黄瑞琳, 彭程, 唐艺玲, 等. 单环芳基葡萄糖苷类底物侧链基团对黑曲霉 β-葡萄糖苷酶活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(6): 160−170. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030093
HUANG Ruilin, PENG Cheng, TANG Yiling, et al. Effect of Side-chain Groups in Monocyclic Aryl-glucoside Substrate on the Activity of *Aspergillus niger* β-Glucosidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(6): 160−170. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030093

· 生物工程 ·

单环芳基葡萄糖苷类底物侧链基团对黑曲霉 β-葡萄糖苷酶活性的影响

黄瑞琳[1], 彭　程[1], 唐艺玲[1], 倪　辉[1,2,3,4], 李利君[1,2,3,*]
（1.集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021;
2.福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021;
3.厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021;
4.厦门海洋职业技术学院海洋生物学院, 福建厦门 361021）

摘　要: β-葡萄糖苷酶能水解芳基葡萄糖苷，在食品和生物转化领域具有重要应用价值。为了探究底物侧链基团对 β-葡萄糖苷酶活性的影响，克隆表达了黑曲霉 β-葡萄糖苷酶（β-D-Glu）。通过虚拟饱和突变结合实验验证，在 β-D-Glu 结合口袋 4 Å范围内鉴定出关键氨基酸，利用分子对接和分子动力学模拟分析酶与底物的构效关系。β-D-Glu 对结构相似但侧链不同的单环芳基葡萄糖苷底物存在显著差异，对水杨苷、熊果苷和 *p*NPG 的酶活分别为 44.72、103.97 和 839.02 IU/mL。关键氨基酸残基 R98 突变对不同底物的催化活性呈现特异性影响：R98F 突变使水杨苷活性提升至原始酶的 266.08%，而 R98I 和 R98Q 则分别降低至 37.62% 和 35.05%；3 个突变体对熊果苷的活性均有所下降，但对 *p*NPG 的活性则基本保持不变。其中，R98F 突变体对水杨苷的催化活性显著提高，同时对熊果苷和 *p*NPG 的活性分别降低 16.44% 和 7.54%。分子对接和分子动力学模拟结果表明，单环芳基葡萄糖苷类底物侧链基团的极性和给电子能力差异使底物与酶结合模式不同；R98F 改变了结合口袋入口处构象柔性及催化关键氨基酸与底物的结合强度，推测突变通过提高对水杨苷糖苷键的断键能力和水解反应速度，从而特异性提高了其水解活性。本研究结果有助于揭示 β-葡萄糖苷酶对不同芳基葡萄糖苷类底物的水解特征，为该酶设计改造提供科学依据。

关键词: β-葡萄糖苷酶, 酶活性, 侧链基团, 单环芳基糖苷类底物, 分子动力学模拟
中图分类号: Q814.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)06−0160−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030093
本文网刊:

Effect of Side-chain Groups in Monocyclic Aryl-glucoside Substrate on the Activity of *Aspergillus niger* β-Glucosidase

HUANG Ruilin[1], PENG Cheng[1], TANG Yiling[1], NI Hui[1,2,3,4], LI Lijun[1,2,3,*]
（1.College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2.Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;
3.Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China;
4.School of Marine Biology, Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361021, China）

Abstract: β-Glucosidase can hydrolyze aryl-glucoside and holds significant application value in the fields of food and biotransformation. To investigate the influence of substrate side-chain groups on the activity of β-glucosidase, the β-D-Glu from *Aspergillus niger* was cloned and expressed. Through in silico saturation mutagenesis followed by experimental

收稿日期: 2025−03−10
基金项目: 福厦泉国家自主创新示范区协同创新平台项目（2024-P-005）。
作者简介: 黄瑞琳（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: Huangruilin5@163.com。
*** 通信作者:** 李利君（1973−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: ljli@jmu.edu.cn。

validation, key amino acid was identified within 4 Å of the β-D-Glu binding pocket, molecular docking and molecular dynamics simulations were employed to analyze the structure-activity relationship between the enzyme and substrate. β-D-Glu exhibited significant differences in activity toward structurally similar monocyclic aryl-glycoside substrates with varying side chains. Specifically, the enzymatic activities toward salicin, arbutin, and *p*NPG were measured at 44.72, 103.97, and 839.02 IU/mL, respectively. Through *in silico* saturation mutagenesis followed by experimental validation, residue R98 was identified as a key amino acid within 4 Å of the β-D-Glu binding pocket. Mutation at this site exerted substrate-specific effects on catalytic activity towards different substrates. Compared to wild-type enzyme, R98F mutation increased the relative activity towards salicin to 266.08%, while R98I and R98Q mutations decreased the relative activities to 37.62% and 35.05%, respectively. All three mutants showed decreased relative activities towards arbutin, but the relative activities towards *p*NPG remained almost unchanged. Specifically, the R98F mutant exhibited significantly enhanced activity towards salicin, while its activity towards arbutin and *p*NPG decreased by 16.44% and 7.54%, respectively. Molecular docking and molecular dynamics simulations revealed that differences in the polarity and electron-donating capacity of the side-chain groups in monocyclic aryl-glucoside substrates lead to distinct binding modes with the enzyme. The R98F mutation modulates both the conformational flexibility at the binding pocket entrance and the binding affinity between catalytic key residues and substrates. It is speculated that the mutation specifically enhances the hydrolytic activity toward salicin by improving both glycosidic bond cleavage efficiency and reaction rate. The results of this study help to reveal the hydrolysis characteristics of β-glucosidase towards different aryl-glucoside substrates and provide a scientific basis for the design and modification of this enzyme.

Key words: β-glucosidase; enzyme activity; side-chain group; monocyclic aryl-glycoside substrates; molecular dynamics simulation

β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)是一种水解酶，它参与末端非还原性葡萄糖和低聚糖相连的糖苷键的水解以及释放相应的配体[1]。β-葡萄糖苷酶对多种物质均具有活性，按照配基类型，其底物可分为：芳基葡萄糖苷[2−3]，包括熊果苷、槲皮苷、水杨苷、普鲁宁、大豆苷等；葡糖二糖[4−5]，包括麦芽糖、纤维二糖、龙胆二糖等；其他结构底物[6]，包括月桂基葡糖苷等。芳基葡萄糖苷类底物是指葡萄糖通过 β-糖苷键与芳香环相连的一类化合物，根据芳香基团结构可将芳基葡萄糖苷分为：熊果苷等单环芳基葡萄糖苷，虎杖苷等多环芳基葡萄糖苷，七叶苷等杂环芳基葡萄糖苷。

芳基葡萄糖苷类底物是多种食品的关键香气前体，在食品风味调控中具有独特优势[7]。芳基葡萄糖苷类底物具有抗菌、抗病毒和抗炎等药理功能[8]，且这些功能大多与糖苷配基有关[9]。同时，虽然芳基葡萄糖苷类底物具有多种功能价值，但它们的生物活性通常需要 β-葡萄糖苷酶将其水解后才能呈现出来，如健康食品关注的具有抗高血压、抗炎、抗癌、抗过敏特性的类黄酮，它们以糖苷形式存在时通常会抑制人体胃肠道吸收，通过 β-葡萄糖苷酶水解获得糖苷配基可增加食品药理作用和生物利用度[10]；如水解东莨菪苷生成的东莨菪素有降血压血脂等[11] 药理活性和杀虫、杀螨、抑菌等[12] 农用生物活性；水解槲皮苷生成的槲皮素具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、心脏保护等[13] 药理作用；大豆中的异黄酮通常以无活性糖苷的形式存在，而只有被 β-葡萄糖苷酶分解成游离异黄酮糖苷配基时，它们才具有生物活性[14]。

β-葡萄糖苷酶的催化活性是保障其应用的重要指标。有研究发现底物侧链基团互作的氨基酸与酶催化不同底物的活性变化具有较大关联性。来自纳豆枯草芽孢杆菌的 β-葡萄糖苷酶 BglH[15] 对侧链基团长短和官能团不同的芳基糖苷底物亲和性差异极大，其对染料木苷的催化效率分别是大豆苷和 *p*NPG 的 3 倍和 49 倍；Arthan 等[16] 发现来自龙葵叶中的 β-葡萄糖苷酶 Torvosidase，其水解速率随着底物中烷基链长度的延长而增加。因此，深入了解侧链基团对酶活性的影响，有助于揭示 β-葡萄糖苷酶对不同芳基葡萄糖苷类底物的水解特征。但目前尚未见相关的研究报道，这限制了 β-葡萄糖苷酶在复杂底物体系中的应用优化。

由于芳基葡萄糖苷类底物广泛存在，其侧链基团呈现高度多样性和复杂性，本研究从结构最简单的单环芳基葡萄糖苷底物入手，探究芳基葡萄糖苷类底物侧链基团对 β-葡萄糖苷酶催化活性的影响。利用黑曲霉 β-葡萄糖苷酶 β-D-Glu(XP_001398816.1)，研究了 β-D-Glu 与单环芳基葡萄糖苷类常见底物中侧链结构最简单的 2 个天然底物水杨苷($C_{13}H_{18}O_7$)、熊果苷($C_{12}H_{16}O_7$)和人工底物 *p*NPG($C_{12}H_{15}NO_8$)的催化活性差异(图 1)，3 个底物的苯环连接的官能团极性和结构不同对酶活性的影响。多数研究证明关键氨基酸的突变通常可以影响葡萄糖苷酶对不同底物的功能特征，如 α-葡萄糖苷酶 HBGase 特异性水解蔗糖，其突变体 Y227H 改变为特异性水解麦芽糖[17]；β-葡萄糖苷酶 Lf18920 活性位点附近关键氨基酸 W274、G420 和 Q421 的突变使其失去对藏红花素二龙胆二酯的水解功能[18]；β-葡萄糖苷酶 *Sf*βgly 的突变体 L428V 提高了对纤维二糖的水解速率[19]。因此本研究对 β-D-Glu 结合口袋周围关键氨基酸进行突变，借助分子对接和动力学模拟探究了侧链基团的极性等因素对芳基葡萄糖苷类底物结合模式和对

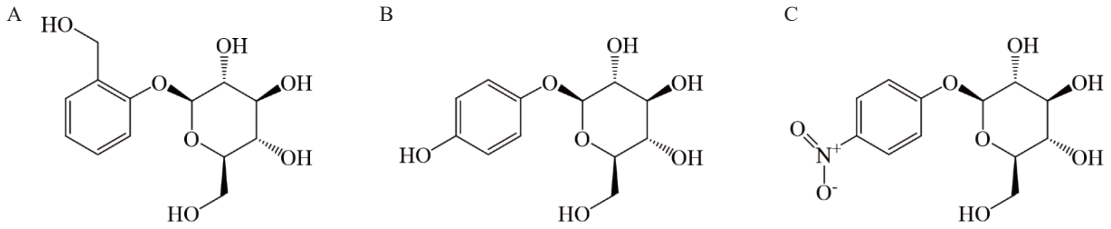


图 1 单环芳基葡萄糖苷类底物水杨苷(A)、熊果苷(B)和 *p*NPG(C)的结构图

Fig.1 Structures of the monocyclic aryl-glucoside substrates salicin (A), arbutin (B) and *p*NPG (C)

酶催化活性的影响。基于底物侧链基团的研究,为定向改造 *β*-葡萄糖苷酶,提升功能性食品效价、天然药物生物利用度以及拓宽 *β*-葡萄糖苷酶在食品与医药等领域的应用提供科学基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Escherichia coli DH5*α*、*Pichia pastoris* GS115 由福建省食品微生物与酶工程重点实验室保藏;黑曲霉 *β*-葡萄糖苷酶(*β*-D-Glu)质粒载体 pPIC9K-*β*-D-Glu 金唯智生物科技(苏州)有限公司合成;定点突变试剂盒、遗传霉素 G418、*EasyTaq* Mix 全式金生物技术有限公司;质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒 天根生化科技北京有限公司;SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 碧云天生物技术公司;限制性内切酶 *Sal* I 宝生物工程大连有限公司;氨苄青霉素 Amp 北京索莱宝生物科技有限公司;水杨苷、熊果苷 上海源叶生物技术公司;对硝基苯基-*β*-D-吡喃葡萄糖苷(*p*NPG) 美国 Sigma-Aldrich 公司;细菌学蛋白胨、技术琼脂粉、酵母粉、葡萄糖、氯化钠 国药集团化学试剂有限公司。

TC-96/G/H(b)C PCR 仪、EPS301 Powerpac Basic 电泳仪、1652100 电穿孔仪 美国 Bio-Rad 公司;Epoch 2T 酶标仪 美国博腾仪器有限公司;5810R 冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;GEAI600 荧光凝胶成像仪 美国 GE 公司;DK-8D 电热恒温水槽 常州国华电器有限公司;IS-RDV1 立式恒温振荡器 美国精骐有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉 *β*-D-Glu 克隆表达 用 *Pme*I 对重组质粒 pPIC9K-*β*-D-Glu 进行线性化,DNA 纯化回收试剂盒进行产物回收得到线性化质粒,后电击转化至 *P. pastoris* GS115 感受态细胞,通过 MD 平板和 YPD 抗性平板(含 50 mg/mL 的 G418)筛选后,菌液 PCR 和测序验证得到阳性转化子。

将阳性转化子菌液按 1% 接种量在 BMGY 培养基培养,以 0.5%(v/v)的甲醇作为碳源诱导菌体在 BMMY 液体培养基中表达,7 d 后收集上清液为 *β*-D-Glu 粗酶液,并进行 SDS-PAGE 分析(80 V,60 min)。

1.2.2 黑曲霉 *β*-D-Glu 突变体的筛选 将 *β*-D-Glu 的氨基酸序列提交 SWISS-MODEL 进行同源建模,使用 Structure Analysis and Verification Server v6.0(SAVES v6.0)服务器(https://saves.mbi.ucla.edu/)的 ERRART、VERIFY 3D、WHATCHECK、PROCHECK 对构建的模型进行合理性评估[20−21]。

将得到的黑曲霉 *β*-D-Glu 模型与 AaBGL1 进行叠合,根据 AcBGL1 的催化活性位点预测出 *β*-D-Glu 的催化关键氨基酸[22]。运用 Discovery Studio 2021 中的 Calculate Mutation Energy 模块对结合口袋周围的关键氨基酸进行虚拟饱和突变,预测出每个残基突变成另外 19 个氨基酸的效果。推测突变能量越低,酶与底物的亲和力越强,根据突变能由小到大筛选出突变点[23−24]。

1.2.3 黑曲霉 *β*-D-Glu 突变体的构建及表达 利用 SnapGene 软件设计引物,参照定点突变试剂盒构建突变体:以 pPIC9K-*β*-D-Glu 质粒为模板,各突变体引物见附表 1(详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版),进行 PCR 扩增(扩增程序:95 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min 30 s,进行 30 次循环;72 ℃ 10 min)。*Dpn* I 酶切 PCR 产物(37 ℃,1.5 h),PCR 产物自身环化(37 ℃,30 min),重组产物转入 *E. coli* DH5*α* 感受态细胞中,LB 抗性平板(含 100 μg/mL Amp)培养筛选后,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证并测序。后续步骤参照 1.2.1。

1.2.4 黑曲霉 *β*-D-Glu 及其突变体的酶学性质测定

1.2.4.1 黑曲霉 *β*-D-Glu 最适反应条件及稳定性测定 DNS 溶液:准确称量 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸溶解后,加入 262 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液,再加酒石酸钾钠溶液(称取 185 g 的酒石酸钾钠加入 500 mL 的蒸馏水在温水浴中溶解(温度≤50 ℃)),称取 5 g 苯酚和 5 g 无水亚硫酸钠加入其中溶解并定容至 1 L,转至棕色瓶中室温放置 7 d 后使用。

分别配制 50 mmol/L 的柠檬酸和磷酸氢二钠溶液,两者对调 pH5.0 即为柠檬酸盐缓冲液,用柠檬酸盐缓冲液配制 2 mmol/L 的不同底物溶液。

β-D-Glu 的最适温度测定:50 μL 酶液与 100 μL 的 *p*NPG 底物溶液在 30~80 ℃ 水浴中反应 10 min 后,加入 1 mL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,在 410 nm 的波长下测定吸光值,并计算酶活,以测得最高酶活为 100%,计算其他温度下的相对酶活。温度稳定性的测定:以相同反应体系,在 60 ℃ 下处理 0~120 min 后,测定残余酶活,以处理前的酶活为 100%,计算不

同处理时间的相对酶活。酶活(IU)定义：每分钟生成 1 μmoL 的对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*NP)所需的酶量被定义为一个活性单位。

β-D-Glu 的最适 pH 测定：分别用 pH3.0~8.0 的缓冲液配制 *p*NPG 底物溶液，50 μL 酶液与 100 μL 的 *p*NPG 底物溶液在最适温度下反应 10 min 后，加入 1 mL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应，在 410 nm 的波长下测定吸光值，并计算酶活，以测得最高酶活为 100%，计算其他 pH 下的相对酶活。pH 稳定性的测定：分别用 pH3.0~8.0 的缓冲液配制 *p*NPG 底物溶液，以相同反应体系，在 60 ℃ 下处理 24 h 后，测定残余酶活，以处理前的酶活为 100%，计算不同 pH 下处理后的相对酶活。

1.2.4.2　黑曲霉 *β*-D-Glu 及其突变体的酶活测定　水杨苷、熊果苷为底物的酶活测定：100 μL 酶液与 300 μL 的不同底物溶液在 60 ℃ 水浴中反应 20 min 后，加入 400 μL DNS 溶液，沸水浴 10 min 终止反应，冷却至室温后在 540 nm 的波长下测定吸光值。酶活(IU)定义：每分钟生成 1 μmoL 的葡萄糖所需的酶量被定义为一个活性单位。*p*NPG 为底物的酶活测定：50 μL 酶液与 100 μL 的 *p*NPG 底物溶液在 60 ℃ 水浴中反应 10 min 后，加入 1 mL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应，在 410 nm 的波长下测定吸光值。

灭活酶为空白，样品设置 3 个平行。以原始型 *β*-D-Glu 酶活为 100%，计算各突变体的相对酶活。

1.2.5　分子对接　以水杨苷、熊果苷、*p*NPG 为配体，以 1.2.2 构建的 *β*-D-Glu 模型为受体。底物配体的三维结构由 PubChem 下载并经 Chem3D 进行能量最小化，使用 AutoDock Vina 运行对接分析，对 *β*-D-Glu 与各底物执行，通过软件遗传算法模拟底物蛋白对接，对接中心参数为(4.606, 13.951, -6.122)，对接盒子参数为(26×24×24)Å^3，选择结合能最低的对接构象，利用 Discovery Studio 2019 Client 分析受体和配体的相互作用力。

1.2.6　分子动力学模拟　将筛选出的对接最佳底物模型上传至 ATB 网站(https://atb.uq.edu.au/)生成底物的拓扑和结构文件，使用 Gromacs 2020.6 [25−26]，选择 GROMOS96 54a7 力场，以分子对接后的最佳酶-底物复合物构象为基础，将蛋白与配体复合物置于模拟盒子中，加入 SPC 模型水分子平衡系统，加入 Na^+中和模拟系统电荷。设置温度体系为 333 K，采用最陡峭下降算法(Steepest descent algorithm)对体系进行能量最小化(Energy minimization, EM)，再进行 NVT 平衡和 NPT 平衡，最后运行 30 ns 的非限制性分子动力学模拟。使用周期校正后的模拟轨迹进行酶与底物的构象分析。

根据 MD 模拟轨迹，分析均方根偏差(Root Mean Square Deviation, RMSD)、回旋半径(Radius of gyration, Rg)和均方根波动(Root Mean Square Fluctuation, RMSF)。分子力学泊松-玻尔兹曼表面积(molecular mechanics Poisson -Boltzmann surface area, MM-PBSA)法被用于计算配体与受体分子动力学模拟后结合自由能[27]。应用“MMPBSA.py v.16.0”脚本计算底物与 *β*-D-Glu 分子动力学模拟平衡后的结合自由能，将总结合自由能分解到各个残基上，分析残基贡献度。

1.3　数据处理

所有实验做 3 次平行，实验结果以每个样本重复值的平均值±标准差表示。采用 Microsoft Excel 2013 对酶活、最适温度、最适 pH 的实验数据进行统计；采用 LSD 及邓肯检验法，使用 SPSS 26.0 软件以不同突变体对各底物的酶活进行显著性分析，其中 $P<0.05$；采用 Origin Pro 8.0 软件和 PyMOL 2.5 软件对酶活和分子动力学模拟的结果进行绘图。

2　结果与分析

2.1　黑曲霉 *β*-D-Glu 的克隆表达和酶学性质

2.1.1　黑曲霉 *β*-D-Glu 的克隆表达　黑曲霉 *β*-D-Glu 经 *P. pastoris* GS115 表达所得的目的条带大约在 120 kDa，比理论蛋白分子量(92.84 kDa)偏大 30 kDa 左右，推测是重组蛋白在表达的过程中发生了糖基化修饰(图 2)。许多真核来源的 *β*-葡萄糖苷酶在 *P. pastoris* 中表达都会存在糖基化修饰[28]，如 *Talaromyces piceae* 的 *β*-葡萄糖苷酶 TpBgl3A[29]。通过 NetNGlyc-1.0[30] 预测出黑曲霉 *β*-D-Glu 有 15 个糖基化位点，符合多 1 个糖链修饰造成分子量偏移约 2 kDa 的结论[31]。

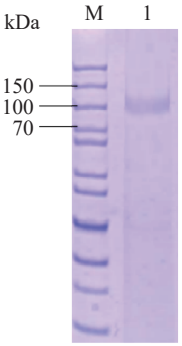


图 2　*β*-D-Glu 的 SDS-PAGE
Fig.2　SDS-PAGE of *β*-D-Glu
注：M 为蛋白 Marker；1 为 *β*-D-Glu。

2.1.2　黑曲霉 *β*-D-Glu 的酶学性质　以 *p*NPG 为底物，黑曲霉 *β*-D-Glu 的最适温度为 60 ℃(图 3A 和图 3B)，其最适温度与 *K. zonata*[32] 和 *Penicillium* sp.的 *β*-葡萄糖苷酶(bgls)[33] 最适温度相同。黑曲霉 *β*-D-Glu 在 60 ℃ 处理 2 h 后，对 *p*NPG 的残余酶活仍有 36%。Volkov 等[34] 报道 *P. verruculosum* 的重组 *β*-葡萄糖苷酶在 60 ℃ 孵育 3 h 后，残余酶活为 25%，Yan 等[35] 发现 *A. terreus* 的 *β*-葡萄糖苷酶在 60 ℃ 的温度下孵育 1 h 后，残余酶活为 65.1%。

以 *p*NPG 为底物，黑曲霉 *β*-D-Glu 的最适 pH 为 5.0，在偏酸性环境(pH3.0~6.0)，其酶活均在

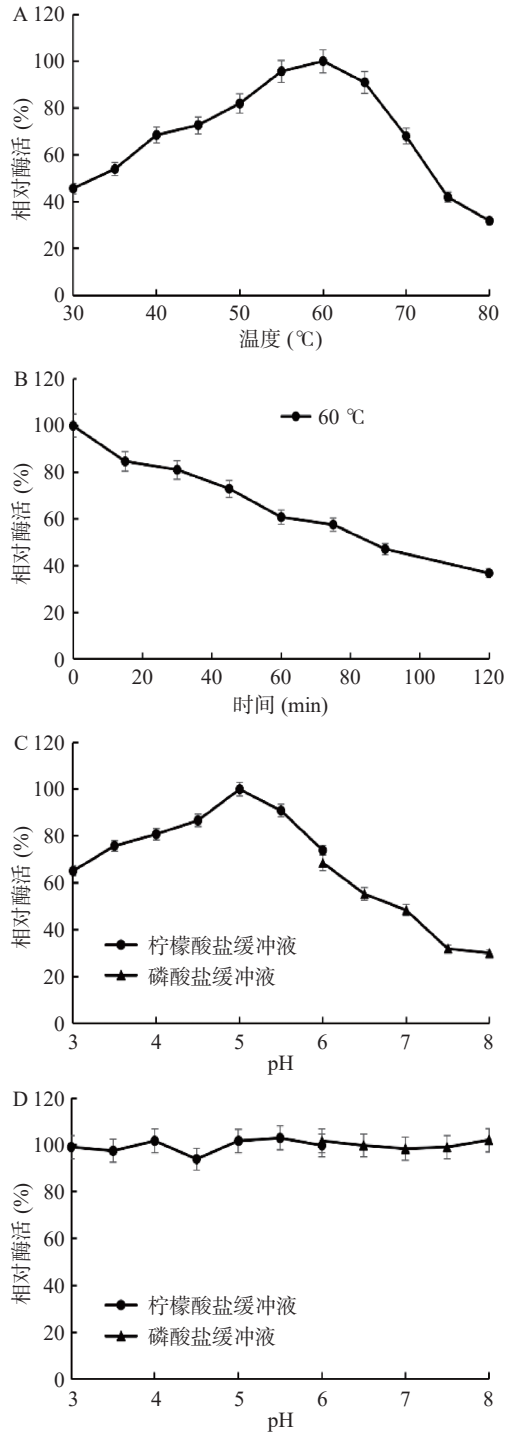


图 3 β-D-Glu 的最适温度(A)、温度稳定性(B)、最适 pH(C)、pH 稳定性(D)

Fig.3 Optimal temperature (A), temperature stability (B), optimal pH (C), pH stability (D) for β-D-Glu

60% 以上(图 3C 和图 3D)。与 *Coptotermes formosanus* 的 β-葡萄糖苷酶 Glu1B[36] 和 *Flammulina velutipes* CFK 3111 的 β-葡萄糖苷酶[37] 最适 pH 相近。将黑曲霉 β-D-Glu 在 pH3.0~8.0 的范围内处理 24 h,以处理前的酶活为 100%,处理后对 *p*NPG 的残余酶活均在 90% 以上,*Alteromonas* sp.的 β-葡萄糖苷酶经过 3 h 的处理,其酶活性在 pH6.0~8.0 范围内,能够保持 70% 以上[38],与之相比,黑曲霉 β-D-Glu 具有更好的 pH 稳定性。以上说明黑曲霉 β-D-Glu 具有较宽的 pH 适应范围及稳定性,具备较好的工业应用潜力。

在最适温度和最适 pH 条件下进行黑曲霉 β-D-Glu 酶活测定,以水杨苷为底物时,β-D-Glu 酶活为 44.72±0.17 IU/mL;以熊果苷为底物时,β-D-Glu 酶活为 103.97±0.14 IU/mL;以 *p*NPG 为底物时,β-D-Glu 酶活为 839.02±29.70 IU/mL。

2.2 黑曲霉 β-D-Glu 突变体的构建及酶活

通过 HHpred[39] 同源结构搜索,发现黑曲霉 β-D-Glu(XP_001398816.1)与来自 *A. aculeatus* 的 β-glucosidases(AaBGL1)[22](PDB: 4IIB)的氨基酸序列相似程度达 81.16%。使用 SWISS-MODEL[40−41] 建模得到黑曲霉 β-D-Glu 与 AaBGL1 的结构相似度极高,结构比对的 RMSD 值为 1.669 Å(附图 1 和附图 2,详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)。根据 AcBGL1 的催化活性位点预测出 β-D-Glu 结合口袋周围的关键氨基酸[22]。

为探究底物苯环上官能团与酶活的关联性,对 β-D-Glu 结合口袋周围的关键氨基酸进行虚拟饱和突变,根据突变能量从小到大筛选出 10 个突变点,分别为 E69W、E69Y、R98F、R98I、R98Q、D99M、D99Y、L141K、D437W、Y511W,它们与原始酶的相对酶活差异如表 1 所示。E69W、R98F 对水杨苷和 R98I对 *p*NPG 的酶活为正影响,D99 和 L141 的突变对 3 个底物酶活产生的负影响较大。以水杨苷为底物时,当 98 位的 Arg 突变为 Phe 时比 Ile 和 Gln 的相对酶活超 7 倍,强疏水性的 Phe 促使酶与葡萄糖基形成疏水作用力,对底物具有固定作用,稳定的结合构象利于酶对糖苷键的正确水解。E69 突变成同为含苯环的 Trp 比 Tyr 相对酶活高 55%,推测是 Trp 吲哚环的 NH 与芳香族底物侧链的 π 电子云之间形成的氢键作用强于 Tyr[42],强相互作用力使酶与底物结合更加紧密,利于酶水解。

表 1 β-D-Glu 突变体对 3 个底物的相对酶活(%)

Table 1 Relative enzyme activities of β-D-Glu mutants towards 3 substrates (%)

样品	水杨苷	熊果苷	*p*NPG
β-D-Glu	100.00	100.00	100.00
E69W	125.72±16.03^{b}	45.14±1.94^{d}	49.25±6.90^{d}
E69Y	70.10±4.12^{c}	62.21±2.94^{b}	57.72±2.44^{c}
R98F	266.08±2.73^{a}	83.56±3.87^{a}	92.46±0.41^{b}
R98I	37.62±2.91^{d}	56.63±1.62^{c}	110.98±3.86^{a}
R98Q	35.05±2.43^{d}	63.90±3.28^{b}	93.54±3.55^{b}
D99M	58.04±5.46^{c}	0.37±0.67^{g}	4.88±0.20^{e}
D99Y	48.39±4.77^{d}	0.14±0.00^{g}	5.10±0.10^{e}
L141K	37.94±9.21^{d}	0.72±0.25^{g}	0.72±0.00^{e}
D437W	72.83±7.50^{c}	40.25±2.88^{e}	61.31±3.05^{c}
Y511W	71.70±3.21^{c}	29.61±0.70^{f}	49.25±3.45^{d}

注:每个底物各为一组,不同字母表示组间存在显著差异,P<0.05。

在 6 个突变位点中,第 98 位精氨酸的突变点对 3 个底物催化活性的特异性影响最强,利于进一步研

究侧链基团对酶活性的影响。对于水杨苷，R98F 的酶活提高至原始型的 266.08%，而 R98I 和 R98Q 对水杨苷的酶活降低幅度近 65%（图 4）；对于熊果苷，3 个突变体的酶活均有不同程度的降低；对于 *p*NPG，R98I 对 *p*NPG的酶活相较原始型提高了 10%，但总体均接近于原始型。因此后续选择 R98F、R98I、R98Q进行结合模式、分子动力学模拟的分析。

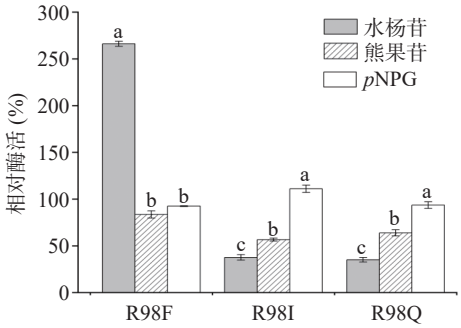


图 4　β-D-Glu 第 98 位突变体相对酶活

Fig.4　Relative enzyme activity of the 98th mutant of β-D-Glu

注：每个突变体各为一组，相同字母表示组间差异不显著，不同字母表示组间存在显著差异，$P<0.05$。

2.3　黑曲霉 β-D-Glu 及其突变体与底物的结合模式

AaBGL1 的活性位点和催化残基位于桶状结构域和 α/β 夹层结构域之间的结构域界面，作为保留型的糖苷水解酶，其亲核试剂和酸/碱残基分别为 Asp280 和 Glu509，功能氨基酸 Trp281 在亚位−1 与葡萄糖基形成芳香堆叠相互作用。依此推测黑曲霉 β-D-Glu 的催化关键氨基酸分别是 Asp280 和 Glu509，固定葡萄糖基的功能氨基酸为 Trp281[22]。

黑曲霉 β-D-Glu、R98F、R98I 和 R98Q 分别与水杨苷、熊果苷和 *p*NPG 的对接结合能和对接情况如表 2 和图 5 所示。对接后的底物均结合在桶状结构域和 α/β 夹层结构域之间的结构域界面，催化氨基酸 Glu509 和 Asp280 均与末端葡萄糖形成氢键，功能位点 Trp281 在底物周围的 4 Å出现，并与其形成疏水相互作用或范德华力。黑曲霉 β-D-Glu 结合底物时，Tyr248 和 Trp68 起到辅助结合的作用，Tyr248 主要与葡萄糖建立氢键作用，Trp68 主要与顶端苯环及其官能团建立氢键或 pi-pi 堆叠作用。

表 2　β-D-Glu 及突变体与不同底物的对接结合能（kcal/mol）

Table 2　Docking binding energies of β-D-Glu and mutants with different substrates (kcal/mol)

样品	水杨苷	熊果苷	*p*NPG
β-D-Glu	−6.2	−6.4	−6.8
R98F	−6.9	−6.7	−7.2
R98I	−7.0	−7.1	−7.0
R98Q	−6.7	−6.7	−7.0

对比 3 个 R98 突变体和原始酶与不同底物的对接构象，发现酶结合水杨苷时，R98F 与水杨苷的相互作用和原始酶相似，但关键催化氨基酸 Glu509 和

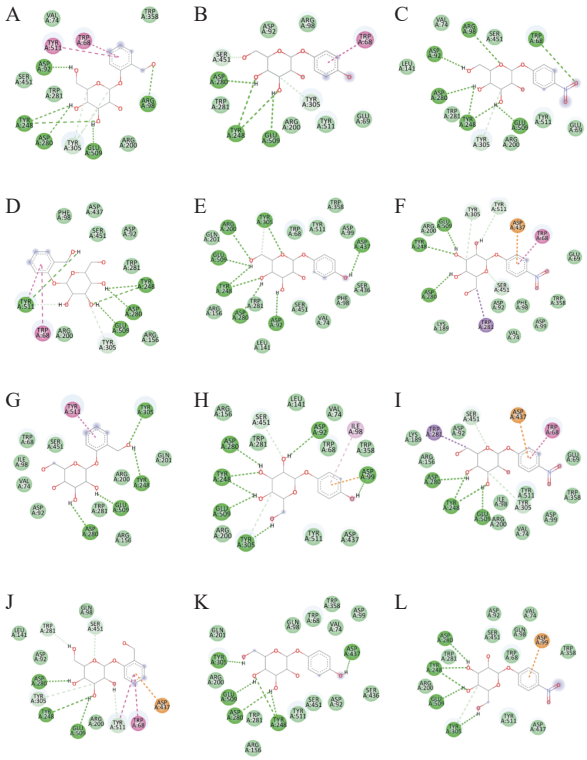


图 5　β-D-Glu 和 R98F 与水杨苷、熊果苷、*p*NPG 的相互作用 2D 图

Fig.5　2D diagram of the interaction between β-D-Glu and R98F with salicin, arbutin and *p*NPG

注：A、B、C 分别为 β-D-Glu 与水杨苷、熊果苷、*p*NPG；D、E、F 分别为 R98F 与水杨苷、熊果苷、*p*NPG；G、H、I 分别为 R98I 与水杨苷、熊果苷、*p*NPG；J、K、L 分别为 R98Q 与水杨苷、熊果苷、*p*NPG。深绿色为氢键作用力；绿色为范德华力；浅绿色为 C-H 键作用力；紫色为 Pi-Sigma 作用力；洋红色为 Pi-Pi Stacked/T-shaped 作用力；粉色为 Pi-Alkyl 作用力；黄色为 Pi-Sulfur 作用力。

Asp280 与底物形成的氢键距离都比原始型更短（原始型为 1.96 Å和 2.88 Å；R98F 为 1.86 Å和 2.46 Å），R98F 中 Tyr511 与苯环上羟甲基形成的氢键距离（2.64 Å）也较原始型中 Arg98 形成的氢键距离更短（3.19 Å），更强的氢键相互作用使酶与底物结合得更稳定[43]，这可能是实验结果中 R98F 对水杨苷酶活提高的原因。R98I 和 R98Q 与水杨苷末端葡萄糖基形成的氢键数量较原始酶减少，酶与底物间相互作用减弱使水解活性降低。酶结合熊果苷时，突变后活性位点与熊果苷的作用力种类发生较大变化，氢键作用增加，但疏水作用减少，原始酶中 Trp68 以 pi-pi 堆叠作用固定住苯环，而突变体由 Asp437 和 Asp99 以氢键作用结合于苯环上的羟基，推测同 α-葡萄糖苷酶 AglA 催化合成熊果苷类似，是酶与苯环结合位姿的不同导致了酶活的差异[44]。酶结合 *p*NPG 时，原始酶形成的氢键作用较多，突变后氢键数量均减少，但疏水作用明显增强，使突变前后酶活波动幅度较小。总体看来，R98F 对 3 个不同底物的相对酶活差异最大，进而以 R98F 为例研究了 β-D-Glu 及其突变酶与底物的结合模式。

2.4　黑曲霉 β-D-Glu 和 R98F 与底物的分子动力学模拟

2.4.1　结构稳定性分析　以上述获得的对接构象作为分子动力学模拟的初始构象，对黑曲霉 β-D-Glu 和 R98F 与底物进行分子动力学模拟。借助 RMSD 值和 Rg 值分析不同底物的结合以及 R98F 突变对 β-D-Glu 结构稳定性的影响(图 6)。在原始酶与底物的复合物体系中，底物结合使蛋白结构相对松散，结构灵活度增加。突变前后的复合物体系相比，R98 突变成 Phe 后，复合物体系的波动范围更小，提升了结构的稳定性和紧密性，说明 R98F 使得酶-底物的构象更稳定。所有体系的 RMSD 值均在 0.15~0.45 nm 变化范围内，均能在反应时间内达到平衡状态，可进行后续的深入分析。

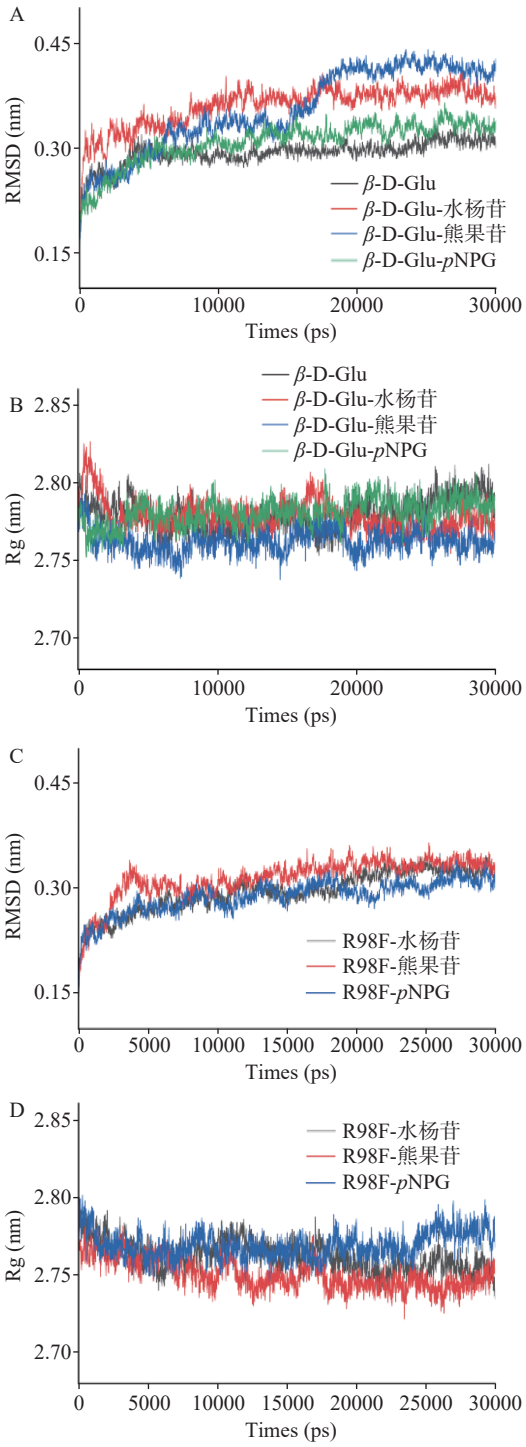


图 6　β-D-Glu 与不同底物结合的 RMSD 值(A)和 Rg 值(B)和 R98F 与不同底物结合的 RMSD 值(C)和 Rg 值(D)

Fig.6　RMSD (A) and Rg (B) of β-D-Glu binding to different substrates and RMSD (C) and Rg (D) of R98F binding to different substrates

2.4.2　结构刚柔性分析　计算 β-D-Glu 和 R98F 的 RMSF 差值(差值为正数表示该区域柔性增强，差值为负数表示该区域刚性增强)，分析催化结构域

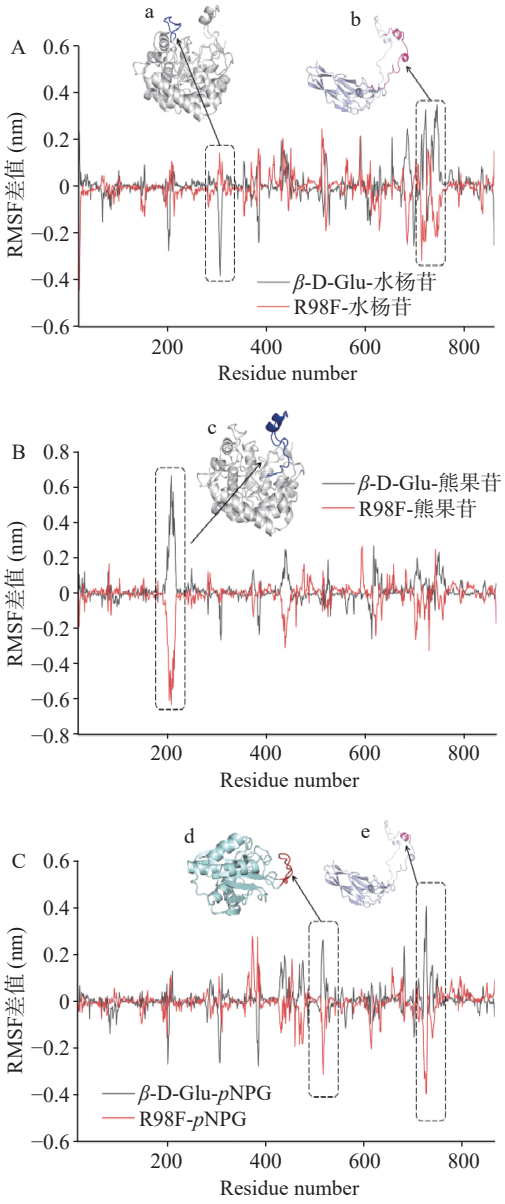


图 7　β-D-Glu 和 R98F 与水杨苷(A)、熊果苷(B)、pNPG(C)复合物的 RMSF 值

Fig.7　RMSF of β-D-Glu and R98F complexed with salicin (A), arbutin (B) and pNPG (C)

注：β-D-Glu 复合物体系的 RMSF 差值是由 β-D-Glu 复合物体系减去纯蛋白体系得出，R98F 复合物体系的 RMSF 差值是由 R98F 复合物体系减去 β-D-Glu 复合物体系得出；TIM 桶状结构域(22~356)，α/β 夹心结构域(385~588)，FnIII 结构域(654~860)；区域 a(301~310)，区域 b(716~723、736~749)，区域 c(193~216)，区域 d(510~520)，区域 e(716~725)。

Loop 区的刚柔性变化，以此判断原始酶和 R98F 与不同底物结合前后的运动趋势。结果如图 7 所示，酶结合水杨苷时，主要运动趋势变化为位于 TIM 桶状结构域中的区域 a 柔性增强和 FnIII 结构域中的区域 b 刚性增强；酶结合熊果苷时，主要运动趋势变化为位于 TIM 桶状结构域中的区域 c 刚性增强；酶结合 *p*NPG 时，主要运动趋势变化为 α/β 夹心结构域中的区域 d 和 FnIII 结构域中的区域 e 的刚性同时增大。这些区域的运动趋势变化可能与 R98 突变后的酶活变化相关。

对比原始酶和 R98F 复合物体系的 RMSF 差值，得出突变后主要参与底物结合的柔性区域的刚柔性发生明显变化。Chen 等[45] 发现酶关键区域的刚柔性对于蛋白结构的稳定至关重要，Wang 等[46] 研究的 α-L-鼠李糖苷酶 L234 突变体通过增强 Loop2 的柔性促使酶活提升，这说明突变后酶关键区域的刚柔性变化对酶水解不同底物的活性有重要影响。与熊果苷结合时，催化结构域中的区域 c 在突变后刚性明显增强（RMSF 差值>0.6 nm），可能限制了 Loop 区的动态性，使酶难以有效地与底物结合和释放，从而降低反应速率，这可能是 R98F 对熊果苷水解活性降低的原因之一。R98 位于活性口袋的入口处，推测 R98 突变体通过影响这些柔性区域的刚柔性变化，使得酶能够更好地适应不同形状和结构的底物，因此进一步探究活性口袋附近关键 Loop 区的微观结构。

2.4.3　微观结构分析　根据截取模拟轨迹中能量最低的构象，结合 MM-PBSA 结合自由能计算结果（表 3），对比分析了酶突变前后与底物复合物的结构变化（图 8）。通过叠合原始酶体系的结构发现（图 8 A），底物主要依靠 3 个 Loop 区域（1：W449-A454，2：S279-A283，3：G508-N513）将其稳定在活性口袋内，Loop1 主要通过范德华力辅助稳定底物构象，有助于位于 Loop2 和 Loop3 上的催化位点攻击糖苷键，推动催化反应的进行。β-D-Glu 与已报道 β-葡萄糖苷酶 AcBGL1 的结合模式最类似[22,47]，底物末端葡萄糖处于亲核试剂 Asp280 与酸碱催化氨基酸 Glu509 之间并建立氢键，有利于稳定过渡态，促进催

表 3　β-D-Glu 和 R98F 与不同底物复合物体系结合自由能（kJ/mol）

Table 3　Free energy of binding of β-D-Glu and R98F with different substrate complex system (kJ/mol)

结合自由能贡献项	β-D-Glu			R98F		
	水杨苷	熊果苷	*p*NPG	水杨苷	熊果苷	*p*NPG
ΔE_{vdW}	–71.634	–64.973	–66.839	–55.039	–60.702	–66.806
ΔE_{elec}	–552.960	–459.769	–542.581	–557.855	–427.500	–450.385
ΔE_{PB}	277.050	229.719	311.734	215.120	196.242	221.970
ΔE_{SASA}	–15.145	–14.413	–14.879	–14.391	–13.992	–13.306
ΔE_{bind}	–362.689	–309.436	–312.566	–412.166	–305.952	–308.526

注：ΔE_{vdW} 为在气相下条件酶与底物的范德华作用；ΔE_{elec} 为在气相下条件酶与底物的静电相互作用；ΔE_{PB} 为酶与底物的极性溶剂化能；ΔE_{SASA} 为酶与底物的非极性溶剂化能；ΔE_{bind} 为复合物的总结合自由能。

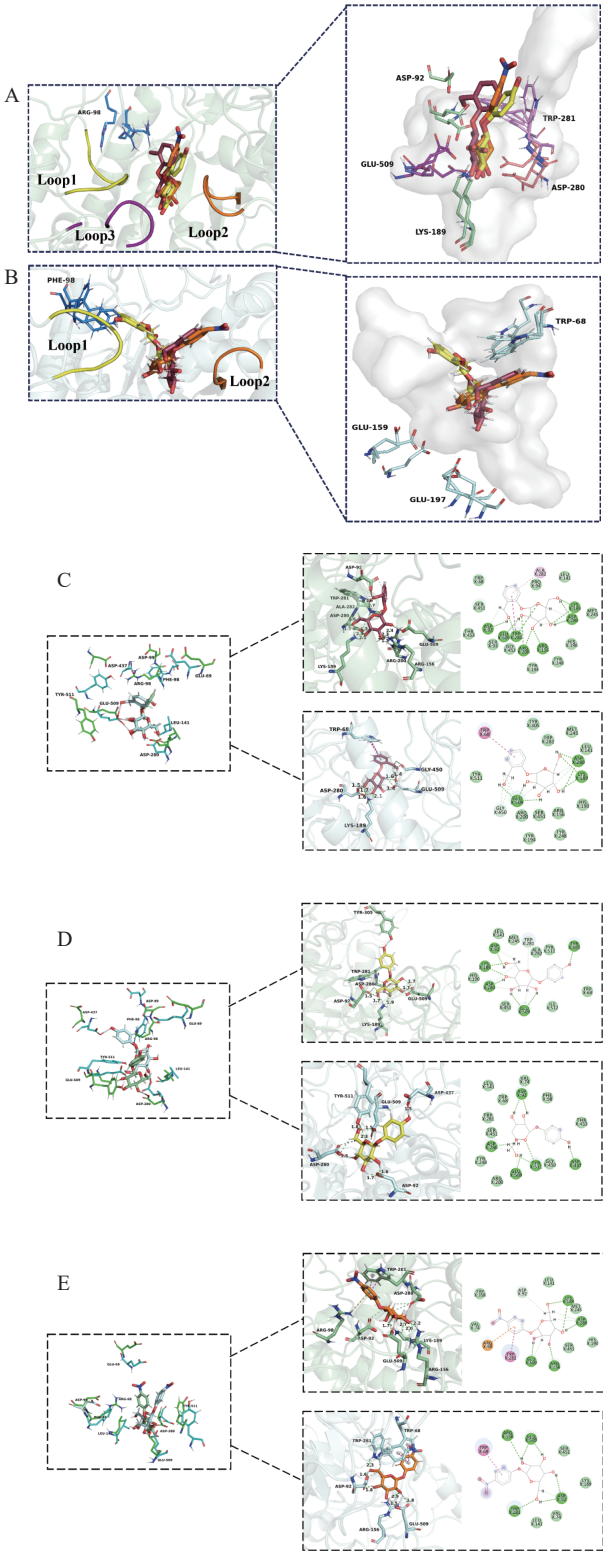


图 8　β-D-Glu 和 R98F 与 3 个底物复合物体系叠合图（A、B）和水杨苷、熊果苷、*p*NPG 分别与 β-D-Glu 和 R98F 复合物体系叠合图及最佳构象图（C、D、E）

Fig.8　Stacking diagrams of β-D-Glu and R98F complexed with 3 substrate systems (A, B) and stacking diagrams of salicin, arbutin, and *p*NPG with β-D-Glu and R98F complex systems and best conformation diagram (C, D, E)

注：底物：紫红色为水杨苷；黄色为熊果苷；橙色为 *p*NPG。作用力：深绿色为氢键作用力；绿色为范德华力；浅绿色为 C-H 键作用力；洋红色为 Pi-Pi Stacked/T-shaped 作用力；粉色为 Pi-Alkyl 作用力；黄色为 Pi-Sulfur 作用力。

化反应; Asp92、Arg156 和 Lys189 形成氢键网络, 有利于稳定六元环的平面结构; Trp281 更倾向通过疏水相互作用与底物顶端的苯环及其官能团结合, 有助于固定底物, 同时吲哚基团与底物苯环相互靠近, 影响糖苷键的折叠角度; Trp68、Tyr305、Tyr511 形成一个环位于活性口袋入口处识别底物, 该环的不同结构导致了其他 GH3 家族 β-D-Glu 不同的底物特异性[22]。

通过叠合 R98 突变体系的结构发现(图 8B), R98 各突变体侧链结构的不同、Trp68 吲哚基团和各底物顶端苯环上官能团极性的差异, 使各底物顶端苯环出现偏离, 进而糖苷键折叠方向和角度出现差异。Landersjö等[48] 的研究表明糖苷键的折叠构象可能改变糖基的相对位置, 从而影响底物与酶的结合模式。受苯环的偏离折叠的影响, Loop1 和 Loop2 通过构象调整稳定底物末端葡萄糖, 但葡萄糖基的深度及其平面也出现偏离。底物辅助结合的功能位点发生变化: Glu159 和 Glu197 的羧基的极性以及 Trp68 与苯环建立 pi-pi 堆叠作用, 有利于稳定复合物构象。因此推断, R98 突变通过改变糖苷键的折叠角度及 Loop 区的构象调整, 从而差异化水解不同底物。

根据结合自由能的结果(表 3 和附表 2~附表 7, 详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)所示, R98F 与水杨苷复合物体系的结合最稳定。β-D-Glu 和 R98F 对 3 种底物的 ΔE_{elec} 在结合自由能贡献中均占比最大(β-D-Glu: –459.769 至 –552.960 kJ/mol; R98F: –427.500 至–557.855 kJ/mol), 表明结合主要以静电互作为主, 此外, 对 3 种底物的 ΔE_{PB} 在结合自由能贡献中的占比仅次于 ΔE_{elec}(β-D-Glu: 229.719 至 311.734 kJ/mol; R98F: 196.242 至 221.970 kJ/mol), 表明极性溶剂化自由能在结合中为辅, 促进结合的同时稳定复合物构象, Ye 等[49] 研究的烯酰辅酶 A 裂解酶突变体的静电相互作用和极性溶剂化能也是影响酶活的主要因素。突变后 β-D-Glu 仅对水杨苷的亲和力有明显的提升, 对熊果苷和 *p*NPG 的亲和力无明显影响, 推测亲和力的提升可能是 R98F 对水杨苷酶活提高的重要因素。

β-D-Glu 活性口袋入口处的 Glu69、Asp99、Asp437 和 Tyr511 位点的侧链对底物顶端苯环的构象有不同程度的影响。底物顶端与苯环相连的官能团分为 3 种: 醇羟基、酚羟基和硝基, 后两者与苯环直接相连并处于对位。与原始酶相比, R98F 失去 a 区域附近 Ala282 与水杨苷形成的疏水作用力, 可能是促使 2.4.2 中 a 区域柔性变强的原因, a 区域位于催化结构域偏上方, 其柔性的增强利于构象的动态变化, 可能保障底物顺利进出通道, 提升了催化效率。原始酶中广义酸碱催化氨基酸 Glu509 与水杨苷葡萄糖基形成 1 个氢键作用(1.43 Å), R98F 的 Glu509 与水杨苷苯环上的醇羟基和葡萄糖基形成 3 个氢键作用(1.39、1.39、1.59 Å)和 2 个 C-H 键作用。强相互作用有利于 Glu509 削弱糖苷键的稳定性, 并与过渡态形成更稳定的相互作用, 降低了反应的活化能, 使质子转移过程高效进行。酶与水杨苷的复合物构象显示突变后范德华力明显增强, 与结合自由能计算结果一致, 疏水相互作用的增强可能会提高 β-葡萄糖苷酶与底物的亲和力并增加酶催化的周转率[50]。结合口袋入口处构象的灵活性和催化关键氨基酸与底物正确的紧密结合可能促使 R98F 对水杨苷酶活的大幅度提高。

与水杨苷的醇羟基相比, 熊果苷顶端的酚羟基供电子能力很强[51], 可能改变催化环境的电荷分布, 使得底物与酶活性位点的电荷互补发生变化。Díaz 等[52] 发现电荷环境的变化可能影响酶与底物的结合模式, Trp281 与水杨苷和 *p*NPG 的苯环形成 pi-pi 相互作用, 而 β-D-Glu 与熊果苷结合时, Tyr305 与其苯环上的酚羟基形成氢键作用, 突变后 R98F 的 Asp437 在同一位置与熊果苷形成氢键作用。突变后较弱的疏水作用可能不利于酶固定熊果苷, 易使其顶端苯环折叠偏移, 同时吸引 Asp69 的侧链向其靠近, 进而影响末端葡萄糖不能结合至更深的位置, 导致糖苷键无法处于与催化氨基酸进行高效动态相互作用的最佳距离范围内, 这可能是 R98F 对熊果苷催化活性降低 16.44%的原因。

*p*NPG 顶端苯环的硝基极性很强, 影响苯环对位的电子密度[53], β-D-Glu 与 *p*NPG 结合时, Arg98 和 Trp281 在苯环的对立面形成 pi-pi 相互作用, 形成稳定的“三明治”结构固定住底物, 可能不利于底物运动。当 Arg98 突变为 Phe 时, 强极性的硝基与非极性的 Phe 不匹配, 仅剩 Trp68 与苯环形成 pi-pi 相互作用, 底物相对更灵活, 利于反应的快速进行。另外, β-D-Glu 为保留型催化机制, 与 *p*NPG 结合时, R98F 的亲核试剂 Asp280 在 4 Å范围内没有与底物形成相互作用, 与糖苷键距离较远, 不易进攻糖苷键上的异头碳, 难以形成过渡态中间体, 可能导致反应速率下降[54]。底物更加灵活, 但糖苷键断键能力减弱, 这可能是 R98F 对 *p*NPG 催化活性小幅度降低的原因。

3 结论

本研究筛选并突变了黑曲霉 β-葡萄糖苷酶 β-D-Glu 结合口袋周围的关键氨基酸, 探讨了单环芳基葡萄糖苷类底物侧链基团对 β-葡萄糖苷酶水解活性的影响。通过靶向突变结合口袋入口处的关键氨基酸, 发现底物侧链苯环上的官能团的极性和官能团的给电子能力影响了结合口袋入口处构象的灵活性、酶水解糖苷键的能力、酶与底物结合的位置和稳定性, 从而使酶对不同底物的活性呈现特异性变化。这一结果与 Dayan 等[55] 关于糖苷配基结构影响底物特异性的结论一致, 拓展了“配基-酶相互作用”在 β-葡萄糖苷酶功能调控的作用机制。但本研究仅探讨了结构简单的单环芳基葡萄糖苷底物侧链基团与 β-葡萄糖苷酶水解活性的关联性, 鉴于芳基葡萄糖苷底物的多样性, 后续将依据底物的结构特征, 深入研究不

同类型侧链基团对酶活性的影响机制。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] KANNAN P, SHAFREEN M M, ACHUDHAN A B, et al. A review on applications of β-glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries[J]. Carbohydrate Research, 2023, 530: 108855.

[2] ZHANG S, HUANG J, HU R, et al. Characterization of a new multifunctional beta-glucosidase from *Musca domestica*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(8): 1219−1227.

[3] SINGHVI M S, ZINJARDE S S. Production of pharmaceutically important genistein and daidzein from soybean flour extract by using β-glucosidase derived from *Penicillium janthinellum* ncim 1171[J]. Process Biochemistry, 2020, 97: 183−190.

[4] HORIKOSHI S, SABURI W, YU J, et al. Substrate specificity of glycoside hydrolase family 1 β-glucosidase atbglu42 from *Arabidopsis thaliana* and its molecular mechanism[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2022, 86(2): 231−245.

[5] SUN N, LIU X X, ZHANG B X, et al. Characterization of a novel recombinant halophilic β-glucosidase of *Trichoderma harzianum* derived from hainan mangrove[J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 185.

[6] NIU W J, NIE W, YUAN M Y, et al. Study of the microscopic mechanism of lauryl glucoside wetting coal dust: environmental pollution prevention and control[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 412: 125223.

[7] LIANG S, WANG F, GRANATO D, et al. Effect of β-glucosidase on the aroma of liquid-fermented black tea juice as an ingredient for tea-based beverages[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134201.

[8] YUAN L, ZHANG Y, PENG S Q, et al. A novel beta-glucosidase gene from *Angelica dahurica* and insights into the metabolic pathway of scopoletin[J]. Industrial Crops and Products, 2025, 231: 121219.

[9] QU Y, LUO Y, YANG X L, et al. Highly efficient biotransformation of phenolic glycosides using a recombinant β-glucosidase from white rot fungus *Trametes trogii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 762502.

[10] MURADOVA M, PROSKURA A, CANON F, et al. Unlocking flavor potential using microbial β-glucosidases in food processing: 24[J]. Foods, 2023, 12(24): 4484.

[11] MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, ZATLOUKALOVÁ L, et al. *In vitro* interactions of coumarins with iron[J]. Biochimie, 2010, 92(9): 1108−1114.

[12] MA X F, ZHANG Y Y, GUO F Y, et al. Molecular characterization of a voltage-gated calcium channel and its potential role in the acaricidal action of scopoletin against *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 168: 104618.

[13] YU Y H, DING X J, DING Z H, et al. Fluorescence spectroscopy and molecular docking analysis of the binding of *Lactobacillus acidophilus* gim1.208 β-glucosidase with quercetin glycosides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 146: 109761.

[14] LI C, XU T Y, LIU X W, et al. The expression of β-glucosidase during natto fermentation increased the active isoflavone content[J]. Food Bioscience, 2021, 43: 101286.

[15] KUO L C, LEE K T. Cloning, expression, and characterization of two β-glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 119−125.

[16] ARTHAN D, KITTAKOOP P, ESEN A, et al. Furostanol glycoside 26-o-β-glucosidase from the leaves of *Solanum torvum* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(1): 27−33.

[17] NA AYUTTHAYA P P, CHANCHAO C, CHUNSRIVIROT S. Insight into the substrate specificity change caused by the Y227H mutation of α-glucosidase III from the European honeybee (*Apis mellifera*) through molecular dynamics simulations[J]. PloS one, 2018, 13(6): e0198484.

[18] WANG X, CHEN Z, ZHU H, et al. Selective transformation of crocin-1 to crocetin-glucosyl esters by β-glucosidase (lf18920) from *Leifsonia* sp. zf2019: Insights from molecular docking and point mutations[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 181: 110522.

[19] TAMAKI F K, ARAUJO É M, ROZENBERG R, et al. A mutant β-glucosidase increases the rate of the cellulose enzymatic hydrolysis[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2016, 7: 52−55.

[20] YU F Y, WU X C, CHEN W S, et al. Computer-assisted discovery and evaluation of potential ribosomal protein s6 kinase beta 2 inhibitors[J]. Computers in Biology and Medicine, 2024, 172: 108204.

[21] KUMAR A, SINGH E, JHA R K, et al. Targeting multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a structure-based approach to identify the promising lead candidates against glutamate racemase [J]. Journal of Molecular Modeling, 2023, 29(6): 188.

[22] SUZUKI K, SUMITANI J I, NAM Y W, et al. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*[J]. Biochemical Journal, 2013, 452(2): 211−221.

[23] WANG J X, PANG C P, TU Z L, et al. Double enzymes coupled screening assisted molecular modification of α-amino acid ester acyltransferase for l-alanyl-l-glutamine biosynthesis[J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103643.

[24] LI L J, PENG C, GONG J Y, et al. Improving alkaline stability of α-L-Rhamnosidase from *Aspergillus niger* through computational strategy combines with folding free energy and binding free energy[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200: 109075.

[25] ABRAHAM M J, MURTOLA T, SCHULZ R, et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. SoftwareX, 2015, 1: 19−25.

[26] SARKAR A, SANTORO J, DI BIASI L, et al. YAMACS: A graphical interface for GROMACS[J]. Bioinformatics, 2022, 38 (19): 4645−4646.

[27] WANG E C, SUN H Y, WANG J M, et al. End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and applications in drug design[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(16): 9478−9508.

[28] BOLLOK M, RESINA D, VALERO F, et al. Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: Expanding the toolbox for recombinant protein production[J]. Recent patents on Biotechnology, 2009, 3: 192−201.

[29] 徐星豪, 夏伟, 吴敬. *Talaromyces piceae* 来源 β-葡萄糖苷酶在毕赤酵母中的重组表达及发酵优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z1): 2091−2099. [XU X H, XIA W, WU J, et al. Re-

combinant expression and fermentation optimization of *β*-Glucosidase from *Talaromyces piceae* in *Pichia pastoris*[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(Z1): 2091−2099.]
[30] PUGALENTHI G, NITHYA V, CHOU K C, et al. Nglyc: A random forest method for prediction of N-glycosylation sites in eukaryotic protein sequence[J]. Protein & Peptide Letters, 2020, 27(3): 178−186.
[31] LI L L, GONG J Y, WANG S, et al. Heterologous expression and characterization of a new clade of *Aspergillus α*-L-Rhamnosidase suitable for citrus juice processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2926−2935.
[32] CANETTIERI D L, PIMENTEL D C, ALMEIDA L F, et al. Application of the *β*-glucosidase from the fungus *Kretzschmaria zonata* on sugarcane bagasse hydrolysis[J]. BioEnergy Research, 2024: 1-10.
[33] SANTA-ROSA P S, SOUZA A L, ROQUE R A, et al. Production of thermostable *β*-glucosidase and cmcase by *Penicillium* sp. IMI01 isolated from the amazon region[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 31: 84−92.
[34] VOLKOV P V, ROZHKOVA A M, ZOROV I N, et al. Cloning, purification and study of recombinant GH3 family *β*-glucosidase from *Penicillium verruculosum*[J]. Biochimie, 2020, 168: 231−240.
[35] YAN F Y, XIA W, ZHANG X X, et al. Characterization of *β*-glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones[J]. Journal of Zhejiang University Science. B, 2016, 17(6): 455−464.
[36] GUTIERREZ-GUTIERREZ D A, FUENTES-GARIBAY J A, VIADER-SALVADÓ J M, et al. Biochemical characterization of the *β*-glucosidase Glu1B from *Coptotermes formosanus* produced in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 163: 110155.
[37] 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.
[38] SUN J J, WANG W, YING Y, et al. A novel glucose-tolerant GH1 *β*-glucosidase and improvement of its glucose tolerance using site-directed mutation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 192(3): 999−1015.
[39] ZIMMERMANN L, STEPHENS A, NAM S Z, et al. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core[J]. Journal of Molecular Biology, 2018, 430(15): 2237−2243.
[40] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296−W303.
[41] BIASINI M, BIENERT S, WATERHOUSE A, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W252−W258.
[42] BARIK S. The uniqueness of tryptophan in biology: Properties, metabolism, interactions and localization in proteins: 22[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(22): 8776.
[43] MATIENKO L I, MIL E M, ALBANTOVA A A, et al. The role H-bonding and supramolecular structures in homogeneous and enzymatic catalysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(23): 16874.
[44] WU Y Q, YU X J, ZHOU H Y, et al. Revealing the critical role of leucine145 of *α*-glucosidase AglA for enhancing *α*-arbutin production[J]. Molecular Catalysis, 2023, 537: 112943.
[45] CHEN C, GUAN B H, GENG Q, et al. Enhanced thermostability of *Candida* ketoreductase by computation-based cross-regional combinatorial mutagenesis[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(11): 7407−7416.
[46] WANG D Q, ZHENG P, CHEN P C, et al. Engineering an *α*-L-Rhamnosidase from *Aspergillus niger* for efficient conversion of rutin substrate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 186: 108572.
[47] BABA Y, SUMITANI J I, TANAKA K, et al. Site-saturation mutagenesis for *β*-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus* to accelerate the saccharification of alkaline-pretreated bagasse[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100: 10495−10507.
[48] LANDERSJÖ C, STENUTZ R, WIDMALM G. Conformational flexibility of carbohydrates: A folded conformer at the φ dihedral angle of a glycosidic linkage[J]. Journal of the American Chemical Society, 1997, 119(37): 8695−8698.
[49] YE Q, XU W Z, HE Y N, et al. Biosynthesis of vanillin by rational design of enoyl-coa hydratase/lyase[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(17): 13631.
[50] ZHOU H Y, CHEN Q, ZHANG Y F, et al. Improving the catalytic activity of *β*-glucosidase from *Coniophora puteana* via semi-rational design for efficient biomass cellulose degradation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 164: 110188.
[51] CHEN J X, YANG J, MA L L, et al. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids[J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 2611.
[52] DÍAZ N, SUÁREZ D. Influence of charge configuration on substrate binding to SARS-CoV-2 main protease[J]. Chemical Communications, 2021, 57(43): 5314−5317.
[53] 王永强. 从核磁共振的化学位移探讨取代苯亲电取代反应的活性和区域选择性[J]. 大学化学, 2020, 35(7): 142−150. [WANG Y Q. An insight into activity & regioselectivity of electrophilic substitution of benzenes based on chemical shift of nuclear magnetic resonance[J]. University Chemistry, 2020, 35(7): 142−150.]
[54] LI S F, CHENG F, WANG Y J, et al. Strategies for tailoring pH performances of glycoside hydrolases[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(1): 121−141.
[55] DAYAN F E, KUHAJEK J M, CANEL C, et al. Podophyllum peltatum possesses a *β*-glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2003, 1646(1): 157−163.