

# *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质的研究

刘 群<sup>1,2</sup>, 管政兵<sup>1,2</sup>, 蔡宇杰<sup>1,2</sup>, 廖祥儒<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 为获得耐碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 进一步研究碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质。从实验室已有蜂蜜中筛选出一株耐碱性的高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4, 根据 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 中 $\beta$ -葡萄糖苷酶(*bglA*)基因序列设计一对引物, 通过 PCR 扩增技术, 获得 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(*bglA*), 将扩增后的 *bglA* 与质粒 pColdII 构建重组表达载体 pColdII-*bglA*, 并转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中表达。重组表达的 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活可达 12.40 U/mL; 该重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适反应温度为 60 °C; 最适反应 pH 值为 pH 8.0; 5 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  可使酶活提高 50% 左右。本实验所获得的碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶比已报道的重组酶在碱性条件下稳定性更好。

**关键词:** 碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶; 大肠杆菌; 基因克隆; 酶学性质; 高地芽孢杆菌

中图分类号: Q 814 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)11-1203-07

## Cloning, Expression and Characterization of Alkali-Stable $\beta$ -Glucosidase from *Bacillus altitudinis* SYBC hb4

LIU Qun<sup>1,2</sup>, GUAN Zhengbing<sup>1,2</sup>, CAI Yujie<sup>1,2</sup>, LIAO Xiangru<sup>\*1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In order to obtain alkali-stable  $\beta$ -glucosidase and study its enzyme characterization, an alkali-stable strain *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 was screened and isolated from native honey. Based on the  $\beta$ -glucosidase coding sequences from *Bacillus altitudinis* SYBC hb4, design up and downstream oligonucleotide primers were designed, and the target gene (*bglA*) was amplified by using PCR. The expression vector pColdII-*bglA* was constructed by subcloning the target gene into plasmid pColdII, and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for heterologous expression. The expression  $\beta$ -glucosidase activity reached to 12.40 U/mL. The optimum temperature and pH of the recombinant  $\beta$ -glucosidase were 60 °C and 8.0, respectively. And 5 mmol/L  $Mg^{2+}$  could increased

收稿日期: 2015-08-08

基金项目: 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28); 无锡市科技发展农业支撑项目(CLE01N1310)。

\* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西赣州人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学与发酵工程方面的研究。  
E-mail: liaoxiangru@163.com

引用本文: 刘群, 管政兵, 蔡宇杰, 等. *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1203-1209.

50%  $\beta$ -glucosidase activity.

**Keywords:** alkali-stable  $\beta$ -glucosidase, *Escherichia coli*, clone, characterization, *Bacillus altitudinis* SYBC hb4

纤维素是自然界含量最多、分布最广的一种多糖,也是天然的可再生能源物质,在医药、食品、工业、农业中有着重要的作用。纤维素酶是降解纤维素形成葡萄糖的一组复合酶的总称,主要包括由外切 $\beta$ -葡聚糖酶、内切 $\beta$ -葡聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶等组成。其中, $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, EC3.2.1.21)又称 $\beta$ -D-葡萄糖苷水解酶,是一种能催化水解 $\beta$ -葡萄糖苷键生成葡萄糖的酶,是纤维素酶系中一类重要的酶<sup>[1]</sup>。纤维素酶在外切 $\beta$ -葡聚糖酶、内切 $\beta$ -葡聚糖酶作用下水解成纤维二糖,纤维二糖在 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用下水解为葡萄糖<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究可以追溯到1837年,Liebig等<sup>[3]</sup>首次在苦杏仁汁中发现了该酶。纤维素酶的最适pH值一般在4.5~6.5,少数在偏碱性pH范围内发挥作用的纤维素酶称为碱性纤维素酶。随着现代工业的不断发展,对碱性纤维素酶的需求量越来越大,它主要应用于洗涤行业<sup>[4-6]</sup>、造纸行业、纺织行业以及医药食品当中。

上世纪70年代初日本生物学家从芽孢杆菌中首先发现碱性纤维素酶<sup>[7]</sup>,随着分子生物学技术的发展,越来越多的碱性纤维素酶基因被发现,包括碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶。由于植物来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活比微生物来源的低的多,所以目前研究的对象主要集中于微生物中<sup>[8]</sup>。微生物来源的碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶可以应用于纺织行业,因为 $\beta$ -葡萄糖苷酶在碱性条件下时更有利于形成聚合物<sup>[9]</sup>。近年来的研究还发现碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶在微生物循环、生产工业燃料、减少工业生产中的环境污染等方面有重大应用。Meng等<sup>[10-11]</sup>发现海洋微生物中能产生耐碱性强的 $\beta$ -葡萄糖苷酶及 $\beta$ -葡聚糖酶。但目前海洋微生物在工业中的应用还有一定难度。Kaur等人<sup>[12]</sup>报道了青霉菌能产生高浓度的 $\beta$ -葡萄糖苷酶,并且在碱性条件下表现出明显的活性和较好的热稳定性但并未提及具体酶活大小。Mao等人<sup>[13]</sup>采用大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)进行 $\beta$ -葡萄糖苷酶的异源表达,所得重组酶的最适pH值为8.0,但当pH值上

升到9.0时剩余酶活在不到40%,且在碱性条件下稳定性较差。

1989年,Gonzalez首次将 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因克隆出来并成功表达,但限于当时技术,表达活力并不高,粗酶液的酶活力只有0.364 U/mL<sup>[14]</sup>。朱宝龙<sup>[15]</sup>构建的毕赤酵母工程菌所表达的重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活可达38 U/mL。然而,目前国内对碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究仅仅停留在探索阶段,对酶活大小以及发酵产酶水平报道较少。因此通过基因克隆技术,构建碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因工程菌是当前实现碱性 $\beta$ -葡萄糖苷酶量产的关键步骤。

针对以上问题,作者从蜂蜜中筛选出一株来源安全并在碱性环境中生长良好的高地芽孢杆菌*Bacillus altitudinis* SYBC hb4,通过对该芽孢杆菌中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因**bglA**克隆表达,获得了耐碱性好、热稳定较好的重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品** 所用菌株是从实验室已有的蜂蜜中筛选,经生理生化实验及16S rRNA基因序列分析鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*),命名为*Bacillus altitudinis* SYBC hb4<sup>[16]</sup>。

**1.1.2 主要试剂** 细菌基因组DNA提取试剂盒、质粒小量抽提试剂盒和DNA胶回收试剂盒:购自上海生工公司;对硝基苯基 $\beta$ -D-葡萄糖苷:购于Sigma(St.Louis,MO)公司;大肠杆菌JM109感受态细胞、16S rRNA基因测序引物、应用细菌基因组DNA抽提试剂盒、氨苄青霉素(Amp)、Taq酶、pColdII载体:购自TaKaRa公司;其他常规试剂均为分析纯,购自国药集团。

**1.1.3 培养基** LB液体培养基(g/L):胰蛋白胨10,NaCl 10,酵母粉5;pH 7.0~7.2,115℃灭菌20 min。固体培养基再额外添加2 g/dL的琼脂。

LB-Amp培养基(g/L):LB固体培养基灭菌至40~50℃后加入Amp,终质量浓度为0.1 mg/L。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 总 DNA 的提取** 应用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒按照其操作提取 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 菌体基因组总 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定其质量和纯度,紫外分光光度计测定其浓度。

**1.2.2  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的 PCR 扩增** 根据芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 全基因组测序的序列设计上下游引物 g1 和 g2(如表 1 所示)。两条引物的 5'端分别含有单一的 *Bam*I 和 *Pst*I(表 1 中下划线所示)限制性酶切位点。以上述芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 基因组为模板,以上述 g1 和 g2 为特异性引物,扩增出芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 中  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(*bglA*)全长编码框序列(1 419 bp)。PCR 反应条件为:以基因组 DNA 为模板,在 50  $\mu$ L 反应体系中,加入 5  $\mu$ L 10  $\times$ ExTaqBuffer、2  $\mu$ L 25 mmol/LMgCl<sub>2</sub>、4  $\mu$ L 2.5 mmol/LdNTP 混合物、以及 20  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L、Ex Taq 酶(Takara 公司)1  $\mu$ L 及 DNA 模板 1  $\mu$ L、补水至 50  $\mu$ L。PCR 循环参数为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,再进行 30 个循环(98  $^{\circ}$ C 变性 10 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min),最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离后,用割胶回收试剂盒回收 1 419 bp 的 DNA 条带,置 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Sequences of the PCR primers

| 引物名 | 引物序列(5'-3')                   |
|-----|-------------------------------|
| g1  | CCCGGATCCATGACGAATTTAGAAAAAAC |
| g2  | CCCGCTGCAGTTATGCCGTCTAAATGC   |

**1.2.3  $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因克隆与序列分析** 目的片段经过割胶回收后,分别用 *Bam*HI 和 *Pst*I 对胶回收产物以及 pColdII 质粒进行双酶切。双酶切产物经纯化后,将 pColdII 质粒与目的基因片段 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。将 20  $\mu$ L 的连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含有 Amp 的平板上筛选,进行菌落 PCR 验证。经 *Bam*HI 和 *Pst*I 双酶切验证阳性质粒,并由上海尼桑生物科技有限公司完成测序。将测序正确的重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。

以 *bglA* 基因为模板,用 NCBI 数据库中 Blast 在线工具进行序列同源性分析。

**1.2.4 重组大肠杆菌的诱导表达** 按体积分数 1% 的接种量将培养过夜重组大肠杆菌接种于 50 mL 含有 Amp 的 LB 培养基中,置于 37  $^{\circ}$ C、转速 220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 值约为 0.4,15  $^{\circ}$ C 静置 30 min,添加 IPTG 到终浓度 0.5 mmol/L 培养约 24 h。培养完成后收集细胞,超声破碎,破碎液 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,收集上清液即粗酶液,测定酶活验证有无活性,进一步 SDS-PAGE 验证相对分子质量大小。

**1.2.5 酶活测定方法** 取 0.5 mL 粗酶液,加入 0.5 mL 30 mmol/L 对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷。将此反应混合液在 60  $^{\circ}$ C 水浴锅反应 1 h。反应结束后,立即加入 2.5 mL 1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止液终止反应,冷却至室温后在 400 nm 波长处测定吸光值。另外,取相同条件下粗酶液在沸水中煮沸 5 min 后再加入底物中,混合反应液在 60  $^{\circ}$ C 水浴锅反应 1 h,作为空白对照组。

酶活力单位定义:1 mL 酶液每分钟释放出 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位<sup>[17]</sup>。

**1.2.6 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化** 将重组菌体经破碎离心后,收集的上清液过孔径 0.22  $\mu$ m 的滤膜,选择使用 1 mL HisTrap HP 组氨酸标签亲和层析柱(镍柱)进行分离纯化。纯化开始时先用 Binding buffer (2 mmol/L 磷酸钠缓冲液,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑)梯度洗脱结合上的蛋白质,收集穿透液以及洗脱峰的蛋白质。测定有无酶活,进一步 SDS-PAGE 蛋白质条带是否单一,分析分离纯化情况。

**1.2.7 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质的研究** 以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物,与不同 pH 的缓冲液在 60  $^{\circ}$ C 下水浴反应 1 h,测定酶活,确定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应 pH。然后在最适 pH 下值在,在 30、40、50、60、70、80、90  $^{\circ}$ C 下水浴反应 1 h,测定酶活,确定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度。以反应液的最高酶活为 100% 计算相对酶活。

以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物研究重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的热稳定性和 pH 稳定性。用 pH 值为 7.0 的酶液在 60  $^{\circ}$ C 水浴保温不同时间后测定酶活,并以该条件下未经保温处理的酶液酶活为 100%,计算相对酶活。作出酶活在 60  $^{\circ}$ C 时随时间的变化曲线。将相同量的酶液分别在不同 pH 值(pH 3.0~8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,pH 8.0~9.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液,pH 9.0~10.0 碳酸

钠-碳酸氢钠)下 30 ℃水浴保温 1 h 后于 60 ℃测定剩余酶活。以各自的初始酶活作为 100%, 计算相对酶活。

**1.2.8 金属离子对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响** 将相同量的酶液加入到终浓度为 0.5 mmol/L 和 5 mmol/L 的不同金属离子溶液中, 以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物测定酶活, 以未经任何处理的酶液的酶活为 100%, 计算相对酶活。比较不同浓度不同金属离子对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响

## 2 结果与讨论

**2.1  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆、鉴定及表达载体的构建**

**2.1.1 基因 *bglA* 序列聚类分析** 利用 NCBI 数据库, 以 *bglA* 基因的核苷酸序列为模板利用 Blast 在线工具序列对比进行同源性分析, 结果显示, 其核苷酸序列与 NCBI 数据库中已知的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *Bacillus pumilus* W3 同源性达 98%。

**2.1.2  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的 PCR 扩增** 根据 *bglA* 的基因序列, 设计了上下游引物。通过 PCR 扩增的方法以芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 的全基因组 DNA 为模板进行扩增。PCR 产物经核酸电泳验证得到大小 1 419 bp 的目的片段(图 1)。将片段测序后, 测序结果表明扩增得到了  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因片段。

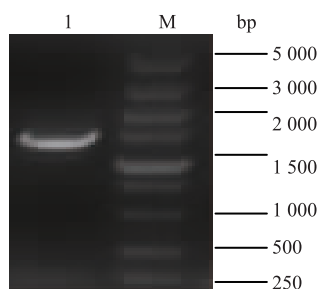


图 1 *Bacillus* sp. SYBC hb4 的 *bglA* 基因的 PCR 扩增  
Fig. 1 Amplification of *bglA* of *Bacillus* sp. SYBC hb4 by PCR

**2.1.3 重组质粒的构建** 用 *Bam*HI 和 *Pst*I 将 PCR 回收的目的片段进行双酶切然后与经过相同限制性内切酶双酶切过的质粒 pColdII 16 ℃连接过夜。将连接产物转化到感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 挑选阳性克隆的转化子并提取质粒就行双酶切验证(图 2)。所得重组质粒 pColdII-*bglA*(图 3)经测序结

果与目的基因的碱基序列一致, 重组质粒构建成功。

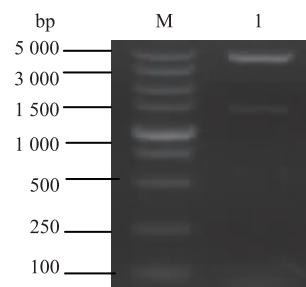


图 2 重组质粒 pCold II-*bglA* 的酶切验证

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pCold II-*bglA*

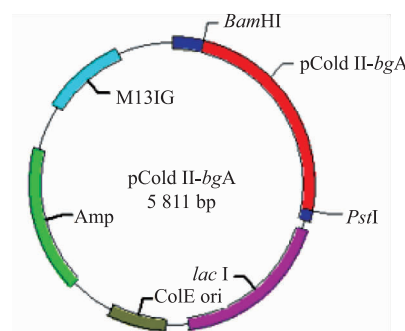


图 3 重组质粒 pCold II-*bglA* 图谱

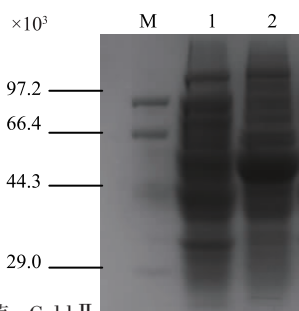
Fig. 3 Map of recombinant plasmid pCold II-*bglA*

**2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及分离纯化**

**2.2.1 重组质粒的诱导表达** 将测序正确的重组质粒 pColdII-*bglA* 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 将呈阳性克隆的重组菌保存后按照 1.2.4 中的方法加 IPTG 低温诱导表达, 培养 24 h 后收集菌体进行超声破碎, 破碎后低温离心收集上清液即粗酶液测定酶活和 SDS-PAGE 验证蛋白质相对分子质量大小。通过软件计算 *bglA* 的蛋白质大小为  $53.92 \times 10^3$ , 以不加 IPTG 诱导为对照, 如图 4 可以看出 SDS-PAGE 电泳结果表明, 在相对分子量  $53 \times 10^3$  附近出现了明显的蛋白质表达条带。

**2.2.2 重组蛋白 *bglA* 的分离纯化** 粗酶液使用 1 mL HisTrap HP 组氨酸标签亲和层析柱(镍柱)进行分离纯化, 纯化结果如图 5 所示。本实验中所选用的质粒 pColdII 带有组氨酸标签, 经镍柱纯化的蛋白质, 具有组氨酸标签的蛋白质可以跟镍结合, 不带有组氨酸标签的杂蛋白质被去除, 得到的蛋白质相对较纯。经镍柱纯化后重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶经 SDS-

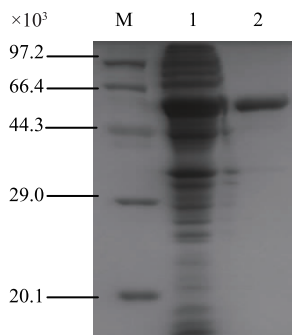
PAGE 验证后,通过图 5 可以看出,与粗酶液相比,纯化后的蛋白质在  $53\times 10^3$  处有一条明显的单一条带,但是也有几条杂带,说明纯化后蛋白质还需进一步纯化。各步纯化结果如表 2 所示,最后所得蛋白质的纯化倍数为 2.70,回收率达到 85.32%。



泳道 1: 重组菌 pCold II -*bglA* 未加 IPTG 诱导; 泳道 2: 重组菌 pCold II -*bglA* 加 IPTG 诱导; 泳道 M: Protein molecular weight marker

图 4 重组表达 *bglA* 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant *bglA*



泳道 1: 重组菌 pCold II -*bglA* 诱导后破碎上清液; 泳道 2: 经 Ni 柱纯化后的重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 泳道 M: Marker

图 5 纯化后重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 结果

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant  $\beta$ -glucosidase

表 2 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化水平

Table 2 Level of recombinant  $\beta$ -glucosidase be purified

| 纯化步骤       | 总酶量/U | 总蛋白质质量/mg | 比酶活/(U/mg) | 回收率/%  | 纯化倍数 |
|------------|-------|-----------|------------|--------|------|
| 粗酶液        | 12.40 | 4.36      | 2.84       | 100.00 | 1.00 |
| HisTrap HP | 10.58 | 1.38      | 7.67       | 85.32  | 2.70 |

## 2.3 重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质的研究

**2.3.1 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度及热稳定性的研究** 以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物,研究不同温度对底物反应的影响,从而找到酶的最适反应温度。如图 6(a)可以看出重组的  $\beta$ -葡

萄糖苷酶的最适反应温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 在该温度下酶活最高。当温度过低时,底物分子的运动速率较慢,其与酶的结合率低,所以在较低的温度下酶活比较低;当温度过高时,蛋白容易变性,酶比较容易失去活性,因此温度过高,酶活也不高。

将重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 pH 7.0、温度  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  时水浴保温不同时间测定剩余酶活,考察重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的温度稳定性。如图 6(b)所示,随着时间的增加,酶活越来越低,重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的半衰期大约在 150 min, 在保温 300 min 后仍然有 10% 的剩余酶活,说明该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶有较好的温度稳定性。目前报道的大肠杆菌重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶温度稳定性一般都比较较好,如 Wolosowska 所表达重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 5 h 后剩余酶活仍高达 67%<sup>[18]</sup>。

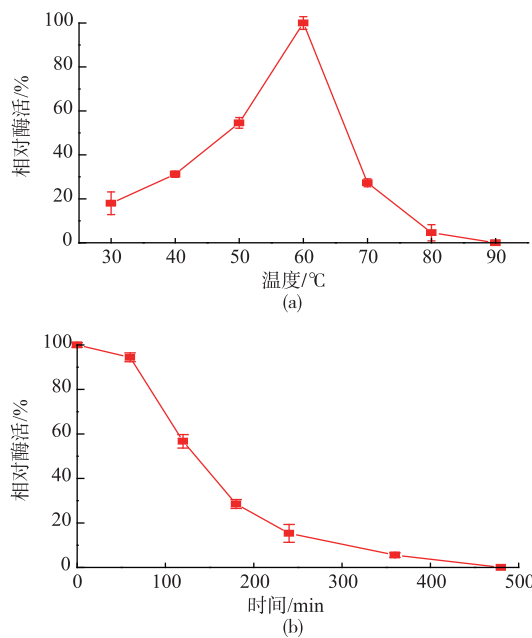


图 6 温度对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性和稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the activity and stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

**2.3.2 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性的研究** 酶促反应对 pH 值的要求很高,不同的 pH 值对底物与酶的结合率有很大影响,它既影响着底物的解离状态,又影响酶分子尤其是活性中心的解离状态。本实验中研究了不同 pH 对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的影响,如图 7(a)所示,重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 约在 pH 8.0。在偏酸性条件时,

pH 3.0~5.0 之间,酶活较低,说明该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在酸性环境下较为敏感,随着酸性增强相对酶活下降较快。在 pH 6.0~9.0 之间时酶活力保持在 40%以上,综上所述,该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在碱性的环境下酶活力较高。

将相同酶量的酶液在不同 pH 条件下水浴保温 1 h 后,以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物,在温度 60 °C、pH 8.0 条件下测定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活,研究该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在不同 pH 条件下的稳定性。以相对酶活作出变化曲线,如图 7(b)所示,发现重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 pH 6.0~9.5 之间时较为稳定,剩余酶活在 70%以上。在 pH 7.0、8.0、8.5、9.0、9.5 缓冲液放置 1 h 后剩余酶活均在 90%以上, pH 3.0~5.0 时,剩余酶活在 40%以下。说明该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在偏酸性条件下时不太稳定,在中性偏碱性条件下时有非常好的稳定。Mao 等人<sup>[13]</sup>采用大肠杆菌重组表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶虽然最适 pH 值为 8.0,但当 pH 值上升到 9.0 时,剩余酶活不到 40%,且在碱性条件下稳定性较差。作者所构建工程菌表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶在碱性条件下的稳定性更好。

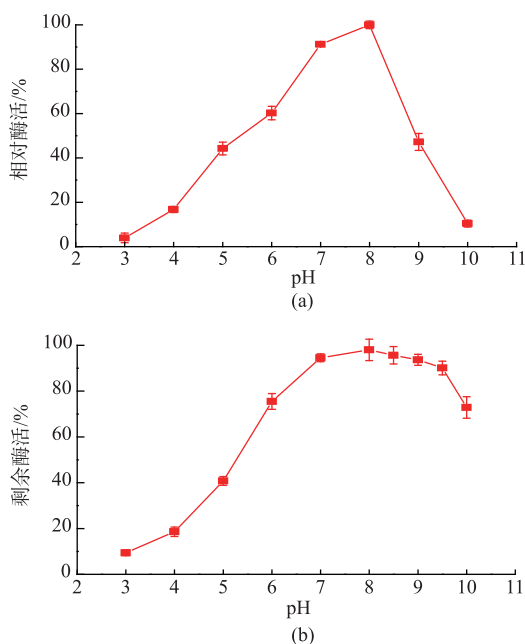


图 7 pH 对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性和稳定性的影响  
Fig. 7 Effect of pH on the activity and stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

**2.3.3 离子浓度对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响**  
将相同量的酶液加入到终浓度为 0.5 mmol/L 和 5 mmol/L 的不同金属离子溶液中,以对硝基苯基- $\beta$ -

D-葡萄糖苷为底物测定酶活。测定不同离子浓度的影响时,以不加任何金属离子的酶液为对照组。作出不同浓度不同金属离子对酶活的影响,如图 8 所示。结果表明,低浓度的金属离子对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力的影响并不是太大,只有  $\text{Ni}^{2+}$ 抑制了 40%左右。当用 5 mmol/L 的金属离子处理时,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 分别抑制了 84%、83%和 87%的酶活。 $\text{Mg}^{2+}$ 和  $\text{Mn}^{2+}$ 对酶活有促进作用,高浓度的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对酶活有抑制作用。不同来源的菌株所产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,金属离子浓度对酶活的影响差异较大。如深海细菌 *Martella mediterranea*<sup>[13]</sup>,  $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 对酶活有强烈的抑制作用,处理后的剩余酶活不到 30%,  $\text{Mg}^{2+}$ 和  $\text{Mn}^{2+}$ 对酶活有轻微的抑制作用,  $\text{K}^{+}$ 和  $\text{Na}^{+}$ 作用下可以提高酶活。

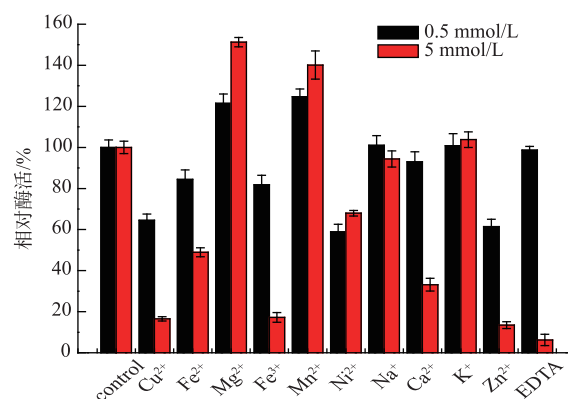


图 8 金属离子对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响  
Fig. 8 Effect of metal ions on the activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase

### 3 结语

碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶是碱性纤维素酶的重要组成部分,具有广泛的应用价值,但由于国内对其的研究报道较少,产酶水平较低,作者通过基因工程技术构建异源表达载体 *E. coli* BL21 (DE3)/pColdII-bglA 实现碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶的高效表达,经 SDS-PAGE 结果分析,低温诱导 24 h 后,重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要以可溶性蛋白存在于破碎后的上清液中,粗酶液酶活可达到 12.40 U/mL。通过对重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质的研究,结果表明该  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 60 °C,最适反应 pH 值 8.0,该重组酶在 pH 7.0、8.0、8.5、9.0、9.5 缓冲液放置 1 h 后剩余酶活均在 90%以上,实验发现  $\text{Mg}^{2+}$

和  $\text{Mn}^{2+}$  对酶活有促进作用, 5 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$  能提高约 50% 的相对酶活。5 mmol/L 的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对酶活有抑制作用。

综上所述, 通过对所得重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质的研究, 说明该重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在碱性条件下有较好的稳定性, 具有重大研究前景。

由于此碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶的克隆表达尚属早期研究, 相较目前  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产酶水平, 此重组碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶产量有待进一步提高。对于实现碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶在纺织业、治理环境污染等方面的应用还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] WOODWARD J, WISEMAN A. Fungal and other  $\beta$ -D-glucosidases; their properties and applications[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1982, 2: 73-79.
- [2] KIM K H, BROWN K M, HARRIS P V, et al. A proteomics strategy to discover beta-glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two dimensional page in gel activity assay and tandem mass spectrometry [J]. **Journal of Proteome Research**, 2007, 6 (12): 4749-4757.
- [3] WANG Zhihong, WEI Hongfu. Advance in research of  $\beta$ -D-glucosidases[J]. **Feed Engineering**, 2006, 27(22): 20-22. (in Chinese)
- [4] GREENOUGH R J, EVERETT D J, STAVNSBJERG M. Safety evaluation of alkaline cellulase [J]. **Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, 1991, 29(11): 781-785.
- [5] ITO S, SHIKATA S, OZAKI K, et al. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties (microbiology & fermentation industry) [J]. **Agricultural & Biological Chemistry**, 1989, 53 (5): 1275-1281.
- [6] ITO S. Alkaline cellulase from alkaliphilic *Bacillus*; Enzymatic properties, genetics, and application to detergents [J]. **Extremophiles**, 1997, 1 (2): 61-66.
- [7] KLINGENBERG P, KOKI Horikoshi, TERUHIKO Akiba. Alkalophilic microorganism—a new microbial world [J]. **Food Nahrung**, 1983, 27(1): 54-54.
- [8] LI Yuanhua. Research of  $\beta$ -glucosidases[J]. **Journal of Anhui Agricultural University**, 2002, 29(4): 421-424. (in Chinese)
- [9] ZHAO X, GAO L, WANG J, et al. A novel ginsenoside Rb1-hydrolyzing  $\beta$ -d-glucosidase from *Cladosporium fulvum* [J]. **Process Biochemistry**, 2009, 44(3): 612-618.
- [10] MENG X, SHAO Z, HONG Y, et al. A Novel pH-Stable, Bifunctional Xylanase Isolated from a Deep-Sea Microorganism, *Demequina* sp. JK4[J]. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2009, 19(10): 1077-1084.
- [11] LIN L, MENG X, LIU P, et al. Improved catalytic efficiency of Endo- $\beta$ -1, 4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2009, 82(4): 671-679.
- [12] AMANDEEP K, CHADHA B S. *Penicillium janthinellum*; a source of efficient and high levels of  $\beta$ -glucosidase [J]. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, 2015, 175(2): 937-949.
- [13] MAO X X, HONG Y Z, SHAO Z Z, et al. A novel cold-active and alkali-stable  $\beta$ -glucosidase gene isolated from the marine bacterium *Marteella mediterranea*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010, 162(8): 2136-2148.
- [14] GONZALEZ C L, ARISTOY M C, POLAINA J, et al. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing beta-glucosidase activity in *Escherichia coli*[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 1989, 55(5): 3173-3177.
- [15] ZHU Longbao, TANG Bin, TAO Yugui, et al. Cloning and secreting expression of the  $\beta$ -glucosidase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(9): 973-977. (in Chinese)
- [16] ZHANG Y, LI X, XI R, et al. Characterization of an acid-stable catalase KatB isolated from *Bacillus altitudinis* SYBC hb4[J]. **Annals of Microbiology**, 2015. DOI 10.1007/s13213-015-1089-y
- [17] LI Hua, GAO Li. Research advance on methods of determining  $\beta$ -glucosidase activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(2): 107-112. (in Chinese)
- [18] WOLOSOWSKA S, SYNOWIECKI J. Thermostable  $\beta$ -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products[J]. **Food Chemistry**, 2004, 85(2): 181-187.