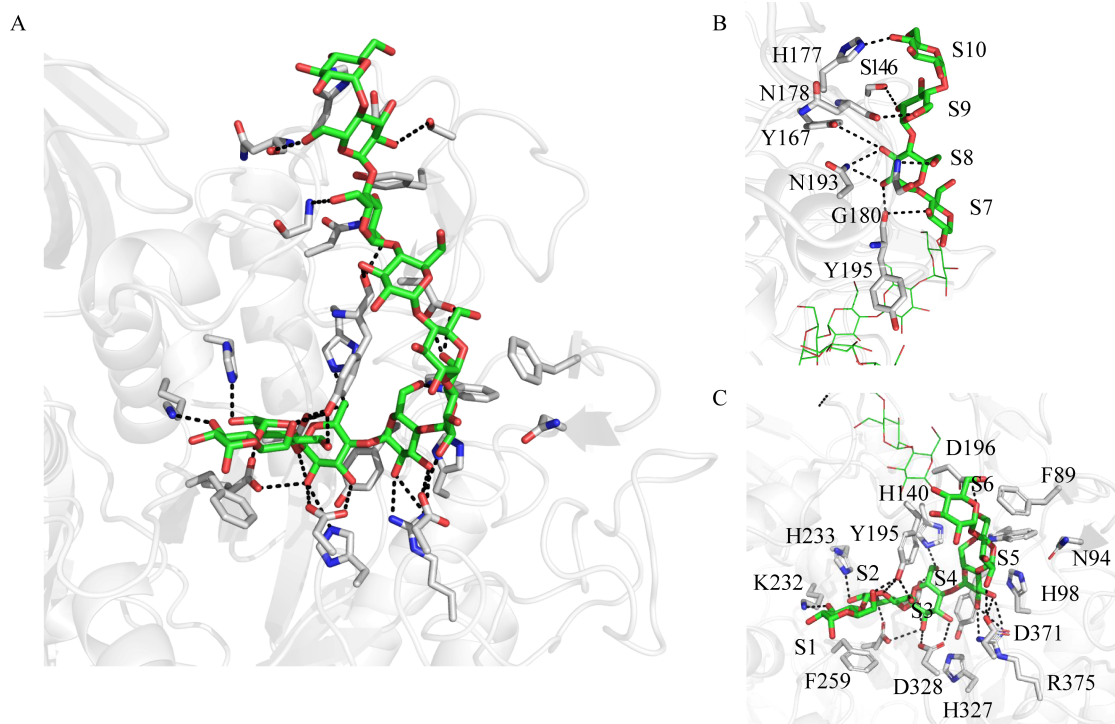


图 4 β -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用三维立体图

Figure 4 Three dimensional diagram of interaction between β -CGTase and decasaccharide chain

注: A: 十糖链和 β -CGTase 氨基酸之间的氢键图; B: 糖链中的 S10-S7 与 β -CGTase 氨基酸之间的氢键放大图; C: S6-S1。

Note: A: Hydrogen bond diagram between decasaccharide chain and β -CGTase amino acids; B: Enlarged diagram of hydrogen bond between S10-S7 and β -CGTase amino acids in sugar chain; C: S6-S1.

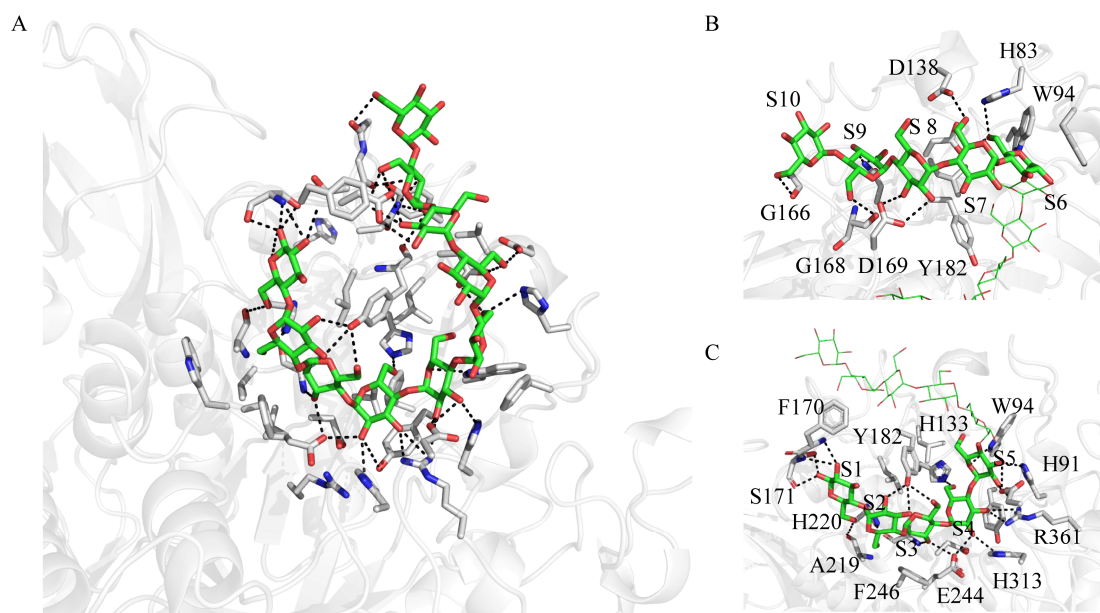


图 5 γ -CGTase 氨基酸和十糖链间相互作用三维立体图

Figure 5 Three dimensional diagram of interaction between γ -CGTase and deca-saccharide chain

注：A：十糖链和 γ -CGTase 氨基酸之间的氢键图；B：糖链中的 S10-S6 与 γ -CGTase 氨基酸之间的氢键放大图；C：糖链中的 S5-S1 与 γ -CGTase 氨基酸之间的氢键。

Note: A: Hydrogen bond diagram between deca-saccharide chain and γ -CGTase amino acids; B: Enlarged diagram of hydrogen bond between S10-S6 and γ -CGTase amino acids in sugar chain; C: Enlarged diagram of hydrogen bond between S5-S1 and γ -CGTase amino acids in sugar chain.

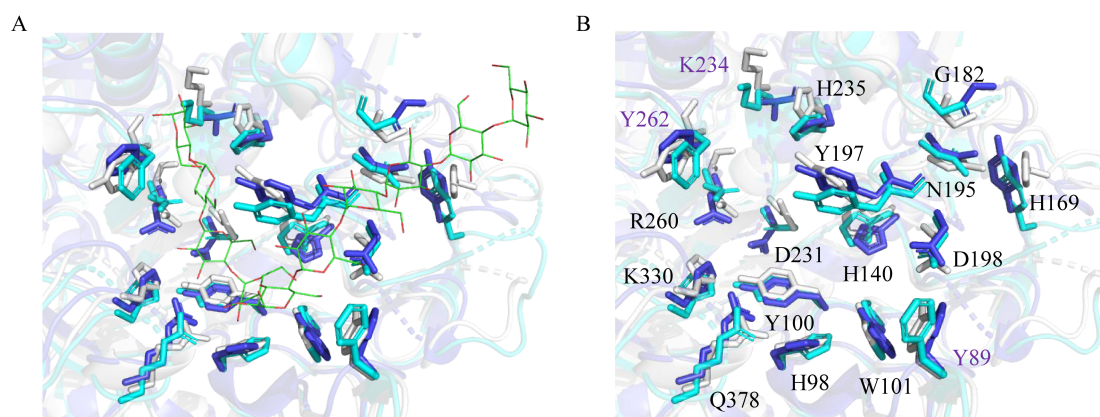


图 6 三种突变体与十糖链位置重合的氢键氨基酸

Figure 6 Hydrogen bond amino acids of three mutants overlapped with deca-saccharide chain

注：A：相同位置氨基酸与十糖链之间的氨基酸位置关系，白色表示 α -CGTase，浅蓝色表示 β -CGTase，深蓝色表示 γ -CGTase；B：重合的关键氢键氨基酸在 α -CGTase 的具体氨基酸名称和位点，黑色字体表示氨基酸类型是一样的，紫色字体表示氨基酸类型不同。

Note: A: Amino acid positional relationship between the amino acid at the same position and the deca-saccharide chain. White indicates α -CGTase, light blue indicates β -CGTase, and dark blue indicates γ -CGTase. B: The key hydrogen-bonding amino acids that overlap are in α -CGTase. The specific amino acid name and position, the black font indicates that the amino acid types are the same, and the purple font indicates that the amino acid types are different.

表 2 三种环糊精糖基转移酶与十糖链间重合的重要氢键位点对应关系

Table 2 Correspondence of important hydrogen bonding sites between three cyclodextrin glycosyltransferases and decasaccharide chains

No.	α -CGTase	β -CGTase	γ -CGTase
1	Y89	F89	H83
2	H98	H98	H91
3	Y100	Y100	Y93
4	W101	W101	W94
5	H140	H140	H133
6	H169	Y167	Y154
7	G182	G180	G167
8	N195	N193	N180
9	Y197	Y195	Y182
10	D198	D196	D183
11	D231	D229	D216
12	K234	K232	A219
13	H235	H233	H220
14	E260	E257	E244
15	Y262	F259	F246
16	H330	H327	H313
17	R378	R375	R361

通过对 α -CGTase 与 γ -CGTase 亲疏水作用力的研究发现,在区域 1 和区域 2 部分两者的差别较大。 α -CGTase 相对于 γ -CGTase 的区域一来说,有一面亲水作用力较大的几个氨基酸组成了一面“亲水墙”。根据图 7 和表 2 分析得出,区域一位置的

亲水位点分别对应的是 K234 和 Y262。在表 2 中, α -CGTase 的 K234 和 Y262 分别对应的 γ -CGTase 位点为 A219 和 F246。234 位点在 α -CGTase 中的氨基酸为赖氨酸,属于碱性极性亲水氨基酸,在 γ -CGTase 该位置变为疏水性的丙氨酸;262 位点在 α -CGTase 中的氨基酸为酪氨酸,也属于亲水氨基酸,在 γ -CGTase 该位置变为疏水性的苯丙氨酸。所以本实验预测如果将 262 位点从亲水性的酪氨酸变成疏水性的氨基酸,可能会对 CGTase 的产物方向有大的改变。

2.2 酶活性和产物专一性

通过定点突变实验以 *Paenibacillus macerans* sp. 602-1 作为模版,将 262 位点亲水性的酪氨酸突变为疏水性的亮氨酸,突变体酶 Y262L 与野生菌酶的活性进行比较(表 3),发现 Y262L 相对于野生菌而言酶活性降低。经过高效液相色谱测得突变酶 Y262L 相较于野生酶总产量有所减少;其中产生 α -CD 的比例有明显降低,从原来的 51.5%降低到 16.7%,总体降低了 2/3;野生菌 *Paenibacillus macerans* sp. 602-1 产生的 γ -CD 占总 CD 产量的比例为 13.7% (质量比),而改造后的 Y262L 突变体产生的 γ -CD 占总 CD 产量的比例达到 39.9% (质量比),突变体相对于野生菌产 γ -CD 的比例增加了 3 倍(表 4)。实验还研究了针对 K234 位点的定点

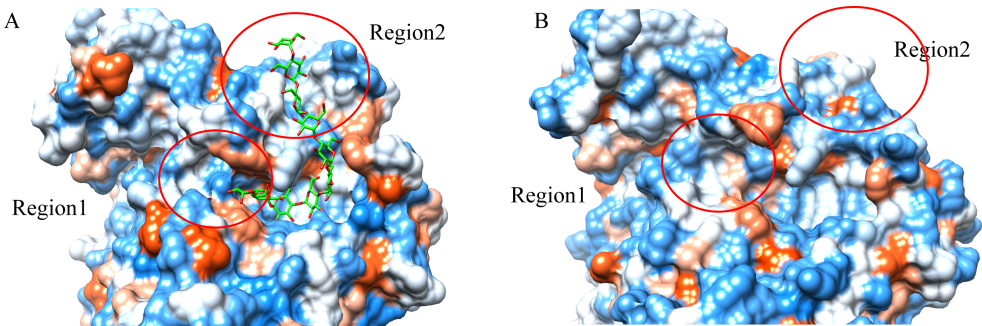


图 7 CGTase 表面亲疏水作用图

Figure 7 Hydrophilic and hydrophobic effects on the surface of CGTase

注: A: α -CGTase 的亲疏水作用; B: γ -CGTase 的亲疏水作用; Region1 和 Region2 表示 α -CGTase 与 γ -CGTase 亲疏水作用力差距较大的区域。

Note: A: the hydrophilic and hydrophobic effects of α -CGTase; B: The hydrophobic and hydrophobic effects of γ -CGTase; The Region1 and Region2 show the regions with different affinity forces between α -CGTase and γ -CGTase.

表 3 Y262L 突变体酶和野生酶的酶活性

Table 3 Enzyme activities of Y262L mutant enzyme and wild enzyme

Mutants	Enzymatic activity (U/mL)	Protein concentration (mg/mL)	Specific activity (U/mg)
Wild	4 856±24	0.547±0.014	8 289±43
Y262L	2 922±13*	0.667±0.011	4 381±19*

注: *: $P<0.01$, 与野生组进行对比, $n=3$.Note: *: $P<0.01$, compared with the wild group, $n=3$.

表 4 高效液相色谱法分析 Y262L 突变体酶和野生酶转化淀粉情况

Table 4 HPLC analysis of Y262L mutant enzyme and wild enzyme conversion starch

24 h	Mutants	Product percentage (%)			Yield (g)
		α	β	γ	
1	Wild	51.5±1.2	34.8±1.4	13.7±0.3	3.64±0.11
2	Y262L	16.7±1.4*	43.5±3.1	39.9±0.9*	2.10±0.06*

注: *: $P<0.01$, 与野生组进行对比, $n=3$.Note: *: $P<0.01$, compared with the wild group, $n=3$.

突变, 突变体酶 K234A 的 α -、 β -和 γ -CD 产物比为 64:25:9 (质量比), 酶活性与野生酶相比变化不大。Y89 位点的突变酶已有文献报道^[17-18], 取代不同的氨基酸会导致产物专一性的变化较大。

3 讨论与结论

Sonnendecker 等^[19-20]改变 *Bacillus* sp. G-825-6 菌的 Y183 位点和 D358 位点后产生的 CD8-CD12 的产率大大增加。然而 Sonnendecker 等^[19-20]的 Y183 和 D358 对应的本文中 4JCM 的位点为 Y182 和 D357, 这两个氨基酸均与十糖链存在氢键作用力。经过表 1 比对发现, Y182 位点相对应改造后的 α -CGTase 和 β -CGTase 对应的是 Y197 和 Y195, Chen 等^[17]通过改造 *Paenibacillus macerans* 的 Y195 位点可以产生更多的 γ -CD。对于 α -、 β -和 γ -CGTase 来说, 结构框架基本相同, 无论是 Sonnendecker 等^[19-20]改造 Y183 位点还是 Chen 等^[17]改造 Y195 位点, 都是处于不同类型 CGTase 的同一关键位置。这一结果表明, 无论是否属于同一种 CGTase, 只要相对应改造的氨基酸处于同一关键位置, 便会引起不同 CGTase 的酶产物专一性产生

相近的变化。

本研究通过比较 3 种 CGTase 口袋附近与底物存在氢键连接的氨基酸, 发现这些氨基酸对酶产物专一性有重要的影响。Li 等^[18]发现突变体 Y89R 有利于将 α -CD 产率从野生菌的 41.8% 提升到 58.2%; Kim 等^[21]表明突变体 Y89F 和 Y100F 有利于产生 β -CD; Leemhuis 等^[22]对位点 Y167F、G179L、G180L、N193G、N193L 和 G179L/G180L 做了研究, 发现改造 G180 位点会引起环化反应和偶联反应, 这些位点都与表 1 中的相关位点对应, 如 G180 和 N193 对应的是 α -CGTase 的 G182 和 N195 位点。根据本实验的分析得出对接口袋附近的这些关键位点对环糊精基糖转移酶的改造有重要意义, 今后可以通过对这些关键位点进行理性改造, 有可能会获得较为理想的结果。本研究对 Y262 位点进行定点突变和产物专一性实验, 结果显示经过分子动力学预测的 Y262L 有助于提高产 γ -CD 专一性, 从野生酶的 13.7% 提高到 39.9%, γ -CD 产物比例提高了 3 倍。研究证实了分子动力学模拟结果对于指导环糊精糖基转移酶的专一性内在机理具有正向的指导意义, 所以如果需要 CGTase 进行更深催化机理的研究, 分子动力学模拟将是重要的突破研究手段。

REFERENCES

- [1] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry[J]. Chemical Reviews, 1998, 98(5): 1743-1754
- [2] Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 329(1/2): 1-11
- [3] Brewster ME, Vandecruys R, Verreck G, et al. Supersaturating drug delivery systems: Effect of hydrophilic cyclodextrins and other excipients on the formation and stabilization of supersaturated drug solutions[J]. Pharmazie, 2008, 63(3): 217-220
- [4] van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Penninga D, et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 296(4): 1027-1038
- [5] Chen SD, Li ZF, Gu ZB, et al. Leu600 mutations decrease product inhibition of the β -cyclodextrin glycosyltransferase

- from *Bacillus circulans* STB01[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 1194-1201
- [6] Ling K, Zhang HB, Liu PF, et al. Site-directed mutation of cyclodextrin glycosyltransferase and analysis of its product specificity[J]. Food Science, 2016, 37(17): 133-138 (in Chinese)
凌凯, 张洪斌, 刘鹏飞, 等. 环糊精糖基转移酶定点突变及其产物特异性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 133-138
- [7] Ishii N, Haga K, Yamane K, et al. Crystal structure of asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011 determined at 1.9 Å resolution[J]. Journal of Molecular Recognition, 2000, 13(1): 35-43
- [8] Madani SH, Sabour MH, Fadaee M. Molecular dynamics simulation of vibrational behavior of annular graphene sheet: Identification of nonlocal parameter[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2018, 79: 264-272
- [9] Xu XD, Cai L, Zheng XL, et al. Molecular dynamics simulations of solvent-exfoliation and stabilization of graphene with the assistance of compressed carbon dioxide and pyrene-polyethylene glycol[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19(24): 16062-16070
- [10] Huang J, MacKerell AD Jr. Force field development and simulations of intrinsically disordered proteins[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 48: 40-48
- [11] Robustelli P, Piana S, Shaw DE. Developing a molecular dynamics force field for both folded and disordered protein states[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(21): E4758-E4766
- [12] Carvalho HF, Barbosa AJM, Roque ACA, et al. Integration of molecular dynamics based predictions into the optimization of De Novo protein designs: Limitations and Benefits[A]//Samish I. Computational Protein Design. Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2017, 1529: 181-201
- [13] Huber RG, Marzinek JK, Holdbrook DA, et al. Multiscale molecular dynamics simulation approaches to the structure and dynamics of viruses[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2017, 128: 121-132
- [14] Jia XB, Guo YH, Lin XJ, et al. Fusion of a family 20 carbohydrate-binding module (CBM20) with cyclodextrin glycosyltransferase of *Geobacillus* sp. CHB1 improves catalytic efficiency[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(6): 471-480
- [15] Lee YS, Woo JB, Ryu SI, et al. Glucosylation of flavonol and flavanones by *Bacillus* cyclodextrin glycosyltransferase to enhance their solubility and stability[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 75-83
- [16] Liao SM, Shen NK, Liang G, et al. Inhibition of α -amylase activity by Zn^{2+} : Insights from spectroscopy and molecular dynamics simulations[J]. Medicinal Chemistry, 2019, 15(5): 510-520
- [17] Chen FJ, Xie T, Yue Y, et al. Molecular dynamic analysis of mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to γ -cyclodextrin[J]. Journal of Molecular Modeling, 2015, 21(8): 208
- [18] Li ZF, Zhang JY, Wang M, et al. Mutations at subsite -3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing α -cyclodextrin specificity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(3): 483-490
- [19] Sonnendecker C, Melzer S, Zimmermann W. Engineered cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus* sp. G-825-6 produce large-ring cyclodextrins with high specificity[J]. Microbiology Open, 2019, 8(6): e00757
- [20] Sonnendecker C, Wei R, Kurze E, et al. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus* cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 87
- [21] Kim YH, Bae KH, Kim TJ, et al. Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 41(2): 227-234
- [22] Leemhuis H, Uitdehaag JCM, Rozeboom HJ, et al. The remote substrate binding subsite -6 in cyclodextrin-glycosyltransferase controls the transferase activity of the enzyme via an induced-fit mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(2): 1113-1119