

第一章 文献综述

1.1 环糊精的介绍

1.1.1 环糊精的结构

环糊精(cyclodextrin, CD)是由 D-吡喃葡萄糖基以 $\alpha-1,4$ -糖苷键连接而成的环状低聚糖,因其聚合度的不同,D-吡喃葡萄糖基数目分别为 6、7、8,依次被称为 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)、 γ -环糊精(γ -CD),三种环糊精的结构如图 1-1 所示。对环糊精的研究始于 1871 年,Villers 等人对环糊精进行了分离;直到 1901 年,Schardinger 等人才对环糊精重要的理化性质进行描述。环糊精具有环状中空圆筒形这一独特的立体结构,科学家采用 X 射线衍射和核磁共振也验证了这一结构,如图 1-2 所示。在这个略呈锥形的环状中空圆筒形结构内部,每一个 D-吡喃葡萄糖基 C3 和 C5 上的 H 原子以及连接葡萄糖基的 O 原子的非极性使圆筒内部具有疏水性;而葡萄糖基 2 位、3 位的仲醇的亲水性—OH 以及 6 位的伯醇的亲水性—OH 分布在圆筒结构的外围,使其具有亲水性,因此环糊精具有非极性空穴和外亲水的特点。这一结构特点使得环糊精能够包埋大小与其相适应的客体分子(有机、无机分子),起到保护、提高溶解度、改变结合分子的物化性状等作用,常被用作分子胶囊和乳化剂,广泛应用于食品、医药、化妆品、农药等领域。

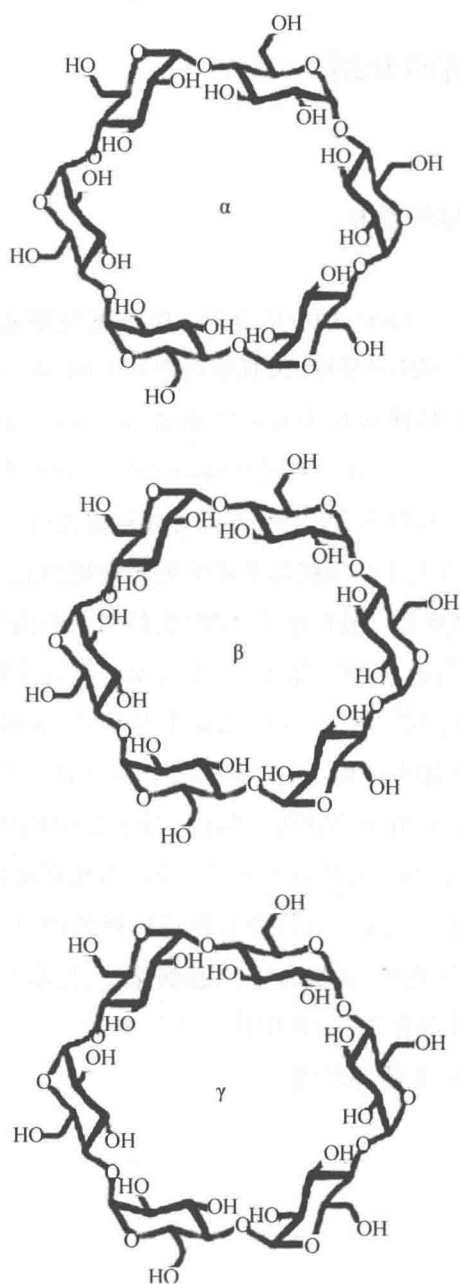


图 1-1 环糊精的结构

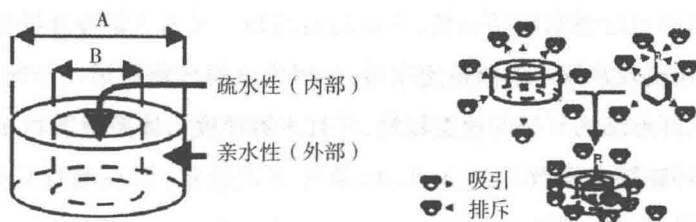


图 1-2 环糊精的立体结构及复合物的形成

1.1.2 环糊精的性质

α 、 β 、 γ 三种环糊精的物理性质极其相似,它们均为白色结晶粉末,而且没有特定的熔点,当温度升高到 200 $^{\circ}\text{C}$ 时,三种环糊精均开始分解。虽然三种环糊精的结构非常相似,但三者在水溶解度及孔穴大小上却有明显的差别,见表 1-1,总体来说环糊精的溶解度是随着温度的升高而增大的。三种环糊精中尤以 β -环糊精的水溶解度最低,易于在水溶液中结晶,便于提纯操作。

表 1-1 环糊精的部分物理常数

环糊精 种类	葡萄糖 单元数	相对分 子质量	室温水溶解度/ $[\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}]$	$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	孔穴 直径/ $\text{\AA}$	外圆周 直径/ $\text{\AA}$
α -CD	6	972	14.5	150 ± 0.5	4.70 ~ 5.30	150 ± 0.4
β -CD	7	1135	1.85	162.5 ± 0.5	6.00 ~ 6.50	150 ± 0.4
γ -CD	8	1297	23.2	177.4 ± 0.5	7.50 ~ 8.30	150 ± 0.5

环糊精的化学性质(包括化学反应和酶反应的性质)与直链糊精有着明显的差别,即:环糊精不具有还原端和非还原端,只能够被 α -淀粉酶水解, β -淀粉酶对其没有任何作用;而对于直链糊精,不仅 α -淀粉酶可将其水解, β -淀粉酶也能够将其水解。除 α -淀粉酶以

外,无机酸也能够水解环糊精,生成葡萄糖和一系列直链麦芽低聚糖,其水解速度较水解直链糊精速度慢,是因为水解环糊精第一个葡萄糖苷键时,环形结构开裂的速度较慢,并且水解速度与体系温度和 pH 值有关。环糊精在碱性 ($\text{pH} > 7.0$) 条件下很稳定,但在酸性 ($\text{pH} < 7.0$) 条件下易被裂解。

1.1.3 环糊精的应用

基于环糊精的非极性空穴和外亲水的结构特点,它常被用作包埋剂,可以包接多种适当大小的疏水性物质并形成包合物,从而改变客体分子的水溶性、稳定性、挥发性和流变学特性等,进而修饰其化学反应特性。此外,环糊精还可以稳定光敏或易氧化的物质、固定易挥发性物质、改善被包接物质的溶解度、保护客体分子不被微生物降解以及掩蔽难闻气味。但是由于三种环糊精所含 D-吡喃葡萄糖基数目不同,圆筒孔穴直径和深度不同,因此不同的环糊精可以包接不同大小的化合物并具有不同的用途。

目前,环糊精已被广泛应用于食品、医药、化妆品、化学工业、农业等领域。三种环糊精在各工业领域中的应用比例大致为:食品工业 80%、医药 10%、农药 5% ~ 10%。其中使用最多的是 β -环糊精,占三种环糊精总量的 90% 以上,分食品级和医药级。在食品工业中可以作为食品添加剂稳定食品,防止其中的某些成分挥发、氧化或是被光和氧分解;可以去除食品中的异臭味和苦涩味,在肉制品加工和蛋糕加工中添加环糊精可以起到品质改良的作用;作为乳化剂添加到人造奶油、黄油中,不但可以起到稳定的作用,还可以降低这些制品中的胆固醇含量。在制药中,可以作为药物分子的包埋剂,使药物不被光照、氧化及恶劣环境破坏,增加药物的稳定性;同时可用于药物的控释和缓释;可降低药物的刺激性,促进药物的吸收;可掩盖苦味和异臭味。在化学工业中可用作纸张表面整理材料;在黏合剂和生物降解塑料中

作为淀粉替代品。

实际生产应用中,环糊精的广泛应用,使其成为淀粉深加工的一个新的经济增长点,具有较大的社会经济效益。而 β -环糊精是产量最大、应用最多的一类,其单一组成纯品应用价值更高。据统计,环糊精在1998年全球消耗量为6000吨,价值1亿美元;2002年环糊精消耗价值达2.5亿美元,当时主要是法国、德国以及日本生产的,那个时期国产环糊精产量低,纯度低,价格较高;2003年以来,混合环糊精的产销主要分布在日本、美国、欧洲等地, β -环糊精的世界总产销量达到5000吨左右,中国仅占全球总产销量的十分之一。随着科学技术的进步,环糊精应用领域必将不断拓展,环糊精的世界产销量将会有更大的增长空间。目前国际市场上环糊精的产销量已突破10万吨,仅药品制备一项需求就达数千吨。日本是环糊精产销量较大的国家,在环糊精生产与应用研究方面位于世界领先地位,年消耗量达3000吨以上。而中国生产环糊精的企业较少,成本高,产品品种单一,年产量不足1万吨,纯度低,因此发展环糊精的生产具有重要的生产实践意义。

1.1.4 环糊精的生产

目前关于环糊精生产方法的相关报道有很多,大多为酶法生产,而化学合成法与酶法相比,较为复杂且产量低,不易提纯。催化淀粉使其发生环化反应生成环糊精的酶是葡萄糖基转移酶(CGTase),目前这类酶可以从多种微生物中分离得到,大多数为芽孢杆菌,这些微生物大致有五类:第一类是好氧、嗜温微生物,如浸麻芽孢杆菌(*Bacillus macerans*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和微球菌(*Micrococcu ssp.*)等;第二类是好氧、嗜热微生物,如嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilis*)等;第三类是厌氧、嗜热微生物,如热产硫黄热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*)等;第

四类是好氧、嗜碱微生物,如环状芽孢杆菌(*B. circulans*)和嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilic*)等;第五类是好氧、嗜盐微生物,如嗜盐杆菌(*Bacillus halophilus*)等。除此以外,少数还有假单胞菌(*pseudomonas spp.*)及类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)等等。目前,常用于工业化生产的菌种只有嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌及浸麻芽孢杆菌少数几种。用于酶法生产环糊精的酶为环糊精葡萄糖转移酶,生产工艺主要有以下几个阶段:菌种选育;CGTase 制备(酶的分离、纯化、浓缩);CGTase 作用于淀粉;环糊精的分离、纯化与结晶。工艺流程图如图 1-3 所示。迄今为止报道的菌株极少有产生单一环糊精的 CGTase,尤其是产生单一的 α -环糊精和 γ -环糊精的更少。绝大多数 CGTase 作用于淀粉后的产物均为 α 、 β 、 γ 三种环糊精的混合物,混合物中 β -环糊精占绝大多数。

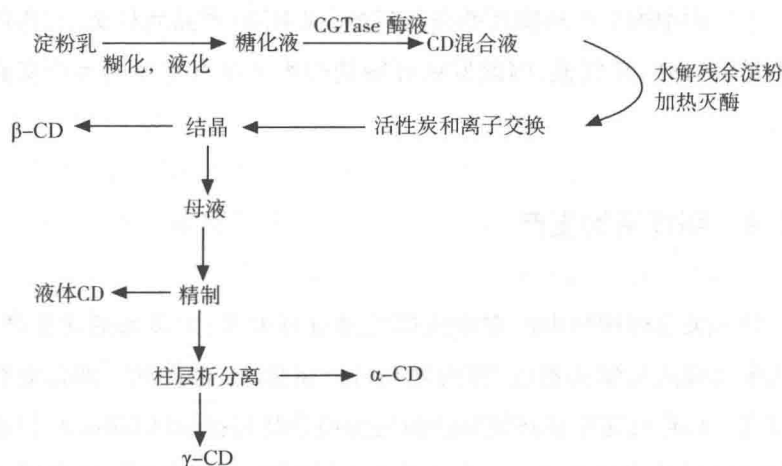


图 1-3 环糊精的酶法生产工艺流程图

1.2 酶的体外进化及定点突变技术

1.2.1 酶的体外进化理论依据

由生物体内活细胞产生的酶是一大类生物催化剂,其化学本质是蛋白质,少数为 RNA,因此酶也被称为生物催化剂(Biocatalyst)。迄今为止,在生物界中已发现和定性的酶有 3000 多种,根据其催化特性,可分为六大类,分别是:氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和连接酶。天然酶在长期的自然进化选择中具有非常理想的生物学功能,而且酶所具有的催化高效性、专一性也使其应用越来越普遍。随着科学技术的发展,人们在使用酶时发现了许多不尽如人意的地方,例如:在体外复杂化学体系中,酶除表现出一些人们所期望的特征外,还表现出一些在反应发生过程中人们不期望的性质,如抑制产物的生成、分解反应物等,同时在反应体系中需要有长时间保持稳定活性的酶存在;在某些极端反应条件下,酶要保持稳定的活性;在同一反应体系中,同一酶可以与不同底物相互作用;等等。综上所述,这些制约都会影响到酶催化的有效性和精确性,不能满足工业化生产要求,因此在分子水平上对天然酶进行基因工程改造是近年来基因工程、酶工程领域所面临的一项十分重要的任务。

从 20 世纪中期开始,生物在自然界中长达几年、十几年甚至上百年的进化实现了在试管内较短时间的模拟和再现。在试管中,以核酸为模板,加入各种聚合酶和四种核苷三磷酸,在适宜的条件下,体系就具备完成达尔文进化的必备因素:遗传、繁殖、突变及选择。酶的体外改造就是利用这一体系,模拟达尔文进化的突变、重组及选择,在体外对酶进行基因工程改造,并按照预期设计选择所需性质的突变酶。因此,可以说体外改造是特定的基因或蛋白质在分子水平上的繁育。

众所周知, Taq DNA 聚合酶不具有 $3' \rightarrow 5'$ 校对功能, 酶体外进化正是利用这一性质, 采用基因工程手段, 在适宜的条件下, 将待进化的酶基因随机引入突变, 而且突变率要保持在一个较低水平。根据定向的选择方法, 筛选出具有所需性质的突变体。按照定向进化方法的不同, 酶的体外定向进化可以分为两大类: 理性设计 (rational design) 和非理性设计 (irrational design)。理性设计适用于已确定蛋白质三维结构及其功能性质的酶, 通过分析酶的结构与功能, 找出在一级结构上合理的氨基酸位点进行改造, 并采用基因工程技术手段来获得具有理想性质的酶, 常用的方法有化学修饰和定点突变 (site-directed mutagenesis)。而非理性设计是针对目标基因结构、表达蛋白质的三维结构及功能不是很透彻的一类酶, 通过模拟自然进化机制与改进的诱变技术相结合, 从而根据所需进化的方向来选择进化方法, 由于这类定向进化的方法不需要事先了解蛋白质的空间结构, 因此这种方法的应用更为广泛。常用的非理性设计有定向进化 (directed evolution)、杂合进化 (hybrid evolution) 等。综上所述, 酶的体外进化是将随机突变与筛选相结合由此引发的进化, 可以人为地控制其选择某一方向的进化, 而排除其他方向的突变。酶的体外定向进化主要有两个目的: 一是人为地改变 (增强或减弱) 天然生物催化剂的某些性质, 二是创造出新的活性, 产生新的催化能力, 从而扩大生物催化剂的使用范围。

1.2.2 定点突变技术

定点突变技术是在 PCR 技术基础上, 通过对酶的蛋白三维结构分析选择理想改造位点设计引物的, 在基因扩增的过程中, 通过改变 DNA 上的碱基组成和顺序来达到改造酶的氨基酸序列组成的目的。定点突变可以改变基因序列中特定的核苷酸, 也可以随机改变酶功能区域的基因序列, 从而产生一系列突变蛋白分子。改变某个已知基因的特定碱基或使其缺失或在其中插入其他碱基均可以改变其对应的

氨基酸序列,从而导致蛋白质结构发生变化。对突变基因的表达产物的研究,为我们进一步研究蛋白质结构和功能的关系奠定了基础。随着基因工程在蛋白质工程中的深入应用,体外定点突变技术在研究蛋白质结构与功能之间的复杂关系中占据着非常重要的位置,同时也是在实验室中改造、优化基因时必备的技术手段之一。其应用范围非常广泛,常用于研究蛋白质相互作用位点的结构特征、酶活性的改造或者酶动力学反应特性、基因启动子或者调控元件的改造、提高蛋白质的某些特性(如抗原性、稳定性、活性等)、蛋白质的三维晶体结构、医药研发、基因治疗等方面。

1.2.2.1 定点突变的方法

目前,比较成熟的定点突变方法主要有三种:寡核苷酸引物介导的定点突变、PCR 介导的定点突变以及盒式突变。

1. 寡核苷酸引物介导的定点突变

随着寡聚脱氧核糖核苷酸固相化学合成法的深入研究,人们采用含有突变碱基的寡核苷酸片段作为突变的引物,引发单链 DNA 分子进行复制,由此产生具有突变碱基序列的新 DNA 链。这种突变方法具有保真度高的优点,可以大大提高突变成功率,已成为研究基因结构与功能关系的最精确、最有力的手段之一。为了提高突变的准确性,使目的基因的特定位置点发生突变,在设计寡核苷酸引物时要求其序列除了所需的突变碱基外,其余的都应该与目的基因编码的特定区段完全互补。此外,还需要将目的基因插入到单链噬菌体 DNA 载体中方可 PCR 扩增,如图 1-4 所示。因此,这种突变方法操作过程复杂,而且在克隆待突变基因时必须考虑到限制性酶切位点的影响。

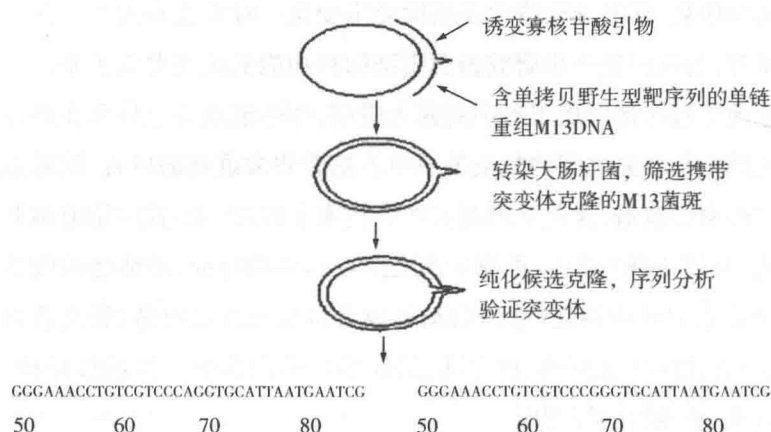


图 1-4 寡核苷酸引物介导的定点突变

2. PCR 介导的定点突变

该法是目前使用最为普遍的突变方法。PCR 介导的定点突变可以在 DNA 片段的任意位置上进行特异性的原位替代、碱基缺失和插入碱基,而且它还可以将几个无关的序列准确地连接起来。这种突变方法操作比较简单,突变的成功率可达 100%。但是该法后续工作较复杂,PCR 扩增产物需要连接到载体分子上,之后才能转录、翻译突变基因进行后续的研究;此外 Taq DNA 聚合酶的保真性偏低,因此 PCR 扩增得到的 DNA 片段要通过测定核苷酸序列来确证 DNA 片段中是否有发生突变。

3. 盒式突变

这种突变形式主要是从野生型基因中消除小片段 DNA,或是 DNA 小片段被带有一点或多点突变的合成 DNA 片段所替代,因此这种突变能在靶区域内引入一个或多个氨基酸。这种盒式突变的引物由两条寡核苷酸组成,在 PCR 退火时,会在 DNA 片段的两端产生克隆需要的黏性末端。由于不存在异源双链的中间体,盒式突变可以使重

质粒经过一次 PCR 即被全部突变。与前两种突变相比,盒式突变除了具有简便、易操作、突变效率高等优点外,还可以在—对限制性酶切位点内—次突变多个位点;其缺点是需要合成多条引物,成本较高。此外,—般情况下靶区域 DNA 片段的两侧很难产生—对限制性酶切位点,这就限制了该突变方法的应用范围,然而—旦满足了这样的条件,该突变方法必将成为定点突变的首选方法。

1.2.2.2 PCR 介导的定点突变的常用方法

目前应用较为普遍的体外定点突变就是比较经典的 PCR 介导的定点突变方法,该法采用 PCR 技术,置换 DNA 片段上特定部位的碱基或插入某(几)个或消除某(几)个特定碱基。常用的几种 PCR 介导的定点突变方法有如下几种。

1. 重叠延伸 PCR(overlap extension PCR, OE-PCR)法

重叠延伸 PCR 法是 Horton 等人在 1989 年建立的一种 PCR 扩增方法,它通过寡聚核苷酸链之间相互重叠的部分搭桥,互为模板,通过多次 PCR 扩增,从而获得目的 DNA 基因片段。重叠延伸 PCR 法可以准确、高效地扩增 DNA 片段,尤其在—进定点突变时可以提高突变效率,并且不受突变位置及突变类型的限制,具体步骤如图 1-5 所示。

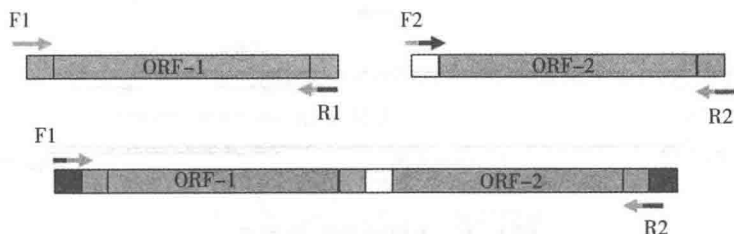


图 1-5 重叠延伸 PCR 法原理

F1 和 R2 与原模板完全匹配, F2 和 R1 是引入的突变位点, 并且具有 12 个以上相匹配的互补碱基。以 ORF 为模板, 用引物 F1 和 R1、F2 和 R2 分别扩增得到 ORF - 1 和 ORF - 2, 再以 ORF - 1 和 ORF - 2 混合物为模板, 用引物 F1 和 R2 扩增得到突变的基因序列。本书考虑到突变碱基的位置及片段的大小, 根据定点突变的原理, 采用重叠延伸 PCR 技术进行 PCR 介导的突变。

2. 大引物 PCR 法

将 OE - PCR 法进一步改进就是目前常用的大引物 PCR。这种突变方法需要三个扩增引物, 需要两轮 PCR 反应, 中间产物无须纯化即可进行下一步反应。如图 1 - 6 所示, 这种突变方法首先需要设置一个在引物 P1 和 P2 之间扩增的 PCR 反应, 其中引物 P1 是含有突变碱基的突变引物, 这轮 PCR 的产物是一个含有突变基因的 DNA 片段 P12; 然后再以 P12 作为第二轮 PCR 的其中一个引物与引物 P3、原模板进行 PCR 反应, 其产物即是含有突变基因的完整 DNA 片段。在这个突变过程中, 所使用的引物 P12 是一个 DNA 片段, 它与通常的引物相比要大很多, 含有上百个碱基, 因此引物 P12 被称为大引物 (mega-pri-mer), 而这种突变方法被命名为大引物 PCR 法。后来, 许多学者又对该法进行了改进, 使得纯化及未纯化的大引物都能在野生型模板的引导下得到延伸, 目的在于提高突变效率, 简化操作。

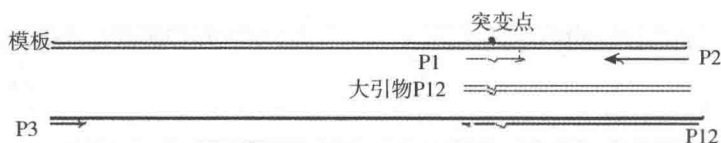


图 1 - 6 大引物 PCR 法原理

3. 全质粒的突变方法

该方法是根据 QuikChange 定点突变试剂盒(美国 Stratagene 公司)经过改进得到的一种突变方法。先把待突变的基因克隆、连接到一个克隆载体上,使其形成一个环状质粒,然后设计一对含突变的引物,用其对整个环状质粒进行 PCR 扩增,这样可以产生含有预期的突变位点的双链质粒,但这个双链质粒中有两个 nick 位点。待突变的质粒通常来源于 *E. coli* 宿主菌等细菌,这些 *E. coli* 宿主菌大多是甲基化细菌,具有甲基化修饰细胞内一些特定的 DNA 碱基序列的功能,而在体外通过 PCR 扩增得到的质粒不会被甲基化,对甲基化酶 *Dpn* I 不敏感。这样用甲基化酶 *Dpn* I 处理,可以消化掉待突变的质粒模板,而使通过 PCR 扩增出来的含有突变位点的质粒被选择性地保留下来。把 *Dpn* I 处理过的产物转化细菌后,质粒中的两个 nick 位点可以被大肠杆菌自身修复系统自行环化,形成环状闭合质粒,得到的克隆就会含有预期的突变质粒了,如图 1-7 所示。这种突变方法的突变过程可以一步完成,原理及操作都比较简单,但需要指出的是这种突变方法对引物设计要求比较严格,要求引物中 GC 百分含量相对较低。

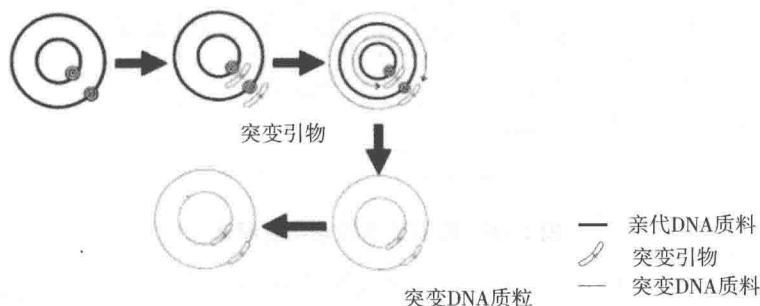


图 1-7 环状质粒 PCR 突变原理

4. 重组 PCR 定点突变

以 PCR 技术为基础的 DNA 重组和定点突变技术可以在 DNA 编码区段的任何部位引发定点突变。在 PCR 过程中,引物通过 PCR 结合到 PCR 产物上,因此可以通过设计引物来人为地控制扩增产物,对产物进行修饰。这种通过 PCR 和基因重组技术共同完成的定点突变叫作重组 PCR 定点突变。重组 PCR 定点突变是在大肠杆菌体内完成重组,并且生成突变菌株和重组子的。在突变过程中,PCR 在两个不同的 DNA 分子末端添加了一段同源性序列,这种同源性序列可以使两个不同的线性 PCR 产物在大肠杆菌中进行重组,形成一个环状的 DNA 融合分子,如图 1-8 所示。将构建在可选择质粒上的融合分子转化大肠杆菌,即可进一步从转化菌中筛选出突变菌株或重组子。

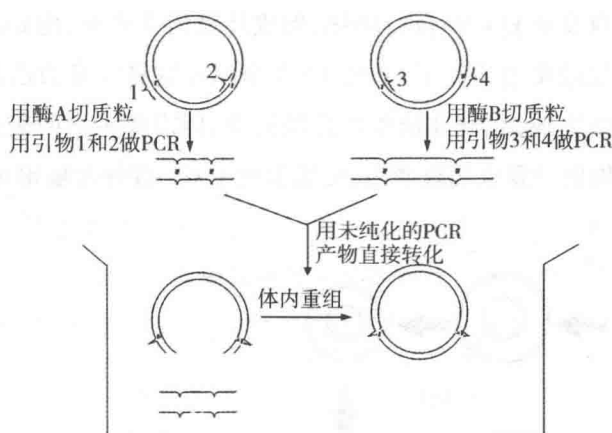


图 1-8 重组 PCR 定点突变原理

1.3 环糊精葡萄糖基转移酶研究进展

1.3.1 环糊精葡萄糖基转移酶简介

环糊精葡萄糖基转移酶是 α -淀粉酶家族中的重要成员之一,属于水解酶类,可以水解含有 α -1,4-葡萄糖苷键的直链葡聚糖,而且从基因序列上分析,CGTase 的 N 端与 α -淀粉酶具有极高的同源性。同时,CGTase 是由微生物发酵产生的胞外酶。

CGTase 是一种多功能型的酶,可以进行催化水解反应(hydrolysis)、环化反应(cyclization)、耦合反应(coupling)及歧化反应(disproportionation)。四种反应机理基本相同,只是受体分子不同,如图 1-9 所示。

(1)水解反应,CGTase 可以水解长链的葡萄糖聚合物,如淀粉、糖原、麦芽寡聚糖等,生成短链的麦芽寡聚糖。

(2)环化反应,CGTase 可以催化直链的葡萄糖聚合物,通过其两端的葡萄糖亚基形成 α -1,4-葡萄糖苷键而生成环糊精。反应从 α -1,4-葡聚糖的非还原末端开始,并受表面活性剂 SDS、Triton X-100 的影响,表面活性剂的疏水基团的大小直接影响反应生成产物 CD 的种类。这个反应是 CGTase 所特有的反应,是 CGTase 工业应用的基础。

(3)耦合反应,即 CGTases 催化环糊精的开环反应,是环化反应的逆反应。反应过程中,酶直接结合到打开的 CD 环的葡萄糖和麦芽糖等受体上,其中最有效的受体是二糖。在耦合反应中环糊精变成直链葡萄糖聚合物。

(4)歧化反应,CGTase 可以催化两个直链葡萄糖聚合物之间形成 α -1,4-葡萄糖苷键,与水解反应相耦联就形成了歧化反应,这个反