

· 食品生物技术 ·

嗜酸古菌 *Cuniculiplasma divulgatum* 来源的 GH1 家族中温 β -葡萄糖苷酶 CdBglA 的原核表达及酶学性质分析

何金见¹, 沈风飞³, 刘鑫涵¹, 杨天均⁴, 李宝通¹, 石鹏君^{2*}, 刘慧芹^{1*}, 曾婉宁¹

1 天津农学院园艺园林学院, 天津 300392

2 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205

3 江西中洪博元生物技术有限公司, 江西 南昌 330200

4 绥江县兴邦农业开发有限公司, 云南 昭通 657700

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 β -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 Jinjian, SHEN Fengfei, LIU Xinhuan, YANG Tianjun, LI Baotong, SHI Pengjun, LIU Huiqin, ZENG Wanning. Expression and characterization of mesophilic GH1 β -glucosidase CdBglA from acidophilic *Cuniculiplasma divulgatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4694-4707.

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的热点。本文对尚未报道的来源于嗜酸古菌 (*Cuniculiplasma divulgatum*) GH1 家族的葡萄糖苷酶进行了克隆表达和酶学性质测定, 以期找到更优的 β -葡萄糖苷酶。从 NCBI 数据库中获取了 *C. divulgatum* 来源的 GH1 葡萄糖苷酶氨基酸序列, 然后制备重组质粒 pET-30a(+)-CdBglA, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达重组蛋白, 对纯化后的 CdBglA 进行酶学性质研究。结果发现, 重组酶 CdBglA 的分子量为 56.0 kDa, 最适 pH 为 5.5, 最适温度为 55 °C。该酶具有良好的 pH 稳定性, 在 pH 5.5–11.0 范围内处理 1 h, 仍维持 92.33% 以上的酶活力。以 pNPG 为底物时的酶促反应动力学参数 K_m 、 V_{max} 和 K_{cat}/K_m 分别为 0.81 mmol、291.99 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 和 387.50 $\text{s}^{-1} \text{mmol}^{-1}$ 。其在终浓度 5 mmol/L 重金属离子的影响下均能保持 90.33% 以上的酶活力; 在 15% 的乙醇溶液中酶活力被提高了 28.67%, 在 20% 的乙醇溶液中酶活力保

资助项目: 国家自然科学基金(32072166); 新疆维吾尔自治区二次引进项目(2022008); 中国农业科学院农业科技创新专项基金(ASTIP-IBFC); 宁夏回族自治区特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室开放课题(2019TSWZ01); 天津市研究生科研创新项目(2022SKYZ073)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072166), the Secondary Introduction Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022008), the Agricultural Science and Technology Innovation Foundation of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ASTIP-IBFC), the Ningxia Hui Autonomous Region Special Habitat Microbial Resource Development and Utilization Key Laboratory Open Project (2019TSWZ01), and the Tianjin Graduate Research and Innovation Project (2022SKYZ073).

*Corresponding authors. E-mail: SHI Pengjun, shipengjun@caas.cn; LIU Huiqin, wjxlhq@126.com

Received: 2023-04-18; Accepted: 2023-07-10; Published online: 2023-10-10

持不变, 在 30% 的乙醇溶液中仍保持 43.68% 的酶活力; 该酶在 0–1.5 mol/L 的 NaCl 溶液中具有明显的激活作用并且可以耐受 0.8 mol/L 葡萄糖。研究表明, CdBglA 是酸性中温酶, 具有宽泛的 pH 稳定性, 且对大部分金属离子、有机溶剂、NaCl 和葡萄糖都具有很强的耐受性。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: 嗜酸古菌; GH1 家族; β -葡萄糖苷酶; 乙醇耐受性; 酶学性质

Expression and characterization of mesophilic GH1 β -glucosidase CdBglA from acidophilic *Cuniculiplasma divulgatum*

HE Jinjian¹, SHEN Fengfei³, LIU Xinhan¹, YANG Tianjun⁴, LI Baotong¹, SHI Pengjun^{2*}, LIU Huiqin^{1*}, ZENG Wanning¹

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

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

3 Jiangxi Zhonghong Boyuan Biotechnology Co., Ltd., Nanchang 330200, Jiangxi, China

4 Suijiang Xingbang Agricultural Development Co., Ltd., Zhaotong 657700, Yunnan, China

Abstract: β -glucosidase has important applications in food, pharmaceuticals, biomass conversion and other fields, exploring β -glucosidase with strong adaptability and excellent properties thus has received extensive interest. In this study, a novel glucosidase from the GH1 family derived from *Cuniculiplasma divulgatum* was cloned, expressed, and characterized, aiming to find a better β -glucosidase. The amino acid sequences of GH1 family glucosidase derived from *C. divulgatum* were obtained from the NCBI database, and a recombinant plasmid pET-30a(+)-CdBglA was constructed. The recombinant protein was induced to express in *Escherichia coli* BL21(DE3). The enzymatic properties of the purified CdBglA were studied. The molecular weight of the recombinant CdBglA was 56.0 kDa. The optimum pH and temperature were 5.5 and 55 °C, respectively. The enzyme showed good pH stability, 92.33% of the initial activity could be retained when treated under pH 5.5–11.0 for 1 h. When pNPG was used as a substrate, the kinetic parameters K_m , V_{max} and K_{cat}/K_m were 0.81 mmol, 291.99 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, and 387.50 $\text{s}^{-1} \text{mmol}^{-1}$, respectively. 90.33% of the initial enzyme activity could be retained when CdBglA was placed with various heavy metal ions at a final concentration of 5 mmol/L. The enzyme activity was increased by 28.67% under 15% ethanol solution, remained unchanged under 20% ethanol, and 43.68% of the enzyme activity could still be retained under 30% ethanol. The enzyme has an obvious activation effect at 0–1.5 mol/L NaCl and can tolerate 0.8 mol/L glucose. In conclusion, CdBglA is an acidic and mesophilic enzyme with broad pH stability and strong tolerance to most metal ions, organic solvents, NaCl and glucose. These characteristics may facilitate future theoretical research and industrial production.

Keywords: *Cuniculiplasma divulgatum*; GH1 family; β -glucosidase; ethanol tolerance; enzymatic properties

β -葡萄糖苷酶(β -D-glucosidase, EC3.2.1.21), 亦称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 别名龙胆二糖酶、纤维二糖酶和苦杏仁苷酶, 是纤维素分解酶系中的重要组成部分, 能够水解 β -D-葡萄糖键并释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基, 广泛应用于生物燃料、制药工业、食品工业、饲料行业和纺织工业等众多领域^[1-2]。 β -葡萄糖苷酶的应用在很大程度上受到反应条件、产物抑制、稳定性差等因素的制约, 而具有独特属性(如乙醇、葡萄糖、NaCl 激活和耐受性, 底物特异性, 热稳定性等)、可应对复杂环境的 β -葡萄糖苷酶凭借其优良性质, 在工业生产中占据重要地位^[2-4]。有关 β -葡萄糖苷酶的报道表明, 它们在 40–70 °C 的温度和 pH 5.0–8.0 之间具有最佳活性, 然而某些工业应用要求酶的活性往往超过此范围。例如, 由于果汁的 pH 在 2.8–3.8 的范围内, 在酸性 pH 下具有最佳活性的酶将更适合释放糖酸结合挥发物以增强风味; 此外, 许多 β -葡萄糖苷酶被水解反应的终产物(即葡萄糖)抑制水解速率, 给它们在工业规模的使用造成了重大阻碍^[2]。因此, 发掘嗜酸、耐受葡萄糖等具有独特属性的酶是许多酶学研究的主要关注点。

β -葡萄糖苷酶广泛存在于细菌、真菌和动植物中, 可参与微生物、植物、动物和人体的大多数生化反应, 在生物机体的正常运行过程中发挥着重要作用^[5-6]。依据结构划分, β -葡萄糖苷酶分布于 GH1、GH3、GH5、GH9、GH30 和 GH116 这 6 个糖苷水解酶家族(glycoside hydrolyzing family, GH)中, 其中 GH1 和 GH3 被广泛研究报道^[7]。GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶结构较简单, 表现为典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构域和袋状催化通道, 通常具有良好的葡萄糖耐受性; 而 GH3 家族的

β -葡萄糖苷酶结构相较复杂, 同时具有 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构域、 $(\beta/\alpha)_6$ 夹心结构域和未知功能的 FnIII 结构域, 通常不具有高浓度葡萄糖耐受性^[3,7-8]。另外, 细菌、真菌和酵母等不同来源的 β -葡萄糖苷酶具有不同的酶学属性, 大多数 β -葡萄糖苷酶在 40–70 °C 的温度范围和 pH 5.0–8.0 的范围内具有最佳活性。其中细菌来源的 β -葡萄糖苷酶往往呈现出低温或中性的特点, 真菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多呈现出嗜酸或耐酸特性, 而古菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多具有嗜热或耐高温特性^[3,9], 如激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*)^[8]、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)^[10]、嗜热球菌(*Thermococcus kodakarensis*)^[11]、嗜酸热原体(*Thermoplasma acidophilum*)^[12]、嗜热球菌(*Thermococcus* sp.)^[13] 和糖酸叶菌(*Acidilobus saccharovorans*)^[14]。

本研究从 NCBI 数据库中得到一种嗜酸古细菌(*Cuniculiplasma divulgatum*)来源的 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶(命名为 CdBglA)基因, 将其在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中进行表达, 并对表达、纯化后的 β -葡萄糖苷酶进行系统的酶学性质测定和分析, 以期拓展古菌来源的新型 β -葡萄糖苷酶的种类提供参考。

1 材料与方法

1.1 穿刺菌株和重组质粒

重组质粒 pET-30a(+)-CdBglA 及穿刺菌株 pET-30a(+)-CdBglA [BL21(DE3)]均由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.2 试剂和主要设备仪器

1.2.1 试剂及检测试剂

对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷

(*p*-nitrophenyl- β -D-glucoopyranoside, *p*NPG)购自 Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit)购自北京百奥莱博科技有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物、卡那霉素和组氨酸标签蛋白纯化磁珠等其他化学试剂为进口或国产分析纯。

1.2.2 培养基及相关溶液

LB 液体培养基: 5 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g NaCl, 用蒸馏水定容至 1 000 mL 进行分装, 然后 121 °C 灭菌 15 min。

LB 固体培养基: 5 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g NaCl, 20 g 琼脂粉, 用蒸馏水定容至 1 000 mL 进行分装, 然后 121 °C 灭菌 15 min。

50 mg/mL 卡那霉素: 称取 500 mg 卡那霉素溶解于足量水中, 定容至 10 mL, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装成 1 mL 小份存于 -20 °C。

1 mol/L IPTG 溶液: 取 2.383 g IPTG, 用蒸馏水定容至 10 mL, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装成 1 mL 小份存于 -20 °C。

0.1 mol/L 柠檬酸溶液: 称取 19.2 g 柠檬酸固体粉末, 先充分溶解于少量蒸馏水中, 然后定容至 1 000 mL, 4 °C 保存备用。

0.2 mol/L Na₂HPO₄ 溶液: 称取 28.4 g Na₂HPO₄ 固体粉末, 先充分溶解于少量蒸馏水中, 然后定容至 1 000 mL, 4 °C 保存备用。

8 mmol/L *p*NPG 底物: 称取 0.108 g *p*NPG 固体粉末超声溶解于 50 mL 蒸馏水中, -20 °C 保存备用。

1.2.3 设备仪器

超净工作台购自北京东联哈尔仪器制造有限公司; PCR 扩增仪购自 Bio-Rad 公司; 磁力搅拌器购自 Kylin-bell 仪器制造有限公司; 台式高速离心机购自湖南赫西仪器装备有限公司; 立式压力灭菌器购自上海博迅实业有限公司;

WD-9406 型胶片观察灯购自北京六一仪器厂; 其他仪器如电热恒温水槽、超声波细胞破碎仪等均为国产仪器。

1.3 方法

1.3.1 CdBglA 的诱导、纯化及检测

将过夜培养活化的 pET-30a(+)-CdBglA 菌液以 1% 的比例接种于 300 mL 含卡那霉素(50 mg/mL)的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 3-4 h 后, 添加 180 μ L 1 mol/L IPTG 溶液(每 100 mL LB 添加 60 μ L IPTG), 37 °C、220 r/min 振荡培养 4-6 h。培养结束后对菌液进行离心(12 000 r/min、4 °C、10 min)、超声破碎(运行条件: 25 min、6/10 s、35%、冰浴)、粗酶收集(破碎上清)和酶活力检测。然后使用 His-tag 磁珠纯化蛋白质并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳验证。

1.3.2 CdBglA 的酶活力测定

采用 *p*NPG 法测定 CdBglA 的酶活力, 即以 *p*NPG 为底物测定 CdBglA 的酶活力, 反应总体积为 2 mL (250 μ L+250 μ L+1.5 mL), 每组实验设置 3 个生物学平行和 1 个对照, 具体方法如下: 取 250 μ L *p*NPG (4 mmol/L)底物和 250 μ L 适当稀释倍数的纯化酶液于玻璃试管中, 置于 55 °C 恒温水浴锅中计时反应 10 min, 使酶分子与底物充分结合, 反应完成后添加 1.5 mL Na₂CO₃ (1 mol/L)溶液终止反应, 待反应体系冷却至室温后, 使用光谱仪在 405 nm 测定吸光度。

1.3.3 CdBglA 的最适温度及热稳定性测定

将适当 pH 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释的纯化酶液在不同温度(30-70 °C)下进行酶促反应, 以酶活力最高点为 100%, 从而测定 CdBglA 的最适温度。

将 CdBglA 在不同温度下(55、60 °C)进行不同时间(0、10、30、60 min)的处理后分别取样,

然后使用最适 pH 值缓冲液稀释至适当倍数,以未处理酶液的酶活力为参照,测定 CdBglA 的相对酶活力以探究其热稳定性。

1.3.4 CdBglA 的最适 pH 及 pH 稳定性测定

将稀释后的纯化酶在不同 pH (3.0–11.0)缓冲液中进行酶促反应,测定 CdBglA 的最适 pH。

将 10 倍稀释的纯化酶在不同的 pH 缓冲液中 37 °C 恒温处理 1 h,然后使用最适 pH (pH 5.5)的缓冲液稀释至适当倍数,在最适温度(55 °C)下测定 CdBglA 剩余酶活力。以未处理酶液的酶活力为 100%,测定不同 pH 处理后的相对酶活力。

1.3.5 CdBglA 酶促反应动力学常数

在最适 pH (pH 5.5)和最适温度(55 °C)条件下,用不同浓度的 *p*NPG (0.1–2.0 mmol/L)为底物测定 CdBglA 的酶活力,测定结果使用 Lineweaver-Burk 作图法制备标准曲线,即可获得酶促反应动力学常数 K_m 、 V_{max} ,最后通过进一步计算即可获取催化效率值 K_{cat}/K_m 。

1.3.6 CdBglA 的底物特异性测定

在最适 pH (pH 5.5)和最适温度(55 °C)条件下,测定 CdBglA 对合成底物(*p*NPG、*o*NPG、*p*NPM、*p*NPGal 和 *p*NPX)和天然底物(槐糖、纤维二糖和龙胆二糖)的水解能力。

1.3.7 金属离子和化学试剂对 CdBglA 酶活力的影响

在酶活力测定体系中加入不同浓度的金属离子溶液或化学试剂溶液,然后置于 55 °C 反应 10 min 测定酶活力,每组处理设置 3 个生物学平行和 1 个对照,来探究金属离子/化学试剂对 CdBglA 的影响。

1.3.8 CdBglA 对甲醇、乙醇、NaCl 和葡萄糖的耐受性测定

在最适 pH (pH 5.5)和最适温度(55 °C)条件下,向酶活力测定体系中加入初始浓度为 10%、

20%、30%、40%、50%、60%、80%的甲醇/乙醇溶液来测定酶活力(以未添加甲醇/乙醇溶液为对照),探究甲醇/乙醇对 CdBglA 酶活力的影响。

在最适 pH (pH 5.5)和最适温度(55 °C)条件下,将稀释所需倍数的纯化酶 CdBglA 和初始浓度为 0.2、0.5、1.0、1.6、2.0、3.0、4.0 mol/L 的 NaCl/葡萄糖溶液按体积 1:1 进行混合,并且以未添加 NaCl/葡萄糖溶液的测定体系为对照测定酶活力,探究 NaCl/葡萄糖对 CdBglA 的影响。

2 结果与分析

2.1 CdBglA 基因序列分析

基因序列分析表明,CdBglA 基因序列长度为 1 446 bp,编码 481 个氨基酸,其蛋白质的分子量为 56.0 kDa。由氨基酸序列比对结果可知(图 1),CdBglA 与来源于嗜酸嗜温古菌 *C. divulgatum* 第 1 家族假设的 β -葡萄糖苷酶基因(WP_148690069.1)序列一致性最高为 97.71%,与来源于嗜酸古菌(*Acidilobus saccharovorans*)^[15]的 β -葡萄糖苷酶(4HA3_A)的序列一致性仅为 49%,与来源于硫磺矿硫化叶菌(*Saccharolobus solfataricus*)^[16]的 β -葡萄糖苷酶(5I3D_A)的序列一致性仅为 47%。上述结果表明 CdBglA 属于 *C. divulgatum* 来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶。

2.2 CdBglA 的表达纯化及 SDS-PAGE 分析

将质粒 pET-30a(+)-CdBglA 转化到 *E. coli* BL21(DE3)进行诱导表达,收集菌液、粗酶和纯化酶上清,然后将处理后的酶蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳检测效果,结果如图 2 所示,纯化后的 CdBglA 蛋白质条带为 56.0 kDa,与理论分子量相符。

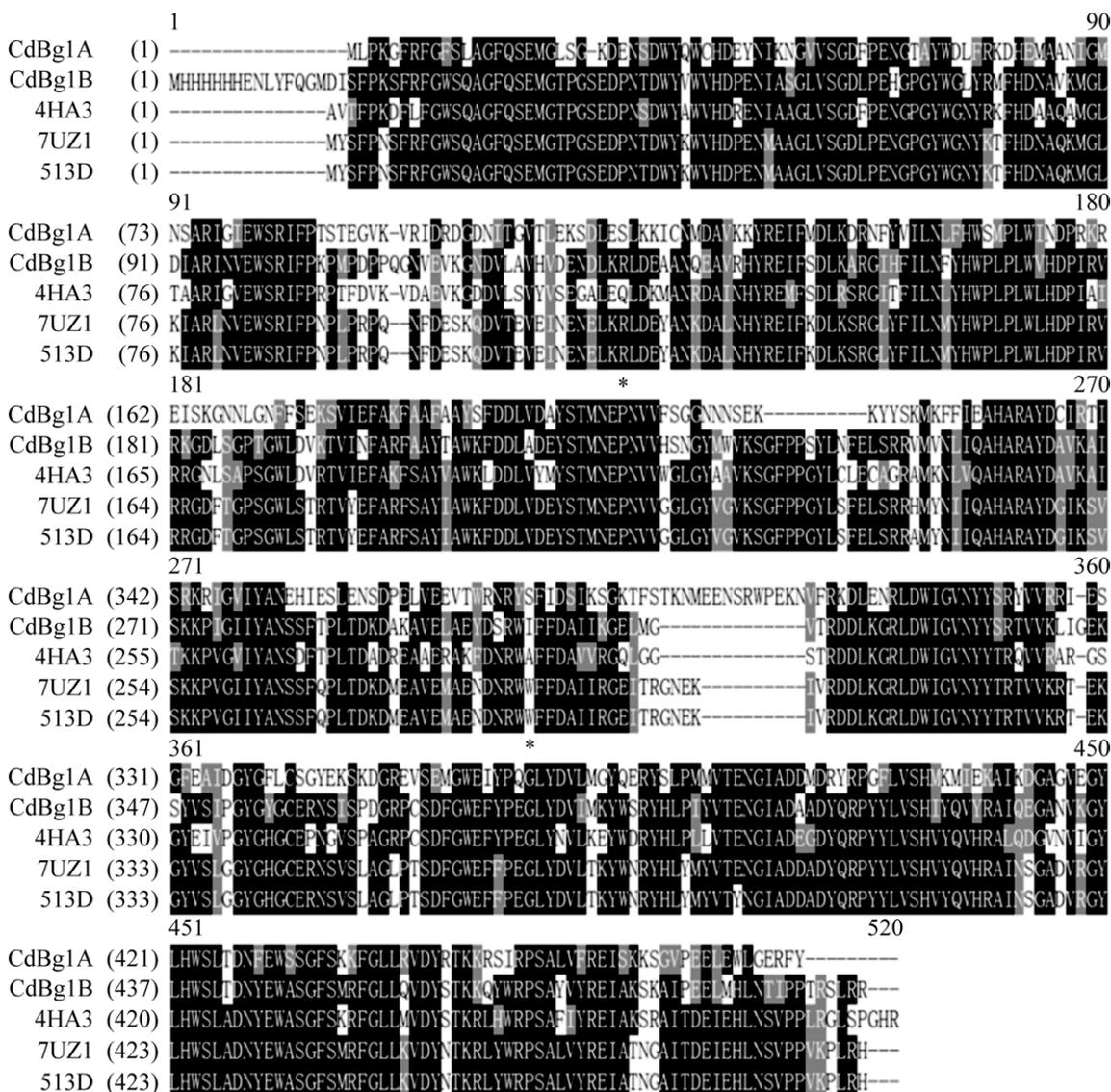


图 1 *CdBglA* 基因与 GH1 家族其他成员的多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of *CdBglA* gene with other members of the GH1 family.

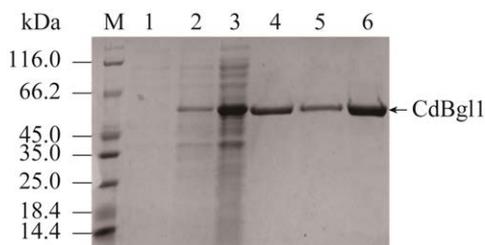


图 2 β -葡萄糖苷酶 CdBglA 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the β -glucosidase CdBglA. M: Protein marker; 1: The sample without IPTG; 2: The sample with IPTG; 3: Broken supernatant; 4-6: Purified protein.

2.3 重组酶的酶学性质

2.3.1 CdBglA 的最适温度、pH 和热稳定性、pH 稳定性分析

温度对 CdBglA 酶活力的影响显著(图 3A), 酶活力整体趋势呈抛物线型。CdBglA 在 55 °C 时酶活力达到最大值, 在低于 55 °C 时呈上升趋势, 在高于 55 °C 时呈下降趋势; 并且当温度持续升高时, 酶活力下降迅速, 当温度为 70 °C 时, 酶活力仅剩 9.85%。

CdBglA 对 pH 变化反应敏感(图 3B), 在 pH 值为 5.5 时, 酶活力最高。在 pH 低于 5.5 时, 酶活力随 pH 上升而提高; 在 pH 高于 5.5 时, 酶活力随 pH 上升而降低。

CdBglA 在中温条件下具有较好的热稳定性。55 °C 恒温处理 0–60 min 后, CdBglA 酶活力整体呈下降趋势(图 3C), 但 55 °C 恒温处理 60 min 后, 酶活力仍保留 53.72%; 60 °C 恒温处理 30 min 后, 酶活力损失明显, 仅剩 16.19%, 恒温处理 60 min 酶活力完全损失。因此, 重组酶 CdBglA 在 55 °C 或更低的温度下具有良好的热稳定性。

CdBglA 在中碱性条件下稳定。将 10 倍稀释的纯化酶 CdBglA 在 pH 3.0–11.0 的缓冲液中 37 °C 处理 1 h, 然后在最适条件下测定其相对酶活力, 以此探究其 pH 稳定性。如图 3D 所示, CdBglA 在 pH 4.0 条件下具有 46.71% 的酶活力, 在 pH

5.5–11.0 范围内依然保留 92.37% 以上的酶活力。

2.3.2 CdBglA 的酶促反应动力学常数分析

以 pNPG 为底物测定 CdBglA 的酶活力, 然后根据 Lineweaver-Burk 作图法制备标准曲线 [$y=2.765x+3.4248$ ($R^2=0.9969$)] 可得酶促反应动力学常数 K_m 为 0.81 mmol、 V_{max} 为 291.99 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 通过进一步计算得知 CdBglA 的催化效率 K_{cat}/K_m 值为 $387.50 \text{ s}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$ 。

2.3.3 金属离子及化学试剂对 CdBglA 酶活力的影响

如表 1 所示, 大部分金属离子对 CdBglA 的催化活性几乎没有影响, 只有极少部分金属离子, 如 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 等, 对重组酶 CdBglA 的酶活力有轻微的抑制作用, 但酶活力均保持在 90.34% 以上。6 种常见化学试剂对 CdBglA 的酶活力有不同的影响, 5 mmol/L EDTA 和 5% 甲醇对 CdBglA 的酶活力有轻微的抑制作用, 酶活力

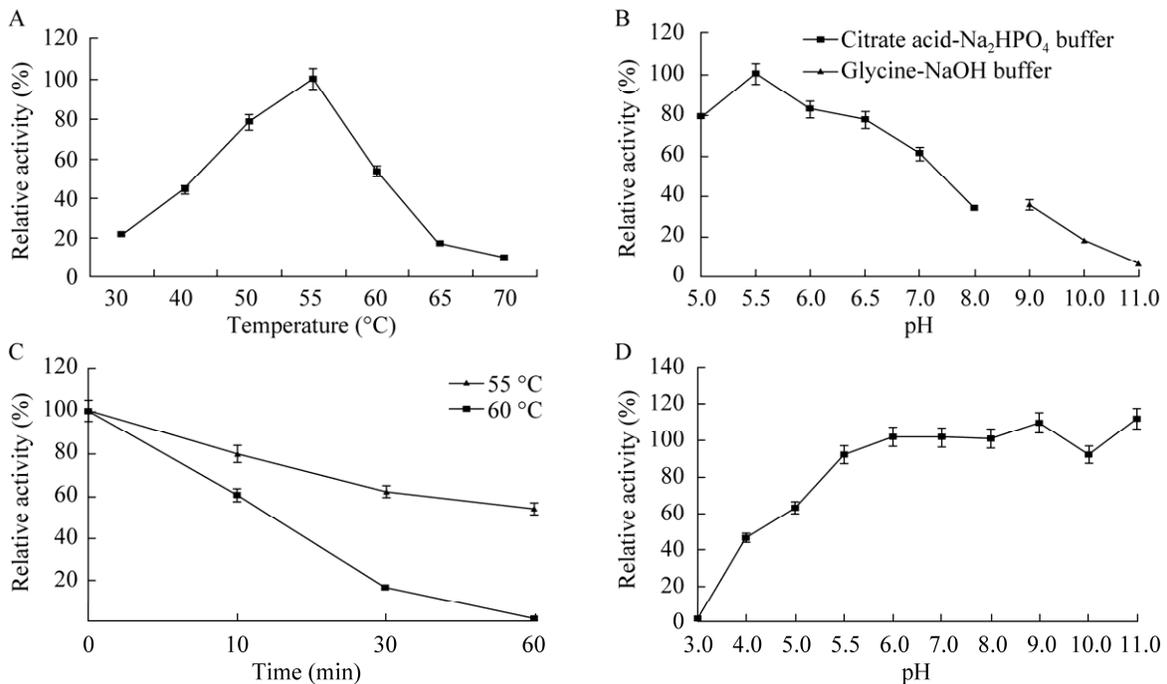


图 3 以 pNPG 为底物时 CdBglA 的酶学性质

Figure 3 Enzymatic properties of the purified CdBglA when pNPG was used as a substrate. A: Effect of temperature on activities. B: Effect of pH on activities. C: Temperature stability. D: pH stability (error bars represent the standard error).

表1 金属离子及化学试剂对 CdBglA 酶活力的影响
Table 1 Effects of metal ions and chemicals on the activity of CdBglA

Reagent 5 mmol/L	Relative activity (%)
None	100.00±2.14
K ⁺	97.37±0.99
Ca ²⁺	97.02±2.48
Zn ²⁺	98.99±0.98
Mg ²⁺	90.34±0.57
Fe ²⁺	95.56±0.84
Fe ³⁺	97.53±0.96
Cu ²⁺	99.94±4.06
Na ⁺	105.80±3.70
Pb ²⁺	104.82±1.56
Ni ²⁺	93.44±0.53
Li ⁺	92.33±2.89
Cd ²⁺	91.70±4.36
Co ²⁺	90.34±5.69
SDS	ND
EDTA	93.16±2.07
Ethanol	114.15±5.37
Methanol	77.98±3.50
Isopropanol	123.42±4.26
β -mercaptoethanol	143.60±1.79

ND: Not detected.

分别损失 6.84%和 22.02%；SDS 作为酶蛋白变性剂，加入 5 mmol/L SDS 致使 CdBglA 的酶活力完全失活；然而 5%乙醇、异丙醇和 β -巯基乙醇对 CdBglA 的酶活力有显著的激活作用，分别提高了 14.15%、23.42%和 43.60%。

2.3.4 CdBglA 对不同浓度乙醇和甲醇的耐受性

CdBglA 对不同浓度(0%–40%)乙醇溶液的耐受性如图 4A 所示,当乙醇浓度为 5%–20%时,能够在一定程度上激发酶活力。其中 15%的乙醇溶液对酶的激活作用最大,可使酶活力提高 28.67%；在 25%–40%的乙醇溶液作用下起一定的抑制作用,在 30%的乙醇溶液作用下仍有初始酶活力的 43.68%,但当乙醇溶液浓度高达 40%时,酶活力几乎被完全抑制。由此可知, β -葡萄糖苷酶 CdBglA 对乙醇溶液具有很强的耐受性,并且低浓度的乙醇溶液在一定程度上能激发酶活力。

β -葡萄糖苷酶的很多应用需要在醇类物质中反应,如大豆异黄酮的水解,一般选用甲醇或者乙醇作为溶剂,在此过程中甲醇可能会对 β -葡萄糖苷酶的酶活力产生一定的抑制作用,

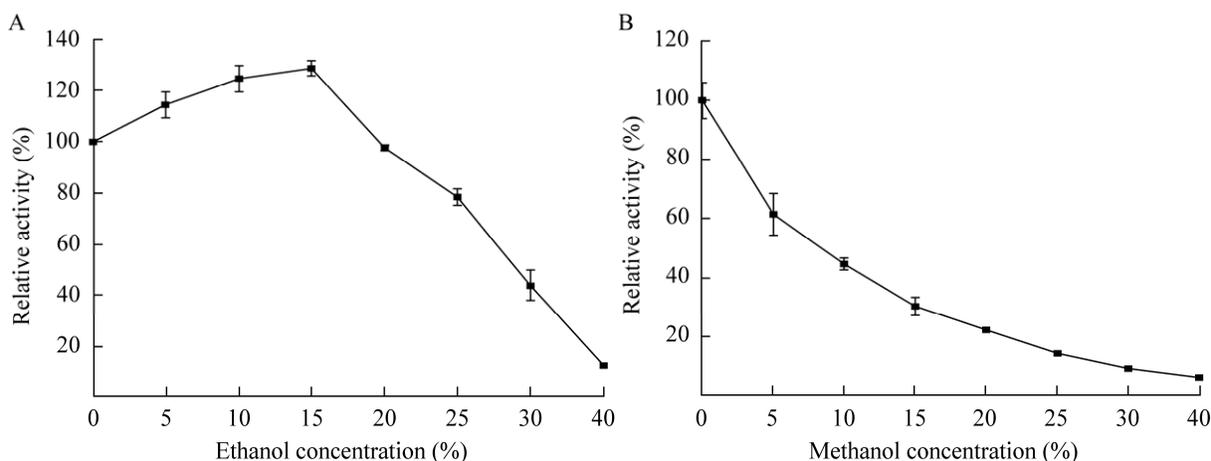


图4 不同浓度乙醇/甲醇对 CdBglA 酶活力的影响

Figure 4 Effect of ethanol (A) and methanol (B) on CdBglA enzyme activity.

故而探究不同浓度的甲醇溶液对酶活力是否有影响。结果如图 4B 所示,甲醇的浓度对 CdBglA 酶活力呈现出梯度抑制现象,随着甲醇浓度的升高,酶活力明显被抑制,尤其当甲醇浓度为 20%时,相对酶活力仅剩 22.14%。

2.3.5 CdBglA 对不同浓度 NaCl 和葡萄糖的耐受性

CdBglA 在不同浓度(0–2 mol/L)的 NaCl 溶液下均保持高达 84.70%的酶活力(图 5A)。当 NaCl 溶液终浓度为 0–1.5 mol/L 时,对酶活力起一定的促进作用;当 NaCl 溶液终浓度为 1 mol/L 时,对酶的激活作用最大,可使酶活力提高 36.84%;而当 NaCl 终浓度为 2 mol/L 时对酶活力起一定的抑制作用,但 2 mol/L 高浓度 NaCl 溶液对酶活力只有轻微的抑制作用,仍有初始酶活力的 84.70%。

CdBglA 对 0–2 mol/L 葡萄糖具有很强的耐受性(图 5B),在低浓度(0–0.5 mol/L)葡萄糖溶

液条件下具有促进作用,当葡萄糖终浓度为 0.25 mol/L 时,对酶的激活作用最大,可使酶活力提高 28.47%;而在高浓度(0.8–2 mol/L)葡萄糖条件下具有抑制作用,但当葡萄糖终浓度为 0.8–1 mol/L 时只有轻微的抑制作用,仍有初始酶活力的 88.53%,在葡萄糖终浓度 2 mol/L 条件下抑制作用明显,但仍占初始酶活力的 50.22%。

2.3.6 CdBglA 的底物特异性

以浓度 4 mmol/L 的合成底物(*p*NPG、*o*NPG、*p*NPM、*p*NPGal 和 *p*NPX)和天然底物(槐糖、纤维二糖和龙胆二糖)为底物来测定和分析重组酶 CdBglA 的底物特异性。结果如表 2 所示,当底物为 *p*NPG 时酶活力最高能达到 (209.93±3.86) U/mg,对 *o*NPG 和 *p*NPM 也有一定的酶活力,其相对酶活力分别是 *p*NPG 的 29.73%和 14.20%,而重组酶 CdBglA 对 *p*NPGal、*p*NPX 及各种寡糖均未表现出水解活性。

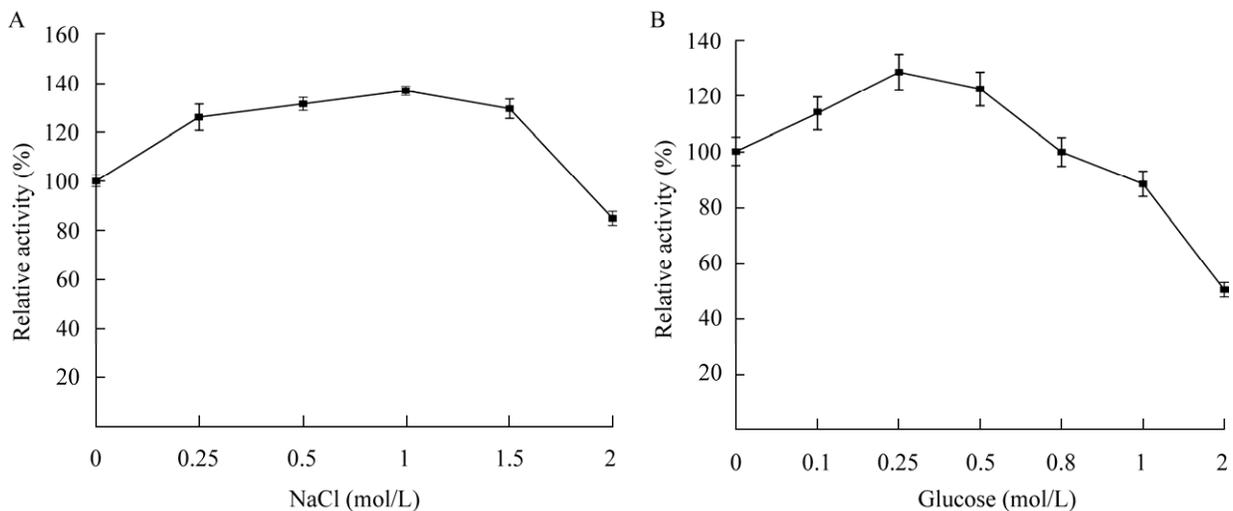


图 5 NaCl 和葡萄糖对 CdBglA 酶活力的影响

Figure 5 Effect of NaCl (A) and glucose (B) on CdBglA enzyme activity.

表 2 CdBglA 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of CdBglA

Substrate	Specific activity (U/mg)
Disaccharide	
Sophorise	ND
Cellobiose	ND
Gentiobiose	ND
Aryl β -glycoside	
<i>p</i> NPG	209.93 \pm 3.86
<i>o</i> NPG	62.41 \pm 1.72
<i>p</i> NPM	29.81 \pm 0.79
<i>p</i> NPGal	ND
<i>p</i> NPX	ND

ND: Not detected.

表 3 不同微生物来源的 β -葡萄糖苷酶的性质对比Table 3 Property comparison of β -glucosidase from different microbial sources

Organisms	Enzyme	Molecular weight (kDa)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	K_m (mmol)	K_{cat}/K_m ($s^{-1} mmol^{-1}$)	Ethanol tolerance (%)	References
<i>Cuniculiplasma divulgatum</i>	CdBgl1	56.0	55	5.5	0.81	387.50	20	Present study
<i>Pyrococcus furiosus</i>	/	58.0	102	5.0	0.15	ND	ND	[8]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	P2	60.0	80	5.5	ND	ND	ND	[10]
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	vul_bgl1A	61.0	105	7.0	1.77	ND	10	[11]
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	TaBglA	57.0	90	6.0	0.40	381.00	ND	[12]
<i>Thermococcus</i> sp.	O08324	51.0	78	6.5	7.60	12.40	10	[13]
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	Asac_1390	55.0	93	6.0	0.24	1 327.10	ND	[14]
<i>Saccharomonospora</i> sp. NB11	BglNB11	51.0	40	7.0	0.40	12 487.71	10	[17]
<i>Bacillus subtilis</i> natto NTU-18	BglH	53.0	45	6.0	2.35	3.01	ND	[18]
Hot-spring	bglM	55.0	70	5.0	0.83	8.59	10	[19]
<i>Alteromonas</i> sp. L82	Bgl	54.0	40	7.0	0.55	135.10	5	[20]
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	BcBgl1A	52.0	40	7.0	10.45	61.17	0	[21]
<i>Pichia guilliermondii</i>	/	97.0	55	5.5	ND	ND	10	[22]

G 1.2

ND: Not detected.

3 讨论与结论

3.1 不同来源的 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

β -葡萄糖苷酶广泛存在于动物、植物和微生物中,是纤维素分解酶系中的重要组成部分,在食品、医药、工业、农业、能源及环境等领域具有重要的应用价值。一般而言,不同来源的 β -葡萄糖苷酶因其生理环境不同,其酶学性质也存在显著差异(表 3)。本研究获得的重组酶 CdBglA 来源于嗜酸古菌(*C. divulgatum*),该菌是从英国安格尔西岛铜矿场地表酸水中分离出来的, CdBglA 的最适反应条件为: pH 5.5, 温度 55 °C,

它与细菌来源的中温 β -葡萄糖苷酶性质相似, 例如, 来源于糖单孢菌(*Saccharomonospora* sp.) NB11 的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 BglNB11, 其最适反应条件为: pH 7.0, 温度 40 °C^[17], 来源于纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*)的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 BglH, 其最适反应条件为: pH 6.0, 温度 45 °C^[18]。CdBglA 与多数古菌来源的 β -葡萄糖苷酶的高温特性不同, 例如, 来源于广古菌门的经典嗜热菌激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 102 °C^[8], 古菌热球菌(*Thermococcus kodakarensis*)来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 vul_bgl1A 的最适反应温度为 105 °C^[11]。

大多数古菌来源的或从酸性环境中分离出来的 β -葡萄糖苷酶在中性或弱酸性条件下往往具有较好的 pH 稳定性, 而本研究获得的重组酶 CdBglA 在弱酸性和碱性环境条件下均具有良好的 pH 稳定性。CdBglA 在 pH 4.0、37 °C 恒温处理 60 min 后仍然可以维持 46.71% 的酶活力, 尤其是在 pH 5.5–11.0 中碱性条件下处理后依然可以维持 92.37% 的酶活力。这一特征与该菌株极度嗜酸(pH 1.0–1.2)的生长特性截然不同, 可能是由于 CdBglA 作为胞内酶且没有信号肽, 因此和其生长环境存在一定的差异。CdBglA 因其具有这种宽泛的酸碱耐受性可更好地适应于复杂的工业环境, 为在实际应用中提供了更大的可能。

3.2 CdBglA 的乙醇耐受性和离子特异性

重组酶 CdBglA 对乙醇溶液具有很强的耐受性, 并且低浓度的乙醇溶液在一定程度上具有激活作用。这与酶分子的构象主要由静电作用力、范德华力、疏水作用以及氢键构成一个复杂的网络来维持有关^[23]。乙醇作为亲水性有机溶剂, 本研究中低浓度乙醇(<15%)对 CdBglA 酶活

力起激活作用以及在 20% 浓度下基本不受影响, 这为在生物燃料或纤维素乙醇生产行业的应用提供了可能^[23]。此外, CdBglA 的酶活力随着乙醇浓度的升高而呈现出逐渐降低的趋势(图 5A), 这可能是由于有机溶剂剥夺了酶周围的水化层, 致使由水分子直接或间接参与形成的氢键、疏水键及范德华力等受到破坏, 从而引起酶构象的剧烈改变而使酶活力下降^[24]。CdBglA 这一特性与林建城等^[25]发现乙醇等有机溶剂对南美对虾中 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosidase, NAGase)酶活力的影响相似。挖掘金属离子和化学试剂耐受等酶学性质优良的 β -葡萄糖苷酶十分必要, 本研究中大部分金属离子对 CdBglA 的催化活性几乎没有影响, 只有极少部分金属离子, 如 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 等, 对重组酶 CdBglA 的酶活力有轻微的抑制作用, 但酶活力均保持在 90.34% 以上。金属离子抗性可能与该菌株分离于英国安格尔西岛铜矿场地表酸水中有关, 金属酸矿中的重金属对该菌的蛋白形成了金属离子抗性。另外, 化学试剂 SDS 的添加致使 CdBglA 酶活力完全损失, 这一现象与多数已报道的蛋白酶相同^[26]; 而异丙醇和 β -巯基乙醇的加入使酶活力分别提高了 23.42% 和 43.60%。

3.3 CdBglA 的 NaCl 和葡萄糖耐受性

嗜热细菌和古细菌栖息在地球的极端环境中, 这些环境对大多数生物极为不利^[27], 并且已知它们能够耐受非常低或非常高的温度、极端的 pH, 有时还可以耐受高浓度的盐。根据微生物最佳生长的盐浓度对嗜盐菌进行了分类, 极端嗜盐菌在含 3.4–5.1 mol/L NaCl 的培养基中生长最好^[28]。在测定耐受性时还发现 CdBglA 具有极强的嗜盐特性, 该酶表现出对 NaCl 的高浓度耐受性, 尤其在 0–1.5 mol/L 都具有激活能力, 最高提升了 36.84% 的酶活力。这可能是由于蛋白

质和盐溶液之间的疏水和静电相互作用^[29]。据报道, NaCl 还能提升酶的酶活力稳定性, 例如来源于 *Thermococcus* sp. 的 β -葡萄糖苷酶 O08324 在 NaCl 存在时半衰期延长^[13]; 土曲霉 UniMAP AA-6 在 2.5 mol/L NaCl 溶液中孵育 24 h 后仍保持 80% 以上的活性^[30]; 来自嗜盐古生菌犹他盐杆菌(*Halorhabdus utahensis*)的纤维二糖水解酶 Hu-CBH1 在高达 5 mol/L NaCl 的存在下仍具有活性^[31]。CdBglA 的耐盐特性是文献中报道的来自 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶中极高的, 这为进一步分析和开发嗜盐纤维素酶混合物提供了研究材料。

葡萄糖作为水解产物通常会抑制 β -葡萄糖苷酶在实际应用过程中的催化效率。真菌来源的 β -葡萄糖苷酶大多对葡萄糖具有较好的耐受性, 但是产物葡萄糖对 β -葡萄糖苷酶的影响机制尚不明确。通过比较结构表明, 活性位点通道中糖苷酮结合位点(+1 和+2 亚位点)的疏水性以及保守区域非保守残基的疏水性、空间位阻性能等决定了 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受性, 并且 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐量是 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的 10–1 000 倍, 这是因为 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶具有深而窄的底物结合口袋致使葡萄糖难以进入, 优于 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶中的浅口袋^[32-33]。本研究表达的 GH1 家族重组 β -葡萄糖苷酶 CdBglA 对葡萄糖具有很强的耐受性, 具体结果如下: 低浓度(≤ 0.8 mol/L)下激活, 即在 0.25 mol/L 葡萄糖浓度下提高了 28.47% 的酶活力; 高浓度(> 0.8 mol/L)下抑制, 但在 1 mol/L 和 2 mol/L 葡萄糖浓度下仍分别维持了 88.53% 和 50.22% 的酶活力。这与 *Thermococcus* sp. 古菌来源的 β -葡萄糖苷酶 O08324^[13] 和温泉来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶 bgIM^[19] 对葡萄糖的耐受特性是一致的。

综上所述, 本研究获取了嗜酸古菌 (*C.*

divulgatum) 来源的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列, 并进行了大肠杆菌异源表达和酶学性质研究。CdBglA 最适温度和最适 pH 分别为 55 °C 和 5.5, 具有宽泛的 pH 稳定性。此外, 重组酶 CdBglA 对大部分金属离子、有机溶剂、NaCl 和葡萄糖都具有很强的耐受性。本研究为进一步探索嗜酸古菌来源的 β -葡萄糖苷酶(GH1) 基因序列、结构特征和分子机制等研究提供了优质材料, 同时也为该酶在工业中的实际应用提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] 张维娜. 宏基因组文库中新型 β -葡萄糖苷酶的功能筛选及鉴定分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2018.
ZHANG WN. Identification and analysis of a novel β -glucosidase by functional screening of metagenomic library[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [2] GODSE R, BAWANE H, TRIPATHI J, KULKARNI R. Unconventional β -glucosidases: a promising biocatalyst for industrial biotechnology[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(9): 2993-3016.
- [3] 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[J]. 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*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4644-4657 (in Chinese).
- [4] ZHANG ZY, WANG M, GAO RJ, YU XX, CHEN G. Synergistic effect of thermostable β -glucosidase TN0602 and cellulase on cellulose hydrolysis[J]. 3 Biotech, 2017, 7(1): 54.
- [5] 孙智. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 化工设计通讯, 2021, 47(2): 144-145.
SUN Z. Advances in β -glucosidase[J]. Chemical Engineering Design Communications, 2021, 47(2): 144-145 (in Chinese).
- [6] WOESE CR, KANDLER O, WHEELIS ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains

- archaea, bacteria, and eucarya[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [7] 周林芳, 江波, 张涛, 李淑华. 糖苷水解酶第 3 家族 β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 330-335.
- ZHOU LF, JIANG B, ZHANG T, LI SH. Research progress of β -glucosidases of glycoside hydrolase family 3[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 330-335 (in Chinese).
- [8] KENGEN SWM, LUESINK EJ, STAMS AJM, ZEHNDER AJB. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 213(1): 305-312.
- [9] BAUER MW, KELLY RM. The family 1 β -glucosidases from *Pyrococcus furiosus* and *Agrobacterium faecalis* share a common catalytic mechanism[J]. Biochemistry, 1998, 37(49): 17170-17178.
- [10] AGUILAR CF, SANDERSON I, MORACCI M, CIARAMELLA M, NUCCI R, ROSSI M, PEARL LH. Crystal structure of the β -glucosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 271(5): 789-802.
- [11] SCHRÖDER C, EIXENBERGER D, SULEIMAN M, SCHÄFERS C, ANTRANIKIAN G. Characterization of an extremely thermo-active archaeal β -glucosidase and its activity towards glucan and mannan in concert with an endoglucanase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9505-9514.
- [12] KIM HJ, PARK AR, LEE JK, OH DK. Characterization of an acid-labile, thermostable β -glucosidase from *Thermoplasma acidophilum*[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(9): 1457-1462.
- [13] SINHA SK, DATTA S. β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. is a salt-tolerant enzyme that is stabilized by its reaction product glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(19): 8399-8409.
- [14] GUMEROV VM, RAKITIN AL, MARDANOV AV, RAVIN NV. A novel highly thermostable multifunctional beta-glycosidase from crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans*[J]. Archaea (Vancouver, B C), 2015, 2015: 978632.
- [15] TROFIMOV AA, POLYAKOV KM, TIKHONOV AV, BEZSUDNOVA EY, DOROVATOVSKII PV, GUMEROV VM, RAVIN NV, SKRYABIN KG, POPOV VO. Structures of β -glycosidase from *Acidilobus saccharovorans* in complexes with tris and glycerol[J]. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2013, 449(1): 99-101.
- [16] IGLESIAS-FERNÁNDEZ J, HANCOCK SM, LEE SS, KHAN M, KIRKPATRICK J, OLDHAM NJ, MCAULEY K, FORDHAM-SKELTON A, ROVIRA C, DAVIS BG. A front-face 'S_Ni synthase' engineered from a retaining 'double-S_N2' hydrolase[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(8): 874-881.
- [17] SALEH ZADA N, BELDUZ AO, GÜLER HI, KHAN A, SAHINKAYA M, KAÇIRAN A, AY H, BADSHAH M, ALI SHAH A, KHAN S. Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant β -glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109799.
- [18] KUO LC, LEE KT. Cloning, expression, and characterization of two β -glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 119-125.
- [19] KAUSHAL G, RAI AK, SINGH SP. A novel β -glucosidase from a hot-spring metagenome shows elevated thermal stability and tolerance to glucose and ethanol[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 145: 109764.
- [20] SUN JJ, WANG W, YAO CY, DAI FQ, ZHU XJ, LIU JZ, HAO JH. Overexpression and characterization of a novel cold-adapted and salt-tolerant GH1 β -glucosidase from the marine bacterium *Alteromonas* sp. L82[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(9): 656-664.
- [21] WU J, GENG A, XIE RR, WANG HC, SUN JZ. Characterization of cold adapted and ethanol tolerant β -glucosidase from *Bacillus cellulositicus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 872-879.
- [22] DA SILVA RR, DA CONCEIÇÃO PJP, de MENEZES CLA, de OLIVEIRA NASCIMENTO CE, MACHADO BERTELLI M, PESSOA JUNIOR A, de SOUZA GM, DA SILVA R, GOMES E. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 294: 73-80.
- [23] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 296-304.

- PENG LF. Effect of organic solvents on enzymatic activity and selectivity[J]. Progress in Chemistry, 2000, 12(3): 296-304 (in Chinese).
- [24] 汪世华, 张晓鹏, 陈明, 张成, 刁苗, 白明凤, 蔡奎山. 有机溶剂和变性剂对枯草芽胞杆菌溶栓酶活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 825-829.
- WANG SH, ZHANG XP, CHEN M, ZHANG C, DIAO M, BAI MF, CAI KS. Effects of organic solvents and denaturants on the activity of bacillus subtilis thrombolytic enzyme[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(6): 825-829 (in Chinese).
- [25] 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[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(5): 693-696.
- LIN JC, XIE XL, GONG M, WANG Y, CHEN QX. Effects of different organic solvents on the activity of N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*)[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2005, 44(5): 693-696 (in Chinese).
- [26] YIN YR, SANG P, YANG FL, LI T, YANG RF, LIU HY, LUO ZL, LI WJ, YANG LQ. Characterization of a Cu^{2+} , SDS, alcohol and glucose tolerant GH1 β -glucosidase from *Bacillus* sp. CGMCC 1.16541[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(10): 1467-1477.
- [27] LISZKA MJ, CLARK ME, SCHNEIDER E, CLARK DS. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2012, 3: 77-102.
- [28] KUSHNER DJ. Halophilic bacteria[J]. Advances in Applied Microbiology, 1968, 10: 73-99.
- [29] KAUSHIK JK, BHAT R. A mechanistic analysis of the increase in the thermal stability of proteins in aqueous carboxylic acid salt solutions[J]. Protein Science, 1999, 8(1): 222-233.
- [30] GUNNY AAN, ARBAIN D, EDWIN GUMBA R, JONG BC, JAMAL P. Potential halophilic cellulases for *in situ* enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses[J]. Bioresource Technology, 2014, 155: 177-181.
- [31] ZHANG T, DATTA S, EICHLER J, IVANOVA N, AXEN SD, KERFELD CA, CHEN F, KYRPIDES N, HUGENHOLTZ P, CHENG JF, SALE KL, SIMMONS B, RUBIN E. Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance[J]. Green Chemistry, 2011, 13(8): 2083-2090.
- [32] 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[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2014, 70(6): 1631-1639.
- [33] 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[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2555-2567.
- SHEN FF, MIAO TT, ZHANG XX, YIN AG, SHI PJ, XU B. Expression and characterization of thermo-activated β -glucosidase TaBgl3 from *Thermofilum adornatum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2555-2567 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)