

β -葡萄糖苷酶 Bgl2A:V224D 稳定性的理性改造及其应用

洪登望^{1,2,3}, 董庆莲^{1,2,3}, 房伟^{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 生物催化与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 酶法体外诊断技术安徽省联合共建学科重点实验室, 安徽 合肥 230000

洪登望, 董庆莲, 房伟, 张学成, 肖亚中. β -葡萄糖苷酶 Bgl2A:V224D 稳定性的理性改造及其应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5214-5228.

HONG Dengwang, DONG Qinglian, FANG Wei, ZHANG Xuecheng, XIAO Yazhong. Rational engineering and application of the β -glucosidase Bgl2A:V224D with high stability[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5214-5228.

摘要:【背景】 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)在食品、医药领域具有重要的应用价值。海洋微生物来源的 β -葡萄糖苷酶 Bgl2A:V224D 在大豆黄浆水精深加工中有较好的应用潜能,但其较低的稳定性和乙醇耐受性限制了其实际应用。【目的】提升 Bgl2A:V224D 的应用潜能,对其进行计算辅助的理性设计改造,提升其在应用环境中的稳定性和有机溶剂耐受性。【方法】综合采用3种计算方法设计构建 Bgl2A:V224D 突变体,利用序列共进化和保守性分析确定候选突变体,再通过湿法实验检测筛选目标突变体。获得稳定性提升的突变体后,通过组合突变进一步提升突变体的稳定性,并对突变体在大豆黄浆水精深加工中转化大豆异黄酮的应用潜能进行评估。【结果】获得多个稳定性提升且酶活维持或提升的单点突变体和组合突变体,其中 S360K/E408Y 稳定性最高,其在 35 °C、pH 6.5 条件下的半衰期提升至出发酶的 6.7 倍左右。该突变体对乙醇的耐受性也比出发酶更高:前者在 35 °C、20%乙醇条件下孵育 20 min,酶活剩余 35%左右;而后者在相同条件下孵育 10 min,酶活降至 5%左右。将 S360K/E408Y 应用于水解大豆异黄酮制备苷元,其水解效率比出发酶 Bgl2A:V224D 显著增加,在相同条件下前者可水解的底物量是后者的 2 倍;用于大豆黄浆水精深加工,转化相同体积黄浆水中的大豆异黄酮,突变体 S360K/E408Y 所需酶量比出发酶减少 1/3 左右。【结论】利用提升稳定性的改造方法提升酶对有机溶剂的耐受性的策略适用于 β -葡萄糖苷酶,通过这一策略可提升 β -葡萄糖苷酶在多领域的应用潜力。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 稳定性; 有机溶剂耐受; 理性改造; 大豆异黄酮

资助项目: 安徽省科技重大专项(202003a06020015)

This work was supported by the Anhui Provincial Major Science and Technology Project (202003a06020015).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Xuecheng, turenzh@ahu.edu.cn; XIAO Yazhong, yzxiao@ahu.edu.cn

Received: 2024-06-18; Accepted: 2024-08-10; Published online: 2024-10-09

Rational engineering and application of the β -glucosidase Bgl2A:V224D with high stability

HONG Dengwang^{1,2,3}, DONG Qinglian^{1,2,3}, FANG Wei^{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 Key Laboratory of Enzymatic In Vitro Diagnostic Technology of Anhui Province, Hefei 230000, Anhui, China

Abstract: **[Background]** β -glucosidase (EC 3.2.1.21) has important application values in food and medicine industries. Bgl2A:V224D, a mutant of a marine microorganism-derived β -glucosidase, is potent in the conversion of soybean isoflavones in the deep processing of soybean yellow slurry water. However, the low stability and low ethanol tolerance limit the application of Bgl2A:V224D. **[Objective]** To enhance the application potential of Bgl2A:V224D, we adopted a computation-assisted rational design to improve the stability and organic solvent tolerance of this enzyme in the application environment. **[Methods]** We employed three complementary computational methods to design stable mutants of Bgl2A:V224D by seeking overlapping mutations. Then, sequence coevolution and conservation analyses were performed to determine candidate mutants. Finally, the target mutant enzymes were selected by experimental assays. After the stable mutant enzymes were identified, their stability was further enhanced by combinational mutation. Finally, the application performance of the mutant enzymes for the conversion of soybean isoflavones in the deep processing of soybean yellow slurry water was evaluated. **[Results]** Several single-point and multi-point mutants with improved stability and maintained or increased enzyme activity were obtained, among which S360K/E408Y had the highest stability, with the half-life at 35 °C and pH 6.5 about 6.7 times that of the starting enzyme. Moreover, S360K/E408Y was more tolerant to ethanol than the starting enzyme. The former had the relative activity of about 35% after 20 min of incubation with 20% ethanol at 35 °C, while the latter had the relative activity of only about 5% after 10 min of incubation under the same conditions. S360K/E408Y was then applied to hydrolyze soybean isoflavones, and its efficiency was significantly increased compared with that of the starting enzyme Bgl2A:V224D. Specifically, the amount of substrate that could be hydrolyzed by the former enzyme was two times that of the latter enzyme under the same conditions. The amount of S360K/E408Y required for converting soybean isoflavones in the deep processing of soybean yellow slurry water was about 1/3 less than that of the starting enzyme. **[Conclusion]** The stability-enhancing engineering strategy for improving the enzyme tolerance to organic solvents is applicable to β -glucosidases, and the application potential of β -glucosidases in various fields can be enhanced by this strategy.

Keywords: β -glucosidase; stability; organic solvent tolerance; rational design; soybean isoflavones

β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)属于糖苷水解酶类,对多种底物均具有活性,在生物燃料、制药和食品等行业具有重要的应用价值。比如,在食品加工中, β -葡萄糖苷酶可用于转化大豆异黄酮。大豆异黄酮是大豆在生长过程中产生的代谢产物,具有类雌激素的功效,可作为药品和保健品。研究表明,大豆异黄酮发挥药理活性的是其苷元形式^[1]。自然界中大豆异黄酮大多以糖苷形式存在,苷元的比例非常低,所以,天然食品中的大豆异黄酮必须经过酶水解之后才能被机体吸收利用。为增加食品中大豆异黄酮的吸收和利用率,可在体外先用 β -葡萄糖苷酶将其水解成苷元。然而,大豆异黄酮的水溶性差,通常需要有有机溶剂来增加溶解度,进而提升酶解效率。这就要求 β -葡萄糖苷酶具有较好的稳定性及对有机溶剂的耐受能力。大多数天然 β -葡萄糖苷酶都来自嗜中温细菌,稳定性和有机溶剂耐受性不佳,并不适用于水解大豆异黄酮。

蛋白质分子的稳定性与有机溶剂耐受性通常是相关联的,稳定性较好的蛋白质通常有机溶剂耐受性也较高,因此,提升蛋白质稳定性的改造通常也会同时提升蛋白质的有机溶剂耐受性^[2]。目前,采用蛋白质工程对 β -葡萄糖苷酶的稳定性进行改造已有多个报道。Cao等^[3]以高活性和葡萄糖耐受的 β -葡萄糖苷酶Ks5A7为起点,通过四轮随机诱变,得到稳定性提升的突变体4R1,在50℃的半衰期是Ks5A7半衰期的8 640倍。Sinha等^[4]通过研究奥氏嗜热盐丝菌(*Halothermothrix orenii*)的 β -葡萄糖苷酶底物通道上的相关位点,构建了稳定性改善的V169C和I246A突变,相较于野生型酶,这2个单点突变体的半衰期分别延长了4.4倍和11倍,组合突变体V169C/I246A的半衰期增加了5倍。虽然非理性和半理性的方法在酶改造方面是有

效的^[5],但它们通常需要筛选大规模的突变文库,消耗大量的人力和财力。相对而言,理性设计具有更快速和更有针对性的优点。目前已有多种理性设计的策略成功应用于提高酶的稳定性,如表面电荷优化^[6],引入二硫键^[7]、脯氨酸^[8]、盐桥^[9]、表面氢键^[10],对B因子较大的柔性区域进行改造^[11],以及计算辅助方法如自由能计算^[12]等。

有许多一站式蛋白质计算辅助设计平台,只需要输入蛋白质的结构或序列就可以自动设计,不需要过多的操作,简单方便。比如,PROSS^[13]的开发者利用计算辅助法对乙酰胆碱酯酶进行改造,相较于野生型,含有51个突变的突变酶的 T_m 提高了20℃;Liu等^[14]利用ABACUS对Ras结合结构域(Ras binding domain, RBD)进行设计,获得了在110℃以上热稳定的突变体,比野生型RBD高出40℃;Buß等^[15]利用FoldX对 ω -转氨酶设计突变改造,获得的最佳突变体的 T_m 值提高到59.3℃,比野生型酶高4.0℃。不过,这些计算辅助设计方法存在一些普遍性问题,比如上位效应会使组合突变的预测误差增加等^[16]。采用多种计算方法相结合的方式可以降低假阳性的概率,提高预测的成功率,Zhang等^[17]采用相似的策略对脂肪酶进行改造,五点组合突变体M10的 T_m 提高了10.63℃,相对活性是野生型的140%。Cui等^[16]同样采用多种能量计算函数进行计算,并采用贪婪积累的策略进行组合突变,最终突变体DuraPETase的熔融温度提高31℃。这些成功的案例说明此方法具有一定的普适性,但目前并未发现此策略用于 β -葡萄糖苷酶的改造案例,也未见此策略用于有机溶剂耐受性改造的报道。

β -葡萄糖苷酶Bgl2A:V224D是本实验室分离自海洋微生物并通过半理性改造方法获得的高酶活和葡萄糖耐受的新型 β -葡萄糖苷酶,可

用于大豆黄浆水精深加工中的大豆异黄酮转化,但是分子改造使酶活性提升的同时,也使酶的稳定性显著下降,对有机溶剂的耐受能力也较差^[18],所以其应用潜力仍有限。本研究综合使用 PROSS、ABACUS 和 FoldX 这 3 种算法设计改造 Bgl2A:V224D,以提升其稳定性,从而提升其应用潜能;将 3 种方法设计的突变求交集,然后利用序列保守性分析确定候选突变体,通过重组表达纯化后使用实验方法检测筛选出目标突变体;获得稳定性提升的突变体后再通过组合突变,进一步提升突变体的稳定性;最后,还对突变体在大豆黄浆水精深加工中转化大豆异黄酮的应用潜能进行评估。

1 材料与方法

1.1 样品

Escherichia coli BL21(DE3),北京全式金生物技术有限公司,用来表达 Bgl2A:V224D 及其突变体;pET22b(+)-Bgl2A:V224D,本实验室保存。40%商品大豆异黄酮,上海麦克林生化科技股份有限公司;大豆黄浆水,安徽人人福食品有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶(*Nde* I 和 *Xho* I)和 PrimeSTAR Max DNA Polymerase,宝日医生物技术(北京)有限公司;质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, pNPG),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。 Ni^{2+} -NTA 亲和层析介质,Novagen 公司。PCR 仪,Eppendorf 公司;紫外分光光度计,UNICO 公司;HPLC 仪,Agilent 公司;超声波细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;旋转蒸发仪,东京理化器械株式会社。

1.3 突变体的设计

1.3.1 突变自由能计算分析

使用同源建模在线网站 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>)对 Bgl2A:V224D 的结构进行模拟,以 PDB:2O9R (序列一致性 43%)为模板生成结构模型,使用 Pymol (<http://www.pymol.org/>)将结构可视化。

利用 PROSS (<https://pross.weizmann.ac.il/step/pross-terms/>)^[13]设计稳定性提升的蛋白质突变体。

利用 ABACUS (<https://biocomp.ustc.edu.cn/servers/abacus-design.php>)^[19]从头设计蛋白质。

利用 FoldX^[20]设计稳定性提升的蛋白质突变体:选择 PROSS 及 ABACUS 设计的突变位点突变为其他 19 种氨基酸,统计突变体自由能的变化,保留其中 $\Delta\Delta G < -0.45$ kcal/mol 的突变(预防假阳性)。

1.3.2 突变位点保守性分析

在碳水化合物活性酶网站(CAZY, <http://www.cazy.org/>)GH1 中检索 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)序列,这可能覆盖了碳水化合物活性酶网站中登记的大部分 GH1 β -葡萄糖苷酶序列。序列经过 MEGA 11^[21]对齐后上传至 WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>)生成保守性图谱。

1.3.3 突变位点共进化分析

将 Bgl2A:V224D 的氨基酸序列提交至 GREMLIN 网站(<https://openseq.org/submit.php>),对蛋白质残基对进行共进化分析,剔除评分大于 0.7 的相关位点的突变设计。

1.4 突变体的构建

使用基于聚合酶链反应的重叠扩增方法产生位点定向诱变,将扩增产物用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 消化后,连接到载体 pET22b(+)上。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3),重组克隆经商业公司测定核苷酸序列确认。

1.5 酶蛋白的表达和纯化

将含有 pET22b(+)-Bgl2A:V224D 或突变体重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)在 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8。然后将培养温度调至 16 °C, 加入异丙基 β -D-1-巯基半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.2 mmol/L, 16 °C 再孵育 16 h 后 $8\ 000\times g$ 离心 15 min 收集细胞, 重悬于 pH 6.5 的 50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液。超声(350 W, 15 min, 工作 2 s, 停止 3 s)破碎细胞, 于 $12\ 000\times g$ 、4 °C 离心 30 min 后收集上清。将上清液用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化。纯化产物用 50 mmol/L pH 6.5 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液透析后用 0.22 μm 超滤管浓缩, 4 °C 保存。用 SDS-PAGE 对表达、纯化和浓缩的产物进行检测。

1.6 酶活的测定

以 pNPG 为底物对 β -葡萄糖苷酶的活性进行测定。反应体系: 50 mmol/L pH 6.5 的柠檬酸盐- Na_2HPO_4 缓冲液 475 μL , 100 mmol/L 的 pNPG 25 μL , 适当稀释的 β -葡萄糖苷酶 25 μL 。45 °C 孵育 5 min 后加入 500 μL 1 mol/L Na_2CO_3 停止反应。在 405 nm 处监测对硝基苯酚的释放量, 并利用标准曲线计算其浓度。酶活性单位(U)定义为: 在所述测定条件下, 每分钟在反应混合物中产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.7 酶的性质表征

以 pNPG 为底物, 在 50 mmol/L 柠檬酸盐- Na_2HPO_4 缓冲液中测定突变体的最佳 pH 和温度, pH 范围为 6.0–7.5, 温度范围为 35–55 °C。为了确定稳定性, 突变体在 50 mmol/L pH 6.5 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中于 35 °C 孵育, 定期采集样品, 测定相对活性。为了研究葡萄糖对酶活性的影响, 在 0–1.5 mol/L 的葡萄糖存在下测定以 pNPG 为底物的酶活。相对活性定义为相对于对照组(不含葡萄糖)的百分比。为了研究酶的乙醇耐受性, 一方面测定酶在 35 °C、不

同浓度(0–30%)乙醇条件下的相对活性, 另一方面测定酶在 35 °C、20%乙醇条件下活性随时间的变化情况。

在 pH 6.5 的 50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中, 加入酶(至适当终浓度)和底物 pNPG (0.1–20.0 mmol/L), 在最佳条件下测定动力学常数。根据 Michaelis-Menten 方程通过 GraphPad Prism 的非线性拟合计算动力学常数。

1.8 数据统计分析与绘图

显著性差异分析: 使用 GraphPad Prism v9.5.1 软件中 One-way ANOVA, 检验两组以上的均值是否存在显著性差异。

1.9 酶水解大豆异黄酮的应用潜能评价

1.9.1 商品大豆异黄酮样品处理

从上海麦克林生化科技股份有限公司购买的大豆异黄酮商品为异黄酮含量 40% 的粉末物, 使用 90%乙醇以 1:20 的料液比在 70 °C 条件下抽提 1.5 h, 将其作为酶解的底物进行后续的酶解试验。

1.9.2 商品大豆异黄酮水解反应条件

以糖苷总体水解率为指标, 分别建立出发酶 Bgl2A:V224D 和 S360K/E408Y 各自的水解体系。水解体系(500 μL): 100 μL 大豆异黄酮萃取液, 加入 10 μL 75 U/mL 的 β -葡萄糖苷酶, 然后用 pH 6.5 的 50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液定容, 混匀后在 40 °C 条件下反应 10 min, 然后加入 4.5 mL 的 90%乙醇终止反应, 用 0.22 μm 滤膜过滤后进行检测。

(1) 最适底物量: 使反应体系中底物大豆异黄酮的量分别为 0.40、0.53、0.80 和 1.60 mg, 在 pH 6.5、40 °C 条件下反应 10 min。

(2) 最适 pH: 将 0.80 mg 底物分别加入 pH 6.0、6.5、7.0、7.5 的缓冲液中, 在 40 °C 条件下反应 10 min; 将 1.60 mg 底物分别加入 pH 6.0、6.5、7.0、7.5 的缓冲液中, 在 40 °C 条件

下反应 10 min。

(3) 最适温度: 将 0.80 mg 底物加入 pH 6.5 的缓冲液中, 加入出发酶 Bgl2A:V224D 分别于 30、35、40 和 45 °C 条件下反应 10 min; 将 1.60 mg 底物加入 pH 6.5 的缓冲液中, 加入突变体 S360K/E408Y 分别于 30、35、40 和 45 °C 条件下反应 10 min。

(4) 最适反应时间: 将 0.80 mg 底物加入 pH 6.5 的缓冲液中, 加入出发酶于 35 °C 条件下分别反应 2、5、10、15 和 20 min; 将 1.60 mg 底物加入 pH 6.5 的缓冲液中, 加入突变体于 35 °C 条件下分别反应 2、5、10、15 和 20 min。

1.9.3 大豆黄浆水精深加工中的大豆异黄酮转化

首先通过蒸发将黄浆水体积浓缩至 1/5 左右, 加入体积为浓缩后黄浆水 3/4 的无水乙醇, 室温下充分混匀后 8 000 r/min 离心 20 min, 得到异黄酮的萃取溶液。由于高浓度乙醇会导致 β -葡萄糖苷酶失活, 再次通过蒸发把萃取溶液浓缩至萃取溶液体积的 60% 左右, 降低乙醇含量的同时提高异黄酮的浓度。取 10 mL 溶液, 分别加入 4、8、12、16 和 20 U 的 β -葡萄糖苷酶, 在 35 °C、pH 6.5 条件下水解 10 min 后加入等体积的 75% 乙醇终止反应。

2 结果与分析

2.1 突变体设计结果

利用 SWISS-MODEL 对 Bgl2A:V224D 进行同源建模获得其模拟结构(图 1)。将模拟结构提交至 PROSS, 设置活性中心及其周边位点(图 1)为不可变位点, 模拟突变共设计获得 9 条序列(DOI: 10.57760/sciencedb.13138); 使用 ABACUS 共设计了 10 条序列(DOI: 10.57760/sciencedb.13138)。取两种方法设计的突变的交集(表 1 中 a)、

这些突变中用 FoldX 预测 $\Delta\Delta G < -0.45$ kcal/mol 的成员(表 1 中 b 和 c)及其交集(表 1 中 d), 然后对选取的突变通过下述共进化和保守性分析等方法进一步筛选。

根据 GREMLIN 对蛋白质残基对的共进化分析, 将得分大于 0.7 的氨基酸对的突变剔除, 评分见 <http://openseq.org/sub.php?id=1683339376>, 以避免突变蛋白质进化过程中比较保守的残基对活性的影响; 然后, 将实验室前期结果(未发表)显示比酶活相比野生型降低的突变剔除; 接着剔除脯氨酸位点的突变, 因脯氨酸侧链构象相对比较刚性, 对整个蛋白质分子的构象一般有稳定作用, 突变成其他氨基酸可能会降低蛋白质分子的稳定性; 最后, 根据 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶序列的保守性图谱(图 2)剔除完全保守位点的突变, 以避免对酶活造成重大损害。



图 1 Bgl2A:V224D 的模拟结构 红色: 催化残基 E170 和 E352; 蓝色: 突变位点

Figure 1 Structure model of Bgl2A:V224D. Red colour: The two conserved catalytic residues E170 and E352; Blue colour: The mutation sites.

表 1 计算设计的 Bgl2A:V224D 突变体

Table 1 Mutation on Bgl2A:V224D designed by computation

设计方法	突变
Design method	Mutation
PROSS+ABACUS ^a	E235D, D238A, M259F, N362V, S232P
PROSS+FoldX ^b	M259F, H274D, E312I, S360K, T243A, S289P
ABACUS+FoldX ^c	I181L, V189K, V189Q, G190D, K191L Y193I, K196A, M259F, I310G, L320V, N376Q, T386L, S399G, A407P, E408F, E408Y, Q424G
PROSS+ABACUS+FoldX ^d	M259F

^a: PROSS 和 ABACUS 设计的突变的交集; ^b: PROSS 设计的突变中 FoldX 预测 $\Delta\Delta G < -0.45$ kcal/mol 的成员; ^c: ABACUS 设计的突变中 FoldX 预测 $\Delta\Delta G < -0.45$ kcal/mol 的成员; ^d: b 与 c 的交集

^a: Overlapping members of the mutations designed by PROSS and ABACUS; ^b: PROSS designed mutations whose $\Delta\Delta G$, predicted by FoldX, < -0.45 kcal/mol; ^c: ABACUS designed mutations whose $\Delta\Delta G$, predicted by FoldX, < -0.45 kcal/mol; ^d: Overlapping members of b and c.

经过以上计算分析最终确定候选突变共 26 个(表 1)。通过 Pymol 结构可视化可以发现这些突变位点都分布在蛋白的表面或底物通道的上部, 离活性中心较远(图 1)。

2.2 酶的制备和表征

2.2.1 酶的制备

共成功构建了 26 个突变体, 其中 12 个可溶表达。这些可溶表达的突变体的制备情况包括表达量、收率和纯度均与野生型相似, 获得蛋白的纯度可达 95%以上(图 3), 因所有可溶表达突变体的情况都很相似, 在此以 S360K 作为代表。

2.2.2 酶活

以 pNPG 作为底物对突变体的酶活进行测定, 结果如表 2 所示, 突变体 S360K、S232P、S289P、E408Y、E408F 和 V189K 的比酶活较出发酶接近或更高, 其中 S289P 的比酶活最高; 其余突变体的比酶活则有不同程度的下降。

2.2.3 酶的最适温度、最适 pH 及稳定性

使用 pNPG 作为底物, 突变体的活性受温度的影响与 Bgl2A:V224D 相似, 最佳温度为 45 °C (图 4A)。突变体的最适 pH 也与出发酶一致, 都是 pH 6.5 (图 4B)。在稳定性方面, S360K、E408Y 和 E408F 表现出比出发酶更长的半衰期, 分别为出发酶的 4.3、3.0 和 3.0 倍(图 4C)。

2.2.4 组合突变体的酶活、最适温度、最适 pH 及稳定性

为进一步提升酶的稳定性, 同时维持或提升酶的活性, 选择稳定性提升同时酶活维持的同时酶活提升的 S289P 突变进行组合。因 S360K 稳定性提升最多, 组合突变均在 S360K 的基础上进行。所有组合突变体均获得成功构建和制备。其比酶活如预期均比出发酶更高(表 3); 最适温度与出发酶相同或更高(图 5A); 最适 pH 与出发酶相同(图 5B); 稳定性也与出发酶接近或更高, 其中 S360K/E408Y 提升最多, 在 35 °C、pH 6.5 条件下的半衰期是出发酶的 6.7 倍左右, 比所有单点突变体都更高(图 5C)。因此, S360K/E408Y 可作为进一步考察应用潜能的候选酶。因含 289 位点的双点组合突变体 S360K/S289P 稳定性比出发酶更低, 所以未进一步构建三点组合突变体。

2.2.5 葡萄糖对突变体酶活的影响

为考察稳定性提升最多的突变体 S360K/E408Y 在应用时对产物抑制的耐受性, 检测了葡萄糖对其活性的影响。相较于出发酶, 突变体保留了低浓度葡萄糖促活性质(图 6), 有利于其实际应用。

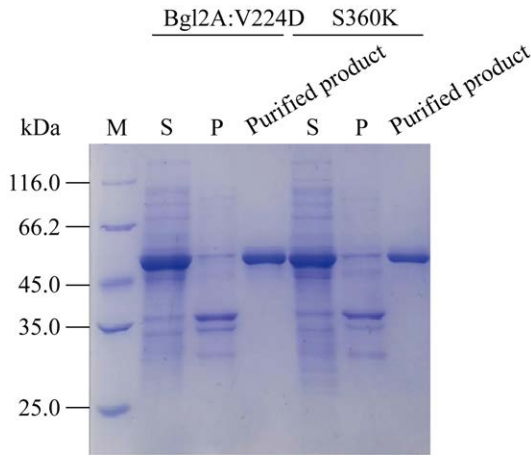


图3 Bgl2A:V224D 和其突变体代表 S360K 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 检测 M: 蛋白质分子量标准; S: 上清; P: 沉淀

Figure 3 SDS-PAGE for the expression and purification of Bgl2A:V224D and its mutant representative S360K. M: Protein marker; S: Supernatant; P: Precipitation.

表2 Bgl2A:V224D 及其突变体对底物 pNPG 的比酶活

Table 2 Specific activities of Bgl2A:V224D and its mutants to substrate pNPG

Enzyme	Specific activity (U/mg)	<i>P</i>
Bgl2A:V224D	89±2.52	*
T243A	58±1.73	<0.000 1
S360K	87±3.32	0.998 3
S232P	96±3.64	0.114 5
E235D	81±1.83	0.021 1
H274D	80±2.43	0.011 0
M259F	54±1.58	<0.000 1
S289P	100±3.96	0.002 5
E408Y	87±2.65	0.992 9
S399G	46±1.04	<0.000 1
A407P	48±2.21	<0.000 1
V189K	87±2.93	0.995 9
E408F	85±2.55	0.640 6

*: *P* 值为突变体的比酶活与出发酶的比酶活的差异显著性指标, 所以出发酶无此数据

The *P*-value is a significant indicator of the difference between the specific enzyme activity of the mutant and the specific enzyme activity of the starting enzyme, so this data is not available for the starting enzyme.

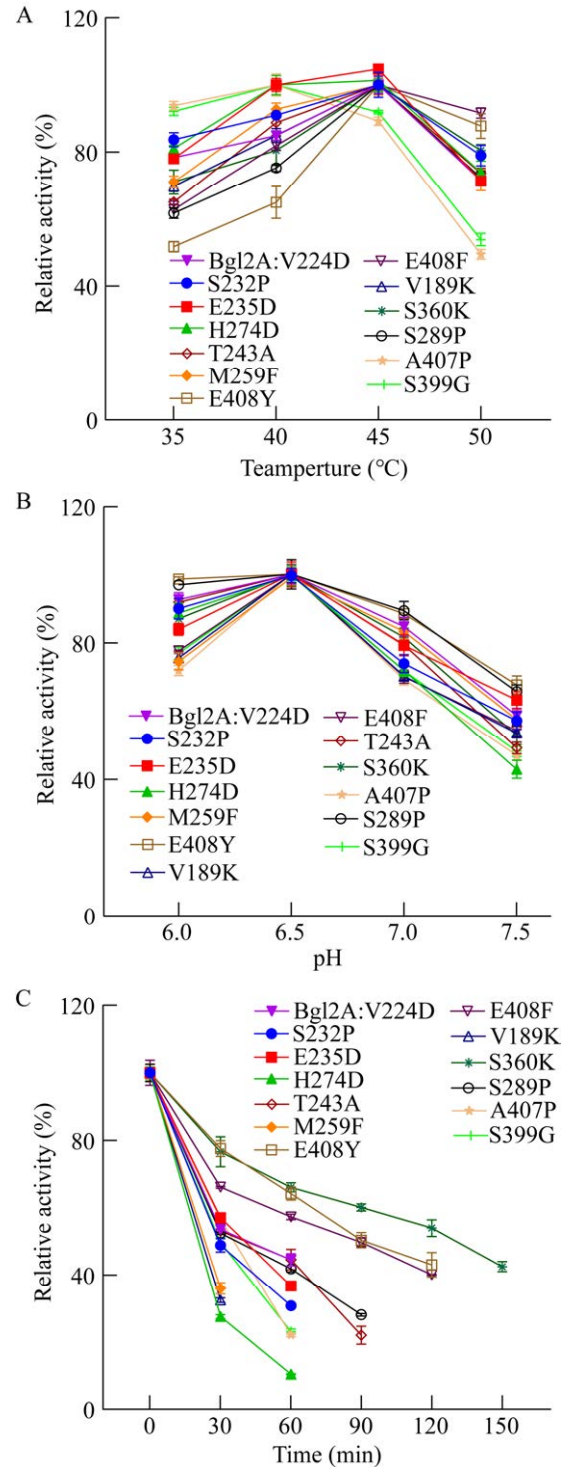


图4 Bgl2A:V224D 及其突变体的最适温度(A)、最适 pH (B)及稳定性(C)

Figure 4 The optimum temperature (A), optimum pH (B) and stability (C) of Bgl2A:V224D and its mutant enzymes.

表 3 Bgl2A:V224D 及组合突变体的比酶活

Table 3 Specific activities of Bgl2A:V224D and its combinational mutants

Enzyme	Specific activity (U/mg)	<i>P</i>
Bgl2A:V224D	89±2.52	*
S360K/E408Y	94±3.47	0.522 9
S360K/E408F	92±2.83	0.988 7
S360K/S289P	96±3.23	0.136 2

*: *P* 值为突变体的比酶活与出发酶的比酶活的差异显著性指标, 所以出发酶无此数据

The *P*-value is a significant indicator of the difference between the specific enzyme activity of the mutant and the specific enzyme activity of the starting enzyme, so this data is not available for the starting enzyme.

2.2.6 乙醇对突变体酶活的影响

为考察稳定性提升最多的突变体 S360K/E408Y 在应用时对环境的适应性, 检测了在 35 °C 条件下不同浓度乙醇对其酶活的影响。结果显示, 突变体在 30%乙醇条件下还保留了 30%以上酶活, 而出发酶在相同条件下则丧失了所有酶活(图 7)。进一步检测了突变体和出发酶在乙醇环境中酶活随时间的变化。结果显示, 出发酶在 20%乙醇中孵育 10 min, 仅剩下 5%左右酶活; 而突变体在相同条件下则保留了 60%左右酶活, 甚至在孵育 20 min 后仍保留了 35%左右酶活(图 8)。这些结果说明 S360K/E408Y 的乙醇耐受性比出发酶更好。

2.2.7 突变体的酶动力学参数

S360K/E408Y 的稳定性提升的同时, 活性也比出发酶更高。为研究其中的机制, 对其酶动力学参数进行了测定。结果显示, 突变体的 K_m 值较出发酶略有降低, 而 k_{cat} 值则有所增加(表 4)。说明 360 位点和 408 位点的突变既影响了底物亲和力也影响了催化效率。

2.3 酶在水解商品大豆异黄酮中的应用

2.3.1 底物量对水解大豆异黄酮的影响

为考察 S360K/E408Y 的应用潜能, 比较了其与出发酶对不同量的商品大豆异黄酮的水解

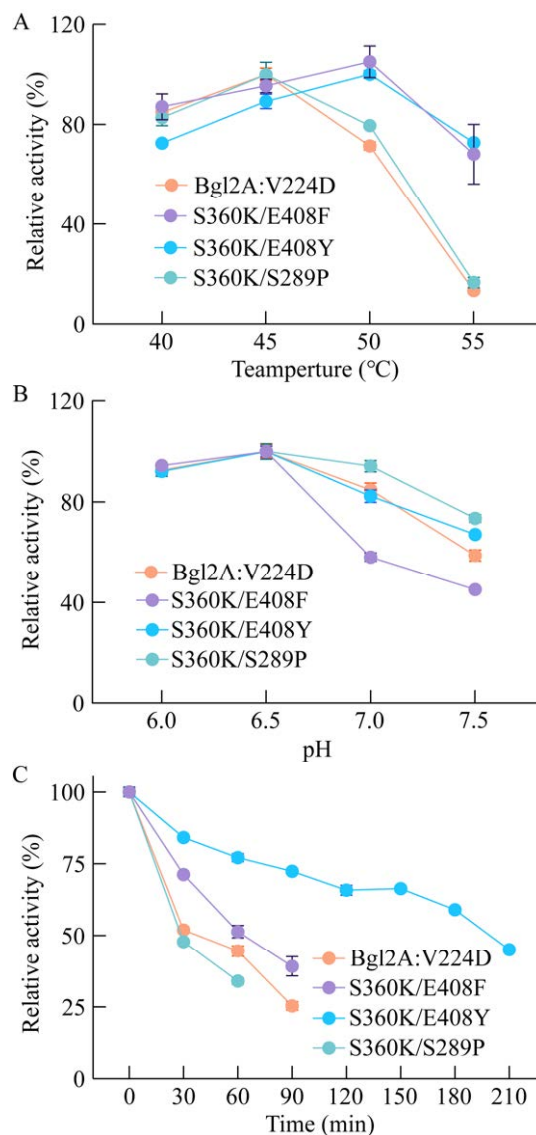


图 5 组合突变体的最适温度(A)、最适 pH (B)、稳定性(C)

Figure 5 The optimum temperature (A), optimum pH (B), and stability (C) of Bgl2A:V224D and its combinational mutants.

性能, 结果显示, 突变体和出发酶的水解率都随底物量的增加而降低。同量(酶活)的酶在相同条件下水解相同量的大豆异黄酮, 突变体可获得更高的水解率: 比如对 0.80 mg 底物, 出发酶的水解率只能达到 80%左右, 突变体则可达到近 100% (图 9)。这说明突变体有更好的应用潜

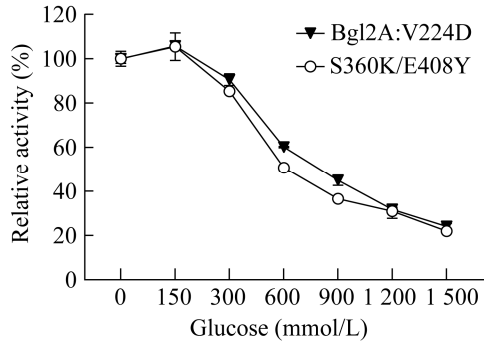


图 6 葡萄糖对 Bgl2A:V224D 和 S360K/E408Y 酶活的影响

Figure 6 Effects of glucose on the activities of Bgl2A:V224D and S360K/E408Y.

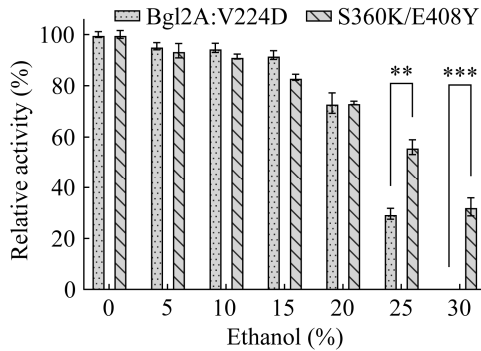


图 7 乙醇对 Bgl2A:V224D 和 S360K/E408Y 酶活的影响

Figure 7 Effects of ethanol on the activities of Bgl2A:V224D and S360K/E408Y. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$.

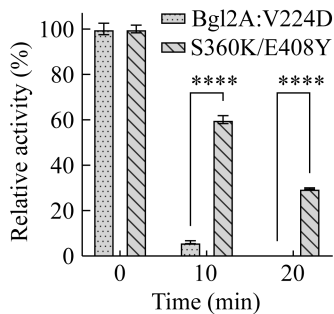


图 8 乙醇条件下孵育时间对 Bgl2A:V224D 和 S360K/E408Y 酶活的影响

Figure 8 Effects of incubation time in ethanol environment on the activities of Bgl2A:V224D and S360K/E408Y. ****: $P < 0.0001$.

表 4 Bgl2A:V224D 和 S360K/E408Y 对 pNPG 的动力学常数

Table 4 Kinetic constants of Bgl2A:V224D and S360K/E408Y to pNPG

Enzyme	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
Bgl2A:V224D	0.96 ± 0.08	42.85 ± 1.38	44.63 ± 2.43
S360K/E408Y	0.74 ± 0.09	49.25 ± 1.87	66.84 ± 4.50

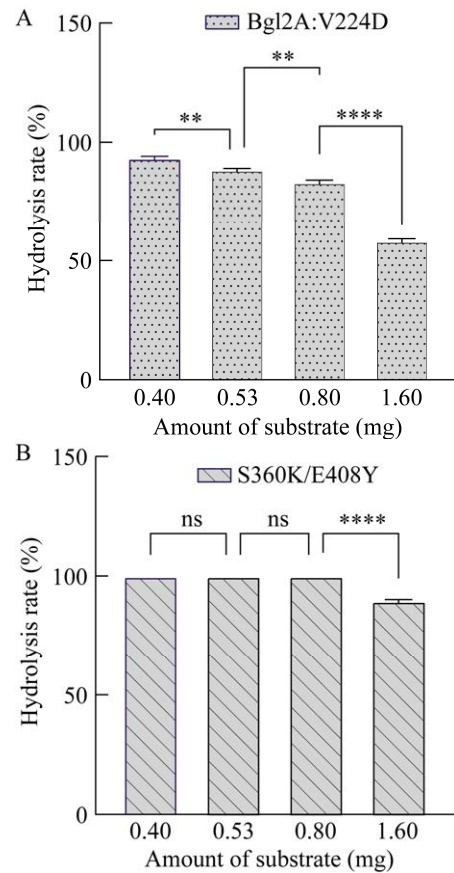


图 9 底物量对 Bgl2A:V224D (A)和 S360K/E408Y (B)水解大豆异黄酮糖苷的影响

Figure 9 Effects of substrate amount on the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by Bgl2A:V224D (A) and S360K/E408Y (B). ns: No significant difference; **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

能。为进一步体现突变体相对于出发酶具有更高底物水解效率的应用优势，在下文所述的商品大豆异黄酮水解实验中，前者的底物量均为后者的底物量的 2 倍(即 1.60 mg 对 0.80 mg)。

2.3.2 pH 对水解大豆异黄酮的影响

比较不同 pH 条件下酶水解大豆异黄酮的效率, 结果显示, 突变体和出发酶的水解率随着 pH 的升高都呈先上升后下降的趋势, 都在 pH 6.5 达到最高。在各种 pH 条件下, 同酶活的突变体的水解率相比出发酶都相当或更高(图 10)。

2.3.3 反应温度对水解大豆异黄酮的影响

比较不同温度条件下酶水解大豆异黄酮的效率, 结果显示, 突变体和出发酶的水解效率随着温度的升高逐渐降低, 都在 35 °C 左右达到最高, 接近 100%。虽然突变体的最适温度相比出发酶没有提升, 但在各种温度下, 前者的水

解率都更高(图 11), 体现了其相对后者更高的热稳定性。

2.3.4 反应时间对水解大豆异黄酮的影响

比较不同反应时间对酶水解大豆异黄酮效率的影响, 结果显示, 随着反应时间的增加, 异黄酮的水解率也逐渐增加。同酶活的突变体和出发酶的在各时长的水解率相当, 都在 10 min 左右完全水解底物(图 12)。

综上, 在各种实验条件下, 突变体都表现出了与出发酶相当或相对更高的大豆异黄酮水解率。如前所述, 在这些实验中使用的突变体和出发酶的酶活相同, 因前者的比酶活比后者更

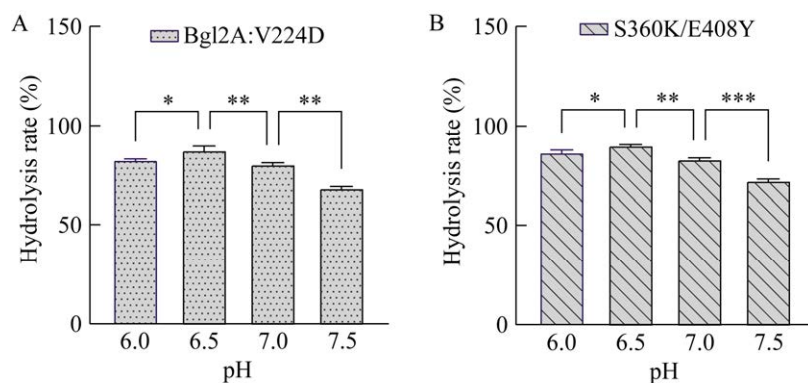


图 10 pH 对 Bgl2A:V224D (A)和 S360K/E408Y (B)水解大豆异黄酮糖苷的影响

Figure 10 The effect of pH on the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by Bgl2A:V224D (A) and S360K/E408Y (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

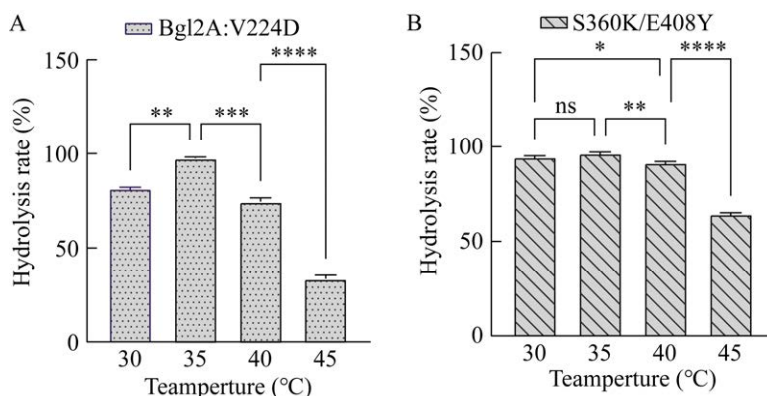


图 11 温度对 Bgl2A:V224D (A)和 S360K/E408Y (B)水解大豆异黄酮糖苷的影响

Figure 11 The effect of temperatures on the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by Bgl2A:V224D (A) and S360K/E408Y (B). ns: No significant difference; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

高, 所以所用突变体的质量比出发酶的质量更少。另外, 实验中突变体的底物量是出发酶的底物量的 2 倍, 综合比较, 突变体水解大豆异黄酮的效率相对出发酶显著更高, 更具应用潜能。

2.4 突变体在大豆黄浆水精深加工中的应用

如前所述, 以商品大豆异黄酮为底物时, 在相同酶活条件下, S360K/E408Y 的水解率比 Bgl2A:V224D 更高。与此类似, 以大豆黄浆水中的大豆异黄酮为底物时, 突变体同样表现出了比相同酶活的出发酶更高的水解率。相应地, 达到相同水解率所需突变体的量比出发酶更少,

比如: 突变体只需 8 U 就能达到 90% 的水解率, 而出发酶则需要 12 U 才能达到相同水解率。大豆异黄酮的水解率随着酶量的增加而逐渐增加, 当酶的用量达到 20 U 时, 两者的水解率都达到 95% 左右(图 13)。

3 讨论

折叠态与去折叠态的自由能之差 ΔG 是反映蛋白质稳定性的参数, 通过对其计算可以筛选自由能更低、更有利于蛋白质稳定的突变设计。采用多种能量函数进行计算评分, 可以减小单一算法的局限性, 降低假阳性的概率。

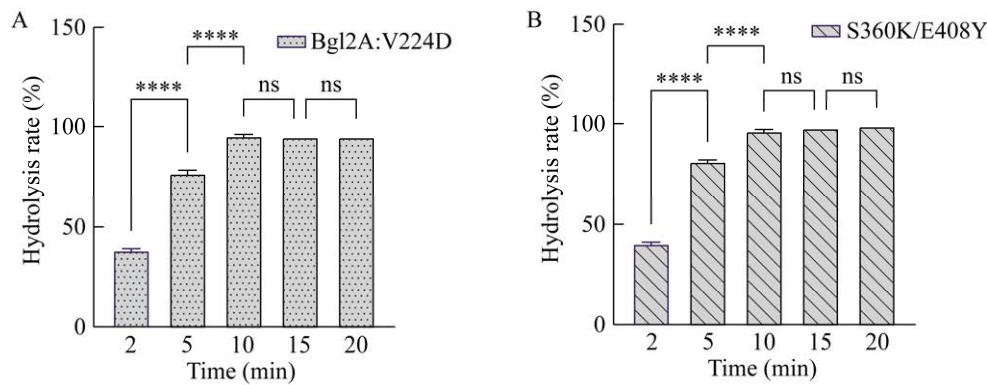


图 12 反应时间对 Bgl2A:V224D (A)和 S360K/E408Y (B)水解大豆异黄酮糖苷的影响

Figure 12 The effect of reaction times on the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by Bgl2A:V224D (A) and S360K/E408Y (B). ns: No significant difference; ****: $P < 0.0001$.

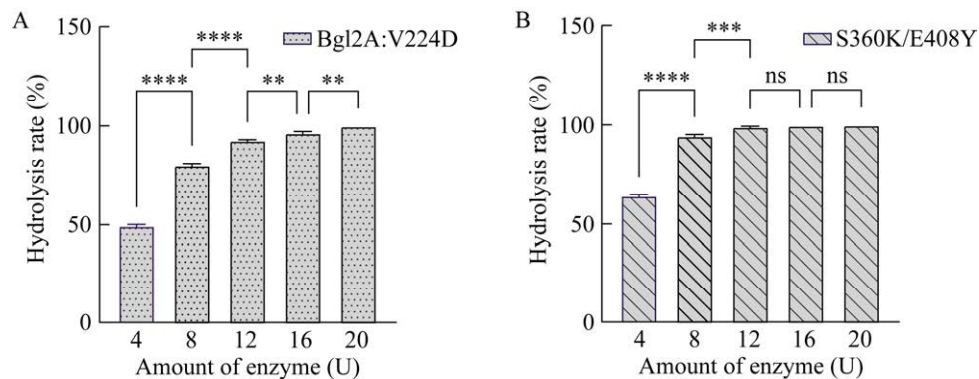


图 13 酶量对 Bgl2A:V224D (A)和 S360K/E408Y (B)水解大豆黄浆水异黄酮糖苷的影响

Figure 13 The effect of enzyme quantities on the hydrolysis of the isoflavone glycosides in soybean yellow slurry water by Bgl2A:V224D (A) and S360K/E408Y (B). ns: No significant difference; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

本研究以前期获得的具有高比酶活和葡萄糖耐受的新型 β -葡萄糖苷酶 Bgl2A:V224D 为研究对象, 用互补的能量函数对突变体的自由能进行计算评分, 以获得蛋白更加稳定的突变体。这些位点都位于蛋白质的表面, 与文献报道的结果相一致: 与蛋白质稳定性相关的位点一般远离活性中心, 保守性也差^[22]。研究表明, 改变活性位点附近的氨基酸可能会极大影响酶的性质^[11]。例如, Jiang 等^[23]通过对 β -葡萄糖苷酶活性中心附近保守区域内的非保守氨基酸突变, 获得的突变体 F167L、R354K 的比活分别约为出发酶的 2 倍和 4 倍。本研究共成功构建 26 个突变体, 其中有 12 个突变体可溶性表达, 14 个突变体以包涵体的形式存在, 形成包涵体可能是由于突变导致的蛋白质不能正确折叠。最终得到组合突变体 S360K/E408Y 在 35 °C、pH 6.5 条件下的半衰期是出发酶的 6.7 倍左右。360 位点和 408 位点的突变对酶活的影响较小, 对酶的葡萄糖耐受性基本也没有影响。通过测定乙醇对酶活的影响, 也进一步证实了稳定性提升的突变体对有机溶剂的耐受能力也会有显著提升。因此, 本研究为通过蛋白质工程提升酶的有机溶剂耐受性提供了一种新策略。

本研究还进一步探究了出发酶 Bgl2A:V224D 和突变体 S360K/E408Y 二者在水解商品大豆异黄酮制备苷元的应用潜能。在优化条件下, 2 个酶对异黄酮的水解率均接近 100%, 但突变体 S360K/E408Y 在相同条件下可水解的底物量是出发酶的 2 倍。另外, 利用 S360K/E408Y 水解黄浆水中的大豆异黄酮, 效果也比出发酶 Bgl2A:V224D 更好, 达到相同水解率所需 S360K/E408Y 的酶量相比出发酶 Bgl2A:V224D 少 1/3 左右。Li 等^[24]将 50 μ L 10%异黄酮提取液和 200 μ L 0.05 U 酶液置于柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 4.5)中, 37 °C 反应 10 min 后终止

反应, 经检测异黄酮苷元含量从 43 mg/mL 增加至 72.4 mg/mL, 糖苷异黄酮并未彻底水解。Yeom 等^[25]用 33 U/mL 的酶水解 7.5%的甲醇提取异黄酮, 染料木苷、大豆苷、黄豆黄苷分别在 120、160 和 200 min 后彻底转化为苷元形式。经对比可见, 本研究获得的突变体 S360K/E408Y 在水解大豆异黄酮方面更加高效彻底, 可以作为水解大豆异黄酮应用的候选酶, 利用其制备的异黄酮苷元可用作食品添加剂以及保健品的成分。另外, 该酶也可用于水解某些天然产物, 如中药材中水溶性较差但可溶于有机溶剂的成分, 制备活性更高的产物。

4 结论

本研究的结果表明, 利用提升稳定性的改造方法提升酶对有机溶剂耐受性的策略适用于 β -葡萄糖苷酶, 通过这一策略可提升 β -葡萄糖苷酶在多领域的应用潜力。

REFERENCES

- [1] ZHOU W, GUAN ZB, CHEN Y, ZHANG F, CAI YJ, XU CW, CHEN XS, LIAO XR. Production of spore laccase from *Bacillus pumilus* W3 and its application in dye decolorization after immobilization[J]. Water Science and Technology, 2017, 76(1/2): 147-154.
- [2] 张会会. 扩展青霉脂肪酶的定向进化及其稳定性的提高[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2015. ZHANG HH. Directional evolution of lipase from *Penicillium expansum* and improvement of its stability[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2015 (in Chinese).
- [3] CAO LC, LI SF, HUANG X, QIN ZM, KONG W, XIE W, LIU YH. Enhancing the thermostability of highly active and glucose-tolerant β -glucosidase Ks5A7 by directed evolution for good performance of three properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(50): 13228-13235.
- [4] SINHA SK, GOSWAMI S, DAS S, DATTA S. Exploiting non-conserved residues to improve activity and stability of *Halothermothrix orenii* β -glucosidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(4): 1455-1463.

- [5] ARNOLD FH. Innovation by evolution: bringing new chemistry to life (Nobel lecture)[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(41): 14420-14426.
- [6] GRIBENKO AV, PATEL MM, LIU JJ, McCALLUM SA, WANG CY, MAKHATADZE GI. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(8): 2601-2606.
- [7] YANG M, YANG SX, LIU ZM, LI NN, LI L, MOU HJ. Rational design of alginate lyase from *Microbulbifer* sp. Q7 to improve thermal stability[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(6): 378.
- [8] SHOULDERS MD, SATYSHUR KA, FOREST KT, RAINES RT. Stereoelectronic and steric effects in side chains preorganize a protein main chain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(2): 559-564.
- [9] CUI HY, ELTOUKHY L, ZHANG LL, MARKEL U, JAEGER KE, DAVARI MD, SCHWANEBERG U. Less unfavorable salt bridges on the enzyme surface result in more organic cosolvent resistance[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(20): 11448-11456.
- [10] ZHANG WM, MULLANEY EJ, LEI XG. Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* PhyA phytase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 3069-3076.
- [11] XIE Y, AN J, YANG GY, WU G, ZHANG Y, CUI L, FENG Y. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(11): 7994-8006.
- [12] CUI YY, YANG M, LIU N, WANG SS, SUN Y, SUN GH, MOU HJ, ZHOU DQ. Computer-aided rational design strategy to improve the thermal stability of alginate lyase AlyMc[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(6): 3055-3065.
- [13] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL SE, GERTMAN O, LAURINO P, ASHANI Y, DYM O, UNGER T, ALBECK S, PRILUSKY J, LIEBERMAN RL, AHARONI A, SILMAN I, SUSSMAN JL, TAWFIK DS, FLEISHMAN SJ. Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(2): 337-346.
- [14] LIU RC, WANG JC, XIONG P, CHEN Q, LIU HY. *De novo* sequence redesign of a functional Ras-binding domain globally inverted the surface charge distribution and led to extreme thermostability[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(5): 2031-2042.
- [15] BUß O, MULLER D, JAGER S, RUDAT J, RABE KS. Improvement in the thermostability of a β -amino acid converting ω -transaminase by using FoldX[J]. *ChemBioChem*, 2018, 19(4): 379-387.
- [16] CUI YL, CHEN YC, LIU XY, DONG SJ, TIAN YE, QIAO YX, MITRA R, HAN J, LI CL, HAN X, LIU WD, CHEN Q, WEI WQ, WANG X, DU WB, TANG SY, XIANG H, LIU HY, LIANG Y, HOUK KN, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [17] ZHANG BF, LÜ C, ZHANG M, XU F. Improving the thermal stability of *Proteus mirabilis* lipase based on multiple computational design strategies[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1537-1553.
- [18] LIU SF, ZHANG M, HONG DW, FANG ZM, XIAO YZ, FANG W, ZHANG XC. Improving the cellobiose hydrolysis activity of glucose-stimulating β -glucosidase Bgl2A[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 169: 110289.
- [19] XIONG P, HU XH, HUANG B, ZHANG JH, CHEN Q, LIU HY. Increasing the efficiency and accuracy of the ABACUS protein sequence design method[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(1): 136-144.
- [20] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, NYS R, ROUSSEAU F, SERRANO L. The FoldX web server: an online force field[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W382-W388.
- [21] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [22] HOU QZ, ROOMAN M, PUCCI F. Enzyme stability-activity trade-off: new insights from protein stability weaknesses and evolutionary conservation[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2023, 19(12): 3664-3671.
- [23] JIANG SZ, LI JJ, CAO CJ, SHEN YL, NI JF. Molecular modification of β -glucosidase from the midgut of *Macrotermes barneyi*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(7): 1081-1090.
- [24] LI XX, XIA W, BAI YG, MA R, YANG H, LUO HY, SHI PJ. A novel thermostable GH3 β -glucosidase from *Talaromyce leycettanus* with broad substrate specificity and significant soybean isoflavone glycosides-hydrolyzing capability[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 4794690.
- [25] YEOM SJ, KIM BN, KIM YS, OH DK. Hydrolysis of isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(6): 1535-1541.