

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022791

引用格式:郑丹妮,柏玉香,纪杭燕,等. γ -CGTase 酶学性质及产物特异性影响因素[J]. 食品与发酵工业,2020,46(5):38-45.
ZHENG Danni, BAI Yuxiang, JI Hangyan, et al. Expression, characterization and product specificity of gamma-CGTase from *Bacillus* sp. [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(5):38-45.

γ -CGTase 酶学性质及产物特异性影响因素

郑丹妮^{1,2}, 柏玉香^{1,2}, 纪杭燕^{1,2}, 李晓晓^{1,2}, 王禹^{1,2}, 蒋彤^{1,2}, 金征宇^{1,2*}

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)

摘 要 将 γ -环糊精葡萄糖基转移酶(γ -CGTase)的特有区域作为判断依据,在美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中,通过序列比对及生物信息学分析,筛选出一种新型基因,并将其克隆表达得到一种酶。利用高效液相色谱-质谱联用进行产物鉴定,表明该酶为 γ -CGTase;酶分子质量大约为 80 kDa,最适温度 50 ℃,最适 pH 10.0;无 α -环糊精生成;甲醇、乙醇、环己烷、十二醇激活 γ -CGTase 活力,异丙醇和正丁醇抑制 γ -CGTase 活力;反应时间、淀粉质量浓度及乙醇体积分数均会影响 γ -CGTase 的产物特异性。HPLC 结果显示,在 10% 的乙醇最终体积分数条件下, γ -CGTase 催化产物中 γ -环糊精的比例由 40.11% 增加至 78.20%,专一性提高了 94.96%。该研究提供了一种新型的 γ -CGTase,为提高 γ -CGTase 产物特异性提供研究基础。

关键词 γ -环糊精葡萄糖基转移酶;酶学性质;乙醇;产物特异性

Expression, characterization and product specificity of gamma-CGTase from *Bacillus* sp.

ZHENG Danni^{1,2}, BAI Yuxiang^{1,2}, JI Hangyan^{1,2}, LI Xiaoxiao^{1,2},
WANG Yu^{1,2}, JIANG Tong^{1,2}, JIN Zhengyu^{1,2*}

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)

ABSTRACT Based on the specific region of γ -cyclodextrin glycosyltransferase (γ -CGTase), a gene was explored from the NCBI database by sequence alignment and biological information analysis. The gene was cloned and expressed, and a recombinant enzyme was obtained. The reaction product was identified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), which indicated that the enzyme was a γ -CGTase. The molecular weight of the recombinant enzyme was about 80 kDa, the optimum temperature was 50 ℃, and the optimum pH was 10.0. There was no detectable α -cyclodextrin production. The enzyme activity was activated by methanol, ethanol, cyclohexane and dodecanol, but was inhibited by isopropanol and butyl alcohol. The product specificity of the enzyme was affected by the reaction time, the concentration of starch and the volume fraction of ethanol. As indicated by the HPLC analysis result, the proportion of γ -cyclodextrin was increased from 40.11% to 78.20% and the specificity increased by 94.96% in the presence of 10% ethanol. This research could not only provide a novel γ -CGTase but also provide a research basis for changing the product specificity of γ -CGTase.

Key words γ -CGTase; characterization; ethanol; product specificity

第一作者:硕士研究生(金征宇教授为通讯作者, E-mail: fpcenter@jiangnan.edu.cn)

基金项目:国家自然科学基金(31701644);江苏省自然科学基金(BK20170184);现代农业重点及面上项目(BE2018304)

收稿日期:2019-11-12, 改回日期:2019-11-24

环糊精葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glycosyl-transferase, CGTase)是一种多功能型酶,能催化4种不同的反应:3种转糖基反应(歧化反应、环化反应和偶合反应)和水解反应。现阶段,歧化、偶合反应主要用于制备甜菊糖苷^[1]、葡萄糖苷^[2]、L-抗坏血酸^[3],环化活力主要应用于生产环糊精(cyclodextrin, CD)。根据反应初期产物中主要CD的类型^[4],将CGTase分为 α -CGTase、 β -CGTase、 γ -CGTase。由于 γ -CGTase的主产物 γ -CD存在分子空腔大、溶解性好及安全性高的独特优势,以及在小肠中 γ -CD可被淀粉酶作用后降解吸收而 α -CD、 β -CD不能被降解^[5],使得 γ -CD在医药、食品、材料、环境、化妆品等领域有着特殊应用^[6-9]。因此, γ -CGTase作为 γ -CD生产中的关键酶制剂,对其进行筛选、改造及其生产 γ -CD工艺条件的优化一直是研究热点。

γ -CGTase作用淀粉或其衍生物的产物为 α -CD、 β -CD、 γ -CD的混合物,只在特定反应阶段中单一CD含量较高。目前已报道的 γ -CGTase共有8种,来源于*Bacillus* sp. G-825-6^[10]的 γ -CGTase产物中 γ -CD占总CD比例高且不产生 α -CD,但淀粉转化率极低;来源于*Bacillus clarkii* 7364^[11]的 γ -CGTase产物中 γ -CD比例高,但体系中存在的 α -CD因溶解度高给 γ -CD实际纯化带来不便。为此,国内外研究者在改变产物特异性方面进行了相关研究。王磊^[12]在来源于*Bacillus clarkii* 7364的 γ -CGTase作用淀粉反应体系中,加入5% (m/V) 环十二酮来提高 γ -CD产率;王宁^[13]也利用同样的 γ -CGTase,在反应体系中添加2% (m/V) 甘草酸改变 γ -CGTase产物比例;李林林^[14]以*Bacillus* sp. G-825-6 γ -CGTase为基础,通过将211位酪氨酸突变为亮氨酸来改变产物特异性,产物专一性提高了40.94%。

总体而言,国内外现有的 γ -CGTase菌株较少,且 γ -CGTase产物特异性较差。为此,本研究将 γ -CGTase共有保守区域及特有氨基酸作为判断指标,在美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中,通过序列比对及生物信息学分析,筛选出一种新型基因,并将其克隆表达后得到 γ -CGTase;通过反应时间、淀粉质量浓度及乙醇浓度来改变 γ -CGTase产物特异性,以期提供一种新型 γ -CGTase以及为改变 γ -CGTase产物特异性提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

α -CD、 β -CD、 γ -CD,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;可溶性淀粉,国药集团化学试剂有限公司;溴甲酚绿,上海麦克林生化科技有限公司;BCA试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;蛋白上样缓冲液,上海生工生物工程股份有限公司;预染蛋白分子量标准,南京生兴生物技术有限公司;乙腈,美国TEDIA有限公司。化学试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

蛋白电泳系统、凝胶成像系统,中国天能有限公司;超声波清洗器,上海声谱超声设备厂;高速冷冻离心机5804R,艾本德国贸易有限公司;酶标仪,美国Molecular Devices公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;pH计,Mettler Toledo公司;电子天平,Mettler Toledo公司;高效液相色谱,日本岛津公司;Milli-Q-超纯水制备仪,默克有限公司;超高效液相色谱-质谱联用,美国waters公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因挖掘及序列分析

在NCBI数据库中,以目前报道的 γ -CGTase为模板,进行序列相似性比较,选择比对结果中相似度在30%~90%的序列进一步分析。以6个保守区域,3个关键氨基酸为CGTase的基本判断指标,-3亚位点47位氨基酸Thr、-3亚位点序列HP_G(E)GF₋、-7亚位点(145-152)D----I区域为 γ -CGTase特征鉴定依据,最终筛选得到来自于*Bacillus* sp. FJAT-44876的一段基因序列。利用MEGA6软件的Muscle模式和现有 α -、 β -、 γ -CGTase进行序列比对,并绘制 γ -CGTase保守区域及关键序列比对图。

1.2.2 酶的克隆表达

在北京华大基因公司合成来自于*Bacillus* sp. FJAT-44876的基因序列(NCBI登录号:WP096185680),以pET-15b为载体,转至*E. coli* BL21(DE3)进行表达。将*E. coli* BL21(DE3)置于含100 μ g/mL氨苄青霉素的LB肉汤培养基中,在37℃、200 r/min条件下摇床培养直至OD₆₀₀达到0.4~0.6。随后,加入终浓度为40 μ mol/L的IPTG进行诱导表达,于18℃、160 r/min条件下培养24 h。在4℃、10 000 r/min的条件下离心8 min获得菌体,随后用20 mmol/L Tris-HCl (250 mmol/L NaCl, pH 7.5)溶液洗涤2次并采用上述条件离心。将离心后的菌体置于冰水混合物中超声破碎20 min,最终4℃、10 000 r/min的条件下离心30 min获得粗酶液。

1.2.3 酶的分离纯化

首先利用去离子水和 20 mmol/L Tris-HCl (250 mmol/L NaCl, pH 7.5) 对镍亲和凝胶进行清洗和平衡,上样粗酶液,重力流穿后再依次利用含不同摩尔浓度咪唑溶液的 20 mmol/L Tris-HCl (250 mmol/L NaCl, pH 7.5) 进行洗脱,并收集洗脱液,最后对镍亲和凝胶进行平衡及保存,以上操作均在冰水浴条件下进行。随后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定酶分子量和 Bradford 法测定酶浓度。

1.2.4 酶活力测定方法

参考 FUWA^[15] 溴甲酚绿 (BCG) 法并稍作改进,对上述步骤制得 CGTase 的环化活力进行测定。将 900 μ L 15 mg/mL 可溶性淀粉和 100 μ L CGTase 在 50 $^{\circ}$ C、pH 10.0 条件下保温 10 min,沸水浴 10 min 灭酶,再向上述体系中加入 50 μ L 1 mol/L HCl,100 μ L 5 mol/L BCG 以及 2 mL 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.2),将反应混合物在室温下放置 20 min 后于 630 nm 处测定吸光值,其中空白不添加酶液。

酶活力单位定义为:每分钟生成 1 mg γ -CD 所需加酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.5 γ -CGTase 最适温度测定

将 900 μ L 15 mg/mL 可溶性淀粉和 100 μ L (0.09 U) γ -CGTase 混合,分别将反应温度设置在 30~70 $^{\circ}$ C 范围内,间隔 10 $^{\circ}$ C,在 pH 10.0 条件下保温 10 min,沸水浴 10 min 灭酶,测定不同温度下 γ -CGTase 酶活力。将最大酶活力者定义为 100%,计算相对酶活力。以温度为横坐标,相对酶活力为纵坐标绘制温度-相对酶活力曲线。

1.2.6 γ -CGTase 最适 pH 测定

配制 20 mmol/L pH 3.0~12.0 的缓冲溶液 (pH 3.0~5.0 醋酸盐缓冲液,6.0~8.0 磷酸盐缓冲液,8.5~12.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),使用该缓冲溶液配制不同 pH 下的 15 mg/mL 可溶性淀粉,取 900 μ L 上述可溶性淀粉与 100 μ L (0.09 U) γ -CGTase 混合,在 50 $^{\circ}$ C 下保温 10 min,沸水浴 10 min 灭酶,测定不同 pH 下 γ -CGTase 酶活。将最大酶活力者定义为 100%,计算相对酶活力。以 pH 为横坐标,相对酶活力为纵坐标绘制 pH-相对酶活力曲线。

1.2.7 动力学参数测定

以 1、2、5、7.5、10、15、18、20 mg/mL 不同质量浓度的可溶性淀粉作底物,在最适温度 50 $^{\circ}$ C、最适 pH 10.0 的条件下反应,测定酶学动力学参数。

1.2.8 有机溶剂对 γ -CGTase 酶活影响

将最终体积分数为 1% 的甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、环己烷、十二醇加入到 γ -CGTase 中,4 $^{\circ}$ C 条件下放置 1 h,测定不同有机溶剂作用下残余酶活力,将未添加有机溶剂的 γ -CGTase 酶活力定义为 100%。

1.2.9 不同反应时间对 γ -CGTase 产物特异性影响

将 15 mg/mL 可溶性淀粉和 γ -CGTase (5.23 U/g 干基淀粉) 按比例混合,在 pH 10.0、50 $^{\circ}$ C 的条件下保温 2、4、6、8、10、15、20、30、40、50、60、90、120、150、180、240、300、360、420 min,利用 HPLC 测定不同时间下产物的生成。

1.2.10 不同淀粉浓度对 γ -CGTase 产物特异性影响

将 10、15、30、50、70、100 mg/mL 可溶性淀粉和 γ -CGTase (5.23 U/g 干基淀粉) 按比例混合,在 pH 10.0、50 $^{\circ}$ C 的条件下反应 6 h,利用 HPLC 测定最终产物。

1.2.11 不同乙醇体积分数对 γ -CGTase 产物特异性的影响

以 50 mg/mL 可溶性淀粉为底物,添加 γ -CGTase (5.23 U/g 干基淀粉) 和最终体积分数为 1%、1.5%、3%、5%、7%、10% 的乙醇,在最适温度 50 $^{\circ}$ C、最适 pH 10.0 的条件下反应 6 h,利用 HPLC 测定最终产物。

1.2.12 高效液相色谱 (HPLC) 法测定

参考 Ji^[16] 的方法并稍作修改。HPLC 色谱条件为:XBridge Amide (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 分析柱;流动相为 V(乙腈):V(水) = 65:35;柱温 30 $^{\circ}$ C;流速 0.8 mL/min;进样量 20 μ L。

1.2.13 超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 测定

UPLC 使用条件为:Waters-Acquity UPLC 色谱仪;BEH Amide (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) 分析柱;流动相为纯乙腈 (A 液),0.1% 氨水 (B 液);洗脱条件为 75% A 液与 25% B 液平衡 5 min 后洗脱 15 min,65% A 液与 35% B 液洗脱 15 min,50% A 液与 50% B 液洗脱 15 min,最终使用 100% A 液保存柱子;柱温 40 $^{\circ}$ C;流速 0.3 mL/min;进样量 1 μ L。MS 使用条件:ESI⁻ 离子方式;毛细管电压 3.0 V;离子源温度 100 $^{\circ}$ C;碰撞能量 6 V;质谱范围 (m/z) 100~3 000。

1.2.14 数据处理方法

实验结果为 3 次数据的平均值,以其标准偏差表示误差线,利用 Origin 软件进行数据分析及作图。

2 结果与分析

2.1 γ -CGTase 生物信息学分析

采用 MEGA6 软件将 NCBI 数据库中 *Bacillus* sp. FJAT-44876 的蛋白序列与已知表达 α -CD、 β -CD 和 γ -CD 的 CGTase 序列进行比对,结果如图 1-A 所示。来源于 *Bacillus* sp. FJAT-44876 的蛋白序列共有 5 个结构域(数据未体现)^[17]、6 个保守区域、3 个关键氨基酸,保守区 III、V 的 Asp 和保守区 IV 的 Glu 是 CGTase 参与催化的保守残基^[18],其中保守区 III 的 Asp 为亲核基团,可作为稳定中间体,保守区 IV 的 Glu 为可能的质子供体,保守区 V 的 Asp 为底物结合位点。研究表明,CGTase 在 -3、-7 亚位点特有氨基酸的差异将导致产物特异性不同^[19],来源于 *Bacillus* sp. FJAT-44876 的蛋白序列与已知 CGTase 特有序列比对结果如图 1-B 所示。-3 亚位点 47 位氨基酸是区分 α -、 β -、 γ -CGTase 的关键位点,来源于 *Bacillus* sp.

FJAT-44876 的蛋白序列在该位点存在 γ -CGTase 特有氨基酸 Thr,而 α -、 β -CGTase 在相应位点主要为 Lys 或 Arg,表明 47 位氨基酸在 CGTase 产物特异性中扮演着重要角色^[20],同时,相比于 α -、 β -CGTase, γ -CGTase 为具备更多空间结合糖基链以形成 CD₈,在 -3 亚位点存在序列 HP_G(E)GF_,而 α -、 β -CGTase 拥有序列 INYSGVN(N)^[21]。此外,为了拥有更大的空间, γ -CGTase 在 -7 亚位点(145-152)缺失 6 个氨基酸形成 D-----I 区域,以便促使 γ -CD 环的形成,而 α -、 β -CGTase 分别为 SSTDP SFA、SSDQPSFA。将基因序列与 NCBI 数据库序列进行 BLAST 比较,发现该序列与已知的 γ -CGTase:*Bacillus* sp. G-825-6 和 *Bacillus clarkii* 7364 相似度均为 70%,依据生物信息学分析结果,初步判断克隆表达的酶为 γ -CGTase。

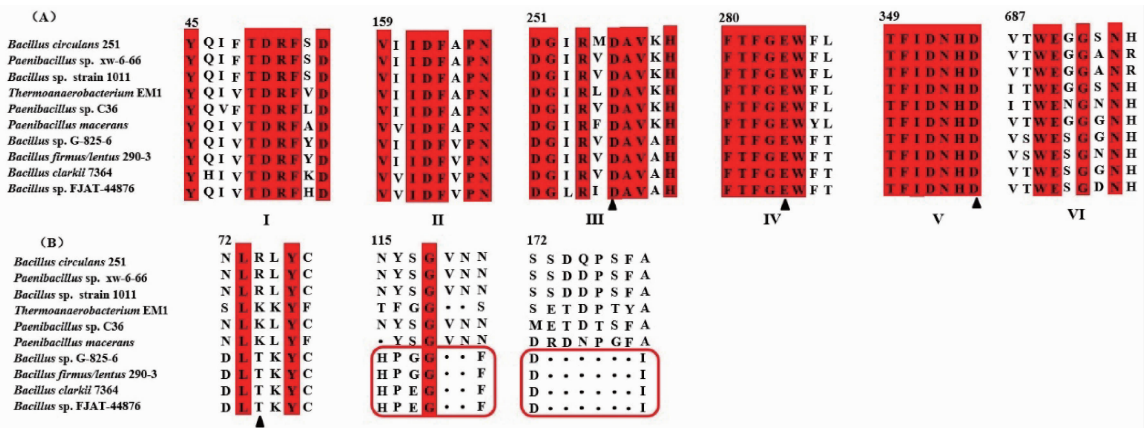


图 1 γ -CGTase 保守区域及关键序列分析

Fig. 1 Conserved regions and the key amino acid sequence of γ -CGTase

注:(A)图中▲表示催化关键氨基酸;(B)图中▲表示 α -、 β -、 γ -CGTase 47 位特有氨基酸,□表示 γ -CGTase-3、-7 亚位点特有序列。 α -、 β -、 γ -CGTase NCBI 登录号为:*Bacillus circulans* 251 (GenBank P43379); *Paenibacillus* sp. xw-6-66 (GenBank AGG09664); *Bacillus* sp. strain 1001 (GenBank BAB18101); *Thermoanaerobacterium* EM1 (GenBank P26827); *Paenibacillus* sp. C36 (GenBank CAP72286); *Paenibacillus* sp. macerans (AGT95840.1); *Bacillus* sp. G-825-6 (GenBank BAE87038); *Bacillus firmus/lentus* 290-3 (GenBank CAA01436); *Bacillus clarkii* 7364 (GenBank BAB91217); *Bacillus* sp. FJAT-44876 (GenBank WP 096185680)

2.2 重组蛋白质的分离纯化

利用 SDS-PAGE 对镍亲和凝胶纯化后的 γ -CGTase 进行分子量测定。来源于 *Bacillus* sp. FJAT-44876 编码的蛋白质由 711 个氨基酸组成,氨基酸序列计算的理论分子量为 80.039 kDa。SDS-PAGE 结果显示目的条带分子量大约为 80 kDa(图 2),与理论值相近,表明重组酶成功表达。

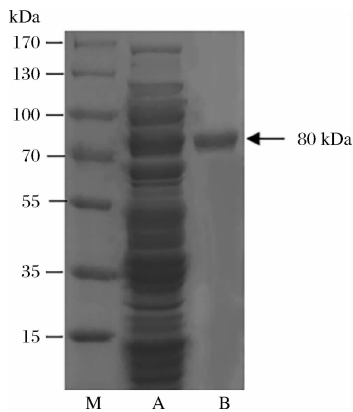
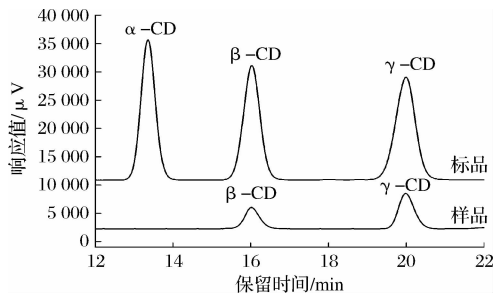
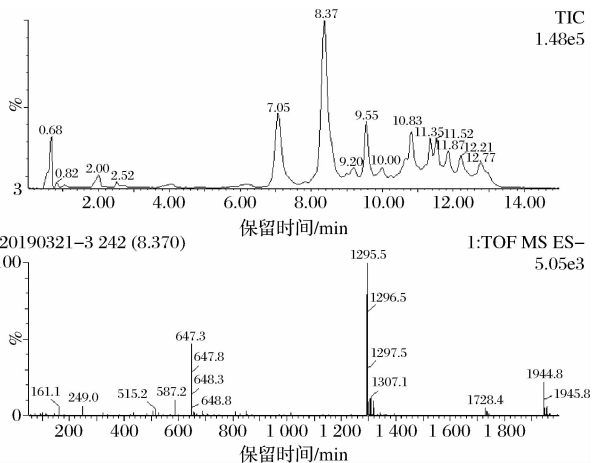
2.3 γ -CGTase 定性分析

以 900 μ L 15 mg/mL 可溶性淀粉为底物,加入 γ -CGTase (0.09 U) 在 50 $^{\circ}$ C、pH 10.0 条件下反应 2 h,利用 HPLC 对产物进行定性分析,结果如图 3 所示。

HPLC 图谱显示,反应 2 h 时主要产物为 γ -CD;此外,利用 UPLC-MS (图 4) 进一步验证,保留时间为 8.370 的质谱表明,此物质的 $[M-H]^{-} = 1\ 295.5$,则其相对分子质量为 1 297,与 γ -CD 标准品出峰位置及相对分子质量一致(数据未显示),确定该物质为 γ -CD。由于 CGTase 种类依据反应初期其主产物类型进行判断^[4],故进一步确定该酶为 γ -CGTase。

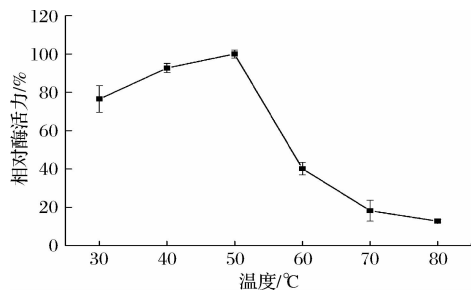
2.4 γ -CGTase 的最适温度

温度是影响酶催化作用的一个重要因素,在最适温度下,酶催化活性最强,酶促反应速率最大,当反应温度高于或低于最适温度时,酶活力均会降低进而影

图2 纯化后 γ -CGTase 的 SDS-PAGE 分析Fig. 2 SDS-PAGE analysis of γ -CGTase from purification图3 γ -CGTase 产物高效液相色谱图Fig. 3 HPLC analysis of the products formed by γ -CGTase注: α -、 β -、 γ -CD 标品浓度均为 8 mg/mL图4 γ -CGTase 产物的超高效液相色谱-质谱联用图Fig. 4 UPLC-MS analysis of the products formed by γ -CGTase

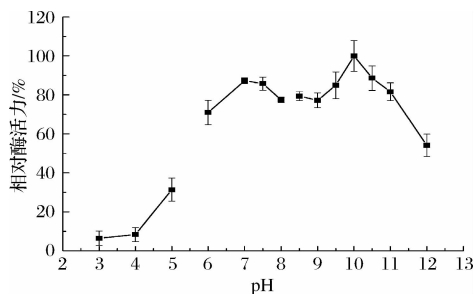
响酶促反应速率。由图 5 可知, γ -CGTase 的最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 与现有报道的 γ -CGTase 最适温度 40 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 接近^[22-23]。 γ -CGTase 酶活力随反应温度的升高而呈上升趋势, 当温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 其酶活力最大, 酶促反应速率最快, 随后, 温度的不断升高导致酶活力持续下降, 最直接原因是高温使酶空间结构破坏, 酶活

力降低。

图5 温度对 γ -CGTase 酶活力的影响Fig. 5 Effect of temperature on the activity of γ -CGTase

2.5 γ -CGTase 的最适 pH

pH 是影响酶催化活性的另一个重要因素, 主要原因是不同 pH 环境可影响酶活性中心构象, 使其发生轻微变化最终导致酶催化活性改变^[24], 由图 6 可知, γ -CGTase 最适 pH 为 10.0, 同时在 7.0 ~ 11.0 范围内有 80% 以上的相对酶活力, 表明 γ -CGTase 在碱性条件下酶活力较高, 与其来源于碱性芽孢杆菌属有关。就目前报道而言, γ -CGTase 最适 pH 与 *Bacillus* sp. G-825-6^[10]、*Bacillus clarkii* 7364^[11] 相近, 而比 *Bacillus* sp. AL-6^[22]、*Bacillus firmus/lentus* 290-3^[23] 最适 pH 值更高, 这有利于高浓度淀粉底物的糊化。此外, γ -CGTase 在 pH 6 ~ 11 范围内, 残余酶活力均大于 70%, 最适 pH 范围较广, 与 CGTase 相关报道一致^[25-26]。

图6 pH 对 γ -CGTase 酶活力的影响Fig. 6 Effect of pH on the activity of γ -CGTase

2.6 γ -CGTase 动力学参数测定

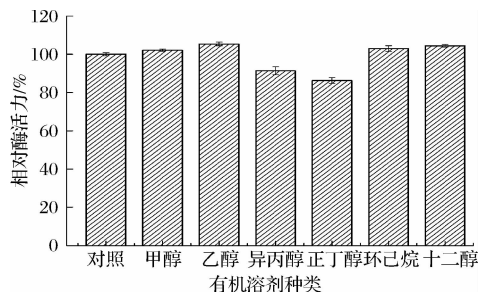
酶促反应动力学参数可表征一个酶的基本性质, 米氏常数 (K_m)、转化数 (k_{cat}) 及最大反应速率 (V_{max}) 不仅可判断酶的最适底物、酶与底物亲和力大小, 还能确定酶促反应速率, 结果如表 1 所示。与王磊^[12]报道的来源于 *Bacillus clarkii* 7364 的 γ -CGTase 动力学参数相比, k_{cat} 值较高, 说明 γ -CGTase 与可溶性淀粉亲和力较高。

表1 γ -CGTase 的动力学参数Table 1 The kinetic parameters of γ -CGTase

$V_{\max}/[\text{mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}]$	$K_m/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$
0.29	4.53	39.64

2.7 有机溶剂对 γ -CGTase 酶活力的影响

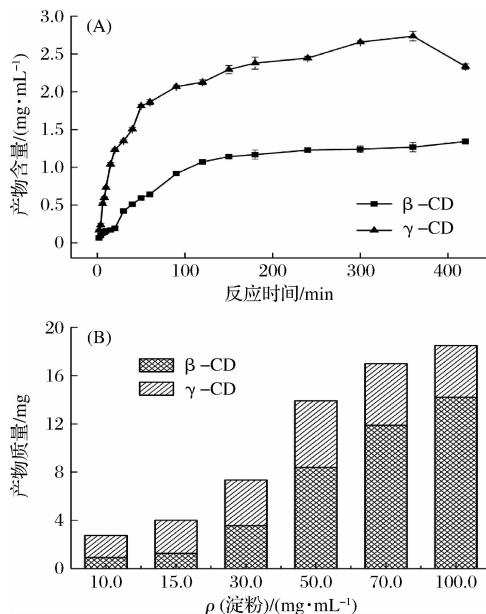
有机溶剂在当前环糊精生产中必不可少,其不仅可改变产物比例,还对 CGTase 酶活力产生一定影响。如图 7 所示,甲醇、乙醇、环己烷、十二醇对 γ -CGTase 酶活力有一定的提高作用,相对而言,乙醇对 γ -CGTase 酶活力提高效果更为明显,而异丙醇和正丁醇使 γ -CGTase 酶活力降低,主要原因是不同 CGTase 对有机溶剂具有不同耐受性,蛋白质结构改变程度不同,进而导致酶活力不同。

图7 有机溶剂对 γ -CGTase 酶活力的影响Fig. 7 Effect of organic solvents on the activity of γ -CGTase

2.8 反应时间及淀粉浓度对 γ -CGTase 产物特异性影响

在实际反应过程中,因 CGTase 还存在偶合、水解、歧化活力,使生成的 CD 可被作为底物继续反应,导致不同反应时间、不同淀粉浓度下的产物比例不同。如图 8-A 所示,在 0~6 h 内, γ -CGTase 反应体系中主产物为 γ -CD 且 γ -CD 产量呈上升趋势, β -CD 含量缓慢增加。6~7 h, γ -CD 含量减少,而 β -CD 仍在增加,产物比例发生明显变化,主要原因^[27]可能是在环化反应进行的同时, γ -CGTase 将反应生成的 CD 和麦芽低聚糖作为底物,通过偶合反应使 CD 生成线性麦芽低聚糖,而 γ -CD 比 β -CD 更适合作为 γ -CGTase 偶合反应底物,最终导致 6~7 h 内, γ -CD 含量减少而 β -CD 含量增加。图 8-B 的结果表明,高浓度淀粉反应的产物中 γ -CD 含量小于 β -CD,而相同反应条件下,低浓度淀粉产物中 γ -CD 含量远大于 β -CD,主要因为反应体积一定时,高浓度淀粉分子与酶相互碰撞几率增大,反应速率加快,生成较多的麦芽低聚糖;产物中麦芽低聚糖可进一步与 CD 发生偶合反应,由于 γ -CD 偶合速率比 β -CD 快,使得高浓度淀粉反应

体系中生成的 γ -CD 含量小于 β -CD。

图8 反应时间(A)、淀粉浓度(B)对 γ -CGTase 产物特异性影响Fig. 8 Effect of reaction time(A) and concentration of starch(B) on the product specificity of γ -CGTase

2.9 不同乙醇体积分数对 γ -CGTase 产物特异性影响

乙醇因其危害性低、挥发性良好且抑菌性效果明显,在改变 CGTase 产物特异性中得到广泛应用^[28]。为了更好地探究乙醇对改变产物特异性的效果,选择生成 β -CD 含量相对较高的淀粉浓度作为底物,最终以 50 mg/mL 淀粉为研究对象。如图 9 所示,对照组中 γ -CGTase 反应 6 h 后 β -CD 比 γ -CD 含量更多,主要因为 γ -CGTase 的偶合作用使 γ -CD 含量减少;与对照组相比,乙醇的添加明显使 γ -CD 得到有效保留,原因可能是极性较高的乙醇会排除水分子进入 γ -CGTase 活性中心,减弱水解反应,从而减少麦芽低聚糖的产生^[29],以及乙醇与麦芽低聚糖结合减弱 γ -CGTase 偶合作用^[30],使 γ -CD 比例提高。总体来看, γ -CD 含量随乙醇最终体积分数的增加呈上升趋势,当乙醇最终体积分数大于 5% 时, γ -CD 含量有微弱减少,主要因为高浓度乙醇环境中, γ -CGTase 酶活损失和淀粉底物利用度降低。此外,由表 2 可知,与对照组相比,添加乙醇后 γ -CD 占总 CD 的比例明显增大,尤其是在 10% 的乙醇最终体积分数下,该比例由 40.11% 增加至 78.20%,专一性提高了 94.96%,表明乙醇在改变 γ -CGTase 产物特异性方面具有广泛前景。

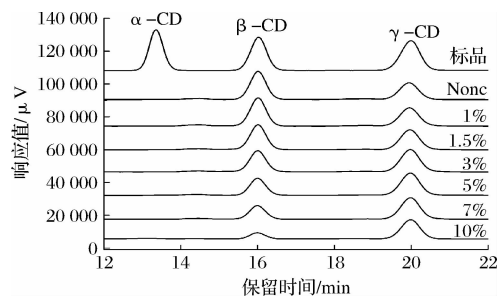


图9 不同乙醇体积分数对γ-CGTase产物特异性影响
Fig.9 Effect of different concentration of ethanol on the product specificity of γ-CGTase

表2 不同体积分数乙醇作用下γ-CGTase产物比例
Table 2 The proportion of γ-CGTase products under different concentration of ethanol

乙醇/% vol	淀粉 转化率/%	单一 CD 所占比例/%	
		β-CD	γ-CD
对照	22.38	59.89	40.11
1.0	23.43	56.96	43.04
1.5	23.16	52.97	47.03
3.0	22.45	46.20	53.80
5.0	20.18	40.59	59.41
7.0	18.04	34.94	65.06
10.0	12.90	21.80	78.20

3 结论

将来源于 *Bacillus* sp. FJAT-44876 的一段基因进行克隆,并在 *E. coli* BL21 (DE3) 异源表达,经镍柱纯化后,对 γ-CGTase 进行酶学性质测定及产物特异性影响因素研究。该酶分子质量大约为 80 kDa,最适温度 50 ℃,最适 pH 10.0。反应时间、淀粉质量浓度及乙醇浓度均对 γ-CGTase 产物特异性有影响,其中乙醇影响效果显著。与对照组相比,10% 乙醇最终体积分数下,γ-CGTase 作用生成的 CD 中 γ-CD 所占比例由 40.11% 增加至 78.20%,专一性提高了 94.96%。这将为 γ-CD 生产提供一种新型 γ-CGTase,并为改变 γ-CGTase 产物特异性提供基础。

参 考 文 献

[1] LUT, XIA Y M. Transglycosylation specificity of glycosyl donors in transglycosylation of stevioside catalysed by cyclodextrin glucanotransferase[J]. Food Chemistry, 2014, 159(15):151-156.
[2] GONZALEZ-ALFONSO J L, LEEMANS L, POVEDA A, et al. Efficient α-glucosylation of epigallocatechin gallate catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* Species [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66 (28): 7 402-7 408.

[3] TAO X M, WANG T, SU L Q, et al. Enhanced 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis through iterative saturation mutagenesis of acceptor subsite residues in *Bacillus stearothermophilus* NO₂ cyclodextrin glycosyltransferase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(34):9 052-9 060.
[4] PENNINGA D, STROKOPYTOV B, ROZEBOOM H J, et al. Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity[J]. Biochemistry, 1995, 34(10):3 368-3 376.
[5] MUNRO I C, NEWBERNE P M, YOUNG V R, et al. Safety assessment of gamma-cyclodextrin [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004, 39:S3-S13.
[6] 张昊,李雅兴,张毅,等. γ-环糊精固载淀粉的制备及其对废水中染料去除性能研究[J]. 化工新型材料, 2019(6):257-262.
[7] 李丹. γ-环糊精包含甜菊苷水解产物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
[8] 杨李霞,魏静,张晓梅. γ-环糊精对槲皮素和扁桃酸的包结[J]. 云南化工, 2016. 43(1):19-23.
[9] 隋小宇,刘畅,王钧,等. 辅酶 Q10-γ-环糊精纳晶混悬物的制备及其性质研究[J]. 中国药杂志, 2015. 50(16):1 412-1 418.
[10] HIRANOK, 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] TAKADA M, NAKAGAWA Y, YAMAMOTO M, et al. Biochemical and genetic analyses of a novel gamma-cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364 [J]. Journal of Biochemistry, 2003, 133(3):317-324.
[12] 王磊. *Bacillus clarkii* 7364 γ-环糊精葡萄糖基转移酶的重组表达及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
[13] 王宁. α-环糊精以及 γ-环糊精的酶转化工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
[14] 李林林. *Bacillus* sp. G-825-6 γ-CGT 酶的性质、应用及其突变研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
[15] FUWA H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate[J]. Journal of Biochemistry, 2008, 41(5):583-603.
[16] JI H Y, BAI Y X, LI X X, et al. Preparation of malto-oligosaccharides with specific degree of polymerization by a novel cyclodextrinase from *Palaeococcus pacificus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 210:64-72.
[17] VEEN B A V D, UITDEHAAG J C M, DIJKSTRA B W, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1543(2): 336-360.
[18] STROKOPYTOV B, PENNINGA D, ROZEBOOM H J, et al. X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases [J]. Biochemistry, 1995, 34(7):2 234-2 240.
[19] QI Q S, ZIMMERMANN W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(5):475-485.
[20] VEEN B A V D, UITDEHAAG J C M, DIJKSTRA B W, et al. The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of

- cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251: Implications for product inhibition and product specificity [J]. FEBS Journal, 2000, 267(12):3 432 – 3 441.
- [21] UITDEHAAG J C M, KALK K H, VEEN BART A V D, et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(49):34 868 – 34 876.
- [22] FUJITA Y, TSUBOUCHI H, INAGI Y, et al. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. AL-6[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990, 70(3):150 – 154.
- [23] SCHMID G. γ -CGTase[P]. US Patent, 5409824, 1995 – 04 – 25.
- [24] ATANASOVA N, KITAYSKA T, BOJADJIEVA I, et al. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1):116 – 122.
- [25] GAWANDE B N, PATKAR A Y. Purification and properties of a novel raw starch degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(9 – 10):735 – 743.
- [26] 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):5 771 – 5 779.
- [27] MORI S, GOTO M, MASE T, et al. Reaction conditions for the production of γ -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605 [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59(6):1 012 – 1 015.
- [28] FENELON V C, AGUIAR M F A, MIYOSHI J H, et al. Ultrafiltration system for cyclodextrin production in repetitive batches by CGTase from *Bacillus firmus* strain 37 [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(7):1 291 – 1 301.
- [29] CALSAVARA L P V, CUNHA A R D, BALBINO T A, et al. Production of cyclodextrins from cornstarch granules in a sequential batch mode and in the presence of ethanol[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(7 – 8):1 485 – 1 493.
- [30] 洪雁, 靳蓉, 周炜. β -环糊精合成中不同助剂以及小分子糖对转化率的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(24):102 – 105.