

## 研究报告

嗜糖黄杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的功能及在稀有人参皂苷制备中的应用

董博妍, 闫学翠, 周凤恩, 王一冰, 周义发, 原野\*

东北师范大学生命科学学院 糖复合物教育部工程研究中心, 吉林 长春 130024

董博妍, 闫学翠, 周凤恩, 王一冰, 周义发, 原野. 嗜糖黄杆菌 $\beta$ -葡萄糖苷酶的功能及在稀有人参皂苷制备中的应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3833-3847.

DONG Boyan, YAN Xuecui, ZHOU Feng'en, WANG Yibing, ZHOU Yifa, YUAN Ye. Glucosidases from *Flavobacterium saccharophilum*: characterization and application in the preparation of minor ginsenosides[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3833-3847.

**摘要:** 【背景】有些稀有皂苷具有较好的药理活性, 寻找活性高和专一性好的糖苷酶可能实现稀有皂苷的定向制备。嗜糖黄杆菌中含有丰富且未被表征的糖苷酶基因是寻找新酶的潜在来源。

【目的】从嗜糖黄杆菌中发现活性高和专一性好的糖苷酶, 用于制备稀有人参皂苷。【方法】重组表达嗜糖黄杆菌中 15 个假定的葡萄糖苷酶基因, 系统研究重组酶的性质和功能, 筛选可用于制备稀有皂苷的酶, 利用薄层层析法和高效液相色谱法鉴定转化产物。【结果】从嗜糖黄杆菌中获得 3 种活性较好的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 即 SA2629、SA0236 和 SA2851。其中, SA2629 具有最高的比酶活 (78.7 U/mg) 和催化效率 [ $k_{\text{cat}} = (27.38 \pm 1.40) \text{ s}^{-1}$ ], 且 SA2629 能同时水解人参皂苷 C-20 位上的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键和 C-3 位直接与苷元相连的葡萄糖苷键。SA2851 和 SA0236 只对 C-20 位上的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键具有水解活性, 其中 SA0236 活力高。将 SA2629 和 SA0236 与课题组前期获得的一种  $\beta$ -1,2-葡萄糖苷酶分别组合, 可以将高含量人参皂苷 Rb1 完全转化成稀有皂苷 CK 和 F2。【结论】获得了可用于制备稀有人参皂苷的糖苷酶, 填补了嗜糖黄杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶研究的空白。

**关键词:** 嗜糖黄杆菌;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 酶学性质; 稀有皂苷

资助项目: 吉林省科技厅医药健康专项(20200504005YY); 中央高校基本科研业务费专项资金(2412022XK011)

This work was supported by the Jilin Provincial Department of Science and Technology Medicine and Health Project (20200504005YY) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2412022XK011).

\*Corresponding author. E-mail: yuany268@nenu.edu.cn

Received: 2022-11-27; Accepted: 2023-05-03; Published online: 2023-06-29

## Glucosidases from *Flavobacterium saccharophilum*: characterization and application in the preparation of minor ginsenosides

DONG Boyan, YAN Xuecui, ZHOU Feng'en, WANG Yibing, ZHOU Yifa, YUAN Ye\*

Engineering Research Center of Glycoconjugates, Ministry of Education, School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin, China

**Abstract:** [Background] Some minor ginsenosides possess valuable pharmacological activities. Mining glycosidases with high activity and specificity can realize the directional preparation of minor ginsenosides. *Flavobacterium saccharophilum* carries abundant and uncharacterized glycosidase genes, which are potential sources for excavating new glycosidases. [Objective] To obtain highly active and specific glycosidases from *F. saccharophilum* for the preparation of minor ginsenosides. [Methods] Fifteen putative glucosidase genes were cloned from *F. saccharophilum* and expressed. To screen out the enzymes for the preparation of minor ginsenosides, we fully characterized the recombinants and identified the biotransformation products by employing thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. [Results] Three  $\beta$ -glucosidases (SA2629, SA0236, and SA2851) with high activities were obtained from *F. saccharophilum*. SA2629 showed the highest specific activity (78.7 U/mg) and catalytic efficiency [ $k_{\text{cat}}=(27.38\pm1.40)\text{ s}^{-1}$ ]. Furthermore, it could simultaneously hydrolyze the  $\beta$ -1,6-glucosidic bond at the C-20 position and the glucosidic bond directly connected to the aglycone at the C-3 position. SA2851 and SA0236 only had hydrolysis activity on the  $\beta$ -1,6 glucosidic bond at the C-20 position, and SA0236 had higher activity. Furthermore, we completely transformed ginsenoside Rb1 to the minor ginsenosides CK and F2 by using SA2629 and SA0236, respectively, with a  $\beta$ -1,2-glucosidase obtained in our lab. [Conclusion] The glycosidases that can be employed to prepare minor ginsenosides were obtained, which filled the gap in the study of  $\beta$ -glucosidases from *F. saccharophilum*.

**Keywords:** *Flavobacterium saccharophilum*;  $\beta$ -glucosidase; enzymatic properties; minor ginsenosides

人参皂苷是人参的主要活性成分, 具有抗癌、抗过敏和抗氧化等多种药理活性<sup>[1-2]</sup>。高含量皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re 和 Rg1 等在总皂苷中的含量超过 80%, 稀有皂苷 F2、Rg3、Rh1、Rh2 和 Compound K (C-K) 等含量极低甚至没有<sup>[3]</sup>, 而稀有皂苷的药理活性往往优于高含量皂苷。因此, 许多研究集中于水解高含量皂苷

中与 C-3、C-6 和 C-20 位置连接的糖链部分来制备稀有皂苷<sup>[4]</sup>。目前报道过加热<sup>[5]</sup>、酸处理<sup>[6]</sup>、发酵<sup>[7]</sup>和酶转化<sup>[8]</sup>等方法, 由于酶转化法具有特异性高、选择性强和反应条件温和等特点而广泛应用。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是制备稀有皂苷过程中较为重要的一类酶。 $\beta$ -葡萄糖苷酶能催化糖类化合

物中非还原性末端  $\beta$ -葡萄糖苷键水解,释放葡萄糖和相应配基<sup>[9-10]</sup>。根据氨基酸序列分类, $\beta$ -葡萄糖苷酶主要来源于 GH1 和 GH3 两个家族<sup>[11]</sup>,GH1 家族中  $\beta$ -葡萄糖苷酶大多来源于古菌、植物和哺乳动物,并且多数是具有半乳糖苷酶活性的双功能酶<sup>[12]</sup>。GH3 家族中  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要分布于细菌和真菌中<sup>[13]</sup>。目前根据反应底物仅将  $\beta$ -葡萄糖苷酶分为水解芳基- $\beta$ -葡萄糖苷的  $\beta$ -芳基葡萄糖苷酶、水解  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的纤维二糖酶和底物选择性广泛的  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[14]</sup>。

许多微生物来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶已实现大量生产和广泛应用,但目前暂无嗜糖黄杆菌来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶的相关报道。本研究旨在从嗜糖黄杆菌中获得活力高且选择性专一的  $\beta$ -葡萄糖苷酶并应用于稀有皂苷等糖类化合物的制备中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

嗜糖黄杆菌(CGMCC 1.12072)购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和质粒 pET-28a(+)购自天根生化科技(北京)有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

pNP $\alpha$ Gal、pNP $\beta$ Gal、pNP $\alpha$ Glu、pNP $\beta$ Glu、pNP $\alpha$ Man、pNP $\beta$ Man、pNP $\alpha$ Arap、pNP $\alpha$ Araf、pNP $\alpha$ Xyl、pNP $\beta$ Xyl、pNP $\alpha$ Rha 和 pNP $\alpha$ Fuc, Sigma 公司;槐糖和纤维二糖,阿拉丁生化科技股份有限公司;昆布二糖,北京百灵威科技有限公司;龙胆二糖,北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪,东胜兴业科学仪器有限公司;高压匀质机,ATS 工业系统有限公司;

酶标仪, BioTek 公司;高效液相色谱系统,北京普源精电科技有限公司;微量分光光度计和离子色谱, Thermo Fisher Scientific 公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 调 pH 值至 7.0; 添加 15.0 g/L 琼脂粉即为 LB 固体培养基, 添加 50  $\mu$ g/mL Kan 即为 Kan 筛选平板。

### 1.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶的序列分析

通过 NCBI 数据库寻找嗜糖黄杆菌基因组(GenBank 登录号为 GCA\_900142735.1)中所有  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因, 利用 ExPASy 在线分析网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对其蛋白分子量进行分析。使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。通过保守结构域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和 TBtools 软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>)预测保守结构域。

### 1.3 重组菌株的构建

将活化后的嗜糖黄杆菌接种至 LB 培养基中, 于 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 16 h。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取嗜糖黄杆菌的基因组。以基因组 DNA 为模板扩增目的基因, 引物序列见表 1。PCR 反应体系: 2 $\times$ GreenMix 5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, 模板(58 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, Phusion HF 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2.8  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 30 s; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 52  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经产物回收试剂盒回收后连接至 pET-28a(+)载体并转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。经 Kan 抗性(50  $\mu$ g/mL)平板筛选、菌落 PCR 和质粒双酶切验证获得阳性重组菌。保存测序正确的重组菌种。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

Name	GenBank accession No.	Primer	Primers sequence (5'→3')
SA2505	SHM14299.1	SA2505-F	ATGGGTCGCGGATCCATGAATAAAGTTGAGAAGTC
		SA2505-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTAAGATAAGAAGTCGCGAA
SA1638	SHL81209.1	SA1638-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAAACAATGTTCCGGTTTA
		SA1638-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTGAAGTGAAAACTCA
SA1023	SHL52973.1	SA1023-F	ATGGGTCGCGGATCCCAACAACAACAATTGATCA
		SA1023-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTGTACTAATTCAAAGT
SA2629	SHM17997.1	SA2629-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAAAGAAGCCGTATCTGGA
		SA2629-R	GTGGTGGTGCTCGAGCTAGCCTTTTATTTCAAAC
SA2489	SHM13873.1	SA2489-F	ATGGGTCGCGGATCCCAACAACCGTAGAAAAATA
		SA2489-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTGAATCAAAAAGACTTT
SA2840	SHM31064.1	SA2480-F	ATGGGTCGCGGATCCCAACAATATCGTTTTAAAGA
		SA2480-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTACTGAATTGCTACTTTAA
SA2851	SHM31376.1	SA2851-F	ATGGGTCGCGGATCCTCGACTGAAAAAGAATTCA
		SA2851-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTGTACCGTAATAGCAA
SA4465	SHM88229.1	SA4465-F	ATGGGTCGCGGATCCATGAAAATGACAGCTGAAGC
		SA4465-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTGAAGGTCAATATTTA
SA1764	SHL84624.1	SA1764-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAAAAAGAACAATAAAAA
		SA1764-R	GTGGTGGTGCTCGAGCTATTTAGTTAACTCAAAAC
SA2453	SHM12971.1	SA2453-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAAAGACACCACAACCTGG
		SA2453-R	GTGGTGGTGCTCGAGCTAGTTTGAATGCATTTCTT
SA0236	SHL28930.1	SA0236-F	ATGGGTCGCGGATCCTGTAAAAAAGACGTACAGTC
		SA0236-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTTGATCGTTATCGCAA
SA3179	SHM40893.1	SA3179-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAAACACTCCAAAATATAA
		SA3179-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTCTGTCACCGTAAGAA
SA0238	SHL28985.1	SA0238-F	ATGGGTCGCGGATCCCAAGCAATATCCCTT
		SA0238-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTTGACAGTTATTTTTT
SA3394	SHM53306.1	SA3394-F	ATGGGTCGCGGATCCTGTGTTATCGCTACATCAAC
		SA3394-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTATTTAATTTTATATCTA
SA3191	SHM41242.1	SA3191-F	ATGGGTCGCGGATCCGTTTATAAAAACAGGATTT
		SA3191-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTACTTCCCAATTTCAAAC

酶切位点以下划线标识

Restriction sites are underlined.

#### 1.4 重组酶的表达、纯化及鉴定

将 5 μL -80 °C 保存的菌种接种到 5 mL LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 条件下培养 12-16 h 后接种到 500 mL LB 培养基中继续培养,  $OD_{600}$  达到 0.6-0.8 后加入 250 μL 1 mol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG), 于 16 °C、120 r/min 诱导培养 16 h 后, 5 000×g 离心 10 min 收集菌体, 并将其重悬于破碎缓冲液(20 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液,

100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.0)。

使用高压匀质机破碎 10 min 后, 4 °C、13 000×g 条件下离心 1 h 收集上清液即为粗酶液, 上样于 Ni-Sepharose 亲和层析色谱柱, 300 mmol/L 咪唑洗脱获得纯酶。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测表达情况和纯度, 使用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

## 1.5 重组酶水解 $p$ NP-糖苷能力的测定

使用  $p$ NP $\alpha$ Man、 $p$ NP $\beta$ Man、 $p$ NP $\alpha$ Araf、 $p$ NP $\alpha$ Arap、 $p$ NP $\alpha$ Xyl、 $p$ NP $\beta$ Xyl、 $p$ NP $\alpha$ Glc、 $p$ NP $\beta$ Glc、 $p$ NP $\alpha$ Gal、 $p$ NP $\beta$ Gal、 $p$ NP $\alpha$ Fuc 和  $p$ NP $\alpha$ Rha 这 12 种糖苷底物分析重组酶的糖基选择性。反应体系中加入 20  $\mu$ L 200 mmol/L 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液, 20  $\mu$ L 5 mmol/L 的  $p$ NP-糖苷底物和适量酶液(酶与底物的摩尔比为 1:1 000), 蒸馏水补至 200  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后立即加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 于 405 nm 波长下测定吸光值( $OD_{405}$ )。以  $p$ NP 的物质的量( $\mu$ mol)为横坐标,  $OD_{405}$  为纵坐标绘制标准曲线, 通过该标准曲线计算酶活力<sup>[15]</sup>。酶活力定义为: 在最适反应条件下, 每分钟释放 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个单位, 记为 1 U。

## 1.6 重组酶的最适反应条件研究

### 1.6.1 最适 pH 和 pH 稳定性的测定

使用 pH 2.0–11.0 的缓冲液(pH 2.0–6.0: NaAc-HAc; pH 6.0–8.0:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 8.0–11.0: Gly-NaOH)测定重组酶的最适 pH。200  $\mu$ L 反应体系包括 150  $\mu$ L 蒸馏水、20  $\mu$ L 200 mmol/L 缓冲液、20  $\mu$ L 5 mmol/L  $p$ NP $\beta$ Glc 和 10  $\mu$ L 稀释一定倍数的纯酶液。37  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后立即加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 于 405 nm 波长下测定吸光值。吸光值最高的为最适 pH, 将该条件下的酶活力定义为 100%, 其他条件下的酶活力与其进行比较。

将稀释一定倍数的纯酶加入上述不同 pH 的缓冲液中, 4  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后加入 20  $\mu$ L 5 mmol/L  $p$ NP $\beta$ Glc, 37  $^{\circ}$ C 反应 5 min 后立即加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 于 405 nm 波长测定吸光值。将不同 pH 条件下未经孵育的酶活力定义为 100%, 孵育后的与其比较。

### 1.6.2 最适温度和温度稳定性测定

在 20–70  $^{\circ}$ C 范围内测定重组酶的最适温度。200  $\mu$ L 反应体系包括 150  $\mu$ L 蒸馏水、20  $\mu$ L 200 mmol/L 缓冲液、20  $\mu$ L 5 mmol/L  $p$ NP $\beta$ Glc 和 10  $\mu$ L 稀释一定倍数的纯酶液, 将反应体系置于不同温度条件下反应 5 min 后立即加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 于 405 nm 波长下测定吸光值。吸光值最高的为最适温度, 将该条件下的酶活力定义为 100%, 其他条件下的酶活力与其进行比较。

将稀释一定倍数的纯酶加入最适 pH 缓冲液中, 在不同温度下孵育 0 min、20 min、40 min、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h 和 3 h 后加入 20  $\mu$ L 5 mmol/L  $p$ NP $\beta$ Glc, 在特定温度下继续反应 5 min 后立即加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 于 405 nm 处测定吸光值。以不同温度下孵育前的酶活力为 100%, 孵育后与其进行比较。

### 1.6.3 动力学常数的测定

以  $p$ NP $\beta$ Glc 为底物测定 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶的  $V_{\max}$  和  $K_m$  值, 根据公式计算  $k_{\text{cat}}$  和  $k_{\text{cat}}/K_m$ 。200  $\mu$ L 反应体系包括 0.1–2.0 mmol/L 浓度范围内的底物、10  $\mu$ L 的纯酶液, 缓冲液补至 200  $\mu$ L。将反应体系置于 37  $^{\circ}$ C 条件下, 每隔 30 s 加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止一组反应至 5 min, 共 10 组, 于 405 nm 波长下测定吸光值, 选取合适的吸光值范围, 计算不同底物浓度下的反应初速度。5 min 反应过程通过酶标仪连续记录, 每 30 s 检测一次。根据吸光值计算不同底物浓度下的反应初速度。在 GraphPad Prism V5 软件中通过 Lineweaver-Burk 法计算  $K_m$  和  $V_{\max}$  值。

## 1.7 重组酶水解葡二糖能力的测定

选取 4 种不同连接方式的葡二糖(槐糖、昆布二糖、纤维二糖和龙胆二糖)为底物分析重组酶的键型选择性。200  $\mu$ L 反应体系包括 5  $\mu$ L 1 mg/mL 的二糖底物、10 mU 酶液, 缓冲液补至 200  $\mu$ L。在最适温度下反应 12 h 后 100  $^{\circ}$ C 加热

5 min。13 000×g 离心 10 min 除去变性的蛋白，上清经 0.22 μm 滤膜过滤，进样于离子色谱(high-performance anion-exchange chromatography, HPAEC)检测二糖的水解情况。检测所用的系统为 Thermo ICS-5000+，分析柱为 CarboPac PA-200 column 4 μm (3 mm×250 mm)，检测器为脉冲安培检测器，流动相为超纯水、1 mol/L 氢氧化钠溶液和 1 mol/L 醋酸钠溶液，流速为 0.5 mL/min，进样体积为 25 μL。

### 1.8 重组酶水解人参皂苷能力的测定

选择 4 种具有代表性结构的人参皂苷 Rb1、Rd、Gyp XVII 和 Re，分析重组酶对人参皂苷中糖苷键的选择性。这 4 种皂苷侧链均含有葡萄糖基，但糖基数目、键型各不相同。反应体系包括 200 μg 人参皂苷底物和纯酶(酶和底物摩尔比为 1:1 000)，缓冲液补至 200 μL。在最适温度下反应 12 h 后，加入等体积水饱和正丁醇萃取，上清用薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)法和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测转化结果。

TLC 检测方法：10 μL 样品点样于硅胶板 G60，置于正丁醇:乙酸乙酯:水=4:4:1 (体积比)展层剂中。展层至适当高度后取出吹干，浸于 5%硫酸-乙醇溶液中染色，吹干后置于 105 °C 烘箱加热 3–5 min 显色。将皂苷样品与标准样品的迁移率(relative mobility, Rf)进行比较，初步鉴定皂苷转化产物。

HPLC 检测方法：采用 C18 反相层析柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行 HPLC 分析，利用 RIGOL L-3000 高效液相色谱系统搭配 UV-VIS 检测器于 203 nm 处检测。用乙腈-水溶液作为洗脱剂，流速为 0.8 mL/min，进样量为 20 μL，柱温 30 °C。

### 1.9 在制备稀有人参皂苷中的应用

利用高含量人参皂苷 Rb1 制备稀有人参皂苷 F2 和 CK。实验室前期研究发现，CcBgl1A

制备人参皂苷 Gyp XVII 的最佳条件是在 30 °C，50 mg/mL Rb1 和 0.4 U/mg (酶活/皂苷质量) CcBgl1A 反应 2 h 即可获得纯度为 90.5%的 Gyp XVII。因此，20 mL 反应体系中加入 1.0 g 人参皂苷 Rb1、400 U CcBgl1A，缓冲液补齐 20 mL，在 30 °C 条件下反应 2 h 后分别加入 SA0236 (1 000 U)和 SA2629 (800 U)，分别在 40 °C 和 45 °C 反应 2 h。反应结束后取样进行 TLC 和 HPLC 检测，结果与标准品比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜糖黄杆菌 β-葡萄糖苷酶基因的生物信息学分析

NCBI 数据库中注释了嗜糖黄杆菌中的 15 个假定 β-葡萄糖苷酶基因，SA2851 (GenBank 登录号为 SHM31376.1)、SA0236 (GenBank 登录号为 SHL28930.1)、SA1638 (GenBank 登录号为 SHL81209.1)、SA2453 (GenBank 登录号为 SHM12971.1)、SA2505 (GenBank 登录号为 SHM14299.1)、SA4465 (GenBank 登录号为 SHM88229.1)、SA0238 (GenBank 登录号为 SHL28985.1)、SA2840 (GenBank 登录号为 SHM31064.1)、SA2489 (GenBank 登录号为 SHM13873.1)、SA3394 (GenBank 登录号为 SHM53306.1)、SA3191 (GenBank 登录号为 SHM41242.1)、SA3179 (GenBank 登录号为 SHM40893.1)、SA1764 (GenBank 登录号为 SHL84624.1)、SA2629 (GenBank 登录号为 SHM17997.1)和 SA1023 (GenBank 登录号为 SHL52973.1)。它们的氨基酸长度为 450–891，分子量 51.2–99.1 kDa，等电点 5.19–8.38。系统发育树结果显示，15 种 β-葡萄糖苷酶分为 A 和 B 两个分支，包含 8 种保守结构域(图 1)。因此，可能从嗜糖黄杆菌中获得具有不同性质和功能的 β-葡萄糖苷酶。

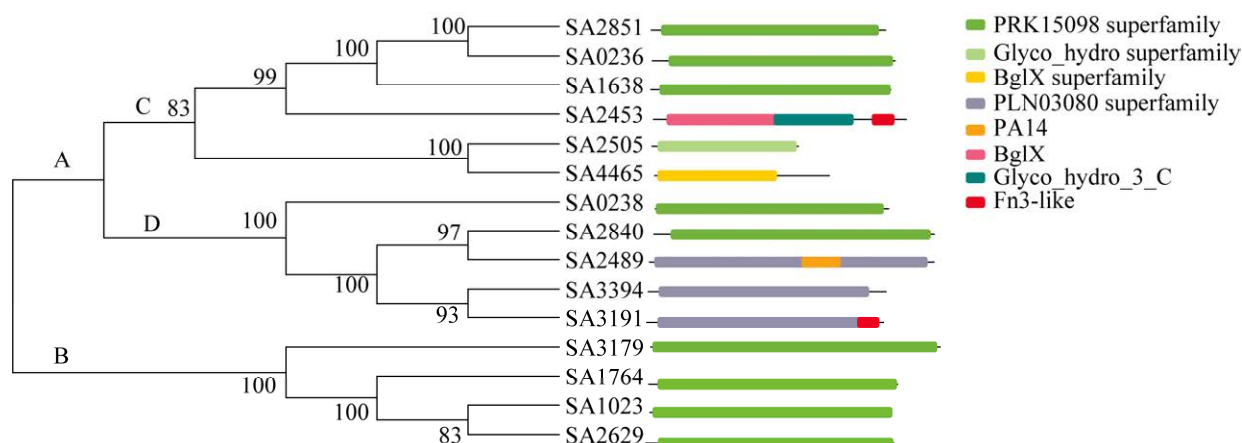


图1 嗜糖黄杆菌中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的系统发育树和保守结构域分析

Figure 1 Phylogenetic tree and conserved domain analysis of glucosidases from *Flavobacterium saccharophilum*.

## 2.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶的异源表达、纯化及鉴定

以基因组为模板扩增出 10 个目的基因, 即 SA2505、SA1638、SA2629、SA2489、SA2851、SA4465、SA1764、SA0236、SA0238 和 SA3394, 并构建了重组菌株。经 0.5 mmol/L IPTG 诱导和 Ni-Sepharose 凝胶纯化, 获得了 8 种纯度较高的酶 SA2629、SA2851、SA0236、SA0238、SA1638、SA2505、SA2489 和 SA4465 (图 2), 实际蛋白质分子量和理论分子量基本一致, 其基本信息如表 2 所示。

## 2.3 重组酶的糖基选择性

以 12 种 *pNP*-糖苷为底物, 分析上述 8 种酶的糖基选择性。SA2629、SA0236 和 SA2851 能够专一水解 *pNP* $\beta$ Glc 且活力较高, 其他 5 种酶活力微弱(表 3)。因此, 深入研究 SA2629、SA0236 和 SA2851 这 3 种重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

## 2.4 重组酶的最适反应条件

### 2.4.1 最适 pH 和 pH 稳定性

以 *pNP* $\beta$ Glc 为底物, 在 pH 2.0–11.0 的范围内测定 SA2629、SA2851 和 SA0236 的最适 pH 和 pH 稳定性。结果如图 3 所示, 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 值均为 6.0。孵育 24 h 后, 在 pH 6.0–9.0 的范围稳定性较好, 酶活力均能保持在 70% 以上。

### 2.4.2 最适温度和温度稳定性

在 20–90  $^{\circ}\text{C}$  范围内, 以 *pNP* $\beta$ Glc 为底物测定

3 种酶的活性。结果如图 4 所示, SA0236 和 SA2851 最适温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ , SA2629 的最适温度为 45  $^{\circ}\text{C}$ 。

在 30–50  $^{\circ}\text{C}$  范围内孵育 3 h, 以 *pNP* $\beta$ Glc 为底物测定 3 种酶的活力变化。结果如图 5 所示, SA2629 和 SA0236 在 30–40  $^{\circ}\text{C}$  有一定的稳定性, 在相应温度下孵育 3 h 后酶活力在 50% 以上。SA2851 稳定性较好, 在 30–45  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 3 h 后酶活力大于 60%, 但在 50  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育后酶活力迅速下降。结合上述最适温度的结果, 40  $^{\circ}\text{C}$  是 3 种酶的最佳反应温度。

### 2.4.3 动力学参数

以 *pNP* $\beta$ Glc 为底物测定 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶的动力学参数。结果如表 4 所示, SA2629 的  $K_m$  值最小, 与底物的亲和力最强, 酶促反应更容易进行; 其  $V_{\max}$  也明显大于其他 2 种酶, 反应速率最高。因此, SA2629 的  $k_{\text{cat}}/K_m$  值最大, 具有较高的催化效率。

## 2.5 重组酶的键型选择性

### 2.5.1 重组酶对葡二糖的选择性

以槐糖 (Glc- $\beta$ -1,2-Glc)、昆布二糖 (Glc- $\beta$ -1,3-Glc)、纤维二糖 (Glc- $\beta$ -1,4-Glc) 和龙胆二糖 (Glc- $\beta$ -1,6-Glc) 为底物分析 3 种酶的键型选择性。如图 6 所示, 3 种酶均能完全水解所有连接方式的葡二糖, 具有广泛的选择性。



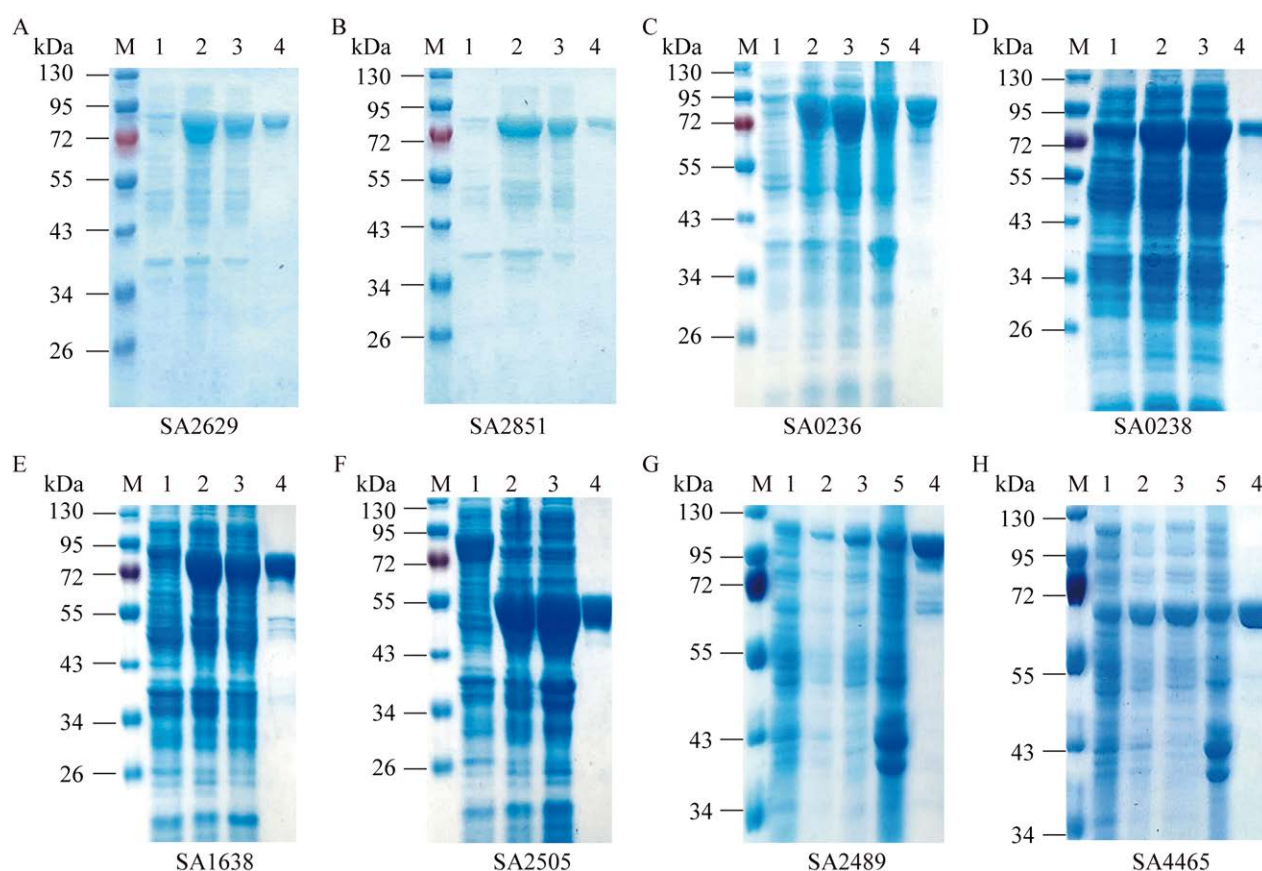


图2 重组酶的 SDS-PAGE 分析 A: SA2629. B: SA2851. C: SA0236. D: SA0238. E: SA1638. F: SA2505. G: SA2489. H: SA4465. M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导前裂解液; 2: 诱导后裂解液; 3: 诱导后裂解液上清; 4: 纯化后的酶液; 5: 诱导后沉淀

Figure 2 Analysis of glucosidases by SDS-PAGE. A: SA2629. B: SA2851. C: SA0236. D: SA0238. E: SA1638. F: SA2505. G: SA2489. H: SA4465. Line M: Protein molecular weight standard; Line 1: Culture lysate before IPTG induction; Line 2: Culture lysate after IPTG induction; Line 3: Supernatant of lysate; Line 4: Purified enzyme; Line 5: Precipitation after IPTG induction.

表2 八种重组酶的基本信息

Table 2 Basic information of 8 glucosidases

Glucosidase	GenBank No.	Length of gene (bp)	MW (kDa)
SA2629	SHM17997.1	2 295	84.2
SA2851	SHM31376.1	2 166	80.4
SA0236	SHL28930.1	2 244	81.8
SA0238	SHL28985.1	2 157	80.1
SA1638	SHL81209.1	2 154	81.3
SA2505	SHM14299.1	1 353	51.2
SA2489	SHM13873.1	2 631	94.8
SA4465	SHM88229.1	1 614	60.1



表 3 重组酶对不同 *p*NP-糖苷底物的比酶活Table 3 Specific activity of glucosidases towards *p*NP-glycoside substrates

Substrate	Specific activity (U/mg)							
	SA2629	SA0236	SA2851	SA0238	SA2505	SA1638	SA2489	SA4465
<i>p</i> NP $\beta$ Glc	78.70 $\pm$ 5.20	4.90 $\pm$ 0.30	3.60 $\pm$ 0.40	0.30 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	—	0.02 $\pm$ 0.01
<i>p</i> NP $\beta$ Gal	—	—	—	0.05 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01	—	—	0.02 $\pm$ 0.01
<i>p</i> NP $\beta$ Man	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\beta$ Xyl	—	—	—	—	—	—	0.24 $\pm$ 0.01	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Glc	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Gal	—	—	0.70 $\pm$ 0.05	—	—	—	—	0.30 $\pm$ 0.01
<i>p</i> NP $\alpha$ Man	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Xyl	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Arap	—	—	—	0.05 $\pm$ 0.01	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Araf	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Rha	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> NP $\alpha$ Fuc	—	—	—	—	—	—	—	—

—: 未检测到

—: Not detected.

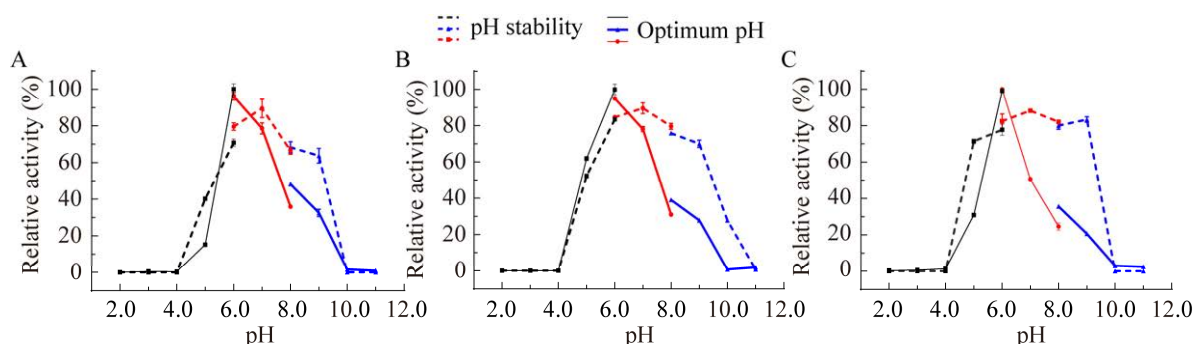


图 3 重组酶最适 pH 和 pH 稳定性曲线 A: SA2629. B: SA0236. C: SA2851. ■: pH 2.0–6.0 醋酸盐缓冲液; ●: pH 6.0–8.0 磷酸盐缓冲液; ▲: pH 8.0–11.0 Gly-NaOH 缓冲液

Figure 3 Optimal pH and pH stability of glucosidases. A: SA2629. B: SA0236. C: SA2851. ■: pH 2.0–6.0 acetate buffer; ●: pH 6.0–8.0 phosphate buffer; ▲: pH 8.0–11.0 Gly-NaOH buffer.

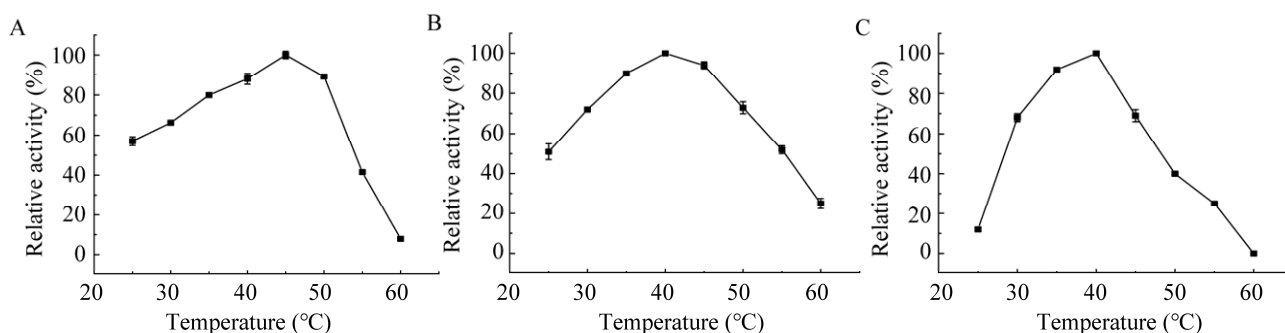


图 4 重组酶的最适温度曲线

Figure 4 Optimal temperature of glucosidases. A: SA2629. B: SA0236. C: SA2851.

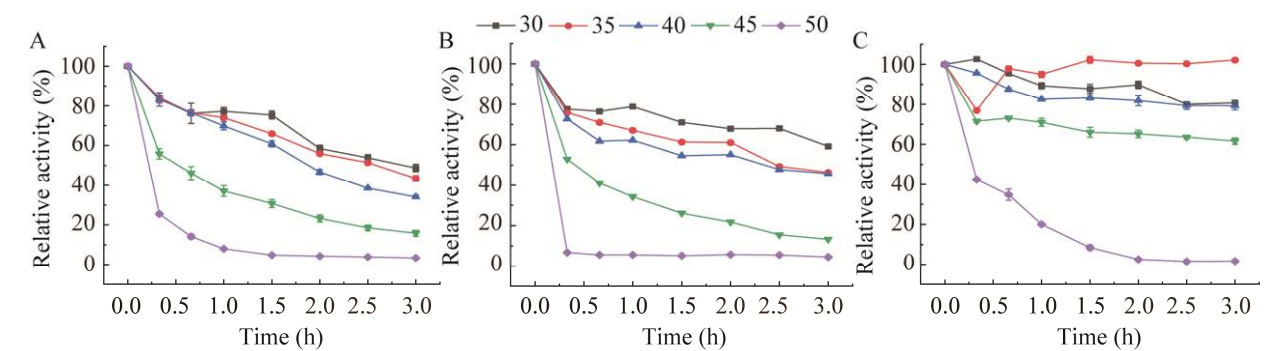


图 5 重组酶的温度稳定性曲线  
Figure 5 Temperature stability of glucosidases. A: SA2629. B: SA0236. C: SA2851.

表 4  $\beta$ -葡萄糖苷酶动力学参数  
Table 4 Kinetic parameters of  $\beta$ -glucosidases

Enzymes	$K_m$ (mmol/L)	$V_{max}$ (mmol/(L·min·mg))	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$
SA2629	1.93±0.16	20.34±1.03	27.38±1.40	14.19
SA2851	4.62±0.34	3.94±0.22	5.1±0.28	1.10
SA0236	2.98±0.29	4.22±0.28	5.6±0.37	1.88

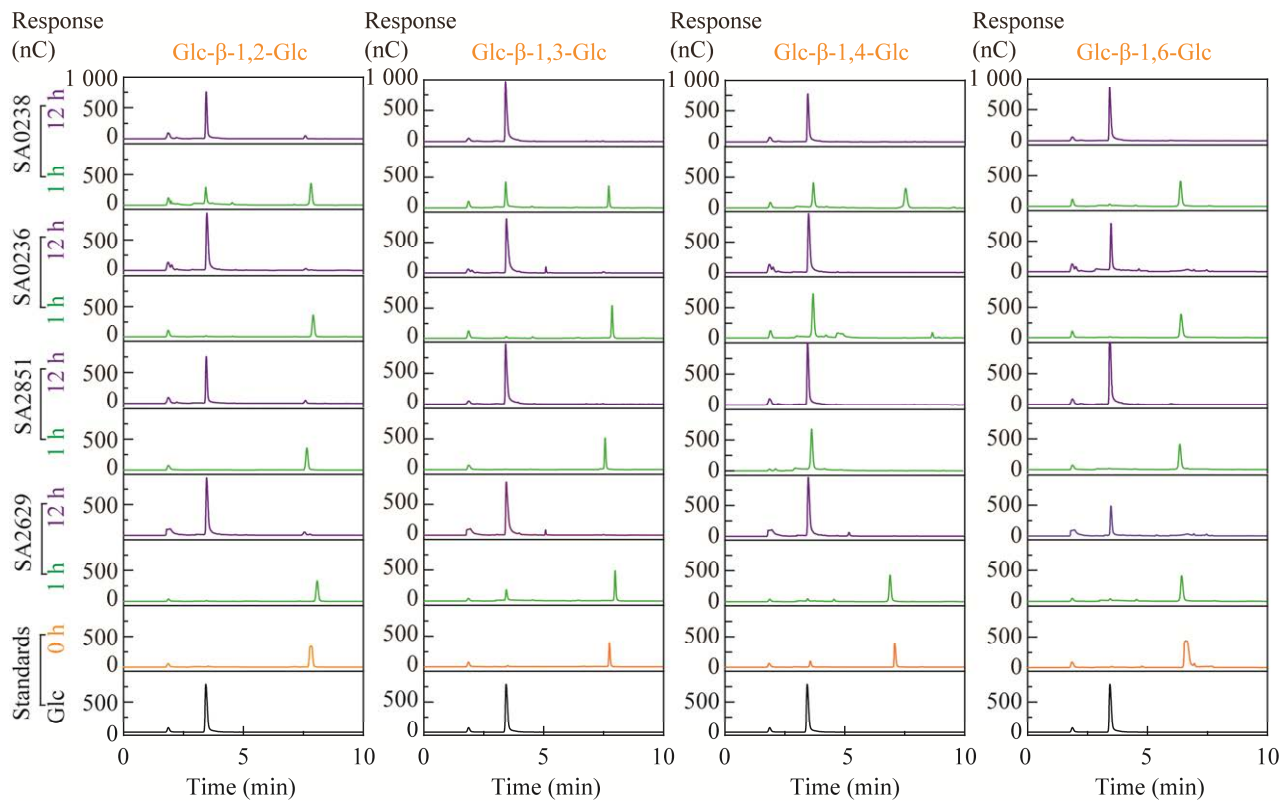


图 6 HPAEC 分析重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶对二糖底物的作用  
Figure 6 Analysis of the products of disaccharides with different linkages by HPAEC.

### 2.5.2 重组酶对人参皂苷的选择性

以含有不同糖苷键的人参皂苷 Rb1、Rd、Gyp XVII 和 Re 为底物分析 3 种酶的选择性。如图 7 所示, 3 种酶均能将 Rb1 转化为唯一产物 Rd。此外, SA2629 还能将 Gyp XVII 完全转化为 CK, 其余 2 种酶只能将 Gyp XVII 完全转化为 F2。结果表明, SA2629 可以水解人参皂苷 C-20 位外侧和 C-3 位内侧的葡萄糖, 而 SA0236 和 SA2851 只能水解 C-20 位外侧的葡萄糖。进一步比较 SA0236 和 SA2851 的水解能力, 结果如图 8 所示, SA0236 催化效率高于 SA2851。因此,

SA0236 可用于制备稀有皂苷 F2, SA2629 可用于制备稀有皂苷 CK。

### 2.6 在转化制备稀有人参皂苷中的应用

人参皂苷 Rb1 是高含量皂苷, 可以从人参中大量分离。本实验室前期获得的一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶 CcBgl1A 能够将人参皂苷 Rb1 完全转化为 Gyp XVII<sup>[16]</sup>。在此基础上, 本研究利用 CcBgl1A、SA0236 和 SA2629 组合转化人参皂苷 Rb1。结果如图 9 所示, CcBgl1A 与 SA0236 组合能够将 Rb1 完全水解产生人参皂苷 F2, CcBgl1A 与 SA2629 组合则能够将 Rb1 完全水解产生人参皂苷 CK。

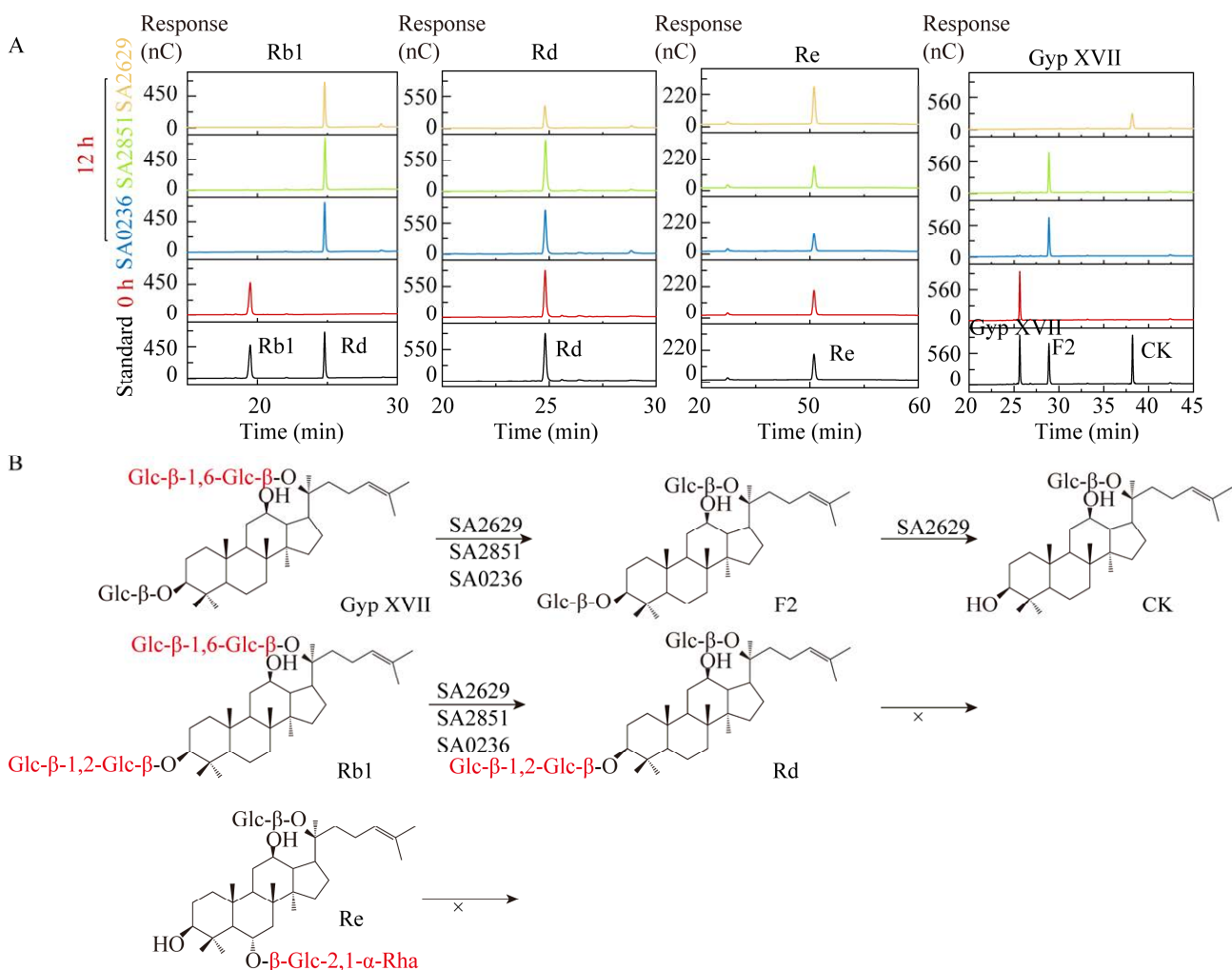


图 7 重组酶对人参皂苷底物的选择性 A: HPAEC 分析重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶对人参皂苷底物的作用. B: 人参皂苷转化途径

Figure 7 Specificity of glucosidases to ginsenosides. A: Analysis of the effects of glucosidases on ginsenoside by HPAEC. B: Transformation pathway of ginsenoside.

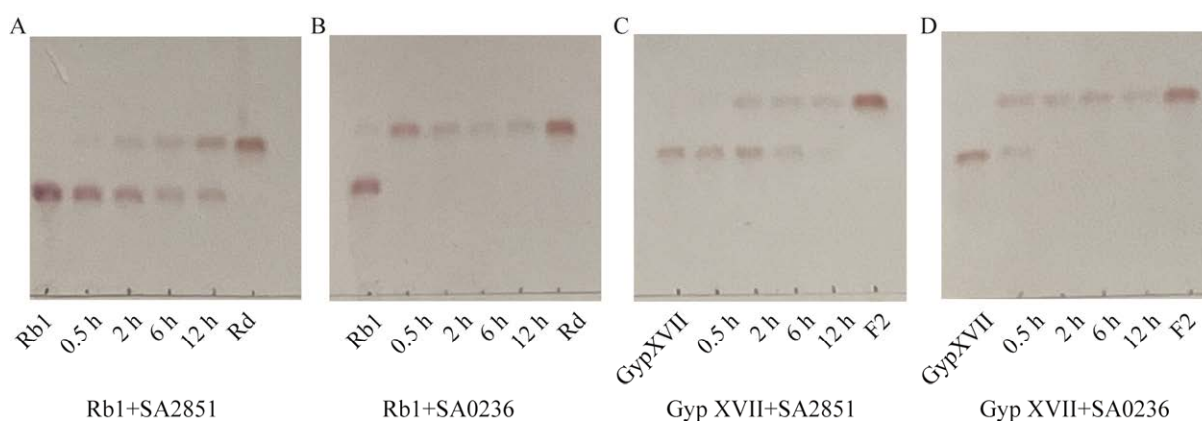


图 8 TLC 检测重组酶转化人参皂苷 **Rb1**、**Gyp XVII**的产物 A: SA2851 转化 **Rb1**. B: SA0236 转化 **Rb1**. C: SA2851 转化 **Gyp XVII**. D: SA0236 转化 **Gyp XVII**

Figure 8 Analysis of the products of the ginsenosides **Rb1** and **Gyp XVII** by TLC. A: SA2851 transformed **Rb1**. B: SA0236 transformed **Rb1**. C: SA2851 transformed **Gyp XVII**. D: SA0236 transformed **Gyp XVII**.

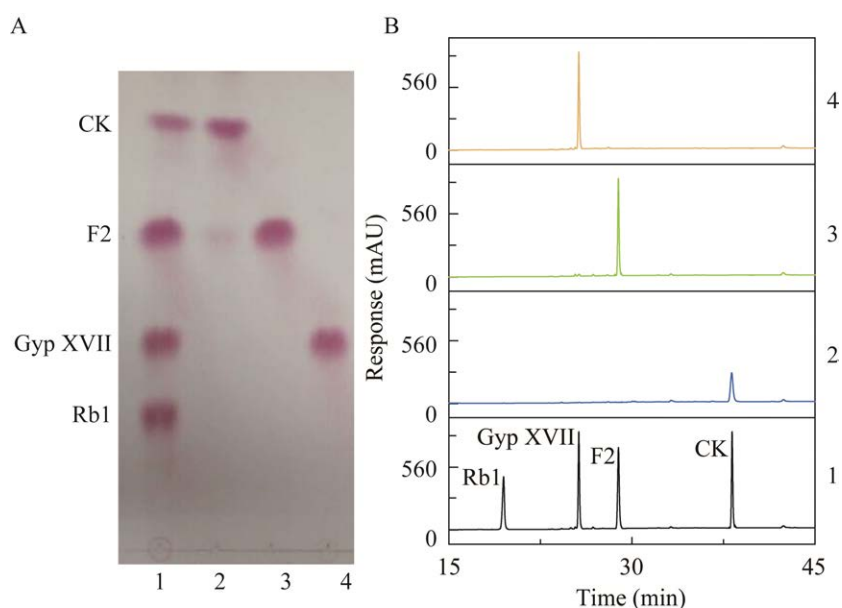


图 9 重组酶组合转化人参皂苷 **Rb1** A: TLC 检测组合转化情况. B: HPLC 检测组合转化情况. 1: Standards; 2: **Rb1**+CcBgl1A+SA2629; 3: **Rb1**+CcBgl1A+SA0236; 4: **Rb1**+CcBgl1A

Figure 9 Ginsenoside **Rb1** transformed by glucosidases. A: The transformation was detected by TLC. B: The transformation was detected by HPLC. 1: Standard; 2: **Rb1**+CcBgl1A+SA2629; 3: **Rb1**+CcBgl1A+SA0236; 4: **Rb1**+CcBgl1A.

### 3 讨论与结论

$\beta$ -葡萄糖苷酶应用广泛, 主要来源于微生物。基因注释结果表明, 嗜糖黄杆菌中含有多个

编码  $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因, 但目前尚无关于嗜糖黄杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究报道。本研究筛选获得了 3 个不同功能的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SA2629、SA2851 和 SA0236, 系统研究了它们

的性质与功能。

目前大多数已报道的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 以酸性或中性居多<sup>[17]</sup>。SA2629、SA2851 和 SA0236 的最适 pH 值为 6.0, 这一结果与同样来自于嗜糖黄杆菌的葡糖苷 3-脱氢酶和黄杆菌属 *Flavobacterium chilense* 的 BglFc 的最适 pH<sup>[18]</sup>相同, 高于来源于嗜热菌 *Talaromyces thermophilus* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl.tls (pH 5.0)<sup>[19]</sup>。SA0236 和 SA2851 的最适温度为 40 °C, SA2629 的最适温度为 45 °C。这与来源于宏基因组文库的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Ks5A7<sup>[20]</sup>相似, 高于来源于南极土壤样品的 EaBgl1A (30 °C)<sup>[21]</sup>, 低于来源于 *Pyrococcus furiosus* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶(95 °C)<sup>[22]</sup>。本研究获得的 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶所表现出的中温中性特点有利于其在工业生产中的应用。

虽然本研究表明上述 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶均具有广泛的底物选择性, 但其在水解人参皂苷时存在差异。SA0236 对皂苷 C-20 位上的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键表现出最快的转化速率, SA2629 表现出独特功能, 除对 C-20 位上  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键具有水解活性外, 还对 C-3 位内侧葡萄糖苷键具有水解活性。因此, SA0236 和 SA2629 在水解高含量皂苷制备活性更好的稀有皂苷应用中具有良好的潜力。

利用 SA0236 和 SA2629 分别与本实验室已报道的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 CcBgl1A 转化人参皂苷 Rb1, 可实现稀有人参皂苷 F2 和 CK 的制备。稀有人参皂苷 CK 是非天然的原人参二醇型皂苷, 近年来研究表明, CK 是发挥人参生物学活性的有效成分之一。利用酶法转化高含量的皂苷来制备稀有皂苷是最有潜力的方法。转化 CK 的人参皂苷水解酶可通过直接纯化获得, Yan 等<sup>[23]</sup>获得了一种来源于拟青霉(*Paecilomyces bainier*) sp. 229 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 该酶转化效率较高, 经 24 h 可将 84.3% 的 Rb1 转化为 CK。但直接纯

化获取的酶产量小。Quan 等<sup>[24]</sup>将酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*)中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中成功表达并在 1 h 内将 77% 的 Rb1 转化为 CK。Zhong 等<sup>[25]</sup>在大肠杆菌中异源表达了两种短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 分别实现了 GypXVII 和 F2 向 CK 的转化, 转化率分别为 89% 和 91%。钟姝凝<sup>[26]</sup>和张庆锋等<sup>[27]</sup>分别异源表达了多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)和耐热科恩氏菌(*Cohnella thermotolerans*)来源的两种  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 均可实现 Rb1 向 CK 的转化, 转化率分别为 42.85% 和 78.36%。然而, 目前尚未实现 Rb1 完全转化为 CK, 本研究将 SA2629 与 CcBgl1A 组合, 实现了 Rb1 完全转化为 CK 且无副产物产生。本研究结果不仅填补了嗜糖黄杆菌糖苷水解酶的空白, 而且为稀有人参皂苷 CK 的制备提供了有效的工具。

## REFERENCES

- [1] SHAHRAJABIAN MH, SUN WL, CHENG Q. The power of natural Chinese medicine, ginger and ginseng root in an organic life[J]. Middle-East Journal of Scientific Research, 2019, 27(1): 64-71.
  - [2] KIM JH, YI YS, KIM MY, CHO JY. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases[J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(4): 435-443.
  - [3] LEE DG, LEE JS, KIM KT, KIM HY, LEE S. Analysis of major ginsenosides in various ginseng samples[J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 2019, 62(1): 87-91.
  - [4] GERALDI A, FATIMAH N, CUI CH, NGUYEN TT, KIM SC. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 by recombinant  $\beta$ -glucosidase of bacterial isolates from Indonesia[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 23: 101449.
  - [5] 屈文佳, 贾天颖, 王海丽, 辛洁萍, 王敏, 白玉莹, 徐文娟, 李向日. 不同蒸制时间下红参颜色及 3 种常见人参皂苷的转化规律研究[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(9): 769-775.
- QU WJ, JIA TY, WANG HL, XIN JP, WANG M, BAI

- YY, XU WJ, LI XR. Study on change in color and contents of three common ginsenosides of Hongshen steamed for different durations[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 43(9): 769-775 (in Chinese).
- [6] 杨烁, 刘一桐, 余欣鑫, 王昆, 赵婷, 徐蕾, 刘文丛. 柠檬酸水解法获得稀有人参皂苷工艺的优化[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(5): 577-582.
- YANG S, LIU YT, SHE XX, WANG K, ZHAO T, XU L, LIU WC. Optimization of rare ginsenoside obtaining technology by citric acid hydrolysis method[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2018, 40(5): 577-582 (in Chinese).
- [7] 夏晚霞, 张尚微, 葛亚中, 任杰, 余庆涛, 杨继国, 宁正祥. 乳酸菌发酵转化人参皂苷[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 136-142, 157.
- XIA WX, ZHANG SW, GE YZ, REN J, YU QT, YANG JG, NING ZX. Fermentation transformed ginsenoside by lactic acid bacteria[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 136-142, 157 (in Chinese).
- [8] 刘文山, 李振伟, 傅荣昭. 糖苷酶在人参皂苷转化中的应用[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(4): 579-588.
- LIU WS, LI ZW, FU RZ. Application of glycosidases for the ginsenosides biotransformation[J]. Letters in Biotechnology, 2019, 30(4): 579-588 (in Chinese).
- [9] 姚瑶, 刘庆, 刘福, 姚彦彤, 朱森林, 蒋红英.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质及其在食品加工中的应用研究进展[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(2): 132-135.
- YAO Y, LIU Q, LIU F, YAO YT, ZHU SL, JIANG HY. Characteristics of  $\beta$ -glucosidase and its applications in food processing[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(2): 132-135 (in Chinese).
- [10] 孙智.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 化工设计通讯, 2021, 47(2): 144-145.
- SUN Z. Advances in  $\beta$ -glucosidase[J]. Chemical Energy, 2021, 47(2): 144-145 (in Chinese).
- [11] AHMED A, BATOOL K, BIBI A. Microbial  $\beta$ -glucosidase: sources, production and applications[J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2017, 5(1): 31-46.
- [12] SINGHANIA RR, PATEL AK, SUKUMARAN RK, LARROCHE C, PANDEY A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J], 2013, 127: 500-507.
- [13] COURNOYER B, FAURE D. Radiation and functional specialization of the family-3 glycoside hydrolases[J], 2003, 5(3): 190-198.
- [14] 常治帅, 兰辉, 包亚莉, 刘占英. 微生物产  $\beta$ -葡萄糖苷酶研究进展[J]. 微生物前沿, 2018(2): 79-86.
- CHANG ZS, LAN H, BAO YL, LIU ZY. Progress of  $\beta$ -glucosidase from microorganisms[J]. Advances in Microbiology, 2018(2): 79-86 (in Chinese).
- [15] 李华, 高丽.  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107-114.
- LI H, GAO L. Research advance on methods of determining  $\beta$ -glucosidase activity[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(2): 107-114 (in Chinese).
- [16] YUAN Y, HU YB, HU CX, LENG JY, CHEN HL, ZHAO XS, GAO J, ZHOU YF. Overexpression and characterization of a glycoside hydrolase family 1 enzyme from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21 and its application for minor ginsenosides production[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 120: 60-67.
- [17] 刘洋, 彭惠, 张余, 董艺凝, 孙星, 罗侠, 蔡华, 赵维萍. 嗜热淀粉芽孢杆菌来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶的重组表达与酶学性质[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2050-2059.
- LIU Y, PENG H, ZHANG C, DONG YN, SUN X, LUO X, CAI H, ZHAO WP. Recombinant expression and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus thermoamylovorans*[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2050-2059 (in Chinese).
- [18] SIDIQI MZ, MEDJEBOURI S, LIU QZ, PARK HY, KIM GR, IM WT. Efficient production of various minor ginsenosides from PPD- and PPT-type major ginsenosides using a single recombinant BglF<sub>c</sub> isolated from *Flavobacterium chilense*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2021, 26(2): 232-246.
- [19] MALLEK-FAKHFAKH H, BELGHITH H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides[J]. Carbohydrate Research, 2016, 419: 41-50.
- [20] UCHIYAMA T, YAOI K, MIYAZAKI K. Glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase retrieved from a Kusaya gravity metagenome[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 548.
- [21] CRESPIE E, ZANPHORLIN LM, de SOUZA FHM, DIOGO JA, GAZOLLA AC, MACHADO CB, FIGUEIREDO F, SOUSA AS, NÓBREGA F, PELLIZARI VH, MURAKAMI MT, RULLER R. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 375-380.

- [22] NOH KH, SON JW, KIM HJ, OH DK. Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(2): 316-321.
- [23] YAN Q, ZHOU XN, ZHOU W, LI XW, FENG MQ, ZHOU P. Purification and properties of a novel beta-glucosidase, hydrolyzing ginsenoside Rb1 to CK, from *Paecilomyces Bainier*[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2008, 18(6): 1081-1089.
- [24] QUAN LH, MIN JW, JIN Y, WANG C, KIM YJ, YANG DC. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 to compound K by recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(14): 3776-3781.
- [25] ZHONG FL, MA R, JIANG ML, DONG WW, JIANG J, WU SQ, LI DH, QUAN LH. Cloning and characterization of ginsenoside-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from *Lactobacillus brevis* that transforms ginsenosides Rb1 and F2 into ginsenoside rd and compound K[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(10): 1661-1667.
- [26] 钟姝凝.  $\beta$ -葡萄糖苷酶对人参皂苷生物转化及其相互作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2021.
- ZHONG SN. Study on biotransformation of ginsenoside by  $\beta$ -glucosidase and its interaction mechanism[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [27] 张庆锋, 吕世鑫, 江雨欣, 王丹丹, 王洪涛. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶微生物的筛选鉴定及其在人参皂苷 Compound K 转化中的应用[J]. 山东农业科学, 2021, 53(11): 63-69.
- ZHANG QF, LÜ SX, JIANG YX, WANG DD, WANG HT. Screening and identification of microorganisms producing  $\beta$ -glucosidase and their application in transformation of ginsenoside Compound-K[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(11): 63-69 (in Chinese).