



β -葡萄糖苷酶的糖耐受和促活性质研究

李璇^{1,2,3#}, 刘帅峰^{1,2,3#}, 孟春雨^{1,2,3}, 程尧^{1,2,3}, 房伟^{1,2,3,4}, 张寅良^{1,2,3,4},
张学成^{1,2,3,4*}, 肖亚中^{1,2,3,4*}

- 1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601
- 2 现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230601
- 3 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230601
- 4 安徽大学绿色产业创新研究院, 安徽 合肥 230000

李璇, 刘帅峰, 孟春雨, 程尧, 房伟, 张寅良, 张学成, 肖亚中. β -葡萄糖苷酶的糖耐受和促活性质研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(5): 2007-2019.
LI Xuan, LIU Shuaifeng, MENG Chunyu, CHENG Yao, FANG Wei, ZHANG Yinliang, ZHANG Xuecheng, XIAO Yazhong. Study and rational engineering of the glucose tolerance and promotion of β -glucosidase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 2007-2019.

摘要:【目的】以葡萄糖耐受并促活的 β -葡萄糖苷酶 Bgl2A 为出发材料, 寻找与 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受和促活性质相关的重要氨基酸残基位点并对其进行突变; 对突变酶性质进行检测, 结合分子对接, 探究突变对酶的糖耐受和促活性质的影响及机制; 进而对葡萄糖不耐受的 Bgl3A (Bgl2A:A22S/V224S) 进行分子改造, 以获得应用潜能更好的突变酶。【方法】通过序列和结构比对、统计耦联分析和结构分析, 选取 Bgl2A 底物通道口、蛋白质表面以及活性中心附近可能间接影响葡萄糖耐受和促活性质的残基作为突变位点, 构建了多个突变酶, 并对其酶学性质进行检测。【结果】以 Bgl2A 为出发酶, D322I、W325A、W126Y、F172N、C173I 和 N226V 的糖耐受和促活性质显著提升。分子对接提示, 这些突变可能是通过变构效应影响活性中心与葡萄糖结合的自由能, 从而改变酶葡萄糖耐受和促活性质。据此, 在 Bgl3A 分子上对应构建多个突变体, 筛选获得了较出发酶在糖耐受和促活性质提升的同时保持较高酶活和稳定性的突变

资助项目: 安徽省科技攻关重大项目(202003a06020015); 国家自然科学基金(31870056); 国家重点研发计划(2018YFC03111106)

This work was supported by the Key Scientific and Technological Project of Anhui Province (202003a06020015), the National Natural Science Foundation of China (31870056), and the National Key Research and Development Program of China (2018YFC03111106).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. ZHANG Xuecheng, Tel/Fax: +86-551-63861063, E-mail: turenzh@ahu.edu.cn;
XIAO Yazhong, E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

Received: 2023-02-28; Accepted: 2023-04-19; Published online: 2023-04-23

酶 N226V 和 F172N。【结论】除了酶与葡萄糖直接结合的位点，不与葡萄糖直接相互作用的位点也可通过远程作用间接影响 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受和促活性性质，这为 β -葡萄糖苷酶的相关理性改造提供了新思路。

关键词： β -葡萄糖苷酶；葡萄糖耐受与促活；理性改造；分子对接；变构效应

Study and rational engineering of the glucose tolerance and promotion of β -glucosidase

LI Xuan^{1,2,3#}, LIU Shuaifeng^{1,2,3#}, MENG Chunyu^{1,2,3}, CHENG Yao^{1,2,3}, FANG Wei^{1,2,3,4}, ZHANG Yinliang^{1,2,3,4}, ZHANG Xuecheng^{1,2,3,4*}, XIAO Yazhong^{1,2,3,4*}

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Anhui Key Laboratory of Modern Biomanufacturing, Hefei 230601, Anhui, China

3 Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230601, Anhui, China

4 Anhui University Green Industry Innovation Research Institute, Hefei 230000, Anhui, China

Abstract: [Objective] In this study, we identified possibly critical sites for the higher glucose tolerance and promotion of Bgl2A through three ways, and checked their significance by mutation and characterized the mutants. Further, we investigated the mechanism of the critical sites affecting the glucose tolerance and promotion by molecular docking. Further, Bgl3A (Bgl2A:A22S/V224S), with low glucose tolerance, was rationally engineered to obtain mutants with better application potential. **[Methods]** Through sequence and structure comparison, statistical coupling analysis, and structural analysis, we selected the residues in the substrate tunnel and near the active center that may indirectly affect the glucose tolerance and promotion for mutations to different type amino acids, then prepared the mutants and tested their enzymatic properties. **[Results]** Some mutants with higher glucose tolerance and promotion, such as D322I, W325A, W126Y, F172N, C173I and N226V were obtained. Molecular docking showed that these mutations may change the energy of glucose binding to the active center by allosteric effect, thus influence the glucose tolerance and promotion. Based on the above results, corresponding mutants were then made for Bgl3A. Some mutants, such as N226V and F172N, with high glucose tolerance and promotion while considerable activity and stability remained, have higher application potential. **[Conclusion]** The results demonstrated that in addition to the sites where glucose directly binds to, there are other sites that do not interact directly with glucose can indirectly influence the glucose tolerance and promotion of β -glucosidase through long range effect, which provides a new clue for rational engineering β -glucosidases.

Keywords: β -glucosidase; glucose tolerance and promotion; rational engineering; molecular docking; allosteric effect

β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)由 Wöhler 和 Liebig 于 19 世纪 30 年代在苦杏仁中首次发现^[1], 为一种糖基水解酶, 可从非还原端切割糖苷或寡糖中的 β -1,4 糖苷键并释放葡萄糖及糖苷配体^[2], 有些酶具有转糖苷^[3-4]和反向水解作用^[5], 在活性化合物的释放和乙醇发酵生产等领域具有广泛的应用^[6-9]。在纤维素降解、虎杖苷水解和大豆异黄酮水解等实际应用中, β -葡萄糖苷酶需在高浓度产物即葡萄糖存在条件下发挥功能, 获得高葡萄糖耐受的 β -葡萄糖苷酶一直为研究者所关注^[10-11]。

目前, 对高耐糖 β -葡萄糖苷酶的报道多以性质描述为主^[12-14], 关于糖调节 β -葡萄糖苷酶活性的机制尚不完全清晰。GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶具有典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 以 2 个保守的谷氨酸残基作为其亲核残基和质子供体。de Giuseppe 等认为, 由于糖基结合位点和催化活性位点均位于底物通道的底部, GH1 家族 β -葡萄糖苷酶深邃的底物通道以及活性中心周边的形状和静电性质决定了其葡萄糖耐受能力较高^[15], 并且通道中某些氨基酸残基位点被认为在葡萄糖耐受的 β -葡萄糖苷酶中相对保守且起关键作用, 如来自于 *Humicola insolens* 的 β -葡萄糖苷酶 HiBG 的 Trp168 和 Leu173^[16]。与此不同, 有一些 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶虽然耐受葡萄糖, 但其底物通道中并没有相应的保守关键残基, 如来自热球菌(*Thermococcus* sp.)的 β -葡萄糖苷酶^[17]和筛选自基因组文库的 β -葡萄糖苷酶 Td2F2^[18]。

Bgl1A 和 Bgl1B 是实验室前期筛选获得的海洋 β -葡萄糖苷酶, 它们序列一致性达到 56%, 但性质迥异, 前者耐受葡萄糖且活性受葡萄糖促进, 后者不耐受葡萄糖。对 Bgl1A 和 Bgl1B 的研究显示, 葡萄糖分子不仅可以与酶活性中

心的残基结合, 也可以与底物通道内的其他位点, 如与通道中部的 228 位残基和通道口的 301-302 位残基结合。据此推测, 葡萄糖可通过以下机制影响 β -葡萄糖苷酶的酶活: 当葡萄糖更易与酶活性中心的残基结合时, 酶的活性被抑制; 当葡萄糖更易与非活性中心位点结合时, 酶分子则表现出对葡萄糖耐受; 当葡萄糖与非活性中心位点结合, 可通过转糖苷等促进底物水解, 酶分子表现出葡萄糖促活性质^[12]。另有一些 β -葡萄糖苷酶通过转糖苷作用使其具有糖耐受和促活性质^[9-10,18], 由此推测转糖苷作用在糖耐受及促活性质中发挥重要作用。但是, 仍有一些不具备转糖苷能力的 β -葡萄糖苷酶具有很好的葡萄糖耐受与促活性质, 如来自于 *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13^T 的 β -葡萄糖苷酶 BglP^[19]和来自于 Kusaya 肉汁宏基因组的 β -葡萄糖苷酶 Ks5A7^[20]; 而某些被低浓度葡萄糖抑制的 β -葡萄糖苷酶却表现出转糖苷能力^[21-22]。因此, β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受和促活机制仍需进一步研究。

如上所述, Bgl1A/Bgl1B 的前期研究揭示了部分与 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受和促活性质相关的关键位点和机制, 除直接与葡萄糖结合的关键位点, 可能另有一些位点通过远程作用(如变构调节等)间接影响这一性质, 但这些位点的研究尚不深入。本研究以葡萄糖耐受并促活的 Bgl2A (Bgl1A:A24S/F297Y)为研究材料, 通过序列和结构比对、统计耦联分析(statistics coupling analysis, SCA)^[23]和结构分析 3 条途径寻找与 β -葡萄糖苷酶的糖耐受和促活性质相关的重要位点, 探究其对糖耐受和促活性质的影响, 并据此对葡萄糖耐受性低的 Bgl3A (Bgl2A:A22S/V224S)进行改造, 筛选获得葡萄糖耐受和促活性质均获提升的突变酶。

1 材料与方 法

1.1 突变体的设计及构建

以 Bgl2A 为研究对象, 以 PDB 数据库中晶体结构 2O9R 为模板, 采用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>)对 β -葡萄糖苷酶 Bgl2A 进行三维结构建模, 通过如下方法寻找可能间接影响糖耐受和促活性的位点: (1) 通过对具有葡萄糖耐受和促活性的 Bgl2A 与不耐受葡萄糖的 Bgl1B 的序列和结构进行比对^[24], 选择底物通道口附近存在差异的位点, 研究其与葡萄糖耐受和促活性的相关性; (2) 通过对 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的 SCA 分析, 确定各独立分量(independent component, IC)。选择包含底物通道及活性中心的 IC 中位于蛋白表面且可能通过变构调节影响活性中心的位点, 研究它们可能对葡萄糖耐受和促活性的影响; (3) 通过结构分析, 选择在 Bgl2A 活性中心附近且侧链指向通道内部的位点, 研究它们对葡萄糖耐受和促活性的影响。

基于以上 3 种方法, 将所选位点的氨基酸残基替换成性质不同(包括侧链疏水性、大小和氨基酸所带电荷等)的氨基酸残基, 设计一系列突变体, 制备并测定其葡萄糖耐受和促活性。选择使葡萄糖耐受和促活性明显提升的突变体, 在 Bgl3A 中进行对应改造。

1.2 酶的重组表达及纯化

将测序正确的重组菌株进行放大培养, 当菌液 OD_{600} 约为 0.6 时, 加入异丙基-1 硫代- β -D-半乳糖苷(Isopropyl-1 thio- β -D-galactoside, IPTG)诱导重组酶表达, 收集重组细胞, 超声破碎获得粗酶液。

采用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化蛋白, 依次用梯度浓度的咪唑洗脱蛋白, 收集洗脱液并进行 SDS-PAGE 检测。将纯度较高的洗脱液用截留量为 10 kDa 的浓缩管浓缩, 并用 citrate- Na_2HPO_4

缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.5)置换咪唑 3–4 次, 最终浓缩至 5 mL, 4 °C 保存备用。

1.3 酶活测定

500 μ L 反应体系中包含 25 μ L 终浓度为 0.005 mol/L 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside, pNPG), 450 μ L citrate- Na_2HPO_4 缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.5)和 25 μ L 适当稀释酶液。反应体系混匀后于 45 °C 反应 5 min, 立即加入 500 μ L Na_2CO_3 (1 mol/L)终止反应。取 200 μ L 终止后的反应液于 96 孔板中, 用酶标仪检测 405 nm 处的吸光值。酶活力单位(U)定义为每分钟水解 pNPG 产生 1 μ mol pNP 所需的酶量。

1.4 酶的最适温度及最适 pH 测定

以 pNPG 为底物, 在 30–55 °C 的不同温度下在 citrate- Na_2HPO_4 缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.5)中温育反应 5 min, 测定不同反应温度对酶活力的影响。以最大酶活作为 100%, 计算相对酶活。温度稳定性测定使用 citrate- Na_2HPO_4 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.5)适当稀释酶液, 在 35 °C 条件下, 间隔一定时间取样测其酶活。以初始酶活作为 100%, 计算相对酶活。

以 pNPG 为底物, 在最适温度下, 在 pH 5.5–7.5 的 citrate- Na_2HPO_4 缓冲液(0.05 mol/L)中测定不同 pH 对酶活的影响。以最大酶活作为 100%, 计算相对酶活, 确定反应最适 pH。

1.5 酶的葡萄糖耐受和促活性测定

以 citrate- Na_2HPO_4 缓冲液(0.05 mol/L)配制葡萄糖溶液。反应体系中加入终浓度为 0–2 mol/L 的葡萄糖, 在酶的最适反应条件下(如 45 °C、pH 6.5)测定酶活, 以无葡萄糖存在时的酶活为 100%, 计算相对酶活。

1.6 分子对接模拟底物 pNPG 和葡萄糖及酶的结合

1.6.1 受体分子和配体分子的获得及处理

酶分子均用 SWISS MODEL (<http://swissmodel>.)

epasy.org/)在线工具进行同源建模。用 Autodock tool (<https://ccsb.scripps.edu/>)将受体分子进行预处理: 去除水分子、加氢、计算电荷、添加原子类型, 保存为.pdbqt 格式的文件于工作目录下, 备用。

受体分子葡萄糖和 pNPG 在 PDB 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载后, 进行预处理: 调整电荷、判定配体的 root 和选择配体可扭转的键, 保存为.pdbqt 格式的文件于工作目录下, 备用。

1.6.2 分子对接的计算和结果分析

用 Autodock vina (AutoDock Vina scripps.edu)

执行分子对接计算, 用 Pymol (<http://www.pymol.org/>)分析对接结果。通过分析 Vina 对接结果中的亲和力(kcal/mol)来判定突变对葡萄糖结合的影响, 负值越高表明对配体的亲和力越高。

2 结果与分析

2.1 Bgl2A 突变体的设计

Bgl2A 的结构模拟结果显示, 其三维结构具有 GH1 家族典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构。通过序列和结构比对、SCA 分析和结构分析, 共确定 17 个可能间接影响葡萄糖耐受和促活性质的氨基酸残基位点(图 1, 表 1)。

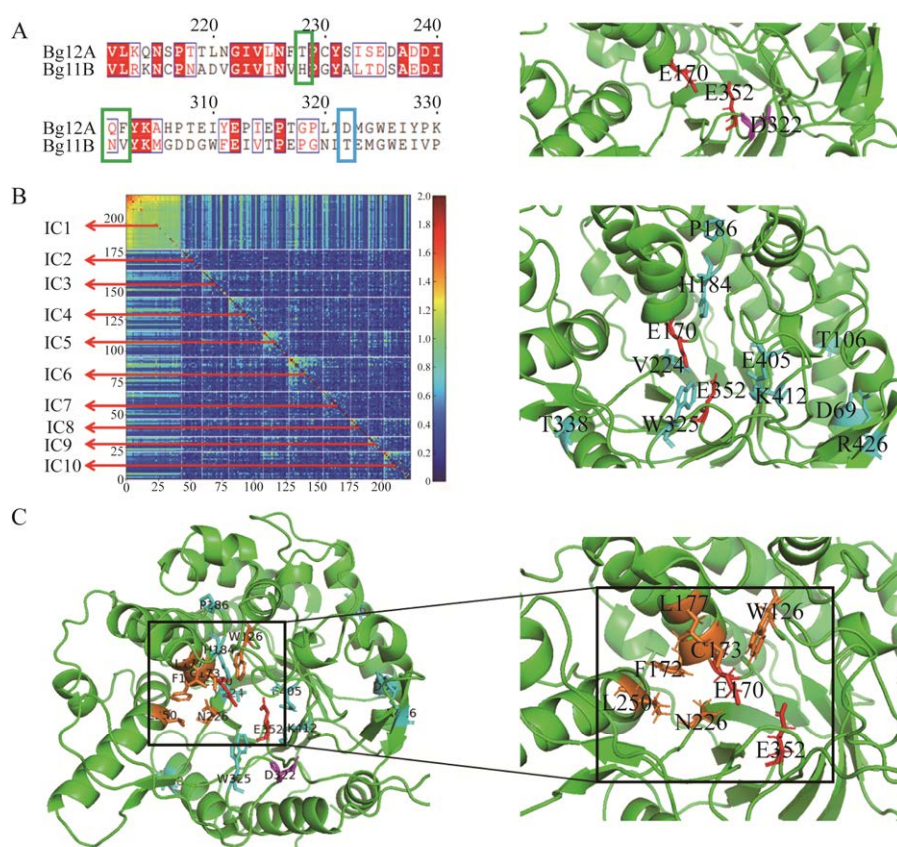


图 1 通过序列和结构比对(A)、SCA 分析(B)和结构分析(C)确定的可能与 Bgl2A 的葡萄糖耐受和促活性性质相关的残基位点

Figure 1 The sites possibly related to the glucose tolerance and promotion of Bgl2A speculated by sequence and structure alignments (A), SCA (B), and structural analysis (C). The sites are colored in purple, blue and brown respectively; Active sites are colored in red. In figure 1A, the sites identified crucial for the glucose tolerance and promotion of Bgl11B are framed in green.

表 1 Bgl2A 的突变设计

Table 1 Mutations designed on Bgl2A

Method	Mutated sites	Mutations
Sequence and structure alignments	D322	D322A, D322F, D322L, D322Y, D322E, D322I, D322Q, D322S, D322T
SCA	D69, T106, H184, P186, V224, T338, E405, R426, K412, W325	D69L, D69R, T106V, H184F, P186D, P186G, P186M, P186F, P186W, V224T, T338E, T338F, E405S, E405T, E405Y, E405W, R426D, R426Y, D69L/R426Y, K412A, K412I, K412W, K412V, K412F, K412L, K412Y, W325A, W325F, W325Y
Structural analysis	W126, F172, L177, C173, N226, L250	W126F, W126Q, W126E, W126Y, F172Q, F172L, F172H, F172R, F172W, F172N, L177A, L177F, L177Y, C173I, C173D, C173V, C173S, C173T, N226V, N226F, N226S, N226D, L250M, L250N, L250H, L250A

依据序列和结构比对, Bgl2A 与 Bgl1B 在底物通道上, 除了前期研究确定的位于中部和入口处的一些位点, 还有一个位于通道口附近的 322 位点残基存在差异, 可能对酶的葡萄糖耐受和促活性质差异也有贡献, 故本研究把 Bgl2A 上该位点的 D 氨基酸突变成 Bgl1B 上的 T 和其他各种性质的代表性氨基酸。

依据 SCA 分析结果显示, β -葡萄糖苷酶可分成 10 个独立分量(IC), 故本研究选取各包含底物通道及活性中心的 IC 中位于蛋白表面的位点进行突变, 研究它们与葡萄糖耐受和促活性质的相关性。突变策略为亲水性氨基酸残基与疏水性氨基酸残基互换, 侧链较大的疏水性氨基酸残基突变为侧链较小的疏水性氨基酸残基。

至于底物通道内可能间接影响葡萄糖结合的位点, 依据结构分析, 选择在 Bgl2A 活性中心周边且侧链指向通道内部的位点, 突变目标氨基酸则主要以性质相近的为主, 性质相反的为辅, 以免因突变造成结构的不稳定。根据以上原则, 共设计突变体 64 个(表 1)。

2.2 Bgl2A 及其突变体的制备和性质

成功构建的 64 个突变体中, P186M 以包涵体的形式表达, 63 个以可溶蛋白形式表达, 13 个无活性, 包括 D69L、D69R、P186D、P186G、

P186F、P186W、E405S、E405T、E405Y、E405W、R426D、R426Y、D69L/R426Y。

通过序列和结构比对分析设计的突变体中, 322 位的疏水氨基酸突变体中多数表现出显著提升的葡萄糖耐受和促活性质, 亲水氨基酸突变体的葡萄糖耐受和促活性质则都与 Bgl2A 相近(图 2)。这可能是因为疏水氨基酸可与葡萄糖直接结合或促进葡萄糖与通道外部位点结合, 减少了葡萄糖与活性中心残基结合, 从而降低对酶活的抑制, 增加了促活作用。

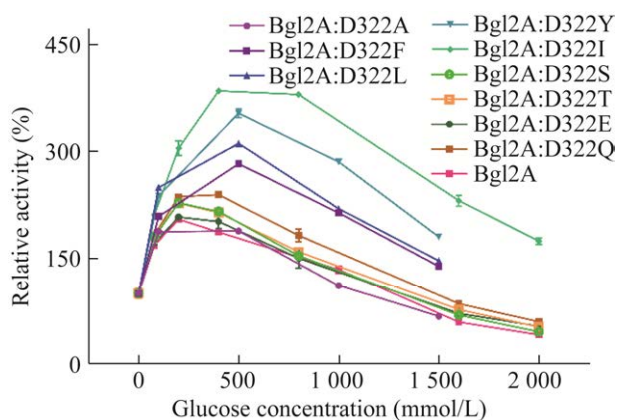


图 2 通过序列结构比对设计的突变体的葡萄糖耐受和促活性质

Figure 2 Effects of glucose on the enzyme activities of Bgl2A and the mutants designed by sequence and structure alignments. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

通过 SCA 分析设计的突变体中, 除 325 位点的 2 个突变体(W325A 和 W325Y)的葡萄糖耐受和促活性显著提升外(图 3A), V224T 和部分 K412 突变体的低于 Bgl2A, 其他均与 Bgl2A 相近。这提示 325 位点所在 IC 可能与 Bgl2A 的葡萄糖耐受和促活性相关。

通过结构分析设计的突变体中, W126Y、F172N、C173I、C173T 和 N226V 相比出发酶具有更好的葡萄糖耐受和促活性(图 4A、4B、4D、4E)。在结构上, W126、F172、C173 和 N226 都距离活性中心比较近, 因此这些突变位点可能通过影响活性中心与葡萄糖的结合改变葡萄糖耐受和促活性。

值得注意的是, 相对于出发酶 Bgl2A, 以上葡萄糖耐受和促活性提升的所有突变体的酶活都有不同程度的下降(表 2), 推测这些突变可能通过影响活性中心改变葡萄糖耐受和促活性, 而不是通过影响通道中部或外部结合葡萄糖的残基位点。

2.3 Bgl2A 及其突变体与葡萄糖和 pNPG 的相互作用

为了探究突变影响 Bgl2A 葡萄糖耐受、促活性和酶活的机制, 本研究通过分子对接模拟了葡萄糖和底物 pNPG 与 Bgl2A 及其突变体之间的相互作用。结果显示, 在突变体中, 葡萄糖结合在活性中心的能量比底物的结合能更

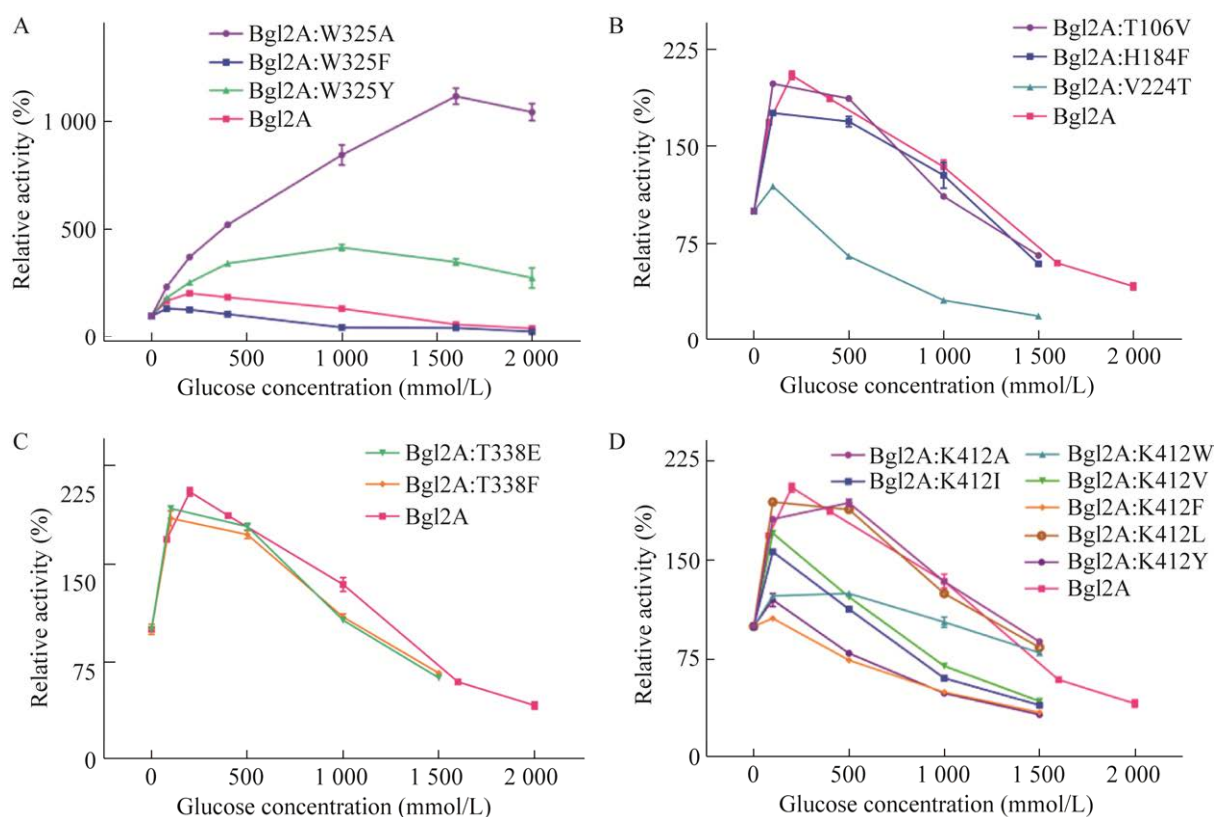


图 3 通过 SCA 分析设计突变体的葡萄糖耐受和促活性

Figure 3 Effects of glucose on the enzyme activities of Bgl2A and the mutants designed by SCA. A: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 325 mutants. B: Effects of glucose on the enzyme activities of the sites 106, 184 and 224 mutants. C: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 338 mutants. D: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 412 mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

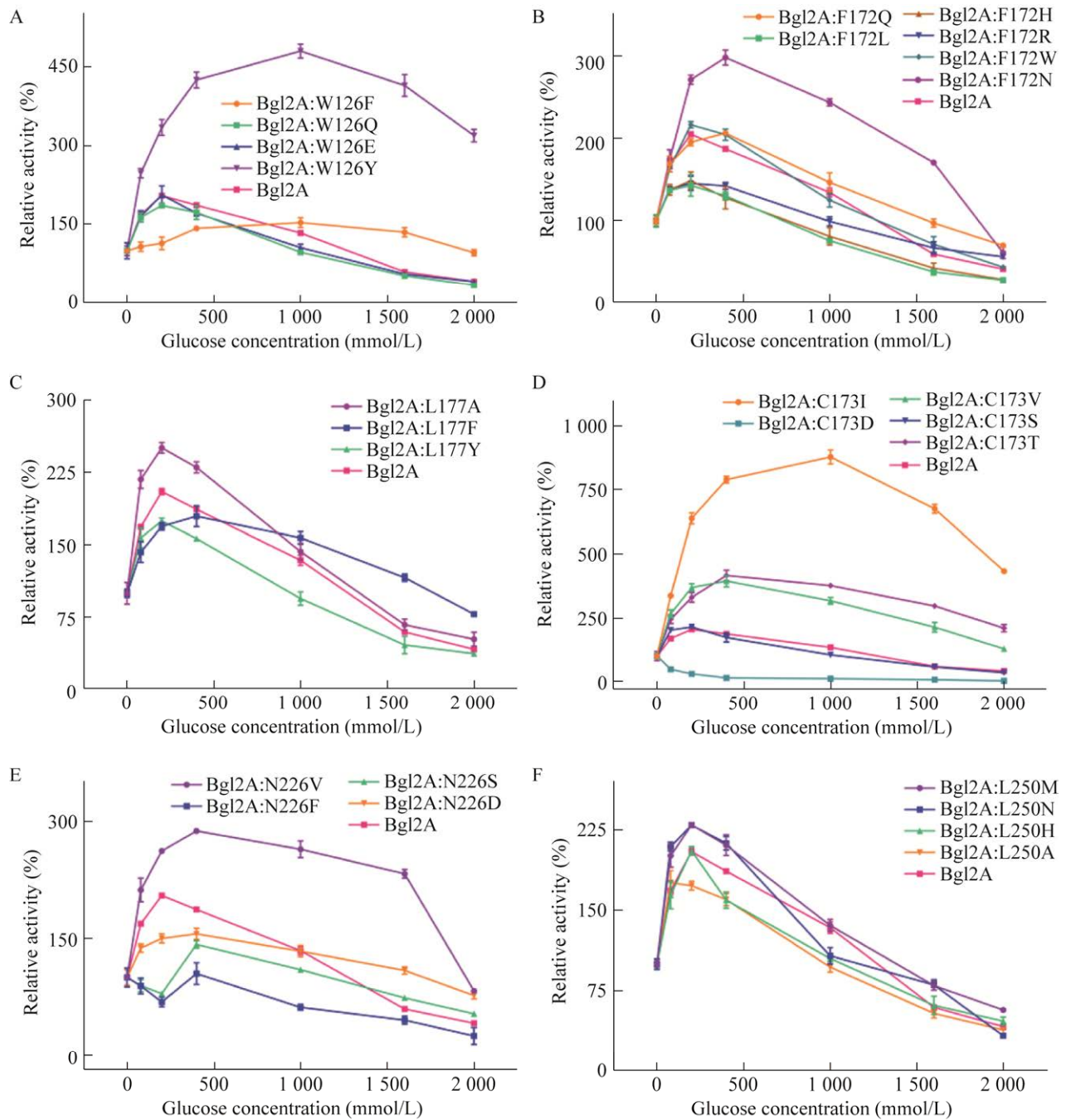


图 4 通过结构分析设计的突变体的葡萄糖耐受和促活性质

Figure 4 Effects of glucose on the enzyme activities of Bgl2A and the mutants designed by structural analysis. A: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 126 mutants. B: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 172 mutants. C: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 177 mutants. D: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 173 mutants. E: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 226 mutants. F: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 250 mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

高,所以对活性的竞争性抑制作用弱,这与它们表现出的葡萄糖耐受和促活性质一致。与 Bgl2A 相比,突变体的葡萄糖结合能升高,底物结合能降低,即葡萄糖的竞争性抑制作用降低,突变体比 Bgl2A 有更高的葡萄糖耐受和促活性质(表 3)。这些结果印证这些突变可能通过影响活性中心改变葡萄糖耐受和促活性质,而不是通过影响通道中部或外部结合葡萄糖的残基位点的推断。

2.4 Bgl3A 及其突变体的制备和性质

因 Bgl2A 上 D322I、D322Y、W325A、W325Y、W126Y、F172N、C173I、C173T 和 N226V 突变体表现出相对较好的葡萄糖耐受和促活性质,故在 Bgl3A 上相应位点构建 9 个突变体。

表 2 Bgl2A 及其突变体对底物 pNPG 的比酶活
Table 2 Specific activities of Bgl2A and mutants toward pNPG

Enzyme	Specific activity to pNPG (U/mg)
Bgl2A	43.33±2.08
Bgl2A:L177F	15.60±0.52
Bgl2A:C173I	0.46±0.93
Bgl2A:N226S	6.50±1.02
Bgl2A:W325A	3.40±0.18
Bgl2A:W325Y	1.70±0.02

表 3 分子对接所得 Bgl2A 及其突变体的活性中心与葡萄糖和 pNPG 的结合能量

Table 3 Binding energies of glucose to the active center of Bgl2A and its mutants

Enzyme	Glucose (kcal/mol)	pNPG (kcal/mol)
Bgl2A	-4.60	-3.57
Bgl2A:W126Y	-3.34	-5.08
Bgl2A:F172N	-3.05	-5.18
Bgl2A:C173I	-3.06	-5.42
Bgl2A:C173T	-3.11	-4.99
Bgl2A:N226V	-3.09	-5.00
Bgl2A:D322I	-3.08	-5.35
Bgl2A:D322Y	-3.00	-5.09
Bgl2A:W325A	-3.05	-5.08
Bgl2A:W325Y	-3.22	-5.18

The lower the score, the higher the affinity.

2.4.1 Bgl3A 及其突变体的葡萄糖耐受和促活性质

Bgl3A 的 9 个突变体都实现了异源表达和性质测定。如图 5 所示,除了 Bgl3A:C173T 和

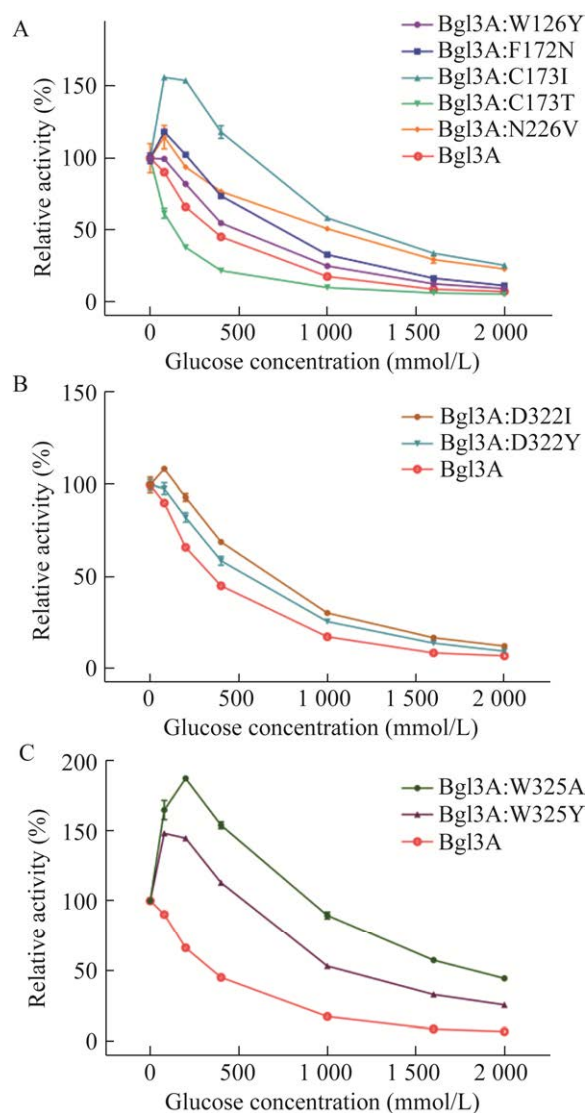


图 5 Bgl3A 及其突变体的葡萄糖耐受性

Figure 5 Effects of glucose on the enzyme activities of Bgl3A and its mutants. A: Effects of glucose on the enzyme activities of the sites 126, 172, 173 and 226 mutants. B: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 322 mutants. C: Effects of glucose on the enzyme activities of the site 325 mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

Bgl3A:W126Y, 其他突变体都表现出比 Bgl3A 更高的葡萄糖耐受性。在 80 mmol/L 葡萄糖存在条件下, Bgl3A:F172N、Bgl3A:D322I 和 Bgl3A:D322Y 的酶活力分别提升至 118%、109%和 105% (图 5A、5B), Bgl3A:C173I 和 Bgl3A:W325Y 的酶活力提升至 156%和 148% (图 5A、5C)。在 200 mmol/L 葡萄糖存在条件下, Bgl3A:W325A 的酶活力提升至 188% (图 5C)。

与 Bgl2A 突变体类似, Bgl3A 突变体的酶活相对于野生型均有所降低(表 4)。

2.4.2 Bgl3A 及其突变体的最适温度及最适 pH

Bgl3A 的最适温度为 45 °C, 而 Bgl3A:W126Y、Bgl3A:C173I、Bgl3A:D322I、Bgl3A:D322Y 等突变酶的最适温度为 40 °C (图 6A、B), Bgl3A:F172N 最适温度为 50 °C (图 6A)。Bgl3A:F172N、Bgl3A:C173T、Bgl3A:N226V、Bgl3A:D322Y 的最适 pH 为 6.5, 与 Bgl3A 相同, 而其他突变酶的最适 pH 则为 7.0 (图 7)。

2.4.3 Bgl3A 及其突变体的稳定性

选取葡萄糖耐受和促活性质提升且酶活较高的部分突变酶 Bgl3A:F172N、Bgl3A:C173I、Bgl3A:N226V, 对其稳定性进行检测。结果显示, 在 35 °C、pH 7.5 条件下, Bgl3A 和 Bgl2A

表 4 Bgl3A 及其突变体对底物 pNPG 的比酶活
Table 4 Specific activities of Bgl3A and mutants toward pNPG

Enzyme	Specific activity (U/mg)
Bgl3A	103.17±33.07
Bgl3A:W126Y	24.04±0.38
Bgl3A:F172N	63.06±22.52
Bgl3A:C173I	41.64±21.69
Bgl3A:C173T	35.02±1.92
Bgl3A:N226V	81.82±29.76
Bgl3A:D322I	52.45±1.37
Bgl3A:D322Y	75.21±2.20
Bgl3A:W325A	5.03±0.23
Bgl3A:W325Y	15.60±4.38

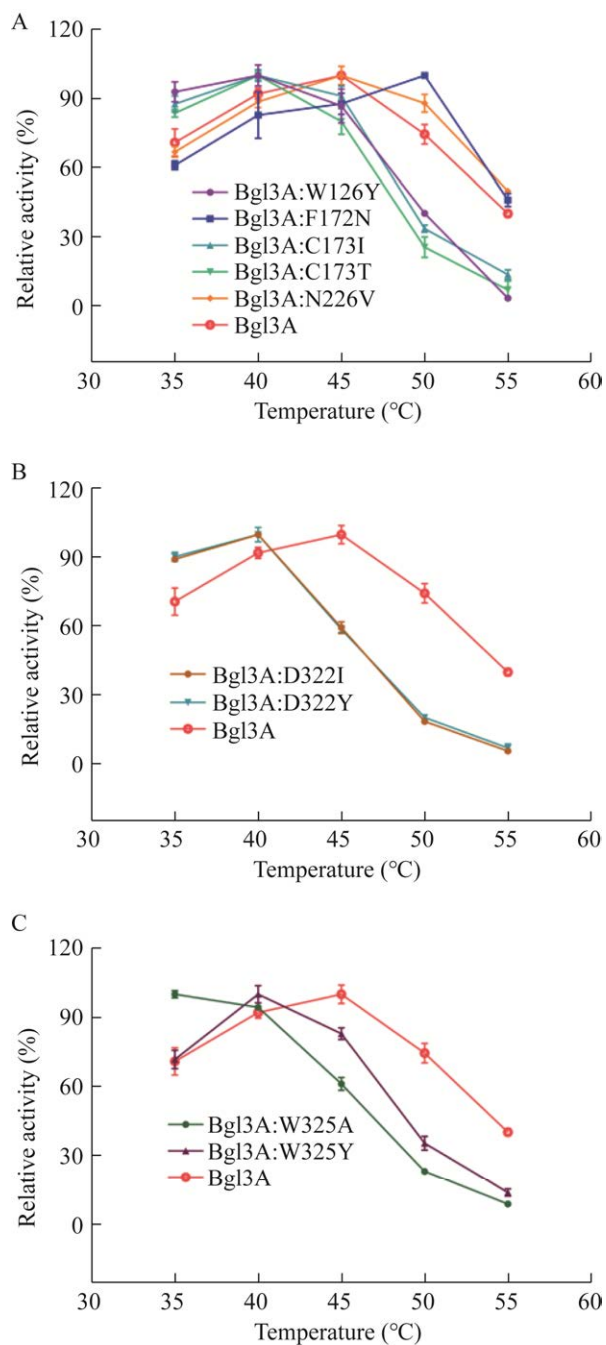


图 6 Bgl3A 及其突变体的最适温度

Figure 6 Optimum temperature of Bgl3A and its mutants. A: Optimum temperature of the sites 126, 172, 173 and 226 mutants. B: Optimum temperature of the site 322 mutants. C: Optimum temperature of the site 325 mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

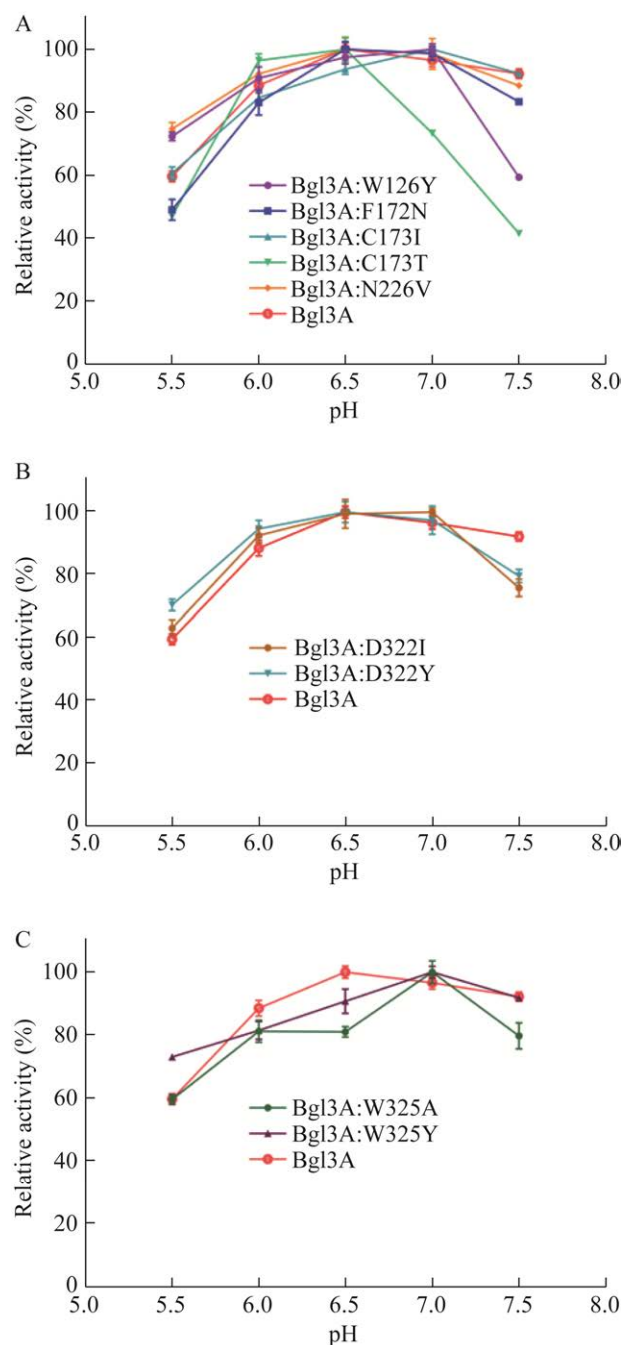


图7 Bgl3A 及其突变体的最适 pH

Figure 7 Optimum pH of Bgl3A and its mutants. A: Optimum pH of the sites 126, 172, 173 and 226 mutants. B: Optimum pH of the site 322 mutants. C: Optimum pH of the site 325 mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

的半衰期分别约为 3 h 和 1.5 h, Bgl3A:F172N 在相同条件下 4 h 仍保持约 80% 的活性, 其稳定性比 Bgl3A 和 Bgl2A 好。相比而言, Bgl3A:N226V 的半衰期约为 1 h, Bgl3A:C173I 则在 2 h 内几乎丧失全部酶活, 二者的稳定性较 Bgl3A 和 Bgl2A 有所降低(图 8)。

3 讨论与结论

本文通过对具有显著葡萄糖耐受和促活性质的 β -葡萄糖苷酶 Bgl2A 的研究, 验证了存在底物通道之外的残基位点可通过远程作用影响这一性质的推断, 并且确定了这些位点的位置。另外, 研究结果还表明这些位点本身不结合葡萄糖, 而是通过改变活性中心与葡萄糖结合的能量, 间接影响酶的葡萄糖耐受和促活性质。这为理性改造不耐受葡萄糖的 Bgl3A, 提升其耐受性甚至赋予其糖促活的性质提供了理论基础, 也证明了这种新的理性改造策略的可行性。因此, 本研究不但加深了对 β -葡萄糖苷酶葡萄糖耐受和促活机制的认识, 还拓宽了 β -葡萄糖苷酶理性改造的思路。

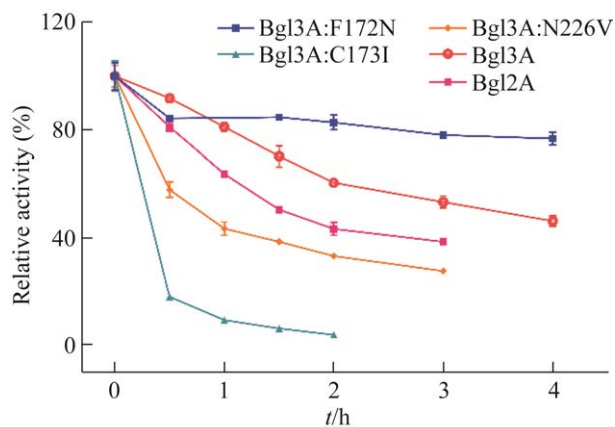


图8 Bgl2A、Bgl3A 及其部分突变体的稳定性

Figure 8 Stability of Bgl2A, Bgl3A and part of its mutants. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

值得注意的是，远离活性中心的残基位点的改变，不但会影响活性中心与葡萄糖的结合，也会同时会影响活性中心与底物的结合，这应是所有突变体都比出发酶的酶活更低的原因。虽然本研究中 Bgl2A 突变体的酶活均有不同程度下降，但是这些突变对其他糖苷酶的糖耐受和促活性质的改造仍有参考价值。大部分 Bgl3A 突变酶表现出提升的葡萄糖耐受和促活性质，验证了此改造策略的可行性。

参考文献

- [1] WÖHLER F, LIEBIG J. Ueber Die bildung des bittermandelöls[J]. *Annalen Der Pharmacie*, 1837, 22(1): 1-24.
- [2] SINGH G, VERMA AK, KUMAR V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(1): 3-16.
- [3] JUNG DH, SEO DH, PARK JH, KIM MJ, BAEK NI, PARK C. Enzymatic synthesis of β -glucosylglycerol and its unnatural glycosides via β -glycosidase and amylosucrase[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(4): 562-570.
- [4] RYE CS, WITHERS SG. Glycosidase mechanisms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4(5): 573-580.
- [5] GUTIERREZ-GUTIERREZ DA, FUENTES-GARIBAY JA, VIADER-SALVADÓ JM, GUERRERO-OLAZARÁN M. Biochemical characterization of the β -glucosidase Glu1B from *Coptotermes formosanus* produced in *Pichia pastoris*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 163: 110155-110164.
- [6] ZHANG XM, CHEN FY, HE C, FANG W, FANG ZM, ZHANG XC, WANG XT, XIAO YZ. Improving the thermostability of a GH97 dextran glucosidase by rational design[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(11): 2211-2221.
- [7] MAICAS S, MATEO JJ. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(3): 322-335.
- [8] XU YH, FENG XD, JIA JT, CHEN XY, JIANG T, RASOOL A, LV B, QU LT, LI C. A novel β -glucuronidase from *Talaromyces pinophilus* Li-93 precisely hydrolyzes glycyrrhizin into glycyrrhetic acid 3-O-mono- β -D-glucuronide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): e00755-e00718.
- [9] SINGHANIA RR, PATEL AK, PANDEY A, GANANSOUNOU E. Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1352-1361.
- [10] SALGADO JCS, MELEIRO LP, CARLI S, WARD RJ. Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases-a review[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 267: 704-713.
- [11] CAO LC, CHEN R, HUANG X, LI SF, ZHANG SF, YANG XP, QIN ZM, KONG W, XIE W, LIU YH. Engineering of β -glucosidase Bgl15 with simultaneously enhanced glucose tolerance and thermostability to improve its performance in high-solid cellulose hydrolysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(19): 5391-5401.
- [12] YANG Y, ZHANG XX, YIN Q, FANG W, FANG ZM, WANG XT, ZHANG XC, XIAO YZ. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17296-17307.
- [13] PANG PJ, CAO LC, LIU YH, XIE W, WANG Z. Structures of a glucose-tolerant β -glucosidase provide insights into its mechanism[J]. *Journal of Structural Biology*, 2017, 198(3): 154-162.
- [14] ARIAENEJAD S, NOOSHI-NEDAMANI S, RAHBAN M, KAVOUSI K, PIRBALOOTI AG, MIRGHADERI S, MOHAMMADI M, MIRZAEI M, SALEKDEH GH. A novel high glucose-tolerant β -glucosidase: targeted computational approach for metagenomic screening[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 813-826.
- [15] de GIUSEPPE PO, SOUZA TACB, SOUZA FHM, ZANPHORLIN LM, MACHADO CB, WARD RJ, JORGE JA, FURRIEL RPM, MURAKAMI MT. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2014, 70(Pt 6): 1631-1639.
- [16] WOOD TM, MCCRAE SI. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*[J]. *Microbiology*, 1982, 128(12): 2973-2982.
- [17] SINHA SK, DATTA S. β -glucosidase from the

hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. is a salt-tolerant enzyme that is stabilized by its reaction product glucose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8399-8409.

- [18] MATSUZAWA T, JO T, UCHIYAMA T, MANNINEN JA, ARAKAWA T, MIYAZAKI K, FUSHINOBU S, YAOI K. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2[J]. *The FEBS Journal*, 2016, 283(12): 2340-2353.
- [19] LIU Y, LI R, WANG J, ZHANG XH, JIA R, GAO Y, PENG H. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13^T[J]. *BMC Biochemistry*, 2017, 18(1): 4-11.
- [20] UCHIYAMA T, YAOI K, MIYAZAKI K. Glucose-tolerant β -glucosidase retrieved from a Kusaya gravy metagenome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 548-556.
- [21] MALLEK-FAKHFAKH H, BELGHITH H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 419: 41-50.
- [22] CHRISTAKOPOULOS P, GOODENOUGH PW, KEKOS D, MACRIS BJ, CLAEYSSSENS M, BHAT MK. Purification and characterisation of an extracellular beta-glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224(2): 379-385.
- [23] HALABI N, RIVOIRE O, LEIBLER S, RANGANATHAN R. Protein sectors: evolutionary units of three-dimensional structure[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 774-786.
- [24] SUN JJ, WANG W, YING Y, HAO JH. A novel glucose-tolerant GH1 β -glucosidase and improvement of its glucose tolerance using site-directed mutation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 192(3): 999-1015.

肖亚中, 博士, 安徽大学二级教授, 博士生导师。主要从事微生物学、酶与酶工程学等研究。主持国家自然科学基金联合基金重点、国家重点研发计划课题、863计划课题等研究 20 余项。以第一或责任作者等在国内外学术期刊发表论文 100 余篇, 主译出版学术专著 1 部, 申报国家发明专利 30 余件, 获发明专利授权 25 件, 牵头获安徽省科学技术奖 3 项。

