

研究报告

白蚁肠道元基因组来源高温 β -葡萄糖苷酶 Bgl17 的酶学性质

刘晓静¹ 钱昌丽² 周志华² 黄勇平³ 李木旺^{1,4} 王倩^{3*} 王钱福^{2*}

(1. 江苏科技大学蚕业研究所 江苏 镇江 212018)

(2. 中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所 合成生物学重点实验室 上海 200032)

(3. 中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所 昆虫发育与进化生物学重点实验室 上海 200032)

(4. 中国农业科学院蚕业研究所 江苏 镇江 212018)

摘要:【目的】对短角球白蚁(*Globitermes brachycerastes*)肠道元基因组文库中筛选得到的一个新型 β -葡萄糖苷酶编码基因 *bgl17* 进行酶学性质研究。【方法】通过克隆与异源表达得到纯的 Bgl17 酶蛋白, 根据 Bgl17 对底物的水解活性测定其稳定性及动力学参数, 利用薄层层析确定其水解产物。【结果】该酶属于糖基水解酶第一家族(GHF1), 对其特异性底物 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPGlc)的最适反应温度为 70 °C, 最适 pH 为 5.0。在最适反应条件下, 该酶以 pNPGlc 为底物比活力为 115.69 U/mg, 以水杨苷为底物比活力为 297.39 U/mg。以 pNPGlc 为底物时, 其动力学参数 K_m 值和 V_{max} 分别为 0.81 mmol/L 和 227.27 μ mol/(mL·min)。在稳定性方面, 该酶在 50 °C 处理 1 h 仍可保持 50% 的活性, 在 pH 5.0 和 6.0 条件下, 该酶的半衰期为 1 h。【结论】该酶在较高的温度下具有较高的活性, 且对水杨苷水解活性高, 这点不同于已知的 β -葡萄糖苷酶, 推测其更有利于木质纤维素复杂结构的降解; 该酶的最适温度远高于白蚁生存环境温度, 可为研究白蚁降解纤维素的机理提供参考。

关键词: 短角球白蚁肠道, 元基因组, β -葡萄糖苷酶, 糖基水解酶第一家族, 水杨苷

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300071, 31172153, 31472046); 上海自然科学基金项目(No. 13ZR1446600)

*通讯作者: 王倩: Tel: 86-21-54923028; 信箱: qianwang@ips.ac.cn

王钱福: Tel: 86-21-54921717; 信箱: qfwang01@sibs.ac.cn

收稿日期: 2015-02-06; 接受日期: 2015-04-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-21

Characterization of a β -glucosidase Bgl17 from a metagenomics library of termite gut

LIU Xiao-Jing¹ QIAN Chang-Li² ZHOU Zhi-Hua² HUANG Yong-Ping³
LI Mu-Wang^{1,4} WANG Qian^{3*} WANG Qian-Fu^{2*}

(1. Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

(2. Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai 200032, China)

(3. Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

(4. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract: [Objective] A novel β -glucosidase encoding gene *bgl17*, which was functional screened from a metagenomic library constructed from the gut of *Globitermes brachycastrus*, was expressed in *Escherichia coli* BL21 and its characteristic were studied. [Methods] The recombinant enzyme Bgl17 was purified, and the stability and kinetic were identified. And the hydrolysates were analyzed by thin layer chromatography. [Results] Bgl17 was belong to glycoside hydrolase family 1 (GH1), and the optimal temperature and pH of Bgl17 with p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPGlc) were 70 °C and 5.0, respectively. The specific activity of purified Bgl17 was 115.69 U/mg and 297.39 U/mg with pNPGlc and salicin as substrate, respectively. The K_m and V_{max} of Bgl17 were 0.81 mmol/L and 227.27 μ mol/(mL·min) with pNPGlc, respectively. Bgl17 can remain 50% activity at 50 °C for 1 hour and 50% residual activity was detected after 1 h at pH 5.0 and 6.0. [Conclusion] The β -glucosidase Bgl17 showed the high activity with salicin, which might be beneficial to the degradation of lignocellulose. It showed the potential for industrial applications because of high thermostability. The optimal temperature of Bgl17 was much higher than that of termites' living environment, which would contribute to the study of cellulose degradation mechanism of termites.

Keywords: *Globitermes brachycastrus* gut, Metagenomic, β -Glucosidase, Glycosyl hydrolase family 1, Salicin

木质纤维素是组成植物细胞壁的主要成分,是由纤维素、半纤维素和木质素组成的复杂结构^[1],其中纤维素是地球上含量最丰富的一类可再生资源^[2],每年经过光合作用产生的纤维素可达 10^{12} t,而约 90%未被利用^[3]。完整的纤维素酶体系主要包括内切葡聚糖酶(简称 EG, EC3.2.1.4)、纤维二糖水解酶(简称 CBH, EC3.2.1.91)和 β -葡萄糖苷酶(简称 BGL, EC3.2.1.21),纤维素在这些酶的共同作用下降解成葡萄糖。其中,作用于寡糖链直接生成葡萄糖的 β -葡萄糖苷酶是纤维素降解过程中的限速步骤^[4]。

白蚁主要以木质纤维素为食,是降解木质纤维素能力最强的生物系统之一^[5]。与一般昆虫相比,白蚁的后肠异常发达,约占全部肠道总容积的

4/5^[6],是木质纤维素降解的主要场所。在后肠中存在大量的共生生物,包括细菌、真菌及鞭毛虫、纤毛虫、变形虫等单细胞原生动植物,这些共生生物与白蚁内生酶类共同作用,协同完成对木质纤维素的降解^[7]。白蚁在木质纤维素的生物循环中发挥着重要的作用,白蚁纤维素酶的开发也被认为是大量转化和利用生物能源的重要途径之一^[1]。随着分子技术手段的不断进步,基于高通量基因测序的元基因组技术成为挖掘木质纤维素酶的有效工具,利用该技术已从兔子盲肠^[8]、土壤^[9]、白蚁肠道^[10]等多种样品中克隆得到了多个 β -葡萄糖苷酶基因,但是这些酶的最适反应温度多为中低温范围,而在工业应用上耐高温酶具有明显优势,所以仍需进一步挖掘适合工业应用的耐高温酶。

为进一步挖掘新的纤维素酶, 实验室在之前的研究中对短角球白蚁(*Globitermes brachycerastes*)的肠道微生物元基因组 Fosmid 文库进行了功能筛选, 筛选得到了一个耐热性较好的 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl17*, 本文进一步对该基因进行克隆与异源表达, 并对其活性、最适反应条件、稳定性等方面进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株及载体: 大肠杆菌 TOP10 和 BL21(DE3) 分别作为克隆宿主和表达宿主, 载体 pET-28a(+) 为表达载体, 均购自 Novagen (美国) 公司。

1.1.2 试剂: 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPGlc)、4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (pNPGal)、纤维二糖、纤维三糖、4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷 (pNPCel)、水杨苷、4-硝基苯基- β -D-木糖苷 (pNPXyl)、微晶纤维素 (Avicel) 均购自 Sigma 公司。

1.1.3 培养基: LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 固体培养基加 1.5%–2.0% 的琼脂。

1.2 Bgl17 的异源表达与纯化

以功能筛选得到的 Fosmid 质粒为模板, 设计引物扩增 *bgl17* 基因。所用正向引物为 5'-GGAATTCATATGGAAAACTTGTATTTCCCA-3', 反向引物为 5'-CGGAATTCCTATAACTCTCCGTATCC-3', 下划线部分为 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点。PCR 反应体系包括 10 \times Buffer for KOD-Plus 5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 1.5 μ L, 模板 1 μ L, 1 U/ μ L KOD-Plus 1 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L。扩增反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 80 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经两种内切酶双酶切后连接入同样酶切处理的 pET-28a(+) 表达载体中, 连接产物转化入大肠杆菌 TOP10, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定。阳性克隆提取质粒经测序验证, 正确的为重组质粒

pET-28a-*bgl17*。

将构建好的重组质粒转化入表达宿主 BL21(DE3) 中, 挑取单个菌落至含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。过夜培养的菌按 1:100 接种至新的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加诱导物 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 18 $^{\circ}$ C、110 r/min 诱导表达 20 h。表达结束后, 离心收集菌体, 重悬在 PBS 缓冲液 (Na₂HPO₄·12H₂O 5.541 g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.705 g/L, pH 7.4) 中, 超声破碎细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液即为粗酶液。

粗酶液使用 Ni-NTA (QIAGEN, 德国) 进行亲和层析纯化, 用不同咪唑浓度 20、40、60、100、200 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 进行洗脱, 收集 100 mmol/L 和 200 mmol/L 洗脱液。收集的洗脱液分别使用 VivaspinTM 超滤管超滤浓缩, 并多次添加 PBS 缓冲液以去除咪唑。浓缩后的蛋白液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 检测蛋白纯度, 并确定其分子量。利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 进行活性蛋白酶谱分析, 根据文献 [11] 报道的方法, 使用 4% 浓缩胶与 10% 分离胶进行电泳, 电泳结束后将凝胶浸泡在 4 mmol/L 的 4-甲基伞形酮酰- β -D-吡喃葡萄糖苷 (MUGlc) 溶液中、50 $^{\circ}$ C 下温育 30 min, 在紫外灯下观察活性蛋白分布情况, 用考马斯亮蓝 R250 染色, 观察蛋白条带。蛋白浓度使用改良型 Bradford 法蛋白浓度检测试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 测定。

1.3 Bgl17 的酶学性质分析

1.3.1 最适反应条件测定: 以 pNPGlc (20 mmol/L) 为底物测定 Bgl17 的 β -葡萄糖苷酶活性, 反应体系在文献 [12] 报道的基础上略作修改。反应最适 pH 的测定使用不同 pH 的乙酸盐 (pH 4.0–6.0)、磷酸盐 (pH 6.0–8.0) 和甘氨酸-NaOH (pH 8.0–10.0) 缓冲液, 将底物用不同 pH 缓冲液稀释为 4 mmol/L 备用, 纯化的酶液也用不同 pH 缓冲液进行适当稀释。取稀释后的酶液和底物各 50 μ L 混合均匀后 45 $^{\circ}$ C 反应

10 min,加入 100 μL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,用酶标仪测定其 405 nm 波长下吸光值,以不同浓度对硝基苯酚(pNP)制作标准曲线,计算酶活力单位,以得到酶活最高的 pH 条件为该酶的最适 pH 条件。实验以添加高温灭活的酶液进行反应作为空白对照,酶活测定均重复 3 次。确定 Bgl17 的最适 pH 值后,以该 pH 缓冲液稀释底物与酶液,在 30–80 $^\circ\text{C}$ 条件下分别测定酶活,以得到酶活最高的温度条件为该酶的最适温度。

酶活力单位(U)定义为每分钟催化硝基苯糖苷底物生成 1 μmol pNP 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.3.2 稳定性分析: 酶的热稳定性分析主要通过测定酶液在最适 pH 条件下经 50、60、70、80 $^\circ\text{C}$ 处理不同时间后残余的 β -葡萄糖苷酶活性。残余活性在最适反应条件下用 1.3.1 节方法测定,以未处理的酶液在最适反应条件下测定的残余活性为 100%。

酶的 pH 稳定性分析通过用不同 pH 缓冲液稀释酶液后,在 50 $^\circ\text{C}$ 温育不同时间,在最适 pH 条件下测定残余的 β -葡萄糖苷酶活性。

1.3.3 金属离子对酶活性的影响: 在反应体系中添加终浓度为 10 mmol/L 的各种金属离子化合物,在最适反应条件下测定酶活,确定不同的金属离子对酶活力的影响,以未添加的反应体系测得的酶活为 100%。

1.3.4 Bgl17 的底物特异性: 以 pNPGal、纤维二糖、pNPCel、水杨苷、pNPXyl、Avicel 等为底物来测定 Bgl17 的底物特异性,其中 pNPGal、pNPCel、pNPXyl 水解活性的测定方法在文献的基础上略作修改^[13],与 pNPGlc 基本相同。纤维二糖水解酶活性测定采用葡萄糖(GO)检测试剂盒(Sigma, 美国)。测定水杨苷水解活性采用 DNS 法^[14],测定反应结束后还原糖产量,以葡萄糖制作标准曲线,水杨苷底物反应终浓度为 1%,酶活单位(U)定义为每分钟催化底物产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。Avicel 水解活性使用底物终浓度为 2%,其余与水杨苷水解活性测定方法相同。

1.3.5 酶动力学参数测定: 以 pNPGlc 为底物,测定 Bgl17 在 0.1–1.0 mmol/L 不同底物浓度条件下的水解速率,根据米氏方程计算得到 Bgl17 的动力学参数。实验进行 3 次独立实验,取平均值,每次实验重复 3 次。

1.4 水解产物的薄层层析(TLC)分析

以 1%的纤维二糖为底物,分别取 0.01 U 和 2 U 的 Bgl17 在最适反应条件下进行反应,取不同时间的水解产物进行薄层层析分析,实验中使用的展层剂为异丙醇:乙酸乙酯:蒸馏水以体积比 3:3:1 的混合溶液,显色剂为 20%浓硫酸的甲醇溶液。将不同时间水解产物在硅胶板上点样,在层析槽中展层结束后,均匀喷洒显色剂,在 110 $^\circ\text{C}$ 烘箱中显色 10 min 观察结果^[15]。

2 结果与分析

2.1 Bgl17 基因的克隆和表达

通过对短角球白蚁肠道微生物进行基于 Fosmid 的元基因组文库功能筛选,从 5 万多个文库克隆中筛选到了大量的纤维素降解相关基因^[16]。从中筛选得到的 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl17* (GenBank 登录号: JN903693.1)编码由 444 个氨基酸组成的酶蛋白,该蛋白属于糖基水解酶第一家族,该酶与 *Sphaerochaeta globosa* 来源的 β -葡萄糖苷酶 (GenBank 登录号: WP_013606846.1)具有最高的相似性(59%)。

PCR 扩增 *bgl17* ORF,经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切后连接入表达载体 pET-28a(+),构建重组质粒 pET-28a-*bgl17*。重组质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中能够成功进行异源表达,通过 Ni 柱亲和和层析纯化,经过 SDS-PAGE 分析表明得到了 Bgl17 纯蛋白,蛋白分子量约为 55 kD (图 1A),与理论预测的分子量相同。非变性胶考染(图 1B)和活性染色(图 1C)显示纯化的 Bgl17 仅含一条目的条带,且活性状态下分子量约为 440 kD,表明该蛋白活性状态下以八聚体形式存在。目前发现的 β -葡萄糖苷酶中仅有少数拥有如此大的分子量,来源于

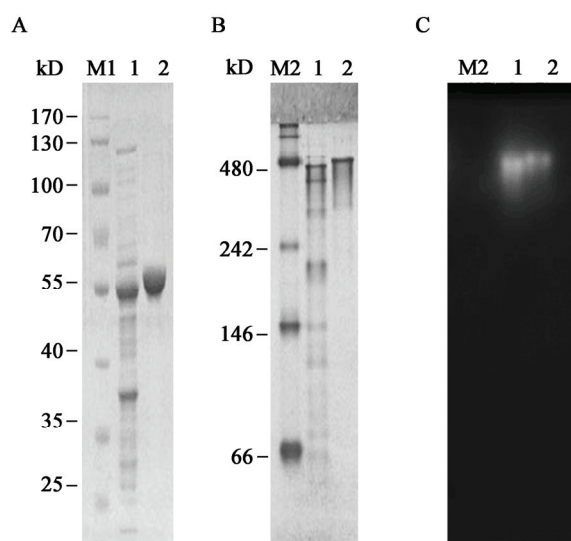


图 1 β -葡萄糖苷酶 Bgl17 的 SDS-PAGE (A)、Native-PAGE (B、C) 分析

Figure 1 SDS-PAGE (A) and Native-PAGE (B, C) analysis of β -glucosidase Bgl17

注: M1: 变性蛋白分子量标准; M2: 活性蛋白分子量标准; 1: 细胞裂解液可溶蛋白; 2: 200 mmol/L 咪唑洗脱液。

Note: M1: Denatured protein molecular weight marker; M2: Native protein molecular weight marker; 1: Soluble protein fractions expressed by *E. coli*; 2: 200 mmol/L imidazole elution.

Phoma sp. 的 β -葡萄糖苷酶活性状态下为分子量为 440 kD 的四聚体^[17], 来源于 *Botrydipodia theobromae* 的 β -葡萄糖苷酶活性分子量为 350–380 kD, 由 8 个 45–47 kD 的活性亚基组成, 每个活性亚基又由 4 个 10–12 kD 的无活性形式组成^[18]。Bgl17 的非变性胶与 MUGlc 的原位染色(图 1C)进一步证明该大分子量条带为具有糖苷水解酶活性的酶蛋白。纯化后的蛋白浓度为 1.67 g/L。

2.2 酶学性质测定

2.2.1 Bgl17 的最适反应条件及其稳定性: 以 pNPGlc 为底物, 测定 Bgl17 的最适反应条件表明: 其最适反应温度为 70 °C, 并且从 55 °C 到 70 °C 范围内均具有较高的活性(图 2A); 最适 pH 值为 5.0 (图 2B)。纯化后的 Bgl17 在最适条件下比活力为 115.69 U/mg。

该酶在 50 °C 条件下稳定性较好, 处理 1 h 仍可保持 50% 的活性, 随着温度的升高酶的稳定性下

降, 在 70 °C 时酶稳定性下降迅速, 处理 5 min 活性即降至 50% (图 2C)。在 pH 稳定性方面, Bgl17 在 pH 5.0 和 pH 6.0 的乙酸盐缓冲液中稳定性较好, 处理 1 h 仍可保持 50% 的活性, 而在 pH 4.0 条件下稳定性下降迅速, 处理 5 min 活性即下降到 40% (图 2D)。

2.2.2 金属离子对 Bgl17 β -葡萄糖苷酶活性的影响: 为研究酶促反应环境中金属离子对酶活性的影响, 实验通过向酶反应体系中添加不同的金属离子, 发现 Ni^+ 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 对酶的活性有一定的促进作用, 其中 Ba^{2+} 与 Al^{3+} 促进作用较明显, 但 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶的活性有非常显著的抑制作用, 添加之后酶的活性几乎全部丧失, Zn^{2+} 对酶活性也有较明显的抑制作用, Zn^{2+} 存在时, 酶的活性只剩下 40% (图 3)。

2.2.3 Bgl17 的底物特异性及其酶动力学分析: Bgl17 除了可以水解 pNPGlc 外, 还可以水解 pNPCel、pNPGal、pNPXyl、纤维二糖和水杨苷, 但不能水解 Avicel (表 1)。该结果表明 Bgl17 具有较宽的底物特异性, 能够水解多种底物, 属于多功能酶^[19]。以 pNPGlc 为底物, 酶的动力学参数测定结果显示其 K_m 值为 0.81 mmol/L, 最大反应速度 V_{\max} 为 227.27 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, K_{cat} 值为 $2.49 \times 10^6/\text{s}$, K_{cat}/K_m 为 $3 \times 10^9 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ 。

2.3 Bgl17 对底物的水解过程分析

利用薄层层析分析了 Bgl17 对纤维二糖的水解

表 1 Bgl17 对不同底物的水解情况
Table 1 The activity of Bgl17 on different substrates

底物 Substrates	比活力 Specific activity (U/mg)
pNPGlc	115.69
pNPGal	76.30
pNPCel	29.48
pNPXyl	4.55
Cellobiose	140.92
Salicin	297.39
Avicel	0

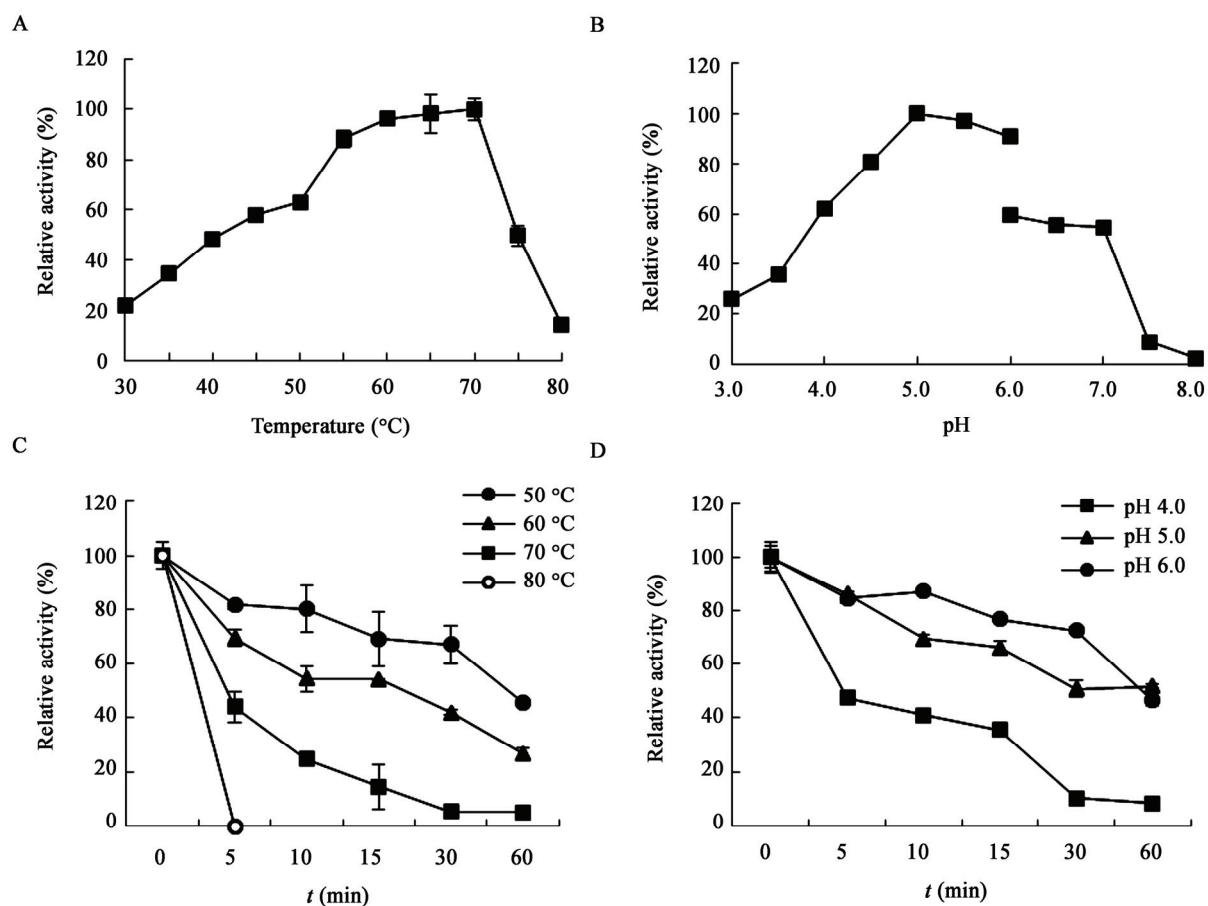


图2 Bgl17 最适反应条件及其稳定性

Figure 2 Optimal conditions and stability of Bgl17

注: A: 最适反应温度; B: 最适反应 pH 值; C: 不同温度条件下酶的稳定性; D: 不同 pH 条件下酶的稳定性。

Note: A: The temperature profile of Bgl17; B: The pH profile of Bgl17; C: Thermostability of Bgl17; D: pH stability of Bgl17.

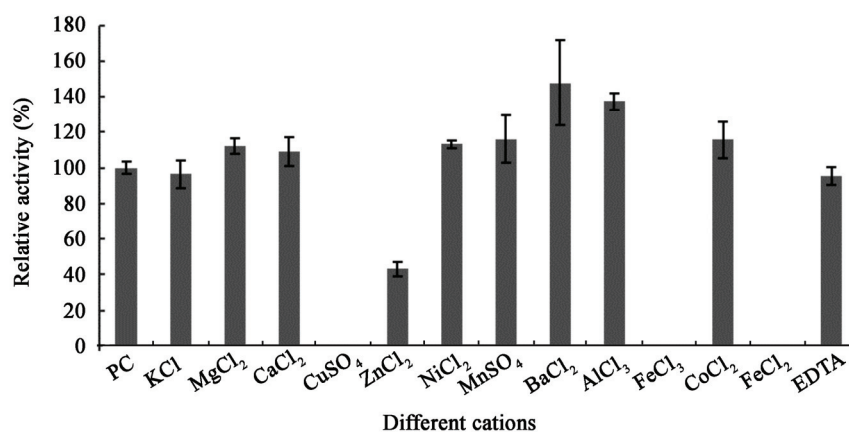


图3 金属离子对 Bgl17 酶活的影响

Figure 3 Effects of various cations on Bgl17 activity

过程, 结果表明 Bgl17 浓度较低时(0.01 U), 反应速度较慢, 反应 10 min 后仅有少量的单糖产生, 随着时间的延长逐步水解底物, 反应 2 h 后, 单糖生成量明显增加, 但仍有部分底物未被水解。当 Bgl17 浓度升高(2 U), 反应速度明显升高, 仅 10 min 就可将全部纤维二糖分解为单糖(图 4A)。对纤维三糖的水解过程进行分析发现, 随着 Bgl17 浓度的升高, 也能够将纤维三糖水解释, 最终水解为葡萄糖(图 4B)。

3 结论

在短角球白蚁肠道元基因组 Fosmid 文库中通过功能筛选, 获得一个新型 β -葡萄糖苷酶 Bgl17, 其属于糖基水解酶第一家族。对 Bgl17 功能分析表明, 该酶的最适反应温度为 70 °C, 最适 pH 值为 5.0, 比活为 115.69 U/mg。根据底物特异性可以将 β -葡萄糖苷酶分为 3 类: (1) 作用于芳基糖苷键的芳基- β -葡萄糖苷酶; (2) 水解纤维二糖为葡萄糖的纤维二糖酶; (3) 可以水解多种底物的 β -葡萄糖苷酶^[4]。大多数的 β -葡萄糖苷酶属于第三类, Bgl17 也不例外。纯化的 Bgl17 降解 pNPCel 活性仅为 pNPGlc 的 25%, 但水解纤维二糖的活性却高于

pNPGlc, 这在之前的报道中也有出现^[20-21]。一些属于糖基水解酶第一家族的酶可以水解芳香族 β -葡萄糖苷键, 例如熊果苷和水杨苷^[22], 主要存在于植物叶片、树皮和花中^[23]。通常情况下, β -葡萄糖苷酶对于 pNPGlc 的水解活性要远高于水杨苷, 而纯化的 Bgl17 对水杨苷具有很高的水解活性, 是 pNPGlc 活性的 2.5 倍, 表明 Bgl17 倾向于芳香族基团, 在以往报道中只有极少数 β -葡萄糖苷酶显示出该特性^[24-25]。这一点也表明该酶可以和白蚁肠道中其他的纤维素酶共同作用, 完成对植物复杂结构的降解。从不同的元基因组中筛选得到的 β -葡萄糖苷酶除极个别^[10,26]最适温度能达到 90 °C 外, 绝大多数最适温度仅在 40 °C 左右或以下^[9,27-28]。在工业应用中, 酶促反应通常在高温中进行, 高温条件下不仅可以提高酶的转化速率, 减小反应液粘度, 还可以防止反应体系中杂菌污染, 耐高温的酶在工业应用中具有明显的优势^[29]。酶学性质分析表明 Bgl17 具有相对较高的最适反应温度和稳定性, 因此具有很好的工业应用潜力; 另一方面, 白蚁的生存环境温度为 20–30 °C, 而从白蚁肠道挖掘到的 Bgl17 的最适温度为 70 °C, 远高于环境温度, 本实

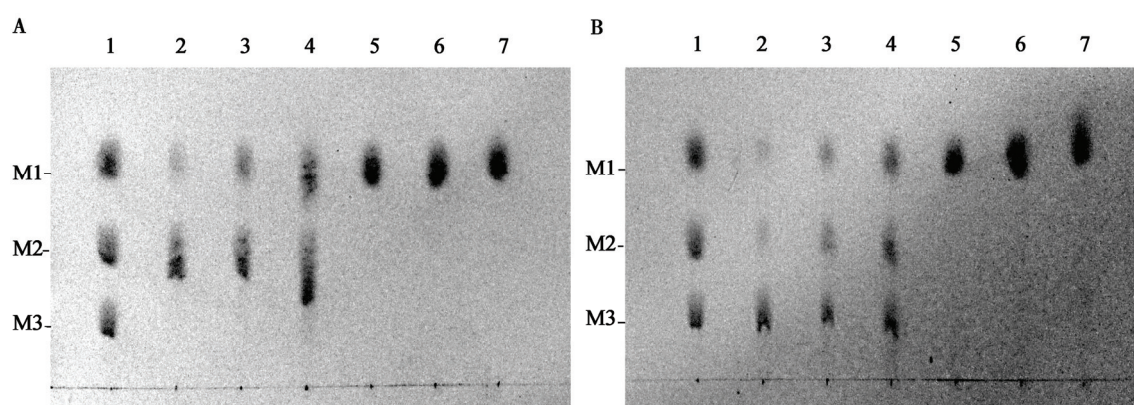


图 4 TLC 分析 Bgl17 对纤维二糖(A)和纤维三糖(B)的水解过程

Figure 4 Analysis of the Bgl17 induced hydrolytic products of cellobiose (A) and cellotriose (B) by TLC

注: 1: 葡萄糖(M1)、纤维二糖(M2)、纤维三糖(M3)混合标准品; 2–4: 0.01 U Bgl17 水解底物 10 min、1 h、2 h 后产物; 5–7: 2 U Bgl17 水解底物 10 min、1 h、2 h 后产物。

Note: 1: Mixture of glucose (M1), cellobiose (M2) and cellotriose (M3); 2–4: The hydrolyate produced by 0.01 U of Bgl17 at 10 min, 1 h and 2 h; 5–7: The hydrolyate produced by 2 U of Bgl17 at 10 min, 1 h and 2 h.

实验室前期的工作中也从白蚁肠道中筛选到最适温度为 90 °C 的高温酶^[10], 这些高温酶与低温酶相互之间的协同作用目前仍未可知, 高温酶的发现也为研究白蚁能够高效降解纤维素的机理研究提供了参考。

参 考 文 献

- [1] Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects[J]. Annual Review of Entomology, 2010, 55: 609-632
- [2] Ohkuma M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(1): 1-9
- [3] Blanchette C, Lacayo CI, Fischer NO, et al. Enhanced cellulose degradation using cellulase-nanosphere complexes[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42116
- [4] Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(4): 375-407
- [5] Mattéotti C, Bauwens J, Brasseur C, et al. Identification and characterization of a new xylanase from Gram-positive bacteria isolated from termite gut (*Reticulitermes santonensis*)[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 83(2): 117-127
- [6] Zhang LL, Li G, Mao RQ. Research progress on the degradation of lignin by termites intestinal microflora[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(3): 433-436 (in Chinese)
张来丽, 李刚, 毛润乾. 白蚁肠道微生物降解木质素研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 433-436
- [7] Ohkuma M. Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(7): 345-352
- [8] Feng Y, Duan CJ, Liu L, et al. Properties of a metagenome derived β -glucosidase from the contents of rabbit cecum[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2014, 73(7): 1470-1473
- [9] Jiang CJ, Li SX, Luoet FF, et al. Biochemical characterization of two novel β -glucosidase genes by metagenome expression cloning[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3272-3278
- [10] Wang Q, Qian C, Zhang XZ, et al. Characterization of a novel thermostable β -glucosidase from a metagenomic library of termite gut[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(6/7): 319-324
- [11] Ng IS, Tsai SW, Ju YM, et al. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel beta-glucosidases from Taiwanese fungi[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6073-6081
- [12] Araujo EF, Barros EG, Caldas RA, et al. Beta-glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp.[J]. Biotechnology Letters, 1983, 5(11): 781-784
- [13] Kruus K, Wang WK, Ching J, et al. Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(6): 1641-1644
- [14] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [15] Park TH, Choi KW, Park CS, et al. Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(4): 411-422
- [16] Liu N, Yan X, Zhang ML, et al. Microbiome of fungus-growing termites: a new reservoir for lignocellulase genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(1): 48-56
- [17] Choi JY, Park AR, Kim YJ, et al. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP isolated from rotten mandarin peel[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(5): 503-508
- [18] Umezurike GM. The subunit structure of beta-glucosidase from *Botryodiplodia theobromae* Pat[J]. Biochemical Journal, 1975, 145(2): 361-368
- [19] Gruninger RJ, Gong X, Forster RJ, et al. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7): 3003-3012
- [20] Yoon JJ, Kim KY, Cha CJ. Purification and characterization of the thermostable β -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose[J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(1): 51-55
- [21] Workman WE, Day DF. Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44(6): 1289-1295
- [22] Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a novel beta-glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(25): 18325-18334
- [23] Margues AR, Coutinho PM, Videira P, et al. *Sphingomonas paucimobilis* β -glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1[J]. The Biochemical Journal, 2003, 370(Pt 3): 793-804
- [24] Wallecha A, Mishra S. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2003, 1649(1): 74-84
- [25] Yang L, Ning ZS, Shi CZ, et al. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(7): 1940-1944
- [26] Schröder C, Elleuche S, Blank S, et al. Characterization of a heat-active archaeal β -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 57: 48-54
- [27] Li G, Jiang Y, Fan XJ, et al. Molecular cloning and characterization of a novel β -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library[J]. Bioresource Technology, 2012, 123: 15-22
- [28] Jiang CJ, Ma GF, Li SX, et al. Characterization of a novel β -glucosidase-like activity from a soil metagenome[J]. The Journal of Microbiology, 2009, 47(5): 542-548
- [29] Berlin A. No barriers to cellulose breakdown[J]. Science, 2013, 342(6165): 1454-1456