



## 链霉菌 GXT6 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质及葡萄糖耐受性分子改造

郑芳芳, 王金佩, 林宇, 王子龙, 韦宇拓, 黄日波, 杜丽琴\*

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

**摘要:**【目的】从经过全基因组测序的链霉菌 GXT6 中克隆、表达一个编码糖基水解酶家族 3 的新  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 研究重组酶的酶学性质并进行相关葡萄糖耐受性的氨基酸残基的分子改造, 提高其对葡萄糖的耐受性。【方法】根据链霉菌 GXT6 的全基因组测序结果, 对其中一个注释为糖基水解酶的基因设计引物, PCR 扩增目的基因, 以 pSE380 为表达载体构建重组质粒, 转化至大肠杆菌中诱导表达; 采用镍亲和层析技术纯化重组蛋白质, 对目的蛋白质进行酶学性质研究; 采用定点饱和突变的方法对重组酶进行相关氨基酸残基的分子改造。【结果】从链霉菌 GXT6 中克隆到一个编码糖基水解酶家族 3 的新  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 并在大肠杆菌中表达。酶学性质研究结果表明该  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度为 40 °C, 最适 pH 为 6.0,  $K_m$  值为(0.4712 $\pm$ 0.0180) mmol/L,  $V_{max}$  值为(128.000 $\pm$ 1.741)  $\mu$ mol/(min·mg), 葡萄糖抑制常数  $K_i$  值为(1.8880 $\pm$ 0.1307) mmol/L。该 BGL3-GXT6 能够水解黄豆苷、染料木苷、甜茶苷、虎杖苷、淫羊藿苷。还对 BGL3-GXT6 中与葡萄糖耐受性可能相关的氨基酸残基位点 81-Trp 和 233-Trp 进行了定点饱和突变, 获得了 25 个具有酶活的突变酶并对其进行酶学性质研究。其中 W233 位点饱和突变后获得的突变酶的  $K_m$  和葡萄糖抑制常数  $K_i$  值与重组酶 BGL3-GXT6 相比均发生明显变化, 葡萄糖耐受性有不同程度的提高, 最高的提高了 209 倍。【结论】本研究获得的 BGL3-GXT6 对天然底物甜茶苷、黄豆苷、染料木苷、虎杖苷和淫羊藿苷具有水解功能, 这些特性表明该  $\beta$ -葡萄糖苷酶在理论研究及在工业中有一定的应用价值。

**关键词:** 链霉菌 GXT6,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 酶学性质, 酶分子改造, 葡萄糖耐受性

$\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -D-glucosidase, EC 3.2.1.21), 又称  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷水解酶, 是从非还原端水解  $\beta$ -葡萄糖苷键并释放出  $\beta$ -D-葡萄糖和糖基配体

的一类酶。从广义意义上讲  $\beta$ -葡萄糖苷酶是催化葡萄糖基在氧亲核基团之间转移的一类酶<sup>[1]</sup>。

由于  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有使  $\beta$ -糖苷键断裂和合

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划自治区主席科技资金(17290-03); 国家自然科学基金(31360369)

\*通信作者。Tel: +86-771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

收稿日期: 2018-01-11; 修回日期: 2018-03-28; 网络出版日期: 2018-05-29

成的双重活性,这种作用使其在很多生物通路如细胞信号传导、生物合成、结构物质的降解、多糖物质的存储、宿主与病原菌之间的相互作用及其他生物技术方面具有重要作用<sup>[2]</sup>。例如, $\beta$ -葡萄糖苷酶在医药方面用于生产白藜芦醇和水解大豆异黄酮等糖苷类物质。白藜芦醇是一种非黄酮类多酚化合物<sup>[3]</sup>,具有抗菌<sup>[4]</sup>、抗氧化、防治心脑血管疾病、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等多种生物学活性。但从植物中直接提取的产量不足以满足市场需求,因此,研究安全有效的方法获取白藜芦醇是人们研究的热点。大豆异黄酮具有预防癌症<sup>[6]</sup>、降低心脑血管疾病风险<sup>[7]</sup>的功效。大豆异黄酮类有糖苷和苷元两种存在形式,其中以糖苷类占多数<sup>[8]</sup>。但糖苷类多难以被人体吸收,因此,选取合适的 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解得到苷元形式,提高其生物利用度,使其具有应用价值。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品和饮料中的应用:水果中<sup>[9]</sup>有数百种不同的糖苷键合态的香味前体物质,这些前体物质的酸解或是酶解可产生有天然香气的风味物质,且绝大部分天然糖苷能被 $\beta$ -葡萄糖苷酶作用,这些风味物质的释放可以增强其对饮料和食品的口感与质量<sup>[10]</sup>。如利用 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解青梅中的苦杏仁苷改善青梅的口味<sup>[11]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在依赖于酶合成反应中的应用: $\beta$ -葡萄糖苷酶合成反应可以用来合成低聚龙胆糖、烷基糖苷<sup>[12]</sup>和糖基复合物。这些糖苷类物质可用作治疗剂、诊断工具、益生菌的生长促进剂和表面活性剂<sup>[13]</sup>等。由于酶法合成具有反应条件温和、产物单一、易于分离等优点而逐渐被人们青睐。

$\beta$ -葡萄糖苷酶被划分到糖基水解酶 1、3、5、9、30、116 家族,目前报道较多的是 GH1 和 GH3 家族, GH1 家族的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受性普遍优于 GH3 家族,然而 GH3 家族 $\beta$ -葡萄糖

苷酶的高  $K_{cat}/K_m$  值是 GH1 家族无法相比的<sup>[14]</sup>。大部分的 GH3 家族的 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适温度一般较高,多数在 50–70 °C 之间,且热稳定性较好,这种特性对于工业生产非常有利。GH3 家族的很多 $\beta$ -葡萄糖苷酶底物特异性广泛,有的具有双功能。例如,来自大麦的 Exo I<sup>[15]</sup>,它具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性,同时又具有 $\beta$ -D-葡聚糖外切酶活性。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是纤维素酶系的重要组成成分,负责纤维素的彻底降解,在饲料、食品、能源、医疗等领域都有重要应用<sup>[16]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶是纤维素生物转化的关键,它能够将纤维素水解为葡萄糖,但葡萄糖的积累又可以通过阻断活性位点或阻止产物离开引起反馈抑制,从而降低纤维素生物转化的速率。为了促进 $\beta$ -葡萄糖苷酶的应用,通过分子改造来改变酶的特性,从而筛选出性状优良、高葡萄糖耐受性、便于工业利用的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是目前研究中常用方法。Liu 等<sup>[17]</sup>从海洋微生物宏基因组中分离得到一个 $\beta$ -葡萄糖苷酶通过与已知结构的 $\beta$ -葡萄糖苷酶进行比对选取 2 个点进行定点突变,得到突变酶 H184F 和 L409E,且 H184F 的葡萄糖耐受性最高,与野生型的相比  $K_i$  值提高了 5 倍。Seidle 等<sup>[18]</sup>研究发现黑曲霉 *Aspergillus niger* GH3 家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶的 Trp-262 是决定其水解活性与转糖基活性的关键氨基酸。利用定点突变的方法对 Trp-262 进行突变,替代氨基酸为苯丙氨酸 Phe、丙氨酸 Ala、亮氨酸 Leu 和半胱氨酸 Cys 的突变酶在纤维二糖和 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 pNPG 分别作为各自反应的糖基供体和受体时,与突变前相比,所获突变酶的反应产物多为转糖基产物。

本研究从链霉菌 GXT6 中克隆出一个新的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因,并在大肠杆菌中进行诱导表达,

研究重组酶的酶学性质。结合定点饱和突变的方法对  $\beta$ -葡萄糖苷酶进行分子改造, 希望能够获得具有高葡萄糖耐受性的  $\beta$ -葡萄糖苷酶突变体。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

链霉菌 *Streptomyces* sp. GXT6 由本实验室保藏并经过全基因组测序, 大肠杆菌 XL1-blue 购买自 TaKaRa 公司, 质粒购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 材料

本研究所使用的 DNA 聚合酶、DNA 连接酶、限制性内切酶等均购买自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒, 胶回收试剂盒均购买自 BioFlux 公司; Ni-NTA 填料购买自 QIAGEN 公司; 实验使用的 *p*NPG 等对硝基苯底物均购买自 Sigma 公司; 瑞鲍迪苷 A、甜菊双糖苷、甜菊醇、甜茶苷购买自四川成都维克奇生物科技有限公司; 黄豆苷、染料木苷、染料木素、宝藜苷 I 等购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 淫羊藿苷、朝藜定 A、朝藜定 B、朝藜定 C 均购买自上海源叶生物科技有限公司; 所使用的各种糖类及其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 链霉菌 GXT6 中 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的扩增

本实验室已经对链霉菌 GXT6 全基因组进行测序, 根据全基因的测序结果, 找到其中一个注释为糖基水解酶的基因, 对其所编码的蛋白质序列进行蛋白质组分析。根据分析结果, 设计引物 PCR 扩增  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bgl3*: 上游引物 *bgl3* F :5'-CACTCATGATGCACCACCACCA CCACACCGCGACCGAAGAAGACGCCG-3' (引入 *Pag* I 酶切位点和组氨酸标签), 下游引物 *bgl3*

R : 5'-CATAAGCTTTCAGCTCACCTGCCGACCG CTC-3' (引入 *Hind* III 酶切位点)。PCR 反应程序: 94 °C 2 min ;94 °C 1 min ,54.5 °C 30 s ,72 °C 150 s , 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物纯化并酶切处理后连接至经过限制酶(*Nco* I 和 *Hind* III)酶切处理的 pSE380 表达载体, 转化至大肠杆菌 XL1-blue 中经过测序。将成功构建的重组质粒命名为 pSE-*bgl3*。

### 1.4 重组酶 BGL3-GXT6 诱导表达和纯化

将重组菌株在 37 °C 条件下培养至  $OD_{600}$  约 0.4–0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在 37 °C 条件下继续培养 6–8 h。收集菌体, 超声破胞后收集上清经过镍亲和层析 Ni-NTA 纯化重组酶 BGL3-GXT6。对纯化得到的重组酶进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和酶谱分析(native-PAGE: 一部分用七叶苷-柠檬酸铁铵进行活性染色, 另一部分用考马斯亮蓝 R-250 染液进行染色)。

### 1.5 重组酶 BGL3-GXT6 的酶学性质研究

$\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力单位 U 定义: 在最适反应条件下, 每分钟催化 1  $\mu$ mol 底物 *p*NPG 转化为产物 *p*NP 所需要的酶量。

酶活测定方法: 70  $\mu$ L 的 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液和 20  $\mu$ L 的 20 mmol/L *p*NPG 在最适反应条件下预热 2 min, 加入适当稀释倍数的酶液, 反应 20 min, 加入 50  $\mu$ L 2 mol/L  $Na_2CO_3$  溶液终止酶反应, 混匀, 取 200  $\mu$ L 反应液加入酶标板中, 读取  $OD_{405}$  的读数。

#### 1.5.1 pH 和温度对重组酶 BGL3-GXT6 的影响:

在 37 °C 条件下, 测定重组酶 BGL3-GXT6 在不同 pH 条件下的酶活力, 确定其最适 pH。将纯酶分别在不同的 pH 3.5–8.0 环境中保存 12 h, 在

BGL3-GXT6 的最适酶反应条件下测定残余酶活力, 研究其 pH 稳定性。

在最适 pH 条件下, 测定重组酶在不同温度条件下的酶活力, 确定其最适温度。将纯酶分别在不同的温度 25–55 °C 条件下保温 1 h, 处理完立即拿出置于冰上, 在最适酶反应条件下测定 BGL3-GXT6 的残余酶活力, 研究其温度稳定性。

**1.5.2 BGL3-GXT6 的  $K_m$ 、 $V_{max}$  的测定:** 在最适酶反应条件下, 测定 BGL3-GXT6 在以不同浓度的 *p*NPG (0.1–4.0 mmol/L) 为底物时的酶活力, 每个浓度均有 3 个平行。

**1.5.3 BGL3-GXT6 的葡萄糖耐受性及葡萄糖抑制常数  $K_i$  值的测定:** 在最适酶反应条件下, 按照标准酶反应体系, 测定终浓度为 0–20 mmol/L 的葡萄糖对 BGL3-GXT6 酶活力的影响。

在最适酶反应条件下, 以一系列不同终浓度的 *p*NPG (0.1–4.0 mmol/L) 测定不添加葡萄糖时以及添加 2 个不同终浓度的葡萄糖 (5 mmol/L 和 10 mmol/L) 时 BGL3-GXT6 的活力。根据 GraphPad Prism 5.0 软件的 Competitive inhibition 方法计算 BGL3-GXT6 的葡萄糖抑制常数。

**1.5.4 重组酶 BGL3-GXT6 的底物特异性测定:** 分别取 2 mmol/L 的芳基类物质作为底物和适当稀释的酶液在最适条件下进行反应, 反应时间为 20 min。4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷的反应产物用紫外灯来检测。

取终浓度为 1% (*M/V*) 的糖类作为底物和纯酶在最适条件下反应, 二糖和部分糖苷类参与反应的时间为 20 min, 通过葡萄糖氧化还原试剂盒来测定二糖和糖苷的活性; 多糖类参与反应的时间为 6 h, 煮沸 5 min 终止反应, 用 DNS 法检测还原糖。

## 1.6 BGL3-GXT6 对天然底物水解功能研究

分别以 0.12 mmol/L 终浓度的黄豆苷、染料木苷为底物, 和纯酶在最适酶反应条件下分别反应 15 min 和 12 h, 对水解产物进行 HPLC 分析。

分别以 1% 终浓度的瑞鲍迪苷 A、甜菊苷、甜菊双糖苷和甜茶苷为底物, 和纯酶在最适酶反应条件下反应 12 h, 对水解产物进行 HPLC 分析。

分别以 100  $\mu$ g/mL 终浓度的淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和虎杖苷为底物, 和纯酶在最适酶反应条件下反应 12 h, 对水解产物进行 HPLC 分析。

## 1.7 BGL3-GXT6 转糖苷功能研究

分别以 60 mmol/L *p*NPG、16% (*M/V*) 葡萄糖和 16% (*M/V*) 纤维二糖为葡萄糖基供体, 20% (*M/V*) 的甘露糖、D-果糖、D-木糖、D(+) 半乳糖、D(-) 阿拉伯糖、麦芽糖、异麦芽糖、 $\alpha$ -乳糖、 $\alpha$ , $\alpha$ -海藻糖、蔗糖为受体, 在最适酶反应条件下反应 12 h, HPLC 检测反应产物。

分别以 60 mmol/L *p*NPG、20% (*M/V*) 葡萄糖和 20% (*M/V*) 纤维二糖为葡萄糖基供体, 分别以 10% (*V/V*) 的甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丁醇和 20% (*V/V*) 的乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、2,3-丁二醇、丙三醇为受体, 在最适酶反应条件下反应 12 h, HPLC 检测反应产物。

分别以 50 mmol/L *p*NPG、20% (*M/V*) 葡萄糖和 20% (*M/V*) 纤维二糖为葡萄糖基供体, 以己醇、辛醇、壬醇、癸醇为受体, 在 37 °C 条件下反应 12 h, 取有机相进行 HPLC 分析。

以 50 mmol/L *p*NPG 为糖基供体, 以烷基糖苷类、咖啡酸、苯甲酸、L-抗坏血酸为糖基受体, 在最适酶反应条件下反应 12 h, HPLC 检测反应产物。

## 1.8 BGL3-GXT6 酶分子改造

$\beta$ -葡萄糖苷酶上具有 1 个或者是多个色氨酸 Trp 对于固定糖类物质具有非常重要的作用。因此, 通过对比 GH3 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列找出保守区内的 Trp, 设计 38 对引物采用定点饱和突变的方法通过反向 PCR 手段将 Trp 突变成其他 19 种氨基酸残基, 希望得到葡萄糖耐受性提高的突变酶。

定点饱和突变: 以重组质粒 pSE-*bgl3* 为模板, PCR 反应程序: 95 °C 3 min; 98 °C 10 s, 60 °C 15 s, 68 °C 7 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

参照 1.4 中的方法对突变体进行诱导表达和纯化; 参照 1.5 中的方法对突变体进行酶学性质研究。

## 1.9 基因的核苷酸序列号

将来自链霉菌 GXT6 (*Streptomyces* sp. GXT6) 的基因 *bgl3* 的核苷酸序列上传到 GenBank 数据库中, 得到基因的序列号为 MG 762745。

## 2 结果和讨论

### 2.1 链霉菌 GXT6 中 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的扩增

对链霉菌 GXT6 全基因组中注释为糖基水解酶的一段核苷酸序列进行 ORF Finder, ORF 大小为 2319 bp, 通过 BLASTx 比对分析, 结果与 *S. ambofaciens* ATCC 23877 的 putative beta-glucosidase 的 Identities=536/750 (71%), Positives=597/750 (80%), Gaps=10/750 (1%)。对该基因编码的氨基酸序列进行 SMART 分析, 发现其含有典型的糖基水解酶 3 家族结构域, 不具有信号肽。

以链霉菌 GXT6 的基因组 DNA 为模板, 用引物 *bgl3* F、*bgl3* R 按照 1.3 中的方法 PCR 扩增目

的基因, 得到一条大小约为 2.3 kb 的特异性条带, 对所得片段测序后发现成功获得一个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 将其命名为 *bgl3*, 对应编码的蛋白质大小预计为 83 kDa, 将其命名为 BGL3-GXT6。

### 2.2 重组酶 BGL3-GXT6 诱导表达和纯化

将成功构建的重组质粒 pSE-*bgl3* 导入大肠杆菌 XL1-blue 中, 诱导表达并收集菌体, 通过镍亲和层析技术纯化得到目的蛋白质 BGL3-GXT6, 通过对表达产物进行 SDS-PAGE 和酶谱分析, 发现其约在 83 kDa 处有一条明显的蛋白质表达条带, 与理论大小一致。对 BGL3-GXT6 进行酶谱分析, 在经过七叶苷-柠檬酸铁铵活性染色后, 在相对应的位置出现了明显的黑色条带(图 1), 说明纯化得到的目的蛋白质 BGL3-GXT6 具有  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性。

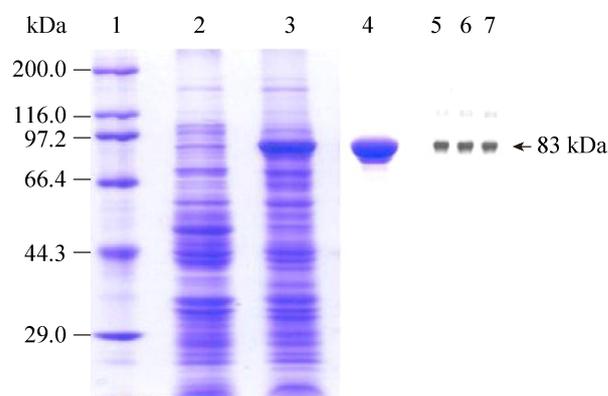


图 1. 重组蛋白 BGL3-GXT6 的 SDS-PAGE 和 native-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE and native-PAGE analysis of recombinant protein BGL3-GXT6. Lane 1: protein marker; lane 2: *E. coli* XL1-blue with pSE380; lane 3: recombinant *E. coli* XL1-blue with pSE-*bgl3*; lane 4: purified protein BGL3-GXT6; lane 5-7: BGL3-GXT6 stained with 0.2% esculin-0.5% ferric ammonium citrate (Native-PAGE of purified BGL3-GXT6).

## 2.3 重组酶 BGL3-GXT6 的酶学性质研究

### 2.3.1 pH 和温度对重组酶 BGL3-GXT6 的影响：

根据结果显示, BGL3-GXT6 的最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–7.0 之间 BGL3-GXT6 能保持 50% 以上的酶活力, 在 pH 低于 5.0 时, BGL3-GXT6 的酶活急剧下降。在不同的 pH 缓冲液中保存 12 h 后, 重组酶 BGL3-GXT6 在 pH 4.0–8.0 之间还能保持 80% 以上酶活力, 在 pH 低于 4.0 时, BGL3-GXT6 酶活力急剧下降, BGL3-GXT6 具有良好的 pH 稳定性。已报道的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 pI 值多数为 3.6–5.5, 但是最适 pH 可以超过 7.0, 多数酶的酸碱耐受性很强<sup>[19]</sup>。

根据结果显示(图 2), BGL3-GXT6 的最适酶反应温度为 40 °C, 25–50 °C 还能保持 50% 以上的酶活力, 在温度高于 50 °C 时, BGL3-GXT6 的酶活力急剧下降。将纯酶在不同温度条件下保存 1 h 后, 在温度 25–45 °C 条件下, BGL3-GXT6 酶活较为稳定, 能保持 80% 以上酶活力, 但在温度高于 45 °C 时酶活力迅速下降。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度在 40–110 °C 中均有分布, 不同来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度差异明显。一般来说, 细菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度比其他来源的要高, 并且温度稳定性较好<sup>[20]</sup>。

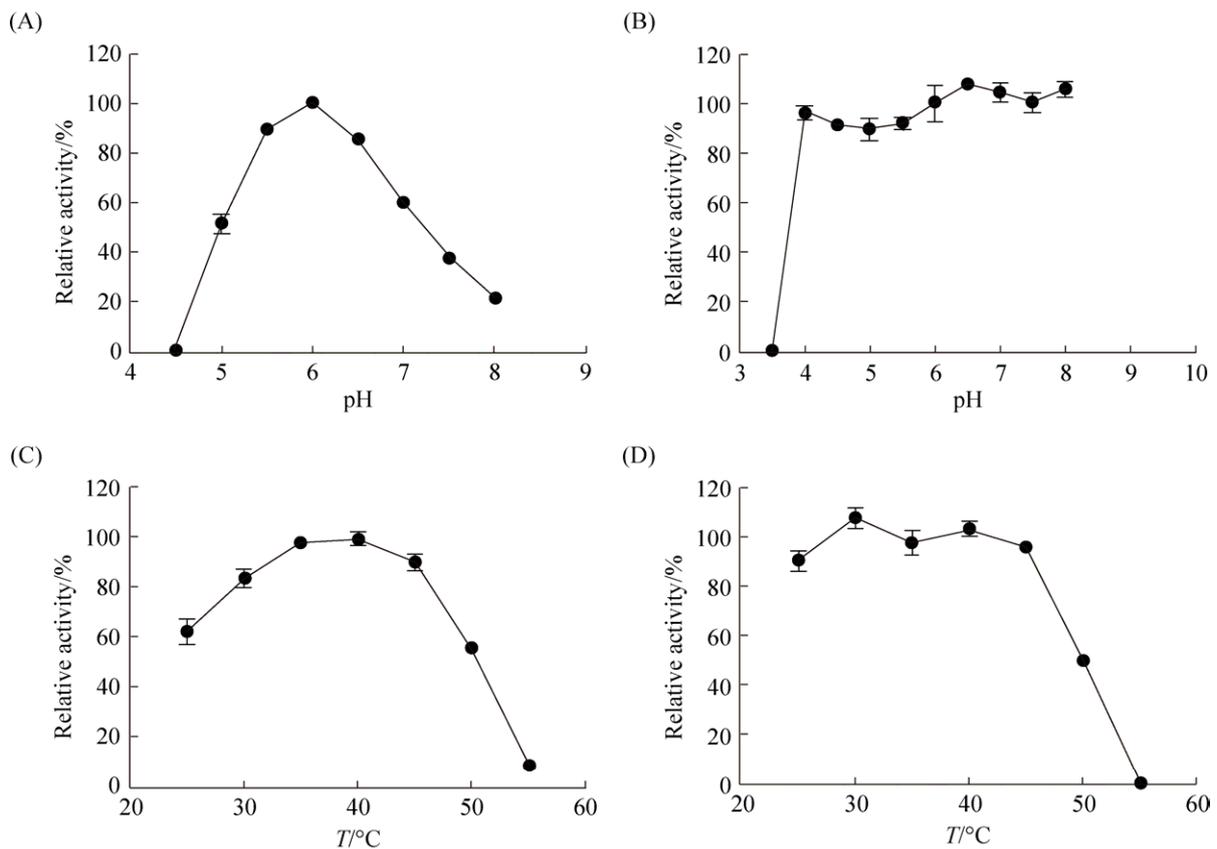


图 2. pH 和温度对重组蛋白质 BGL3-GXT6 酶活的影响

Figure 2. Effect of pH and temperature on recombinant enzyme activity. A: effect of pH on BGL3-GXT6 enzyme activity; B: pH stability of BGL3-GXT6; C: effect of temperature on BGL3-GXT6 enzyme activity; D: thermal stability of BGL3-GXT6.

**2.3.2 BGL3-GXT6 的  $K_m$ 、 $V_{max}$  的测定：**利用软件 GraphPad Prism 5 通过非线性回归拟合出 BGL3-GXT6 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $(0.4712 \pm 0.0180)$  mmol/L 和  $(128.000 \pm 1.741)$   $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ， $K_{cat}$  值为  $(182.57 \pm 2.48)$  /s (图 3)。

**2.3.3 BGL3-GXT6 的葡萄糖耐受性及葡萄糖抑制常数  $K_i$  值：**根据结果可知(图 4)，随着体系中葡萄糖终浓度的逐渐增加，BGL3-GXT6 的酶活逐渐下降。当体系中葡萄糖终浓度为 20 mmol/L 时，BGL3-GXT6 的残余酶活只有 40% 左右。

根据 GraphPad prism 5.0 软件的 Competitive inhibition 的方法计算 BGL3-GXT6 的葡萄糖抑制常数  $K_i$  值为  $(1.8880 \pm 0.1307)$  mmol/L。不同来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶对葡萄糖的反应各不相同，多数  $\beta$ -葡萄糖苷酶被低浓度的葡萄糖强烈抑制，它们的葡萄糖抑制常数一般不超过 0.1 mol/L。目前发现葡萄糖耐受性最高的  $\beta$ -葡萄糖苷酶来自于土壤宏基因组<sup>[21]</sup>文库，其  $K_i$  为 4.28 mol/L。

**2.3.4 BGL3-GXT6 底物特异性研究：**根据表 1 结果显示，BGL3-GXT6 除了水解 *p*NPG 外，还能够水解 MU-Glc、水杨苷和苦杏仁苷，对龙胆二糖、纤维二糖、昆布二糖和槐糖具有微弱的水解能力，不能水解 4-硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-吡

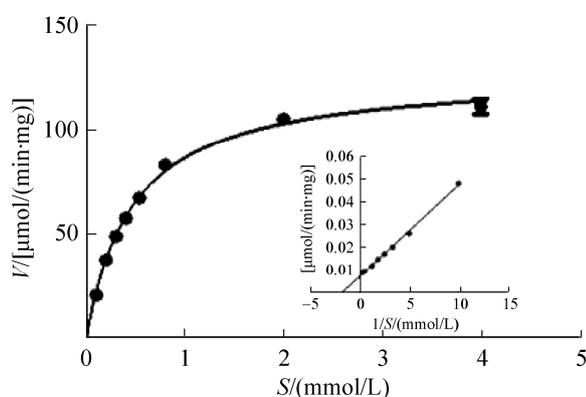


图 3. BGL3-GXT6 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值

Figure 3.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of BGL3-GXT6.

喃葡萄糖苷、*o*NPG、*p*NPGal、*p*NPC、 $\alpha$ -*p*NPG、异麦芽糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖，另外也不能水解羧甲基纤维素、桦木木聚糖、淀粉等多糖类物质。结果显示，BGL3-GXT6 在水解芳基类物质和二糖时对形成糖苷键的糖较为严格，能够水解 *p*NPG、七叶苷、MUG、黄豆苷、染料木苷纤维二糖和龙胆二糖等由葡萄糖基参与形成的  $\beta$ -糖苷键，但是却不能水解 *p*NP-纤维二糖苷、*p*NP-木糖苷、*p*NP-半乳糖苷和乳糖，这与多数 GH3 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶不同。

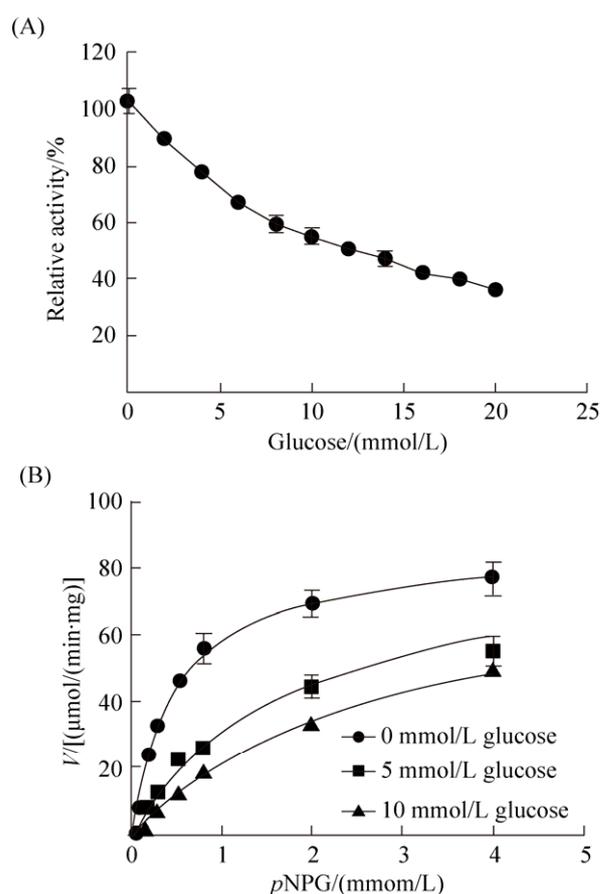


图 4. BGL3-GXT6 的葡萄糖耐受性及葡萄糖抑制常数  $K_i$  值

Figure 4. Glucose tolerance and glucose inhibition constant  $K_i$  of BGL3-GXT6. A: effect of glucose on BGL3-GXT6 enzyme activity. B: glucose inhibition constant  $K_i$  of BGL3-GXT6.

表 1. BGL3-GXT6 底物特异性分析

Table 1. Analysis of the BGL3-GXT6 on substrates specificity

Substrates	Relative activity/%
<i>p</i> NPG	100.00±0.49
MU-Glc	+
<i>o</i> NPG/ <i>p</i> NPGal/ <i>p</i> NP-Xyl/ <i>p</i> NPC/ $\alpha$ - <i>p</i> NPG/ <i>p</i> NPAG	0
Cellobiose	0.08±0.01
CMC	0
Soluble starch	0
Xylan from birchwood	0
Maltose	0
Isomaltose	0
Sucrose	0
Trehalose	0
Lactose	0
Gentiobiose	0.79±0.11
Salicin	2.80±0.79
Amygdalin	3.80±0.13
Laminaribiose	0.073±0.002
Sophorose	0.026±0.001

+: The substrate can be hydrolyzed, but can not calculate production yield.

## 2.4 BGL3-GXT6 对天然底物水解功能研究

将重组酶 BGL3-GXT6 与不同的天然底物进行水解反应, 对水解产物进行 HPLC 分析, 水解结果及产物信息见表 2。

BGL3-GXT6 能够水解黄豆苷、染料木苷、黄豆黄苷、虎杖苷、淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 等底物上的糖苷键, 生成对应的产物。大豆异黄酮在大豆中主要以糖苷和苷元两种形式存在, 其中以糖苷为主要存在形式, 但是苷元更容易被人体吸收; 白藜芦醇是一种非黄酮类多酚化合物, 但天然植物中提取出的白藜芦醇不能满足人们对它的需求。因此, 采用安全有效的酶解法<sup>[22]</sup>从虎杖中水解得到白藜芦醇成为研究热点; 淫羊藿的主要化学成分为黄酮类化合物、生物碱、多糖、木质素、挥发油及一些微量元素<sup>[23]</sup>。其中黄酮类化合物含量高并且有较强的生物活性但不

表 2. BGL3-GXT6 对天然底物水解结果

Table 2. Analysis of natural substrate hydrolysis of BGL3-GXT6

Substrates	Hydrolysis results	Hydrolyzate
Daidzin	+	Daidzein
Genistin	+	Genistein
Glycitin	+	Glycitein
Polydatin	+	Resveratrol
Icariin	+	Baohuoside I
Epimedium A	+	Sagittatoside A
Epimedium B	+	Sagittatoside B
Epimedium C	+	2-O-Rhamnosylcariside II
Rebaudioside A	-	-
Steviolbioside	-	-
Stevioside	-	-
Rubusoside	+	Steviol + mid product

-: The substrate can't be hydrolyzed.

易被人体吸收, 黄酮类化合物主要是朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷。因此, 水解大豆异黄酮糖苷、淫羊藿黄酮类和虎杖苷, 得到更容易被人体利用吸收的苷元形式是一项具有商业价值的应用。

BGL3-GXT6 不能水解瑞鲍迪苷 A、甜菊双糖苷、甜菊苷中的糖苷键, 只能将甜茶苷中 C-13 和 C-19 位的葡萄糖苷键水解, 生成甜菊醇和一个去掉葡萄糖基的中间产物。甜菊醇是甜菊糖苷类物质的苷元部分, 由于具有广泛的生理活性而逐渐被人们研究。目前已报道的水解甜菊糖苷的酶有 7 个, 其中 3 个是  $\beta$ -半乳糖苷酶, 另外 4 个均是  $\beta$ -葡萄糖苷酶。其中来自 *Penicillium decumbens*<sup>[24]</sup> 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SPGase 能够水解甜菊苷、甜茶苷、甜菊单糖苷和甜菊单糖脂, 能够将甜菊苷水解为甜菊醇。另外本课题组已经鉴定了一个来自链霉菌 *Streptomyces* sp. GXT6 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶能够水解甜菊糖苷中的甜菊苷和甜菊双糖苷<sup>[25]</sup>。而本研究中的 BGL3-GXT6 能够水解甜茶苷, 生成甜菊醇, 是除了 SPGase 外能够将甜菊糖苷水解生成甜菊醇的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 具有一定的应用潜力。

### 2.5 BGL3-GXT6 转糖苷功能的研究

选用不同的供受体与重组酶 BGL3-GXT6 进行转糖苷研究, 将转糖苷反应产物用 HPLC 检测, 结果见表 3 和表 4。

根据表 3 结果显示, BGL3-GXT6 以 *p*NPG 为糖基供体, 以单糖和二糖为受体时没有转糖苷能力, 以甲醇、异丙醇、乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、2,3-丁二醇、丙三醇为受体时虽有转糖基产物生成, 但是转糖苷能力较弱, 转糖苷产物的产量都很低。以 *p*NPG 和葡萄糖为糖基供体, 以

表 3. BGL3-GXT6 转糖苷功能研究

Table 3. Analysis of transglycosylation products of BGL3-GXT6

Receptor	Donor		
	Glucose	Cellobiose	<i>p</i> NPG
D-Mannose	-	-	-
D-Fructose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
D+Galactose	-	-	-
D+Arabinose	-	-	-
Maltose	-	-	-
Isomaltose	-	-	-
$\alpha$ -Lactose	-	-	-
$\alpha,\alpha$ -Trehalose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Methanol	-	-	+
Ethanol	-	-	-
N-propanol	-	-	-
Isopropanol	-	-	+
Butanol	-	-	-
Glycol	-	-	+
1,2-propanediol	-	-	+
1,3-propanediol	-	-	+
2,3-butanediol	-	-	+
Glycerol	-	-	+
(+)-Catechin	-	-	-
Hexanol	+	-	++
Octanol	+	-	++
Nonanol	+	-	++
Decanol	-	-	+

+: Transglycosylation product generated, the amount is proportional to the output; -: No transglycosylation product was generated.

表 4. BGL3-GXT6 转糖苷功能研究

Table 4. Analysis of transglycosylation products of BGL3-GXT6

Receptor	Donor : <i>p</i> NPG
Hexyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+
Heptyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+
n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside	+
Nonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+
Decyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	+
Caffeic acid	-
Benzoic acid	-
L-Ascorbic acid	-

+: Transglycosylation product generated; -: No transglycosylation product was generated.

己醇、辛醇、壬醇为受体时均有较为明显的转糖苷产物生成, 同时以 *p*NPG 为供体时的转糖苷产物产量比以葡萄糖为供体时要高。在以癸醇为糖基受体时, 只有以 *p*NPG 为供体时才有少量转糖苷产物生成。以上结果均表明, BGL3-GXT6 在发生转糖苷反应时偏好以 *p*NPG 作为糖基供体。

根据表 4 结果显示, 以 *p*NPG 为糖基供体, 以烷基糖苷类为受体时虽然均有转糖苷产物生成, 但是只有在以庚基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷为受体时, BGL3-GXT6 的转糖苷能力较强, 有比较明显的转糖苷产物生成。

### 2.6 $\beta$ -葡萄糖苷酶 BGL3-GXT6 的分子改造

相关文献研究表明<sup>[18]</sup>,  $\beta$ -葡萄糖苷酶上具有一个或者多个色氨酸 Trp(W), 对于固定糖具有非常重要的作用。糖与 Trp 上的吲哚环能够产生范德华力、弱静电作用、氢键等相互作用力, 是 Trp 具有如此重要作用的原因。因此, 对比糖基水解酶 3 家族(GH3)的氨基酸序列找出其保守区内的 Trp, 通过定点饱和突变的方法将 Trp 突变成其他 19 种氨基酸。以期能够改变 BGL3-GXT6 的葡萄糖耐受性, 获得具有较高葡萄糖耐受性的突变菌株。

在 NCBI 上通过 BlastX 查找 GH3 家族  $\beta$ -葡萄

糖苷酶氨基酸序列并进行序列比对, 结果显示 BGL3-GXT6 的 81 位和 233 位色氨酸 W 在其他 32 个同源性较高的 GH3 家族的酶中是严格保守的, 因此对这 2 个点进行定点饱和突变。

通过反向 PCR 的方法获得目的 DNA 序列, 将 DNA 序列进行测序并与 *bgl3* 基因序列进行比对后确定 W81 和 W233 位点的核苷酸均已成功饱和和突变。将成功构建的重组质粒导入大肠杆菌, 按照方法 1.4 对重组菌株进行诱导表达和纯化。将 W81 和 W233 位点的所有突变体用七叶苷-柠檬酸铁铵平板进行活性筛选, 结果显示 W81 位点的突变体有 7 个具有酶活, W233 位点有 18 个具有酶活(图 5), 因此挑选这 25 个突变体按照方法 1.5 中

BGL3-GXT6 酶活测定方法测定各突变体酶的最适 pH、最适温度、动力学常数、葡萄糖抑制常数, 结果如表 5 所示。

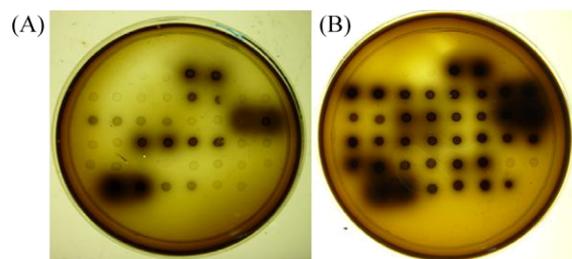


图 5. 七叶苷-柠檬酸铁铵平板筛选到的阳性突变子  
Figure 5. Positive mutants screened on the selective plate. A: Positive mutants of W81 screened on the selective plate; B: Positive mutants of W233 screened on the selective plate.

表 5. 突变酶的酶学性质研究

Table 5. Enzyme properties determination of mutants

Mutants	Optimal temperature/°C	Optimal pH	$K_m$ / (mmol/L)	$V_{max}$ / [ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]	$K_i$ / (mmol/L)	$K_{cat}$ / (1/S)
BGL3-GXT6	40	6.0	0.47±0.02	128.00±1.74	1.88±0.13	182.57±2.48
W81C	45	5.5	0.41±0.02	25.71±0.15	2.25±0.14	36.67±0.21
W81F	50	5.5	0.36±0.02	137.6±2.38	2.94±0.30	196.26±3.39
W81I	45	5.5	0.44±0.02	3.88±0.06	1.73±0.09	5.53±0.08
W81L	45	5.5	0.42±0.03	13.01±0.24	2.04±0.14	18.55±0.34
W81M	40	6.0	0.35±0.02	73.62±1.32	1.48±0.09	105.01±1.88
W81V	45	5.5	0.48±0.03	3.39±0.06	2.43±0.18	4.83±0.08
W81Y	40	6.0	0.39±0.02	147.3±2.32	1.95±0.11	210.09±3.30
W233A	35	6.5	1.60±0.08	3.52±0.05	60.66±2.98	5.02±0.07
W233C	45	5.5	0.93±0.05	2.52±0.04	120.2±8.82	3.59±0.05
W233D	40	5.5	4.4±0.16	2.13±0.04	396.4±11.99	3.03±0.05
W233E	35	6.0	1.12±0.04	1.41±0.01	197.7±6.17	2.01±0.01
W233F	45	6.0	0.66±0.004	32.58±0.54	12.05±0.70	46.46±0.77
W233G	35	6.0	2.38±0.14	0.32±0.01	8.88±0.58	0.45±0.01
W233H	45	6.5	1.43±0.06	6.69±0.10	17.03±0.78	9.54±0.14
W233I	45	6.0	0.86±0.07	0.25±0.01	312.6±34.00	0.35±0.01
W233K	45	6.0	2.01±0.09	0.48±0.01	146.1±6.67	0.68±0.01
W233L	50	6.0	0.68±0.05	1.58±0.03	215.3±14.94	2.25±0.04
W233M	50	6.0	1.09±0.08	3.34±0.07	65.68±6.03	4.76±0.09
W233N	45	6.0	2.71±0.13	1.31±0.02	98.38±4.64	1.86±0.02
W233Q	45	6.0	2.99±0.09	2.21±0.03	84.96±3.01	2.88±0.04
W233R	45	6.0	1.27±0.05	0.65±0.01	43.07±2.33	0.92±0.01
W233S	40	6.0	2.10±0.13	3.23±0.07	62.67±4.37	4.60±0.09
W233T	45	6.0	0.71±0.04	0.44±0.01	226.2±18.42	0.62±0.01
W233V	45	6.0	0.78±0.05	0.32±0.01	385.4±43.29	0.45±0.01
W233Y	45	6.0	0.55±0.03	21.12±0.39	23.00±1.62	30.12±0.55

表中结果显示, 突变酶的最适温度和最适 pH 与野生重组酶 BGL3-GXT6 相比有不同程度的变化。W81 位的 7 个突变酶的  $K_m$  和葡萄糖抑制常数  $K_i$  值与野生重组酶相比基本上没有变化, 但是  $V_{max}$  却有不同变化。突变酶 W81F 和 W81Y 与 BGL3-GXT6 相比略有提高, W81C、W81L、W81M、W81I 和 W81V 的  $V_{max}$  有不同程度的降低。

W233 位点饱和和突变后获得的突变酶的  $K_m$ 、 $V_{max}$  和葡萄糖抑制常数  $K_i$  与野生重组酶 BGL3-GXT6 相比均发生了明显变化。各突变酶的  $K_m$  与 BGL3-GXT6 相比均出现不同程度的升高, 其中 W233D 4.4 mmol/L 升高了 3.53; 突变酶的酶活与野生重组酶相比都有很大程度的降低; 各突变酶的葡萄糖抑制常数  $K_i$  值都有不同程度的提高, 突变酶 W233C、W233D、W233E、W233I、W233K、W233L、W233T 和 W233V 的  $K_i$  值变化较为明显, 与 BGL3-GXT6 相比分别提高了约 63、209、104、165、77、114、119 和 204 倍, 变化最小的突变酶 W233G 的  $K_i$  值也提升了 4 倍。因此, 233 位的饱和和突变成功获得了葡萄糖耐受性提高的突变酶。

W81 位点和 W233 位点获得的突变体对于葡萄糖耐受性呈现出不同的变化, 通过 SWISS-MODEL 对 BGL3-GXT6 进行建模分析, 结果(图 6)是以新阿波罗栖热胞菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[26]</sup> (PDB: 2x42) 为模板, 其中绿色标注的氨基酸为亲核试剂 Asp 和质子供体 Glu, 蓝色标注为突变位点。通过分析 BGL3-GXT6 的模型图发现, W81 位点远离  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性中心, 而 W233 位点位于其活性中心。因而推测, 造成 2 个位点对于葡萄糖耐受性变化不同的原因可能是因为 W81 位点远离 BGL3-GXT6 的活性中心, 它的突变对于葡萄糖与 BGL3-GXT6 结合影响不大; 而 W233 位点位于活性中心, 它的突变影响了 BGL3-GXT6 与葡萄糖

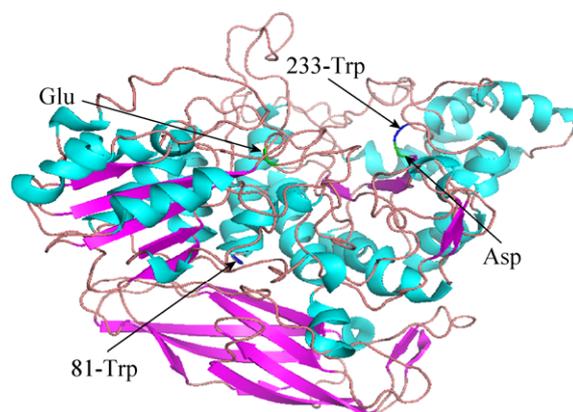


图 6. BGL3-GXT6 的 3D 结构

Figure 6. 3D structure of BGL3-GXT6.

的结合, 而且突变成不同的氨基酸后对于葡萄糖耐受程度也有所不同。

根据文献报道<sup>[27]</sup>, BGL3-GXT6 中的 Trp-81 是其转糖基活性的关键氨基酸。对该位点饱和突变所获得的 5 个有活性的突变酶按照方法 1.7 进行转糖苷活性研究, 结果见表 6。

将突变酶的转糖苷结果与 BGL3-GXT6 的转糖苷结果进行对比分析发现, 突变酶的转糖苷能力并没有明显的变化。

### 3 结论

本研究以经过全基因测序的链霉菌 GXT6 为出发菌株, 从中克隆出一个  $\beta$ -葡萄糖苷基因, 命名为 *bgl3*, 该基因核苷酸序列长度为 2319 bp。选用 pSE380 为表达载体, 转化至大肠杆菌 XL1-blue 中诱导表达, 通过镍亲和层析方法纯化得到大小为 83 kDa 的目的蛋白质 BGL3-GXT6, 对 BGL3-GXT6 进行酶学性质研究。BGL3-GXT6 的最适温度为 40 °C, 最适 pH 为 6.0,  $K_m$  值为  $(0.4712 \pm 0.0180)$  mmol/L,  $V_{max}$  值为  $(128.000 \pm 1.741)$   $\mu$ mol/(min·mg), 葡萄糖抑制常数  $K_i$  值为  $(1.8880 \pm 0.1307)$  mmol/L。BGL3-GXT6 对天然底物黄豆苷、染料木苷、黄豆黄苷、甜茶

表 6. 突变酶的转糖苷活性研究

Table 6. Analysis of transglycosylation products of mutant enzymes

Receptor	Donor : pNPG				
	W81C	W81F	W81M	W81L	W81I
Hexyl-β-D-glucopyranoside	-	-	+	-	-
Heptyl-β-D-glucopyranoside	-	-	-	-	-
n-Octyl-β-D-Glucopyranoside	-	+	+	-	-
Nonyl-β-D-glucopyranoside	-	+	+	-	-
Decyl-β-D-glucopyranoside	-	-	-	-	-
Hexanol	-	+	+	+	+
Octanol	+	+	+	+	+
Nonanol	-	+	+	+	+
Decanol	-	-	+	+	-
Caffeic acid	-	-	-	-	-
Benzoic acid	-	-	-	-	-
L-Ascorbic acid	-	-	-	-	-
(+)-Catechin	-	-	-	-	-

+: Transglycosylation product generated; -: No transglycosylation product was generated.

苷和虎杖苷具有水解能力。对 BGL3-GXT6 中葡萄糖耐受性相关的氨基酸位点(Trp-81, Trp-233)进行饱和突变, 获得 25 个有活性的突变酶。对突变酶进行酶学性质研究, W81 位点和 W233 位点获得的突变体对葡萄糖耐受性呈现出不同的变化, 其中 W81 位点的突变体葡萄糖抑制常数和 BGL3-GXT6 相比基本上没有变化, W233 位点的突变体的葡萄糖抑制常数均有提高, 突变酶 W233C、W233D、W233E、W233I、W233K、W233L、W233T 和 W233V 的  $K_i$  值变化较为明显, 与 BGL3-GXT6 相比分别提高了约 63、209、104、165、77、114、119 和 204 倍, 变化最小的突变酶 W233G 的  $K_i$  值也提升了 4 倍。因此, 233 位的饱和突变成功获得了葡萄糖耐受性提高的突变酶。对 W81 位点获得的突变体进行转糖苷活性研究, 发现各突变体的转糖苷活性相比 BGL3-GXT6 基本上没有正向的变化。

## 参 考 文 献

[1] Crespin E, Zanthorlin LM, de Souza FHM, Diogo JA, Gazolla AC, Machado CB, Figueiredo F, Sousa AS, Nóbrega F, Pellizari VH, Murakami MT, Ruller R. A novel

cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β-glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 82: 375–380.

- [2] Zhou X, Huang Z, Yang HW, Jiang Y, Wei W, Li QY, Mo QG, Liu JL. β-Glucosidase inhibition sensitizes breast cancer to chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 91: 504–509.
- [3] Zhao XY, Li R, Liu Y, Zhang XH, Zhang M, Zeng Z, Wu LM, Gao XL, Lan T, Wang YQ. Polydatin protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017, 629: 1–7.
- [4] Zhang R, Li YJ, Wang X. Research progress on the antimicrobial action of resveratrol. *Journal of Hebei Medical University*, 2010, 31(9): 1151–1154. (in Chinese)  
张瑞, 李永军, 王鑫. 白藜芦醇抗菌作用的研究进展. *河北医科大学学报*, 2010, 31(9): 1151–1154.
- [5] Scherzberg MC, Kiehl A, Zivkovic A, Stark H, Stein J, Fürst R, Steinhilber D, Ulrich-Rückert S. Structural modification of resveratrol leads to increased anti-tumor activity, but causes profound changes in the mode of action. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015, 287(1): 67–76.
- [6] Chen X, Tang LJ, Sun YN, Qiu PH, Liang G. Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010, 104(4): 379–384.
- [7] Cano A, García-Pérez MÁ, Tarín JJ. Isoflavones and cardiovascular disease. *Maturitas*, 2010, 67(3): 219–226.
- [8] Ahn-Jarvis JH, Teegarden MD, Schwartz SJ, Lee K, Vodovotz

- Y. Modulating conversion of isoflavone glycosides to aglycones using crude beta-glycosidase extracts from almonds and processed soy. *Food Chemistry*, 2017, 237: 685–692.
- [9] Fan G, Wang KX, Pan SY. Advances in research of glycosidically bound aroma compounds in fruits. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(24): 5100–5111. (in Chinese)  
范刚, 王可兴, 潘思轶. 水果中糖苷键合态香气物质的研究进展. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5100–5111.
- [10] Agrawal R, Verma AK, Satlewal A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable  $\beta$ -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 33: 472–482.
- [11] Li P, Wan XC, Tao WY, Ding XL. Enhancing the aroma of foods by using  $\beta$ -glucosidase. *Food and Fermentation Industries*, 1999, 26(2): 5–6, 32. (in Chinese)  
李平, 宛晓春, 陶文沂, 丁霄霖. 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的食品增香应用. *食品与发酵工业*, 1999, 26(2): 5–6, 32.
- [12] Florindo RN, Souza VP, Mutti HS, Camilo C, Manzine LR, Marana SR, Polikarpov I, Nascimento AS. Structural insights into  $\beta$ -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*. *New Biotechnology*, 2018, 40: 218–227.
- [13] Kumar P, Ryan B, Henehan GTM.  $\beta$ -Glucosidase from *Streptomyces griseus*: Nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis. *Protein Expression and Purification*, 2017, 132: 164–170.
- [14] Teugias H, Våljamäe P. Selecting  $\beta$ -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 105.
- [15] Varghese JN, Hrmova M, Fincher GB. Three-dimensional structure of a barley  $\beta$ -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure*, 1999, 7(2): 179–190.
- [16] Chan AKN, Wang YY, Ng KL, Fu ZB, Wong WKR. Cloning and characterization of a novel cellobiase gene, *cba3*, encoding the first known  $\beta$ -glucosidase of glycoside hydrolase family 1 of *Cellulomonas biazotea*. *Gene*, 2012, 493(1): 52–61.
- [17] Liu JJ, Zhang XC, Fang ZM, Fang W, Peng H, Xiao YZ. The 184th residue of  $\beta$ -glucosidase Bgl1B plays an important role in glucose tolerance. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(5): 447–450.
- [18] Seidle HF, McKenzie K, Marten I, Shoseyov O, Huber RE. Trp-262 is a key residue for the hydrolytic and transglucosidic reactivity of the *Aspergillus niger* family 3  $\beta$ -glucosidase: Substitution results in enzymes with mainly transglucosidic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 444(1): 66–75.
- [19] Pan LH, Luo JP. Advance in research and application of  $\beta$ -D-glucosidase. *Food Science*, 2006, 27(12): 803–807. (in Chinese)  
潘利华, 罗建平. 葡萄糖苷酶的研究及应用进展. *食品科学*, 2006, 27(12): 803–807.
- [20] Parry NJ, Beever DE, Owen E, Vandenberghe I, Beeumen JV, Bhat MK. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical Journal*, 2001, 353(1): 117–127.
- [21] Li G, Jiang Y, Fan XJ, Liu YH. Molecular cloning and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 15–22.
- [22] Chen RR, Jiang H, Pu HL. Optimization technology for production of resveratrol by enzyme. *China Food Additives*, 2011, (5): 64–67. (in Chinese)  
陈蓉蓉, 姜华, 蒲含林. 酶解法制备白藜芦醇的工艺优化. *中国食品添加剂*, 2011, (5): 64–67.
- [23] Lei YT, Liang Y, Hao XY, Qiu L, Hu ZY. Four active components of epimedium in different habitats determination of content of high performance liquid chromatography. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(6): 1404–1405. (in Chinese)  
雷永涛, 梁妍, 郝小燕, 裘璐, 胡朝阳. 不同产地淫羊藿中 4 种活性成分含量的高效液相色谱法测定. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1404–1405.
- [24] Ko JA, Ryu YB, Kwon HJ, Jeong HJ, Park SJ, Kim CY, Wee YJ, Kim D, Lee WS, Kim YM. Characterization of a novel steviol-producing  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and optimal production of the steviol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8151–8161.
- [25] Wang ZL, Wang JP, Jiang MH, Wei YT, Pang H, Wei H, Huang RB, Du LQ. Selective production of rubusoside from stevioside by using the sophorose activity of  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9663–9674.
- [26] Pozzo T, Pasten JL, Karlsson EN, Logan DT. Structural and functional analyses of  $\beta$ -glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(3): 724–739.
- [27] Seidle HF, Allison SJ, George E, Huber RE. Trp-49 of the family 3  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* is important for its transglucosidic activity: Creation of novel  $\beta$ -glucosidases with low transglucosidic efficiencies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, 455(2): 110–118.

# Characterization of $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6 and its molecular modification of glucose tolerance

Fangfang Zheng, Jinpei Wang, Yu Lin, Zilong Wang, Yutuo Wei, Ribo Huang, Liqin Du\*

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

**Abstract:** [Objective] A gene encoding family 3  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6 was cloned and expressed. The enzymatic properties of recombinant protein were studied in detail. And the related amino acid residues were modified to improve glucose-tolerance. [Methods] Based on the analysis of the genome sequence of *Streptomyces* sp. GXT6, one of the genes annotated as glycosyl hydrolase family 3 was cloned into expression vector pSE380. The recombinant plasmid pSE-bgl3 was constructed and transformed into *Escherichia coli* XL1-blue for induction of expression. The recombinant protein was purified with Ni-NTA. The features of the recombinant protein BGL3-GXT6 were characterized. The recombinant enzyme was modified through site-directed saturation mutation. [Results] A new gene encoding  $\beta$ -glucosidase of glycosyl hydrolase family 3 was cloned from *Streptomyces* sp. GXT6. The properties of BGL3-GXT6 were identified. Its optimal pH and temperature were 6.0 and 40 °C, respectively. Its  $K_m$  and  $V_{max}$  values were (0.4712±0.0180) mmol/L and (128.000±1.741)  $\mu$ mol/(min·mg), and  $K_i$  value was (1.8880±0.1307) mmol/L. BGL3-GXT6 was able to hydrolyze daidzin, genistin, polydatin and icariin. Furthermore, the possible amino acids related to glucose tolerance of BGL3-GXT6 (81-Trp and 233-Trp) were substituted. Then, twenty-five mutants with activity were obtained and further characterized. As a result, it was found  $K_m$  and  $K_i$  values of mutants of W233 were significantly changed compared with the wild-type BGL3-GXT6. And the glucose tolerance of these mutants was improved to some extent, with the highest increase of 209 times. [Conclusion] The  $\beta$ -glucosidase BGL3-GXT6 in this study has the ability to hydrolyze rubusoside, daidzin, genistin, polydatin and icariin. These characteristics indicate that BGL3-GXT6 has important applications in theoretical research and in industry.

**Keywords:** *Streptomyces* sp. GXT6,  $\beta$ -glucosidase, enzymatic properties, molecular modification, glucose tolerance

(本文责编: 李磊)

Supported by the Guangxi Science Research and Technology Development Program the Chairman Fund Project (17290-03) and by the National Natural Science Foundation of China (31360369)

\*Corresponding author. Tel: +86-771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

Received: 11 January 2018; Revised: 28 March 2018; Published online: 29 May 2018