



差异柠檬酸杆菌 GXW-1 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及分子改造

江民华^{1,3}, 林厚民¹, 尹金阳¹, 王子龙¹, 庞浩², 黄日波¹, 杜丽琴^{1*}

¹ 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

² 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物科学与技术研究中心, 广西科学院, 广西 南宁 530007

³ 广东溢多利生物科技股份有限公司, 广东 珠海 519060

摘要:【目的】筛选鉴定 1 株产 β -葡萄糖苷酶的菌株, 克隆、表达该菌株中的 β -葡萄糖苷酶基因, 研究重组酶的酶学性质并进行分子改造。【方法】在自然界中采集土样, 筛选到 1 株具有 β -葡萄糖苷酶活性的菌株, 对野生菌进行 16S rDNA 鉴定, 比对分析 GenBank 数据库中与野生菌同属的 β -葡萄糖苷酶基因序列, 设计简并引物 PCR 扩增基因保守区; 设计引物扩增目的基因, 以 pQE30 为表达载体构建重组质粒, 转化至大肠杆菌中进行诱导表达; 采用镍亲和层析对重组酶进行纯化, 研究其酶学性质; 采用易错 PCR 和定点随机突变相结合的方法对野生型 β -葡萄糖苷酶进行分子改造。【结果】一个来自于差异柠檬酸杆菌 GXW-1 的 β -葡萄糖苷酶基因被克隆并在大肠杆菌中表达。酶学性质研究结果表明该 β -葡萄糖苷酶 CBGL 的最适温度为 45 °C, 最适 pH 为 6.0, V_{\max} 值是(0.1704±0.0073) $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, K_{cat} 值为(0.2380±0.0102)/s。CBGL 能水解 α -pNPG、甜菊苷、黄豆苷和染料木苷。对野生酶进行分子改造, 获得 V_{\max} 是野生酶 2.54 倍的突变体 W147F。【结论】CBGL 不仅具有 β -1,4-糖苷键水解能力, 还可能具有一定的 α -糖苷键水解酶活性。此外, CBGL 还能够水解天然底物甜菊苷、黄豆苷和染料木苷。这些特性表明该 β -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: 差异柠檬酸杆菌 GXW-1, β -葡萄糖苷酶, 酶学性质, 酶分子改造

β -葡萄糖苷酶属于糖苷水解酶, 可将 β -葡萄糖苷键的非还原端水解, 释放出糖基配体和 β -D-葡萄糖。 β -葡萄糖苷酶对纤维素的彻底降解起着至关重要的作用, β -葡萄糖苷酶来源广泛, 包括微生物、植物和动物等。植物的 β -葡萄糖苷酶活

性较高, 最适催化温度相对较高, 在工业生产中得到更多的应用; 原核生物的 β -葡萄糖苷酶多被运用于科学研究, 该类 β -葡萄糖苷酶易于获得, 但是酶活性普遍偏低^[1]。

β -葡萄糖苷酶具有广泛的应用价值。在能源

基金项目: 国家自然科学基金(31360369, 21366007); 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118097, 2014GXNSFAA118078); 广西主席基金[桂财教函(2015)284号]

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

收稿日期: 2016-06-21; 修回日期: 2016-11-02; 网络出版日期: 2016-11-15

方面,可参与生物质的降解,用于制备纤维素乙醇燃料^[2],纤维素是由多个葡萄糖分子以 β -1,4-糖苷键联结成的多糖类物质,它的彻底降解需要多种酶相互作用, β -葡萄糖苷酶是纤维素最终彻底降解为葡萄糖所必需的一个关键酶,人为添加高活性的 β -葡萄糖苷酶可有效提高纤维素的降解效率^[3],使纤维素乙醇燃料的得率提高;食品方面, β -葡萄糖苷酶可用于果酒增香、脱苦,提高茶叶香味等^[4];医药方面, β -葡萄糖苷酶可用于生产大豆异黄酮苷元^[5]和甜茶苷^[6]等;另外, β -葡萄糖苷酶底物特异性^[7]、转糖苷功能^[8]和葡萄糖耐受性^[9]等也备受关注。深入了解 β -葡萄糖苷酶的性质,挖掘其潜在的应用价值对现实有重要的指导意义。

本研究利用选择平板从广西武鸣糖厂周围的土壤中筛选到1株产 β -葡萄糖苷酶的菌株,然后通过16S rDNA序列分析对筛选到的菌株进行鉴定。对GenBank数据库中来自同属的 β -葡萄糖苷酶基因进行比对分析,设计简并引物扩增得到菌株中的目标 β -葡萄糖苷酶基因。然后,在大肠杆菌中进行克隆和表达,研究重组酶的酶学性质。最后,结合易错PCR和定点随机突变对目的 β -葡萄糖苷酶进行分子改造。

1 材料和方法

1.1 菌株

差异柠檬酸杆菌(*Citrobacter koser*) GXW-1由本研究筛选所得,大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1-blue购自TaKaRa公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*) M15、质粒pQE30购自Qiagen公司。

1.2 材料

本研究所用PCR扩增聚合酶、限制性内切酶以及DNA连接酶等均购自大连TaKaRa公司;

Ni-NTA购自Qiagen公司;BioSpin PCR Purification Kit、BioSpin Gel Extraction Kit、BioSpin Plasmid DNA Extraction Kit等购自BioFlux公司;pNPG及各对硝基苯基底物等均购自Sigma公司;二糖和多糖及其它试剂均为国产分析纯。

1.3 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及系统发育分析

在广西武鸣糖厂周围采集土样,利用七叶苷-柠檬酸铁铵选择平板筛选产 β -葡萄糖苷酶的菌株。根据文献已经报道的16S rDNA基因的保守序列合成引物^[10],PCR扩增菌株GXW-1的16S rDNA。PCR的反应程序:94 °C 2 min;94 °C 40 s,56 °C 30 s,72 °C 2 min,30个循环;72 °C 10 min。PCR产物连接至载体pMD19-T,转化到大肠杆菌中,送去北京华大基因研究中心进行测序。使用生物软件MAGA 5.0 (Molecular evolutionary genetics analysis)对16S rDNA序列进行分析并建立进化树。

1.4 GXW-1 β -葡萄糖苷酶基因保守区序列的扩增

于GenBank数据库中查找与差异柠檬酸杆菌同属的 β -葡萄糖苷酶基因,分析它们所编码的蛋白质的结构组件,根据蛋白质结构组件的不同进行分类,用生物软件VECTOR NTI Advance 11.5对基因序列进行比对分析,查找同源区并最终设计简并引物:上游引物C-1:5'-CCGAAAGAAGCCATCCGNGAGATGAT-3',下游引物C-2:5'-ATCGGGAAGCTNACGGTCTG-3'。PCR的反应程序:94 °C 2 min;94 °C 10 s,57.5 °C 30 s,72 °C 150 s,30个循环;72 °C 10 min。PCR扩增出的DNA片段连接至载体pMD19-T,转化到大肠杆菌中,进行测序。使用生物软件Vector NTI Advance 11.5对DNA序列进行分析,于NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中对序列进行BLAST比对分析。

1.5 GXW-1 β -葡萄糖苷酶基因的扩增

根据保守区的比对分析结果, 设计引物 PCR 扩增 β -葡萄糖苷酶基因 *cbgl*: 上游引物 *cbgl*-1: 5'-ATAGGATCCGAAGCGTTGTCTGGCAACCATCCGC-3' (引入 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物 *cbgl*-2: 5'-GCGAAGCTTCTACTACAGCAGTTCAAACCTCGCCCTGC-3' (引入 *Hind* III 酶切位点)。PCR 反应程序同 1.4。扩增的目的片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的表达载体 pQE30 连接, 转化到大肠杆菌菌株 XL1-blue 中, 进行测序。将成功构建的重组质粒命名为 pQE-*cbgl*。

1.6 重组酶 CBGL 的诱导表达和纯化

将重组质粒 pQE-*cbgl* 转化到大肠杆菌 M15 中, 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.6, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 同时添加山梨醇(终浓度为 100 mmol/L)、甜菜碱(终浓度为 2.5 mmol/L), 摸索诱导表达条件。在最佳诱导表达条件下培养菌体, 超声波破胞后镍亲和层析 Ni-NTA 纯化重组酶 CBGL。对纯化的重组酶 CBGL 进行变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(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)。

1.7 重组酶 CBGL 酶学性质的研究

β -葡萄糖苷酶酶活力单位(U)的定义: 在酶的最适反应条件下, 每 1 min 水解 pNPG 释放 1 μ mol pNP 所需的酶量。

CBGL 酶活测定方法: 取 14 μ L 25 mmol/L pNPG (终浓度为 2.5 mmol/L) 与最适的 116 μ L 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液混合, 最适反应温度下预热 5 min, 加入 10 μ L 已稀释适当倍数的酶, 反应 20 min, 用 70 μ L 0.4 mol/L

Na_2CO_3 溶液对反应进行终止。取 200 μ L 反应液至酶标板, 于酶标仪读取其 OD_{410} 。

以牛血清白蛋白为标准品, 参照 Bradford 法^[11]来测定纯化的蛋白质浓度。

所有实验均做 3 个平行实验。

1.8 CBGL 的分子改造

采用易错 PCR 和定点随机突变相结合的方法对 CBGL 进行分子改造。

易错 PCR: 所用引物为 *cbgl*-1 和 *cbgl*-2, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的终浓度分别为 0.70 mmol/L 和 0.05 mmol/L, 反应程序如 1.4, T_m 值为 52.5 °C。

定点随机突变引物如下。W147-f: 5'-AACATG ACCNNNGCGCCGATGGTG-3'; W147-r: 5'-GGTC ATGTTCAGGCCATCGTCAGC-3'; D557-f: 5'-GAT CAGCAGGCTNNNGCCATTCTG-3'; D557-r: 5'-G GTTTCCAGAATGGCNNNAGCCT-3'。

参照 1.6 中的方法对突变体进行诱导表达和纯化, 参照 1.7 中的方法测定突变体的酶学性质。

1.9 基因的核苷酸序列号

将来自差异柠檬酸杆菌(*C. koser*) GXW-1 基因 *cbgl* 的核苷酸序列上传到 GenBank 数据库中, 得到基因的序列号为 KX 394622。

2 结果和讨论

2.1 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及系统发育分析

根据 1.3 中的方法利用七叶苷-柠檬酸铁铵选择平板筛选到 1 株具有 β -葡萄糖苷酶活性的菌株 GXW-1(图 1-A), 以菌株 GXW-1 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出 16S rDNA 序列, 其大小约 1.5 kb。将测序结果于 NCBI 中进行 BLASTn 比对, 菌株 GXW-1 与 *Citrobacter koser* 的 16S rDNA 基因序列相似性达 99%, 并将 GXW-1 与亲缘关系最

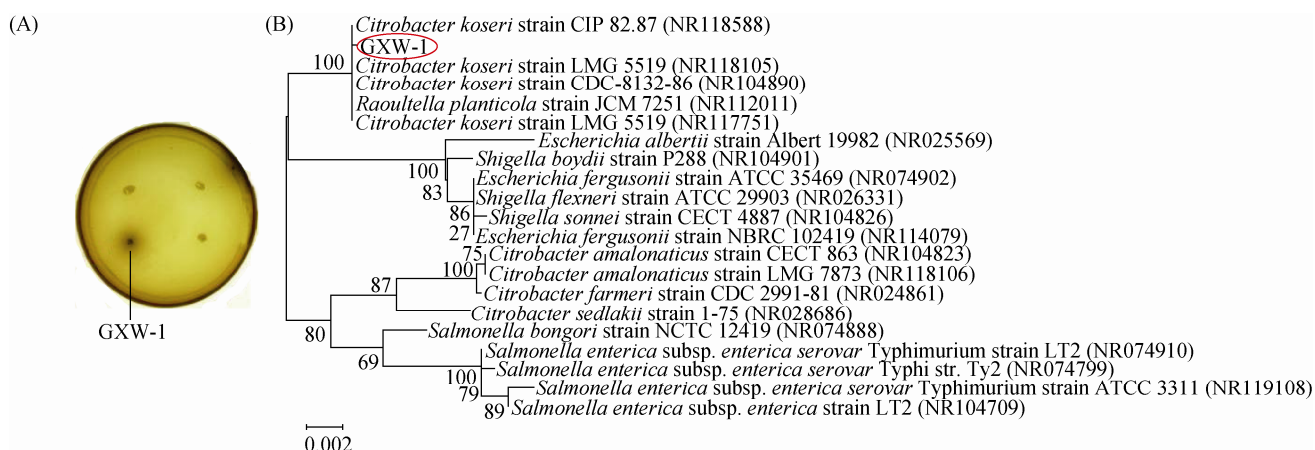


图 1. 菌株 GXW-1 的筛选及其 16S rDNA 进化树分析

Figure 1. Strain GXW-1 and the phylogenetic analysis of 16S rDNA of GXW-1. A: strain GXW-1; B: the phylogenetic analysis of 16S rDNA of GXW-1. Phylogenetic tree was inferred using the Neighbor-Joining method in MEGA 5.2. The GenBank accession numbers are given in parentheses; numbers at branching points are bootstrap values. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position.

近的 19 个菌株建立进化树(图 1-B), 结果显示 GXW-1 与 *Citrobacter koser* ATCC BAA-895 亲缘关系最近, 鉴定菌株 GXW-1 属于 *Citrobacter koser*, 将其命名为差异柠檬酸杆菌 GXW-1。

2.2 GXW-1 β -葡萄糖苷酶 *cbgl* 保守区和 *cbgl* 的扩增

利用引物 C-1 和 C-2 扩增基因的保守区, 保守区大小约为 2.0 kb。将测序结果于 NCBI 中进行 BLASTx 比对分析, 发现它与 *Citrobacter koser* ATCC BAA-895 的一个假定蛋白同源性最高, 约 99%。

利用引物 *cbgl*-1 和 *cbgl*-2 PCR 扩增出目的基因, 获得大小约为 2.3 kb 的 DNA 条带。对测序结果分析发现成功克隆到 1 个 β -葡萄糖苷酶基因, 命名为 *cbgl*。 *cbgl* 基因大小为 2298 bp, 预计蛋白分子量约为 83 kDa, 将 *cbgl* 所编码的蛋白质命名为 CBGL。对 *cbgl* 编码的氨基酸序列进行 SMART 分析, 发现 CBGL 含典型的 GH3 家族功能域。

2.3 重组蛋白 CBGL 的诱导表达和纯化

将重组质粒 pQE-*cbgl* 转入大肠杆菌 M15 中进行诱导表达, 镍亲和层析纯化目的蛋白 CBGL。对纯化产物进行 SDS-PAGE 分析, 发现在约 83 kDa 处有明显的蛋白质特征性条带(图 2-A), 其分子量与理论分子量一致。对 CBGL 进行酶谱分析, 经七叶苷-柠檬酸铁铵活性染色后, 在相应的位置出现了明显的黑色条带(图 2-B), 说明纯化到的 CBGL 具有 β -葡萄糖苷酶活性。

2.4 重组蛋白 CBGL 的酶学性质研究

2.4.1 温度和 pH 对 CBGL 的影响:

在 pH 7.0 条件下, 测定 CBGL 在不同温度(30、35、40、45、50、55 °C)下的酶活力, 其最适温度为 45 °C, 在 40–50 °C 之间保留 50% 以上的活力, 当温度上升到 55 °C 时活性急剧下降(图 3-A)。纯酶分别于 20、25、30、35、40、45 °C 中保温 1 h 后, 最适反应条件下测定 CBGL 的残余活力, 并以在 4 °C 保存的重组酶的酶活为对照, 在 20–40 °C 之间, CBGL 保持有 60% 以上的活力(图 3-B), 当温度在 40 °C

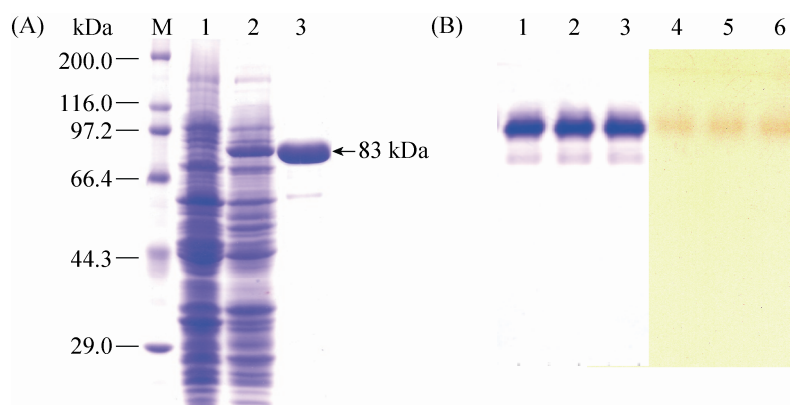


图 2. 重组蛋白 CBGL 的 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE and native-PAGE analysis of recombinant protein CBGL. A: SDS-PAGE of recombinant protein CBGL. M: protein marker; lane 1: *E. coli* M15 with pQE30; lane 2: recombinant *E. coli* M15 with pQE-*cbgl*; lane 3: purified protein CBGL. B: Native-PAGE of purified CBGL. lane 1–3: CBGL stained with coomassie brilliant blue; lane 4–6: CBGL stained with 0.2% esculin - 0.5% ferric ammonium citrate.

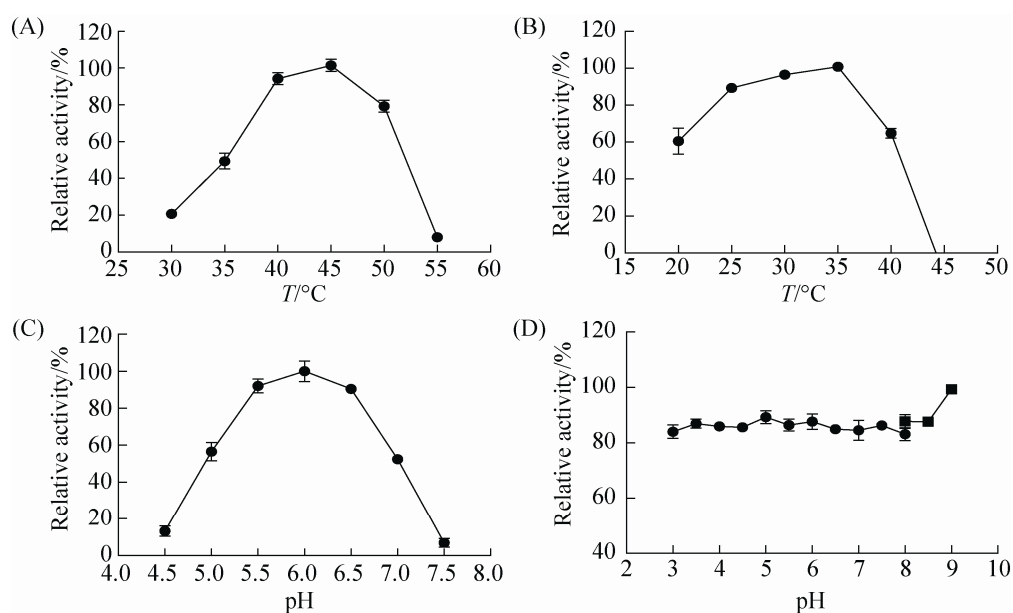


图 3. 温度和 pH 对重组蛋白 CBGL 活性的影响

Figure 3. Effect of temperature and pH on recombinant enzyme activity. A: effect of temperature on CBGL enzyme activity; B: thermal stability of CBGL; C: effect of pH on CBGL enzyme activity; D: pH stability of CBGL.

以上, 其酶活急剧下降。β-葡萄糖苷酶的最适温度大多分布在 40–110 °C 之间^[12]。CBGL 的热稳定性较差, 酶的热稳定性与酶蛋白本身的特性相关, 不同酶之间具有明显的差异。如来源于 *Neosartorya fischeri* P1 的 β-葡萄糖苷酶 NfBGL 与 CBGL 的热稳

定性相似, NfBGL 的最适温度为 80 °C, 但在 80 °C 保温 1 h 后, 残余活性小于原始酶活的 20%^[13]。

在最适温度下, 测定 CBGL 在不同 pH (4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 条件下的酶活力, 其最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–7.0 之间保留 50% 以

上的活力,当 pH 在 5.0 以下和 7.0 以上酶活性急剧下降(图 3-C)。纯酶分别保存于不同的 pH(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)缓冲液中 12 h 后,最适反应条件下测定 CBGL 的残余酶活,CBGL 基本都能保持 80%以上的活力(图 3-D),CBGL 的 pH 稳定性较好。虽然大部分 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 大多在 3.5 到 6.5 之间,可是它们都具有良好的酸碱耐受性^[12]。

2.4.2 CBGL 的 K_m 和 V_{max} 测定:将 CBGL 与一系列不同浓度的 p NPG (浓度为 2.5 mmol/L 至 22.5 mmol/L)进行反应,利用 GraphPad Prism 软件计算出 CBGL 的 K_m 和 V_{max} 值。反应结果具有典型的米氏动力学特性(图 4)。CBGL 的 K_m 值为

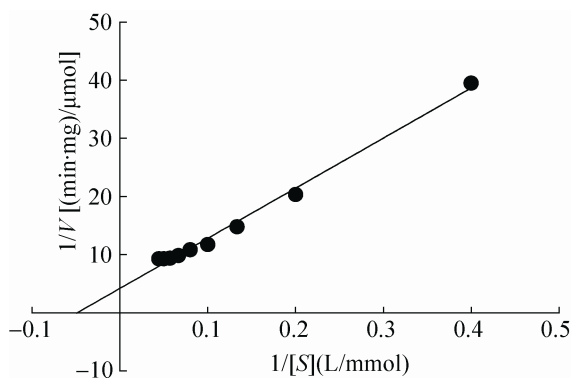


图 4. 重组酶 CBGL 的 K_m 和 V_{max} 值
Figure 4. K_m and V_{max} values of recombinant CBGL.

(11.280±1.073) mmol/L、 V_{max} 值是(0.1704±0.0073) $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, K_{cat} 值为(0.2380±0.0102)/s。

2.4.3 CBGL 的葡萄糖耐受性和葡萄糖抑制常数 K_i 值的测定:测定不同浓度(0–30 mmol/L)的葡萄糖对 CBGL 活力的影响。葡萄糖浓度在 5–25 mmol/L 之间,CBGL 基本都能保持 60%以上的活力,随着葡萄糖浓度增加,其活力逐渐下降(图 5-A)。参考 $K_{M,APP}$ ^[14]法,在反应体系中分别添加不同浓度(0、20、35 mmol/L)的葡萄糖,测定在不同浓度的 p NPG 下 CBGL 的酶活力(图 5-B),利用 GraphPad Prism 软件计算出 CBGL 的 K_i 值为(66.84±3.40) mmol/L。

近年来发现对葡萄糖耐受性较好的 β -葡萄糖苷酶大多来源于真菌,但目前为止,对于 β -葡萄糖苷酶葡萄糖耐受性的结构理论尚不明确,然而通过结构比对分析发现,一般情况下 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受性较差^[15], K_i 值一般在 0.1–100.0 mmol/L^[16],本研究表达的 CBGL 的 K_i 值大小与 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的普遍现象相符。

2.4.4 CBGL 底物特异性的测定:分别以终浓度为 2.5 mmol/L 的人工底物(α - p NPG、 p NP-galac、 p NPX、 o NPG、 p NPA)和 1% (W/V)的二糖和多糖(纤维二糖、乳糖、水杨苷、苦杏仁苷、蔗糖、麦芽糖、异麦芽糖、海藻糖、木聚糖、羧甲基纤维素

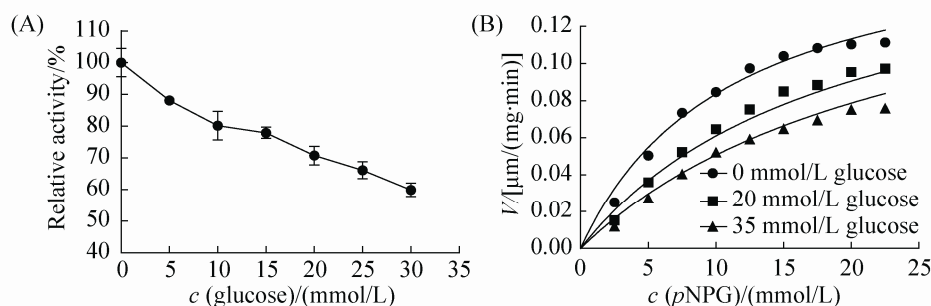


图 5. CBGL 的葡萄糖耐受性和葡萄糖抑制常数 K_i 的测定

Figure 5. Glucose tolerance and glucose inhibition constant K_i of CBGL. Each data point represents the mean±SD of three independent experiments.

(CMC)为底物, 检测 CBGL 对它们的水解能力。CBGL 除了能水解 *p*NPG 外, 还能水解人工底物 α -*p*NPG, 其相对活力是 *p*NPG 的 22%, 说明 CBGL 不仅对 β -1,4-糖苷键有水解能力, 还可能具有一定的 α -糖苷键水解酶活性。而 CBGL 对 *p*NP-galac、*p*NPX、*o*NPG、*p*NPA 及二糖和多糖没有表现出水解活性(表 1)。

CBGL 是目前研究中较为少见的能同时水解 β -糖苷键、 α -糖苷键的 β -葡萄糖苷酶。2015 年, Justo 等^[17]从 *Caulobacter crescentus* 中克隆到 1 个比较少见的兼具 β -葡萄糖苷酶 [V_{\max} 为 (0.041 ± 0.002) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]、 β -木糖苷酶 [V_{\max} 为 (0.055 ± 0.002) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] 和 α -阿拉伯糖苷酶 [V_{\max} 为 (0.0910 ± 0.0004) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] 3 种酶活的多功能酶, 是较为少见的能同时水解 β -糖苷键、 α -糖苷

键的 β -葡萄糖苷酶, 但该酶和 CBGL 一样都是酶活普遍偏低。

分别以终浓度为 1% 的瑞鲍迪苷 A、甜菊苷、甜茶苷、甜菊双糖苷为底物, 加入纯酶于最适条件下反应 12 h, 对水解产物进行 HPLC 分析, 研究了 CBGL 对甜菊糖苷类底物的水解活性。

CBGL 能够将甜菊苷部分水解, 生成甜茶苷(图 6-C)。目前已报道能水解甜菊糖苷的 β -葡萄糖苷酶有 5 个, 分别为来自 *Clavibacter michiganense* 的 CMGase^[18]、来自 *Flavobacterium johnsoniae* 的 FJGase^[19]、来自 *Aspergillus aculeatus* 的 SSGase^[20]、来自 *Penicillium decumbens* 的 SPGase^[21] 及来自 *Streptomyces* sp. GXT6 的 BGL1^[6], 它们对甜菊苷

表 1. CBGL 的底物特异性分析

Table 1. Analysis of the CBGL on substrates specificity

Substrates	$V/[\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})]$	Relative activity
Artificial substrates		
<i>p</i> NPG	0.027150	100%
α - <i>p</i> NPG	0.005973	22%
<i>p</i> NP-galac/ <i>p</i> NPX/ <i>o</i> NPG/ <i>p</i> NPA	—	—
Disaccharide		
Cellobiose	—	—
Lactose	—	—
Salicin	—	—
Amygdalin	—	—
Sucrose	—	—
Maltose	—	—
Isomaltose	—	—
Trehalose	—	—
Polysaccharide		
Xylan	—	—
CMC	—	—
Soluble starch	—	—

—: The substrate can't be hydrolyzed.

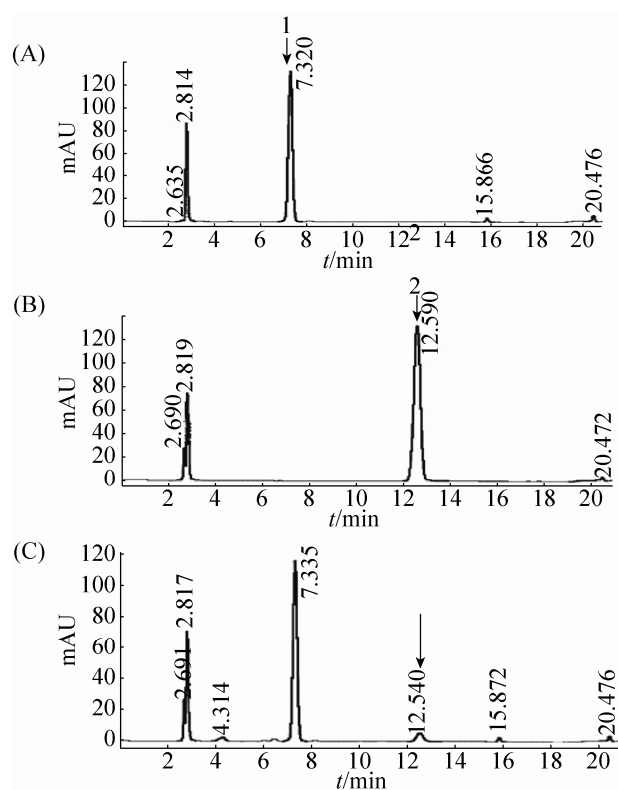


图 6. 甜菊苷水解产物的 HPLC 分析

Figure 6. HPLC analysis of the products from stevioside hydrolysis. A: standard stevioside; B: standard rubusoside; C: hydrolysis reaction of stevioside (12 h).

都具有水解活性,主要区别就是能否水解 C-19 的糖酯键和 C-13 位的糖苷键及水解 C-19 糖酯键和 C-13 位糖苷键的先后顺序的不同,其中,CMGase 能够水解甜菊苷、甜茶苷和甜菊单糖酯 C-19 位的葡萄糖酯键;FJGase 的底物特异性与 CMGase 相似,能够水解甜菊苷、甜茶苷和甜菊单糖酯 C-19 位的葡萄糖酯键;SPGase 可以催化水解包括甜菊苷、甜茶苷、甜菊单糖苷和甜菊单糖酯在内的所有与甜菊醇相连的葡萄糖苷键和葡萄糖酯键,是唯一一个能够独立完成甜菊苷水解来生产甜菊醇的酶;SSGase 能够水解甜菊苷和甜茶苷 C-13 位的糖苷键;BGL1 能水解甜菊苷和甜菊双糖苷 C-13 位的糖苷键。本研究表达的 β -葡萄糖苷酶 CBGL 只能水解甜菊苷 C-13 位上的糖苷键,生成甜茶苷。CBGL 虽然能将甜菊苷部分水解,但活性较低,目前已报道对甜菊苷催化效率较高的 β -葡萄糖苷酶分别来自 *S. sp.* GXT6 和 *A. aculeatus*, K_{cat}/K_m 分别为 9.0 L/(mmol·s)和 8.5 L/(mmol·s)。

分别以终浓度为 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 底物的黄豆苷、染料木苷为底物,加入纯酶于最适反应条件下反应 1 h 或 12 h,然后对水解产物进行 HPLC 分析,研究了 CBGL 对大豆异黄酮中主要成份黄豆苷和染料木苷的水解活性。

CBGL 作用黄豆苷 1 h,有部分黄豆苷水解生成黄豆苷元(图 7-B) 随着反应时间的延长至 12 h,黄豆苷完全被水解为黄豆苷元(图 7-C); CBGL 在对染料木苷作用了 12 h 后只能部分水解染料木苷,生成染料木素(图 7-D)。大豆异黄酮在大豆等中主要以糖苷形式存在,但其苷元形式更易于人体吸收。 β -葡萄糖苷酶可水解大豆异黄酮,释放出游离的大豆异黄酮苷元,这些游离的苷元可被小肠壁吸收,提高机体对大豆异黄酮的吸收率,大豆异黄酮的结构和雌激素的结构非常相似,摄

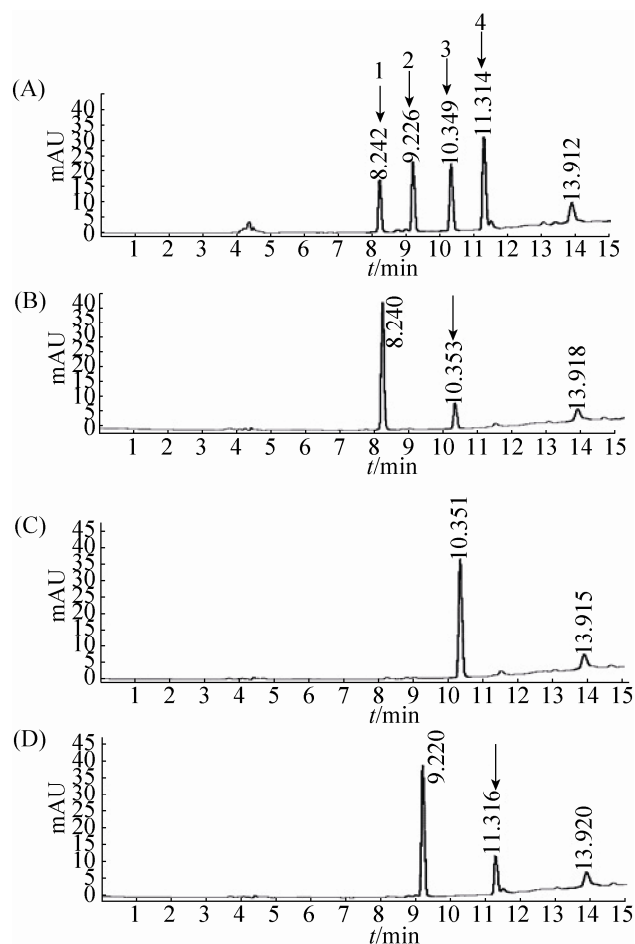


图 7. 黄豆苷和染料木苷水解产物的 HPLC 分析
Figure 7. HPLC analysis of the products from hydrolysis of daidzin and genistin. A: 1: standard daidzin, 2: standard genistin, 3: standard daidzein, 4: standard genistein; B: hydrolysis product of daidzin (1 h); C: hydrolysis product of daidzin (12 h); D: hydrolysis product of genistin (12 h).

入适量的大豆异黄酮可以减少心血管疾病、骨质疏松和高胆固醇等^[22]的发病率。*Novosphingobium sp.* GX9^[5]、*Bifidobacterium animalis ssp. lactis* Bb12^[23]、*Lactobacillus casei* 2607^[23]、*Lactobacillus acidophilus* ATCC4461^[23]的 β -葡萄糖苷酶都可将糖苷形式的大豆异黄酮水解,生成具有生物活性的大豆异黄酮苷元,目前已报道的来自 *Novosphingobium sp.* GX9 的 β -葡萄糖苷酶对黄豆

苷具有最高的催化效率；而对染料木苷具有高催化效率的 β -葡萄糖苷酶有来自 *Dalbergia nigrescens*、*Pyrococcus furiosus*、*Novosphingobium* sp. GX9 菌株，它们的 K_{cat}/K_m 都在 10000 L/(mmol·s) 以上^[5]。

甜茶苷、黄豆苷元和染料木素在食品、医药行业具有广泛的应用，CBGL 能够水解甜菊苷、黄豆苷和染料木苷，这些特性使其在工业上具有广泛的应用前景。

2.5 CBGL 的分子改造

本研究首先采用易错 PCR 对 CBGL 进行分子改造，构建了包含约 10000 个转化子的突变体库，但在突变体库中没有筛选到酶活提高的突变体。于是利用 SWISS-MODEL 网站以 3U48 (PDB-ID, sequence identity 49.1%) 为模板对 CBGL 的蛋白结构进行建模分析(图 8)，结合 McAndrew 等^[24]和 Zhao 等^[25]报导的 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶蛋白结构，对突变体库中酶活降低(W147L、D557E)和完全失去酶活(E209R、D218E)的单位点突变体进行相应氨基酸位点的分析。建模结果发现：147 位点的氨基酸位于 CBGL 活性中心位点附近；

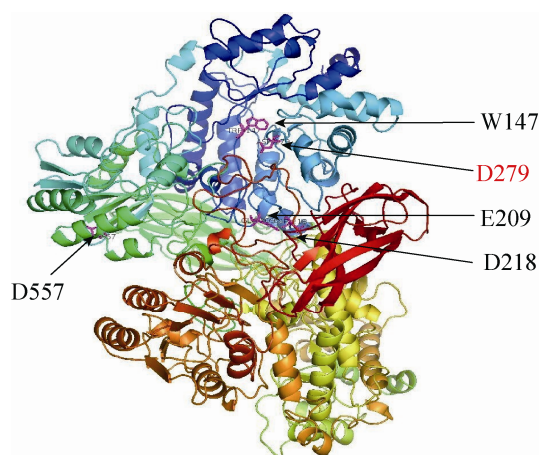


图 8. CBGL 的蛋白质建模分析图

Figure 8. The 3D model analysis of CBGL.

209、218 位点的氨基酸位于蛋白结构内部且位于酶与底物对接处附近，推测 209、218 位点的氨基酸相对保守；557 位点的氨基酸位于蛋白表面，推测该位点氨基酸的电荷性对 CBGL 的酶活有一定的影响。故结合随机突变获得的突变体，选取了 147 和 557 这 2 个位点的氨基酸来进行第 2 次定点随机突变改造。

对这 2 个位点的氨基酸进行定点随机突变，筛选到了 4 个有活性的突变体 W147A、W147F、D557H 和 D557W，对它们分别进行诱导表达和纯化，测定它们的酶学性质，它们的最适温度和最适 pH 与重组酶 CBGL 一致，分别为 45 °C 和 pH 6.0。其中 W147F 的相对活力提高至 185%，故进一步测定其 K_m 和 V_{max} 值(图 9)。

W147F 的 K_m 值为(18.810±1.247) mmol/L， V_{max} 值为(0.43220±0.01844) μ mol/(mg·min)， K_{cat} 值为(0.6036±0.0258)/s，其 V_{max} 是重组酶 CBGL 的 2.54 倍。该突变体 147 位的 Trp 突变为 Phe，Trp 和 Phe 结构相似，但 Trp 有吲哚环，空间位阻比苯环大，且 147 位点位于活性中心附近，当由空间位阻较大的 Trp 突变为空间位阻较小的 Phe 时，底物与酶更易于结合，从而使酶的活性提高。

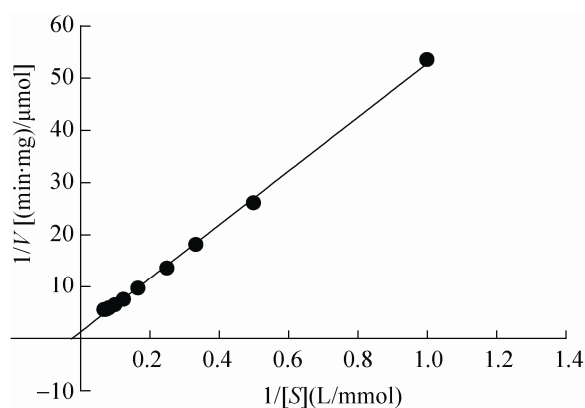


图 9. 突变子 W147F 的 K_m 和 V_{max} 值的测定

Figure 9. K_m values and V_{max} of W147F.

3 结论

本研究利用七叶苷-柠檬酸铁铵选择平板从广西武鸣糖厂周围的土壤中筛选到 1 株产 β -葡萄糖苷酶的菌株, 经 16S rDNA 序列分析, 鉴定为 *Citrobacter koser*, 命名为差异柠檬酸杆菌 (*Citrobacter koser*) GXW-1。通过设计简并引物 PCR 扩增获得 β -葡萄糖苷酶基因 *cbgl*, 其核苷酸序列长度为 2298 bp, 编码 765 个氨基酸。以 pQE30 为表达载体在 *E. coli* M15 中表达基因, 表达蛋白 CBGL 的分子量为 83 kDa, 用镍亲和层析纯化重组酶, 测定纯化酶的酶学性质。CBGL 的最适 pH 和温度分别为 6.0 和 45 °C, K_m 值为(11.280±1.073) mmol/L, K_{cat} 值为(0.2380±0.0102)/s, K_i 值为(66.84±3.40) mmol/L; 对 CBGL 的底物特异性进行了研究, 发现 CBGL 除了是目前较为少见的可能具有一定的 α -糖苷键水解酶活性的 β -葡萄糖苷酶外, 还能够水解甜菊苷、黄豆苷和染料木苷萜类化合物。另外, 通过易错 PCR 结合定点随机突变对它进行分子改造, 筛选到一个正向突变体 W147F, 其 V_{max} 是野生酶的 2.54 倍。CBGL 的这些特性表明该 β -葡萄糖苷酶在理论研究及工业中有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Liu Z, Zhu QX, Shi XA, Peng YH, Chen YN. Development in molecular modification of β -glucosidase *in vitro*. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(4): 565–571. (in Chinese)
刘震, 朱秋享, 石贤爱, 彭永辉, 陈荫楠. β -葡萄糖苷酶体外分子改造研究进展. 福州大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 565–571.
- [2] Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4775–4800.
- [3] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE, Davison B, Hamilton R, Himmel M, Keller M, Mcmillan JD, Sheehan J, Wyman CE. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(2): 169–172.
- [4] Su EZ, Xia T, Gao LP, Dai QY, Zhang ZZ. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioproducts Processing*, 2010, 88(2/3): 83–89.
- [5] Du LQ, Wang ZL, Zhao YL, Huang JQ, Pang H, Wei YT, Lin LH, Huang RB. A β -glucosidase from *Novosphingobium* sp. GX9 with high catalytic efficiency toward isoflavonoid glycoside hydrolysis and (+)-catechin transglycosylation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(16): 7069–7079.
- [6] 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 β -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9663–9674.
- [7] Yang SQ, Hua CW, Yan QJ, Li YN, Jiang ZQ. Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(1): 784–791.
- [8] Mallek-Fakhfakh H, Belghith H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 2016, 419: 41–50.
- [9] Uchiyama T, Yaoi K, Miyazaki K. Glucose-tolerant β -glucosidase retrieved from a Kusaya gravy metagenome. *Frontiers Microbiology*, 2015, 6: 548.
- [10] Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 1988, 71(2): 491–499.
- [11] Bradford BM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [12] Pan LH, Luo JP. Advance in research and application of β -D-glucosidase. *Food Science*, 2006, 27(12): 803–807. (in Chinese)
潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展. 食品科

- 学, 2006, 27(12): 803–807.
- [13] Yang XZ, Ma R, Shi PJ, Huang HQ, Bai YG, Wang YR, Yang PL, Fan YL, Yao B. Molecular characterization of a highly-active thermophilic β -glucosidase from *Neosartorya fischeri* P1 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106785.
- [14] Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999, 27(6): 756–762.
- [15] de Giuseppe PO, de Arruda Campos Brasil Souza T, Souza FHM, Zanphorlin LM, Machado CB, Ward RJ, Jorge JA, dos Prazeres Melo Furriel R, Murakami MT. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. *Acta Crystallographica Section D*, 2014, 70(6): 1631–1639.
- [16] Huo YL. Cloning, expression, characterization and molecular modification of β -glucosidase from *Paenibacillus cookii* GX-4. *Guangxi University Master Degree Thesis*, 2013. (in Chinese) 霍云龙. *Paenibacillus cookii* GX-4 的 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达、酶学性质研究与分子改造. 广西大学硕士学位论文, 2013.
- [17] Justo PI, Corrêa JM, Maller A, Kadowaki MK, da Conceição-Silva JL, Gandra RF, de Cássia Garcia Simão R. Analysis of the xynB5 gene encoding a multifunctional GH3-BglX β -glucosidase- β -xylosidase- α -arabinosidase member in *Caulobacter crescentus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(4): 993–1007.
- [18] Nakazawa H, Okada K, Onodera T, Ogasawara W, Okada H, Morikawa Y. Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(4): 649–657.
- [19] Okamoto K, Nakano H, Yatake T, Kiso T, Kitahata S. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2000, 64(2): 333–340.
- [20] Ko JA, Kim YM, Ryu YB, Jeong HJ, Park TS, Park SJ, Wee YJ, Kim JS, Kim D, Lee WS. Mass production of rufusoside using a novel stevioside-specific β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(24): 6210–6216.
- [21] 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 β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and optimal production of the steviol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8151–8161.
- [22] Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71(S6): 1705S–1707S.
- [23] Otieno DO, Shah NP. A comparison of changes in the transformation of isoflavones in soymilk using varying concentrations of exogenous and probiotic-derived endogenous β -glucosidases. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(3): 601–612.
- [24] McAndrew RP, Park JI, Heins RA, Reindl W, Friedland GD, D'haeseleer P, Northen T, Sale KL, Simmons BA, Adams PD. From soil to structure, a novel dimeric β -glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 3 isolated from compost using metagenomic analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(21): 14985–14992.
- [25] Zhao JQ, Guo C, Tian CG, Ma YH. Heterologous expression and characterization of a GH3 beta-glucosidase from *Thermophilic Fungi myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(2): 511–527.

Characterization and molecular modification of β -glucosidase from *Citrobacter koser* GXW-1

Minhua Jiang^{1,3}, Houmin Lin¹, Jinyang Yin¹, Zilong Wang¹, Hao Pang², Ribo Huang¹, Liqin Du^{1*}

¹ 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

² National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Bio-science and Technology Research Center, Guangxi Academy of Science, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

³ Guangdong VTR BIO-TECH Co., Ltd., Zhuhai 519060, Guangdong Province, China

Abstract: **[Objective]** The aim of this study was to characterize β -glucosidase from *Citrobacter koser* GXW-1 isolated from soil and to improve the enzyme by molecular modification. **[Methods]** A bacterial strain with β -glucosidase activity was screened from the soil around Wuming sugar mill in Guangxi by esculin-ferric ammonium citrate selecting plate. The 16S rDNA of the strain was obtained and analyzed. By searching GenBank database, the genes encoding β -glucosidase from the same genus *Citrobacter* were found. These sequences were aligned. Then, a gene encoding β -glucosidase was amplified by PCR. The recombinant plasmid pQE-cbgl was constructed. The recombinant protein was purified with Ni-NTA. The enzyme properties of the recombinant protein CBGL were studied in detail. At last, the wild enzyme CBGL was reformed by error-prone PCR and site-directed random mutagenesis. **[Results]** *C. koser* GXW-1 with β -glucosidase activity was isolated from the soil. A gene encoding β -glucosidase was cloned from the wild strain GXW-1. The properties of CBGL were identified. Its optimal pH and temperature were 6.0 and 45 °C. Its K_m and V_{max} value were (11.280±1.073) mmol/L and (0.1704±0.0073) μ mol/(mg·min), respectively. Its K_i values was (66.84±3.40) mmol/L. CBGL can hydrolyze α -pNPG, stevioside, daidzin and genistin. CBGL was modified by error-prone PCR and site directed random mutagenesis. A positive mutant W147F was obtained successfully. Its V_{max} was 2.54 times that of the wild enzyme CBGL. **[Conclusion]** CBGL not only can hydrolyze β -glycosidic bond, but also can hydrolyze the α -glycosidic bond in α -pNPG. Furthermore, CBGL can hydrolyze stevioside, daidzin and genistin. These characteristics indicate that the β -glucosidase CBGL has important applications in theoretical research and in industry.

Keywords: *Citrobacter koser* GXW-1, β -glucosidase, enzyme properties, molecular modification

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31360369, 21366007), by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (2014GXNSFAA118097, 2014GXNSFAA118078) and by the Chairman Fund Project of Guangxi Province [(2015)284]

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

Received: 21 June 2016; Revised: 2 November 2016; Published online: 15 November 2016