

研究报告

一株产 β -葡萄糖苷酶甘草内生菌的筛选、全基因组分析及产酶优化

孔晓双¹, 黄新新¹, 董应宏², 侯敏^{*1}, 买尔哈巴·艾合买提¹, 侯新强¹, 崔卫东^{*1}

1 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

2 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

孔晓双, 黄新新, 董应宏, 侯敏, 买尔哈巴·艾合买提, 侯新强, 崔卫东. 一株产 β -葡萄糖苷酶甘草内生菌的筛选、全基因组分析及产酶优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 279-294.

KONG Xiaoshuang, HUANG Xinxin, DONG Yinghong, HOU Min, Marhaba Ahmat, HOU Xinqiang, CUI Weidong. Screening, whole genome analysis, and fermentation condition optimization of a β -glucosidase-producing endophyte from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 279-294.

摘要:【背景】从健康甘草须根中分离获得的一株芽孢杆菌具有高产 β -葡萄糖苷酶的活性。【目的】探究分离菌株潜在的产酶遗传信息, 为该菌深入研究与工业应用提供数据支撑。【方法】利用七叶苷培养基进行产 β -葡萄糖苷酶的益生菌筛选, 筛到一株产 β -葡萄糖苷酶的芽孢杆菌, 采用三代 NanoPore PromethION 和二代 Illumina NovaSeq 平台对菌株进行基因组测序与组装, 并通过基因预测与功能注释等生物信息分析预测菌株潜在的 β -葡萄糖苷酶基因。另外, 以 β -葡萄糖苷酶活性为指标, 研究碳源、氮源、接种量、温度和起始 pH 对菌株产酶活性的影响。【结果】从甘草须根中分离得到一株具有 β -葡萄糖苷酶活性的菌株, 通过形态学观察、生理生化和分子生物学试验鉴定为芽孢杆菌属菌株, 并命名为 *Bacillus rugosus* A78.1。该菌株基因组大小为 4 146 938 bp, G+C 含量为 43.86%, 共编码 4 255 个基因。在基因组中, 共注释到碳水化合物活性酶基因 192 个, 其中 β -葡萄糖苷酶基因 10 个, 分别属于 GH1 和 GH3 家族基因。在基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和同源基因簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)数据库分别注释到 2 896、4 019 和 3 657 个基因。该菌株基因组测序结果上传至 NCBI 获得 GenBank 登录号为 CP096590。菌株 A78.1 产 β -葡萄糖苷酶的最佳碳、氮源分别

资助项目: 新疆维吾尔自治区重点研发任务专项(2022B02042); 新疆维吾尔自治区重点研发专项-厅厅联动、厅地联动项目(2022B02056-1); 国家地区科学基金(31960681); 新疆维吾尔自治区农区高效肉羊品种选育推广技术体系岗位专家项目(xjnjry-g-2312)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022B02042), the Key Research and Development Program of the Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022B02056-1), the National Regional Science Foundation Program (31960681), and the Xinjiang Uygur Autonomous Region Agricultural Efficient Mutton Sheep Breeding Promotion Technology System Post Expert Project (xjnjry-g-2312).

*Corresponding authors. E-mail: HOU Min, hmde_092@163.com; CUI Weidong, cuwedo@163.com

Received: 2023-05-08; Accepted: 2023-10-07; Published online: 2023-11-09

为 0.5%葡萄糖、1.0%酵母浸粉, 最佳培养条件为温度 37 °C、3%接种量、pH 6.0, 此条件下 β -葡萄糖苷酶活力可达到(5.640 \pm 0.085) U/mL。【结论】通过全基因组测序分析及产酶优化试验确定了 *Bacillus rugosus* A78.1 优良的产 β -葡萄糖苷酶能力及在碳水化合物代谢方面的潜力, 为该菌株在纤维素分解、糖苷类化合物水解等生物、化工和食品领域的研究与应用提供基础。

关键词: 甘草内生菌; *Bacillus rugosus*; β -葡萄糖苷酶; 全基因组; 发酵优化

Screening, whole genome analysis, and fermentation condition optimization of a β -glucosidase-producing endophyte from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch

KONG Xiaoshuang¹, HUANG Xinxin¹, DONG Yinghong², HOU Min^{*1}, Marhaba Ahmat¹, HOU Xinqiang¹, CUI Weidong^{*1}

¹ Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

² College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] *Bacillus rugosus* A78.1 isolated from the fibrous roots of healthy *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. has high β -glucosidase activity. [Objective] To investigate the genetic information of the isolate for enzyme production and provide data support for the further research and industrial application of the strain. [Methods] A β -glucosidase-producing *Bacillus* strain was screened by the medium supplemented with esculin. NanoPore PromethION and Illumina NovaSeq were used for genome sequencing and assembly, and the potential β -glucosidase genes of the strain were predicted by gene prediction and functional annotation. In addition, the effects of carbon source, nitrogen source, inoculum amount, temperature, and initial pH on the enzyme-producing activity of the strain were investigated with β -glucosidase activity as an indicator. [Results] A strain capable of producing β -glucosidase was isolated from the fibrous roots of *G. uralensis*. It was identified as a strain of *Bacillus* by morphological observation, physiological and biochemical tests and named *B. rugosus* A78.1. The genome of this strain was 4 146 938 bp in length, with the G+C content of 43.86%, encoding 4 255 genes. In the genome, 192 carbohydrate-active enzyme genes were annotated, including 10 β -glucosidase genes belonging to the GH1 and GH3 families. A total of 2 896, 4 019, and 3 657 genes were annotated in GO (gene ontology), KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes), and COG (clusters of orthologous groups of proteins), respectively. The genome sequencing data were submitted to NCBI and obtained the GenBank accession No. CP096590. For the production of β -glucosidase, the strain should be fermented with 0.5% glucose as the carbon source, 1.0% yeast extract as the nitrogen source at 37 °C and pH 6.0 with the inoculum amount of 3%. Under these conditions, the activity of β -glucosidase produced by this strain reached (5.640 \pm 0.085) U/mL. [Conclusion] We

confirmed the excellent β -glucosidase-producing ability of *B. rugosus* A78.1 and the potential of this strain in carbohydrate metabolism by whole genome sequencing and fermentation condition optimization for enzyme production. The findings provide a basis for the research and application of this strain in biochemical and food fields such as cellulose degradation and glycoside hydrolysis.

Keywords: endophyte of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; *Bacillus rugosus*; β -glucosidase; whole genome; optimization of fermentation conditions

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC3.2.1.21)是纤维素酶的一种, 又称 β -葡萄糖苷水解酶, 它能够水解羟基或芳香基与糖基原子团间的糖苷键, 生成葡萄糖和相应的配基, 是纤维素分解酶系中的组成部分^[1-2]。 β -葡萄糖苷酶具有特有的理化性质及生理功能, 在化工、食品工业、生物医药和农业等领域具有重要的应用价值^[3-4]。生产应用中的 β -葡萄糖苷酶大都来源于植物和微生物(真菌、细菌)^[5]。植源性 β -葡萄糖苷酶存在原料有限、价格高昂等问题, 而从木霉和曲霉等菌株发酵获得的 β -葡萄糖苷酶在应用上存在酶活力偏低、热稳定性差和反应条件范围小等问题, 直接限制了 β -葡萄糖苷酶在工业中的应用^[6]。研究表明, 植物内生菌与宿主植物形成共生关系, 参与宿主植物的生理或代谢过程, 直接或间接转化植物代谢物^[7]。药用植物内生菌拥有完整且庞大的产酶体系, 代谢产物可转化植物体内黄酮糖苷、皂苷等化合物, 进而提高活性物质的含量, 影响药用植物的药效^[8]。

甘草作为药材作物之一, 其药理功效广泛。研究表明, 甘草提取物中含有大量皂苷类、黄酮类和多糖类活性成分, 具有抗菌、抗肿瘤、抗炎和抑菌等生物活性, 被广泛应用于药业、食品和饲料添加剂等领域^[9-10]。本研究旨在从甘草须根中分离出一株产 β -葡萄糖苷酶的内生细菌菌株, 围绕该菌株形态、生理生化特征和分子生物学试验等方法进行鉴定。为进一步挖掘其产酶基因和潜在益生价值, 对分离菌株的全基因组进行测序, 并对该菌株进行基

因本体数据库(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-active enzymes database, CAZy)和同源基因簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)中的功能基因注释分析。同时对该菌株的 β -葡萄糖苷酶活性进行验证与优化, 在提供高产 β -葡萄糖苷酶菌株的同时, 为后续对该菌株的功能特性、应用价值的深入研究奠定科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

新鲜健康的乌拉尔红皮甘草于2021年秋季采自新疆阿勒泰地区, 放置采样袋中4 °C条件下带回实验室后立即进行试验。

1.1.2 培养基

营养肉汤培养基(nutrient broth, NB)参考文献[11]配制。

七叶苷固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 3.0, 氯化钠 3.0, 七叶苷 1.0, 柠檬酸铁 0.5, 琼脂粉 20.0, 蒸馏水 1.0。

产酶基础培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 10.0, 磷酸二氢钾 5.0, 硫酸镁 0.4, 蒸馏水 1.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

七叶苷和柠檬酸铁, 上海源叶生物科技有限公司; 营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基, 青岛海博生物技术有限公司; TIANamp Bacteria

DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; β -葡萄糖苷酶试剂盒(微量法), 苏州科铭生物技术有限公司。

细菌培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; 酶标仪, PCR 仪, 杭州博日科技有限公司; 电泳仪, Bio-Rad 公司; 离心机, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 凝胶成像系统, 上海艾研生物科技有限公司; NanoDrop One 超微量紫外分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 甘草内生菌的分离纯化

取新鲜的乌拉尔红皮甘草的根, 先用自来水冲洗干净, 切成 5–6 cm 的小段, 进行表面消毒处理。即用无菌水冲洗 3 次, 在 75%乙醇中浸泡 3 min, 无菌水冲洗 1 min; 5%次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 无菌水冲洗 1 min; 用 75%乙醇漂洗 30 s, 无菌水冲洗 1 min, 备用^[12]。取最后一次无菌水洗涤液 100 μ L, 涂布于 NA 平板, 做 3 个重复空白对照, 35 $^{\circ}$ C 培养 1–3 d, 若无菌落生长则表明甘草表面消毒彻底。

消毒完毕后, 将乌拉尔红皮甘草根样本使用无菌打浆机匀浆, 取组织匀浆液使用无菌水依次稀释 2 000、6 000 和 18 000 倍后涂布于 10% NA 培养基中, 在 96 孔细胞培养板中 35 $^{\circ}$ C 培养 1–3 d^[13], 挑取长出的菌液在 NA 平板上连续划线获得纯化菌株。

1.3 产 β -葡萄糖苷酶内生菌的筛选

β -葡萄糖苷酶内生菌的筛选利用七叶苷显色原理, 即七叶苷被 β -葡萄糖苷酶水解后生成的 6,7-二羟香豆素也称七叶苷元与铁离子反应产生黑褐色物质, 培养基上的菌落周围产生颜色变化。将纯化后的甘草内生菌重新划线至七叶苷固体培养基上在 37 $^{\circ}$ C 培养 24–36 h 后观察颜色变化, 菌株划线附近的培养基变黑, 即可判断该菌株能产 β -葡萄糖苷酶^[14]。

1.4 生理生化试验、菌株 16S rRNA 基因鉴定和基因组测序

参照《伯杰细菌鉴定手册》^[15]与《常见细菌系统鉴定手册》^[16]对产 β -葡萄糖苷酶的菌株进行相关生理生化试验。

挑取纯化后的内生菌株单菌落接种于营养肉汤培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 18 h。4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 后取沉淀菌体, 按照 TIANamp Bacteria DNA Kit 操作步骤提取甘草内生细菌的 DNA。采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACG ACTT-3') 进行扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA (10 ng/ μ L) 1.0 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。采用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物扩增检验, 出现条带为 1 500 bp 左右的产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将菌株测序结果在 EzBioCloud 数据库 (<https://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)中与模式菌株序列进行比对。将相似度较高的菌株序列下载, 采用 MEGA 7.0 软件的邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 确定分离菌株的物种分类信息。

采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取沉淀菌体基因组 DNA。使用 1%的琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度。DNA 样品检测合格后, 用干冰运输至天津诺禾致源生物信息科技有限公司进行全基因组测序。

1.5 基因组组分分析

使用 Unicycler 软件 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>)^[17]将菌株二代+三代数据进行基因组组装, 将染色体与质粒序列筛分, 并组

装染色体序列。通过 GeneMarkS^[18] 软件 (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>) 对基因组的编码基因进行预测; 通过 RepeatMasker 软件进行散在重复序列预测, 采用串联重复序列查找工具 (tandem repeats finder, TRF) 查找 DNA 序列中的串联重复序列; 通过 tRNAscan-SE、rRNAmmer 软件分别对 tRNA 与 rRNA 进行预测; sRNA 首先在 Rfam 数据库进行比对注释, 接着用 cmsearch 程序确定最终的 sRNA。

1.6 基因组功能注释

利用 BLASTp、Diamond 序列比对工具将预测基因的蛋白质序列在 gene ontology (GO)、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)、COG、carbohydrate-active enzymes database (CAZy) 等数据库进行比对, 获得功能注释信息。针对菌株的组装基因组序列与编码基因的预测结果, 使用 Circos 软件绘制基因组环形图谱。

1.7 β -葡萄糖苷酶产酶曲线和酶活性测定

将菌株发酵液接种于产酶基础培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床培养 36 h, 每 6 h 取一次样测菌株 OD_{600} 并绘制生长曲线。

将每 6 h 所取的培养发酵液 4 °C、8 000×g 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。按照 β -葡萄糖苷酶试剂盒(微量法)说明书测定菌株的胞外 β -葡萄糖苷酶的酶活, 绘制产酶曲线。

β -葡萄糖苷酶的酶活定义: 在 37 °C 条件下, 每分钟产生 1 nmol 对硝基苯酚需要的酶量定义为 1 个酶活性单位 U。

1.8 产 β -葡萄糖苷酶的优化

将菌株按不同条件分别接种于产酶基础培养基, 改变碳源种类(2%麦芽糖、2%葡萄糖、2%蔗糖、2%甘露醇和 2%可溶性淀粉)、碳源添加量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和 2.5%)、氮源种类(1%牛肉膏、1%蛋白胨、1%酵母浸粉、

1%硫酸铵、1%尿素和 1%玉米粉)、氮源添加量(0.5%、1.0%、3.0%、5.0%和 7.0%)、接种量(1%、3%、5%、7%和 9%)、温度(27、32、37、42 和 47 °C)和起始 pH (3.0、4.5、6.0、7.5 和 9.0)对菌株进行发酵培养, 并测定上清液中 β -葡萄糖苷酶的酶活性, 对菌株的产酶条件进行优化。

2 结果与分析

2.1 产 β -葡萄糖苷酶菌株的分离

利用七叶苷与柠檬酸铁的显色反应, 将分离纯化得到的甘草内生菌接种到七叶苷平板上, 如图 1 所示, 观察到菌落周围培养基颜色变为棕黑色, 即认为该菌株能产 β -葡萄糖苷酶, 并编号为 A78.1。

2.2 菌株鉴定结果

产酶变色的菌株在 NA 平板上呈微黄白色、表面干燥有褶皱和边缘不规则的圆形菌落(图 2A); 通过革兰氏染色发现该菌株为阳性、梭状杆菌(图 2B); 初步鉴定为芽孢杆菌属; 利用 16S rRNA 基因扩增测序对菌株进行种属鉴定, PCR 产物片段的长度约为 1 500 bp(图 2C)。



图 1 七叶苷固体培养基分析菌株 A78.1 产 β -葡萄糖苷酶

Figure 1 Analysis of strain A78.1 producing β -glucosidase in esculin solid medium.

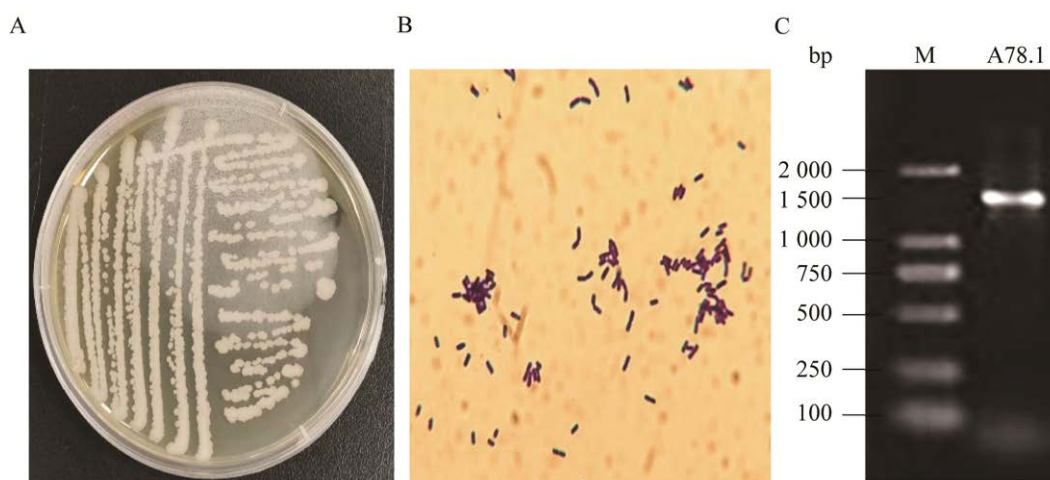


图2 菌株 A78.1 的菌落形态(A)、革兰氏染色(B)及种属鉴定(C) A: 菌落形态. B: 革兰氏染色镜检图(放大倍数 1 000×, 油镜). C: PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图(M: 100 bp 梯级 DNA 分子量标志物; A78.1: 靶 DNA 扩增片段约 1 500 bp)

Figure 2 The colony morphology (A) and Gram staining (B) and species identification results (C) of strain A78.1. A: Colonial morphology. B: Gram staining microscopy (1 000×, oil bath). C: Electrophoresis of PCR products (M: 100 bp ladder DNA molecular weight Marker; A78.1: Target DNA amplification fragment about 1 500 bp).

菌株 A78.1 的 14 项生理生化试验结果见表 1。由表 1 可知, 菌株 A78.1 革兰氏阳性、产芽孢, 接触酶试验、10% NaCl 生长、淀粉水解、甲基红反应、V-P 试验、明胶液化、七叶苷显色和硝酸盐还原反应均呈阳性, 而溶血性呈阴性, 同时菌株 A78.1 最适温度为 37.0 °C, 最适 pH 值为 7.0–8.0 之间。

将测序结果在 EzBioCloud 中与同芽孢杆菌属的模式菌株进行比对, 结果如图 3 所示, 发现菌株 A78.1 与 *Bacillus rugosus* SPB7 (JABUXO010000041) 在同一进化分支上, 表明两菌株间的亲缘关系最相近。另外, 结合形态观察和生理生化结果分析, 确定将该分离株命名为 *Bacillus rugosus* A78.1。

2.3 基因组概况分析

采用 NanoPore PromethION 平台和 Illumina NovaSeq PE150 平台相结合的测序技术, 对菌株 A78.1 的全基因组进行测序。菌株 A78.1 全基

表 1 菌株 A78.1 的生理生化指标鉴定

Table 1 Identification of physiological and biochemical indicators of strain A78.1

项目 Items	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+
产芽孢	+
Whether to produce budding spores or not	
接触酶 Contact enzymes	+
最适温度 Optimum temperature (°C)	37.0
最适 pH Optimum pH	7.0–8.0
10% NaCl	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
甲基化反应 Methyl red reaction	+
V-P 试验 V-P test	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
七叶苷显色	+
Esculin sesquihydrate color development reaction	
溶血性 Hemolysis	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

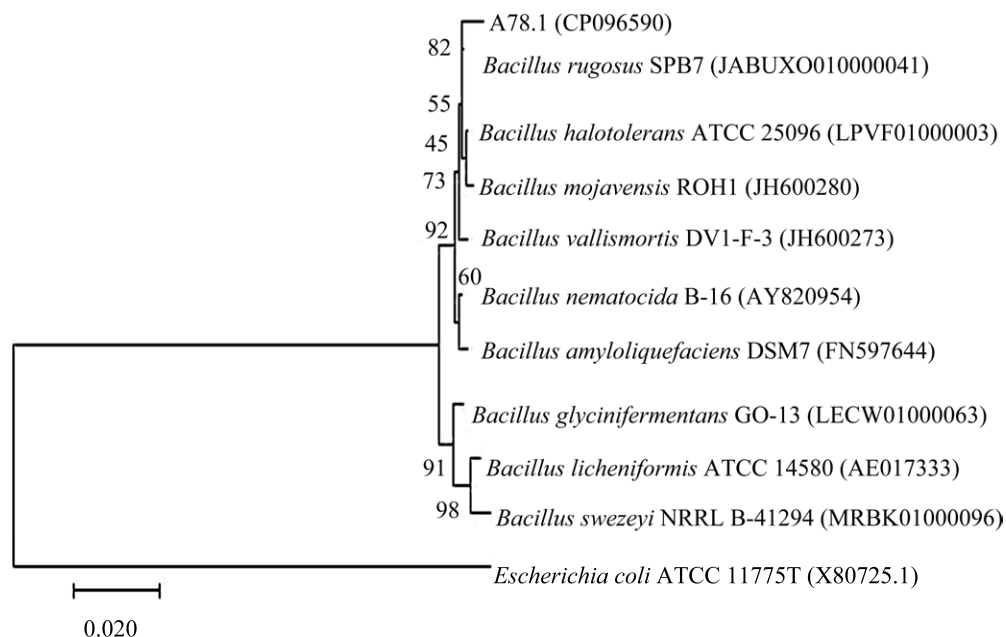


图3 菌株 A78.1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号;分支处数字表示 bootstrap 的支持率;标尺刻度 0.020 表示序列进化分支差异

Figure 3 Phylogenetic tree of strain A78.1 based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession number are set in parentheses; The branch number indicates the bootstrap support rate; Scale 0.020 represents sequence evolutionary branching differences.

基因组大小为 4 146 938 bp, G+C 含量为 43.86%。预测编码基因 4 255 个, 所有编码基因的总长度为 3 696 324 bp, 编码基因的平均长度为 869 bp, 编码区总长度占全基因组的 89.13%。预测到散在重复序列 301 个, 串联重复序列 78 个。含有 tRNA 基因 87 个, 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA 基因各 10 个。菌株 A78.1 基因组测序数据提交至 NCBI, GenBank 登录号为 CP096590, 菌株 A78.1 基因组图见图 4。

2.4 基因组功能注释

2.4.1 GO 数据库注释

Bacillus rugosus A78.1 中共有 2 896 个基因在 GO 数据库获得注释, 结果见图 5。注释结果分为分子功能(molecular function)、细胞组

分(cellular component)和生物过程(biological process)三个部分, 分子功能、细胞组分和生物过程分别有 10、13 和 25 个功能分类。在分子功能中, 主要功能是催化活性(catalytic activity)和结合(binding), 分别占比 38.54%和 32.03%。在细胞组分中, 主要功能是细胞部分(cell part)和细胞(cell), 分别占比 26.67%。在生物过程中, 主要注释到的功能是生物过程调节(regulation of biological process)、代谢过程(metabolic process)、定位(localization)、定位建立(establishment of localization)、细胞过程(cellular process)和生物调节(biological regulation), 分别占比 12.48%、39.95%、14.81%、14.12%、39.25%和 13.93%。

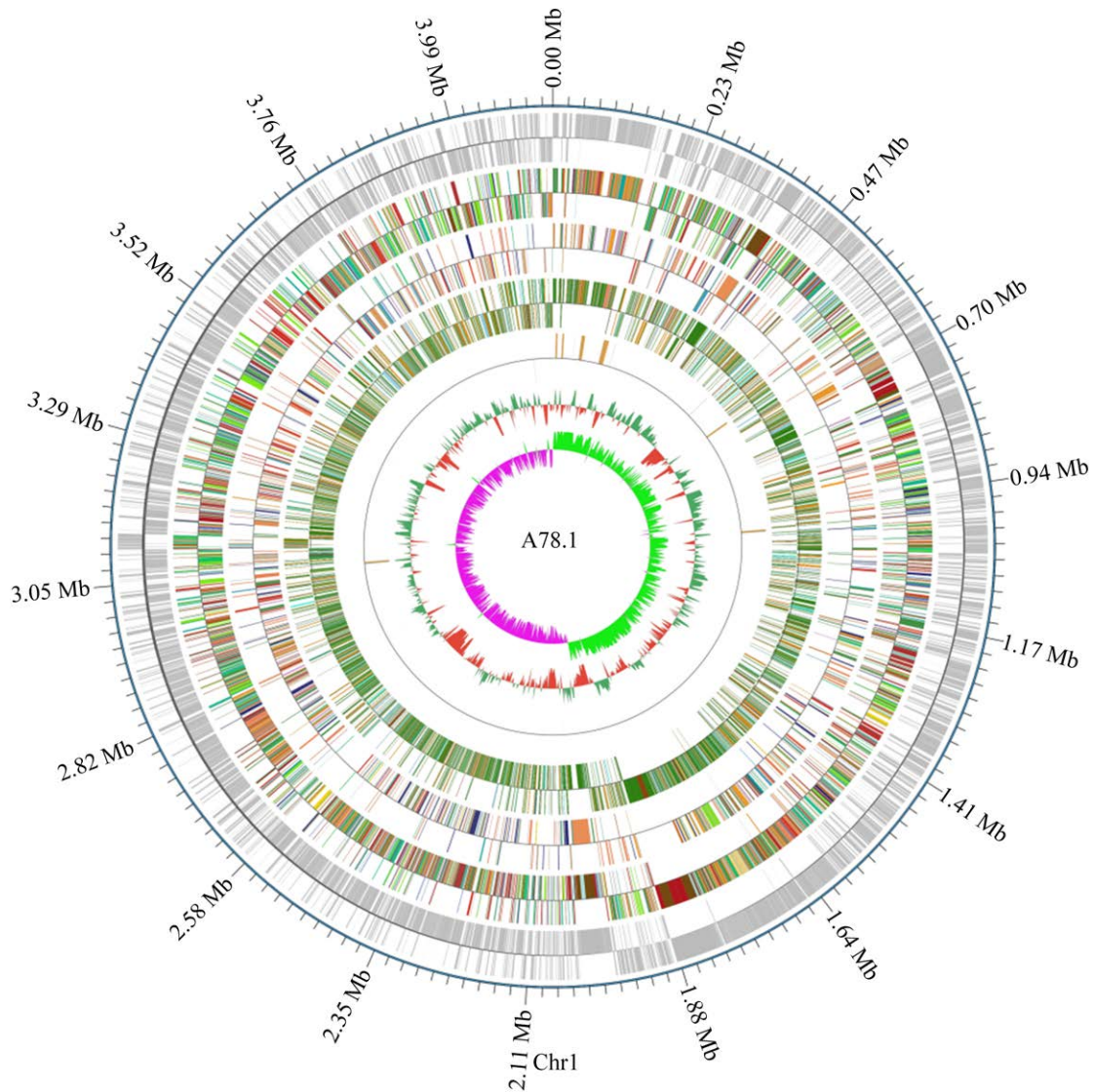


图4 菌株 A78.1 基因组图谱 图片最外圈是基因组序列位置坐标, 从外到内分别表示编码基因与功能基因注释结果的分布图

Figure 4 Genomic map of the strain A78.1. The outermost circle of the picture is the position coordinates of the genome sequence, showing the distribution of annotation results for coding gene and functional genes from outside to inside.

2.4.2 KEGG 与 COG 数据库注释

对菌株 A78.1 的 KEGG 代谢途径基因进行注释, 结果如图 6 所示, 共注释到 4 019 个编码 KEGG 代谢通路的基因, 占基因组的 94.45%, 被分为六大类。未被明确注释的基因有 236 个。细胞过程(cellular processes)相关通路基因占基

因组的 3.71%; 环境信息处理(environmental information processing)相关通路基因占基因组的 7.36%; 遗传信息处理(genetic information processing)相关通路基因占基因组的 4.35%; 人类疾病(human diseases)相关通路基因占基因组的 2.04%; 代谢(metabolism)相关通路基因占基

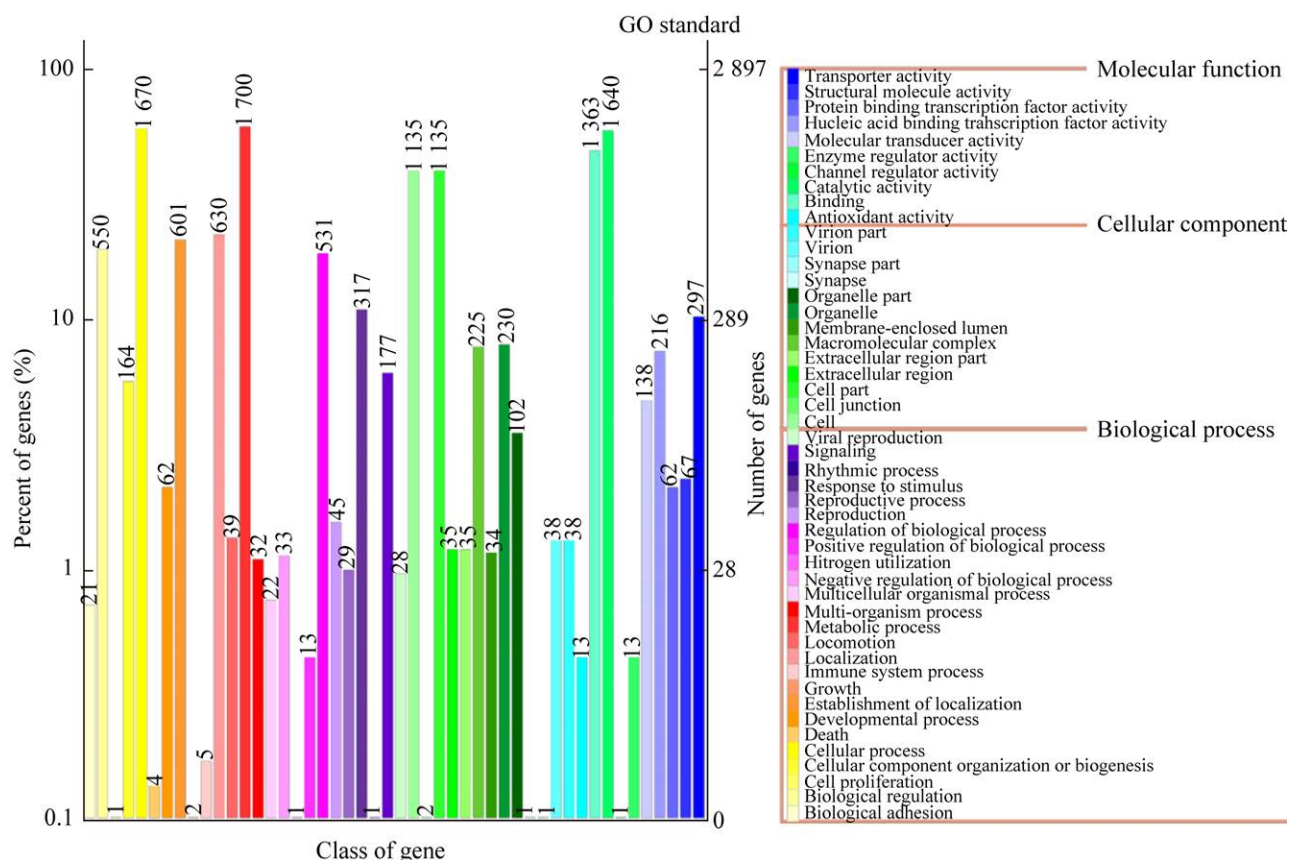


图 5 菌株 A78.1 的 GO 功能基因注释分类

Figure 5 GO functional gene annotation classification of the strain A78.1.

因组的 42.51%，其中全球概览图(global and overview maps)通路基因数在代谢(metabolism)相关通路最多，其次是碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)通路基因数，分别在代谢(metabolism)相关通路占比 16.70%和 6.72%。生物系统(organismal systems)相关通路基因占基因组的 1.01%。

菌株 A78.1 基因组注释的蛋白质序列在 COG 数据库比对分析，预测其相关蛋白的基因功能，注释结果如图 7 所示，共注释到 3 657 个 COG 功能基因，分为 24 类。其中基因注释最丰富的三类分别是参与转录(transcription)的功能基因 318 个，氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)功能基因 313 个，碳水

化合物转运和代谢(carbohydrate transport and metabolism)功能基因 304 个，分别占注释基因的 8.70%、8.56%和 8.31%。

2.4.3 CAZy 数据库注释

通过将菌株 A78.1 的蛋白质序列与 CAZy 数据库比对，共注释到 192 个碳水化合物酶类家族基因。结果如图 8 所示，共注释到 2 个氧化还原酶(auxiliary activities, AA)基因、50 个碳水化合物结合组件(carbohydrate-binding modules, CBM)、16 个糖酯酶(carbohydrate esterases, CE)基因、77 个糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)基因、40 个糖基转移酶(glycosyl transferases, GT)基因和 7 个多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PL)基因。为了从遗传水平阐明 *Bacillus rugosus*

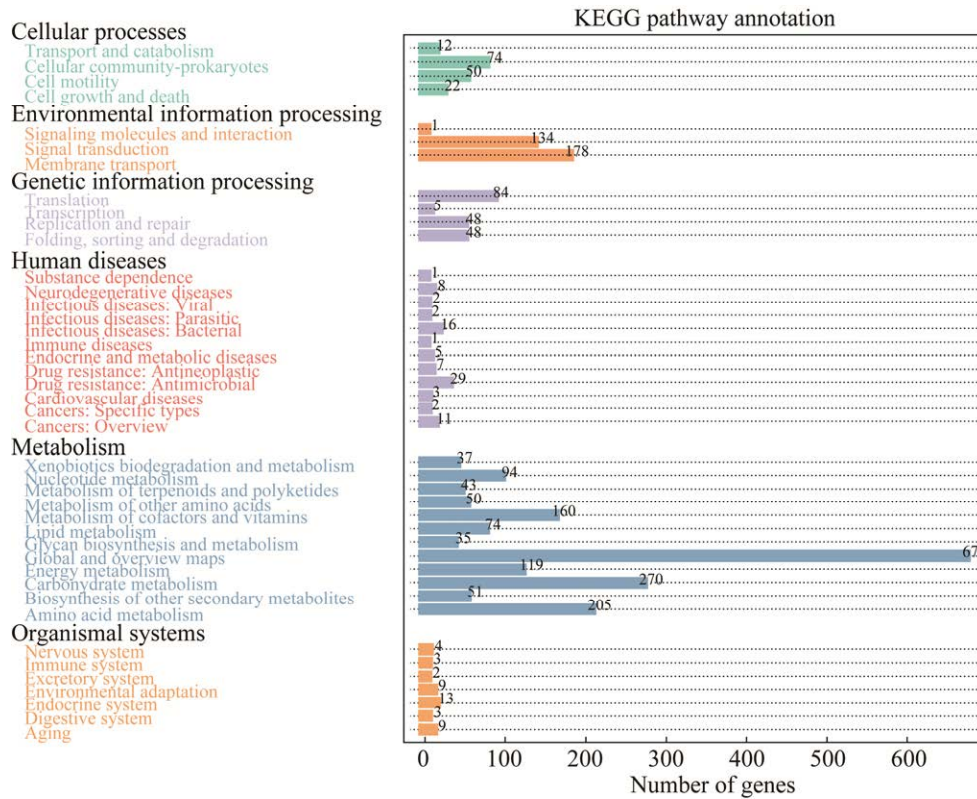


图 6 菌株 A78.1 的 KEGG 数据库注释结果

Figure 6 The annotation results of KEGG database of the strain A78.1.

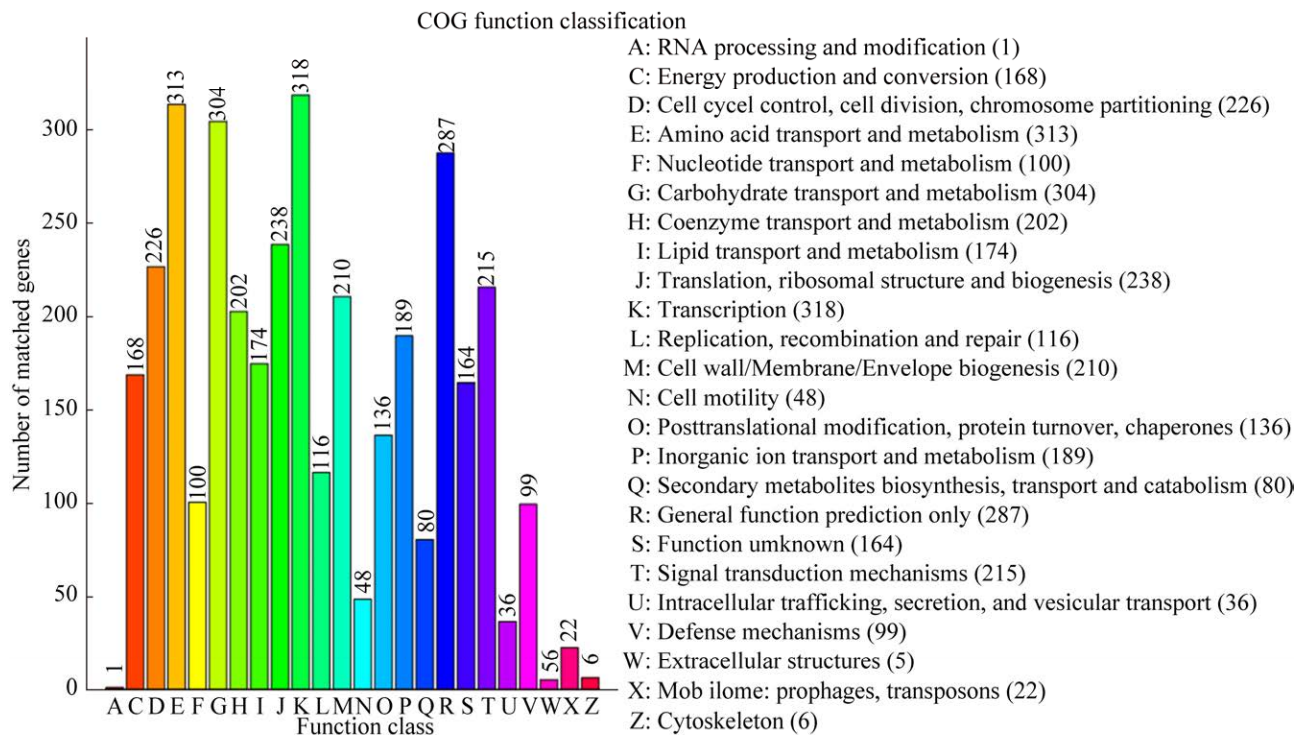


图 7 菌株 A78.1 的 COG 功能基因分类结果

Figure 7 The classification results of COG functional genes of the strain A78.1.

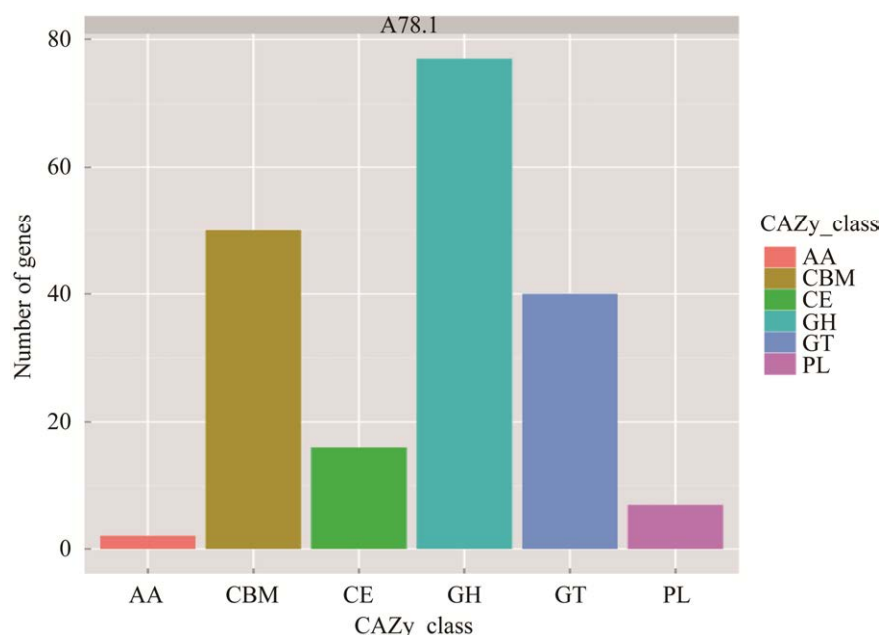


图 8 菌株 A78.1 的 CAZy 功能基因分类结果 AA: 氧化还原酶家族基因; CBM: 碳水化合物结合组件; CE: 糖酯酶家族基因; GH: 糖苷水解酶家族基因; GT: 糖基转移酶家族基因; PL: 多糖裂解酶家族基因

Figure 8 The classification results of CAZy functional genes of the strain A78.1. AA: Auxiliary activities; CBM: Carbohydrate-binding modules; CE: Carbohydrate esterases; GH: Glycoside hydrolases; GT: Glycosyl transferases; PL: Polysaccharide lyases.

A78.1 在产 β -葡萄糖苷酶的能力, 本研究分析了有关 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列基因(COG2723), 共注释到 10 个(A78.1_GM000131、A78.1_GM000366、A78.1_GM000622、A78.1_GM002168、A78.1_GM003664、A78.1_GM004027、A78.1_GM004051、A78.1_GM004140、A78.1_GM000185 和 A78.1_GM001336)基因, 其中前 8 种属于 GH1 家族基因, 后 2 种属于 GH3 家族基因, 均属于碳水化合物转运和代谢类, 表明该菌株在纤维素和糖苷等碳水化合物降解方面具有一定的遗传基础和应用潜力。

2.5 生长曲线与酶活变化曲线

接种菌株 A78.1 于液体培养基中, 在 37 °C、180 r/min 培养 36 h, 每隔 6 h 检测发酵液的 OD_{600} 和 β -葡萄糖苷酶活性。结果如图 9 所

示, 0–12 h 为菌株 A78.1 的对数生长期, 在该时期细菌生物量迅速增加, 相应的酶活也在逐步升高; 12–18 h 细菌生长较为缓慢, 处于生长平台期, 酶活保持缓慢上升; 在 18 h 之后, 该菌生物量开始下降, 可以判断为衰亡期。在 24 h 时, 酶活达到最大值为 2.38 U/mL, 此后酶活开始下降。

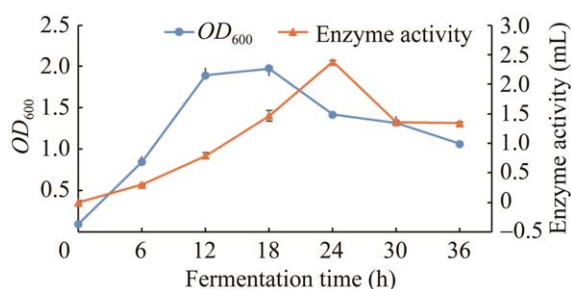


图 9 发酵时间对菌株 A78.1 生长和产酶的影响
Figure 9 Effect of fermentation time on the growth and enzyme production of the strain A78.1.

2.6 菌株 A78.1 产 β -葡萄糖苷酶的优化结果

分别在产酶基础培养基中用麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇和可溶性淀粉作为碳源,保持其他条件不变,在 37 °C、180 r/min 条件下培养 24 h,取发酵液测定酶活性,由图 10A 可以看出,葡萄糖是菌株发酵产 β -葡萄糖苷酶的最佳碳源。图 10B 表明,以葡萄糖为碳源,分别按 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和 2.5%的添加量培养,随着碳源添加量的增加,菌株产酶能力显著下降,即 0.5%葡萄糖为最佳碳源添加量。

选择六种不同的氮源探究对菌株 A78.1 产酶的影响。由图 10C 可知,有机氮源比无机氮源有利于菌株产 β -葡萄糖苷酶。其中以酵母浸粉为氮源时产酶最高,牛肉膏次之,因此后续试验选择酵母浸粉作为氮源。由图 10D 可知,添加 1.0%酵母浸粉作为氮源时的酶活性最高。

接种量也会影响菌株的产酶量,由图 10E 可知,菌株 A78.1 的最佳接种量是 3%,接种量不足或过量都会降低 β -葡萄糖苷酶的产酶量。

由图 10F 可知,当培养温度在 27–37 °C 时,

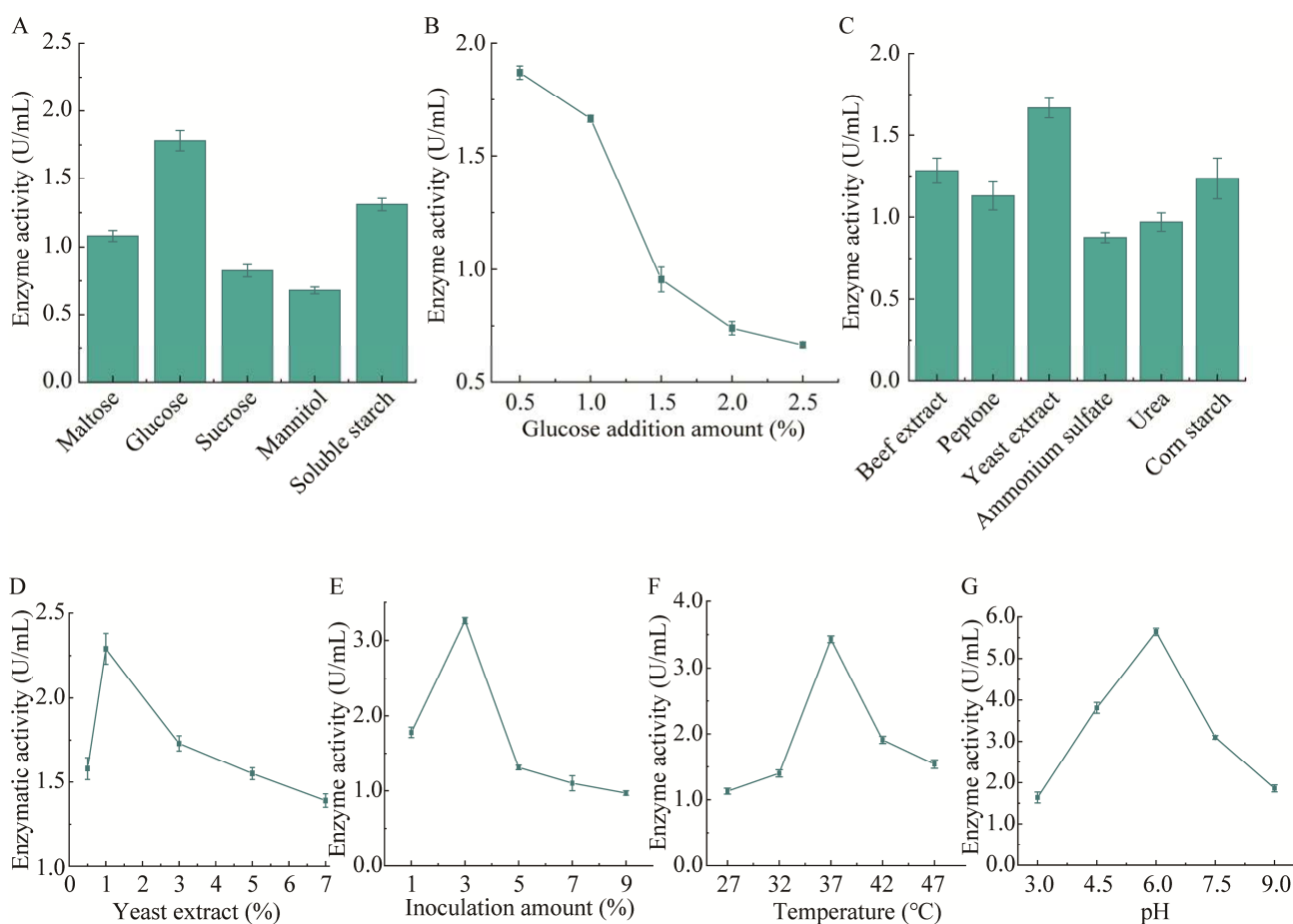


图 10 菌株 A78.1 的 β -葡萄糖苷酶活性与产酶优化 A: 碳源. B: 葡萄糖添加量. C: 氮源. D: 酵母浸粉添加量. E: 接种量. F: 温度. G: pH

Figure 10 β -glucosidase activity and enzyme production optimization of strain A78.1. A: Carbon sources. B: Glucose addition amount. C: Nitrogen source. D: Yeast extract addition amount. E: Inoculation amount. F: Temperature. G: pH.

发酵液中的产 β -葡萄糖苷酶活力随温度升高而增大。当菌株培养温度高于 37 °C 时, 酶活力迅速下降, 因此选择 37 °C 作为最佳产酶温度。

起始 pH 值对菌株 A78.1 产 β -葡萄糖苷酶活性也有重要的影响。由图 11G 可知, pH 值较低时, 菌株 A78.1 生长代谢缓慢, 严重影响了菌株产酶; 当 pH 值逐渐增大时, 菌株 A78.1 产酶的活力随之升高, pH 值为 6.0 时酶活力最高, 为 (5.640±0.085) U/mL; 当 pH>6.0, 随着 pH 值继续升高时, 菌株 A78.1 产酶活力呈现下降趋势。

3 讨论

甘草类黄酮化合物主要以糖苷形式存在, 作为一类大分子物质, 黄酮糖苷在人体内不能透过小肠壁进入血液, 需转化成苷元才能被吸收利用, 即黄酮苷元是主要生理活性形式。内生菌不仅能够参与植物次生成分的合成, 还可对植物次生代谢产物进行转化。 β -葡萄糖苷酶资源的挖掘已经取得了一定的进展, 其不仅在纤维素降解中起关键作用^[3], 还可以用于制备黄酮和异黄酮苷元以提高化合物的生物活性及保健功能^[19-20]。

微生物来源的 β -葡萄糖苷酶具有巨大的开发价值, 因为产酶来源丰富、成本低、较高的特异性、容易获得高纯度的酶制剂^[21]。目前, 产 β -葡萄糖苷酶菌株来源主要有霉菌, 如曲霉、青霉和木霉, 还有酵母菌和乳酸杆菌等。目前, 对芽孢杆菌属的相关研究较少^[22]。酵母菌、乳酸杆菌产 β -葡萄糖苷酶的酶活较低; 真菌产 β -葡萄糖苷酶的酶活相对较高, 但发酵周期较长^[23]; 芽孢杆菌具有其他菌属不具备的生产上和应用上的优势, 如培养周期短、适应能力强, 有利于进行工业生产^[24]。本研究从甘草内部分离一株内生细菌, 通过七叶苷平板初筛和酶活复筛确定该菌株产 β -葡萄糖苷酶。经生

理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析, 发现该菌株与 *Bacillus rugosus* SPB7^[25] 亲缘关系最近, 鉴定为 *Bacillus rugosus* A78.1。另外, 本研究菌株分离自甘草须根内部, 甘草质地坚硬、木质纤维多^[26], 植物内生菌需要合成大量的纤维素酶等水解酶才能侵入甘草组织内部^[8]。因此, 植物内生菌被认为是高产 β -葡萄糖苷酶菌株的潜在来源。

此前有研究分离筛选甘草内生菌及其产酶情况, 但鲜见对甘草内生菌全基因组进行测序的研究。本研究为了深入研究乌拉尔甘草内生菌 *Bacillus rugosus* A78.1 潜在的益生功能和相关分子机制, 采用二代+三代测序技术对菌株 A78.1 进行全基因组测序及生物信息学分析。本研究菌株 *Bacillus rugosus* A78.1 基因组由一条环状染色体组成; GO 注释结果显示, 主要富集在代谢过程、催化活性、细胞组分和生物合成方面, 表示该菌具有良好的代谢及催化合成能力。KEGG 和 COG 数据库的注释结果一致表明, *Bacillus rugosus* A78.1 基因组中含有丰富的碳水化合物代谢和氨基酸代谢基因, 说明其在碳水化合物和蛋白质合成与降解方面具有较强的应用潜力。在 CAZy 注释结果中, GH 家族基因为主要注释基因, 这与上述结果一致。GH 家族中 GH1、GH8 和 GH9 等家族编码纤维素酶, GH5、GH7 和 GH12 等家族主要编码内切葡聚糖酶, 而 β -葡萄糖苷酶为 GH1、GH2、GH3、GH5、GH9、GH30 和 GH116 家族。大多研究报告, 真菌 β -葡萄糖苷酶是细胞外的, 属于 GH3 家族, 而细菌 β -葡萄糖苷酶是细胞内的, 属于 GH1 家族^[27]。GH1、GH3 家族主要与 β -葡萄糖苷酶相关, 它们共同参与了纤维素的降解^[28]。菌株 A78.1 有 10 个 β -葡萄糖苷酶相关基因, 其中 8 个属于 GH1 家族, 2 个属于 GH3 家族。进一步证明 *Bacillus rugosus* A78.1 产 β -葡萄糖苷酶, 具有将大分子物

质类黄酮化合物转化成甘草苷的潜力。

β -葡萄糖苷酶因其广泛的生物学功能，在生产实践各领域中广泛应用。但目前生产 β -葡萄糖苷酶依然面临着酶活性低、产量不高等问题。刘宏丽等^[22]从獭兔新鲜粪样中筛选获得一株产 β -葡萄糖苷酶的芽孢杆菌菌株，其酶活达 0.283 U/mL。于平等^[29]从土壤中获得一株 β -葡萄糖苷酶活性最高的菌株，经鉴定该菌株为蜡状芽孢杆菌，其酶活为 0.46 U/mL。冯伦元等^[30]从豆豉中分离筛选出具有高水解酶活银杏黄酮苷的产 β -葡萄糖苷酶菌株 GUXN01，其 β -葡萄糖苷酶活力为 4.022 U/g。相较于前人在动物粪便、土壤和豆制品等方面的研究，本试验通过单因素的产酶优化，*Bacillus rugosus* A78.1 产酶的培养基最佳碳、氮源分别为 0.5%葡萄糖、1.0%酵母浸粉，最佳培养条件为温度 37 °C、3%接种量、pH 6.0。在此条件下，*Bacillus rugosus* A78.1 上清液中最高 β -葡萄糖苷酶活力可达到 (5.640±0.085) U/mL。本试验菌株在同属芽孢杆菌中产酶活力属于中上等。由此可见，*Bacillus rugosus* A78.1 作为一株细菌，其产 β -葡萄糖苷酶能力具有一定的开发利用的价值。

4 结论

综上，本研究从甘草须根部分离的一株 *Bacillus rugosus* A78.1，经过发酵培养条件优化，证实该菌株具有较强的产 β -葡萄糖苷酶的能力。同时，为了进一步挖掘产酶基因和潜在益生价值，对菌株 A78.1 进行全基因组测序分析。结果表明，该菌株含有大量糖苷水解酶、碳水化合物代谢和氨基酸代谢相关的基因，说明菌株 A78.1 在糖苷水解、碳水化合物降解相关领域具有应用潜力，为菌株的开发提供了应用基础。此外，对该菌产酶条件优化研究及应用开发提供试验依据。

REFERENCES

- [1] 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 胡洋, 刘俊梅, 薛艳杰, 于寒松. 微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 329-335.
ZHANG YY, SU M, PIAO CH, HU Y, LIU JM, XUE YJ, YU HS. Progress on the β -glucosidase from microorganisms and its applications in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 329-335 (in Chinese).
- [2] HUANG C, FENG Y, PATEL G, XU XQ, QIAN J, LIU Q, KAI GY. Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 177: 437-446.
- [3] 刘晓柱, 张远林, 黎华, 李银凤, 于志海, 刘晓辉, 黄名正. β -葡萄糖苷酶在酒类酿造中研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(6): 8-12.
LIU XZ, ZHANG YL, LI H, LI YF, YU ZH, LIU XH, HUANG MZ. Research progress on β -glucosidase in alcoholic drink-brewing[J]. China Brewing, 2020, 39(6): 8-12 (in Chinese).
- [4] 王晨, 李家儒. 植物 β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(2): 101-109.
WANG C, LI JR. Research progress of plant β -glucosidase[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2021, 43(2): 101-109 (in Chinese).
- [5] AGRAWAL R, VERMA AK, SATLEWAL A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33: 472-482.
- [6] BATRA P, SHARMA AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives[J]. 3 Biotech, 2013, 3(6): 439-459.
- [7] 张昊, 刘苗苗, 刘晓娜, 李宗谕, 赵丽丽, 杨清香. 内生菌影响药用植物产生药理活性化合物的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(8): 41-51.
ZHANG H, LIU MM, LIU XN, LI ZY, ZHAO LL, YANG QX. Impact of endophytic microorganisms on the pharmaco-active compounds production in medicinal plants: a review[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 41-51 (in Chinese).
- [8] 梁金凤, 汪涯, 肖依文, 常军, 季波, 朱笃. 内生真菌 *Eupenicillium javanicum* R57 水解京尼平苷 β -葡萄糖苷酶分离纯化及其酶学性质[J]. 菌物学报, 2017, 36(11): 1543-1555.
LIANG JF, WANG Y, XIAO YW, CHANG J, JI B,

- ZHU D. Purification and characterization of geniposide-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic *Eupenicillium javanicum* R57 harboring in Dongxiang wild rice[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(11): 1543-1555 (in Chinese).
- [9] CHENG MZ, ZHANG JQ, YANG L, SHEN SJ, LI P, YAO S, QU H, LI JY, YAO CL, WEI WL, GUO DA. Recent advances in chemical analysis of licorice (Gan-Cao)[J]. *Fitoterapia*, 2021, 149: 104803.
- [10] 杨悦, 刘鸣畅, 杨艳歌, 吴亚君. 甘草提取物的生物功能评价及相关质量标志物预测[J]. *沈阳农业大学学报*, 2023, 54(1): 72-80.
- YANG Y, LIU MC, YANG YG, WU YJ. Evaluation of biological function of licorice extracts and prediction of related quality markers[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2023, 54(1): 72-80 (in Chinese).
- [11] 王全, 李红亚, 李术娜, 王会, 朱宝成. 产 β -葡萄糖苷酶芽孢杆菌 Z-1 的筛选、鉴定及其酶学特性研究[J]. *饲料工业*, 2016, 37(8): 49-54.
- WANG Q, LI HY, LI SN, WANG H, ZHU BC. Screening and identification of *Bacillus* Z-1 of producing β -glucosidase and study of its enzymatic properties[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(8): 49-54 (in Chinese).
- [12] 杜晓宁. 宁夏枸杞可培养内生菌的多样性及其生物活性研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2016.
- DU XN. Diversity and biological activity of endophytes isolated from *Lycium barbarum* of Ningxia[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2016 (in Chinese).
- [13] ZHANG JY, LIU YX, GUO XX, QIN Y, GARRIDO-OTER R, SCHULZE-LEFERT P, BAI Y. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 988-1012.
- [14] 刘文静, 程晗, 陈崇艺, 柴春月, 田龙, 周索. 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(23): 43-49.
- LIU WJ, CHENG H, CHEN CY, CHAI CY, TIAN L, ZHOU S. Screening of β -glucosidase producing strains and optimization of enzyme production conditions[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(23): 43-49 (in Chinese).
- [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册: 第八版[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Translated by the Translation Group of the *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed.[M]. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [17] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [18] BESEMER J, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2607-2618.
- [19] 刘静波, 陈晶晶, 王二雷. 黄酮苷元类化合物制备技术及功能活性研究进展[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(10): 276-285.
- LIU JB, CHEN JJ, WANG EL. Research progress in preparation technologies and functional activities of flavonoid aglycone compounds[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(10): 276-285 (in Chinese).
- [20] XIE JC, XU H, JIANG JC, ZHANG N, YANG J, ZHAO J, WEI M. Characterization of a novel thermostable glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from the hyperthermophile *Ignisphaera aggregans* and its application in the efficient production of baohuoside I from icariin and total epimedii flavonoids[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 104: 104296.
- [21] 刘姜华. 微生物转化槐角苷制备染料木素的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2017.
- LIU JH. Production of genistein from sophoricoside by microbial transformation[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [22] 刘宏丽, 郭晓军, 狄聪颖, 郭威, 朱宝成. 产 β -葡萄糖苷酶芽孢杆菌的筛选及水解大豆异黄酮糖苷研究[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(6): 621-629.
- LIU HL, GUO XJ, DI CY, GUO W, ZHU BC. Screening of *Bacillus* strains producing β -glucosidase and study on hydrolysis of soybean isoflavone glycosides[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2017, 37(6): 621-629 (in Chinese).
- [23] 周林芳, 江波, 张涛, 李淑华. 糖苷水解酶第3家族 β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017,

- 38(14): 330-335.
- ZHOU LF, JIANG B, ZHANG T, LI SH. Research progress of β -glucosidases of glycoside hydrolase family 3[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 330-335 (in Chinese).
- [24] AHMED A, ASLAM M, ASHRAF M, UL-HASSAN NASIM F, BATOOL K, BIBI A. Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications[J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2017, 5(2): 57-73.
- [25] BHATTACHARYA D, SANTOS VILLALOBOS S, RUIZ VV, SELVIN J, MUKHERJEE J. *Bacillus rugosus* sp. nov. producer of a diketopiperazine antimicrobial, isolated from marine sponge *Spongia officinalis* L[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(11): 1675-1687.
- [26] 赵妮. 甘肃野生与栽培甘草内生菌有效菌株发酵物与宿主及药效成分抑菌活性对比研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学硕士学位论文, 2016.
- ZHAO N. Comparative study on antimicrobial activity between the Gansu wild and cultivated licoc endophyte fermentation product and the host plant and its medicinal ingredient[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu University of Chinese Medicine, 2016 (in Chinese).
- [27] BHATIA Y, MISHRA S, BISARIA VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(4): 375-407.
- [28] van den BRINK J, de VRIES RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(6): 1477-1492.
- [29] 于平, 李鹏, 陈幸鸽, 徐真妮. 产中性耐热 β -葡萄糖苷酶芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 236-242.
- YU P, LI P, CHEN XG, XU ZN. Screening and identification of a neutral and heat-tolerant β -glucosidase-producing *Bacillus* strain[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(9): 236-242 (in Chinese).
- [30] 冯伦元, 何腊平, 李翠芹, 张宏文, 邢书奇, 陈翠翠. 贵州传统发酵豆制品中水解银杏黄酮苷的微生物 β -葡萄糖苷酶筛选[J]. 微生物学报, 2020, 60(2): 320-332.
- FENG LY, HE LP, LI CQ, ZHANG HW, XING SQ, CHEN CC. Screening of ginkgo-flavonoids-hydrolyzing microbial β -glucosidase from traditional fermented soybean in Guizhou[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(2): 320-332 (in Chinese).