



研究报告

嗜热淀粉芽孢杆菌来源 β -葡萄糖苷酶的重组表达与酶学性质刘洋^{1,2} 彭惠² 张余¹ 董艺凝¹ 孙星¹ 罗侠¹ 蔡华¹ 赵维萍^{*1}¹ 滁州学院生物与食品工程学院 安徽 滁州 239000² 安徽大学现代生物制造协同创新中心 安徽 合肥 230601

摘要:【背景】 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21, β -glucosidase), 是纤维素分解酶系中的重要组成部分, 目前工业上应用的 β -葡萄糖苷酶多数来源于植物和真菌, 来源于细菌的较少, 且应用中还存在酶活力偏低、热稳定性差、反应条件适用范围窄、酶活力易受产物反馈抑制等问题, 增加了经济成本。嗜热微生物具有特殊的遗传信息资源, 极有可能从中挖掘到酶学性质优良的新型 β -葡萄糖苷酶, 从而解决工业难题。【目的】从嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)基因组中挖掘新型 β -葡萄糖苷酶基因, 通过基因重组、异源表达和蛋白纯化技术制备新型 β -葡萄糖苷酶, 并探究其酶学性质, 为新型 β -葡萄糖苷酶在纤维素水解等领域的应用奠定基础。【方法】人工合成新型 β -葡萄糖苷酶基因 *bg152*, 构建重组表达质粒 pET22b-*bg152*, 并用电脉冲法转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中实现可溶性表达, 利用 Ni-NTA 亲和层析纯化得到高纯度的 β -葡萄糖苷酶 Bg152。【结果】实现重组表达质粒 pET22b-*bg152* 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的可溶性表达, 并获得 β -葡萄糖苷酶 Bg152 纯蛋白, 蛋白分子量为 52 kD, 在 70 °C 和 pH 6.5 条件下表现出最佳活性; 以 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG)为底物时的比酶活为 223.7 \pm 5.3 U/mg; K_m 为 9.3 \pm 1.2 mmol/L, V_{max} 为 270.3 \pm 4.3 μ mol/(min·mg); Bg152 偏好性水解 β -1,4 糖苷键的底物; Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶的激活作用明显, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和 SDS 可抑制其活性; Bg152 是少有的几种葡萄糖和木糖激活型 β -葡萄糖苷酶之一, 当反应体系中外源添加 0.2 mol/L 葡萄糖时可提升活力至 2.84 倍, 外源添加 0.4 mol/L 木糖时可提升活力至 3.24 倍, 同时 Bg152 在生理条件下基本不受产物的反馈抑制。【结论】利用嗜热微生物基因组中蕴藏的遗传信息资源, 通过现代生物技术方法, 可以从中挖掘到酶学性质优良的 β -葡萄糖苷酶, 为其在纤维素降解等工业领域的应用奠定基础。

关键词: 嗜热淀粉芽孢杆菌, β -葡萄糖苷酶, 重组表达, 酶学性质

Foundation items: Key Projects of Natural Science Research in Universities of Anhui Province (KJ2018A0426, KJ2019A0639); Open Laboratory Project of Collaborative Innovation Center of Modern Bio-Manufacture of Anhui University (BM2017003); Open Fund of Key Laboratory of Ministry of Agriculture Crop Gene Resources and Germplasm Creation in East China (ECG2018001)

***Corresponding author:** Tel: 86-550-3512035; E-mail: zwp_1020@163.com

Received: 11-01-2020; **Accepted:** 24-03-2020; **Published online:** 16-04-2020

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2018A0426, KJ2019A0639); 安徽大学现代生物制造协同创新中心实验室开放课题(BM2017003); 农业部华东作物基因资源与种质创制重点实验室开放基金(ECG2018001)

***通信作者:** Tel: 0550-3512035; E-mail: zwp_1020@163.com

收稿日期: 2020-01-11; **接受日期:** 2020-03-24; **网络首发日期:** 2020-04-16

Recombinant expression and characterization of β -glucosidase from *Bacillus thermoamylovorans*

LIU Yang^{1,2} PENG Hui² ZHANG Cuan¹ DONG Yi-Ning¹ SUN Xing¹ LUO Xia¹
CAI Hua¹ ZHAO Wei-Ping^{*1}

1 College of Biological and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000, China

2 Collaborative Innovation Center of Modern Bio-Manufacture, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China

Abstract: [Background] β -glucosidase (EC 3.2.1.21) is an important component of cellulase system. At present, most β -glucosidases used in industry come from plants and fungi, but few come from bacteria, and there are some problems such as low enzyme activity, poor thermal stability, narrow reaction conditions, products inhibition, which increase the economic cost. Thermophilic microorganisms have special genetic information resources, so it is possible to excavate novel β -glucosidases with good enzymatic characterization from the genome to solve the industrial problems. [Objective] A novel β -glucosidase gene was extracted from the genome of *Bacillus thermoamylovorans*, and purified protein was obtained by gene recombination, heterologous expression and protein purification. The enzymatic characterization was studied systematically. It can lay the foundation for the application of β -glucosidase in the fields of cellulose hydrolysis. [Methods] The recombinant plasmid pET22b-*bgl52* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) by electric pulse method. The recombinant protein was expressed in soluble form and purified by Ni-NTA affinity chromatography. [Results] The recombinant plasmid pET22b-*bgl52* was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified β -glucosidase Bgl52 protein was obtained. The molecular weight of the Bgl52 was 52 kD and it showed the best activity at 70 °C and pH 6.5. When *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) as substrate, the specific enzyme activity was 223.7 ± 5.3 U/mg, K_m was 9.3 ± 1.2 mmol/L, V_{max} was 270.3 ± 4.3 μ mol/(min·mg). Bgl52 preferred substrate for hydrolysis of β -1,4 glycosidic bond. Fe^{2+} and Mg^{2+} activated the enzyme activity obviously, Co^{2+} , Cu^{2+} and SDS inhibited the activity of enzyme. Bgl52 is one of the few glucose and xylose-activated glucosidases. A maximal 2.84-fold stimulation by glucose was observed at 0.2 mol/L, and a maximal 3.24-fold stimulation by xylose was found at 0.4 mol/L. At the same time, under physiological conditions, Bgl52 was not substantially inhibited by the feedback of the product glucose. [Conclusion] Using the genetic information resources contained in the genomes of thermophilic microorganisms, and through modern biotechnological methods such as gene synthesis, we can excavate the β -glucosidase with excellent enzymatic characterization, it lays a foundation for its application in cellulose degradation and other industrial fields.

Keywords: *Bacillus thermoamylovorans*, β -glucosidase, Recombinant expression, Enzymatic characterization

嗜热微生物是一类长期生存在高温环境下的微生物, 由于其基因组相对较小, 因此也是最早被测序的微生物之一^[1]。这些嗜热微生物基因组中存在大量未被研究的功能酶基因, 利用现代生物技术方法, 如基因克隆和基因合成等技术, 极有可能挖掘到新型功能酶, 对解决工业上的应用难题具有积极意义^[2]。

β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21, β -glucosidase), 是

纤维素分解酶系中的重要组成部分, 能够催化水解结合于末端非还原性的 β -D-糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基^[3]。 β -葡萄糖苷酶在自然界中分布广泛, 对维持生物体的正常生理功能和工业应用都有重要作用, 例如 β -葡萄糖苷酶可以与纤维素酶协同用来降解纤维素或作用于纤维素酶的产物纤维寡糖产生葡萄糖, 葡萄糖再经微生物发酵生产乙醇, 提供清洁能源^[4]; 也可以

在改善食品风味^[5-7]、大豆异黄酮转化^[8]、植物病虫害防御^[9]、疾病检测^[10]等领域发挥重要作用。目前,工业上应用的 β -葡萄糖苷酶多数来源于植物和真菌,来源于细菌的较少,且应用上还存在酶活力偏低、热稳定性差、反应条件适用范围窄、酶活力易受产物反馈抑制等问题,制约了其在工业上的应用,增加了经济成本^[11-12]。

本研究通过分析NCBI和CAZy数据库中来源于嗜热微生物嗜热淀粉芽孢杆菌基因组中的新型 β -葡萄糖苷酶(Bgl52)的氨基酸序列,挖掘具有潜在应用价值的 β -葡萄糖苷酶。通过优化密码子,人工合成 *bgl52* 基因序列并构建重组表达质粒,实现其在大肠杆菌 BL21(DE3)中的异源表达,获得有活性的高纯度 β -葡萄糖苷酶,并对其酶学性质展开系统研究,可为后期的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)和质粒 pET-22b 来自通用生物系统(安徽)有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

Ni-NTA 柱胶, Novagen 公司; *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG)、*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*p*NPGal)、*o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*o*NPG)、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*o*NPGal)、Cellobiose 和 Lactose, 阿拉丁生化科技股份有限公司; 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 其他常规试剂, 中国国药集团化学试剂有限公司。

电转化仪, Bio-Rad 公司; 超声波细胞粉碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 紫外分光光度计, UNICO 仪器有限公司。

1.3 序列分析与重组质粒构建

Bgl52 的氨基酸序列(AWI14273)来源于嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)基因组^[13], 由447个氨基酸残基构成。挑取糖苷水解酶

第一家族(glycoside hydrolases family 1, GH1)中的其中 5 条已有文献报道的 β -葡萄糖苷酶序列与 Bgl52 进行多序列比对, 其中 β -葡萄糖苷酶 MaBG (KU170546)来自 *Microcerotermes annandalei*^[14]; β -葡萄糖苷酶 Bgl6 (KP736171)来自一个宏基因组文库^[15]; β -葡萄糖苷酶 Bgl1A (GU647096)来自海洋微生物宏基因组文库^[16]; BglIP (KF453503)来自黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种 E13^[17]; AsBG1 (KY039184)来自 *Alicyclobacillus* sp. A4^[18]。蛋白质分子量预测使用在线翻译工具(<http://web.expasy.org/translate/>), 多序列比对依托在线分析软件 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)。

根据大肠杆菌对蛋白表达的密码子偏好性, 利用 DNAWorks 对 Bgl52 蛋白序列进行密码子优化, 然后进行 *bgl52* 基因序列(1 344 bp)人工合成, 序列两端分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 内切酶位点, 构建重组质粒 pET22b-*bgl52*。基因人工合成和重组质粒构建委托通用生物系统(安徽)有限公司完成。

1.4 异源表达与纯化

pET22b-*bgl52* 重组质粒电转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 37 °C 恒温培养 12 h 后挑取单克隆至含 50 μ g/mL 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的 5 mL LB 液体培养基中进行种子培养, 37 °C、220 r/min 培养, 待菌液 *OD*₆₀₀ 升至 1.0–1.5 时, 按照 1%的接种量接种到含 300 mL LB 液体培养基(含 50 μ g/mL Amp)的三角瓶中继续培养, 及时监测菌液浓度, 当 *OD*₆₀₀ 升至 0.6–0.8 时, 添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 条件下诱导表达 6–8 h。诱导结束后, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体进行冰浴超声破碎(400 W 超声, 工作时间 4 s, 间歇时间 6 s, 共 20 min)。破碎液在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 后收集的上清即为粗酶液。经 Ni-NTA 柱纯化获得 Bgl52 纯蛋白, 通过 SDS-PAGE 检测蛋白分子量和纯度, 蛋白浓度测定使用 BCA 法蛋白定量检测试剂盒。

1.5 酶学性质分析

1.5.1 最适反应条件测定

以 p NPG 为底物测定 Bgl52 的酶活, 反应体系 300 μ L, 包括 260 μ L 50 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.5)、30 μ L 50 mmol/L 的 p NPG (反应终浓度为 5 mmol/L)和 10 μ L 稀释后的酶液(加酶量 0.085 μ g), 对照组中不加酶液。70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 5 min 后, 加等体积(300 μ L)的 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应, 取反应液至比色皿中, 读取 OD_{410} 下的吸光值, 实验组与对照组分别做 3 个平行重复, 取平均值。以不同浓度条件下的对硝基苯酚(p NP)在 OD_{410} 下的吸光值制作标准曲线。

20–90 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 作为一个测量点, 比较各温度条件下的相对酶活, 确定最适反应温度; 配制 50 mmol/L pH 4.0–10.0 范围内的各类缓冲液, 其中 pH 4.0–5.0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-Citric acid}$)、pH 5.0–9.0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$)、pH 8.5–10.0 (Glycine-NaOH), 在最适温度下测定各个 pH 条件下的相对酶活, 确定最适反应 pH。

1.5.2 稳定性分析

将酶液在 60、65 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行孵育, 分时间段取样, 并在最适反应条件下测定残余酶活, 以未作处理的酶液在最适条件下测定的酶活作为对照, 分析其热稳定性; 用不同 pH 的缓冲液(pH 4.0–10.0)对酶液进行稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 48 h 后, 在最适条件下测定残余酶活, 以未作处理的酶液在最适条件下测定的酶活作为对照, 分析酶在不同 pH 条件下的稳定性。

1.5.3 金属离子和化学试剂对酶活的影响

在反应体系中添加终浓度为 5 mmol/L 的金属离子或添加终浓度为 1% 的化学试剂, 在最适反应条件下测定残余酶活, 以未添加金属离子和化学试剂的反应体系测定的酶活作为对照。

1.5.4 底物特异性分析

以终浓度为 5 mmol/L 的 p NPG、 p NPGal、 o NPG、 o NPGal 为底物, 最适反应条件下测定酶

活。其中以纤维二糖和乳糖作为底物时的终浓度为 1%, 产物检测使用葡萄糖检测试剂盒。

1.5.5 动力学参数测定

用 50 mmol/L pH 6.5 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, 分别配制不同浓度的 p NPG 溶液, 按照标准酶活力测定方法, 在最适条件下测定 Bgl52 在不同底物浓度下的酶活力, 根据米氏方程 Lineweaver-Burk 法计算 Bgl52 的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{\max} 。

1.5.6 各种糖对酶活力的影响

用 50 mmol/L pH 6.5 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液配制各种糖的母液(葡萄糖、木糖、纤维二糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖、果糖、蔗糖和阿拉伯糖), 母液浓度为 1 mol/L。反应体系中添加一定量的糖母液, 测定 0.1 mol/L 各种糖存在时 Bgl52 的酶活力, 以体系中未添加任何糖的试验组作为对照。

1.5.7 高浓度葡萄糖和木糖对酶活力的影响

在反应体系中添加不同浓度的葡萄糖或木糖溶液(0–4 mol/L), 在最适反应条件下测定酶活, 以未添加葡萄糖或木糖的试验组作为对照, 计算各个葡萄糖或木糖浓度下 Bgl52 的酶活力, 分析葡萄糖和木糖对 Bgl52 酶活力的影响。

1.6 数据处理方法

每个试验数据均独立进行 3 次, 取平均值, 且每次独立试验均设置 3 组平行; 图表绘制采用 Origin 2017 软件。

2 结果与分析

2.1 序列分析

Bgl52 蛋白的理论分子量为 52 kD。BLAST 结果显示, Bgl52 的氨基酸序列和糖苷水解酶 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶有较高的序列一致性。其中 Bgl52 与 *Bacillus* sp. 7586-K 来源的 β -葡萄糖苷酶(PAD70304)具有最高的相似性(74.05%), 但是该酶的酶学性质未见报道。多序列比对结果如图 1 所示, Bgl52 和挑选的这 5 条 β -葡萄糖苷酶序列都拥

MaBG	-----MAALEFPAGFLFGTATSAYQIEGAWKEDGKGESMWDRLTTHDHEPI IKDKSTGD	53
Bg16	---MTSDTARSYRFPPEGFLWGAATAAYQIEGSSMADGAGESIWDRFSH-TPGNMKDGDGTGD	57
Bg11A	MTKISLPTCSPLLTKEFIYGVATASFQIEGSSA---HRLPCIWDTFCD-TPGKIADNSNGH	57
Bg152	-----MAIIQLPKDFQWGVATAAYQIEGAYNEDGRGLSIWDTFSH-TPGKVRNGDNGD	52
Bg1P	-----MLQFPKDFIWGAATSSYQIEGTATGGDKIYSIWDFSR-IPGKVANGDNGD	50
AsBG1	-----MSQNLSPDDFIWGAATASYQIEGAAAEDGRGPSIWDTFSK-TPGKVLHGHTGD	53
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	VACNSYHLYKEDVRMLKELGVNFYRFSVSWSRILPTGHDNVVNQAGIAYNNLINELIAN	113
Bg16	VACDHYNRWREDIELMKRLNLQAYRFSVSWSRVLPQGRGA-INPKGLAFYDRLVDGLLEA	116
Bg11A	VACDHYNNWKQIDILIESLGVDAYRLSISWPRVITK-SGE-LNPEGVKFYTDILDELKKR	115
Bg152	IACDSYHRYKEDIKLMKELGVDIYRFSISWPRIFPTGRGP-VNSKGLEFYHHFVDELIAN	111
Bg1P	IAIDHYNRYIDVALMKALHLKAYRFSSTWARLYTETPGK-FNEKGLDFYKRLVHELLEN	109
AsBG1	IACDHYHRYESDVKLMAELGIRSYRFSLAWPRVFFA-KGK-VLDNGFDFYKRLLEQLHKH	111
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	GIQPMVIMYHFDLPQPLQDLGGWTNPVLANYFEDYARVLYANFGDRVKKWNTINEPQIHA	173
Bg16	GIEPLATLYHWDLPALDDRGWLNPDADWFADYGVLFKFKGRVKTWGTINEPWVIV	177
Bg11A	NIKAFVTLYHWDLPQHLEDEGGWLNRETAFAHYVDLITLAFGDRVHSYATLNEPFCSA	175
Bg152	GIEPMCTLYHWDLPQSLQDITGGWANREVVEAFVEYSTFIFKEFNGKIKKWITINEPWCIS	171
Bg1P	DIEPMLTIYHWDMPQALQKGGWENRDIVHYFQYAAFLYENLGDVVRKWITHNEPWWVT	169
AsBG1	GITPAATLYHWDLPQWIEDEGGWSNRAVVDDYLEFAEKAFRELGDQIPMWITHNEPWCAS	171
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	MGYSEPFGLAPNLTTPGHG---QYLAVHTFLLSHARAYRLYEREFKAKQGGKVSIVPGG	229
Bg16	DGGYL---HGALAPGHRSAYEAVIAGHNVLRAHGAAVRRFREVG---EGQIGIVLNI	227
Bg11A	FLGYE---IGIHAPGKVGKQYGRKAAHLLLAHGLAMTVLKQNS--P-TTLNGIVLNF	227
Bg152	FLSNY---EGKHAPGNHNLQLAVTISHHLLLAHGKAVKAFRNLG--I-EGEIGYAPNV	223
Bg1P	YLGYG---NGEHAPGIQNFSTFLKAAHHVLLSHGEAVKAFRAIG--PKDGEIGITLNL	222
AsBG1	LLSYG---IGEHAPELRDWRRAAHHLLLAHGEAVKLYRSLG--L-KGEIGITLNL	223
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	FWMQPTSDSK-DEEEAARAQEMQLGWVLPYISATGDYPPVMKEWMAKKSKEEGYSRSR	288
Bg16	EPKYPASDKP-EDEAARRRAEAQMNRWFLDPLMG--RGYPEELTDVYG-----AA	274
Bg11A	TPCYSISEDA-DDIAATAFADDYLNQWYMKPIMD--GTYPATIEQLPS-----AH	274
Bg152	EWIEPSSSKQ-EDQDACHRMGIFIEWFFDPVFK--GKYPDFMLDWFEQ-----NGA	272
Bg1P	TPGYAFDPQDEKAVDAARKWDGFMNRWFLDPVFK--GQYPKDMLEVYKDY-----LPN	273
AsBG1	TPAYSASDSP-QDVAAAARQDCFANRWFLDPLFK--GEYPAEFMERVERF-----CGD	273
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	LPSFTKEEIEVMVKGTDWYDLGLNHYTTFFTLQSKESMFLKDTGVANIQDDKYPASAASEWL	348
Bg16	WREFPKEDFELIAEPTDWMGLNWNVTRAVPENAPDA-WPTR---SRPVRQTQHAHTETGW-	329
Bg11A	LPDIHGDMAIISQSIDYLGINFYTRQFYKAHPT-----E---IYEPTEPTGPLTDMGW-	325
Bg152	VPEIQEGDMQMISQPIDFVGINFYTGSGVGRYNK--EAGLL---EVEKINIGYQTTDIGW-	326
Bg1P	--IYQEGDLQTIQQPIDFFGFNYSTATLKDWWKGEREPI---VFEHVSTGRPVTDMMNW-	327
AsBG1	LDVVRPGDMEAIATKMDFLGINFYTRSLVADDPN--DPLL---GVKHLKTDNPNVTDMMGW-	327
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	QVVPWGFRLKLLNWIACK-YNNPPIVITENGFI-----SDHGELNDRDRVNYLTLYLCEL	400
Bg16	EVYPPALTDTLVWLSEQTGGKLPMLVTENGSAWYDPPHAI DGR IHDPMRVHYLQTHIKAL	389
Bg11A	EIYPKSFTTELLVTLNNT-YTLPPIFIITENGAAMPDS-Y-NNGEINDVDRLDYNSHLNAV	382
Bg152	NIYPEGFYKVLNKNINQ-YGNIPYITENGAACYNDE-V-INGRVKDEGRIEYLYKQHLTSI	383
Bg1P	EVNPNGLFDLMMRLKND-YGDIPLYITENGAAYKDY-VNEQGEVEDNERIAYIREHLIAC	385
AsBG1	EVYPDALYDLLHRLQKD-YTDLPIYITENGAASADV-V-EDGNVHDADRIAYLHQHLEAA	384
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	LKAVKDDGCNVIGYTVWLSLMDNFEWPSGYTEKFLGHVDFNDPDRKRTAKKSAEVYSQII	460
Bg16	HDA-IGKGVDLRGYMAWSLLDNLEWSLGYSKRFGIVHVNFAATQ-ERTIKDSGLLYAEVI	446
Bg11A	HNA-TEQGVRIIDGYFAWSLMDNFEWAEGYLRFGIVYVDYSTQ--QRTIKNSGLAYKALI	439
Bg152	RRS-IETGVNIKGYFAWSLLDNFEWAEGYDMRFLVHINFHTL--ERTKKDSYVYWKKIV	440
Bg1P	HRA-IEQGVNLKGYVWSLFDNFEWAFGYDKRFGIYVDYETL--ARIPKKSALWYKETI	442
AsBG1	RKF-ISEGGNLKGYLWSLLDNFEWAFGYTKRFGIYVDYDTQ--ERIPKDSFEWYRQVI	441
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
MaBG	KNKKIPVEFAEG- 472	
Bg16	KTHGDVNLNTL--- 456	
Bg11A	SNR----- 442	
Bg152	RNRWFEI----- 447	
Bg1P	MNHGVK----- 448	
AsBG1	AANSLPETVQGTV 454	

图 1 Bgl52 和 GH1 家族其他成员的氨基酸保守序列比对

Figure 1 The conserved amino acid sequences alignment between Bgl52 and members of the GH1 family

有 GH1 家族典型的保守序列 NEP 和 TENG, 其中保守的两个谷氨酸 Glu166 和 Glu353 分别作为酸/碱基团和亲核基团。

2.2 重组表达与纯化

将重组表达质粒 pET22b-*bgl52* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经 IPTG 诱导表达、Ni-NTA 亲和层析纯化, 获得 Bgl52 纯蛋白。SDS-PAGE 检测结果(图 2)显示, 与含 pET-22b 空载体的大肠杆菌 BL21(DE3)破碎液上清相比, 含重组质粒 pET22b-*bgl52* 的大肠杆菌 BL21(DE3)破碎液上清在 52 kD 左右的位置有一条明显条带, 与理论上预测的 Bgl52 蛋白分子量一致, Ni-NTA 柱纯化后的蛋白浓度为 0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.3 酶学性质

2.3.1 最适反应条件和稳定性

Bgl52 的最适反应温度曲线如图 3A 所示,

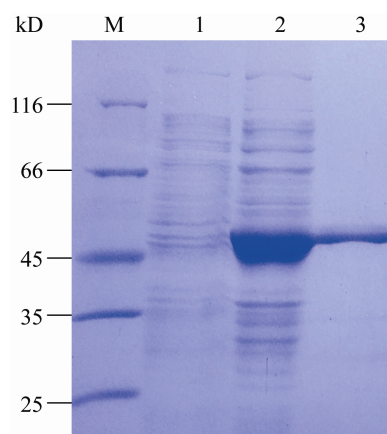


图 2 重组蛋白 Bgl52 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant Bgl52

注: M: 蛋白 Marker; 1: 含 pET-22b 空载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 破碎液上清; 2: 含重组质粒 pET22b-*bgl52* 的大肠杆菌 BL21(DE3)破碎液上清; 3: Bgl52 纯蛋白。

Note: M: Protein Marker; 1: Cell extract of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-22b; 2: Cell extract of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET22b-*bgl52*; 3: Purified Bgl52 enzyme.

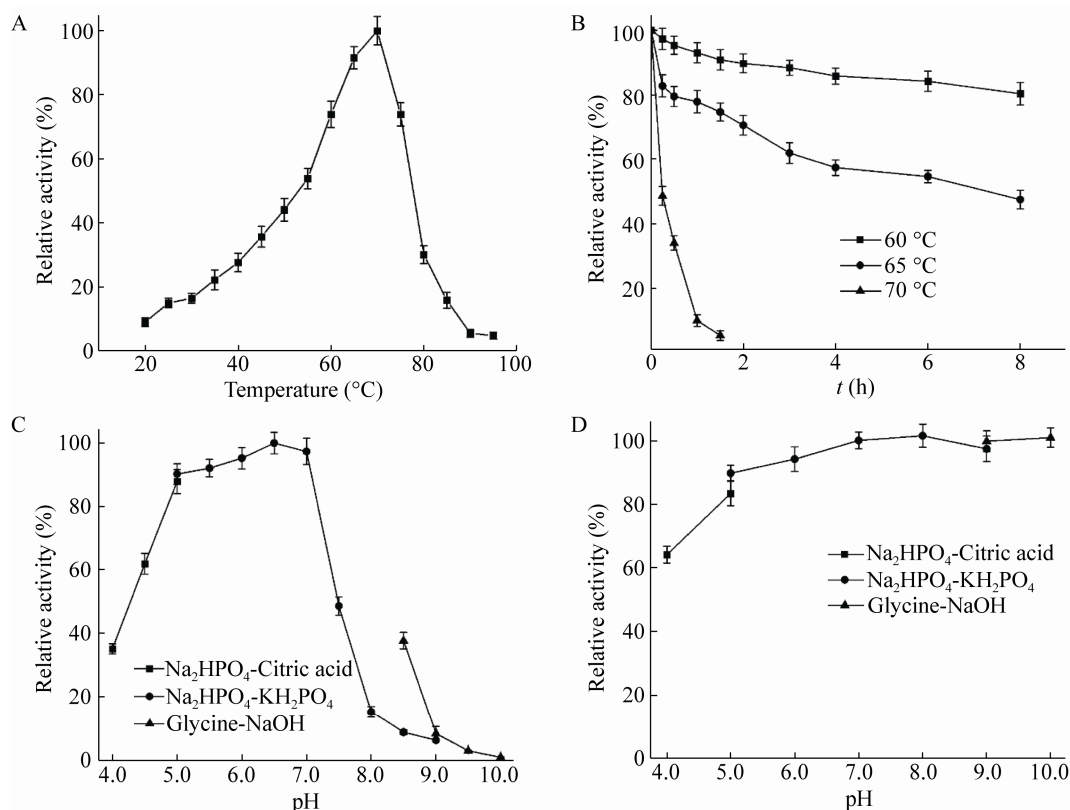


图 3 Bgl52 的最适反应条件及其稳定性

Figure 3 Optimal conditions and stability of Bgl52

注: A: 最适反应温度; B: 热稳定性; C: 最适反应 pH; D: pH 稳定性。

Note: A: Optimal reaction temperature; B: Thermal stability; C: Optimal reaction pH; D: pH stability.

20–70 °C 温度范围内, 酶的活力随着反应温度的升高而升高, 70 °C 时展现出最高活性; 随着温度的继续升高, 酶活力逐渐降低, 90 °C 时基本失活。热稳定性结果如图 3B 所示, Bgl52 在 60 °C 条件下孵育 8 h 后仍保留 80% 以上的活力; 在 65 °C 条件下的半衰期为 7 h; 70 °C 条件下稳定性有所下降, 1 h 后仅保留 10% 的活力, 半衰期为 15 min。最适反应 pH 试验结果如图 3C 所示, Bgl52 在 pH 6.5 时酶活最高, 在 pH 4.5–7.5 范围内可表现出 50% 以上的活力, 说明 Bgl52 发挥活力的酸碱范围较为广泛。pH 稳定性如图 3D 所示, Bgl52 在 pH 4.0 和 pH 5.0 的酸性环境下 4 °C 保存 48 h 后, 剩余酶活力分别为 82% 和 91%; 在 pH 8.0–10.0 的碱性环境下 4 °C 保存 48 h 后, 剩余酶活力均在 98% 以上, 说明 Bgl52 具有很好的酸碱环境适应性, 尤其是在碱性环境下的稳定性更好。

2.3.2 底物水解特异性和酶动力学分析

分别测定 Bgl52 在以 5 mmol/L 的 *p*NPG、*p*NPGal、*o*NPG、*o*NPGal 和 1% 的 Cellobiose 和 Lactose 为底物条件下的酶活力, 结果如表 1 所示, Bgl52 对供试的几种人工合成或天然的底物均具有一定的水解能力, 展现出较为广泛的底物水解特性。其中, 在以 *p*NPG 为底物时的酶活最高, 其次为纤维二糖和 *p*NPGal, 说明 Bgl52 对 β -糖苷键具有一定的水解偏好性, 尤其对 β -1,4 糖苷键底物的水解能力要高于 β -1,2 糖苷键底物。Bgl52 在以 *p*NPG 为底物时的比酶活达 223.7 ± 5.3 U/mg, 根据米氏方程 Lineweaver-Burk 法得出其米氏常数 K_m 值和最大反应速率 V_{max} 分别为 9.3 ± 1.2 mmol/L 和

270.3 ± 4.3 μ mol/(min·mg)。

2.3.3 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

金属离子和化学试剂对 Bgl52 酶活力的影响如图 4 所示, 金属离子和化学试剂对 Bgl52 酶的活性均有不同程度的影响, 其中 5 mmol/L Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶的激活作用最为明显, 而 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和 SDS 对酶活力则具有明显的抑制作用。

2.3.4 各种糖对酶活力的影响

各种糖对 Bgl52 酶活力的影响结果如图 5 所示, 测试用的 9 种糖(终浓度为 0.1 mol/L)对酶的活力均没有抑制作用, 相反还表现出一定的激活作用, 尤其是葡萄糖和木糖对酶的激活作用最为明显。0.1 mol/L 的葡萄糖和木糖可分别将 Bgl52 的酶活提高至 2.77 倍和 2.71 倍。

2.3.5 高浓度葡萄糖和木糖对酶活的影响

进一步探索葡萄糖和木糖对 Bgl52 酶活力的影响, 试验测定了 0–4 mol/L 范围内不同浓度葡萄糖和木糖对 Bgl52 酶活力的影响。结果如图 6 所示, 随着葡萄糖浓度的升高, 酶活力开始不断提升, 当葡萄糖浓度为 0.2 mol/L 时, 对 Bgl52 的激活效果达到最高, 可将酶活力提升至 2.84 倍; 随着葡萄糖浓度的继续升高, 激活作用逐渐减弱, 当葡萄糖浓度达到 1.1 mol/L 左右时, 开始抑制 Bgl52 的酶活; 木糖浓度在 0.4 mol/L 时对 Bgl52 的激活效果最好, 可提升酶活至 3.24 倍。图 6 还显示, 当体系中葡萄糖和木糖的浓度分别为 1.5 mol/L 和 1.9 mol/L 时, Bgl52 仍可表现出 50% 以上的酶活, 表明 Bgl52 在生理条件下基本不受产物的反馈抑制。

表 1 Bgl52 对各种底物的水解活性

Table 1 Hydrolysis activities of Bgl52 on various substrates

底物 Substrate	糖基连接 Linkage of glycosyl group	相对酶活 Relative activity (%)
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (<i>p</i> NPG)	(β -1,4) Glucose	100
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (<i>p</i> NPGal)	(β -1,4) Galactose	38.8 ± 3.4
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (<i>o</i> NPG)	(β -1,2) Glucose	24.9 ± 2.1
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (<i>o</i> NPGal)	(β -1,2) Galactose	15.9 ± 1.6
Cellobiose	(β -1,4) Glucose	59.5 ± 3.2
Lactose	(β -1,4) Galactose	19.5 ± 1.9

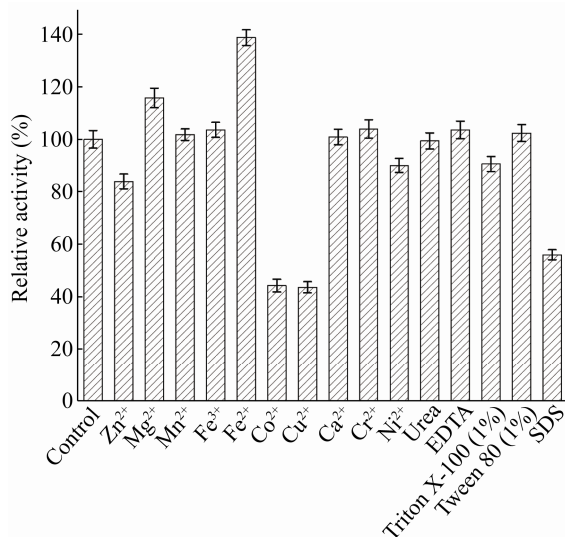


图4 金属离子和化学试剂对 Bgl52 酶活力的影响
Figure 4 Effects of metal ions and reagents on activities of Bgl52

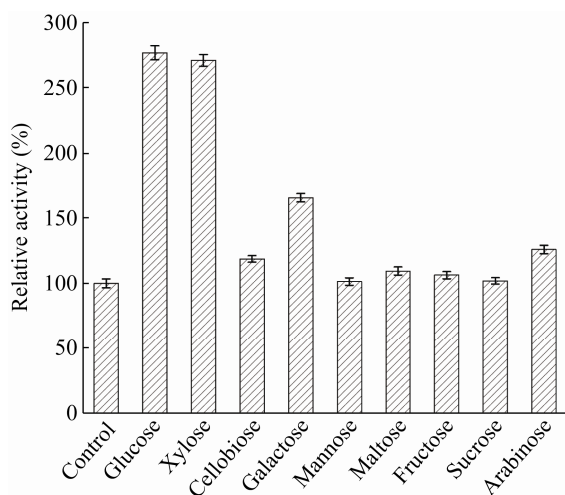


图5 各种糖对 Bgl52 酶活力的影响
Figure 5 Effects of various sugars on activities of Bgl52

3 讨论与结论

本研究从嗜热淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus thermoamylovorans*) 基因组中检索到一个 β -葡萄糖苷酶(Bgl52)的氨基酸序列, 经密码子优化和人工合成, 获取基因序列并构建重组表达质粒 pET22b-bgl52, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功实现可溶性表达, 经 Ni-NTA 柱纯化获得纯蛋白。

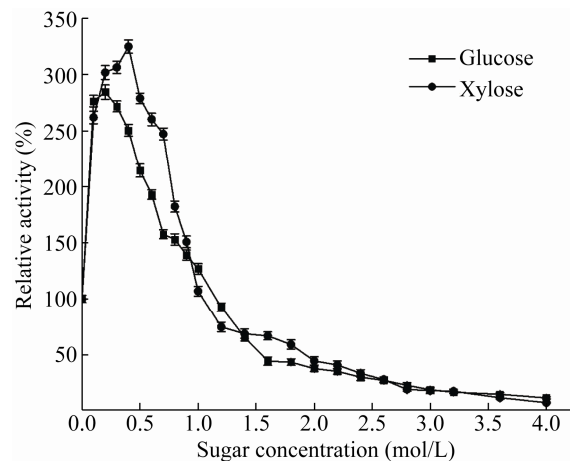


图6 葡萄糖和木糖对 Bgl52 酶活力的影响
Figure 6 Effects of glucose and xylose on activities of Bgl52

多序列比对结果表明, Bgl52 与其他糖苷水解酶 GH1 家族来源的 β -葡萄糖苷酶具有相同的保守序列和保守氨基酸位点, 属于 GH1 家族成员。

Bgl52 的蛋白分子量为 52 kD, 在 70 °C 和 pH 6.5 条件下表现出最高活性。Bgl52 的最适反应温度高于其他来源的一些 β -葡萄糖苷酶, 同时最适反应 pH 偏酸性, 目前大多数已报道的 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 也以酸性或中性居多。如来源于宏基因组文库的 β -葡萄糖苷酶 Ks5A7 的最适温度为 45 °C, pH 5.0–6.5 条件下活性最佳^[19]; 来自于黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种的 β -葡萄糖苷酶 BglP 的最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 7.0^[17]; 来源于嗜热厌氧杆菌的 β -葡萄糖苷酶 BGL 在 60 °C 和 pH 6.0 时活性最高^[20]; 来源于南极土壤样品的 β -葡萄糖苷酶 EaBgl1A 的最适反应温度为 30 °C^[21]; 来源于嗜热菌 *Talaromyces thermophilus* 的 β -葡萄糖苷酶 Bgl.tls 在 pH 5.0 和 65 °C 条件下表现出最佳活性^[22]; 来源于枯草杆菌的 BGL 的最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 为 6.0^[23]。

本实验得到的 Bgl52 也具有良好的热稳定性和酸碱稳定性, 60 °C 条件下孵育 8 h 仍保留 80% 以上的活力; 65 °C 条件下的半衰期为 7 h。Bgl52 具有良好的酸碱环境适应性, 尤其是在碱性环境

下的稳定性更好,与其他来源的 β -葡萄糖苷酶相比具有一定的优势。例如来源于枯草芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶BGL,在60 °C条件下孵育1 h后的酶活仅保留85%^[23];来源于海洋链霉菌的 β -葡萄糖苷酶r-BglNH,在45 °C条件下孵育1 h,仅保留40%的活力^[24];来源于黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种的 β -葡萄糖苷酶BglP在65 °C情况下孵育2.0 h后仅保留50%的活力^[17]。在工业应用中,酶促反应通常在高温进行,高温条件可以提高酶的转化速率、减小反应液粘度,还可以防止杂菌污染,所以耐高温酶在工业应用中具有明显优势^[25]。酶学性质分析表明Bgl52具有相对较高的最适反应温度、热稳定性和酸碱环境下的稳定性,具有很好的工业应用潜力。

我们获得的Bgl52对天然和人工合成的底物具有较为广泛的水解能力,其中以对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)为底物时酶活最高,同时也可以高效水解纤维二糖。Bgl52对含 β -1,4糖苷键的底物具有水解偏好性,该特征与黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种来源的 β -葡萄糖苷酶BglP较为相似。Bgl52在以pNPG为底物时的比酶活为 223.7 ± 5.3 U/mg, K_m 为 9.3 ± 1.2 mmol/L, V_{max} 为 270.3 ± 4.3 μ mol/(min·mg),与其他一些嗜热微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相比,Bgl52在以pNPG为底物时的比酶活与来源于嗜热镰刀菌的 β -葡萄糖苷酶(8.9 U/mg)^[26]和嗜热厌氧杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶BGL (103.8 U/mg)^[20]相比都具有一定的优势,但是要低于来源于黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种的 β -葡萄糖苷酶BglP (842 ± 15.5 U/mg)^[17]。金属离子和化学试剂对Bgl52活性有不同程度的影响,其中 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶的激活作用最为明显, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 和SDS可强烈抑制其活性。该性质与其他来源的 β -葡萄糖苷酶有所区别,如来源于黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种的 β -葡萄糖苷酶BglP在5 mmol/L金属离子存在时酶活不会受到明显的抑制或增强^[17],而来源于嗜热厌氧杆菌的 β -葡萄糖

苷酶BGL在5 mmol/L Fe^{2+} 存在时会强烈抑制其活性^[20]。

已有研究表明,高效的纤维素糖化是从木质纤维素生物质中生产乙醇的关键环节,大多数 β -葡萄糖苷酶活性都易受到产物的反馈抑制,需要较高的酶负荷才能达到一定的水解效率,从而增加了生产成本,具有高催化效率的葡萄糖激活型 β -葡萄糖苷酶在应用中具有很高的价值,尤其是那些使用简便的表达系统以低成本生产的酶^[22]。纤维素水解过程中可产生大量的葡萄糖和木糖,因此,葡萄糖和木糖刺激型 β -葡萄糖苷酶对提高纤维素水解效率是非常有利的,Bgl52正是符合这一特征的 β -葡萄糖苷酶。Bgl52也是目前少有的几个可以同时被葡萄糖和木糖激活的 β -葡萄糖苷酶之一^[17,26-27],当葡萄糖和木糖浓度为0.1 mol/L条件下,可分别将Bgl52酶活力提升至2.77倍和2.71倍,葡萄糖浓度在0.2 mol/L时激活效果最高可达2.84倍,木糖浓度在0.4 mol/L时激活作用可达3.24倍;同时Bgl52还表现出良好的葡萄糖和木糖耐受性,当体系中葡萄糖和木糖的浓度分别为1.5 mol/L和1.9 mol/L时,Bgl52仍可表现出50%以上的酶活。本研究结果可为Bgl52在纤维素水解等相关工业领域的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Counts JA, Zeldes BM, Lee LL, et al. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2017, 9(3): e1377
- [2] Donati ER, Castro C, Urbieta MS. Thermophilic microorganisms in biomineralization[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(11): 179
- [3] del Cueto J, Møller BL, Dicenta F, et al. β -Glucosidase activity in almond seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 126: 163-172
- [4] McDonald JE, Houghton JN, Rooks DJ, et al. The microbial ecology of anaerobic cellulose degradation in municipal waste landfill sites: evidence of a role for fibrobacters[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(4): 1077-1087
- [5] Wang HT, Yang JT, Chen KI, et al. Hydrolyzation of mogrosides: Immobilized β -glucosidase for mogrosides

- deglycosylation from Lo Han Kuo[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(2): 834-843
- [6] Asati V, Sharma PK. Purification and characterization of an isoflavones conjugate hydrolyzing β -glucosidase (ICHG) from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar)[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2019, 20: 100669
- [7] Nguyen TTH, Seo C, Kwak SH, et al. Enzymatic production of steviol glucosides using β -glucosidase and their applications[A]/Kuddus M. Enzymes in Food Biotechnology[M]. London: Academic Press, 2019: 405-418
- [8] Yang SQ, Wang LJ, Yan QJ, et al. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1247-1252
- [9] Pentzold S, Jensen MK, Matthes A, et al. Spatial separation of the cyanogenic β -glucosidase ZfBGD2 and cyanogenic glucosides in the haemolymph of *Zygaena* larvae facilitates cyanide release[J]. Royal Society Open Science, 2017, 4(6): 170262
- [10] Zhou X, Huang Z, Yang HW, et al. β -Glucosidase inhibition sensitizes breast cancer to chemotherapy[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 504-509
- [11] Rahikainen JL, Martin-Sampedro R, Heikkinen H, et al. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption[J]. Bioresource Technology, 2013, 133: 270-278
- [12] Rahikainen JL, Moilanen U, Nurmi-Rantala S, et al. Effect of temperature on lignin-derived inhibition studied with three structurally different cellobiohydrolases[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 118-125
- [13] Cai L, Zheng SW, Shen YJ, et al. Complete genome sequence provides insights into the biodrying-related microbial function of *Bacillus thermoamylovorans* isolated from sewage sludge biodrying material[J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 141-149
- [14] Arthornthurasuk S, Jenkhetkan W, Suwan E, et al. Molecular characterization and potential synthetic applications of GH1 β -glucosidase from higher termite *Microcerotermes annandalei*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 186(4): 877-894
- [15] Cao LC, Wang ZJ, Ren GH, et al. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 202
- [16] Fang Z, Fang WM, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(9): 1351-1358
- [17] Liu Y, Li R, Wang J, et al. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose-and xylose-stimulated β -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13^T[J]. BMC Biochemistry, 2017, 18(1): 4
- [18] Cao HF, Zhang YQ, Shi PJ, et al. A highly glucose-tolerant GH1 β -glucosidase with greater conversion rate of soybean isoflavones in monogastric animals[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(6): 369-378
- [19] Uchiyama T, Yaoi K, Miyazaki K. Glucose-tolerant β -glucosidase retrieved from a Kusaya gravity metagenome[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 548
- [20] Yang F, Yang XF, Li Z, et al. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(21): 8903-8915
- [21] Crespin E, Zaphorlin LM, de Souza FHM, et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 375-380
- [22] Mallek-Fakhfakh H, Belghith H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides[J]. Carbohydrate Research, 2016, 419: 41-50
- [23] Chamoli S, Kumar P, Navani NK, et al. Secretory expression, characterization and docking study of glucose-tolerant β -glucosidase from *B. subtilis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 425-433
- [24] Mai ZM, Yang J, Tian XP, et al. Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced β -glucosidase from a marine *Streptomyces*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(5): 1512-1522
- [25] Berlin A. No barriers to cellulose breakdown[J]. Science, 2013, 342(6165): 1454-1456
- [26] Zanoelo FF, Polizeli MLTM, Terenzi HF, et al. β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 240(2): 137-143
- [27] Souza FHM, Meleiro LP, Machado CB, et al. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose-and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 106: 1-10