

• 工业生物技术 •

嗜热古菌 *Infirmifilum uzonense* 来源的双功能高温 β -葡萄糖苷酶 IuBgl3 的原核表达及酶学性质分析刘鑫涵¹, 沈风飞², 石鹏君^{3,4}, 刘慧芹¹

1 天津农学院 园艺园林学院, 天津 300392

2 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

3 中国农业科学院 麻类研究所, 湖南 长沙 410205

4 中国农业科学院 农产品加工研究所, 北京 100193

刘鑫涵, 沈风飞, 石鹏君, 刘慧芹. 嗜热古菌 *Infirmifilum uzonense* 来源的双功能高温 β -葡萄糖苷酶 IuBgl3 的原核表达及酶学性质分析. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4644-4657.

LIU XH, SHEN FF, SHI PJ, LIU HQ. Expression and characterization of a bifunctional thermal β -glucosidase IuBgl3 from thermophilic archaeon *Infirmifilum uzonense*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4644-4657.

摘 要: β -葡萄糖苷酶在食品、医药、生物质转化等领域具有重要的应用价值, 因此发掘适应性强、性质优良的 β -葡萄糖苷酶是国内外研究热点。本研究从嗜热古菌 *Infirmifilum uzonense* 中成功克隆出一个 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶基因, 命名为 *Iubgl3*。基因序列分析显示 *Iubgl3* 全长为 2 109 bp, 编码 702 个氨基酸, 理论分子量为 77.0 kDa。将该基因在大肠杆菌中进行克隆表达并对纯化后的 IuBgl3 进行酶学性质研究。结果显示, 重组酶 IuBgl3 最适 pH 5.0, 最适温度 85 °C。该酶具有良好的热稳定性, 80 °C 处理 2 h 后仍能保持 85% 以上的酶活力。其具有优良的 pH 稳定性, 在 pH 4.0–11.0 范围内处理 1 h, 仍维持 85% 以上的酶活力。通过底物特异性测定发现, 该酶对对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl β -D-glucoside, *p*NPG) 和对硝基苯- β -D-吡喃木糖苷 (*p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside, *p*NPX) 均有很高的水解能力, 是典型的双功能酶。以 *p*NPG

Received: March 14, 2022; **Accepted:** May 6, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31760438, 32072166); Institute of Agricultural Products Processing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, ‘N Speciality’ (CAAS-ASTIP-2021-IFST-SN2021-11); Tianjin University Young Backbone Innovative Talents Training Program (J01009030709); Tianjin Enterprise Science and Technology Specialist Project (20YDTPJC01330); The Opening Foundation of Ningxia Key Laboratory for the Development and Application of Microbial Resources in Extreme Environments, China (2019TSWZ01)

Corresponding authors: SHI Pengjun. E-mail: shipengjun@caas.cn

LIU Huiqin. E-mail: wjxlhq@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31760438, 32072166); 中国农业科学院农产品加工研究所“N 专项” (CAAS-ASTIP-2021-IFST-SN2021-11); 天津市高校中青年骨干创新人才培养计划 (J01009030709); 天津市企业科技特派员项目 (20YDTPJC01330); 宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室开放课题 (2019TSWZ01)

为底物时的动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.38 mmol 和 248.55 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 催化效率 $k_{cat}/K_m=6\ 149.20\ \text{s}^{-1}\text{mmol}^{-1}$ 。大多数金属离子对 IuBgl3 的酶活力没有显著影响, SDS 可导致酶完全失活, 而 EDTA 却能提高 30% 的酶活力。本研究丰富了高温古菌 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶基因, 获得了一个稳定性优良的高温酸性双功能酶, 具有良好的工业应用前景。

关键词: 嗜热古菌; GH3 家族; β -葡萄糖苷酶; 酶学性质; 双功能酶

Expression and characterization of a bifunctional thermal β -glucosidase IuBgl3 from thermophilic archaeon *Infirmifilum uzonense*

LIU Xinhan¹, SHEN Fengfei², SHI Pengjun^{3,4}, LIU Huiqin¹

1 College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China

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

3 Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, Hunan, China

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

Abstract: β -glucosidase has important applications in food, medicine, biomass conversion and other fields. Therefore, exploring β -glucosidase with strong stability and excellent properties is a research hotspot. In this study, a GH3 family β -glucosidase gene named *Iubgl3* was successfully cloned from *Infirmifilum uzonense*. Sequence analysis showed that the full length of *Iubgl3* was 2 106 bp, encoding 702 amino acids, with a theoretical molecular weight of 77.0 kDa. The gene was cloned and expressed in *E. coli* and the enzymatic properties of purified IuBgl3 were studied. The results showed that the optimal pH and temperature for pNPG hydrolysis were 5.0 and 85 °C, respectively. The enzyme has good thermal stability, and more than 85% of enzyme activity can be retained after being treated at 80 °C for 2 h. This enzyme has good pH stability and more than 85% of its activity can be retained after being treated at pH 4.0–11.0 for 1 h. It was found that the enzyme had high hydrolysis ability to *p*-nitrophenyl β -D-glucoside (pNPG) and *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside (pNPX). When pNPG was used as the substrate, the kinetic parameters K_m and V_{max} were 0.38 mmol and 248.55 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, respectively, and the catalytic efficiency k_{cat}/K_m was 6 149.20 $\text{s}^{-1}\text{mmol}^{-1}$. Most metal ions had no significant effect on the enzyme activity of IuBgl3. SDS completely inactivated the enzyme, while EDTA increased the enzyme activity by 30%. This study expanded the β -glucosidase gene diversity of the thermophilic archaea GH3 family and obtained a thermostable acid bifunctional enzyme with good industrial application potential.

Keywords: thermophilic archaea; GH3 family; β -glucosidase; enzymatic properties; bifunctional enzymes

β -葡萄糖苷酶是纤维素降解酶系的重要组成部分, 可水解底物末端的非还原性 β -D-葡萄

糖苷键, 生成 β -D-葡萄糖及相关配基, 也被称为 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶 (E.C.3.2.1.21)。

β -葡萄糖苷酶广泛用于葡萄酒酿造、食品加工、生物质燃料生产和农业生产等领域。大多数天然酶由于反应条件温和而限制了其在工业中的应用^[1],而高温 β -葡萄糖苷酶凭借其优良的性质,在工业生产中占重要地位,被称为天然糖苷转化的理想催化剂^[2]。由于纤维素的分解通常在 50 °C 或更高的温度下长时间进行 (有时超过 100 h),该过程的较高温度不会影响高温 β -葡萄糖苷酶的活性,还有利于纤维素的水解,Liu 等研究发现源自烟曲霉菌 Z5 的高温 β -葡萄糖苷酶在分解木质纤维素时还可以降解多酚类化合物^[3]。多项研究表明,在工业生产过程中, β -葡萄糖苷酶可以很好地克服水解产物抑制水解速率的现象^[4-7]。高温 β -葡萄糖苷酶不仅可以提高催化效率,减少底物分解,还降低了污染风险和能源消耗^[8],将参与分解后的 β -葡萄糖苷酶回收重复利用,还可降低生产成本,绿色环保。

β -葡萄糖苷酶在真核生物、细菌、古菌中广泛存在^[9],主要参与生物体内糖代谢、细胞信号传导等过程,帮助维持生物体正常的生理功能^[10]。按照氨基酸序列一致性和结构相似性, β -葡萄糖苷酶分布于糖苷水解酶家族 (glycoside hydrolyzing family, GH) GH1、GH3、GH5、GH9、GH30 和 GH116 这 6 个家族中,其中微生物来源的 β -葡萄糖苷酶的研究主要集中在 GH1 和 GH3 两大家族^[11]。不同来源的 β -葡萄糖苷酶的分子量不同,一般在 70–330 kDa 之间,在结构和理化性质方面也存在较大差异,GH1 家族具有 $(\beta/\alpha)_8$ 桶装结构域,其中包含催化位点,具有良好的葡萄糖耐受性;而 GH3 家族具有典型的双结构域,即 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构域和 $(\beta/\alpha)_6$ 三明治夹层结构域,催化位点位于双结构域之间,对高浓度葡萄糖没有耐受性^[12]。另外,细菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多具有低温或 pH 中性的特点,真菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多具有耐酸

性的特点,而古菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多具有耐高温特性^[13]。

古菌是迄今为止发现的最古老的生物,与它们极端的生存环境有关。按照其生活环境和对养分的需求,将古菌分为:产甲烷菌 (methanogens)、极端嗜盐菌 (extreme halophiles)、极端嗜热菌 (extreme thermophiles) 和嗜冷菌 (psychrophiles) 4 大类群^[14]。由于古菌进化缓慢,保留了许多原始特征,与其他微生物相比,多数古菌来源的 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度更高,稳定性也更强,在食品、医药、生物质转化等领域被广泛应用。古菌来源的 β -葡萄糖苷酶主要集中在 GH1 家族,而 GH3 家族目前只报道了 1 个来源于新型超嗜热泉古菌门菌株 (*Infirmifilum lucidum*) 3507LT^T 的 β -葡萄糖苷酶,该酶最适催化条件为 85 °C、pH 6.0–6.7,是典型的高温葡萄糖苷酶^[15]。

嗜热古菌 *Thermofilum uzonense* 1807-2^T 属于热丝菌科,在 85 °C、pH 6.0–6.5 条件下生存。通过表型特征和系统发育分析,*T. uzonense* 1807-2^T 被重新归为 *Insolidifilum uzonense*^[15]。通过已发表的基因组序列分析发现,其编码 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶基因 *Iubgl3*。本研究将该酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中诱导表达并纯化,得到重组 β -葡萄糖苷酶,命名为 IuBgl3。对该酶的酶学性质进行研究,旨在为进一步开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株

E. coli DH5 α 为克隆宿主,*E. coli* BL21(DE3) 为表达宿主,均购自博迈德公司。

1.1.2 重组质粒

pET-30a(+)-*Iubgl3* 合成于通用生物系统

(安徽) 有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂

TGA Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit 12%购自 Bio-Rad 公司; 蛋白胨、酵母提取物均购自 Oxoid 公司; His-tag 蛋白纯化磁珠购自苏州海狸生物医学工程有限公司; 底物: 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl β -D-glucoside, *p*NPG)、对硝基苯 β -D-半乳糖苷 (*p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside, *p*NPGal)、对硝基苯- β -D-吡喃木糖苷 (*p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside, *p*NPX) 均购自 Megazyme 公司; 其他试剂均为国产分析纯, 购自北京化学试剂公司。

1.2.2 培养基及主要试剂的配制

培养基: LB 培养基 (1%氯化钠, 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母提取物), 卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL。

1 mol/L IPTG 溶液: 称取 2.383 g IPTG 溶解于 10 mL 蒸馏水中, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装储存于-20 $^{\circ}$ C。诱导时每 100 mL 培养基加 60 μ L。

NTA 缓冲液 (100 mL): 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 20 mL, 2 mol/L NaCl 溶液 25 mL, 1 mol/L 咪唑各取 0、2、4、6、8、10、20、30 mL, 分别为 NTA-0-300, 各梯度 pH 为 7.6。

4 mmol/L *p*-nitrophenyl β -D-glucoside (*p*NPG): 称取 0.054 g *p*NPG 充分溶解于 50 mL ddH₂O 中, -20 $^{\circ}$ C 储存备用。4 mmol/L *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside (*p*NPX): 称取 0.054 g *p*NPX 充分溶解于 50 mL ddH₂O 中, -20 $^{\circ}$ C 储存备用。4 mmol/L *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside (*p*NPGal): 称取 0.06 g *p*NPGal 充分溶解于 50 mL ddH₂O 中, -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.3 主要仪器

脱色摇床, 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; 电泳仪, 北京东方瑞利电泳设备有限公司; DK-8D 三孔电热恒温水槽, 上海齐欣科学仪器有限公司; pH 计, METTLER TOLEDO 公司; 超声波细胞破碎仪, 贝普斯科技有限公司; 紫外分光光度计, 菲勒仪器有限公司; 胶片观察灯, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 重组酶 *IuBgl3* 在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

(1) 诱导表达

将重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态, 取 200 μ L 转化后菌液涂于 LK 固体培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。选择测序正确的阳性转化子转接至 4 mL LK 培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 24 h, 以 1% (*V/V*) 接种量转接至 200 mL LK 培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min, 培养至菌液 *OD*₆₀₀ 在 0.4-0.8 之间, 加入 120 μ L IPTG (1 mol/L) 诱导蛋白表达, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 诱导培养 6 h。

(2) 蛋白浓度测定及纯化方法

诱导结束后将菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, NTA-0 重悬菌体, 超声破碎, 收集破碎上清即为粗酶。采用磁珠法纯化蛋白, 分别用不同浓度 NTA 缓冲液洗脱杂蛋白, 收集各浓度 NTA 洗脱的蛋白, 取 NTA-300 洗脱的蛋白, 使用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。按照牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 蛋白浓度测定方法绘制标准曲线, 测定蛋白含量。

1.3.2 重组酶 *IuBgl3* 的酶活力测定

采用 *p*NPG 法测定 *IuBgl3* 的酶活力: 分析 β -葡萄糖苷酶的活性用对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*NPG) 作底物 (*p*NPG 溶解在 pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 浓度为 4 mmol/L)。取 250 μ L *p*NPG 于试管中, 设 3 个平行和 1 个对照, 于 80 $^{\circ}$ C 水浴锅中温育 4 min 后, 各平行间隔 10 s 依次加入 250 μ L 适度稀释的酶液 (对

照不加), 80 °C 反应 10 min, 反应结束立即加入 1.5 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应并显现黄色, 各平行间隔 10 s, 冷却至室温 (对照组先加终止液后加对应浓度酶液), 使用分光光度计在 405 nm 处测定吸光值。

1.3.3 重组酶 IuBgl3 的最适温度及热稳定性测定

最适温度测定: 在不同温度下 (60–100 °C), 选用适当 pH 值的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释纯酶, 适当稀释倍数的酶液与底物 pNPG 进行酶促反应。

热稳定性测定: 在不同温度下 (70 °C、80 °C、90 °C), 处理不同时间 (0、0.5、1.0、2.0、3.0 h) 分别取样, 酶活力测定方法采用 pNPG 法。

1.3.4 重组酶 IuBgl3 的最适 pH 值及 pH 值稳定性测定

最适 pH 值测定: 最适温度下, 利用 pH 值 4.0–8.0 范围内柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液将纯酶分别稀释适当倍数, 测定酶活力, 以酶活力最高点为 100%。

pH 稳定性测定: 用不同 pH 缓冲液将纯酶稀释 10 倍, 37 °C 处理 1 h, 4 °C 冷却保温, 酶活力测定方法采用 pNPG 法。

1.3.5 重组酶 IuBgl3 的酶促反应动力学参数

在最适反应条件下, 以 pNPG 为底物, 测定 IuBgl3 在 0.1–2.0 mmol/L 不同底物浓度条件下的酶活力, 测定结果结合米氏方程和双倒数作图法来计算反应动力学参数 K_m 、 V_{\max} 和 k_{cat}/K_m 。

1.3.6 重组酶 IuBgl3 的底物特异性测定

测定重组酶在最适反应条件下对不同底物的降解能力, 选用底物: 4 mmol/L 的 pNPG、pNPM、pNPX、pNPGal、oNPG、纤维二糖、纤维三糖、龙胆二糖和槐糖。

1.3.7 不同金属离子和化学试剂对重组酶 IuBgl3 酶活力的影响

在最适反应条件下, 向反应体系中加入终

浓度为 5 mmol/L 的不同金属离子溶液或终体积为 5% 的不同化学试剂, 各处理设 3 个平行, 将未添加任何离子和试剂的反应设为对照, 以对照测得的酶活力为 100%, 测定 IuBgl3 的相对酶活力, 研究不同金属离子与化学试剂对 IuBgl3 酶活力的影响。

1.3.8 重组酶 IuBgl3 对甲醇、乙醇、葡萄糖耐受性测定

在最适反应条件下, 向反应体系中加入终体积为 5%、10%、20% 和 30% 的乙醇/甲醇, 以未添加乙醇/甲醇为对照, 研究不同浓度乙醇/甲醇对 IuBgl3 的酶活力影响, 测定方法同 1.3.2。

以最适 pH 值的 pNPG 为底物, 将稀释适当倍数的纯酶与不同浓度葡萄糖溶液 1:1 混合, 使葡萄糖终浓度分别为 0.5、1.0 和 2.0 mol/L, 将未加葡萄糖的反应体系设为对照, 以对照测得的酶活力为 100%, 在最适温度条件下测定 IuBgl3 的相对酶活力, 研究不同浓度葡萄糖对 IuBgl3 酶活力的影响。

2 结果与分析

2.1 重组酶 IuBgl3 基因序列分析

分析结果显示, β -葡萄糖苷酶 IuBgl3 基因长度为 2 109 bp, 编码 702 个氨基酸, 由氨基酸序列比对结果可知 IuBgl3 与已鉴定的来源于嗜热古菌中的热丝菌 (*Thermofilum adornatum*) 的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶 (WP_020961743.1) 序列一致性最高, 为 66.91%; IuBgl3 与已鉴定的来源于嗜热古菌 *Thermofilum pendens* 的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶 (Tpbgl) 的一致性为 60.77%; 与来源于嗜热细菌 *Thermotoga neapolitana* 的 β -葡萄糖苷酶 (2X42_A) 的序列一致性为 61.28%。上述结果表明 IuBgl3 属于 *Infirmifilum uzonense* 来源的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶, 具体

序列如图 1 所示。利用 SignalP 5.0 和 TMHMM 分析 IuBgl3 结构, 结果显示该酶不具有信号肽

和跨膜螺旋 (图 2、图 3), 是胞内酶, 故选择将 *Iubgl3* 基因在大肠杆菌中进行胞内表达。

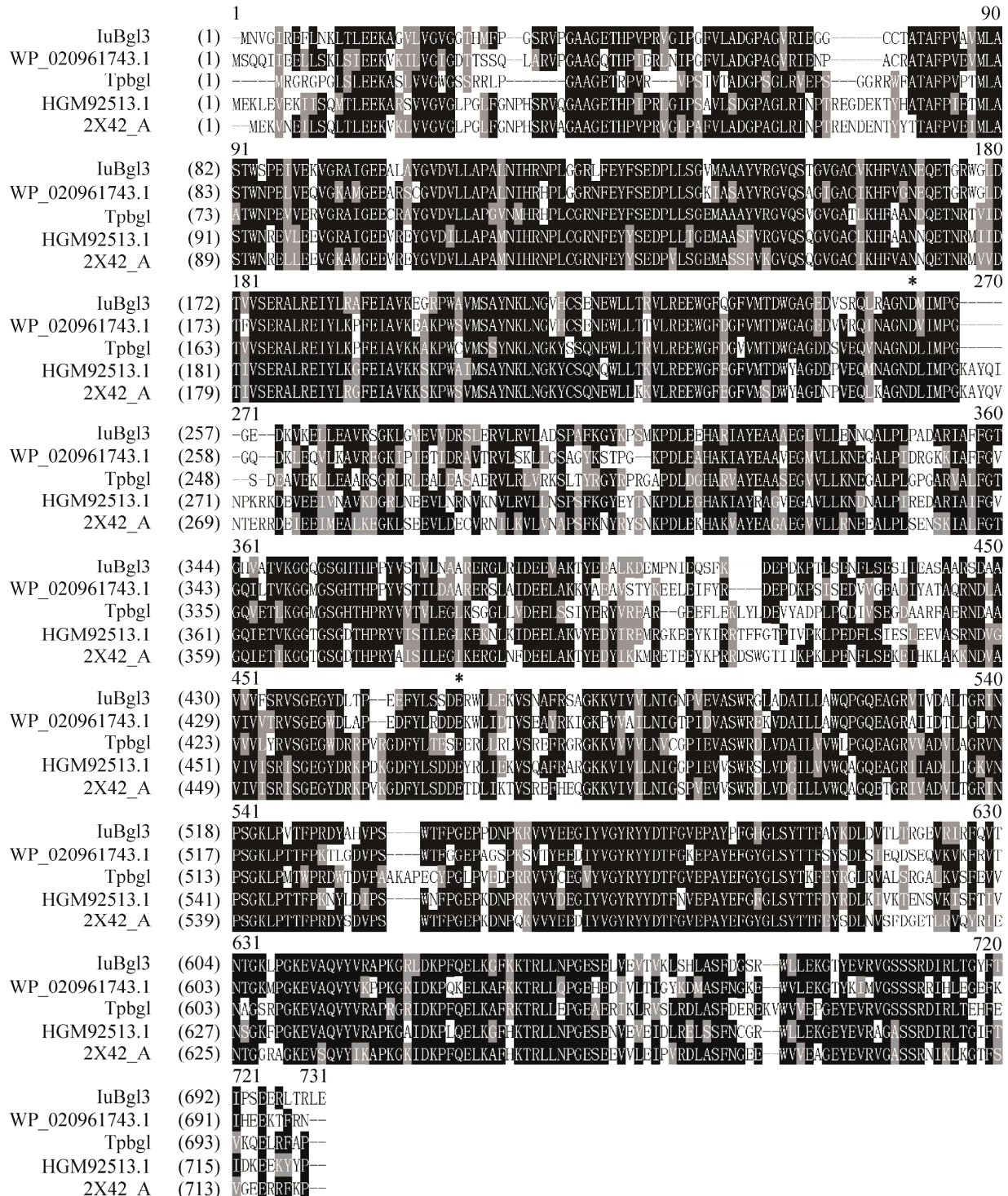


图 1 IuBgl3 氨基酸的多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of IuBgl3 amino acids. The catalytic sites marked with *.

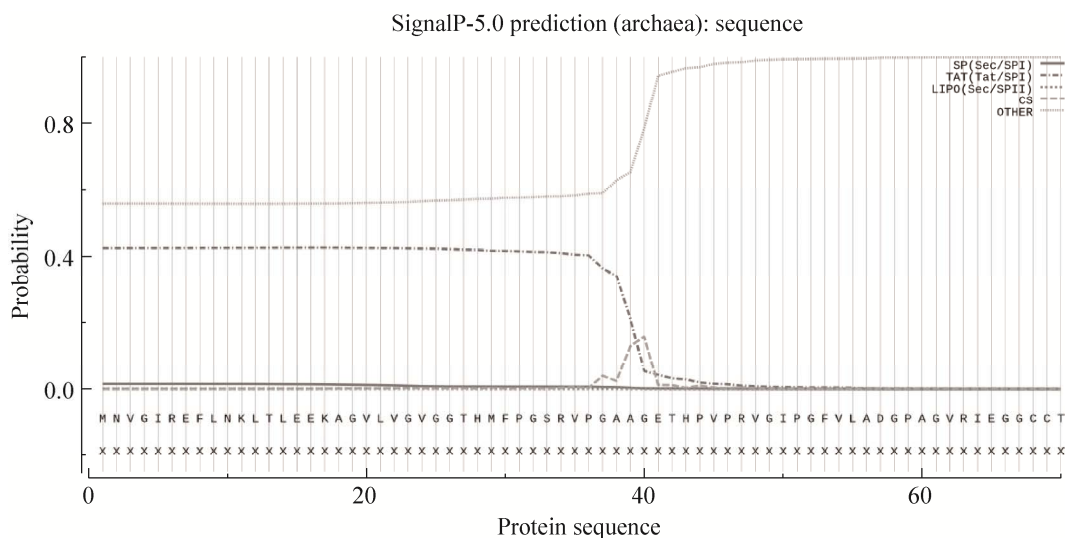


图2 IuBgl3 氨基酸序列信号肽预测结果

Figure 2 Prediction results of IuBgl3 amino acid sequence signal peptide.

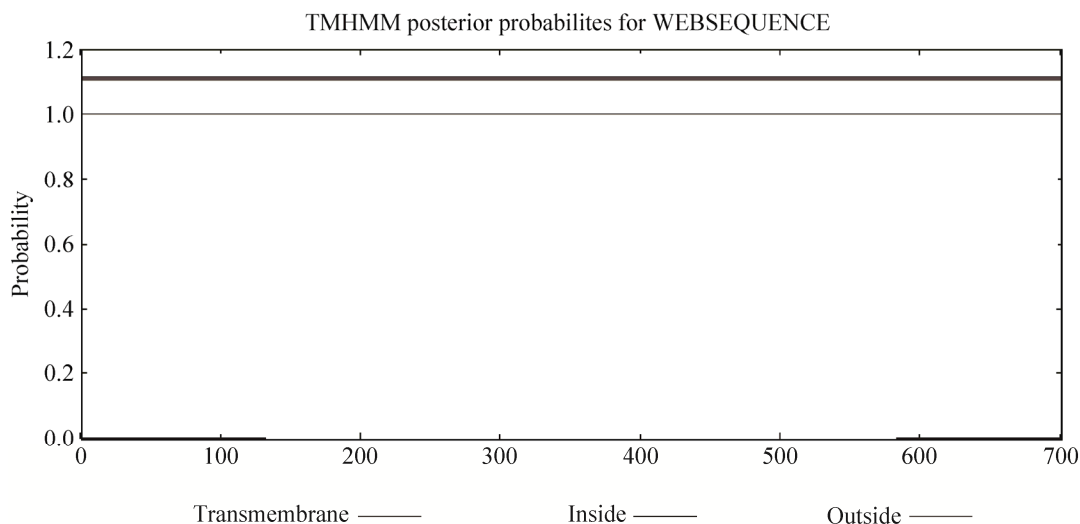


图3 IuBgl3 蛋白跨膜结构域的氨基酸排布示意图

Figure 3 Distribution of amino acids of the transmembrane domain of IuBgl3 protein.

2.2 重组酶 IuBgl3 在大肠杆菌中的表达纯化及 SDS-PAGE 分析

重组质粒 pET-30a(+)-IuBgl3 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 选择阳性转化子进行诱导表达, 分别收集加入 IPTG 前后菌液上清、粗酶上清、纯酶上清, 酶样品经 SDS-PAGE 检测, 如图 4 所示, 纯化后 β -葡萄糖苷酶

电泳条带显示分子量与理论分子量相符, 为 77.0 kDa。

2.3 IuBgl3 的酶学性质分析

2.3.1 重组酶 IuBgl3 的最适反应条件和稳定性分析

重组酶 IuBgl3 在不同温度下酶活力变化如图 5A 所示。IuBgl3 在温度 70–100 °C 范围内,

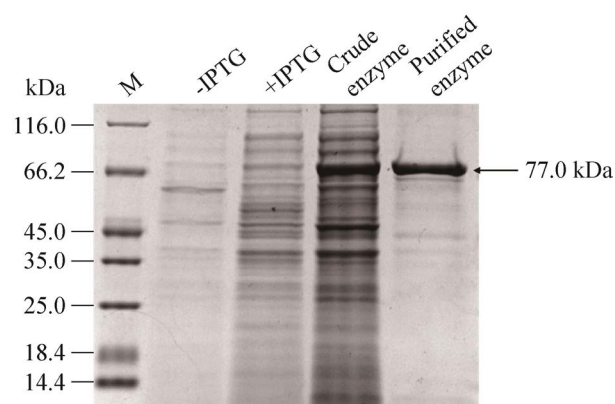


图 4 重组 β -葡萄糖苷酶 IuBgl3 的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant β -glucosidase IuBgl3. M: standard protein molecular weight marker; 1: supernatant before induction without IPTG; 2: supernatant after induction with IPTG; 3: broken supernatant after induction, namely crude enzyme; 4: purified protein.

反应温度低于 85 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活力随着温度升高不断上升; 反应温度为 85 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活力达最大值, 为最适反应温度; 随着温度继续升高, 酶活力不断下降, 反应温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 时, 相对酶活力下降到 58.56%; 反应温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, 相对酶活力仅剩 4.08%。

酶活力受 pH 的影响十分显著, 图 5B 表明, 在 pH 值为 5.0 的条件下, 酶活力最高, 为最适反应 pH。在 pH 低于 5.0 的条件下, 酶活力随 pH 值升高不断提高; 而当 pH 值高于 5.0 时, 酶活力随 pH 值增加逐渐降低。

重组酶 IuBgl3 的热稳定性如图 5C 所示。70 $^{\circ}\text{C}$ 保温处理 2 h, 酶活力稳定保持在最佳状态; 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温处理 2 h, 相对酶活力仍保留 85.52%, 继续加长保温时间, 酶活力则迅速下降, 当处理 3 h 后, IuBgl3 相对酶活力

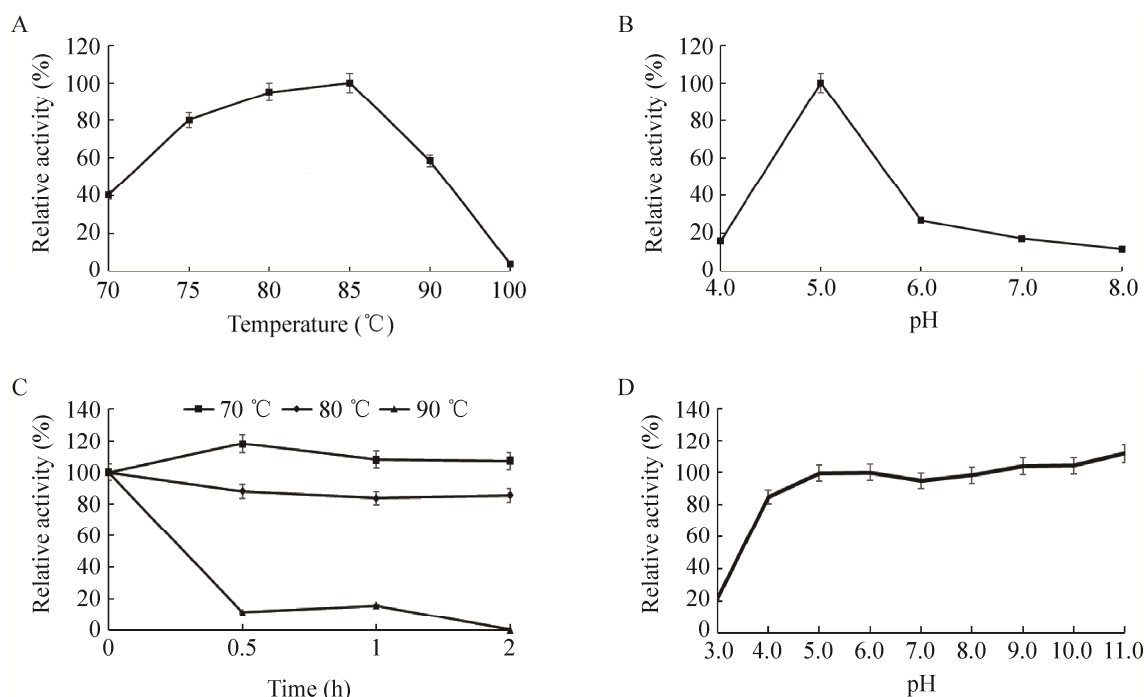


图 5 重组酶 IuBgl3 以 pNPG 为底物时的酶学性质

Figure 5 Enzymatic properties of the purified recombinant enzyme IuBgl3 when pNPG is substrate. (A) Effect of temperature on IuBgl3 enzyme activity. (B) Effect of pH on IuBgl3 enzyme activity. (C) Stability of IuBgl3 at different temperatures. (D) pH stability of IuBgl3. Error bars represent the standard error.

仅剩 5.96%；而在 90 °C 条件下保温处理 0.5 h，酶活力骤然下降，相对酶活力仅剩 11.46%，处理 2 h 后酶活力完全丧失。以上结果表明，重组酶 IuBgl3 在 70–80 °C 范围内具有良好的热稳定性。

适当稀释的纯酶经 pH 3.0–11.0 范围内不同 pH 缓冲液处理后，在最适条件下测定重组酶 IuBgl3 的 pH 稳定性，如图 5D 所示。稀释 10 倍的重组酶 IuBgl3 在 pH 4.0–11.0 的缓冲液中处理 1 h，依然可以保留 85% 以上的相对酶活力。该酶具有较好的 pH 稳定性，具有在不同领域应用的潜力。

2.3.2 重组酶 IuBgl3 的动力学参数分析

采用双倒数作图法得到一条直线，其回归方程为 $y=1.470\ 2x+4.364\ 3$ ($R^2=0.998\ 2$)，由此可计算其特征常数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.38 mmol/L 和 248.55 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ，催化效率 $k_{cat}/K_m=6\ 149.20\ \text{s}^{-1}\text{mmol}^{-1}$ 。

2.3.3 不同金属离子和化学试剂对重组酶 IuBgl3 酶活力的影响

表 1 结果显示， Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Co^{2+} 等金属离子的存在对 IuBgl3 的催化活性没有产生显著的影响； K^+ 、 Mg^{2+} 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Na^+ 等离子通过降低 10%–30% 的酶活力表现出不同程度的抑制作用，但仍能保持 60% 以上的酶活力。在 5 种常见酶抑制剂中，EDTA 的加入可使 IuBgl3 的酶活力提高 30% 左右；而其他 4 种化学试剂对该酶酶活力均具有不同程度地抑制，其中 IuBgl3 对异丙醇耐受性较好，酶活力受其影响较小；经甲醇 (methanol) 处理后，该酶损失 20% 左右酶活力；巯基乙醇 (β -mercaptoethanol) 可明显抑制 IuBgl3 的酶活力，使其失去 70% 左右的酶活力；SDS 为酶蛋白变性剂，加入后对酶有明显的失活作用。

表 1 不同金属离子和化学试剂 (5 mmol/L) 对重组酶 IuBgl3 酶活力的影响

Table 1 Effects of different metal ions and inhibitors (5 mmol/L) on the enzymatic activity of recombinase IuBgl3

Reagents	Relativity activity (%)
None	100.00 \pm 6.33
K^+	79.14 \pm 7.17
Ca^{2+}	69.77 \pm 6.76
Zn^{2+}	85.16 \pm 3.50
Mg^{2+}	76.08 \pm 4.31
Fe^{2+}	88.74 \pm 3.40
Fe^{3+}	66.87 \pm 5.46
Cu^{2+}	105.26 \pm 3.06
Na^+	87.10 \pm 4.10
Pb^{2+}	107.55 \pm 4.35
Ni^{2+}	86.94 \pm 6.63
Li^+	73.97 \pm 4.65
Cd^{2+}	98.22 \pm 4.57
Co^{2+}	101.73 \pm 4.65
SDS	ND
EDTA	130.45 \pm 7.32
β -mercaptoethanol	31.17 \pm 1.71
Methanol	77.61 \pm 0.50
Isopropanol	93.86 \pm 4.12

ND: not detected.

2.3.4 重组酶 IuBgl3 对不同浓度乙醇和甲醇的耐受性

(1) 不同浓度乙醇对 IuBgl3 酶活力的影响

在探究乙醇对 IuBgl3 酶活力的影响时发现，低浓度乙醇 (<5%) 可以保持并微弱提高酶活力，随着乙醇浓度升高，酶活力迅速降低，当乙醇浓度为 20% 时，相对酶活力仅剩 27.69% (图 6)。

(2) 不同浓度甲醇对 IuBgl3 酶活力的影响

由图 7 可以看出，高浓度甲醇对 IuBgl3 表现为失活作用，这种作用受甲醇浓度影响很大，低浓度甲醇 (<5%) 对酶活力影响不大，但随着甲醇浓度逐渐增加，酶活力被明显抑制，进而降低酶的催化效率。

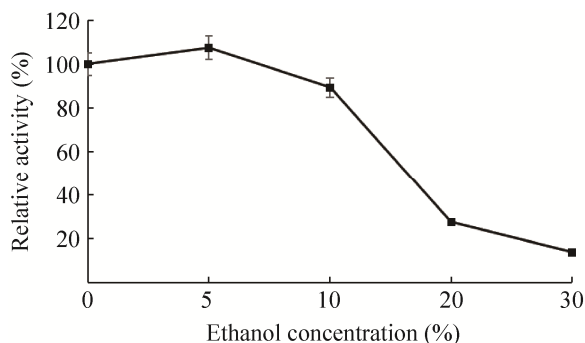


图 6 不同浓度乙醇对 IuBgl3 酶活力的影响
Figure 6 Effect of different concentrations of ethanol on IuBgl3 enzyme activity.

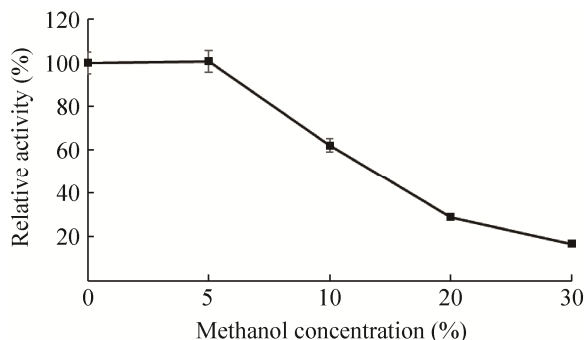


图 7 不同浓度甲醇对 IuBgl3 酶活力的影响
Figure 7 Effect of different concentrations of methanol on IuBgl3 enzyme activity.

2.3.5 不同浓度葡萄糖对 IuBgl3 酶活力的影响

如图 8 所示,随着葡萄糖浓度的增加,IuBgl3 的酶活力逐渐减弱。当反应体系的葡萄

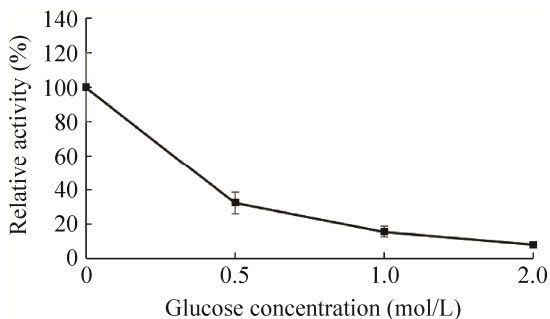


图 8 不同浓度葡萄糖对 IuBgl3 酶活力的影响
Figure 8 Effect of different concentrations of glucose on IuBgl3 enzyme activity.

糖浓度达到 2 mol/L 时, IuBgl3 的相对酶活力仅剩 7.81%,说明高浓度葡萄糖对酶活力具有明显的抑制作用,但当葡萄糖浓度为 0.25 mol/L 时, IuBgl3 的相对酶活力仍有 47%以上。

2.3.6 重组酶 IuBgl3 的底物特异性分析

在最适反应条件下,使用不同底物来测定和分析重组酶 IuBgl3 的底物特异性,结果如表 2 所示, IuBgl3 对 *p*NPG 和 *p*NPX 的活性相对高于其他人造底物,以 *p*NPG 为底物时,酶活力最高可达到 (224.74 ± 2.37) U/mg,而以 *p*NPX 为底物时,酶活力可达 (165.59 ± 6.42) U/mg,另外当底物为槐糖 (sophorise) 时,该酶也具有一定的酶活力,而重组酶 IuBgl3 对纤维二糖 (cellobiose)、纤维三糖 (1,4- β -D-celotriose)、龙胆二糖 (gentiobiose)、*p*NPman、*o*NPG 的水解能力均比较弱。这说明不同底物对 IuBgl3 的酶活力影响较大, IuBgl3 对 *p*NPG 和 *p*NPX 具有较强的水解能力,是一个双功能酶,重组酶 IuBgl3 在未来食品、饲料、燃料领域的应用中具有极大的潜力。

3 讨论

β -葡萄糖苷酶在微生物中普遍存在,是纤维素降解过程中的关键限速酶,广泛应用在食

表 2 IuBgl3 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of IuBgl3

Substrates	Specific activity (U/mg)
Disaccharide	
Sophorise	7.99 \pm 1.20
Cellobiose	ND
1,4- β -D-celotriose	ND
Gentiobiose	ND
Aryl β -glycoside	
<i>p</i> NPG	224.74 \pm 2.37
<i>p</i> NPX	165.59 \pm 6.42
<i>p</i> NPman	ND
<i>o</i> NPG	ND

ND: not detected.

品、医药、生物质转化等多个领域。表 3 列举了不同微生物来源的 β -葡萄糖苷酶及其酶学性质。为了拓宽 β -葡萄糖苷酶的应用范围,充分发挥其催化潜力,寻求酶学性质优良的 β -葡萄糖苷酶十分必要。众所周知,环境选择基因、基因影响结构、结构决定性质,因此广泛分布于海洋、温泉、土壤、沉积物、热液喷发口等特殊环境的古菌成为近年来的研究热点^[16]。古菌来源的 β -葡萄糖苷酶研究主要集中在 GH1 家族^[17-18],而对于 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的研究十分局限。多数古菌来源的 β -葡萄糖苷酶的 pH 值集中在 4.0–7.0 范围内,温度集中在 60–110 °C 之间,例如广古菌门激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 和最适反应温度分别为 5.0 和 102–105 °C^[19]; 来源于古菌热球菌属的超耐热菌 (*Thermococcus kodakarensis*) 的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 vul_bgl1A,其最适反应 pH 和最适反应温度分别为 7.0 和 105 °C^[20]; 以及唯一的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶来源于依赖热丝菌 (*Thermofilum pendens*)^[21],该酶的最适反应 pH 和最适反应温度分别为 3.5 和 90 °C。

本研究获得的重组酶 IuBgl3 来源于嗜热古菌 *Infirmifilum uzonense*, 该菌从堪察加半岛一酸性温泉沉积物中分离出来,IuBgl3 的最适反应温度为 85 °C,最适反应 pH 为 5.0,与多数古菌来源的 β -葡萄糖苷酶相似,都具有高温酸性的特点,由此可见,古菌来源的 β -葡萄糖苷酶的最适反应条件与其菌株的生存环境具有很高的一致性。

与古菌 *Pyrococcus furiosus*^[22]和 *Sulfolobus solfataricus*^[12]来源的 β -葡萄糖苷酶相比,重组酶 IuBgl3 也具有较好的热稳定性,在 70 °C 和 80 °C 高温条件下保温 2 h 可维持 85% 以上的酶活力。 β -葡萄糖苷酶的高温耐热特性在生物质加工中十分重要,高温不仅可以提高反应底物的溶解度,降低其黏度,减少了污染风险,同时也提高了反应的催化效率^[17]。大多数古菌来源的 β -葡萄糖苷酶的 pH 在 4.0–7.0 之间有较好的稳定性,而 IuBgl3 在酸性和碱性环境下均具有良好的稳定性,可在 pH 4.0–11.0 范围内保持 85% 以上的酶活力,具有很大的应用潜力。当反应体系 pH 值为 7.0 时,IuBgl3 的酶活力略微下降,可能由于当酸性酶所在的反应体系逐渐偏碱性时,碱性环境会对酶活性中心的必需基

表 3 不同微生物来源的 β -葡萄糖苷酶的性质比较

Table 3 Property comparison of β -glucosidase from different microbial sources

Organisms	Enzymes	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	K_m (mmol)	k_{cat}/K_m	References
<i>Infirmifilum uzonense</i>	IuBgl3	77.0	85	5.0	0.380	6 149.20	Present study
<i>Thermofilum pendens</i>	Tpbgl	77.8	90	3.5	0.149	3.05	[21]
<i>Pyrococcus furiosus</i>		230.0	102–105	5.0–6.0	0.150	ND	[19]
<i>Thermotoga</i> sp.	TsBgl1A	50.0	90	6.0	0.240	509.11	[33]
<i>Aspergillus niger</i>	NLAB280	330.0	70	4.6–5.3	1.110	60.06	[34]
<i>Bacillus subtilis</i>	BglH	53.0	45	6.0	0.150	147.00	[35]
<i>Penicillium piceum</i>	PpCel3B	92.0	60	5.0	0.003	933.33	[36]
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Bgl.tls	116.0	65	5.0	0.250	ND	[37]
<i>Thermotoga naphthophila</i>	Tnap0602	51.0	95	7.0	0.127	ND	[38]
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Bgl	52.0	70	6.5	0.620	ND	[39]
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	vul_bgl1A		105	7.0	1.770	ND	[20]

ND: not detected.

团产生一定影响,破坏酶与底物的结合,降低催化效率。而当 pH 值处于 8.0–11.0 时,该酶的 pH 稳定性逐渐增强,由于其等电点为 5.57,带负电的酶在碱性环境中,电子的互斥使蛋白质保持稳定的构象,这一特点与来源于土壤的 BglB 超家族的 β -葡萄糖苷酶 Bgl747 相似^[23]。

pNPG 和 pNPX 是典型的芳香基糖苷底物,本研究表明,当 IuBgl3 以 pNPG 为底物时,酶的比活力可达 (224.74 ± 2.37) U/mg,而以 pNPX 为底物时的比活力是最适底物对应比活力的 74%。与其他来源的酶相比,酶活力优势更加明显,例如,比活力为 (76.12 ± 5.40) U/mg 的 vul_bgl1A 来源于嗜热古菌 *Thermococcus kodakarensis*^[20]。IuBgl3 对槐糖 (β -1,2) 仅有微弱的水解能力,说明 IuBgl3 与底物槐糖分子之间存在微弱的亲水作用力;但对纤维二糖 (β -1,4) 和龙胆二糖 (β -1,6) 几乎没有活性。不同 β -葡萄糖苷酶由于结构不同导致可水解的底物不同,通常认为, GH3 家族的水解范围略窄,而 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶具有广泛的底物特异性,除了可以水解葡萄糖苷键外还可以水解半乳糖苷键、甘露糖苷键、木糖苷键和岩藻糖苷键等^[24],例如,来自芽孢杆菌的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 BsBgl1A 不仅可水解纤维素二糖、纤维素三糖、半乳糖,还可水解 pNPG 和 pNPX^[25]。前人研究发现,由于纤维二糖和龙胆二糖比槐糖分子的直角构型所需的空间更大^[26],所以该酶无法与这些底物进行有效结合,无法进行催化,而通过控制酶催化口袋的大小改变酶和底物的接触面积可以改变 β -葡萄糖苷酶的底物特异性。金属离子和化学试剂耐受性是酶促反应过程中的理想特性,本研究中 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 等金属离子的存在对 IuBgl3 的催化活性没有产生显著的影响,其他离子对酶活力表现出不同程度的抑制,但酶活力均保

持在 60%–98% 范围内,一项关于黑霉菌 β -葡萄糖苷酶的研究也发现了类似的金属效应趋势^[27]。添加蛋白质变性剂 SDS 可使该酶完全失活,这一性质与多数蛋白酶相似^[28],而 EDTA 的加入使酶活力提高了 30%。

重组酶 IuBgl3 对低浓度的乙醇、甲醇均具有一定的耐受性。具有一定构象的酶才会表现出催化活性,而酶的构象主要依赖于酶分子与水分子之间次级键的稳定性及酶活性中心的柔性^[29]。乙醇和甲醇均属于亲水性有机溶剂,本研究显示低浓度乙醇和甲醇溶液 (<5%) 对 IuBgl3 酶活力影响不大或略微提高酶活力,可能由于水分子通过参与非共价作用力来维持酶活性中心的柔性^[30]。随着乙醇和甲醇溶液浓度升高, IuBgl3 的酶活力显著降低,可能是由于有机溶剂改变了反应体系的疏水性,破坏了水分子参与的非共价作用力,导致酶构象发生改变,同时也增加了蛋白质失活的概率,所以有机溶剂含水量越低则酶活力越低。该酶这一特性与林建城等发现乙醇和甲醇等有机溶剂对南美对虾中几丁质酶 (NAGase) 酶活力的影响相似^[31–32]。

本研究获得 1 个重组酶 IuBgl3,其最适温度和最适 pH 分别为 85 °C 和 5.0,具有十分优良的 pH 稳定性和热稳定性,且可以高效水解 pNPG 和 pNPX 这两种底物,是一种典型的双功能高温酸性 β -葡萄糖苷酶。另外,该酶对大部分金属离子和有机溶剂也有一定的耐受性。本研究为后续深入探索 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的结构和稳定性提供了优质材料,也为该酶今后良好的工业化应用提供了理论支持。

REFERENCES

- [1] Yenenler A, Sezerman OU. Design and characterizations of two novel cellulases through single-gene shuffling of

- Cel12A (*EG3*) gene from *Trichoderma reesei*. Protein Eng Des Sel, 2016, 29(6): 219-229.
- [2] Zhang ZY, Wang M, Gao RJ, et al. Synergistic effect of thermostable β -glucosidase TN0602 and cellulase on cellulose hydrolysis. 3 Biotech, 2017, 7(1): 54.
- [3] Liu DY, Zhang RF, Yang XM, et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. Microb Cell Fact, 2012, 11: 25.
- [4] Teugjas H, Våljamäe P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. Biotechnol Biofuels, 2013, 6(1): 105.
- [5] Cao LC, Wang ZJ, Ren GH, et al. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 202.
- [6] Sharma S, Vaid S, Bhat B, et al. Thermostable enzymes for industrial biotechnology. Advances in Enzyme Technology. Amsterdam: Elsevier, 2019: 469-495.
- [7] Pei XQ, Yi ZL, Tang CG, et al. Three amino acid changes contribute markedly to the thermostability of β -glucosidase BglC from *Thermobifida fusca*. Bioresour Technol, 2011, 102(3): 3337-3342.
- [8] Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour Technol, 2003, 89(1): 17-34.
- [9] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. PNAS, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [10] 孙智. β -葡萄糖苷酶的研究进展. 化工设计通讯, 2021, 47(2): 144-145.
- Sun Z. Advances in β -glucosidase. Chem Eng Des Commun, 2021, 47(2): 144-145 (in Chinese).
- [11] 周林芳, 江波, 张涛, 等. 糖苷水解酶第 3 家族 β -葡萄糖苷酶的研究进展. 食品工业科技, 2017, 38(14): 330-335.
- Zhou LF, Jiang B, Zhang T, et al. Research progress of β -glucosidases of glycoside hydrolase family 3. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(14): 330-335 (in Chinese).
- [12] Aguilar CF, Sanderson I, Moracci M, et al. Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. J Mol Biol, 1997, 271(5): 789-802.
- [13] Goyal K, Selvakumar P, Hayashi K. Characterization of a thermostable β -glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity. J Mol Catal B Enzym, 2001, 15(1/2/3): 45-53.
- [14] 杨磊. 超嗜热古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 产高温 α -葡萄糖苷酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- Yang L. Studies on a thermostable α -glucosidase from hyperthermophilic archaea *Thermococcus siculi* HJ21. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
- [15] Zayulina KS, Elcheninov AG, Toshchakov SV, et al. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Infirmifilum lucidum* gen. nov. sp. nov., reclassification of *Thermofilum uzonense* as *Infirmifilum uzonense* comb. nov. and assignment of the family Thermofilaceae to the order Thermofilales ord. nov.. Syst Appl Microbiol, 2021, 44(4): 126230.
- [16] 姬雪莉, 林琪琪, 陈颖. 岩溶环境古菌的研究进展. 广东化工, 2022, 49(4): 89-92, 108.
- Ji XL, Lin QQ, Chen Y. Research progress on archaea in Karst environments. Guangdong Chem Ind, 2022, 49(4): 89-92, 108 (in Chinese).
- [17] Ariaenejad S, Nooshi-Nedamani S, Rahban M, et al. A novel high glucose-tolerant β -glucosidase: targeted computational approach for metagenomic screening. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 813.
- [18] Zverlov VV, Volkov IY, Velikodvorskaya TV, et al. *Thermotoga neapolitana* bglB gene, upstream of *LamA*, encodes a highly thermostable beta-glucosidase that is a laminaribiase. Microbiology (Reading), 1997, 143 (Pt 11): 3537-3542.
- [19] Bauer MW, Kelly RM. The family 1 beta-glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism. Biochemistry, 1998, 37(49): 17170-17178.
- [20] Schröder C, Eixenberger D, Suleiman M, et al. Characterization of an extremely thermo-active archaeal β -glucosidase and its activity towards glucan and mannan in concert with an endoglucanase. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(23/24): 9505-9514.
- [21] Li D, Li XL, Dang W, et al. Characterization and application of an acidophilic and thermostable β -glucosidase from *Thermofilum pendens*. J Biosci Bioeng, 2013, 115(5): 490-496.
- [22] Kengen SW, Luesink EJ, Stams AJ, et al. Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Eur J Biochem, 1993, 213(1): 305-312.
- [23] 戴爽, 李荷. β -葡萄糖苷酶 Bgl747 的定向筛选、重组表达与酶学性质. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2524-2533.
- Dai S, Li H. Targeted screening, recombinant expression

- and enzymatic properties of β -glucosidase Bgl747. Microbiol China, 2021, 48(8): 2524-2533 (in Chinese).
- [24] Sinha SK, Prakash Reddy K, Datta S. Understanding the glucose tolerance of an archaeon β -glucosidase from *Thermococcus* sp.. Carbohydr Res, 2019, 486: 107835.
- [25] Dong S, Liu YJ, Zhou HX, et al. Structural insight into a GH1 β -glucosidase from the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica*. Int J Biol Macromol, 2021, 170: 196-206.
- [26] 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[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- Xia W. Diversity and molecular engineering of glycoside hydrolyase family 3 β -glucosidases from thermophilic fungi[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [27] Gong GH, Zheng ZM, Liu H, et al. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin. J Microbiol Biotechnol, 2014, 24(6): 788-794.
- [28] Yin YR, Sang P, Yang FL, et al. Characterization of a Cu^{2+} , SDS, alcohol and glucose tolerant GH1 β -glucosidase from *Bacillus* sp. CGMCC 1.16541. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(10): 1467-1477.
- [29] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响. 化学进展, 2000, 12(3): 296-304.
- Peng LF. Effect of organic solvents on enzymatic activity and selectivity. Prog Chem, 2000, 12(3): 296-304 (in Chinese).
- [30] 汪世华, 张晓鹏, 陈明, 等. 有机溶剂和变性剂对枯草芽胞杆菌溶栓酶活性的影响. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 825-829.
- Wang SH, Zhang XP, Chen M, et al. Effects of organic solvents and denaturants on activity of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. Chin J Appl & Environ Biol, 2008, 14(6): 825-829 (in Chinese).
- [31] 林建城, 谢晓兰, 龚敏, 王悦, 陈清西. 有机溶剂对南美白对虾 N-乙酰- β D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(5): 693-696.
- Lin JC, Xie XL, Gong M, et al. Effects of different organic solvents on the activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn(*Penaeus vannamei*). J Xiamen Univ (Nat Sci Ed), 2005, 44(5): 693-696 (in Chinese).
- [32] 林建城, 陈郁花, 林俊兵. 有机溶剂及变性剂对南美白对虾体壁几丁质酶的影响. 海洋通报, 2007, 26(4): 61-65.
- Lin JC, Chen YH, Lin JB. Effects of organic solvents and denaturants on the activity of chitinase from the integument of the prawn (*Penaeus vannamei*). Mar Sci Bull, 2007, 26(4): 61-65 (in Chinese).
- [33] 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[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- Sheng LL. Heterologous expression and molecular modification of *Thermotoga* sp. β -glucosidase, and its application in preparation of gentiooligosaccharides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [34] Rashid MH, Siddiqui KS. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Aspergillus niger*. Folia Microbiol (Praha), 1997, 42(6): 544-550.
- [35] Kuo LC, Lee KT. Cloning, expression, and characterization of two beta-glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. J Agric Food Chem, 2008, 56(1): 119-125.
- [36] Gao L, Gao F, Zhang DY, et al. Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. Bioresour Technol, 2013, 147: 658-661.
- [37] Mallek-Fakhfakh H, Belghith H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. Carbohydr Res, 2016, 419: 41-50.
- [38] Kong FS, Yang JW, Zhen Z, et al. Gene cloning and molecular characterization of a β -glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10: an effective tool for synthesis of galacto-oligosaccharide and alkyl galactopyranosides. Chem Res Chin Univ, 2015, 31(5): 774-780.
- [39] Pei JJ, Pang Q, Zhao LG, et al. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. Biotechnol Biofuels, 2012, 5(1): 31.

(本文责编 陈宏宇)