

环糊精水解酶 cds1-3 底物通道氨基酸的定点突变研究*

汤宏赤¹, 莫莉², 闭海², 林丽华¹, 郭媛¹, 庞浩^{1,2**}

(1. 广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物炼制重点实验室, 广西生物科学与技术研究中心, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

摘要:本研究对具有大分子水解能力的环糊精水解酶 cds1-3 的蛋白结构进行分析, 选取底物通道相关氨基酸进行定点突变。通过比较突变酶和野生酶的功能差异, 定位决定 cds1-3 特殊功能的氨基酸。采用 sybyl 1.2 进行蛋白质底物结合分析, 选取和多聚体形成、底物结合以及底物通道相关的氨基酸 Glu66、Pro48、Phe289 为突变位点, 反向 PCR 构建 pSE380/E66G、pSE380/P48H、pSE380/F289A 表达质粒并进行表达, 获得酶活突变体并与原始酶进行底物特异性比较分析。其结果显示, 突变酶 E66G 降解大分子底物木薯淀粉和支链淀粉的相对酶活力分别提高 26.96% 和 23.15%, 而对小分子底物普鲁兰糖的水解能力下降 13.14%。因此, cds1-3 是一个能水解大分子底物的特殊环糊精水解酶, 氨基酸 Glu66 是 cds1-3 水解大分子支链淀粉的关键氨基酸之一。

关键词:环糊精水解酶 同源建模 底物通道 定点突变 蛋白结构 氨基酸

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)04-0410-07

0 引言

环糊精水解酶属于糖苷水解酶 13 家族成员, 具有水解环糊精中 α -1,4-糖苷键能力^[1]。环糊精水解酶具有广泛的底物特异性, 能水解环糊精、普鲁兰糖、可溶性淀粉及支链淀粉等多种底物^[2]。但是环糊精水解酶在淀粉工业上的应用并不广泛。研究发现, 不同微生物来源的环糊精水解酶对底物作用的专一性不同, 主要表现在对各种支链低聚糖的分解能力上^[3-4]。环糊精水解酶在底物识别方面存在一个共同

的问题: 它们对小分子底物的亲和力高, 对大分子底物的亲和力弱, 因而对小分子环糊精具有很强的水解能力, 对支链淀粉水解能力很弱^[5]。较低的水解效率阻碍环糊精水解酶在水解支链淀粉上的实际应用。

cds1-3 是从宏基因组文库中筛选得到的一个新环糊精水解酶。cds1-3 的底物特异性异于传统环糊精水解酶, 对支链淀粉的水解能力是水解环糊精能力的 1.9 倍^[6]。cds1-3 与模式菌 *Thermus* sp. IM6501 的环糊精水解酶 ThMA^[7] 氨基酸序列一致性高达 94.7%, 仅存在 30 个氨基酸差异。但两者对环糊精

* 广西科技基地和人才专项(桂科 AD16380016), 广西重点研发计划(桂科 AB17190534)和广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA294047)资助。

【作者简介】

汤宏赤(1989—), 男, 助理研究员, 主要从事分子酶学研究。

【**通信作者】

庞浩(1975—), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事分子微生物学和酶工程研究, E-mail: panghouse@126.com。

【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20190808.006

汤宏赤, 莫莉, 闭海, 等. 环糊精水解酶 cds1-3 底物通道氨基酸的定点突变研究[J]. 广西科学, 2019, 26(4): 410-416.

TANG H C, MO L, BI H, et al. Site-directed mutagenesis of amino acid in the substrate of cyclodextrin hydrolase cds1-3 [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(4): 410-416.

和支链淀粉的作用能力却有较大的差别: ThMA 对环糊精等小分子物质的作用力最强, 对支链淀粉的水解能力最弱; 而 cds1-3 对支链淀粉的水解能力却很强^[6-7]。本研究以环糊精水解酶 ThMA (id 为 O69007) 的晶体结构 1SMA 为模板, 对 cds1-3 进行同源建模并根据构建好的结构模型对支链淀粉酶 cds1-3 进行空间结构分析, 选取底物通道相关氨基酸进行定点突变, 比较突变酶和野生酶的功能差异, 定位决定 cds1-3 特殊功能的氨基酸。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 XL10-Gold 和 DH5 α 由实验室保存, 表达质粒 pSE380-cds1-3 由实验室构建保存。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司; 分子生物学工具酶包括限制性内切酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、DNA Marker 和 Protein Marker 等购自 TaKaRa 公司; α -环糊精购自上海生物工程有限公司; 支链淀粉购自 Sigma 公司; 可溶性淀粉购自国药集团化学试剂有限公司; IPTG 购自 Aldrich 公司; Yeast extract 和 Tryptone 购自 Oxoid 公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂; 寡聚核苷酸引物由 Invitro-

gen 公司合成。

1.2 突变体的构建

1.2.1 突变位点选择

以氨基酸序列高度一致的模式菌 *Thermus* sp. IM6501 的环糊精水解酶 ThMA (id 为 O69007) 的晶体结构 1SMA 为模板, 利用 M4T server 进行同源建模构建 cds1-3 的三维结构模型^[8]。通过 cds1-3 和 ThMA 氨基酸序列比对, 以及 cds1-3 同源建模结构分析, 发现序列高度相似、三维结构外观一致的两个酶对大分子底物降解存在较大的差异。为探求造成这一差异的具体原因, 采用 sybyl 1.2 和 PyMOL 软件工具进行蛋白质底物结合分析及蛋白结构显示, 从 ThMA 蛋白质和 cds1-3 蛋白质的差异中选取和多聚体形成、底物结合以及底物通道相关的氨基酸进行模拟分析(图 1~2)。由图 1 可知, 除黄色球体表示的 289 位氨基酸外, 其余球状体均为差异氨基酸。绿色环状体为环糊精底物分子, 示意底物环糊精的结合位置。差异氨基酸主要位于远离底物结合位点的底物通道区域, 只有少数几个氨基酸在底物结合区域附近。由图 2 可知, Glu66、Pro48、Phe289 3 个氨基酸位点在空间上距离底物通道远近具有差异, 分属不同的空间结构, 这 3 个位点所属的空间结构对酶与底物

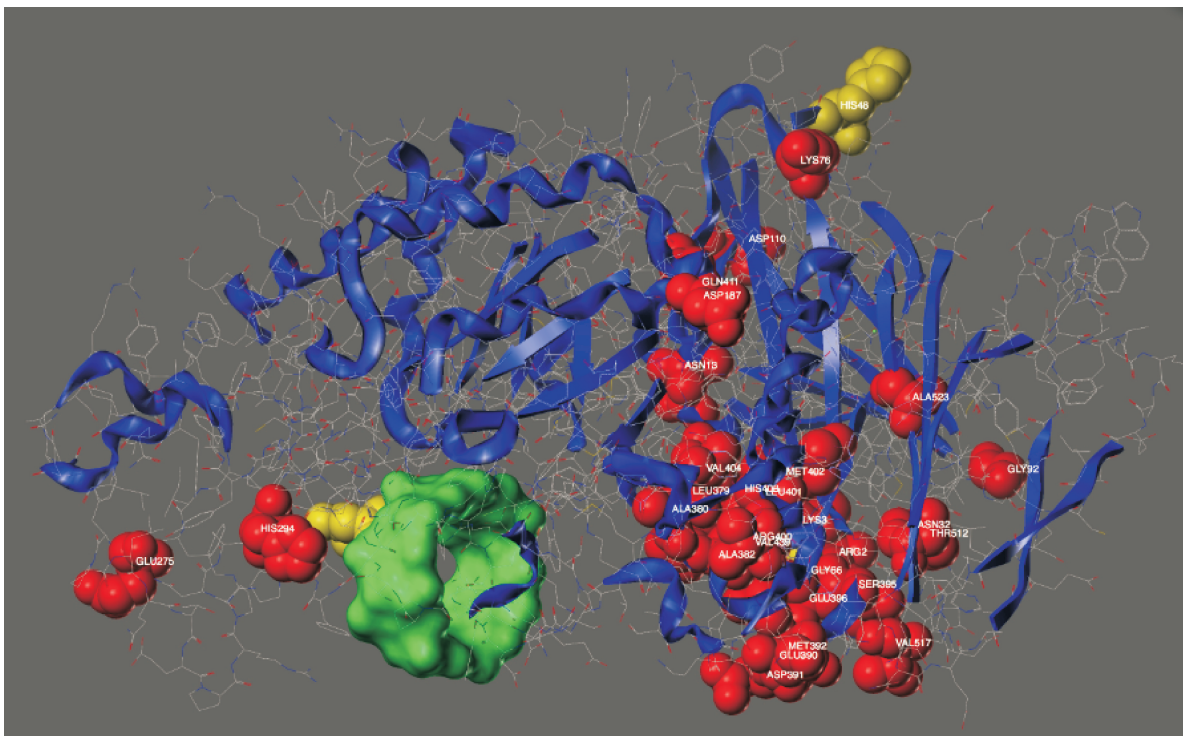


图 1 cds1-3 蛋白质结构模拟分析

Fig. 1 Structure simulation analysis of protein cds1-3

的结合和功能影响可通过对 3 个氨基酸位点进行突变研究来确定。cds1-3 蛋白序列中的 Glu66、Pro48、Phe289 这 3 个氨基酸对应 ThMA 蛋白序列的 Gly66、His48、Ala289 氨基酸。为找到决定 cds1-3 功能差异的关键氨基酸,选择 Glu66、Pro48、Phe289 为突变位点,构建突变体 E66G、P48H、F289A。通过研究突变后突变酶的底物特异性变化,缩小 cds1-3 的功能差异关键氨基酸的选择范围,为后续进一步选点突变研究提供参考。

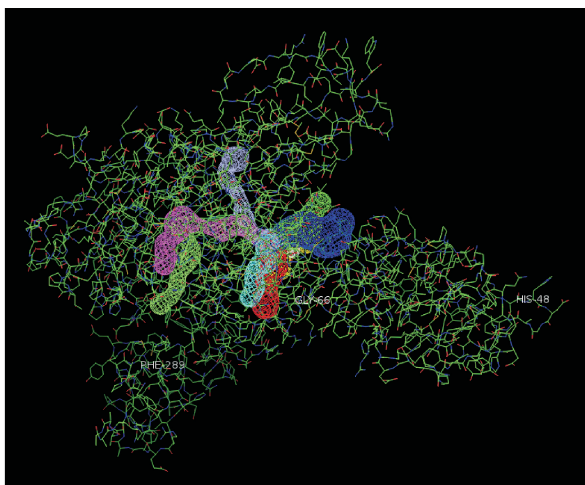


图 2 cds1-3 酶的底物通道模拟

Fig. 2 Substrate channel simulation of cds1-3 enzyme

1.2.2 定点突变

利用 PCR 等技术向模板 DNA 片段导入所需变化的定点突变,是常用的体外诱变技术。本研究采用核苷酸引物介导的定点突变方法对环糊精水解酶 cds1-3 进行定点突变,此方法关键在于引物设计的合理与否。定点突变引物设计要遵循一定的原则和注意事项^[9]。本实验的引物设计如表 1 所示。

表 1 支链淀粉酶定点突变引物

Table 1 Primers of site-directed mutagenesis of debranching enzyme

Primer	Sequences
3P48H-f	5'-CGAATGGC <u>AC</u> GATGGCGCCTGGCAGTTTG-3'
3P48H-r	5'-GCGCCATCGTGCATTTCGTACGGGTCGCC-3'
F289A-f	5'-CGACACAGCA <u>GC</u> GTTTCGTGCCGCAAATGCC-3'
F289A-r	5'-CACGAACGCTGCTGTGTCTGTAATTCGGGCGCGG-3'
E66G-f	5'-GAAGCGAC <u>GC</u> GCTTGTGTTGACTATTGGCTCGCCG-3'
E66G-r	5'-CAAACAAGCCGTCGCTTCCCGTTTCCGCATCGG-3'

PCR 体系参照 TaKaRa 的 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 的说明书。PCR 反应程序:98℃,

3 min;98℃ 10 s,55℃ 15 s,72℃ 6 min,30 个循环;72℃,10 min。

模板消化:PCR 结束后,每 20 μ L 扩增产物加 1 μ L Dpn I,混匀,37℃ 消化模板质粒 1 h。

取消化产物转化大肠杆菌 XL10-Gold,涂布氨苄抗性平板,过夜培养。挑取 6 株单菌落提取质粒,送华大基因公司进行测序。

1.3 突变酶的表达与纯化

所有突变体经测序验证为正确突变后,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,构建重组菌,分别命名为 E66G、P48H、F289A。重组菌经 IPTG 诱导表达,收集菌体经超声破胞离心后定性测定上清中的酶活力,有酶活的上清继续用镍柱亲和层析法除去大部分的杂蛋白。然后用 HiTrap Desalting 预装柱脱盐(洗脱 buffer 为 50 mmol/L pH 值 6.5 的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液)、置换缓冲液,超滤管浓缩。最后再用 HiTrap Q FF 阴离子交换柱进行纯化、浓缩,得到纯酶(平衡液:50 mmol/L pH 值 6.5 的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液,洗脱液:含 1 mol/L NaCl 的 50 mmol/L pH 值 6.5 的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液)。

1.4 酶活力的测定

酶活力测定:往 EP 管中加入 500 μ L 底物(底物用 100 mmol/L pH 值 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解),加入适当浓度的酶液 10 μ L,混匀,置于 50℃ 水浴锅中反应 30 min,然后立即加入 1 mL DNS,沸水浴 5 min;反应结束后冷却到室温,并测定 OD₅₄₀,进而计算出酶反应所产还原糖的量。

酶活定义:在反应条件下,每分钟支链淀粉酶水解底物产生的 1 μ mol 还原糖(用葡萄糖来计算)所需的酶量为一个酶活单位。

1.5 突变酶与原始酶的底物特异性比较

分别以 α -环糊精、普鲁兰糖、可溶性淀粉、木薯淀粉和支链淀粉作为底物,测定突变酶与 cds1-3 对不同底物的降解效果,比较分析突变酶与 cds1-3 的底物特异性差异。

1.6 协同作用比较

将地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶分别与 cds1-3、突变酶按酶活 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的比例混匀,加入用 500 μ L 100 mmol/L pH 值 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制的 1% 底物(α -环糊精、普鲁兰糖、可溶性淀粉、支链淀粉、木薯淀粉),50℃ 反应 1 h,用 DNS 测定还原糖含量计算协同率。

2 结果与分析

2.1 突变酶的构建、表达与纯化

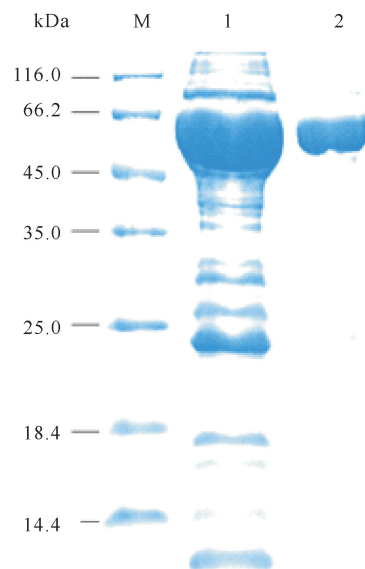
定点突变构建得到突变体 E66G、P48H、F289A, 重组菌经过诱导表达, 菌体经超声破胞离心后定性测定上清中的酶活力, 发现只有突变体 E66G 有酶活。突变体 E66G 经诱导表达、纯化后得到纯酶。由 SDS-PAGE 电泳分析图(图 3)可知, 经镍柱亲和层析、脱盐浓缩及阴离子交换后获得突变酶 E66G 的纯酶, 为单一蛋白质条带, 大小约为 65 kDa, 与原始酶 cds1-3 大小一致。

由表 2 可知, 粗酶液经镍柱亲和层析, 突变酶比活力由 16.07 U/mg 提高到 83.68 U/mg, 纯化倍数为 5.21 倍, 回收率为 51%。经 HiTrap Q FF 阴离子交换纯化, 得到重组酶的比活力达到 111.85 U/mg, 纯化倍数为 6.96。纯化后的突变酶 E66G 比活力是原始酶 cds1-3 纯酶的 98.2%, 在 95% 的可信度范围内认为两者比活力没有区别。

2.2 突变酶与原始酶的底物特异性比较

以降解 α -环糊精的酶活力为 100%, 将突变酶 E66G 和原始酶 cds1-3 的底物特异性进行列表比较, 并以 cds1-3 的相对酶活力为参照计算 E66G 的相对酶活增长率(表 3)。由表 3 可知: E66G 和 cds1-3 对不同底物降解能力相差较大。降解能力大小排序依次为 α -环糊精 > 可溶性淀粉 > 普鲁兰糖 \approx 支链淀粉 \approx 木薯淀粉。突变酶 E66G 降解可溶性淀粉和小

分子底物普鲁兰糖的能力下降, 对大分子底物木薯淀粉和支链淀粉的降解能力有所提高。其中, 对木薯淀粉的增长率为 26.96%, 对支链淀粉的增长率为 23.15%。



M: 标准蛋白 Marker; 1: 镍柱纯化后的 E66G; 2: 离子交换后超滤浓缩的 E66G

M: Normalized protein Marker; 1: The purified enzyme E66G by Ni-chelating affinity chromatography; 2: The concentration of mutational enzyme E66G after IEC

图 3 突变酶 E66G 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 The SDS-PAGE electrophoresis analysis of mutational enzyme E66G

Table 2 Parameters of purification steps of mutational enzyme E66G

纯化步骤 Purification step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total enzyme activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery rate (%)
初始粗酶液 Crude enzyme	52.93	850.62	16.07	1.00	100.00
镍柱纯化 Nickel purification	5.19	433.86	83.68	5.21	51.00
阴离子交换 Anion exchange	0.84	94.29	111.85	6.96	11.08

2.3 协同作用

协同率为两个酶协同作用时所产的还原糖与单酶反应时所产还原糖含量的比值。由表 4 可知, 与地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶协同作用降解小分子底物时, 突变酶 E66G 跟原始酶 cds1-3 协同率都小于 1, 而且

协同率相近, 表明原始酶和突变酶在水解小分子底物时结果相似。但对于大分子底物, 尤其是支链淀粉, 其产生的协同率明显大于 1, 且与原始酶 cds1-3 协同作用结果相比而言, 也有较明显的增加, 表明突变酶 E66G 对大分子底物的作用能力比原始酶高。

表 3 突变酶 E66G 和 cds1-3 的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of cds1-3 and mutational enzyme E66G

底物 Substrate	cds1-3 相对酶活力 cds1-3 relative enzyme activity (%)	E66G 相对酶活力 E66G relative enzyme activity (%)	相对酶活力增长率 Growth rate of relative enzyme activity (E66G - cds1-3)/cds1-3
α -环糊精 α -cyclodextrin	100	100	—
普鲁兰糖 Pullulan	8.78	7.63	-13.09
木薯淀粉 Cassava starch	6.22	7.90	26.96%
可溶性淀粉 Soluble starch	28.8	26.28	-8.74%
支链淀粉 Amylopectin	6.9	8.49	23.15%

表 4 cds1-3、E66G 与地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶协同作用的结果Table 4 The synergistic results of cds1-3 and E66G with *Bacillus licheniformis* α -amylase

底物 Substrate	cds1-3 与 α -淀粉酶协同率 Collaborative rate of cds1-3 and α -amylase					E66G 与 α -淀粉酶协同率 Collaborative rate of E66G and α -amylase				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
α -环糊精 α -cyclodextrin	0.78	0.76	0.69	0.82	0.64	0.66	0.77	0.80	0.73	0.73
普鲁兰糖 Pullulan	0.61	0.72	0.73	0.76	0.64	0.66	0.80	0.80	0.76	0.71
可溶性淀粉 Soluble starch	0.77	0.95	1.03	1.05	0.99	0.88	1.05	0.99	0.97	0.94
木薯淀粉 Cassava starch	1.06	1.07	0.99	1.06	1.01	0.98	1.19	1.15	1.09	1.06
支链淀粉 Amylopectin	1.17	1.27	1.19	1.14	1.15	1.50	1.51	1.24	1.17	1.16

酶蛋白活力的维持不仅与氨基酸的空间位阻、氨基酸的性质相关,还与氨基酸相互作用折叠形成的蛋白质空间结构有密切的关系。突变体 F289A 的突变位点靠近酶活性中心的底物结合区域,其没有酶活力的原因可能是氨基酸相互作用折叠形成的蛋白质空间结构改变,从而使酶活力丧失。对于突变体 P48H,该突变体的突变位点位于远离底物结合区域的底物通道区域上,第 48 位氨基酸由最初的疏水 Pro 突变成亲水 His,两个疏水性完全相反的氨基酸的替换,可能造成突变位点的氨基酸与附近氨基酸相互作用的范德华力的改变,使得蛋白质构型发生改变。

环糊精水解酶、麦芽糖淀粉酶和新普鲁兰酶这些具有环糊精降解能力的酶在氨基酸上具有 40%~60% 的序列同源性,在酶结构上同样具有相似性^[10]。

3 讨论

突变酶 E66G 对大分子底物支链淀粉的水解能力有所提高,其可能原因是因为突变后氨基酸侧链空间位阻变小,但关键位点的空间构型几乎没有变化。由于第 66 位氨基酸由原来的谷氨酸(Glu, E)突变成甘氨酸(Gly, G),前者的侧链为—CH₂—CH₂—COOH,后者侧链为一个—H,远比 Glu 侧链小,因此突变后氨基酸侧链的空间位阻比突变前小,所以突变酶 E66G 对大分子底物支链淀粉的水解能力有所提高。但由于 R 基为—H,甘氨酸的性质介于极性和非极性之间,故由亲水的谷氨酸突变为甘氨酸,66 位氨基酸的特性并没有太大的改变,所以 cds1-3 的构型几乎也没有变化。

它们在 N 端有一段延伸序列是典型的 α -淀粉酶不具有的。这段延伸序列被认为是参与酶的二聚体形成、影响酶底物的选择关键肽段^[1,11-12]。所以,cds1-3 和 ThMA 在 N 端的氨基酸序列差异,造成两个酶底物特异性上差异的可能性更高。E66G 突变酶在酶比活力上与野生酶一致,但是在底物特异性上发生了变化,其对小分子的普鲁兰糖水解能力降低,对大分子的木薯淀粉和支链淀粉水解能力增强。这一结果表明 N 端序列确实参与酶的底物选择。cds1-3 和 ThMA 在 N 端的序列上共有 9 个氨基酸差异,对这 9 个氨基酸差异位点的突变研究将有助于对环糊精水解酶的蛋白质改造,提高支链淀粉的水解效率。同时有助于我们解析决定支链淀粉酶底物专一性的相关氨基酸,开拓新的支链淀粉水解酶及其应用。

4 结论

本研究在氨基酸序列比对、蛋白质同源建模及蛋白质结构模拟分析的基础上, 选定突变位点, 成功构建得到3个突变体: E66G、P48H、F289A。通过定性测定破胞上清酶液发现, 只有突变体 E66G 有酶活。对 E66G 进行诱导表达纯化, 得到纯化的突变酶 E66G。比较分析突变酶 E66G 与原始酶 cds1-3 的底物特异性, 以及与地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶协同作用的协同率。结果表明, 与原始酶 cds1-3 相比, 突变酶 E66G 对大分子底物木薯淀粉和支链淀粉的降解能力有所提高。其中, 对木薯淀粉降解的增长率为 26.96%, 对支链淀粉降解的增长率为 23.15%。

E66G 突变酶的鉴定为揭示大分子底物, 特别是支链淀粉底物的水解作用方式提供了一个新的切入点。实验结果为进一步研究 cds1-3 中与底物专一性相关的氨基酸打下基础, 有助于环糊精水解酶的蛋白质改造, 从而提高支链淀粉的水解效率。

参考文献

- [1] LEE H S, KIM M S, CHOS H S, et al. Cyclomalto-dextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(24): 21891-21897.
- [2] LEE M H, KIM Y W, KIM T J, et al. A novel amylolytic enzyme from *Thermotoga maritima*, resembling cyclodextrinase and α -glucosidase, that liberates glucose from the reducing end of the substrates [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2002, 295(4): 818-825.
- [3] SONG H N, JUNG T Y, PARK J T, et al. Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX [J]. Proteins, 2010, 78(8): 1847-1855.
- [4] CHOI J H, LEE H, KIM Y W, et al. Characterization of a novel debranching enzyme from *Nostoc punctiforme* possessing a high specificity for long branched chains [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 378(2): 224-229.
- [5] KAULPIBOON J, PONGSAWASDI P. Purification and characterization of cyclodextrinase from *Paenibacillus* sp. A11 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(2/3): 168-175.
- [6] 莫莉, 韦廷宗, 闭海, 等. 支链淀粉水解酶水解支链淀粉的特异氨基酸分析[J]. 广西科学, 2015, 22(1): 31-36.
- [7] OH S W, JANG M U, JEONG C K, et al. Modulation of hydrolysis and transglycosylation activity of *Thermus* maltogenic amylase by combinatorial saturation mutagenesis [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(8): 1401-1407.
- [8] FERNANDEZ-FUENTES N, MADRID-ALISTE C J, RAI B K, et al. M4T: A comparative protein structure modeling server [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (web server): W363-W368.
- [9] ZHENG L, BAUMANN U, REYMOND J L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(14): e115.
- [10] NAKAGAWA Y, SABURI W, TAKADA M, et al. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel γ -cyclodextrin-specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2008, 1784(12): 2004-2011.
- [11] HONDOH H, KURIKI T, MATSUURA Y. Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 326(1): 177-188.
- [12] KIM J S, CHA S S, KIM H J, et al. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(37): 26279-26286.

Site-directed Mutagenesis of Amino Acid in the Substrate of Cyclodextrin Hydrolase *cds1-3*

TANG Hongchi¹, MO Li², BI Hai², LIN Lihua¹, GUO Yuan¹, PANG Hao^{1,2}

(1. National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Key Laboratory of Bio-refinery, Guangxi Bio-science and Technology Research Center, Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

Abstract: By analyzing the protein structure of the cyclodextrin hydrolase *cds1-3* with macromolecular hydrolysis ability, the substrate-related amino acids were selected for site-directed mutagenesis. By comparing the functional differences between the mutant enzyme and the wild enzyme, the amino acids that determine the specific function of *cds1-3* were located. Protein substrate binding analysis was performed using sybyl 1.2. The amino acids Glu66, Pro48, and Phe289 related to multimer formation, substrate binding, and substrate channel were selected as mutation sites. The pSE380/*E66G*, pSE380/*P48H*, pSE380/*F289A* expression plasmids were constructed by reverse PCR and expressed. Enzyme-activated mutants were obtained and compared with the original enzyme for substrate specificity analysis. The relative enzyme activities of the mutant enzyme *E66G* degrading macromolecular substrates such as tapioca starch and amylopectin were increased by 26.96% and 23.15%, respectively, while the hydrolysis ability of the small molecule substrate pullulan was decreased by 13.14%. Therefore, *cds1-3* is a special cyclodextrin hydrolase capable of hydrolyzing macromolecular substrates, and amino acid Glu66 is one of the key amino acids of *cds1-3* hydrolyzed macromolecular amylopectin.

Key words: cyclodextrin hydrolase, homology modeling, substrate channel, site-directed mutation, protein structure, amino acid

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>