

# 化学添加剂提高重组 $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶酶制剂稳定性

郑贤良<sup>1,2</sup>, 吴丹<sup>1,2</sup>, 李兆丰<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>, 吴敬<sup>1,2</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 通过向重组  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶 ( $\alpha$ -CGT 酶) 液中添加化学添加剂以提高其热稳定性及贮存稳定性。在不同温度下研究了添加剂对酶液的贮存稳定性影响, 并用圆二色谱 (CD) 研究了 CGT 酶在近紫外区和远紫外区蛋白质结构与热稳定性的变化关系。当单独加入各种添加剂在 50 °C 水浴 1 h 和室温放置 108 d 后, 发现含有 20 % 甘油的酶液稳定性最好, 与未加任何添加剂的对照酶液相比仍有 91 % 和 50 % 的酶活, 对照酶液在 50 °C 水浴 1 h 后仅有小于 10 % 的活性, 室温放置 108 d 后已经没有酶活。明胶、CaCl<sub>2</sub> 和 PEG400 也有一定的保护效果。将 4 种保护剂分别以最佳浓度组合叠加添加到 CGT 酶发酵液中 40 °C 贮存 45 d, CGT 酶的残酶活几乎不变, 维持在 100 % 左右。通过变温圆二光谱分析  $\alpha$ -CGT 酶  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠变化, 发现了保护剂可以明显降低高温条件下酶的变性程度, 有利于维持其二级结构及天然三维构象, 使酶在高温时保持较高的酶活。化学添加剂可以明显提高  $\alpha$ -CGT 酶酶制剂的稳定性, 为 CGT 酶的工业化应用提供稳定剂复配的方法, 同时蛋白质的变温圆二色谱分析也为其他蛋白酶热稳定性研究提供了理论依据。

**关键词:**  $\alpha$ -环糊精葡萄糖基转移酶, 化学添加剂, 热稳定性, 圆二色光谱

## Enhanced storage stability of recombinant enzyme preparation of $\alpha$ -CGTase from *Paenibacillus macerans* by chemical additives

Xianliang Zheng<sup>1,2</sup>, Dan Wu<sup>1,2</sup>, Zhao Feng Li<sup>1,2</sup>, Jian Chen<sup>1,2</sup>, and Jing Wu<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** To enhance the thermostability and storage stability of  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase ( $\alpha$ -CGTase), we added specific chemical additives into the preparation of  $\alpha$ -CGTase, and studied the effect of additives on the storage stability of

**Received:** June 3, 2010; **Accepted:** September 25, 2010

**Supported by:** National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20625619), Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology (No. SKLF-MB-200802), National Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB 714036).

**Corresponding author:** Jing Wu. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu80@hotmail.com

国家杰出青年基金 (No. 20625619), 食品科学与技术国家重点实验室科研基金 (No. SKLF-MB-200802), 国家重点研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB 714036) 资助。

$\alpha$ -CGTase at different temperatures. Then we measured the protein structure of CGTase in the far UV (200–250 nm) and near UV (250–320 nm) ranges respectively by Circular dichroism (CD) spectra under high temperature and analyzed the relationship between thermostability and protein structure. The results indicated that the addition of selected additives (gelatin, glycerin,  $\text{CaCl}_2$  and PEG400) enhanced the thermostability of  $\alpha$ -CGTase dramatically. After 45 days, the preparation of  $\alpha$ -CGTase still had 100% of the enzyme activity with different additives superimposed at the optimum concentration at 40 °C. The CD spectra of  $\alpha$ -CGTase showed that glycerin could protect the secondary and the tertiary structure of the CGTase under high temperature and therefore the enzyme maintained its high activity. Chemical additives can improve the stability of  $\alpha$ -CGTase significantly and they preserve the enzyme activity by protecting its secondary structure.

**Keywords:**  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase, chemical additives, thermostability, circular dichroism

环糊精葡萄糖基转移酶 (CGT 酶, EC 2.4.1.19) 是一个很重要的多功能酶, 能催化 3 种转糖基反应 (歧化反应、环化反应和耦合反应) 和水解反应。通过分子内转糖苷反应, CGT 酶能将淀粉或淀粉类似物转化为环糊精<sup>[1-2]</sup>。由于环糊精能与客体分子形成包含复合物, 改变客体分子的物理和化学性质, 因而在分析化学、农业、生物技术、医药、食品和化妆品等领域具有广泛的用途<sup>[3]</sup>。另外, CGT 酶还可以通过偶合和歧化反应, 淀粉或糊精转化为单糖、双糖或低聚糖, 然后将这些糖分子作为供体转移到各种受体分子上, 从而改善受体分子的性质。如 CGT 酶可催化低聚糖转移到蔗糖或果糖上制备具有难蚀性的偶合糖, 还可催化甜菊苷、L-抗坏血酸、鼠李糖等进行糖基化, 显著提高这些物质的使用性能<sup>[4]</sup>。

在工业化酶制剂中, 酶的热稳定性是很关键的一个因素。酶的热稳定性高不仅可以延长酶的储存时间、减少酶在运输过程中酶活的损失, 而且可以使酶在较高反应温度下延长酶的反应时间, 提高生产效率, 从而有效地降低生产成本。在液体酶中直接加入稳定剂做成液体酶制剂是一种常用的、经济有效的方法。如 Mudeppa Devaraja Gouda 等向葡萄糖氧化酶中添加 NaCl 和  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 较不添加前酶半衰期提高了 30 多倍<sup>[5]</sup>; 刘彩琴等向  $\alpha$ -半乳糖苷酶液中加入甘露醇和海藻糖等, 使其半衰期提高了 2 倍<sup>[6]</sup>; Zhi 等通过向氯化物过氧化物酶中添加 PEG200、甘油、海藻糖等, 显著地提高了其贮存稳定性<sup>[7]</sup>。由于在工业化环糊精生产中, 酶与底物的反应温度一般是 50 °C~60 °C, 这就要求酶在 50 °C 左右仍具有

良好的稳定性。前期我们发现来源于 *Paenibacillus macerans* 的天然  $\alpha$ -CGT 酶或重组酶酶制剂的热稳定性均较差, 不利于其工业化水平的利用, 有关 CGT 酶酶制剂热稳定性研究目前也未见报道。本研究分析各种稳定剂如糖类、多元醇类、蛋白类、多聚体、金属离子等化学物质对  $\alpha$ -CGT 酶热稳定性的影响, 通过各种稳定剂的复配以显著提高其应用稳定性及其贮存稳定性, 在此基础上进一步研究不同条件下酶的热稳定性与蛋白质结构变化的关系。

蛋白质结构的柔性及运动性与功能有密切关系, 当蛋白质在外界条件下发生去折叠或部分去折叠时, 蛋白质的相应功能可能就会发生变化。近年来, 人们逐渐认识到蛋白质的构象对其生理功能的巨大意义, 而圆二色光谱 (Circular dichroism spectra, 简称 CD) 技术作为研究稀溶液状态下蛋白质或多肽构象的一种重要手段, 已受到研究者的广泛关注<sup>[8-9]</sup>。 $\alpha$ -CGT 酶属于  $\alpha$ -淀粉酶家族 (家族 13), 是一种重要的淀粉转化酶。对酶分子结构进行研究发现  $\alpha$ -CGT 酶分子结构中除了具有与  $\alpha$ -淀粉酶相同的 A、B、C 结构域之外, 还存在另外 2 个结构域, D 和 E 结构域<sup>[10]</sup>。A 域是催化 ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-桶区域; B 域是一个环区域, 可与底物结合; C 是一种  $\beta$ -三明治结构, 具有结合麦芽糖或原淀粉的功能; D 域也存在  $\beta$ -片状结构, 其功能还未知; E 域是结合淀粉的区域。由于  $\alpha$ -CGT 酶结构复杂, 而其在热作用下结构变化目前还没有详细研究, 因此有必要研究其在加热下酶结构不稳定变化机理。本研究通过 CD 来研究在不同温度下酶结构动态变化, 从而阐明酶的

不稳定变化规律, 为提高其他酶制剂热稳定性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 重组 $\alpha$ -CGT 酶粗酶液的制备

采用 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌发酵生产来源于 *Paenibacillus macerans* 的  $\alpha$ -CGT 酶, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 除菌体, 收集培养物上清液。

#### 1.1.2 主要仪器

Unic7200 型分光光度计购自尤尼柯上海仪器有限公司, 蛋白电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司, Eppendorf 核酸蛋白定量仪购自 Eppendorf 公司, Mos-450/AF-CD 圆二色光谱仪购自法国 Biologic 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\alpha$ -CGT 酶活力的测定

甲基橙法测定酶环化活力: 将适当稀释的发酵上清液加入装有用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 配制 1% (W/V) 可溶性淀粉溶液的试管中, 40 °C 反应 10 min, 加入 1.0 mL 1.0 mol/L 的盐酸停止反应, 再加入 1.0 mL 用 50 mmol/L 磷酸缓冲液配制的 0.1 mmol/L 甲基橙, 20 °C 保温 20 min, 测定  $OD_{505}$ 。一个酶活单位 (U) 定义为在上述条件下每分钟生成 1  $\mu$ mol 的  $\alpha$ -环糊精所需的酶量。

#### 1.2.2 $\alpha$ -CGT 酶最适贮存浓度和 pH 的选择

将发酵液在 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 除菌体后, 取上清, 用超滤仪将发酵液浓缩, 用磷酸盐缓冲液调 pH 分别为 7.0、6.5、6.0, 并稀释得到蛋白浓度分别为 1、2、3、4、5、6 mg/mL。将不同蛋白浓度和 pH 的酶制剂在 50 °C 水浴 15 min 后, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清测酶液的残酶活。

#### 1.2.3 $\alpha$ -CGT 酶粗酶液长期贮存情况

在蛋白含量为 4 mg/mL, pH 为 6.5 时, 将酶液

置于 37 °C 恒温培养箱, 定时取样, 测其残酶活和蛋白含量。

#### 1.2.4 $\alpha$ -CGT 酶保护剂的筛选及浓度优化

向酶液中直接添加一定浓度的明胶、甘油、PEG400、海藻糖、木糖醇、甘露醇、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub> 与空白酶液一起在 50 °C 水浴 1 h 后, 测  $\alpha$ -CGT 酶的残酶活。

将明胶、甘油、PEG400、CaCl<sub>2</sub> 添加到酶液中, 明胶的浓度分别为 0.5%、1% 和 2%, 甘油的浓度分别为 10% 和 20%, 钙离子的浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L, PEG 的浓度分别为 5%、10%、15%、20%。然后将添加保护剂的酶液置于 50 °C 水浴 1 h, 测残酶活。

#### 1.2.5 保护剂对 CGT 酶长期贮存保护效果的研究

将选定的 4 种保护剂, 以最佳浓度添加到  $\alpha$ -CGT 酶液中, 将酶液置于 4 °C、25 °C 和 37 °C 下, 隔一定时间测定酶液的残酶活。

将保护剂以最佳浓度叠加, 添加到  $\alpha$ -CGT 酶液中, 将酶液置于 40 °C 恒温培养箱定期取样测酶活。

#### 1.2.6 CGT 酶的热稳定性与其结构的变化

将  $\alpha$ -CGT 酶发酵液经 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀、阴离子交换 Q-Sepharose 柱层析、疏水 phenyl-Superose (HR10/10) 柱层析三步纯化, 获得表观电泳纯酶蛋白, 用圆二色光谱仪分别在远紫外区 200~250 nm 和近紫外区 250~320 nm 对 4 °C 和 50 °C 保温 0.5 h 后的  $\alpha$ -CGT 酶液进行扫描, 得出酶的  $\alpha$ -螺旋和三级结构的谱带变化, 扫描时的蛋白浓度为 0.1 g/L, 缓冲液为 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液。 $\alpha$ -螺旋在 208 nm 和 222 nm 处表现出 2 个负的特征肩峰谱带, 而近紫外区肩峰谱带的变化则反映了酶的三维结构的变化。并用 k2d 方法计算  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠及无规卷曲随温度变化而变化的量, 与 CD 谱带相对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 粗酶制剂的稳定性

已有研究发现酶制剂的贮存 pH 和贮存酶蛋白浓度对其稳定性有一定的影响<sup>[11]</sup>。实验室前期研究表明重组  $\alpha$ -CGT 酶在 pH 6~9.5 之间均相对稳定, 最适反应 pH 为 6<sup>[12]</sup>。本研究选择 pH 6 和酶制剂浓度为 1~6 mg/mL 来研究酶的稳定性, 结果见图 1。从图 1 可见, 在 pH 分别为 6、6.5、7 时, 4 mg/mL 的酶制剂在 50 °C 处理 15 min 后残留活性均高于其他蛋白浓度的酶制剂, 可达到 60% 以上, 而在 4 mg/mL 的蛋白浓度下, pH 6.5 的酶制剂残留酶活最高, 达 75%。

酶溶液的 pH 和蛋白浓度对酶液的稳定性有很大的影响, 不同的酶其最适 pH 也不同, 对于  $\alpha$ -CGT 酶来说, 其等电点约为 5.3, 有报道称稀蛋白溶液易发生蛋白质器壁吸附<sup>[13]</sup>, 即蛋白质与固相表面接触时所发生的吸附现象, 且在等电点附近吸附量最大, 这种器壁吸附现象使得蛋白质结构发生改变, 即酶的活性丧失, 这可能是低蛋白浓度的 CGT 酶不稳定的主要原因, 因此增加蛋白质的浓度可以降低蛋白

质的器壁吸附程度, 提高溶液中蛋白质的稳定性, 但是蛋白质浓度过高也不利于蛋白质的稳定, 这可能是由于蛋白含量过多易发生蛋白质之间的相互聚集沉淀, 从而影响酶的活性。

为了进一步考查  $\alpha$ -CGT 酶的贮存稳定性, 将以上蛋白含量为 4 mg/mL, pH 6.5 的粗酶制剂分别在 4 °C、25 °C 和 37 °C 贮存, 定时取样测酶活, 结果见图 2。当酶液在 4 °C 和 25 °C 贮存时,  $T_{1/2}$  分别为 100 d 和 50 d; 在 37 °C 贮存时,  $\alpha$ -CGT 酶的酶活很快下降,  $T_{1/2}$  为 2.9 d, 1 周后酶活完全丧失。此外, 观察发现置于 37 °C 的  $\alpha$ -CGT 酶粗酶制剂在 24 h 后便会产生沉淀, 并随时间的延长沉淀量增多, 并且其蛋白含量的变化趋势与酶活降低成正相关, 可能是蛋白质变性失活凝聚成大分子, 从而形成絮状沉淀, 这是由蛋白分子所处的复杂环境共同作用的结果, 包括温度、pH、缓冲液、表面活性剂等<sup>[14]</sup>。

### 2.2 化学添加剂对酶制剂稳定性的影响

由于酶的稳定性受到各种复杂因素的影响, 因此目前提高酶的稳定性是比较大的挑战之一。近年来对于向酶液中添加稳定剂来提高酶的稳定性的研究已经越来越多, 已经证明很多化学添加剂在稳定

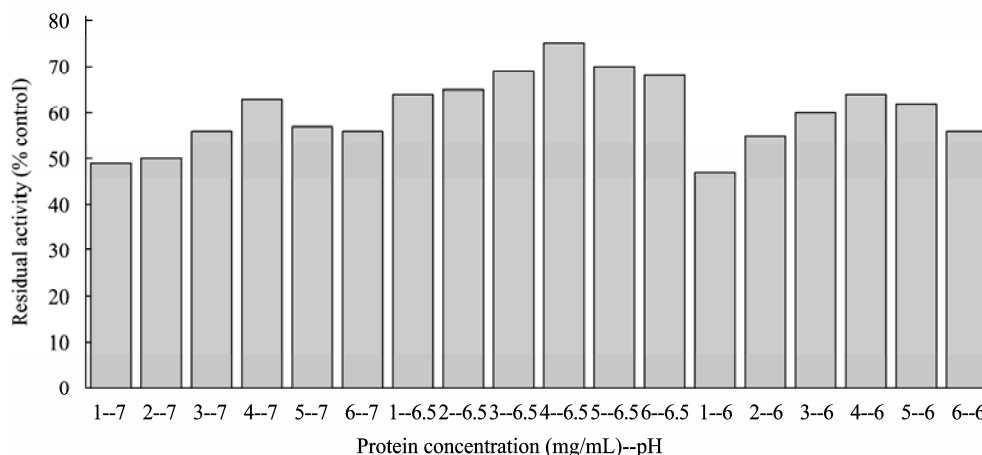
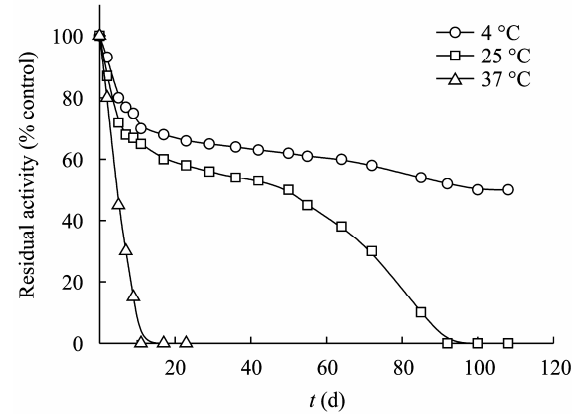


图 1 不同蛋白浓度和 pH 对 CGT 酶热稳定性的影响

Fig. 1 Thermal stability of  $\alpha$ -CGTase with different protein concentration and pH. The crude enzyme preparation with different pH and protein concentration was heated in 50 °C for 15 min, Activity of the unheated sample was taken as 100%, and the percent of the remaining activity of the heated samples was calculated. 1--7 means protein concentration is 1 mg/mL and pH is 7.



**图 2** 不同温度下 CGT 酶制剂的贮存稳定性

Fig. 2 Storage stability of crude  $\alpha$ -CGTase preparation. The crude enzyme preparation was incubated in 4 °C, 25 °C and 37 °C. Activity of the sample before incubation was taken as 100%, and the percent of the remaining activity of the incubated samples was calculated.

蛋白酶的天然构象方面具有重要作用，比如某些糖类、盐类和多元醇类等<sup>[5,15-16]</sup>。本研究选择了明胶、甘露醇、木糖醇、甘油、海藻糖、PEG400、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>共 8 种化学添加剂进行稳定性试验，由于前期试验中未发现贮存的酶液中有微生物生长，故未向酶液中添加防腐剂，结果发现在众多的稳定剂中，明胶、甘油、PEG400、CaCl<sub>2</sub> 对提高酶制剂的热稳定性有较显著作用，其中甘油对酶活性测定具有一定的激活作用，其他添加剂对酶的活性测定无影响。

进一步观察不同浓度的上述 4 种添加剂对  $\alpha$ -CGT 酶制剂保护作用，结果见表 1。从表 1 所见，50 °C 热处理 1 h 后，未添加任何保护剂的  $\alpha$ -CGT 酶酶活保留率为 10%，而添加了化学添加剂的酶制剂的热稳定性明显提高，其酶活保留率最高分别是 81% 明胶、91% 甘油、60% CaCl<sub>2</sub> 和 61% PEG400。

鉴于之前  $\alpha$ -CGT 酶在 25 °C 和 37 °C 的贮存稳定性不是很理想，为了考察以上 4 种化学添加剂对  $\alpha$ -CGT 酶酶制剂贮存稳定性的影响，向  $\alpha$ -CGT 酶酶制剂中分别添加的 1% 明胶、10% PEG400、20% 甘油和 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>，其最终蛋白浓度为 4 mg/mL，pH 为 6.5。然后分别在 4 °C、25 °C 和 37 °C 考察其稳定性，结果见图 3。

**表 1** 不同浓度化学添加剂对 CGT 酶的保护效果

Table 1 Heat inactivation of enzyme preparation in the presence of chemical additives

Additives	Concentration	Residual activity (%)
Gelatin (W/V)	0.5%	73.28
	1%	81.56
	2%	70.13
Glycerin (V/V)	10%	68.69
	20%	91.85
	30%	93.65
CaCl <sub>2</sub>	0.5 mmol/L	50.24
	1 mmol/L	59.92
	2 mmol/L	58.57
PEG400 (V/V)	5%	25.79
	10%	60.98
	20%	64.74
Without additives		10.05

The crude enzyme preparation was heated at 50 °C for 1 h. Activity of the unheated sample was taken as 100%, and the percent of the remaining activity of the heated samples was calculated.

如图 3 所示，在 4 °C 条件下，添加了这 4 种物质后酶制剂的 T<sub>1/2</sub> 均为 108 d；在 25 °C 时，酶制剂添加 1% 明胶、10% PEG400、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 20% 甘油的 T<sub>1/2</sub> 分别为 100、72、64、108 d，分别是未添加保护剂的对照组的 2 倍、1.5 倍、1.3 倍和 2 倍。在 37 °C，酶制剂添加 1% 明胶、10% PEG400、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 20% 甘油的 T<sub>1/2</sub> 分别为 23 d、7 d、21 d 和 36 d，分别是未添加保护剂的对照组的 7.6 倍、2.3 倍、7 倍和 12 倍。对这 4 种稳定剂进行复配以观察其协同效果，结果见图 4。

由图 4 所示，在 40 °C 条件下，未添加任何保护剂的酶制剂在 4 d 后酶活完全丧失；含有明胶+CaCl<sub>2</sub> 和 CaCl<sub>2</sub>+PEG400 的酶制剂在 21 d 后酶活完全丧失；含有甘油+CaCl<sub>2</sub>+明胶的酶制剂在 45 d 内仍有 80% 的酶活，而含有甘油+CaCl<sub>2</sub>、甘油+CaCl<sub>2</sub>+PEG400 和甘油+CaCl<sub>2</sub>+PEG400+明胶的酶制剂 45 d 内酶活基本保持不变。

据文献报道部分有机溶剂、金属离子、蛋白类、糖类等对  $\alpha$ -淀粉酶家族具有一定的稳定作用<sup>[17-19]</sup>；毛新焕等的研究表明，明胶对酶稳定性的提高有一定作用，这是由于明胶是富含多种氨基酸的多聚阳

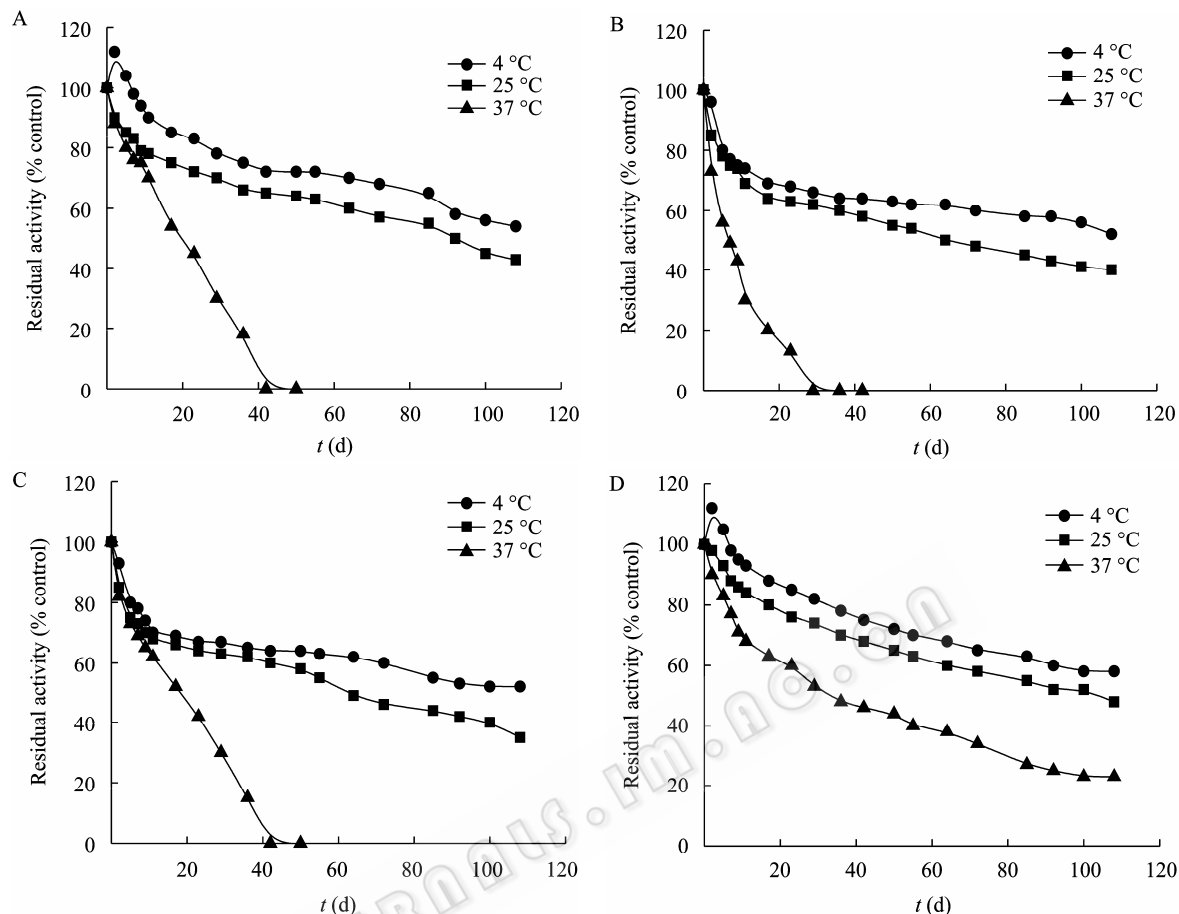


图3 化学添加剂对 CGT 酶酶制剂贮存稳定性的影响

Fig. 3 Storage stability of crude  $\alpha$ -CGTase preparation by chemical additives. (A) Gelatin. (B) PEG400. (C) CaCl<sub>2</sub>. (D) Glycerin. The crude enzyme preparation was incubated in 4 °C, 25 °C and 37 °C. Activity of the sample before incubation was taken as 100%, and the percent of the remaining activity of the incubated samples was calculated.

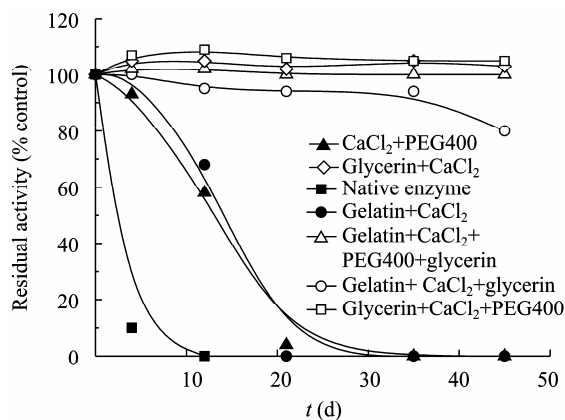


图4 化学添加剂叠加对 CGT 酶酶制剂贮存稳定性的影响

Fig. 4 Synthetic effects of chemical additive on the stability of enzyme preparation. The crude enzyme preparation was incubated at 40 °C. Activity of the sample before incubation was taken as 100%, and the percent of the remaining activity of the incubated samples was calculated.

离子胶质结构, 为酶提供还原性环境, 利于酶保持天然构象及酶活<sup>[20]</sup>; Nielsen 等通过 Ca<sup>2+</sup>对  $\alpha$ -淀粉酶稳定性的研究发现,  $\alpha$ -淀粉酶家族含有一个保守的 Ca<sup>2+</sup>结合位点, 因此 Ca<sup>2+</sup>对于  $\alpha$ -淀粉酶家族的稳定性具有积极的作用<sup>[18]</sup>; Kunihiro 等的研究表明, 甘油等多元醇类能通过优先水合作用, 在蛋白质表面形成一层有序的水化层, 使得酶分子构象得以稳定<sup>[21]</sup>; 另外, 研究表明 PEG 为非极性多元醇, 在酶溶液中能与蛋白质的疏水位点相结合, 并且水溶液中的 PEG 能够减少蛋白质的脱水作用, 因此能在较高的温度下稳定蛋白质的结构<sup>[7]</sup>. 另外一个现象是, 只要含有甘油, 酶制剂的贮存稳定性就比较高, 前面也提到过甘油对酶活性的测定具有一定的激活作用, 考虑到 CGT 酶的测定条件是 40 °C 水浴 10 min,

若不加甘油酶可能在反应过程中会有一定程度的失活, 添加甘油后可能会防止酶活性的损失, 提高酶的催化能力, 故测定的酶活性有 10%~20% 的提高。根据 Kunihiro<sup>[21]</sup>和 Tsutomu 等<sup>[22]</sup>对甘油等多元醇对蛋白质的稳定机理的研究发现, 由于甘油属于多元醇类多羟基化合物, 在水溶液中与酶分子接触时, 能产生优先水合作用在酶分子表面形成一层有序的水化层; 另外当溶液中加入甘油, 甘油进入水晶格形成甘油-水结构, 加强了溶剂结构, 甘油的存在增加了蛋白质的疏水性, 使酶分子结构趋于紧实, 因此甘油能够显著提高酶分子的稳定性。

### 2.3 $\alpha$ -CGT 酶天然构象与热稳定性之间的相关性

蛋白质的圆二色光谱 (CD) 是研究稀溶液中蛋白质构象的一种快速、简单、较准确的方法。从 1969 年, Greenfield 最早用 CD 光谱数据估计了蛋白质的构象<sup>[23]</sup>, 此后相关的 CD 研究方法得到了很大发展<sup>[24-25]</sup>。CD 光谱远紫外区 (200~250 nm) 反映的是蛋白质的二级结构, 近紫外区 (250~350 nm) 反映的是蛋白质的三级结构。

为了采用 CD 研究  $\alpha$ -CGT 酶天然构象与热稳定性之间的关系, 首先必须获得  $\alpha$ -CGT 酶的纯品。因此将  $\alpha$ -CGT 酶粗酶液先用硫酸铵盐析, 然后采用两步法, 包括 Q-Sepharose 阴离子交换色谱和 phenyl-Superose (HR10/10) 疏水色谱, 对重组  $\alpha$ -CGT 酶进行纯化。SDS-PAGE 证明了两步纯化后酶蛋白的均一性 (图 5)。

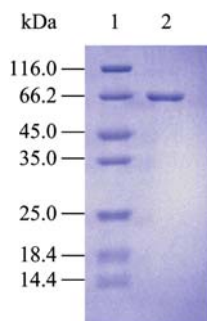


图 5 纯化重组  $\alpha$ -CGT 酶的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purification process of  $\alpha$ -CGTase 1: protein marker; 2: purified  $\alpha$ -CGTase.

在蛋白质的二级结构中,  $\alpha$ -螺旋在 208 nm 和 222 nm 处表现出 2 个负的特征峰,  $\beta$ -折叠在 216 nm 有一负谱带,  $\beta$ -转角在 206 nm 附近有一正的 CD 谱带<sup>[26]</sup>。将纯化的  $\alpha$ -CGT 酶及添加化学添加剂后的酶液分别在 4 °C 和 50 °C 水浴 0.5 h 后用圆二色光谱在远紫外区进行扫描, 结果见图 6。

蛋白质中不同类型的二级结构所产生的特征光谱可用来估算二级结构的百分含量, 近年来已经发展了很多估算方法, k2d 法<sup>[27]</sup>便是其中之一, k2d 法是 Andrade 等通过自制网络二级结构图, 将得到的蛋白质 CD 扫描数据输入已设好的程序中, 该程序便可给出  $\alpha$ -helix 和  $\beta$ -sheet 的百分比估算值。k2d 服务器公开访问网站为 <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>。通过该法可以计算蛋白样品在  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠以及无规卷曲含量方面的变化。表 2 列出了采用 k2d 法计算的结果。由图 6 所示, 原酶液、原酶液+PEG400 以及原酶液+CaCl<sub>2</sub> 在 50 °C 处理后 CD 谱在远紫外区相对于 4 °C 处理的对照变化较大 (图 6A, 6B, 6C), 其中 208 nm 和 222 nm 处  $\alpha$ -螺旋分别减少了 0.07、0.19、0.14, 216 nm 处  $\beta$ -折叠分别增加了 0.04、0.12、0.11 (表 2), 但 ( $\alpha$ + $\beta$ ) 总的含量呈下降趋势, 无规卷曲总的含量呈上升的趋势; 当酶液中添加甘油、甘油+CaCl<sub>2</sub>、甘油+CaCl<sub>2</sub>+PEG400 在 50 °C 处理后 CD 谱在远紫外区相对于 4 °C 处理的对照变化不大 (图 6D, 6E, 6F), k2d 计算结果也可以看出  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠含量几乎没有变化, 无规卷曲的含量在 2 个温度下也是相同的 (表 2)。

表 2  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、无规卷曲的含量变化

Table 2 Content of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random

	$\alpha$ -helix		$\beta$ -sheet		Random coil	
	4 °C	50 °C	4 °C	50 °C	4 °C	50 °C
Native enzyme	0.24	0.17	0.19	0.23	0.57	0.60
Glycerin	0.28	0.27	0.15	0.16	0.56	0.56
PEG400	0.28	0.09	0.18	0.30	0.54	0.61
CaCl <sub>2</sub>	0.25	0.11	0.18	0.29	0.57	0.60
Glycerin+CaCl <sub>2</sub>	0.29	0.27	0.18	0.19	0.54	0.54
Glycerin+CaCl <sub>2</sub> +PEG	0.25	0.24	0.17	0.17	0.58	0.58

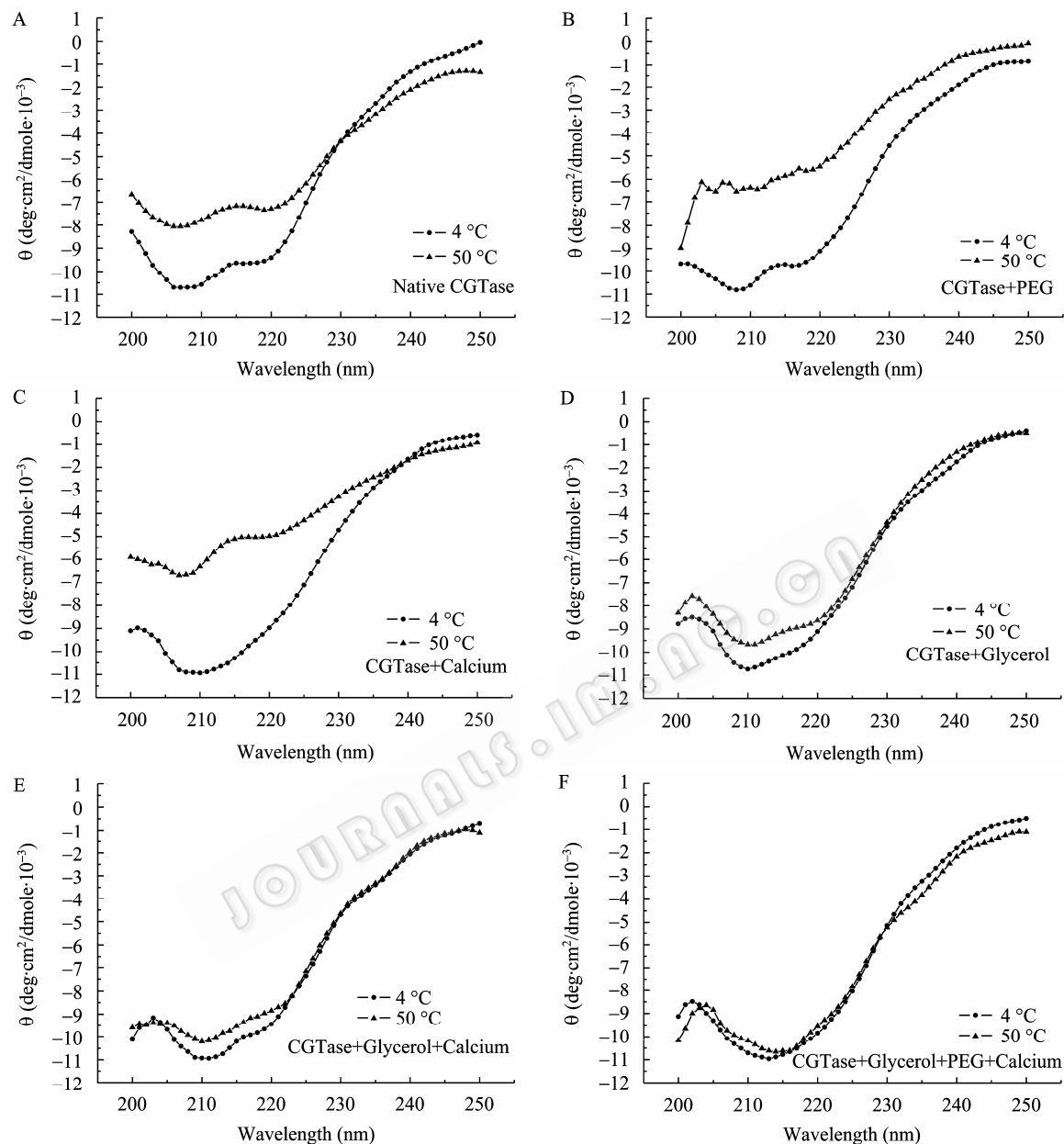


图6 远紫外区 4 °C 和 50 °C 的 CGT 酶图谱

Fig. 6 Far UV region (200–250 nm) CD spectra of  $\alpha$ -CGTase in the absence of any additives (A), in the presence of PEG400 (B),  $\text{CaCl}_2$  (C), glycerin (D), glycerin+ $\text{CaCl}_2$  (E), glycerin+  $\text{CaCl}_2$ +PEG400 (F). The enzyme was incubated at 4 °C and 50 °C for 30 min.

远紫外的 CD 图谱主要反映蛋白质二级结构的变化趋势,近紫外的 CD 图谱则可反映酶分子的三级结构的变化情况。由图 7 可见,经过 50 °C 热处理后的酶与对照相比,天然酶在近紫外 CD 光谱 280 nm 和 300 nm 处的特征峰已经基本消失 (图 7A),表明酶分子的三级结构已经基本不存在,也就是说  $\alpha$ -CGT 酶的天然构象已经被破坏,酶分子已经变性

失活。Lu 等用 CD 分析蛋白质的结构变化同样得出了这个结果<sup>[28]</sup>。而在酶液中添加甘油后,经过 50 °C 热处理后的酶与对照相比,在 280 nm 和 300 nm 处仍有明显的特征峰 (图 7B),证明  $\alpha$ -CGT 酶仍然维持着良好的三级结构,从而说明甘油的存在能在高温时保护酶分子的三级机构,使酶分子在较高的温度下仍然保持稳定。



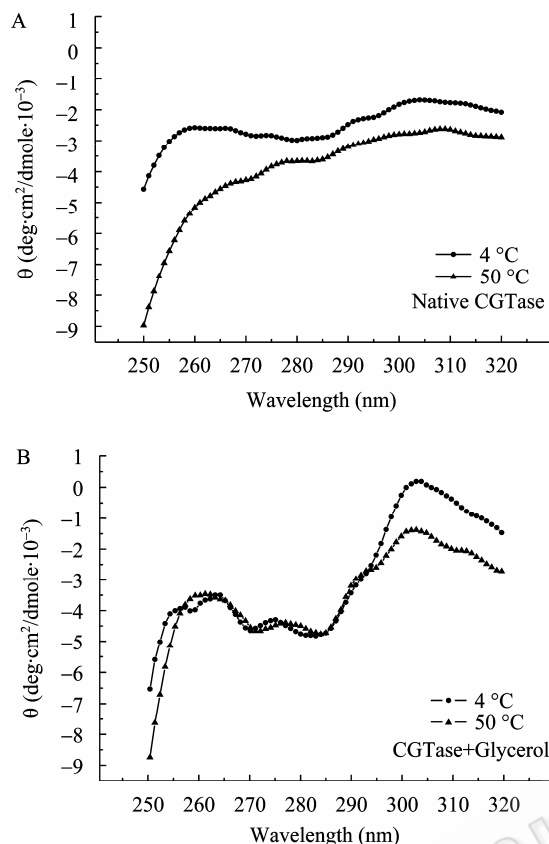


图7 近紫外区 4 °C 和 50 °C 的 CGT 酶图谱

Fig. 7 Near UV regions (250–320 nm) CD spectra of native  $\alpha$ -CGTase alone (A) and  $\alpha$ -CGTase in the presence of glycerol (B). The enzyme was incubated at 4 °C and 50 °C for 30 min.

前面已经提到  $\alpha$ -CGT 酶也是典型的  $\alpha/\beta$  结构模体的酶,也就是说  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的比率是一定的,合适的  $\alpha/\beta$  及无规卷曲含量与酶的特定功能域的形成及酶的构象变化紧密相关,而酶的天然构象的稳定对酶保持其活性是非常重要的<sup>[29]</sup>。酶的活性直接由  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的构象决定,若  $\alpha$ -螺旋结构发生改变可能会影响酶的活性中心及底物结合域,同时也可能破坏酶分子的氢键或其他结构而产生酶天然构象的不可逆破坏,使底物不能顺利地与酶分子结合使酶失去活性,因此  $\alpha/\beta$  结构模体的酶分子中其  $\alpha/\beta$  的比率一般是恒定的,特定的  $\alpha/\beta$  比率决定了其特定的天然构象,  $\alpha/\beta$  比率改变的越大,造成酶分子构象的改变越大,酶分子的错误折叠结构越多,从

而使酶失去活性;另外,无规卷曲的含量越多,酶分子的柔性就越强,也就是说其天然构象就越容易改变,使酶的活性中心失去原有的功能,使底物不能与之结合,从而使酶失活。因此  $\alpha/\beta$  及无规卷曲的含量变化越小,酶分子的自然构象变化越小,通过 CD 图谱便可以看出酶液中若有甘油等化学添加剂的存在能在一定程度上维持酶分子的自然构象,进而提高酶分子的热稳定性,在高温时保护酶分子的二级结构免遭破坏,使酶能够在高温时较完整地维持其自然构象,从而维持其自然活性。

与 CD 扫描的实验结果相吻合,在 50 °C 处理 0.5 h 后,酶的高级结构变化较大的原 CGT 酶仅剩 35% 的酶活,添加 PEG400 和  $\text{CaCl}_2$  的酶液还有 50%~60% 的酶活,而添加甘油、甘油+ $\text{CaCl}_2$ 、甘油+PEG400+ $\text{CaCl}_2$  的酶的高级结构变化不大,还有 95% 以上的酶活,从而证明了这些稳定剂可保护酶分子的二级结构,稳定酶的自然三维构象,因而提高酶的热稳定性。

### 3 结论

本研究分析了在重组  $\alpha$ -CGT 酶酶液中添加糖类、多羟基醇类、金属离子、蛋白类等化学物质对酶稳定性的影响,筛选出了对酶稳定性作用比较大的 4 种稳定剂——明胶、甘油、PEG400、 $\text{CaCl}_2$ ,并在此基础上结合成本因素考虑得到最终复配方法为:20% 甘油 (V/V)、10% PEG400 (V/V)、1 mmol/mL  $\text{CaCl}_2$ 。加入复合稳定剂 45 d 内酶液在 40 °C 酶活基本保持在 100% 左右,其贮存稳定性显著提高。此外,我们通过圆二色光谱研究了天然酶和添加化学添加剂的酶其自然构象的改变与酶分子热稳定性之间的关系,如图 6 和图 7 所示,发现添加稳定剂主要是保护了酶分子的自然构象,从而增加了其热稳定性。本研究结论不仅提供了一种可以较好用来稳定蛋白质酶制剂的复配方法,而且为研究蛋白质热稳定性变化规律提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Chung HJ, Yoon SH, Lee MJ, et al. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(3): 952–959.
- [2] Van der Veen BA, Uitdehaag JC, Dijkstra BW, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1543(2): 336–360.
- [3] Jeang CL, Lin DG, Hsieh SH. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16): 6301–6304.
- [4] Li ZF, Wang M, Wang F, et al.  $\gamma$ -cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 245–255.
- [5] Gouda MD, Singh SA, Rao AG, et al. Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using additives. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 24324–24333.
- [6] Liu CQ, Ruan H, Fu ML, et al. Method for increasing stability of  $\alpha$ -galactosidase. *Food Ferment Ind*, 2007, 33(11): 26–29.
- 刘彩琴, 阮晖, 傅明亮, 等. 提高  $\alpha$ -半乳糖苷酶稳定性的研究. *食品与发酵工业*, 2007, 33(11): 26–29.
- [7] Zhi LF, Jiang YC, Wang YS, et al. Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(3): 729–733.
- [8] Parrot I, Huang PC, Khosla C. Circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of immunogenic gluten peptides and their analogs. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45572–45578.
- [9] Lu RC, Cao AN, Lai LH, et al. Interaction between bovine serum albumin and equimolarly mixed cationic–anionic surfactants decyltriethylammonium bromide–sodium decyl sulfonate. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2005, 41(2/3): 139–143.
- [10] Goh KM, Mahadi NM, Hassan O, et al. Molecular modeling of a predominant  $\beta$ -CGTase G1 and analysis of ionic interaction in CGTase. *Biotechnology*, 2008, 7(3): 418–429.
- [11] Lú-Chau TA, Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, et al. Effect of pH on the stability of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase during heterologous production in *Emericella nidulans*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2004, 26(5): 287–293.
- [12] Li ZF, Zhang JY, Wang M, et al. Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing  $\alpha$ -cyclodextrin specificity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83: 483–490.
- [13] Hlady V, Buijs J. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, 7(1): 72–77.
- [14] Kaushik JK, Bhat R. Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. *J Phys Chem B*, 1998, 102(36): 7058–7066.
- [15] Lerbret A, Bordat P, Affouard F, et al. How do trehalose, maltose and sucrose influence some structural and dynamical properties of lysozyme? Insight from molecular dynamics simulations. *J Physical Chem B*, 2007, 111(31): 9410–9420.
- [16] Gekko K, Timasheff SN. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol–water mixtures. *Biochemistry*, 1981, 20(16): 4667–4676.
- [17] Wang AP, Dong SW, Lu DN. Study on thermal stabilizer of  $\alpha$ -amylase and its inactivation kinetic. *Textile Auxiliaries*, 2009, 26(3): 10–13.
- 王爱平, 董绍伟, 陆大年.  $\alpha$ -淀粉酶热稳定剂及失活动力学研究. *印染助剂*, 2009, 26(3): 10–13.
- [18] Nielsen AD, Pusey ML, Fuglsang CC, et al. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus*  $\alpha$ -amylase—the effect of calcium ions. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1652(1): 52–63.
- [19] Wang YB, Nagata S. Participation of ions and solutes on the thermostability of  $\alpha$ -amylase. *Chin J Biotech*, 2004, 20(1): 104–110.
- 王耀兵, 永田进一. 无机离子和有机溶质对  $\alpha$ -淀粉酶热稳定性的影响. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 104–110.
- [20] Mao XH, Li X, Wang SS, et al. Stabilizers of horseradish peroxidase. *Chin J Biotech*, 2009, 25(3): 388–391.
- 毛新焕, 李响, 王姗姗, 等. 辣根过氧化物酶的热稳定剂. *生物工程学报*, 2009, 25(3): 388–391.
- [21] Watanabe K, Fujita Y, Usami M, et al. Thermodynamic analysis of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase and its cumulatively proline-introduced mutant proteins by differential scanning calorimetry. *J Mol Catal B: Enzym*,

- 2000, 10(1/3): 257–262.
- [22] Arakawa T, Timasheff SN. Mechanism of polyethylene glycol interaction with proteins. *Biochemistry*, 1985, 24(24): 6756–6762.
- [23] Greenfield NJ, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 1969, 8(10): 4108–4116.
- [24] Citovsky V, Yanai P, Loyter A. The use of circular dichroism to study conformational changes induced in Sendai virus envelope glycoproteins. A correlation with the viral fusogenic activity. *J Biol Chem*, 1986, 261(5): 2235–2239.
- [25] Lu RC, Cao AN, Lai LH, et al. Effect of cationic surfactants on the interaction between sodium perfluorooctanoate and  $\beta$ -lactoglobulin. *J Colloid Interface Sci*, 2006, 293(1): 61–68.
- [26] Shen Q, Huang B, Shao JL, et al. Mechanism discussion of interaction between enzyme and several compounds with circular dichroism method. *J Sun Yatsen Univ*, 2006, 45(4): 62–64.
- 沈琼, 黄滨, 邵嘉亮, 等. 运用圆二色谱研究酶与化合物相互作用的机理. *中山大学学报*, 2006, 45(4): 62–64.
- [27] Andrade MA, Chacón P, Merelo JJ, et al. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, 1993, 6(4): 383–390.
- [28] Lu RC, Cao AN, Lai LH, et al. Protein-surfactant interaction: differences between fluorinated and hydrogenated surfactants. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 64(1): 98–103.
- [29] Bischof JC, He XM. Thermal stability of proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1066: 12–33.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 生物营养强化农产品开发和应用

#### 生命科学前沿

〔美〕 G.S. 巴纽埃洛斯 林治庆 编著 尹雪斌 李飞 刘颖 周守标 译

开本: B5 营销分类: 农业科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029334-3 ¥ 60.00 2010 年 11 月出版

#### 内容简介

我国农业历经了从高产到无公害,再到绿色有机的发展阶段。但是,安全仅仅是对食品要求的一个方面,在中国科学院农业领域战略研究组编撰的《中国至 2050 年农业科技发展路线图》中,食品的营养化和功能化已被提上日程,代表了我国未来农业发展的新方向。

本书从生物营养强化的概念出发,寻求目前世界上普遍存在的营养失衡的解决之道。本书的撰稿人均是活跃在农产品生物营养强化领域有经验的科学家。他们从缺乏现象最为普遍的硒、铁、锌、碘出发,着力于通过品种选育、肥料施用、农艺管理以及现代基因工程等技术手段来改善或解决这个问题,对改善我国民众的微量营养水平和提高我国有关研究、实践均有着非常重要的启发意义。

本书适合生命科学、农学等相关方向的研究人员参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目