

环糊精糖基转移酶产物专一性改造 : 难题与挑战

The Product Specificity Evolution of Cyclodextrin Glucanotransferase : Problems and Challenges

赵新帅 , 王占坤 , 祁庆生 *

ZHAO Xin-Shuai , WANG Zhan-Kun and QI Qing-Sheng *

山东大学生命科学院 , 济南 250100

Life Science School , Shandong University , Jinan 250100 , China

摘 要 生产环糊精所必需的环糊精糖基转移酶与其产物专一性进化研究已经成为当今的研究热点。这项研究中的进展不仅会使环糊精糖基转移酶的应用取得突破结果 , 还会对其它酶的改造提供帮助。目前 , 人们对这类酶的性质已经有了较为深入的认识 , 但还存在着一些尚未解决的问题 , 如酶产物专一性的决定因素尚未系统阐明等。通过对环糊精糖基转移酶各个方面 , 尤其是其产物专一性进化方面研究的回顾 , 指出并分析了研究中尚未解决的问题 , 并对将来这一研究领域的前景进行了展望。

关键词 环糊精糖基转移酶 , 空间结构 , 催化机制 , 产物专一性
中图分类号 Q555 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0181-08

Abstract Cyclodextrin glucanotransferase , the essential enzyme for the production of cyclodextrins , has become the focus of scientific research nowadays . Although many related enzyme properties are well known , the crucial factors in product specificity determination remain to be answered . Here , the recent research progresses of cyclodextrin glucanotransferase , especially those about the evolution of product specificity , were reviewed , and the scientific problems were discussed .

Key words cyclodextrin glucanotransferase , three-dimensional structure , catalytic mechanism , product specificity

随着环糊精(Cyclodextrin , 简称 CD)在当今科学研究和工业生产中的广泛应用 , 生产环糊精所必需的环糊精糖基转移酶(Cyclodextrin glucanotransferase , 简称 CGTase)已经成为当今研究的热点。早在 1911 年人们就发现一些 *B. macerans* 菌株能够利用淀粉生产环糊精^[1]。在过去近百年的研究中 , 人们对这类酶的性质已经有了较为深入的认识 , 尤其这类酶的基因改造工作已经成为研究的热点。但研究中还存在着一些尚未解决的问题 , 如酶产物专一性进化

工作等。本文回顾了关于环糊精糖基转移酶的各个方面的研究 , 尤其是其产物专一性进化方面 , 指出并分析了研究中尚未解决的问题 , 并对将来这一研究领域的前景进行了展望。

1 环糊精糖基转移酶的分类和来源

环糊精糖基转移酶(EC 2.4.1.19)是 α -淀粉酶家族(家族 13)中的一员 , 系统分类名称为 1,4- α -D-葡萄糖基-4- α -D-转移酶。

Received : September 5 , 2006 ; Accepted : October 19 , 2006 .

This work was supported by the Key Project of Science and Technology Research of Ministry of Education(No.105102).

* Corresponding author . Tel : + 86-531-8365628 ; Fax : + 86-531-8565610 ; E-mail : zhiqingsheng@sdu.edu.cn

教育部科学技术研究重点项目(No. 105102)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

环糊精根据糖残基的数目分为 α -环糊精(6个葡萄糖残基)、 β -环糊精(7个葡萄糖残基)和 γ -环糊精(8个葡萄糖残基)。环糊精糖基转移酶则根据酶主要催化产生的环糊精种类而分为 α -、 β -和 γ -环糊精糖基转移酶三类^[2]。其实在实际反应中,由于这类酶的产物专一性不强,不论应用哪种环糊精糖基转移酶最终反应达到平衡时,都会形成环糊精的混合物^[3]。另一方面,环糊精糖基转移酶的这种分类方法只是较为粗略的划分,同类的环糊精糖基转移酶当来源不同时,性质上也会存在差异。

人们已经从多种微生物中分离得到多种环糊精糖基转移酶。产生该酶的菌株主要为革兰氏阳性细菌,例如 *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Thermoanaerobacterium*、*Thermoanaerobacter*、*Actinomycetes* 等^[3]。仅有极少数革兰氏阴性细菌能产生活性较强的环糊精糖基转移酶,如能产生 α -环糊精糖基转移酶的 *Klebsiella pneumoniae* sp. M5al 菌株^[4]等。当今各类环糊精糖基转移酶的具体来源见文献[2]。

2 环糊精糖基转移酶的结构

各种来源的环糊精糖基转移酶在氨基酸序列上有 47% 至 99% 的相似性^[1],表现出较为明确的一级结构特性。通过对 31 个环糊精糖基转移酶氨基酸序列的比较,发现序列中存在 51 个保守的氨基酸残基,分布于 α -淀粉酶家族氨基酸序列的 5 个保守区域之中^[5]。这些残基与环糊精糖基转移酶的催化活性、底物结合能力、钙离子结合能力有密切关系,例如其中的两个保守的 Asp 残基和一个 Glu 残基对环糊精糖基转移酶的催化活性有重要的作用^[6]。

各种环糊精糖基转移酶一级结构的差异被认为与其产物专一性有密切的联系,但其中作用机理尚未得以阐明。通过氨基酸序列分析发现 α -和 β -环糊精糖基转移酶在一级结构上没有明显差异,但 γ -环糊精糖基转移酶却与以上两种酶在一级结构中存在以下显著差异^[7]。(1)在底物结合位点 -7 处 α -和 β -环糊精糖基转移酶的氨基酸序列分别为 SSTDPSEFA 和 SSDQPSFA,而 γ -环糊精糖基转移酶却在该区域缺少 6 个氨基酸残基。该性质被认为对催化合成 γ -环糊精有重要作用^[8]。(2)在底物结合位点 -3 处^[9,10] α -、 β -、 γ -环糊精糖基转移酶中分别存在 Lys、Arg、Thr 残基^[11],并在 87-93 氨基酸环和 Asn94 处存在差异^[12]。这些区域中的氨基酸残基被认为对各类环糊精糖基转移酶的产物专一性有重要作用,但在这一区域进行的点突变实验却没有直接支持这一

观点。例如,对菌株 *B. circulans* 251 中的环糊精糖基转移酶进行突变 Tyr89Asp 并没有影响酶的产物专一性^[13]。这暗示该区域中各个残基对酶产物专一性的贡献并不相同,其中具体作用机理有待阐明。(3) α -和 β -环糊精糖基转移酶中存在特有的氨基酸序列 INYSGVN(N),同时 γ -环糊精糖基转移酶中存在特有的延伸氨基酸序列 HP-GGF-。(4) γ -环糊精糖基转移酶中的氨基酸环要小于在 α -和 β -环糊精糖基转移酶中的氨基酸环。这些性质与各类环糊精糖基转移酶产物专一性的关系尚未充分阐明。

通过应用 X 射线晶体衍射技术,至今已有 5 种天然环糊精糖基转移酶结合(及不结合)底物(或抑制物)时的空间结构被阐明,分别来自 *B. circulans* 251, *B. circulans* 8, *Bacillus* sp.1011, *B. stearothermophilus* 和 *Thermoanaerobacterium thermosulfigenes* EM1。其中最早获得结晶的环糊精糖基转移酶来自 *B. circulans* 8^[14]。该酶由 5 个功能域组成,编号由 A 到 E。功能域 A 中有一个 α -淀粉酶家族成员均有的 TIM 桶状结构^[15],其中与底物结合和催化有密切相关的氨基酸残基便位于该功能域碳端的 β 片层上。功能域 B 和 C 的作用是维持活性中心的稳定和结合底物^[16]。功能域 E 含有多个麦芽糖结合位点,在各类降解淀粉的酶中有相同结构。点突变实验证实,该功能域中的一个麦芽糖结合位点对淀粉的结合有重要作用,其它结合位点作用为引导直链淀粉链到达该酶的活性中心^[17]。但是作为环糊精糖基转移酶类所特有的 D 功能域的作用却至今尚未阐明,最近的研究结果暗示这一功能域可能有保证 E 功能域位于正确位置的作用^[18],但需要更多的相关研究支持。该功能域作用的研究或许不应当仅局限于对本功能域内部,而应当着眼于整个酶的性质来设计实验。

在该环糊精糖基转移酶的活性中心处,有 9 个底物结合位点依次排列在底物结合槽内,编号 +2 到 -7^[9]。该酶的催化位点位于底物结合位点 +1 到 -2 处。反应时底物的非还原端结合于底物结合位点 -7 处。底物结合位点 +1 同时是激活物结合位点,通过诱导契合机制激活该酶的糖基转移反应^[10]。

3 环糊精糖基转移酶的催化机制

环糊精糖基转移酶主要催化糖基转移反应,分为环化反应(Cyclization reaction)、偶联反应(Coupling reaction)和歧化反应(Disproportionation reaction)。图

1)。歧化反应可以看作是这类酶的“错误”反应， α -淀粉酶家族的其它成员也会发生，如图 1 所示。图中 R_1 、 R_2 、 R_3 表示不同的化学基团， n 表示糖残基数 ($n \geq 6$)。环糊精糖基转移酶所特有的反应是环化反应，是将从底物中酶解下来的低聚糖链自身首尾相连形成环糊精。环化反应的逆反应便称为偶联反应，同样可以由这类酶催化。在具体实践中，应用较长链的底物可以促进环化反应，应用高浓度麦芽低

聚糖或葡萄糖作底物可以促进偶联反应。以天然淀粉为底物时，反应初期主要发生歧化反应，会使底物溶液粘性系数迅速下降，但当底物链长达到合适长度时，环化反应会再次占主导地位^[3]。另一方面，作为 α -淀粉酶家族成员的环糊精糖基转移酶同样具有一定的淀粉水解酶活性，能催化淀粉水解反应 (Hydrolysis reaction)。

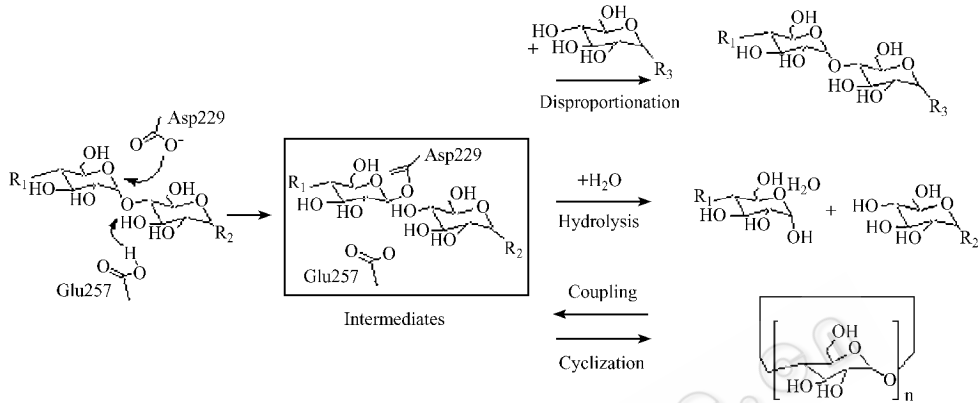


图 1 环糊精糖基转移酶所催化的各类反应

Fig.1 The different reactions catalyzed by CGTase

关于环糊精糖基转移酶环化反应历程的最新观点认为，这类酶是随机断开直链淀粉中的 α -D-(1,4) 糖苷键，并将新形成的低聚糖链自身非还原端与还原端相连。因此，在反应初期会形成葡萄糖残基数从 6 至 60 不等的环糊精^[19]，但在随后的反应中环糊精糖基转移酶通过环化反应等使分子量较大环糊精转化成了常见的 α -、 β -和 γ -环糊精^[2]。

环糊精糖基转移酶环化反应的机制是 α -糖苷键保留的双取代反应机制^[20]，具体可以分为 5 步^[6]：(1) 当底物结合在酶的活性中心后，Glu257 提供一个氢质子给底物结合位点 +1 处的葡萄糖残基，该质子结合在葡萄糖残基糖苷键中的氧原子上；另一方面 Asp229 残基与在底物结合位点 -1 处的非还原端葡萄糖残基的 C1 发生反应；(2) 一个氧合磷正离子形式的过渡态物质形成，随后形成共价中间产物^[21]；(3) 在底物结合位点 +1 处，结合了氢质子的葡萄糖残基从酶的活性中心脱落，导致底物链的断裂，而后在该处新形成的还原端葡萄糖残基攻击非还原端的葡萄糖残基与 Asp229 残基之间的共价键；(4) 氧合磷正离子形式的过渡态物质再次形成^[10]；(5) 还原端葡萄糖残基提供一个氢质子给 Glu257 残基，而后取代了 Asp229 残基，与非还原端葡萄糖残基结合，形成了新的 α -D-(1,4) 糖苷键和部分羟基，完成了环化反应。

在反应过程中，Glu257 残基的侧链作为广义酸催化基团，提供氢质子；亲核基团 Asp229 残基有稳定中间产物的作用；Asp328 对底物的结合有重要作用^[24]。这 3 个酸性氨基酸残基所起的重要作用，是通过应用环糊精糖基转移酶的拟四碳抑制物——阿卡波糖而得以阐明的^[2]。

4 环糊精糖基转移酶的产物专一性进化

自从 1986 年首次在 *B. macerans* 菌株中定位环糊精糖基转移酶基因^[22]至今，人们已经分离得到近 30 种这类酶的基因，如来自菌株 *Bacillus* sp. A2-5a、*Thermococcus* sp. B1001 的基因等。但关于这类酶的基因性质仍存在一些没有解决的问题，其中有 (1) 通常的观点认为，细菌产生环糊精糖基转移酶的意义是将周围的碳源物质转化成一般微生物所不能利用的环糊精，而这些细菌往往能同时产生转运和利用环糊精的蛋白，因而使它们在生存竞争中存在一定优势。但在一些细菌种类中只发现有环糊精糖基转移酶基因，而没有编码转运和利用环糊精的蛋白的相应基因^[2]。这些细菌产生环糊精糖基转移酶对其自身的意义至今尚未解释清楚，分析可能的原因有该细菌进化中的基因缺失或存在利用环糊精的特殊途径，如细胞信号传导等等。(2) 对部分能产生并

利用环糊精的细菌种类进行全基因组测序时发现 , 环糊精糖基转移酶基因可能并不单单存在于细菌的染色体。例如对产生环糊精糖基转移酶的 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri 菌株进行全基因组测序并未发现环糊精糖基转移酶基因^[23]。这类细菌环糊精糖基转移酶基因的确切位置与其高效表达

的机制 , 及该现象从进化角度的合理解释是有待阐明的问題。

在当今环糊精糖基转移酶的基因改造研究(表 1)中 , 该酶的产物专一性进化研究是最受关注的。那些在环糊精糖基转移酶活性中心并用于结合底物的氨基酸残基被认为对这类酶产物专一性有重要影

表 1 环糊精糖基转移酶产物专一性进化实验
Table 1 Genetic modifications of CGTase for improved product specificity

Origin	Main types of CD produced	Genetic modification	Results of modification	Reference
<i>Bacillus clarkii</i> 7364	γ	A223K & A223R & A223H & G255K & G255R & G255H	A223K & A223R & A223H enhanced the γ-CD forming activity in the neutral pH range ; G255K & G255R & G255H reduce the γ-CD production	Nakagawa Y , et al (2006)
<i>B. circulans</i> A11 和 <i>Paenibacillus macerans</i> IAM1243	β&α	Construction of chimeras with different combinations of domains	Most chimeras showed reduced activities ; several ones showed altered product specificity	Rimphanitchayakit V et al (2005)
<i>B. circulans</i> 251	β	Y167F & G179L & G180L & N193G & N193L & G179L/G180L	All mutants showed reduced cyclization , coupling , and disproportionation activities ; mutant G179L reduce the α-CD production ; G180L & Y167F & N193L enhanced the α-CD production ; N193G & G179L/G180L reduce the β-CD production	Leemhuis H , et al (2002)
<i>B. circulans</i> 251	β	E263A & K232L & K232Q & F259N & F183S & F183N & F259S & F183S/F259N	All mutants showed reduced cyclization , coupling , and disproportionation activities ; F259N & F183S & F183N & F259S & F183S/ F259N enhanced the hydrolysis activity	Veen B A van der , et al (2001)
<i>B. circulans</i> 251	β	R47L & R47Q	R47Q reduced the cyclization , coupling , and disproportionation activities while enhanced theβ-CD andγ-CD production ; R47L decrease the cyclization activity while increase the disproportionation and hydrolysis activities.	Veen B A van der , et al (2000)
<i>B. circulans</i> 251	β	Y89G & Y89 & S146P & Y89D/S146P	Y89G enhanced theβ-CD production while reduced the coupling and hydrolysis activities ; Y89D & S146P & Y89D/S146P enhanced theα-CD production	Veen B A van der , et al (2000)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 1011	β	H233N	Mutant lost the ability to produceα-CDs	Ishii N , et al (2000)
<i>Thermococcus</i> sp. B1001	α	Y100W & W191Y & Y267W & W191F & Y267F	Y267W enhanced theβ-CD andγ-CD production ; other mutants showed no significantly altered activities	Yamamoto T , et al (2000)

续表 1

Origin	Main types of CD produced	Genetic modification	Results of modification	Reference
<i>B. circulans</i> 8	β	D229A & 195W & L194T	D229A lost the cyclization activity ; Y195W & L194T enhanced the γ -CD production	Parsiegla G , <i>et al</i> (1998)
<i>T. thermosulfurigenes</i> EM1	α/β	F196G	F196G enhanced the α -CD production while altered the pH optima	Wind R D , <i>et al</i> (1998)
<i>T. thermosulfurigenes</i> EM1	α/β	D197H & F284K & N327D & D371R	All mutants showed reduced cyclization , coupling activities and altered pH optima ; D197H & D371R enhanced the γ -CD production ; F284K enhanced the β -CD production ; N327D enhanced the α -CD production	Wind R D , <i>et al</i> (1998)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. I-5	β	N94S & Y89F & Y100F	N94S enhanced the α -CD production ; Y89F & Y100F enhanced the β -CD production	Kim Y H , <i>et al</i> (1997)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 1011	β	Y195L & F183L & F259L & F183L/F259L & Y283L	Y195L lost the ability to produce α -CDs while enhanced the γ -CD production ; F183L & F259L & F183L/F259L & Y283L reduced the cyclization activity	Nakamura A , <i>et al</i> (1994)
<i>GBacillus ohbensis</i> G	β	Replace W188 with other 19 amino acids respectively	W188Y enhanced the γ -CD production ; other mutants showed no significantly altered activities	Sin K A , <i>et al</i> (1994)
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. 1011	β	D229N & E257Q & E264Q & D328N	E264Q enhanced the β -CD production ; other mutants almost lost the cyclization activity	Nakamura A , <i>et al</i> (1992)

* This table includes all the published genetic modifications of CGTase for improved product specificity.

响,因而常常被选作进化实验的突变位点。可通过对这类酶结合竞争性抑制物后的空间结构分析而得出这些氨基酸残基的位置。所有用于结合底物的氨基酸残基中有一部分在所有种类的环糊精糖基转移酶甚至整个 α -淀粉酶家族中是高度保守的,被认为对这类酶产物专一性影响不大^[1]。突变位点的选择集中在另一些保守性相对较差的氨基酸残基区域,例如底物结合位点-7区域。这一区域中各类环糊精糖基转移酶在一级结构上存在明显差异。该区域中用于结合底物的氨基酸残基多位于功能域B开始部分的氨基酸环上,位于His140残基(该残基在整个 α -淀粉酶家族中高度保守)和Glu153残基(该残基为环糊精糖基转移酶所特有)之间。为了扰乱该区域中氨基酸残基与底物的结合,对*B. circulans* 251菌株中的环糊精糖基转移酶进行突变Ser146Pro^[11],发现该酶催化产生 β -环糊精的比例有所下降且产生 α -环糊精的比例有所上升。 γ -环糊精糖基转移酶在该区域比 α -和 β -环糊精糖基转移酶缺少6个氨基酸残基。根据这一性质,将*B. circulans* 8菌株中的 β -环糊精糖基转移酶中145至151的氨基酸残基用一个Asp替代^[8],发现该酶产生 γ -环糊

精的能力得到增强。该突变被认为扰乱了该酶反应时将初期形成的大分子环糊精转化成小分子环糊精的能力,因而促进了较大分子环糊精的合成^[1]。另一个保守性相对较差的氨基酸残基区域是底物结合位点-3区域。如前所述,该区域中各类环糊精糖基转移酶在一级结构上存在明显差异。通过分析结合抑制物后的酶空间结构,表明该区域中位于87-93氨基酸环上的Tyr89残基能通过疏水反应与底物结合。对*B. circulans* 251菌株中的环糊精糖基转移酶进行突变Tyr89Asp^[11],发现该酶催化产生 α -环糊精的比例略微有所上升。对*Bacillus* sp. I-5菌株中的 α -环糊精糖基转移酶进行突变Tyr89Phe^[24]提高了产物中 β -环糊精的比例,但导致环糊精整体产量的下降;对相同的酶进行突变Tyr89Ser,却对该酶的产物专一性没有影响。这一区域中的Asn94残基在各类环糊精糖基转移酶中存在差异,被认为对酶产物专一性有影响。对*Bacillus* sp. I-5菌株中的 α -环糊精糖基转移酶进行突变Asn94Ser^[24]提高了产物中 α -环糊精的比例并提高了环糊精的整体产量。对*B. circulans* 251菌株中的环糊精糖基转移酶在底物结合位点-3和底物结合

位点-7 两处进行双突变 Ser146Pro/Tyr89Asp^[11],发现该酶产生 α -环糊精的能力增强了 1 倍。

对菌株 *T. thermosulfurigenes* EM1 中结合竞争性抑制物后的 α -环糊精糖基转移酶进行的晶体浸渍实验^[25] 提供了这类酶产物专一性决定因素的新观点,也为进化实验的设计提供了新的思路。实验中发现,酶与竞争性抑制物形成的复合物中多糖抑制物分子与自然状态相比,空间构型发生了一定程度的弯曲,暗示该酶在形成 α -环糊精的环化反应中存在一个有类似结构的中间体。这一中间体结构被认为对小分子环糊精合成过程中的反应限速步骤有重要影响^[1]。促进这一中间体的形成被认为在一定程度上提高了该酶的环化反应并提高了其 α -环糊精的产量。为了促进这一中间体的形成,对菌株 *T. thermosulfurigenes* EM1 中的 α -环糊精糖基转移酶进行突变 Asp197His^[25],结果提高了该酶整体的环糊精产量和产物中 α -环糊精的比例,而阻碍该中间体形成的突变 Asp371Arg,则得到相反的实验结果。在 *B. circulans* 251 菌株中的环糊精糖基转移酶进行的突变 Arg47Leu 以及 Arg47Gln 也同样支持了这一假说^[12]。这一假说也许能为这类酶产物专一性进化实验提供新的实验思路,一种立足于反应过程中间体结构而不是单纯基团间反应的实验设计思路。

至今环糊精糖基转移酶产物专一性进化研究已经取得了一定的成绩,但研究中依然存在着许多有待改进的方面,其中有 (1) 研究中大部分改造结果是酶产物专一性的降低,尚无法合理、定向地对酶产物专一性进行改造。这一问题解决需要对改造前与改造后酶空间结构及氨基酸功能有更为深刻全面的认识和分析。(2) 酶产物专一性进化实验往往对这类酶环化反应活性有不利影响。也许这一结果一定程度上是既有的实验中突变位点过多集中于环化活性中心附近而造成,全面考虑多个区域的性质的实验设计新观点可能会对这一问题的解决有所帮助。(3) 对相同或相对应的同一个氨基酸残基进行的突变实验,结果往往存在较大差异。这暗示酶中特殊氨基酸残基的作用可能是多个方面的,在突变设计时同样应当考虑到突变后氨基酸残基的各方面性质。相应的研究也可能将为酶产物专一性决定因素提供新的观点。(4) 过去这一领域的研究多采用传统酶进化的手段和实验设计观点,手段较为单一且实验设计观点存在一定局限,需要新方法和新观点的确立。2005 年 Rimphanitchayakit 等人通过结合 *B. circulans* A11 菌株中的 β -环糊精糖基转移酶和

Paenibacillus macerans IAM1243 菌株中的 α -环糊精糖基转移酶的不同功能域的基因,而构建了多种酶嵌合体的基因,通过基因异源表达技术获得了相应的酶嵌合体,并对其结构和产物专一性进行了分析^[18]。实验中,各种酶嵌合体显示出不同的酶活性,部分酶嵌合体产物专一性发生了改变。实验结果指出,对酶产物专一性有重要影响的氨基酸区域从碳端算起在功能域 A 和 B 区域的中部。实验同时暗示功能域 C 和 D 的作用可能是使功能域 E 靠近功能域 A 和 B 并使功能域 E 空间取向正确,对酶的活性有重要影响。这一研究成果带来了对环糊精糖基转移酶性质和产物专一性决定因素的新的认识,同时也暗示出功能域 C 和 D 所起的重要作用。这两个功能域在以往的研究中未得到充分的重视,基于该功能域区域的性质而在该区域设计并进行突变实验,将可能会对研究工作有一定帮助。

5 环糊精糖基转移酶其它方面的基因改造

环糊精糖基转移酶基因改造工作的重点之一是其反应 pH 性质的改造。已知的环糊精糖基转移酶的最适 pH 环境多为碱性(pH9 到 11),通过对其反应 pH 性质的改造可以增强该酶在研究和生产中的应用,并为更灵活的产物分离方法和实验条件设计提供了可能。如前所述, Glu257 残基在环糊精糖基转移酶环化反应中起重要作用。对菌株 *T. thermosulfurigenes* EM1 中环糊精糖基转移酶 Glu257 附近的 Phe284 和 Asn327 进行替换,引入双突变 Phe284Lys/Asn327Asp^[25],发现改造后的酶反应 pH 范围得到扩展。但直接对 Glu257 残基进行突变则会极大影响酶的环化反应活性。研究结果同样表明, Glu257 及其附近氨基酸残基是该酶反应 pH 范围的唯一决定因素。相应的研究工作正在积极进行。

环糊精糖基转移酶基因改造工作的另一个重点是其热稳定性的改造。在生产中应用热稳定性较高的环糊精糖基转移酶能在较高温度下进行环糊精合成,这样便能有效减弱天然淀粉中的氢键,促进酶对天然淀粉的结合并促进环糊精的生产^[1]。在晶体结构已知的环糊精糖基转移酶中,热稳定性最好的是分离自菌株 *T. thermosulfurigenes* 的环糊精糖基转移酶。该酶中 Asp188 和 Arg192 间存在一个盐桥,被认为对该酶的热稳定性有重要影响。仿照该酶的结构,对来自菌株 *B. circulans* 的环糊精糖基转移酶进

行双突变 Asn188Asp/Lys192Arg,发现改造后的酶在60℃条件下活性半衰期得到有效延长^[26]。晶体结构测定表明该酶空间结构中也存在如上所述的盐桥。这一方面的工作正在积极展开。

最近环糊精糖基转移酶基因改造工作的一个新的方面是将环糊精糖基转移酶改造成水解酶。这一方面的研究提供了关于这类酶性质的新的认识。通过比较并利用 G2-淀粉酶和环糊精糖基转移酶空间结构的差异,在来自菌株 *T. thermosulfurigenes* 的环糊精糖基转移酶的底物结合位点 + 3 区域插入了 5 个氨基酸残基^[27],发现该酶的环化反应活性几乎全部丧失,酶几乎被改造成一个淀粉水解酶,其机理被认为是这一突变阻碍了酶活性区域对底物的结合。另一方面,通过易错 PCR 实验发现,对菌株 *B. circulans* 251 中的环糊精糖基转移酶进行突变 Ala230Val^[28],该酶的水解活性被提高了 90 倍。改造后的酶的空间结构指出,Val 残基较大的侧链基团严重影响了底物结合位点 + 1 与底物的结合。实验同样证实了底物结合位点 + 1 所起到的通过诱导契合机制激活该酶的糖基转移反应的作用。这一方面的工作将有助于人们对环糊精糖基转移酶结构及性质有更深层的认识,相应的研究工作正在积极进行中。

6 环糊精糖基转移酶产物专一性进化研究前景展望

至今关于环糊精糖基转移酶基因改造的研究已经取得了突出成绩,但相关工作远没有完成,至今尚未获得产物专一性和酶活性非常出色的环糊精糖基转移酶。这一现象归根结蒂是由于对环糊精糖基转移酶产物专一性机理的认识仍然不足。虽然环糊精糖基转移酶的许多性质已经被人们所了解,但酶中某些结构部分所起的具体作用仍然未被认识,而且关于这类产物专一性的决定因素仅有一些个别证据和部分性质的阐述,尚未得出深刻系统的结论。另一方面,已有的只在一个区域进行突变的实验或多或少暗示这类酶产物专一性可能并非由单个氨基酸残基或单个氨基酸区域所完全决定,而更可能是由多个区域共同决定的,因而只用单区域的突变实验可能并不能完全阐明这一问题。因此,通过新的研究方法对酶进行改造是未来研究的重点。

为了促进环糊精的合成,我们实验室通过将 α -凝集素连接在来自菌株 *B. circulans* 的环糊精糖基转移酶 N 末端位置,使该环糊精糖基转移酶在酿酒

酵母表面进行表达^[29]。通过酵母的发酵作用,消耗不利于环糊精糖基转移酶环化反应的葡萄糖和麦芽糖,同时由于发酵生成的乙醇能与生成的环糊精形成络合物而促进了环糊精的合成。其它基于结构分析的环糊精糖基转移酶基因改造工作正在进行中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Veen BA van der, Uitehaag JC, Dijkstra BW, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1543**: 336 – 360.
- [2] Qi QS, Zimmermann W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**: 475 – 485.
- [3] Endo T, Zheng M, Zimmermann W. Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins. *Aust J Chem*, 2002, **55**: 39 – 48.
- [4] Schmid G. Cyclodextrin glycosyltransferase production-yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology*, 1989, **7**(9): 244 – 248.
- [5] Janecek S. Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (alpha/beta)8-barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *FEBS Lett*, 1995, **377**: 6 – 8.
- [6] Maarel MJ van der, Veen BA van der, Uitehaag JC, et al. Properties and applications of starchconverting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol*, 2002, **194**: 137 – 155.
- [7] Takada M, Nakagawa Y, Yamamoto M. Biochemical and genetic analyses of a novel gamma-cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *J Biochem*, 2003, **133**: 317 – 324.
- [8] Parsiegla G, Schmidt AK, Schulz GE. Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the gamma-cyclodextrin production. *Eur J Biochem*, 1998, **255**: 710 – 717.
- [9] Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. Nomenclature for sugarbinding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1997, **321**: 557 – 559.
- [10] Uitehaag JC, Kalk KH, Veen BA van der, et al. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34868 – 34876.
- [11] Veen BA van der, Uitehaag JC, Penninga D, et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase alpha-cyclodextrin production. *J Mol Biol*, 2000, **296**: 1027 – 1038.
- [12] Veen B A van der, Uitehaag JC, Dijkstra BW, 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. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 3432 – 3441.
- [13] Hofmann BE, Bender H, Schulz GE. Three-dimensional structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* at 3.4 Å

- [14] Janecek S. Parallel beta/alpha-barrels of alpha-amylase ,cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of beta-amylase : Evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences. *FEBS Lett* , 1994 , **353** :119 – 123.
- [15] Knegtel RM , Wind RD , Rozeboom HJ , *et al.* Crystal structure at 2.3 Å resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermonaanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J Mol Biol* , 1996 , **256** :611 – 622.
- [16] Penninga D , Veen BA van der , Knegtel RM , *et al.* The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *J Biol Chem* , 1996 , **271** :32777 – 32784.
- [17] Terada Y , Sanbe H , Takaha T , *et al.* Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferases. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** :1453 – 1460.
- [18] Rimphanitchayakit V , Tonozuka T , Sakano Y. Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. *Carbohydr Res* , 2005 , **340** (14) :2279 – 2289.
- [19] Koshland DE. Stereochemistry and the mechanism of enzyme reactions. *Biol Rev* , 1953 , **28** :416 – 436.
- [20] McCarter JD , Withers SG. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoroglycosyl fluorides. *J Biol Chem* , 1996 , **271** :6889 – 6894.
- [21] Nakamura A , Haga K , Yamane K. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS Lett* , 1994 , **337** :66 – 70.
- [22] Takano T , Fukuda M , Monma M , *et al.* Molecular cloning , DNA nucleotide sequencing and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J Bacteriol* , 2002 , **166** :1118 – 1122.
- [23] Silva AC da , Ferro JA , Reinach FC , *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* , 2002 , **417** :459 – 463.
- [24] Kim YH , Bae KH , Kim TJ , *et al.* Effect on product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase by site-directed mutagenesis. *Biochem Mol Biol Int* , 1997 , **41** (2) :227 – 234.
- [25] Wind RD , Uitdehaag JC , Buitelaar RM , *et al.* Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J Biol Chem* , 1998 , **273** (10) :5771 – 5779.
- [26] Leemhuis H , Rozeboom HJ , Dijkstra BW , *et al.* Improved thermostability of *bacillus circulans* cyclodextrin glycosyltransferase by the introduction of a salt bridge. *Proteins* , 2004 , **54** (1) :128 – 134.
- [27] Leemhuis H , Kragh KM , Dijkstra BW , *et al.* Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity. *J Biotechnol* , 2003 , **103** :203 – 212.
- [28] Leemhuis H , Rozeboom HJ , Wilbrink M , *et al.* Conversion of cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase by directed evolution : The role of alanine 230 in acceptor subsite + 1. *Biochemistry* , 2003 , **42** :7518 – 7526.
- [29] Wang Z , Qi Q , Wang PG. Engineering of cyclodextrin glucanotransferase on the cell surface of yeast for improved cyclodextrin production. *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72** :1873 – 1877.