

γ -CGTase 突变体制备及其产 γ -CD 条件优化

王金鹏^{1,2,3}, 王萍^{1,2,3}, 苑征^{1,2,3}, 李林林^{1,2,3}, 范浩然^{1,2,3}, 金征宇^{1,2,3}

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

摘要:采用定点突变法将来自 *Bacillus* sp. G-825-6 的 γ -CGTase 的 211 位的酪氨酸突变为亮氨酸,并利用突变体 Y211L 催化淀粉制备 γ -CD,分别研究了底物种类、底物质量分数、反应时间、反应温度、加酶量对 γ -CD 产率的影响,并在单因素的基础上进行了正交优化,优化后的反应条件为:木薯淀粉质量分数为 6%,加酶量为 4 U/g,反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 24 h,在此条件下催化产生 γ -CD 的产率可达到 14%,以总环糊精质量分数为 100%计,催化产 γ -CD 的比率为 97%。

关键词: CGTase; γ -CD;定点突变;产物专一性

中图分类号: TS 239 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)10-1015-06

Preparation of γ -CGTase Mutant and Optimization of the Production of γ -CD

WANG Jinpeng^{1,2,3}, WANG Ping^{1,2,3}, YUAN Zheng^{1,2,3}, LI Linlin^{1,2,3}, FAN Haoran^{1,2,3}, JIN Zhengyu^{1,2,3}

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

Abstract: In this thesis, tyrosine 211 of γ -CGTase from *Bacillus* sp. G-825-6 changed into leucine based on site-directed mutagenesis. The influences of substrate type, concentration, time, temperature, and enzyme concentration on the mutant Y211L catalyzed starch to produce γ -CD were evaluated. On the basis of single factor experiments, orthogonal design method was used to optimize the condition for production of γ -CD. As a result, the best condition was: cassava starch 6%, enzyme concentration 4 u/g, temperature 50 $^{\circ}\text{C}$, time 24 h. Under these conditions, the production of γ -CD can reach 14%. If the total cyclodextrin content is 100%, the catalytic production ratio of γ -CD is 97%.

Keyword: CGTase, γ -CD, site-directed mutagenesis, product specificity

收稿日期: 2016-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401524); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140143); 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAD37B03); 江苏省科技支撑计划项目 (BE2013311); 农业部公益性行业(农业)科研专项 (201303070-02); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 王金鹏(1984—), 女, 河南开封人, 工学博士, 教授, 主要从事环糊精的开发和利用研究。E-mail: jpwang1984@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王金鹏, 王萍, 苑征, 等. γ -CGTase 突变体制备及其产 γ -CD 条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(10): 1015-1020.

环糊精(cyclodextrin,简称 CD)是由环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase,简称 CGTase)酶解淀粉或者淀粉类似物产生的由D-吡喃型葡萄糖单元通过 α -1,4-糖苷键连接而成的一类环状低聚化合物^[1-3]。与 α -CD、 β -CD相比, γ -CD具有独特的性质:首先, γ -CD具有较大的空腔和较高的溶解度,能够包埋较大的客体分子从而增加其溶解度,进而改变它们的理化性质;其次, γ -CD安全性高,可以被人体内的唾液淀粉酶和胰异淀粉酶迅速消化^[4-5],因此, γ -CD在人体小肠内可以迅速的降解和吸收^[6-7],但 α -CD、 β -CD则不能。并且 γ -CD的高生物利用度使得其在食品和医药领域有着特殊的应用。

影响 γ -CD产率及产物专一性的因素有很多,主要包括CGTase的来源及其酶学特性,反应条件如反应时间、反应温度、底物浓度、底物种类、有机溶剂种类及含量等的影响。曹新志等^[8]以质量分数5%的马铃薯、玉米、木薯、甘薯、焦藕淀粉为底物,加入质量分数2%的甘草酸和适量的CGTase酶液,于60℃反应12h,结果表明以木薯淀粉和焦藕淀粉为底物时 γ -CD转化率最高;Rendleman等人^[9]利用*Bacillus* sp.AL6生产 γ -CD时,当底物质量分数由2.5%增加到6%时, γ -CD的转化率却由35%降到了21%。Kyoko等人^[10]研究发现改变反应的pH,也会使环糊精种类所占比例发生改变。还有研究表明,在低温及有机溶剂存在的条件下,更有利于提高环糊精的转化率,因为低温条件下环糊精-有机溶剂复合物更加稳定,易于将环糊精从反应体系中沉淀出来,使酶反应向着正方向进行^[11-12]。

作者所用 γ -CGTase来自于*Bacillus* sp.G-825-6,据报道该酶催化淀粉不产生 α -CD,仅产生 β -CD和 γ -CD。作者依据参考文献,对该酶位于-7亚位点附近的211位氨基酸(酪氨酸)进行了定点突变,研究了突变体Y211L催化淀粉产 γ -CD的条件,对于降低 γ -CD的生产成本和推动 γ -CD的工业化生产具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒pET-20b (+)/ γ -cgt:德国莱比锡大学Zimmermann教授提供;克隆宿主*E. coli* DH5 α 和*E. coli* BL21(DE3):购于南京百斯凯科技有限公司。

可溶性淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉、酵母粉、胰蛋白胨、氯化钠、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷、氨苄、三羟甲基氨基甲烷等:购自国药集团。

高速冷冻离心机(BIOFUGE PRIMOR):美国Thermo Scientific有限公司产品;双光束紫外可见分光光度计(TU-1900):北京普析通用仪器有限责任公司产品;高效液相色谱仪(LC-20AT230V)、示差折光检测器(RID-10A)、AKTA purifier900蛋白纯化系统:岛津公司产品;Hypersil NH2色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m APS-2Hypersil微粒):美国Thermo公司产品;纯泰Ni-NTA亲和层析柱:GE Healthcare life sciences公司产品;Shodex OHpak SB-804 HQ和OHpak SB-802.5 HQ色谱柱:日本昭和公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 突变体的构建 以质粒pET-20b (+)/cgt为模板,设计一对互补引物,采用一步PCR法突变CGTase基因中的相应位点,设计引物如下:

正向引物:5'-ATC GAAATCTTCTTGATTTAGCTAGT-3',

反向引物:5'-GACTAGCTAAATCAAGAA GAT TTC GAT-3',

PCR反应体系为:DNA模板10~100 ng,正向突变引物(10 μ mol/L)1 μ L,反向突变引物(10 μ mol/L)1 μ L,5 $\times$ Reaction Buffer10 μ L,Fast Alteration DNA Polymerase(2.5 U/ μ L)1.5 μ L,用灭菌的双蒸水补充至50 μ L。

质粒DNA的提取按照Thermo Scientific公司的质粒小提试剂盒说明书提取。

PCR扩增条件为:预变性(95℃)3 min;变性(95℃)30 s,退火(55℃)30 s,延伸(72℃)3 min,共30个循环;延伸(72℃)5 min,冷却至4℃。

取PCR产物50 μ L加入20 U/ μ L的限制性内切酶DpnI 1 μ L,充分混匀后将该酶切体系于37℃条件下消化1 h。

将酶切后的产物转化至宿主菌中,具体步骤如下:从-80℃冰箱中取出感受态细胞*E. coli* DH-5 α 置于冰上解冻;取45 μ L刚刚解冻好的感受态细胞和5 μ L DpnI消化产物放于提前预冷好的2 mL无菌离心管中,用枪头轻柔吹打混匀,继续冰浴30 min;将试管放到42℃水浴锅中,准确热激60 s,立

即置于冰上 5 min; 加入 500 μ L 预热的无菌的 LB 培养基(不含 Amp),混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 摇床以 200 r/min 振荡培养 1.5 h,使菌体复苏;培养结束后,5 000 r/min 离心 5 min,去掉上清液 400 μ L。将余下的感受态细胞涂布在含有 Amp 的 LB 固体琼脂培养基上,将平板置于室温直至液体被吸收,倒置平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。

挑取 LB 平板上的单菌落接种至含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中以 200 r/min 振荡培养 10 h,然后提取质粒、酶切, DNA 琼脂糖凝胶电泳验证,将验证正确的质粒送至上海生物工程公司测序鉴定。将测序正确的质粒转化至 *E.coli* BL21(DE3),挑取单菌落接种至含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素钠的 LB 液体培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中以 200 r/min 振荡培养过夜,保藏菌种即得到含有突变质粒的基因工程菌,将该基因工程菌置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保藏。

1.2.2 Y211L/ γ -CGTase 的制备、纯化

1) 溶液配制方法 LB 培养基配制:取胰蛋白胨 10 g、NaCl 10 g、酵母提取物 5 g,加入去离子水 1 L,搅拌均匀后分装,于高压灭菌锅内 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min;IPTG 溶液制备:准确称取 1.19 g 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷置于 10 mL 烧杯中,加入少量无菌水溶解后,转移至灭菌的 5 mL 容量瓶中定容,分装后于 -18 $^{\circ}$ C 下保存;氨苄溶液配制:准确称取 1 g 氨苄置于 10 mL 烧杯中,加入少量无菌水溶解后,转移至灭菌的 10 mL 容量瓶中定容,分装后于 -18 $^{\circ}$ C 下保存;Tris-HCl 溶液配制:取 6.05 g 三羟甲基氨基甲烷置于 1 L 的烧杯中,加入 1 L 去离子水溶解,滴加盐酸用 pH 计调 pH 至 0.85,后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2) 环糊精糖基转移酶的制备方法 从冰箱中取出甘油管保藏菌接种至含有 50 mL LB 培养基的 250 mL 的锥形瓶中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养 10 h。

按体积分数 4% 的接种量接种至含有 100 mL 培养基的 500 mL 的锥形瓶中培养,在 600 nm 下测定吸光度,待 $A_{600\text{nm}}=0.6\sim0.8$ 时加入 IPTG 使其终浓度为 0.05 mmol/L,后在 18 $^{\circ}$ C、200 r/min 下诱导培养 16 h。培养结束后,菌液在 5 000 r/min 离心 30 min,弃掉上清液,收集菌体。将菌体悬浮于 pH 8.5 的 Tris-HCl 中进行超声破碎,离心后所得上清液即

粗酶液。

3) 环糊精糖基转移酶的纯化方法 粗酶液纯化采用淀粉吸附法。向粗酶液中按质量分数 5% 加入玉米淀粉,然后加入硫酸铵使其终浓度为 1 mol/L,在 4 $^{\circ}$ C 下缓慢搅拌 1 h,使酶充分被淀粉吸附;反应结束后将混合物 5 000 r/min 离心 15 min,沉淀用预冷的 1 mol/L 的硫酸铵洗涤除去未被吸附的蛋白质,离心后取沉淀;将沉淀用含有 1 mmol/L γ -CD 的 50 mmol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 在 37 $^{\circ}$ C 下振荡混合 30 min 离心后得到洗脱液 1,将剩余沉淀再用同样的含有 γ -CD 的缓冲液洗脱,得到洗脱液 2;将两次洗脱液合并,用 50 mmol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液在 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,每隔 8 h 换一次缓冲溶液。

1.2.3 γ -CD 标准曲线测定方法 称取 0.4 g γ -CD,用少量超纯水溶解后定容至 100 mL,配制成 4 mg/mL 的标准溶液。取标准溶液分别稀释至 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL,取适量稀释液过膜用高效液相色谱法测定绘制标准曲线,测定条件为流动相体积分数 70% 乙腈,流量 1 mL/min,温度 40 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。

1.2.4 酶活测定 配制质量分数 2% 的可溶性淀粉为底物,取 900 μ L 底物于 2 mL 离心管中加入 100 μ L 酶液,置于酶反应器上反应 50 $^{\circ}$ C、800 r/min 反应半小时后取 500 μ L 沸水浴中灭活 10 min,测定。剩余的 500 μ L 继续反应半小时后煮沸灭活,测定。

测定方法:以 γ -CD 的转化率为指标采用高效液相色谱法进行分析。取反应液 500 μ L 加入 500 μ L 乙腈 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液过膜,进行测定分析,分析条件为流动相体积分数 70% 乙腈,流量 1 mL/min,温度 40 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。

酶活定义:上述方法,每 30 min 生成 1 mmol 的 γ -CD 需要的酶量为一个酶活单位。

1.2.5 催化条件优化方法

1) 单因素实验 以 γ -CD 的转化率为指标分别考察底物种类、底物浓度、加酶量、反应时间对 CGTase 催化淀粉分解的影响。

分别取玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉做为底物,加入去离子水加热糊化,制成质量分数为 1% 的溶液,冷却到室温,取 1 mL 底物加入适量 CGTase,置于恒温震荡混匀器上反应 24 h,结束后沸水浴灭酶 10 min。取 500 μ L 反应液加入 500 μ L 乙腈 10 000 r/min 离心 10 min 后过膜,采用 HPLC

对 γ -CD 含量进行测定。测定方法与 2.3.2 中相同。

取最适底物, 分别配制质量分数为 1%、3%、5%、7% 的溶液, 加热糊化后冷却到室温, 取 1 mL 底物加入适量 CGTase, 置于恒温震荡混匀器上反应 24 h, 结束后沸水浴灭酶 10 min, 取 500 μ L 反应液加入 500 μ L 乙腈 10 000 r/min 离心 10 min 后过膜, 采用 HPLC 对 γ -CD 含量进行测定。测定方法与 2.3.3 中相同。

选取最佳底物配制成最佳质量分数的溶液, 加热糊化后冷却到室温, 取 1 mL 底物分别加入 2、4、6、8、10 U/g 的 CGTase, 置于恒温震荡混匀器上反应 24 h, 结束后沸水浴灭酶 10 min, 取 500 μ L 反应液加入 500 μ L 乙腈 10 000 r/min 离心 10 min 后过膜, 采用 HPLC 对 γ -CD 含量进行测定, 测定方法与 2.3.3 中相同。

2) 正交设计实验 在单因素实验的基础上选取底物质量分数、加酶量、反应时间 3 个因素, 进行正交实验, 选用正交表 $L_9(3^3)$ 对 CGTase 的催化淀粉分解条件进行优化, 实验结果采用 Minitab16 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 突变体的验证

用 DNAMAN 对目的基因碱基序列和突变后的碱基序列进行比对, 发现目的基因中的酪氨酸 Y (TAT) 成功突变成了亮氨酸 L (CTT), 结果见图 1。

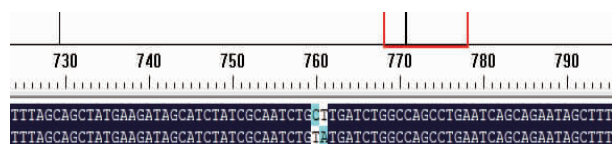


图 1 突变前后基因的碱基序列比对图

Fig. 1 Base sequence alignment for the gene before and after mutation

2.2 γ -CGTase (Y211L) 催化淀粉条件探索

2.2.1 底物种类对催化反应的影响 由图 2 可知, γ -CGTase (Y211L) 催化淀粉的反应中, 不同的反应底物对 γ -CD 的得率影响较大。其中木薯淀粉为底物时 γ -CD 的得率最高, 马铃薯淀粉和可溶性淀粉为底物时 γ -CD 的得率较小。推测其原因是, 不同来源的淀粉其直链淀粉/支链淀粉的比例不同, 且分子量大小存在很大差异, 这将影响 γ -CGTase (Y211L)

催化作用, 进而造成不同的环糊精产率。

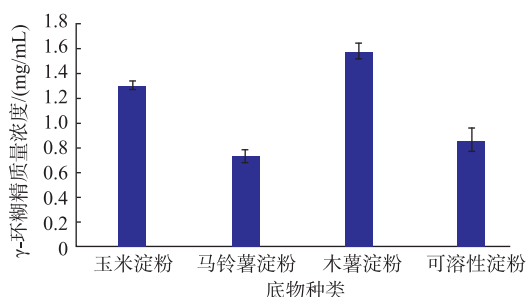


图 2 底物种类对催化反应的影响

Fig. 2 Effect of substrate type on catalysis

2.2.2 底物质量分数对催化反应的影响 由图 3 可知, 随着底物质量分数的增加, γ -CGTase (Y211L) 催化淀粉产生 γ -CD 的质量浓度先增加后减少, 质量分数为 5% 时 γ -CD 的质量浓度达到最大, 推测原因可能是由于低浓度时, 酶催化反应较彻底, 体系中小分子浓度较高, 加剧了 CGTase 的偶合和环化作用, 造成了较低的环糊精含量, 随着底物质量分数的升高, 反应向环化方向偏移, 但底物质量分数过高时, 造成两个或两个以上的底物分子占据酶蛋白的活性位点, 这可能会形成无活性的中间产物, 使酶活性受到抑制。而且, 底物质量分数过高, 体系黏度较大, 底物流动性减小, 使酶无法与底物充分接触, 减弱 γ -CGTase (Y211L) 的环化作用。

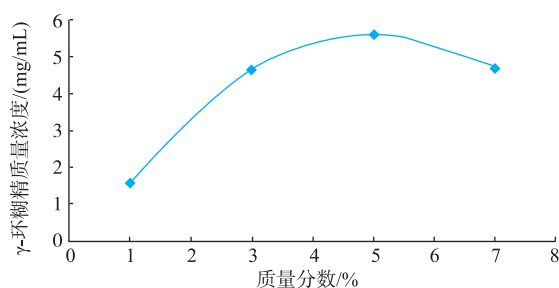


图 3 底物质量分数对催化反应的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration on catalysis

2.2.3 加酶量对催化反应的影响 如图 4 可知, CGTase 催化淀粉反应随加酶量的增加 γ -CD 的产量先增加后减少, 在 4 U/g 时 γ -CD 的产量最大, 因此加酶量选取 4 U/g。

γ -CD 产量随加酶量先增加后减少, 可能是由于加酶量过少时, 反应缓慢; 加酶量过高时, 酶催化反应较彻底, 环糊精降解, 体系中小分子浓度较高。

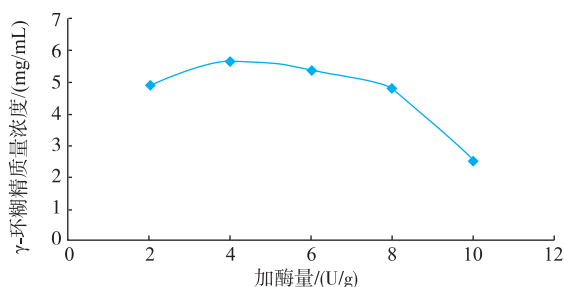


图4 加酶量对催化反应的影响

Fig. 4 Effect of enzyme concentration on catalysis

2.2.4 反应时间对催化反应的影响 如图5可知, γ -CGTase(Y211L)催化淀粉反应随反应时间的增加 γ -CD 的产量不断增加,在24 h之前增加较快,24 h之后增加缓慢。出现这种现象可能是由于,在反应开始阶段,体系中长链底物较多,利于环化反应进行,因此 γ -CD 的产量增加较快。但随着反应时间的延长,体系中产物不断增加,竞争性产物抑制作用加强,环化反应活性降低;同时,可能由于小分子浓度的增加,促进了 CGTase 的偶合和歧化作用,因而导致反应速率下降。

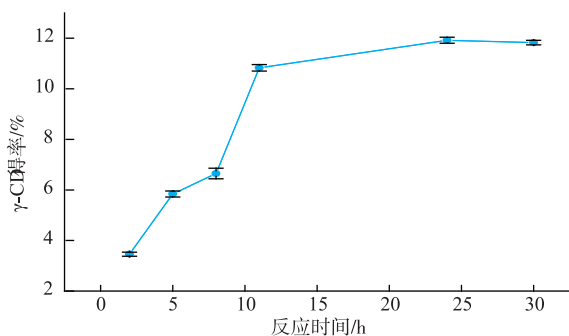


图5 反应时间对催化反应的影响

Fig. 5 Effect of time on catalysis

2.3 γ -CGTase(Y211L)催化淀粉条件优化

以单因素探索的底物质量分数、加酶量、反应时间这3个因素对 γ -CD 产率的影响为依据,进行3因素、3水平的正交实验设计,因素水平表如表1所示,正交实验结果如表2所示。

表1 因素水平表

Table 1 Factor level table

水平	底物质量分数 A/%	加酶量 B/ (U/g)	反应时间 C/h
1	4	4	24
2	5	6	30
3	6	8	36

由表2可知,CGTase 催化淀粉分解的最佳参数

为 $A_3B_1C_1$, 因素对试验结果的影响顺序为 $A>B>C$, 所以 CGTase 催化淀粉分解的最佳条件为: 反应底物木薯淀粉,质量分数6%,加酶量4 U/g,反应时间24 h,反应温度50 $^{\circ}\text{C}$ 。

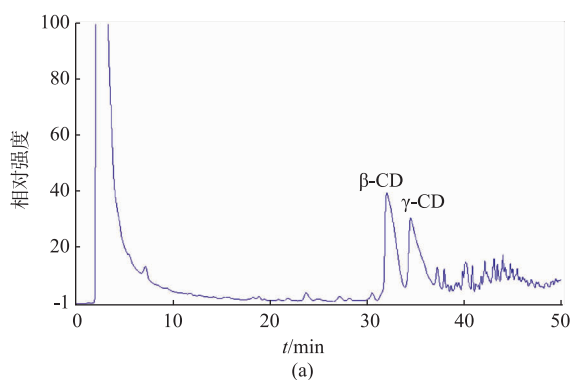
表2 正交结果和分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal

试验号	A	B	C	γ -CD 产率/%
1	1	1	1	14.14
2	1	2	2	12.00
3	1	3	3	10.92
4	2	1	2	13.12
5	2	2	3	11.36
6	2	3	1	14.22
7	3	1	3	11.43
8	3	2	1	12.32
9	3	3	2	10.14
K_1	3.70	5.15	4.97	
K_2	4.79	4.41	4.34	
K_3	5.06	3.99	4.25	
r	1.35	1.16	0.72	
主次因素	$A>B>C$			
优化方案	$A_3B_1C_1$			

2.4 γ -CGTase(Y211L)催化淀粉产物的分析

在同样的催化条件下,原始的 γ -CGTase 催化淀粉后产物的 HPAEC 测定图如图6(a)所示,突变体 Y211L 的催化产物图如图6(b)所示,由图可以看出,突变体 Y211L 催化生成的环糊精中 γ -CD 明显提高,表明突变体具有良好的催化专一性,该研究能为 γ -CD 的工业化生产提供参考。



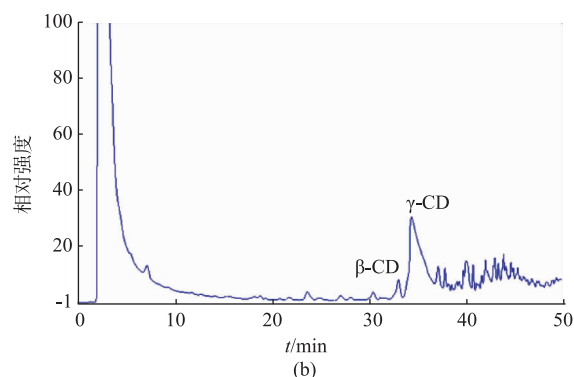
图 6 γ -CGTase催化淀粉后产物的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC diagram of products from starch catalyzed

3 结 语

γ -CGTase(Y211L)是一种多功能酶,它能够通过环化反应催化淀粉转化为环糊精。目前对于CGTase催化淀粉产物的研究主要集中于产 α -CD、 β -CD,对 γ -CD的研究较少。但是 γ -CD具有较高的溶解性,同时其空腔也较大,具有较好的应用前景。作者构建了 γ -CGTase突变体Y211L,从单因素实验、正交实验进行了制备 γ -CD的条件优化,在适当的反应条件下提高了 γ -CD的产量,对以后 γ -CD产量的提高及其应用具有一定参考价值。

参考文献:

- [1] 吴敬,顾正彪,陈坚. 环糊精葡萄糖基转移酶的制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2011.
- [2] FREUDENBERG K, CRAMER F. Notizen: die konstitution der schardinger-dextrine α , β und γ [J]. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 1948, 3(11-12): 464-466.
- [3] 王宁. α -环糊精以及 γ -CD的酶转化工艺研究[D]. 无锡:江南大学,2010.
- [4] MARSHALL J J, MIWA I. Kinetic difference between hydrolyses of γ -cyclodextrin by human salivary and pancreatic α -amylases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1981, 661(1): 142-147.
- [5] KONDO H, NAKATANI H, HIROMI K. In vitro action of human and porcine α -amylases on cyclomalto-oligosaccharides [J]. *Carbohydrate research*, 1990, 204: 207-213.
- [6] DE B A, VAN O B, BAR A. Disposition of [14 C] γ -Cyclodextrin in Germ-Free and Conventional Rats [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1998, 27(2): 150-158.
- [7] LAI C S, CHOW J, WOLF B W. Methods of using gamma cyclodextrin to control blood glucose and insulin secretion. Google Patents, 2013.
- [8] 曹新志. 环糊精糖基转移酶和 γ -环糊精生物合成的研究[D]. 无锡:江南大学,2005.
- [9] RENDLEMAN J A. Enhanced production of cyclomaltooctaoase(γ -cyclodextrin) through selective complexation with C 12 cyclic compounds [J]. *Carbohydrate Research*, 1992, 230(2): 343-359.
- [10] HIRANO K, ISHIHARA T, OGASAWARA S, et al. Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(2): 193-201.
- [11] MATIOLI G, ZANIN G M, DE MORAES F F. Influence of substrate and product concentrations on the production of cyclodextrins by CGTase of *Bacillus firmus*, strain no. 37 [J]. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*; Springer, 2002: 947-961.
- [12] 杨钟超. 淀粉预处理对环糊精制备影响的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.