

环糊精葡萄糖基转移酶钙离子结合位点结构与功能分析*

班宵逢¹⁾ 李才明¹⁾ 鲍春辉¹⁾ 顾正彪^{1, 2)} 李兆丰^{1, 2)**}

(¹⁾江南大学食品学院, 无锡 214122; (²⁾江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要 通过多重序列比对和晶体结构分析发现, 钙离子结合位点 Ca I 和 Ca II 普遍存在于环糊精葡萄糖基转移酶(CGT 酶)中, 且两个位点处氨基酸残基具有较高的保守性, 而钙离子结合位点 Ca III 仅存在于少数 CGT 酶中. 此外, 研究发现, 钙离子结合位点可能与 CGT 酶的环化活力、热稳定性和产物特异性密切相关.

关键词 环糊精葡萄糖基转移酶, 钙离子结合位点, 结构, 功能

学科分类号 Q814, Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00031

作为 α -淀粉酶家族的成员, 环糊精葡萄糖基转移酶(CGT 酶, EC 2.4.1.19)不仅具有与 α -淀粉酶相同的水解活性, 还能催化三种不同的转糖基反应(歧化、偶合和环化)^[1]. 环化反应是 CGT 酶的特征反应, 能将淀粉转化成由 D-吡喃型葡萄糖单元通过 α -(1-4)-糖苷键连接而成的环糊精, 其中, α -、 β -和 γ -环糊精最为常见^[2-3]. 由于 CGT 酶作用淀粉所合成的产物为多种环糊精的混合物, 因此, 根据生成环糊精的主要类型即产物特异性不同, CGT 酶可主要分为 α -、 β -和 γ -型. 随着环糊精在食品、医药、化工等领域的应用越来越广^[4-5], 生产环糊精所必需的 CGT 酶已成为当今研究的热点.

钙离子结合位点广泛存在于 α -淀粉酶家族中. 目前, 已有大量关于 α -淀粉酶钙离子结合位点的研究, 发现钙离子结合位点处氨基酸残基与 α -淀粉酶的催化活力、热稳定性等密切相关^[6-8]. 对于 CGT 酶来说, 关于其钙离子结合位点的研究相对较少. 不过, 已有的研究显示, CGT 酶钙离子结合位点处氨基酸残基突变也能明显影响其活力^[9-11], 证明钙离子结合位点同样对 CGT 酶有重要作用. 本文主要对 CGT 酶钙离子结合位点的结构

和功能进行分析, 为进一步揭示钙离子结合位点在 CGT 酶中的生物学意义提供思路 and 方向.

1 实验方法

1.1 序列来源

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 ExPASy 数据库 (SIB Bioinformatics Resource Portal, http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html)获取来源不同、产物特异性不同的 CGT 酶和具有代表性的 α -淀粉酶蛋白序列, 见表 1. 除非特定说明 CGT 酶的来源, 文中氨基酸序号一般以 *Bacillus circulans* 251 CGT 酶中氨基酸残基顺序为基准.

* 国家自然科学基金 (31101228), 江苏省自然科学基金 (BK2011152), 霍英东教育基金会高等院校青年教师基金 (131069) 和“十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD34B07) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85329237, E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-01-19, 接受日期: 2013-04-01

Table 1 Varied sources of CGTase and α -amylase

Type	Bacterial source	SWISS-MODEL Repository
α -CGTase	<i>Paenibacillus macerans</i>	P04830
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P08704
α/β -CGTase	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> EM1	P26827
	<i>Bacillus licheniformis</i>	P31797
β/α -CGTase	<i>Bacillus circulans</i> 8	P30920
	<i>Bacillus</i> sp. 6.6.3	P31747
β -CGTase	<i>Bacillus circulans</i> 251	P43379
	<i>Bacillus</i> sp. B1018	P17692
β/γ -CGTase	<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. N 1.1	P31746
	<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	O30565
γ -CGTase	<i>Bacillus clarkii</i> 7364	Q8L3E0
	<i>Alkalophilic B. sp.</i> G-825-6	Q25CB6
α -Amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	P06278
	<i>Bacillus subtilis</i> 168	P00691

1.2 序列和晶体结构分析

使用 ClustalX 1.83 软件将 CGT 酶和 α 淀粉酶的相应钙离子结合位点处氨基酸进行多重序列比对, 其中 Gap Opening 设置参数为 15, Gap Extension 设置参数为 6.66, Delay divergent sequence 设置参数为 30, DNA transition Weight 设置参数为 0.5.

利用 SWISS-MODEL 和 Chimera 1.6.1 软件对野生型 CGT 酶及其突变体的晶体结构进行在线模拟分析.

1.3 CGT 酶突变体的构建

定点突变方法采用质粒一步 PCR 法^[12]. 以来源于 *P. macerans* 的 CGT 酶基因为模板, 设计一对互补引物, 采用一步 PCR 法突变相应位点(表 2). PCR 反应体系依照 TaKaRa 公司 STAR Primer 试剂盒说明书进行. 反应条件为: 10×Ex Taq buffer (Mg²⁺ Plus) 10 μ l, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μ l, 正向引物(10 μ mol/L) 1 μ l, 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l, Ex Taq HS(5U/ μ l) 0.5 μ l,

加入双蒸水 32.5 μ l. PCR 扩增条件为: 98℃ 预变性 4 min; 以 98℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 8 min 条件进行 35 个循环; 最后 72℃ 保温 10 min.

将所得的 PCR 产物经 *Dpn* I 处理 2 h 后转化到 *E. coli* JM 109 中, 并涂布到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基中, 在 37℃ 恒温箱中过夜培养 12 h, 从中挑选出单菌落接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 培养过夜, 并按照质粒提取试剂盒说明书要求提取质粒鉴定测序. 将突变质粒通过化学转化法转入表达宿主 *E. coli* BL(DE 3)中.

1.4 野生型 CGT 酶及突变体的生产

将转化好的表达宿主接入装有 50 ml LB 培养基的 250 ml 三角瓶中, 37℃、200 r/min 培养 8 h. 以 4%的接种量接种到装有 50 ml TB 培养基的 250 ml 三角瓶中, 25℃、200 r/min 培养 36 h.

各培养基使用前均加入 100 mg/L 氨苄青霉素.

1.5 CGT 酶环化活力的测定

取适当稀释的 CGT 酶液 0.1 ml, 加入装有 0.9 ml 预先用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)配制的 1%(w/v)可溶性淀粉溶液的试管中, 在 50℃ 下反应 10 min.

加入 1.0 ml 1.0 mol/L 的盐酸和 1.0 ml 用 50 mmol/L 磷酸缓冲液配制的 0.1 mmol/L 甲基橙溶液, 室温下保温 15 min, 在 505 nm 下测定吸

Table 2 Mutant primers used for site directed mutagenesis

Primer	Sequence from 5' to 3' (Forward)
Asp315→Ala	5'G TCG CAA TAC <u>GCC</u> TAC ATC AAC 3'
Asp29→Arg	5' C TTC GCG GAC GGG <u>CGC</u> AGG ACG AAC AAT C 3'
Asp29→Asn	5' C TTC GCG GAC GGG <u>AAC</u> AGG ACG AAC AAT C 3'

Underlined sequences present introduction of mutants.

光度, 对应 α 环糊精标准曲线计算出 α 环糊精含量; 加入 3.5 ml 30 mmol/L NaOH 和 0.5 ml 由 5 mmol/L Na_2CO_3 溶液配制的 0.02%(w/v) 酚酞, 室温下保温 15 min, 在 550 nm 下测定吸光度, 对应 β 环糊精标准曲线计算出 β 环糊精含量; 加入 50 μl 1.0 mol/L 的盐酸停止反应, 随后加入 2 ml 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.2) 和 100 μl 5 mmol/L 溴甲酚绿 (BCG) 溶液, 室温下保温 15 min, 在 615 nm 下测定吸光度, 对应 γ -环糊精标准曲线计算出 γ 环糊精含量. 一个酶活单位定义为在上述条件下每分钟生成 1 μmol 环糊精所需的酶量^[13-16].

1.6 野生型 CGT 酶及突变体热稳定测定

将野生型 CGT 酶及突变体在 60℃ 下保温, 间隔一定时间取样并迅速冷却至 0℃, 测定残余环化活力, 以未保温时的酶活力为 100%.

1.7 CGT 酶蛋白浓度测定

蛋白质浓度测定采用上海生工生物工程有限公司 Modified Bradford Protein Assay Kit 改良型 Bradford 蛋白质浓度测定试剂盒(产品编号 SK3041)所示方法进行. 使用牛血清蛋白作为标准品, 牛血清蛋白购于 Sigma-Aldrich(上海)公司.

1.8 CGT 酶的产物特异性分析

为了分析钙离子对 CGT 酶环化反应的影响, 以 5% 的麦芽糊精(DE 3)为底物, 反应体系中加入不同浓度的钙离子, 并添加终浓度为 1 U/ml 的野生 CGT 酶或突变体, 置于 37℃、200 r/min 摇床中反应 12 h, 煮沸灭酶 10 min, 加入 10 μl 糖化酶 (100 U/ml) 糖化 30 min, 煮沸灭酶 10 min. 将待测样品 10 000 r/min 离心并取上清液, 0.45 μm 超滤膜过滤后经高效液相色谱法(HPLC)测定.

HPLC 测定条件为: Waters 600 高效液相色谱仪(配示差折光检测器), 色谱柱 Lichrosorb NH_2 (4.6 mm $\times$ 150 mm), 流动相采用 68% 的乙腈水溶液, 柱温为 30℃, 流速为 1 ml/min.

2 结果与讨论

2.1 钙离子结合位点 Ca I 结构分析

CGT 酶第 27~34 位氨基酸序列中有 4 个氨基酸残基与钙离子结合, 第 49~55 位氨基酸序列中有 2 个氨基酸残基与钙离子结合, 这 6 个氨基酸残基共同组成钙离子结合位点 Ca I, 依次标记为 Asp27、Asn29 或 Asp29、Asn32、Asn33、Gly51 和 Asp53. 通过多重序列比对可以发现(表 3), 氨

基酸残基 Asp27、Asn32、Asn33、Gly51 和 Asp53 在 CGT 酶中具有较高的保守性, 而 29 位氨基酸残基在不同来源的 CGT 酶中呈现出一定特异性: 在主产 α 环糊精的 α -CGT 酶和主产 γ 环糊精的 γ -CGT 酶中均为天冬氨酸(D), 在其他类型 CGT 酶中则为天冬酰胺(N). 另外, CGT 酶钙离子结合位点 Ca I 处的氨基酸残基与 α 淀粉酶中所对应的氨基酸残基有明显差异.

Table 3 Alignment of amino acid sequences at calcium binding site Ca I of CGTases and α -amylases

Type	SWISS-MODEL Repository	(27~34)aa	(49~55)aa
α -CGTase	P04830	DGDP TNNP	YFGGDWQ
	P08704	DGDNS NNP	YTGGDWQ
α/β -CGTase	P26827	DGNTS NNP	YFGGDWQ
	P31797	DGNTS NNP	YCGGDWQ
β/α -CGTase	P30920	DGNPS NNP	YCGGDWQ
	P31747	DGNPS NNP	YCGGDWQ
β -CGTase	P43379	DGNP ANNP	YCGGDWQ
	P17692	DGNP ANNP	YCGGDWQ
β/γ -CGTase	P31746	DGNP GNNP	YCGGDWQ
	O30565	DGNP ANNP	YCGGDWQ
γ -CGTase	Q8L3E0	DGDP DNNP	YCGGDWQ
	Q25CB6	DGDP TNNP	YCGGDWQ
α -Amylase	P06278	L---PHSAA	NDGQHWK
	P00691	G---PAAAS	TLKH-----

Amino acid residues in bold represents calcium ion binding sites, -, means deletion or misalignment of corresponding amino acids of α -amylase.

CGT 酶钙离子结合位点 Ca I 处氨基酸以天冬氨酸(D)和天冬酰胺(N)为主, 这可能是由于天冬氨酸带有负电性, 易于与带正电荷的钙离子产生静电相互作用; 而天冬酰胺具有相对较强的极性, 使得钙离子易于与天冬酰胺中的羰基氧发生相互作用而结合在酶蛋白上. 另外, 通过晶体结构模拟分析发现(图 1), CGT 酶钙离子结合位点 Ca I 处氨基酸残基侧链较短、亲水性较强, 这些残基与其附近残基形成扭曲的 U 型结构, 钙离子被包裹于 U 型结构中央, 从而起到稳定钙离子的作用.

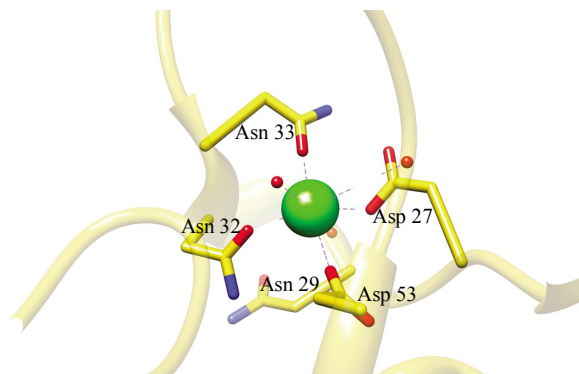


Fig. 1 Models about calcium binding site Ca I of CGTase from *B. circulans*

Big ball represents calcium ion, small balls represent water molecules around calcium ion.

2.2 钙离子结合位点 Ca II 结构分析

CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 大部分由 4 个氨基酸残基组成，分别为第 139、190、199 和 233 位氨基酸残基，这些氨基酸残基通过离子键、氢键、范德华力等与钙离子结合。通过多重序列比对发现，CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 处氨基酸残基具有一定的保守性(表 4)：第 139 位氨基酸残基均为天冬酰胺(N)，第 233 位氨基酸残基均为组氨酸(H)；第 199 位氨基酸残基在 γ -CGT 酶中为丝氨酸(S)，在其他类型 CGT 酶中为天冬氨酸(D)；除来源于 *Klebsiella pneumoniae* 的 α -CGT 酶外，其余 CGT 酶第 190 位氨基酸残基均为异亮氨酸(I)。另外，CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 处氨基酸残基与 α 淀粉酶中所对应的氨基酸残基有明显相似性，推测该钙离子结合位点在 α 淀粉酶家族中可能普遍存在。

Table 4 Alignment of amino acid sequences at calcium binding site Ca II of CGTases and α -amylases

Type	SWISS-MODEL Repository	137~141	188~192	197~201	231~235
α -CGTase	P04830	AP N HT	DGIYK	LADIN	V K HMP
	P08704	AP N HS	QVKNH	LSDLN	IK H MD
α/β -CGTase	P26827	AP N HT	DGIYR	LADLN	V K HMP
	P31797	AP N HT	DGIYR	LADLN	V K HMP
β/α -CGTase	P30920	AP N HT	NGIYK	LADFN	V K HMP
	P31747	AP N HT	NGIYK	LADFN	V K HIA
β -CGTase	P43379	AP N HT	NGIYK	LADLN	V K HMP
	P17692	AP N HT	NGIYK	LADLN	V K HMP
β/γ -CGTase	P31746	TP N HS	DSIYR	LADYD	V K HMS
	O30565	TP N HS	DSIYR	LADYD	V K HMS
γ -CGTase	Q8L3E0	VP N HT	NSIYR	LASLN	VA H MP
	Q25CB6	VP N HT	DGIYR	LASLN	VA H MP
α -Amylase	P06278	VI N HK	NGNYD	YADID	V K HIK
	P00691	VI N HT	----QN	LYDWN	AK H IE

Amino acid residues in bold represents calcium ion binding sites, -, means deletion or misalignment of corresponding amino acids of α -amylase.

通过晶体结构模拟分析发现(图 2)，CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 处氨基酸残基同样具有较强的亲水性且较短的侧链，可能有利于钙离子的结合。CGT 酶表面存在一个底物结合和催化活性中心，

底物糖苷键的断裂和连接均发生在该中心^[13, 17]。钙离子结合位点 Ca II 位于这个活性中心，因此，该位点处氨基酸残基可能对 CGT 酶的活性至关重要。

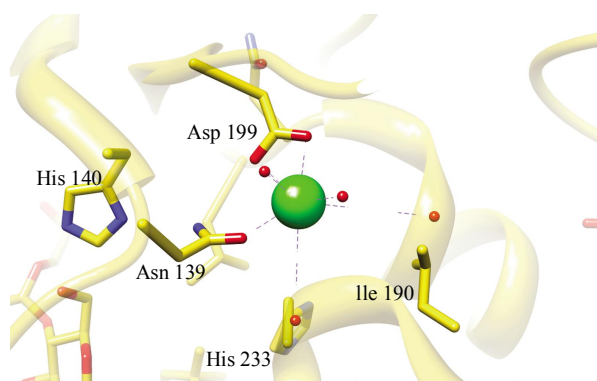


Fig. 2 Models about calcium binding site Ca II of CGTase from *B. circulans*

Big ball represents calcium ion, small balls represent water molecules around calcium ion.

2.3 钙离子结合位点 Ca III 结构分析

钙离子结合位点 Ca III 仅存在于少数 CGT 酶中。其中, 来源于 *B. circulans* 的 CGT 酶最具代表性, 该位点由 Ala315 和 Asp577 两个氨基酸残基组成(图 3)。另外, 该钙离子结合位点在 CGT 酶和 α 淀粉酶中呈现显著差异。来源于 *B. licheniformis* 的 α 淀粉酶虽然存在该位点, 但由 Asp407、Asp430 和 Gly300 三个氨基酸残基组成, 而来源于 *Bacillus subtilis* 168 的 α -淀粉酶则不存在该位点。钙离子结合位点 Ca III 存在与否可能与酶蛋白结合钙离子的能力有一定关系。

2.4 CGT 酶钙离子结合位点功能分析

2.4.1 钙离子结合位点与 CGT 酶的环化活力。

目前, 已有研究显示 α 淀粉酶钙离子结合位

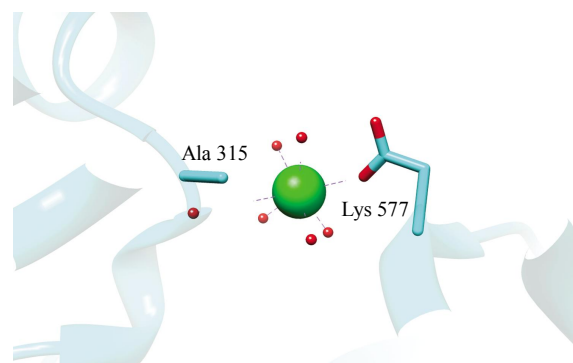


Fig. 3 Models about calcium binding site Ca III of CGTase from *B. circulans*

Big ball represents calcium ion, small balls represent water molecules around calcium ion.

点与其水解活力有一定关联^[6-7]。对于 CGT 酶而言, 先前的一些研究报道显示钙离子结合位点处氨基酸残基的突变在一定程度上影响 CGT 酶的活力。如, 来源于 *Bacillus sp.* G1 的 CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 处氨基酸残基 N132R(对应 *B. circulans* CGT 酶的第 139 位)突变使其环化活力大幅下降, 而钙离子结合位点 Ca I 处相应氨基酸残基 N28R(对应 *B.circulans* CGT 酶的第 29 位)突变使其 β 环化活力上升 66.2%^[18]。这表明钙离子结合位点影响 CGT 酶环化活力。

本研究将 *P. macerans* CGT 酶钙离子结合位点 Ca I 处氨基酸残基 Asp29 突变为天冬酰胺(N)和精氨酸(R), 结果显示, D29N 和 D29R 突变均使 α 环化活力下降, 而 β 环化活力分别上升 23%和 35%(表 5)。进一步表明钙离子结合位点处氨基酸残基与 CGT 酶的环化活力密切相关。

Table 5 Cyclization activities of the wild type and mutant CGTases from *P. macerans*

Mutant (protein)	α -Cyclization (U/mg)	β -Cyclization (U/mg)	γ -Cyclization (U/mg)	Total (U/mg)
Wild type	184.2	33.1	5.4	222.7
D29N	167.2	40.6	5.9	213.7
D29R	158.7	44.7	7.9	211.3

Each value represents the means of three independent measurements.

2.4.2 钙离子结合位点与 CGT 酶的热稳定性。

钙离子结合位点不仅影响 CGT 酶的催化活力, 还影响其热稳定性。Goh 等^[18]研究发现, 来源于

Bacillus sp. G1 的 CGT 酶钙离子结合位点 Ca II 处 N132R 突变能显著提高其热稳定性。

本研究将 *P. macerans* CGT 酶钙离子结合位点

Ca I 处 Asp29 和 Ca III 处 Asp315 进行突变, 结果显示, 突变体 D29R 和 D315A 在 60℃ 下的半衰期均有明显提高. 在 60℃ 保温 30 min 后, 野生型 CGT 酶残余环化活力约为 1.3%, 而突变体 D29R 和 D315A 剩余环化活力分别约为 14.2% 和 12.3%

(图 4). 这说明 CGT 酶钙离子结合位点处氨基酸残基能影响酶的热稳定性. 其机理可能是: 钙离子结合位点处氨基酸残基突变增强了其与钙离子及附近氨基酸残基的相互作用, 有助于钙离子结合位点的稳定性, 从而提高酶的耐热性.

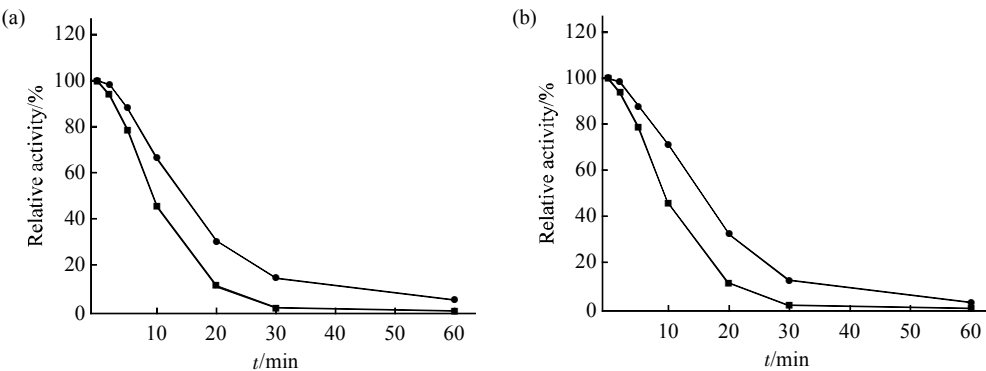


Fig. 4 The thermostability of wild type and mutants CGTase from *P. macerans*

(a) ■—■: Wild type; ●—●: D29R. (b) ■—■: Wild type; ●—●: D315A.

2.4.3 钙离子结合位点与 CGT 酶的产物特异性.

将 CGT 酶钙离子结合位点 Ca III 处第 315 位天冬氨酸(D)突变为丙氨酸(A), 突变体生成大元环糊精的能力增强, 相比于野生型 CGT 酶, D315A 突变的 β 和 γ 环化活力分别上升 31.3% 和 285.7%

(表 6), 进一步考察当反应进行到 9 h 后野生型 CGT 酶及突变体生产环糊精的情况, 相比于野生型 CGT 酶, 突变体 D315A 终产物中 β 和 γ 环糊精占总产物的比例上升 28.5%(图 5). 证明钙离子结合位点与 CGT 酶产物特异性具有相关性.

Table 6 Cyclization activities of the wild type and mutant CGTases from *P. macerans*

Mutant (protein)	α -Cyclization (U/mg)	β -Cyclization (U/mg)	γ -Cyclization (U/mg)	Total (U/mg)
Wild type	187.7	33.6	0.7	222.0
D315A	164.3	44.1	2.7	211.1

Each value represents the means of three independent measurements.

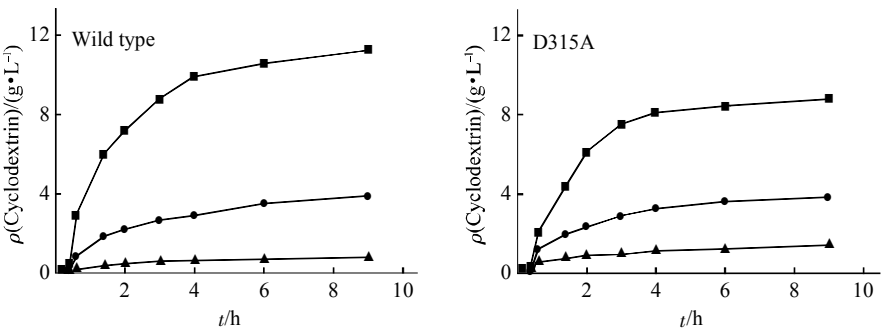


Fig. 5 Production of cyclodextrins by wild type and mutant CGTase enzymes from *P. macerans*

■: α -cyclodextrin; ●: β -cyclodextrin; ▲: γ -cyclodextrin.

通过在反应体系中加入钙离子, 分析其对 *P. macerans* CGT 酶环化产物的影响。结果显示, 随着钙离子浓度的增加, α 环糊精占总环化产物的比例上升, 而 β 环糊精占总环化产物的比例明显下降(图 6)。相比于未添加钙离子的对照组, 当钙离子浓度达到 60 mmol/L 时, α 环糊精占总环化产物的比例上升了 76.1%, 而 β 环糊精的比例下降了 79.5%。这说明钙离子能够改变 CGT 酶环化产物的比例, 进一步证明钙离子结合位点与 CGT 酶产物特异性相关。

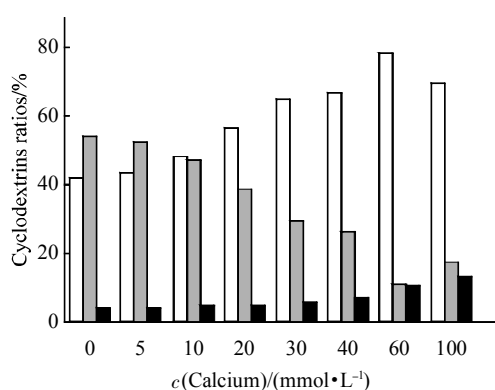


Fig. 6 The effect of calcium ion on cycling products of CGTase from *P. macerans*

□: α -cyclization; ■: β -cyclization; ■: γ -cyclization.

3 结 论

通过多重序列比对和晶体结构分析发现, 钙离子结合位点 Ca I 和 Ca II 在 CGT 酶中普遍存在, 且氨基酸残基具有较高的保守性, 而 Ca III 仅存在于少数 CGT 酶中。钙离子结合位点可能与 CGT 酶的环化活力、热稳定性和产物特异性密切相关, 因此, 有必要对其结构与功能进行更加深入的分析。

参 考 文 献

- [1] Kelly R M, Dijkhuizen L, Leemhuis H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Appl Microbiol Biotech*, 2009, **84**(1): 119-133
- [2] Li Z F, Wang M, Wang F, *et al.* gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotech*, 2007, **77**(2): 245-255
- [3] 吴 敬, 顾正彪, 陈 坚, 等. 糊精葡萄糖基转移酶的制备与应用. 北京: 化学工业出版社, 2011: 3-12
Wu J, Gu Z B, Chen J, *et al.* Preparation and Application of Cyclodextrin Glycosyltransferase. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 3-12
- [4] Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 2007, **329**(1-2): 1-11
- [5] Leemhuis H, Kelly R M, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotech*, 2010, **85**(4): 823-835
- [6] Priyadharshini R, Gunasekaran P. Site-directed mutagenesis of the calcium-binding site of alpha-amylase of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 2007, **29**(10): 1493-1499
- [7] Liu Y, Shen W, Shi G Y, *et al.* Role of the calcium-binding residues Asp231, Asp233, and Asp438 in alpha-amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* as revealed by mutational analysis. *Curr Microbiol*, 2010, **60**(3): 162-166
- [8] Igarashi K, Hatada Y, Ikawa K, *et al.* Improved thermostability of a *Bacillus* alpha-amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **248**(2): 372-377
- [9] Ishii N, Haga K, Yamane K, *et al.* Crystal structure of asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011 determined at 1.9 Å resolution. *J Molecular Recognition: JMR*, 2000, **13**(1): 35-43
- [10] Kelly R M, Leemhuis H, Rozeboom H J, *et al.* Elimination of competing hydrolysis and coupling side reactions of a cyclodextrin glucanotransferase by directed evolution. *Biochem J*, 2008, **413**(3): 517-525
- [11] Van Der Veen B A, Leemhuis H, Kralj S, *et al.* Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(48): 44557-44562
- [12] Li Z F, Zhang J Y, Wang M, *et al.* Mutations at subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* enhancing alpha-cyclodextrin specificity. *Appl Microbiol Biotech*, 2009, **83**(3): 483-490
- [13] Leemhuis H, Uitdehaag J C, Rozeboom H J, *et al.* The remote substrate binding subsite -6 in cyclodextrin-glycosyltransferase controls the transferase activity of the enzyme *via* an induced-fit mechanism. *J Biol Chem*, 2002, **277**(2): 1113-1119
- [14] Szerman N, Schroh I, Rossi A L, *et al.* Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technol*, 2007, **98**(15): 2886-2891
- [15] Kelly R M, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Conversion of a cyclodextrin glucanotransferase into an alpha-amylase: assessment of directed evolution strategies. *Biochemistry*, 2007, **46** (39): 11216-11222
- [16] Leemhuis H, Dijkstra B W, Dijkhuizen L. Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from a transglycosylase into a starch hydrolase. *FEBS Letters*, 2002, **514**(2-3): 189-192
- [17] Leemhuis H, Rozeboom H J, 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**(24): 7518-7526
- [18] Goh P H, Illias R M, Goh K M. Rational mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability. *Int J Mol Sci*, 2012, **13**(5): 5307-5323

Structure and Function Analysis of Calcium Binding Sites in Cyclodextrin Glucanotransferase*

BAN Xiao-Feng¹⁾, LI Cai-Ming¹⁾, BAO Chun-Hui¹⁾, GU Zheng-Biao^{1,2)}, LI Zhao-Feng^{1,2)**}

¹⁾ School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²⁾ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is an extracellular enzyme capable of producing cyclodextrins through an intramolecular transglycosylation reaction. With the application of cyclodextrins expanding in the industries related to food, pharmaceuticals, cosmetic, *etc*, CGTase has become the focus of scientific research nowadays. Calcium binding sites widely exist in α -amylase family. Previous studies indicated that these sites had very important roles for α -amylase. It was known that CGTases also possess two or three calcium binding sites. However, their structure and function are not very clear. In the present study, structure and function of calcium binding sites in CGTases were analyzed. Sequence comparisons were performed using the ClustalX 1.8 sequence alignment program. Based on the results and crystal structure analysis, it was found that calcium binding sites Ca I and Ca II exist commonly in CGTase. Most amino acids at these two calcium binding sites are highly conserved, but the residue 29 at Ca I and residue 199 at Ca II have significant differences between different types of CGTases. The residue 29 in α -CGTase primarily producing α -cyclodextrin or γ -CGTase primarily producing γ -cyclodextrin is Asp, while others are Asn. The residue 199 in γ -CGTase is Ser, while others are Asp. Calcium binding site Ca III only exists in few CGTases. The site consists of residues 315 and 577. In addition, site-directed mutagenesis was used to investigate the functions of calcium binding sites in CGTases. The replacement of Asp29 by Asn and Arg resulted in 23% and 35% increase in β -cyclization activity, respectively. Mutant D29R and D315A showed higher stability than wild-type CGTase at 60°C. Moreover, the mutant D315A had higher β - and γ -cyclodextrin specificity. These results suggested that calcium binding sites might be related to cyclization activity, thermal stability, and product specificity of CGTases, which provided the directions for further revealing biological functions of calcium binding sites of CGTases.

Key words cyclodextrin glucanotransferase, calcium binding sites, structure, function

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00031

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31101228), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011152), Fok Ying-Tong Education Foundation for Young Teachers in the Higher Education Institutions of China (131069) and the Twelfth Five-Year National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD34B07).

**Corresponding author.

Tel: 86-510-85329237, E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

Received: January 19, 2013 Accepted: April 1, 2013