

来源于 *Bacillus circulans* 的重组 β -CGT 酶的分离纯化及其生化性质分析

李才明^{1,2,3}, 黄敏¹, 顾正彪^{1,2,3}, 洪雁^{1,2,3}, 程力^{1,2,3}, 李兆丰^{*1,2,3}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 作者将来源于 *Bacillus circulans* STB01 的重组 β -CGT 酶进行分离纯化, 并对其生化性质进行了分析。结果表明, 采用 Phenyl HP 柱疏水层析、Q-HP 柱阴离子交换层析两步能很好的对重组 β -CGT 酶进行纯化, 酶的回收率达到 45.3%。重组 β -CGT 酶的表现相对分子质量约为 76 500, 且相对分子质量呈单分散, 说明酶蛋白分子在溶液中是以单聚体形式存在。该酶的最适 pH 为 6.5, 且在甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中体现出更好的热稳定性; 最适温度为 60 °C。该酶的活性不依赖于金属离子, 在酶催化反应的整个过程中, 其主要产物均为 β -环糊精。以玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉为底物时, 该酶环化反应的动力学性质不符合米氏方程; 而分别以可溶性淀粉、麦芽糊精(DE 5、15、25)为底物时, 其环化反应的动力学性质能用米氏方程很好的进行描述。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶; 环糊精; 枯草杆菌; 分离纯化; 生化性质

中图分类号: Q 555 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)04-0360-09

Purification and Characterization of Recombinant β -CGTase From *Bacillus circulans* STB01

LI Caiming^{1,2,3}, HUANG Min¹, GU Zhengbiao^{1,2,3}, HONG Yan^{1,2,3}, CHENG Li^{1,2,3}, LI Zhaofeng^{*1,2,3}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Collaborative Innovation Center for Food Safety and Quality Control, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: According to the wild used of cyclodextrin, the cyclodextrin glycosyltransferase (EC 2.4.1.19, CGTase) used to product cyclodextrins industrially has become the focus of scientific research nowadays. In this study, the purification and characterization of recombinant β -CGTase from *Bacillus circulans* STB01 were measured. The results showed that the recombinant β -CGTase could be purified by a combination of Phenyl HP hydrophobic chromatography and Q-HP anion

收稿日期: 2016-01-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31701645); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150146); 中国博士后科学基金面上项目(2015M570406); 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心产业发展项目。

作者简介: 李才明(1984—), 男, 江西泰和人, 工学博士, 讲师, 主要从事淀粉生物技术研究。E-mail: caimingli@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 李兆丰(1979—), 男, 湖南益阳人, 工学博士, 教授, 主要从事淀粉生物技术研究。E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 李才明, 黄敏, 顾正彪, 等. 来源于 *Bacillus circulans* 的重组 β -CGT 酶的分离纯化及其生化性质分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 360-368.

exchange chromatography. The recovery of the enzyme was 45.3%. The apparent molecular weights of the β -CGTase was about 76 500 and presented monodisperse, which indicated that the purified enzyme was a monomer in solution. The optimum cyclization reaction pH of the β -CGTase was 6.5, and showed more thermostable in glycine-NaOH buffer. The optimum cyclization reaction temperature was 60 °C. The thermostability of β -CGTase increased gradually with increased concentration of the enzyme. The function of β -CGTase did not required the metal cofactor. During the whole cyclization reaction, β -cyclodextrin was the main product. The kinetics of the β -CGTase catalyzed cyclization reaction could not be described by the Michaelis-Menten equation with corn starch, potato starch or cassava starch as the substrate. However, the kinetics of cyclization reaction could be fairly well described by the Michaelis-Menten equation while used soluble starch or maltodextrins (DE 5, 15, 25) as the substrate, respectively.

Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase, cyclodextrin, *Bacillus subtilis*, purification, characterization

环糊精(Cyclodextrin), 又称 Schardinger 糊精、环聚葡萄糖等, 是由 6 个及以上 D-吡喃葡萄糖通过 α -1,4 糖苷键连接而成的环状低聚物^[1-3]。最常用的环糊精主要有 3 种, 为 α -、 β -和 γ -环糊精, 分别由 6、7 和 8 个葡萄糖残基分子构成, 这 3 种环糊精又统称为基础环糊精^[4]。环糊精的空间结构呈中空圆筒形^[5], 其外部含有葡萄糖单元 C-2、C-3 以及 C-6 的羟基, 导致外部亲水; 而其内腔含有醚键氧原子以及 C-3 和 C-5 上的氢原子, 所以内腔疏水^[6]。正因为这种特性, 使得环糊精在食品、农业、生物、医药、化工等领域具有广泛的用途^[7-9]。

环糊精的工业化生产均采用酶法工艺, 即在环糊精葡萄糖基转移酶 (EC2.4.1.19, Cyclodextrin glucanotransferase 或 Cyclodextrin glycosyltransferase, 简称 CGT 酶) 的催化作用下通过环化反应转化淀粉或相关基质而生成环糊精^[10-12]。根据 CGT 酶催化反应初始阶段所产生主要环糊精的种类, 可将 CGT 酶分为 3 种类型, 即 α -CGT 酶、 β -CGT 酶、 γ -CGT 酶^[13]。

在前期研究中, 来源于 *Bacillus circulans* STB01 的 β -CGT 酶成功在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600 中实现了胞外过量表达, 为其工业化生产及应用打下了基础。为了促进重组 β -CGT 酶在工业上的应用, 有必要全面分析其生化性质。虽然来源于 *B. circulans* 的 β -CGT 酶的一些生化性质已有报道^[14-17], 但关于其不同 pH 下的热稳定性、酶浓度对其热稳定性的影响尚未见报道, 而且有关金属离子对 β -

CGT 酶环化活力影响的报道也不是很全面, 尤为明显的是, 大部分针对生化性质的研究主要是围绕 CGT 酶的水解活力进行开展, 而非以其特征反应的环化活力为指标进行评价。研究报道显示, CGT 酶催化水解反应和环化反应的最佳条件存在明显差异^[18-19], 而环化反应是其工业应用的基础, 因此, 有必要以环化活力为评价指标对 β -CGT 酶的生化性质进行全面分析。

作者主要对重组 β -CGT 酶发酵上清液进行分离纯化, 然后以环化活力为评价指标全面分析其生化性质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和菌株 环状芽孢杆菌 *B. circulans* STB01、*E. coli* JM109、宿主菌 *B. subtilis* WB600、质粒 pST 均保藏于本实验室。

1.1.2 主要试剂与材料 酵母粉和胰蛋白胨: 购自英国 Oxoid 公司; α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、牛血清蛋白标准品: 购自 Sigma-Aldrich (上海) 公司; 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和标准相对分子质量蛋白: 购自碧云天生物技术有限公司; 卡那霉素、赤霉素: 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 疏水色谱填料 Phenyl HP、强阴离子交换色谱填料 Q-HP: 购自美国 Amersham 公司; 麦芽糊精 (DE=5、15、25): 购自法国罗盖特公司; 其它化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 主要仪器 PTC-200 型基因扩增仪:美国 MJ Research 公司产品;CR21GIII 冷冻立式离心机:日本 Hitachi 公司产品;蛋白核酸定量测定仪:德国 Eppendorf 公司产品;GelDoc 凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司产品;905 型超低温冰箱:美国 Thermo scientific 公司产品;Mini Protein 3 蛋白电泳系统:美国 Bio-Rad 公司产品;DAMN HELEOS-II 多角度激光光散射凝胶色谱系统(配:Waters 1525 Binary HPLC 泵、Wyatt Optilab T-rEX 折光率检测器、Waters 2489 紫外检测器、DAMN HELEOS-II Wyatt MALLS 检测器):美国 Wyatt Technology 公司产品;高效液相色谱(HPLC)系统:美国 Agilent Technologies 公司产品。

1.1.4 培养基 种子培养基为 LB 培养基,发酵培养基为 TB 培养基,固体平板培养基为添加质量分数 1.5%琼脂的 LB 培养基;培养基的具体配制方法参照文献[20]进行。

1.2 实验方法

1.2.1 重组 β -CGT 酶的生产

1)种子培养 将 -80°C 冰箱中保藏的甘油管菌株接 100 μL 至装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,接种量为体积分数 0.1%, 37°C 摇床(200 r/min)培养过夜。接种前添加终质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素和赤霉素。

2)发酵培养 将 LB 培养基中活化的枯草杆菌种子液以体积分数 4%的接种量接入装有 50 mL TB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37°C 摇床(200 r/min)振荡培养 48 h,接种前添加终质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的赤霉素。

发酵培养结束后,将发酵液于 4°C 、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液即为重组 β -CGT 酶粗酶液。

1.2.2 重组 β -CGT 酶的纯化 β -CGT 酶的纯化采用两步法:

第一步,疏水 Phenyl HP 柱(CV 50 mL)。缓冲液 A_1 为含 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH 6.5),缓冲液 B_1 为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5);重组 β -CGT 酶粗酶液在 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)中透析 48 h,一边搅拌一边缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体至终浓度为 1 mol/L,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤;用 5 个柱体积的缓冲液 A_1 平衡疏水 Phenyl HP 柱;上样,流速为 10 mL/min;分别用

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.8、0.6、0.4、0.2 mol/L)、缓冲液 B_1 、超纯水、0.5 mol/L NaOH 进行梯度洗脱,流量为 10 mL/min。

第二步,强阴离子交换 Q-HP 柱(CV 20 mL)。缓冲液 A_2 为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5),缓冲液 B_2 为缓冲液 A_2 + 1 mol/L NaCl;含有 β -CGT 酶的组分在缓冲液 A_2 中透析 48 h,上样,流量为 5 mL/min;分别用 NaCl(0.1、0.2、0.3、0.5、1 mol/L)、0.5 mol/L NaOH 进行梯度洗脱,流量为 5 mL/min。

β -CGT 酶通过测定酶活和 SDS-PAGE 进行鉴定,纯化 β -CGT 酶超滤浓缩后分装, -80°C 保存。

1.2.3 β -环化活力的测定 β -环化活力的测定采用酚酞法并作适当修改^[21-22],取适当稀释的酶液 0.1 mL,加入装有 0.9 mL 预先用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)配制的 1 g/dL 麦芽糊精(DE=5)溶液的试管中,在 50°C 下反应 10 min 后,加入 3.5 mL 30 mmol/L NaOH 和 0.5 mL 由 5 mmol/L Na_2CO_3 溶液配制的 0.02 g/dL 酚酞溶液停止反应,在室温下保温 20 min,在 550 nm 下测定吸光度。以失活的酶作为空白。一个酶活单位定义为在上述条件下每分钟生成 1 μmol β -环糊精所需的酶量。

1.2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳 SDS-PAGE 电泳凝胶采用碧云天试剂盒制备,所用浓缩胶的质量浓度为 5 g/dL,分离胶的质量浓度为 10 g/dL,具体配方及操作参考产品说明书和相关文献^[23-24]。电泳结束后,用质量分数 0.1%考马斯亮蓝 R-250 对蛋白胶进行染色,并通过 Quantity One 软件估算酶蛋白的表观相对分子质量。

1.2.5 蛋白质浓度的测定 采用 Bradford 法^[25]测定样品蛋白浓度,以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,具体操作参见蛋白浓度检测试剂盒中的说明书。

1.2.6 β -CGT 酶相对分子质量的测定 未变性 β -CGT 酶的相对分子质量采用多角度激光光散射凝胶色谱系统进行测定:HPLC 柱型号:P8514-806 Shodex Packed column;样品质量浓度 1.7 mg/mL(溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.5),以 BSA(相对分子质量为 66 000)作为标准品;测试条件:进样量 0.2 mL,流动相为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5,含质量分数 0.02% NaN_3 ,超声脱气处理),流量 0.5 mL/min,激光波长 658 nm,校正常数 2.5×10^{-5} ,数据采集时间间隔 1 s;数据处理:采用系统自带软件 ASTRA 5.3.4 进行分析。

变性 β -CGT 酶的相对分子质量采用 SDS-PAGE 方法估算。

1.2.7 β -CGT 酶最适温度和热稳定性的测定 在不同温度(45~65 $^{\circ}\text{C}$)下,按 1.2.3 的方法测定纯化酶的 β -环化活力,将酶活最高者定为 100%,计算相对酶活,作温度-相对酶活力曲线,以确定酶的最适温度。

纯化酶(3.2×10^{-8} mol/L)在不同温度(45、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$)下保温,不同时间点取样,迅速冰浴冷却,按 1.2.3 的方法测定酶的残余酶活,以未保温的样品酶活力定为 100%,计算相对残余酶活,作时间-相对酶活力曲线。

1.2.8 β -CGT 酶最适 pH 和 pH 稳定性的测定 分别用浓度为 10 mmol/L 的不同 pH 值的缓冲液(柠檬酸-柠檬酸钠:pH 4~6; Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 :pH 6~8;甘氨酸-氢氧化钠:pH 8~10)稀释酶液和配制底物,按 1.2.3 的方法测定纯化酶的 β -环化活力,将酶活最高者定为 100%,计算相对酶活,作 pH-相对酶活力曲线,以确定酶的最适 pH。

将纯化酶用上述不同 pH 缓冲液稀释至浓度约为 3.2×10^{-8} mol/L,60 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min,不同时间点(10、20、30 min)取样,迅速冰浴冷却,按 1.2.3 的方法测定酶的残余酶活,以未保温的样品酶活力定为 100%,计算相对残余酶活,作时间-相对酶活力曲线。

1.2.9 金属离子对 β -环化活力的影响 在麦芽糊精(DE=5)底物中添加一定终浓度的金属离子,按 1.2.3 的方法测定纯化酶的 β -环化活力,以未添加金属离子的酶活性定为 100%。

1.2.10 β -CGT 酶产物特异性分析 用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)配制 5 g/dL 的麦芽糊精(DE=5)溶液作为底物,加入终浓度为 1 U/mL 的纯化酶,置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 摇床(200 r/min)中反应 12 h,不同时间点取样,煮沸灭酶 10 min,加入 10 μL 糖化酶(100 U/mL)糖化 30 min,煮沸灭酶 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.45 μm 超滤膜过滤后,采用高效液相色谱法(HPLC)测定反应液中 α -、 β -和 γ -环糊精浓度。

HPLC 测定条件为:Agilent 1260 HPLC 系统(配示差折光检测器),色谱柱 Lichrosorb NH_2 (4.6 mm $\times$ 150 mm),流动相采用体积分数 68%的乙腈水溶液,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,流量为 1 mL/min。

1.2.11 β -CGT 酶动力学参数的测定 用 10 mmol/L

磷酸缓冲液(pH 6.5)分别配制底物浓度为 0.1~10 mg/mL 的溶液,按 1.2.3 的方法测定 β -CGT 酶的酶活,按 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,计算酶的动力学参数,包括:米氏常数(K_m)、最大反应速率($V_{\max}$)、催化常数(K_{cat})和催化效率(K_{cat}/K_m)。

1.2.12 数据处理 实验结果为 3 次平行实验的平均值,用平均值和标准偏差表示。采用 OriginPro 8.0 软件(美国 OriginLab 公司)分析数据和作图;显著性分析($P<0.05$)采用 SPSS 软件进行,通过单因素方差分析(ANOVA)、Student-Newman-Keuls (SNK)程序来实现。

2 结果与讨论

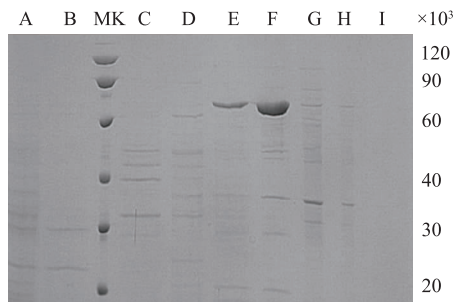
2.1 酶的分离纯化

2.1.1 Phenyl HP 柱疏水层析 从图 1 (a) 可以看出,目的蛋白主要集中在 0.2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (条带 F)洗脱液中,其次在 0.4 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (条带 E)洗脱液中也有一定含量,同时酶活验证也进一步证实了这一点。合并条带 E、F 对应的洗脱液,在 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)中透析 48 h,进行下一步阴离子交换层析,以进一步纯化目的蛋白。

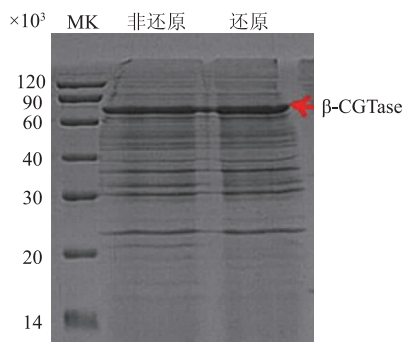
β -CGT 酶的理论相对分子质量为 77 300,重组 β -CGT 酶粗酶液在还原与非还原状态下的 SDS-PAGE 分析如图 1 (B) 所示,从图中可以看出, β -CGT 酶蛋白在粗酶液中占主要成分,而且分子间不存在二硫键。重组 β -CGT 酶的纯化采用 Phenyl HP 柱疏水层析和 Q-HP 柱阴离子交换层析相结合进行。

2.1.2 Q-HP 柱阴离子交换层析 从图 2(a)可以看出,经 Q-HP 柱阴离子交换层析后,目的蛋白几乎都集中在透过液中(条带 B),且已达到电泳纯。收集条带 B 对应的酶溶液,进一步超滤浓缩保存。从图 2 (b)可以看出,重组 β -CGT 纯酶在还原与非还原状态下的表观相对分子质量基本相同,约为 76 500,与理论相对分子质量 77 300 接近,说明分子间不存在二硫键,而且酶蛋白分子在溶液中以单聚体形式存在。

重组 β -CGT 酶粗酶液的纯化结果如表 1 所示,通过测定相应纯化步骤中的酶活性及蛋白浓度,最终 β -CGT 酶的比酶活为 296.5 U/mg,纯化倍数达到 27.2,回收率高达 45.3%。



(a)柱纯化



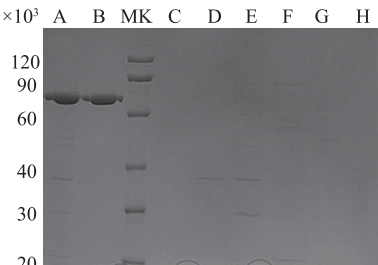
(b)粗酶液

MK: 蛋白质标准相对分子质量;A: 进样;B: 穿透液;C:0.8 mol/L(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱;D:0.6 mol/L(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱;E:0.4 mol/L(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱;F:0.2 mol/L(NH_4) $_2$ SO $_4$ 洗脱;G:10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5)洗脱;H:超纯水洗脱;I:0.5 mol/L NaOH 洗脱。上样量均为 10 μm 。

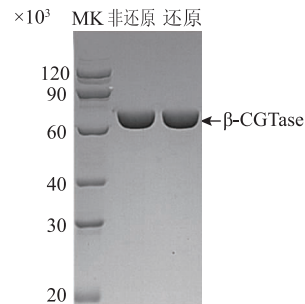
图 1 重组 β -CGT 酶粗酶液和 Phenyl HP 柱纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the crude recombinant β -CGTase and the purification process of Phenyl HP column

MK: 蛋白质标准相对分子质量;A: 进样;B: 穿透液;C:0.1 mol/L NaCl 洗脱;D:0.2 mol/L NaCl 洗脱;E:0.3 mol/L NaCl 洗脱;F:0.5 mol/L NaCl 洗脱;G:1 mol/L NaCl 洗脱;H:0.5 mol/L NaOH 洗脱。上样量均为 10 μm 。



(a)



(b)

图 2 Q-HP 柱纯化过程和纯化酶液的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purification process of Q-HP column and the purified enzyme

表 1 β -CGT 酶的分离纯化

Table 1 A summary of the purification steps of β -CGTase

纯化步骤	总酶活/ U	总蛋白 质量/ mg	比酶活/ (U/mg)	纯化 倍数	回收率/ %
粗酶液	15 920.0	1460.6	10.9	1.0	100.0
硫酸铵 沉淀	13 181.8	465.8	28.3	2.6	82.8
Phenyl HP 柱	10 093.3	49.5	203.8	18.7	63.4
Q-HP 柱	7 211.8	24.3	296.5	27.2	45.3

2.2 酶相对分子质量的测定

采用多角度激光光散射凝胶色谱系统进一步测定 β -CGT 酶蛋白的相对分子质量, 结果如图 3 所示,经系统自带软件 ASTRA 5.3.4 分析,该酶分子平均相对分子质量为 76 600,与 SDS-PAGE 分析结果相当,接近其理论相对分子质量。多分散性系数 M_w/M_n 为 1.001,说明相对分子质量呈单分散,也进一步验证了酶蛋白分子在溶液中是以单聚体形式存在。

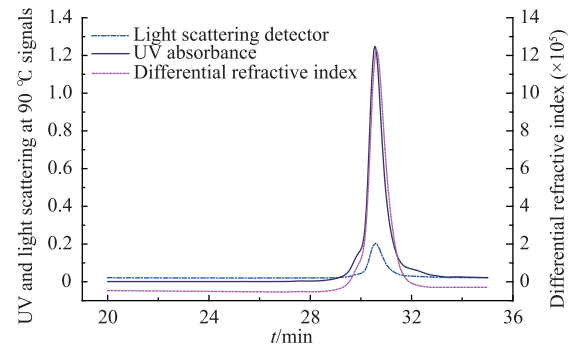


图 3 多角度激光光散射凝胶色谱图

Fig. 3 Multi-angle laser light scattering gel chromatogram

2.3 酶浓度对其热稳定的影响

酶浓度在其热稳定性研究中是首先需要考察的一个因素,作者采用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)将浓缩纯 β -CGT 酶稀释至 4 个不同浓度,分别为 2.0×10^{-6} 、 5.1×10^{-7} 、 1.3×10^{-7} 和 3.2×10^{-8} mol/L,分别研究其 60 °C 下的热稳定性,结果如图 4 所示, β -CGT 酶浓度越高,其热稳定性越好,说明低的酶浓度能够降低非共价分子间的相互作用。在后续酶热稳定性的研究中,酶浓度选择 3.2×10^{-8} mol/L。

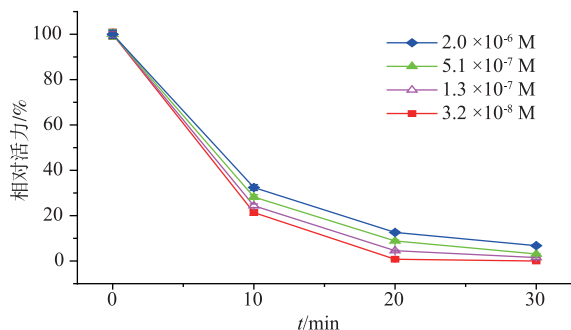


图 4 β -CGT 酶浓度对其热稳定性的影响

Fig. 4 Effect of the enzyme concentration on the thermostability of β -CGTase

2.4 最适温度和热稳定性

在不同温度(45~65 °C)下进行酶活力测定,将酶活最高者定为 100%,结果如图 5(a)所示, β -CGT 酶环化反应的最适温度为 60 °C。

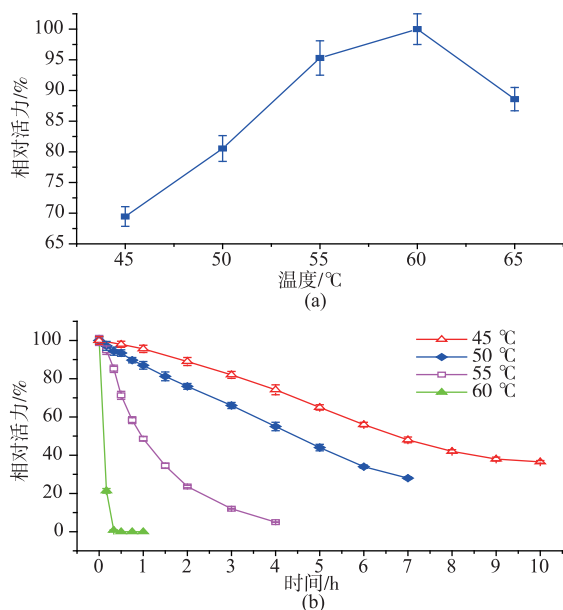


图 5 温度对 β -CGT 酶活性和热稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the activity and thermostability of β -CGTase

β -CGT 酶在 45、50、55 和 60 °C 下的稳定性结果如图 5(b)所示,45、50、55 和 60 °C 时的半衰期分别为 6.8、4.5 h、55.6 min 和 6.5 min,60 °C 保温 20 min 导致酶基本失去活力,说明该酶的热稳定性较差。

2.5 最适 pH 和 pH 稳定性

在不同 pH(4~10)条件下进行酶活力测定,将酶活最高者定为 100%,结果如图 6 所示, β -CGT 酶在 pH 5~7 的范围内,酶活力较高,其最适 pH 为 6.5;pH 低于 5 或高于 7 时, β -CGT 酶的环化活力下降较快。在相同 pH 值时, β -CGT 酶在甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中的环化活力明显高于其在 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液中的环化活力。

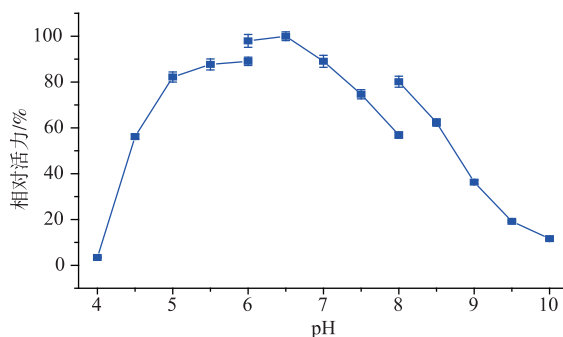
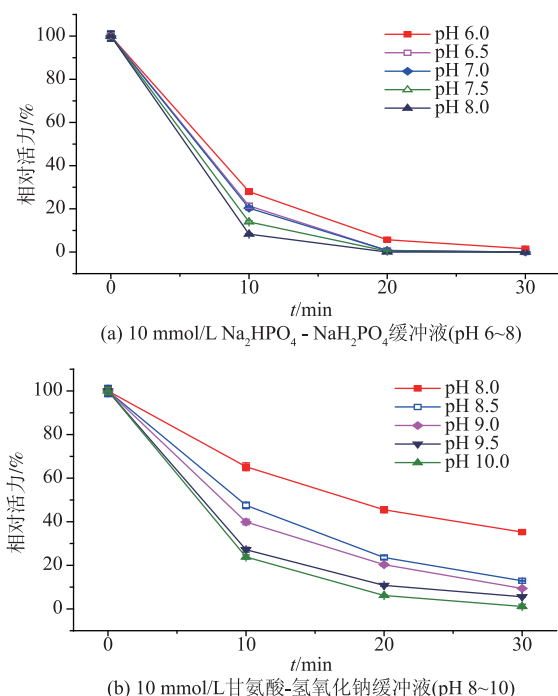


图 6 pH 对 β -CGT 酶活性的影响

Fig. 6 Effects of pH on the activity of β -CGTase

β -CGT 酶在不同 pH(4~10)条件下的热稳定性均较差,而且在 pH 值相同而类型不同的缓冲液中,其热稳定性也存在明显差异。在 10 mmol/L pH 4~6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, β -CGT 酶 60 °C 保温 10 min 即几乎失去活力(数据未显示)。从图 7(a)和表 2 可以看出,在 10 mmol/L pH 6~8 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液中, β -CGT 酶 60 °C 时的热稳定性随 pH 值的升高略有降低;从图 7(b)和表 2 可以看出,在 10 mmol/L pH 8~10 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中, β -CGT 酶 60 °C 时的热稳定性同样随 pH 值的升高而降低,pH 从 8.0 升高到 10.0 时, $t_{1/2}$ (min,60 °C)降低了 62.7%。很明显,甘氨酸-氢氧化钠缓冲液更有利于 β -CGT 酶的稳定,暗示了甘氨酸可能能够提高 β -CGT 酶的热稳定性,但后续实验发现, β -CGT 酶在含 10 mmol/L 甘氨酸的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (10 mmol/L,pH 6~8)缓冲液中,其热稳定性与未添加甘氨酸时几乎一致(数据未显示),说明甘氨酸只有在特定的缓冲液、特定的 pH 条件下才能有利于 β -CGT 酶的热稳定性。

图7 不同 pH 条件下 β -CGT 酶的热稳定性Fig. 7 Thermostability of β -CGTase under different pHs表2 不同 pH 条件下 β -CGT 酶 60 °C 下的半衰期Table 2 Half-lives of β -CGTases at 60 °C under different pHs

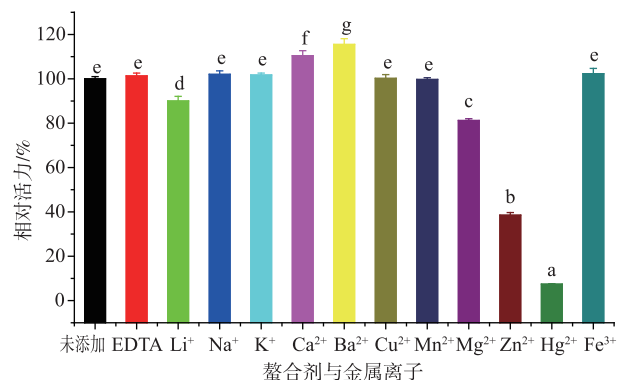
缓冲液类型	pH	$t_{1/2}/\text{min}^1$
Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液	6.0	7.0 ± 0.3^b
	6.5	6.5 ± 0.2^b
	7.0	6.4 ± 0.2^b
	7.5	5.8 ± 0.2^a
	8.0	5.4 ± 0.1^a
甘氨酸-氢氧化钠 缓冲液	8.0	17.7 ± 0.5^e
	8.5	9.5 ± 0.4^d
	9.0	8.3 ± 0.3^c
	9.5	6.9 ± 0.3^b
	10.0	6.6 ± 0.2^b

1 每个值为 3 次平行实验的平均值,同一列中不同上标字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.6 金属离子对 β -CGT 酶环化活力的影响

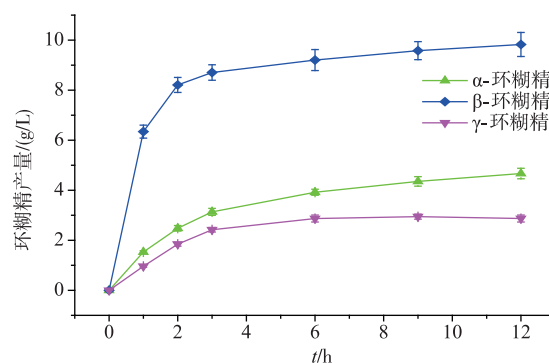
金属离子通常能作为酶的辅因子而对其活力产生重要影响,为了验证 β -CGT 酶的环化活力是否对金属离子辅因子存有依赖,将一定终浓度的金属离子螯合剂(EDTA)加入到 β -CGT 酶反应体系中,并分析其对 β -CGT 酶环化活力的影响;同时研究了常规金属离子,包括: Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Fe^{3+} ,对 β -CGT 酶环化

活力的影响,结果如图 8 所示。EDTA 和金属离子的终浓度分别为 10 mmol/L 和 1 mmol/L,以未添加 EDTA 和金属离子条件下的环化活力为 100%。每个值为 3 次平行实验的平均值,柱状图上不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

图8 EDTA 和金属离子对 β -CGT 酶环化活力的影响Fig. 8 Effects of EDTA and metal ions on the cyclization activity of β -CGTase

2.7 产物特异性

β -CGT 酶催化底物能同时生成 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精,从图 9 可以看出,在整个反应过程中,重组 β -CGT 酶的主要产物均为 β -环糊精,其次为 α -环糊精, γ -环糊精产量最低;尤其在反应的初始阶段, β -环糊精产量急剧增加,这正是定义来源于 *B. circulans* STB01 的 CGT 酶为 β -型的根据;随着反应进行至 3 h,3 种产物的增加趋于平缓, α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精占总环糊精产物的比例分别为 26.9%、56.6%和 16.5%,总转化率为 34.7%。

图9 β -CGT 酶在 pH 6.5、40 °C 条件下作用 5 g/dL 的麦芽糊精 (DE=5) 生产环糊精Fig. 9 Production of cyclodextrins by β -CGTase incubating with 5% (wet basis, w/v) maltodextrin (DE=5) at pH 6.5 and 40 °C

2.8 动力学分析

为了进一步确定重组 β -CGT 酶的动力学性质,分别测定了以不同浓度的玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉、可溶性淀粉或 3 种麦芽糊精(DE=5、15、25) 为底物时酶的 β -环化活力,通过 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,计算酶的动力学参

数。从研究结果发现,当分别以玉米淀粉、马铃薯淀粉或木薯淀粉为底物时,环化反应的动力学性质不符合米氏方程(数据未显示)。而分别以可溶性淀粉或 3 种麦芽糊精为底物时,环化反应的动力学性质能用米氏方程很好的进行描述(相关系数 $R^2 > 0.99$),酶的动力学参数计算结果如表 3 所示。

表 3 以可溶性淀粉或麦芽糊精为底物时 β -CGT 酶的动力学参数*

Table 3 Kinetic parameters of β -CGTases with soluble starch or maltodextrin as the substrate

底物类型	$K_m/(\text{mg/mL})$	$V_{\max}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1})$	$K_{\text{cat}}/(\times 10^2 \text{ s}^{-1})$	K_{cat}/K_m ($\times 10^2 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
可溶性淀粉	2.62 ± 0.45^a	0.42 ± 0.06^a	6.36 ± 0.91^a	2.43 ± 0.07^c
DE 5 麦芽糊精	3.42 ± 0.62^a	0.54 ± 0.08^a	8.18 ± 1.21^a	2.39 ± 0.08^c
DE 15 麦芽糊精	6.46 ± 1.08^a	0.80 ± 0.09^b	12.11 ± 1.36^b	1.88 ± 0.10^b
DE 25 麦芽糊精	25.57 ± 3.52^b	1.30 ± 0.09^c	19.69 ± 1.37^c	0.77 ± 0.05^a

* 每个值为 3 次平行实验的平均值,同一列中不同上标字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

从表 3 可以看出,可溶性淀粉的 K_m 值平均值最低,说明 β -CGT 酶与可溶性淀粉的亲合性最大,尽管与 DE 5、DE 15 的麦芽糊精 K_m 值没有显著性差异,以可溶性淀粉或 DE 5 麦芽糊精为底物时,酶的催化效率(K_{cat}/K_m)最高,随着麦芽糊精 DE 值的增大,酶的催化效率显著降低,说明低 DE 值的麦芽糊精更适合生产环糊精。

3 结 语

对获得的重组 β -CGT 酶发酵上清液进行分离纯化,然后以环化活力为评价指标全面分析了其生化性质。结果表明,采用 Phenyl HP 柱疏水层析、Q-HP 柱阴离子交换层析两步能很好的对重组 β -CGT 酶进行纯化,酶的回收率达到 45.3%。重组 β -CGT

酶的表现相对分子质量约为 76 500,且在溶液中是以单聚体形式存在。该酶的最适 pH 为 6.5,在甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中体现出更好的热稳定性;最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。45、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期分别为 6.8 h、4.5 h、55.6 min 和 6.5 min;60 $^{\circ}\text{C}$ 下的热稳定性随酶浓度的升高而增大。该酶的活性不依赖于金属离子,1 mmol/L Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 对该酶的 β -环化活力有抑制作用,而 1 mmol/L Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 能明显激活酶的 β -环化活力。以玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉为底物时,该酶环化反应的动力学性质不符合米氏方程;而分别以可溶性淀粉、麦芽糊精(DE 5、15、25) 为底物时,其环化反应的动力学性质能用米氏方程很好的进行描述。

参考文献

- [1] FRENCH D, RUNDLE R. The molecular weights of the schardinger alpha and beta dextrins [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1942, 64(7): 1651-1653.
- [2] SZENTE L, SZEJTLI J. Cyclodextrins as food ingredients[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15(3-4): 137-142.
- [3] JIN Zhengyu, BAI Yuxiang, WANG Jinpeng. Screen and modification of cyclodextrin glycosyltransferase [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(2): 113-123. (in Chinese)
- [4] LI Z F, WANG M, WANG F, et al. γ -cyclodextrin: A review on enzymatic production and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 245-255.
- [5] 童林芸. 环糊精化学 - 基础与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [6] KHAN A R, FORGO P, STINE K J, et al. Methods for selective modifications of cyclodextrins [J]. *Chemical Reviews*, 1998, 98(5): 1977-1996.
- [7] THOMPSON D O. Cyclodextrins - Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals [J]. *Critical Reviews in*

- Therapeutic Drug Carrier Systems**, 1997, 14(1):1-104.
- [8] GOMES L M M, PETITO N, COSTA V G, et al. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with beta-cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt[J]. **Food Chemistry**, 2014, 148:428-436.
- [9] SILVA F, FIGUEIRAS A, GALLARDO E, et al. Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids[J]. **Food Chemistry**, 2014, 145:115-125.
- [10] PAZZETTO R, DELANI T C D, FENELON V C, et al. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge[J]. **Process Biochemistry**, 2011, 46(1):46-51.
- [11] URBAN M, BERAN M, ADAMEK L, et al. Cyclodextrin production from amaranth starch by cyclodextrin glycosyltransferase produced by *Paenibacillus macerans* CCM 2012[J]. **Czech Journal of Food Sciences**, 2012, 30(1):15-20.
- [12] JIN Zhengyu, WANG Jinpeng, BAI Yuxiang. Catalytic mechanisms and influence factors on cyclodextrin preparation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(1):1-8.
- [13] LI Z F, CHEN S, GU Z B, et al. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2014, 35(2):151-160.
- [14] MARECHAL L R, ROSSO A M, MARECHAL M A, et al. Some properties of a cyclomaltodextrin-glucanotransferase from *Bacillus circulans* DF 9 R type[J]. **Cellular and Molecular Biology**, 1996, 42(5):659-664.
- [15] SALVA T J G, RODRIGUES J A D, COLOMBO C A. Purification and determination of some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* N degrees 76 using response surface analysis [J]. **Revista De Microbiologia**, 1997, 28:13-21.
- [16] VASSILEVA I A, ATANASOVA N, IVANOVA V, et al. Characterisation of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* ATCC 21783 in terms of cyclodextrin production[J]. **Annals of Microbiology**, 2007, 57(4):609-615.
- [17] GASTON J A R, SZERMAN N, COSTA H, et al. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 45(1):36-41.
- [18] LARSEN K L, DUEDEHL O L, CHRISTENSEN H J S, et al. Purification and characterisation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. F8[J]. **Carbohydrate Research**, 1998, 310(3):211-219.
- [19] WIND R D, UITDEHAAG J C M, BUITELAAR R M, et al. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1998, 273(10):5771-5779.
- [20] 张佳瑜. 软化芽孢杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在毕赤酵母和枯草杆菌中的表达[D]. 无锡:江南大学, 2010.
- [21] MAKELA M, KORPELA T, LAAKSO S. Colorimetric determination of β -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein[J]. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, 1987, 14(2):85-92.
- [22] 李兆丰. 软化芽孢杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析[D]. 无锡:江南大学, 2009.
- [23] J S, DW R. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd eds ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001.
- [24] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1):248-254.