

水牛瘤胃宏基因组的一个新的 β -葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的克隆、表达及其表达产物的酶学特性

郭 鸿^{1,2}, 封 毅², 莫新春², 段承杰^{1,2}, 唐纪良^{1,2}, 冯家勋^{1,2}

1 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西大学, 南宁 530005

2 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005

摘 要: 以木质纤维素为原料、应用同步糖化共发酵工艺发酵生产酒精时需要酸性中低温高活力纤维素酶包括 β -葡萄糖苷酶。本工作分 6 次构建了水牛瘤胃未培养微生物宏基因组文库, 获得 1.26×10^5 个克隆, 文库含外源 DNA 的总长度约为 4.8×10^6 kb。从文库中筛选到 118 个表达 β -葡萄糖苷酶活性的独立克隆。发现其中 8 个克隆表达的 β -葡萄糖苷酶在 pH5.0、37°C 条件下活性较强。对其中一个克隆进行了亚克隆, 序列分析发现一个 2223 bp 的潜在的编码 β -葡萄糖苷酶基因(*umcel3G*)的开放阅读框(ORF), 其编码产物的氨基酸序列与来自于 *Bacillus* sp. 的一个 β -葡萄糖苷酶同源性最高, 具有 60%的一致性和 73%的相似性。该 ORF 在 *E.coli* 中的表达产物 Umcel3G 的分子量与预测大小相似, 酶谱分析表明该表达产物具有 β -葡萄糖苷酶活性, 证实该基因为一个 β -葡萄糖苷酶基因。测定了用 Ni-NTA 纯化的 Umcel3G 的酶学特性, 其最适 pH 和最适温度分别为 6.0~6.5 和 45°C。一些金属离子如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 能显著提高该酶的酶活, 而另外一些金属离子如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 能抑制 Umcel3G 的活性。在 pH4.5、35°C 和 5 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的条件下, 用 Ni-NTA 纯化的重组酶的比活为 22.8 IU/mg, 说明该酶在用 SSCF 工艺发酵生产酒精中有潜在的应用价值。

关键词: 未培养微生物, 宏基因组, β -葡萄糖苷酶, 木质纤维素, 同步糖化共发酵

Cloning and Expression of a β -Glucosidase Gene *umcel3G* from Metagenome of Buffalo Rumen and Characterization of the Translated Product

Hong Guo^{1,2}, Yi Feng², Xinchun Mo², Chengjie Duan^{1,2}, Jiliang Tang^{1,2}, and Jiaxun Feng^{1,2}

1 Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530005, China

2 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: Metagenomic cosmid libraries containing 1.26×10^5 clones, covering about 4.8×10^6 kb metagenomic DNA of uncultured microorganisms from the contents of buffalo rumens were constructed, and 118 independent clones expressing β -glucosidase activity were isolated from the libraries. Screening of these clones showed that eight clones expressed relatively higher β -glucosidase activity at pH 5.0 and 37°C. One out of the eight clones was subcloned. Sequencing analysis showed that an open reading frame (ORF) of

Received: May 21, 2007; **Accepted:** June 14, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30560003) and Program for New Century Excellent Talents in University of China (No. NCET-05-0752).

Corresponding author: Jiaxun Feng. Tel: +86-771-3239401; Fax: +86-771-3239413; E-mail: fengshi@gxu.edu.cn

国家自然科学基金资助(No. 30560003), 教育部新世纪优秀人才支持计划资助(No. NCET-05-0752)和广西科技攻关计划资助(桂科攻0630003-7)。

2223 bp, termed *umcel3G*, potentially encodes a β-glucosidase. The encoded product shared highest homology with a β-glucosidase from *Bacillus* sp. at 60% identity and 73% similarity. The *umcel3G* was over-expressed in *Escherichia coli* and the size of the translated product Umcel3G on SDS-PAGE was in agreement with the predicted molecular mass. Zymogram analysis showed that Umcel3G exhibited β-glucosidase activity, confirming that this ORF encodes a β-glucosidase. The Umcel3G, purified with Ni-NTA column, exhibited optimal activity at pH 6.0~6.5 and 45°C. Certain ions such as Ca²⁺, Zn²⁺ had significant positive effect on the activity of Umcel3G. However, some ions such as Fe³⁺, Cu²⁺ gave significant inhibitory effect on the enzyme. The Ni-NTA purified recombinant β-glucosidase Umcel3G had a specific activity of 22.8 IU/mg at pH4.5, 35°C and at the presence of 5 mmol/L Ca²⁺, indicating that this enzyme has potential applications in the fermentative production of ethanol by simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF) of lignocelluloses.

Keywords: uncultured microorganism, metagenome, β-glucosidase, lignocellulose, simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF)

纤维素酶(cellulase)是一类能协同作用将纤维素降解生成葡萄糖的酶系的总称。纤维素酶主要有: (1) 内切葡聚糖酶(endo-1, 4-β-D-glucanase, EC3.2.1.4), 能随机在纤维素分子内部切断β-1, 4-糖苷键; (2) 外切葡聚糖酶(exo-1, 4-β-D-glucanase, EC3.2.1.91), 能从纤维素分子的还原端或非还原端以纤维二糖为单位切割β-1, 4-糖苷键; (3) β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase, EC3.2.1.21), 能将纤维二糖水解释生成葡萄糖, 以及水解一些纤维三糖或纤维寡糖^[1]。

以木质纤维素为原料、用纤维素酶水解纤维素后发酵生产酒精, 最早的工艺路线是先糖化后发酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 工艺, 先预处理木质纤维素, 再用纤维素酶水解纤维素产生糖, 接着再用酵母菌或其它微生物发酵产生酒精, 这种工艺的主要缺点是: 在水解产生的葡萄糖存在的情况下, β-葡萄糖苷酶停止水解纤维二糖, 纤维二糖的积累又导致对纤维素降解的终止。这种工艺后来被改进为同步糖化发酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 工艺, 在该工艺中, 纤维素酶对纤维素的水解和发酵在同一容器中进行, 一边酶解产生葡萄糖, 发酵微生物就一边将葡萄糖转化成酒精。不但减少了反应器, 更重要的是避免了产物抑制问题。现在, SSF 工艺被改进成同步糖化共发酵 (Simultaneous Saccharification and Cofermentation, SSCF) 工艺。SSCF 工艺就是边糖化、发酵微生物可以同时边发酵多种糖底物。该工艺目前存在的主要问题是: 纤维素酶的酶活低、生产成本高; 纤维素酶的作用温度和常用发酵微生物酵母菌的发酵温度不匹配。解决的办法之一是研发酸性中低温高活力纤维素酶包括 β-葡萄糖苷酶^[2] (http://www1.eere.energy.gov/biomass/process_description.html)。

很多微生物包括细菌、放线菌和真菌等都能产生β-葡萄糖苷酶^[3]。但是目前分离到的β-葡萄糖苷酶主要是从纯培养微生物中得到的, 而占自然界中微生物种类 99% 以上的未培养微生物 (uncultured microorganisms) 中蕴藏着丰富的基因资源^[4], 已经有较多文献报道通过构建和筛选环境样品的未培养微生物宏基因组文库获得新基因, 如编码脂肪酶、蛋白酶、几丁质酶、淀粉酶、纤维素酶以及抗生素等活性物质的基因^[5, 6]。

反刍动物能高效利用纤维性食物, 与其瘤胃中的微生物能分泌产生高效降解纤维素的纤维素酶是分不开的。牛瘤胃是纤维素被剧烈降解的环境, 研究表明, 牛瘤胃中的微生物种类有 8000 多种, 其中 85% 以上是未培养微生物^[7], Ferrer^[8] 等通过构建奶牛瘤胃未培养微生物宏基因组文库筛选到 9 个内切葡聚糖酶。本实验拟通过构建水牛瘤胃未培养微生物宏基因组文库, 筛选获得新的编码高效的适用于同步糖化共发酵工艺的β-葡萄糖苷酶的基因。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在南宁市一个屠宰场, 采集了 30 个水牛的新鲜且相对比较干燥的瘤胃内容物。用保鲜袋密封保存, 于实验室-20 °C 冰箱保存待用。

1.2 主要试剂

本工作所用主要试剂及来源如下: Sephadex G200 购于原 Pharmacia 公司; 文库构建试剂盒 pWE-B::TNCTM Cosmid Cloning Kit 购于 Epicentre 公司; 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP, Polyvinylpyrrolidone)、七叶苷 (Esculin hydrate)、柠檬酸高铁铵 (Ammonium iron(III) citrate) 购于 Sigma 公司; 限制性内切酶

*Bam*H、*Kpn* 购于 Promega 公司; *Xho* 购于 NEB 公司; T4 DNA 连接酶和 Ex Taq DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司; pET30a(+)载体购于 Novagen 公司; 其它生化试剂购于上海生工生物工程有限公司。

1.3 水牛瘤胃内容物宏基因组文库的构建

每次称取 5 个水牛瘤胃内容物各 10 g 并将它们混合,用提取缓冲液(sodium phosphate: 100 mmol/L, pH8.0; Tris-HCl: 100 mmol/L, pH8.0; EDTA: 100 mmol/L, pH8.0; NaCl: 1.5 mol/L; CTAB: 1%; SDS: 2%)稀释样品, 搅拌机充分搅碎。水牛瘤胃内容物总 DNA 的提取方法参照 Zhou 等^[9]。提取的总 DNA 的纯化和回收方法参照 Feng 等^[6]。回收后的 DNA 片段依据文库构建试剂盒 pWEB::TNCTM Cosmid Cloning Kit 所附说明书进行文库的构建工作。

1.4 水牛瘤胃内容物宏基因组文库中表达 β -葡萄糖苷酶活性克隆的筛选

水牛瘤胃内容物宏基因组文库 β -葡萄糖苷酶基因的筛选方法参照 Kwon 等^[10], 将文库克隆影印到含 0.1%七叶苷和 0.25%柠檬酸高铁铵的 LA 平板(简称七叶苷平板)上培养 12~16 h, 用氯仿对文库克隆熏蒸 15 min 后, 37°C 放置 1 h, 菌落周围显黑色的即为阳性克隆。得到的阳性克隆用 *Bam*H 和 *Eco*R 酶切分析。

将所有表达 β -葡萄糖苷酶活性的独立克隆分别接种到 pH 5.0 的七叶苷平板, 在 37°C 培养箱中倒置培养 10 h, 挑选平板上活性较强的克隆。

1.5 β -葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的鉴定

对上述表达 β -葡萄糖苷酶活性较强的一个阳性克隆先用 *Xho* 进行亚克隆, 再用 *Bam*H 进行亚克隆后测序, 用 DNAStar 软件寻找 ORF, 用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 BlastP 搜寻 GenBank 数据库, 用 SMART 软件对蛋白质功能域进行预测。

1.6 重组蛋白 *Umcel3G* 的表达与纯化

利用 VectorNTI 软件设计引物, 扩增 *umcel3G* 的 ORF 上不包括信号肽的编码序列。在正向引物(5'-TTAGGGTACCGAAGCCGACGGCTACCGGCT-3')5'端添加 *Kpn* 位点, 在反向引物(5'-AGTGCTCGA-GTCTGCGGTAGATGGACACGCA-3')5'端添加 *Xho* 位点。起始密码子和终止密码子由表达载体 pET30a(+)提供。表达产物的 N 端有一个由表达载体提供的 His 标签(6-His Tag)。

把经过 *Kpn* 和 *Xho* 双酶切后回收的 PCR 产物

和经同样酶切后回收的表达载体 pET30a(+)连接并转化 *E. coli* EPI100 以得到正确的重组质粒 pUmcel3G。把 pUmcel3G 转化到 *E. coli* BL21(DE3)pLys 中获得表达菌株 BL21(DE3)pLys/pUmcel3G, 在 37°C 下用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactoside)诱导 *umcel3G* 基因表达, 用裂解液(lysis buffer: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, inidazole 10 mmol/L, pH8.0)悬浮收集的菌体, 超声波破碎细胞后离心收集上清液即为粗酶液。用购自 Qiagen 公司的 Ni 柱(Ni-NTA Column)纯化粗酶液, 纯化时所用洗涤液(wash buffer): NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, inidazole 60 mmol/L, pH8.0; 洗脱液(elution buffer): NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, inidazole 250 mmol/L, pH 8.0。用 SDS-PAGE 电泳检测^[11]纯化后的酶蛋白。参照 Feng 等^[12]的方法进行酶谱分析。

1.7 β -葡萄糖苷酶的活性测定

以 pNPG (p-nitrophenyl - β -D-glucopyranoside)为底物测定 β -葡萄糖苷酶的活性, 以每分钟催化 pNPG 生成 1 μ mol p-nitrophenol 所需的酶量为一个酶活单位(IU)。最适 pH 值和最适温度的测定参照 Saha 等^[13]的方法。最适 pH 测定所用缓冲液为: pH3.0~7.0: citrate-phosphate buffer; pH6.0~8.0: 0.1 mol/L sodium-phosphate buffer; pH7.0~9.0: 0.1 mol/L Tris-HCl buffer。反应体系为: 10 μ L 25 mmol/L 的 pNPG, 10 μ L 适当浓度的酶液, 116 μ L 不同 pH 的缓冲液, 37°C 反应 5 min, 加入 70 μ L 0.4 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液以终止反应, 反应后用酶标仪测 A₄₁₀。与上述反应体系及方法相同, 在最适 pH 的缓冲液中测定该酶在不同温度下的相对酶活。酶的温度稳定性和 pH 稳定性的测定参照 Feng 等^[6]的方法。将纯化酶的溶液分别在各个温度下放置 1 h 后, 按上述方法在最适反应条件下分别测定其酶活。将纯化酶分别加入不同 pH 的缓冲液中并在 4°C 保存 24 h 后, 按上述方法在最适反应条件下分别测定其酶活。把纯化酶溶液稀释到 pH4.5 的缓冲液中, 并始终置于 35°C 水浴中, 每隔 2 h 取出少量酶液并按上述方法测定其酶活, 以测定该酶在发酵条件下的半衰期。金属离子对 *Umcel3G* 活性影响的测定参照 Shipkowski 等^[14]的方法。上述所有测定中, 每个样品均作 3 次重复。

1.8 GenBank 索引号

β -葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的索引号为

EU118293。

2 结果与分析

2.1 水牛瘤胃内容物宏基因组文库的构建及表达β-葡萄糖苷酶活性的克隆的筛选

一次从 50 g 水牛瘤胃内容物中提取总 DNA, 经 Sephadex G200 层析柱和电洗脱纯化后回收的 40 kb 以上的 DNA 量约为 10 μg, 回收的 DNA 片段用 pWEB::TNC™ Cosmid Cloning Kit 试剂盒中末端修复酶(end-repaired enzyme)进行修复后, 再用 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收的 20 kb 以上的 DNA 片段的量约为 6 μg(图 1)。



图 1 水牛瘤胃内容物中提取及纯化的总 DNA

Fig. 1 The extracted and purified DNA from the contents of buffalo rumen

M: uncut λDNA; 1: crude DNA; 2: purified and recovered DNA with Sephadex G200 chromatography and subsequent electroelution; 3: end-repaired and recovered DNA with low melting point agarose gel electrophoresis

本工作一共提取了 6 次总 DNA, 每次用 5 个水牛瘤胃的内容物混合物 50 g, 构建了 6 个水牛瘤胃宏基因组文库, 共获得 12.6 万个克隆。

从其中一个文库中任意挑取 15 个克隆提取其质粒, 用 *Bam*HI 进行酶切分析, 结果表明每个质粒除含有一条 5.8 kb 的载体片段外, 没有两个质粒外源 DNA 片段的酶切带型完全相同(图 2), 说明文库克隆外源片段的随机性较高。外源片段最小的为 20.5 kb, 最大的为 48.0 kb, 平均大小为 38.2 kb, 推测所构建 6 个文库的总库容量为 4.8×10^9 bp。用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 对初筛获得的阳性克隆的质粒进行酶切分析, 共得到 118 个表达β-葡萄糖苷酶活性的独立克隆。提取这些克隆的质粒 DNA, 重新转化到大肠杆菌

EPI100 后得到的转化子仍然表达有β-葡萄糖苷酶活性, 证明表达的酶活是克隆的外源 DNA 所提供的。

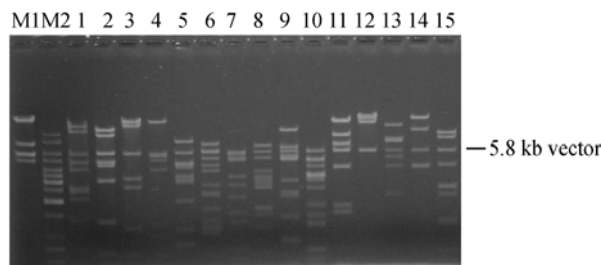


图 2 水牛瘤胃宏基因组文库重组质粒的 *Bam*HI 酶切分析

Fig. 2 *Bam*HI restriction analysis of recombinant plasmids from metagenomic library of the contents of buffalo rumen

M1: λ*Eco*RI ; M2: 1 kb DNA ladder; 1~15: recombinant plasmids digested by *Bam*HI .

将表达β-葡萄糖苷酶活性的 118 个克隆转接到 pH5.0 的七叶苷平板上, 在 37 °C 培养箱中倒置培养 10 h 后观察, 结果有 8 个克隆菌体周围的黑色较深, 表达的β-葡萄糖苷酶活性较强, 本工作对其中一个克隆 pGLU64 进行了深入的研究。

2.2 β-葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的序列分析

用 *Xho*I 对 pGLU64 进行了亚克隆, 把编码β-葡萄糖苷酶的基因定位在约 14 kb 的 *Xho*I 片段上, 用 *Bam*HI 对该片段进行亚克隆, 把编码β-葡萄糖苷酶的基因定位在 5 kb 的 *Bam*HI 片段上。双向双链测序得到该片段上 3334 bp 的 DNA 序列, 其中第 592 bp~2814 bp 是一个 2223 bp 的完整的开放阅读框, 其编码产物的氨基酸序列与来自于 *Bacillus* sp. 的一个β-葡萄糖苷酶的同源性最高, 具有 60% 的一致性和 73% 的相似性。该基因编码的产物由 740 个氨基酸组成, 预测的分子量约为 80.9 kD, 等电点为 4.77。SMART 软件分析表明, 该多肽的第 1~23 个氨基酸残基为信号肽, 第 121~410 个氨基酸残基为糖苷水解酶家族 3 的催化功能域, 第 485~728 个氨基酸残基为糖苷水解酶家族 3C 的结构域。

2.3 β-葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 在大肠杆菌中的表达及表达产物 Umcel3G 的纯化

为了得到表达产物 Umcel3G, 用 IPTG 处理表达菌株 BL21(DE3)pLys/pUmcel3G。和对照菌株即含有空载体 pET30a(+) 的 BL21(DE3)pLys 给出的蛋白质带型(图 3 泳道 1)相比, 表达菌株明显给出一条额外的约 83 kD 的蛋白质带(图 3 泳道 2), 其与表达产物

预计的分子质量(83.9 kD)相似。经过 Ni-NTA 柱纯化后的产物在 SDS-PAGE 上只显示出一条主要的蛋白质带(图 3 泳道 3), 得到的纯化产物可以用来进行酶学特性的分析。把凝胶上的纯化的表达产物复性后, 在七叶苷平板上显示出 β -葡萄糖苷酶活性(图 3 泳

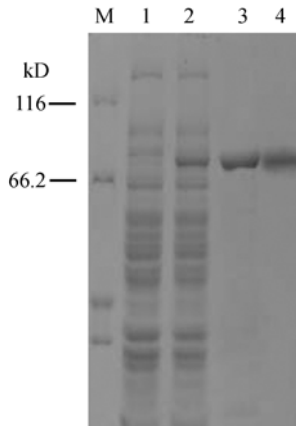


图 3 重组蛋白 Umcel3G 的纯化及纯化的 Umcel3G 的酶谱分析

Fig. 3 Purification of recombinant Umcel3G and zymogram analysis of the purified Umcel3G

M: protein molecular weight marker; 1: total protein of BL21(DE3)pLys/pET30a(+); 2: total protein of BL21(DE3)pLys/pUmcel3G; 3: Umcel3G purified with Ni-NTA column; 4: the renatured purified Umcel3G exhibited β -glucosidase activity

道 4)。

2.4 重组 Umcel3G 的酶学特性

以 pNPG 为底物, 测得 Umcel3G 酶促反应的最适 pH 为 6.0~6.5(图 4A), 在 pH4.5 时该酶具有约 65% 的相对酶活; Umcel3G 酶促反应的最适温度为 45°C (图 4B), 在 35°C 时该酶具有约 80% 的相对酶活。在最适 pH 和最适温度下, 纯化的重组酶对底物 pNPG 的比活力为 35.4 IU/mg。该酶在 pH4.5 的缓冲液中在 4°C 条件下放置 24 h 后仍然还保留有约 70% 的酶活, 该酶在 pH5.0~6.0 的条件下放置 24 h 后酶活减少很少(图 4C)。该酶在 35°C 以下比较稳定, 但该酶在 40°C 条件下放置 1 h 后只剩约 10% 的酶活(图 4D)。

将重组酶 Umcel3G 置于 SSCF 工艺条件(pH4.5、35°C)下, 测得 Umcel3G 的半衰期约为 7 h 左右(图 5)。一些金属离子对 Umcel3G 的活性影响非常大, 例如 5 mmol/L 的 Ca^{2+} 可以把 Umcel3G 的活性提高约 40% 左右, 达到 52.5 IU/mg。而 5 mmol/L 的 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 则几乎完全抑制该酶的活性(表 1)。另外, 在有 5 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在、pH4.5 和 35°C 条件下, 测得该酶的比活力为 22.8 IU/mg。

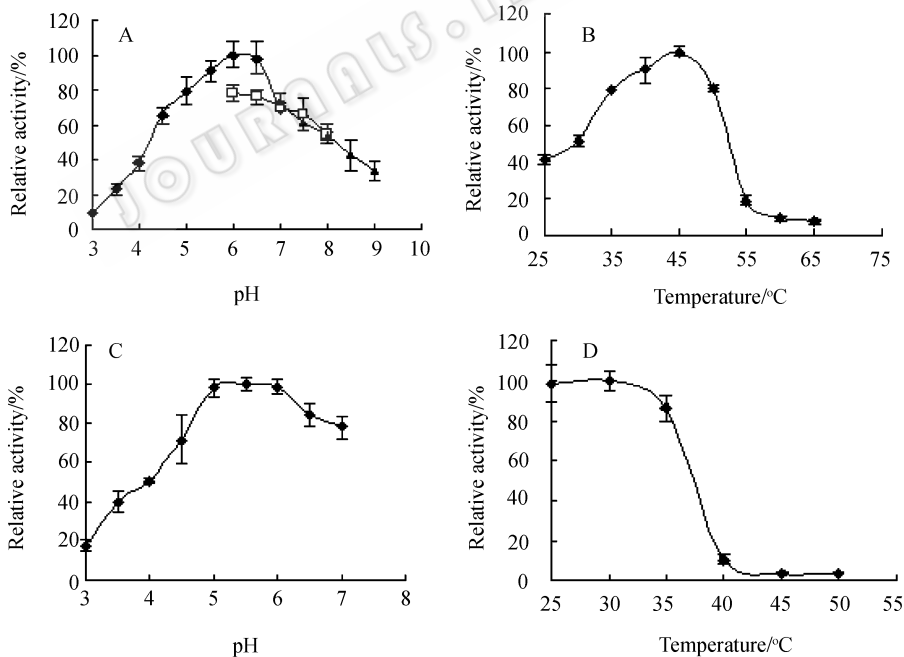


图 4 pH 和温度对 Umcel3G 酶活的影响

Fig. 4 Effect of pH and temperature on the enzyme activity of the recombinant Umcel3G to the substrate pNPG

The vertical bars represent the standard deviation of the mean calculated from three replicates. A: Determination of the optimal pH of the recombinant Umcel3G (—●— citrate-phosphate buffer, pH3.0~7.0; —○— 0.1mol/L sodium-phosphate buffer, pH6.0~8.0; —▲— 0.1mol/L Tris-HCl buffer, pH7.0~9.0); B: Determination of the optimal temperature of the recombinant Umcel3G; C: Test of pH stability of the recombinant Umcel3G; D: Test of thermal stability of the recombinant Umcel3G

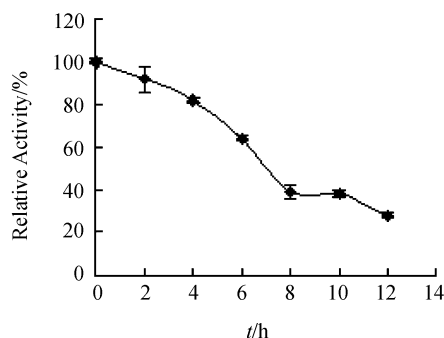


图5 重组酶 Umcel3G 在 SSCF 发酵条件下的半衰期的测定

Fig. 5 Determination of half life of the recombinant enzyme Umcel3G under the condition of SSCF

The vertical bars represent the standard deviation of the mean calculated from three replicates

表1 金属离子对 Umcel3G 酶活的影响

Table 1 Effect of ions on the enzyme activity of the recombinant Umcel3G

Compound	Concentration/(mmol/L)	Relative activity/% (± standard deviation)
Umcel3G		100
CaCl ₂	5	139.8 ± 8.58
ZnCl ₂	5	117.6 ± 3.27
NaCl	5	113.6 ± 4.52
MnCl ₂	5	112.4 ± 4.02
MgCl ₂	5	101.2 ± 2.76
KCl	5	82.3 ± 7.77
CoCl ₂	5	73.5 ± 4.93
FeCl ₂	5	7.8 ± 5.10
CuCl ₂	5	7.2 ± 0.12
FeCl ₃	5	1.2 ± 2.01

3 讨论

本工作从水牛瘤胃未培养微生物宏基因组文库中克隆并鉴定出一个β-葡萄糖苷酶基因。序列分析表明该基因的编码产物可能是来自水牛瘤胃未培养微生物中的一个新的β-葡萄糖苷酶。测序分析时在该基因的两侧没有发现有rRNA基因,因而,本工作无法得知该基因来自哪种微生物。

以 pNPG 为底物,在 pH6.0、45°C 条件下 Umcel3G 的比活力为 35.4 IU/mg,而且浓度为 5 mmol/L 的 Ca²⁺还能把该酶的比活提高到 52.5 IU/mg。以 pNPG 为底物时, Yu 等^[15] 2007 年从苹果种子中分离纯化的β-葡萄糖苷酶的比活为 17.5 IU/mg, Maekawa 等^[16] 2006 年纯化的来自于 *Physarum polycephalum* 的重组β-葡萄糖苷酶的比活

为 27.8 IU/mg, Hashimoto 等^[17] 1998 年纯化的来自于 *Bacillus* sp. 的一个重组β-葡萄糖苷酶的比活为 54.2 IU/mg, Tokuda 等^[18] 2002 年从白蚁唾液腺分泌物中纯化得到的β-葡萄糖苷酶的比活为 55.3 IU/mg, Hu 等^[19] 2007 年从一种蜗牛中纯化获得的一种β-葡萄糖苷酶的比活较高,为 162.78 IU/mg。因此,就我们所知,本工作所获得的β-葡萄糖苷酶 Umcel3G 是一个活力较强的β-葡萄糖苷酶。

在以纤维素为原料发酵生产酒精的 SSCF 工艺过程中,要求纤维素酶在发酵微生物如酵母菌的发酵条件(pH 4.5~5.0、30°C 左右)下有较高的酶活。过高的温度使酵母菌对糖的发酵速度减慢,就会造成糖的积累,反馈抑制纤维素酶的活性并进而降低纤维素被降解的速度。本工作获得的β-葡萄糖苷酶在 pH 4.5~5.0、温度低于 35°C 的条件下比较稳定,在 pH 4.5、温度 35°C 条件下该酶的半衰期约为 7 h,还有,在 pH4.5、温度 35°C 和有 5 mmol/L 的 Ca²⁺存在的条件下,β-葡萄糖苷酶 Umcel3G 具有 22.8 IU/mg 的比活力,这些说明该酶在用 SSCF 工艺发酵生产酒精中有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **88**(7): 797–824.
- [2] Öhgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 2007, **42**(5): 834–839.
- [3] Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 1997, **15**(3–4): 583–620.
- [4] Amann RL, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [5] Streit WR, Daniel R, Jaeger KE. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinions in Biotechnology*, 2004, **15**(4): 285–290.
- [6] Feng Y, Duan CJ, Pang H, Mo XC, Wu CF, Yu Y, Hu YL, Wei J, Tang JL, Feng JX. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(2): 319–328.

- [7] Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microbiology Review*, 2003, **27**(5): 663–693.
- [8] Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Reyes-Duarte D, Martins Dos Santos VAP, Strompl C, Elborough K, Jarvis G, Neef A, Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(12): 1996–2010.
- [9] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [10] Kwon KS, Lee J, Kang HG, Hah YC. Detection of beta-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**(12): 4584–4586.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259): 680–685.
- [12] Feng JX, Karita S, Fujino E, Fujino T, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a cell-bound multi-domain xylanase from *Clostridium josui*, and characterization of the translated product. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, **64**(12): 2614–2624.
- [13] Saha BC, Freer SN, Bothast RJ. Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**(10): 3774–3780.
- [14] Shipkowski S, Brenchley JE. Characterization of an unusual cold-active β -glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolases from the psychrophilic isolate *Paenibacillus* sp. strain C7. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(8): 4225–4232.
- [15] Yu HL, Xu JH, Lu WY, Lin GQ. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**(2): 354–361.
- [16] Maekawa A, Hayase M, Yubisui T, Minami Y. A cDNA cloned from *Physarum polycephalum* encodes new type of family 3 β -glucosidase that is a fusion protein containing a calx- β motif. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2006, **38**(12): 2164–2172.
- [17] Hashimoto W, Miki H, Nankai H, Sato N, Kawai S, Murata K. Molecular cloning of two genes for β -D-glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and identification of one as a gellan-degrading enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, **360**(1): 1–9.
- [18] Tokuda G, Saito H, Watanabe H. A digestive β -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes kosunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **32**(12): 1681–1689.
- [19] Hu Y, Luan HW, Hao DC, Xiao H, Yang S, Yang L. Purification and characterization of a novel ginsenoside-hydrolyzing β -D-glucosidase from the China white jade snail (*Achatina fulica*). *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**(5): 1358–1366.

安捷伦科技推出新一代全基因组水稻微阵列

安捷伦科技公司(NYSE:A)于 2008 年 1 月 30 日推出新一代水稻寡核苷酸微阵列 44K RAP-DB。该微阵列以日本国家农业生物科学研究所(NIAS)注释的水稻基因组信息为基础,可以帮助研究者同时研究水稻中成千上万个与生长发育过程和应激反应相关的基因。

除覆盖水稻全基因组之外,微阵列 44K RAP-DB 还是目前最精确的水稻微阵列,每个 1×3 英寸玻片上有 4 个 44K 微阵列,其探针充分利用了被认为是黄金标准的水稻基因组注释数据库(RAP-DB)。而且安捷伦 60-mer 的探针长度具有灵敏度优势,使得研究人员可以检测到以前很可能被忽略的低表达基因。

NIAS 的研究人员 Hiroshi Takatsuji 博士表示,“利用该微阵列,水稻研究人员将可以识别许多以前可能会被忽略的重要的水稻基因。除了 cDNA 数据库之外,安捷伦的水稻寡核苷酸微阵列还包含了从基因组序列预测得到的基因,这可以提高发现那些只在某种特定条件下表达而不能用常用 cDNA 数据库检测的基因”Takatsuji 博士的研究团队利用这种新一代的微阵列识别了转录因子 WRKY45,该基因被认为对抵抗两种主要水稻疾病真菌稻瘟和白叶枯病有重要作用。

安捷伦的 SurePrint 微阵列制造技术提供了无可比拟的数据可重复性,在价格和样品处理时间上都非常经济。如欲了解关于安捷伦的详细信息,请访问 www.agilent.com。

