

# 来源于生孢噬纤维菌的新型 $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的性质研究

费嵩禹, 王梓懿, 荆晓凤, 杨帆, 陈晓艺\*, 李宪臻

(大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 通过表达水平分析比较, 从生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 基因组中筛选出在菌株降解纤维二糖过程中起关键作用的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 SmBgl3A。该基因含有 2 283 bp 碱基对, 编码 760 个氨基酸, 其编码蛋白质与来源于 *Bacteroides ovatus* 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 BoGH3B 同源率为 46.76%。将该基因在大肠杆菌中进行异源表达, 粗酶液经 Ni-NTA 亲和层析一步纯化得到电泳级纯度的酶蛋白 SmBgl3A, 重组蛋白质相对分子质量与理论值( $8.12 \times 10^4$ )一致。酶学性质表征结果表明, SmBgl3A 最适温度和 pH 分别为 35 °C 和 6.5; pH 在 5.0~7.0、温度在 40 °C 以下时, 稳定性较好, 同时有着较好的 NaCl 耐受性。SmBgl3A 的最适底物为 pNPG, 以 pNPG 为底物时的比活力高达 14.74 U/mg;  $K_m$  值为 10.88 mmol/L,  $k_{cat}$  值为 46.72 s<sup>-1</sup>。SmBgl3A 作为一种新型的、酶学性质优良的 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 进一步扩展了 $\beta$ -葡萄糖苷酶的种类, 为该酶在纤维素降解、食品工业等领域的应用奠定基础。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; GH3 家族; 生孢噬纤维菌 CX11; 异源表达; 酶学性质

中图分类号: Q 814 文章编号: 1673-1689(2023)01-0083-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.01.007

## Characterization of a Novel $\beta$ -glucosidase SmBgl3A from *Sporocytophaga* sp. CX11

FEI Songyu, WANG Ziyi, JING Xiaofeng, YANG Fan, CHEN Xiaoyi\*, LI Xianzhen

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** A  $\beta$ -glucosidase gene SmBgl3A, which might play a key role in cellobiose degradation and utilization, was screened from *Sporocytophaga* sp. CX11 genome through the analysis and comparison of expression level. The gene contains 2 283 bp and encodes 760 amino acids. The encoded protein of SmBgl3A has 46.76% homology with the  $\beta$ -glucosidase BoGH3B from *Bacteroides ovatus*. The gene SmBgl3A was heterologously expressed in *Escherichia coli*. The electrophoretically pure recombinant protein SmBgl3A was achieved by the purification of crude enzymes using Ni-NTA affinity chromatography, and the relative molecular weight of recombinant protein was consistent with the theoretical value ( $8.12 \times 10^4$ ). Characterization of enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH of SmBgl3A were 35 °C and 6.5, respectively. When

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31801469); 辽宁省自然科学基金项目(2020-MS-276)。

\* 通信作者: 陈晓艺(1982—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物资源与生物催化等方面的研究。

E-mail: chen-xy@dlpu.edu.cn

the pH value was 5.0~7.0 and the temperature was below 40 °C, SmBgl3A was stable. In addition, SmBgl3A showed good NaCl tolerance. The optimal substrate for SmBgl3A was *p*NPG, and the specific enzyme activity with *p*NPG as substrate was 14.74 U/mg.  $K_m$  and  $k_{cat}$  of SmBgl3A towards *p*NPG were 10.88 mmol/L and 46.72 s<sup>-1</sup>, respectively. SmBgl3A is a novel enzyme with excellent enzymatic properties, further expanding the kinds of  $\beta$ -glucosidase and laying a foundation for the enzyme application in cellulose degradation, food industry and other fields.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase, GH3 family, *Sporocytophaga* sp. CX11, heterologous expression, enzymatic properties

$\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, EC3.2.1.21), 又称  $\beta$ -葡萄糖苷水解酶, 是一种用于改善食品风味或生产活性单体成分的重要酶制剂, 广泛应用于食品、药品、保健品等领域<sup>[1]</sup>。近年来, 有关  $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品加工领域的应用备受关注, 有研究表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶是水解芳香前体物质, 释放结合态糖苷配基的关键性酶, 能够改善茶叶、果汁、果酒、面包等食品的风味, 提升食品品质<sup>[2]</sup>。周小玲等研究发现, 可利用  $\beta$ -葡萄糖苷酶辅助提取茶叶中的天然产物<sup>[3]</sup>; 刘芳舒等研究发现,  $\beta$ -葡萄糖苷酶解增香能在较大程度上还原刺梨汁的天然香气<sup>[4]</sup>; 孙爱东等研究发现, 用  $\beta$ -葡萄糖苷酶处理各类葡萄酒, 能够使其香气更加饱和, 感官品质明显提高<sup>[5]</sup>; 钱超等研究发现, 添加高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的乳酸菌发酵葡萄汁酸面团, 能够明显改善面包风味<sup>[6]</sup>。此外,  $\beta$ -葡萄糖苷酶能够在纤维素的降解过程中解除纤维二糖对内切葡聚糖苷酶和外切葡聚糖苷酶的产物抑制, 能够水解结合于非还原性末端的  $\beta$ -葡萄糖苷键, 同时释放出葡萄糖和相应的配基。 $\beta$ -葡萄糖苷酶主要作用于  $\beta$ -1,4 糖苷键, 此外还可以作用于  $\beta$ -(1,1)、(1,2)、(1,3)、(1,6) 糖苷键<sup>[7]</sup>。依据氨基酸序列的同源性和结构的相似性, 已知的  $\beta$ -葡萄糖苷酶被归为 GH1、GH3、GH5、GH9、GH30 和 GH116 等 6 个家族中<sup>[7-10]</sup>。近年来, 关于微生物来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶的报道日益增多。相比于真菌, 一些细菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶热稳定性更强, 但是产量较低。针对这些问题, 研究者利用基因工程等手段, 异源表达性能优越的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 以提高其产量<sup>[11]</sup>。

生孢噬纤维菌是土壤中常见的好氧性纤维素分解细菌, 对纤维素的降解能力十分强大。然而, 由于生孢噬纤维菌不易分离纯化, 研究难度较大, 关于生孢噬纤维菌的纤维素降解机制尚不明确<sup>[12]</sup>。部分研究人员对生孢噬纤维菌中纤维素酶的特性进行了研究, Osmundsvag 等从生孢噬纤维菌的发酵液

上清液中检测到内切葡聚糖酶的酶活力<sup>[13]</sup>, 刘东波等对生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. JL-01 的纤维素酶进行了定位研究<sup>[14]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在生孢噬纤维菌降解纤维素的过程中起着十分重要的作用, 但至今还未有关于生孢噬纤维菌中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的报道。

为了获得酶学性质优良的新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 作者首次从生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 的基因组中筛选出在降解纤维二糖过程中可能发挥关键作用的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*SmBgl3A*), 将该基因克隆, 在大肠杆菌中进行异源表达, 并对其酶学性质进行了研究, 为进一步扩展  $\beta$ -葡萄糖苷酶的种类, 及其功能及应用的探索奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌株和质粒载体** *Sporocytophaga* sp. CX11: 作者所在实验室分离保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3)、质粒 pET-28a (+): 中国科学院大连物理化学研究所赵宗保研究员课题组惠赠。

**1.1.2 主要试剂** Primer STAR HS DNA Polymerase、DNA Marker、Protein Molecular Weight Marker、PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)、*Dpn* I、*Pst* I、*Sma* I、*rTaq* DNA 聚合酶等: 大连宝日生物股份有限公司产品; SanProp 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanProp 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、考马斯亮蓝 G250、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 等: 生工生物工程股份有限公司产品; 对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*NPG): 北京索莱宝科技有限公司产品; 胰蛋白胨、酵母浸粉: 北京奥博星生物技术有限责任公司产品; RNA 提取试剂盒: 艾科瑞生物公司产品。



54 °C退火 30 s, 72 °C延伸 2 min, 循环 30 次; 最后 72 °C延伸 10 min。由此得到目的片段, 以扩增出来的  $\beta$ -葡萄糖苷酶目的片段为引物, 利用 RF-clone (restriction-free clone) 技术将目的片段克隆至 pET-28a(+) 载体上。随后用 1.5  $\mu$ L 的限制性内切酶 *Dpn* I 消化模板, 37 °C 反应 10 h 以上, 得到构建成功的质粒。将构建成功的质粒电击转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取阳性转化子, 酶切验证正确后送测序, 测序结果比对正确即重组质粒鉴定正确。

**1.3.6 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 在大肠杆菌中表达** 将鉴定正确的重组质粒热激转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取阳性转化子送公司测序, 将测序正确的转化子接种至 LB 培养基 (含终质量浓度 30  $\mu$ g/mL 的卡纳霉素), 37 °C、200 r/min 过夜培养。将种子液以 2% (体积分数) 接种量接入 LLB 发酵培养基, 37 °C、200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 过夜诱导 16 h。

**1.3.7 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的纯化** 重组大肠杆菌诱导过夜后, 收集菌体。用 pH 8.0 的缓冲液重悬菌体, 混合均匀后用高压匀浆破碎。于 4 °C 条件下, 10 000 g 离心 20 min, 上清液即为粗酶液, 利用 Ni-NTA 亲和层析进行纯化。

纯化采用 AKTA 蛋白质纯化系统, 用 5 倍柱体积的结合缓冲液 (0 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 8.0) 平衡系统 (2 mL/min)。依次用 5 倍柱体积的结合缓冲液、清洗缓冲液 (30 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 8.0) 及洗脱缓冲液 (250 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 8.0) 洗脱蛋白质, 收集洗脱液。分别对粗酶液及洗脱液进行 SDS-PAGE 检测。利用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度。

**1.3.8 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的酶活力测定** 以对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) 为底物测定 SmBgl3A 的酶活力, 反应体系包括 250  $\mu$ L 1.25 mmol/L pNPG 和 250  $\mu$ L 酶液, 35 °C 反应 30 min 后, 加入 1 mL 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应, 在 405 nm 处检测吸光度, 以灭活蛋白质作空白对照, 每组设置 3 个平行样。

酶活力单位定义: 在 pH 6.5、35 °C 条件下, 每

分钟水解 pNPG 释放出 1  $\mu$ mol pNP 所需要的酶量为 1 U。

以纤维二糖为底物测定 SmBgl3A 的酶活力, 反应体系包括 250  $\mu$ L 1 g/dL 纤维二糖和 250  $\mu$ L 酶液, 35 °C 反应 30 min 后, 沸水浴 10 min 终止反应。10 000 g 离心 5 min, 取上清液, 利用离子色谱法测定葡萄糖的生成量, 离子色谱条件为: 进样量为 10  $\mu$ L, 流动相流量为 0.4 mL/min, 用体积分数 98% 的 200 mmol/L NaOH 洗脱, 分析柱及保护柱温度为 30 °C。以灭活蛋白质作空白对照, 每组设置 3 个平行样。

酶活力单位定义: 在 pH 6.5、35 °C 条件下, 每分钟水解纤维二糖释放出 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量为 1 U。

以其他底物测定 SmBgl3A 的酶活力, 反应体系包括 250  $\mu$ L 1 g/dL 的底物和 250  $\mu$ L 酶液, 35 °C 反应 30 min 后, 沸水浴 10 min 终止反应。10 000 g 离心 5 min, 取 150  $\mu$ L 上清液与 200  $\mu$ L 的 DNS 试剂混合, 煮沸 5 min, 冷却后向其中加入 900  $\mu$ L 的蒸馏水, 在 540 nm 处检测吸光度。以灭活蛋白质作空白对照, 每组设置 3 个平行样。

酶活力单位定义: 在 pH 6.5、35 °C 条件下, 每分钟水解底物释放出 1  $\mu$ mol 还原糖所需要的酶量为 1 U。

### 1.3.9 重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 酶学性质表征

1) SmBgl3A 最适反应温度和热稳定性的测定在 25~80 °C, 每隔 5 °C 作为一个测量点, 于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.5) 中, 测定酶活力。以最大值为 100%, 分别计算不同温度下的相对酶活力, 以此确定 SmBgl3A 的最适反应温度。

将 SmBgl3A 酶蛋白分别在 25~80 °C 条件下 (每隔 5 °C 作为一个测量点) 孵育 2 h, 在最适条件下测定残余酶活力。以未经处理的酶液为对照, 计算残余酶活力占对照酶活力的百分比 (相对酶活力), 以此测定 SmBgl3A 的热稳定性。

2) SmBgl3A 最适反应 pH 和 pH 稳定性的测定分别用不同 pH 的缓冲液稀释酶液, 在最适温度下反应 30 min, 测定酶活力。以最大值为 100%, 分别计算不同 pH 条件下的相对酶活力, 以此测定最适反应 pH。缓冲体系包括: 柠檬酸-柠檬酸钠体系 (pH 4.0~6.0), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系 (pH 6.0~8.0); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 体系 (pH 8.0~9.0)。

将 SmBgl3A 酶蛋白分别在不同 pH 的缓冲液中孵育 2 h,然后在最适条件下测定残余酶活力。以未经处理的酶液为对照,计算残余酶活力占对照酶活力的百分比(相对酶活力),以此测定 SmBgl3A 的 pH 稳定性。

3)SmBgl3A 的底物特异性测定 分别以 1.25 mmol/L 芳香基糖苷(对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷(pNPX)、4-硝基苯基- $\beta$ -D-纤维二糖苷(pNPC)、4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(pNP( $\alpha$ )G))、终质量浓度为 1 g/dL 的二糖(纤维二糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖)及多糖(微晶纤维素 avicel、普鲁兰糖、木聚糖、壳寡糖、几丁质、黄原胶)、滤纸、CMC-Na、水杨苷为底物,在 35 °C、pH 6.5 的条件下反应,测定产物生成量,参照 1.3.8 的方法,计算酶的比活力。

4)SmBgl3A 的 NaCl 耐受性测定 在酶反应体系中分别添加终浓度为 0~2 500 mmol/L 的 NaCl 溶液。参照 1.3.8 所述方法测定残余酶活力,将不添加 NaCl 的酶活力设置为 100%,计算残余酶活力占对照酶活力的百分比(相对酶活力)。

5)金属离子对 SmBgl3A 酶活力的影响 在酶反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ 、 $Li^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  等金属离子盐溶液及 EDTA,以未添加金属离子溶液的酶活力为 100%,测定金属离子对 SmBgl3A 酶活力的影响。

6)SmBgl3A 的葡萄糖耐受性测定 在酶反应体系中分别添加终浓度为 0~2 000 mmol/L 的葡萄糖溶液。参照 1.3.8 所述方法测定残余酶活力,将不添加葡萄糖组的酶活力设置为 100%,计算残余酶活力占对照酶活力的百分比(相对酶活力)。

7)SmBgl3A 的酶促反应动力学参数测定 以 pNPG 为底物,测定 SmBgl3A 的酶促反应动力学参数。250  $\mu$ L 酶液分别与等体积终浓度为 0.1~5.0 mmol/L 的 pNPG 溶液混合,测定反应初速度,确定反应时间,计算不同底物浓度下的反应速度,采用双倒数作图法,以  $1/[S]$  为横坐标, $1/V$  为纵坐标,计算动力学参数。

以纤维二糖为底物,测定 SmBgl3A 的酶促反应动力学参数。250  $\mu$ L 酶液分别与等体积终浓度为 0.5~50.0 mmol/L 的纤维二糖溶液混合,测定反应初速度,确定反应时间,计算不同底物浓度下的反应速度,采用双倒数作图法,以  $1/[S]$  为横坐标, $1/V$  为

纵坐标,计算动力学参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 中不同 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的表达水平分析

通过基因注释以及 NCBI 数据库比对分析,在生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 基因组中共挖掘到 7 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因。其中,所对应的蛋白酶 SmBgl1A 为 GH1 家族的糖苷水解酶,SmBgl3A、SmBgl3B、SmBgl3C、SmBgl3D、SmBgl3E 以及 SmBgl3F 均为 GH3 家族的糖苷水解酶。为了从中筛选出在降解纤维二糖过程中起关键作用的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,利用实时荧光定量 PCR 技术对上述编码基因在不同碳源培养条件下的相对表达水平进行了分析。结果如图 1 所示,7 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在以纤维二糖为碳源的培养基中的表达水平均高于以葡萄糖为碳源的培养基中的表达水平,其中 SmBgl3A 在以纤维二糖为碳源的培养基中的表达水平是在以葡萄糖为碳源的培养基中表达水平的 18 倍,上调最为显著。且 SmBgl3A 的表达量相对较高,推测其可能在生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 降解纤维二糖的过程中发挥关键作用,解除纤维二糖对内切纤维素酶及外切纤维素酶的产物抑制作用,提高 *Sporocytophaga* sp. CX11 菌株降解纤维素的效率。

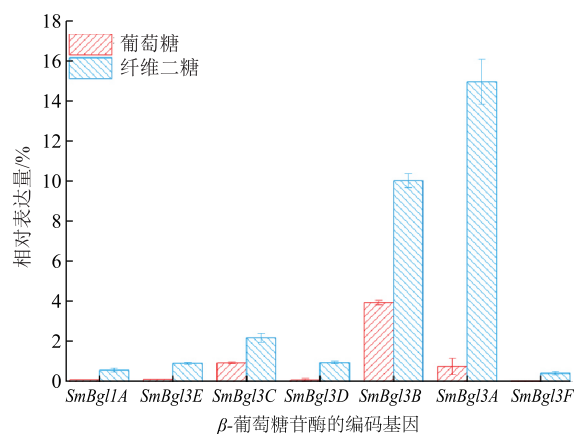
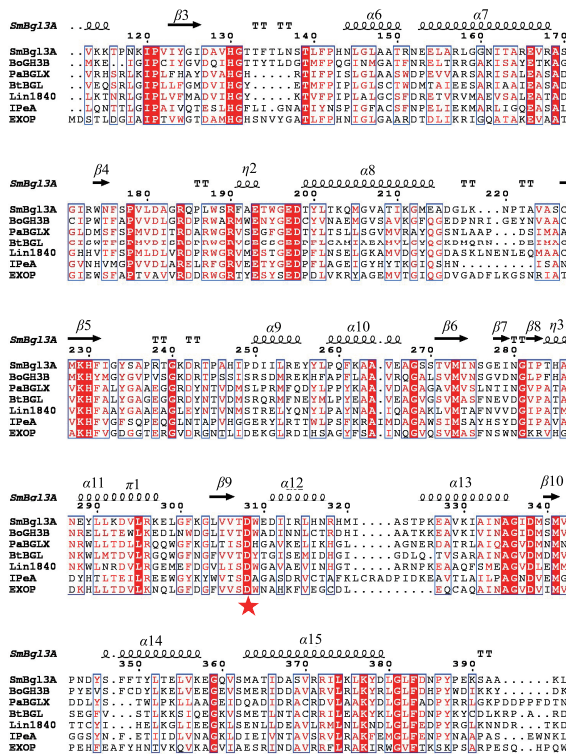


图 1 生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在不同碳源条件下的相对表达量

Fig. 1 Relative expression level of  $\beta$ -glucosidase genes from *Sporocytophaga* sp. CX11 in different carbon sources

2.2 新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的序列分析

SmBgl3A (NCBI 登录号 No. OL653716) 编码的蛋白质由 760 个氨基酸组成, 该蛋白质由信号肽、GH3 催化结构域及 Fibronectin type III-like domain (Fn III) 结构域组成。其中, GH3 催化结构域主要由 22 个  $\alpha$ -螺旋和 17 个  $\beta$ -折叠构成, Fn III 结构域主要由 8 个  $\beta$ -折叠组成, 这种结构在 GH3 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶中普遍存在<sup>[21]</sup>。图 2 为 SmBgl3A 与 PDB 数据库中 GH3 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶多重氨基酸序列比对结果, 其中 SmBgl3A 与 *Bacteroides ovatus* 来源的 BoGH3B<sup>[15]</sup> (NCBI 登录号 No. WP\_004298458.1) 的同源性最高, 为 46.76%。据报道, 在 GH3 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶中, 参与催化反应的氨基酸主要包括一个亲核催化残基和一个酸/碱催化残基。其中, 亲核催化



SmBgl3A 多重序列比对包括: *Bacteroides ovatus*<sup>[15]</sup>, *Bacteroides thetaiotaomicron*<sup>[16]</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[17]</sup>, *Listeria innocua*<sup>[18]</sup>, *Aspergillus oryzae*<sup>[19]</sup>, *Pseudoalteromonas* sp. BB1<sup>[20]</sup> 来源的 GH3 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 分别为 BoGH3B、BtBGL、PaBGLX、Lin1840、IPeA。

图 2  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 与其他 GH3 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶多重氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Multiple amino acid sequences blast of  $\beta$ -glucosidase SmBgl3A with other  $\beta$ -glucosidase from GH3 families

残基非常保守, 通常是天冬氨酸, 而作为广义酸碱对的催化残基却并不保守<sup>[22]</sup>, 一般为谷氨酸。经过比对分析推断, SmBgl3A 保守的亲核催化残基为 D308。

2.3 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的表达与纯化

将重组大肠杆菌菌株接种至 LLB 培养基中, 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 左右时加入 IPTG 诱导培养 16 h。SDS-PAGE 分析结果 (见图 3) 表明, SmBgl3A 表达量相对较高, 经纯化后, 得到电泳纯的目的蛋白质, 且与理论相对分子质量 (8.12 $\times$ 10<sup>4</sup>) 一致。酶活力测定结果显示, 以 pNPG 为底物时, SmBgl3A 的比活力为 14.74 U/mg。该酶的比活力高于细菌 *Actinomadura amylolytica* YIM 77502T<sup>[22]</sup> (4.6 U/mg) 来源、真菌 *Sporothrix schenckii*<sup>[23]</sup> (0.801 U/mg) 来源、植物 *Cyamopsis tetragonoloba*<sup>[24]</sup> (6.6 U/mg) 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

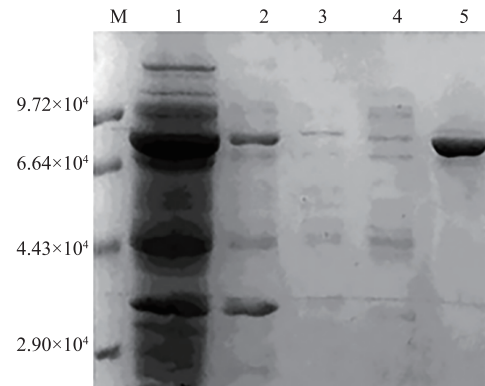


图 3 重组蛋白质 SmBgl3A 亲和层析纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purification of SmBgl3A by affinity chromatography

2.4 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 SmBgl3A 的酶学性质分析

2.4.1 温度和 pH 对 SmBgl3A 酶活性的影响

SmBgl3A 的最适反应温度曲线如图 4 (a) 所示, 在 25~35  $^{\circ}$ C 时, 酶活力随着反应温度的升高而升高, 35  $^{\circ}$ C 时酶活力最高; 随着温度的继续升高, 酶活力逐渐降低, 60  $^{\circ}$ C 时基本失活。热稳定性结果如图 4 (b) 所示, SmBgl3A 在 40  $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h 后仍保留 40% 以上的酶活力, 45  $^{\circ}$ C 条件下稳定性有较大幅度的下降。最适 pH 结果如图 5(a) 所示, SmBgl3A 在 pH 6.5 时酶活力最高, 在 pH 5.0~8.0 时可表现出

50%以上的相对酶活力。pH 稳定性结果如图 5(b) 所示,SmBgl3A 在 pH 5.0~7.0 的条件下,在 35 °C 孵育 2 h 后,残余酶活力(相对酶活力)在 50%以上;在 pH 低于 4.5 及 pH 高于 8.0 时,残余酶活力有较大幅度的下降,说明 SmBgl3A 有一定的酸碱适应能力。GH3 家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度一般较高,多在 50~70 °C,且具有较好的热稳定性,例如来源于 *Bifidobacterium adolescentis*<sup>[25]</sup> 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶

BaBgl3 的最适温度为 45 °C,来源于 *Penicillium citrinum* UFV1<sup>[21]</sup> 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 Pc $\beta$ Glu2 在 50 °C 孵育 13 h,仍能保持 50%的酶活力,这种特性对于工业应用来说非常有利<sup>[6]</sup>;GH3 家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 一般在 4.0~6.5,且在酸性范围内稳定性较好<sup>[7]</sup>,例如来源于 *Penicillium citrinum* UFV1<sup>[26]</sup> 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 Pc $\beta$ Glu1 最适 pH 为 5.0,且在 pH 4.0~8.0 时稳定性较好,与 SmBgl3A 的 pH 稳定性类似。

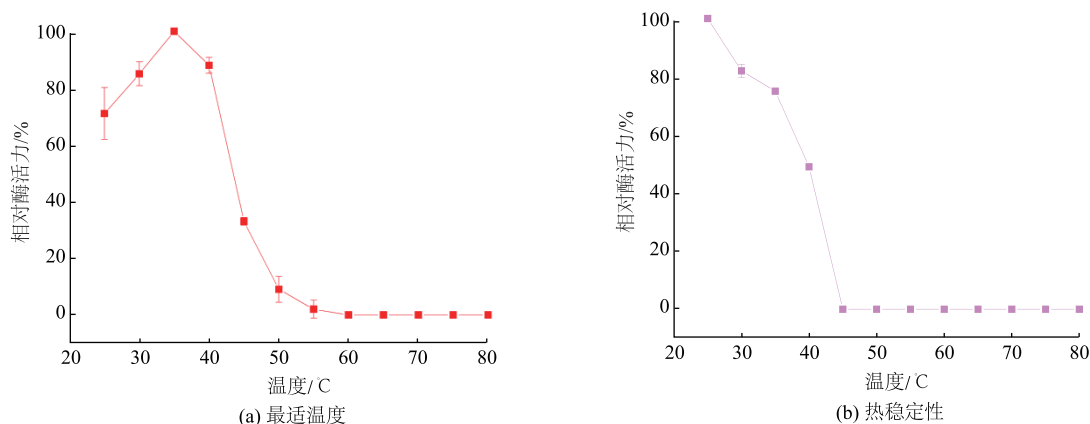


图 4 重组蛋白质 SmBgl3A 的最适温度及热稳定性

Fig. 4 Optimum temperature and thermal stability of recombinant protein SmBgl3A

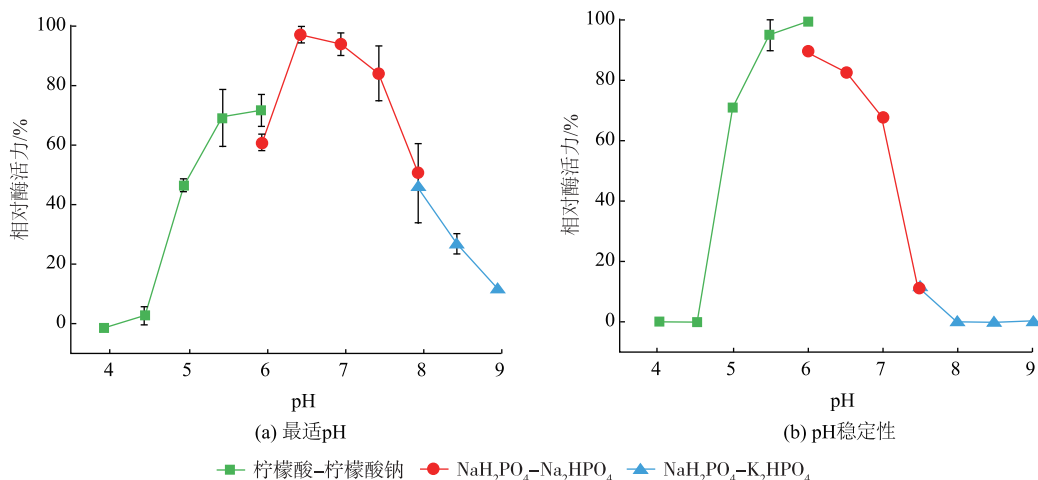


图 5 重组蛋白质 SmBgl3A 的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 5 Optimum pH and pH stability of recombinant protein SmBgl3A

**2.4.2 SmBgl3A 的底物特异性分析** SmBgl3A 的底物特异性分析结果如表 2 所示,SmBgl3A 对芳香族底物 pNPG 和 pNPX 具有水解活性,且对 pNPG 的活性最高。除此之外,SmBgl3A 还能水解 pNPC,这意味着其可以水解纤维寡糖,但是对 pNP( $\alpha$ )G 不具有活性。在天然底物中,SmBgl3A 对纤维二糖活性最高,其次是水杨苷,对蔗糖、CMC-Na、avicel 和

普鲁兰糖有微弱的酶活力,对麦芽糖、乳糖、黄原胶、木聚糖、壳寡糖、几丁质、滤纸均未检测到活性。GH3 家族的 $\beta$ -葡萄糖苷酶可水解的底物类型很多,除可强烈水解 pNPG 外,部分 $\beta$ -葡萄糖苷酶还可水解 4-硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖苷、纤维二糖、纤维三糖、纤维四糖等<sup>[27]</sup>。

表 2 SmBgl3A 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of SmBgl3A

底物	比活力/(U/mg)
pNPG	14.741 0±0.155 7
pNPX	0.021 0±0.000 4
pNPC	0.280 0±0.001 0
pNP( $\alpha$ )G	ND
纤维二糖	9.677 0±0.281 6
水杨苷	0.699 0±0.026 1
蔗糖	0.040 0±0.000 6
普鲁兰糖	0.035 0±0.000 6
avicel	0.013 0±0.000 2
CMC-Na	0.014 0±0.000 3
麦芽糖	ND
乳糖	ND
黄原胶	ND
木聚糖	ND
壳寡糖	ND
几丁质	ND
滤纸	ND

注:ND 表示未检测到活性。

**2.4.3 NaCl 对 SmBgl3A 酶活力的影响** 测定 NaCl 对 SmBgl3A 酶活力的影响,结果如图 6 所示。NaCl 浓度在 0~400 mmol/L 时,SmBgl3A 的酶活力有小幅下降,但仍能保留 90%以上活性;NaCl 浓度在 400~800 mmol/L 时,酶活力相对稳定,相对酶活力约为 90%;当 NaCl 浓度在 800~2 500 mmol/L 时,SmBgl3A 酶活力开始较大幅度降低,但是当 NaCl 浓度达到 2 500 mmol/L 时,仍能保留约 50%的活性。据报道,只有少数的  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有较好的 NaCl 耐受性,如来源于 *Alteromonas* sp. L82 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl<sup>[28]</sup>在 NaCl 浓度为 1 000 mmol/L 时的相对酶活力为 90.7%,来源于 *Bacillus cellulosilyticus* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 BcBgl1A<sup>[29]</sup>在 NaCl 浓度为 1 000 mmol/L 时的相对酶活力为 62.3%。而在相同 NaCl 浓度下,SmBgl3A 仍能保存 80%以上的相对酶活力,说明 SmBgl3A 具有较好 NaCl 耐受性。在工业应用中, $\beta$ -葡萄糖苷酶在复杂的外部环境中仍能保持活性非常重要,较好的 NaCl 耐受性使  $\beta$ -葡萄糖苷酶在工业上具有更大的应用潜力,可以尝试应用于海洋食品加工、生物乙醇生产等领域<sup>[30]</sup>。

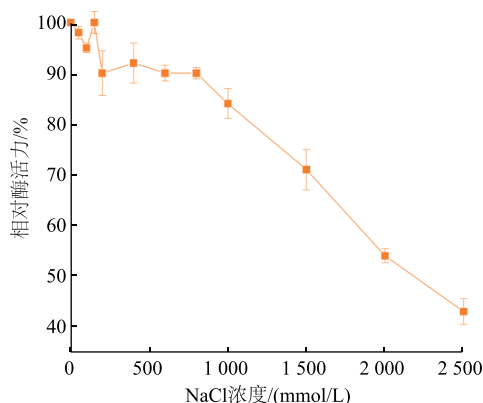


图 6 重组蛋白质 SmBgl3A 的 NaCl 耐受性

Fig. 6 NaCl tolerance of recombinant protein SmBgl3A

**2.4.4 金属离子对 SmBgl3A 酶活力的影响** 在酶反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ 、 $Li^+$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 等金属离子盐溶液及 EDTA,测定金属离子对 SmBgl3A 酶活力的影响(见图 7)。结果表明, $Mg^{2+}$ 和  $Li^+$ 对酶活力有少许激活作用,相对酶活力分别达 104%和 103%;其余 8 种金属离子及 EDTA 对酶活力均有抑制作用,其中  $Fe^{3+}$ 能够完全抑制酶活力。一般而言,金属离子对不同  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性影响有很大区别。梁金凤等分离获得的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,其酶活力经  $Zn^{2+}$ 激活,受  $Fe^{2+}$ 抑制,而  $Cu^{2+}$ 、EDTA 对其活性基本无影响<sup>[33]</sup>。王剑锋等分离获得的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,酶活力经  $Fe^{2+}$ 激活,被  $Cu^{2+}$ 抑制<sup>[34]</sup>。

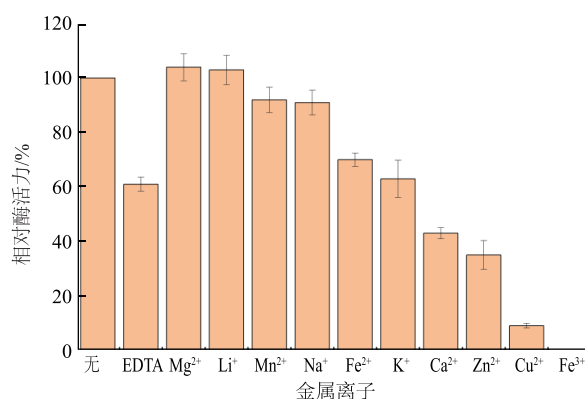


图 7 金属离子对 SmBgl3A 酶活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on the enzyme activity of SmBgl3A

**2.4.5 葡萄糖对 SmBgl3A 酶活力的影响** 测定葡萄糖对 SmBgl3A 酶活力的影响,结果如图 8 所示,SmBgl3A 的 IC<sub>50</sub> 小于 25 mmol/L,对葡萄糖较敏感。正如报道的那样,GH3 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 IC<sub>50</sub> 通常小于 100 mmol/L<sup>[31]</sup>。提高 SmBgl3A 对葡萄



糖的耐受性,对其在工业中的应用具有十分重要的意义。

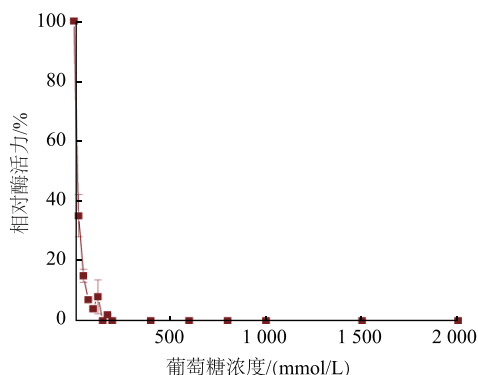


图8 重组蛋白质 SmBgl3A 的葡萄糖耐受性

Fig. 8 Glucose tolerance of recombinant protein SmBgl3A

**2.4.6 SmBgl3A 酶促反应动力学分析** 测定 SmBgl3A 水解 pNPG 及纤维二糖的酶促反应动力学参数,结果如表 3 所示,SmBgl3A 对 pNPG 的亲合力较好,催化效率更高。SmBgl3A 对纤维二糖的催化效率远高于 *Actinomadura amylolytica* YIM 77502T<sup>[22]</sup> 来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶(10.7 s<sup>-1</sup>)。同时 SmBgl3A 对 pNPG 的催化效率也高于 *Actinomadura amylolytica* YIM 77502T 来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶(5.5 s<sup>-1</sup>)。

表 3 SmBgl3A 的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of SmBgl3A

底物	$K_m$ /(mmol/L)	$k_{cat}$ /s <sup>-1</sup>	$V_{max}$ /(mmol/(L·min))
pNPG	10.88±1.89	46.72±5.84	0.14±0.02
纤维二糖	30.93±4.66	35.03±1.86	7.0±0.37

## 参考文献:

- [1] 张媛媛,苏敏,朴春红,等. 微生物来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. 食品工业科技,2019,40(16):329-335.
- [2] 姚瑶,刘庆,刘福,等. $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质及其在食品加工中的应用研究进展[J]. 贵州农业科学,2018,46(2):132-135.
- [3] 周小玲,汪东风,李素臻,等. 不同酶法提取工艺对茶多糖组成的影响[J]. 茶叶科学,2007,27(1):27-32.
- [4] 刘芳舒,罗昱,张瑜,等. 杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶对刺梨果汁风味品质的影响[J]. 食品科技,2016,41(1):240-246.
- [5] 孙爱东,葛毅强,倪元颖,等. 不同来源的增香酶酶解橙汁(皮)中键合态主要芳香物质的效果分析[J]. 食品与发酵工业,2001,27(11):1-4.
- [6] 钱超,杨文丹,张宾乐,等. 高产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的乳酸菌在葡萄汁酸面团面包中的应用[J]. 食品与机械,2017,33(5):14-20.
- [7] 许晶,张永忠,孙艳梅. $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):183-186.
- [8] HENRISSAT B, DAVIES G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7(5):637-644.
- [9] GUDMUNDSSON M, HANSSON H, KARKEHABADI S. Structural and functional studies of the glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -glucosidase Cel3A from the moderately thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii*[J]. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2016, 72(7):860-870.
- [10] HENRISSAT B A. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. *Biochemical Journal*,

## 3 结语

从生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 基因组中筛选出在纤维二糖降解过程中起关键作用的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(SmBgl3A),该基因编码的蛋白质同一些已报道的 GH3 家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶氨基酸序列同源性较高,其中,与 *Bacteroides ovatus* 来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 BoGH3B 同源性为 46.76%。将该基因在大肠杆菌中异源表达,得到纯酶相对分子质量为  $8.12 \times 10^4$ 。SmBgl3A 的最适底物为 pNPG,对 pNPG 比活力高达 14.74 U/mg,最适 pH 为 6.5,最适温度为 35 °C,且 pH 在 5.0~7.0、温度在 40 °C 以下时,稳定性较好。SmBgl3A 具有较好的 NaCl 耐受性,使其在食品、药品等工业领域的应用更为广泛。但 SmBgl3A 的酶活力及稳定性还有待提高,糖基化修饰是改善酶活力及稳定性的有效手段。经过糖基化位点的预测可知,SmBgl3A 存在 4 个潜在的 N-糖基化位点(N137、N161、N459、N483)。有研究表明,将细菌来源的基因在毕赤酵母中表达时,分泌表达的酶蛋白会被糖基化修饰,能够明显改善酶的热稳定性<sup>[32]</sup>。在后续研究中,可将 SmBgl3A 的基因在毕赤酵母中异源表达,以提高酶活力及稳定性。作者将一种新型的来自于生孢噬纤维菌 *Sporocytophaga* sp. CX11 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中进行异源表达,并对重组蛋白质的酶学性质进行了表征,为挖掘新型 $\beta$ -葡萄糖苷酶及其功能应用奠定了基础,也为该酶的进一步工业化应用提供参考与借鉴。

- 1992, 280(2):309-316.
- [11] SRIVASTAVA N, RATHOUR R, JHA S, et al. Microbial beta glucosidase enzymes: recent advances in biomass conversion for biofuels application[J]. **Biomolecules**, 2019, 9(6):1-23.
- [12] 刘东波. 生孢噬纤维菌的分离、鉴定及生物学特性的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2004.
- [13] OSMUNDSVAG K, GOKSOYR J. Cellulases from *Sporocytophaga myxococcoides*[J]. **FEBS Journal**, 1975, 57(2):405-409.
- [14] 刘东波, 王秀然, 张青, 等. 一株生孢噬纤维菌的纤维素酶的定位研究[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2005, 37(4):107-110.
- [15] HEMSWORTH G R, THOMPSON A J, STEPPER J, et al. Structural dissection of a complex *Bacteroides ovatus* gene locus conferring xyloglucan metabolism in the human gut[J]. **Open Biology**, 2016, 6(7):1-11.
- [16] ISHIGURO R, TANAKA N, ABE K, et al. Function and structure relationships of a  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharide-degrading  $\beta$ -glucosidase[J]. **FEBS Letters**, 2017, 591(23):3926-3936.
- [17] MAHASENAN K V, BATUECAS M T, STEFANIA D B, et al. Catalytic cycle of glycoside hydrolase BglX from *Pseudomonas aeruginosa* and its implications for biofilm formation[J]. **ACS Chemical Biology**, 2019, 15(1):189-196.
- [18] NAKAJMA M, YOSHIDA R, MIYANAGA A, et al. Functional and structural analysis of a  $\beta$ -glucosidase involved in  $\beta$ -1,2-glucan metabolism in *Listeria innocua*[J]. **Plos One**, 2016, 11(2):1-19.
- [19] MATSUZAWA T, WATANABE M, NAKAMICHI Y, et al. Crystal structure and substrate recognition mechanism of *Aspergillus oryzae* isoprimeverose-producing enzyme[J]. **Journal of Structural Biology**, 2019, 205(1):84-90.
- [20] NAKATANI Y, CUTFIELD S M, COWIESON N P, et al. Structure and activity of exo-1,3/1,4- $\beta$ -glucanase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. BB1 showing a novel C-terminal domain[J]. **FEBS Journal**, 2012, 279(3):464-478.
- [21] 周林芳, 江波, 张涛, 等. 糖苷水解酶第3家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14):330-335.
- [22] YIN Y R, SANG P, XIAN W D, et al. Expression and characteristics of two glucose-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidases from *Actinomadura amylolytica* YIM 77502T for promoting cellulose degradation[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2018, 9:120-131.
- [23] HERNÁNDEZ-GUZMÁN A, MARTÍNEZ A F, PONCE-NOYOLA P, et al. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Sporothrix schenckii*[J]. **FEBS Open Bio**, 2016, 6(11):1067-1077.
- [24] ASATI V, SHARMA P K. Purification and characterization of an isoflavones conjugate hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase (ICHG) from *Cyamopsis tetragonoloba*(guar)[J]. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 2019, 20:1-8.
- [25] FLORINDO R N, SOUZA V P, MANZINE L R, et al. Structural and biochemical characterization of a GH3  $\beta$ -glucosidase from the probiotic bacteria *Bifidobacterium adolescentis*[J]. **Biochimie**, 2018, 3(148):107-115.
- [26] DA COSTA S G, LIPARINI P O, ANDRE T F, et al. *Penicillium citrinum* UFV1  $\beta$ -glucosidases: purification, characterization, and application for biomass saccharification[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2018, 11(1):1-19.
- [27] JEYA M, JOO A R, LEE K M, et al. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2010, 86(5):1473-1484.
- [28] SUN J J, WANG W, YAO C Y, et al. Overexpression and characterization of a novel cold-adapted and salt-tolerant GH1  $\beta$ -glucosidase from the marine bacterium *Alteromonas* sp. L82[J]. **Journal of Microbiology**, 2018, 56(9):656-664.
- [29] WU J, GENG A, XIE R R, et al. Characterization of cold adapted and ethanol tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus cellulosilyticus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 109:872-879.
- [30] BAI W Q, XUE Y F, ZHOU C, et al. Cloning, expression and characterization of a novel salt-tolerant xylanase from *Bacillus* sp. SN5[J]. **Biotechnology Letters**, 2012, 34(11):2093-2099.
- [31] LI C C, WANG Z J, REN G H, et al. Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2015, 8(1):1-12.
- [32] XI H X, TIAN Y P, ZHOU A M, et al. Characterization of an N-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2015, 55(2):236-246.
- [33] 梁金凤, 汪涯, 肖依文, 等. 内生真菌 *Eupenicillium javanicum* R57 水解京尼平苷  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 菌物学报, 2017, 36(11):1543-1555.
- [34] 王剑锋, 陈今朝, 梁华正, 等. 黑曲霉水解京尼平苷  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 菌物学报, 2010, 29(5):683-690.