



嗜热古菌 *Thermofilum adornatum* 来源的高温热激活 β-葡萄糖苷酶 TaBgl3 的原核表达及酶学性质研究

沈风飞^{1,2}, 缪婷婷^{1,2}, 张晓晓³, 尹爱国², 石鹏君^{3*}, 徐波^{2*}

1 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

2 广东石油化工学院生物与食品工程学院, 广东 茂名 525000

3 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193

沈风飞, 缪婷婷, 张晓晓, 尹爱国, 石鹏君, 徐波. 嗜热古菌 *Thermofilum adornatum* 来源的高温热激活 β-葡萄糖苷酶 TaBgl3 的原核表达及酶学性质研究. 微生物学报, 2022, 62(7): 2555–2567.

Shen Fengfei, Miao Tingting, Zhang Xiaoxiao, Yin Aiguo, Shi Pengjun, Xu Bo. Expression and characterization of thermo-activated β-glucosidase TaBgl3 from *Thermofilum adornatum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2555–2567.

摘要:【目的】β-葡萄糖苷酶, 又称 β-D-葡萄糖苷水解酶, 属于纤维素酶类, 是一种降解纤维素的关键限速酶。来源于嗜热古菌的 β-葡萄糖苷酶已被广泛验证具有酸性高温等特性, 已成为高温酶的研究热点之一。本文对尚未报道的来源于嗜热古菌中一种热丝菌(*Thermofilum adornatum*)的 GH3 家族的葡萄糖苷酶, 进行了原核表达和酶学性质测定, 以期找到更优的 β-葡萄糖苷酶。【方法】从 NCBI 数据库中获得了嗜热古菌(*T. adornatum*)来源的 GH3 氨基酸序列, 构建重组质粒 pET-30a(+)-TaBgl3, 并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞中诱导表达重组蛋白; 采用磁珠纯化, 研究其酶学性质。【结果】重组蛋白 TaBgl3 的分子量为 77.0 kDa; 酶学性质结果表明, 其最适反应条件为 80 °C 和 pH 5.0, 在 70 °C 保温处理 1–4 h, 对 TaBgl3 的酶活力有促进作用, 在最适温度 80 °C 处理 2 h 后, 其激活作用更加明显, 能提高 40% 以上的酶活; 其在 pH 5.0–8.0 下 37 °C 保温 1 h, 仍具有 60% 以上的活性; 底物为对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)时酶的比

基金项目: 国家自然科学基金(31760438, 32072166); 广东省自然科学基金(2019A1515011696); 茂名市科技项目(mmkj2020011); 中国农业科学院农产品加工研究所“N 专项”(CAAS-ASTIP-2021-IFST-SN2021-11)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760438, 32072166), by the Guangdong Natural Science Fund-General Project (2019A1515011696), by the Maoming Science and Technology Project (mmkj2020011) and by the Institute of Agricultural Products Processing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, “N Speciality” (CAAS-ASTIP-2021-IFST-SN2021-11)

*Corresponding authors. E-mail: SHI Pengjun, shipengjun@caas.cn; XU Bo, xubo583@sina.com

Received: 20 October 2021; Revised: 27 January 2022; Published online: 7 March 2022

活力为 144.23 U/mg, 米氏常数 K_m 值和最大反应速率 V_{max} 分别为 1.81 mmol/L 和 268.10 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 催化效率为 115.47/s; 终浓度为 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Li^+ 和 EDTA 对 TaBgl3 的酶活有较大的促进作用, 可提升 39% 以上的酶活, 而 5 mmol/L Fe^{3+} 和 5% β -巯基乙醇对酶活有抑制作用, SDS、乙醇和葡萄糖对酶具有很强的抑制作用。【结论】本研究中, TaBgl3 是酸性高温酶, 且具有较好的热稳定性和热激活特性, 这些特征在以后的理论研究及在工业生产中具有一定的科学价值。

关键词: 嗜热古菌; GH3 β -葡萄糖苷酶; 高温热激活酶; 热稳定性

Expression and characterization of thermo-activated β -glucosidase TaBgl3 from *Thermofilum adornatum*

SHEN Fengfei^{1,2}, MIAO Tingting^{1,2}, ZHANG Xiaoxiao³, YIN Aiguo², SHI Pengjun^{3*}, XU Bo^{2*}

1 College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, Guangdong, China

3 Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: [Objective] β -glucosidase, also known as β -D-glucosidase hydrolase, is a key rate-limiting enzyme for cellulose degradation, which is a cellulase. The β -glucosidases from thermophilic archaea have been verified to have tolerance to acid and high temperature, which have become one of the research hotspots of thermostable enzymes. We studied the prokaryotic expression and enzymatic properties of a GH3 family glucosidase from *Thermofilum adornatum*, which has not been reported, aiming to mine superior β -glucosidase. [Methods] We obtained the GH3 amino acid sequence of *T. adornatum* from NCBI database and constructed the recombinant plasmid pET-30a(+)-TaBgl3. The recombinant protein TaBgl3 was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells under induction. The properties of the enzyme were studied after purification with magnetic beads. [Results] TaBgl3 had a molecular weight of 77.0 kDa and the best performance at pH 5.0 and 80 °C. The treatment at 70 °C for 1–4 h improved the enzyme activity, and that at the optimum temperature of 80 °C for 2 h showed the most significant effect, which increased the enzyme activity by more than 40%. The enzyme still had the relative activity of above 60% after being treated 37 °C and pH 5.0–8.0 for 1 h. When the substrate was 4-*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG), the enzyme had the specific activity of 144.23 U/mg, the K_m value of 1.81 mmol/L, the maximum reaction rate of 268.10 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, and the catalytic efficiency of 115.47/s. Cu^{2+} , Li^+ and EDTA at the final concentration of 5 mmol/L all increased the enzyme activity, which had the maximum increase of 39%. Fe^{3+} (5 mmol/L) and 5% β -mercaptoethanol had inhibitory effect on the enzyme activity. In addition, SDS, ethanol and glucose greatly inhibited the enzyme activity. [Conclusion] TaBgl3 is an acidic thermostable enzyme with good thermal stability and thermal activation characteristics, which can shed light on the future theoretical research and industrial production.

Keywords: *Thermofilum adornatum*; GH3 β -glucosidase; thermo-activated enzyme; thermostability

古菌是不同于细菌和真核生物的第三种生物, 是世界上最古老的生命, 分布广泛, 大多生活于高温、厌氧、高盐等极端环境中^[1-2], 一般分为 4 大类: 产甲烷菌(methanogens)、极端嗜盐菌(extreme halophiles)、极端嗜热菌(extreme thermophiles)和嗜冷菌(psychrophiles)^[3]。嗜热微生物产生的酶具有良好的热稳定性, 被称为嗜热酶, 如 α -淀粉酶、耐高温普鲁兰酶、葡萄糖苷酶和葡萄糖淀粉酶。相较于常温酶来说, 嗜热酶不仅具有高效催化的特点和很好的热稳定性, 还对有机试剂有很强的耐受性^[4]。目前, 许多嗜热酶陆续被挖掘出来, 并在食品、环境保护和能源等多个领域被广泛应用^[3]。

β -葡萄糖苷酶, 也称为 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 是能特异性催化低聚糖和芳香族糖苷中末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 从而生成 β -葡萄糖和相应配基的一类酶的总称^[5], 是纤维素降解过程中的关键限速酶, 广泛存在于植物^[6]、动物^[7]和微生物(细菌^[8]、真核微生物^[9]、古菌^[10]、病毒^[11])中。根据核苷酸系列同一性, 可分别归入糖苷水解酶 GH1 家族、GH3 家族、GH5 家族、GH9 家族、GH30 家族、GH116 家族^[12-13], 目前报道最多的是 GH1 家族和 GH3 家族^[14], GH1 家族包含了近 60 种 β -葡萄糖苷酶, 它们大多数来源于动植物、细菌、真菌和古菌^[15], 而 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶主要来源于细菌和真菌^[16]。不同来源的 β -葡萄糖苷酶的理化性质存在极大的差异, 具体体现在相对分子量、温度和 pH 等方面。由于来源、氨基酸序列长度等不同, β -葡萄糖苷酶的相对分子量一般在 40–300 kDa^[14], 而 GH3 家族的分子量则在 70–130 kDa^[17]。一般来说, β -葡萄糖苷酶的最适温度在 40–100 °C, 嗜热微生物来源的 β -葡萄糖苷酶最适反应温度在 40–70 °C, 而来

自极端嗜热微生物的 β -葡萄糖苷酶最适反应温度可能达到 100 °C 甚至更高^[18-19]。Kengen 等^[18]研究的来源于古菌激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*)的 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶最适反应温度可达 102–105 °C。大多数 β -葡萄糖苷酶的 pI 值处于 3.5–5.5, 但也有少数 β -葡萄糖苷酶处于碱性范围, 属于碱性酶^[20]。大部分 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶在 pH 4.0–9.0 之间能正常催化反应^[14]。 β -葡萄糖苷酶具有广泛的底物特异性, 能够水解不同种类的糖苷底物, 也可协同纤维素酶降解纤维素, 从而进行植物细胞壁成分的降解和利用。因此, β -葡萄糖苷酶在许多方面得到广泛的应用, 如在食品行业, 利用 β -葡萄糖苷酶可以增加果汁、茶叶、葡萄酒香味^[21-22], 生产低聚龙胆糖^[23-24]; 在生物能源方面, 生产乙醇清洁燃料^[25-26]; 在饲料领域的应用体现在水解大豆异黄酮生成活性苷元^[27-28]。

目前, 国内外已开展了大量古菌来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的研究。然而对古菌来源的 GH3 家族的葡萄糖苷酶的研究很少。嗜热古菌(*Thermophilum adornatum*) 1910bT 是于 2009 年从俄罗斯的 Kamchatkan 温泉中分离得到的^[29], 根据其基因组序列分析发现具有 GH1 家族、GH3 家族、GH4 家族、GH13 家族、GH38 家族、GH57 家族、GH65 家族、GH113 家族的相关纤维素降解酶。本研究从 NCBI 数据库中得到嗜热古菌中一种热丝菌 *T. adornatum* 来源的一个与已鉴定的葡萄糖苷酶氨基酸序列一致性在 60% 以下的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的基因。经生物公司合成重组质粒 pET-30a(+)-*TaBgl3* 使其在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达重组蛋白, 并对其酶学性质进行了研究, 以期找到更优的 β -葡萄糖苷酶。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5 α 克隆菌株、*E. coli* BL21(DE3) 表达菌株购自博迈德生物公司；重组质粒 pET-30a(+)-*TaBgl3* 合成于通用生物系统(安徽)有限公司。

1.2 试剂

TGA Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit 12%购自 Bio-Rad 公司；其他试剂均为国产分析纯，购自北京化学试剂公司。

1.3 实验仪器

立式压力灭菌器(上海博迅实业有限公司)、DK-8D 三孔电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器有限公司)、PCR 扩增仪(Bio-rad 公司)、紫外分光光度计(菲勒仪器有限公司)、超声波细胞破碎仪(贝普斯科技有限公司)、台式高速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)、pH 计(METTLER TOLEDO 公司)、电子天平(上海天美天平仪器有限公司)、胶片观察灯(北京六一仪器厂)、电泳仪(北京东方瑞利电泳设备有限公司)、磁力搅拌器(Kylin-bell 实验仪器公司)、恒温振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司)、脱色摇床(Kylin-bell 实验仪器公司)、洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

1.4 培养基和相关溶液

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, (固体培养基含 20 g/L 琼脂), 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

10 \times SDS-PAGE 缓冲液: 188 g 甘氨酸, 10 g SDS, 30.3 g Tris 碱, 去离子水 900 mL 25 $^{\circ}$ C 水浴搅拌溶解, 加蒸馏水定容至 1 L, 室温保存备用。

考马斯亮蓝 R250 染色液: 0.1% (W/V)考马斯亮蓝 R250, 10% (W/V)冰醋酸, 25% (W/V)异

丙醇, 加蒸馏水定容至 1 L, 过滤去除杂质, 室温避光保存备用。

卡那霉素(50 mg/mL): 溶解 500 mg 卡那霉素于足量的水中, 最后定容至 10 mL。滤器过滤除菌, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

NTA 缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 0.5 mol/L NaCl, 20-300 mmol/L 咪唑, 每个梯度调 pH 7.4。

1 mol/L IPTG: 称取 2.383 g IPTG 固体粉末, 溶于足量的水中, 定容至 10 mL, 滤器过滤除菌, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

40%甘油: 取 40 mL 丙三醇, 加 ddH₂O 60 mL, 混匀, 灭菌, 保存备用。

1 mol/L Na₂CO₃: 称取 106 g Na₂CO₃ 粉末, 溶于 900 mL 去离子水中, 定容至 1 000 mL。

4 mmol/L pNPG: 称取 0.054 g pNPG 粉末, 溶于 40 mL 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲溶液中, 定容至 50 mL, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 重组质粒 pET-30a(+)-*TaBgl3* 的转化

重组质粒的转化参照 *E. coli* BL21(DE3)感受态的转化方法进行。

1.6 重组蛋白的诱导、纯化及检测

将过夜培养的 pET-30a(+)-*TaBgl3* 按 1%接种于 200 mL 含卡那抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.8, 加入 120 μ L 1 mol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6 h, 诱导蛋白表达。诱导结束后, 离心(10 000 r/min, 10 min), 超声破碎(工作参数: 25 min, 6/10 s, 35%, 冰浴), 收集上清液和破碎沉淀, 上清液即为粗酶, 用磁珠纯化蛋白, 并用不同浓度的咪唑洗脱纯化蛋白, 然后用 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.7 重组蛋白的酶学性质研究

1.7.1 酶活测定

酶活单位(U)的定义: 指在即定的反应条件

下, 样品每分钟水解底物对硝基苯- β -D-葡萄糖苷(*p*NPG)生成 1 μ mol 对硝基苯酚或水解糖苷类底物生成 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量即为 1 个酶活单位(U)。

β -葡萄糖苷酶酶活的测定方法为: 在试管中加入 250 μ L 4 mmol/L *p*NPG 底物在 80 $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 4 min, 再加入 250 μ L 稀释酶液, 于 80 $^{\circ}$ C 水浴锅反应 10 min, 反应结束后, 加入 1.5 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应, 冷却至室温后, 使用分光光度计测定 OD_{405} 值。做 3 个平行和一个对照(先加终止液, 后加酶液)。

1.7.2 最适反应条件

在 50–90 $^{\circ}$ C 温度区间下, 最适温度通过测定在 pH 5.0 条件下的相对酶活, 以确定 TaBgl3 的最适反应温度。最适 pH 在已测定的最适温度下, 通过测定酶在柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 4.5、5.0、6.0、7.0、8.0) 下的相对酶活, 以确定酶的最适反应 pH。

1.7.3 稳定性和热激活特性

将酶分别置于 70、80、90 $^{\circ}$ C 进行保温处理一定时间后, 测其剩余活力, 以确定该酶的热稳定性。将酶分别置于不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 测其剩余活力, 以确定该酶的 pH 稳定性。

将酶分别置于 60、70、80 $^{\circ}$ C 处理 0.5、1.0、2.0 h, 测定其剩余活力, 以确定高温对该酶酶活是否有激活作用。

1.7.4 TaBgl3 的动力学参数

在最适反应条件下, 分别测定终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.5、1.0 和 2.0 mmol/L 的 *p*NPG 底物条件下, 反应 5 min 的酶活, 绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 计算最大反应速率 V_{\max} 、米氏常数 K_m 和催化效率 K_{cat}/K_m 。

1.7.5 不同金属离子和化学物质对 TaBgl3 酶活力的影响

在最适反应条件下, 以不添加金属离子为对照组, 在测定体系中分别添加终浓度为 5 mmol/L 的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Na^+ 、 Pb^{2+} 、 Ni^+ 、 Li^+ 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、SDS、EDTA, 以及 5% 的甲醇、异丙醇、 β -巯基乙醇为实验组, 按照 1.7.1 的测定方法测定其相对酶活, 确定不同金属离子和化学物质对酶活力的影响。

1.7.6 乙醇和葡萄糖对 TaBgl3 的酶活力影响

最适条件下, 以不加乙醇或葡萄糖为对照, 在反应中加入终体积比为 5%、10%、20%、30%、40%、50% 的乙醇或 0–50 mmol/L 的葡萄糖, 按照 1.7.1 的测定方法测定其相对酶活, 以分析乙醇和葡萄糖对酶活力的影响。

1.7.7 TaBgl3 的底物特异性

最适反应条件下, 分别测定终浓度为 2 mmol/L 的人工底物(*p*NPG)、对硝基苯木糖苷(*p*NPX)、对硝基苯甘露糖苷(*p*NPM)、对硝基苯半乳糖苷(*p*NP-galac)、邻硝基苯葡萄糖苷(*o*NPG)和天然底物[纤维二糖、龙胆二糖(β -1,6 键)、纤维三糖、槐糖(β -1,2 键)]的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 序列分析

序列分析结果表明, β -葡萄糖苷酶 TaBgl3 核苷酸序列长度为 2 100 bp, 编码 699 个氨基酸, 其蛋白的理论分子量为 77.0 kDa。将 TaBgl3 的氨基酸序列于 NCBI 中进行 BLAST 比对分析(图 1), 发现它与来源于热丝菌(*Thermofilum* sp.) 的 β -葡萄糖苷酶(NAZ25638.1)氨基酸序列一致性最高, 约 95.57%。其与已鉴定的来源于那不勒斯栖热袍菌(*Thermotoga neapolitana*)的同家族 β -葡萄糖苷酶(pdb:2X42)的一致性仅为 58.89%。

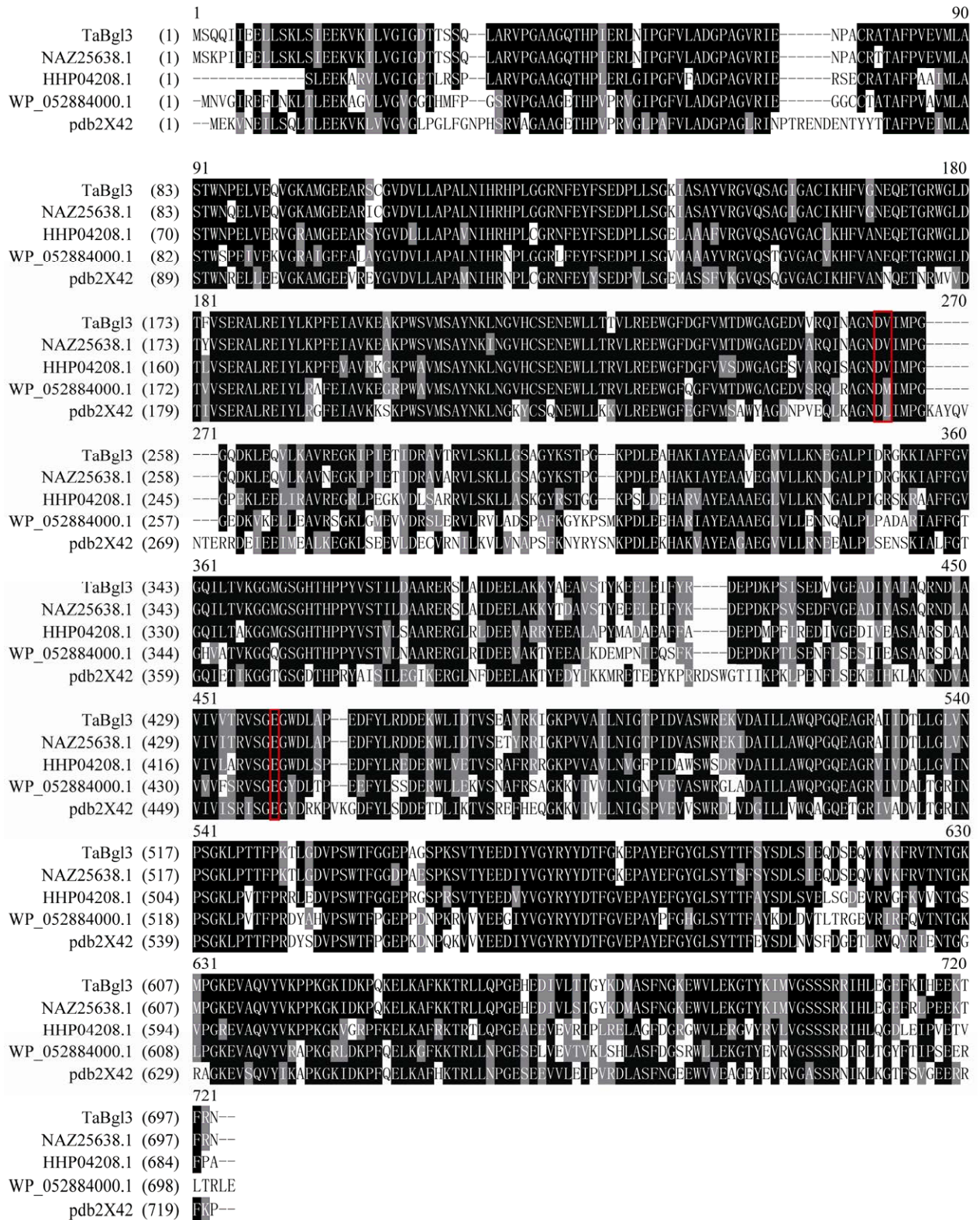


图 1 TaBgl3 的多序列比对分析
 Figure 1 Multiple sequences alignment analysis of TaBgl3.

2.2 重组蛋白的表达与纯化

将重组质粒 pET-30a(+)-*TaBgl3* 转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞进行诱导表达, 利用磁珠纯化蛋白。对得到的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 其结果如图 2 所示, 在 77.0 kDa 附近有明显的特征条带, 与理论分子量一致。

2.3 最适反应条件、稳定性和热激活特性

在 pH 5.0 条件下, 在 50–80 °C 范围内, 随着温度的上升, 酶活逐渐提升, 在 70–85 °C, 保持 50%以上的活力, 80 °C 酶活活性最高, 当温度升到 90 °C 时, 仅保留 8.7%的活力(图 3A)。将酶分别置于 70、80 和 90 °C 处理, 测定该酶的剩余活力。在 70 °C 下, 将酶液保温 1–3 h 后, 对该酶酶活有较小的促进作用, 可提高约 10%以上的酶活力, 而 4 h 之后, 随着时间的延长呈递减状态; 80 °C 处理 1–4 h, 都对酶活有促进作用, 且 2 h 的促进作用最大, 但 5 h 后,

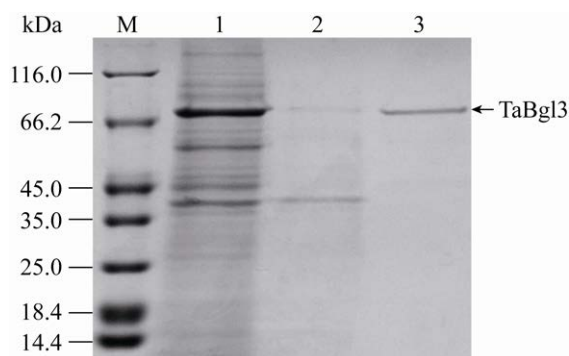


图 2 *TaBgl3* 重组蛋白的 SDS-PAGE

Figure 2 SDS-PAGE of recombinant protein *TaBgl3*. M: marker; lane 1: +IPTG; lane 2: crude enzyme; lane 3: purified protein.

酶活丧失; 说明 *TaBgl3* 具有较好的热稳定性(图 3C)。

在最适温度 80 °C 下, 测定不同 pH (2.3、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)下的酶活, 低于 pH 4.5, 没有活性, pH 5.0 时, 酶活达到最高,

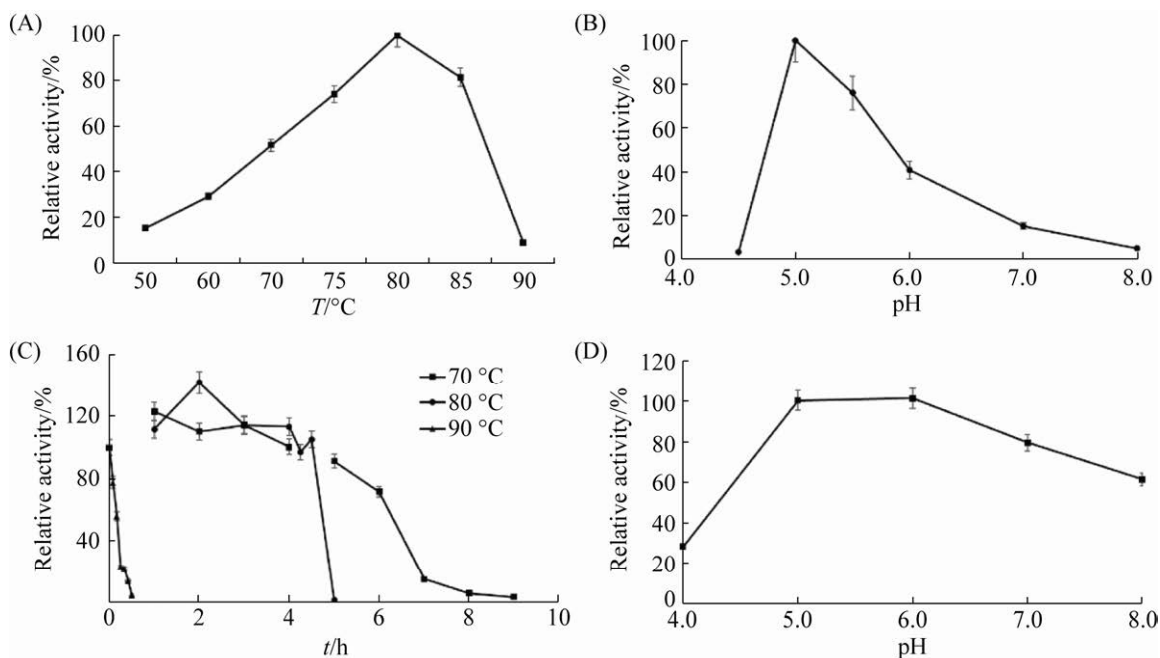


图 3 温度和 pH 对 *TaBgl3* 酶活的影响

Figure 3 Effects of temperature and pH on recombinant enzyme activity. A: effect of temperature on *TaBgl3* enzyme activity; B: effect of pH on *TaBgl3* enzyme activity; C: thermal stability of *TaBgl3*; D: pH stability of *TaBgl3*. Error bars represent the standard error.

随着 pH 继续升高, 酶活逐渐降低, pH 8.0 时, 残余活力仅剩 5.23% (图 3B)。在 pH 8.0 保温 1 h 后, 仍保留 61.51% 的活性, 说明 TaBgl3 在偏碱性环境下具有较好的稳定性(图 3D)。

根据之前热稳定性所测数据, 结果发现该酶在 80 °C 处理 2 h 后, 高温对 TaBgl3 的酶活具有明显激活作用, 因此再次对 β -葡萄糖苷酶 TaBgl3 进行热激活实验, 选取 60、70、80 和 90 °C 4 个温度, 分别处理 0.5、1.0、2.0 h, 再测其相对酶活, 以验证温度对酶的激活作用。结果如图 4 所示, 0.5–2.0 h 内, 60、70 和 80 °C 对酶都有激活作用, 其中 80 °C 对酶的激活作用更明显, 最大能提升 68% 的酶活。然而 90 °C 处理 0.5 h, 仅剩 4.46% 的酶活(图 4)。

将 TaBgl3 纯化后, 在 90 °C 下立即进行热处理, 结果如图 5 所示, 在 0.5 h 内, TaBgl3 失活。随后将其冷藏贮存(4 °C), 2 个月后, 再次置于 90 °C 下热处理, 结果发现在处理 0.5 h 后, TaBgl3 的酶活回到了原始状态, 并在处理 2 h 后, 对 TaBgl3 的酶活有一定的激活作用, 可提升 37.09% 的酶活, 而随着时间的延长, 其酶活逐渐降低, 4 h 后, 还残留 71.07% 的酶活。

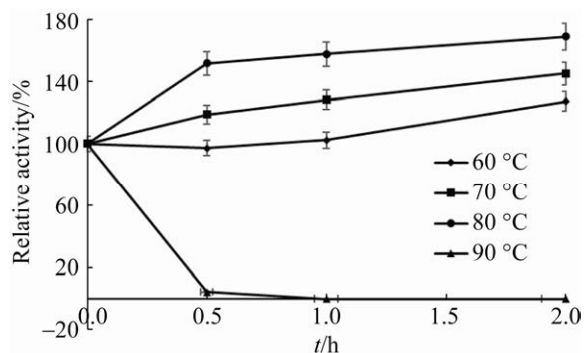


图 4 温度对 TaBgl3 酶活的激活影响

Figure 4 Thermal activation of temperature on activation of TaBgl3. Error bars represent the standard error.

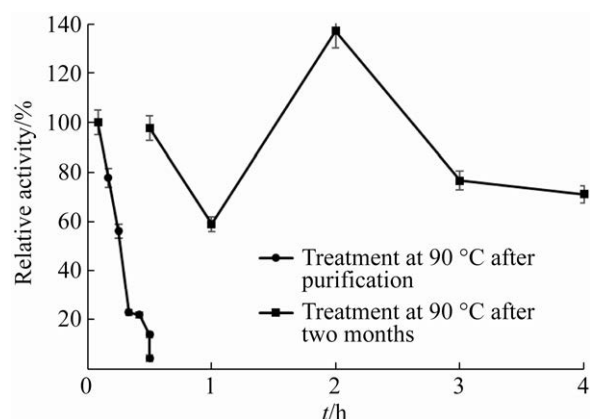


图 5 高温对 TaBgl3 酶活的激活作用

Figure 5 Effect of temperature on activation of TaBgl3. Error bars represent the standard error.

2.4 动力学参数分析

以不同浓度(0.5–4.0 mmol/L)的 *p*NPG 为底物与 TaBgl3 反应, 测其酶活。根据线性回归方程 $y=6.7485x+3.7300$ ($R^2=0.9998$) 可得该酶特征常数 K_m 和 V_{max} 分别为 1.81 mmol/L 和 268.10 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 催化效率 K_{cat}/K_m 为 115.47/s。

2.5 不同金属离子和化学物质对 TaBgl3 酶活力的影响

不同金属离子对 β -葡萄糖苷酶活力的影响程度不同, 如表 1 所示, 部分金属离子对 TaBgl3 的催化活性几乎没有影响, 而大部分重金属离子对重组酶 TaBgl3 的酶活都有促进作用, 且 Cu^{2+} 、 Li^+ 能提高 39% 以上的酶活, 但是 Fe^{3+} 对 TaBgl3 的酶促反应有明显的抑制作用。这一结果与 *Thermotoga neapolitana* 的 Tpbgl3 和 *Thermotoga petrophila* 的 rBG1A 的实验结果相似^[30–31]。

5 种化学试剂对 TaBgl3 的酶活力有不同的影响, 5 mmol/L EDTA 对 TaBgl3 的酶活力有显著的激活作用, 可提高 40.80% 的酶活, 其他 4 种有机溶剂对重组酶均有不同程度的抑制作用; 其中异丙醇的抑制作用相对较弱, 对重组

表 1 不同金属离子和化学试剂对 TaBgl3 酶活力的影响

Table 1 Effects of different metal ions and chemicals on enzyme activity of TaBgl3

Reagents	Relative activity/%
CK (5 mmol/L)	100.00±2.86
K ⁺ (5 mmol/L)	91.22±8.13
Ca ²⁺ (5 mmol/L)	98.75±1.39
Zn ²⁺ (5 mmol/L)	84.12±0.25
Mg ²⁺ (5 mmol/L)	83.75±4.20
Fe ²⁺ (5 mmol/L)	112.58±2.74
Fe ³⁺ (5 mmol/L)	53.67±2.01
Cu ²⁺ (5 mmol/L)	139.98±1.17
Na ⁺ (5 mmol/L)	116.56±1.81
Pb ²⁺ (5 mmol/L)	117.50±1.81
Ni ²⁺	115.63±0.91
Li ⁺	147.14±0.44
Cd ²⁺	125.78±0.81
Co ²⁺	123.41±3.05
EDTA	140.80±5.29
β-mercaptoethanol	51.27±2.01
Methanol	71.73±1.89
Isopropanol	93.87±3.01
SDS	ND

ND: not detected.

酶 TaBgl3 的酶活力抑制作用从小到大依次为: 异丙醇、甲醇、β-巯基乙醇; 而在 SDS 下, 酶完全失活(表 1)。

2.6 酶活力受不同浓度乙醇和葡萄糖的影响

测定不同体积比的乙醇对 TaBgl3 的影响。

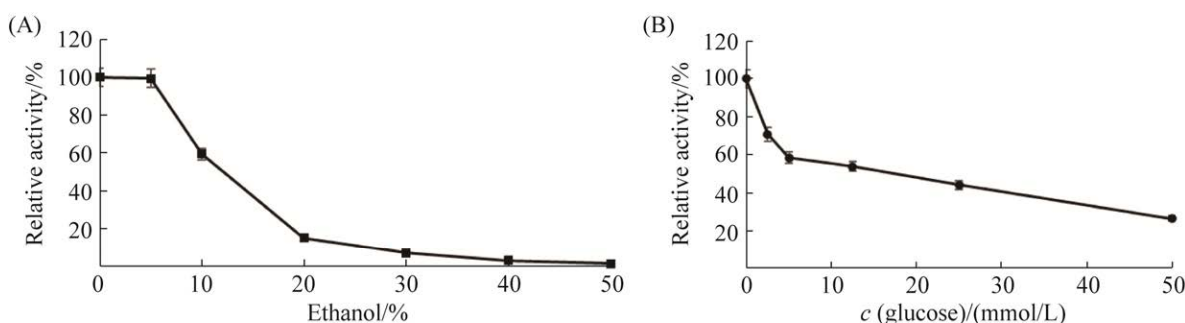


图 6 乙醇和葡萄糖对 TaBgl3 酶活的影响

Figure 6 Effect of ethanol and glucose on TaBgl3 enzyme activity. A: ethanol; B: glucose. Error bars represent the standard error.

根据图 6A 结果所示, 乙醇浓度在 10% 以下, TaBgl3 能保持 60% 以上的活性, 但随着乙醇浓度的增加, TaBgl3 的酶活力逐渐减弱。当反应体系中乙醇浓度达到 20% 时, 酶活降到了 20% 以下, 而乙醇浓度达到 50% 时, TaBgl3 的相对酶活力仅残留 3.36%, 说明乙醇对 TaBgl3 的酶活有明显的抑制或变性作用。

测定不同浓度 (0–50 mmol/L) 的葡萄糖对 TaBgl3 活力的影响。结果如图 6B 所示, 葡萄糖浓度在 0–12.5 mmol/L 时, TaBgl3 基本都保持在 50% 以上的活力, 随着葡萄糖浓度的增加, 其活力逐渐下降, 当葡萄糖浓度达到 50 mmol/L 时, 仅残余 25% 的活力。这说明 TaBgl3 对其产物葡萄糖的耐受性极低, 也与 GH3 家族的 β-葡萄糖苷酶对葡萄糖产物抑制耐受性差的特点一致。

2.7 底物特异性分析

以终浓度 2 mmol/L 的人工底物 (*p*NPG、*p*NPX、*p*NPM、*p*NP-galac、*o*NPG) 和天然底物 (纤维二糖、龙胆二糖、纤维三糖、槐糖) 为底物, 检测 TaBgl3 对不同底物的水解能力 (表 2)。当底物为 *p*NPG 时, 酶活力最高达到 92.55 U/mg。TaBgl3 除了能水解 *p*NPG, 还能水解人工底物 *p*NPX, 其相对活力是 *p*NPG 的 4.01%, 而 TaBgl3 对 *p*NPgal、*p*NPM、*o*NPG 及各种寡糖都没有表现出水解活性。

表 2 TaBgl3 的底物特异性分析

Table 2 Analysis of the TaBgl3 on substrates specificity

Substrates	Specific activity/(U/mg)
Disaccharide	
1,4-β-D-cellobiose	ND
Sophorose	ND
Gentiobiose	ND
Aryl β-glycoside	
pNPG	92.55±3.49
pNPX	3.71±1.39
pNPgal	ND
pNPM	ND
oNPG	ND

ND: not detected.

3 讨论

3.1 不同来源的 β-葡萄糖苷酶的酶学性质

不同来源的 β-葡萄糖苷酶有着极大的理化性质差异, 一般来说, β-葡萄糖苷酶的最适温度为 40–110 °C, 大多数 β-葡萄糖苷酶的最适 pH 处于偏酸性, 少数处于碱性。如来源于差异柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*)的 β-葡萄糖苷酶的最适反应条件是 45 °C、pH 6.0, 来源于真菌中一种腐质霉(*Humicola insolens*)的 β-葡萄糖苷酶在反应中的最适温度为 60 °C。而从古菌中分离出的 β-葡萄糖苷酶在酶促反应中的最适温度

会比细菌和真菌高很多, 如来源于热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium*)的 β-葡萄糖苷酶的最适温度为 70 °C, 来源于栖热袍菌(*Thermotoga sp.*)的 β-葡萄糖苷酶的最适温度可达 90 °C (表 3)。本研究来源于一种热丝菌(*Thermofilum adornatum*)的 TaBgl3 具有高温、酸性的特点, 与大部分来源于嗜热微生物的特性一致, 都属于酸性偏高温酶, 其较好的热稳定性优于大多数微生物来源的 β-葡萄糖苷酶, 但其对纤维二糖等寡糖的比活力和催化效率相对偏低, 其原因可能是对于寡糖类底物的催化口袋小。所以要实现 TaBgl3 的工业化实际应用, 对其进行分子改造非常有必要。

不同来源的 β-葡萄糖苷酶的酶学性质总结如表 3。

3.2 TaBgl3 的热稳定性、热激活特性

近年来, 温度对于 β-葡萄糖苷酶酶活的影响一直都是人们研究的一大重点, 尤其是耐高温 β-葡萄糖苷酶, 因为纤维素降解过程中会释放出大量的热, 所以对酶的耐热性有一定的要求。影响酶的热稳定性的因素有很多: 氢键、疏水相互作用、静电相互作用、二硫键、芳香环相互作用、氨基酸组成和蛋白质的包装效率等。氢键的形成可能影响酶的热稳定性^[36]。芳

表 3 不同来源 β-葡萄糖苷酶酶学性质的比较

Table 3 Comparison of enzymatic properties of β-glucosidases from different sources

Organisms	Enzymes	Molecular weight/kDa	Optimum temperature/°C	Optimum pH	K_m /(mmol/L)	K_{cat}/K_m	References
<i>Thermofilum adornatum</i>	TaBgl3	77.0	80	5.0	1.81	115.47	This study
<i>Thermotoga sp.</i>	TsBgl1A	50.0	90	6.0	0.24	509.11	[23]
<i>Thermoanaerobacterium</i>	rBGL	–	70	6.4	0.63	–	[32]
<i>Humicola insolens</i>	HiBgl3A	95.1	60	5.5	0.90	81.60	[14]
<i>Citrobacter koser</i>	CBGL	83.0	45	6.0	11.28	0.02	[33]
<i>Bacillus subtilis</i>	BglH	53.0	37	6.0	0.15	147.00	[34]
<i>Thermoanaerobacterium</i>	BglY	52.0	65	6.5	2.10	–	[35]
<i>Thermosaccharolyticum</i>							

香族氨基酸易于形成疏水型表面, 其侧链与周围氨基酸的疏水相互作用可以提高酶的活性和稳定性^[37]。另外蛋白的高级结构中的短螺旋和离子键数量的增多, 使底物结合活性位点的区域显示正电荷, 蛋白的三级结构更稳定, 从而使得酶的热稳定性提高^[38]。本研究中的 TaBgl3, 80 °C 处理 6 h 后, 还残留 71.68% 的酶活。在热稳定性的实验中, 发现温度对 TaBgl3 的酶活有激活作用, 进一步进行验证发现 2 h 以内, 60、70 和 80 °C 对酶都有激活作用, 其中 80 °C 对酶的激活作用更明显, 最大能提升 68% 的酶活, 说明温度对 TaBgl3 的酶活具有明显的激活作用。其原因可能是由于 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶具有 2 个典型的结构域: $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构域和 $(\beta/\alpha)_6$ 三明治夹层结构域, 催化位点位于 2 个结构域的中间, 周围存在 5 个柔性 loop 区, 上面分布的多个氨基酸残基与底物分子形成稳定的相互作用力^[14]。该酶具有高温激活特性的原因可能是温度对酶的结构具有明显的影响, 导致酶在高温处理后提升了对底物的水解能力。另外, 纯化的 TaBgl3 在冷藏贮存(4 °C) 2 个月后, 酶活明显减低, 仅剩余初始纯化酶的 20% 左右。对其进行 90 °C 下热处理 0.5 h 后, 酶活力恢复到初始纯化酶活。这说明低温对 TaBgl3 的酶活力具有抑制作用, 酶的结构发生了改变。但热处理后, 酶的结构恢复到原始状态, 酶活回升, 且有一定的激活作用。

3.3 TaBgl3 的葡萄糖耐受性

葡萄糖对 β -葡萄糖苷酶(BGs)的产物抑制被认为是植物-生物质糖化酶促技术中的限制步骤。近年来发现对葡萄糖耐受较好的 β -葡萄糖苷酶大多来源于真菌, 然而对于 β -葡萄糖苷酶葡萄糖耐受性的结构理论仍难以捉摸。通过比较结构分析表明, +2 亚位点在内的活性位点入口的形状和静电性质决定了葡萄糖耐受性,

并且 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐量是 GH3 BGs 的 10–1 000 倍^[39]。因为 GH1 BGs 的活性部位位于深而窄的腔内, 这与 GH3 BGs 中的浅口袋形成对比。本研究表达的 TaBgl3 对葡萄糖的耐受性与 GH3 家族葡萄糖苷酶的普遍现象相符。因此, 在后期的实验中, 应就如何提高 TaBgl3 的葡萄糖耐受性进行深入研究。

综上所述, 本研究从 NCBI 数据库中获得嗜热古菌(*T. adornatum*)来源 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列, 构建了重组载体 pET-30a(+)-TaBgl3, 使其在 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中表达, 研究其酶学性质。TaBgl3 属于酸性高温酶, 80 °C 处理 4 h 后, 其酶活仍能保持在 90% 以上, 说明 TaBgl3 具有较好的热稳定性。另外, 高温对 TaBgl3 的酶活有明显的激活作用。重金属离子对 TaBgl3 的酶活有一定的促进作用。本研究对于后续深入探讨温度对 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶的结构和热稳定性的理论研究提供了优良材料。

参考文献

- [1] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. *PNAS*, 1990, 87(12): 4576–4579.
- [2] Zhang CL, Pearson A, Li YL, Mills G, Wiegel J. Thermophilic temperature optimum for crenarchaeal synthesis and its simplification for archaeal evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4419–4422.
- [3] 杨磊. 超嗜热古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 产高温 α -葡萄糖苷酶的研究. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [4] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1–43.
- [5] 姚瑶, 刘庆, 刘福, 姚彦彤, 朱森林, 蒋红英. β -葡萄糖苷酶的性质及其在食品加工中的应用研究进展. *贵州农业科学*, 2018, 46(2): 132–135.

- Yao Y, Liu Q, Liu F, Yao YT, Zhu SL, Jiang HY. Characteristics of β -glucosidase and its applications in food processing. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2018, 46(2): 132–135. (in Chinese)
- [6] Singh S, Singh DK, Meena A, Dubey V, Masood N, Luqman S. Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity. *Phytomedicine*, 2019, 55: 92–104.
- [7] Berrin JG, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G, Puigserver A, Kroon PA, Juge N. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(1): 249–258.
- [8] Barabote RD, Xie G, Leu DH, Normand P, Necsulea A, Daubin V, Médigue C, Adney WS, Xu XC, Lapidus A, Parales RE, Detter C, Pujic P, Bruce D, Lavire C, Challacombe JF, Brettin TS, Berry AM. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1033–1043.
- [9] Maheshwari R, Bhardwaj G, Bha MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 461–488.
- [10] Pei JJ, Pang Q, Zhao LG, Fan S, Shi H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 31.
- [11] Antwerpen MH, Georgi E, Zoeller L, Woelfel R, Stoecker K, Scheid P. Whole-genome sequencing of a pandoravirus isolated from keratitis-inducing acanthamoeba. *Genome Announc*, 2015, 3(2): e00136-15.
- [12] Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS*, 1995, 92(15): 7090–7094.
- [13] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of 113 glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7: 637–644.
- [14] 夏伟. 嗜热真菌第 3 家族 β -葡萄糖苷酶的多样性和分子改造. 浙江大学博士学位论文, 2016.
- [15] Tiwari R, Kumar K, Singh S, Nain L, Shukla P. Molecular detection and environment-specific diversity of glycosyl hydrolase family 1 β -glucosidase in different habitats. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1597.
- [16] Zhang C, Zhang LL, Wang DD, Ma HL, Liu BL, Shi Z, Ma XH, Chen Y, Chen Q. Evolutionary history of the glycoside hydrolase 3 (GH3) family based on the sequenced genomes of 48 plants and identification of *Jasmonic* acid-related GH3 proteins in *Solanum tuberosum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1850.
- [17] 王欢. 嗜热毛壳菌 β -葡萄糖苷酶 BGL3 基因的克隆、表达和分子改造. 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
- [18] Kengen SW, Luesink EJ, Stams AJ, Zehnder AJ. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 213(1): 305–312.
- [19] Bohlin C, Olsen SN, Morant MD, Patkar S, Borch K, Westh P. A comparative study of activity and apparent inhibition of fungal beta-glucosidases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(6): 943–952.
- [20] 牛瑜. 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶 Pbg125-217 的克隆、表达与酶学性质研究. 山东大学硕士学位论文, 2011.
- [21] González-Pombo P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F, Brena BM. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases. *Food Chemistry*, 2014, 143: 185–191.
- [22] Pardo-García AI, De La Hoz KS, Zalacain A, Alonso GL, Salinas MR. Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines. *Food Chemistry*, 2014, 163: 258–266.
- [23] 盛玲玲. *Thermotoga* sp. β -葡萄糖苷酶重组表达、分子改造及制备低聚龙胆糖研究. 江南大学硕士学位论文, 2020.
- [24] 朱婧, 覃拥灵, 陈桂光, 张云开, 刘演景, 罗杰, 梁智群. β -葡萄糖苷酶高产菌株的选育及酶法转化葡萄糖生产龙胆低聚糖. *食品与发酵工业*, 2010(4): 21–24, 27.
- Zhu J, Qin YL, Chen GG, Zhang YK, Liu YJ, Luo J, Liang ZQ. Selection of the high β -glucosidase mutant and production of gentiooligosaccharid. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(4): 21–24, 27. (in Chinese)
- [25] Baba Y, Sumitani JI, Tani SJ, Kawaguchi T. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. *AMB Express*, 2015, 5: 3.
- [26] Kudo K, Watanabe A, Ujje S, Shintani T, Gomi K. Purification and enzymatic characterization of

- secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2015, 120(6): 614–623.
- [27] 孙艳梅, 张永忠, 王伊强, 许晶. 大豆 β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究. *中国粮油学报*, 2006, 21(2): 86–89.
Sun YM, Zhang YZ, Wang YQ, Xu J. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by β -glucosidases from soybean. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2006, 21(2): 86–89. (in Chinese)
- [28] Miksch R, Wiedemann G. Blood sugar determination with the GOD-POD-ABTS method using uranylacetate for deproteinization. *Zeitschrift für Medizinische Labortechnik*, 1973, 14(1): 27–33.
- [29] Zayulina KS, Kochetkova TV, Piunova UE, Ziganshin RH, Podosokorskaya OA, Kublanov IV. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Thermofilum adornatum* sp. nov. uses GH1, GH3, and two novel glycosidases for cellulose hydrolysis. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2972.
- [30] Park TH, Choi KW, Park CS, Lee SB, Kang HY, Shon KJ, Park JS, Cha J. Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable beta-glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(4): 411–422.
- [31] Xie JC, Zhao DX, Zhao LG, Pei JJ, Xiao W, Ding G, Wang ZZ. Overexpression and characterization of a Ca²⁺ activated thermostable β -glucosidase with high ginsenoside Rb1 to ginsenoside 20(S)-Rg3 bioconversion productivity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(6): 839–850.
- [32] Fang ZM, Fang W, Liu JJ, Hong YZ, Peng H, Zhang XC, Sun BL, Xiao YZ. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, 20(9): 1351–1358.
- [33] 江民华, 林厚民, 尹金阳, 王子龙, 庞浩, 黄日波, 杜丽琴. 差异柠檬酸杆菌 GXW-1 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及分子改造. *微生物学报*, 2017, 57(3): 363–374.
Jiang MH, Lin HM, Yin JY, Wang ZL, Pang H, Huang RB, Du LQ. Characterization and molecular modification of β -glucosidase from *Citrobacter koser* GXW-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 363–374. (in Chinese)
- [34] Kuo LC, Lee KT. Cloning, expression, and characterization of two β -glucosidase from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 56(1): 119–125.
- [35] 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. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(4): 1062–1068.
Liu Y, Zhang C, Peng H, Dong YN, Zhao WP. Recombinant expression and characterization of β -glucosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(4): 1062–1068. (in Chinese)
- [36] Alekel DL, Genschel U, Koehler KJ, Hofmann H, Van Loan MD, Beer BS, Hanson LN, Peterson CT, Kurzer MS. Soy isoflavones for reducing bone loss study: effects of a 3-year trial on hormones, adverse events, and endometrial thickness in postmenopausal women. *Menopause-the Journal of the North American*, 2015, 22(2): 185–197.
- [37] Nakamura A, Tsukada T, Auer S, Furuta T, Wada M, Koivula A, Igarashi K, Samejima M. The tryptophan residue at the active site tunnel entrance of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A is important for initiation of degradation of crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(19): 13503–13510.
- [38] De Souza AR, De Araújo GC, Zanphorlin LM, Ruller R, Franco FC, Torres FAG, Mertens JA, Bowman MJ, Gomes E, Da Silva R. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1,4- β -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 20–26.
- [39] De Giuseppe PO, De Arruda Campos Brasil Souza T, Souza FHM, Zanphorlin LM, Machado CB, Ward RJ, Jorge JA, Dos Prazeres Melo Furriel R, Murakami MT. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2014, 70(Pt 6): 1631–1639.

(本文责编 张晓丽)