



# 嗜冷德沃斯氏菌来源 GH1 家族 $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl59 的原核表达及酶学性质分析

刘颖, 董盼盼, 孙丽芳, 吴琳娇, 李兰兰, 吴允昆\*

福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108

刘颖, 董盼盼, 孙丽芳, 吴琳娇, 李兰兰, 吴允昆. 嗜冷德沃斯氏菌来源 GH1 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl59 的原核表达及酶学性质分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2955-2966.

LIU Ying, DONG Panpan, SUN Lifang, WU Linjiao, LI Lanlan, WU Yunkun. Prokaryotic expression and characterization of the GH1  $\beta$ -glucosidase Bgl59 from *Devosia psychrophila*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2955-2966.

**摘要:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品、医学以及生物能源等多个领域有着广泛的应用, 因此挖掘新型高效的  $\beta$ -葡萄糖苷酶是十分必要的。【目的】对嗜冷德沃斯氏菌(*Devosia psychrophile*)来源的 GH1 家族的葡萄糖苷酶原核表达并测定其酶学性质。【方法】通过人工合成技术得到 *D. psychrophila* 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的编码基因, 命名为 *bgl59*。将该基因转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中, 诱导基因表达, 对得到的蛋白进行纯化并测定其酶学性质。【结果】Bgl59 的分子量为 48.8 kDa, 最适温度为 55 °C, 最适 pH 为 6.0; Bgl59 在 pH 5.0–8.5 范围内处理 1 h 后仍保持 80% 以上酶活; 在 8 种供试底物中, Bgl59 对 4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG)有着最高的水解能力, 其  $K_m$  为 3.090 mmol/L,  $V_{max}$  为 194  $\mu$ mol/(min·mg),  $k_{cat}$  为 159  $s^{-1}$ ; 1 mmol/L 的  $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  对 Bgl59 具有明显的激活作用, 0.1% 的 SDS 会使酶活全部丧失; 0.10 mol/L 葡萄糖和 0.30 mol/L 木糖具有促酶活作用, 可分别使 Bgl59 酶活提高 74% 和 91%; 在 1.25 mol/L 葡萄糖或 2.00 mol/L 木糖存在的条件下, 仍可保持 50% 以上酶活。【结论】Bgl59 的酶学性质优异, 具有良好的 pH 稳定性, 对金属离子或化学试剂都具有一定耐受能力, 是少见的葡萄糖激活型  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 具有优良的糖促活性和耐受性, 在未来的工业生产以及应用中具有潜在研究价值。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 酶学性质; GH1 家族; 葡萄糖耐受

资助项目: 福建省自然科学基金(2019J01280, 2021J01171)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01280, 2021J01171).

\*Corresponding author. E-mail: wuyk@fjnu.cn

Received: 2024-01-25; Accepted: 2024-05-21; Published online: 2024-05-28

# Prokaryotic expression and characterization of the GH1 $\beta$ -glucosidase Bgl59 from *Devosia psychrophila*

LIU Ying, DONG Panpan, SUN Lifang, WU Linjiao, LI Lanlan, WU Yunkun\*

College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

**Abstract:**  $\beta$ -glucosidases have been widely used in food, medicine, bioenergy and other fields, and thus it is necessary to explore new and efficient  $\beta$ -glucosidases. **[Objective]** To realize the prokaryotic expression of a GH1 glucosidase derived from *Devosia psychrophila* and characterize the enzymatic properties of the expressed protein. **[Methods]** The gene encoding the  $\beta$ -glucosidase derived from *D. psychrophila* was synthesized, named *bgl59*, and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). After the gene expression was induced, and the obtained protein was purified and characterized for the enzymatic properties. **[Results]** Bgl59 had a molecular weight of 48.8 kDa, with the highest activity at 55 °C and pH 6.0. After treatment for 1 h within the range of pH 5.0–8.5, Bgl59 maintained the relative activity over 80%. Bgl59 had the highest hydrolysis ability for 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) among the eight substrates tested, with the  $K_m$  of 3.090 mmol/L,  $V_{max}$  of 194  $\mu$ mol/(min·mg), and  $k_{cat}$  of 159 s<sup>-1</sup>. The presence of 1 mmol/L of Ca<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> had a significant activating effect on Bgl59, while the presence of 0.1% SDS resulted in a complete loss of enzyme activity. The presence of 0.10 mol/L glucose and 0.30 mol/L xylose increased the activity of Bgl59 by 74% and 91%, respectively. Moreover, the enzyme remained the relative activity above 50% even when being cultured with 1.25 mol/L glucose or 2.00 mol/L xylose. **[Conclusion]** Bgl59 exhibits outstanding enzymatic properties, robust pH stability, and tolerance to metal ions and chemical reagents. It is a rare glucose-activated  $\beta$ -glucosidase with exceptional tolerance to glucose, holding significant potential for future industrial production and application.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase; enzymatic properties; GH1 family; glucose tolerance

$\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21,  $\beta$ -glucosidase)属于水解酶的一种,能够水解含有 $\beta$ -葡萄糖苷键的 $\beta$ -葡萄糖苷等多种糖缀合物,在水解的同时释放出葡萄糖以及相应的糖基配体<sup>[1]</sup>。根据结构特征的不同可将 $\beta$ -葡萄糖苷酶分为GH1家族<sup>[2]</sup>和GH3家族<sup>[3]</sup>两个家族, GH1家族呈现典型的 $(\alpha/\beta)_8$  TIM-barrel结构和口袋状催化通道, GH3家族包括 $(\beta/\alpha)_8$  TIM-barrel折叠、 $(\alpha/\beta)_6$ 三明治结构域和未知功能的FnIII结构域。一般来说, GH1家族的 $\beta$ -葡萄糖苷酶在古菌、植物和

动物中广泛存在,而GH3家族的 $\beta$ -葡萄糖苷酶主要来自细菌、丝状真菌和酵母<sup>[4]</sup>。作为一种重要的工业酶, $\beta$ -葡萄糖苷酶在造纸、纺织<sup>[5-6]</sup>、食品加工<sup>[7]</sup>、生物医学以及生物燃料<sup>[8]</sup>等行业均有广泛应用。当前,应用于工业生产的 $\beta$ -葡萄糖苷酶在应用过程中存在酶活力偏低、反应条件适用范围窄、易受葡萄糖产物抑制等问题,这无疑增加了工业生产的成本,制约了 $\beta$ -葡萄糖苷酶的广泛应用<sup>[9]</sup>。因此筛选获得高催化效率、不受产物抑制且适用范围较广的 $\beta$ -葡萄糖苷酶

非常具有研究价值<sup>[10]</sup>。

嗜冷菌是一类长期生存在寒冷环境中的微生物, 比起那些需要在正常或者较高温度下才能发挥最大工作效率的微生物, 嗜冷菌已被证明更加经济环保<sup>[11]</sup>。由嗜冷菌产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶一般在低温至适当温度下能够表现出较高的催化活性, 而且适用范围广, 例如洗涤剂、食品工业、精细化学品的合成以及生物修复<sup>[12]</sup>, 进而克服工业生产中苛刻反应条件对  $\beta$ -葡萄糖苷酶应用的限制<sup>[13]</sup>。嗜冷德沃斯氏菌(*Devosia psychrophila*)是一种从奥地利阿尔卑斯山的皮茨塔勒约奇勒冰川采集的冻土中分离出来的嗜冷细菌, 为 *Devosia* 属, 在系统发育上归为  $\alpha$  变型菌纲<sup>[14]</sup>。本研究对 NCBI 数据库中 *D. psychrophila* 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶序列进行了分析, 运用密码子优化以及基因合成技术获得相应基因, 命名为 *bgl59*。将 *bgl59* 转化进大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中实现异源表达, 进行了 *Bgl59* 的酶学性质表征, 以期挖掘出一种新型功能酶, 为解决  $\beta$ -葡萄糖苷酶在低温条件下的工业应用难题提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和重组质粒

*Escherichia coli* BL21(DE3)用于蛋白表达, 该菌株为本课题组保存菌株, 重组表达质粒 pET28a-bgl59 为通用生物(安徽)股份有限公司构建合成。

### 1.2 主要试剂和仪器

蛋白分离用镍柱填料, Novagen 公司; 5 $\times$ 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 北京索莱宝科技有限公司; 标准蛋白 marker, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; EDTA、NaOH 等其他试剂均为国产分析纯。

高压匀质机, 永联生物科技(上海)有限公

司; AKTA pure 蛋白质纯化系统, 厦门英诺科仪器有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 双层组合式振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 培养基以及培养条件

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0。培养条件: 37  $^{\circ}$ C、220 r/min, 在 LB 液体培养基中培养 *Escherichia coli* BL21(DE3)。

### 1.4 序列分析

于 NCBI 数据库中获得 *Bgl59* (WP\_046170703.1) 的氨基酸序列。运用 ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对该蛋白的基本性质进行分析。运用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 进行多序列比对分析。在 MEGA X 软件中选择邻接法构建系统发育树。

### 1.5 诱导表达以及蛋白纯化

通过热激法将重组表达质粒 pET28a-*Bgl59* 转化至感受态 *Escherichia coli* BL21(DE3), 在添加了卡那霉素的平板上涂布培养, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后挑选单克隆于添加卡那霉素的 LB 液体培养基中进行放大培养(37  $^{\circ}$ C, 220 r/min), 当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.3 mmol/L), 16  $^{\circ}$ C 下诱导表达 14–16 h。诱导完成后将菌液 4  $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 25 min, 去上清, 沉淀的菌体用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液重悬, 倒入高压匀质机中将菌体破碎, 经 4  $^{\circ}$ C、1 350 r/min 离心 20 min 后, 获得的上清液为粗酶液。

采用 50 mL Ni-NTA 柱对粗酶进行纯化, 用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制不同浓度(20、40、60、300 mmol/L)的咪唑洗脱液, 依次将杂蛋白从 Ni-NTA 柱中洗脱下来, 在咪唑浓度为 300 mmol/L 时洗脱目的蛋白, 蛋白分子大小、纯度以及表达情况采用 SDS-PAGE 进行检测。

## 1.6 酶活测定

取 170  $\mu\text{L}$  柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0)于 1.5 mL EP 管内, 在 55  $^{\circ}\text{C}$ 下温育 5 min, 依次加入 20  $\mu\text{L}$  浓度为 10 mmol/L 的 4-硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG), 10  $\mu\text{L}$  稀释适当倍数的酶液, 55  $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。反应结束后立刻加入 50  $\mu\text{L}$  浓度为 0.5 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。在 96 孔板中加入 200  $\mu\text{L}$  的反应混合液, 放入酶标仪, 测定该溶液在波长 405 nm 下的吸光值, 根据吸光值在标准曲线中的位置算出酶活力。每组试验设置 3 个平行。

酶活力单位(U)的定义: 在最适条件下, 1 min 内水解 pNPG 释放出 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚(p-nitrophenol pNP)的所需酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

来源于 *D. psychrophila* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl59 属于糖苷水解酶 GH1 家族(WP\_046170703.1), 含有 437 个氨基酸残基, 理论等电点 pI 为 5.41, 理论分子量为 48.8 kDa。信号肽预测结果表明该酶中无信号肽。使用 NCBI Conserved Domains 对 Bgl59 的结构域进行分析, 如图 1

所示, 该基因序列编码的蛋白质包含 GH1 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶都含有的 Bgl B 保守结构域(氨基酸残基 6–430)。

在 NCBI 数据库中对 Bgl59 进行了 Protein BLAST, 发现 Bgl59 与来源于 *Devosia* 属微生物所产的另 3 条 GH1 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似性较高, 结果如图 2 所示。Bgl59 与 *Devosia* sp. Root635 (WP\_056234560.1)来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似度最高, 为 91.99%; 与 *Devosia* sp. Root6351 (WP\_291364866.1)来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似度为 91.76%; 与 *Devosia* sp. Root436 (WP\_056259356.1)来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相似性为 91.08%。Bgl59 与所对比的序列都具有 NEP 和 TENG 这 2 个高度保守元件, 属于 GH1 家族特有元件, 表明 Bgl59 属于 GH1 家族并推测 Glu168 和 Glu351 为该酶的催化活性位点。

### 2.2 系统发育树的构建

选取了同源性较高的 9 个 GH1 家族的  $\beta$ -葡萄糖苷酶序列, 利用 NCBI 数据库对 Bgl59 进行了 BLAST 同源性比对, 通过 MEGA X 软件构建系统发育树, 结果如图 3 所示。图 3 中可以清晰地看到各  $\beta$ -葡萄糖苷酶之间的同源性, 其中 Bgl59 与 WP\_056234560.1 (*Devosia* sp. Root635) 亲缘关系最近, 序列相似性高达 91.99%。

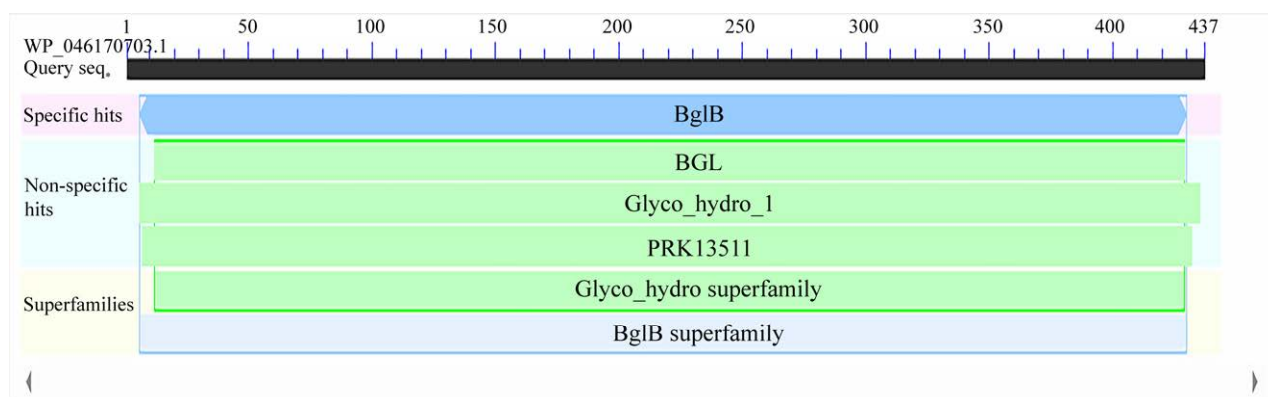


图 1 Bgl59 结构域预测

Figure 1 Structural regions prediction of Bgl59.

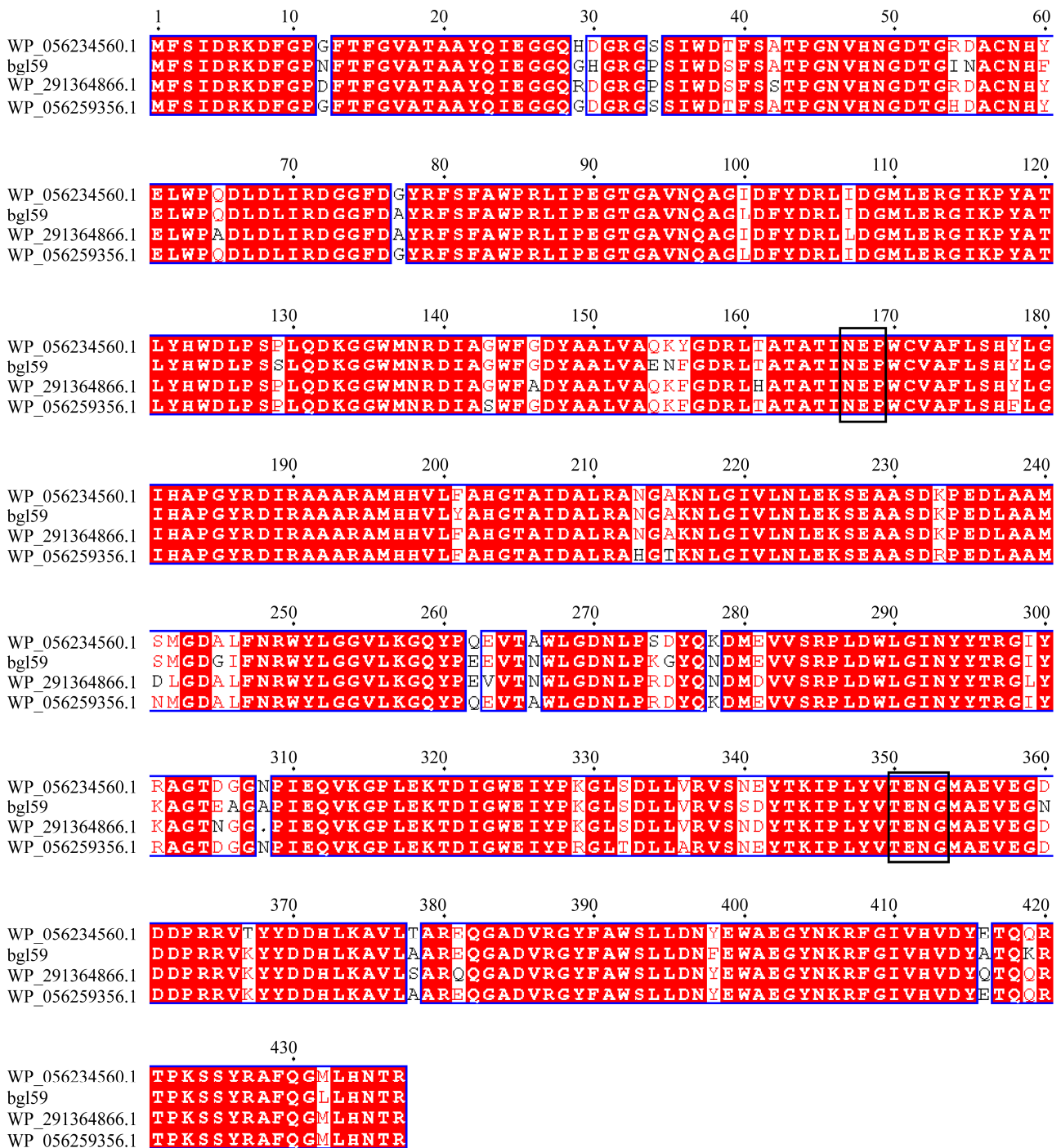


图 2 Bgl59 与 GH1 家族其他成员氨基酸序列比对 框格表示保守氨基酸; 红色部分为序列间相同氨基酸; 黑色框为高度保守元件

Figure 2 Amino acid sequences alignment of Bgl59 with other GH1 family members. Boxes represent conserved amino acids; Red parts are amino acids with the same sequences; Black boxes are highly conserved elements.

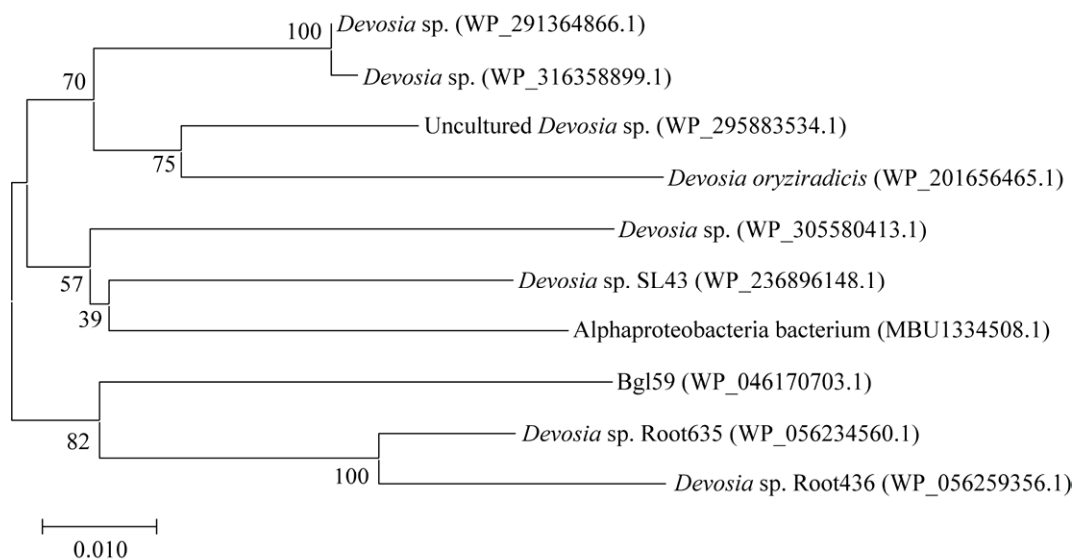
## 2.3 蛋白的重组表达与纯化

将质粒 pET28a-Bgl159 转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行诱导表达, 通过 Ni-NTA 亲和层析对蛋白进行纯化, 并测定了相应的蛋白浓度(Bradford 法)以及酶活(*p*NPG 法)。得到的纯化情况见表 1, 该重组蛋白的纯化倍数为 13.1, 比活力达到 128.8 U/mg。通过 SDS-PAGE 对重组蛋白 Bgl159 的纯化结果进行分析。由图 4 可知, 纯化后的蛋白在 48.8 kDa 左右的位置有一条明显的条带, 这与其理论分子量是一致的。

## 2.4 酶学性质

### 2.4.1 Bgl159 最适反应温度

用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液将纯化后的酶稀释适当倍数, 以 *p*NPG 为反应底物, 在 10–80 °C 范围内测定该酶的最适反应温度, 测定得到的温度与酶活的关系如图 5 所示。当温度为 10–55 °C 时, 酶活性随温度的升高而增大, 55 °C 时达到最大活性; 55 °C 后酶活性随温度升高不断降低。65 °C 之后酶活降低至 50% 以下, 由此可知, 该酶的最适反应温度为 55 °C, 能够在较大的温度范围内发挥作用。



**图 3** 基于 16S rRNA 基因序列构建的 Bgl159 系统发育树 括号内的数字为 GenBank 和 NCBI 登录号 (序列 MBU1334508.1 来自 GenBank, 其余序列来自 NCBI); 分支线附近的数字表示测试中分支的可靠性百分比; 比例尺表示每个分支的 0.010 个替换核苷酸位置

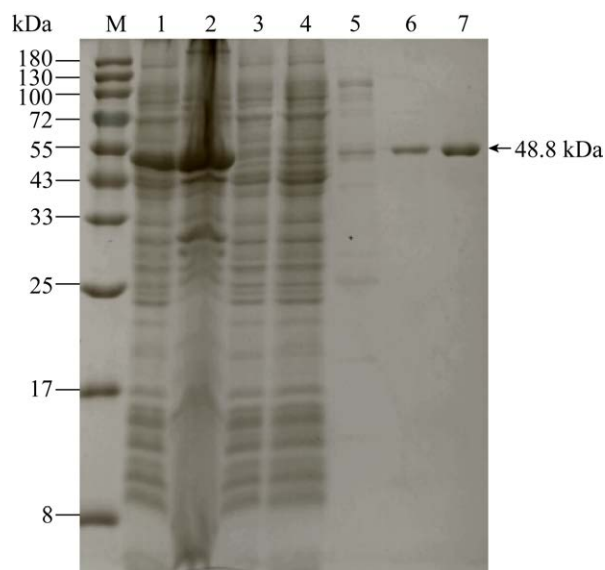
Figure 3 The phylogenetic tree of Bgl159 constructed based on the 16S rRNA gene sequence. The number in brackets are GenBank and NCBI accession number (sequence MBU1334508.1 from GenBank, the rest from NCBI); The number near the branch line indicates the percentage of reliability of the branch in the test; The scale represents 0.010 replacement nucleotide positions for each branch.

**表 1 Bgl159 纯化步骤**

Table 1 Bgl159 purification steps

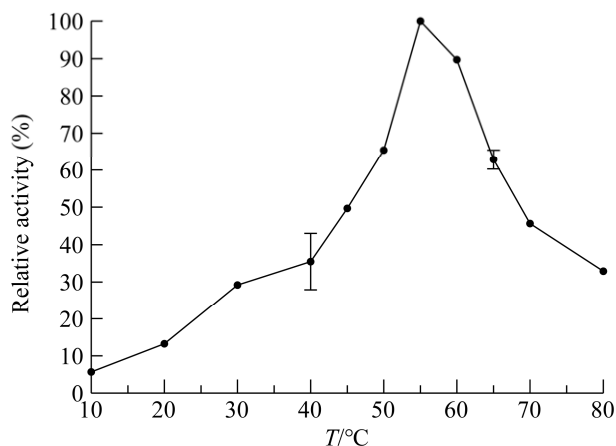
Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
Crude enzyme	48.9	479.2	9.8	1.0	100.0
Ni-column	0.9	115.9	128.8	13.1	24.2





**图4 Bgl59的 SDS-PAGE 分析** M: 蛋白 marker; 1: 细胞裂解液沉淀; 2: 细胞裂解液上清; 3:  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析流穿; 4: 20 mmol/L 咪唑洗脱; 5: 40 mmol/L 咪唑洗脱; 6: 60 mmol/L 咪唑洗脱; 7: 300 mmol/L 咪唑洗脱(Bgl59)纯蛋白

Figure 4 SDS-PAGE analysis of Bgl59. M: Protein marker; 1: Cell lysate precipitation; 2: Supernatant of cell lysate; 3:  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography flow through; 4: 20 mmol/L imidazole elution; 5: 40 mmol/L imidazole elution; 6: 60 mmol/L imidazole elution; 7: 300 mmol/L imidazole elution (Bgl59) pure protein.



**图5 Bgl59 最适反应温度**

Figure 5 Bgl59 optimum reaction temperature.

#### 2.4.2 Bgl59 最适反应 pH

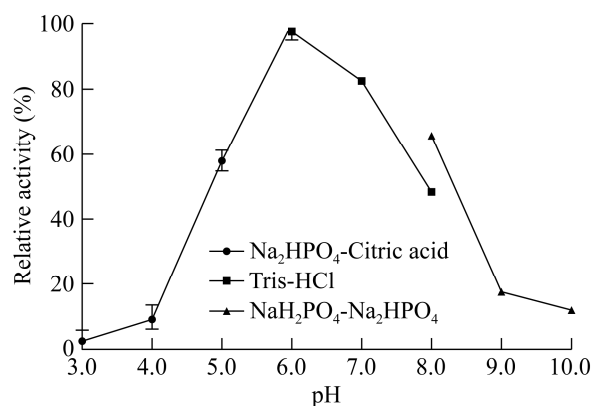
在最适温度条件下, 分别测定该酶在  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Citric acid 缓冲液(pH 3.0–6.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0–8.0)和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 8.0–10.0)中的相对酶活, 测定得到的 pH 与酶活关系如图 6 所示, 在 pH 5.0–8.0 范围内, 该酶可以发挥 50%以上的酶活, pH 为 6.0 时, 酶活力最高, 当 pH 为 4.0 或者 pH 高于 9.0 时酶活力较低, 当 pH 为 3.0 时基本无酶活。由此可知, 该酶的最适反应 pH 为 6.0, 并且能在较宽的酸碱范围内发生作用。

#### 2.4.3 Bgl59 热稳定性

将酶置于不同温度下(30、35、40、45、50 °C)处理不同时间(5、10、15、30、45、60 min), 在最适反应条件下(55 °C, pH 6.0)测定各处理组的酶活, 以初始酶活为 100%, 计算相对酶活, 得到该酶的热稳定性结果如图 7 所示。Bgl59 在 30–45 °C 时表现出较好的稳定性, 酶活能够保持在 60%以上, 当在 50 °C 中作用超 40 min 后, 该酶的酶活将全部丧失。

#### 2.4.4 Bgl59 pH 稳定性

用不同的 pH 缓冲液(pH 5.0–8.5)稀释酶液, 在 37 °C 水浴锅中孵育 1 h, 在最适条件下(55 °C, pH 6.0)测定各处理样品的残余酶活, 得



**图6 Bgl59 最适反应 pH**

Figure 6 Optimum reaction pH of Bgl59.

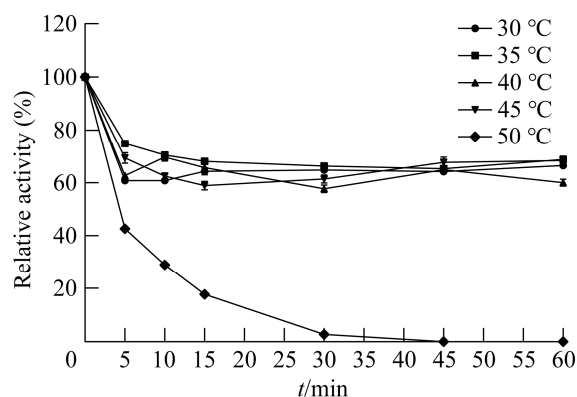


图 7 Bgl159 热稳定性

Figure 7 Thermal stability of Bgl159.

到的结果如图 8 所示。在 pH 5.0–8.5 范围内该酶仍可以保持 80%以上的酶活，对于酸碱环境具有一定的适应能力。

#### 2.4.5 底物特异性和酶促反应动力学分析

在最适反应条件下，分别以 *p*NPG、2-硝基苯基-β-D-葡萄糖苷(2-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *o*NPG)、4-硝基苯基-β-D-半乳糖苷(4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, *p*NPGal)、2-硝基苯基-β-D-半乳糖苷(2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, *o*NPGal)、4-硝基苯基-α-D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside, *p*NP(α)G)、4-硝基苯基-α-D-半乳糖苷(4-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside, *p*NP(α)Gal)、4-硝基苯基-β-D-木糖苷(4-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*NPX)、4-硝基苯基-β-D-纤维二糖苷(4-nitrophenyl-β-D-cellobioside, *p*NPC)、1%的纤维二糖以及乳糖为底物，测定酶对各底物的水解能力，结果如表 2 所示。在 8 种供试底物中，当以 *p*NPG 作为底物时，酶活最高，此时比酶活达 137.07 U/mg。该酶对 β 型糖苷键底物具有水解专一性，而对 α 型糖苷键并无水解活性；对不同糖类的糖苷类化合物来说，该酶对葡萄糖苷类底物有最高的水解活力，对半乳糖苷类底物的水解活力次之，而对木糖苷类并无水解活性；对天然底物纤维二糖和乳糖具有一定的水解能力，分

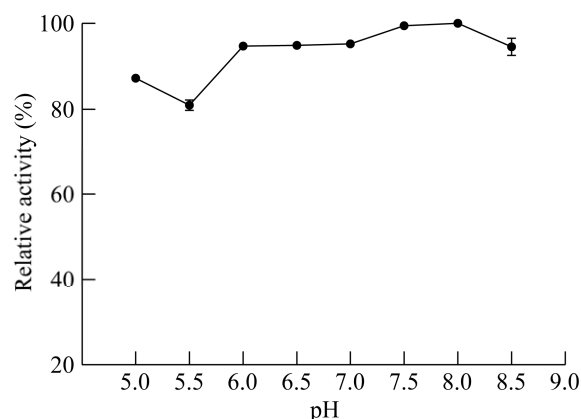


图 8 Bgl159 pH 稳定性

Figure 8 pH stability of Bgl159.

表 2 Bgl159 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of Bgl159

Substrate	Relative activity (%)
<i>p</i> NPG	100.00±1.70
<i>o</i> NPG	32.20±0.50
<i>p</i> NPGal	10.10±0.30
<i>o</i> NPGal	4.50±1.00
<i>p</i> NP(α)G	ND
<i>p</i> NP(α)Gal	ND
<i>p</i> NPX	ND
<i>p</i> NPC	ND
Cellobiose	28.31±2.70
Lactose	10.00±0.64

ND: Not detected.

别为 *p*NPG 活力的 28.31%和 10.00%。用最适反应 pH 缓冲液配制不同浓度的 *p*NPG 溶液 (0.625–20 mmol/L)，在最适酶促反应条件下，测定不同底物浓度下的酶活力，于 GraphPad 软件中非线性拟合 Michaelis-Menten 方程，得出该酶的  $K_m$  值为 3.090 mmol/L， $V_{max}$  为 194 U/mg，通过进一步计算可知  $k_{cat}$  为  $159 \text{ s}^{-1}$ ，催化效率  $k_{cat}/K_m$  为  $51.46 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 2.4.6 不同金属离子、化学试剂对 Bgl159 酶活力的影响

以 10 mmol/L 的 *p*NPG 为底物，在反应体系中加入不同的金属离子(终浓度为 1 mmol/L)和不



同的化学试剂(终浓度为 0.1%), 在最适反应条件下进行酶促反应, 测得金属离子或化学试剂对 Bgl59 酶活影响如图 9 所示。终浓度为 1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  会对该酶产生一定的激活作用, 其中  $\text{Ca}^{2+}$  对酶的激活作用最强, 能够提升约 30% 的酶活。终浓度为 1 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ , 以及终浓度为 0.1% 的 EDTA、DTT、Tween 80 会产生一定的抑制作用, 表面活性剂 SDS 则会使酶直接失活。

#### 2.4.7 不同单糖及蔗糖对酶活力的影响

在最适酶促反应条件下, 以 *p*NPG 为底物, 以未添加糖类的试验组为对照, 测定不同单糖和蔗糖(终浓度为 0.1 mol/L)对酶活力的影响, 得到的结果如图 10 所示。除了果糖、蔗糖以及甘露糖对 Bgl59 有一定的抑制作用以外, 其他单糖均能在一定程度上提高 Bgl59 的酶活, 特别是木糖和葡萄糖, 对酶有着最显著的促进作用, 可以分别使酶活提升 91% 和 60%。

#### 2.4.8 高浓度葡萄糖和木糖对酶活力的影响

在酶活测定体系中加入不同浓度(0–2.00 mol/L)的木糖或葡萄糖, 以 *p*NPG 为底物, 在最适条

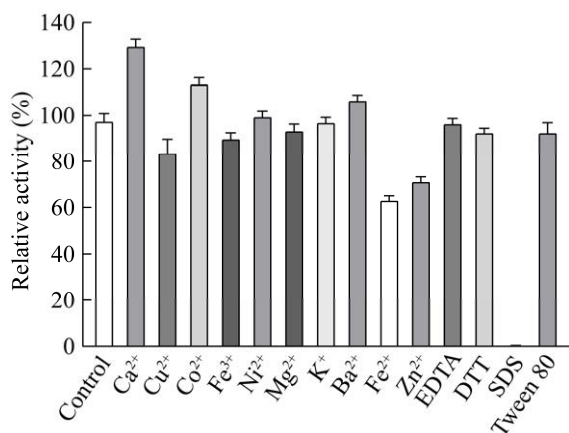


图 9 金属离子与化学试剂对重组蛋白 Bgl59 酶活力的影响

Figure 9 Effect of metal ions and chemical reagents on the enzymatic activity of recombinant protein Bgl59.

件下进行反应, 测定各处理下的相对酶活, 结果如图 11 所示。一定浓度的葡萄糖或木糖均能使 Bgl59 的酶活得以提高, 尤其是在 0.10 mol/L 葡萄糖或者是 0.30 mol/L 木糖浓度的条件下, Bgl59 受到的激活效果最好, 可以分别使酶活提高 74% 或 91%, 而后随着浓度的持续升高, 激活效果逐渐减弱, 在葡萄糖浓度为 0.75 mol/L 或木糖浓度为 1.50 mol/L 时, 抑制作用开始出现。在 2.00 mol/L 木糖浓度或 1.25 mol/L 葡萄糖浓度的反应体系中, Bgl59 的酶活仍在 50% 以上,

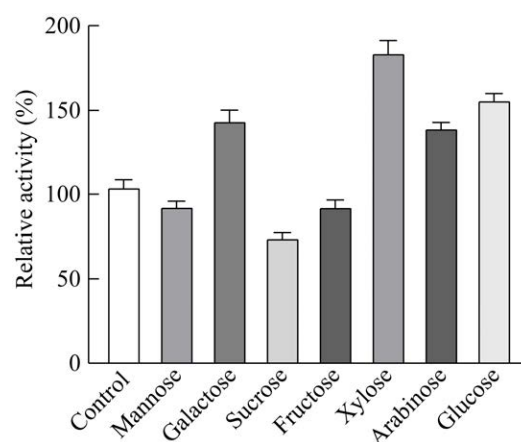


图 10 不同糖类对 Bgl59 酶活力的影响

Figure 10 Effect of different saccharides on Bgl59 enzyme activity.

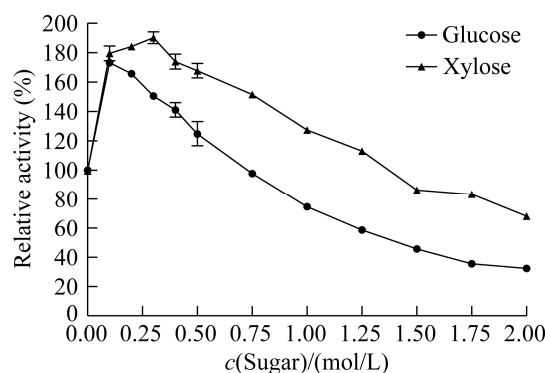


图 11 不同浓度葡萄糖和木糖对 Bgl59 酶活力的影响

Figure 11 Effect of different concentrations of glucose and xylose on Bgl59 enzyme activity.

说明 Bgl59 对葡萄糖和木糖有较好的耐受性，一般的生理条件下不会出现产物反馈抑制现象。

### 3 讨论与结论

本研究运用现代生物技术，对 *Devosia psychrophila* 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶(Bgl59)进行重组表达并测定酶学性质。对 Bgl59 进行多重序列比对发现，Bgl59 与另外 3 条嗜冷菌产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶同样具有 GH1 家族特有的保守序列以及保守的氨基酸位点，由此可知，Bgl59 也属于 GH1 家族的一员。构建了 Bgl59 系统发育树并将其与同源性较高的一些序列比对发现，Bgl59 与 WP\_056234560.1 (*Devosia* sp. Root635) 亲缘关系最近，相似度高达 91.99%。

$\beta$ -葡萄糖苷酶在自然界中广泛存在，在各个领域都具有重要的应用价值。一般来说，不同来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶因其生理环境不同，往往其酶学性质也存在显著差异<sup>[15]</sup>，如表 3 所示。虽然 Bgl59 来源于嗜冷细菌，但其最适反应温度为 55 °C，最适反应 pH 为 6.0，其性质与一些来源于嗜中温细菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有一定的相似性。如来源于 *Thermomonospora amylolytica* 的嗜碱  $\beta$ -葡萄糖苷酶 tabg12a，其最适反应条件

为 45 °C 和 pH 8.0<sup>[16]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶 BGL3-GXT6 来源于链霉菌 GXT6，40 °C 为其最适反应温度<sup>[17]</sup>。Bgl52 是一种来源于嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)的  $\beta$ -葡萄糖苷酶，其最适反应温度比 Bgl59 要高，为 70 °C<sup>[18]</sup>。在目前所报道的各个  $\beta$ -葡萄糖苷酶的相关研究中，大多数的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 是酸性或者中性，而 Bgl59 的最适 pH 是 6.0，这一特性与大多数的  $\beta$ -葡萄糖苷酶一样，它们在偏酸性的环境中具有较高活性。

通过酶学性质表征，可以看出重组蛋白 Bgl59 的温度效应比一些来源于其他微生物的  $\beta$ -葡萄糖苷酶来说具有一定的优势。r-BglNH 是源于海洋链霉菌的一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶，在 45 °C 的条件下作用 1 h 后仅剩 40% 的酶活<sup>[19]</sup>；在 45 °C 条件下作用 0.5 h 后，源于土壤宏基因组文库的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bgl1269 仅剩 20% 的酶活<sup>[20]</sup>。Bgl59 与上述 2 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶相比具有较好的热稳定性，在 30–45 °C 的温度范围内孵育 1 h 还能保持 60% 以上的酶活，在 pH 5.0–8.0 的环境中，将 Bgl59 置于 37 °C 恒温处理 1 h 后，该酶能够保持 40% 以上的酶活，可以看出，无论在酸性还是碱性环境中 Bgl59 都能够保持一定的稳定性。

表 3 不同来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质对比

Table 3 Comparison of enzymatic properties of  $\beta$ -glucosidase from different sources

Organisms	Enzyme	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	$K_m$ (mmol/L)	Activity (U/mg)	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}\cdot mmol^{-1}$ )	References
<i>Devosia psychrophila</i>	Bgl59	48.77	55	6.0	3.090	137.07	51.46	Present study
<i>Thermomonospora amylolytica</i>	tabg12a	78.39	45	8.0	ND	ND	ND	[16]
<i>Streptomyces</i> sp.	BGL3-GXT6	83.00	40	6.0	0.471	ND	ND	[17]
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Bgl52	52.00	70	6.5	9.300	223.70	ND	[18]
<i>Streptomyces</i> sp.	r-BglNH	51.00	45	6.0	10.900	24.10	ND	[19]
a metagenomic library of mangrove soil	Bgl1269	66.00	40	6.0	0.228	ND	ND	[20]
<i>Scytalidium thermophilum</i>	/	40.00	60	6.5	0.290	8.90	45.76	[21]
Soil metagenomic library	bgl2238	80.67	44	6.1	0.296	29.10	ND	[22]

ND: Not detected; /: None.

Bgl59 对天然或者人工合成的底物具有广泛的水解能力, 对  $\beta$ -1,4 糖苷键具有水解偏好性。当底物为 *p*NPG 时, 比活力为 137.07 U/mg。来源于嗜热镰刀菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 当其以 *p*NPG 为底物时, 比酶活仅为 8.9 U/mg<sup>[21]</sup>; 来源于宏基因组文库的 bgl2238, 其最大比酶活为 29.1 U/mg<sup>[22]</sup>。金属离子和化学试剂的存在均会对 Bgl59 的活性产生一定的影响, 其中 1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  以及  $\text{Co}^{2+}$  对 Bgl59 活性具有促进作用, 而 1 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  会较为明显地抑制 Bgl59 的活性。对 Bgl59 酶活抑制作用最明显的是 0.1% 的 SDS, 在此浓度下它能够使酶完全失活。Bgl59 在其余金属离子或化学试剂存在时均能保持 70% 以上的酶活。由此可见, 无论是金属离子还是化学试剂, Bgl59 都具有较好的耐受性, 这一特性也有利于其在工业上的广泛应用。

研究表明在通过木质纤维素生物质生产乙醇的过程中, 纤维素的糖化是至关重要的环节<sup>[18]</sup>。然而在纤维素的水解过程中, 其产物葡萄糖会对大多数的  $\beta$ -葡萄糖苷酶产生反馈抑制作用<sup>[23-24]</sup>。因此, 在工业生产中, 那些通过简易表达系统就能获得, 能够进行高效率催化, 并且属于葡萄糖激活型的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 有着更高的应用价值, 可以使生产成本进一步降低<sup>[10]</sup>。Bgl59 正是符合这一要求的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 能够同时被木糖以及葡萄糖所激活, 当葡萄糖浓度为 0.10 mol/L 时激活作用最大, 可将酶活提高 74%; 在木糖浓度为 0.30 mol/L 时有最好的激活效果, 可将酶活提高 91%。Bgl59 能够表现出较好的木糖或葡萄糖耐受性, 在 2.00 mol/L 木糖浓度或 1.25 mol/L 葡萄糖浓度的反应体系中还能保持 50% 以上的酶活。综上所述, 本研究为挖掘新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其功能应用奠定了基础, 并为该酶在未来工业上的应用提供了一定的理论支持。

## 参考文献

- [1] KETUDAT CAIRNS JR, ESEN A.  $\beta$ -glucosidases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(20): 3389-3405.
- [2] ZHANG RQ, CAO CH, BI JH, LI YJ. Fungal cellulases: protein engineering and post-translational modifications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(1): 1-24.
- [3] WANG KX, HUANG QX, LI HX, ZHAO XH. Co-evolution of  $\beta$ -glucosidase activity and product tolerance for increasing cellulosic ethanol yield[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(11): 2239-2250.
- [4] AMER A, FAIZ UH N, KASHFA B, AASIA B. Microbial  $\beta$ -glucosidase: sources, production and applications[J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2017, 5(1): 31-46.
- [5] LIEW KJ, LIM L, WOO HY, CHAN KG, SHAMSIR MS, GOH KM. Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 1094-1102.
- [6] LI Y, GAO N, ZHANG XY, ZHAO GQ, SONG X. Sophorolipid production using lignocellulosic biomass by co-culture of several recombinant strains of *Starmerella bombicola* with different heterologous cellulase genes from *Penicillium oxalicum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(2): 377-388.
- [7] YANG G, YANG DQ, WANG XD, CAO WT. A novel thermostable cellulase-producing *Bacillus licheniformis* A5 acts synergistically with *Bacillus subtilis* B2 to improve degradation of Chinese distillers' grains[J]. Bioresource Technology, 2021, 325: 124729.
- [8] GOMES DG, SERNA-LOAIZA S, CARDONA CA, GAMA M, DOMINGUES L. Insights into the economic viability of cellulases recycling on bioethanol production from recycled paper sludge[J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 347-355.
- [9] FUSCO FA, FIORENTINO G, PEDONE E, CONTURSI P, BARTOLUCCI S, LIMAURO D. Biochemical characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 783-791.
- [10] MALLEK-FAKHFAKH H, BELGHITH H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of

- cello-oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 2016, 419: 41-50.
- [11] HAMID B, BASHIR Z, YATOO AM, MOHIDDIN F, MAJEED N, BANSAL M, POCZAI P, ALMALKI WH, SAYYED RZ, SHATI AA, ALFAIFI MY. Cold-active enzymes and their potential industrial applications-a review[J]. *Molecules*, 2022, 27(18): 5885.
- [12] YADAV AN, SACHAN SG, VERMA P, KAUSHIK R, SAXENA AK. Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic *Bacilli* isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(3): 294-307.
- [13] TANAKA T, SAWANO M, OGASAHARA K, SAKAGUCHI Y, BAGAUTDINOV B, KATOH E, KUROISHI C, SHINKAI A, YOKOYAMA S, YUTANI K. Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150 degrees C[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(17): 4224-4230.
- [14] ZHANG DC, REDZIC M, LIU HC, ZHOU YG, SCHINNER F, MARGESIN R. *Devosia psychrophila* sp. nov. and *Devosia glacialis* sp. nov., from alpine glacier cryoconite, and an emended description of the genus *Devosia*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 3): 710-715.
- [15] 何金见, 沈风飞, 刘鑫涵, 杨天均, 李宝通, 石鹏君, 刘慧芹, 曾婉宁. 嗜酸古菌 *Cuniculiplasma divulgatum* 来源的 GH1 家族中温  $\beta$ -葡萄糖苷酶 CdBglA 的原核表达及酶学性质分析[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(11): 4694-4707.
- HE JJ, SHEN FF, LIU XH, YANG TJ, LI BT, SHI PJ, LIU HQ, ZENG WN. Expression and characterization of mesophilic GH1  $\beta$ -glucosidase CdBglA from acidophilic *Cuniculiplasma divulgatum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(11): 4694-4707 (in Chinese).
- [16] 黄裕颖, 李馨伟, 李蕾, 朱倩, 饶孟迪, 尹以瑞. *Thermomonospora amylolytica* 来源嗜碱  $\beta$ -葡萄糖苷酶的克隆、异源表达及其酶学性质研究[J]. *中国饲料*, 2023(17): 56-61.
- HUANG YY, LI XW, LI L, ZHU Q, RAO MD, YIN YR. Cloning, heterologous expression and characterization of a basophilic  $\beta$ -glucosidase from *Thermomonospora amylolytica*[J]. *China Feed*, 2023(17): 56-61 (in Chinese).
- [17] 郑芳芳, 王金佩, 林宇, 王子龙, 韦宇拓, 黄日波, 杜丽琴. 链霉菌 GXT6  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质及葡萄糖耐受性分子改造[J]. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1839-1852.
- ZHENG FF, WANG JP, LIN Y, WANG ZL, WEI U, HUANG RB, DU LQ. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. GXT6 and its molecular modification of glucose tolerance[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1839-1852 (in Chinese).
- [18] 刘洋, 彭惠, 张余, 董艺凝, 孙星, 罗侠, 蔡华, 赵维萍. 嗜热淀粉芽孢杆菌来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶的重组表达与酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2050-2059.
- LIU Y, PENG H, ZHANG C, DONG YN, SUN X, LUO X, CAI H, ZHAO WP. Recombinant expression and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus thermoamylovorans*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2050-2059 (in Chinese).
- [19] MAI ZM, YANG J, TIAN XP, LI J, ZHANG S. Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase from a marine *Streptomyces*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(5): 1512-1522.
- [20] LI G, JIANG Y, FAN XJ, LIU YH. Molecular cloning and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 15-22.
- [21] ZANOELO FF, POLIZELI MD, TERENCE HF, JORGE JA. Beta-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240(2): 137-143.
- [22] 唐乐丽, 王晓萌, 吴秀玲, 黄庆, 李荷. 宏基因组文库新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶的筛选、克隆及酶学性质分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 118-124.
- TANG LL, WANG XM, WU XL, HUANG Q, LI H. Screening, cloning and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from soil metagenomic library[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 118-124 (in Chinese).
- [23] KARNCHANATAT A, PETSOM A, SANGVANICH P, PIAPHUKIEW J, WHALLEY AJS, REYNOLDS CD, SIHANONTH P. Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 270(1): 162-170.
- [24] MAMMA D, HATZINIKOLAOU DG, CHRISTAKOPOULOS P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular  $\beta$ -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 27(4/5/6): 183-190.