

肠膜明串珠菌ATCC 12291蔗糖磷酸化酶的酶学性质及转糖苷分子改造

何贺贺, 林厚民, 寇力丹, 覃凤兰, 韦宇拓, 黄日波, 杜丽琴*

(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 根据GenBank数据库公布的肠膜明串珠菌ATCC 12291中蔗糖磷酸化酶基因序列, 构建重组表达质粒pQE-*lmsp*。在大肠杆菌*Escherichia coli* M15/pREP4中诱导表达, 镍亲和层析纯化蛋白, 进行酶学性质测定和重组酶转糖苷活性的研究。以蔗糖为底物对LMsp进行酶学性质分析, 其最适温度和最适pH值分别为40 °C和6.5; K_m 值和 V_{max} 值分别为 (34.16 ± 1.219) mmol/L和 (370.5 ± 6.049) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。当以葡萄糖-1-磷酸为供体时, 对于大多数单糖及其糖醇类受体均具有转糖苷活性, 尤其对L-阿拉伯糖具有75%的转化效率。然后通过对LMsp进行同源建模和氨基酸序列比对分析, 进行分子改造, 并比较酶学性质及转糖苷活性的变化。获得7个单点和联合的突变体T180A、T219V、P236S、T180A-T219V、T180A-P236S、T219V-P236S、T180A-T219V-P236S, 其中突变体T180A、P236S对L-山梨糖的转糖苷活性分别有13.7%和15%的提高。本研究通过对LMsp的研究, 发现其具有良好的酸碱稳定性和对L-阿拉伯糖的高转糖苷活性, 并且获得了对于L-山梨糖转糖苷活性提高的突变体, 丰富了有关于蔗糖磷酸化酶的性质, 并且对该酶的分子改造提供了经验依据。

关键词: 肠膜明串珠菌; 蔗糖磷酸化酶; 酶学性质; 转糖苷功能; 分子改造

Characterization of Recombinant Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 and Its Molecular Modification for Improved Transglucoside Activity

HE Hehe, LIN Houmin, KOU Lidan, QIN Fenglan, WEI Yutuo, HUANG Ribo, DU Liqin*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: A recombinant expression plasmid named pQE-*lmsp* was constructed based on the sequence of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 published in the GenBank database. The plasmid pQE-*lmsp* was expressed in *Escherichia coli* M15/pREP4. The recombinant protein LMsp was purified by NI-NTA affinity chromatography. The enzymatic properties, especially transglycoside activity of LMsp were studied. Using sucrose as substrate, the optimum temperature and pH were 40 °C and 6.5, respectively. The K_m and V_{max} values were (34.16 ± 1.219) mmol/L and (370.5 ± 6.049) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, respectively. When glucose-1-phosphate was used as donor, it had transglycoside activity on most monosaccharides, especially L-arabinose, which had 75% conversion efficiency. Then, molecular modification of LMsp was performed by homology modeling and amino acid sequence alignment analysis. A total of 7 single- and multiple-point mutants were obtained, including T180A, T219V, P236S, T180A-T219V, T180A-P236S, T219V-P236S, and T180A-T219V-P236S, and the transglycoside activities of T180A and P236S on L-sorbose were increased by 13.7% and 15%, respectively compared to that of LMsp. In this study, we found the sucrose phosphorylase LMsp had good pH stability and high transglycoside activity on L-arabinose. Further, the mutants with improved transglycoside activity on L-sorbose were obtained. This study enriches the properties of sucrose phosphorylase and provides a basis for molecular modification.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*; sucrose phosphorylase; enzymatic properties; transglycoside; molecular modification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181024-279

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 20-0122-08

收稿日期: 2018-10-24

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21566003); 广西自然科学基金项目 (2018GXNSFAA138103)

第一作者简介: 何贺贺 (1993—) (ORCID: 0000-0001-6721-6170), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子酶工程。

E-mail: HD160910@163.com

*通信作者简介: 杜丽琴 (1975—) (ORCID: 0000-0003-4659-8856), 女, 教授, 博士, 研究方向为分子酶工程。

E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

引文格式:

何贺贺, 林厚民, 寇力丹, 等. 肠膜明串珠菌ATCC 12291蔗糖磷酸化酶的酶学性质及转糖苷分子改造[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 122-129. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181024-279. <http://www.spkx.net.cn>

HE Hehe, LIN Houmin, KOU Lidan, et al. Characterization of recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 and its molecular modification for improved transglucoside activity[J]. Food Science, 2019, 40(20): 122-129. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181024-279. <http://www.spkx.net.cn>

蔗糖在植物体内广泛存在, 是人类生产生活中最重要的食品添加剂之一^[1]。利用生物酶资源拓宽蔗糖的应用范围, 生产高附加值产品成为研究热点方向之一。蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)在碳水化合物活性酶数据库属于糖基水解酶13家族^[2]。此酶能够可逆催化蔗糖和无机磷酸生成D-果糖和葡萄糖-1-磷酸^[3], 葡萄糖-1-磷酸是糖酵解途径的重要中间体^[4], 这使得蔗糖磷酸化酶在代谢中具有重要作用。蔗糖磷酸化酶除能水解蔗糖以外, 还具有催化转移葡萄糖苷键的能力^[5], 并且受体较为广泛, 包括无机磷酸、水, 及含有酚羟基、醇羟基及羧基的物质^[6]。葡萄糖基具有极性、结构稳定的特点, 因此所生成的产物在理化性质如耐热性、水溶性、抗氧化性等方面都普遍得到改善, 使得该酶在食品、医药、及化妆品等行业具有较强的应用价值和潜力^[7]。目前此酶研究最多的是催化转糖苷反应, 并且对其分子改造大多也是为了改善转糖苷性质。其中糖类底物的转糖苷产物益生元低聚糖, 常被作为低热量、非龋齿性的食品添加剂, 也是目前研究热点之一^[8]。

蔗糖磷酸化酶主要存在于微生物体内, 最早于20世纪40年代分别被Kagan^[9]与Doudoroff^[10]等从肠膜明串珠菌和嗜糖假单胞菌中发现。Schwarz等^[11]通过对肠膜明串珠菌的蔗糖磷酸化酶进行突变改造, 确定了196位点的天冬氨酸为其转糖苷关键位点之一, 揭开了探索该酶催化机理的序幕。Van Den Broek等^[12]克隆表达了来自青春双歧杆菌DSM 20083的蔗糖磷酸化酶, 并研究转糖苷性质, 发现其对于单糖具有良好的转糖苷特性, 而二糖和三糖并不适合作为其底物。李恬等^[13]以蔗糖作为葡萄糖的供体底物, 麦芽四糖作为加成引物, 利用蔗糖磷酸化酶和葡聚糖磷酸化酶协同作用探索出了直链糊精的低成本且操作简单的合成途径, 为工业化大规模生产提供了理论基础。

为改善酶学性质, 对蔗糖磷酸化酶的分子改造也取得了较多进展。Verhaeghe等^[14]利用半理性突变的方法, 构建突变体文库并进行高通量筛选, 得到了一个对二糖选择性高达95%的双位点突变体, 为其在食品及益生元领域的应用提供了基础。Kraus等^[15]首次对于活性位点进行突变, 间接性的增大活性口袋空间, 使得该酶能对以多酚类的底物具有转糖苷作用。其中对于槲皮素的糖基化能提高其抗氧化还原能力^[16], 并且人体对于其吸收利用能力也得到增强^[17]。

综上, 对于蔗糖磷酸化酶的研究必定是以大量酶学性质数据作为基础和支撑的。本研究旨在丰富不同来源蔗糖磷酸化酶的数据, 对蔗糖磷酸化酶进行改造, 进一步挖掘潜在的结构和理论价值, 得到更多有关于分子改造的经验, 为此酶分子改造技术的进步以及在食品行业的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC12291、大肠杆菌 *Escherichia coli* M15/pREP4、大肠杆菌 *E. coli* XL10-Gold均为本实验室保存。

高保真DNA聚合酶Prime STARTM HS、dNTP Mixture、λDNA/Hind III Marker、蛋白质Marker以及限制性内切酶EcoR I、Hind III、BamH I、T₄ DNA连接酶等大连TaKaRa宝生物工程有限公司; Dpn I 富酶泰斯生物技术(深圳)有限公司; DNA纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒DNA小量提取试剂盒 BioFlux杭州博日科技有限公司; 镍亲和层析填料Ni-NTA 德国Qiagen公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 美国Gibco公司; 葡萄糖-1-磷酸 美国Sigma公司; 色谱级乙腈 美国Fisher公司; 葡萄糖、蔗糖等其他糖类试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Biometra聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 德国耶拿公司; SHEL LAB W20M-2水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; 恒温培养箱 上海予腾生物科技有限公司; 恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司; 台式离心机 德国艾本德公司; 酶标仪 美国伯腾仪器公司; 1260 infinity Series 高效液相色谱分析仪 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 肠膜明串珠菌ATCC 12291蔗糖磷酸化酶基因的克隆

将肠膜明串珠菌ATCC 12291活化培养, 采用机械破胞法提取基因组DNA。对已报道的肠膜明串珠菌ATCC 12291蔗糖磷酸化酶基因*lmsp*所编码的氨基酸序列进行蛋白质结构和信号肽分析, 然后设计扩增引物,

引物为: LMsp-F: 5'-CGCGGATCCGAAATTCAAACA
AAGCAATGTTG-3', 引入BamH I酶切位点; LMsp-R:
5'-CCCAAGCTTTTATGTTGGTGGTGGTGGTGGTCTGAGT
CAAATTATCACT-3', 引入Hind III酶切位点和组氨酸标签。

PCR程序: 98 ℃、2 min预变性, 98 ℃、10 s变
性, 56.5 ℃、15 s退火, 72 ℃、2 min延伸, 30 个循
环; 72 ℃、10 min。将PCR产物和pQE30质粒分别进行
BamH I和Hind III酶切处理, 之后经连接并转化至*E.coli*
XL10-Gold中。经过测序, 将成功构建的重组质粒命名为
pQE-lm_{sp}。

1.3.2 重组酶LMsp的诱导表达和蛋白质纯化

将重组质粒转入*E. coli* M15/pREP4中, 于37 ℃培
养至OD_{600 nm}约0.4~0.6时, 加入终浓度为0.5 mmol/L的
IPTG, 20 ℃、180 r/min培养22 h。离心并收集菌体, 超
声波破碎后, 对上清液进行Ni-NTI镍亲和层析, 纯化后
得到重组酶命名为LMsp, 并进行变性十二烷基硫酸钠-聚
丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide
gel electrophoresis, SDS-PAGE)。

1.3.3 重组酶LMsp的酶学性质分析

利用3,5-二硝基水杨酸比色法测定酶学的基本
参数^[18]。反应体系设为200 μL。取180 μL 0.2 mol/L磷酸
氢二钠-0.1 mol/L柠檬酸缓冲液、10 μL 20 g/100 mL蔗糖
在, 在最适反应温度温浴2 min后, 加入10 μL适当稀释
酶液, 精确反应20 min后加入2 倍体积3,5-二硝基水杨酸
(400 μL) 终止反应, 沸水浴5 min显色。待样品冷却至
室温, 取200 μL至96 孔酶标板中, 在540 nm波长处读取
样品的吸光度。

蔗糖磷酸化酶活力单位(U)的定义: 在最适反
应条件下, 每1 min水解蔗糖释放1 μmol还原糖所需
的酶量。

1.3.3.1 最适pH值的测定

以pH 4.0~8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制反
应体系, 加入适当稀释纯酶液在37 ℃条件下精确反应
20 min, 测定不同pH值条件下的酶活力。以最高活力为
100%, 计算不同pH值条件下酶的相对活力, 相对活力最
高的pH值即为酶最适反应pH值。

1.3.3.2 最适温度的测定

在最适pH值条件下, 测定在不同反应温度
(30~65 ℃) 条件下的酶活力, 以最高活力为100%计算
不同温度条件下酶的相对活力, 相对活力最高的温度即
为酶最适反应温度。

1.3.3.3 重组酶pH值稳定性的测定

将重组酶在不同pH值的缓冲液(4.0~8.0)中于4 ℃
保存12 h, 在最适反应条件下测定其残存酶活力, 以保存
在pH 7.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠洗脱液中的酶活力为
100%, 计算不同pH值下重组酶的相对活力。

1.3.3.4 重组酶热稳定性的测定

将重组酶保存在不同温度(25~60 ℃)下1 h, 立即
取出放于冰上, 在最适反应条件下测定残存酶活力, 以
4 ℃保存的酶活力为100%, 计算不同温度下重组酶的相
对活力。

1.3.3.5 重组酶K_m和V_{max}值的测定

在最适反应温度和pH值条件下, 测定以不同浓度
(1.5~234 mmol/L) 蔗糖为底物时的酶活力, 带入经典
米氏方程得到酶的K_m、V_{max}值。

1.3.3.6 转糖苷功能的测定

以15%葡萄糖-1-磷酸(溶于最适pH值的磷酸氢二钠-
柠檬酸缓冲液)为葡萄糖基供体, 5%的D-阿拉伯糖、
L-阿拉伯糖、D-木糖、D-木糖醇、D-半乳糖、D-甘露
糖、D-甘露糖醇、D-果糖、D-葡萄糖、L-山梨糖、D-山
梨糖醇、L-鼠李糖为受体, 加入60 μg纯化酶液配制成
200 μL反应体系, 在最适条件下反应12 h, 沸水浴10 min
终止反应, 冷却至室温后, 12 000 r/min离心30 min取上
清液进行高效液相色谱分析, 检测其反应产物。转化率
定义为实验组底物减少量与对照组底物量的比值。

色谱检测条件: 检测器: 示差折光检测器
(Agilent 1260 RID)、散射蒸发光检测器(Alltech
2000ES ELSD); 色谱柱: Alltima Amino NH₂柱
(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 72%乙腈; 流
速: 1 mL/min; 柱温: 室温(26 ℃); 上样量: 20 μL。

1.3.4 LMsp的分子改造

采用半理性设计的方法寻找可能影响蔗糖磷酸化酶
LMsp转糖苷活性的关键氨基酸, 并利用反向PCR技术进
行定点突变改造。

使用建模软件SWISS-MODEL对蔗糖磷酸化酶LMsp
的氨基酸序列进行分析, 以青春双歧杆菌蔗糖磷酸化酶
的3D结构(序列一致性>36%)为模板, 建立LMsp的蛋
白质三维模型。使用PyMOL软件对LMsp的蛋白质三维模
型进行分析, 并结合与另外2个氨基酸序列相差较小,
但转糖苷性质差异较大的两个序列的比对结果(分别来
自于肠膜明串珠菌NRRL B1149、肠膜明串珠菌NRRL
B1355的蔗糖磷酸化酶), 找到了3个可能影响LMsp转
糖苷活性的关键氨基酸残基, 并进行突变改造。突变引
物如表1所示。

表1 反向PCR引物
Table 1 Primer sequences used for inverse-PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
T180A1	ATTAAGGCAACCCCTTGAAGACATGGTA
T180A2	AAGGGTTCCTTAATAAATTCCTTGGC
T219V1	TGGGACGTTTGAATGAAGTACGTGAA
T219V2	ATTCAAACGTCCTCCAGATTCTGGCTC
P236S1	ATTTTAAGCGAAATTCATGAACATTAC
P236S2	AATTTCGCTTAAATTCAGCCTTTAA

注: 下划线处为所选突变位点。

定点突变PCR程序：除退火温度为57℃外，其他条件同1.3.1节。PCR产物中加入*Dpn*I酶消解质粒模板，胶回收后将PCR产物转入*E. coli* XL10-Gold中经过测序获得正确突变体。并且在单点突变体基础上，进行累积突变，获得T180A-T219V、T180A-P236S、T219V-P236S和T180A-T219V-P236S四个联合突变体。

蔗糖磷酸化酶LMsp突变体的诱导表达参照1.3.2节进行；酶学性质测定及转糖苷性质研究参照1.3.3节进行。

2 结果与分析

2.1 蔗糖磷酸化酶的生物信息学分析和基因克隆

使用SMART软件对肠膜明串珠菌ATCC12291的蔗糖磷酸化酶基因所编码的氨基酸序列进行蛋白质结构组件分析。生物信息学分析与基因克隆结果如图1所示。结果表明其N端30~337位氨基酸为 α -淀粉酶结构域，不具有信号肽。以肠膜明串珠菌ATCC12291的基因组DNA为模板，用引物LMsp-F、LMsp-R按照1.3.1节中方法PCR扩增目的基因，得到一条大小约为1.5 kb的特异性条带，测序正确后将其命名为*lmsp*，对应的蛋白质大小预计为55 848.77 Da。

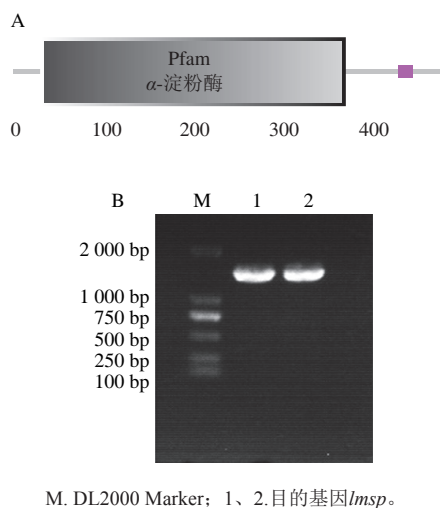
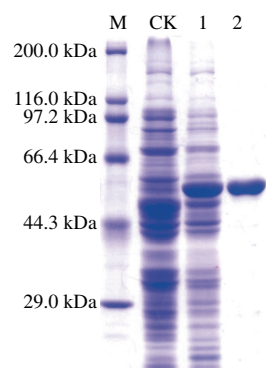


图1 LMsp蛋白质结构组件(A)及目的基因的克隆(B)
Fig. 1 Modular architecture (A) and cloning (B) of target gene

2.2 重组酶LMsp的诱导表达和蛋白质纯化

重组菌诱导后裂解物菌体蛋白的SDS-PAGE分析如图2所示。含有重组质粒的菌株约在56 kDa大小处表达有明显的蛋白质特征条带，与理论分子质量一致。纯化后的重组蛋白LMsp在预期大小处的条带明显且单一，说明目的蛋白符合预期，即*lmsp*已在宿主菌内成功表达，可进一步测定酶学性质。



M. 蛋白Marker; CK. *E. coli* M15/pREP4/pQE30诱导后裂解物;
1. *E. coli* M15/pREP4/pQE-lmmp诱导后裂解物; 2. 纯化酶LMsp。

图2 重组蛋白LMsp的SDS-PAGE分析

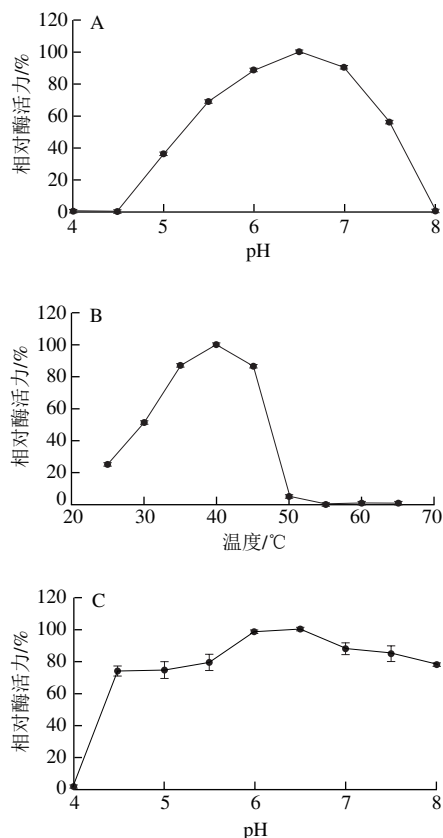
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein LMsp

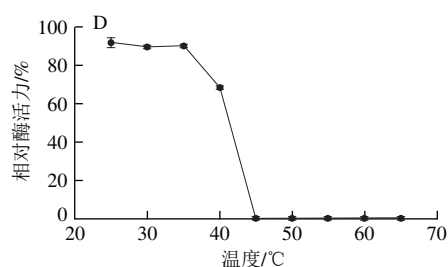
2.3 重组酶LMsp的酶学性质分析

2.3.1 pH值和温度对于重组酶LMsp的影响

如图3A、B所示，LMsp的最适pH值为6.5，在pH 5.5~7.5之间能保持50%以上的酶活力。最适温度为40℃，在30~45℃之间能保持50%以上的酶活力。

LMsp在pH 4.5~8.0的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液中4℃保存24 h后，残余酶活力在70%以上（图3C），说明在此范围内LMsp的酸碱稳定性较好。在25~40℃条件下水浴保温1 h后，仍残留有50%以上的酶活力，其中在25~35℃时能稳定保留有80%以上的酶活力（图3D）。





A. pH值对LMsp酶活力影响; B.温度对LMsp酶活力影响;
C. LMsp的酸碱稳定性; D. LMsp的热稳定性。

图3 pH值和温度对重组蛋白质LMsp酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH and temperature on recombinant enzyme activity

2.3.2 LMsp的动力学常数测定结果

利用GraphPad Prism 5软件对所测酶活数据进行处理, 通过非线性回归拟合得到动力学常数(图4) K_m 为 (34.16 ± 1.219) mmol/L, V_{max} 值为 (370.5 ± 6.049) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

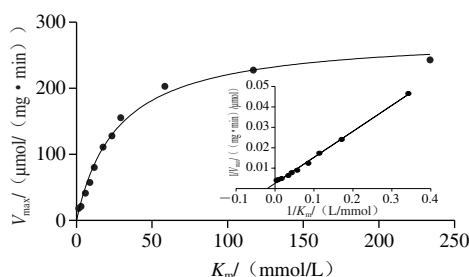


图4 LMsp的 K_m 和 V_{max} 值

Fig. 4 K_m and V_{max} values of LMsp

2.3.3 LMsp转糖苷功能分析

在以15%的葡萄糖-1-磷酸为供体, 受体为5%的糖类时, 检测反应产物并计算转化率如表2所示。可知LMsp对D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木糖醇、D-半乳糖、D-甘露糖、D-果糖、D-葡萄糖、L-山梨糖具有转糖苷活性, 尤其对L-阿拉伯糖具有75%的转化效率。

表2 LMsp转糖苷产物的转化率

Table 2 HPLC analysis of transglycosidase products from LMsp

受体底物	转化率/%
D-阿拉伯糖	3.8
L-阿拉伯糖	75
D-果糖	11.2
D-半乳糖	13.5
D-葡萄糖	2.9
D-甘露糖	4.6
D-甘露糖醇	—
L-鼠李糖	—
L-山梨糖	6.7
D-山梨糖醇	—
D-木糖	—
D-木糖醇	3.1

注: —, 无转糖苷反应。表4同。

2.4 LMsp的分子改造

2.4.1 LMsp的同源建模分析与突变位点的选择

选择来自与蔗糖磷酸化酶LMsp氨基酸序列一致性大于30% (序列一致性为36.58%) 的青春双歧杆菌3D结构为模板, 使用SWISS-MODEL建立了LMsp的蛋白质三维结构。找出了距离LMsp催化亲核试剂196位天冬氨酸10 Å以内的氨基酸残基位点 (图5中的橘黄色棒状物)。

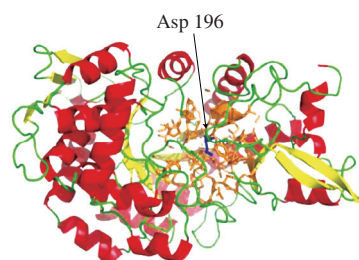


图5 距离LMsp催化亲核试剂10 Å以内的氨基酸残基

Fig. 5 Amino acid residues from the catalytic nucleophile of LMsp within 10 Å

已有研究^[19]发现来自肠膜明串珠菌NRRL B1149和肠膜明串珠菌NRRL B1355的蔗糖磷酸化酶与LMsp有高达86%以上的氨基酸序列相似性, 但转糖苷活性差别较大, 因此推测2种菌中不同的氨基酸残基中包含有影响转糖苷活力的关键位点。

结合LMsp同源建模所找到的距离催化亲核试剂10 Å以内的氨基酸残基位点, 并根据序列比对分析的结果, 找出了3个可能影响LMsp转糖苷活性的氨基酸残基位点, 即T180、T219、P236, 如图6所示。将这3个位点突变成为肠膜明串珠菌NRRL B1355氨基酸序列上所对应的T180A、T219V、P236S, 并在此基础上进行累积突变, 直至获得LMsp在180、219、236三个位点上的全部7个突变体。

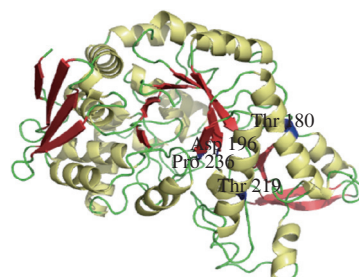


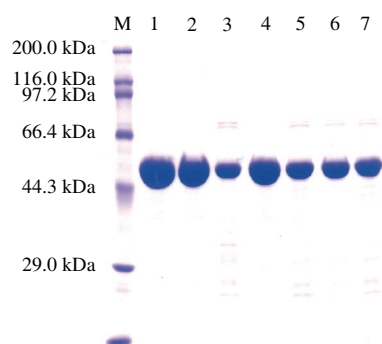
图6 LMsp突变位点的选择

Fig. 6 Selection of mutation site in LMsp

2.4.2 突变体的获得与突变蛋白的表达纯化

用表1中引物, 以pQE-lmcp为模板反向PCR扩增得到目的产物, 将测序正确的突变质粒转入E. coli M15/pREP4中得到突变体。突变体经诱导表达并使用镍亲和层析纯化, 纯化后的7个突变蛋白分子质量大小一致,

约为56 kDa, 与预期大小相符。SDS-PAGE分析结果如图7所示。



M.标准蛋白Marker; 1~7.纯化的突变蛋白。

图7 突变蛋白SDS-PAGE分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purified mutant proteins

2.4.3 突变酶酶学性质

将所得突变体, 按照1.3.3节中的酶活测定方法, 对比野生酶LMsp结果如表3所示。突变酶的最适温度和最适pH值与野生重组酶LMsp相比变化不大, K_m 、 V_{max} 值较野生酶相比变化明显。其中T180A的 K_m 值为 (77.74 ± 5.671) mmol/L, 比野生酶高出 (43.58 ± 4.452) mmol/L, 提高了约1.28倍, 该突变体对蔗糖的亲和力降低最大。同时也得到了对于底物亲和力提高的突变体T219V-P236S。突变酶T180A的 V_{max} 值 (618.1 ± 23.37) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 比野生酶高出 (247.6 ± 17.321) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 酶活力显著上升。而其余各突变酶的 V_{max} 值与野生酶相比均有不同程度的下降, 其中P236S、T180A-T219V、T180A-P236S及T219V-P236S的 V_{max} 值与突变前相比下降幅度较明显, 分别约为之前的60%、41%、63%和60%。

表3 突变酶酶学性质测定结果

Table 3 Enzymatic properties of mutants

突变体	最适温度/℃	最适pH	K_m /(mmol/L)	V_{max} /($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)
LMsp	40	6.5	34.16 ± 1.219	370.5 ± 6.049
T180A	40	6.5	77.74 ± 5.671	618.1 ± 23.37
T219V	40	6.5	50.25 ± 3.770	356.7 ± 11.62
P236S	40	6.5	31.10 ± 1.044	222.3 ± 2.634
T180A-T219V	40	6.0	31.21 ± 1.337	153.0 ± 2.317
T180A-P236S	40	6.0	41.69 ± 2.165	233.4 ± 4.861
T219V-P236S	40	6.5	28.48 ± 1.835	222.4 ± 4.862
T180A-T219V-P236S	45	6.5	58.81 ± 4.269	359.4 ± 12.10

2.4.4 突变体转糖苷功能

由表4可知, 在以15%的葡萄糖-1-磷酸为供体, 受体底物为5%糖类时, LMsp及其突变体对L-阿拉伯糖均有很高的转糖苷活性。与野生重组酶相比, 突变酶T180A、P236S对L-山梨糖的转糖苷活性提高了约15%; T180A、P236S、T180A-P236S对L-阿拉伯糖的转糖苷活性基本不

变; T180A、T219V、T180A-T219V对D-果糖的转糖苷活性基本不变; P236S、T219V-P236S对D-葡萄糖的转糖苷活性与野生酶基本一致; T180A、T219V-P236S、T180A-T219V-P236S对D-木糖醇的转糖苷活性基本不变; P236S对D-甘露糖, T219V对L-山梨糖的转糖苷活性同野生酶相当。除此之外, 其他突变体对各受体底物的转糖苷活性都有不同程度的下降, 甚至对部分底物失去活性。

表4 LMsp及突变体对底物的转化率

Table 4 Conversion efficiencies of LMsp and mutants toward substrate

受体底物	转化率/%							
	LMsp	T180A	T219V	P236S	T180A-T219V	T180A-P236S	T219V-P236S	T180A-T219V-P236S
D-阿拉伯糖	3.8	2.2 ↓	1 ↓	1.3 ↓	1.5 ↓	1.9 ↓	1.4 ↓	1.9 ↓
L-阿拉伯糖	75	76.3	60.8 ↓	74.4	66.7 ↓	73.1	66.1 ↓	66.1 ↓
D-果糖	11.2	11.3	11.1	9.7 ↓	10.8	10.3 ↓	10.1 ↓	9.8 ↓
D-半乳糖	13.5	7.2 ↓	6.5 ↓	8.1 ↓	8.4 ↓	11.0 ↓	8.3 ↓	8.4 ↓
D-葡萄糖	2.9	1.5 ↓	1.3 ↓	2.8	—	—	2.6	1.0 ↓
D-甘露糖	4.6	2.8 ↓	2.7 ↓	4.4	3.4 ↓	3.1 ↓	2.6 ↓	2.5 ↓
D-甘露醇	—	—	—	—	—	—	—	—
L-鼠李糖	—	—	—	—	—	—	—	—
L-山梨糖	6.7	20.4 ↑	6.0	21.8 ↑	4.0 ↓	1.3 ↓	4.8 ↓	4.5 ↓
D-山梨糖醇	—	—	—	—	—	—	—	—
D-木糖	—	—	—	—	—	—	—	—
D-木糖醇	3.1	2.9	1.9 ↓	3.8 ↑	2.3 ↓	2.2 ↓	3.1	3.2

注: ↑、↓对比野生酶增强和降低。

3 讨论

本研究从肠膜明串珠菌ATCC 12291基因组中克隆得到了蔗糖磷酸化酶基因 $lmsp$, 并在大肠杆菌M15中成功实现了异源表达。目的酶蛋白分子质量大小约为56 kDa, 最适温度为40℃, 最适pH值为6.5, 在25~40℃、pH 4.5~8.0条件下能保持酶活力稳定。Lee等^[20]报道来自肠膜明串珠菌NRRL B1149的蔗糖磷酸化酶的最适温度为37℃, 李群良等^[21]测定来源于*Bacillus megaterium* NCIB 8508的蔗糖磷酸化酶最适温度为50℃, 最适pH值为7.5, 一定程度上表明不同来源的酶在酶学性质上表现有差异, 这是在菌株需要不断适应外界环境而长期进化造成的。在以蔗糖为底物时 K_m 为 (34.16 ± 1.219) mmol/L, V_{max} 值为 (370.5 ± 6.049) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。LMsp对D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木糖醇、D-半乳糖、D-甘露糖、D-果糖、D-葡萄糖、L-山梨糖具有转糖苷活性。

为找到影响转糖苷反应的关键残基位点, 以提高转糖苷活性, 对其进行了分子改造。依据Morler等^[22]的距离定义即: 离活性中心距离超过10 Å即被认定为远距离位点。以青春双歧杆菌蔗糖磷酸化酶的3D结构为模板, 建立了LMsp的蛋白质三维模型。并结合同源蔗糖磷酸化酶的氨基酸序列比对分析, 选取了距离LMsp亲核试剂

Asp 196位点10 Å以内的T180、T219、P236三个位点进行了定点及累积突变,获得了7个近距离突变体。其中突变体T180A、P236S对L-山梨糖的转糖苷活性有所提高,对其他一些受体底物则出现了反向变化。

为解释性质改善的原因,经过分析发现,苏氨酸与丙氨酸相比,R基上多一个羟基和甲基,空间结构较复杂。脯氨酸是一种有着环状结构的亚氨基酸,其空间结构比丝氨酸更加复杂,空间位阻更大。因此当180、236位点上的苏氨酸和脯氨酸突变成为空间位阻较小的丙氨酸和丝氨酸时,酶的活性口袋更容易与底物相契合,使得酶对这些底物的转糖苷活性上升。突变体T180A、P236S对L-山梨糖的转糖苷活性均有所提高,而T180A-P236S联合突变体对于山梨糖的活性却发生了降低,即多位点的相互叠加并不会把单点突变的优势叠加起来,反而造成了活性的减弱。结合建模分析,推测由于突变后氨基酸空间结构改变对相邻氨基酸产生了影响,酶的空间构象发生变化,造成了底物与酶在诱导契合过程中产生了阻碍作用。

为改善酶学特性,远距离突变的改造方案也曾被采用,并取得了一定成果。Whittle等^[23]曾在距离活性中心19 Å的位置进行了突变,使酶活力增强了32倍。Van Den Heuvel等^[24]在距离活性中心远达32 Å的位置引入突变,使酶活力增强了4.2倍。一定程度上表明了远距离的氨基酸变化可以通过一系列的接触传递到活性中心,从而影响酶活力。此外,基于蛋白质结构能量预测的方法也有很多成功的例子^[25-27],能量最低化对于稳定蛋白质性质及提高产物得率也是一个很好的方法。本研究丰富了蔗糖磷酸化酶资源的性质数据,获得了部分性质具有改善的突变酶,为进一步对于蔗糖磷酸化酶的分子改造提供了宝贵经验。

参考文献:

- [1] EGGLESTON G, LEGENDRE B, TEW T. Indicators of freeze-damaged sugarcane varieties which can predict processing problems[J]. Food Chemistry, 2004, 87(1): 119-133. DOI:10.1016/j.foodchem.2003.11.004.
- [2] SPROG E D, VAN DEN BROEK L A M, MIRZA O, et al. Crystal structure of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*[J]. Biochemistry, 2004, 43(5): 1156-1162. DOI:10.1021/bi0356395.
- [3] TEDOKON M, SUZUKI K, KAYAMORI Y, et al. Enzymatic assay of inorganic phosphate with use of sucrose phosphorylase and phosphoglucosyltransferase[J]. Clinical Chemistry, 1992, 38(4): 512-515.
- [4] REID S J, ABRATT V R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(3): 312-321. DOI:10.1007/s00253-004-1885-y.
- [5] LEE J H, MOON Y H, KIM N, et al. Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(4): 749-754. DOI:10.1007/s10529-007-9608-y.
- [6] 侯顾伟, 马江锋, 隋姗姗, 等. 蔗糖磷酸化酶制备及应用的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 28(6): 17-20. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2010.06.006.
- [7] 万月佳, 马江锋, 徐蓉, 等. 重组大肠杆菌产蔗糖磷酸化酶的酶学性质及其催化合成 α -熊果苷[J]. 生物工程学报, 2012, 28(12): 1450-1459.
- [8] ROBERFROID M. Prebiotics: the concept revisited[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(3): 830S-837S. DOI:10.1093/jn/137.3.830S.
- [9] KAGAN B, LATKER S, ZFASMAN E. Phosphorolysis of saccharose by cultures of *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Biokhimiya, 1942, 7: 93-108.
- [10] DOUDOROFF M, KAPLAN N, HASSID W Z. Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1943, 148(1): 67-75.
- [11] SCHWARZ A, NIDETZKY B. Asp-196 \rightarrow Ala mutant of *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase exhibits altered stereochemical course and kinetic mechanism of glucosyl transfer to and from phosphate[J]. FEBS Letters, 2006, 580(16): 3905-3910. DOI:10.1016/j.febslet.2006.06.020.
- [12] VAN DEN BROEK L A, VAN BOXTEL E L, KIEVIT R P, et al. Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(2): 219-227. DOI:10.1007/s00253-003-1534-x.
- [13] 李恬, 周星, 徐进, 等. 以蔗糖为底物双酶法合成直链糊精[J]. 食品与发酵工业, 2012(10): 29-34. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.10.019.
- [14] VERHAEGHE T, DE W K, BERLAND M, et al. Converting bulk sugars into prebiotics: semi-rational design of a transglucosylase with controlled selectivity[J]. Chemical Communications, 2016, 52(18): 3687. DOI:10.1039/c5cc09940d.
- [15] KRAUS M, GRIMM C, SEIBEL J. Switching enzyme specificity from phosphate to resveratrol glucosylation[J]. Chemical Communications, 2017, 53(90): 12181-12184. DOI:10.1039/c7cc05993k.
- [16] DAY A J, BAO Y, MORGAN M R, et al. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2000, 29(12): 1234-1243. DOI:10.1016/S0891-5849(00)00416-0.
- [17] HOLLMAN P C, BIJSMAN M N, VAN G Y, et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man[J]. Free Radical Research Communications, 2009, 31(6): 569-573. DOI:10.1080/10715769900301141.
- [18] CHOI H C, SEO D H, JUNG J H, et al. Development of new assay for sucrose phosphorylase and its application to the characterization of *Bifidobacterium longum* SJ32 sucrose phosphorylase[J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(2): 513-518. DOI:10.1007/s10068-011-0071-0.
- [19] AERTS D, VERHAEGHE T F, ROMAN B I, et al. Transglucosylation potential of six sucrose phosphorylases toward different classes of acceptors[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(13): 1860-1867. DOI:10.1016/j.carres.2011.06.024.

- [20] LEE J H, YOON S H, NAM S H, et al. Molecular cloning of a gene encoding the sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1149 and the expression in *Escherichia coli*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 612-620. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.11.008.
- [21] 李群良, 张欣英, 姚评佳, 等. 巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* NCIB 8508 蔗糖磷酸化酶的分离鉴定[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(12): 61-64. DOI:10.3969/j.issn.1672-5425.2010.12.019.
- [22] MORLEY K L, KAZLAUSKAS R J. Improve enzyme properties: when are closer mutations better?[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(5): 231-237. DOI:10.1016/j.tibtech.2005.03.005.
- [23] WHITTLE E, SHANKLIN J. Engineering delta 9-16: 0-acyl carrier protein (ACP) desaturase specificity based on combinatorial saturation mutagenesis and logical redesign of the castor delta 9-18:0-ACP desaturase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(24): 21500-21505. DOI:10.1074/jbc.M102129200.
- [24] VAN DEN HEUVEL R H H, VAN DEN BERG W A M, ROVIDA S, et al. Laboratory-evolved vanillyl-alcohol oxidase produces natural vanillin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 179(32): 33492-33500. DOI:10.1074/jbc.M312968200.
- [25] SIVARAMAKRISHNAN V, THIYAGARAJAN C, KALAIVANAN S, et al. Homology modeling, molecular docking and electrostatic potential analysis of MurF ligase from *Klebsiella pneumonia*[J]. Bioinformation, 2012, 8(10): 466-473. DOI:10.6026/97320630008466.
- [26] MOUGHON S E, SAMUDRALA R. LoCo: a novel main chain scoring function for protein structure prediction based on local coordinates[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 368. DOI:10.1186/1471-2105-12-368.
- [27] GUO R, RIGOLET P, ZARGARIAN L, et al. Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(10): 3109-3124. DOI:10.1093/nar/gki619.