

研究报告

土壤微生物中新型 β -葡萄糖苷酶的挖掘与鉴定

王霏 王绍琛 曹明明 冯治洋*

(南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095)

摘要:【背景】通过培养微生物来获得新 β -葡萄糖苷酶因只有少部分微生物可以被培养而受到限制,但宏基因组学技术可以挖掘非培养微生物来源的 β -葡萄糖苷酶资源。【目的】利用宏基因组学技术挖掘土壤微生物来源的新型 β -葡萄糖苷酶,并对其酶学性质进行初步分析。【方法】构建土壤微生物的宏基因组文库,利用七叶苷平板显色法对所构建的文库进行筛选获得阳性克隆,并对阳性克隆所含的 β -葡萄糖苷酶基因进行异源表达和生物化学特性分析。【结果】通过筛选文库中的 62 万个克隆,获得一个具有 β -葡萄糖苷酶活性的克隆,其插入片段中包含一个 2 301 bp 的 ORF (YNBG3),蛋白同源性分析显示其属于 β -葡萄糖苷酶第三家族。对 YNBG3 酶的生化分析确定其最佳反应温度为 53 °C,最适 pH 为 5.2,有较好的热稳定性,对一定浓度范围内的 DMSO、丙酮、乙醇等有机试剂有较好的耐受性,EDTA 和尿素可增加该酶的活性。【结论】利用宏基因组学技术获得了一个有较好热稳定性及耐受一定浓度有机试剂和尿素的新 β -葡萄糖苷酶。

关键词: 宏基因组学, 功能性筛选, β -葡萄糖苷酶, 酶学性质

A novel β -glucosidase from soil microbes

WANG Fei WANG Shao-Chen CAO Ming-Ming FENG Zhi-Yang*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Background] Only a small proportion of microbes can be cultured in laboratories, thereby hampering the discovery of novel β -glucosidases from microbes. Novel microbial β -glucosidases can be discovered using culture-independent metagenomic approach. [Objective] Discovery of new β -glucosidase from soil microbes by metagenomic technology. [Methods] Screening a metagenomic library on esculin-containing Luria-Bertani agar plates and the putative β -glucosidase gene derived from the active clone was heterologously expressed for characterization. [Results] We found a β -glucosidase active clone by screening 620 000 clones in the library and an ORF (YNBG3) whose product is homologous with the third family of β -glucosidase was identified from the active clone. YNBG3 was heterologously expressed and characterized. Its optimum pH is 5.2, and optimal temperature is 53 °C. YNBG3 showed good tolerance to organic solvents including dimethyl sulphoxide, acetone and ethanol, and the activity of YNBG3 was enhanced in presence of EDTA and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31370088)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfheng@njau.edu.cn

Received: February 27, 2017; Accepted: May 17, 2017; Published online (www.cnki.net): June 27, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370088)

*通信作者: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfheng@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-02-27; 接受日期: 2017-05-17; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-06-27

urea. **[Conclusion]** A new β -glucosidase, with thermostability and stability in the presence of organic solvents and urea, was discovery in this study.

Keywords: Metagenomics, Functional screening, β -glucosidase, Enzymatic properties

土壤中包含的多种多样的微生物是现代工业酶类的重要来源,微生物酶是通过微生物的分离、培养和发酵来获得的。然而微生物分子生态学研究表明,利用传统的纯培养技术仅有极少数的微生物可被培养,而超过 99%的非培养性微生物才是土壤微生物多样性的主体^[1],这极大地限制了实验室条件下对微生物资源的研究与利用。20 世纪末 Handelsman 等提出的宏基因组学方法有效地解决了这一重大难题^[2]。宏基因组学是以环境中全部微生物的基因组为研究对象,研究特定环境中所有微生物的生态结构和遗传表达的方法^[3-4]。通过构建宏基因组文库,将微生物基因克隆到合适的载体上,再在宿主中进行功能表达,可以极大地开发非培养性微生物的基因资源^[5-7]。

β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21, Beta-glucosidase),是纤维素分解酶系中一类重要的水解酶类^[8-11],又名龙胆二糖酶、纤维二糖酶。 β -葡萄糖苷酶能够催化水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键,同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基。但纤维素酶组分中该酶含量最少、活力普遍较低,因此增加 β -葡萄糖苷酶活性会有效提高纤维素酶解效率^[12-13]。此外, β -葡萄糖苷酶在食品风味的改善^[14]、植物防御^[15]、疾病的检测^[16]和生产制造业^[17-18]等方面具有重大的应用价值。 β -葡萄糖苷酶存在于细菌和真菌等微生物中^[19-20],而宏基因组学方法可极大地挖掘土壤中的微生物资源,因此可成为挖掘具有优良特性的新型 β -葡萄糖苷酶的有力工具。

宏基因组学技术可以挖掘非培养微生物来源的 β -葡萄糖苷酶资源,并可利用生长在不同环境中的微生物获得具有不同酶学特性优势的 β -葡萄糖苷酶,如从动物肠道宏基因组文库中获得活性高且有较宽 pH 耐受性的 β -葡萄糖苷酶^[21],从海洋微生物宏基因组文库中获得具有明显耐盐和耐热特性的 β -葡萄糖苷酶^[22-23]。从宏基因组文库中挖掘

到的 β -葡萄糖苷酶与已知酶同源性较低,通常为新型酶。

本研究通过筛选云南土壤宏基因组文库中的 62 万个克隆,获得了一个具有 β -葡萄糖苷酶活性的克隆。通过构建阳性克隆插入片段亚克隆获得了一个 β -葡萄糖苷酶功能基因,将该基因进行异源表达后获得了功能蛋白 YNBG3。进而研究了 YNBG3 的最适 pH、最适反应温度、耐盐性、葡萄糖耐受性,以及对不同有机溶剂、金属离子等的耐受性,为性质优异新型酶的发现研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和载体

E. coli EPI100、pWEB-TNCTM Cosmid Cloning Kit 试剂盒, Epicentre 公司; pTG-19T 载体,上海捷瑞生物工程有限公司; pET-30a(+)载体和 *E. coli* BL21(DE3)由本课题组保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

*Sau*3A I、*Bam*H I、*Nde* I、*Xho* I、CIAP、T4 DNA Ligase、*Pfu* DNA 聚合酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;质粒提取试剂盒 TIANpure Mini Plasmid Kit II 和琼脂糖凝胶回收试剂盒 TIANgel Midi Purification Kit,天根生化科技(北京)有限公司;4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG),上海瑞永生物技术有限公司;柠檬酸铁铵、胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠,生工生物工程(上海)股份有限公司;七叶苷,上海麦克林生化科技有限公司;氨基青霉素、氯霉素、卡那霉素,上海捷瑞生物有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,南京化学试剂有限公司。Multiskan FC 型酶标仪, Thermo Scientific 公司;FA2004N 型精密天平,上海民桥精密科学仪器有限公司;Tpersonal 型 PCR 仪,珠海黑马医学仪器有限公司。

1.1.3 LB 培养基(g/L)

胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0,

pH 7.0; 需要时添加氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素分别至 100、15、30 mg/L; 筛选培养基为固体 LB 培养基添加 0.1% 七叶苷、0.25% 柠檬酸铁铵。

1.2 实验方法

1.2.1 β -葡萄糖苷酶活性克隆的筛选

将文库菌稀释后涂布在筛选培养平板上, 37 °C 培养 3–5 d 后观察产生黑色水解圈的阳性克隆。将阳性克隆挑取后划线培养, 再次在选择性平板上验证活性, 验证正确的单克隆应用天根质粒提取试剂盒提取质粒。

1.2.2 亚克隆制备

用稀释 1 000 倍终浓度为 0.01 U/ μ L 的 *Sau*3A I 限制性内切酶对产 β -葡萄糖苷酶的文库质粒进行不完全酶切。随后琼脂糖凝胶电泳检测, 将 2–4 kb 之间的酶切 DNA 产物进行切胶回收, 回收的 DNA 片段与经 *Bam*H I 酶切的 pWEB-TNC 载体连接, 连接产物电转化后涂布在筛选平板上, 再次筛选具有 β -葡萄糖苷酶活性的亚克隆菌株。对亚克隆中所含质粒的插入片段进行测序, 并进行 BLASTx 比对分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得 β -葡萄糖苷酶的基因序列。

1.2.3 构建重组表达质粒

扩增 β -葡萄糖苷酶基因 *YNBG3* 的引物为:

YNBG-F: 5'-GGAATTCCATATGAGCAAGCTCAGAATTGCCCTC-3';

YNBG-R: 5'-CCGCTCGAGGCTTCTGGTCCGAGTAATCGA-3'。

上下游引物 F、R 下划线处表示 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, 粗体表示起始密码子。以重组质粒为模板, 利用 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): ddH₂O 35.0 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5.0 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L, 阳性亚克隆质粒(50 ng/ μ L) 1.5 μ L, *Pfu* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 条件: 95 °C 3 min; 94 °C 45 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物克隆至 pTG-19T 载体后, 测序验证扩增

产物序列。

将测序验证正确的重组质粒 pTG-19T-*YNBG3* 和 pET-30a(+)表达载体进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切反应, 用 T4 DNA 连接酶连接构建原核重组表达质粒 pET-30a(+)-*YNBG3*。将 pET-30a(+)-*YNBG3* 电转化至制备好的 *E. coli* EPI100 克隆宿主中, 验证正确后提取质粒再次电转化 *E. coli* BL21 (DE3)表达宿主, 进行后续诱导表达。

1.2.4 诱导表达蛋白及纯化

(1) 将含 pET-30a(+)-*YNBG3* 的重组菌划线至含卡那霉素的 LB 固体培养板上活化, 挑取单克隆接种至对应抗性的液体培养基内, 37 °C、220 r/min 培养过夜。(2) 取 400 μ L 过夜培养菌液转接至 400 mL 新鲜液体 LB 培养基内, 37 °C、220 r/min 培养至菌体浓度 *OD*₆₀₀ 在 0.6–0.8 之间。(3) 添加 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L, 将温度、转速分别调至 28 °C、200 r/min 后继续培养 12 h 诱导表达蛋白。

将诱导表达 12 h 的菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀。加入裂解液, 超声破碎菌体 20 min (6 mm 超声探头, 超声 1.5 s, 间隔 2 s) 后, 离心取上清液。将上清液通过偶联镍离子的层析柱进行亲和纯化, 5 倍体积清洗液(NaCl 5.8 g, Tris 6.0 g, 加 800 mL 蒸馏水溶解后调节 pH 至 7.5, 再加蒸馏水定容至 1 000 mL)清洗后, 利用洗脱液(含 500 mmol/L 咪唑的清洗液)将蛋白从柱上洗脱下来。根据预测的 β -葡萄糖苷酶的蛋白分子量选择 10%分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.5 酶反应体系

加入 31 μ g/mL 的酶溶液和 10 mmol/L 的 pNPG 各 10 μ L 到 80 μ L pH 缓冲液中, 在实验温度(20–80 °C)反应 10 min 后, 加入 100 μ L 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 测定 *OD*₄₀₅ 值。

1.2.6 确定 *YNBG3* 酶促反应的最适 pH 及 pH 对酶稳定性的影响

在 50 °C 条件下, 使用 pH 3.0–11.0 的缓冲液测定在不同 pH 条件下的酶活力, 根据酶活值大小初步确定最适 pH。缓冲液分别为 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲

液(pH 3.0–6.0)、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)和 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–11.0), 初始 pH 为 3.0–11.0, 梯度设为 1 个 pH 单位, 反应后得出酶的高活力 pH 范围。在此范围中, 缩小 pH 梯度为 0.2 个 pH 单位, 最终确定最适 pH。

纯化的酶溶液用 pH 4.0–7.0、梯度为 1 个 pH 单位的缓冲液稀释 20 倍, 4 °C 放置 4 h, 在相同酶反应体系下测定剩余酶活力。每个反应 4 个平行, 4 个空白对照。

1.2.7 确定 YNBG3 酶促反应的最适温度及温度对酶稳定性的影响

在最适 pH 5.2 缓冲液体系下, 加入 31 µg/mL 的酶溶液和 10 mmol/L 的 pNPG 各 10 µL 到 80 µL 缓冲液中, 分别放置在 20、30、40、50、60、70、80 °C 温度下反应 10 min, 加入 100 µL 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 测定 OD₄₀₅ 值, 以得出酶的高活力温度范围。再以 42 °C 为起点, 每隔 2 °C 为一个温度梯度, 测定不同温度下的酶活, 确定最适温度。同时在相同反应体系下, 将稀释 20 倍的纯酶溶液放置于 40、50、60、70、80 °C 水浴中保温 4 h, 测定剩余酶活力。在随后的反应中, 均在最适反应温度和最适条件下进行, 每个反应 4 个平行, 4 个空白对照。

1.2.8 不同金属离子对 YNBG3 酶活的影响

反应体系内分别加入 KCl、ZnCl₂、MgCl₂、CaCl₂、NiCl₂、FeCl₂、FeCl₃、LiCl、NaCl、ZnCl₂、CoCl₂、CuCl₂、MnCl₂ 金属离子溶液, 使其在 pH 缓冲液中终浓度为 1 或 10 mmol/L, 在最适温度条件下检测金属离子对 β-葡萄糖苷酶酶活的影响。以添加 β-葡萄糖苷酶和金属离子作为实验组, 添加金属离子而未加 β-葡萄糖苷酶的反应体系作为空白对照, 以添加 β-葡萄糖苷酶而未加金属离子的反应酶活定为 100%。

1.2.9 不同化合物对 YNBG3 酶活的影响

在反应体系中添加不同体积的 DMSO、乙醇、EDTA、SDS 等化合物, 使其终浓度为 1%、15%或 30%, 在最适温度和最适 pH 的条件下测定 YNBG3 酶活。以添加 β-葡萄糖苷酶和化合物作为

实验组, 添加化合物而未加 β-葡萄糖苷酶的反应体系作为空白对照, 以添加 β-葡萄糖苷酶而未加化合物的反应酶活定为 100%。

1.2.10 葡萄糖对 YNBG3 的反馈抑制分析

β-葡萄糖苷酶水解 β-1,4-糖苷键生成葡萄糖和相应的配基, 葡萄糖作为产物, 对 β-葡萄糖苷酶的活性会产生一定的反馈抑制作用, 通过在反应体系中加入不同浓度的葡萄糖, 测定葡萄糖对酶活力的影响。将酶与葡萄糖终浓度为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5 mol/L、pH 5.2 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液混合, 4 °C 放置 1 h 后测定酶活, 以未加入葡萄糖时的反应酶活定为 100%。

1.2.11 YNBG3 的耐盐性分析

在标准反应体系的基础上, 加入 NaCl 溶液至终浓度为 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mol/L, 测定酶活, 以未添加 NaCl 溶液时反应酶活定为 100%。

1.3 核苷酸序列登录号

YNBG3 核苷酸序列在 GenBank 数据库中的登录号为 KY654505。

2 结果与分析

2.1 阳性亚克隆目的基因序列分析

通过筛选已构建的云南土壤宏基因组文库^[24]中的 62 万个克隆, 在加了七叶苷和柠檬酸铁铵底物平板上得到一个产生黑色水解圈的克隆菌。经过亚克隆的筛选和序列分析发现了一个 2 301 bp 的 ORF, 其蛋白序列与来源于 *Cystobacter fuscus* 的 β-葡萄糖苷酶(WP_002628458.1)具有 58%的相似性, 而非培养菌株来源的某一 β-葡萄糖苷酶(AGK74984.1)有 80%的相似性。

将该 β-葡萄糖苷酶 YNBG3 氨基酸序列和其它具有一定相似性的 β-葡萄糖苷酶氨基酸序列构建近邻系统发育进化树(图 1)发现, 参照 β-葡萄糖苷酶家族分类标准^[25], YNBG3 可划分于 β-葡萄糖苷酶第三家族。目前认为 β-葡萄糖苷酶两个催化中心都含有酸性氨基酸 Asp 和 Glu^[26], 而在第三家族成员中, 则发现 Asp 为保守氨基酸。通过分析, YNBG3 的保守氨基酸是 Asp⁵⁶¹。

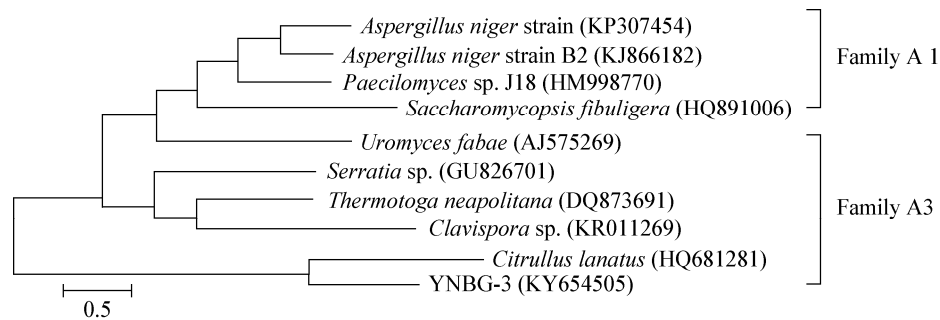


图 1 YNBG3 的进化树分析

Figure 1 Neighbour-joining analysis of YNBG3

注：括号中的序号为不同来源酶的序列登录号；标尺指示遗传距离。

Note: The numbers in parentheses indicate the accession numbers for different enzymes sequences; the scale bar represents the number of substitutions per site.

2.2 重组表达体系的构建与 YNBG3 的表达纯化

以阳性亚克隆重组质粒为模板，以 YNBG3-F 和 YNBG3-R 为引物进行 PCR，扩增获得大小为 2.3 kb 的 DNA 片段(图 2)，测序验证后与 pET-30a(+)载体连接后获得 pET-30a(+)-YNBG3 电转化至 BL21(DE3)宿主菌中进行蛋白表达。

利用含 pET-30a(+)-YNBG3 的 BL21(DE3)重组菌表达含有 His-tag 标签的 YNBG3 蛋白，用镍柱进行亲和分离纯化，SDS-PAGE 电泳检测纯化后蛋白，其大小与之前按氨基酸组成预测加 His-tag 标

签后的分子量 84.7 kD 大小相符(图 3)。

2.3 YNBG3 酶促反应最适 pH 及 pH 对酶稳定性的影响

在 pH 2.0–11.0 条件下测定酶活性，发现 pH 5.0 时 YNBG3 具有较高的活性和稳定性，进一步缩小 pH 梯度后确定在 pH 5.2 的磷酸盐缓冲体系内酶活最高(图 4A、B)。在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 的缓冲液条件下放置，其中 pH 5.0–6.0 时 YNBG3 放置 4 h 后仍能保持 50%以上的酶活力，表明 YNBG3 在酸性条件下有良好稳定性(图 5)。

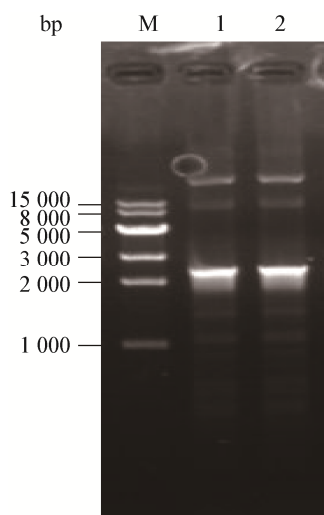


图 2 电泳检测 YNBG3 基因

Figure 2 Electrophoresis analysis of the PCR products of YNBG3

注：M：1 kb-III DNA Marker；1、2：YNBG3 PCR 产物。

Note: M: 1 kb-III DNA Marker; 1, 2: PCR product of YNBG3.

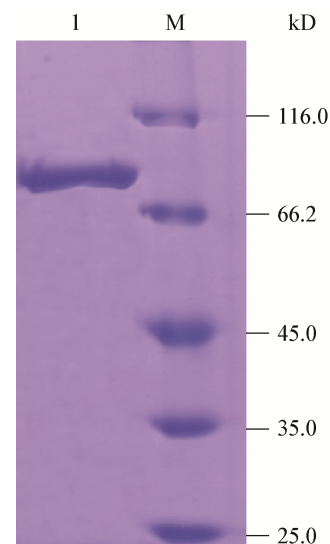
图 3 SDS-PAGE 检测纯化的 β -葡萄糖苷酶蛋白

Figure 3 SDS-PAGE detection of purified protein

注：1：纯化后蛋白；M：蛋白 Marker。

Note: 1: Purified protein; M: Protein Marker.

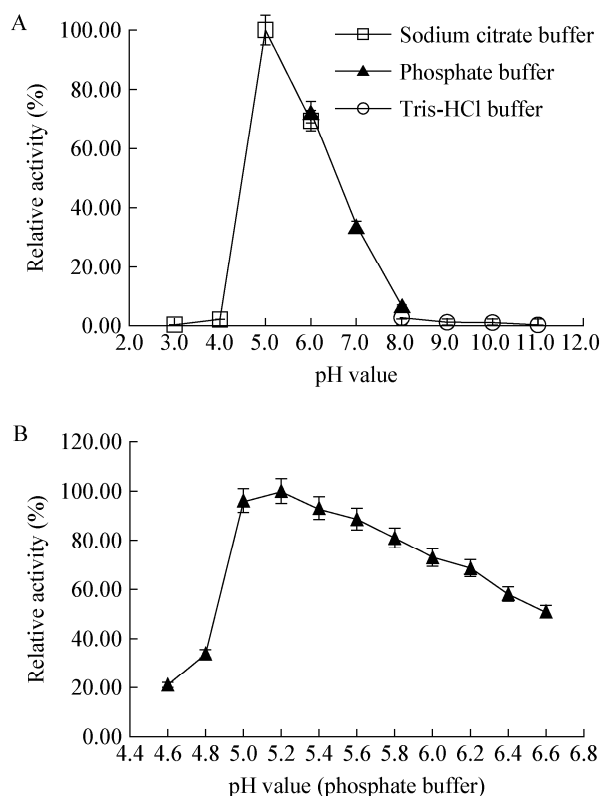


图4 pH-活力曲线图

Figure 4 Effects of pH on activity of YNBG3

Note: A: pH 2.0-11.0; B: pH 4.6-6.6.

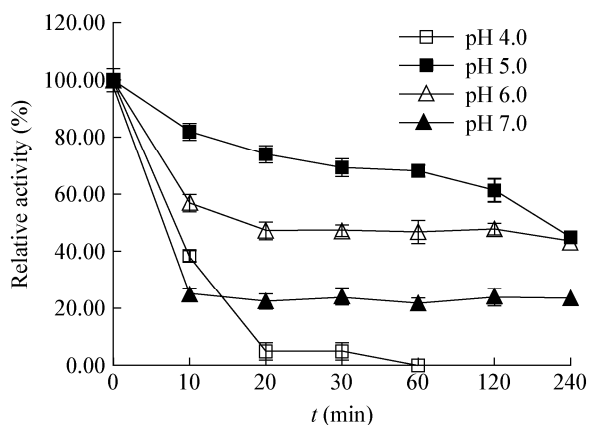


图5 pH对酶的稳定性影响

Figure 5 Effects of pH on stability of YNBG3

2.4 YNBG3 酶促反应最佳温度及其耐热性

在 pH 5.2 的磷酸盐缓冲体系下,分别检测 20、30、40、50、60、70、80 °C 等温度下酶活,初步确定较高酶活温度范围是 45-55 °C。在 45-55 °C 范

围内以 45 °C 为起点,每隔 2 °C 为一个温度梯度,确定 53 °C 时酶活最高,确定 YNBG3 最佳反应温度为 53 °C;在 20-58 °C 范围内,酶活力随温度的升高而升高;过了 60 °C 以后,酶活力会随着温度的升高急剧下降;到 70 °C 几乎完全失活(图 6)。值得一提的是,该酶在 50 °C 放置超过 12 h 以后,仍具有高于 30% 的酶活,具有较好的耐热性(图 7)。

2.5 不同金属离子对 YNBG3 酶活的影响

在 53 °C、pH 5.2 的磷酸盐缓冲液中,分别加入 KCl、ZnCl₂、MgCl₂、CaCl₂、NiCl₂、FeCl₂、FeCl₃、LiCl、NaCl、CoCl₂、CuCl₂、MnCl₂ 金属离子溶液,使其终浓度为 1 或 10 mmol/L,在终浓度为 1 mmol/L 时,几乎所有的这些常见金属离子都表现出对酶活有一定的促进作用;而当终浓度为 10 mmol/L 时,发现 Ca²⁺、Mg²⁺有明显的促进作用,而 Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Co²⁺、Mn²⁺则对酶活性表现出了抑制作用,

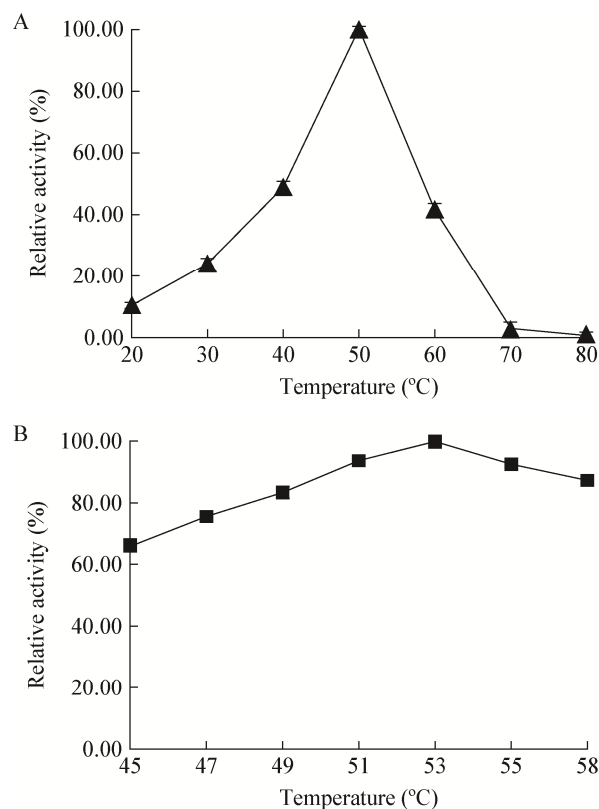


图6 温度-活力曲线图

Figure 6 Effects of temperature on activity of YNBG3

Note: A: 20-80 °C; B: 45-57 °C.

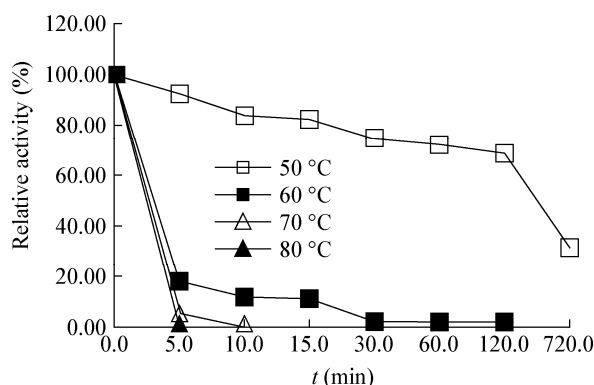


图7 温度对酶稳定性的影响

Figure 7 Effects of temperature on stability of YNBG3

但 YNBG3 酶活仍能保持在 60% 以上(图 8)。可见, YNBG3 是不依赖于金属离子而又对常见金属离子有很好耐受性的酶。

2.6 YNBG3 对不同化合物的耐受性

在最适反应温度 53 °C、最适 pH 5.2 的磷酸盐缓冲条件下, 在反应体系中添加 DMSO、乙醇、乙酸乙酯、乙腈、丙酮、尿素、SDS 和 EDTA, 使其终浓度分别为 1%、15% 和 30%, 测定了不同反应条件下的酶活力。结果如图 9 所示, SDS 作为蛋白质的强力变性剂, 在 1% 条件下, YNBG3 仅剩 60% 的活性, 当浓度到 15% 时, YNBG3 完全失活; 而作为蛋白变性剂的 EDTA 和尿素, 在低浓度条件下对酶起到了促进作用, 浓度达到 15% 时

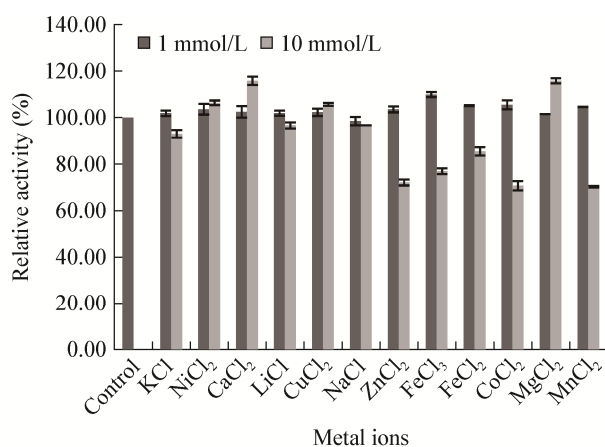


图8 不同金属离子对 YNBG3 酶活的影响

Figure 8 Effect of metal ions on activity of YNBG3

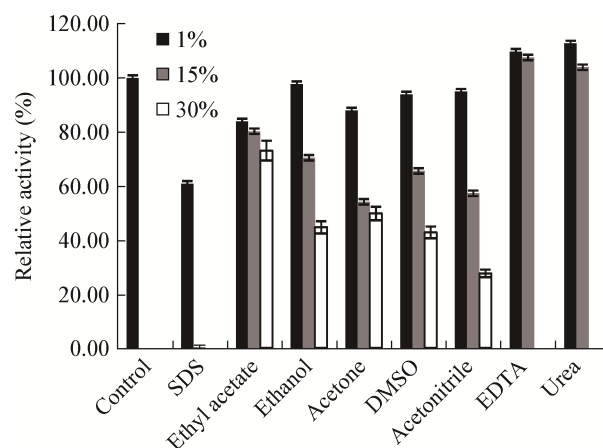


图9 YNBG3 对不同化合物的耐受性

Figure 9 Effect of different solvents on activity of YNBG3

对酶活没有影响, YNBG3 对这两种化合物表现出了很好的耐受性; 在低浓度条件下(1%), 有机试剂对 YNBG3 的酶活力基本无影响, 但随着有机化合物浓度的增大, 酶活逐渐降低。

2.7 葡萄糖对 YNBG3 活性的抑制

葡萄糖作为 β -葡萄糖苷酶酶促反应的产物, 对 β -葡萄糖苷酶酶促反应有明显的影响, 一般会存在对 β -葡萄糖苷酶的促进作用和反馈抑制作用^[27]。通过在反应体系中加入不同浓度的葡萄糖, 测定酶的相对活力, 结果如图 10 所示。由图 10 可以看出, 葡萄糖对 YNBG3 活性有较强的抑制作用, 随着葡萄糖浓度的增加, 酶活力迅速减弱。当葡萄糖浓度达到 2.5 mol/L 时, YNBG3 活性完全被抑制。

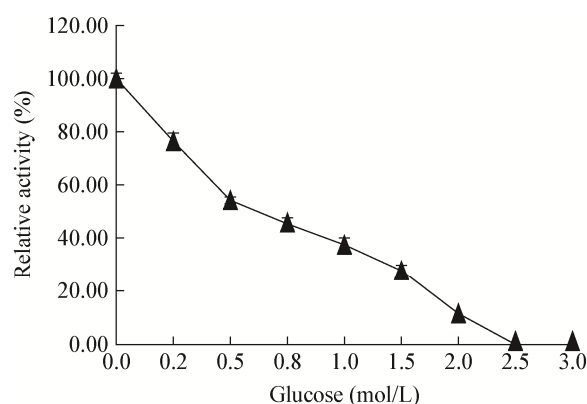


图10 葡萄糖对 YNBG3 酶活影响

Figure 10 Effect of glucose on activity of YNBG3

2.8 YNBG3 的耐盐性分析

将 YNBG3 与不同浓度的 NaCl 溶液混匀, 4 °C 放置 1 h 后测定酶活, 结果如图 11 所示。NaCl 在 0.5 mol/L 以下时, 对酶活力有显著的促进作用; 浓度为 0.1 mol/L 时, YNBG3 的相对酶活达到最高 (141%); 而当 NaCl 浓度超过 0.5 mol/L 后, 对酶开始产生抑制作用。同时随着浓度的增加抑制作用愈显著, NaCl 浓度为 1 mol/L 时, 酶活力仅为对照的 32%。

3 讨论与结论

目前实际应用的 β -葡萄糖苷酶的酶活普遍偏低, 培养条件要求高且表达量低^[28], 很大程度上限制了 β -葡萄糖苷酶在食品工业、农业、医药等领域的广泛应用。常规的克隆 β -葡萄糖苷酶基因方法即从可培养微生物和植物等^[29-30]筛选, 而利用宏基因组学技术, 能挖掘到具有优良特性和广泛应用潜力的新型 β -葡萄糖苷酶基因。陆坚等^[31]利用高糖土壤微生物宏基因组文库筛选到了两株编码新型 β -葡萄糖苷酶的 unbg13A 和 unbg13B, 在核苷酸水平上, unbg13A 和 unbg13B 与已知数据库中的 β -葡萄糖苷酶基因没有任何相似性。侯亚会等^[32]利用白蚁肠道宏基因组挖掘到编码新型 β -葡萄糖苷酶的 CfBG-Ib, 其开放阅读框为 1 692 bp, 产物编码 563 个氨基酸。本研究利用基于宏基因组学技术的功能筛选方法, 从土壤微生物宏基因组文库中筛选到一致性低的 β -葡萄糖苷酶 YNBG3, 证明宏基因组学方法是筛选新型特异活性酶类的有力工具^[33]。

对 YNBG3 的基因进行 PCR 扩增、测序, 并进行序列比对分析, 得知 YNBG3 属于糖基水解酶第三家族。将 YNBG3 基因进行异源表达, 最终纯化得到 YNBG3, 比活力为 33.65 U/mg。分析其酶学性质, 在 50 °C 环境下能保持 30% 以上酶活超 12 h, 该酶的温度耐受性要高于文献^[34]所报道, 具有研究价值。值得一提的是, 在含 EDTA 和尿素的反应缓冲体系内, 该酶活性不仅没有被抑制,

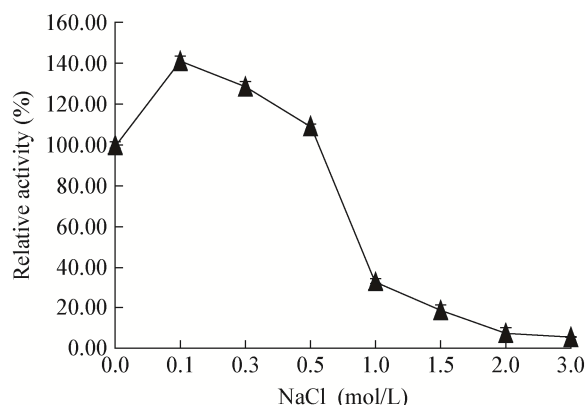


图 11 盐离子对 YNBG3 酶活的影响

Figure 11 Effect of NaCl on activity of YNBG3

而且还对酶产生了促进作用, 这更是已报道^[35-36]的众多 β -葡萄糖苷酶所不具备的特性。同时, 研究发现该酶对常见的金属离子和有机溶剂也有极好的耐受性, NiCl_2 、 CaCl_2 、 MgCl_2 对 YNBG3 有明显的促进作用。此外, YNBG3 在低浓度盐离子环境中酶活能提高到 140%, 表明该酶还具有一定程度的嗜盐性, 能抵抗较高浓度的盐离子, 在实际的生化生产反应中是非常有利的因素^[37]。这些特性有利于 YNBG3 在各类果汁、食品加工及洗涤工业生产等领域的应用。因此, 热稳定性好且对 EDTA、尿素和有机试剂有良好耐受性的新型 β -葡萄糖苷酶 YNBG3 具有潜在的工业应用价值。同时, 本研究也对基于宏基因组学技术挖掘新型功能基因和活性物质的研究具有一定的参考意义。

REFERENCES

- [1] Yang J, Hong K. Comparing study on different methods for DNA from mangrove soil[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(S1): 366-371 (in Chinese)
杨建, 洪葵. 红树林土壤总 DNA 不同提取方法比较研究[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 366-371
- [2] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular bio-logical access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [3] Hugenholtz P, Tyson GW. Microbiology: metagenomics[J]. Nature, 2008, 455(7212): 481-483
- [4] Martin MF, Liras P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites[J]. Annual Review of Medicine, 1989, 43(1): 173-206

- [5] Torsvik VL, Goksoyr J. Determination of bacterial DNA in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1978, 10(1): 7-12
- [6] Qian CL, Liu N, Yan X, et al. Engineering a high-performance, metagenomic-derived novel xylanase with improved soluble protein yield and thermostability[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 70: 35-41
- [7] Sathya TA, Khan M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(11): R2149-R2156
- [8] Mai ZM, Su HF, Li LZ, et al. Construction of a mangrove soil metagenome library and identification of two novel β -glucosidase genes[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(6): 168-172 (in Chinese)
麦志茂, 苏宏飞, 李丽珍, 等. 红树林土壤微生物宏基因组文库的构建及两种新颖的 β -葡萄糖苷酶基因的鉴定[J]. 生物技术通报, 2014(6): 168-172
- [9] Willis JD, Oppert B, Oppert C, et al. Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)[J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(2): 300-306
- [10] Li XM, Ma HL. Comparison of two β -Glucosidase-producing strains from the intestinal tract of vegetarians and optimization of fermentation conditions for β -Glucosidase production[J]. Food Science, 2016, 37(7): 123-127 (in Chinese)
李笑梅, 马慧玲. 两株素食者肠道菌产 β -葡萄糖苷酶考察及产酶条件优化[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 123-127
- [11] Li YH. Research progress on β -glucosidase[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2002, 29(4): 421-425 (in Chinese)
李远华. β -葡萄糖苷酶的研究进展(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 421-425
- [12] Wood TM, McCrae SI. Purification and some properties of the extracellular β -glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1980, 128: 2973-2982
- [13] Harada KM, Tanaka K, Fukuda Y, et al. Degradation of rice bran hemicellulose by *Paenibacillus* sp. strain HC1: gene cloning, characterization and function of β -D-glucosidase as an enzyme involved in degradation[J]. Archives of Microbiology, 2005, 184: 215
- [14] Li YB, Wu GL. Current studies on the β -glucosidase and the enzyme immobilization[J]. Journal of Tea Business, 2004, 26(1): 21-22 (in Chinese)
李英波, 吴国林. β -葡萄糖苷酶及酶固定化研究进展[J]. 茶叶通报, 2004, 26(1): 21-22
- [15] Pan LH, Luo JP. Advance in research and application of β -D-glucosidase[J]. Food Science, 2006, 27(12): 803-807 (in Chinese)
潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807
- [16] Shao JH. The application of β -glucosidase[J]. Chemistry of Life, 2005, 25(1): 22-24 (in Chinese)
邵金辉. β -葡萄糖苷酶在工农医领域的应用[J]. 生命的化学, 2005, 25(1): 22-24
- [17] Wang X, Shen C, Zhou YB. Relationship between β -glucosidase and tea flavor, and tea pest and disease resistance[J]. Tea Communication, 2014, 41(4): 8-12 (in Chinese)
王晓, 沈程, 周跃斌. β -葡萄糖苷酶与茶增香及抗病虫害的研究进展[J]. 茶叶通讯, 2014, 41(4): 8-12
- [18] Mielenz J. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 4(3): 324-329
- [19] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [20] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355-383
- [21] Suzuki K, Sumitani J, Nam YW, et al. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*[J]. Biochemical Journal, 2013, 452(2): 211-221
- [22] Fang W, Fang ZM, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine metagenome[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(12): 1914-1920 (in Chinese)
房伟, 方泽民, 刘娟娟, 等. 新型海洋微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1914-1920
- [23] Xia W. Diversity and molecular engineering of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *thermophilic fungi*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
夏伟. 嗜热真菌第 3 家族 β -葡萄糖苷酶的多样性和分子改造[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016
- [24] Gu XQ, Wang SL, Wang SC, et al. Identification and characterization of two novel esterases from a metagenomic library[J]. Food Science and Technology Research, 2015, 21(5): 649-657
- [25] Li YK, Chir J, Tanaka S, et al. Identification of the general acid/base catalyst of a family 3 β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*[J]. Biochemistry, 2002, 41(8): 2751-2759
- [26] Pellerin P, Brillouet JM. Purification and properties of an exo-(1 \rightarrow 3)-beta-D-galactanase from *Aspergillus niger*[J]. Carbohydrate Research, 1994, 264(2): 281-291
- [27] Rodríguez ME, Lopes C, Valles S, et al. Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(6/7): 812-820
- [28] Yi XN, Cheng W, Ding SH, et al. Construction of an engineered strain producing high β -glucosidase activity and its application in the production of 2,6-Dimethoxybenzoquinone[J]. Food Science, 2016, 38(8): 69-73 (in Chinese)
易晓男, 程炜, 丁树慧, 等. 高产 β -葡萄糖苷酶工程菌株的构建及其在 2,6-二甲氧基对苯醌发酵制备中的应用[J]. 食品科学, 2016, 38(8): 69-73
- [29] Peng LS, Zhang YX, Yan Q, et al. Separation, purification, and enzymatic properties of thermo-tolerant β -glucosidase from *Trichoderma viride*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(9): 168-172 (in Chinese)

- 189-196 (in Chinese)
- 彭利沙, 张永祥, 闫青, 等. 绿色木霉耐热 β -葡萄糖苷酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 189-196
- [30] Zhou HC, Lei PD, Ding Y. Research advance on β -glucosidase of tea plant[J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(2): 111-118 (in Chinese)
- 周汉琛, 雷攀登, 丁勇. 茶树 β -葡萄糖苷酶研究进展[J]. 茶叶科学, 2016, 36(2): 111-118
- [31] Lu J, Du LQ, Pang H, et al. Construction of metagenomic library of microbes from sugar enriching soil and identification of β -glucosidase genes[J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(1): 30-35 (in Chinese)
- 陆坚, 杜丽琴, 庞浩, 等. 高糖土壤微生物宏基因组文库的构建及 β -葡萄糖苷酶基因鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(1): 30-35
- [32] Hou YH, Yan SC, Wu WJ, et al. Gene cloning and characterization of a β -glucosidase gene from *Coptotermes formosanus* Shiraki[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45(3): 96-101 (in Chinese)
- 侯亚会, 严善春, 吴文静, 等. 台湾乳白蚁 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与分析[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(3): 96-101
- [33] Jiang CJ, Hao ZY, Zeng R, et al. Characterization of a novel serine protease inhibitor gene from a marine metagenome[J]. Marine Drugs, 2011, 9(9): 1487-1501
- [34] Chen J, Hao WW, Wang CM, et al. Screening and identification of β -glucosidase-producing fungi, and purification and enzymatic analysis[J]. Food Science, 2013, 34(5): 191-196 (in Chinese)
- 陈静, 郝伟伟, 王春梅, 等. 产 β -葡萄糖苷酶真菌的筛选鉴定、纯化及酶学性质分析[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 191-196
- [35] Tang J, Su D, Yuan S, et al. Cloning and enzymatic characteristics of three new β -glucosidases in soil metagenomic library[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(4): 14-18 (in Chinese)
- 唐婧, 苏迪, 袁帅, 等. 土壤宏基因组文库中3个新 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及其酶学特性[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(4): 14-18
- [36] Liu DH, Hao YM, Yue DD, et al. Isolation of a strain with β -glucosidase and its enzymatic properties[J]. China Brewing, 2013, 32(6): 47-51, 60 (in Chinese)
- 刘德海, 郝益民, 岳丹丹, 等. 一株产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(6): 47-51, 60
- [37] Su ZF. Bioinformation and expression patterns analysis of GH1 β -glucosidase in Arabidopsis and rice[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 苏振峰. GH1 β -葡萄糖苷酶在拟南芥和水稻中的生物信息学及表达模式分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

