

蜡状芽孢杆菌环糊精糖基转移酶的基因克隆表达·酶学特性及定点突变研究

花敬涵, 杨静文*, 胡雪芹*, 张洪斌 (合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 研究克隆、表达了蜡状芽孢杆菌来源的环糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, EC 2.4.1.19)基因,研究了其酶学性质,并在此基础上构建突变菌株以探究关键氨基酸位点与产物特异性的关系。结果表明,重组CGTase的最大比活力达5 292 U/mL,分子量约为68 kDa,最适温度和pH分别为55℃和8.5;以淀粉为底物催化合成的主要产物是 β -环糊精(β -CD);通过序列对比选取了第47位氨基酸(Ala)进行定点突变,构建了A47R、A47M、A47S、A47Y。研究发现活性区域中第47位氨基酸对于产物特异性和产量具有一定的影响,其中亲水性氨基酸更利于CDs(尤其 β -CD)的合成,这为酶法合成 β -CD的工业应用提供了方法。

关键词 β -环糊精糖基转移酶;克隆;表达;定点突变

中图分类号 S188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)05-0110-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning, Expression, Enzymatic Properties and Site-directed Mutation of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus cereus*

HUA Jing-han, YANG Jing-wen, HU Xue-qin et al (School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract In this study, the cloning, expression and enzymatic properties of the cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) gene from *Bacillus cereus* were studied. Based on this, four mutant strains A47R, A47M, A47S, A47Y were constructed to explore the relationship between key amino acid sites and product specificity. The results showed that the maximum specific activity of recombinant CGTase was 5 292 U/mL, the molecular weight was about 68 kDa. The optimum temperature and pH were 55 °C and 8.5, respectively. The main product of starch-based catalytic synthesis was β -cyclodextrin (β -CD). Through sequence alignment, the 47th amino acid (Ala) was selected for sequence-directed mutagenesis, and A47R, A47M, A47S, A47Y were constructed. It was found that the active-site residue 47 had certain influence on product specificity and yield, among which hydrophilic amino acids were more conducive to the synthesis of CD (especially β -CD). This study provided a method for the industrial application of enzymatic synthesis of β -CD.

Key words β -cyclodextrin glycosyltransferase; Cloning; Expression; Site-directed mutagenesis

环糊精(cyclodextrins, CDs)是含有亲水外部和疏水中心腔的环状低聚糖,由于它们具有能够与许多难溶性亲脂性分子形成水溶性包合物的独特优势,故被广泛应用于制药、纺织、农业、化妆品、化学和食品工业等领域^[1-3]。CDs通常由淀粉或淀粉衍生物经环糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, EC 2.4.1.19)催化合成^[4]。CGTase是 α -淀粉酶家族的重要成员,是一种胞外酶,可催化淀粉或多糖中 α -1,4键裂解成CDs^[5-6]。

CGTase的来源以细菌和古细菌居多,而真菌较少,这其中又以芽孢杆菌为主^[3,7]。将CGTase基因在合适宿主中进行异源表达仍被认为是提高CGTase产量的有效方法,大约50%的商业化生产的CGTase是通过异源生产获得的^[7-10]。在众多表达宿主中,大肠杆菌由于其低成本、易培养和高蛋白表达量,被认为是CGTase异源表达的最理想宿主^[7,10]。VAN等^[11]描述了环糊精糖基转移酶催化合成环糊精的具体机制。CGTase可以催化4种反应:环化、偶联、歧化和水解^[12]。其中,环化反应(淀粉中 α -糖苷键断裂,供体的一部分被分离出来作为受体环化产生CDs)是CGTase的特异性反应,产物多以 α -CD、 β -CD、 γ -CD这3种混合物的形式存在;偶联反应(CDs的环状结构中 α -糖苷键裂解,所得的寡

糖转移至受体底物形成糖基化产物)被认为是环化的逆反应;歧化反应(直链低聚糖的 α -糖苷键断裂,产生的葡萄糖或低聚糖作为糖基供体转移到受体底物,生成聚合度不同的糖基化产物)和水解反应(水分子参与反应,催化底物分解成低聚糖);环化、偶联和歧化反应均具有转糖基功能,其活性通常大于水解酶活^[11,13-14]。

CGTase催化淀粉合成CDs,其产物主要是 α -、 β -和 γ -CD的混合物(分别具有6、7和8个葡萄糖单元),这给CDs的后续分离和纯化带来困难^[3,7,15-16]。因此,提高催化产物的专一性对特定环糊精的实际生产具有重要意义,即产物特异性。近年来提高环糊精的产物特异性一直是研究热点,主要流行的2种有效策略包括向反应混合物中添加有机溶剂和使用定点突变来改变CGTase的结构^[16-18]。尽管添加有机溶剂可以提高环糊精的特异性和总收率,但溶剂(例如甲苯或丙酮)的毒性和从最终产品中去除的成本限制了环糊精产品的大规模生产,特别是食品工业^[18]。与添加有机溶剂作为复合剂相比,对CGTase进行分子改造的方法更环保且成本更低^[16]。因此,理性改造CGTase以提高其产物特异性是必要的。

笔者对多种来源的CGTase基因进行序列比对,结果显示不同组的CGTase的残基31性质各不相同(图1)。而蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)来源的CGTase中Ala47与环状芽孢杆菌(*B. circulans*)Ala31具有高度相似性。对蜡状芽孢杆菌来源的CGTase中Ala47进行了定点突变,并研究了47位氨基酸侧链对其环糊精产物特异性的影响,探讨此位点对

作者简介 花敬涵(1994—),男,安徽六安人,硕士研究生,研究方向:生物制药与酶工程。*通信作者:胡雪芹,副教授,博士,从事生物制药与酶工程研究;杨静文,讲师,博士,从事酶的分子改造及催化应用研究。

收稿日期 2019-01-03; **修回日期** 2019-01-08

CGTase 产物特异性的影响,还分析了相关机制。

1 材料与与方法

1.1 菌种、材料与试剂 将生物制药与酶工程实验室构建保存的重组质粒 *pBV220-cgt* 用作 PCR 反应的 DNA 模板,质粒 *pET-22b* (上海生工生物工程公司) 作为基因表达载体。限制性核酸内切酶 (*Bam*HI、*Sal*I)、DNA 聚合酶 (FastPfu DNA Polymerase)、DNA 连接酶 (*T*₄ DNA Ligase)、Fast Mutagenesis System 试剂盒、质粒提取试剂盒、用于表达的宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 和用于克隆的宿主菌 *E. coli* DMT、*E. coli* DH5 α 均购自北京全式金公司。

α -CD、 β -CD 和 γ -CD 的标准样品购自上海生工生物工程公司 (中国上海),引物合成和 DNA 测序由苏州金唯智生物科技有限公司提供服务;其余试剂均为分析级。

1.2 仪器与设备 Life Eco PCR 基因扩增仪购自杭州博日科技有限公司;Knauer 高效液相色谱仪 (包括示差检测器及色谱工作站) 购自德国诺尔公司;TSKgel Amide-80 5 μ m 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm) 购于东曹 (上海) 生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 β -CGTase 基因的克隆。 使用重组质粒 *pBV220-cgt* 作为模板,利用 Primer Premier 软件设计引物,通过 PCR 扩增蜡状芽孢杆菌来源的 β -CGTase 的基因,其中设计的正向引物序列是 5'-CGCGGATCCGATGATTACGCCAAGCTTTA-3',反向引物序列是 5'-ACGCGTCTGACTTACCAATTGATATGACC-3',引物含有 *Bam*HI 和 *Sal*I 限制性位点 (下划线)。具体扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;接着进行 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min);最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

随后用限制酶消化扩增的 PCR 片段,将 PCR 扩增产物与经 *Bam*HI、*Sal*I 双酶切的 *pET22b* 载体连接,得到重组质粒 *pET22b-cgt*,随后通过热激法将重组质粒 *pET22b-cgt* 转化至 *E. coli* DH5 α 。在经过涂布氨苄西林的固体 LB 抗性筛选后,挑选阳性克隆进行 DNA 测序,测序正确的 *E. coli* DH5 α 即含有 *pET22b-cgt* 的克隆菌。

1.3.2 重组 β -CGTase 的表达和纯化。 从克隆菌中提取质粒,并转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中,得含重组质粒的表达菌。将表达菌的菌株接种到含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中 (1% V/V 接种量),置于转速 250 r/min、37 $^{\circ}$ C 下过夜培养;次日吸取适量种子培养菌液转接至新鲜 LB 培养基富集培养,在菌液浓度 OD₆₀₀ 达 1.0 时加入 IPTG 并置于 25 $^{\circ}$ C 下发酵诱导;在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 下离心得到菌体沉淀,按照菌体干重加入对应量的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 为 8.5);随后振荡、超声破碎、离心,取上清液,即粗酶液。设计单因素试验,分别研究培养温度、菌浓 (OD₆₀₀)、IPTG 剂量和诱导时间对 β -CGTase 表达量的影响。

通过硫酸铵沉淀和凝胶过滤技术对 β -CGTase 进行浓缩纯化。具体操作:使用质量分数为 60% 的硫酸铵对 β -CGTase 进行浓缩,缓慢且温和地搅拌混合物以有效促进盐析;待过夜盐析后,在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,将沉淀重悬于 10 mL 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH8.5) 中;随后

使用 Sephadex G-100 色谱柱 (2.0 cm \times 80 cm) 纯化 β -CGTase,用甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH8.5) 以 20 mL/h 的流速洗脱结合的 β -CGTase。通过 SDS-PAGE^[19] 测定 β -CGTase 的分子量。

1.3.3 酶活力和蛋白含量的测定方法。 酶活的测定采用碘值法^[8],具体方法为取 10 μ L 适量稀释的酶液,加入 0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.5) 200 μ L,加入 200 μ L 质量浓度为 0.2% 的可溶性淀粉,在 40 $^{\circ}$ C、pH 为 8.5 的甘氨酸-NaOH 体系中反应 10 min 后,加入 0.5 mol/L 的冰乙酸 500 μ L 终止反应。通过加入 3 mL 质量浓度为 0.005% 的碘液进行显色,同时以不加酶液的等量蒸馏水作为对照,根据 700 nm 波长下的吸光度 (OD₇₀₀) 确定酶活,一个酶活单位定义为使吸光度下降 10% 的酶量^[20]。

以牛血清白蛋白作为标准蛋白绘制标准曲线,根据标准曲线测定蛋白含量,整个过程通过 Bradford 法完成^[21-22]。

1.3.4 酶学性质研究。 以下关于 β -CGTase 酶学性质几项指标的测定均采用碘值法,并将在温度为 55 $^{\circ}$ C、pH 为 8.5 下测定的酶活数值记为 100%,以此计算相对酶活、剩余酶活。

1.3.4.1 β -CGTase 的最适温度。 将 β -CGTase 在 40~100 $^{\circ}$ C 范围内不同温度下孵育 10 min 后,测定各温度下的剩余相对酶活,确定 β -CGTase 的最适温度。

1.3.4.2 β -CGTase 的最适 pH。 在最适的 pH 条件下,酶的活性最高。分别用以下各缓冲液替换 0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.5),采用碘值法测定酶活以确定 β -CGTase 的最适 pH:0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH4.0~6.0)、0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0~8.0)、0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.0~11.0)。

1.3.4.3 β -CGTase 的温度稳定性。 将 0.01 mL 酶与 0.2 mL 0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.5) 在不同温度 (40~90 $^{\circ}$ C) 下孵育 30 min 后计算剩余酶活以测定 β -CGTase 的温度稳定性。

1.3.4.4 β -CGTase 的 pH 稳定性。 将 0.01 mL 纯化的酶分别在以下缓冲液中孵育 30 min 后测定剩余酶活以判断 β -CGTase 的 pH 稳定性:0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0~6.0)、0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0~8.0)、0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.0~11.0)。

1.3.5 酶法合成环糊精及 HPLC 检测。 将可溶性淀粉溶于甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.5) 中,并在不断搅拌下煮沸至淀粉糊化,制备 0.3 mol/L 糊化淀粉。待糊化淀粉溶液冷却至室温,按照 800 U/g 淀粉的加酶量加入酶液。反应液经煮沸、离心及过滤后,通过 HPLC 检测并结合内标法计算可知 CDs 的生成量。

高效液相色谱 (HPLC) 检测条件:液相检测器为示差检测器,流动相为 65% 乙腈/35% 水,流速为 1.0 mL/min,色谱柱为 X-Amide 色谱柱,柱温为 25 $^{\circ}$ C。

1.3.6 突变菌株的构建。 以重组表达质粒 *pET22b-cgt* 为模板,引入各突变酶的设计引物 (表 1),分别将 47 位的丙氨酸

突变为丝氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、精氨酸,得到单突变体 A47S、A47M、A47Y、A47R。各突变体的 PCR 反应程序均为 94 °C 预变性 3 min;接着进行 30 个循环(94 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 4 min);最后 72 °C 保温 10 min。各突变体的 PCR 反应体系(50 μ L)均为质粒 *pET22b-cgt* 1 μ L,正向引物(10 μ mol/L)1 μ L,反向引物(10 μ mol/L)1 μ L, 2 \times TransStart FastPfu PCR Supermix 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。

表 1 突变酶的引物设计

Table 1 Primer design of mutant β -CGTase

序号 No.	引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence
1	A47S-Forward	TTCTCAGACGGAAATCCAAGCAACCCAT-CTGGG
2	A47S-Reverse	GCTTGGATTTCCTCTGAGAACCGGTCGGT-ACAAT
3	A47M-Forward	TTCTCAGACGGAAATCCAATGAACAACCCAT-CTGGG
4	A47M-Reverse	CATTGGATTTCCTCTGAGAACCGGTCGGT-ACAAT
5	A47Y-Forward	TTCTCAGACGGAAATCCATATAACAACCCAT-CTGGG
6	A47Y-Reverse	ATATGGATTTCCTCTGAGAACCGGTCGGT-ACAAT
7	A47R-Forward	TTCTCAGACGGAAATCCACGTAACAACCCAT-CTGGG
8	A47R-Reverse	ACGTGGATTTCCTCTGAGAACCGGTCGGT-ACAAT

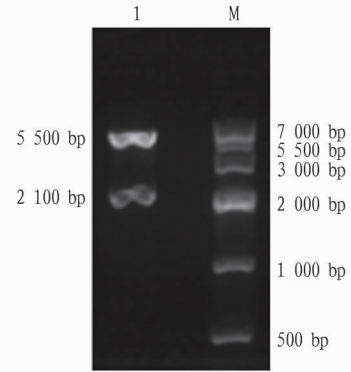
PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证其大小无误后,向 PCR 产物中加 1 μ L DMT 酶,混匀,37 °C 孵育 1 h,去除甲基化模板。然后将得到的酶切产物纯化,转化到 *E. coli* DMT 感受态细胞内,经过含氨苄青霉素的 LB 平板筛选,挑选阳性克隆并提取质粒进行测序。将测序结果正确的重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)中,即得突变菌株的表达菌。

2 结果与分析

2.1 蜡状芽孢杆菌 β -CGTase 的克隆与序列分析 来源于蜡状芽孢杆菌的 β -CGTase(GenBank:KF269705.1)的基因(2 085 bp)被克隆并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。限制性分析表明大约 2 100 bp 的 PCR 片段(图 1)被插入到 *pET22b* 载体中,得到重组质粒 *pET22b-cgt*,其结构见图 2。核苷酸序列测序结果表明, β -CGTase 基因为 2 085 bp,编码 694 个氨基酸残基,其核苷酸序列以登录号 KF269705 保存在 GenBank 数据库中。

2.2 重组 β -CGTase 的表达 图 3A 表明重组 β -CGTase 的最佳表达温度为 25 °C,培养温度对重组 β -CGTase 工程菌的表达有明显影响,这是因为在高温下,酶的表达速率太快而不能被正确折叠,因此形成了无活性的包涵体;而较低的培养温度可以减少包涵体的产生以产生更高的活性。由图 3B 可知,诱导的最佳菌体浓度是 OD₆₀₀ 为 1.8 对应的菌浓。当 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 时,诱导时间为 16 h,CGTase 显示出高酶活,因为高浓度的 IPTG 可以抑制细菌的生长(图 3C、3D)。

2.3 β -CGTase 的纯化及酶学性质 通过硫酸铵沉淀成功纯化 β -CGTase,然后进行 Sephadex G-100 柱层析。纯化的 β -CGTase 在 SDS-PAGE 上显示出分子量为 68 kD 的单个条带



注:1. 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切得到的片段;M. DL8000 DNA Marker

Note:1. The fragment obtained by *Bam*HI and *Sal*I enzyme digestion;M.

DL8000 DNA Marker

图 1 重组质粒电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of recombinant plasmid

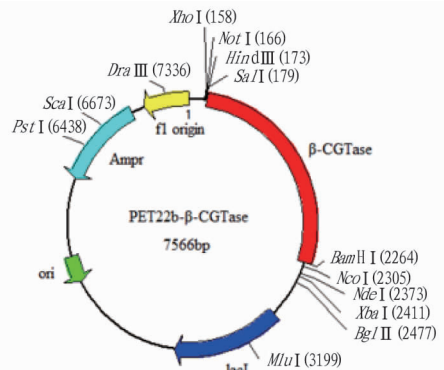


图 2 重组质粒 *pET22b-cgt*

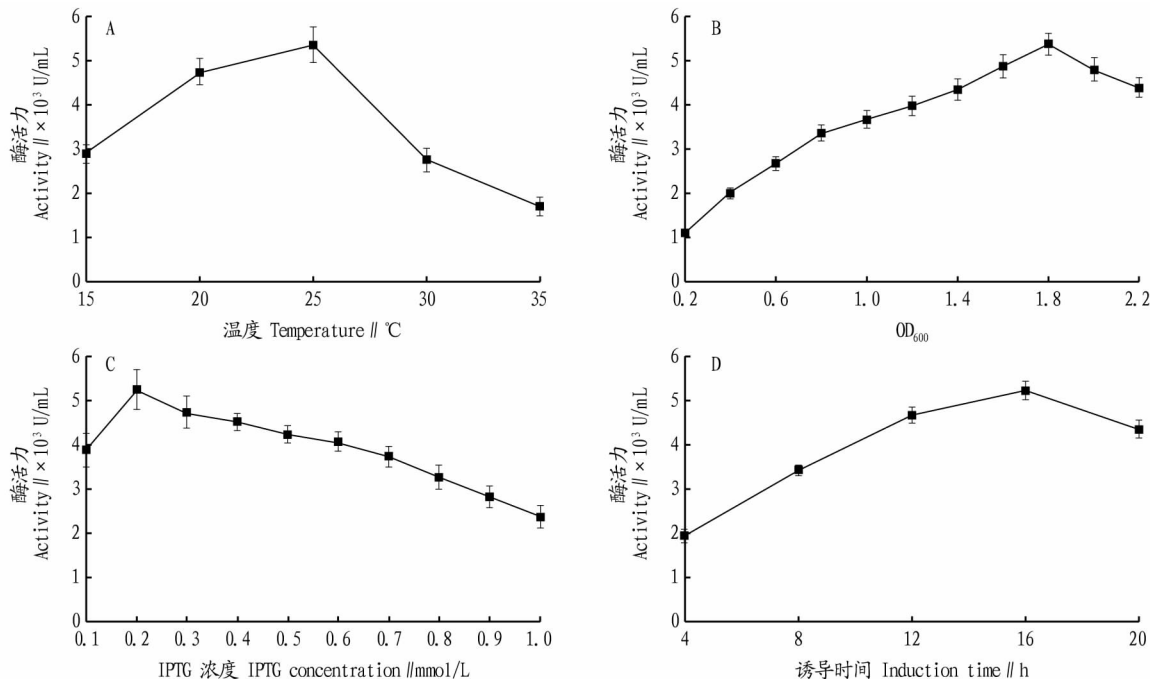
Fig. 2 *pET22b-cgt* recombinant plasmid

(图 4),说明该酶在大肠杆菌中成功获得表达。在最佳发酵条件下,粗酶的比酶活可达 5 239 U/mL。而经过 Sephadex G-100 柱洗脱可得到纯化酶,其比酶活是粗酶的 10.68 倍,纯化产率为 30.91%(表 2)。

由图 5A、5B 可知,该酶的最适温度为 55 °C、最佳 pH 为 8.5。其酶活在 pH 为 7.0~9.0 时相对稳定(图 5B、5D),表明蜡状芽孢杆菌来源 β -CGTase 的催化条件适宜弱碱性,与文献报道 CGTase 的最适 pH(5.0~8.0)结果一致^[23]。图 5C 表明,当温度升至 70 °C 时,酶仍表现出较高的活性,这有利于其催化淀粉合成 CDs。因为淀粉结构中包含无定形区和结晶区,前者通常以松散结构呈现,容易被外界因素影响;后者大多由双螺旋结构形成,相对致密,不易被破坏,同时也难以被 β -CGTase 作用^[24]。而随着温度的升高,淀粉的溶解度显著增加并且其晶体结构被破坏,这有利于提高 β -CGTase 的催化效率从而改善环糊精的产率^[24-25]。

2.4 影响环糊精生成的因素

2.4.1 温度对 β -CD 产率的影响。在酶的催化反应中,温度对产物生成起重要作用。在 pH 8.5 和不同温度(40~70 °C)下,向 0.3 mol/L 糊化淀粉溶液中加入 800 U/g 淀粉的 β -CGTase 进行反应。由图 6 可知,温度以 2 种方式影响 β -CGTase 酶促反应的速率。首先,升高温度(40~55 °C)会增加底物分子

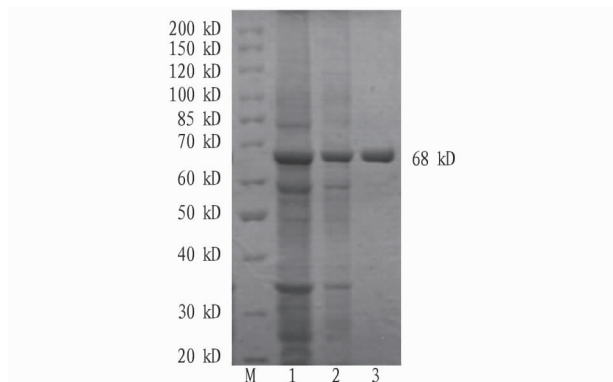


注:A. 培养温度对 β -CGTase 酶活力的影响;B. OD_{600} 对 β -CGTase 酶活力的影响;C. IPTG 浓度对 β -CGTase 酶活力的影响;D. 诱导时间对 β -CGTase 酶活力的影响

Note:A. effect of culture temperature on activity of β -CGTase;B. effect of OD_{600} on activity of β -CGTase;C. effect of IPTG concentration on activity of β -CGTase;D. effect of induction time on activity of β -CGTase

图3 β -CGTase 表达及发酵条件的优化

Fig. 3 Fermentation optimization research on expression of recombinant β -CGTase



注:M. 蛋白质 Marker;1. 粗酶 β -CGTase;2. 硫酸铵沉淀后的酶 β -CGTase;3. 纯化后的 β -CGTase

Note:M. Protein Marker;1. crude enzyme β -CGTase;2. enzyme after ammonium sulfate precipitation;3. purified CGTase

图4 大肠杆菌 BL21(DE3) β -CGTase 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant β -CGTase from the *E. coli* BL21(DE3)

表2 被纯化的 β -CGTase 的酶活及蛋白量

Table 2 Enzyme activity and protein content of purified β -CGTase

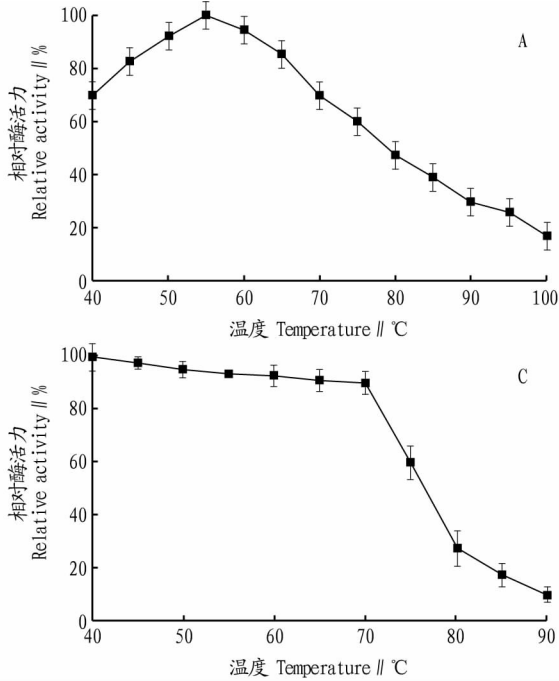
种类 Type	总酶活 Total enzyme activity U	总蛋白量 Total protein content mg	比酶活 Specific enzyme activity U/mg	纯化倍数 Purification fold	剩余酶活 Residual enzyme activity//%
粗酶 Crude enzyme	60 330	11.40	5 292.1	—	—
60% $(NH_4)_2SO_4$	41 132	4.80	8 569.2	1.62	68.18
SephadexG-100	18 648	0.33	56 509.1	10.68	30.91

的热能并提高反应速率,从而提高 β -CD 的产率(16.43% \rightarrow 28.49%)。然而,较高的温度($>55^\circ C$)会产生第2种效应,即增加 β -CGTase 蛋白结构的分子热能,这会使非共价键(例如氢键和范德华力)被削弱,而这些作用力维持 β -CGTase 的三维结构,这样就导致 β -CGTase 蛋白结构的解折叠,从而使 β -CD 产率降低(28.49% \rightarrow 13.23%)。由图6可知,最适合 β -CD 生产的温度为 $55^\circ C$,此时 β -CD 产率最高,这也与相似来源 CGTase 的最佳催化温度接近,即环状芽孢杆菌 E192 来源的 β -CGTase 最佳温度为 $60^\circ C$ ^[26];Qiu 等^[27]使用来自地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的 CGTase,在 $55^\circ C$ 时 γ -CD 的最大产率为 32.9%;来自克拉氏芽孢杆菌 (*B. clarkii*) 7364 的 CGTase 在 $55^\circ C$ 时其 CD 产率达到最大值 45.3%^[28]。

2.4.2 pH 对 β -CD 产率的影响。在不同 pH(6.0~10.0)和温度 $55^\circ C$ 下,将 800 U/g 酶粗溶液与 0.3 mol/L 可溶性淀粉一起反应。由图7可知,当 pH 为 8.5 时, β -CD 的产率最高。最佳 pH(8.0~9.0)的轻微偏差导致 β -CGTase 活性位点的电离发生变化, β -CD 的产率略有下降(28.27% \rightarrow 25.94%和 28.27% \rightarrow 26.47%);当 pH 变化很大($> pH 10.0$ 和 $< pH 6.0$)时,许多维持 β -CGTase 三维结构的共价键被破坏,这导致酶的解折叠。对于来自地衣芽孢杆菌的 CGTase,在 pH 10.0 时,CD 的产率达最高值(35.5%)^[27];当 pH 为 10.0 时,来自克拉氏芽孢杆菌 7364 的 CGTase 实现了最大的 CD 产率 41.6%^[28]。这 2 种 CGTase 催化的最佳 pH(10.0)高于其他来源的 CGTase,如坚强芽孢杆菌 (*B. firmus*) (pH 5.5~9.0) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneu-*

moniae) AS-22(pH 6.0~9.0)^[29],这主要归因于来源菌株的性

质不同。



注:A. 温度对 β -CGTase 酶活性的影响;B. pH 对 β -CGTase 酶活性的影响;C. 温度对 β -CGTase 酶稳定性的影响;D. pH 对 β -CGTase 酶稳定性的影响
 Note:A. effect of temperature on activity of β -CGTase;B. effect of pH on activity of β -CGTase;C. effect of temperature on stability of β -CGTase;D. effect of pH on stability of β -CGTase

图5 重组 β -CGTase 的酶学性质

Fig.5 Properties of recombinant β -CGTase

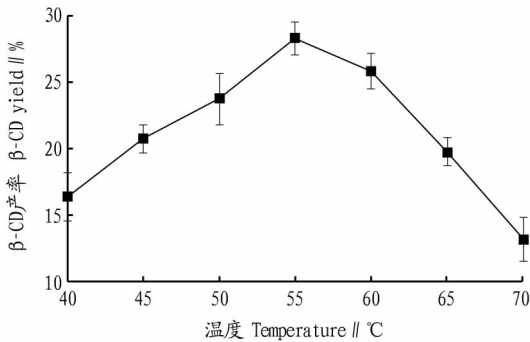


图6 温度对 β -CD 产率的影响

Fig.6 Effect of temperature on yield of β -CGTase

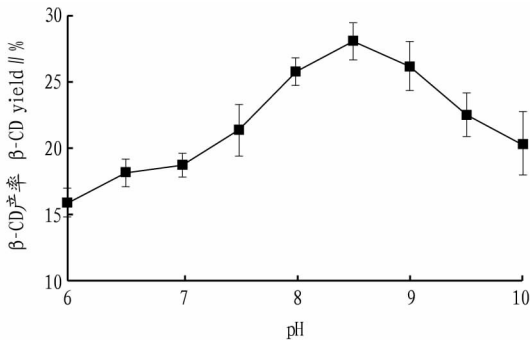
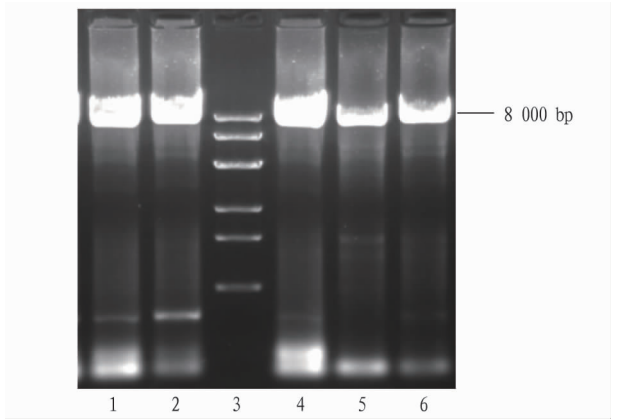


图7 pH 对 β -CD 产率的影响

Fig.7 Effect of pH on yield of β -CD

2.5 突变酶的构建 由图8可知,各组在8 000 bp 左右处有条带产生,大小与目的条带基本吻合。



注:1. Wild;2. A47M;4. A47S;5. A47Y;6. A47R;3. DL8000 DNA Marker

图8 各突变酶的PCR 扩增条带

Fig.8 PCR amplification band of each mutant enzyme

突变酶阳性克隆的测序结果见图9。由图9 多重序列比对可知,各突变酶第47 位氨基酸位点对应的碱基序列由GCG(丙氨酸的密码子)突变为CGT(精氨酸的密码子)、ATG(蛋氨酸的密码子)、AGC(丝氨酸的密码子)、TAT(酪氨酸的密码子),表明突变酶A47R、A47M、A47S、A47Y 构建成功。

2.6 定点突变对 β -CGTase 酶活性的影响 采用碘值法测定各种酶的酶活,与原酶相比,突变酶A47M、A47S 的酶活有了不同程度的降低,而A47Y 和A47R 的酶活变化较小(表3)。几种突变酶的酶活数值比较可观,可用于环糊精的制备反应。

2.7 定点突变对 CDs 产量的影响 用原酶 Wild 和突变酶A47S、A47M、A47Y、A47R 按照“1.3.6”所述方法制备及检测反

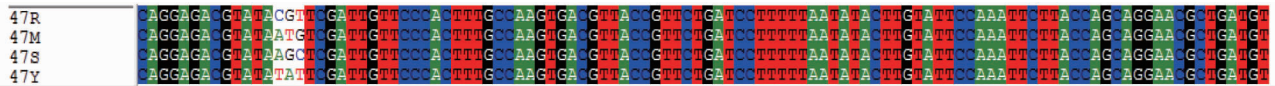


图9 β -CGTase 在 47 位氨基酸位点突变的序列比对

Fig. 9 Multiple sequence alignment of the region around the residue 47 in β -CGTase

应液, β -CD、 γ -CD 的生成量及产物特异性 (β -CD/ γ -CD) 变化不一(表 4)。而突变后的氨基酸变为亲水性氨基酸(Ser、Arg)时, β -CD、 γ -CD 产量都明显增加,而且 β -CD/ γ -CD 比值增大,表示亲水性氨基酸更利于 CDs 合成,其中对 β -CD 的影响更明显。而突变后的氨基酸变为疏水性氨基酸(Tyr、Met)时,A47M 催化合成的 CDs 生成量减少,且 β -CD/ γ -CD 比值也下降,说明疏水性氨基酸对 β -CD 产量的影响更大;而 A47Y 由于突变后氨基酸(Tyr)的疏水性低于 Ala 的疏水性,故 β -CD、 γ -CD 合成量均比原始酶的多,这也与文献得到的结论相似^[16]。

表 3 原始酶和突变酶的酶活比较

Table 3 Comparison of enzyme activity of wild-type and mutant β -CGTase

酶种类 Types of enzyme	比酶活 Specific enzyme activity//U/mL	OD ₇₀₀
Wild	5 239	0. 018
A47M	4 768	0. 020
A47S	4 621	0. 023
A47Y	5 321	0. 016
A47R	5 548	0. 013

表 4 原始酶和突变酶作用于淀粉的 CDs 产量比较

Table 4 Comparison of the yield of CDs with wild-type and mutant β -CGTase

酶种类 Types of enzyme	β -CD mg/mL	γ -CD mg/mL	β -CD/ γ -CD
Wild	14. 12	4. 73	2. 99
A47Y	15. 40	6. 28	2. 45
A47M	13. 42	4. 66	2. 88
A47S	16. 36	4. 17	3. 92
A47R	17. 66	5. 15	3. 43

3 结论

来自蜡状芽孢杆菌的 β -CGTase 被克隆并在大肠杆菌中异源表达。在最佳诱导条件下, β -CGTase 的比活力达 5 292 U/mL。 β -CGTase 的分子量约为 68 kD,最适温度和 pH 分别为 55 $^{\circ}$ C 和 8.5。通过控制 pH、反应温度、反应时间, β -CD 产量可达 14. 12 mg/mL 且高特异性(产物中 β : γ =74. 75%:25. 04%)。通过序列对比选取了第 47 位氨基酸(Ala)进行定点突变,构建了 A47R、A47M、A47S、A47Y,发现活性区域中第 47 位氨基酸对产物特异性具有一定的影响,其中亲水性氨基酸更利于 CDs(尤其 β -CD)的合成,这为酶法合成 β -CD 的工业应用提供了方法。

参考文献

[1] SHELLEY H, BABU R J. Role of cyclodextrins in nanoparticle-based drug delivery systems[J]. J Pharm Sci-U.S., 2018, 107(7): 1741-1753.
 [2] KURKOV S V, LOFTSSON T. Cyclodextrins[J]. International journal of pharmaceuticals, 2013, 453(1): 167-180.
 [3] LI Z F, CHEN S, GU Z B, et al. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications[J]. Trends Food Sci Tech, 2014, 35(2): 151-160.
 [4] CONCEIÇÃO J, ADEOYE O, CABRAL-MARQUES H M, et al. Cyclodextrins as excipients in tablet formulations[J]. Drug Discov Today, 2018, 23

(6): 1274-1284.
 [5] PISHTIYSKI I, ZHEKOVA B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production[J]. World J Microb Biot, 2006, 22(2): 109-114.
 [6] LI Z F, HUANG M, GU Z B, et al. Asp577 mutations enhance the catalytic efficiency of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*[J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 83: 111-116.
 [7] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications[J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(2): 415-428.
 [8] 段宇珩, 王雁萍, 秦广雍, 等. 离子束诱变产生的 CGTase 高产菌株发酵规律研究[J]. 河南农业科学, 2005(5): 16-18.
 [9] 曹新志, 金征宇. 嗜碱芽孢杆菌产环糊精葡萄糖基转移酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2005(2): 122-126.
 [10] QI Q S, ZIMMERMANN W. Cyclodextrin glucanotransferase: From gene to applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66(5): 475-485.
 [11] VAN DER VEEN B A, UITDEHAAG J C M, DIJKSTRA B W, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity[J]. Biochimica et biophysica acta, 2000, 1543(2): 336-360.
 [12] LI C M, LI W W, HOLLER T P, et al. Polyethylene glycols enhance the thermostability of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*[J]. Food chemistry, 2014, 164: 17-22.
 [13] LI Z F, WANG M, WANG F, et al. γ -Cyclodextrin: A review on enzymatic production and applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(2): 245-255.
 [14] VAN DER VEEN B A, VAN ALEBEEK G J, UITDEHAAG J C, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(3): 658-665.
 [15] SZENTE L, SINGHAL A, DOMOKOS A, et al. Cyclodextrins: Assessing the impact of cavity size, occupancy, and substitutions on cytotoxicity and cholesterol homeostasis[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1228.
 [16] CHEN S D, LI Z F, GU Z B, et al. Leu600 mutations decrease product inhibition of the β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* STB01[J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 115: 1194-1201.
 [17] WU D, CHEN, WANG S N, et al. Gamma-cyclodextrin production using cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus clarkii* 7364[J]. Appl Biochem Biotech, 2012, 167(7): 1954-1962.
 [18] TESFAI B T, WU D, CHEN S, et al. Effect of organic solvents on the yield and specificity of cyclodextrins by recombinant cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) from *Anaerobranca gottschalkii*[J]. J Incl Phenom Macro, 2013, 77(1/2/3/4): 147-153.
 [19] LEE M C G, WU K S Y, NGUYEN T N T, et al. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for direct quantitation of protein adsorption[J]. Anal Biochem, 2014, 465: 102-104.
 [20] SONG B H, YUE Y, XIE T, et al. Mutation of tyrosine 167 histidine at remote substrate binding subsite-6 in alpha-cyclodextrin glycosyltransferase enhancing alpha-cyclodextrin specificity by directed evolution[J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(3): 232-239.
 [21] HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. J Mol Biol, 1983, 166(4): 557-580.
 [22] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
 [23] ATANASOVA N, KITAYSKA T, BOJADJIEVA I, et al. A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties[J]. Process Biochem, 2011, 46(1): 116-122.
 [24] SAKINAH A M M, ISMAIL A F, HASSAN O, et al. Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes[J]. Desalination, 2009, 239(1/2/3): 317-333.
 [25] DURA A, ROSELL C M. Physico-chemical properties of corn starch modified with cyclodextrin glycosyltransferase[J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 87: 466-472.
 [26] BOVETTO L J, BACKER D P, VILLETTE J R, et al. Cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. I. Purification and characterization of the enzyme[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1992, 15(1): 48-58.

模、类别、等级等不同而参差不齐,多为规则式的植物配置方式,且应用的保健植物多为感官保健类和抗污染保健类。如成都军区昆明总医院的入口为对植的高山榕,列植的加拿利海枣和桂花,片植的四季秋海棠、木荷蒿等花带;兵器工业昆明疗养院的出入口景观为列植的棕榈。根据保健植物在出入口绿地应用频度显示,此区域主要种植的种类包括桂花、加拿利海枣、滇朴、银桦、香樟、云南樱花等。

2.4.2 宅间绿地。宅间绿地是门诊楼、急诊楼、辅助医疗区、住院部建筑旁或建筑间的绿地。其植物配置情况往往受限于建筑间的空地大小,较大的空间会被打造成中心小游园的形式,比如昆明市第二附属医院住院部旁、延安医院医技楼与住院部间均有游园式绿地,其应用的保健植物相对丰富,且多以乔灌草的复合式结构为主;较小的空间会被构造成树池,多种植灌木草本类保健植物。调查发现,宅间绿地主要种植的保健植物有蔷薇科、木兰科、樟科、女贞属、银杏、滇朴、南天竹、红花檵木、八角金盘、杜鹃、常春藤等。

2.4.3 隔离绿地。隔离绿地是指医疗机构中供应服务区内或特殊性质用房旁的绿地,主要附属于食堂、药库、停车场、锅炉房、病理解剖室、垃圾处理房等地。调查昆明市医疗机构隔离绿地发现,应用的保健植物种类较少,主要种植的有香樟、桂花、女贞、棕榈、黄杨、竹类等。

3 讨论与建议

通过对昆明市医疗机构绿地植物应用情况、保健植物应用种类以及在不同医疗绿地的应用特点分析发现,医疗机构户外绿地的保健植物多样性较丰富,尤其是感官保健类和抗污染保健类,植物的应用频度不能与植物的保健效益呈正相关;在不同类别的医疗机构绿地中,保健植物的应用多考虑其观赏性,而对于其功能、种类的应用还有待于进一步改进。

3.1 增加活性和抑菌保健类植物,推广高保健效益的植物适当增加活性保健类和抑菌保健类植物在医疗机构绿地中的应用,活性保健类植物能够直接帮助病患改善其身体状况,抑菌保健类植物能直接改善医疗环境,这两类保健植物的使用能针对性地解决医疗机构中普遍存在的问题。在植物选择时应综合考虑植物的保健效益,尽可能多种植综合保健效益较高的植物。

3.2 结合绿地周边空间环境,合理选用乔灌草保健植物出入口绿地要给予来往车辆良好的视线,考虑到视线的通透性应优先选择小乔木、灌木、草本或者分枝较高的乔木树种;宅间绿地空间有限,可多选用藤本进行垂直绿化;隔离绿地由于附属在特殊的构筑物周边,这类空间可能给人带来紧张不适的情绪,因此需要选择枝叶繁密、具有遮挡视线作用的植物,如大乔木及株高达1.5 m以上的灌木树种。

3.3 满足功能区绿地需求,凸显植物景观的保健主题出入口绿地要营造优美健康的氛围,且此区域的流动性较大,所以在植物的保健功能上首先考虑其直接保健效益,给人带来的视觉、嗅觉、听觉、触觉特殊的感官体验^[10],通过释放的挥发性物质以及负离子物质带来的清新愉悦的心理体验,可供选择的植物有广玉兰、紫薇、红千层、红花羊蹄甲、木槿、杜鹃、云南含笑、月季、石竹等;宅间绿地的人流量大,且人们的停留时间较长,其不仅发挥着美化环境的作用,还具有调节心理,甚至是辅助健康的作用,因此要考虑其植物的间接保健效益,通过植物的抑菌杀菌、滞尘降噪、吸收有害气体来营造清静卫生的医疗环境,并适当选用感官体验较好、具有活性释氧功能的植物,以积极健康的氛围鼓励病患,可供选择的植物有银桦、臭椿、海桐、枇杷、灰莉、常春藤,以及大部分松柏类、木兰科、樟科植物等;隔离绿地通常设置在医疗机构的角落,其主要作用是隔离污染,减小外界干扰,应该选用能抑菌、抗污染的植物,如侧柏、猴樟、女贞、君迁子、云南珊瑚树、竹类、四季桂、龟背竹等。

4 结语

通过对25家医疗机构,特别是8家典型机构绿地的植物材料进行调查和分析,发现医疗机构绿地保健植物多样性较丰富,但已有的植物保健功能较单一,配置还不够完善。医疗机构的主要使用人群是病患,由于其在身体机能或心理上处于失调状态而更加敏感,合理的保健植物应用能鼓励慰藉他们,因此保健植物在发挥调节美化环境的生态意义的同时还能积极推动疾病治愈,在今后的医疗环境绿地建设中,可以通过科学构建保健植物群落、丰富医疗景观效果,打造更加完善的医疗机构户外保健环境。

参考文献

- [1] 杨小灿. 康体养生必备保健植物[M]. 北京:气象出版社,2010:5.
- [2] 王晓博. 以医疗机构外部环境为重点的康复性景观研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [3] 易文芳,马静茹,龙显,等. 保健植物分类及在城市园林中的应用[J]. 现代农业科学,2009,16(3):124-126.
- [4] 马娟,蔡清. 保健型园林植物景观的营造[J]. 科技展望,2014(6):47.
- [5] 郑林森,庞名瑜,姜义华,等. 47种园林植物保健型挥发性物质的测定[C]//中国风景园林学会. 风景园林 人居环境 小康社会——中国风景园林学会第四次全国会员代表大会论文集(上册). 北京:中国风景园林学会,2008:5.
- [6] 蒋春,程宁,黄利斌. 优良绿化保健植物选择及群落模式配置[J]. 江苏林业科技,2015,42(2):26-32,57.
- [7] 陈景利. 重庆地区保健型植物资源及其在园林中的应用[J]. 南方农业(园林花卉版),2007(2):46-50.
- [8] 张文英,巫盈盈,肖大威. 设计结合医疗——医疗花园和康复景观[J]. 中国园林,2009,25(8):7-11.
- [9] 中国科学院昆明植物研究所. 云南种子植物名录[M]. 昆明:云南人民出版社,1984.
- [10] 苏珊·K·韦勒,刘博新. 约翰霍普金斯医院的康复花园[J]. 中国园林,2015,31(1):18-23.

(上接第115页)

- [27] QIU C, WANG J P, FAN H R, et al. High-efficiency production of γ -cyclodextrin using β -cyclodextrin as the donor raw material by cyclodextrin opening reactions using recombinant cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Carbohydr Polym, 2018, 182:75-80.
- [28] WANG L, WU D, CHEN J, et al. Enhanced production of γ -cyclodextrin

by optimization of reaction of γ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase[J]. Food chemistry, 2013, 141(3):3072-3076.

- [29] GAWANDE B N, PATKAR A Y. Application of factorial designs for optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* AS-22[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 64(2):168-173.