

• 工业生物技术 •

新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2 异源表达及水解虎杖苷能力

何成, 吴言, 孟春雨, 肖亚中, 方泽民, 房伟

安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

何成, 吴言, 孟春雨, 等. 新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2 异源表达及水解虎杖苷能力. 生物工程学报, 2021, 37(2): 580-592.

He C, Wu Y, Meng CY, et al. Heterologous expression of a novel β -glucosidase BglD2 and its application in polydatin-hydrolyzing. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 580-592.

摘要: 从海洋细菌 *Bacillus* sp. D1 中克隆、重组表达 β -葡萄糖苷酶 BglD2, 研究其酶学性质, 并对其水解虎杖苷制备白藜芦醇的能力进行分析。BglD2 的最适催化温度和 pH 分别为 45 °C 和 6.5, 在 30 °C 和 pH 6.5 条件下的半衰期约为 20 h。BglD2 能够水解含 β (1 \rightarrow 3)、 β (1 \rightarrow 4)、 β (1 \rightarrow 6) 等键型的多种底物。BglD2 具有良好的糖促活性, 100 mmol/L 葡萄糖和 150 mmol/L 木糖分别将酶活力提升 2.0 倍和 2.3 倍。BglD2 具有较好的乙醇促活及耐受特性, 30 °C 时, 10% 乙醇使酶活力提升 1.2 倍, 25% 乙醇存在时其仍保留 60% 的酶活力。BglD2 具有水解虎杖苷制备白藜芦醇的能力, 35 °C 条件下反应 2 h 水解率为 86%。具有乙醇耐受及抗产物抑制等特性的 β -葡萄糖苷酶 BglD2 在酶法水解虎杖苷制备白藜芦醇方面有应用潜力。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 葡萄糖耐受, 乙醇耐受, 虎杖苷, 白藜芦醇

Heterologous expression of a novel β -glucosidase BglD2 and its application in polydatin-hydrolyzing

Cheng He, Yan Wu, Chunyu Meng, Yazhong Xiao, Zemin Fang, and Wei Fang

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

Abstract: A novel β -glucosidase BglD2 with glucose and ethanol tolerant properties was screened and cloned from the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. D1. The application potential of BglD2 toward polydatin-hydrolyzing was also evaluated. BglD2 exhibited the maximal β -glucosidase activity at 45 °C and pH 6.5. BglD2 maintained approximately 50% of its origin activity after incubation at 30 °C and pH 6.5 for 20 h. BglD2 could hydrolyze a variety of substrates containing β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4), and β (1 \rightarrow 6) bonds. The activity of β -glucosidase was enhanced to 2.0 fold and 2.3 fold by 100 mmol/L glucose and 150 mmol/L xylose, respectively. BglD2 possessed ethanol-stimulated and -tolerant properties. At 30 °C, the activity of BglD2 enhanced to 1.2 fold in the presence of 10% ethanol and even remained 60% in 25% ethanol. BglD2 could hydrolyze polydatin to produce resveratrol. At 35 °C, BglD2 hydrolyzed 86% polydatin after incubation for 2 h. Thus, BglD2 possessed glucose and

Received: June 1, 2020; **Accepted:** July 31, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program (No. 2018YFC0311106), National Natural Science Foundation of China (No. 31870056).

Corresponding author: Wei Fang. Tel: +86-551-63861063; E-mail: fangahu@ahu.edu.cn
国家重点研发计划 (No. 2018YFC0311106), 国家自然科学基金 (No. 31870056) 资助。

ethanol tolerant properties and can be used as the potential candidate of catalyst for the production of resveratrol from polydatin.

Keywords: β -glucosidase, glucose tolerance, ethanol tolerance, polydatin, resveratrol

白藜芦醇是一种非黄酮类多酚化合物, 具有显著的抗氧化活性, 在预防癌症、保护心血管和神经系统、提高免疫力、延长寿命等方面有重要作用^[1]。虽然白藜芦醇的药用价值极高, 但目前的产量远远不能满足市场需求。白藜芦醇广泛存在于花生、葡萄、虎杖和决明子等天然植物中, 但含量均较低。虎杖是白藜芦醇含量最高的来源植物, 其中白藜芦醇含量仅为 0.2%–0.4%, 白藜芦醇与葡萄糖的结合物虎杖苷含量约为 1.5%–3.0%^[1]。研究表明, 高效水解虎杖苷中的糖苷键获得白藜芦醇, 是提高白藜芦醇产量的有效途径之一。

酸水解、微生物转化和酶转化等方法能够将虎杖苷转化为白藜芦醇^[2-6], 其中通过 β -葡萄糖苷酶催化转化虎杖苷转获得白藜芦醇具有反应条件温和、操作简单、成本低、污染少等优点。 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21), 即 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 主要水解糖苷或寡糖中的 β -1,4-糖苷键, 同时释放葡萄糖以及糖苷配体^[7], 在现代工业生物技术如食品、医药、饲料加工、能源炼制等领域具有重要应用价值。

β -葡萄糖苷酶能够有效水解虎杖苷中的 β -糖苷, 生成白藜芦醇, 是酶转化制备白藜芦醇的重要用酶。乙醇是虎杖苷提取的常用试剂, 虎杖苷提取物作为酶转化底物可能会将一定量的乙醇带入反应体系, 而且随着反应的进行, 产物葡萄糖会不断累积。因此, 具有乙醇耐受及抗产物抑制等活性的 β -葡萄糖苷酶将更适合于酶法转化虎杖苷以制备白藜芦醇。获取具有优良催化性能的 β -葡萄糖苷酶, 将有助于改进现有酶参与的催化水解工艺, 从而降低工业生产成本^[8]。

海洋是筛选具有盐耐受、有机溶剂耐受、抗碳水化合物抑制等活性的新型 β -葡萄糖苷酶的重要来源。前期, 从南海海底沉积物中筛选得到一株

具有 β -葡萄糖苷酶活性的芽孢杆菌属细菌 *Bacillus* sp. D1, 与分离自海洋的褐藻降解菌 *Bacillus weihaiensis* Alg07 亲缘关系较近。对 *B. weihaiensis* Alg07 基因组分析, 可知其基因组中含有 2 个可能的 β -葡萄糖苷酶编码基因。依照 *B. weihaiensis* Alg07 基因组中 β -葡萄糖苷酶的编码基因设计引物, 以 *Bacillus* sp. D1 基因组为模板, 成功克隆并异源表达了 β -葡萄糖苷酶 BglD1 (GenBank 登录号: QCQ29109), 该酶显示出独特转糖苷特性^[9]。进一步分析 *B. weihaiensis* Alg07 基因组获知, 基因组中存在另一个 β -葡萄糖苷酶基因 (GenBank 登录号: WP_072580823)。基于此分析, 本文依照 β -葡萄糖苷酶的编码基因 (WP_072580823) 设计引物, 以 *Bacillus* sp. D1 基因组为模板, 克隆并异源表达了新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2, BglD2 具有较好的乙醇耐受性及葡萄糖耐受性, 能够有效水解虎杖苷制备白藜芦醇, 在酶法制备白藜芦醇方面具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

Bacillus sp. D1 菌株为前期从南海海底沉积物样品中筛选获得并保存于实验室。大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞, pEASY-T3 载体购自北京全式金生物技术有限公司。虎杖苷、白藜芦醇、纤维二糖、葡萄糖、昆布二糖、龙胆二糖、龙胆三糖和纤维三糖等购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPGlc) 购自阿拉丁生化科技股份有限公司。其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 β -葡萄糖苷酶 BglD2 的克隆及序列分析

基于 *B. weihaiensis* Alg07 基因组序列分析,

以 β -葡萄糖苷酶 (WP_072580823) 编码基因为参照, 设计上游引物 5'-GATATACATATGACTAGATTTTCAAAGA-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点), 下游引物 5'-GTGGTGCTCGAGAATGAGATCTTTTCCAA-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点), 以 *Bacillus* sp. D1 基因组为模板扩增目的基因, PCR 产物连接 pEASY-T3 载体后转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序验证序列正确性。以 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切阳性克隆, 并连接至 pET-22b(+) 表达载体, 构建重组质粒 pET-22b(+)-*bglD2*, 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 采用 BLAST 检索与 *BglD2* 序列一致性较高的 β -葡萄糖苷酶序列, 使用 ClustalX 以及 GENEDOC 软件, 对 *BglD2* 与部分已知 β -葡萄糖苷酶序列进行全序列比对分析。

1.3 β -葡萄糖苷酶 *BglD2* 的重组表达及纯化

将含有 pET-22b(+)-*bglD2* 表达载体的 *E. coli* BL21(DE3) 培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 诱导, 16 °C 培养 16 h。4 °C、6 000 \times g 离心 5 min, 收集细胞。用 150 mL 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.8) 重悬菌体, 超声破碎。4 °C、12 000 \times g 离心 30 min 收集上清, 制备粗酶液。Ni²⁺-NTA 亲和柱纯化蛋白, 过程参照 Novagen 使用说明书, 纯化的蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯度及分子量, BCA 法测定蛋白浓度。

1.4 β -葡萄糖苷酶 *BglD2* 的酶活测定

以 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 6.5) 配制 0.1 mol/L *p*NPGlc。500 μ L 反应体系包含 25 μ L 适当稀释的酶液, 终浓度为 5 mmol/L 的 *p*NPGlc 和 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 6.5)。反应体系于 45 °C 反应 10 min 后, 加入 500 μ L Na₂CO₃ (1 mol/L) 混合均匀终止反应, 测定 OD_{405} 处吸光值。酶活力单位定义为 1 min 产

生 1 μ mol/L *p*NP 所用的酶量为 1 U。

1.5 温度和 pH 对 β -葡萄糖苷酶 *BglD2* 酶活力的影响

将酶分别置于 25–55 °C (间隔 5 °C) 条件下, 测定不同反应温度对酶活力的影响。温度稳定性测定使用 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 适当稀释酶液, 在 30 °C 条件下, 间隔一定的时间取样测酶活力。以初始酶活力作为 100%, 计算相对酶活力。

以 5 mmol/L *p*NPGlc 为底物, 分别在 50 mmol/L Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (pH 4.5–7.0) 和 HAC-NaAc 缓冲液 (pH 4.5–5.5) 中测定酶活力, 确定反应最适 pH。将适量酶液置于不同 pH 的 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.0–7.0) 中, 于 45 °C 条件下孵育, 测定不同 pH 条件对酶稳定性的影响。间隔相同的时间取样测酶活力, 以初始酶活力作为 100%, 计算相对酶活力。

1.6 金属离子及化学试剂对酶活力的影响

用 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 分别配制 0.1 mol/L K⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Na⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、DTT、EDTA、SDS、Urea 等溶液。以 5 mmol/L *p*NPGlc 为底物, 向反应体系中分别加入上述溶液, 至终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 在最适条件下测酶活力, 以不加上述溶液的酶活作为 100%, 计算相对酶活力。

1.7 *BglD2* 水解二糖及虎杖苷的酶活力测定

以 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 分别配制 0.1 mol/L 龙胆二糖、乳糖、纤维二糖和昆布二糖。二糖作为底物时采用 500 μ L 反应体系, 包括 25 μ L 适当稀释的酶液和 475 μ L 含有相应浓度底物的 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5), 45 °C 反应 10 min。依照产品说明书, 采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定反应体系中葡萄糖含量 (Shanghai Rongsheng Biotech Co., Ltd., China)。

以 Citrate-Na₂HPO₄ 缓冲溶液 (50 mmol/L,

pH 6.5) 配制 80% 乙醇, 用 80% 乙醇配制 0.1 mol/L 虎杖苷母液。500 μ L 反应体系包含 25 μ L 适当稀释的酶液, 终浓度为 5 mmol/L 的虎杖苷和 Citrate- Na_2HPO_4 缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 6.5)。反应体系于 45 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 500 μ L 无水乙醇混合均匀终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 有机系滤器, 高效液相色谱法 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 检测产物生成。酶活力单位定义为 1 s 产生 1 nmol/L 白藜芦醇所用的酶量为 1 U。

1.8 葡萄糖和木糖对酶活力的影响

以 Citrate- Na_2HPO_4 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 配制葡萄糖和木糖溶液。反应体系中分别加入终浓度为 0–2 mol/L 的葡萄糖或木糖, 在最适条件下测定酶活力。以不加糖的酶活力为 100%, 计算相对酶活。

1.9 BglD2 转糖苷活性的测定

建立 2.5 mL 的转糖苷反应体系, 包含酶液 500 μ L (10 U/mL, 以 pNPGlc 为底物测定), 终浓度为 150 g/L 的纤维二糖, 35 $^\circ\text{C}$ 条件下反应 2 h, 采用 HPLC 法检测转糖苷产物。

1.10 乙醇对酶活力及稳定性的影响

以 pNPGlc 为底物, 向反应体系中分别加入终浓度为 5%–30% 的乙醇, 分别在 30–50 $^\circ\text{C}$ 条件下, 测定不同浓度乙醇对酶活力的影响。以不加乙醇的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

以 pNPGlc 为底物, 向反应体系中加入 10% 乙醇, 在 30 $^\circ\text{C}$ 条件下测定乙醇对酶稳定性的影响。以初始酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.11 酶动力学分析

反应体系中加入终浓度为 0–3 mmol/L 的 pNPGlc 为底物, 在最适反应条件下, 测定 BglD2 反应动力学参数。反应体系中分别加入终浓度为 10% 的乙醇、100 mmol/L 的葡萄糖和 150 mmol/L 的木糖, 分别测定乙醇、葡萄糖、木糖对 BglD2

动力学参数的影响。使用 Origin 8.5 软件, 通过非线性拟合 Michaelis-Menten 方程, 推算酶催化的 K_m 、 k_{cat} 及催化效率 (k_{cat}/K_m)。

1.12 BglD2 水解虎杖苷的动力学参数测定

体系中加入终浓度为 0.02–5.00 mmol/L 的虎杖苷作为底物, 建立水解反应体系。反应结束以 500 μ L 无水乙醇终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 有机系滤器, HPLC 检测产物生成。根据标准曲线计算白藜芦醇量, 采用 Origin 8.5 软件非线性拟合 Michaelis-Menten 方程, 计算酶水解虎杖苷动力学参数。

1.13 BglD2 水解虎杖苷制备白藜芦醇条件优化

以 Citrate- Na_2HPO_4 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 配制 80% 乙醇, 以配制 200 mmol/L 虎杖苷母液。建立 8 mL 酶水解虎杖苷的反应体系, 虎杖苷终浓度为 2 mg/mL (乙醇浓度为 15%), 酶量为 5 U。将反应体系放入 30–45 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 3 h, 以 500 μ L 无水乙醇终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 上清过 0.22 μm 有机系滤器, HPLC 检测, 确定最适反应温度。

最适反应温度下, 向 8 mL 反应体系中加入 5–20 U 的酶, 反应 3 h, 以 500 μ L 无水乙醇终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 上清过 0.22 μm 有机系滤器过滤, HPLC 检测, 测定反应最适酶量。

最适反应温度和酶量下, 在 8 mL 反应体系中分别加入终浓度为 2、3、4 mg/mL 的虎杖苷 (乙醇浓度分别为 15%、20%、25%), 酶量为 15 U, 反应 3 h, 以 500 μ L 无水乙醇终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 有机系滤器过滤, HPLC 检测, 测定反应最适底物浓度。

建立优化的水解反应体系, 分别反应 1、2、3 h, 以 500 μ L 无水乙醇终止反应, 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 有机系滤器过滤, HPLC 检测, 优化反应时间。

虎杖苷水解率计算公式为: 虎杖苷水解率

(%)=(水解前虎杖苷质量-水解后虎杖质量)/水解前虎杖苷质量×100。

1.14 高效液相色谱 (HPLC) 检测

虎杖苷水解产物检测使用 Agilent Technologies 1260 Infinity 设备, 配备蒸发光检测器及 TSKgel Amide-80 (4.6 mm×25 cm, 5 μm) 分析柱。洗脱流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为水, 采用梯度洗脱, 30 min 内流动相由 A:B 为 20:80 逐渐过渡至 90:10, 维持洗脱 5 min; 接着在 5 min 内降至 20:80。流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 于 303 nm 检测产物的生成。

2 结果与分析

2.1 β-葡萄糖苷酶 BglD2 的重组表达及序列分析

由 *Bacillus* sp. D1 菌株克隆获得 *bglD2*, 全长 1 347 bp, 基因序列已经递交 GenBank 数据库 (登录号: MT815914)。该基因编码由 449 个氨基酸组成的蛋白, SDS-PAGE 结果显示其分子量约为 50 kDa (图 1), 与基于氨基酸序列计算的理论分子量 49.4 kDa 相近。以 *p*NPGlc 为底物, 纯化后蛋白比酶活为 (120.90±0.03) U/mg。

序列分析表明, 与 BglD2 氨基酸序列一致性超过 70% 的蛋白序列, 多为基因组测序或直接递交。BglD2 与部分来自海洋的 β-葡萄糖苷酶序列一致性较高, 如 *Bacillus weihaiensis* Alg07 (一致性 99%, 相似性 99%)、*Bacillus mesophilus* (一致性 82%, 相似性 90%)、海洋芽孢杆菌 *Bacillus oceanisediminis* (一致性 81%, 相似性 90%), 这些序列均来自全基因组测序。与部分已性质表征的 GH1 家族 β-葡萄糖苷酶相比, BglD2 与来自表层海水微生物元基因组文库的 β-葡萄糖苷酶 Bgl1A 的序列一致性为 44% (相似性 60%), 来自同一文库的 Bgl1B 的序列一致性为 40% (相似性 60%)^[10-11]。BglD2 与前期从 *Bacillus* sp. D1 菌株克隆获得的 β-葡萄糖苷酶 BglD1 的一致性为

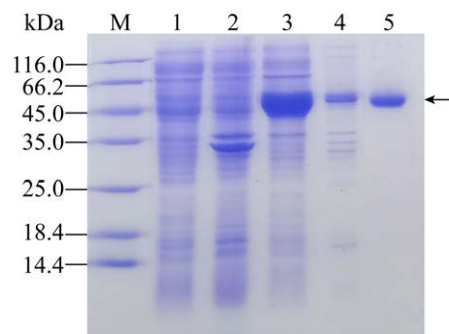


图 1 β-葡萄糖苷酶 BglD2 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of β-glucosidase BglD2. M: protein molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific, Inc.); lane 1: the sonication supernatant of *E. coli* harboring plasmid pET22b(+)-*bglD2* without induction; lane 2: the sonication precipitate of *E. coli* harboring plasmid pET22b(+)-*bglD2* without induction; lane 3: the sonication supernatant of *E. coli* harboring plasmid pET22b(+)-*bglD2* induced by IPTG; lane 4: the sonication precipitate of *E. coli* harboring plasmid pET22b(+)-*bglD2* induced by IPTG; lane 5: the protein after purification by Ni²⁺-NTA affinity chromatography.

47%, 相似性为 63%。序列比对发现, BglD2 与部分已性质表征的 GH1 家族 β-葡萄糖苷酶都具有该家族相对保守的序列 NEP 和 ENG^[10], 其中 Glu163 和 Glu351 为 BglD2 推测的催化残基 (图 2)。

2.2 温度和 pH 对 β-葡萄糖苷酶 BglD2 酶活力的影响

β-葡萄糖苷酶 BglD2 最适反应温度为 45 °C, 在 25–50 °C 范围内保持超过 50% 的酶活力 (图 3A)。BglD2 的最适温度与一些来自海洋的微生物酶类似, 均处于 45–55 °C 温度区间, 如来自气单胞菌属 *Aeromonas* sp.、链霉菌属 *Streptomyces* sp.、地中海马特氏菌 *Marteella mediterranea* 的酶^[12-14], 当反应温度提高时, 因酶的稳定性的下降而活性降低。BglD2 最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 5.5–7.0 范围内保持超过 80% 的酶活力 (图 3B)。与海洋来源酶类似, BglD2 高温不稳定, 30 °C 半衰期可延长至 20 h (图 3C)。BglD2 在 pH 6.0–7.0 范围内较稳定, pH 7.0 时的稳定性最好 (图 3D)。

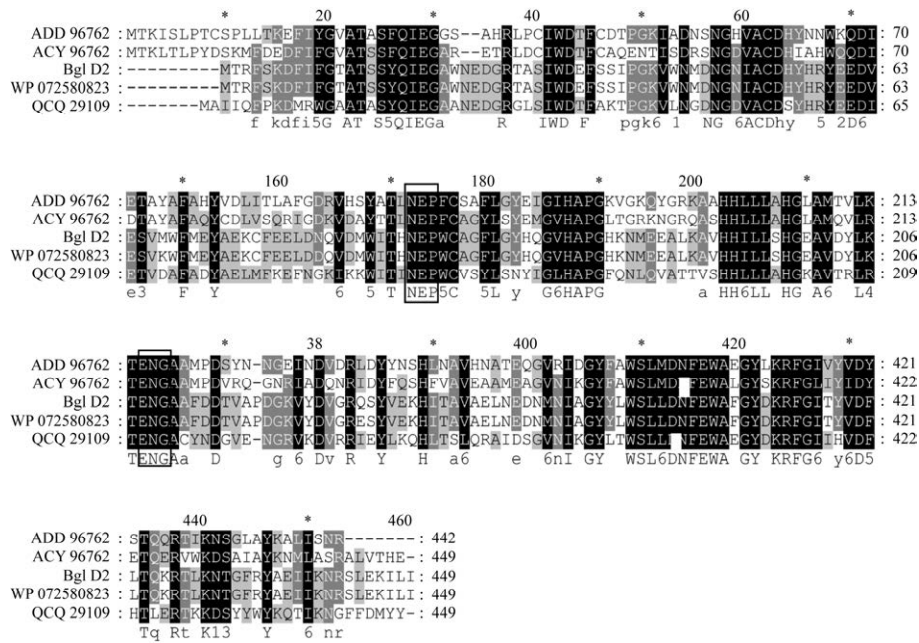


图 2 BglD2 与部分已知 β -葡萄糖苷酶序列比对

Fig. 2 Alignments of the amino acid sequences of BglD2 and other known β -glucosidases. The conserved motifs of NEP and ENG were boxed. ADD 96762: β -glucosidase Bgl1A from metagenomic library; ACY 09072: β -glucosidase Bgl1B from metagenomic library; WP 072580823: β -glucosidase from *Bacillus weihaiensis* Alg07; QCQ29109: β -glucosidase BglD1 from *Bacillus* sp. D1.

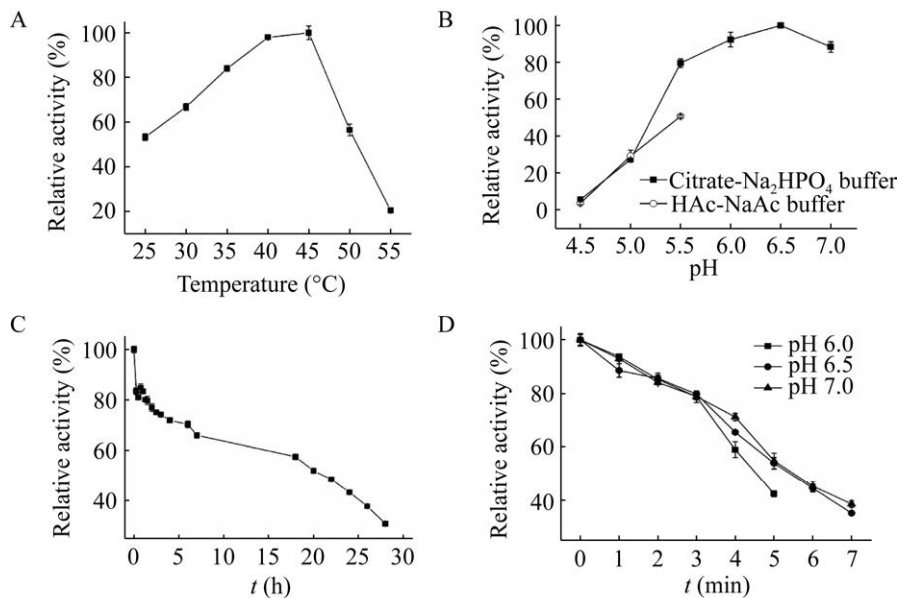


图 3 温度和 pH 对 BglD2 酶活力及稳定性的影响

Fig. 3 Effects of temperature and pH on the activity (A and B) and stability (C and D) of BglD2. The optimum temperature and pH were determined with *p*NPGlc as the substrate. For the effect of temperature on enzyme stability, the purified enzyme was kept at 30 °C in 50 mmol/L Citrate-Na₂HPO₄ buffer (pH 6.5), and the residual activity was measured using *p*NPGlc as the substrate. For the effect of pH on enzyme stability, the purified enzyme was pre-incubated in 50 mmol/L Citrate-Na₂HPO₄ buffer (pH 6.0 to pH 7.0) at 45 °C, and the remaining activities were measured with *p*NPGlc as the substrate. All the results were the average of triplicate experiments.

2.3 金属离子及化学试剂对酶活力的影响

5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、SDS 对酶活力均有抑制作用, 5 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、DTT 对酶活力均有促进作用, 其中 DTT 可使酶活力提升至 1.27 倍 (表 1)。EDTA 的加入对酶活力无影响, 由此推测 BglD2 不是金属离子依赖性的蛋白, 与多数已报道的 β -葡萄糖苷酶结果一致^[15-17]。

2.4 BglD2 水解虎杖苷和二糖底物的比酶活测定

以虎杖苷为底物, BglD2 催化比酶活为 (284.05 ± 2.47) U/mg。BglD2 可以水解 β (1 \rightarrow 4)、 β (1 \rightarrow 3)、 β (1 \rightarrow 6) 等多种键型。以天然二糖为底物, BglD2 对纤维二糖和昆布二糖的水解活力相对较高。与来自同一菌株的 β -葡萄糖苷酶 BglD1 不同^[9], BglD2 对乳糖的水解能力较弱 (表 2)。

表 1 金属离子及化学试剂对 BglD2 酶活力的影响
Table 1 Effects of metal ions and chemical reagents on BglD2 activity

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mmol/L	5 mmol/L
K^{+}	100.67 \pm 1.81	91.75 \pm 3.59
Mn^{2+}	99.54 \pm 2.56	92.09 \pm 9.29
Ca^{2+}	106.66 \pm 1.02	113.20 \pm 5.84
Mg^{2+}	95.79 \pm 3.63	111.12 \pm 2.89
Na^{+}	100.58 \pm 1.19	112.37 \pm 1.13
Cu^{2+}	96.67 \pm 4.13	79.26 \pm 2.90
Zn^{2+}	95.25 \pm 3.55	89.96 \pm 4.82
DTT	102.29 \pm 1.51	127.70 \pm 3.15
EDTA	96.92 \pm 2.60	100.46 \pm 1.68
SDS	40.02 \pm 3.16	21.99 \pm 1.02
Urea	105.41 \pm 3.43	101.33 \pm 2.58

表 2 BglD2 水解二糖底物的比酶活

Table 2 Specific activity of BglD2 toward disaccharide substrates

Substrates	Linkages	Enzyme activity (U/mg)	Relative activity (%)
Cellobiose	β (1 \rightarrow 4)	4.02 \pm 0.08	100
Laminaribiose	β (1 \rightarrow 3)	3.63 \pm 0.18	90
Gentiobiose	β (1 \rightarrow 6)	1.20 \pm 0.02	30
Lactose	β (1 \rightarrow 4)	0.49 \pm 0.02	12

2.5 葡萄糖和木糖对酶活力的影响

葡萄糖和木糖对 BglD2 的酶活力有一定的促进作用, 100 mmol/L 的葡萄糖对酶活力促进作用最大, 达到原酶活力的 2.0 倍; 150 mmol/L 的木糖对酶活力的促进作用最大, 达到原酶活力的 2.3 倍。随着糖浓度的增加, 酶活力受到抑制。当木糖和葡萄糖浓度提升至 1.2 mol/L 和 1.0 mol/L, BglD2 酶活力降低为原酶活力的一半 (图 4)。

已有研究发现, 糖对酶活力的促进与酶的转糖苷活性有关。以纤维二糖为底物, 经 BglD2 转糖苷后生成纤维三糖, 表明 BglD2 具有一定的转糖苷能力 (图 5)。

2.6 乙醇对酶活力及稳定性的影响

30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 10% 乙醇对 BglD2 的酶活力具有促进作用, 可使酶活力提升约 1.2 倍, 25% 的乙醇中可保留约 60% 酶活力。当温度升高至 45 $^{\circ}\text{C}$ 以上, 乙醇对酶活力的促进作用减弱 (图 6A)。乙醇对酶的稳定性影响较大, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, BglD2 在 10% 乙醇中的半衰期仅为 5 h, 而不加乙醇时的半衰期大约为 20 h (图 6B)。

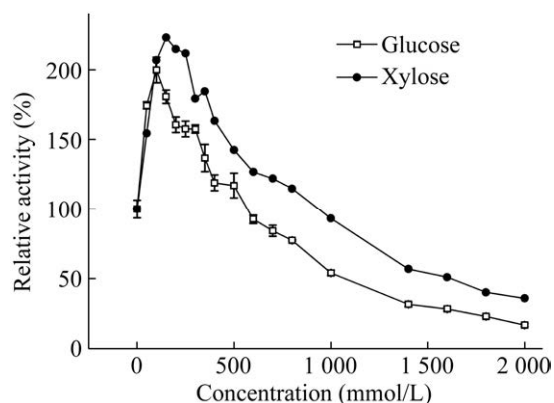


图 4 葡萄糖和木糖对 BglD2 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of glucose and xylose on the activity of BglD2 with pNPGlc as the substrate. The activity of the enzyme was evaluated in the presence of varying concentrations of monosaccharides. The relative activity was defined as the activity in the presence of effectors relative to that in the absence of the effectors. All results were the average of triplicate experiments.

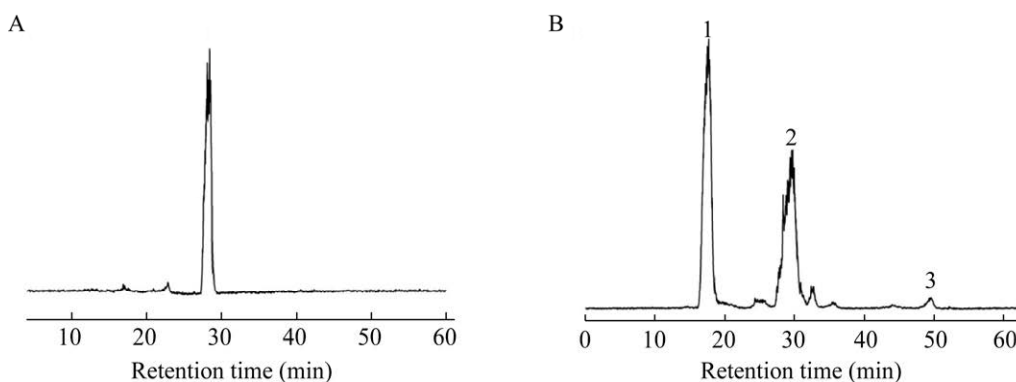


图 5 以纤维二糖为底物的转糖苷产物检测

Fig. 5 HPLC analysis of transglycosylation activity with cellobiose as the substrate. (A) Cellobiose in the reaction mixture before transglycosylation. Peak 1, cellobiose. (B) Transglycosylation products of BglD2. Peaks: 1 glucose, 2 cellobiose, 3 cellobiose.

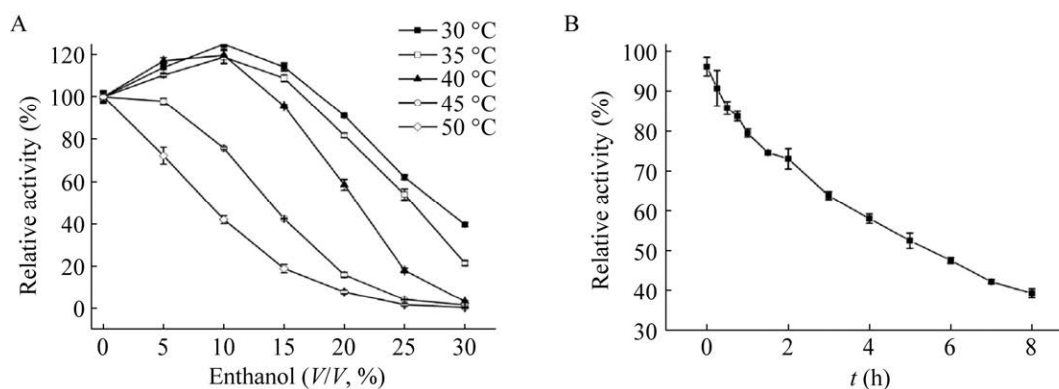


图 6 乙醇对 BglD2 酶活力 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Fig. 6 Effects of ethanol on the enzyme activity and stability. (A) Effects of ethanol on the enzyme activity. Reaction mixtures contained 5 mmol/L *p*NPGlc in Citrate- Na_2HPO_4 buffer (50 mmol/L, pH 6.5) with varying concentrations of ethanol. After incubation at 30–50 °C for 10 min, the activity was measured under standard assay conditions. (B) Effect of ethanol on the stability of BglD2. The stability was assessed by incubating appropriate volumes of the purified enzyme with 10% (V/V) ethanol at 30 °C. Aliquots were taken at regular interval, and the residual activity was monitored using *p*NPGlc as the substrate. All figures were the average of results from triplicate experiments.

2.7 酶动力学参数

在最适反应条件下, 以 *p*NPGlc 为底物时, K_m 和 k_{cat} 分别为 0.23 mmol/L 和 103.04 s^{-1} (表 3)。一定浓度的木糖和葡萄糖对 BglD2 的酶活力有一定的促进, 动力学分析亦表明, 在 100 mmol/L 葡萄糖或 150 mmol/L 木糖存在时, 酶催化的 k_{cat} 分别增加了 136% 和 167% (表 3)。在 10% 乙醇存在条件下, 酶催化 k_{cat} 增加了 11%。

以虎杖苷为底物, BglD2 水解虎杖苷的 K_m

表 3 BglD2 动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of BglD2

	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
<i>p</i> NPGlc	0.23 ± 0.02	103.04 ± 0.02	444.17 ± 0.01
<i>p</i> NPGlc (10% ethanol)	1.14 ± 0.02	114.37 ± 0.03	100.32 ± 0.02
<i>p</i> NPGlc (100 mmol/L glucose)	0.71 ± 0.04	244.52 ± 0.02	316.27 ± 0.01
<i>p</i> NPGlc (150 mmol/L xylose)	0.69 ± 0.04	276.27 ± 0.01	397.51 ± 0.02
Polydatin	1.03 ± 0.01	12.95 ± 0.01	12.57 ± 0.01

为 1.03 mmol/L (表 3), 稍高于来自 *Aspergillus niger* SK34.002 的 β -葡萄糖苷酶水解虎杖苷的 K_m (0.74 mmol/L)^[18]。

2.8 虎杖苷水解条件优化

以白藜芦醇生成量为衡量指标, BglD2 在 30–35 °C 范围内, 白藜芦醇产量较高, 超过 35 °C, 产量下降, 因此后续优化在 35 °C 条件下进行 (图 7A)。酶量优化结果显示, 加入 1.8 U/mL BglD2 白藜芦醇产量最高 (图 7B)。底物浓度优化结果表明, 加入 3 mg/mL 虎杖苷, 水解后白藜芦醇产量最高 (图 7C)。时间优化结果表明, 水解反应 2 h 后白藜芦醇产量最高 (图 7D)。优化后 BglD2 水解虎杖苷反应条件为: 底物浓度 3 mg/mL, 1.8 U/mL 酶量, 在 35 °C 条件下反应 2 h。最优条件下, BglD2 对虎杖苷的水解率达到 86%, 白藜

芦醇产量达到 0.75 mg/mL (图 7)。

3 讨论

来自降解藻类微生物的糖苷水解酶可能具有与陆地来源酶截然不同的特点, 因而被认为是挖掘新颖酶资源的宝库^[19]。作为与褐藻降解菌 *B. weihaiensis* Alg07 的 16S rRNA 序列一致性较高的微生物, *Bacillus* sp. D1 基因组中可能亦蕴含了新型糖苷水解酶的编码基因。前期, 已从 *Bacillus* sp. D1 基因组成功克隆并表达了新型 β -葡萄糖苷酶 BglD1, 该酶具有较强的转糖苷活性, 并适用于低聚半乳糖的合成。本研究从 *Bacillus* sp. D1 基因组中, 成功克隆了另一个新型 β -葡萄糖苷酶 BglD2, 与 BglD1 的序列一致性仅为 47%, 且两者的酶学性质差异较大, 说明 BglD1 和 BglD2 在

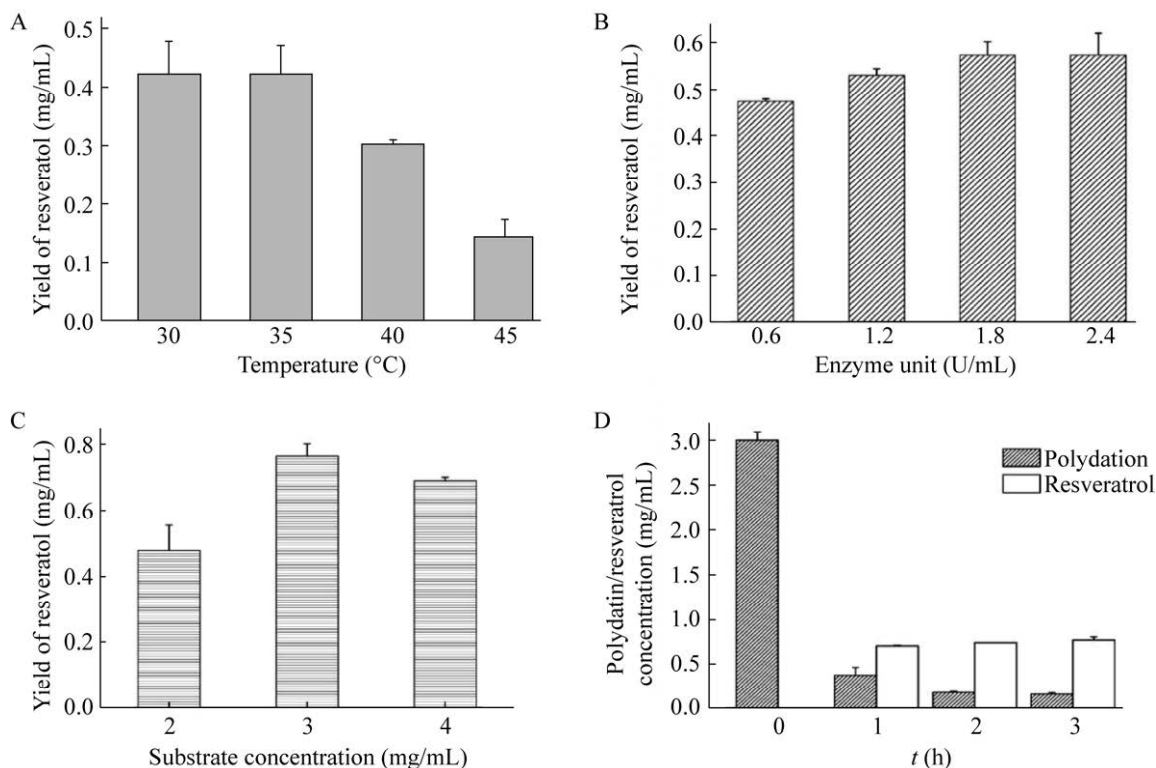


图 7 BglD2 水解虎杖苷制备白藜芦醇条件优化

Fig. 7 Hydrolysis of polydatin for the production of resveratrol by BglD2. (A) Effect of temperature on the production of resveratrol. (B) Effect of enzyme dosage on the production of resveratrol. (C) Effect of substrate concentration on the yield of resveratrol. (D) Time course of the reaction mixture catalyzed by BglD2. All results were the average of triplicate experiments.

来源菌 *Bacillus* sp. D1 中可能行使了不同的生物学功能。

海洋来源、具有中温催化特性的 β -葡萄糖苷酶, 其最适催化温度多在 45–55 °C 范围^[13-14,20], 如来自海洋表层海水微生物元基因组文库的 Bgl1A^[10]和 Bgl1B^[11], 来自 *Bacillus* sp. D1 的 BglD1^[9]和 BglD2 等。虽然此类酶拥有高于海洋环境的最适催化温度, 但高温下多不稳定^[9-10]。BglD2 在 pH 6.0–7.0 环境中具有比较高的酶活力且比较好的稳定性, 符合细菌 β -葡萄糖苷酶的催化特性^[11], 这一特性在海洋来源酶 Bgl1A^[10]、Bgl1B^[11]和 BglD1^[9]等酶中亦有体现。一般而言, 低浓度的 Cu^{2+} 是 β -葡萄糖苷酶的有效抑制剂, 而其他金属离子对酶活力的影响各异。对于 BglD2, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^{+} 等金属离子可提升酶活力至 1.1 倍以上, 而对来自同一菌株的 BglD1 的影响不同, 仅有 Mg^{2+} 可提升 BglD1 的酶活力, Ca^{2+} 和 Na^{+} 对酶活影响较小^[9]。

已知 β -葡萄糖苷酶普遍存在受产物葡萄糖反馈抑制, 如现有的绝大多数 β -葡萄糖苷酶都对其水解反应产物葡萄糖异常敏感, 极低浓度的葡萄糖就可以反馈抑制 β -葡萄糖苷酶的活性, 其抑制常数 (K_i) 一般为 0.5–100 mmol/L。但亦有多种来源的具有葡萄糖耐受性的 β -葡萄糖苷酶被报道, 一些酶的葡萄糖耐受 K_i 可达摩尔级, 并且往往伴随着葡萄糖对酶的激活作用^[10,21-23]。此外, 木糖、蔗糖、半乳糖等对 β -葡萄糖苷酶的酶活力也显示出促进作用^[24-26]。来自 *Bacillus* sp. D1 的 BglD2 和 BglD1, 以及来自海洋表层海水微生物元基因组文库的 Bgl1A^[10]均具有糖促活特性, 葡萄糖、木糖能够有效地促进酶活力的提升^[9]。转糖苷作用在糖促进 β -葡萄糖苷酶酶活提升方面起非常重要的作用^[27-28]。以纤维二糖为底物, BglD1 显示出了良好的转糖苷活性^[9], BglD2、Bgl1A^[10]亦显示较弱的转糖苷活性, 由此推测, 转糖苷作用在 β -葡萄糖苷酶受糖促活方面可能也起到了重

要作用。

少数 β -葡萄糖苷酶显示出乙醇耐受的特性, 如来自土壤元基因组文库的 β -葡萄糖苷酶 Bg10, 在 500 mmol/L 乙醇条件下可保持大于 70% 的酶活力; 来自解纤维芽孢杆菌 *Bacillus cellulosilyticus* 的 β -葡萄糖苷酶的乙醇耐受 K_i 为 15% (V/V)^[29]; 来自海洋元基因组文库的 β -葡萄糖苷酶 Bgl1A, 经过基因工程改造, 乙醇耐受性得以提升^[30]。与已报道的乙醇耐受特性不同, BglD2 显示出良好的乙醇促活特性, 10% 的乙醇可使酶活力提升至 1.2 倍, 在此条件下酶催化 k_{cat} 值有所增加。短侧链醇对 β -葡萄糖苷酶活力的促进在嗜热毁丝霉 *Myceliophthora thermophila*^[31]、嗜热子囊菌 *Thermoascus aurantiacus*^[32]、米曲霉 *Aspergillus oryzae*^[33] 以及尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*^[34] 等来源的酶中亦有发现, 对这一现象的可能解释为乙醇引起的溶液极性的变化可以一定程度上稳定酶的构象^[35]。

以虎杖苷为底物, β -葡萄糖苷酶能够有效水解糖苷键, 释放苷元。用于虎杖苷酶法转化生成白藜芦醇的 β -葡萄糖苷酶多来源于真菌, 如布鲁塞尔德克酵母 *Dekkera bruxellensis*^[36-37]、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[38]、*Aspergillus oryzae*^[39] 和黑曲霉 *Aspergillus niger*^[38], 以及细菌, 如乳酸杆菌属 *Lactobacillus* sp.^[40] 和 *Bacillus* sp.^[41] 等来源的酶。表 4 列举了已报道用于水解虎杖苷的 β -葡萄糖苷酶, 除 Bgl2238 外, 均由来源菌发酵制备, 酶的基因或蛋白序列未见报道。 β -葡萄糖苷酶 Bgl2238 蛋白基因 (GenBank 登录号: KU320675) 克隆自土壤元基因组文库^[42], 序列分析表明其为 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶, 与 BglD2 分属不同糖苷水解酶家族。

以虎杖苷为底物, BglD2 显示出较高的比酶活, 是 *Dekkera bruxellensis* 来源酶的 2.5 倍, 但催化 K_m 稍高于 *Aspergillus* sp. 来源酶 (表 4)。部分真菌 β -葡萄糖苷酶, 如 *Aspergillus* sp. 以及

表 4 BglD2 与已报道 β -葡萄糖苷酶水解虎杖苷的比酶活、 K_m 及水解条件比较Table 4 Comparison of the specific activity, K_m and hydrolysis conditions toward polydatin using BglD2 and some known β -glucosidases

Enzyme origin	Specific activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	Temperature ($^{\circ}$ C)	pH	Time	Hydrolysis rates (%)	References
<i>Aspergillus oryzae</i> sp. 100	55.00	0.74	60	5.0	2 h	About 100%	[39]
<i>Aspergillus oryzae</i> (CICC 2436)	Nm	Nm	50	4.8	8 h	About 100%	[5]
<i>Aspergillus niger</i> SK34.002	75.90	0.74	60	Nm	4 h	About 100%	[18]
<i>Dekkera bruxellensis</i> (BCRC920084)	115.00	Nm	50	5.0	About 25 h	About 80%	[36]
Almonds (Sigma)	54.15	Nm	50	6.0	About 12 h	About 100%	[36]
<i>Lactobacillus kimchi</i> JB301	1.49 ^a	0.20	30–40	5.0	40 h	Over 99%	[40]
Bgl2238 from metagenomic library	Nm	Nm	44	Nm	12 h	95%	[42]
<i>Bacillus</i> sp. D1	284.05	1.03	35	6.5	2 h	86%	This study

a: one unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing 1 μ mol of glucose from glucosides per minute. Nm: not mentioned.

Dekkera bruxellensis 来源酶, 需要在高于 50 $^{\circ}$ C 条件下水解虎杖苷生成白藜芦醇 (表 4)。虽然多种来源的 β -葡萄糖苷酶在水解虎杖苷方面显示出较高的水解率, 但有些酶需要较长的反应时间, 如 *Aspergillus oryzae* (CICC 2436) 来源酶需要 8 h 左右可达到 100% 水解率, *Dekkera bruxellensis* 来源酶则需要 25 h 左右, 可达 80% 以上水解率 (表 4)。相比而言, 来源于海洋细菌 *Bacillus* sp. D1 的 BglD2, 可在 35 $^{\circ}$ C 条件下水解虎杖苷, 反应 2 h 后水解率达到 86%, 具有低温、高效催化虎杖苷水解的优势。另一方面, 水解体系中, 虎杖苷提取物作为酶转化底物将一定量的乙醇带入反应体系, 而且随着反应的进行, 产物葡萄糖会不断累积。具有乙醇耐受及抗产物抑制等特性的 β -葡萄糖苷酶 BglD2 将更适合于酶法转化虎杖苷以制备白藜芦醇。

4 结论

海洋是筛选具有盐耐受、有机溶剂耐受、抗碳水化合物抑制等活性的新型 β -葡萄糖苷酶的重要来源。本研究从海洋细菌 *Bacillus* sp. D1 中成功克隆并异源表达了 β -葡萄糖苷酶 BglD2, 该酶具有较好的乙醇及葡萄糖促活特性, 能够在较短

时间、较低温度中快速水解虎杖苷生成白藜芦醇, 具有酶法生产白藜芦醇的潜力。

REFERENCES

- [1] 周林芳. 酶法提取虎杖中白藜芦醇及白藜芦醇酯的合成研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
Zhou LF. Study on enzymatic extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* and synthesis of resveratrol esters[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [2] Jin S, Luo M, Wang W, et al. Biotransformation of polydatin to resveratrol in *Polygonum cuspidatum* roots by highly immobilized edible *Aspergillus niger* and yeast. *Bioresour Technol*, 2013, 136: 766-770.
- [3] Tian TL, Sun QL, Shen J, et al. Microbial transformation of polydatin and emodin-8- β -d-glucoside of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc into resveratrol and emodin respectively by *Rhizopus microsporus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(6): 861-866.
- [4] La Torre GL, Lagana G, Bellocco E, et al. Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. *Food Chem*, 2004, 85(2): 259-266.
- [5] Wang H, Liu L, Guo YX, et al. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*,

- 2007, 75(4): 763-768.
- [6] Yang C, Yan AX, Yang XY, et al. An optimum fermentation model established by genetic algorithm for biotransformation from crude polydatin to resveratrol. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166(2): 446-457.
- [7] Li D, Li XL, Dang W, et al. Characterization and application of an acidophilic and thermostable β -glucosidase from *Thermofilum pendens*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115(5): 490-496.
- [8] Pei JJ, Pang Q, Zhao LG, et al. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5: 31.
- [9] Deng PJ, Meng CY, Wu Y, et al. An unusual GH1 β -glucosidase from marine sediment with β -galactosidase and transglycosidation activities for superior galacto-oligosaccharide synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(11): 4927-4943.
- [10] Fang ZM, Fang W, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(9): 1351-1358.
- [11] 房伟, 方泽民, 刘娟娟, 等. 新型海洋微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1914-1920.
- Fang W, Fang ZM, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine metagenome. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1914-1920 (in Chinese).
- [12] Wang ZL, Wang JP, Jiang MH, et al. Selective production of rufoside from stevioside by using the sophorose activity of β -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9663-9674.
- [13] Huang XL, Zhao Y, Dai YJ, et al. Cloning and biochemical characterization of a glucosidase from a marine bacterium *Aeromonas* sp. HC11e-3. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(12): 3337-3344.
- [14] Mao XX, Hong YZ, Shao ZZ, et al. A novel cold-active and alkali-stable β -glucosidase gene isolated from the marine bacterium *Marteella mediterranea*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162(8): 2136-2148.
- [15] Asha BM, Pathma J, Sakthivel N. Isolation and characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* SU40. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2015, 51(1): 24-29.
- [16] Chang KH, Jo MN, Kim KT, et al. Purification and characterization of a ginsenoside Rb₁-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 12140-12152.
- [17] Mallerman J, Papinutti L, Levin L. Characterization of β -glucosidase produced by the white rot fungus *Flammulina velutipes*. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(1): 57-65.
- [18] Zhou LF, Li SH, Zhang T, et al. Properties of a novel polydatin- β -d-glucosidase from *Aspergillus niger* SK34.002 and its application in enzymatic preparation of resveratrol. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(7): 2588-2595.
- [19] Martin M, Vandermies M, Joyeux C, et al. Discovering novel enzymes by functional screening of plurigenomic libraries from alga-associated *Flavobacteriia* and *Gammaproteobacteria*. *Microbiol Res*, 2016, 186-187: 52-61.
- [20] Mai ZM, Yang J, Tian XP, et al. Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced β -glucosidase from a marine *Streptomyces*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(5): 1512-1522.
- [21] Uchima CA, Tokuda G, Watanabe H, et al. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(6): 1761-1771.
- [22] Chan CS, Sin LL, Chan KG, et al. Characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Anoxybacillus* sp. DT3-1. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 174.
- [23] Crespim E, Zanphorlin LM, De Souza FHM, et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82: 375-380.
- [24] Masui DC, Zimbardi ALRL, Souza FHM, et al. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var.

- thermoidea* under solid state fermentation. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(8): 2689-2701.
- [25] Souza FHM, Inocentes RF, Ward RJ, et al. Glucose and xylose stimulation of a β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: A kinetic and biophysical study. J Mol Catal B: Enzy, 2013, 94: 119-128.
- [26] Xu H, Xiong AS, Zhao W, et al. Characterization of a glucose-, xylose-, sucrose-, and D-galactose-stimulated β -glucosidase from the alkalophilic bacterium *Bacillus halodurans* C-125. Curr Microbiol, 2011, 62(3): 833-839.
- [27] de Giuseppe PO, Souza TACB, Souza FHM, et al. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. Acta Cryst D Crystallogr Biol, 2014, 70(6): 1631-1639.
- [28] Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. J Biol Chem, 2013, 288(25): 18325-18334.
- [29] Wu J, Geng AL, Xie RR, et al. Characterization of cold adapted and ethanol tolerant β -glucosidase from *Bacillus cellulosilyticus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol. Int J Biol Macromol, 2018, 109: 872-879.
- [30] Fang W, Yang Y, Zhang XM, et al. Improve ethanol tolerance of β -glucosidase Bgl1A by semi-rational engineering for the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. J Biotechnol, 2016, 227: 64-71.
- [31] Karnaouri A, Topakas E, Paschos T, et al. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. Peer J, 2013, 1: e46.
- [32] Parry NJ, Beever DE, Owen E, et al. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. Biochem J, 2001, 353(1): 117-127.
- [33] Riou C, Salmon JM, Vallier MJ, et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3607-3614.
- [34] Christakopoulos P, Goodenough PW, Kekos D, et al. Purification and characterisation of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. Eur J Biochem, 2005, 224(2): 379-385.
- [35] Mateo JJ, Di Stefano R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. Food Microbiol, 1997, 14(6): 583-591.
- [36] Kuo HP, Wang R, Huang CY, et al. Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. J Food Drug Anal, 2018, 26(1): 163-171.
- [37] Kuo HP, Wang R, Lin YS, et al. Pilot scale repeated fed-batch fermentation processes of the wine yeast *Dekkera bruxellensis* for mass production of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. Bioresour Technol, 2017, 243: 986-993.
- [38] Todaro A, Palmeri R, Barbagallo RN, et al. Increase of *trans*-resveratrol in typical sicilian wine using β -glucosidase from various sources. Food Chem, 2008, 107(4): 1570-1575.
- [39] Zhang CZ, Li D, Yu HS, et al. Purification and characterization of piceid- β -d-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Process Biochem, 2007, 42(1): 83-88.
- [40] Ko JA, Park JY, Kwon HJ, et al. Purification and functional characterization of the first stilbene glucoside-specific β -glucosidase isolated from *Lactobacillus kimchi*. Enzyme Microb Technol, 2014, 67: 59-66.
- [41] 冯薇, 胡小妍, 马明娜, 等. 产 β -葡萄糖苷酶细菌的筛选及转化白藜芦醇的研究. 生物技术通报, 2017, 33(11): 130-135.
Feng W, Hu XY, Ma MN, et al. The screening of β -glycosidase-producing strain and the transforming of resveratrol. Biotechnol Bull, 2017, 33(11): 130-135 (in Chinese).
- [42] Wang CQ, Liu XL, Zhang ML, et al. Efficient enzyme-assisted extraction and conversion of polydatin to resveratrol from *Polygonum cuspidatum* using thermostable cellulase and immobilized β -glucosidase. Front Microbiol, 2019, 10: 445.

(本文责编 郝丽芳)