

## 研究报告

# 新型海洋微生物 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质

房伟<sup>1</sup>, 方泽民<sup>1</sup>, 刘娟娟<sup>1</sup>, 洪宇植<sup>1</sup>, 彭惠<sup>1</sup>, 张学成<sup>1</sup>, 孙宝林<sup>2</sup>, 肖亚中<sup>1</sup>

1 安徽大学生命科学学院 生物工程研究中心, 合肥 230039

2 中国科技大学生命科学学院, 合肥 230026

**摘要:** 通过功能筛选方法, 从中国南海海洋表层海水微生物元基因组文库筛选得到了 6 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆。对其中的一个阳性克隆 pSB47B2 进一步亚克隆和序列分析, 获得一新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(命名为 *bgl1B*) 开放阅读框。以 pET22b(+) 为载体、*Escherichia coli* BL21(DE3) 为宿主菌, *bgl1B* 被高效活性重组表达。通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化了重组 Bgl1B (rBgl1B)。纯化的 rBgl1B 催化 pNPG 水解反应的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 40°C。在最适反应条件下, rBgl1B 水解 pNPG 的活性达到 39.7 U/mg,  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 0.288 mmol/L、36.9  $\mu$ mol/min。纤维二糖是 rBgl1B 的有效作用底物, 其  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 0.173 mmol/L、35  $\mu$ mol/min。但 rBgl1B 不能催化转化蔗糖、乳糖、麦芽糖以及 CMC。rBgl1B 催化 pNPG 的水解反应对高浓度的  $Na^+$  有较好的耐受性, 而低浓度的  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  对该酶活有一定促进作用。不同于许多来源于真菌的酸性  $\beta$ -葡萄糖苷酶, rBgl1B 在 pH 7.0~9.0 范围内具有比较高的酶活力并具有较好的稳定性。

**关键词:** 海洋微生物, 元基因组,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 葡萄糖苷水解酶 I

## Cloning and characterization of a $\beta$ -glucosidase from marine metagenome

Wei Fang<sup>1</sup>, Zemin Fang<sup>1</sup>, Juanjuan Liu<sup>1</sup>, Yuzhi Hong<sup>1</sup>, Hui Peng<sup>1</sup>, Xuecheng Zhang<sup>1</sup>, Baolin Sun<sup>2</sup>, and Yazhong Xiao<sup>1</sup>

1 Biotechnology Center, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

2 School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

**Abstract:** In the present study, through a functional strategy, a metagenome library of the marine microbes from the surface water of the South China Sea was screened for  $\beta$ -glucosidase and six positive clones were obtained. One of these clones, pSB47B2, was subcloned and further analysed in sequence. The result showed that there was an open reading frame for a novel  $\beta$ -glucosidase, which was nominated as *bgl1B*. Using pET22b(+) as vector and *Escherichia coli* BL21(DE3) as host, Bgl1B was overexpressed recombinantly with high yield obtained and substantial enzymatic activity detected. The recombinant protein (rBgl1B) was purified by Ni-NTA affinity chromatography and further biochemically characterized. The results indicated that, with pNPG as substrate, the optimum pH and temperature for the hydrolytic activity of rBgl1B were about 6.5 and 40°C respectively. Under the optimum

**Received:** October 10, 2009; **Accepted:** November 9, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA09Z421), Science and Technology Foundation of Distinguished Young Scholars of Anhui Province (No. 08040106908).

**Corresponding author:** Yazhong Xiao. +86-551-5108509; E-mail: xiaoyz@yahoo.cn

Baolin Sun. +86-551-3606748; E-mail: sunb@ustc.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA09Z421), 安徽省优秀青年科技基金(No. 08040106908)资助。

conditions, rBgl1B hydrolyzed pNPG with an activity up to 39.7 U/mg,  $K_m$  and  $V_{max}$  being 0.288 mmol/L and 36.9  $\mu$ mol/min respectively. In addition, rBgl1B could also hydrolyze cellobiose, with a  $K_m$  of 0.173 mmol/L and a  $V_{max}$  of 35  $\mu$ mol/min. However, we did not detect evident hydrolytic activity of rBgl1B to lactose, maltose, sucrose, and CMC. The enzymatic activity of rBgl1B to pNPG was stimulated to certain degrees by low concentration of  $Ca^{2+}$  or  $Mn^{2+}$ , whereas it exhibited significant tolerance against high  $Na^+$ . Distinguished from most of the  $\beta$ -glucosidases derived from fungi, which display the highest activities under acidic conditions, rBgl1B exhibited relatively higher activity and stability at pH between 7.0 and 9.0.

**Keywords:** marine microbe, metagenome,  $\beta$ -glucosidase, glycoside hydrolases I

$\beta$ -葡萄糖苷酶 (Bgl, EC 3.2.1.21) 属于纤维水解酶类, 是一类催化水解或转移  $\beta$ -1,4-糖苷键的酶。它的主要催化特征是在短链的寡糖和纤维二糖内部、芳香基团或烷基碳水化合物基团之间打断  $\beta$ -1,4-糖苷键。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在许多工业过程中有潜在的应用价值, 包括: 对生物质的降解<sup>[1]</sup>; 利用纤维秸秆类生产燃料乙醇<sup>[2]</sup>; 作为一种重要的风味酶, 它能作用于茶叶、葡萄酒以及果汁中的风味前体物, 释放出风味成分, 起到增香作用<sup>[3]</sup>; 以及合成重要的糖配体<sup>[4]</sup>等。

目前, 已发现的  $\beta$ -葡萄糖苷酶大部分来自可培养微生物。然而, 自然界中, 超过 99% 的微生物不能进行纯培养, 严重限制了微生物资源的开发和利用。元基因组技术通过直接获取典型环境微生物全基因组, 转入可培养微生物中表达, 为寻找新型生物活性物质提供了新途径<sup>[5]</sup>。海洋微生物具有种群多样性、生理生化类群多样性、生态功能多样性、遗传特征多样性等特点, 其中蕴藏有不同于其他环境微生物来源的遗传资源, 成为微生物研究的热点领域<sup>[6]</sup>。本实验室通过功能筛选方法, 从中国南海海洋表层海水微生物元基因组文库筛选并获得了 6 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆。本研究报道对其中一新型海洋微生物  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因克隆、表达以及重组酶学性质研究的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RNase A、pNPG (p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) 购自 Sigma 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T Vector、*Ex Taq* 购自 TaKaRa 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒为 Axygen 产品; 七叶苷、柠檬酸铁铵购自 BBI 公司; pUC19 DNA/*Bam*H I 为

MBI 公司产品, 其余均为国产或进口分析纯。菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  及 *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 中国南海表层海水微生物元基因组文库构建

采集南海海洋表层海水, 分离微生物细胞, 通过低熔点琼脂糖包埋裂解制备基因组 DNA, 获得的 DNA 利用 *Hind* III 进行部分酶切, 回收 50~150 kb 的 DNA 片段, 并与 BAC 载体连接, 构建海洋微生物元基因组文库<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆的筛选

参照 Feng 等<sup>[8]</sup>的方法。将构建好的文库复制到含有 0.1% 七叶苷和 0.2% 柠檬酸铁铵的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 20 h, 菌落周围显黑色的初步确定为阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒, 转化至 *E. coli* EPI300, 重新涂布功能筛选平板, 菌落周围显黑色的确定为  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因阳性克隆。

#### 1.2.3 亚克隆及序列分析

阳性克隆质粒通过 *Sau*3A I 部分酶切, 回收 2~5 kb 片段, 并与 pUC19 DNA/*Bam*H I 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。将转化菌涂布筛选平板, 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h, 筛选  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因阳性克隆。得到的阳性克隆序列测定后利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找开放阅读框, 利用 NCBI 的 Blast 服务器以及 CAZy (<http://www.cazy.org/>) 进行相似序列搜索。所得相关序列使用 ClustalW 1.81 以及 GENEDOC 进行比对分析。

#### 1.2.4 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因表达载体的构建

为了从 BAC 文库阳性克隆扩增  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*bgl1B*), 根据已获得的基因测序结果设计特异性引物 Bgl1B F 以及 Bgl1B R, 并在引物两端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。引物序列分别为: Bgl1B F: 5'-GGGCATATGACAAAATTAACCTTACCT-3' (下划线

处标记 *Nde* I 酶切位点); *Bgl*1B R: 5'-TTTCTCGAGTTCGTGGTAACAAGTG-3'(下划线处标记 *Xho* I 酶切位点)。PCR 产物经纯化酶切后, 与经过同样酶切处理的 pET22b(+)载体连接, 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 筛选阳性克隆并测序验证序列的正确性。

### 1.2.5 重组表达条件的优化

以每升发酵菌合成目标蛋白量为指标, 以培养温度、起始菌密度、诱导剂 IPTG 终浓度以及诱导时间为变量, 即温度为 30°C、37°C, 起始菌密度( $OD_{600}$ )为 0.4、0.6、0.8, IPTG 终浓度为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mmol/L, 诱导时间为 4、5、6、7、8 h, 设定培养温度为 30°C、37°C, 在不同起始菌密度条件下, 加入不同终浓度的 IPTG 进行诱导, 确定合适的起始菌密度、IPTG 终浓度以及培养温度。在上述优化的起始菌密度、IPTG 终浓度以及培养温度条件下, 优化诱导时间。

### 1.2.6 重组蛋白纯化

经超声破碎的菌体于 30 000×g 离心 30 min, 收集上清, 利用 Ni-NTA 柱亲和纯化蛋白, 纯化过程参照 Novagen 使用说明书, 纯化的蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯度及分子量, 利用 BCA 法 (Bio-Rad) 测定蛋白浓度。

### 1.2.7 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定

以 pNPG 为底物测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 反应体系包括 25  $\mu$ L 适当稀释的酶液和 475  $\mu$ L pNPG 终浓度为 5 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5), 40°C 反应 10 min 后, 加入 500  $\mu$ L 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应。酶活单位(IU) 定义为每分钟催化 pNPG 生成 1  $\mu$ mol p-nitrophenyl 所需要的酶量。

### 1.2.8 重组酶最适反应 pH 和 pH 稳定性

以 pNPG 为底物, 在不同 pH(5.0~8.0, 间隔 0.5 单位)的 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液中, 测试酶活力并确定酶的最适反应 pH。分别使用 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液和 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液, 以不同 pH(5.0~10.0, 间隔 1.0 单位)缓冲液稀释的酶液保温于 30°C, 1 h 后测定剩余酶活力, 0 h 为对照, 计算相对酶活力, 确定酶 pH 稳定性。

### 1.2.9 重组酶最适反应温度和温度稳定性

最适反应温度通过在 15°C~60°C (间隔 5°C) 条件下测定不同温度下的酶活力进行确定。温度稳定性

测定使用 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 7.0), 适当稀释初始酶液, 在不同温度(5°C~55°C, 间隔 10°C) 下保温 1 h, 0 h 测定初始酶活力, 1 h 后测定剩余酶活力, 计算相对酶活力。

### 1.2.10 重组酶底物特异性

分别使用 pNPG、纤维二糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖以及 CMC 为底物, 测定 r*Bgl*1B 的底物特异性。pNPG 作为底物的反应体系同酶活测定反应体系, 40°C 反应 5 min 后测定释放 p-nitrophenyl 的量。二糖及多糖作为底物时采用 2 mL 反应体系, 包括 25  $\mu$ L 适当稀释的酶液和 1975  $\mu$ L 含有相应浓度底物的 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.5), 40°C 反应 5 min。葡萄糖含量测定采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(GOD-POD)。根据 Lineweaver-Burk 作图法, 计算不同底物的  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

### 1.2.11 金属离子、EDTA、葡萄糖和有机溶剂对重组酶活力的影响

选取  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ , 测定存在金属离子的条件下对酶活力的影响, 以不加金属离子的相同条件作为对照。在不同浓度葡萄糖、乙醇(V/V)、SDS、PMSF、EDTA 和 DMSO 存在条件下, 测定 r*Bgl*1B 的相对酶活力。

## 2 结果

### 2.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆的筛选

通过功能筛选, 经过初筛和复筛, 从包含 20 000 个克隆的文库中共筛选到 6 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶阳性克隆。对其中活性较强的一个克隆 pSB47B2 进行亚克隆分析。

### 2.2 亚克隆筛选及序列分析

对 pSB47B2 进行亚克隆, 并将  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因定位在经 *Sau*3A I 部分酶切的 3.4 kb 的片段上。测序结果分析发现一个编码  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的开放阅读框(ORF), 命名为 *bgl1B* (GenBank Accession No. GU 067480)。 *bgl1B* 全长 1350 bp, Vector NTI 软件分析表明其 G+C 含量为 40.96%, 编码的蛋白 *Bgl*1B 由 449 个氨基酸组成, 蛋白分子量为 51 kD, 理论等电点为 4.52。Signal-P 分析显示其不含信号肽序列。

通过 BLAST 程序对 *Bgl*1B 全序列进行分析比较, 发现其与来自 *Glacielecola* sp. HTCC 2999 以及麦

氏交替单胞菌 *Alteromonas macleodii* 'Deep ecotype' 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶蛋白分别具有 99% 和 60% 的序列相似性, 但这些序列均来自全基因组测序, 没有进行系统的酶学性质研究。对编码区进行蛋白质结构功能

域的分析发现, Bgl1B 的 9~445 区段为糖基水解酶家族 1(GH1) 功能域 (Pfam: PF00232, E-value: 8.50e-166), 其中存在着 GH1 的几个高度保守区, 如图 1 所示; SWISS-MODEL 预测分析显示 Bgl1B 具有

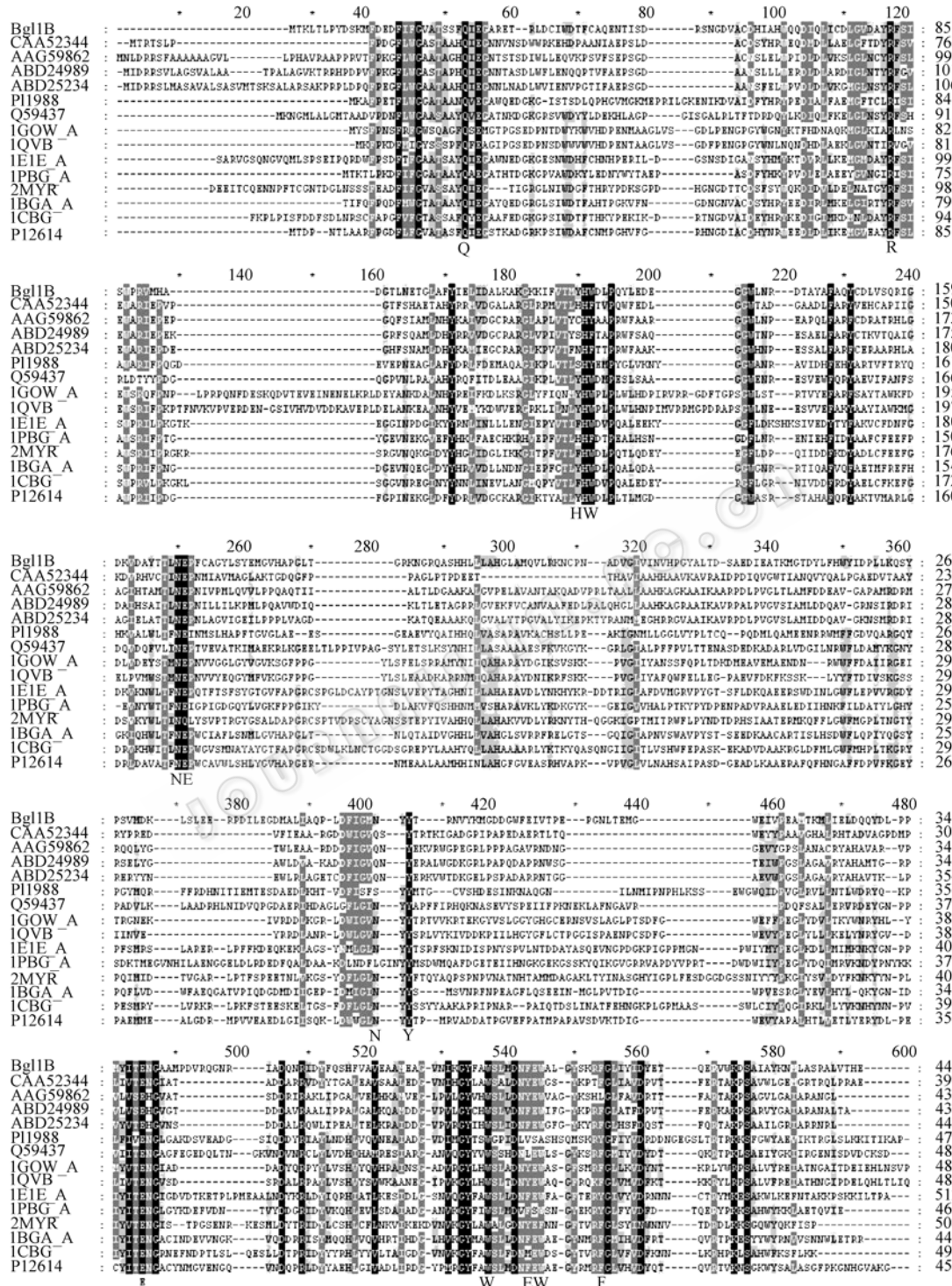


图 1 Bgl1B 全序列比对图

Fig. 1 Multiple alignment of Bgl1B with the  $\beta$ -glucosidases from different sources. In this alignment, the amino acid sequences were referred to published data<sup>[9]</sup>. The alignment was performed using ClustalW version 1.81 and GENEDOC. The conserved residues are indicated under the bottom line of the alignment. The protein donor and nucleophile are indicated as # and \* on the top of the alignment, respectively.

GH1 家族蛋白典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 形成的圆筒结构。

### 2.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆及表达

成功地构建了表达载体 pET22b(+)-*bgl1B*, 并实现重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶 rBgl1B 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的高效表达。对重组蛋白表达的条件进行了优化, 结果显示, 30°C 条件下表达的蛋白以活性溶解状态存在, 而 37°C 表达的蛋白主要以包涵体形式存在。当使用初始浓度为 0.75 mmol/L IPTG 时, 在 30°C 条件下诱导培养 7 h; 能够获得最大的目标蛋白表达效率, 纯化后获得的重组蛋白达到~370 mg/L 发酵液。

### 2.4 rBgl1B 的纯化

通过 Ni-NTA 柱纯化的诱导产物, 经过 SDS-PAGE 检测显示单一目标蛋白条带(图 2), 说明 rBgl1B 已被成功纯化到 SDS-PAGE 电泳纯。

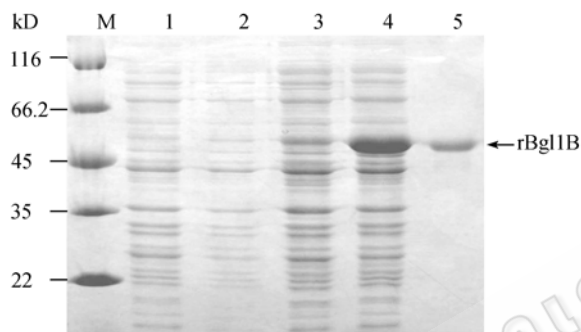


图 2 Ni-NTA 纯化 rBgl1B 蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE for the overexpressed and Ni-NTA purified rBgl1B. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 (DE3) /pET22b(+) induced by IPTG for 7 h; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)-*bgl1B* induced by IPTG for 0 h; 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)-*bgl1B* cultured for 7 h, uninduced; 4: *E. coli* BL21(DE3) /pET22b(+)-*bgl1B* induced by IPTG for 7 h; 5: Ni-NTA purified rBgl1B.

### 2.5 重组酶的最适 pH 和 pH 稳定性

以 50 mmol/L 柠檬酸钠为缓冲体系, 测得 rBgl1B 的最适 pH 为 6.5。在 pH 5.0~8.0 范围内均能检测到酶活性; 在 pH 6.0~7.5 范围内, 能检测到 80% 以上的残余酶活力(图 3A)。在 pH 6.5~9.0 范围内, 酶的稳定性较好; 在 pH 8.0 时酶有最好的保藏稳定性(图 3B)。

### 2.6 重组酶的最适温度和温度稳定性

在最适反应 pH 条件下测得 rBgl1B 催化水解 pNPG 反应的最适温度为 40°C(图 3C)。酶在 30°C~45°C 范围内有相对较高的酶活力。当温度升至 50°C 时, 酶活力迅速下降, 仅有 40°C 时的 28%。酶在低

温条件下(5°C~15°C)有很好的稳定性, 随保藏温度升高, 酶趋向于不稳定。在温度 50°C 下保藏 1 h 后, 测得酶残余活力为 18%(图 3D)。

### 2.7 金属离子、EDTA、葡萄糖及有机溶剂对酶活力的影响

金属离子和 EDTA 对 rBgl1B 活性的影响见图 4。10 mmol/L 的 EDTA 对 rBgl1B 活性没有明显影响。在 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  存在条件下, rBgl1B 催化 pNPG 的活力分别达到对照的 118.4% 和 110.1%。10 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  对 rBgl1B 均有较强的抑制作用, 而 10 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  对酶活性影响较小。 $\text{Na}^{+}$  对酶活性影响较小: 添加 500 mmol/L  $\text{Na}^{+}$ , 相对酶活为 42%;  $\text{Na}^{+}$  达到 1 mol/L 时, 酶活残留 14%。

乙醇和葡萄糖对 rBgl1B 活性均有抑制作用。在 30 mmol/L 葡萄糖或 7% 乙醇存在条件下, rBgl1B 活性损失 50%; 当葡萄糖浓度增加到 40 mmol/L 或乙醇浓度增加到 20% 时, 酶活完全丧失。

SDS 是 rBgl1B 的有效抑制剂, 反应中添加 1% SDS 就可能导致酶活性完全丧失。DMSO 对酶活性也有较大影响: 加入 5% DMSO, 酶活降低 30%; 加入 20% DMSO, 相对酶活为 30%; 而 50% DMSO 可以完全抑制酶的活性。PMSF 对酶活性影响较小, 加入 1 mmol/L PMSF, 仍有 77% 的酶活保留。

### 2.8 底物特异性

在最适反应条件下, 以 pNPG 为底物时, rBgl1B 酶活达到 39.7 U/mg,  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 0.288 mmol/L、36.9  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。纤维二糖是 rBgl1B 的有效作用底物, 其  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 0.173 mmol/L、35  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。rBgl1B 不能催化转化蔗糖、乳糖、麦芽糖以及 CMC。

## 3 讨论

根据酶催化功能结构域的氨基酸序列相似性和结构相似性, 糖基水解酶目前被分为 115 个家族, 其中  $\beta$ -葡萄糖苷酶被归入 GH1、GH3 和 GH9 家族<sup>[10]</sup>。本研究中, 通过序列分析以及结构预测, 可知 Bgl1B 具有 GH1 家族蛋白特有的保守氨基酸序列以及 $(\beta/\alpha)_8$ 形成的圆筒结构, 是一个 GH1 家族蛋白。据我们所知, 这是第一个报道的来自海洋微生物的 GH1 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[8,11]</sup>。

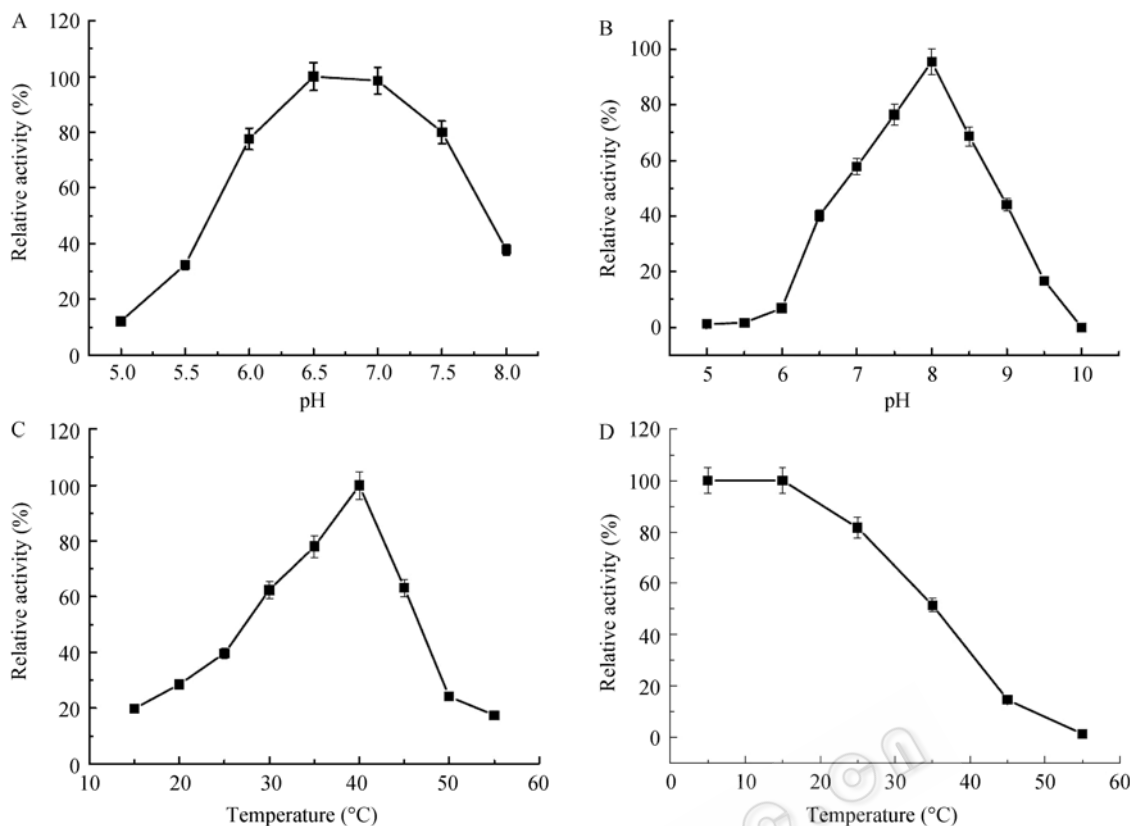


图 3 pH、温度对 Bgl1B 活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature and pH on the activity of rBgl1B. (A) pH dependence of rBgl1B enzymic activity. (B) pH dependence of rBgl1B stability. (C) Temperature dependence of rBgl1B enzymic activity. (D) Thermal stability of the rBgl1B.

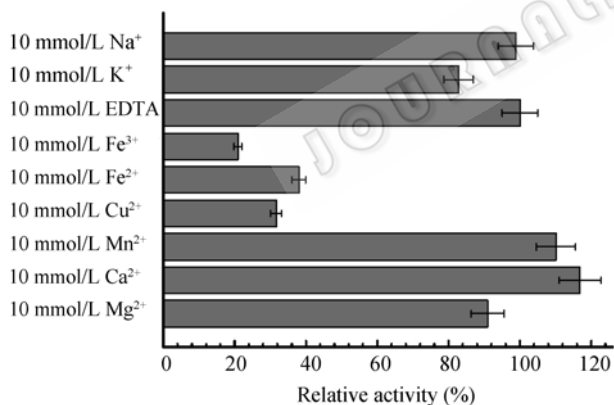


图 4 不同金属离子及 EDTA 对 rBgl1B 酶活性的影响  
Fig. 4 Influence of different metal ions and EDTA on rBgl1B enzymatic activity. The figures are mean values derived from duplicate experiments.

酶是一种具有专一水解活性的蛋白质，金属离子普遍能够对其活性产生或多或少的影响。对于  $\beta$ -葡萄糖苷酶而言，一般情况下低浓度的  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 对酶有较明显的抑制作用，而  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 对酶活性有激活作用， $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 则对某些  $\beta$ -葡萄糖苷酶是激活剂，对另一些又是

抑制剂。本研究中，低浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 是 rBgl1B 的激活剂，在 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 存在条件下，rBgl1B 催化 pNPG 的活力分别达到对照的 118.4%和 110.1%，与来自土壤微生物宏基因组文库中  $\beta$ -葡萄糖苷酶相类似<sup>[11]</sup>。10 mmol/L 的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Fe}^{2+}$ 对 rBgl1B 均有较强的抑制作用，而  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 对酶活性影响较小。与多数  $\beta$ -葡萄糖苷酶不同，rBgl1B 对  $\text{Na}^+$ 有突出的耐受性，加入 500 mmol/L  $\text{Na}^+$ ，酶活还可以保留 42%，这可能与 rBgl1B 来源于海洋环境相关。

目前， $\beta$ -葡萄糖苷酶主要来源于微生物。虽然微生物来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶在许多催化性质上都表现出一定的相似性，但与大部分真菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶相比，细菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶还是在最适 pH、等电点等方面表现出明显的不同。真菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶在酸性条件下有较好的催化活性，细菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶一般在中性或碱性条件下表现出最佳催化活性。本研究中，rBgl1B 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与氢离子浓度有较大关

系, 其反应最适 pH 为 6.5~7.0, 在中性和碱性环境中具有比较高的酶活力且具有比较好的稳定性, 有别于目前纯化得到的许多来源于真菌的酸性  $\beta$ -葡萄糖苷酶。同时, 以 pNPG 为底物, 在 pH 6.5 和 40°C 条件下, 比活力为 39.7 U/mg, 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  还能将酶的比活力提高到 47 U/mg。以上表明, rBg11B 是有开发应用前景的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 可以较好地用于中性或弱碱性酶制剂的开发。

## REFERENCES

- [1] Coughlan MP. The properties of fungal and bacterial cellulases with comments on their production and application. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1985, **3**: 39–109.
- [2] Saha BC, Bothast RJ. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel  $\beta$ -glucosidase from *Candida peltata*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3165–3170.
- [3] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, *et al.* A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *J Agri Food Chem*, 1996, **44**: 2336–2340.
- [4] Makropoulou M, Christakopoulos P, Tsitsimpikou C, *et al.* Factors affecting the specificity of  $\beta$ -glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl- $\beta$ -D-glucosides. *Int J Biol Macromol*, 1998, **22**: 97–101.
- [5] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, **5**: 245–249.
- [6] Yooshep S, Sutton G, Rusch DB, *et al.* The sorcerer II global ocean sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol*, 2007, **5**: e16.
- [7] Chu XM, He HZ, Guo CQ, *et al.* Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80**: 615–625.
- [8] Feng Y, Duan CJ, Pang H, *et al.* Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**: 319–328.
- [9] Marques AR, Coutinho PM, Videira P, *et al.* *Sphingomonas paucimobilis*  $\beta$ -glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1. *Biochem J*, 2002, **370**: 793–804.
- [10] Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1996, **316**: 695–696.
- [11] Kim SJ, Lee CM, Kim MY, *et al.* Screening and characterization of an enzyme with  $\beta$ -glucosidase activity from environmental DNA. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**: 905–912.