

木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

常祥祥, 田永莉, 颜娟, 李文超, 刘石生

Isolation, Purification and Characterization of β -Glucosidase from Cassava Roots

CHANG Xiangxiang, TIAN Yongli, YAN Juan, LI Wenchao, and LIU Shisheng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050202>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

双齿围沙蚕 β -1,3-葡萄糖苷酶分离纯化及其酶学性质

Purification and characterization of β -1, 3-glucosidase from *Perinereis aibuhitensis*

食品工业科技. 2017(10): 227-230 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.035>

黑曲霉中 β -葡萄糖苷酶的发酵优化及纯化研究

Study on the fermentation conditions and purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger*

食品工业科技. 2017(05): 174-178 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.024>

牦牛酸奶酪中高产乳糖酶菌株分离鉴定及其酶学性质

Isolation and Identification of Microorganism with High Producing Lactase Activity from Yark Yoghourt Cheese and Its Enzymatic Properties

食品工业科技. 2019, 40(5): 124-129 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.021>

桔青霉产核酸酶P1酶分离纯化及其酶学性质

Isolation, Purification and Enzymatic Properties of Nuclease P1 Fermented by *Penicillium citrinum*

食品工业科技. 2021, 42(7): 89-94 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050212>

锦橙中 β -葡萄糖苷酶的提取纯化及其结构表征

Extraction, Purification and Structural Characterization of β -Glucosidase in Jincheng Oranges

食品工业科技. 2019, 40(15): 84-88 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.014>

芋头球蛋白的提取纯化及其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

Extraction, Purification of Taro Globulin and Its Inhibitory Activity on α -Amylase and α -Glucosidase

食品工业科技. 2021, 42(14): 25-32 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100266>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

常祥祥, 田永莉, 颜娟, 等. 木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 141-147. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050202

CHANG Xiangxiang, TIAN Yongli, YAN Juan, et al. Isolation, Purification and Characterization of β -Glucosidase from Cassava Roots[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 141-147. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050202

· 生物工程 ·

木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

常祥祥^{1,2}, 田永莉^{1,2}, 颜娟^{1,2}, 李文超^{1,2}, 刘石生^{1,2,*}

(1.海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228;

2.热带多糖资源利用教育部工程研究中心, 海南海口 570228)

摘要:研究了木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质。以缓冲液从木薯块根中获得粗提酶液, 粗酶酶活力为 9.37 U/g 木薯干重; 再分别通过丙酮沉淀、离子交换层析和凝胶过滤层析进行纯化, β -葡萄糖苷酶酶活力为 1.14 U/g 木薯干重, 经纯化 β -葡萄糖苷酶纯度提高了 14.62 倍, 总活力回收率为 12.14%, 电泳测得其分子量约 70 kDa。该酶米氏常数 K_m 为 3.60 mmol/L, V_{max} 为 12.36 μ mol/(min·mg protein); 其最适 pH 为 7.0, pH 在 6.0~8.0 之间有较好的稳定性; 在 40 $^{\circ}$ C 以内有良好稳定性, 在 4 $^{\circ}$ C 存放 30 d 酶活力剩余 81.78%。Mn²⁺和 K⁺对酶有一定的促进作用, Al³⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Na⁺、尿素和 SDS 对酶没有显著影响 ($P>0.05$), 而 Fe³⁺、Fe²⁺、Ag⁺和 EDTA 均会不同程度地抑制酶活性, 其中 Ag⁺的抑制作用最强。研究结果可为今后木薯块根中的 β -葡萄糖苷酶的应用提供理论依据。

关键词:木薯块根, β -葡萄糖苷酶, 分离, 纯化, 酶学性质

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)03-0141-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050202



本文网刊:

Isolation, Purification and Characterization of β -Glucosidase from Cassava Roots

CHANG Xiangxiang^{1,2}, TIAN Yongli^{1,2}, YAN Juan^{1,2}, LI Wenchao^{1,2}, LIU Shisheng^{1,2,*}

(1.College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China;

2.Engineering Research Center of Utilization of Tropical Polysaccharide Resources,

Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Abstract: The isolation, purification and enzymatic properties of β -glucosidase from cassava roots were studied. The crude enzyme extract was obtained from cassava roots with buffer solution, and the activity of crude enzyme was 9.37 U/g cassava dry weight. Purified by acetone precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, β -glucosidase activity was 1.14 U/g cassava dry weight, purified β -glucosidase purity increased by 14.62 times, the total activity recovery was 12.14%, the molecular weight of β -glucosidase was about 70 kDa. The K_m and V_{max} of the enzyme were 3.60 mmol/L and 12.36 μ mol/(min·mg protein) respectively. The optimum pH was 7.0, and it was stable when the pH was between 6.0 and 8.0. It had good stability within 40 $^{\circ}$ C, and 81.78% enzyme activity remained after 30 days at 4 $^{\circ}$ C. Mn²⁺ and K⁺ promoted the enzyme to a certain extent. Al³⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Na⁺, urea and SDS had no significant effect on the enzyme activity ($P>0.05$). Fe³⁺, Fe²⁺, Ag⁺ and EDTA all inhibited the enzyme activity to varying degrees, among which Ag⁺ had the strongest inhibitory effect. The results can provide theoretical basis for the application of β -glucosidase in cassava roots in the future.

收稿日期: 2022-05-19

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目 (2019RC031)。

作者简介: 常祥祥 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与利用, E-mail: 18334779198@163.com。

* 通信作者: 刘石生 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然植物资源开发与利用, E-mail: stoneliu77@126.com。

Key words: cassava roots; β -glucosidase; isolation; purification; enzymatic properties

β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase, EC3.2.1.21), 也称作 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 可使连接两个葡萄糖或葡萄糖替代物分子的糖苷键水解断裂, 生成 β -D-葡萄糖和与其相对应的配基^[1]。 β -葡萄糖苷酶在生物生长代谢活动中具有多种生理功能, 比如参与前体活化^[2-3]、植物香味前体的水解^[4-6]、促进异黄酮苷水解^[7]、激活植物激素^[8-9] 以及促进植物免疫防御机制^[10] 等。

近年来, 已有研究者从动植物^[11-12] 和微生物^[13-15] 中分离出 β -葡萄糖苷酶。其中, 植物来源的 β -葡萄糖苷酶由于清洁无污染得到了广泛关注, 国内外学者从玉米^[16]、锦橙^[17]、芦荟叶皮^[18]、金线莲^[19]、橡胶籽^[20]、樱桃种子^[21]、甜菊叶片^[22] 和甘蓝^[23] 等大量植物中发现 β -葡萄糖苷酶, 并进行纯化和性质研究, 将其应用于食品工业及废料的生物水解等领域。如郭天赐等^[24] 通过提取苦杏仁中的 β -葡萄糖苷酶, 并将其添加到豆浆中, 得到的豆浆中染料木素、黄豆黄素、大豆苷元的含量均有提升; 陈杏等^[25] 将纯化后的茶树菇 β -葡萄糖苷酶应用于中草药残渣的生物水解中, 为环境减负。大量研究表明, β -葡萄糖苷酶用途广泛, 具有很好的研究前景。

不同品种的木薯中 β -葡萄糖苷酶的含量及性质不同, 如 Mkpong 等^[26] 从木薯叶中分离纯化得到约 65 kDa 的 β -葡萄糖苷酶, 但总活力回收率较低, 仅为 4% 左右。目前国内对于木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及性质研究还未见报道。为了提高木薯的利用价值, 本文从木薯块根中分离 β -葡萄糖苷酶并进行纯化, 对其酶学性质进行探究, 为今后木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的应用提供研究依据, 开发木薯的经济价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木薯华南 205 号(SC205) 海南省海口市澄迈县木薯试验基地; 对硝基苯- β -D-葡萄糖苷 生物试剂, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DEAE-Sephadose fast flow 生物试剂, 北京酷来搏科技有限公司; 考马斯亮蓝 G-250 生物试剂, 国药集团化学试剂有限公司; Sephadex™ G-100 生物试剂, GE 医疗集团; 牛血清白蛋白 生物试剂, 上海源叶生物科技有限公司; 彩虹 130 光谱蛋白 marker 生物试剂, 北京索莱宝科技有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

HH-4 水浴锅 金坛市晶玻实验仪器厂; Synergy LX 酶标仪 美国 BIOTEX 公司; EL303 电子天平 梅特勒-托利多有限公司; FA2104 分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; CR 22N 高速离心机 日本 HITACHI 公司; QE-100 电动磨粉机 浙江屹立工贸有限公司; FJ300-SH 高压均质机 上

海标本模型仪器厂; SCI-VS 可调式混匀仪 美国 SCILOGEX 公司; HL-2N 数显恒流泵 上海沪西分析仪器厂有限公司; BL-100 部分收集器 上海沪西分析仪器厂有限公司; HD-3000 核酸蛋白检测仪 上海嘉鹏科技有限公司; 层析柱 上海亚荣生化仪器厂; DYY-8C 电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 将采收的 SC205 取回后立即冲洗干净, 处理为 0.5~1.0 cm 切片, 自然晾干后在干燥环境下贮藏备用。

1.2.2 木薯块根 β -葡萄糖苷酶粗酶液的制备 参考李斐然^[20] 的方法并加以修改, 将预处理好的木薯切片粉碎, 40 目过筛后取 10.000 g 加入 0.1 mol/L、pH 为 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 均质机匀速匀浆 60 s, 高速离心机 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液为木薯 β -葡萄糖苷酶粗酶液。

1.2.3 木薯 β -葡萄糖苷酶的初步纯化 参考李斐然^[20] 的方法并加以修改, 将粗酶液加入一定体积预冷过的丙酮, 使得粗酶液与丙酮的体积比 1.6:1, 混匀, 4 °C 条件下静置一段时间, 12000 r/min 离心 15 min 后取沉淀, 挥干溶剂后用将沉淀溶解, 离心, 取上清液为初步纯化的酶液。

1.2.4 离子交换层析纯化 参考李蕊伽^[18] 的方法并加以修改, 选用以弱阴离子为交换介质的 DEAE-Sephadose fast flow 将层析柱填充好后, 分别用蒸馏水和 50 mmol/L、pH 为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡。将经初步纯化得到的样品通过浓缩脱盐后上样, 用 Tris-HCl 缓冲液平衡层析柱, 之后用含有 0~0.6 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 洗脱速度 0.5 mL/min, 每 6 min 收集一管, 在 280 nm 波长处在线监测, 测定各管的酶活力。以管号为横坐标, 以 280 nm 处监测的信号值、NaCl 浓度和 400 nm 处的吸光值为纵坐标制作洗脱曲线。

1.2.5 凝胶过滤层析纯化 将溶胀好的 Sephadex G-100 凝胶填充到层析柱中, 注意避免产生气泡, 用 Tris-HCl 缓冲液平衡。将经离子交换层析得到的样品经浓缩脱盐后上样, 用 Tris-HCl 缓冲液进行洗脱, 洗脱速度 0.5 mL/min, 每 3 min 收集一管, 在 280 nm 下在线监测, 并测定各管的酶活力。以管号为横坐标, 以 280 nm 处监测的信号值和 400 nm 处的吸光值为纵坐标制作洗脱曲线。

1.2.6 酶活力的测定 分别配制 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mmol/L 对硝基苯酚溶液, 以 Na_2CO_3 为对照, 400 nm 处测定吸光值, 以对硝基苯酚浓度(mmol/L)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得到标准曲线: $y=10.289x-0.0103$, $R^2=0.9996$ 。

酶活力测定采用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷

(p-NPG)法: 参考徐佳茜^[27]的方法并加以修改, 取 0.1 mL 稀释酶液, 加入 pH7.0 的磷酸盐缓冲液 0.2 mL, 10 mmol/L p-NPG 0.1 mL, 47 °C 水浴 30 min 后立即加入 2.5 mL 1 mol/L Na_2CO_3 , 定容至 5 mL, 400 nm 下测定其吸光度。以酶液先加入 Na_2CO_3 , 再分别加入磷酸盐缓冲液与 p-NPG 为空白试验, 计算 β -葡萄糖苷酶酶活力, 计算公式如下:

$$Y = \frac{c \times V_1}{t \times V_2} \times n$$

式中: Y 为酶活力(U/mL); c 为标准曲线中对硝基苯酚对应的浓度(mmol/L); V_1 为酶活反应体积(mL); t 为反应时间(min); V_2 为提取酶液体积(mL); n 为酶液稀释倍数。

1.2.7 蛋白质含量的测定 采用 Bradford^[28]的方法, 加入考马斯亮蓝试剂 5 mL, 加入 0.1 mL 酶液, 混匀后静置 5 min, 在 595 nm 处测定其吸光值, 以 0.1 mL 蒸馏水为空白试验。分别配制 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 牛血清白蛋白溶液, 以蛋白质浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得到标准曲线方程: $y = 4.7808x - 0.0143$, $R^2 = 0.9992$ 。

1.2.8 分子量的测定 采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 将经纯化后得到的酶液经脱盐浓缩后与 5 \times 上样缓冲液混匀, 沸水浴 5 min 后上样。开始电泳时调节电流 20 mA, 电压 80 V, 待样品进入到分离胶后调节电压到 100 V。当溴酚蓝移动到距玻璃板约 0.5 cm 时关闭电泳仪。电泳后分别进行考马斯亮蓝 R-250 染色液和脱色液处理, 脱色完成后观察其分子量。

1.2.9 木薯 β -葡萄糖苷酶的各步骤纯化效果评价 通过对木薯块根中 β -葡萄糖苷酶进行分离纯化, 分别计算其总活力、总蛋白量、比活力、纯化倍数和总活力回收率, 比较各步骤纯化效果。其中酶纯化过程相关的计算公式如下:

$$\text{比活力(U/mg protein)} = \frac{\text{酶液中的总酶活力(U)}}{\text{酶液中的总蛋白含量(mg)}}$$

$$\text{纯化倍数(倍)} = \frac{\text{纯化后酶比活力(U/mg)}}{\text{纯化前酶比活力(U/mg)}}$$

$$\text{总活力回收率(\%)} = \frac{\text{纯化后总酶活力(U)}}{\text{粗酶总酶活力(U)}} \times 100$$

1.2.10 木薯 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

1.2.10.1 酶的 pH 稳定性研究 取 0.1 mL 酶液, 加入 0.4 mL 不同 pH(3.0~9.0)的 0.1 mol/L 缓冲液(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 磷酸氢二钠-柠檬酸; 8.0、9.0 硼酸-硼砂), 分别在 4 °C 下静置 24 h, 分别测定刚加入缓冲液和 4 °C 下静置 24 h 条件下的酶活力。将加入同体积的蒸馏水测得的酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.10.2 酶的热稳定性研究 将酶液分别放在 30、

40、50、60、70 °C 的水浴锅中, 每隔一段时间测定其酶活力。将 4 °C 条件下保存测得的酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力。

1.2.10.3 酶的保存稳定性研究 将纯化后得到的 β -葡萄糖苷酶酶液置于 4 °C 密闭的环境中保存, 每 2 d 取一次样, 将纯化后的酶立即测得的酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力并做相关曲线图, 分析酶液的保存稳定性。

1.2.10.4 酶水解 p-NPG 动力学常数的测定 参考安玫^[29]的方法并加以修改, 分别配制 1、2、2.5、5、10、25、50、100 mmol/L 的 p-NPG 溶液, 通过 p-NPG 法测定酶活力确定酶水解 p-NPG 的动力学常数。采用 Lineweaver-Burk 作图法, 以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标做图, $-1/K_m$ 为横坐标截距, $1/V_{\max}$ 为纵坐标截距。

1.2.10.5 部分金属离子和有机物对酶活性的影响 将酶液中加入一定体积的 AlCl_3 、 FeCl_3 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MgSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 BaCl_2 、 CaCl_2 、 KCl 、 NaCl 、 AgNO_3 、EDTA、尿素和 SDS, 使其溶液终浓度为 10 mmol/L, 4 °C 静置 30 min, 测定其酶活力。将加入同体积的蒸馏水测得的酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力。

1.3 数据处理

所有实验均重复三次, 实验数据使用 Excel 2019 进行统计分析; 显著性差异使用 SPSS 26 进行统计分析; 作图采用 Origin 2021 软件。

2 结果与分析

2.1 离子交换层析纯化

木薯 β -葡萄糖苷酶经粗提及丙酮沉淀初步纯化后, 通过 DEAE-Sepharose fast flow 进行离子交换层析纯化, 得到洗脱曲线如图 1 所示。经纯化后, 得到 6 个蛋白组分, 其中第四个蛋白峰具有酶活力, 之后继续加大 NaCl 浓度后基本为杂蛋白。通过改变盐溶液的浓度, 不同蛋白质由于所带电荷的不同被分离出来, 当 NaCl 浓度达到 0.3 mol/L 时, 木薯块根中的 β -葡萄糖苷酶被洗脱下来, 在之后大量制备木薯

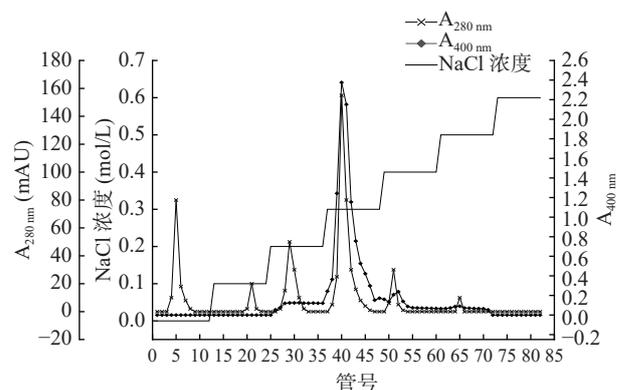


图 1 离子交换层析洗脱曲线图

Fig.1 Plot of ion exchange chromatography elution

块根 β -葡萄糖苷酶时,可使用 0~0.2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱出酶液中的一部分杂蛋白,再用 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,可将酶蛋白与杂蛋白较好的分离。收集 0.3 mol/L 洗脱出的蛋白组分,脱盐浓缩后待凝胶过滤层析。

2.2 凝胶过滤层析纯化

继续采用 Sephadex G-100 做葡聚糖凝胶过滤层析纯化,得到洗脱曲线如图 2 所示。经纯化后,得到 2 个蛋白组分,其中第 1 个蛋白组分与酶活峰基本重合,表明 Sephadex G-100 可较好的将酶蛋白与杂蛋白分离。测定各管中洗脱液的酶活力,将酶活力较高的部分(即管号 7~11)收集,脱盐浓缩后待电泳分析。

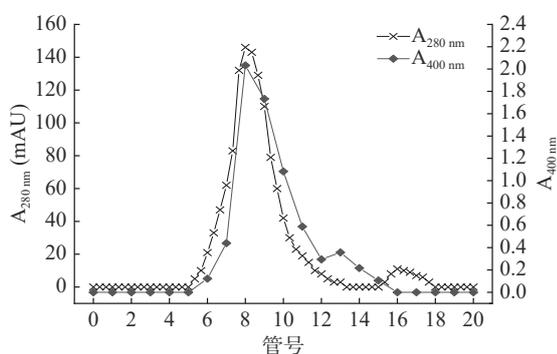


图 2 葡聚糖凝胶层析洗脱曲线图
Fig.2 Plot of dextran gel chromatography elution

2.3 SDS-PAGE 电泳测定分子量

通过 SDS-PAGE 电泳测定纯化后木薯块根 β -葡萄糖苷酶的分子量,结果如图 3 所示。纯化后的酶经电泳得到单条较为清晰的条带,分子量约为 70 kDa,与 Mkpong 等^[26]从木薯叶中分离纯化得到的 β -葡萄糖苷酶分子量(65 kDa)不同。可见不同来源的 β -葡萄糖苷酶分子量有一定的差异。

2.4 木薯 β -葡萄糖苷酶的各步骤纯化效果

各步骤纯化效果如表 1 所示,在纯化过程中,丙酮沉淀可得到绝大部分酶蛋白,但此时的酶液中仍然存在大量的杂蛋白,导致比活力较低,需要进行进一步纯化获取纯度更高的酶蛋白。从纯化效果来看,离子交换层析通过不同浓度的盐溶液洗脱,可去除大量杂蛋白,有较好的纯化效果,其纯化倍数达到了 11.11,但随着纯化的持续进行,比活力的升高伴随着蛋白的逐渐损失,造成总活力下降。通过纯化, β -葡萄糖苷酶的酶活力得率为 1.14 U/g 木薯干重,纯度提高了 14.62 倍,活力回收率为 12.14%。

表 1 木薯 β -葡萄糖苷酶的纯化

Table 1 Purification of cassava β -glucosidase

方法	木薯粉(g)	总活力(U)	总蛋白量(mg)	比活力(U/mg)	纯化倍数(倍)	总活力回收率(%)
粗酶液提取		937.13	60.06	15.60	/	100.00
丙酮沉淀	100.00	857.69	31.50	27.23	1.75	91.52
离子交换层析		384.68	2.22	173.32	11.11	41.05
凝胶过滤纯化		113.80	0.50	228.16	14.62	12.14

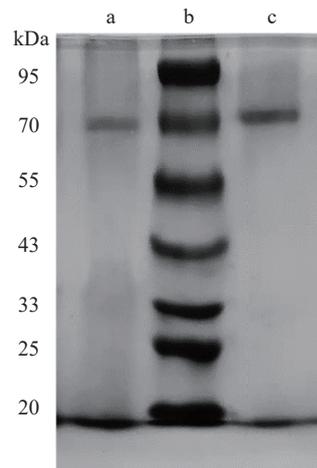


图 3 木薯 β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 电泳

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of cassava β -glucosidase
注: a: 粗酶液; b: 标准蛋白; c: 纯化后的酶液。

2.5 木薯 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

2.5.1 酶的 pH 稳定性 木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的 pH 稳定性如图 4 所示,在强酸环境下,酶蛋白发生变性失活;pH 为 6.0~8.0 之间,酶表现出良好的稳定性,在 pH7.0 时相对酶活力最高,达到 98.87%;pH 超过 8.0 后,过碱环境使得酶蛋白结构破坏,部分酶蛋白变性失活,造成酶活力下降。

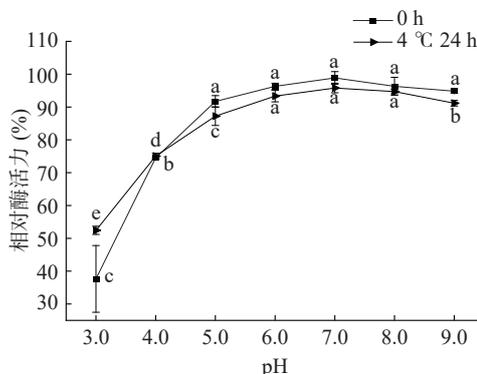


图 4 β -葡萄糖苷酶的 pH 稳定性

Fig.4 pH stability of β -glucosidase
注: 图中不同小写字母表示组内差异显著, $P < 0.05$; 图 8 同。

不同来源的 β -葡萄糖苷酶 pH 稳定性不同, pH 的变化可能会使氨基酸所带的正负电荷发生改变,造成酶蛋白失活,如荞麦^[30] β -葡萄糖苷酶的稳定 pH 为 5.0 左右。相比较玄参^[31]在 pH3.5~6.0 之间及甘蓝^[23]中的 β -葡萄糖苷酶在 pH 低于 4.0 以下有良好的稳定性,推测木薯块根 β -葡萄糖苷酶在碱性条件

下有更好的稳定性。

2.5.2 酶的热稳定性 木薯块根中 β -葡萄糖苷酶的热稳定性结果如图 5 所示, 在 30 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 48 h, 残余酶活分别为 94.20% 和 73.01%; β -葡萄糖苷酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 h 酶活仅剩 20% 左右, 说明酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以内有良好的稳定性, 超过 40 $^{\circ}\text{C}$ 会造成部分蛋白质变性失活, 变性温度在 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

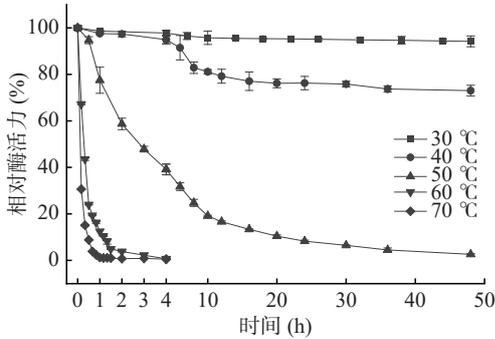


图 5 β -葡萄糖苷酶的热稳定性
Fig.5 Thermostability of β -glucosidase

植物来源的 β -葡萄糖苷酶最适温度一般分布在 25~65 $^{\circ}\text{C}$ ^[32], 不同来源的 β -葡萄糖苷酶其稳定性不同, 如柑橘^[33] β -葡萄糖苷酶在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下较稳定, 40 $^{\circ}\text{C}$ 时由于酶蛋白失活, 酶活力会降至 30 $^{\circ}\text{C}$ 时的 26%, 相较于柑橘, 木薯块根 β -葡萄糖苷酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时表现出更加良好的热稳定性。

2.5.3 酶的保存稳定性 木薯块根 β -葡萄糖苷酶的保存稳定性如图 6 所示, 酶液在存放两周左右残余酶活在 90% 左右; 两周后可能由于酶液中部分酶蛋白变质造成酶活力与之前相比下降较迅速, 之后趋于稳定, 酶液在存放 30 d 仍然剩余 81.78%, 表明酶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 密闭的环境下保存, 酶活的下降趋势较为缓慢。

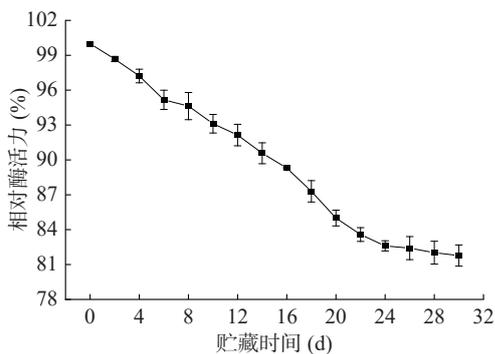


图 6 β -葡萄糖苷酶的保存稳定性
Fig.6 Storage stability of β -glucosidase

2.5.4 酶水解 p-NPG 动力学常数的测定 通过改变 p-NPG 的浓度测定酶活力并采用 Lineweaver-Burk 做图法, 以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作图, 结果如图 7 所示。通过线性回归得到方程: $y=0.2914x+0.0809$, $R^2=0.9983$, 计算得到 K_m 为 3.60 mmol/L, V_{max} 为 12.36 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$, 比鸡蛋花^[34] β -葡萄糖苷酶与 p-NPG 的亲合力更高, 与双齿围沙蚕^[35]中

分离得到的 β -1,3-葡萄糖苷酶 K_m 值接近。 K_m 值越小, 表明酶与底物的亲和力越强, 由此可见, 木薯 β -葡萄糖苷酶对 p-NPG 有较高的亲和力。

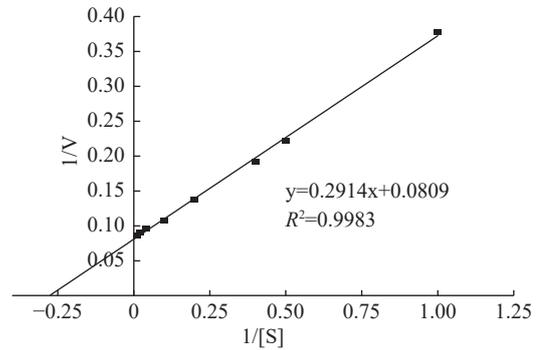


图 7 酶水解 p-NPG 的 Lineweaver-Burk 关系图
Fig.7 Lineweaver-Burk plot of enzymatic hydrolysis of p-NPG

2.5.5 部分金属离子和有机物对酶活性的影响 金属离子和有机物对酶活性的影响如图 8 所示, Mn^{2+} 和 K^+ 对酶有一定的促进作用; Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、尿素和 SDS 对酶无显著影响($P>0.05$); 而 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^+ 和 EDTA 对酶有不同程度的抑制作用, 其中 Ag^+ 对酶有较强的抑制作用, 相对酶活力仅为 25.69%, 这主要是由于 Ag^+ 能催化水解二硫键^[36], 而 EDTA 可能与蛋白质相互作用导致酶蛋白失活。

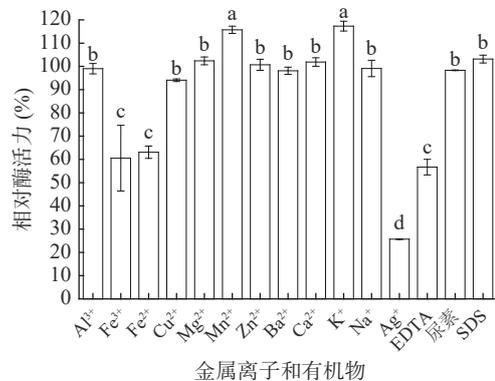


图 8 金属离子和有机物对酶活性的影响
Fig.8 Effects of metal ions and organics on enzyme activity

3 结论

本研究通过对木薯块根中 β -葡萄糖苷酶进行缓冲液提取、丙酮初步纯化、离子交换层析和凝胶过滤层析, 得到约 70 kDa 的 β -葡萄糖苷酶, 酶活力 1.14 U/g 木薯干重, 纯度提高了 14.62 倍, 酶回收率为 12.14%。木薯块根 β -葡萄糖苷酶水解 p-NPG 的动力学常数 K_m 为 3.60 mmol/L, V_{max} 为 12.36 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$; 该 β -葡萄糖苷酶 pH 在 6.0~8.0 之间有较好的稳定性, 最适 pH 为 7.0; 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以内稳定性较好, 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 30 d 酶活力剩余 81.78%; Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^+ 、尿素和 SDS 对酶无显著影响($P>0.05$), Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^+ 和 EDTA 会不同程度的造成酶失活, 其中 Ag^+ 抑制酶的作用最强。通过对木薯块根 β -葡萄糖苷酶的研究, 可以为

木薯的综合利用提供科学理论依据。

参考文献

- [1] CHIOU T Y, LIN Y H, SUN N W, et al. Beta-glucosidase isolated from soybean okara shows specificity toward glucosyl isoflavones [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(15): 8872–8878.
- [2] 王国泽, 方杰, 王志国, 等. 地稍瓜 β -葡萄糖苷酶和多聚半乳糖醛酸酶基因克隆 [J]. *内蒙古科技大学学报*, 2019, 38(4): 327–330. [WANG G Z, FANG J, WANG Z G, et al. Cloning of the gene encoding beta-glucosidase and polygalacturonase from *Cynanchu mthesioides* (Freyn) K. Schum [J]. *Journal of Inner Mongolia University of Science and Technology*, 2019, 38(4): 327–330.]
- [3] 余奕宏, 顾苑婷, 丁筑红, 等. β -葡萄糖苷酶生物转化刺梨鞣皮素糖苷的工艺优化 [J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(5): 109–118. [YU Y H, GU Y T, DING Z H, et al. Effect of β -glucosidase on biotransformation of quercetin glycosides in *Rosa roxburghii* [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(5): 109–118.]
- [4] BARBAGALLO R N, PALMERI R, FABIANO S, et al. Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(5): 570–575.
- [5] GAO J, WU B P, GAO L X, et al. Glycosidically bound volatiles as affected by ripening stages of Satsuma mandarin fruit [J]. *Food Chemistry*, 2018, 240(feb.1): 1097–1105.
- [6] ZHANG T, FANG K, NI H, et al. Aroma enhancement of instant green tea infusion using β -glucosidase and β -xylosidase [J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126287.
- [7] DOAN D T, LUU D P, NGUYEN T D, et al. Isolation of *Penicillium citrinum* from roots of *Clerodendron cyrtophyllum* and application in biosynthesis of aglycone isoflavones from soybean waste fermentation [J]. *Foods*, 2019, 8(11): 554.
- [8] YANG S, WANG L, YAN Q, et al. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila* [J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(4): 1247–1252.
- [9] XU Z Y, LEE K H, DONG T, et al. A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2184–2199.
- [10] MOTZ D, SHARP J, MOORE T, et al. Abstract T P337: Outcomes for a cohort of patients not treated with thrombolytic therapy due to mild or rapidly improving stroke symptoms: A retrospective review [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 92(6): 2036–2040.
- [11] 曾颖, 张亚楠, 曾臻, 等. 双水相体系萃取分离鲍鱼内脏中的 β -葡萄糖苷酶 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 164–171. [ZENG Y, ZHANG Y N, ZENG Z, et al. Extraction of β -glucosidase from abalone viscera by aqueous two-phase system [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(21): 164–171.]
- [12] BI Y, ZHU C, WANG Z, et al. Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from black plum seed and its structural changes in ionic liquids [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 422–428.
- [13] SAROJ P, MANASA P, NARASIMHULU K. Biochemical characterization of thermostable carboxymethyl cellulase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253 [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2021, 57(S1): S98–S106.
- [14] 周俊, 夏秀东, 李亚辉, 等. 产 β -D-葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选、鉴定及系统发育分析 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(12): 119–123, 131. [ZHOU J, XIA X D, LI Y H, et al. Screening, identification and phylogenetic analysis of Lactic acid bacteria producing β -D-glucosidase [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(12): 119–123, 131.]
- [15] YIN B, GU H, MO X, et al. Identification and molecular characterization of a psychrophilic GH1 β -glucosidase from the subtropical soil microorganism *Exiguobacterium* sp. GXG2 [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 159.
- [16] 王天亮, 柯野, 谢璐, 等. 玉米中 β -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研究 [J]. *浙江农业科学*, 2018, 59(2): 4. [WANG T L, KE Y, XIE L, et al. Study on the determination conditions of β -D-glucosidase activity in maize [J]. *Zhejiang Agricultural Science*, 2018, 59(2): 4.]
- [17] 任婧楠, 范刚, 张璐璐, 等. 锦橙中 β -葡萄糖苷酶的提取纯化及其结构表征 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(15): 84–88. [REN J N, FAN G, ZHANG L L, et al. Extraction, purification and structural characterization of β -glucosidase in Jincheng oranges [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2019, 40(15): 84–88.]
- [18] 李蕊伽. 芦荟叶皮 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质和功能基因研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017. [LI R J. Isolation and purification of β -glucosidase from *Aloe vera* leaf bark and its enzymatic properties and functional groups [D]. Chongqing: Southwest University, 2017.]
- [19] KAR B, VERMA P, PATEL G K, et al. Molecular cloning, characterization and *in silico* analysis of a thermostable β -glucosidase enzyme from *Putranjiva roxburghii* with a significant activity for cellobiose [J]. *Phytochemistry*, 2017, 140: 151–165.
- [20] 李斐然. 橡胶籽中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及性质研究 [D]. 海口: 海南大学, 2012. [LI F R. Isolation, purification and properties of β -glucosidase in rubber seeds [D]. Haikou: Hainan University, 2012.]
- [21] 刘凯琳. 樱桃种子苦杏仁苷含量变化规律及其调控技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019. [LIU K L. Study on the change pattern and regulation technology law of amygdalin content in cherry seeds [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.]
- [22] 侯益兰, 杨永恒, 张婷, 等. 甜菊叶片 β -葡萄糖苷酶的提取及其性质研究 [J]. *中国农学通报*, 2020, 36(7): 128–134. [HOU M L, YANG Y H, ZHANG T, et al. β -Glucosidase from *Stevia* leaves: Extraction and characteristics [J]. *China Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(7): 128–134.]
- [23] BE I L, I A A, MUHOVI I, et al. Purification and characterization of β -glucosidase from *Brassica oleracea* [J]. *Journal of Food Processing & Preservation*, 2017, 41(2): 1–7.
- [24] 郭天赐, 赵石磊, 刘石生. 苦杏仁 β -葡萄糖苷酶水解豆浆中大豆异黄酮的工艺研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(12): 82–88. [GUO T C, ZHAO S L, LIU S S. Study on the hydrolysis of soy isoflavones in soymilk by bitter almond β -glucosidase [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(12): 82–88.]
- [25] 陈杏, 杨成丽, 鲍炳鑫, 等. 茶树菇 β -葡萄糖苷酶的纯化及应用研究 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(8): 192–194. [CHEN X,

- YANG C L, BAO B X, et al. Purification and application of β -glucosidase in the mushroom camellia chinensis[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 192–194.]
- [26] MKPONG O E, YAN H, CHISM G, et al. Purification, characterization, and localization of linamarase in cassava[J]. *Plant Physiology*, 1990, 93(1): 176–181.]
- [27] 徐佳茜. 水分对橡胶籽 β -葡萄糖苷酶热稳定性的影响[D]. 海口: 海南大学, 2020. [XU J Q. Effect of moisture on thermal stability of rubber seed β -glucosidase[D]. Haikou: Hainan University, 2020.]
- [28] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248–254.]
- [29] 安玫. 盾叶薯蓣根状茎 β -葡萄糖苷酶研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2017. [AN M. β -Glucosidase in rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright[D]. Wuhan: Wuhan University, 2017.]
- [30] 张卓. 荞麦中 β -葡萄糖苷酶的分离提取及其酶促动力学的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011. [ZHANG Z. Study on the extraction and separation of β -glucosidase from buckwheat and its kinetics of enzymic reaction[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.]
- [31] 喻欢欢, 吉光见稚代, 胥秀英, 等. 玄参中 β -葡萄糖苷酶活性测定条件及干燥过程中酶活性变化的研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 6. [YU H H, YOSHIMITSU M, XU X Y, et al. Investigate optimum conditions and determinate changes of β -glucosidase activity in *Scrophularia* root under different drying conditions [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(2): 6.]
- [32] SUE M, ISHIHARA A, IWAMURA H. Purification and characterization of a beta-glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings[J]. *Plant Science*, 2000, 155(1): 67–74.]
- [33] REN J N, YANG Z Y, TAI Y N, et al. Characteristics of β -glucosidase from oranges during maturation and its relationship with changes in bound volatile compounds[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2015, 95(11): 2345–2352.]
- [34] BOONCLARM D, SORNWATANA T, ARTHAN D, et al. β -Glucosidase catalyzing specific hydrolysis of an iridoid β -glucoside from *Plumeria obtusa*[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2006, 38(8): 563–570.]
- [35] 于海慧, 宋淑梅, 佟长青, 等. 双齿围沙蚕 β -1,3-葡萄糖苷酶分离纯化及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2017, 38(10): 227–230. [YU H H, SONG S M, TONG C Q, et al. Purification and characterization of β -1,3-glucosidase from *Perinereis aibuhitensis* [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2017, 38(10): 227–230.]
- [36] 宋晓青. 蜡梅花 β -葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005. [SONG X Q. Preliminary studies on activity, purification and characterization of β -glucosidase in *Chimonanthus praecox* L.[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.]