



研究报告

粪便微生物宏基因组来源 GH1 β -葡萄糖苷酶的重组表达及酶学性质范琴¹ 杨金茹¹ 唐湘华^{1,2,3} 黄遵锡^{1,2,3} 杨云娟^{1,2,3} 吴倩^{1,2,3} 许波^{*1,2,3}¹ 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500² 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500³ 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500

摘要:【背景】 β -葡萄糖苷酶是一类重要的纤维素分解酶类。目前较多可培养微生物来源的 β -葡萄糖苷酶(Bgl)存在热稳定性和酸碱稳定性差及作用范围窄的问题。【目的】从滇金丝猴粪便微生物宏基因组中挖掘新型 β -葡萄糖苷酶基因, 异源表达并研究其酶学性质, 为食品等领域提供新型酶资源。

【方法】从粪便微生物宏基因组出发, 扩增和异源表达 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9*, 并进行酶学性质研究。【结果】获得 GH1 家族重组 β -葡萄糖苷酶 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9*, 分子量分别为 60 kD 和 50 kD。 *BglRBS_26* 的最适作用条件为 pH 6.0、45 °C; *BglRBS_9* 的最适作用条件为 pH 5.0、40 °C。 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 的 K_m 分别为 $(0.681\ 6 \pm 0.164\ 2)\ \mu\text{mol/L}$ 和 $(3.317\ 0 \pm 0.871\ 4)\ \mu\text{mol/L}$ 。 *BglRBS_26* 具有较好的酸碱耐受性, 在 pH 5.0–6.0 下处理 1 h, 剩余酶活大于 110%; pH 7.0–8.0 范围内, 剩余酶活仍然保持在 100% 以上。此外, 蔗糖对 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 有不同程度的激活, 当反应体系中加入 20% (质量体积分数) 蔗糖, *BglRBS_26* 酶活力可提高至 140%; 10% (质量体积分数) 蔗糖可将 *BglRBS_9* 酶活力提高至 180%。此外, *BglRBS_26* 具有较好的 NaCl 耐受性和稳定性, 其在 37 °C、2.5 mol/L 的 NaCl 下处理 1 h 后保留 80% 活性。【结论】从滇金丝猴粪便微生物宏基因组中获得 2 个新型 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9*, 并成功在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达。 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 具有较好的 pH 稳定性和蔗糖耐受性, 在食品、发酵等行业具有潜在应用价值。

关键词: 滇金丝猴, 粪便微生物宏基因组, β -葡萄糖苷酶

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31860299); National Key Research and Development Program of China (2017YFB0308400)

***Corresponding author:** Tel: 86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

Received: 11-03-2021; **Accepted:** 29-04-2021; **Published online:** 13-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31860299); 国家重点研发计划(2017YFB0308400)

***通信作者:** Tel: 0871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

收稿日期: 2021-03-11; **接受日期:** 2021-04-29; **网络首发日期:** 2021-05-13

Purification and characterization of GH1 β -glucosidase from fecal microbes metagenome

FAN Qin¹ YANG Jinru¹ TANG Xianghua^{1,2,3} HUANG Zunxi^{1,2,3} YANG Yunjuan^{1,2,3}
WU Qian^{1,2,3} XU Bo^{*1,2,3}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: [Background] β -glucosidase is an important class of cellulolytic enzymes. At present, β -glucosidase (Bgl) derived from cultivable microorganisms has the problems of poor thermal stability and acid-base stability and a narrow range of action. [Objective] Discover new β -glucoside genes from the fecal microbial metagenomics of *Rhinopithecus bieti*, express heterologously and study its enzymatic properties, and provide new enzyme resources for food and other fields. [Methods] Starting from the fecal microbial metagenome, the β -glucosidase genes *BglRBS_26* and *BglRBS_9* were amplified and heterologously expressed, and the enzymatic properties were studied. [Results] The GH1 family recombinant β -glucosidase BglRBS_26 and BglRBS_9 were obtained, with molecular weights of 60 kD and 50 kD, respectively. The optimal conditions for BglRBS_26 are pH 6.0 and 45 °C; the optimal conditions for BglRBS_9 are pH 5.0 and 40 °C. The K_m of BglRBS_26 and BglRBS_9 are $(0.681 \pm 0.164 \text{ 2}) \mu\text{mol/L}$ and $(3.317 \pm 0.871 \text{ 4}) \mu\text{mol/L}$, respectively. BglRBS_26 has good acid-base tolerance. After treatment at pH 5.0–6.0 for 1 h, the remaining enzyme activity is greater than 110%; in the range of pH 7.0–8.0, the remaining enzyme activity remains above 100%. In addition, sucrose can activate BglRBS_26 and BglRBS_9 to varying degrees. When 20% (M/V) sucrose is added to the reaction system, the enzyme activity of BglRBS_26 can be increased to 140%; 10% (M/V) sucrose can increase the enzyme activity of BglRBS_9 to 180%. In addition, BglRBS_26 has better NaCl tolerance and stability. It retains 80% enzyme activity after being treated at 37 °C and 2.5 mol/L NaCl for 1 h. [Conclusion] In this study, two novel β -glucosidase genes *BglRBS_26* and *BglRBS_9* were obtained from the *R. bieti* fecal microbial metagenome, and they were successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). BglRBS_26 and BglRBS_9 have good pH stability and sucrose tolerance, making them have potential applications in food, fermentation and other industries.

Keywords: *Rhinopithecus bieti*, fecal microbes metagenome, β -glucosidase

纤维素是植物细胞壁的主要成分,其完全被分解需要纤维素酶系共同作用。数千至数万个葡萄糖分子通过 β -1,4-糖苷键连接形成天然纤维素链,基本重复单元为纤维二糖^[1]。外切纤维素酶降解纤维素而释放的纤维二糖和纤维四糖产物,最终被 β -葡萄糖苷酶水解成单糖和二糖^[2]。在碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-Active Enzymes Database, CAZy) 中, β -葡萄糖苷酶 (β -Glucosidase, EC 3.2.1.21) 根据氨基酸和结构相似性分属于 GH1、GH2、GH3、GH5、GH9、GH30 和 GH116 家族,被广泛用于食品、药品、酿酒等

行业^[3-4]。不同应用领域所需 β -葡萄糖苷酶性质具有差异,因此,对不同来源的 β -葡萄糖苷酶基因资源的开发具有重要意义。研究表明,植食性动物胃肠道中存在丰富的与纤维素降解有关的酶类,但不同动物之间存在差异^[5-8]。

目前研究的 β -葡萄糖苷酶主要来源于可培养微生物,如 *Saccharomyces cerevisiae*^[9]、*Aspergillus niger*^[10]、*Clostridium thermocellum*^[11]、*Bacillus tequelensis*^[12]、*Thermoascus aurantiacus*^[13]、*Penicillium verruculosum*^[14] 和 *Bacillus subtilis*^[15],但它们存在热稳定性差、底物作用范围窄^[16]等缺

点,需要进一步通过基因突变等手段来提高其热稳定性和酶活性^[9]。然而自然界中约有 99.8%的微生物不易培养^[17]。

宏基因组,即生境中全部微小生物遗传物质的总和^[18],极大地扩展了微生物资源的利用空间,增加了获得新的生物活性物质的机会^[19]。宏基因组学(Metagenomics)就是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的的新的微生物研究方法,通过避开微生物的培养可获得丰富的新酶及其基因。目前,通过宏基因组学技术已从白蚁肠道^[20]、土壤^[21-22]、牛瘤胃^[23]、松材线虫^[24]、Poraquê 湖^[25]、堆肥^[26]、*Kusaya gravity*^[27]等中获得高度耐受乙醇^[28]、葡萄糖^[29]的新型 β -葡萄糖苷酶和基因。

滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)是典型的植食性动物^[30],由于动物摄食植物种类及物种差异,其胃肠道中可能蕴含不同于其他动物的新型微生物 β -葡萄糖苷酶基因资源,本课题组在前期研究中已从滇金丝猴粪便微生物宏基因组中获得木聚糖酶等其他多种水解酶类^[30-33]。因此,本研究从滇金丝猴粪便微生物宏基因组出发,筛选、克隆并异源表达 β -葡萄糖苷酶,以期工业、食品、饲料等行业提供新的酶和基因。

1 材料与方法

1.1 样品

滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA,本课题组保存;表达载体 pEASY-E2,实验室保藏。

1.2 主要试剂和仪器

一步快速克隆试剂盒(CloneExpress II One Step Cloning Kit),南京诺唯赞生物科技有限公司;PrimeSTAR Max DNA Polymerase, TaKaRa 公司;限制性内切酶,大连宝生物工程有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒, Omega 公司;Ni-NTA Agarose, Qiagen 公司;大肠杆菌

BL21(DE3),北京擎科新业生物技术有限公司;氨苄青霉素钠,宝生物工程有限公司;2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(oNPG)、4-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(pNPG),Sigma-Aldrich 公司。高压细胞破碎系统,Constant Systems Limited 公司;凝胶成像仪和 PCR 仪等,Bio-Rad 公司;紫外分光光度计,耶拿分析仪器股份公司。

1.3 基因克隆和序列分析

1.3.1 基因克隆

根据 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 的全长序列及一步快速克隆试剂盒说明书设计引物:

BglRBS_26 NdeF:

5'-TAAGAAGGAGATATACATATGGAATTGATGTTTGATAAGGAGTTTGTC-3';

BglRBS_26 XhoR:

5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTCCGGGAAAATAACGTC-3';

BglRBS_9 NdeF:

5'-TAAGAAGGAGATATACATATGGAATTGATGAAAGATTTTATTTACGGTGCG-3';

BglRBS_9 XhoR:

5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCCTTTTAATTCTTTGCCG-3'。

上述的上、下游引物分别含有限制性内切酶 *Nde* I (CATATG)和 *Xho* I (CTCGAG)的识别位点。以滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA 为模板,常规 PCR 扩增 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9*。PCR 反应体系: PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, *BglRBS_26* 引物对 *BglRBS_26 NdeF* 和 *BglRBS_26 XhoR* (10 μ mol/L)各 1 μ L, 或 *BglRBS_9*引物对 *BglRBS_9 NdeF* 和 *BglRBS_9 XhoR* (10 μ mol/L)各 1 μ L, 滇金丝猴粪便微生物宏基因组 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 补足 50.0 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 55 $^{\circ}$ C 15 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 15 min。将纯化后的 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 分别转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,构建 BL-21(DE3)/

BglRBS_26 和 BL21(DE3)/*BglRBS_9* 重组子, 经阳性克隆验证(菌液 PCR)后, 送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.3.2 序列分析

使用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)完成核苷酸和氨基酸序列比对。信号肽用 SignalP-4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)预测。蛋白质分子量大小用 Bio-xm 2.6 预测。使用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)进行多序列比对分析, 并用 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)对结果美化; 用 MEGA X 制作系统进化树。

1.4 蛋白的表达与纯化

分别取大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/*BglRBS_26* 和 BL21(DE3)/*BglRBS_9* 以 0.1% 的量接种于 LB (Amp 终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$)培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 约为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.7 mmol/L 的 IPTG, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16 h 以诱导重组蛋白产生。高压破碎细胞(35 KPSI)后亲和层析 Ni-NTA Agarose 纯化粗酶液, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析纯化后的酶, 以空载体 pEASY-E2 转化大肠杆菌 BL21(DE3)作为阴性对照检测 β -葡萄糖苷酶 *BglRBS_26*、*BglRBS_9* 的表达情况。用 Bicinchoninic acid (BCA)蛋白定量试剂盒测定纯化的蛋白质浓度。

1.5 酶活性的测定

酶活性测定方法参照陆坚等^[34], 略有改动。取 28 μL pNPG (初始浓度为 25 mmol/L)与最适 pH 值(*BglRBS_26* 为 pH 6.0, *BglRBS_9* 为 pH 5.0)的缓冲液 232 μL 混合, *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 分别于 45 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 10 min, 加入 20 μL 稀释适当倍数(*BglRBS_26* 稀释 200 倍、*BglRBS_9* 稀释 50 倍)的酶, 反应 15 min 后用 140 μL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应并显色。取 200 μL 反应液至酶标板, 酶标仪读取其 OD_{410} , 以加入 20 μL 已失活的酶液作为空白对照。酶活单位定义为: 1 个酶活单位(U)即在酶的最适反应条件下, 每分钟水解

pNPG 释放 1 μmol pNP 所需的酶量。

1.6 重组蛋白 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 的酶学性质研究

1.6.1 最适反应条件测定

在 37 $^{\circ}\text{C}$ 测定 pH 3.0–11.0 (pH 3.0–7.0: 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液; pH 8.0–11.0: 0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)缓冲液的酶活力。比较各 pH 条件下的相对酶活, 确定最适反应 pH。在最适 pH 条件下测定 0–60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内的酶活力, 确定最适作用温度。

1.6.2 稳定性测定

将纯酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和不同 pH 3.0–11.0 缓冲溶液中保温 1 h, 最适反应条件下测定其剩余酶活力。以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照, 分析 pH 稳定性。将酶于 30、37、40、45 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别放置 1 h, 并在最适反应条件下测定其剩余酶活力。以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照, 分析热稳定性。

1.6.3 底物特异性

在酶最适反应条件下, 以 25 mmol/L 的对硝基苯基- β -D-半乳糖苷、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基- β -D-木吡喃糖苷、对硝基苯基- β -D-纤维二糖糖苷、对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、纤维二糖、乳糖、蔗糖、CMC-Na 和 10% (质量体积分数)可溶性淀粉为底物进行特异性活力测定分析。

1.6.4 金属离子和化学试剂对重组酶的影响

将各种金属离子(Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Na^{+} 、 Li^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^{+})和化学试剂(β -巯基乙醇、吐温-80、DTT、盐酸胍、PEG4000、EDTA、乙酸、乙醇、尿素、SDS、乙酸乙酯)加入到酶促反应体系中, 使其各种金属离子和化学试剂的终浓度分别为 10 mmol/L 和 1% (体积分数), 在酶最适作用条件下测定其活力, 以不加金属离子和化学试剂的酶活力为对照。

1.6.5 动力学参数测定

以 0.5–8.0 mmol/L pNPG 为底物, 在酶最适反应温度及最适 pH 下测定酶活力, 根据 Lineweaver-Burk 法计算 K_m 、 V_{max} 值。

1.7 NaCl 浓度对酶活力的影响

分别用 pH 6.0、pH 5.0 (0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠)缓冲液配制 0.5–5.0 mol/L NaCl 溶液。在酶最适反应条件下, 向不同浓度 NaCl 溶液中加入底物和酶液进行酶促反应, 以反应体系中不含 NaCl 为对照, 测定 NaCl 对酶的影响。将纯酶加入 0.5–5.0 mol/L NaCl 中于 37 °C 保温 1 h, 在最适反应条件下测定剩余酶活力, 以未经 NaCl 处理的酶活力为对照, 测定 NaCl 稳定性。

1.8 各种糖对酶活力的影响

向反应体系中加入终浓度为 1%–20% (质量体积分数)的葡萄糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖、果糖、蔗糖和阿拉伯糖, 于最适反应条件下测定酶活力, 以未添加任何糖的试验组为对照, 分析糖对酶活力的影响。

1.9 葡萄糖和木糖对酶活力的影响

向反应体系中加入终浓度为 5%–40% (质量体积分数)的葡萄糖和木糖, 于最适反应条件下测定酶活力, 以未添加葡萄糖和木糖的试验组为对照, 分析葡萄糖和木糖对酶活力的影响。

1.10 重组酶转糖苷产物的 UPLC 检测

将重组酶分别与 10% (质量体积分数)葡萄糖在酶最适作用条件下反应 48 h, 煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 采用 UPLC 分析产物, 以失活的酶为对照。

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过 PCR 扩增得到 β -葡萄糖苷酶基因 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9*。*BglRBS_26* (GenBank 登录号为 MW557605)和 *BglRBS_9* (GenBank 登录号为 MW557606)基因全长分别为 1 584 bp 和 1 323 bp, GC 含量分别为 58.59%和 51.55%, 起始密码子均为

ATG, 终止密码子分别为 TAA、TGA, 分别编码 527、440 个氨基酸, 理论分子量分别为 60.75 kD 和 51.22 kD, 等电点分别为 4.8 和 5.6, 均无信号肽序列。与 BLAST 中的氨基酸序列比对发现, *BglRBS_26* 的氨基酸序列与田鼠肠道细菌 *Lachnospiraceae bacterium* 的 β -葡萄糖苷酶氨基酸序列(56.45%, GenBank 登录号为 MBD5491873.1)有最高相似性; *BglRBS_9* 的氨基酸序列与人类肠道微生物 *Clostridiales bacterium* (64.69%, GenBank 登录号为 PWM016-03.1)来源的 β -葡萄糖苷酶氨基酸序列有最高相似性, 均无相关酶学性质报道。这表明 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 的编码产物可能是来自滇金丝猴粪便未培养微生物的新 β -葡萄糖苷酶。

根据 BLAST-PDB 数据库进行比对后, 发现 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 与 GH1 家族来源的 β -葡萄糖苷酶相似性最高, 因此选取不同宏基因组来源的 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶进行多序列比对。根据多序列比对结果(图 1)可知, *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 与白蚁肠道微生物宏基因组来源的 *Bgl-gsl* (3. AGS52251.1)、Lake Poraquê 宏基因组来源的 *AmBgl-LP* (4. SOU12973.1)、*Jeotgalibacillus malaysiensis* 来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 *BglD5* (5. A0A0B5ARU7)、深海沉积物来源的 *Bacillus* sp. 编码的 *BglD1* (6. QCQ29109.1)、*Bur-saphelenchus xylophilus* 来源的 *Cen502* (7. ARM37687.1)具有 GH1 家族的高度保守序列元件 NEP 和 TENG, 同时发现其氨基酸序列带有通用酸/碱和催化亲核试剂残基的保守基序区域, 与 GH1 家族的其他 β -葡萄糖苷酶^[35]一致。因此 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 属于 GH1 家族。

选取不同微生物来源的 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列构建系统进化树(图 2), 结果表明 *BglRBS_26* 和 *BglRBS_9* 与胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相似性最高。*BglRBS_26* 与田鼠肠道细菌 *Lachnospiraceae bacterium* (MBD5491873.1)聚在一起, *BglRBS_9* 与人类肠道微生物 *Clostridiales*

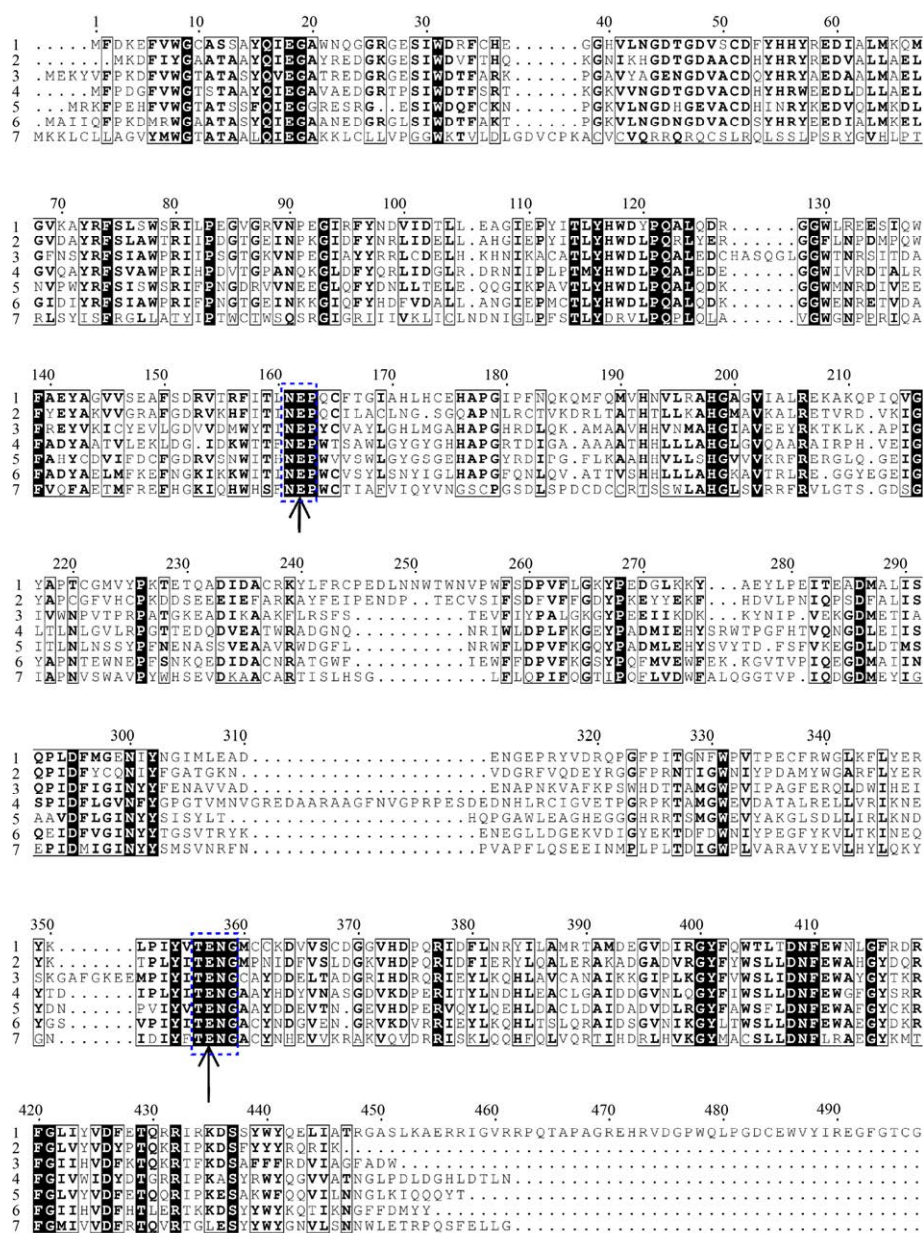


图 1 BglRBS_26 和 BglRBS_9 的多序列比对分析

Figure 1 Multiple sequence alignment analysis of BglRBS_26 and BglRBS_9

注：蓝色虚线框是 GH1β-葡萄糖苷酶的保守性氨基酸残基序列。箭头代表一般酸/碱和催化亲核试剂的保守残基。序列号 1、2、3、4、5、6、7 分别代表 MW557605、MW557606、AGS52251.1、SOU12973.1、A0A0B5ARU7、QCQ29109.1、ARM37687.1，其中，AGS52251.1、SOU12973.1、A0A0B5ARU7、QCQ29109.1 和 ARM37687.1 分别表示 *Globitermes sulphureus* 肠道微生物宏基因组来源、Lake Poraquê 宏基因组来源、*Jeotgalibacillus malaysiensis* 来源、海沉积物来源的 *Bacillus* sp. 和 *Bursaphelenchus xylophilus* 来源的氨基酸序列

Note: The blue dashed box is the conservative amino acid residue sequence of GH1β-glucosidase. The arrows represent the conserved residues of general acids/bases and catalytic nucleophiles. The serial numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 represent MW557605, MW557606, AGS52251.1, SOU12973.1, A0A0B5ARU7, QCQ29109.1, ARM37687.1, respectively. Among them, AGS52251.1, SOU12973.1, A0A0B5ARU7, QCQ29109.1 and ARM37687.1 respectively represent the amino acid sequence of *Globitermes sulphureus* gut microbial metagenomic source, Lake Poraquê metagenomic source, *Jeotgalibacillus malaysiensis* source, *Bacillus* sp. from sea sediment, and *Bursaphelenchus xylophilus*

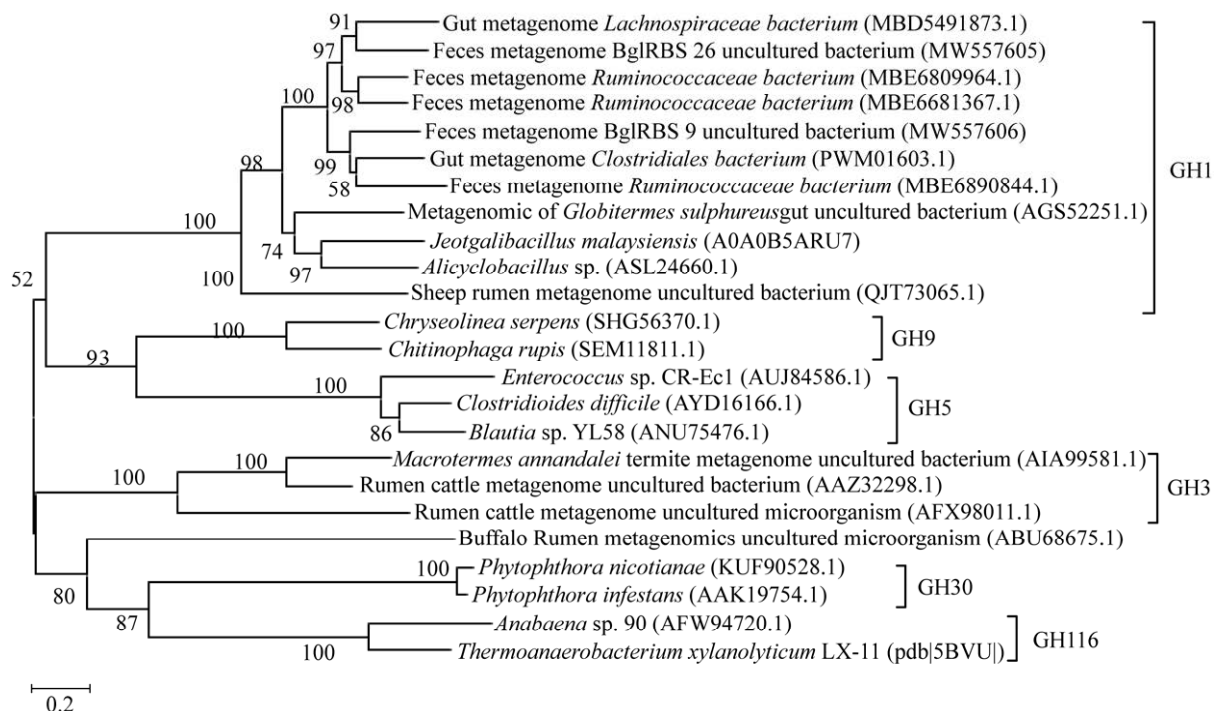


图2 BglRBS_26 和 BglRBS_9 与不同家族来源 β -葡萄糖苷酶氨基酸序列的系统进化分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of BglRBS_26 and BglRBS_9 and β -glucosidase from different families

注: 系统进化分析是使用 MEGA X 使用 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建的。分支线附近的数字表示测试中分支的可靠性百分比(序列[5BVU]来自 PDB, 其余来自 GenBank)

Note: The phylogenetic tree analysis was constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method using MEGA X. The number near the branch line indicates the percentage of reliability of the branch in the test (sequences [5BVU] from PDB, the rest from GenBank)

bacterium (PWM01603.1) 和厌氧菌群来源的细菌 *Ruminococcaceae bacterium* (MBE6890844.1) 为一个分支; 而 *Lachnospiraceae*、*Clostridiales* 和 *Ruminococcaceae* 均为 *Clostridiales* 微生物, 表明 BglRBS_26 和 BglRBS_9 可能来源于 *Firmicutes* 的 *Clostridiales* (图 2)。有研究表明 *Clostridiales* 是分解纤维素的优势菌群之一^[36]。本课题组之前的宏基因组测序研究发现, 该属微生物也是滇金丝猴的肠道优势菌^[37]。

2.2 重组表达与纯化

将重组质粒 pEASY-E2/BglRBS_26 和 pEASY-E2/BglRBS_9 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达, Ni-NTA Agarose 树脂纯化目的蛋白。对纯化产物用 SDS-PAGE 电泳检测发现, 与含 pEASY-E2 空载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 破碎液上

清相比, BglRBS_26 和 BglRBS_9 分别在 60 kD 和 50 kD 处有明显条带(图 3), 与理论上预测的蛋白分子量一致。BglRBS_26 和 BglRBS_9 的蛋白质浓度分别为 0.84 mg/mL 和 0.38 mg/mL。

2.3 重组 β -葡萄糖苷酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9 的酶学性质

2.3.1 最适 pH 和 pH 稳定性

最适 pH 如图 4A 所示, 重组 β -葡萄糖苷酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9 分别在 pH 6.0 和 pH 5.0 时相对酶活力最高。BglRBS_26 在 pH 5.0–8.0 范围内表现出 50% 以上活力, 表明其发挥酶活力的酸碱范围较为广泛。

稳定性如图 4B 所示, BglRBS_26 耐酸的能力较耐碱能力强, 在 pH 5.0 和 pH 6.0 下处理 1 h, 其剩余酶活分别为 110% 和 170%; 在 pH 7.0、pH 8.0

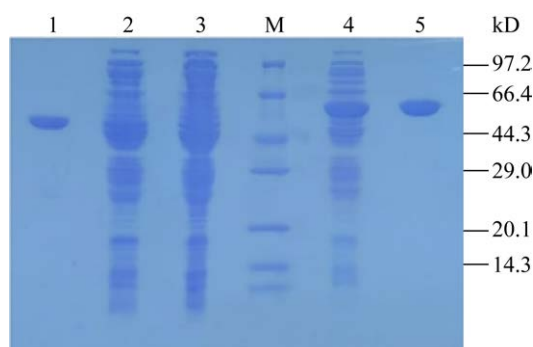


图3 重组酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of β -glucosidase recombinase

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: BglRBS_9 纯酶; 2: BglRBS_9 粗酶; 3: 含空载质粒 pEASY-E2 的大肠杆菌细胞裂解液; 4: BglRBS_26 粗酶; 5: BglRBS_26 纯酶

Note: M: Protein molecular weight standard; 1: BglRBS_9 pure enzyme; 2: BglRBS_9 crude enzyme; 3: Bacterial cell lysate containing empty plasmid pEASY-E2; 4: BglRBS_26 crude enzyme; 5: BglRBS_26 pure enzyme

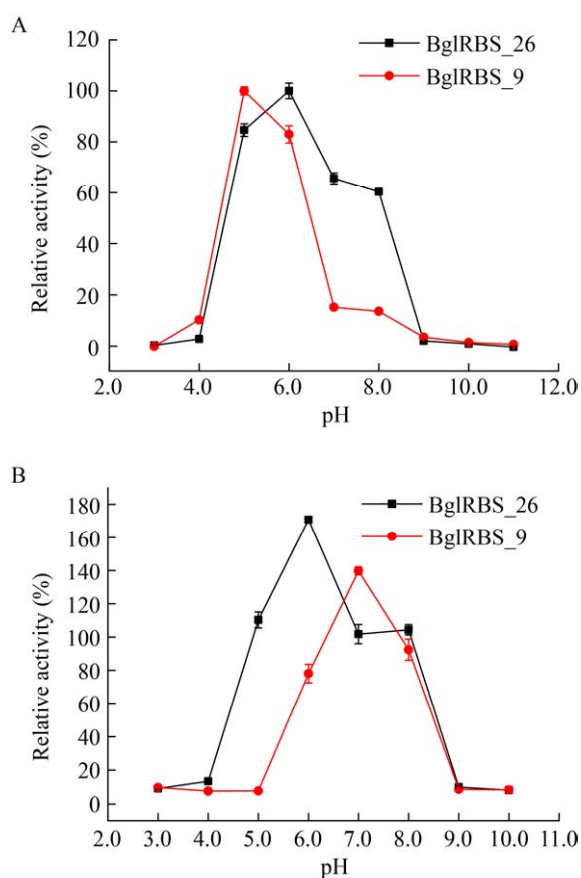


图4 重组酶最适反应 pH (A)及其 pH 稳定性(B)

Figure 4 Optimum pH (A) and stability (B) of recombinase

下处理 1 h, 剩余酶活均高于 100%。BglRBS_9 作用 pH 条件主要为弱酸性至弱碱性, 而且在中性条件下的稳定性较好; 其在 pH 6.0、7.0 和 8.0 下处理 1 h, 酶活力分别为 75%、140%和 90%。

2.3.2 最适温度和温度稳定性

最适反应温度如图 5A 所示, BglRBS_26 和 BglRBS_9 的最适温度分别为 45 °C、40 °C。二者在 40–50 °C 之间保留 60%酶活力, 温度达 60 °C 时基本无酶活。

温度稳定性如图 5B 所示, 重组酶经 30、37、40、45 和 50 °C 分别处理 1 h, 在 30–40 °C 条件下保持较高酶活性。BglRBS_9 热稳定性较 BglRBS_26 好, BglRBS_26 在 45 °C 条件下处理 1 h, 活性保持在 65%。

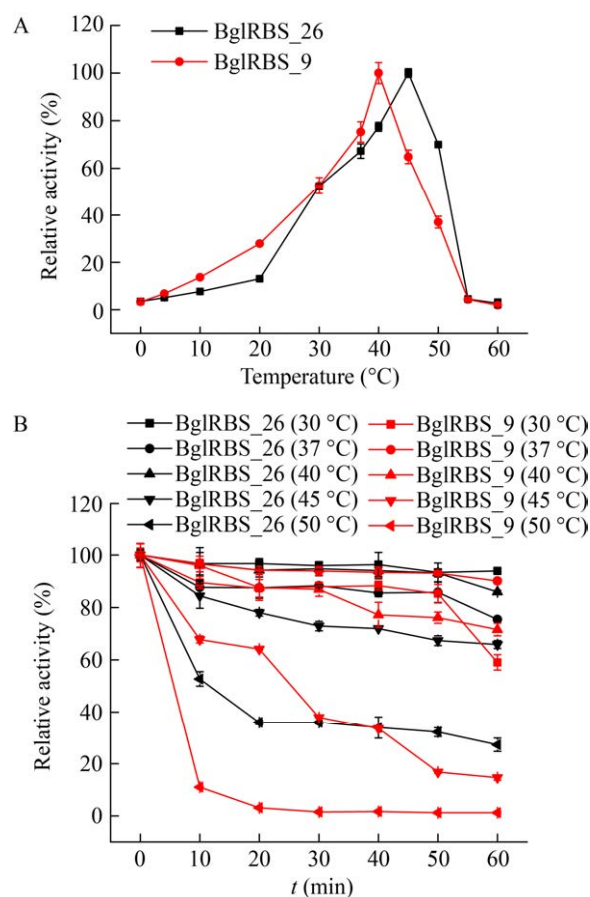


图5 重组酶的最适反应温度(A)及其温度稳定性(B)

Figure 5 The optimal reaction temperature (A) and stability (B) of recombinase

2.3.3 金属离子和化学试剂的影响

由表 1 可知, 金属离子 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 和化学试剂尿素、PEG4000、EDTA、SDS 几乎或完全抑制酶活性; Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Al^{3+} 对 BglRBS_9 的抑制作用大于 BglRBS_26, Mn^{2+} 则反之; 乙酸乙酯、 Li^{+} 对 BglRBS_9 活性有促进作用, 吐温-80、乙酸和 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 对 BglRBS_26 活性有不同程度的提高, 却抑制 BglRBS_9 活性; 盐酸胍将 BglRBS_26 活性提高 2.58 倍, 却抑制 BglRBS_9

活性; β -巯基乙醇、DTT 能将 BglRBS_26 分别提高 3.62、4.12 倍; 乙醇将 BglRBS_9 和 BglRBS_26 活性分别提高至 117%和 103%。

2.3.4 动力学参数

BglRBS_26 和 BglRBS_9 在以 pNPG 为底物时的比活力分别为 188.1 U/mg 和 114.4 U/mg。BglRBS_26 和 BglRBS_9 的米氏常数 K_m 值及最大反应速率 V_{\max} 分别为 0.681 6 $\mu\text{mol/L}$ 、158.8 $\mu\text{mol/min}$ 及 3.317 0 $\mu\text{mol/L}$ 、44.55 $\mu\text{mol/min}$ (表 2)。

表 1 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

Table 1 Effects of metal ions and chemical agents on enzyme activity

Metal ions or chemical reagents		Relative activity of BglRBS_26 (%)	Relative activity of BglRBS_9 (%)
Metal ions (10 mmol/L)	Control	100.00 \pm 2.05	100.00 \pm 2.91
	Cu^{2+}	1.09 \pm 0.11	1.47 \pm 0.10
	Al^{3+}	72.29 \pm 1.77	0.81 \pm 0.21
	Co^{2+}	143.63 \pm 3.17	43.82 \pm 4.55
	Ni^{2+}	82.2 \pm 12.43	20.81 \pm 1.53
	Mg^{2+}	96.88 \pm 0.31	36.70 \pm 0.95
	Mn^{2+}	43.99 \pm 0.02	55.85 \pm 6.41
	Hg^{2+}	0.53 \pm 0.58	0
	Na^{+}	60.88 \pm 3.73	40.28 \pm 4.19
	Li^{+}	98.65 \pm 5.27	105.00 \pm 1.40
	Pb^{2+}	0	13.59 \pm 1.04
	Ca^{2+}	29.23 \pm 1.58	13.04 \pm 3.05
	Zn^{2+}	14.83 \pm 2.27	18.39 \pm 0.46
	K^{+}	39.02 \pm 6.17	10.49 \pm 1.93
	Fe^{3+}	169.89 \pm 7.94	3.54 \pm 3.87
	Fe^{2+}	162.21 \pm 0.54	58.72 \pm 4.19
	Ag^{+}	8.88 \pm 3.40	3.43 \pm 0.12
Chemical reagents 1% (V/V)	SDS	1.01 \pm 0.13	0.31 \pm 0.15
	EDTA	91.78 \pm 7.96	7.97 \pm 0.74
	Guanidine Hydrochloride	258.10 \pm 0.25	85.20 \pm 3.70
	β -mercaptoethanol	362.93 \pm 0.18	101.23 \pm 0.87
	Urea	0	1.56 \pm 0.28
	PEG4000	17.76 \pm 3.48	0.60 \pm 0.14
	Tween-80	285.11 \pm 9.84	98.23 \pm 2.56
	DTT	412.58 \pm 0.26	123.32 \pm 0.80
	Acetic Acid	121.21 \pm 2.41	25.89 \pm 4.82
	Ethanol	103.57 \pm 3.49	117.72 \pm 0.05
	Ethyl acetate	93.73 \pm 0.66	118.61 \pm 0.52

表 2 重组酶的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of recombinase

Enzyme	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
BglRBS_26	$158.80\pm0.492\ 4$	$0.681\ 6\pm0.164\ 2$
BglRBS_9	$44.55\pm0.668\ 9$	$3.317\ 0\pm0.871\ 4$

2.3.5 底物特异性

据表 3 可知, 重组酶具有广泛的底物水解特性, 能有效水解 4-对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷和纤维二糖, 其次对 2-对硝基苯基- β -D-半乳糖苷和麦芽糖的水解能力较其他底物强, 但完全不能水解乳糖和可溶性淀粉。

表 3 重组酶对各种底物的水解活性

Table 3 Hydrolysis activities of recombinase on various substrates

Substrate (25 mmol/L)	Relative activity of BglRBS_26 (%)	Relative activity of BglRBS_9 (%)
p-nitrophenyl- β -D-galactoside	32.76 ± 0.52	60.18 ± 0.79
p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	1.02 ± 0.39	0.48 ± 0.13
p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	4.23 ± 0.69	1.87 ± 0.01
p-nitrophenyl- β -D-cellobiose glycoside	12.22 ± 0.41	42.42 ± 1.76
p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	100.00 ± 1.06	100.00 ± 1.80
Sucrose	18.88 ± 0.54	0.68 ± 0.09
Lactose	0	0
Maltose	47.86 ± 0.60	0.58 ± 0.06
Cellobiose	100.00 ± 5.61	100.00 ± 3.11
CMC-Na	0.46 ± 0.03	0.20 ± 0.27
Soluble starch 10% (I/I)	0	0

2.4 NaCl 浓度的影响和稳定性

NaCl 浓度的影响由图 6A 可知, 随 NaCl 浓度的升高, 重组酶活力随之降低。当 NaCl 的浓度为 0.5 mol/L 时, BglRBS_9 酶活性降至 40%以下; 而 BglRBS_26 在 4.5 mol/L NaCl 时其剩余酶活仍能维持在 70%以上。

NaCl 稳定性由图 6B 可知, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h 后, BglRBS_26 在 2.5 mol/L 时的酶活性为 80%, 说明 BglRBS_26 对 NaCl 具一定耐受性; BglRBS_9 的活性随 NaCl 浓度的增高呈下降趋势, 说明其对 NaCl 不具耐受性。

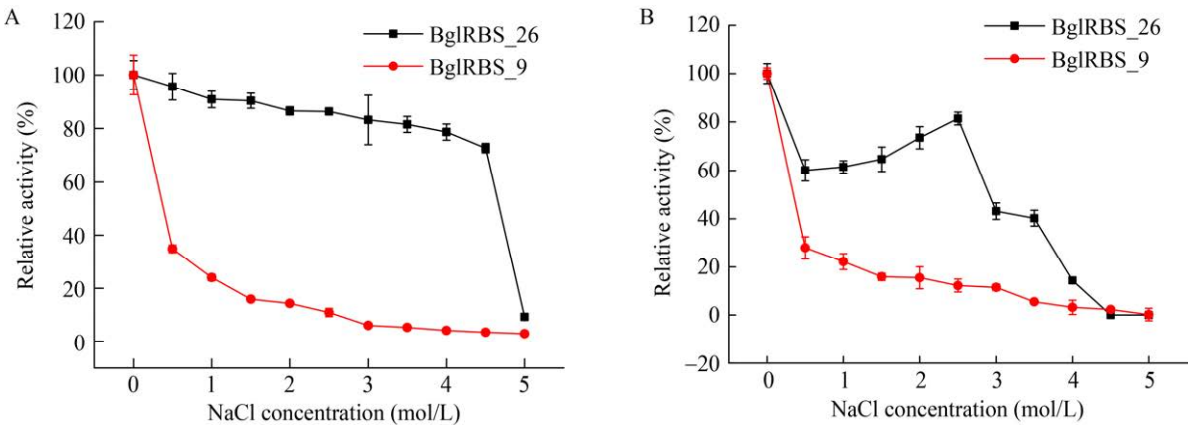


图 6 NaCl 对 β -葡萄糖苷酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9 的影响(A)及其稳定性(B)

Figure 6 Effect (A) and stability (B) of NaCl on β -glucosidase BglRBS_26 and BglRBS_9

2.5 各种糖对酶活力的影响

测定 1%–20% (质量体积分数) 的葡萄糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖和木糖对 BglRBS_26 和 BglRBS_9 酶活力的影响。

从图 7 可知, 重组酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9 为可耐受多种单糖、二糖、多糖并被其激活的新型 β -葡萄糖苷酶, 葡萄糖、木糖和阿拉伯糖对酶活性有不同程度的抑制作用。1%–20% (质量体积分数) 半乳糖对 BglRBS_26 有不同程度的抑制作用; 1% (质量体积分数) 甘露糖可将 BglRBS_26 酶活提高至 121%; 1%–5% (质量体积分数) 果糖将酶活性提高至 120%; 1%–20% (质量体积分数) 蔗糖对酶活性有不同程度的激活作用, 当反应体系中加入 20% (质量体积分数) 蔗糖时, BglRBS_26 酶活力可提高至 140%。

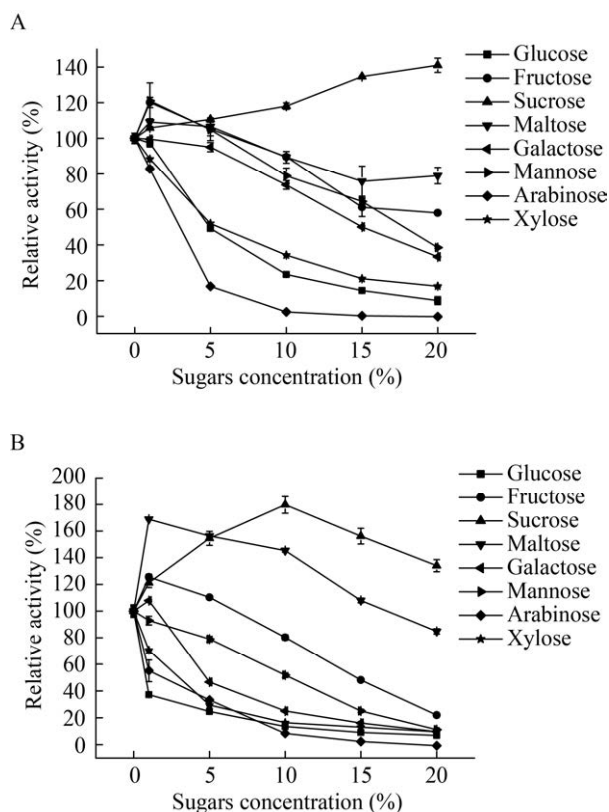


图 7 各种糖对 BglRBS_26 (A) 和 BglRBS_9 (B) 的影响
Figure 7 The effect of various sugars on BglRBS_26 (A) and BglRBS_9 (B)

2.6 葡萄糖及木糖稳定性

从图 8 可知, 5%–40% (质量体积分数) 葡萄糖和木糖抑制重组酶活性。这可能与高浓度糖可直接或间接干扰底物与酶活性位点的结合从而降低反应速率有关^[38]。

2.7 转糖苷产物的 UPLC 定性检测

重组酶具有糖基活性, 以葡萄糖为底物时生成 3 个峰值。对照图 9A (纤维二糖标准品) 和图 9B (β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖产物葡萄糖) 可知, 在 14、15 和 17 min 产生的峰分别为果糖、葡萄糖和纤维二糖。BglRBS_26 的水解产物包括果糖、葡萄糖和纤维二糖(图 9C)。BglRBS_9 水解产物除了果糖、葡萄糖和纤维二糖外, 还有一未知多糖(图 9D)。

3 讨论与结论

本研究从滇金丝猴粪便微生物宏基因组中获得 2 个 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9, 最适 pH 值分别为 6.0 和 5.0, 与多数胃肠道微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相似(最适 pH 值范围为 5.0–6.8) (表 4)。尽管重组酶为酸性酶, 但其具有较广的酸碱作用范围, BglRBS_26 在 pH 8.0、37 °C 保温 1 h 依然能保持 100% 的活性; BglRBS_9 在 pH 7.0、37 °C 保温 1 h 可维持 140% 的活性, 在 pH 8.0、37 °C 保温 1 h 仍能保持 90% 的活性(图 4B)。

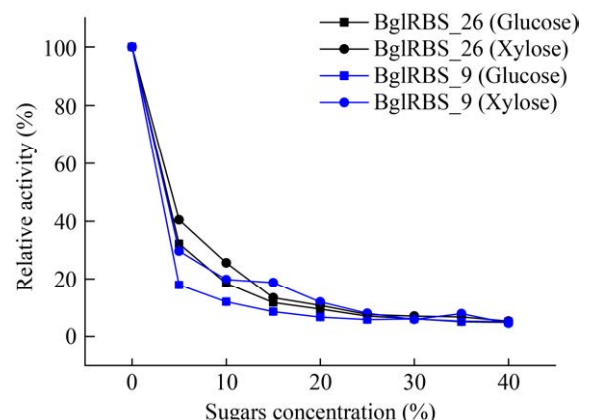


图 8 重组酶的葡萄糖和木糖稳定性
Figure 8 The glucose and xylose stability of recombinase

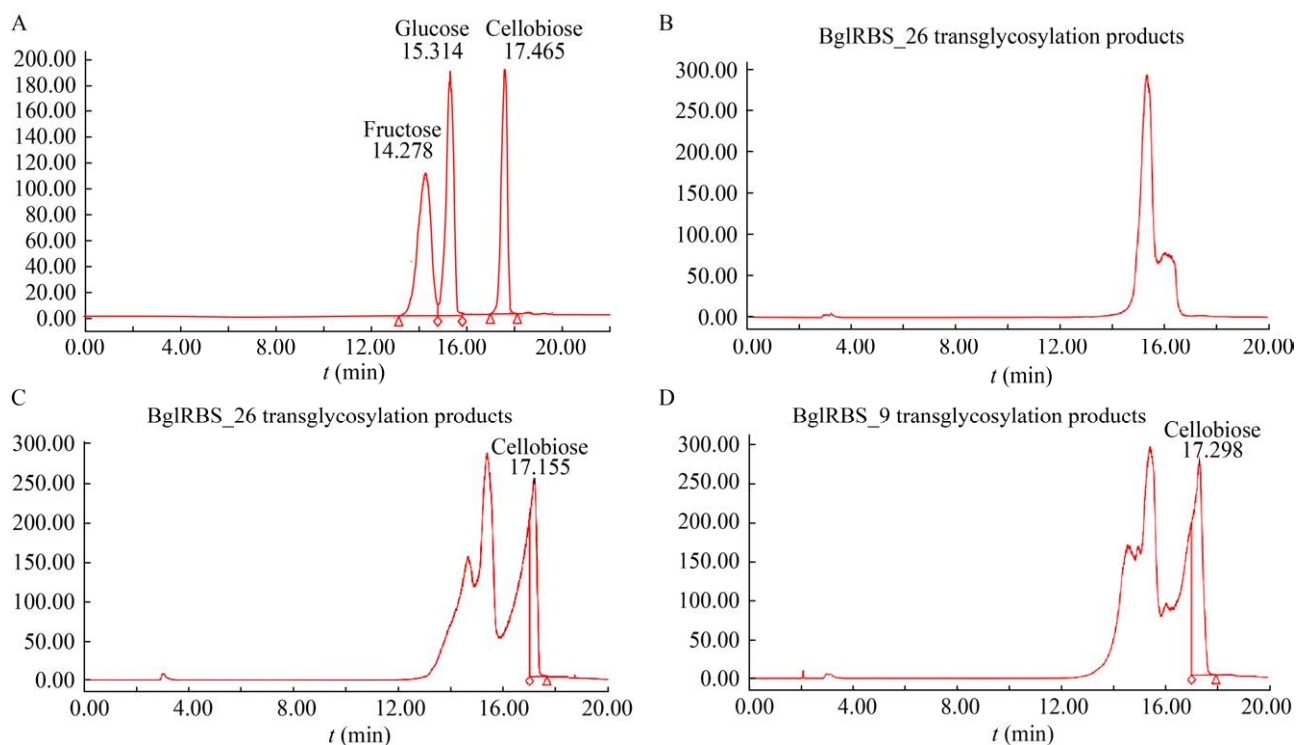


图9 重组酶转糖苷产物的UPLC分析

Figure 9 UPLC analysis of transglycoside products of recombinase

注: A: 果糖, 葡萄糖和纤维二糖混合标准品, B: β -葡萄糖苷酶水解纤维二糖产物对照, C: BglRBS_26 转糖苷产品, D: BglRBS_9 转糖苷产品

Note: A: Fructose, glucose and cellobiose mixed standard, B: β -glucosidase hydrolyzed cellobiose product control, C: BglRBS_26 transglycoside product, D: BglRBS_9 transglycoside product

这比牛瘤胃微生物宏基因组来源的 UnbifC5、兔盲肠宏基因组来源的 NGLU007 和 *nglu07*、*Globitermes sulphureus* 肠道来源的 Bgl-gs1 及 *Reticulitermes chinensis* 肠道来源的 RcBG3 的稳定性都要好(表 4)。因此, 在食品、啤酒和葡萄酒、动物饲料、纺织和洗衣、制浆造纸等工业领域有潜在的应用价值^[50]。

BglRBS_26 和 BglRBS_9 为中低温酶, 最适反应温度分别为 40 °C 和 45 °C, 与胃肠道微生物来源的多数 β -葡萄糖苷酶相似(最适反应温度范围为 30–50 °C); 二者温度稳定性较好, 在 30–45 °C 处理 1 h 后残余酶活均大于 59%, 高于牛瘤胃微生物宏基因组来源的 UnbifC5、Unglu135B12 和 *Reticulitermes chinensis* 肠道来源的 RcBG3 (表 4)。

金属离子对重组酶活性影响显著。Cu²⁺、Ag⁺、

Hg⁺对 β -葡萄糖苷酶活性有抑制作用, 与大多数胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相似^[20,23,39,42-43,48], Co²⁺ 和 Fe³⁺ 对 BglRBS_26 有促进作用却抑制 BglRBS_9 的活性, 而 Co²⁺ 和 Fe³⁺ 抑制了绝大多数胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶活性, 但对 *Macrotermes annandalei*^[48] 来源的 BGL5 表现为促进作用。Fe²⁺ 对多数胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶起抑制作用^[39,42-43,46], 却能将 BglRBS_26 的活性提高 1.6 倍。Co²⁺ 和 Fe³⁺ 可能作为辅因子与 BglRBS_26 紧密结合, 对其活性有促进作用^[51]。

化学试剂对酶活性的影响差异明显, 特别是 BglRBS_26。SDS 和 EDTA 对酶活性有抑制作用, 与大多数胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶相似^[20,23,39,42-43,48], EDTA 作为金属离子螯合

表 4 重组酶与胃肠道粪便宏基因组来源的 β -葡萄糖苷酶酶学性质比较

Table 4 Comparison of the enzymatic properties of recombinase with β -glucosidase derived from gastrointestinal fecal metagenome

Source	Enzyme	GH family	Optimum temperature (°C)	Temperature stability	Optimum pH	pH stability	K_m (μ mol/L)	Specific activity (U/mg)	Reference
<i>R. bieti</i> fecal metagenome	BglRBS_9	GH1	40	30 °C for 1 h has 59% activities; 37 °C for 1 h has 90% activities; 40 °C for 1 h has 85% activities; 45 °C for 1 h has 15% activities	5.0	pH 6.0 for 1 h (37 °C) has more than 75% activities; pH 7.0 for 1 h (37 °C) has more than 140% activities; for 1 h (37 °C) has more than 90% activities	3.317 0	114.4	This study
	BglRBS_26	GH1	45	30 °C for 1 h has 90% activities; 37 °C for 1 h has 75% activities; 40 °C for 1 h has 85% activities; 45 °C for 1 h has less than 65% activities	6.0	pH 5.0 for 1 h (37 °C) has more than 110% activities; pH 6.0 for 1 h (37 °C) has more than 170% activities; pH 7.0–8.0 for 1 h (37 °C) has more than 100% activities	0.681 6	188.1	This study
Buffalo rumen metagenome	Umccl3G	GH3	45	Relatively stable below 35 °C, 40 °C for 1h has only about 10% activity	6.0–6.5	pH 4.5 for 24 h (4 °C) has 70% activities; pH 5.0–6.0 for 24 h activity is basically unchanged	–	3.4	[39]
Cow rumen metagenome	LAB25g2	GH3	50	50 °C for 150 h, has 82% activities	5.2	–	450	1.5	[40]
Rumen of cattle metagenome	UnbifC5	–	37	37 °C for 0.5 h has 80% activities, 45 °C for 0.5 h has only 20% activities	6.4	pH 4.0–7.0 for 1 h (4 °C) has 80% activities; pH 8.0–9.0 for 1 h has 40%–60% activities	–	–	[41]
	Unglu135B12	GH3	38	30 °C for 1 h has more than 85% activities; Poor temperature stability above 40 °C	5.0	pH 5.0–6.5 for 24 h (4 °C) has more than 60% activities	309	2.5×10^3	[23]
<i>Capra hircus</i> rumen metagenome	Umccl 6X	GH3	50	55 °C for 1 h has more than 60% activities, 60 °C for 1 h, almost no enzyme activity	7.5	pH 5.5 for 24 h (4 °C) has 70% activities; pH 6.5–8.5 for 24 h has more than 80% activities	–	33.6	[42]
Sheep rumen metagenome	Persi BGL1	GH1	40	40 °C for 48 h has more than 80% activities; less 10% activities after 264 h	8.0	–	1 250	–	[43]

(待续)

		(续表 4)			
Rabbit cecum metagenome	NGLU007	—	50	30–35 °C for 1 h has 100% activities, 40–60 °C for 1 h has 60% activities	10.0 pH 7.0–8.0 for 1 h (RT) activity is basically unchanged; pH 5.0–6.0 and pH 9.0–11.0 has more than 60% activities [44]
	<i>nglu07</i>	GH1	50	30–40 °C for 1 h has more than 80% activities, 70 °C has 50% activities	10.0 pH 4.0–10.0 for 0.5 h (RT) has 60% activities; pH 7.0 has 100% activities [45]
<i>G. sulphureus</i> gut metagenome	Bgl-gsl	GH1	90	70–75 °C for 135min has more than 60% activities	6.0 pH 6.0–6.5 for 2 h (70 °C) has more than 45% activities [20]
<i>Coptotermes Formosanus</i> metagenome	Bgl3311	—	51	4–45 °C for 4 h, has more than 90% activities	6.8 pH 7.0–11.0 for 4 h (4 °C) has more than 60% activities [46]
<i>R. chinensis</i> gut metagenome	RcBG3	GH3	35	35 °C for 6 h has more than 60% activities; 40 °C for 1 h, has 60% activities; 45 °C for 1 h, only 30% activities	5.2 pH 5.5 for 1 h (30 °C) has 70% activities; pH 7.5 has more than 90% activities; pH 8.0 has 60 activities [47]
<i>Macrotermes annandalei</i> metagenome	BGL5	GH3	30	—	6.5 1.99 mg/mL [48]
<i>Syntermes wheeleri</i> gut metagenome	Bgl7226	GH3	40	—	7.0; 10.0 53.1 (pH 7.0); 498.93 (pH 10.0) [49]

注：—：无或文献中没有提及；RT：室温
Note: —: None or not mentioned in the literature; RT: Room temperature

剂, 对酶活性的影响可能需要二价阳离子参与。DTT 和乙醇均对 BglRBS_26 和 BglRBS_9 有促进作用, DTT 可将巯基还原为二硫键^[52], 二硫键对蛋白质的立体结构有稳定作用, 可能使底物结合于酶活性中心, 导致活性增加; 吐温-80、盐酸胍和乙酸对 BglRBS_26 有促进作用, 而乙酸乙酯对 BglRBS_9 有促进作用。BglRBS_26 和 BglRBS_9 具有较好的乙醇耐受性(表 1), 使其在发酵工艺、燃料生产工业等方面具有良好的潜在价值。金属离子和化学试剂对酶活性的影响差异显著, 可能由于正负电氨基酸的数目及排列方式导致(表 5)。此外, BglRBS_26 与同源蛋白(48.37%, PDB ID 号为 6z1h)的带电氨基酸分布图(图 10)显示, BglRBS_26 活性中心正背面的正负电氨基酸散乱或交叉排布, 而同源蛋白则呈连续排布, 阳性金属离子与带负电氨基酸相互作用, 可能导致酶立

体及活性中心结构发生改变, 从而使酶活性增加或减少。

BglRBS_26 和 BglRBS_9 较纯, 其比活力远远高于多数胃肠道粪便微生物来源的 β -葡萄糖苷酶(表 4)。其次, 其 K_m 值较小, 在较低底物浓度下就能到达较大催化速率, 不仅大于轮白蚁肠道宏基因组来源的 Bgl7226, 而且远高于其他胃肠道宏基因组来源的 β -葡萄糖苷酶(表 4)。

蔗糖能极大程度地提高重组酶活性。BglRBS_26 和 BglRBS_9 的蔗糖耐受性高于土壤宏基因组来源的 Unbgl3A^[50], 15%的蔗糖对 Unbgl3A 激活作用最大, 使 Unbgl3A 的酶活力提高 70%, 而 BglRBS_26 和 BglRBS_9 活性分别在 20%、10%的蔗糖下达到最大, 分别为 140%、180%; BglRBS_9 即使在 20%的浓度下也能维持 130%的活性。因此添加蔗糖不会影响酶对底物 pNPG 的影响。

表 5 重组酶与胃肠道粪便宏基因组来源的 β -葡萄糖苷酶带电氨基酸比较

Table 5 Comparison of charged amino acids between recombinant enzymes and β -glucosidase derived from gastrointestinal stool metagenomics

Enzyme	Positively charged amino acids		Negatively charged amino acid		Total amino acids	Reference
	K (Lys)	R (Arg)	D (Asp)	E (Glu)		
BglRBS_18	48 (10.91%)	39 (8.86%)	38 (8.64%)	47 (10.68%)	440	This study
BglRBS_26	16 (3.03%)	38 (7.21%)	35 (6.64%)	41 (7.78%)	527	This study
Umcel3g	23 (3.11%)	44 (5.95%)	47 (6.35%)	49 (6.62%)	740	[39]
LAB25g2	44 (5.65%)	10 (1.28%)	35 (4.49%)	50 (6.42%)	779	[40]
UnbifC5	—	—	—	—	—	[41]
Unglu135B12	43 (5.52%)	34 (4.36%)	37 (4.75%)	45 (5.78%)	779	[23]
Umcel 6X	—	—	—	—	—	[42]
Persi BGL1	30 (6.45%)	21 (4.52%)	32 (6.88%)	38 (8.17%)	465	[43]
NGLU007	1 (1.08%)	9 (9.68%)	3 (3.23%)	11 (11.83%)	93	[44]
Nglu07	—	—	—	—	—	[45]
Bgl-gsl	31 (6.81%)	21 (4.62%)	29 (6.37%)	31 (6.81%)	455	[20]
Bgl3311	24 (3.79%)	14 (2.21%)	24 (3.79%)	21 (3.31%)	634	[46]
RcBG3	—	—	—	—	—	[47]
BGL5	21 (2.85%)	50 (6.78%)	52 (7.06%)	35 (4.75%)	737	[48]
Bgl7226	—	—	—	—	—	[49]

注: —: 无或文献中未引用

Note: —: None or no references in the literature

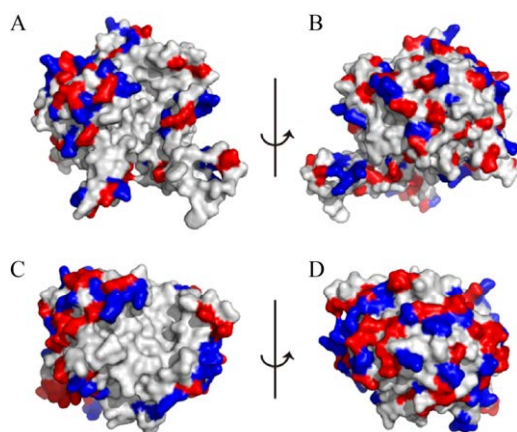


图 10 BglRBS_26 (A 和 B) 与同源蛋白带电氨基酸分布图(C 和 D)

Figure 10 The distribution of charged amino acids of BglRBS_26 (A and B) and the homologous protein (C and D)

注: BglRBS_26 结构是通过 SWISS-Model 以具有最高序列相似性(PDB ID: 6z1h)的结构为模板进行建模的; 图片是由 pymol 软件制作的。A 和 B 是 BglRBS_26 的活性中心的正视图和后视图, C 和 D 是同源蛋白的正视图和后视图。带正电荷的氨基酸[K(Lys)和 R(Arg)]标记为蓝色, 带负电荷的氨基酸[D(Asp)和 E(Glu)]标记为红色

Note: The BglRBS_26 structure was modeled by SWISS-Model using the structure with the highest sequence similarity (PDB ID: 6z1h) as a template; the picture was made by pymol software. A and B are the front and back surface views of the active center of BglRBS_26, C and D are the front and back views of the homologous protein; positively charged amino acids [K(Lys) and R(Arg)] are marked in blue, and negatively charged amino acids [D(Asp) and E(Glu)] are marked in red

NaCl 对酶活性影响的研究表明, BglRBS_26 在 4.5 mol/L NaCl 条件下剩余酶活仍维持在 70% 以上, 而 BglRBS_9 在 0.5 mol/L NaCl 条件下活性降至 40% 以下。此外, BglRBS_26 在 37 °C、2.5 mol/L 的 NaCl 条件下处理 1 h 仍保留 80% 活性, 因此具有较好的 NaCl 耐受性和稳定性。其在食品加工领域具有潜在的应用价值^[53]。

本研究获得 2 个具有转糖基活性的 β -葡萄糖苷酶 BglRBS_26 和 BglRBS_9, 可将葡萄糖催化为纤维二糖, 同时具有较好的酸碱稳定性和较高的催化效率; 另外, 蔗糖能极大程度地提高 BglRBS_26 和 BglRBS_9 活性(图 7); 此外, BglRBS_26 具有较好的 NaCl 稳定性(图 6A)。因

此, BglRBS_26 和 BglRBS_9 在作物育种、食品和化工等领域具有较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Duan XY. Functional sites analysis for typical cellulase active site architecture[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong University, 2013 (in Chinese)
段晓云. 代表性纤维素酶家族活性架构的功能位点分析[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2013
- [2] Semêdo LTAS, Gomes RC, Bon EPS, Soares RMA, Linhares LF, Coelho RRR. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84/86(1/9): 267-276
- [3] 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
- [4] 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)
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
- [5] Song HY. Screening, identification of Mongolian horse source cellulose-decomposing strains and cloning and expression of cellulase gene[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese)
宋海燕. 蒙古马源纤维素分解菌的筛选鉴定及纤维素酶基因的克隆与表达[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2018
- [6] He J. A study on the gut microbiome and cellulolytic bacterium in Bactrian camels[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese)
何静. 双峰骆驼肠道微生态特征及纤维素分解菌的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2019
- [7] Liang TY. Study on gastrointestinal tract mucosal morphology, enzyme activity and microflora of donkeys[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2019 (in Chinese)
梁婷玉. 驴胃肠道组织形态、酶活及微生物区系研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2019
- [8] Zhou JP. Preliminary study on cellulases and hemicellulases from symbiotic bacteria harbored in the gut of *Batocera horsfieldi* larvae[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)

- 周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2010
- [9] Li J, Zeng Y, Zhang MM, Bai FW, Zhao XQ. Disrupting cell wall protein encoding gene *CWP2* enhances extracellular β -glucosidase activity by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 681-690 (in Chinese)
李洁, 曾钰, 张明明, 白凤武, 赵心清. 破坏细胞壁蛋白 *CWP2* 基因提高重组酿酒酵母 β -葡萄糖苷酶胞外酶活[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 681-690
- [10] Abdella A, El-Baz AF, Ibrahim IA, Mahrous EE, Yang ST. Biotransformation of soy flour isoflavones by *Aspergillus niger* NRRL 3122 β -glucosidase enzyme[J]. Natural Product Research, 2018, 32(20): 2382-2391
- [11] Ahmed SS, Akhter M, Sajjad M, Gul R, Khurshid S. Soluble production, characterization, and structural aesthetics of an industrially important thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 9308593
- [12] Raza A, Pothula R, Abdelgaffar H, Bashir S, Jurat-Fuentes JL. Identification and functional characterization of a β -glucosidase from *Bacillus tequelensis* BD69 expressed in bacterial and yeast heterologous systems[J]. PeerJ, 2020, 8: e8792
- [13] Smekenov I, Bakhtambayeva M, Bissenbayev K, Saparbayev M, Taipakova S, Bissenbaev AK. Heterologous secretory expression of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(1): 107-123
- [14] Volkov PV, Rozhkova AM, Zorov IN, Sinitsyn AP. Cloning, purification and study of recombinant GH3 family β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*[J]. Biochimie, 2020, 168: 231-240
- [15] Feng LY, He PH, 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)
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
- [16] Xie YF, Han XM, Lu FP. Expression, purification and enzymatic properties of β -glucosidase from *Lactobacillus paracasei*[J]. China Biotechnology, 2019, 39(5): 72-79 (in Chinese)
谢玉锋, 韩雪梅, 路福平. 副干酪乳杆菌 β -葡萄糖苷酶的表达、纯化及酶学性质研究[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(5): 72-79
- [17] Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics: the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498
- [18] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [19] Yan B, Hong K, Xu Y, Ma C. Metagenome cloning: a new approach for novel microbial bioactive compounds discovery[J]. Microbiology, 2005, 32(1): 113-117 (in Chinese)
阎冰, 洪葵, 许云, 马超. 宏基因组克隆: 微生物活性物质筛选的新途径[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 113-117
- [20] Wang QF, Qian CL, Zhang XZ, Liu N, Yan X, Zhou ZH. 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
- [21] De Fátima Alves L, Meleiro LP, Silva RN, Westmann CA, Guazzaroni ME. Novel ethanol- and 5-hydroxymethyl furfural-stimulated β -glucosidase retrieved from a Brazilian secondary Atlantic forest soil metagenome[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2556
- [22] Matsuzawa T, Yaoi K. Screening, identification, and characterization of a novel saccharide-stimulated β -glycosidase from a soil metagenomic library[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 633-646
- [23] Li YD, Liu N, Yang H, Zhao F, Yu Y, Tian Y, Lu XY. Cloning and characterization of a new β -glucosidase from a metagenomic library of Rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*[J]. BMC Biotechnology, 2014, 14(1): 85
- [24] Zhang L, Fu Q, Li WP, Wang BW, Yin XY, Liu SY, Xu ZN, Niu QH. Identification and characterization of a novel β -glucosidase via metagenomic analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* and its microbial flora[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 14850
- [25] Toyama D, De Moraes MAB, Ramos FC, Zanphorlin LM, Tonoli CCC, Balula AF, De Miranda FP, Almeida VM, Marana SR, Ruller R, et al. A novel β -glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil)[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Proteins and Proteomics, 2018, 1866(4): 569-579
- [26] Matsuzawa T, Jo T, Uchiyama T, Manninen JA, Arakawa T, Miyazaki K, Fushinobu S, Yaoi K. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(12): 2340-2353
- [27] Uchiyama T, Yaoi K, Miyazaki K. Glucose-tolerant β -glucosidase retrieved from a *Kusaya gravity* metagenome[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 548
- [28] Gomes-Pepe ES, Machado Sierra EG, Pereira MR, Castellane TCL, De Macedo Lemos EG. Bgl10: a novel

- metagenomics alcohol-tolerant and glucose-stimulated GH1 β -glucosidase suitable for lactose-free milk preparation[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167932
- [29] Cao HF, Zhang YQ, Shi PJ, Ma R, Yang H, Xia W, Cui Y, Luo HY, Bai YG, Yao B. 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
- [30] Dai LM, Deng M, Huang ZX, Wang YJ, Li JJ, Zhou JP, Mu YL, Xu B. Gene diversity of the glycosyl hydrolase family 10 xylanase in the fecal microorganism of *Rhinopithecus bieti*[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 44-50 (in Chinese)
戴利铭, 邓梦, 黄遵锡, 王余娇, 李俊俊, 周峻沛, 慕跃林, 许波. 滇金丝猴粪便微生物 GH10 家族木聚糖酶基因多样性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 44-50
- [31] Yang ZF. Characterization of chitinase and β -galactosidase in fecal microbial metagenome from *Rhinopithecus bieti*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2018 (in Chinese)
杨正凤. 滇金丝猴粪便微生物宏基因组来源几丁质酶和 β -半乳糖苷酶的研究[D]. 昆明: 云南师范大学硕士学位论文, 2018
- [32] Zhang WH, Yang YX, Yang ZF, Huang ZX, Li JJ, Tang XH, Yang YJ, Wu Q, Mu YL, Han NY, Xu B. Expression and characterization of β -galactosidase from fecal microbes of *Rhinopithecus bieti*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(8): 1561-1575 (in Chinese)
张文洪, 杨雁霞, 杨正凤, 黄遵锡, 李俊俊, 唐湘华, 杨云娟, 吴倩, 慕跃林, 韩楠玉, 许波. 滇金丝猴粪便微生物来源的 β -半乳糖苷酶基因的表达及酶学性质[J]. 微生物学报, 2019, 59(8): 1561-1575
- [33] Yang YX, Yang YJ, Fan Q, Huang ZX, Li JJ, Wu Q, Tang XH, Ding JM, Han NY, Xu B. Molecular and biochemical characterization of salt-tolerant trehalose-6-phosphate hydrolases identified by screening and sequencing salt-tolerant clones from the metagenomic library of the gastrointestinal tract[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1466
- [34] Lu J, Lu WW, Li WL, Guo XM, Du LQ, Wei YT, Huang RB. Cloning, expression and characterization of novel β -glucosidase from soil metagenomic library[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2018, 31(12): 2589-2597 (in Chinese)
陆坚, 路卫卫, 李伟亮, 郭晓敏, 杜丽琴, 韦宇拓, 黄日波. 高糖土壤宏基因组文库 β -葡萄糖苷酶基因克隆表达及酶学性质分析[J]. 西南农业学报, 2018, 31(12): 2589-2597
- [35] Ly HD, Withers SG. Mutagenesis of glycosidases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1999, 68: 487-522
- [36] Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [37] Xu B, Xu WJ, Li JJ, Dai LM, Xiong CY, Tang XH, Yang YJ, Mu YL, Zhou JP, Ding JM, Wu Q, Huang ZX. et al. Metagenomic analysis of the *Rhinopithecus bieti* fecal microbiome reveals a broad diversity of bacterial and glycoside hydrolase profiles related to lignocellulose degradation[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 174
- [38] Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 500-507
- [39] Guo H, Feng Y, Mo XC, Duan CJ, Tang JL, Feng JX. Cloning and expression of a β -glucosidase gene umcel3G from metagenome of buffalo rumen and characterization of the translated product[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2): 232-238 (in Chinese)
郭鸿, 封毅, 莫新春, 段承杰, 唐纪良, 冯家勋. 水牛瘤胃宏基因组的一个新的 β -葡萄糖苷酶基因 umcel3G 的克隆、表达及其表达产物的酶学特性[J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 232-238
- [40] Del Pozo MV, Fernández-Arrojo L, Gil-Martínez J, Montesinos A, Chernikova TN, Nechitaylo TY, Waliszek A, Tortajada M, Rojas A, Huws SA, Golyshina OV, Newbold CJ, Polaina J, Ferrer M, Golyshin PN. Microbial β -glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 73
- [41] Xin S. Cloning, characterization and expression of the novel cellulase genes from uncultured microorganisms[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2013 (in Chinese)
辛盛. 未培养微生物中两个纤维素酶基因的克隆、鉴定及表达研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2013
- [42] Xu FZ, Li BH, Li L, Ding XL. Screen and analysis of enzymic property of β -glucosidase from metagenome of goat(*Capra hircus*) rumen[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(11): 1345-1350 (in Chinese)
许发芝, 李炳华, 李吕木, 丁小玲. 山羊瘤胃宏基因组文库中 β -葡萄糖苷酶筛选及性质研究[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1345-1350
- [43] Ariaeenejad S, Nooshi-Nedamani S, Rahban M, Kavousi K, Salekdeh GH. A novel high glucose-tolerant β -glucosidase: targeted computational approach for metagenomic screening[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 813
- [44] Ma SH. Isolation of a β -glucosidase gene from metagenome of rabbit cecum[D]. Chongqing: Master's Thesis of

- Southwest University, 2008 (in Chinese)
马淑华. 兔盲肠宏基因组中 β -葡萄糖苷酶基因的分离研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2008
- [45] Ma ZG, Tang J, Ma SH, Zhang SH, Jia JJ, Li T, Zhou ZY. Gene isolation and characterization of a novel alkaline β -glucosidase with low molecular mass[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 108-113 (in Chinese)
马振刚, 唐婧, 马淑华, 张时恒, 贾俊杰, 李田, 周泽扬. 新型碱性低分子量 β -葡萄糖苷酶基因的分离与酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 108-113
- [46] Wang A. Gene cloning and directed evolution of a novel β -glucosidase derived from metagenomic library of guts inhabiting microbes of *Coptotermes fonnosanus*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Sun Yat-sen University, 2013 (in Chinese)
王安. 台湾乳白蚁肠道宏基因组中新型 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及定向进化研究[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2013
- [47] Zhang YQ. Metagenomic analysis of the intestinal bacteria of *Reticulitermes chinensis* snyder and characterization of a novel β -glucosidase[D]. Wuhan: Master's Thesis of Central China Normal University, 2014 (in Chinese)
张燕琼. 黑胸散白蚁肠道微生物的宏基因组学研究以及一种 β -葡萄糖苷酶的特性研究[D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2014
- [48] Zhang ML, Liu N, Qian CL, Wang QF, Wang Q, Long YH, Huang YP, Zhou ZH, Yan X. Phylogenetic and functional analysis of gut microbiota of a fungus-growing higher termite: bacteroidetes from higher termites are a rich source of β -glucosidase genes[J]. Microbial Ecology, 2014, 68(2): 416-425
- [49] Lima RAT, De Oliveira G, Souza AA, et al. Characterization of a novel GH3 β -glucosidase from the gut metagenome of the Brazilian Cerrado termite *Syntermes Wheeleri*[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 165(Pt A): 822-834
- [50] Ben Hmad I, Gargouri A. Neutral and alkaline cellulases: production, engineering, and applications[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017, 57(8): 653-658
- [51] Song Y, Zhong LP, Zhang JL, Wang M. Effect of metal ions on *Rhodococcus* sp. nitrile hydratase activity[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2009, 24(1): 11-14, 18 (in Chinese)
宋洋, 钟莉萍, 张锦丽, 王敏. 金属离子对红球菌腈水合酶活力的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(1): 11-14, 18
- [52] Cleland WW. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups[J]. Biochemistry, 1964, 3(4): 480-482
- [53] Wang WW, Tang HZ, Xu P. Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and archaea[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 550-558 (in Chinese)
王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 550-558