

# 环糊精葡萄糖基转移酶 182 位点定点改造催化合成糖基化染料木素

柴宝成<sup>1,2</sup>, 姜钰琳<sup>1,2</sup>, 倪晔<sup>1,2</sup>, 韩瑞枝<sup>1,2</sup>

1 江南大学 生物工程学院, 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

柴宝成, 姜钰琳, 倪晔, 韩瑞枝. 环糊精葡萄糖基转移酶 182 位点定点改造催化合成糖基化染料木素. 生物工程学报, 2022, 38(2): 749-759.

CHAI BC, JIANG YL, NI Y, HAN RZ. Engineering the 182 site of cyclodextrin glucosyltransferase for glycosylated genistein synthesis. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 749-759.

**摘要:** 染料木素及其单糖苷衍生物在食品和医药领域具有重要作用, 但难溶于水的特性极大地限制了其应用范围, 研究表明糖基化反应可有效提高其水溶性。文中针对来源于软化芽孢杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶, 研究其对染料木素单糖苷衍生物槐角苷的糖基化反应。通过对 D182 位点的定点饱和突变, 突变酶 D182C 较 WT 转化率提高了 13.42%, 主要糖基化产物 (槐角苷单糖苷、二糖苷、三糖苷) 分别提高了 39.35%、56.05% 和 64.81%。酶学性质研究发现, D182C 较 WT 的环化、水解、歧化活力均有所提高。且最适 pH 和温度分别为 6 和 40 °C。动力学研究发现, D182C 针对底物 (糖基供体和受体) 的  $K_m$  值较 WT 均有所降低, 且催化效率  $k_{cat}/K_m$  则明显提高, 说明 D182C 对底物的亲和力相较于 WT 有大幅提升。同源建模及分子对接结果表明, 突变酶 D182C 糖基化效率提高的原因可能与底物作用力增加有关。

**关键词:** 染料木素; 槐角苷; 环糊精葡萄糖基转移酶; 水溶性; 定点饱和突变; 糖基化反应

Received: February 19, 2021; Accepted: April 30, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102700); National Natural Science Foundation of China (31871738, 21776112)

Corresponding author: HAN Ruizhi. Tel/Fax: +86-510-85329265; E-mail: hanrz@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2102700); 国家自然科学基金 (31871738, 21776112)

# Engineering the 182 site of cyclodextrin glucosyltransferase for glycosylated genistein synthesis

CHAI Baocheng<sup>1,2</sup>, JIANG Yulin<sup>1,2</sup>, NI Ye<sup>1,2</sup>, HAN Ruizhi<sup>1,2</sup>

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

**Abstract:** Genistein and its monoglucoside derivatives play important roles in food and pharmaceuticals fields, whereas their applications are limited by the low water solubility. Glycosylation is regarded as one of the effective approaches to improve water solubility. In this paper, the glycosylation of sophoricoside (genistein monoglucoside) was investigated using a cyclodextrin glucosyltransferase from *Penibacillus macerans* (*PmCGTase*). Saturation mutagenesis of D182 from *PmCGTase* was carried out. Compared with the wild-type (WT), the variant D182C showed a 13.42% higher conversion ratio. Moreover, the main products sophoricoside monoglucoside, sophoricoside diglucoside, and sophoricoside triglucoside of the variant D182C increased by 39.35%, 56.05% and 64.81% compared with that of the WT, respectively. Enzymatic characterization showed that the enzyme activities (cyclization, hydrolysis, disproportionation) of the variant D182C were higher than that of the WT, and the optimal pH and temperature of the variant D182C were 6 and 40 °C, respectively. Kinetics analysis showed the variant D182C has a lower  $K_m$  value and a higher  $k_{cat}/K_m$  value than that of the WT, indicating the variant D182C has enhanced affinity to substrate. Structure modeling and docking analysis demonstrated that the improved glycosylation efficiency of the variant D182C may be attributed to the increased interactions between residues and substrate.

**Keywords:** genistein; sophoricoside; cyclodextrin glucosyltransferase; water solubility; site-specific saturation mutagenesis; glycosylation

染料木素 (4,5,7-三羟基异黄酮) 是一种重要的大豆异黄酮, 主要以其单苷形式, 如染料木苷 (genistein-7-O-glucoside) 和槐角苷 (genistein-4'-O-glucoside), 存在于许多豆科植物如大豆、三叶草、葛根、刺槐、金雀花等中<sup>[1]</sup>。染料木素及其糖苷衍生物作为重要的雌激素, 对多种疾病具有预防和治疗作用。例如, 染料木素具有抗氧化作用, 可通过抑制酪氨酸激酶和拓扑异构酶活性, 抑制癌细胞生成<sup>[2-4]</sup>。此外, 近期研究显示染料木素能促进脑神经再生, 促进昏迷者的觉醒<sup>[5]</sup>, 并且对于骨质疏松也有一定的治疗作用<sup>[6]</sup>。因此, 染料木素被广泛应用

于医药和食品领域<sup>[7]</sup>。

然而, 染料木素及其单苷衍生物难溶于水, 严重限制了其应用范围。研究表明, 糖基化反应可以有效提高染料木素的水溶性。例如, 染料木素单糖苷、二糖苷和三糖苷衍生物水溶性分别较染料木素提高了 5 倍、3 700 倍和 44 000 倍<sup>[8-9]</sup>。同时, 这些糖苷衍生物在体内可分解成染料木素和葡萄糖, 不会影响染料木素的生物活性和生物功能。

环糊精葡萄糖基转移酶 (CGTase)<sup>[10]</sup>具有环化、耦合、水解和歧化等多种催化功能<sup>[6,11]</sup>, 常被用于催化转糖基反应。研究表明 CGTase

可以用于缓解甜菊苷苦味<sup>[12]</sup>,降低甾体皂苷的细胞毒性<sup>[13]</sup>、AA-2G (糖基化抗坏血酸)的酶法合成等<sup>[14]</sup>。本课题组前期构建了来自软化芽孢杆菌 (*Penibacillus macerans*) 的 CGTase (*PmCGTase*),并用于催化染料木素糖基化反应,发现可生成槐角苷及其多糖基衍生物,但是糖基化效率低<sup>[15]</sup>。因此,通过蛋白质工程策略提高环糊精葡萄糖基转移酶的糖基化效率显得尤为重要。

近年来,基于计算机设计的半理性与理性设计策略已成为蛋白质工程领域新的学术思想与技术手段<sup>[16]</sup>。通过计算机辅助蛋白质设计,结合定向进化方法,可实现蛋白质快速精准的改造。例如,孙周通课题组<sup>[17]</sup>采用聚焦理性迭代定点诱变策略 (focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM) 对 UGT74AC2 进行半理性改造,有效地提高了糖基转移酶对底物的区域选择性。本课题组前期通过半理性设计对 *PmCGTase* 的关键位点 (如 A156、A166 和 L174) 进行改造,改善其产物特异性,并揭示了 pH 对 *PmCGTase* 产物特异性的调控机制<sup>[18]</sup>。

本研究分别以染料木素单苷衍生物槐角苷和可溶性淀粉为糖基受体和糖基供体,针对 *PmCGTase* 关键位点 D182 进行饱和突变,从而提高其糖基化效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和试剂

#### 1.1.1 质粒和菌株

重组质粒 pET-20b(+)/*PmCGTase* (GenBank

Accession No. JX412224) 是本课题组前期构建并保藏的。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 购于 TaKaRa 公司。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 固体培养基需添加 2% 的琼脂粉。

TB 培养基 (g/L): 蛋白胨 12, 酵母粉 24, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.43, 甘油 5。

#### 1.1.3 酶

*Taq* 酶、限制性内切酶 (*Bam*H I、*Xho* I、*Dpn* I) 以及高保真 PCR 聚合酶 KOD 购于 TaKaRa 公司。

#### 1.1.4 试剂

槐角苷购自国药集团化学试剂有限公司; 甲基橙购自北京伊诺凯科技有限公司。引物合成及 DNA 测序由天霖生物科技有限公司完成。

### 1.2 PCR 引物的设计

*PmCGTase* 182 位点定点饱和突变引物如表 1 所示。

### 1.3 突变体的获得

采用高保真酶 KOD 对 D182 位点进行定点饱和突变。反应条件如下: 98 °C 5 min; 98 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物在经过 *Dpn* I 消化 1 h 后,转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态中。挑选单菌落至 96 孔板中,每孔含有 300 μL 的 LB 培养基与 100 μg/mL 的氨苄青霉素, 37 °C、200 r/min 培养 8 h 后,转接 100 μL 菌液至每孔含有 900 μL 的 TB 培养基与 100 μg/mL 的氨苄青霉素的 96 孔板中。25 °C 培养 48 h 后

表 1 CGTase 突变体引物设计

Table 1 Primer sequences used to amplify the mutated CGTase

Primer name	D182	Size (bp)
Forward primer (5'→3')	AACGGCGGTACGNNKTTTAGTAC	23
Reverse primer (5'→3')	ACTAAAMMNCGTACCGCCGTTGT	23

The bold letters indicate the bases of the mutation sites. N: A, G, C, T; K: T, G; M: A, C.

4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集上清发酵液。吸取 50  $\mu$ L 发酵液, 加入至每孔含有 200  $\mu$ L 麦芽糊精溶液 ( $W:V=1:100$ , 溶于 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 6.0) 中) 的 96 孔板中, 40 °C 孵育 10 min 之后, 立即加入 250  $\mu$ L 的 1 mmol/L 的盐酸终止反应, 接着加入 250  $\mu$ L 的溶于 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 6.0) 的 0.1 mmol/L 的甲基橙溶液。室温下静置 20 min 后在 505 nm 下测定吸光度。并计算出  $\Delta OD_{505}$  ( $\Delta OD_{505}=OD_{505}(\text{mutant})-OD_{505}(\text{WT})$ ),  $\Delta OD_{505}$  的数值越大代表突变酶相较于 WT 环化活力提升越大。

#### 1.4 活力测定

采用甲基橙法测定环化活力<sup>[19]</sup>。将 0.1 mL 的酶液加入到 0.9 mL 的麦芽糊精溶液中 ( $W:V=1:100$ , 溶于 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 6.0) 中), 40 °C 孵育 10 min 之后, 立即加入 1 mL 的 1 mmol/L 的盐酸终止反应, 接着加入 1 mL 的溶于 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 6.0) 的 0.1 mol/L 的甲基橙溶液。室温下静置 20 min 后于 505 nm 处测定吸光度。一个酶活单位定义为每 1 min 生成 1  $\mu$ mol  $\alpha$ -环糊精所需要的酶量。

采用 DNS 显色法测定水解活力<sup>[20]</sup>。将 0.1 mL 的酶液加入到 0.9 mL 的可溶性淀粉溶液中 ( $W:V=1:100$ , 溶于 0.2 mol/L 的乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) 中), 50 °C 孵育 10 min 后, 加入 3 mL DNS 溶液, 沸水中煮 7 min 后立即用冰水浴冷却, 定容至 10 mL 混匀, 于 540 nm 处测定吸光度。一个酶活单位定义为每 1 min 生成 1  $\mu$ mol 还原糖所需要的酶量。

歧化活力<sup>[21]</sup>: 将 300  $\mu$ L 的 4 mmol/L EPS 与 300  $\mu$ L 的 200 mmol/L 麦芽糖混合 50 °C 预热 10 min, 加 100  $\mu$ L 酶液反应 10 min 后加 50  $\mu$ L 的 3 mol/L 盐酸灭酶, 5 min 后加入 50  $\mu$ L 的 3 mol/L NaOH 中和后加 100  $\mu$ L  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在 60 °C 下反应 1 h。之后加 100  $\mu$ L 的 1 mol/L

的碳酸钠调至 pH 8.0。用分光光度计 (石英比色皿) 测对硝基苯酚浓度 (400 nm)。一个单位活力被定义为每 1 min 转移 1  $\mu$ mol EPS 的酶量。

#### 1.5 糖基化反应

初始反应体系 (1 mL) 包括 200  $\mu$ L 槐角苷 (1 g/L) 溶于二甲基亚砜 (DMSO), 600  $\mu$ L 水溶性淀粉 (10 g/L) 溶于 PBS 缓冲液 (pH 6.5), 200  $\mu$ L 纯化后的 CGTase (50 U/mL) 溶于 PBS 缓冲液 (pH 6.5)。整个反应溶液混合在 2 mL 封闭管中, 40 °C、120 r/min 的摇床中反应 24 h。然后用高效液相色谱法测定反应产物。转化率=(底物减少峰面积/底物初始峰面积) $\times$ 100%。

#### 1.6 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析

采用 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统, 采用 250 mm $\times$ 4.6 mm Diamonasil C18 色谱柱, Agilent 1260 WVD 检测器 254 nm 定量染料木素及其糖基化产物。流动相为溶液 A (水:磷酸=100:0.1,  $V/V$ ) 和溶液 B (乙腈)。梯度洗脱条件为: 在 15 min 内流动相从 A:B=85:15 逐渐线性变化为 A:B=15:85, 柱温为 30 °C, 流速为 0.8 mL/min。用自动进样器进行高效液相色谱分析, 进样量为 10  $\mu$ L。

#### 1.7 pH 对反应的影响

测定纯化后的 *Pm*CGTase (wild type, WT) 及突变酶在不同 pH 值 (pH 4.0–8.0) 的缓冲液中糖基化反应的转化率以及产物产量, 分析 WT 及其突变酶的最适反应 pH 值。其中缓冲液为柠檬酸磷酸氢二钠缓冲液 (pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)。

#### 1.8 温度对反应的影响

测定纯化后的 WT 及突变酶在不同温度 (20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C) 下的转化率以及产物产量, 分析 WT 及其突变酶的最适反应温度。

#### 1.9 动力学参数测定

分别以槐角苷 (0.05、0.10、0.20、0.40、

1.00 g/L) 和可溶性淀粉 (0.6、1.5、3.0、6.0、12.0 g/L) 为糖基受体和糖基供体, 在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 40 °C 反应 20 h 测定野生型和突变型 CGTase 的动力学参数。其中一种底物的浓度是恒定的, 并研究另一种底物浓度对底物转化率的影响。最后, 底物浓度增加, 产物浓度不增加。结果使用 GraphPad Prism 5 进行分析。将实验结果拟合到以下公式<sup>[13]</sup>:

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

其中  $v$  是反应速率 (g/(L·mg·min));  $V_{\max}$  是最大的反应速率 (g/(L·mg·min));  $a$  和  $b$  是供体 (水溶性淀粉) 和受体 (槐角苷) 浓度(g/L),  $A$  和  $B$  分别是供体 (可溶性淀粉) 和受体 (槐角苷)。

### 1.10 同源建模及分子对接

以来源于 *P. macerans* 的 CGTase 的晶体结构 (PDB 登录号: 4JCL) 为模板构建了 *PmCGTase* 及其突变体的结构模型。使用 Discovery Studio Client 4.5 和基于 CHARMM 力场的 CDOCKER 对接算法完成以染料木素为小分子的分子对接计算。使用交互式增长和随后的标准参数评分评价对接结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PmCGTase* 糖基化反应

如图 1A 所示, 糖基供体可在环糊精葡萄糖基转移酶歧化作用下转移糖基至底物槐角苷, 同时水解反应可使长链糖基化槐角苷水解成为短链糖基化槐角苷。分别以槐角苷与可溶性淀粉作为糖基受体和供体, 通过 *PmCGTase* 催化糖基化反应, 并对反应产物进行 HPLC 分析。结果如图 1B 所示, 除了底物槐角苷 (图中对应的峰 4) 外, 主要有 3 种产物生成 (分别对应峰 1、2、3)。根据前期本实验室液相质谱研究结果<sup>[17]</sup>

得知, 产物峰 1、2、3 分别为槐角苷三糖苷衍生物 ( $G_3S$ )、槐角苷二糖苷衍生物 ( $G_2S$ )、槐角苷单糖衍生物 ( $G_1S$ )。根据前期文献报道, 染料木素单糖苷、二糖苷和三糖苷衍生物 (即对应  $S$ 、 $G_1S$ 、 $G_2S$ ) 水溶性分别较染料木素提高了 5 倍、3 700 倍和 44 000 倍<sup>[8-9]</sup>, 由此证明染料木素糖基化衍生物水溶性获得显著改善。为了提高 *PmCGTase* 糖基化效率及这 3 种主要产物的产量, 针对 *PmCGTase* 进行分子改造是十分必要的。

### 2.2 *PmCGTase* 的突变位点选择

CGTase 属于  $\alpha$ -淀粉酶家族, 催化中心包括 3 个氨基酸, 包括 E258、D229、D329<sup>[6]</sup>。将 CGTase 的晶体结构 (PDB: 4JCL) 与染料木素进行分子对接, 得到与染料木素有相互作用力的一系列位点。如图 2 所示, 除了催化三联体中 E258 和 D329 外, 在催化中心附近存在氨基酸 F183, D182 与染料木素存在作用力。F183 与染料木素之间存在  $\pi$ - $\pi$  T 形相互作用力, 但对 F183 位点进行饱和突变, 发现突变体呈失活状态, F183 可能为较为保守的氨基酸。D182 位点与底物染料木素之间存在范德华力。本研究对 D182 位点进行饱和突变, 突变后粗酶环化活力测定, 发现突变酶 D182C、D182S、D182G 具有活力。通过镍柱纯化后获得 WT 以及突变酶 D182C、D182S、D182G 纯酶, 并进行后续研究。

### 2.3 D182 位点突变酶转糖基反应

WT 以及突变酶 D182C、D182S、D182G 在 40 °C、pH 6.0 的反应条件下反应 20 h 后, 对其糖基化产物进行测定。如图 3A 所示, 结果显示突变酶 D182C 在底物转化率上相较于 WT 提高比较明显, 从 57.76% 提升至 71.18%。而 D182S 与 D182G 的底物转化率相较于 WT 并没有明显的改变。

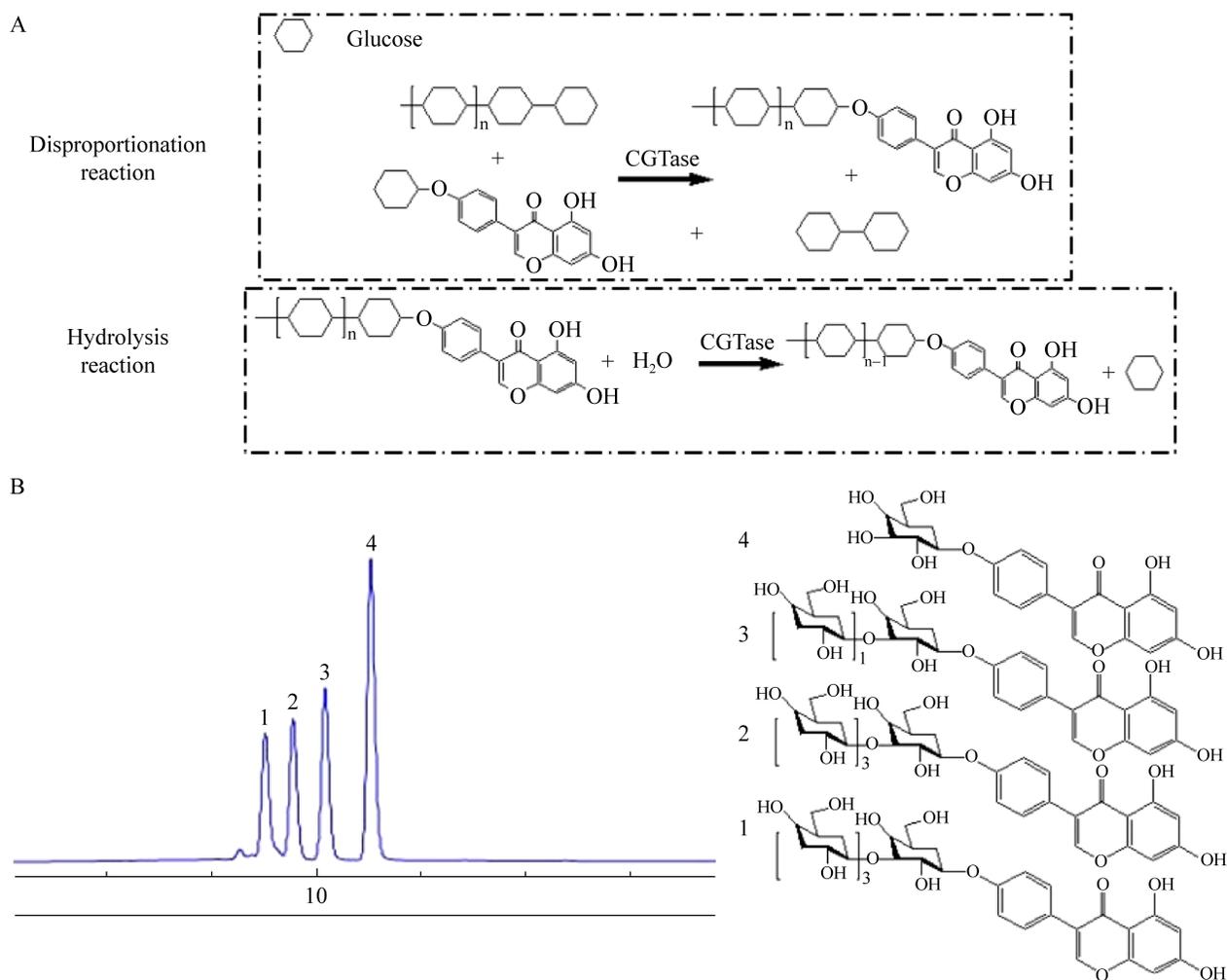


图1 *PmCGTase* 糖基化反应示意图及反应高效液相色谱图

Figure 1 Schematic representation of the glycosylation reaction (disproportionation and hydrolysis) catalyzed by *PmCGTase* (A) and the HPLC profile of the reaction and the structure of glycosidated sophoroside. 1: sophoricoside triglucoside; 2: sophoricoside diglucoside; 3: sophoricoside monoglucoside; 4: sophoricoside (B).

由于转化率的提高, 所生成主要产物产量也随之提高。如图 3B 所示, D182C 的单糖苷产物 ( $G_1S$ )、二糖苷产物 ( $G_2S$ )、三糖苷产物 ( $G_3S$ ) 产量分别较 WT 提高 39.35%、56.05% 和 64.81%。而 D182S 与 D182G 相较于 WT 来说没有太大的变化。

#### 2.4 WT 及突变酶酶活测定

对 WT 以及突变酶 D182C、D182S、D182G

的环化活力、水解活力、歧化活力比酶活进行测定, 结果如表 2 所示。相较于 WT, 突变酶 D182C 环化活力提高 42.76%, 水解活力提高 18.99%, 歧化活力提高 48.78%。而 D182S 和 D182G 虽然环化活力和水解活力有所提高, 但歧化活力变化不大。由此可见, 歧化反应对于转糖基反应更为关键。后续针对突变酶 D182C 进行进一步酶学性质研究。

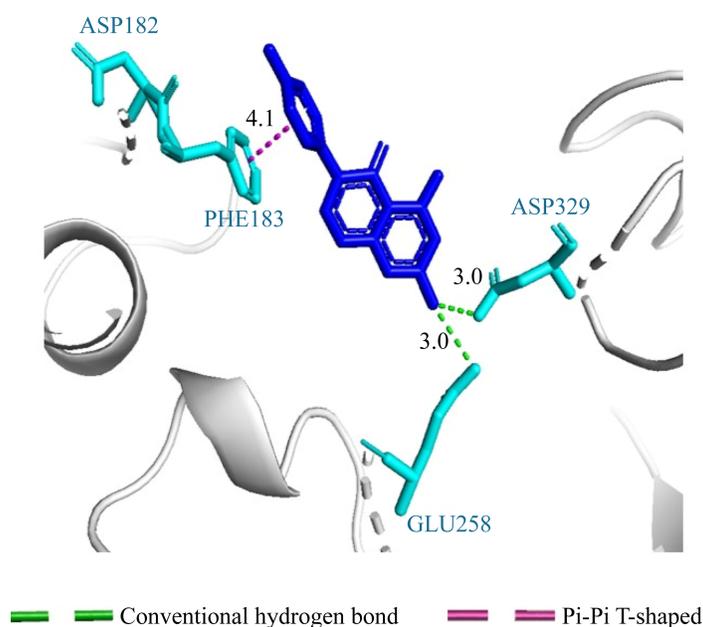


图 2 CGTase 晶体结构与底物染料木素对接结果

Figure 2 The crystal structure of CGTase (PDB: 4JCL) and the molecular docking results with genistein.

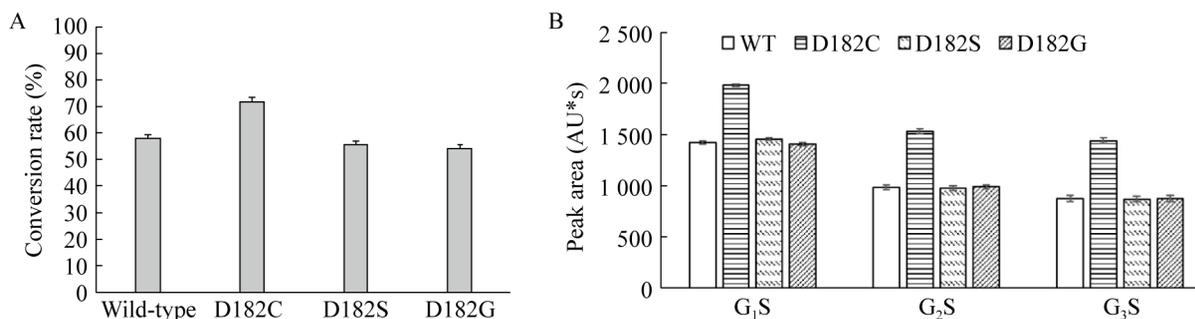


图 3 WT 及突变酶转化率 (A) 以及主要糖基化产物对比 (B)

Figure 3 Comparison of substrate conversion (A) and glycoside products (B) between the WT and the variants D182C, D182S, and D182G. Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean is <5%.

表 2 D182 位点突变体活力测定

Table 2 Comparison of activities of the WT and the variants D182C, D182S, and D182G

Enzymes	$\alpha$ -cyclization activity (U/mg)	Hydrolytic activity (U/mg)	Disproportionation activity (U/mg)
WT	8.7±1.2	7.9±0.1	4.1±0.1
D182C	15.2±1.1	9.4±0.2	6.1±0.2
D182S	13.2±0.9	9.5±0.1	4.3±0.1
D182G	13.5±0.6	9.3±0.1	4.2±0.1

## 2.5 pH 对 WT 及 D182C 转糖基反应的影响

为了探究 pH 对于转糖基反应的影响,测定了不同 pH 条件下 (pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) WT 以及突变酶 D182C 的转化率以及主要糖基化产物 (图 4)。WT 在 pH 6.0 时有最高的转化率, D182C 在 pH 5.0 时有最高的转化率 (图 4C), 随着 pH 的上升与下降, 转化率均降低, WT 各糖苷产物在 pH 6.0 时产量达到最高。

D182C 各糖苷产物在 pH 5.0 时产量达到最高。当 pH 4.0 时, WT 和 D182C 催化合成的多糖苷产物产量高于少糖苷产物 ( $G_3S > G_2S > G_1S$ ), 而在当 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 时, 结果却相反 ( $G_1S > G_2S > G_3S$ ) (图 4B)。这可能是由于 pH 4.0 时 WT 和 D182C 的酶活损失较大所致。

## 2.6 温度对 WT 及 D182C 转糖基反应的影响

为了探究温度对于转糖基反应的影响, 测定了不同温度下 (20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C) WT 以及突变酶 D182C 的转化率以及主要的糖基化产物 (图 5)。WT 与突变体 D182C 均在 40 °C 时有最高的底物转化率 (图 5C), 随着温度的上升与下降, 底物转化率均降低, WT 与 D182C 各糖苷产物在 40 °C 时达到最高产

量 (图 5A–5B)。

## 2.7 动力学参数

通过研究不同浓度下底物槐角苷 (0.05、0.10、0.20、0.40、1.00 g/L) 以及不同浓度下可溶性淀粉 (0.6、1.5、3.0、6.0、12.0 g/L) 的底物转化率, 来求得 WT 以及突变酶 D182C 的动力学常数。如表 3 所示, 相较于 WT, 突变酶 D182C 亲和力发生了改变。突变酶 D182C 的  $k_{cat}$  值为 WT 的 2.22 倍, 针对糖基受体槐角苷而  $K_m$  下降了 14.7%, 对糖基供体可溶性淀粉  $K_m$  下降了 20.7%。D182C 的催化效率  $k_{cat}/K_m$  值分别为 WT 的 2.6 倍 (槐角苷) 和 2.8 倍 (可溶性淀粉)。突变酶 D182C 亲和力相较于 WT 有了明显提升, 可能为糖基化效率提高的原因。

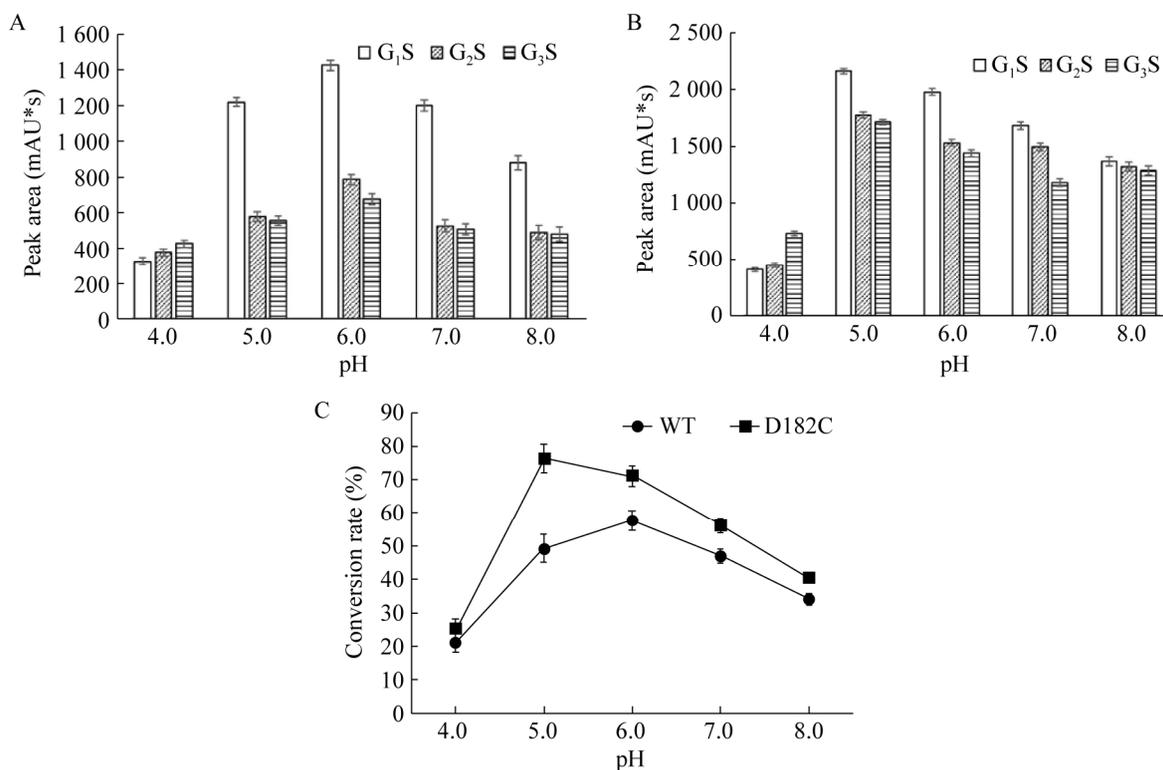


图 4 pH 对 WT (A)、D182C (B) 转糖基反应的各产物产量以及底物槐角苷转化率 (C) 的影响

Figure 4 Effect of pH on glycosylation of the WT and the variant D182C. Effect of pH on the yield of products by the WT (A) and the variant D182C (B). (C) Effects of pH on conversion of sophoricoside by the WT and the variant D182C. Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean is <5%.

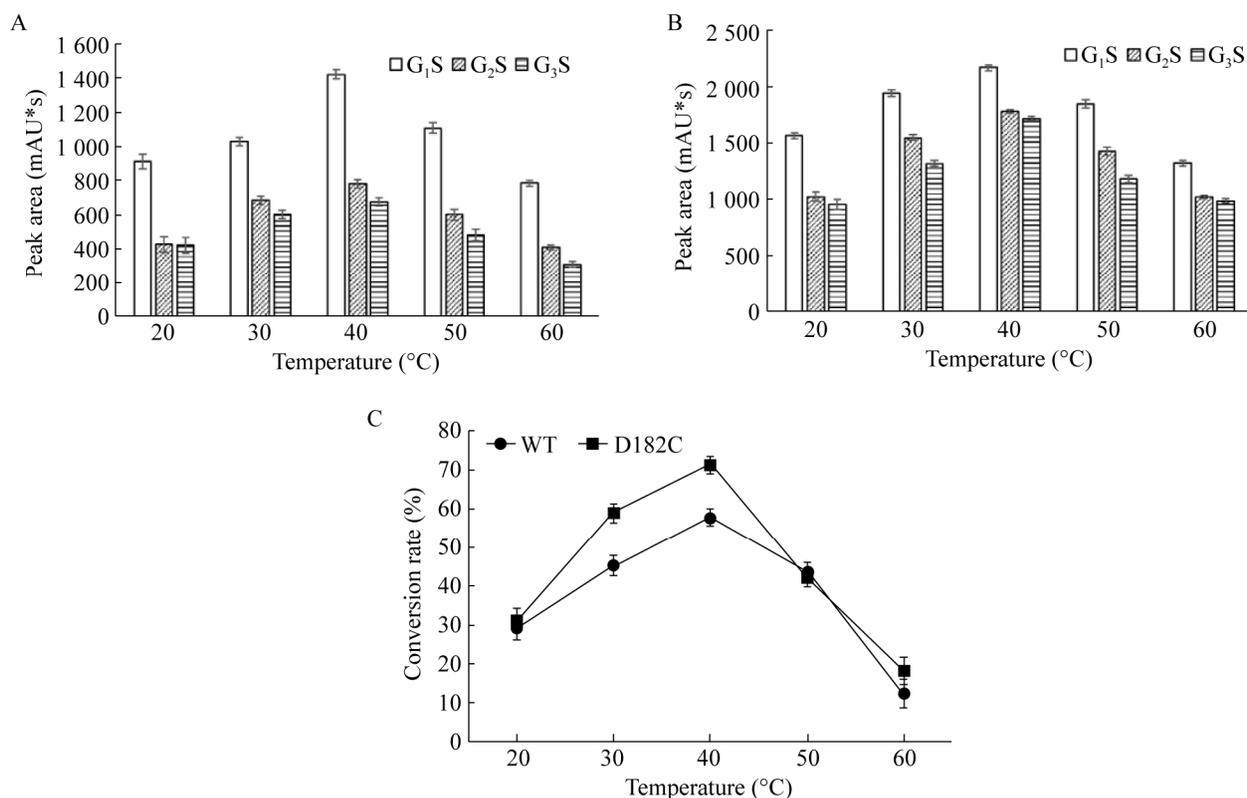


图 5 温度对 WT (A)、D182C (B) 转糖基反应的各个产物产量以及底物槐角苷转化率 (C) 的影响  
Figure 5 Effect of temperature on glycosylation of the WT and the variant D182C. Effect of temperature on the yield of products by the WT (A) and the variant D182C (B). (C) Effects of temperature on conversion of sophoricoside by the WT and the variant D182C. Each value represents the mean of three independent measurements, and the deviation from the mean is <5%.

表 3 WT 及突变酶 D182C 动力学参数

Table 3 Determination of kinetic parameters of the WT and the variant D182C

Enzyme	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{mA}$ (g/L)	$k_{cat}/K_{mA}$ (L/(g·min))	$K_{mB}$ (g/L)	$k_{cat}/K_{mB}$ (L/(g·min))
WT	$0.32 \pm 0.12$	$0.34 \pm 0.21$	0.94	$3.43 \pm 0.13$	$9.33 \times 10^{-2}$
D182C	$0.71 \pm 0.15$	$0.29 \pm 0.11$	2.44	$2.72 \pm 0.15$	$26.11 \times 10^{-2}$

A: sophoricoside; B: soluble starch.

## 2.8 PmCGTase 和突变酶 D182C 与染料木素的分子对接

将突变酶结构与底物进行分子对接, 如图 6 所示, 当天冬氨酸突变为半胱氨酸后, 酶与底物之间的作用力变多。在 WT 与染料木素的对接结果中 (图 6A), 仅有 D182 与底物之间的范德华力, F183 与底物之间的  $\pi$ - $\pi$  T 形相互作用力, 以

及催化中心 D329、E258 与底物之间的氢键作用。在 D182 与底物之间的对接结果中 (图 6B), 虽然少了 D182 的范德华力, 但是 A230 与底物产生了新的氢键作用, 并且催化中心 D329、E258 与底物之间多出了阴离子- $\pi$  作用力。突变酶底物转化率的提高, 可能正是因为底物与酶之间作用力的增加, 从而提高了酶与底物的亲和力。

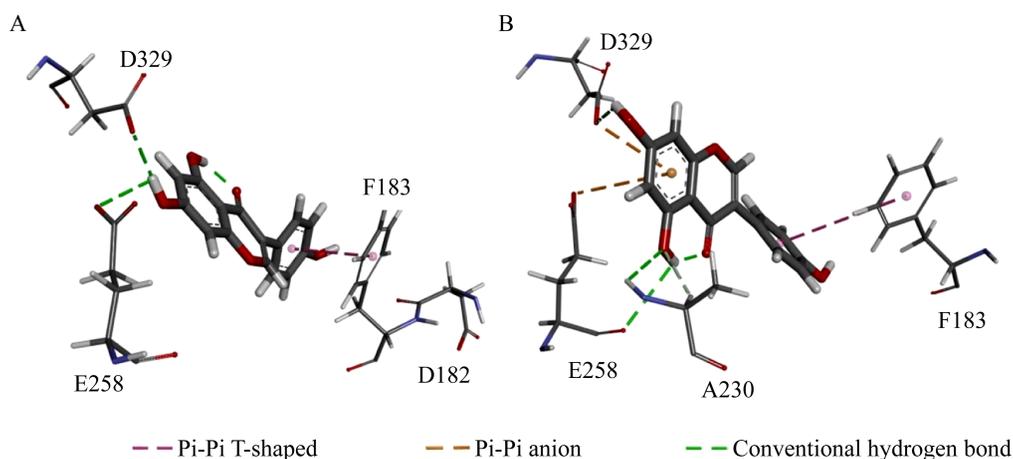


图6 WT (A) 和 D182C (B) 与染料木素对接结果  
Figure 6 Docking results of the WT (A) and the variant D182C (B).

### 3 结论

染料木素及单糖苷衍生物（如槐角苷和染料木苷）具有较高的药用价值，然而其极低的水溶性限制了其应用范围。本研究通过 *PmCGTase* 催化将槐角苷糖基化，提高其水溶性。通过 *PmCGTase* 的晶体结构与底物染料木素进行对接，找到了与底物具有范德华力作用的位点 D182，通过定点饱和突变和高通量筛选，得到具有活力的突变酶 D182C、D182S、D182G。蛋白纯化后对其糖基化反应进行了考察，发现突变酶 D182C 转化率较 WT 提高了 13% 左右，且主要糖基化产物 ( $G_1S$ 、 $G_2S$ 、 $G_3S$ ) 产量也有较大提高。而 D182S、D182G 糖基化效率相较于 WT 变化不大。酶学性质研究发现，突变酶 D182C 的环化活力、歧化活力和水解活力均有所提高。WT 与 D182C 最适反应 pH 分别为 6.0 和 5.0，最适反应温度均为 40 °C。动力学结果显示，突变酶 D182C 对于底物的亲和力和催化效率相较于 WT 有了明显提升。随后通过同源建模及分子对接，发现 182 位点的天冬氨酸突变为半胱氨酸之后，影响了活性中心周围氨基

酸空间结构，A230 位点与底物产生了新的氢键作用力。并且催化中心 D329 和 E258 与底物之间多出了阴离子- $\pi$  相互作用。因此，作用力的增多可能是突变酶底物亲和力提高以及糖基化效率提高的原因。

### REFERENCES

- [1] Kim SH, Kim CW, Jeon SY, et al. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of genistein, a soy isoflavone, upon cancer development and progression in preclinical animal models. *Lab Anim Res*, 2014, 30(4): 143-150.
- [2] Choi EJ, Kim T, Lee MS. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Sci*, 2007, 80(15): 1403-1408.
- [3] Gruca A, Krawczyk Z, Szeja W, et al. Synthetic genistein glycosides inhibiting EGFR phosphorylation enhance the effect of radiation in HCT 116 colon cancer cells. *Molecules*, 2014, 19(11): 18558-18573.
- [4] Kato K, Takahashi S, Cui L, et al. Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(8): 786-791.
- [5] Han R, Li J, Shin HD, et al. Fusion of self-assembling amphipathic oligopeptides with cyclodextrin glycosyltransferase improves 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis with soluble starch as the

- glycosyl donor. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(15): 4717-4724.
- [6] Han R, Li J, Shin HD, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2): 415-428.
- [7] Boué SM, Wiese TE, Nehls S, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(8): 2193-2199.
- [8] Li D, Roh SA, Shim JH, et al. Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16): 6516-6524.
- [9] Koirala N, Pandey RP, van Thang D, et al. Glycosylation and subsequent malonylation of isoflavonoids in *E. coli*: strain development, production and insights into future metabolic perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(11): 1647-1658.
- [10] Go YH, Kim TK, Lee KW, et al. Functional characteristics of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-31 highly specific for intermolecular transglycosylation of bioflavonoids. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(9): 1550-1553.
- [11] van der Veen BA, van Alebeek GJ, Uitdehaag JC, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *Eur J Biochem*, 2000, 267(3): 658-665.
- [12] Jung SW, Kim TK, Lee KW, et al. Catalytic properties of  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-12 and intermolecular transglycosylation of stevioside. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2007, 12(3): 207-212.
- [13] Wang YZ, Feng B, Huang HZ, et al. Glucosylation of steroidal saponins by cyclodextrin glucanotransferase. *Planta Med*, 2010, 76(15): 1724-1731.
- [14] Zhang ZC, Li JH, Liu L, et al. Enzymatic transformation of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by  $\alpha$ -cyclodextrin glucanotransferase from recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2011, 16(1): 107-113.
- [15] Han RZ, Ge BB, Jiang MY, et al. High production of genistein diglucoside derivative using cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(9): 1343-1354.
- [16] Qu G, Zhu T, Jiang YY, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2019, 35(10): 1843-1856.
- [17] Li J, Qu G, Shang N, et al. Near-perfect control of the regioselective glucosylation enabled by rational design of glycosyltransferases. *Green Synth Catal*, 2021, 2(1): 45-53.
- [18] Han RZ, Ni J, Zhou JY, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reveals pH-regulated mechanism of enhanced long-chain glycosylated sophoricoside specificity. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(7): e00004-20.
- [19] 刘虹, 顾正彪, 洪雁, 等. 甲基橙褪色分光光度法定量测定  $\alpha$ -环糊精. *中国粮油学报*, 2008, 23(5): 186-189.
- Liu H, Gu ZB, Hong Y, et al. Fading spectrophotometric determination of  $\alpha$ -cyclodextrin with methyl orange. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2008, 23(5): 186-189 (in Chinese).
- [20] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定. *河南农业科学*, 2010, 39(4): 115-118.
- Wang JL, Nie GX, Li SZ, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method. *J Henan Agric Sci*, 2010, 39(4): 115-118 (in Chinese).
- [21] van der Veen BA, Uitdehaag JCM, Dijkstra BW, et al. The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *Eur J Biochem*, 2000, 267(12): 3432-3441.

(本文责编 郝丽芳)