

工业酶改造与应用

亚位点+1 处突变提高软化类芽胞杆菌环糊精糖基转移酶底物麦芽糊精特异性

许乔艳^{1,2}, 韩瑞枝^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 刘龙^{1,2}, 陈坚³

1 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 粮食发酵工艺及技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

许乔艳, 韩瑞枝, 李江华, 等. 亚位点+1 处突变提高软化类芽胞杆菌环糊精糖基转移酶底物麦芽糊精特异性. 生物工程学报, 2014, 30(1): 98-108.

Xu QY, Han RZ, Li JH, et al. Improving maltodextrin specificity by site-saturation engineering of subsite +1 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 98-108.

摘要: 通过改造来源于软化类芽胞杆菌 *Paenibacillus macerans* 的环糊精糖基转移酶 (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGT 酶) 的+1 亚位点提高其对麦芽糊精的底物特异性, 并进一步提高以麦芽糊精为糖基供体催化合成 2-O-D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G) 的效率。首先对+1 亚位点附近的 3 个氨基酸残基 Leu194、Ala230 和 His233 分别进行定点饱和突变, 得到 3 个优势突变体 L194N (亮氨酸→天冬酰胺), A230D (丙氨酸→天冬氨酸), H233E (组氨酸→谷氨酸), 然后以这 3 个优势突变体为模板进一步进行两点和三点复合突变, 获得 7 个复合突变体。研究表明, 突变体 L194N/A230D/H233E 以麦芽糊精为底物合成 AA-2G 的产量最高, 达到 1.95 g/L, 比野生型 CGT 酶提高了 62.5%。对获得的突变体进行动力学分析, 发现高浓度的底物 L-AA 对突变型 CGT 酶催化的酶促反应具有抑制作用。确定了突变体酶促反应的最适温度、pH 和反应时间。模拟突变体的三维结构并分析, 突变体底物特异性的改善可能与 CGT 酶第 194 位、230 位和 233 位的氨基酸残基的亲水性及与底物分子间的作用力的改变有关。

关键词: 环糊精糖基转移酶, L-抗坏血酸, 麦芽糊精, 2-O-D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸, 定点饱和突变

Received: August 5, 2013; **Accepted:** September 26, 2013

Supported by: 111 Project (No. 111-2-06), the Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province, China (No. BE2011624).

Corresponding author: Long Liu. Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

111 工程 (No. 111-2-06), 江苏省科技支撑计划项目(No. BE2011624)资助。

网络出版时间: 2013-11-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131127.1119.002.html>

Improving maltodextrin specificity by site-saturation engineering of subsite +1 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*

Qiaoyan Xu^{1,2}, Ruizhi Han^{1,2}, Jianghua Li^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, Long Liu^{1,2}, and Jian Chen³

¹ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

³ National Engineering of Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: By engineering the subsite +1 of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Paenibacillus macerans*, we improved its maltodextrin specificity for 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) synthesis. Specifically, we conducted site-saturation mutagenesis on Leu194, Ala230, and His233 in subsite +1 separately and gained 3 mutants L194N (leucine → asparagine), A230D (alanine → aspartic acid), and H233E (histidine → glutamic acid) produced higher AA-2G yield than the wild-type and the other mutant CGTases. Therefore, the 3 mutants L194N, A230D, and H233E were further used to construct the double and triple mutations. Among the 7 obtained combinational mutants, the triple mutant L194N/A230D/H233E produced the highest AA-2G titer of 1.95 g/L, which was increased by 62.5% compared with that produced by the wild-type CGTase. Then, we modeled the reaction kinetics of all the mutants and found a substrate inhibition by high titer of L-AA for the mutants. The optimal temperature, pH, and reaction time of all the mutants were also determined. The structure modeling indicated that the enhanced maltodextrin specificity may be related with the changes of hydrogen bonding interactions between the side chain of residue at the three positions (194, 230 and 233) and the substrate sugars.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, L-ascorbic acid, maltodextrin, 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, site-saturation mutagenesis

维生素 C (Vitamin C, VC), 又称 L-抗坏血酸 (L-Ascorbic Acid, L-AA), 是一种水溶性维生素。VC 参与很多体内生理活动, 在保持和促进人体健康以及动物生长方面具有重要的作用^[1-3]。VC 用途很广泛, 可以作为酸味剂、还原剂、抗氧化剂、漂白剂和稳定剂, 广泛应用于化妆品、食品和医药等行业中^[4]。但 VC 本身极不稳定, 位于 C2 位置上的羟基很容易受 pH、热及 Cu²⁺、Fe²⁺ 影响而发生氧化还原反应, 导致其生理活性迅速减弱甚至消失, 使其在应用上受到了很大的限制^[5-7]。因此, 为了提高 VC 的稳定性, 许多 VC 衍生物相继出现, 主要包括:

VC 金属盐, VC 酯类以及糖基化 VC^[8-9]。由于 VC 糖基衍生物具有安全、稳定性强、在体内易降解产生 L-AA 等优点, 能更好地为人体和动物吸收和利用, 因而更具优势。在所有的 VC 糖基衍生物中, 以 2-O-D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2G) 研究最多, 应用最为广泛, 成为最理想的 VC 衍生物^[7]。

AA-2G 是利用糖基转移酶特异性的转糖基作用将糖基供体上的葡萄糖苷转移到 VC 的 C2 上合成的。糖基转移酶的选择与使用是整个 AA-2G 合成中的重要环节, 直接影响到 AA-2G 的合成效率^[10]。目前报道过的糖基转移酶有: α -

葡萄糖苷酶^[11]、环糊精葡萄糖基转移酶 (CGT 酶)^[12]、淀粉酶^[13]、蔗糖磷酸化酶^[14]和 α -异麦芽糖基-吡喃葡糖形成酶^[15]。其中来源于软化类芽胞杆菌 *Paenibacillus macerans* 的环糊精葡萄糖基转移酶 (CGT 酶(EC2.4.1.19)) 因其催化生产 AA-2G 的高产物特异性而被认为是最优选择^[16]。CGT 酶是一种多功能型酶,能催化 3 种转糖基反应 (歧化、环化和耦合反应) 和水解反应^[9,17]。它可以将一个或多个糖基供体环上的糖残基 α -1, 2 糖苷键接于 L-AA 的 C2 原子上进行修饰得到 AA-2G_(n) (“n”代表连接到 L-AA 上的糖基数量), 再由糖化酶的作用水解成 AA-2G^[18]。

研究发现以环糊精为糖基供体时,产物专一性比较高,但是以 α -环糊精为糖基供体,成本太高;以 β -环糊精为糖基供体,由于 β -环糊精的溶解度较低,酶促反应效率受到较大限制,均不适用于 AA-2G 大规模工业化生产^[16,19]。因此,以价格低廉且易溶的麦芽糊精为糖基供体高度专一地合成 AA-2G 具有重要意义。X-射线衍射研究表明 CGT 酶表面存在一个明显的底物结合凹槽,在底物结合凹槽中存在 9 个亚位点,标记为+2~+7,每个亚位点能结合一个葡萄糖残基^[20]。在之前的研究中,我们已经对-3 亚位点附近的氨基酸残基进行定点突变并获得较理想的结果,说明-3 亚位点是改善 CGT 酶对麦芽糊精的底物特异性的有效位点^[21]。前期研究发现+1 亚位点亦是 CGT 酶催化转糖基的关键位点^[22]。本研究中,我们对+1 亚位点附近涉及的氨基酸残基: Leu194、Ala230 和 His233 进行定点饱和突变,旨在考察亚位点+1 处突变对 CGT 酶以麦芽糊精为糖基供体特异性合成 AA-2G 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

P. macerans JFB05-01 系本研究室从淀粉生产企业附近的土壤中筛选获得,菌种保藏在国家典型微生物保藏中心 (保藏号: CCTCC M203062); 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 pMD19T-simple 和表达质粒 pET-20b(+) 购自大连宝生物工程有限公司; 重组质粒 pET-20b(+)/*cgt* 由本实验室构建并保藏 (GenBank Accession No. AF047363)。

1.1.2 酶和试剂

质粒小量提取试剂盒、氨苄青霉素及麦芽糊精 (DE15-20) 购自上海生工生物工程公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、定点突变试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、PrimerStarDNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司。AA-2G 购自日本林原生化研究所, L-AA 购自江苏江山制药有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

培养基 LB、TB 均按 Invitrogen 公司操作手册方法配制。

1.2 方法

1.2.1 突变质粒的构建与转化

以质粒 pET-20b(+)/*cgt* 为模板,设计引物,采用突变试剂盒一步 PCR 法对 CGT 酶 +1 亚位点附近的氨基酸残基 (Leu194、Ala230、His233) 进行定点饱和突变。以第一轮突变的产物为模板进行两点和三点复合突变。Leu194、Ala230、His233 定点饱和突变及复合突变的引物见表 1。

表 1 定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis

Primer	Template	Oligonucleotide sequence (5'-3')
L194X	Wild-type	TTTACAAGAAC <u>NNN</u> TACGACCTGGC
		TACCGTCTTCAATCGTGAAAAATC
A230X	Wild-type	TTTTGAC <u>NNN</u> GTGAAGCATATGCC
		CGAATCCCGTCCACACCCAT
H233X	Wild-type	GACGCGGTGAAG <u>NNN</u> ATGCC
		AAAACGAATCCCGTCCACACC
L194N/ A230D	L194N	TTTTGAC <u>GAC</u> GTGAAGCATATGCC
		CGAATCCCGTCCACACCCAT
L194N/ H233E	L194N	GACGCGGTGAAG <u>GAA</u> ATGCC
		AAAACGAATCCCGTCCACACC
A230D/ H233E	A230D	GACGCGGTGAAG <u>GAA</u> ATGCC
		AAAACGAATCCCGTCCACACC
L194N/ A230D/ H233E	L194N/ A230D	GACGCGGTGAAG <u>GAA</u> ATGCC
		AAAACGAATCCCGTCCACACC

Underlined and bold sequences denote the coding sequence of the mutated amino acid.

NNN (corresponding to Leu194, Ala230 and His233) was separately replaced by the following amino acid codons: Phe(TTC), Leu(CGT), Ile(ATC), Met(ATG), Val(GTT), Ser(TCT), Pro(CCG), Thr(ACC), Ala(GCG), Tyr(TAC), His(CAC), Gln(CAG), Asp(AAC), Glu(GAA), Cys(TGC), Trp(TGG), Arg(CGT), Gly(GGT), Asn(AAC) and Lys(AAA).

PCR 产物纯化后, 经定点突变试剂盒处理转化 *E. coli* JM109, 挑取阳性克隆, 送上海生物工程有限公司测序。将鉴定正确的突变质粒分别转化表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3), 得到含有突变质粒的基因工程菌。

1.2.2 突变体的生产与纯化

种子培养: 将含突变质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 接入装有 20 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 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 4% (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 90 h。

各培养基使用前添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素。

含有突变质粒的基因工程菌培养 90 h 后的发酵液在 8 000 r/min、4 °C 下离心 15 min, 除去菌体, 得上清即粗酶液。所有饱和突变体粗酶液的纯化均采用 Ni 柱一步亲和层析法^[5]。

1.2.3 AA-2G 的合成与检测

将纯化后的酶液用醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 稀释至蛋白浓度为 1 mg/mL, 取适量与底物麦芽糊精和 L-AA (5%, W/V) 混合, 以 2 mL 甘油管作为反应容器, 基本装满, 黑色纸包裹避光避氧下 37 °C 反应 24 h, 然后加入 10 U/mL 糖化酶在 65 °C、pH 5.5 条件下反应 24 h, 通过 HPLC 方法检测 AA-2G 产量。

HPLC 检测 AA-2G 产量方法: 酶反应样品通过 0.22 μ m 滤膜过滤, 使用 Amethyst C18-H 柱 (4.6 mm \times 250 mm, Sepax, America) 检测。检测波长: 238 nm; 流动相: 0.05 mol/L KH_2PO_4/H_3PO_4 (pH 2.0); 流速: 0.6 mL/min。在此条件下, 在大约 10 min 时会出现 AA-2G 的流出峰。AA-2G 浓度通过峰面积计算而得。

在初始转化条件 (37 °C, pH 5.5) 的基础上, 考虑不同反应温度 (20 °C、28 °C、36 °C、44 °C 和 52 °C) 和 pH (醋酸-醋酸钠缓冲液: pH 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0; 磷酸缓冲液: pH 6.0、6.5、7.0 和 8.0) 对野生型/突变型 CGT 酶合成 AA-2G 的影响。

将野生型(突变型)CGT 酶与不同浓度的麦芽糊精 (0.23、0.46、1.16、2.3、11.6 和 23.2 mmol/L) 和 L-AA (2.83、5.67、28.3、56.7 和 141.5 mmol/L) 混合反应测定 AA-2G 合成的动力学参数。采用

SigmaPlot (Jandel Scientific) 拟合数据, 得到下面的公式:

乒乓(Ping-Pong)反应机制:

$$v = V_{\max} \cdot a \cdot b / (K_{mA} \cdot b + K_{mB} \cdot a + a \cdot b) \quad (1)$$

底物抑制反应机制:

$$v = V_{\max} \cdot a \cdot b / (K_{mB} \cdot a + K_{mA} \cdot b \cdot (1 + b/K_{iB}) + a \cdot b) \quad (2)$$

其中: v 为不同底物浓度下的反应速率 (每毫克酶每小时催化生成 AA-2G 的量, $\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$); V_{\max} 为反应的最大速率 ($\text{mmol}/\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h}$); a 和 b 分别为糖基供体 (麦芽糊精) 和受体 (L-AA) 的浓度 (mmol/L); K_{mA} 和 K_{mB} 分别为底物麦芽糊精和 L-AA 的亲和常数; K_{iB} 为底物 L-AA 的抑制常数。

1.2.4 酶活测定

甲基橙法测定 α -环化活力的方法^[23]: 取适当稀释的酶液 0.1 mL, 加入装有 0.9 mL 预先用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 配制的 3% 可溶性淀粉溶液中, 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 磷酸缓冲液配制的 0.1 mmol/L 甲基橙, 在 16 °C 下保温 20 min, 在 505 nm 下测定吸光度。一个酶活单位定义在该条件下每分钟生成 1 μmol α -环糊精所需酶量。

淀粉水解活力测定方法^[9]: 将适量的酶液加入到含 2% 可溶性淀粉的 50 mmol/L 磷酸缓冲液中 (pH 6.5), 50 °C 反应 10 min, 然后用 DNS 法测定还原糖浓度。一个酶活单位定义在该条件下每分钟生成 1 μmol 还原糖所需酶量。

歧化反应活力测定方法^[9]: 将含有 6 mmol/L 供体底物 4-硝基苯基- α -D-麦芽庚糖-4-6-O-亚乙基 (EPS) 和 10 mmol/L 受体底物麦芽糖的 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 在 50 °C 保温 10 min 中, 然后加入适当稀释的酶液 0.1 mL 反应, 每 0.5 min 取 100 μL 反应样品加入 20 μL 1.2 mol/L HCl (4 °C), 然后在 60 °C 保温 10 min

使 CGTase 失活。随后, 加入 20 μL 1.2 mol/L NaOH 中和, 将样品加到磷酸缓冲液 (pH 7.0), 并加入 60 μL (1 U) α -糖苷酶于 37 °C 反应 60 min。加入 1 mL 1 mol/L 碳酸钠使样品 pH 升至 8 以上, 在 401 nm 波长下侧吸光值 ($\epsilon_{401} = 18.4 \text{ mmol}/\text{L}$)。1 单位酶活定义为每分钟转化 1 μmol 的酶的量。

1.2.5 突变体的晶体结构模拟

野生型 (突变型) CGT 酶的理论晶体结构通过 SWISS-MODEL 蛋白模拟在线服务器 (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>^[24]) 进行同源模拟获得, 模板为来源于 *B. circulans* 251 的 CGT 酶 (PDB 编码: 1CXK)^[25]。理论结构与模板具有 68.4% 的同源性, 序列对比显示仅在 249 位的氨基酸存在差异。所有分子结构图形均由 Accelrys Discovery Studio Client 2.5 软件制作。通过组合扩展方法 (<http://cl.sdsc.edu/>^[26]) 进行结构比对, 对模型进行 PROCHECK^[27]、Verify3D^[28] 和 ProQ^[29] 分析, 发现有 95% 的残基位于理想区域, 仅 0.2% 位于未知区域。模型与模板之间的根均方偏差 (RMSD) 也由组合扩展方法^[26] 计算而得, 发现模型与模板的外观结构十分相似 (通过 $C\alpha$ 原子最小二乘法原则进行叠加, RMSD 为 0.5 Å)。麦芽九糖抑制剂由模板 PDB 1CXK 的活性位点转移至模型的活性位点。最后, 酶-底物反应的能量由 Accelrys Discovery Studio Client 2.5 提供的 Amber-based 能量最小化方法计算获得。

2 结果与分析

2.1 突变体的 AA-2G 合成

所有的突变体均由定点突变技术成功构建并经 DNA 测序鉴定正确。将野生型和饱和突变获得的所有突变型 CGT 酶经 *E. coli* BL21 (DE3) 表达, SDS-PAGE 鉴定发现表达水平及分子量均无

明显变化。粗酶液经 Ni-柱纯化,得到电泳纯蛋白。

在构建的所有单点突变体中,突变体 L194N、A230D、H233E 相较于野生型 CGT 酶产 AA-2G 的量最高(其他单点突变体产 AA-2G 的量均低于野生型 CGT 酶或提高率在 10%以下)。在这 3 株优势突变体的基础上,我们再进行两点和三点复合突变,得到 L194N/A230D、L194N/H233E、A230D/H233E 和 L194N/A230D/H233E 四株复合突变体。其中,三点复合突变体 L194N/A230D/H233E 以麦芽糊精为糖基供体产 AA-2G 的量最高为 1.95 g/L,较野生型提高了 62.5%(表 2)。

表 2 野生型(突变型)CGT 酶的相对酶活和 AA-2G 产量

Table 2 Comparison of the reaction activities and AA-2G yields of the wild-type and mutant CGTases

Enzyme	Relative activity (%) [*]			AA-2G yield (g/L) Maltodextrins glycosyl donor
	Cyclization (α -cyclodextrin-forming activity)	Hydrolysis (starch-degrading activity)	Disproportionation	
Wild-type	100	100	100	1.20±0.04
L194N	54.5±2.0	81.8±1.0	115.6±0.3	1.39±0.05
A230D	38.3±1.5	148.5±5.0	125.8±0.5	1.51±0.06
H233E	44.7±2.0	142.4±5.0	127.5±0.6	1.53±0.06
L194N/A230D	50.2±2.2	106.1±4.0	140.2±0.8	1.68±0.05
L194N/H233E	52.1±2.5	112.1±3.0	147.5±1.0	1.77±0.07
A230D/H233E	47.5±1.3	93.9±1.0	158.3±0.9	1.91±0.05
L194N/A230D/H233E	45.2±1.2	124.2±4.0	162.5±1.0	1.95±0.07

*: The cyclization, hydrolysis and disproportionation reaction activity for the wild-type CGTase were 165±5, 8.3±0.1 and 806±8 U/mg, respectively, and were defined as 100% in the relative activity; Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean was below 5%.

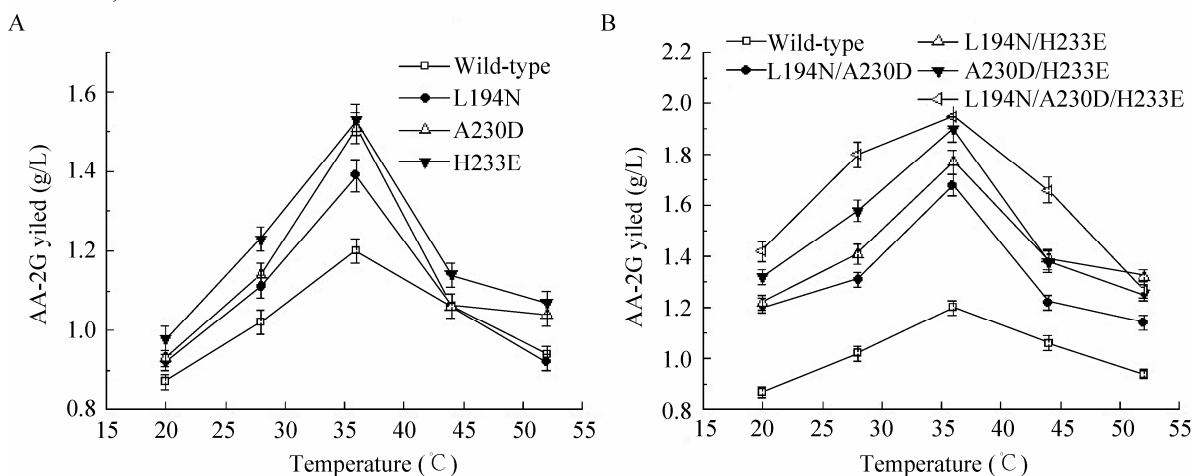


图 1 反应温度对野生型(突变型)CGT 酶以麦芽糊精为糖基供体合成 AA-2G 的影响

Fig. 1 Effect of reaction temperature on AA-2G synthesis by the wild-type and mutant CGTases with maltodextrin as the glycosyl donor.

图 2 反映了不同 pH 对野生型 (突变型) CGT 酶催化合成 AA-2G 的影响。与野生型相比, 突变体的最适反应 pH 有一定程度上的变化。其中, 突变体 L194N、L194N/A230D 与野生型一致, 催化合成 AA-2G 的最适 pH 为 6.5; 而突变体 A230D、H233E、L194N/H233E、A230D/H233E 和 L194N/A230D/H233E 则在 pH 7.0 时获得最高的 AA-2G 产量。初步推测,

突变体引入的不同极性的氨基酸可能改变了底物结合活性位点可解离基团的 pK_a , 进而造成最适反应 pH 的改变。

图 3 为在最适温度和最佳 pH 条件下, 野生型和突变型 CGT 酶催化合成 AA-2G 产量随时间的变化曲线。在反应的初始阶段, AA-2G 的产量有明显的增长, 野生型和突变体均在 24 h 时获得 AA-2G 的最高产量 (表 2)。在所有突变体中,

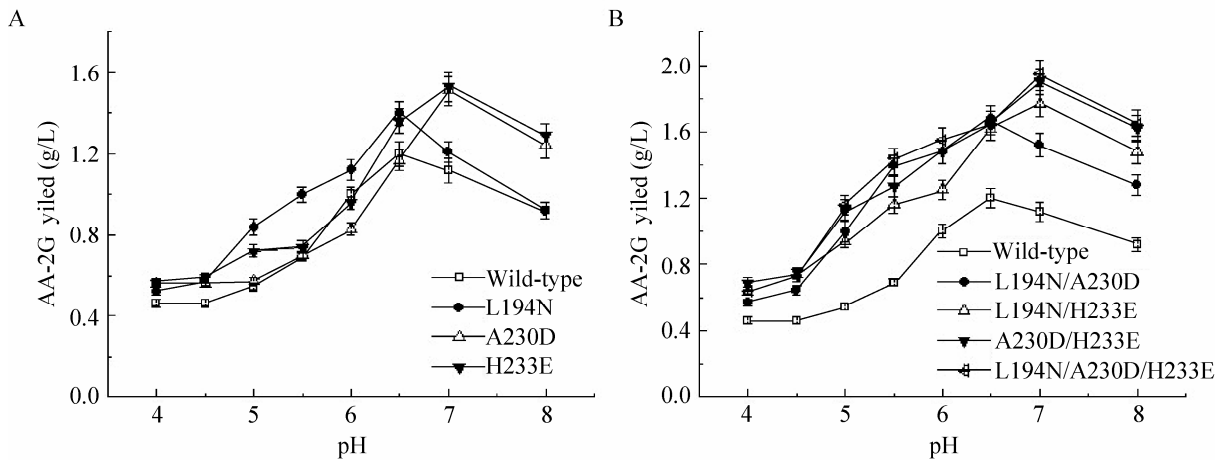


图 2 反应 pH 对野生型 (突变型) CGT 酶以麦芽糊精为糖基供体合成 AA-2G 的影响

Fig. 2 Effect of reaction pH on AA-2G synthesis by the wild-type and mutant CGTases with maltodextrin as the glycosyl donor.

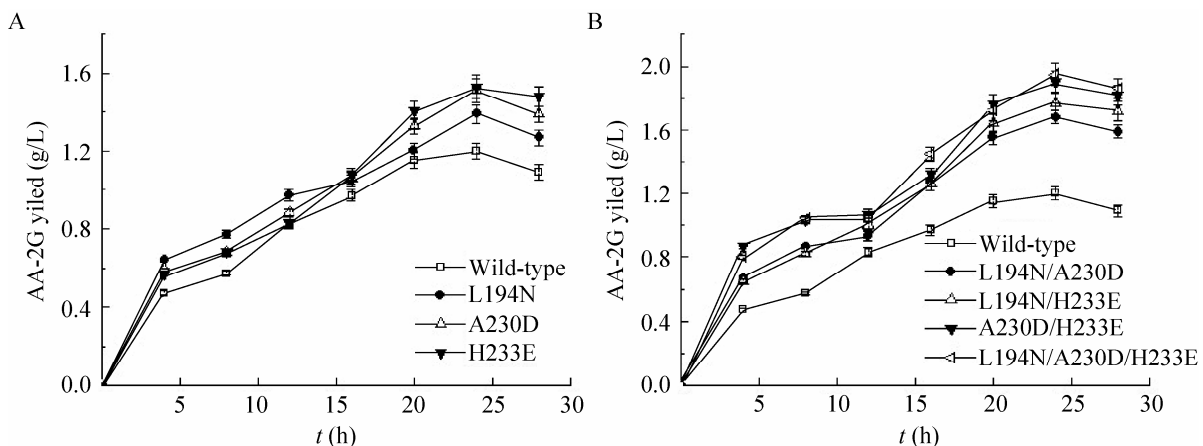


图 3 野生型 (突变型) CGT 酶以 L-AA 和麦芽糊精为底物合成 AA-2G 的时间产量曲线

Fig. 3 Time profiles of AA-2G synthesis by the wild-type and mutant CGTases with L-AA and maltodextrin as the substrates.

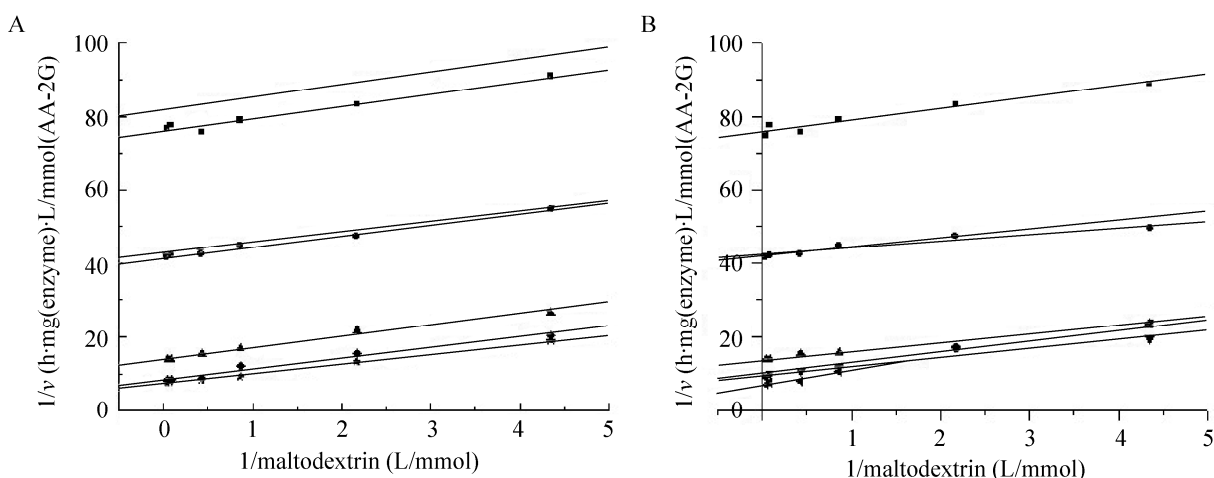


图 4 野生型 CGT 酶(a)和突变体 L194N/A230D/H233E (b)合成 AA-2G 反应的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots of the AA-2G synthesis by the wild-type CGTase (A) and the mutant L194N/A230D/H233E (B). L-AA concentrations (mmol/L): ■: 2.83; ●: 5.67; ▲: 28.3; ◆: 56.7; ★: 141.5. Linear regression of the experimental data is represented by black dotted lines, and the calculated values from Equation (1) and (2) are represented by red solid lines.

L194N/A230D/H233E 的产量最高, 约为野生型的 1.6 倍。

2.3 突变体的反应动力学及作用机理分析

为了研究野生型 (突变型) CGT 酶的动力学性质, 分别测定了以不同浓度的麦芽糊精和 L-AA 为底物时 AA-2G 的产量。拟合数据并对野生型 CGT 酶及突变体 L194N/A230D/H233E 进行 Lineweaver-Burk 作图, 得到图 4。如图 4A 所示, 对野生型 CGT 酶进行动力学分析, 经双倒数线性拟合得到的直线符合多底物酶促反应的乒乓机制, 与公式(1)计算的值相符合; 而突变体 L194N/A230D/H233E 线性拟合的结果与公式(2)计算的较符合, 说明其酶促反应符合底物抑制动力学模型, 高浓度的底物 L-AA 对 AA-2G 的合成存在抑制作用 (图 4B)。另外几个突变体的分析结果也符合公式(2), 详细的动力学参数见表 3。

突变体的最大反应速率 (V_{max}) 要高于野生

型, K_m (麦芽糊精) 和 K_{cat}/K_m (麦芽糊精) 值的变化显示出突变体对底物麦芽糊精的亲性和酶促反应的催化效率与野生型相比都有一定程度的提高。突变体相对于野生型 K_m (L-AA) 和 K_{cat}/K_m (L-AA) 值的变化则说明突变体对底物 L-AA 的亲性有所降低。抑制常数 K_i (L-AA) 表明高浓度的 L-AA 对突变体 K47L/Y89F/N94P/D196Y 催化的酶促反应抑制作用最显著。

我们还考察了突变对 CGT 酶 α -环化活力、淀粉水解活力及歧化活力的影响。如表 2 所示, 突变型 CGT 酶的 α -环化活力降至野生型的一半甚至更低, 而除突变体 L194N 和 A23D/H233E 的淀粉水解活力较野生型分别降低了 18.2%和 6.1%外, 大部分突变型 CGT 酶的淀粉水解活力均有一定程度的提高。突变体 L194N、A230D、H233E、L194N/A230D、L194N/H233E、A230D/H233E 和 L194N/A230D/H233E 的歧化反应活力较野生型

CGT 酶分别提高了 15.6% ,25.8% ,27.5% ,40.2% , 47.5% , 58.3%和 62.5%。这一增长趋势与 AA-2G 产量的趋势一致,说明歧化反应是以麦芽糊精做为糖基供体生产 AA-2G 的关键反应。

图 5A-D 依次为野生型 CGT 酶和第 94 位亮氨酸,第 230 位丙氨酸和第 233 位组氨酸分别被天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酸取代的突变体,可以看出突变体与野生型 CGT 酶的氨基酸侧链有很大的差别。

如图 5B,CGT 酶第 194 位的氨基酸由亮氨酸突变为天冬酰胺,使侧链结构发生了改变,进而引发了附近的氨基酸残基及整个空间结构的变化,可能在一定程度上改善了 CGT 酶与线性底物麦芽糊精间的结合,提高了 AA-2G 的合成效率。

如图 5C 所示,CGT 酶第 230 位的丙氨酸突变为天冬氨酸后,与底物分子间的氢键作用力较突变前有所增强。增加的氢键使底物分子更趋向于第 230 位的氨基酸残基,可能在一定程度上阻滞了线性底物的环化,造成突变体 A230D 环化活力的大幅度降低。然而增强的氢键作用力也可能有效改善了突变体 A230D 对线

性底物(如麦芽糊精)的亲水性,更利于其以麦芽糊精为糖基供体合成更高产量的 AA-2G。突变体 H233E 底物特异性改善的机理与突变体 A230D 类似(图 5D)。相关动力学参数 K_m (麦芽糊精)和 K_{cat}/K_m (麦芽糊精)的变化也证实了这一点。

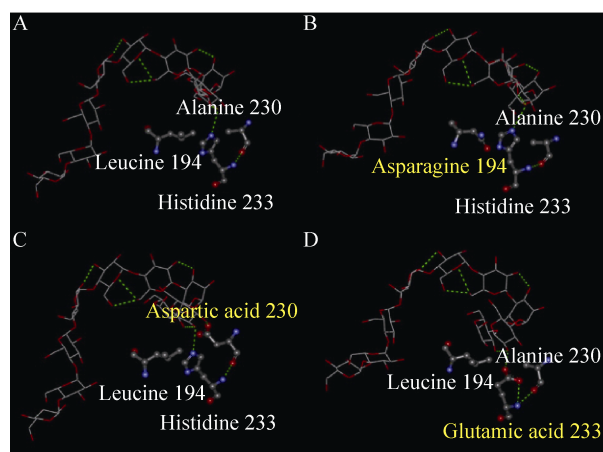


图 5 野生型 (突变型) CGT 酶与麦芽九糖抑制剂在 +1 亚位点上作用的模拟结构图

Fig. 5 Close-up the wild-type and mutant CGTases theoretical structure with a maltodextrin substrate at subsite +1 (PDB accession code 1CXK). (A) Wild-type CGTase. (B) L194N. (C) A230D. (D) H233E.

表 3 野生型 (突变型) CGT 酶的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of the wild-type and mutant CGTases

Enzyme	V_{max} (mmol/(L·mg·h))	K_{cat} (h ⁻¹)	K_m (L-AA) (mmol/L)	K_{cat}/K_m (L-AA) (mmol/(L·h))	K_m (maltodextrin)* (mmol/L)	K_{cat}/K_m (maltodextrin) (mmol/(L·h))	K_i (L-AA) (mmol/L)
Wild-type	0.17±0.01	12.75	34.10±0.20	0.37	0.55±0.05	23.18	ND
L194N	0.19±0.01	14.25	38.80±0.17	0.37	0.52±0.04	27.40	354
A230D	0.21±0.01	15.75	37.52±0.24	0.42	0.49±0.02	32.14	368
H233E	0.21±0.01	15.75	42.71±0.15	0.37	0.45±0.01	35.00	359
L194N/A230D	0.23±0.02	17.25	46.31±0.16	0.37	0.40±0.01	43.12	264
L194N/H233E	0.24±0.02	18.00	42.07±0.35	0.43	0.44±0.03	40.91	321
A230D/H233E	0.26±0.02	19.50	43.25±0.17	0.45	0.45±0.02	43.33	335
L194N/A230D/H233E	0.26±0.02	19.50	46.44±0.34	0.42	0.41±0.02	47.56	286

*: Here the average molecular weight of maltodextrin was 2 150.68 Da; ND: not detectable; Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean was below 5%.

3 结论

本实验通过定点突变技术构建了 7 株底物麦芽糊精特异性明显改善的 CGT 酶突变体, 其中三点突变体 L194N/A230D/H233E 以麦芽糊精为底物合成 AA-2G 的产量最高为 1.95 g/L, 较野生型 CGT 酶提高 62.5%。通过动力学分析和晶体结构模拟我们初步阐述了突变体底物麦芽糊精特异性改善的机理。研究结果使我们进一步了解了+1 亚位点附近氨基酸残基的突变能有效提高 CGT 酶与线性底物分子的亲和性。为了进一步提高 AA-2G 的产量, 还需继续开展 CGT 酶的固定化和转化条件优化等工作。

REFERENCES

- [1] Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr*, 1986, 6(1): 365–406.
- [2] Jacob RA, Sotoudeh G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutri Clin Care*, 2002, 5(2): 66–74.
- [3] Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*, 2003, 2(1): 7.
- [4] Fujiwara S, Kakihara H, Sakaguchi K, et al. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J Bacteriol*, 1992, 174(22): 7478–7481.
- [5] Li ZF, Zhang JY, Sun Q, et al. Mutations of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhance β -cyclodextrin specificity. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(18): 8386–8391.
- [6] 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. *Biochem*, 1995, 34(10): 3368–3376.
- [7] Yamamoto I, Muto N, Murakami K, et al. L-ascorbic acid α -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidases: its improved stability and structure determination. *Chem Pharm Bull (Tokoyo)*, 1990, 38(11): 3020.
- [8] 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.
- [9] van der Veen BA, Uitdehaag J, Penninga D, et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *J Mol Biol*, 2000, 296(4): 1027–1038.
- [10] Han R, Liu L, Li J, et al. Functions, applications and production of 2-O-d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95: 313–320.
- [11] Muto N, Suga S, Fujii K, et al. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase. *Agricul Biol Chem*, 1990, 54(7): 1697–1703.
- [12] Aga H, Yoneyama M, Sakai S, et al. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* (Biological Chemistry). *Agric Biol Chem*, 1991, 55(7): 1751–1756.
- [13] Lee SB, Nam K, Lee SJ, et al. Antioxidative effects of glycosyl-ascorbic acids synthesized by maltogenic amylase to reduce lipid oxidation and volatiles production in cooked chicken meat. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(1): 36–43.
- [14] Kwon T, Kim CT, Lee JH. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(4): 611–615.
- [15] Mukai K, Tsusaki K, Kubota M, et al. Process for producing 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid: EP patent, 1553186. 2005-07-13.

- [16] Jun HK, Bae KM, Kim SK. Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp.. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(21): 1793–1797.
- [17] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, 280(2): 309.
- [18] Zhang Z, Li J, Liu L, et al. Enzymatic transformation of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by α -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16(1): 107–113.
- [19] Tanaka M, Muto N, Yamamoto I. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1078(2): 127–132.
- [20] Strokopytov B, Knegt RMA, Penninga D, et al. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*, 1996, 35(13): 4241–4249.
- [21] Liu L, Xu Q, Han R, et al. Improving maltodextrin specificity for enzymatic synthesis of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid by site-saturation engineering of subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *J Biotechnol*, 2013, 166: 198–205.
- [22] Leemhuis H, Rozeboom HJ, Wilbrink M, et al. Conversion of cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase by directed evolution: the role of alanine 230 in acceptor subsite +1. *Biochem*, 2003, 42(24): 7518–7526.
- [23] Li Z, Li B, Gu Z, et al. Extracellular expression and biochemical characterization of α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *Carbohydr Res*, 2010, 345(7): 886–892.
- [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] 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.
- [26] Shindyalov IN, Bourne PE. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng*, 1998, 11(9): 739–747.
- [27] Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 1993, 26(2): 283–291.
- [28] Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 1991, 253(5016): 164–170.
- [29] Wallner B, Elofsson A. Can correct protein models be identified? *Protein Sci*, 2009, 12(5): 1073–1086.

(本文责编 陈宏宇)