

易错 PCR 技术改造 β -环糊精葡萄糖基转移酶的催化特性

郑婉¹, 刘振杨¹, 郑金珠¹, 武国干², 吴华伟^{1*}

(1. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025) (2. 上海市农业科学院, 上海 200000)

摘要: β -环糊精是一种环状多糖, 可用于改变某些大分子化合物的理化性质, 在食品、生物及医药等领域都具有很高的工业应用前景。通过利用 β -环糊精葡萄糖基转移酶 (β -CGTase), 使其作用于淀粉等含有葡萄糖基的多糖化合物, 可转化生成 β -环糊精。该研究采用易错 PCR 技术对来源于 *Paenibacillus campinasensis* 的 β -CGTase 进行定向进化, 得到酶活力高的突变体, 并对突变体进行镍柱亲和纯化与酶学性质分析。实验最终获得了一株突变体 Q280L, 其酶活力与原始 β -CGTase 相比提高了 42.10%, 对 β -环糊精的转化率提高了 7.60%, 最适反应 pH 值和稳定性均有所变化, 底物亲和力提高 46.13%。经序列比对及结构分析, 发现突变体 Q280L 与野生 β -CGTase 相比, 第 280 位氨基酸残基种类以及周围氢键发生变化。该试验结果表明, 基于易错 PCR 技术对 β -CGTase 基因进行定向进化, 可提高酶活力和改善酶学性质, 为实现 β -环糊精的工业生产提供参考意义。

关键词: *Paenibacillus campinasensis*; β -CGTase; 定向进化; 易错 PCR; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2023)05-25-31

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0603

Modification of the Catalytic Properties of β -cyclodextrin

Glucosyltransferase through Error-prone PCR

ZHENG Wan¹, LIU Zhenyang¹, ZHENG Jinzhu¹, WU Guogan², WU Huawei^{1*}

(1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

(2. Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200000, China)

Abstract: β -cyclodextrin is a cyclic polysaccharide that can be used to alter the physical and chemical properties of certain macromolecular compounds. It has remarkable industrial application prospects in the fields of food, biology, and medicine. β -cyclodextrin is obtained by converting polysaccharide compounds containing glucose groups, such as starch, by the action of β -cyclodextrin glucosyltransferase (β -CGTase). In the present study, β -CGTase derived from *Paenibacillus campinasensis* was subjected to directed evolution through error-prone PCR to obtain a mutant with potent enzymatic activity. The mutants were subjected to nickel column affinity purification and analyzed for their enzymatic properties. Finally, the mutant Q280L was obtained. Compared with that of the wildtype β -CGTase, the enzymatic activity of Q280L was increased by 42.10%, conversion rate of β -cyclodextrin was increased by 7.6%, its optimal reaction pH and pH stability were shifted, and its substrate affinity was increased by 46.13%. Sequence alignment and structural analysis revealed that compared with that in wildtype β -CGTase, the amino acid residue at position 280 and the hydrogen bonding interaction between this and its surrounding residues were altered in Q280L. These findings indicate that directed evolution of β -CGTase based on error-prone PCR could improve enzymatic activity and properties, thereby providing a reference for the industrial production of β -cyclodextrin.

Key words: *Paenibacillus campinasensis*; β -CGTase; directed evolution; error-prone PCR; enzymatic properties

引文格式:

郑婉, 刘振杨, 郑金珠, 等. 易错 PCR 技术改造 β -环糊精葡萄糖基转移酶的催化特性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 25-31.

ZHENG Wan, LIU Zhenyang, ZHENG Jinzhu, et al. Modification of the catalytic properties of β -cyclodextrin glucosyltransferase through error-prone PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 25-31.

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21576110); 江苏省益生制剂重点实验室开放课题 (JSYSZJ2017001)

作者简介: 郑婉 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基因工程, E-mail: zw19164096082@163.com

通讯作者: 吴华伟 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 重要工业用酶基因资源发掘、基因工程高效表达及分子改性, E-mail: wuhuawei-2000@163.com

β -环糊精 (β -Cyclodextrin, β -CD), 是一种由亲水外部与疏水中心组成的环状低聚糖, 由 7 个 D-吡喃葡萄糖单元通过 α -1,4 糖苷键连接而成, 能作为主体包含客体分子, 通过范德华力等作用可对客体分子的物理性质和化学性质进行修饰^[1,2]。而 β -环糊精葡萄糖基转移酶 (β -Cyclodextrin Glycosyltransferase, β -CGTase, EC 2.4.1.19) 作为 α -淀粉酶家族 13 (GH13) 中的主要成员之一, 可以催化淀粉等多糖化合物中的 α -1,4 糖苷键断裂并进一步环化生成 CD^[3], 而在 β -CD 生产过程中, 温度及 pH 值的不同也会影响到 β -CD 的产率, 这些因素使得 β -CD 的生产成本增加而生产效率降低。因此通过分子改造获得一种具有高酶活性以及高 pH 和温度稳定性的 CGTase 对于工业生产 β -CD 具有重要的技术和经济意义。

目前酶的改造方法分为理性设计与非理性设计^[4], 其中, 前者需要明确的蛋白质三维结构, 通过软件模拟突变, 可实现对酶的高效改造^[5,6], 虽然该方法改造效果好, 但其受蛋白质空间结构、数据复杂以及成功率低等因素的影响, 应用受到限制^[7]; 而后者则能直接在实验中模拟自然进化过程^[8], 可实现随机突变、重组或选择, 其突变效率高, 同时能改善酶的底物特异性和稳定性^[9-11], 因此应用较广。非理性设计包括了易错聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、DNA 改组和定点突变等技术。其中, 易错 PCR 技术是目前应用最广的一种酶体外定向进化技术, 已经应用于提高脂肪酶、纤维酶、淀粉水解酶等酶活性^[12]。易错 PCR 的缺点在于正向突变几率小, 突变文库筛选工作量较大, 但此技术可以简化序列分析对比工作, 且操作难度较小。

凌凯等^[13]通过定点突变的方式获得了 γ -CD 转化率提高的突变体 H43E 等, 李晓涵等^[14]通过定点突变获得了 β -CD 特异性转化率提高 7% 的突变体 R81T。本研究将通过易错 PCR 技术, 以 *Paenibacillus campinasensis* 的 β -CGTase 基因为模板, 构建突变文库, 筛选出酶活力更高, 产物特异性转化率和稳定性都有所增强的突变菌株, 并通过三维建模技术分析影响 β -CGTase 酶学性质的位点, 为 β -CGTase 的进一步的研究和应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种与质粒

重组质粒 pET28a-cgt-his 由本实验室构建并保存^[15]。该基因工程菌来源于 *Paenibacillus campinasensis*。

感受态细胞 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 购买于北京全式金生物公司。

1.1.2 酶和试剂

EasyTaq® DNA Polymerase, 北京全式金生物公司; 限制性核酸内切酶 (*Nco* I 和 *Xho* I)、T4 DNA Ligase, Takara 公司; 质粒提试剂盒, 天根生化科技有限公司; 胶回收试剂盒, OMEGA (Omega Bio-Tek) 公司; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.00 g/L, 酵母膏 5.00 g/L, 氯化钠 10.00 g/L (固体培养基加入 15.00~20.00 g/L 琼脂粉)。

初筛培养基: 在 LB 固体培养基中, 加入 20.00 g/L 的可溶性淀粉, 于培养基凝固后涂布 100 μL 浓度为 1 mol/L 的 IPTG。

1.1.4 主要溶液配制

25 mmol/L MgCl_2 溶液: 准确称取 0.505 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 定容至 100 mL, 通过 0.22 μm 水系滤膜在超净工作台过滤除菌, 分装保存于 -20°C 。

5 mmol/L MnCl_2 溶液: 准确称取 0.10 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 定容至 100 mL, 通过 0.22 μm 水系滤膜在超净工作台过滤除菌, 分装保存于 -20°C 。

1.2 试验方法

1.2.1 易错 PCR 扩增

以重组质粒 pET28a-cgt-his 为模板, 设计带有 *Nco* I 酶切位点的 N 端上游引物 CGTase-N: TAACCATGGC TGCCCCGATACCTCGGTATCC; 以及带有 *Xho* I 酶切位点的 C 端下游引物 CGTase-C-His: CCACTCGAG AGGCTGCCAGTTCACATTAC。在普通 PCR 反应体系中加入一定浓度的 Mg^{2+} 与 Mn^{2+} 进行易错 PCR。

易错 PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times *EasyTaq*® Buffer: 5 μL , dNTPs (2.50 mmol/L): 4 μL , 模板 10 ng, 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$): 1 μL , *EasyTaq*® DNA Polymerase: 0.50 μL , 分别加入不同浓度 Mg^{2+} (终浓度 2、4、6、8 和 10 mmol/L) 和 Mn^{2+} (终浓度 0、0.10、0.30、0.50、0.70 和 0.90 mmol/L), 最后加入无菌 ddH₂O 补足体系, 根据突变率来确定最优的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度用于后续实验。

PCR 扩增条件: 94 $^\circ\text{C}$ 热启动 4 min; 变性 (94 $^\circ\text{C}$, 30 s) \rightarrow 退火 (58 $^\circ\text{C}$, 30 s) \rightarrow 延伸 (72 $^\circ\text{C}$, 3.5 min), 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 再次延伸 5 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.2 构建突变文库

根据易错 PCR 条带结果, 使用 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。使用 *Nco* I 和 *Xho* I 分别对目

的DNA片段与pET28a表达载体于37℃下双酶切4h。电泳验证双酶切条带并回收,使用T4 DNA ligase将目的DNA条带与载体片段于16℃过夜连接。将连接产物通过热激法转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,转入含50 μg/mL卡那霉素的LB平板,37℃培养12h,此过程获得了容量约为500株转化子的突变体文库。

1.2.3 突变文库筛选

初筛:(1)培养基筛选法:将连接产物通过热激法转化入感受态细胞后,涂布于LB平板上,于37℃培养约12h,然后挑选所有的单菌落转至筛选培养基中,37℃培养24h,用酚酞试剂对平板染色1~2min,根据平板中菌落褪色圈形态挑选出阳性菌落^[16-18]。(2)96孔板法:将转化挑取的单菌落置于96孔板中培养,每孔加入50 μL的4% (m/V)可溶性淀粉溶液,进行酶活反应后使用多功能酶标仪检测酶活,以野生型为对照,通过吸光值大小判断其酶活性,选择出正向突变体^[18]。

复筛:将初筛结果中的阳性转化子进行扩大发酵培养,对发酵液超声破碎后取破碎上清液,检测其酶活性,选择活性高于原始β-CGTase的转化子提取质粒并测序。

1.2.4 β-CGTase的酶活测定

取400 μL用0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH值7.00)配制的4% (m/V)淀粉溶液,55℃水浴预热1min后加入40 μL酶液,55℃水浴10min,加入1400 μL 0.5 mol/L Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲液(pH值10)终止反应。再加入200 μL由5 mmol/L Na₂CO₃配制的0.02% (m/V)酚酞试剂,摇匀,10000 r/min离心3min,取上清,在550 nm波长处测吸光度。一个酶活单位为反应条件下每分钟产生1 μmol β-CD所需的酶量^[19]。

1.2.5 突变体的纯化

(1)突变体菌株的培养:将验证正确的突变体接种于5 mL LB培养基(含50 μg/mL Kana),37℃过夜培养,以2%的接种量接种于含50 μg/mL Kana的LB培养基中,37℃培养OD₆₀₀至0.60~0.90时,添加终浓度0.50 mmol/L的IPTG,30℃诱导培养5h。

(2)粗酶液的制备及纯化:取100 mL诱导培养的菌液于4℃,10000 r/min离心10min,弃上清,加入无菌ddH₂O重复洗涤菌体两次后加入8 mL破菌缓冲液悬浮菌体,使用超声破碎仪破碎细胞(75%功率,工作3s,停止6s)30min后再离心(4℃,12000 r/min,20min)取上清液,即为粗酶液^[20]。

Ni-NTA Agarose亲和层析纯化粗酶液,然后使用Millipore超滤离心管进行缓冲液的置换和浓缩,得到

浓度高的纯化蛋白溶液,再通过SDS-PAGE电泳验证其蛋白的大小。纯化后的酶液比酶活为205.7 U/mg。

1.2.6 突变体酶学性质的研究

(1) 最适反应pH值测定

分别使用pH值4.00~7.00的Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液、pH值7.00~8.50的Tris-HCl缓冲液和pH值4.00~11.00的甘氨酸-NaOH缓冲液配置不同pH值反应体系,加入稀释约30倍的纯酶液,于55℃反应并测定酶活,以最高酶活力为100%,计算相对酶活性。

(2) pH稳定性测定

使用0.10 mol/L上述不同pH值的缓冲液(pH值4.00~11.00)将纯化后的酶液稀释约30倍,于55℃放置1h,测定剩余酶活,以4℃保存并稀释到相应倍数的纯化酶的活力为100%,计算相对酶活性。

(3) 最适反应温度测定

将纯化后的酶液稀释约30倍,分别于不同的温度(35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90℃)下进行反应并测定酶活,以最高酶活力为100%,计算相对活性。

(4) 热稳定性测定

将纯化后的酶液稀释约30倍,并在55、65、75℃分别保温1、2、3、4、5h,再分别测定其剩余酶活力,以4℃保存并稀释到相应倍数的酶的活力为100%,计算相对酶活力。

(5) 酶动力学参数测定

分别取不同浓度(0.30%、0.40%、0.50%、0.60%、0.70%)的可溶性淀粉(用pH值8.00、0.10 mol/L Tris-HCl缓冲液配制),在pH值8.00和65℃下反应后测定其突变体的酶活性。

1.2.7 突变体转化β-CD的HPLC分析

在反应体系中加入2 μL的纯化后的β-CGTase和1 mL pH值8.00的4% (m/V)淀粉溶液。65℃反应12h,沸水浴20min。12000 r/min离心15min,以50%乙腈溶液10倍体积稀释样品,使用0.22 μm有机系滤膜过滤后,经HPLC分析。HPLC流动相为乙腈:水=65:35;流量:1 mL/min;柱温25℃;上样量:10 μL。

1.2.8 突变体序列的分析和结构的预测

使用NCBI在线系统,对测序的突变体与野生型进行序列比对,再利用SWISS-MODEL同源建模对突变体进行结构预测,最后使用PyMol对结果进行可视化^[21]。

1.2.9 数据分析

本实验每项检测指标均设三组平行,以Microsoft Excel 2016软件计算所得数值的平均值及标准差,最终数值为平均值,以误差线代表标准方差。

2 结果与讨论

2.1 易错 PCR 条件的初步研究

本试验初步研究了 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 浓度对易错 PCR 结果的影响。其中, 提高 Mg^{2+} 浓度可以增加非互补碱基配对的稳定性, 而在反应体系中加入一定浓度的 Mn^{2+} 可以降低 DNA 聚合酶对模板的特异性, 从而利于 DNA 链的复制^[22,23]。因此, 通过调节反应体系中 Mg^{2+} 与 Mn^{2+} 各自的浓度以及两者的比例, 可以获得不同突变效率

的突变文库。为了选择最适的 Mg^{2+} 终浓度和 Mn^{2+} 终浓度, 分别加入不同浓度的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} , 对其 PCR 反应条件的进行优化, 通过核酸电泳验证不同的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度梯度, 如图 1 所示: 由 PCR 产物条带亮度判断 Mg^{2+} 的最适浓度范围为 2~6 mmol/L, Mn^{2+} 的最适浓度范围为 0.10~0.50 mmol/L, 将此浓度范围内的 PCR 片段进行测序验证, 依据胡海燕等^[20]的研究结论, 选取突变碱基为 1~5 个, 对应突变氨基酸个数为 1~2 个的突变体, 根据结果分析, Mg^{2+} 的最适浓度为 4.00 mmol/L, Mn^{2+} 的最适浓度为 0.30 mmol/L。

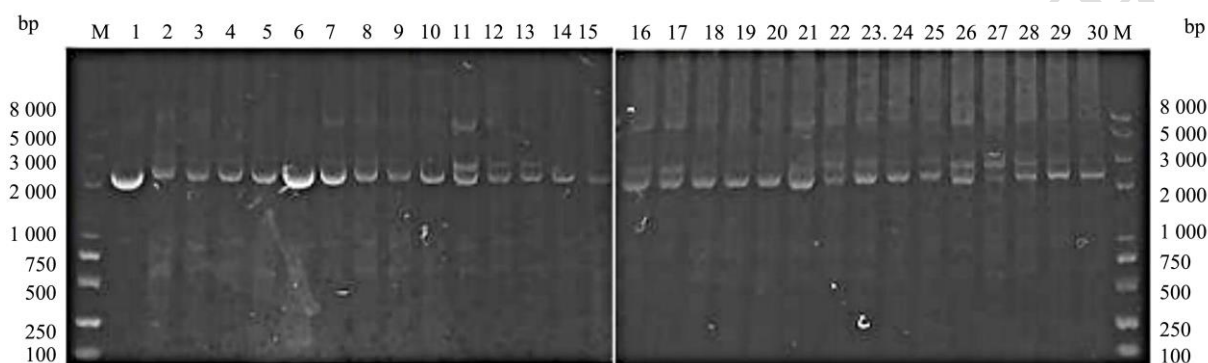


图 1 易错 PCR 条件优化结果

Fig.1 Optimized results for error-prone PCR conditions

注: M 为 marker; 泳道 1~5 为 0 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 6~10 为 0.10 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 11~15 为 0.30 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 16~20 为 0.50 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 21~25 为 0.70 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 26~30 为 0.90 mmol/L Mn^{2+} ; 泳道 1、6、11、16、21、26 为 2 mmol/L Mg^{2+} ; 泳道 2、7、12、17、22、27 为 4 mmol/L Mg^{2+} ; 泳道 3、8、13、18、23、28 为 6 mmol/L Mg^{2+} ; 泳道 4、9、14、19、24、29 为 8 mmol/L Mg^{2+} ; 泳道 5、10、15、20、25、30 为 10 mmol/L Mg^{2+} 。

2.2 突变文库的构建及筛选

在优化后的易错 PCR 反应条件下, 构建突变文库。将 PCR 产物经核酸电泳验证并进行胶回收和重组载体的构建, 然后转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 得到突变文库 (如图 2)。然后对其菌落进行筛选, 得到酶活性高的突变体, 提取其质粒后, 送检测序。通过此步骤, 获得了酶活性比野生型提高 42.10% 的突变体 Q280L。

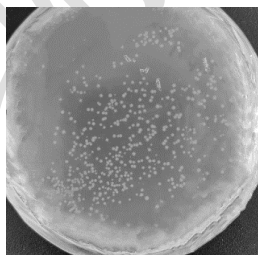


图 2 突变文库的构建

Fig.2 Construction of mutant library

2.3 突变体 Q280L 的分离纯化

将突变体 Q280L 菌株培养及诱导表达后, 通过超

声破碎得到粗酶液, 经 Ni-NTA Agarose 亲和层析及 Millipore 超滤离心管浓缩后, 获得纯化的突变酶, 在 SDS-PAGE 电泳条带中显示其大小约为 74 ku, 与野生型的分子量一致^[24]。

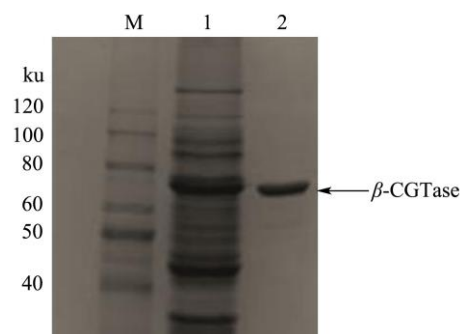


图 3 Q280L 纯化后的电泳图

Fig.3 Electrophoresis of purified Q280L

注: M 为 marker; 泳道 1 为 Q280L 粗酶液; 泳道 2 为纯化后的 Q280L。

2.4 突变体 Q280L 转化生产 β -CD 的液相分析

经 HPLC 分析, 突变体 Q280L 以可溶性淀粉为底物, 在 65 °C 和 pH 值 8.0 条件下孵育 12 h 后, 产物为

α -CD、 β -CD 和 γ -CD(图4), 转化率最高可达到 39.40%, 与野生型相比^[15], 提高了 7.60%。而三种产物之间的比例由突变前的 α -CD: β -CD: γ -CD=23:47:30 变为了 α -CD: β -CD: γ -CD=5:62:33, 说明用 Leu 代替 Q280 位的 Gln 能够提高底物的转化率的同时也可以增加 β -CD 和 γ -CD 的特异性转化。

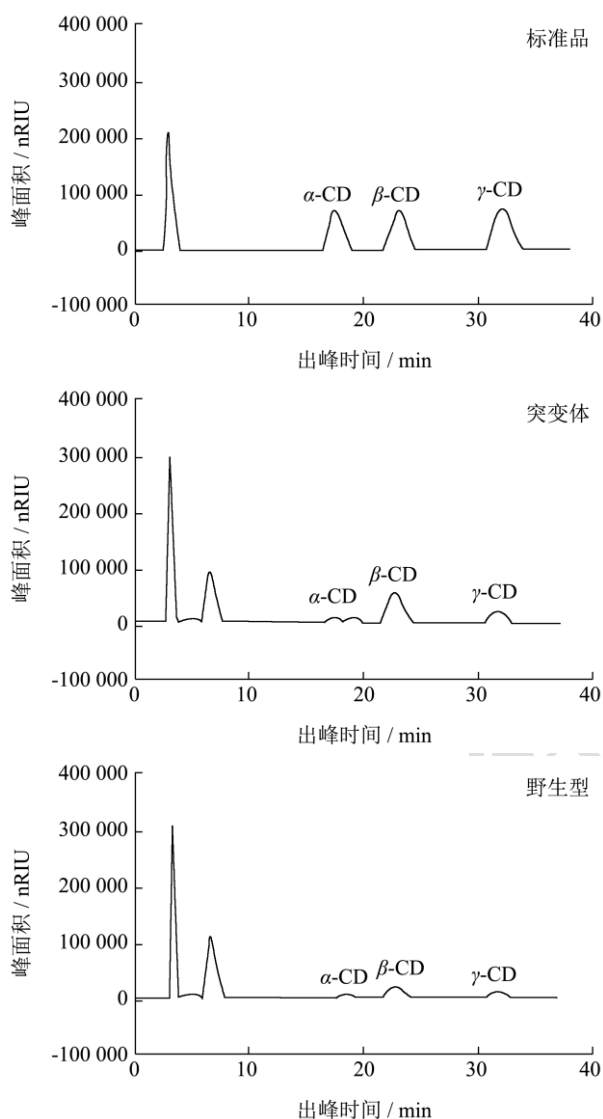


图4 突变体 Q280L 转化可溶性淀粉生成 β -CD

Fig.4 The mutant Q280L transforms soluble starches to produce β -cyclodextrin

2.5 突变体 Q280L 酶学性质的分析

(1) 最适反应 pH 值及 pH 值稳定性: 在 pH 值 4.00~11.00 范围内, 55 °C 条件下反应, 分别测定其相对酶活。结果如图 5 所示: 突变体 Q280L 在 pH 值 8.0 条件下, 酶活力最高。在 pH 值 7.50~11.00 时, 突变体 Q280L 在 55 °C 条件下保温 1 h 后其仍保留 70.00% 以上的相对活性。而野生型的最适 pH 值为 7.00, 在 pH 值

5.00~10.00 时, 能保留 95.00% 以上的相对活性^[24], 表明突变体 Q280L 的最适 pH 与野生型相比发生了变化, 且野生型的 pH 稳定性范围广。但在碱性条件下, 突变体 Q280L 的稳定性明显高于野生型。

(2) 最适温度及热稳定性: 如图 6a 可知, 在 pH 值 8.00 条件下, 突变酶在 65 °C 时酶活力最高, 与野生型的最适温度一致^[15], 说明该突变并未对酶的最适温度产生影响。对两者的热稳定性进行比较(图 6b)也发现在 55 °C 时, 突变酶和野生型的热稳定性基本一致, 而当温度升高至 65 °C 时突变酶的热稳定性远低于野生型。

(3) 突变体 Q280L 的动力学参数分析: 以可溶性淀粉为底物, 测定突变体 Q280L 的动力学参数, 其中, K_m 为 2.02 mg/mL, V_{max} 为 71.63 μ mol/min。与野生型 (K_m 为 3.75 mg/mL) 相比^[15], 其 K_m 值有所降低, 说明突变体 Q280L 对底物的亲和力高于野生型。

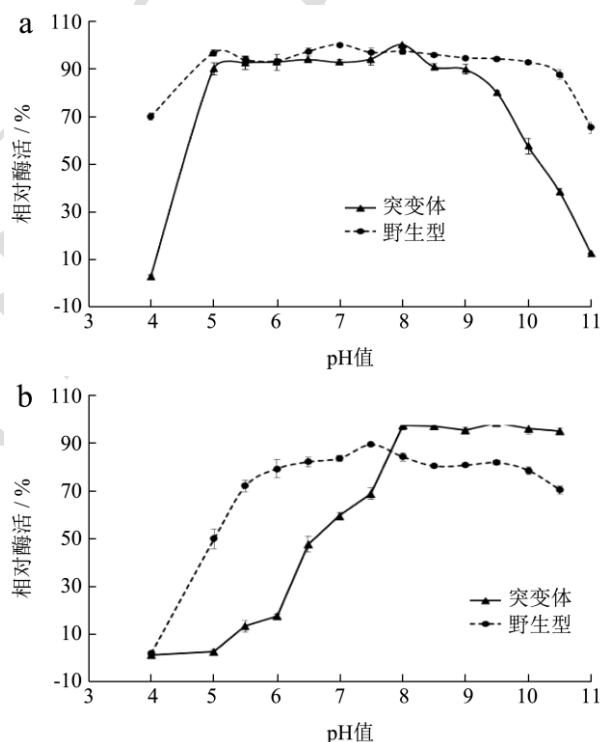
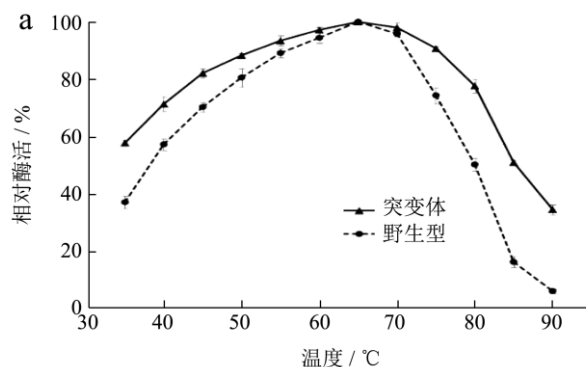


图5 最适反应 pH 值 (a) 及 pH 值稳定性 (b)

Fig.5 Optimal reaction pH (a) and pH stability (b)



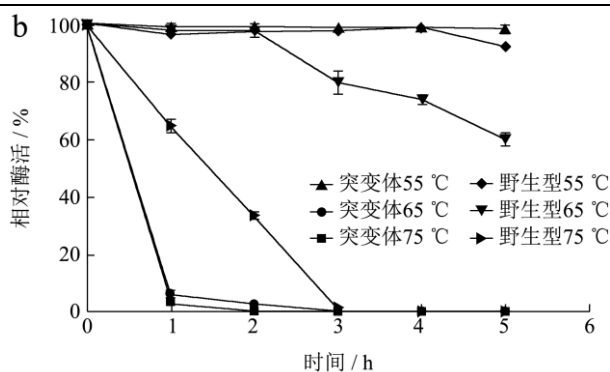


图6 最适反应温度 (a) 及热稳定性 (b)

Fig.6 Optimal reaction temperature (a) and thermal stability (b)

表1 动力学参数分析

样品	K_m /(mg/mL)	V_{max} /(μ mol/min)
野生型	3.75 \pm 0.11 ^a	79.47 \pm 1.23 ^a
突变体	2.02 \pm 0.07 ^b	71.63 \pm 1.06 ^b

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.6 突变体 Q280L 的序列分析和结构预测

由 NCBI 的序列对比结果可知, 突变体 Q280L 的序列与野生型相比, 第 839 位的腺嘌呤 (A) 突变为胸腺嘧啶 (T), 相对应的氨基酸序列中第 280 位的谷氨酰胺 (Q) 变为亮氨酸 (L)。

使用 SWISS-MODEL 建模系统进行三级结构的建模, 选择来源于 *Bacillus* sp. 1011 的 CGTase (PDB: 1v3k) 作为模板, 其相似度和质量评估分别为 98.98% 和 0.99。使用 PyMol 对其突变位点进行分析。结果如图 7, 突变体第 280 位氨基酸残基由 GLN 变为 LEU, 侧链变短。突变前的 Q280 位点与氨基酸残基 Y269 有氢键作用; 突变后, L280 位点与氨基酸残基 Y269 的氢键作用力消失。李晓涵等^[13,14,25]认为, 氢键作用力的变化会改变酶与底物结合的结合能力, 从而对 CGTase 的环化作用产生影响。Xie 等^[26]的研究结果表明, 当活性位点氨基酸残基的侧链长度较短时, 可以加大底物结合凹槽的作用空间, 有利于生成更大的 CD 产物, 说明侧链大小和 CGTase 的环化特异性之间有一定的关联。凌凯等^[13]的研究结果表明用侧链较短的氨基酸替代活性位点的侧链较长氨基酸也能有效提高 β -CD 与 γ -CD 的转化率。同时, 突变位点的第 280 位残基靠近与活性位点相关的 Y258、F259、F283, 这些活性位点会影响于其相关的环化活性和产物的特异性^[27]。还有研究表明, 氢键的数量和距离与热稳定和活性有关^[27], 所以 Q280L 中 L280 与 Y269 之间的一个氢键作用力的消失很可能是导致突变体 Q280L 热稳定低于野生型的原因。

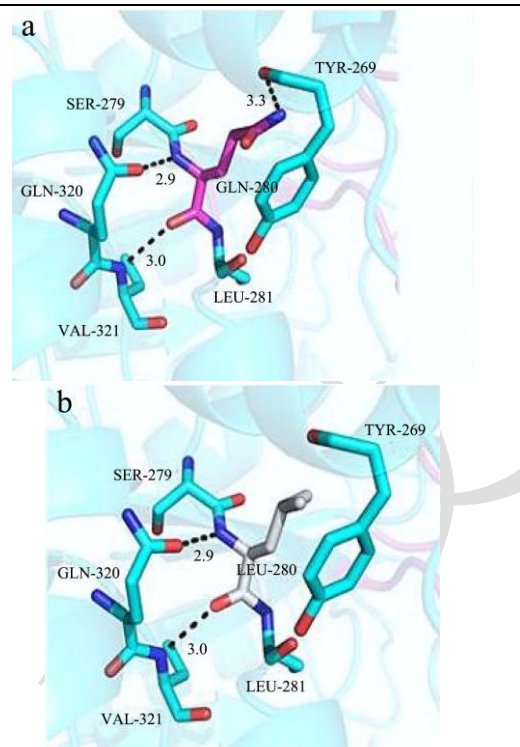


图7 野生酶 (a) 和突变酶 (b) 在 280 位点上与周围氨基酸之间的氢键作用力的结构图

Fig.7 Hydrogen bonding interaction of the amino acid residue 280 of Wild β -CGTase (a) and mutant β -CGTase (b) with surrounding amino acid residues

3 结论

本研究通过易错 PCR 技术进行了来源于 *Paenibacillus campinasensis* 的 β -CGTase 的体外定向进化, 并对筛选得到的突变体 Q280L 的酶学性质进行了研究分析, 结果表明: 在构建突变文库的过程中, 在反应体系中添加 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度分别为 4.00 mmol/L 与 0.30 mmol/L 时, 可获得最高的阳性转化率, 发生突变的氨基酸个数为 1 个, 符合易错 PCR 构建突变文库的要求。相对于野生型, Q280L 具有更高的酶活性以及耐碱能力, 其对底物的结合特异性更强。

本研究简单、快速地完成了突变文库高通量筛选工作, 获得了耐碱、酶活性更高的突变酶 Q280L, 为 β -CGTase 工业化应用提供了新的方向。

参考文献

- [1] WANG Lei, CHEN Shen, WU Jing. Cyclodextrin enhanced the soluble expression of *Bacillus clarkii* γ -CGTase in *Escherichia coli* [J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 72.
- [2] HUANG Yan, YANG Yulu, XIA Wei, et al. Optimization of maltooligosyl fructofuranosidase production by recombinant β -cyclodextrin glycosyltransferase [J]. Chinese Journal of

- Biotechnology, 2021, 37(4): 1415-1424.
- [3] 陈晓彤. α -环糊精葡萄糖基转移酶中试制备工艺优化及酶的应用评价[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- [4] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(1): 1-11.
- [5] WU Bian, Wijma, SONG Lu, et al. Versatile peptide C-terminal functionalization via computationally engineered peptide amidase [C]// ACS Catalysis, 2016, 6(8): 5405-5414.
- [6] 崔颖璐, 吴边. 计算机辅助蛋白结构预测及酶的计算设计研究进展[J]. 广西科学, 2017, 24(1): 1-6.
- [7] Choi Jung Min, Kim Hak Sung. Structure-guided rational design of the substrate specificity and catalytic activity of an enzyme [J]. Methods in Enzymology, 2020, 643: 181-202.
- [8] KONG Xiangduo, LIU Yiming, GOU Xiaojun, et al. Directed evolution of α -aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 137.
- [9] Nirantar Saurabh Rajendra. Directed evolution methods for enzyme engineering [J]. Molecules, 2021, 26(18): 5599-5599.
- [10] Arnold F H, Wintrod P L, Miyazaki K, et al. How enzymes adapt: lessons from directed evolution [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(2): 100.
- [11] Turner N J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(11): 474.
- [12] WU Haiyang, TIAN Xiaojing, DONG Zixing, et al. Engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase with improved calcium independence and catalytic efficiency by error-prone PCR [J]. Starch- Stärke, 2018, 70(3-4): 1700175.
- [13] 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.
- [14] 李晓涵, 郭姣梅, 宋凯, 等. *Bacillus* sp. Y112 环糊精葡萄糖基转移酶位点 R81 定点突变提高产物特异性[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 133-138.
- [15] ZHENG Jinzhu, LI Xiangqian, WU Huawei. High-level extracellular secretion and characterization of the thermophilic β -cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* in *Escherichia coli* [J]. Biotech, 2019, 9(10): 1-11.
- [16] 孙晨, 肖慈英, 郭美锦, 等. 基于易错 PCR 技术的红酵母 D-氨基酸氧化酶的定向进化[J]. 工业微生物, 2014, 4: 52-58.
- [17] 许勇. 酶的定向进化及其应用进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 23: 12-14.
- [18] 李振国, 徐明波, 姚文兵, 等. 大肠杆菌周至蛋白提取工艺的研究[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 95-97.
- [19] 吴华伟, 张展, 李相前, 等. 易错 PCR 定向进化大幅度提高耐热 β -葡聚糖酶的活性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 1-4.
- [20] 胡海艳, 甘祥武, 黄秀敏, 等. 基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究[J]. 轻工学报, 2020, 35(4): 8-15.
- [21] GUAN Lijun, GAO Yang, LI Jialei, et al. Directed evolution of *Pseudomonas fluorescens* lipase variants with improved thermostability using error-prone PCR [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 1034-1034.
- [22] QIU Jiarong YANG Haiyan, SHAO Yuting, et al. Enhancing the activity and thermal stability of a phthalate-degrading hydrolase by random mutagenesis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111795.
- [23] 湛恩华, 李相前, 吴华伟. β -环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆、表达及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 77-81.
- [24] LI Caiming, YOU Yuxian, ZHANG Yuzhu, et al. Maltose binding site 2 mutations affect product inhibition of *Bacillus circulans* STB01 cyclodextrin glycosyltransferase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 175: 254-261.
- [25] KONG Demin, WANG Lei, SU Lingqia, et al. Effect of Leu277 on disproportionation and hydrolysis activity in *Bacillus stearotheophilus* NO₂ cyclodextrin glucosyltransferase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(12).
- [26] Xie T, Song B H, Yue Y, et al. Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. 602-1 [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 170: 10-16.
- [27] 李才明. β -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中的分泌表达及其热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.