



研究报告

β -葡萄糖苷酶 Bgl747 的定向筛选、重组表达与酶学性质

戴爽 李荷*

广东药科大学 广东 广州 510006

摘要:【背景】 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC3.2.1.21)是3种纤维素酶中的重要成分之一。目前工业用纤维素酶大都来源于木霉等真菌,较少来源于细菌,而且在应用中还存在反应条件(温度、pH等)适用范围窄、酶活力较低、获取成本偏高等问题,这大大限制了 β -葡萄糖苷酶的应用。从秸秆还田土壤细菌中筛选 β -葡萄糖苷酶有极大地可能性筛选出酶学性质较好的酶,从而解决现存的工业问题。【目的】从土壤中筛选 β -葡萄糖苷酶,通过基因重组、表达优化和蛋白纯化获得一株新型 β -葡萄糖苷酶,探究其酶学性质,为其在工业上的应用奠定基础。【方法】利用功能筛选法从土壤中筛选出 β -葡萄糖苷酶,全长为747 bp,命名为Bgl747,构建重组表达质粒pET-28a-Bgl747,以*Escherichia coli* BL21(DE3)为宿主菌株,经IPTG诱导实现可溶性表达并优化表达条件,通过His标签蛋白纯化试剂盒纯化获得纯化酶,探究其酶学性质。【结果】 β -葡萄糖苷酶Bgl747属于BglB超家族,分子量为27.23 kD,最适反应温度为45 °C,最适pH 4.0;最佳诱导条件:当 OD_{600} 为1.0,加入终浓度为0.6 mmol/L的IPTG,于37 °C、220 r/min诱导10 h后 β -葡萄糖苷酶Bgl747蛋白获得最高表达量1.82 mg/mL;底物为对硝基苯- β -D-半乳糖苷(p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, pNPG)时的比酶活225.07 U/mg,米氏常数 K_m 值和最大反应速率 V_{max} 分别为0.268 mmol/L、547.23 μ mol/(L·min);1 mmol/L K^+ 、1 mmol/L和10 mmol/L Fe^{2+} 、30%甲醇、30%乙醇、1 mmol/L和10 mmol/L盐酸胍对酶活都有促进作用,30% TritonX-100及10 mmol/L SDS抑制其酶活效果较为明显;该酶受到产物葡萄糖的反馈抑制,葡萄糖浓度越高,抑制效果越明显,但当葡萄糖浓度为1 mol/L时,酶活仍保持50%以上。【结论】Bgl747反应温度范围较广且稳定,酶学性质优异,为其在纤维素降解等工业应用奠定基础。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 秸秆, 功能筛选, 重组表达, 酶学性质

Targeted screening, recombinant expression and enzymatic properties of β -glucosidase Bgl747

DAI Shuang LI He*

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract: [Background] β -glucosidase (EC3.2.1.21) is one of the important components of the three

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31971384); Guangzhou Science and Technology Project (201802030009); Innovation and Strengthening School Project of Guangdong Pharmaceutical University (2016KTSCX067, 2016SFKC_28); Science and Technology Project of Guangdong Province (2017A010105011, 2014A020208134)

*Corresponding author: E-mail: lihe32@163.com

Received: 23-11-2020; **Accepted:** 11-03-2021; **Published online:** 19-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31971384); 广州市科技计划(201802030009); 广东药科大学创新强化学校项目(2016KTSCX067, 2016SFKC_28); 广东省科技计划(2017A010105011, 2014A020208134)

*通信作者: E-mail: lihe32@163.com

收稿日期: 2020-11-23; **接受日期:** 2021-03-11; **网络首发日期:** 2021-04-19

cellulase enzymes. At present, most of the industrial cellulase are derived from fungi such as *Trichoderma*, and less derived from bacteria, and there are still problems in application such as narrow application range of reaction conditions (such as temperature, pH), low enzyme activity, and high acquisition cost. These greatly limit the application of β -glucosidase. Screening β -glucosidase from soil bacteria has a great possibility to screen out enzymes with better enzymatic properties, thus solving existing industrial problems. **[Objective]** Use functional screening method to screen β -glucosidase from soil, obtain a new type of β -glucosidase through gene recombination, expression optimization and protein purification, explore its enzymatic properties, and its industrial application lay the foundation. **[Methods]** The β -glucosidase was screened from the soil by the functional screening method. Because its full length is 747 bp, it was named Bgl747, and the recombinant expression plasmid pET-28a-Bgl747 was constructed with *Escherichia coli* BL21(DE3). Induced by IPTG to achieve soluble expression and optimize expression conditions, the purified enzyme was purified by His-tag protein purification kit, and its enzymatic properties were explored. **[Results]** β -glucosidase Bgl747 as part of the BglB superfamily, its molecular weight is 27.23 kD, and an optimal pH of 4.0, an optimal reaction temperature of 45 °C; The optimal induction conditions are: when OD_{600} 1.0, add the final concentration IPTG 0.6 mmol/L, the highest expression level of β -glucosidase Bgl747 protein was 1.82 mg/mL after being induced at 37 °C and 220 r/min for 10 h. The specific enzyme activity when the substrate is p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNPG) is 225.07 U/mg, the Michaelis constant K_m value and the maximum reaction rate are respectively 0.268 mmol/L, 547.23 μ mol/(L·min); 1 mmol/L K^+ , 1 mmol/L and 10 mmol/L Fe^{2+} , 30% methanol, 30% ethanol, 1 mmol/L and 10 mmol/L guanidine hydrochloride all have a promoting effect on enzyme activity, 30% TritonX-100 and 10 mmol/L SDS inhibits enzyme activity more obviously; The enzyme is feedback inhibition by the product glucose, the greater the glucose concentration, the more obvious the inhibitory effect, but when the glucose concentration is 1 mol/L, the enzyme activity remains above 50%. **[Conclusion]** Bgl747 has a wide and stable reaction temperature range and excellent enzymatic properties, and lays the foundation for its industrial applications such as cellulose degradation.

Keywords: β -glucosidase, straw, functional screening, recombinant expression, enzymatic properties

β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)是一种糖苷水解酶,能够水解芳香基或羟基与糖苷键间的 β -1,4-糖苷键,从而生成葡萄糖^[1]。 β -葡萄糖苷酶目前已被用于化学工业^[2]、食品^[3]、医药^[4]等各个领域。在纤维素水解过程中,纤维二糖被 β -葡萄糖苷酶水解成葡萄糖分子,形成有机肥料,可供植物吸收,因此加速纤维素降解的关键酶是 β -葡萄糖苷酶。目前,大多数 β -葡萄糖苷酶都来自植物和真菌,而且来源于细菌的 β -葡萄糖苷酶存在反应条件适用范围窄、酶活力普遍较低、热稳定性差等问题。因此筛选获得催化效率高、酶学性质优异的 β -葡萄糖苷酶具有重要的现实意义。

秸秆还田是指将秸秆直接施入田地里,利用秸秆作为作物生长的养分。这些肥料不仅可以增加土壤有机质,还能改善土壤的结构。秸秆还

田土壤中存在大量的微生物^[5-6],功能丰富、增殖速度快、适应能力强是它们的特点,因而利用微生物降解秸秆具有广阔的应用前景^[7]。农作物秸秆的纤维结构较为复杂,其降解过程需要多种纤维素酶共同完成,而促进纤维素降解的关键酶是 β -葡萄糖苷酶,因此其他纤维素酶与从秸秆还田土壤中筛选的 β -葡萄糖苷酶构成了秸秆降解菌,这大大解决了焚烧秸秆所造成的环境污染等问题。

利用功能筛选法从黑龙江省牡丹江市郊区玉米秸秆还田土壤中获得了一株 β -葡萄糖苷酶,经载体构建并在大肠杆菌中表达,通过诱导及表达条件优化获得纯度较高的 β -葡萄糖苷酶,对其酶学性质进行研究,以期工业应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (克隆菌株)与 *E. coli* BL21 (表达菌株)由本实验室-80 °C 保存,表达载体质粒 pET-28a 购自 Novagen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒(E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit), Omega 公司; His 标签蛋白纯化试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、定量 DNA Marker, TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶, Fermentas 公司; 氨苄青霉素(Amp)、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), Sigma 公司; p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (pNPG)、七叶苷、柠檬酸铁铵, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 酵母提取粉(Yeast Extract)、胰蛋白胍(Tryptone), Oxoid 公司。

基因测序及 PCR 引物合成由广州艾基生物技术有限公司完成。

PCR 扩增仪, BA 公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 酶标仪, Bio-Tek 公司。

1.3 定向筛选

称取 10 g 土壤样品,放入 250 mL 锥形瓶中,加入 90 mL 无菌水,28 °C、180 r/min 摇床上充分振荡 20 min,使样品中微生物充分分散于水中。取出经振荡浑浊的菌液,静置 10 min,吸取 100 μ L 上清液加入盛有 900 μ L 无菌水的 1.5 mL EP 管中吹打混匀,得到 10^{-2} 稀释菌液,照此方法依次制备浓度梯度稀释液(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})。取 7 个浓度梯度的稀释菌液 80 μ L 涂布于 LB 固体培养基上,于 37 °C 恒温箱中倒置培养 24 h,将长出的菌落再次涂布于固体培养基,于 37 °C 恒温箱中倒置培养 24 h,挑取白色菌落点涂于 β -葡萄糖苷酶筛选培养基(0.25% 柠檬酸铁铵、0.1% 七叶

苷、100 μ g/mL Amp),于恒温培养基中培养 12 h,观察有无黑色水解圈。

1.4 序列分析

β -葡萄糖苷酶的蛋白质序列已保存在美国国立生物技术信息中心(NCBI),登录号为 MW197409。

使用在线翻译工具(<http://web.expasy.org/translate/>)预测蛋白分子量,使用网站 ExPASy 的在线程序 ProtParam 预测 β -葡萄糖苷酶 Bgl747 的基本特性(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>),利用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)来预测其信号肽。

1.5 重组质粒构建与双酶切验证

根据测序结果,设计一对引物 Bgl747-F 与 Bgl747-R,具体引物序列如下: Bgl747-F: 5'-CCG GAATTCCCCCGTTGCGGTGTCATTATACTGAC-3' (下划线为 *Eco*R I 酶切位点); Bgl747-R: 5'-CCG CTCGAGGCTCCCGAAGAACCTATGAAACCAAT TG-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)。采用 Prime STAR[™] Max Premix 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系: Bgl747 模板 1 μ L, Bgl747-F (20 mmol/L) 1 μ L, Bgl747-R (20 mmol/L) 1 μ L, Prime STAR[™] Max Premix 14 μ L, ddH₂O 3 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 共 20 个循环; 72 °C 5 min; 结束后于 15 °C 保存。经纯化后将 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点分别添加在序列两端,通过基因工程的方法将其与表达载体 pET-28a 相连接,获得 pET-28a-Bgl747 的重组质粒。重组质粒的双酶切验证体系: *Hind* III 1 U, *Eco*R I 1 U, 重组质粒 1 μ g, ddH₂O 30 μ L, 10 \times H Buffer 3 μ L。在 37 °C 下酶切,1 h 后采用琼脂糖凝胶电泳的方法对样品进行验证。

1.6 重组蛋白的表达优化与纯化

将含 pET-28a-Bgl747 的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,于 37 °C、220 r/min 的条件下培养至 OD₆₀₀ 在 0.6–1.0 范围内,添加 IPTG 诱导表达,至其终浓度分别为 0.4、0.6、0.8 mmol/L,

15、37 和 40 °C 于 220 r/min 培养 10 h, 分别取以上菌液 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 进行超声破碎(30 W, 4 s/6 s, 15 min), 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 根据蛋白条带确定最适的表达条件。最适表达条件下制样, 超声破碎, 经 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化后进行 SDS-PAGE 分析。蛋白含量测定采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒。

1.7 酶学性质分析

1.7.1 酶活测定

取稀释 10 倍的酶液 10 μ L、pH 为 4.0 的 B-R 缓冲液 80 μ L、50 mmol/L 的 *p*NPG 10 μ L 混合, 45 °C 下反应 20 min, 加入 200 μ L NaCO₃ 终止反应, 吸取 200 μ L 混合液, OD₄₀₅ 平行测定 3 次, 以不加酶的反应体系为对照组。酶活力单位(U)定义: 每分钟分解 *p*NPG 产生 1 μ mol *p*NPG 所需的酶量。

1.7.2 最适反应条件测定及稳定性分析

在 pH 4.0 条件下, 通过测定 4、20–80 °C 温度范围内(间隔 5 °C)各个温度下的相对酶活确定最适反应温度; 温度稳定性通过酶置于 4、20–80 °C 温度(间隔 5 °C)下保温 2 h 后测定剩余活力, 通过测定酶在 B-R 缓冲液(pH 1.0–11.0)中的相对酶活确定最适 pH; pH 稳定性: 将酶置于不同 pH 条件下, 45 °C 保存 2 h 后测定剩余酶活。

1.7.3 金属离子和化学试剂对酶活的影响

最适温度和 pH 条件下, 以不加金属离子和化学试剂的样品组作为对照, 以反应体系中添加浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 K⁺、Na⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、SDS、EDTA、咪唑、尿素和盐酸胍, 以及添加浓度分别为 1%、15%、30%的甲醇、乙醇、异丙醇、DMSO 和 Triton X-100 为实验组, 测定相对酶活, 分析金属离子和化学试剂对酶活力的影响。

1.7.4 酶促动力学

最适条件下, 按照 1.7.1 所示的测定酶活力的方法, 测定在不同浓度 *p*NPG 溶液下 Bgl747 的酶

活力, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 计算最大反应速率 V_{\max} 和米氏常数 K_m 。

1.7.5 酶活力受不同浓度葡萄糖的影响

最适条件下, 在反应中加入 0–4 mol/L 浓度的葡萄糖溶液, 室温放置 2 h, 测定各浓度下 Bgl747 的剩余酶活, 以不含葡萄糖的酶液酶活力定义为 100%。

1.8 数据处理方法

所有试验数据均取 3 次重复的平均值, 图表绘制采用 Origin 9 软件。

2 结果与分析

2.1 定向筛选

用底物七叶苷功能筛选法, 对 β -葡萄糖苷酶进行初步筛选, 发现筛选平板上有黑色水解圈(图 1), 证明其具有 β -葡萄糖苷酶的活性, 将其编号为 B21-3。

2.2 序列分析

经测序结果显示基因序列的插入片段中有一个 β -葡萄糖苷酶编码基因的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)序列, 该编码阅读框全长 747 bp, 编码 248 个氨基酸, 预测其编码翻译的蛋白分子量大小为 27.23 kD, 将其命名为 Bgl747。BLAST 结果显示, Bgl747 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。多序列比对如图 2 所示, Bgl747 与所选相似性高的 β -葡萄糖苷酶都拥有 NEP 这个 GH1 家族典型的保守序列。

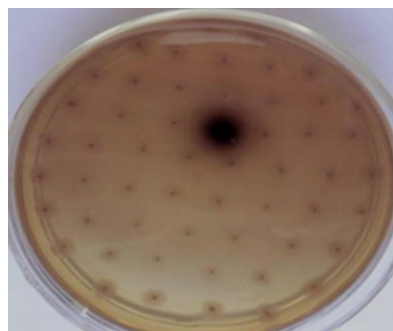


图 1 β -葡萄糖苷酶的筛选

Figure 1 Screening of β -glucosidase

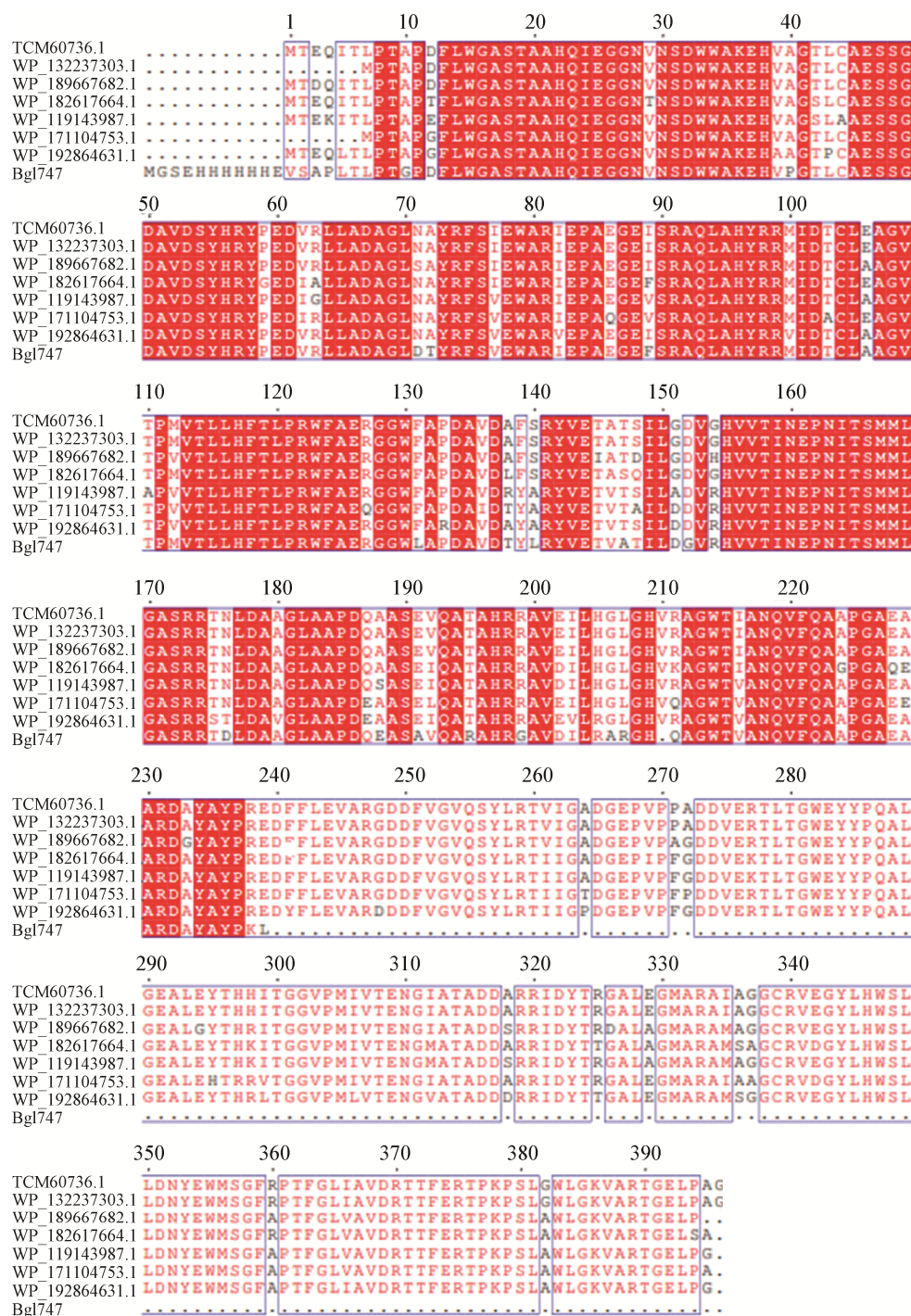


图 2 Bgl747 和 GH1 家族其他成员的氨基酸保守序列比对

Figure 2 The conserved amino acid sequences alignment between Bgl747 and members of the GH1 family

2.3 重组质粒构建与双酶切验证

经 PCR 扩增后出现了一条明显的 DNA 条带，结果如图 3 显示，大小位于 750 bp，与预期基因大小一致(6×His 标签)。利用 *Hind* III 和 *Eco*R I 对重组

质粒 pET-28a-Bgl747 进行酶切验证，结果如图 4 显示，重组质粒被酶切后出现了与预期大小一致的 DNA 片段，证明 Bgl747 已成功构建到表达载体 pET-28a 上。

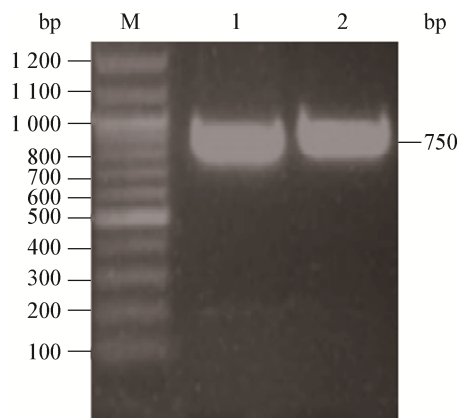


图3 基因 *Bgl747* 的 PCR 扩增产物电泳图
Figure 3 Amplified products of gene *Bgl747* electrophoresis

注: M: DL2000 DNA Marker; 1、2: *Bgl747* 基因
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Gene *Bgl747*

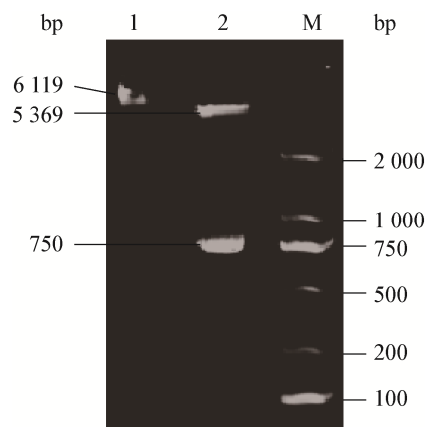


图4 重组质粒酶切验证电泳图
Figure 4 Electrophoresis identification of digested plasmids

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: pET-28a-Bgl747; 2: pET-28a-Bgl747 digested by *Hind* III and *Eco*RI

2.4 重组蛋白的表达与优化

如图5 SDS-PAGE 分析结果所示, 重组蛋白 Bgl747 在 15 °C 几乎没有可溶性表达, 37 °C 诱导时有较好的可溶性表达效果。由图5可知, 获得最佳蛋白表达的条件: OD_{600} 为 1.0、37 °C、0.6 mmol/L IPTG。经纯化后的蛋白浓度为 1.82 mg/mL, 如图6所示, SDS-PAGE 分析结果表明重组蛋白 Bgl747 的理论分子量(27.23 kD)和表观分子量(约 28 kD)一致。

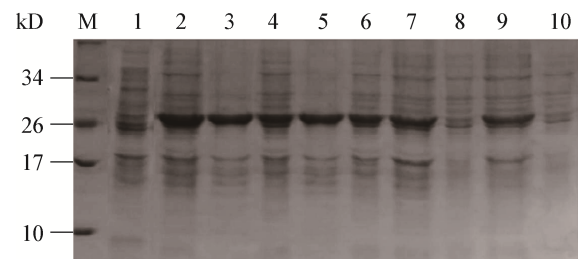


图5 *Bgl747* 重组蛋白表达优化的 SDS-PAGE 分析
Figure 5 SDS-PAGE analysis of *Bgl747* recombinant protein expression optimization

注: M: 蛋白 Marker; 1: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 0.0 mmol/L 样品(未诱导); 2: 37 °C、 OD_{600} =0.6、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样; 3: 37 °C、 OD_{600} =0.8、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样; 4: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样; 5: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 0.4 mmol/L 诱导后沉淀样; 6: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 0.6 mmol/L 诱导后沉淀样; 7: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 0.8 mmol/L 诱导后沉淀样; 8: 15 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样; 9: 37 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样; 10: 40 °C、 OD_{600} =1.0、IPTG 1.0 mmol/L 诱导后沉淀样

Note: M: Protein Marker; 1: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 0.0 mmol/L sample (not induced); 2: 37 °C, OD_{600} =0.6, IPTG 1.0 mmol/L precipitation sample after induction; 3: 37 °C, OD_{600} =0.8, IPTG 1.0 mmol/L precipitation sample after induction; 4: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 1.0 mmol/L precipitation sample after induction; 5: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 0.4 mmol/L precipitation sample after induction; 6: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 0.6 mmol/L precipitation sample after induction; 7: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 0.8 mmol/L precipitation sample after induction; 8: 15 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 1.0 mmol/L precipitation sample after induction; 9: 37 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 1.0 mmol/L precipitation sample after induction; 10: 40 °C, OD_{600} =1.0, IPTG 1.0 mmol/L precipitate samples after induction

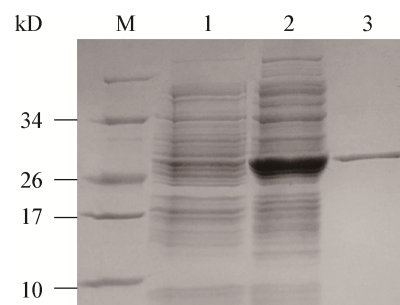


图6 重组蛋白 *Bgl747* 的 SDS-PAGE 分析
Figure 6 SDS-PAGE analysis of recombinant protein *Bgl747*

注: M: 蛋白 Marker; 1: 含 pET-28a 空载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 破碎液上清; 2: 含重组质粒 pET-28a-Bgl747 的大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞破碎液上清; 3: *Bgl747* 纯蛋白

Note: M: Protein Marker; 1: Cell extract of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-28a; 2: *E. coli* BL21(DE3) cell disruption supernatant containing recombinant plasmid pET-28a-Bgl747; 3: *Bgl747* pure protein

2.5 酶学性质

2.5.1 最适反应条件和稳定性

Bgl747 的最适反应 pH 结果如图 7A 所示, 在 pH 为 4.0 时 Bgl747 酶活力最高, pH 2.0–4.0 内仍有 50% 以上的活力, 说明 Bgl747 是一种偏酸性的 β -葡萄糖苷酶。pH 稳定性如图 7A 所示, Bgl747 即使在 pH 2.0–5.0 的酸性条件下 45 °C 孵育 2 h 仍有 50% 以上的活性, pH 8.0 时可保留 87% 的活力, 说明在酸碱环境下 Bgl747 具有较好的稳定性, 尤其是在酸性条件下。

Bgl747 的最适反应温度结果如图 7B 所示, 4–45 °C 时随着温度的逐渐升高, 酶活力不断增加, 45 °C 时达到最高酶活, 温度大于 45 °C 时活性逐渐减小, 80 °C 条件下酶活力仍为 77%。综上所述, Bgl747 在 45 °C 时具有最高酶活力, 并且温度适用范围较广。温度稳定性结果如图 7B 所示, Bgl747 在 45 °C 条件下稳定性最好; 直到 70 °C 时保温 2 h 仍存有 80% 以上的酶活力, 展示出较好的热稳定性。

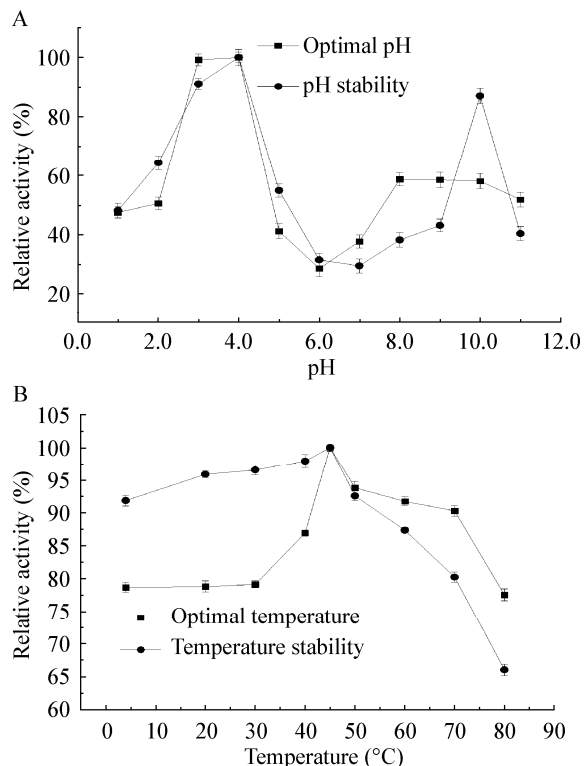


图 7 Bgl747 的最适反应条件及其稳定性

Figure 7 Optimal conditions and stability of Bgl747

2.5.2 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 Bgl747 酶活力的影响如图 8 所示。金属离子和化学试剂对 Bgl747 的酶活性均有不同程度的影响, 其中 1 mmol/L K^+ 、1 mmol/L 和 10 mmol/L Fe^{2+} 、30% 甲醇及乙醇、1 mmol/L 和 10 mmol/L 的盐酸胍对酶活都有较明显的促进作用, 而 30% Triton X-100 及 10 mmol/L SDS 酶活抑制作用较明显。其中, 金属离子 Fe^{2+} 的促进作用随着浓度的增加而增强; 有机溶剂中的乙醇对酶分子表面进行亲水化作用增加了醇与水的结合能力以及与蛋白质间的相互作用, 而使酶活性增加; 阴离子表面活性剂 SDS 随着浓度的增加酶活性显著降低, 其原因是 SDS 疏水性的脂肪族侧链与酶蛋白内部疏水区域的非极性基团相互作用, 导致酶蛋白的微环境发生改变, 从而影响蛋白酶的空间构象, 致使酶变性失活。

2.5.3 酶促动力学分析

以 pNPG 为底物 Bgl747 的比酶活达 225.07 U/mg, 根据图 9 所示方程得出横纵坐标与曲线的交点, 由此算出最大反应速率 V_{max} 为 547.23 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 米氏常数 K_m 为 0.268 mmol/L。

2.5.4 酶活力受不同浓度葡萄糖的影响

如图 10 所示, 随着葡萄糖浓度的增加, Bgl747 的酶活力逐渐减弱。当反应体系中葡萄糖浓度达到 3 mol/L 时, Bgl747 的活性仅剩 13%, 说明高浓度葡萄糖对酶活有明显的抑制作用, 但当葡萄糖浓度为 1 mol/L 时, Bgl747 的酶活仍有 50% 以上。

3 讨论与结论

本研究利用底物七叶苷功能筛选法从玉米秸秆土壤中筛选出一株 β -葡萄糖苷酶, 其原理为 β -葡萄糖苷酶将七叶苷分解为可与三价铁离子反应的七叶苷原, 继而与 Fe^{3+} 络合成黑色化合物。根据 NCBI 数据库中(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的同源性分析, 所筛选出来的 β -葡萄糖苷酶属于 BglB 超家族。本实验通过构建重组质粒 pET-28a-Bgl747 并转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达, 经蛋白纯

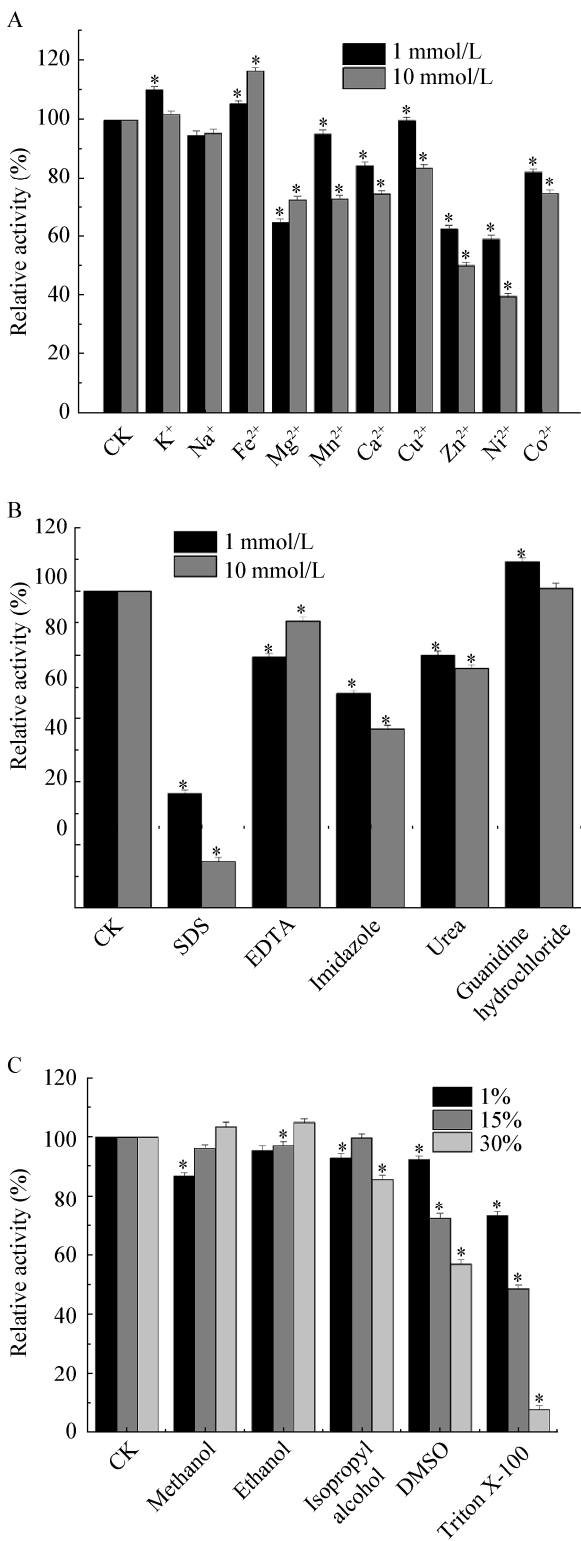


图 8 金属离子和化学试剂对 Bgl747 酶活力的影响
Figure 8 Effects of metal ions and reagents on activities of Bgl747
Note: *: $P < 0.05$

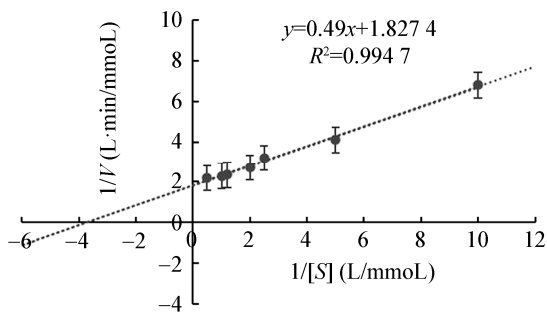


图 9 Bgl747 的动力学参数
Figure 9 Lineweaver-Burk plot for Bgl747

化试剂盒纯化获得纯蛋白。

重组 β -葡萄糖苷酶 Bgl747 反应的最适温度为 45 °C，较优于来源于其他微生物的 β -葡萄糖苷酶，例如最适温度为 40 °C 且来源于链霉菌 GXT6 的 β -葡萄糖苷酶 BGL3-GXT6^[8]，拥有 44 °C 最适温度的 bgl2238 来源于宏基因组文库^[9]，但低于嗜热微生物中的 β -葡萄糖苷酶 BglY，其最适反应温度为 65 °C^[10]，也低于从嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)基因组中挖掘的 β -葡萄糖苷酶 Bgl52，其最适反应温度为 70 °C^[11]。Bgl747 具有较好的热稳定性，70 °C 时保温 2 h 仍存有 80% 以上的酶活力，具有较好稳定性，优于源自海洋链霉菌的 r-BglNH 和源于土壤宏基因组文库的 Bgl1269，前者 45 °C 下经 1 h 后酶活只剩 40%^[12]，后者 45 °C 下仅经过 0.5 h 酶活只剩 20%^[13]；Bgl747 的最适反

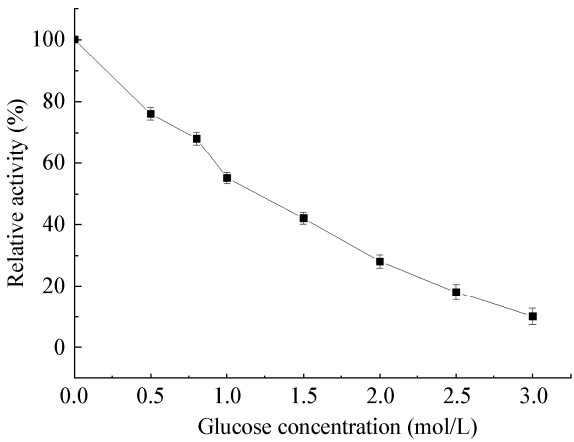


图 10 葡萄糖对 Bgl747 酶活力的影响
Figure 10 Effects of glucose on the activity for Bgl747

应pH为4.0,在酸性和碱性环境中均能保持一定的稳定性,尤其是在酸性条件下,因其等电点pI为5.5,属于酸性蛋白质,所以在酸性条件下能保持稳定的构象。体系pH7.0时,Bgl酶活性处于不稳定的状态,其相对酶活力呈现下降的趋势。这是由于反应体系逐渐偏碱时,会对酶活性中心的必需基团具有一定的影响,削弱底物和酶的解离程度,从而破坏酶与底物间的结合和催化能力。pH为8.0–10.0时,稳定性逐渐增强,原因在于其的等电点是5.5,带负电的蛋白质在碱性环境中,由于电子的互斥而使蛋白质保持稳定构象,而当pH>10.0时,蛋白质发生不可逆的变性而失活。酶学性质的研究表明,Bgl747具有相对较高的最适反应温度、热稳定性及酸碱稳定性,具有较好的工业应用前景。

当以pNPG为底物时 β -葡萄糖苷酶Bgl747的比酶活可达到225.07 U/mg,相比于其他来源的酶,其酶活力更具优势,例如比酶活为13 U/mg的来源于极端嗜热纤维素降解菌的 β -葡萄糖苷酶^[14],比酶活为93 U/mg的来源于嗜碱性芽孢杆菌C-125的 β -葡萄糖苷酶^[15]。金属离子与化学试剂对Bgl747的酶活力有一定程度的影响,其中1 mmol/L K^+ 、1 mmol/L和10 mmol/L Fe^{2+} 、30%甲醇、30%乙醇、1 mmol/L和10 mmol/L的盐酸胍对酶活都有较明显的促进作用,然而只有30% Triton X-100及蛋白质变性剂SDS对酶活有明显的抑制作用,添加其他金属离子和化学试剂时酶活均保持在50%以上,综上所述, β -葡萄糖苷酶Bgl747对金属离子及有机溶剂具有一定的耐受性,在工业上表现出良好的应用前景。

β -葡萄糖苷酶可以控制着纤维素酶水解反应过程的快慢,对产物葡萄糖尤为敏感。Bgl747虽然受到葡萄糖的反馈抑制,但只有对高浓度的葡萄糖表现出明显的抑制作用,当反应体系中葡萄糖的浓度为1 mol/L时, β -葡萄糖苷酶Bgl747的活性仍能保留50%以上,显示出其对葡萄糖具有一定的耐受性,为 β -葡萄糖苷酶Bgl747在纤维素水解及其相

关领域的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Cairns JRK, Esen A. β -glucosidases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(20): 3389-3405
- [2] Ibrahim E, Jones KD, Taylor KE, Hosseiny EN, Mills PL, Escudero JM. Recombinant *E. coli* cellulases, β -glucosidase, and polygalacturonase convert a *Citrus* processing waste into biofuel precursors[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(6): 7304-7312
- [3] 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
- [4] Kumar P, Ryan B, Henahan GTM. β -glucosidase from *Streptomyces griseus*: nanoparticle immobilisation and application to alkyl glucoside synthesis [J]. Protein Expression and Purification, 2017, 132: 164-170
- [5] Xiang DJ, Man LL, Zhang CF, Zhang CL, Zhang D, Yin KD, Cao TX, Wang LN. Screening of a corn straw cellulose-degrading strains and optimization of the cellulase producing condition[J]. Aem Roducts Rocessing, 2014(4): 37-39,43 (in Chinese)
向殿军, 满丽莉, 张春风, 张彩玲, 张娣, 殷奎德, 曹天旭, 王丽娜. 玉米秸秆纤维素降解菌的分离纯化与产酶工艺优化[J]. 农产品加工·学刊: 中, 2014(4): 37-39,43
- [6] Zhang JF. Breeding of straw degradation engineering bacteria and development of quick-rot fungi in Northeast China[D]. Jilin: Doctoral Dissertation of Jilin Agricultural University, 2012 (in Chinese)
张建峰. 东北地区秸秆降解工程菌的选育及速腐菌剂的研制[D]. 吉林: 吉林农业大学博士学位论文, 2012
- [7] Xia YL. Screening and preliminary characterization of a novel β -glucosidase gene[D]. Guangdong: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2015 (in Chinese)
夏玉林. β -葡萄糖苷酶基因的筛选及性质分析[D]. 广东: 广东药科大学硕士学位论文, 2015
- [8] Zheng FF, Wang JP, Lin Y, Wang ZL, Wei YT, Huang RB, Du LQ. Characterization of β -glucosidase from *Streptomyces* sp. and its molecular modification of glucose tolerance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(10): 1839-1852 (in Chinese)
郑芳芳, 王金佩, 林宇, 王子龙, 韦宇拓, 黄日波, 杜丽琴. 链霉菌 GXT6 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及葡萄糖耐受性分子改造[J]. 微生物学报, 2018, 58(10): 1839-1852
- [9] Tang LL, Wang XM, Wu XL, Huang Q, Li H. Screening, cloning and characterization of a novel β -glucosidase from soil metagenomic library[J]. Food Science, 2018, 39(4): 118-124 (in Chinese)

- 唐乐丽, 王晓萌, 吴秀玲, 黄庆, 李荷. 宏基因组文库新型 β -葡萄糖苷酶的筛选、克隆及酶学性质分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 118-124
- [10] Liu Y, Zhang C, Peng H, Dong YN, Zhao WP. Recombinant expression and characterization of β -glucosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020: 1-9 (in Chinese)
刘洋, 张余, 彭惠, 董艺凝, 赵维萍. 热解糖高温厌氧杆菌 β -葡萄糖苷酶的重组表达与酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2020: 1-9
- [11] Liu Y, Peng H, Zhang C, Dong YN, Sun X, Luo X, Cai H, Zhao WP. Recombinant expression and characterization of β -glucosidase from *Bacillus thermoamylovorans*[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2050-2059 (in Chinese)
刘洋, 彭惠, 张余, 董艺凝, 孙星, 罗侠, 蔡华, 赵维萍. 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[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2050-2059
- [12] Mai ZM, Yang J, Tian XP, Li J, Zhang S. 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
- [13] Li G, Jiang Y, Fan XJ, Liu YH. 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
- [14] Hong MR, Kim YS, Park CS, Lee JK, Kim YS, Oh DK. Characterization of a recombinant beta-glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(1): 36-40
- [15] Xu H, Xiong AS, Zhao W, Tian YS, Peng RH, Chen JM, Yao QH. Characterization of a glucose-, xylose-, sucrose-, and D-galactose-stimulated β -glucosidase from the alkalophilic bacterium *Bacillus halodurans* C-125[J]. Current Microbiology, 2011, 62(3): 833-839