



嗜酸乳杆菌GIM1.208 β -葡萄糖苷酶的 异源表达、纯化及酶学性质研究*

余奕宏 丁小娟 丁筑红** 宋煜婷 王 翼

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 国家林业和草原局刺梨工程技术研究中心, 贵州省农畜产品贮藏加工重点实验室, 贵阳 550025)

摘要 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 是益生菌, 前期研究发现 *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 所产生的 β -葡萄糖苷酶 (BGL) 具有较高活性, 为探明其结构与特性, 本研究采用 PCR 体外扩增技术获得 *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 BGL 的目的基因, 并在大肠杆菌中成功表达, 经镍亲和层析等蛋白质纯化技术获得纯度达 90% 以上的蛋白质样品, 进而通过圆二色光谱法 (CD) 和同源建模法对 BGL 的二级结构和三级结构进行测定分析并研究其酶学性质. 结果表明, *Lactobacillus acidophilus* BGL 的分子质量为 52 ku, 纯化后浓度为 1.88 g/L, 二级结构包括 15.9% α 螺旋、44.1% β 折叠、18.1% β 转角、27.2% 无规则卷曲, 其三维结构显示, 该蛋白质有 8 个 β 折叠和 8 个 α 螺旋, 整体呈圆锥形. *Lactobacillus acidophilus* BGL 具有良好的葡萄糖耐受性与 NaCl 耐受性, 最适反应温度为 47°C, 最适反应 pH 为 5.6, 在 20°C~50°C 范围内和 pH 2.2~6.0 间有较高的稳定性, 且乙酸乙酯、甲醇对酶活性抑制作用明显, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 对酶有显著激活作用. 上述研究结果为 *Lactobacillus acidophilus* BGL 后续功能发掘和应用研究提供了重要参考依据.

关键词 β -葡萄糖苷酶 (BGL), 异源表达, 纯化, 酶学性质, 圆二色谱, 同源建模

中图分类号 Q782, Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0226

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 属于乳杆菌科乳杆菌属, 是重要的益生菌, 被广泛应用于食品工业中^[1]. 研究表明, *L. acidophilus* 具有很强的耐酸性, 能在其他乳酸菌无法存活的酸性环境中生长繁殖^[2], 在人体中能通过平衡肠道菌群和调节微生态促进人体健康^[3]. Zhao 等^[4] 通过体内和体外试验发现 *L. acidophilus* 在免疫调节中也具有积极作用.

β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, BGL) 广泛存在于动植物和微生物体内^[5], 对结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键具有催化特异性, 能转移葡萄糖基^[6]. BGL 在活细胞内产生, 可在体外参与各类反应, 如转化大豆异黄酮苷提高食品保健功能^[7]、利于葡萄酒香气的提升^[8]等, 在食品工业中有极大的应用价值并受到研究者关注. 随着 BGL 的应用越来越广泛, 国内外也开始关注该酶的性质及功能特性. 乳酸菌来源的 BGL 对食品的营养价值及其功能特性改善有双重提升作用, 安全性高, 是 BGL 的理想来源^[9], 但目前国内外针对微生物来

源 BGL 的研究主要集中在黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、木霉菌 (*Trichoderma*) 等, 对乳酸菌来源的 BGL 及其相关酶学性质研究鲜有报道. 研究表明, NaCl 浓度、温度、pH 的变化都有可能影响蛋白质结构的变化, 进而影响酶活性^[10], 制约了 BGL 的工业化生产^[11]. 采用基因克隆技术、异源表达和纯化 *L. acidophilus* GIM1.208 BGL, 不仅可高效表达具有高稳定性的 BGL, 还可提高酶活性, 可为 *L. acidophilus* BGL 的性质及结构研究提供基础支撑.

本研究从 *L. acidophilus* GIM1.208 中克隆获得 BGL 基因, 构建重组载体 PET-28a(+)-bgl, 将其转化大肠杆菌 (*E. coli*), 首次实现了 *L. acidophilus* BGL

* 国家自然科学基金(31860446), 贵州省科学技术基金(黔科合基础[2019]1104)和贵州省科技计划(黔科合平台人才[2018]5781号)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13595028312, E-mail: 457950584@qq.com

收稿日期: 2020-07-08, 接受日期: 2020-09-09

的异源表达, 并初步探明BGL的蛋白质二、三级结构及其酶学性质, 为*L. acidophilus* BGL的深入研究和*L. acidophilus*未来工业化应用提供重要理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜酸乳杆菌 GIM 1.208 (*Lactobacillus acidophilus* GIM 1.208) 购自广东省微生物菌种保藏中心; 载体PET-28a(+)、*E. coli* Rosetta (DE3) 为本实验室保存.

PCR产物纯化试剂盒、SK3071非干扰型蛋白质定量试剂盒、TMB显色试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 樟脑磺酸(CSA)(纯度>98%)购自Sigma; 溶菌酶(纯度>98%)购自上海索莱宝生物科技有限公司; T4DNA连接酶(纯度>98%)购自美国Promega公司; 其他试剂均为分析纯.

LB培养基参考何传雨^[12]方法并作修改: 胰蛋白胨1 g, 酵母提取物0.5 g, 氯化钠1 g, 加入蒸馏水100 ml, 120 kPa灭菌30 min.

1.2 仪器与设备

ABI5700型PCR反应扩增仪(加拿大BBI公司); DYY-8型pH复合电极(上海琪特分析仪器有限公司); SX Chirascan圆二色光谱仪(英国应用光物理公司); TGL IOM型台式高速冷冻离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司); C600793 Ni-NTA镍琼脂糖凝胶亲和层析柱(上海生工生物有限公司).

1.3 方法

1.3.1 *L. acidophilus* GIM1.208基因组DNA获取

a. 特异性引物设计及合成. 根据实验室保存质粒PET-28a(+)的基因序列, 利用软件Primer5设计特异性引物序列, bglF引物添加限制性内切酶*Xho*I位点, bglR引物添加限制性内切酶*Bam*H I位点. 上游引物(F): 5'-cagcaatgggtcgcGGATCC-ATGCTCACAACTAAAGATAAATATTTATATAA-3' (下划线标示*Xho*I酶切位点); 下游引物(R): 3'-gtggtggtggtggtgCTCGAGTTACTTTCCTACAATTACTAATTCG-5' (下划线标示*Bam*H I酶切位点).

b. 目的基因的提取. 取肉汤培养基(MRS Broth) 37℃发酵过夜培养的*L. acidophilus* GIM1.208发酵菌液1 ml, 加入2 ml离心管, 室温8 000 r/min离心1 min, 收集沉淀. 使用细菌基因组

DNA抽提试剂盒提取嗜酸乳杆菌GIM1.208基因组DNA, 其操作步骤按试剂盒使用说明进行.

c. 目的基因片段的扩增与纯化. 将提取的嗜酸乳杆菌GIM1.208基因组DNA作为PCR扩增模板. PCR反应体系见表1, PCR反应条件见表2.

Table 1 The PCR reaction system

PCR amplification system	Volume/ μl (Total volume 50 μl)
10×Fast Pfu buffer	5
bglF	2
bglR	2
Template	2
Pfu (5 U/μl)	0.4
ddH ₂ O	38.6

Table 2 The PCR reaction conditions

Program	Temperature/℃	Time	Number of cycles
Predenaturation	95	3 min	1
Denaturation	95	22 s	22
Annealing	55	20 s	
Extension	72	45 s	
Repair extension	72	5 min	1

PCR反应产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外透射光下观察. 利用San Prep柱式PCR产物纯化试剂盒纯化PCR扩增产物, 具体操作步骤详见试剂盒说明.

1.3.2 重组质粒构建与基因转化实验

按照PCR产物酶切体系和载体酶切体系分别对纯化后回收的PCR产物和载体PET-28a(+)用*Bam*H I和*Xho*I双酶切, 将配置好的酶切体系放入37℃恒温水浴锅中反应2 h, 使得PCR产物和载体PET-28a(+)进行充分酶切. 分别将用*Bam*H I和*Xho*I双酶切处理后的目的DNA片段和PET-28a(+)进行连接.

将连接液转入感受态细胞中, 混匀并冰浴30 min后, 42℃热激90 s, 快速转移至冰块静置5 min, 添加250 μl LB液体于离心管, 轻轻混匀, 37℃振荡培养60 min, 将离心管于4 000 r/min离心1 min, 弃去部分上清, 将剩余液体轻轻振荡使菌液悬浮, 取全部菌液, 用经过灭菌处理的涂布器涂布于LB固体培养基(含终浓度为30 mg/L卡那霉素和34 mg/L氯霉素), 37℃倒置过夜培养, 待其长出菌落. 挑取单克隆, 用San Prep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒提取质粒, 将经酶切和PCR鉴定无

误的转化子测序.

1.3.3 重组BGL的诱导表达

取 1 μ l 重组的 PET-28a(+) 载体转化 *E. coli* Rosetta(DE3) 感受态, 42℃ 热激 90 s 后冰上静置 5 min, 涂布于 LB 固体平板 (含终浓度为 30 mg/L 卡那霉素和 34 mg/L 氯霉素), 37℃ 培养过夜.

挑取表达菌株 *E. coli* Rosetta(DE3) 的单菌落于 LB 培养基中 37℃、220 r/min 过夜培养; 将过夜培养的菌液按 1 : 100 分别接种于 10 ml LB 培养基 (含终浓度为 30 mg/L 卡那霉素和 34 mg/L 氯霉素), 37℃、220 r/min 培养; 当吸光度 (A) 值达到 0.6 时, 添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG; 37℃ 诱导 4 h. 分别在 20℃、220 r/min 条件下诱导过夜; 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 弃上清, 收集菌体, 用 500 μ l 细菌裂解液充分悬浮, 超声破碎 6 min, 超声 0.5 s 停 1.5 s, 12 000 r/min, 4℃, 离心 20 min, 分离上清和沉淀, 沉淀用 500 μ l 包涵体溶解液溶解, 取 40 μ l 样品和 10 μ l 5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液混匀, 沸水浴 10 min; 准备 12% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), Tris-Gly 电泳缓冲液, 上样量 10 μ l, 浓缩胶 80 V, 20 min, 分离胶 120 V, 60 min, 凝胶电泳结束考马斯亮蓝染色 20 min, 脱色.

将培养的菌液按 1 : 100 比例接种于 3 L 的 LB 液体培养基 (含终浓度为 30 mg/L 卡那霉素和 34 mg/L 氯霉素). 在 37℃、220 r/min 振荡培养, 当 A 值达到 0.6 时, 添加终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 于 37℃、220 r/min 诱导过夜, 离心收集细菌菌体.

1.3.4 重组BGL的纯化

参照高玉霞^[13]破碎方法, 适当延长超声波破碎时间. 超声完毕, 在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 收集上清进行镍琼脂糖凝胶亲和层析纯化.

a. 将 5 ml Ni-NTA 用 5 倍柱床体积的结合缓冲液以 5 ml/min 流速清洗平衡层析柱.

b. 填料和样品孵育 1 h 后上柱, 收集穿透液.

c. 5 倍柱床体积的结合缓冲液以 5 ml/min 流速清洗层析柱.

d. 以 2 ml/min 流速的清洗缓冲液洗去杂蛋白, 收集洗脱液.

e. 以 2 ml/min 流速的洗脱缓冲液洗脱, 收集洗脱液.

f. 将经镍琼脂糖凝胶亲和层析出来的上样液、

流出液, 以及分别经不同浓度 (20、50、500 mmol/L 咪唑 (imidazole)) 洗脱液洗脱的目标蛋白, 均在 50 mmol/L Tris、300 mmol/L NaCl、pH 8.0 的溶液中 4℃ 透析过夜. 透析结束后用 PEG 20000 浓缩, 再用 0.45 μ m 滤膜过滤后分装 1 ml/tube, -80℃ 保存并进行 SDS-PAGE 检测. 目标蛋白浓度按照 SK3071 非干扰型蛋白质定量试剂盒的操作步骤进行检测.

g. 收集蛋白质进行蛋白质印迹 (Western blot) 检测.

1.3.5 BGL酶活力测定

采用 4-硝基苯基- β -吡喃葡萄糖苷 (p-NPG) 法^[14]测定 BGL 酶活力, 在这里 1 ml 粗酶液在 37℃、pH 5.0 反应条件下, 1 min 酶解 p-NPG 产生 1 μ mol 对硝基苯酚 (p-NP) 的酶量, 定义为一个酶活力单位, 以 U/ml 表示.

1.3.6 *L. acidophilus* BGL的酶学性质研究

a. *L. acidophilus* BGL 最适反应温度. 参考刘群等^[15]的方法, 取 0.1 ml 重组 BGL 酶液分别置于 20℃~90℃ 水浴锅中孵育处理 30 min, 测不同温度下 BGL 的酶活力, 按照催化反应体系最高酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力.

b. *L. acidophilus* BGL 的热稳定性. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 和 90℃ 条件下, 分别保温 20、40、60、80、100、120 min 后, 测定酶活力, 以 20℃ 所测酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力.

c. *L. acidophilus* BGL 最适反应 pH. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于等体积 pH 2.0~3.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、pH 3.5~5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液、pH 6.0~8.0 的磷酸盐缓冲液中, 测定酶活力, 以催化反应体系最高酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力.

d. *L. acidophilus* BGL 的 pH 稳定性. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于等体积 pH 2.2~3.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、pH 3.6~5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液、pH 5.8~8.0 的磷酸盐缓冲液中, 4℃ 孵育 4 h 后, 测定酶活力, 以 pH 2.2 催化反应条件下所测得 BGL 酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力.

e. 不同有机溶剂对 *L. acidophilus* BGL 酶活性的影响. 参考张玉梅^[16]的方法, 并作修改. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于等体积的 0%、10%、20%、30%、40%、50% 无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等有机溶剂中, 4℃ 孵育 4 h 后, 测定酶活力, 以在催化反应体系中添加 0% 有机溶剂所测酶活力为

100%, 计算不同条件下的相对酶活力。

f. 金属离子对 *L. acidophilus* BGL 酶活性的影响. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于等体积的含有 0.5 mmol/L 的 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 离子的溶液中, 4℃ 孵育 4 h 后, 测定酶活力, 以空白组 (未添加金属离子) 所测酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力。

g. *L. acidophilus* BGL 的耐糖量. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于不同浓度 (0.0、0.5、0.8、1.0、2.0、2.5、3.0 mol/L) 的葡萄糖溶液中, 测定酶活力, 以空白组 (未添加葡萄糖) 所测 BGL 的酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力。

h. *L. acidophilus* BGL 的耐盐性. 取 1 ml 粗酶液, 分别置于不同浓度 (0.0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mol/L) NaCl 溶液中, 测定酶活力, 空白组 (未添加 NaCl) 所测 BGL 的酶活力为 100%, 计算不同条件下的相对酶活力。

1.3.7 *L. acidophilus* BGL 的二级结构分析

a. 标准品远近紫外扫描. 设定扫描波长 180~340 nm 进行背景测试、空白缓冲液测试, 然后采集 1 g/L CSA 标准品溶液在 180~340 nm 范围的圆二色远近紫外吸收。

b. 样品远紫外扫描. 将比色皿用 2 mol HNO_3 浸泡过夜, 去离子水冲洗干净后晾干, 先采集背景, 再采集空白缓冲液, 然后在比色皿中加入 200 μl 浓度为 0.2 g/L 的供试品在 190~260 nm 波长范围内进行远紫外扫描并采集数据。

c. 扫描图谱处理. 对扫描后的所有图谱用 Pro-Data Viewer3.5 软件进行扣除基线 (subtract baseline)、曲线平滑 (smoothing) 处理. 对标准品波峰波谷 CD 值的比值进行计算, 有效比值范围为 (2.08 ± 0.06) 。

1.3.8 *L. acidophilus* BGL 的三级结构同源建模分析

根据 *L. acidophilus* GIM.1208 BGL 编码的基因测序结果, 利用 SWISS-MODEL 平台对 *L. acidophilus* BGL 的三维结构进行同源建模。

2 结果与分析

2.1 *L. acidophilus* GIM1.208 BGL 编码基因的克隆与表达

将连接的重组载体 PET-28a(+)-bgl, 利用琼脂糖凝胶电泳进行双酶切鉴定. 重组载体 PET-28a(+)-bgl 全长为 5 700 bp (图 1), 将验证正确的重组质

粒 PET-28a(+)-bgl 导入感受态细胞中转化, 在 LB 平板中过夜培养后筛选所需单克隆体。

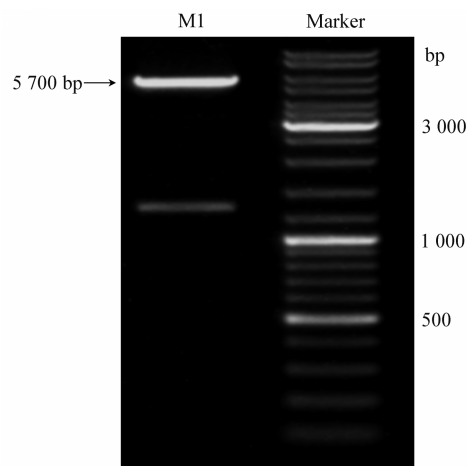


Fig. 1 Enzyme digestion analysis of PET-28a(+)-bgl

M1: Recombinant plasmid PET-28a(+)-bgl after digestion.

由图 2 可知, 37℃ 诱导过夜的重组质粒 PET-28a(+)-bgl 较 20℃ 下诱导过夜的重组质粒诱导表达的目的基因效果更佳, 表达产物条带清晰且明亮. 同时发现, 20℃ 和 37℃ 诱导条件下所得上清液中诱导表达产物条带较诱导后沉淀中的诱导产物条带亮度较弱, 20℃ 诱导后的沉淀中诱导物条带亮度较 37℃ 诱导产物条带较弱. 因此, 可以确定在 37℃、220 r/min 振荡诱导条件下, 诱导过夜的沉淀中能够更好地得到所需的诱导表达产物, 经诱导原核表达 β -葡萄糖苷酶的基因片段大小为 52 ku.

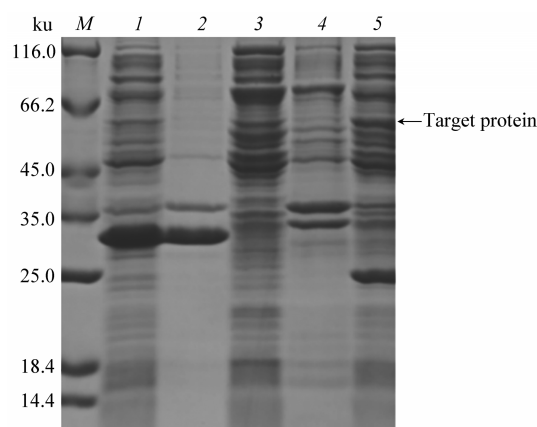


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme BGL expression level at different induction temperatures

M: Protein molecular mass marker; I: Total protein before induction; 2: 20°C supernatant; 3: 20°C precipitation; 4: 37°C supernatant; 5: 37°C precipitation.

2.2 镍琼脂糖亲和层析纯化

如图3所示, 1~5泳道分别为上样液、流出液、以及不同浓度(20、50、500 mmol/L imidazole)洗脱液洗脱后经透析所得的目标蛋白BGL. 第4和5泳道的条带较为清晰, 且无杂带, 表明经镍琼脂糖亲和层析柱纯化后, 在50 mmol/L Tris、300 mmol/L NaCl、50/500 mmol/L imidazole、pH 8.0的溶液、4℃透析的条件下, 目的蛋白能够被较好地纯化出来, 条带大小为52 ku.

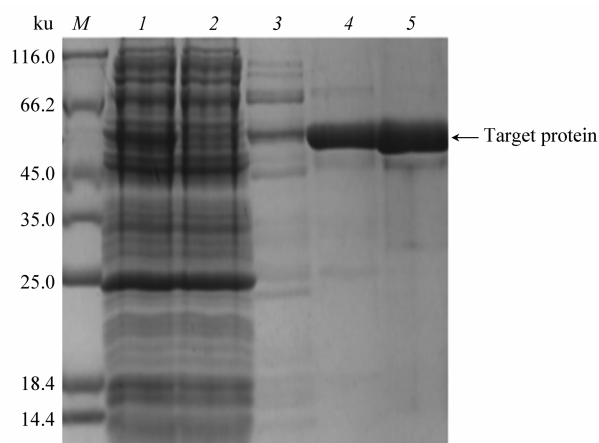


Fig. 3 Purification of β -glucosidase by nickel sepharose affinity chromatography

M: Protein molecular mass marker; 1: Loading; 2: Outflow; 3: 20 mmol/L imidazole; 4: 50 mmol/L imidazole; 5: 500 mmol/L imidazole.

2.3 *L. acidophilus* BGL表达的检测

2.3.1 融合蛋白的Western blot分析

经 Western blot 检测分析, 在电泳图第一泳道可以清晰地看到目的蛋白的完整条带, 分子质量为52 ku, 表明已得到纯度较高的目的蛋白(图4).

2.3.2 融合蛋白浓度测定

测得融合蛋白浓度为1.88 g/L, 得率为80%, 表明通过基因克隆技术、异源表达和纯化已成功得到目的蛋白.

2.4 *L. acidophilus* BGL的最适反应温度

温度对BGL影响较大^[17]. 酶作为催化剂, 随温度上升, 催化反应体系的速度逐渐增大, 不同来源酶最适反应温度存在差异^[18]. 由图5可知, 在20℃~40℃时, 由于温度升高分子间的碰撞频率增加^[19], 其动能增强, 使酶活性增强; 在47℃时, 其酶活力达到最大值, 为5.973 U/ml, 此时酶的生物活性结构处于相对稳定的状态; 当温度高于

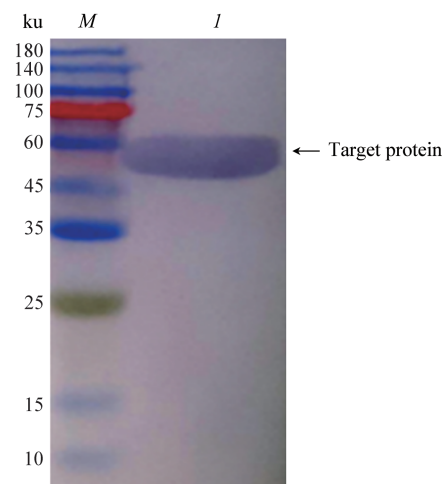


Fig. 4 Western blot analysis of β -glucosidase

M: Prestained marker; I: Target protein.

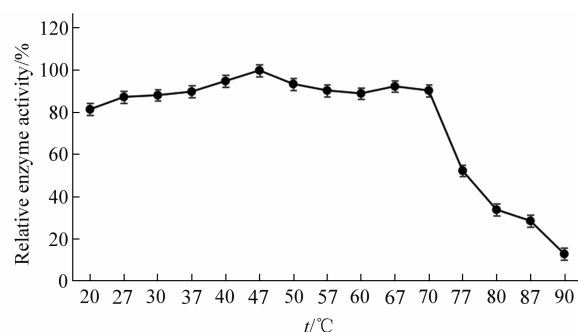


Fig. 5 The effect of temperature on the activity of recombinant β -glucosidase

50℃, 酶活力下降. 结果表明BGL的p-NPG催化反应最适温度为47℃.

2.5 *L. acidophilus* BGL的热稳定性

由图6可知, 在20℃、30℃恒温孵育2 h后, 其酶活性相对稳定, 相对酶活力基本维持在90%以上; 在40℃~60℃, 酶活性随时间延长缓慢减弱, 残余酶活力仍高于65%, 这表明在20℃~60℃, BGL有较好的稳定性, 70℃时残余酶活力为40%, 90℃时残余酶活力已低于10%. 有文献报道, 酶活性降低的原因是, 先前处于稳定状态的BGL高级结构因温度升高与底物的作用力逐渐减弱, 酶的活性中心被破坏, BGL的蛋白质构象发生变化, 促使肽链的延伸, 使得酶蛋白变性失活^[20].

杨芯卓^[21]发现BGL3A4在40℃~65℃时BGL的残留酶活力大于60%. 刘文龙等^[22]研究发现, 黑曲霉来源的BGL在85℃孵育处理60 min后, 其

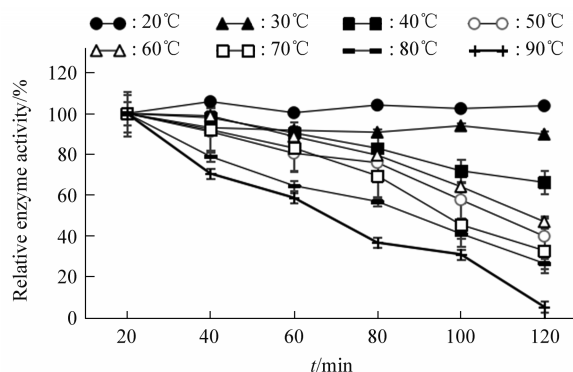


Fig. 6 The temperature stability of recombinant β -glucosidase

相对酶活力约为25%。可见, *L. acidophilus* BGL与其他来源的BGL相比具有更好的热稳定性。

2.6 *L. acidophilus* BGL的最适反应pH

反应体系pH对酶具有较大的影响, 偏酸或偏碱都会促使酶蛋白变性进而失活。图7显示, BGL在pH 2.2~5.0时, 随催化反应体系pH值增加, 其酶活性也逐渐增强; 在pH 5.6时, 酶活力达到最大值为5.605 U/ml; pH 5.8~8.0时, 随体系pH值增加, 酶活性呈现下降趋势。

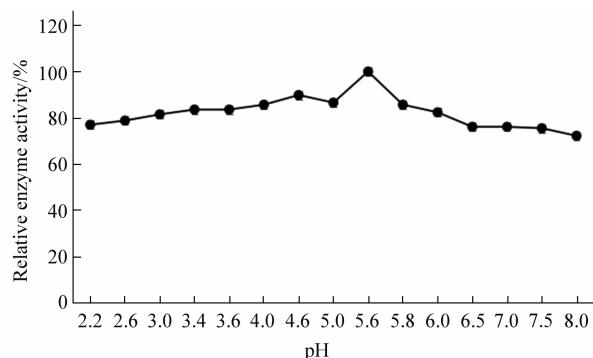


Fig. 7 The effect of pH on the activity of recombinant β -glucosidase

2.7 *L. acidophilus* BGL的pH稳定性

由图8可知, 在pH 2.2~6.0时, 酶活性具有一定稳定性; 在体系pH 7.0~8.0时, BGL酶活性处于不稳定的状态, 其相对酶活力呈现下降的趋势。这是由于反应体系偏碱时, 对酶的活性中心必需基团具有一定的影响, 从而破坏酶与底物间的结合和催化能力^[23]。不同微生物种类BGL的pH耐受性和稳定性一般有一定差异, 它们大多倾向于酸性pH范

围^[24-26]。同其他来源的BGL相比较, *L. acidophilus* 所产BGL的pH稳定性较好, 而且具有一定耐酸性。

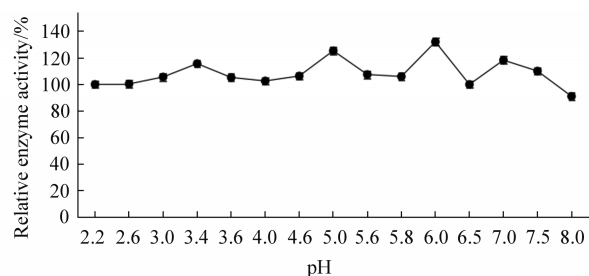


Fig. 8 The pH stability of recombinant β -glucosidase

2.8 有机溶剂对*L. acidophilus* BGL的影响

BGL催化电位的增加与葡萄糖基转移酶的活性有关^[27]。有机溶剂对酶活性有一定影响^[28]。图9显示, 4种有机溶剂对重组酶均有不同程度抑制作用。其中甲醇、乙酸乙酯、丙酮对BGL的抑制作用较强, 无水乙醇的抑制作用相对较弱。对重组BGL的酶活性抑制作用从小到大依次为: 无水乙醇、丙酮、甲醇、乙酸乙酯。

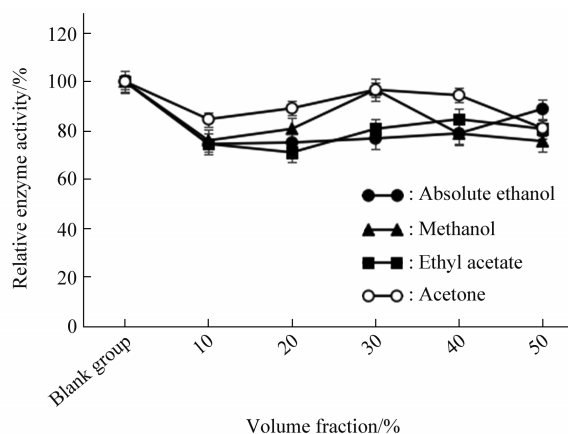


Fig. 9 Effects of various organic solvents on the activity of recombinant β -glucosidase

2.9 金属离子对*L. acidophilus* BGL的影响

BGL在工业化生产及其相关的应用过程中, 可与金属离子相互作用而影响酶活性^[29]。图10显示, Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 对重组BGL有不同程度抑制作用。 Na^+ 、 Al^{3+} 对BGL的抑制作用较强^[30], 分别促使重组BGL活性降低21.34%、21.02%。 K^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活性抑制作用较

弱. Becker和Evans^[31]研究发现金属离子对BGL的影响与单价离子的半径有关, 如 Na^+ 可以与蛋白质反应, 导致酶结构的构象变化从而失活. Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 对BGL有不同程度的促进作用, 其中 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 的激活作用较为显著. 这是因为金属离子在酶与底物相互作用时可起到桥梁作用, 有利于底物同BGL活性位点结合^[32]. 另外, 也有研究表明, Ca^{2+} 可通过稳定BGL的活性位点构象, 来提高与底物的结合亲和力^[33].

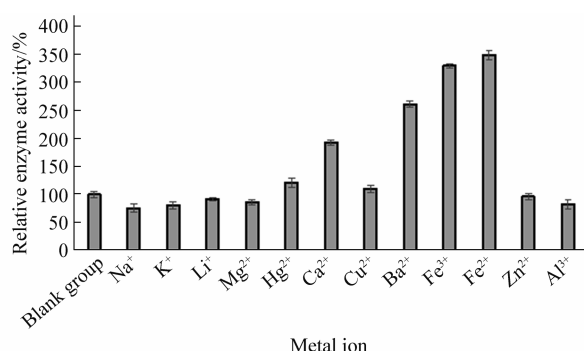


Fig. 10 Effect of various metal ions on the activity of recombinant β -glucosidase

2.10 *L. acidophilus* BGL糖耐量的研究

葡萄糖对大多数微生物来源的BGL有抑制作用, 是限制该酶被工业化使用的主要因素^[34]. 图11显示, 葡萄糖浓度在0.0~1.0 mol/L时, 葡萄糖对BGL催化活性有促进作用, 并在葡萄糖浓度为1.5 mol/L时, 酶活力达到最大值. 在葡萄糖浓度为2.0~3.0 mol/L时, 酶活性呈现下降趋势, 这与Singhanian等^[35]的研究结果一致, 高糖浓度可直接或间接干扰底物与酶活性位点的结合, 降低反应速率.

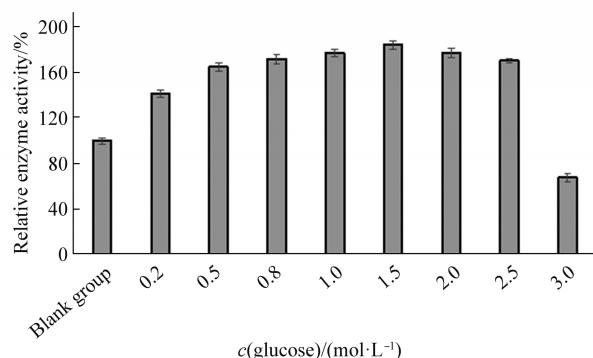


Fig. 11 The influence of glucose on recombinant β -glucosidase activity

2.11 *L. acidophilus* BGL对NaCl耐受性研究

研究发现BGL具有一定耐盐性, 在高盐浓度环境中, 会有较多带负电荷的氨基酸残基聚集于蛋白质表面, 进而防止蛋白质变性失活^[36]. 图12中, 在0.0~1.5 mol/L NaCl时, 随着催化反应体系盐浓度升高, 酶活性呈现上升趋势. NaCl浓度为2.0 mol/L时, 对酶活性具有一定的激活作用, 使酶活力提高79.11%. 在2.5~3.0 mol/L NaCl时, 酶活性降低. 而施赛铃^[32]研究发现, 200 mmol/L NaCl对BGL存在一定激活作用, 酶活力仅增长20%, 表明*L. acidophilus* BGL与其他来源的BGL相比具有更好的盐耐受性.

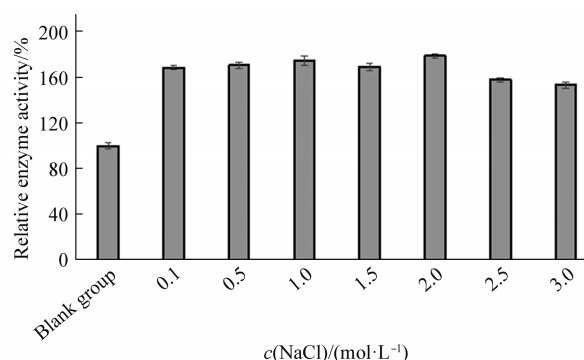


Fig. 12 The influence of NaCl on recombinant β -glucosidase activity

2.12 *L. acidophilus* BGL的圆二色谱分析

标准品CSA在波长192 nm附近有一个负峰, 在290 nm附近有一个正峰(图13). BGL的蛋白质二级结构在190 nm处有最大峰值, 在远紫外区随着波长的增大, 其紫外吸收光谱峰值逐渐趋近于零(图14). 因此, 可知圆二色谱法、紫外吸收光谱法具有较高的灵敏度和稳定性, 能够较准确地测定BGL的二级结构.

图14显示, BGL在远紫外区的190 nm附近出现一个正峰, 在208 nm和227 nm附近出现一个负峰, 该峰均为 α 螺旋结构在远紫外区的特征峰^[37-38]. β 折叠结构于195 nm附近有正的特征吸收峰, 216 nm处存在负的特征吸收峰. β 转角在220~230 nm附近有负的特征吸收峰^[39]. BGL二级结构组成见表3.

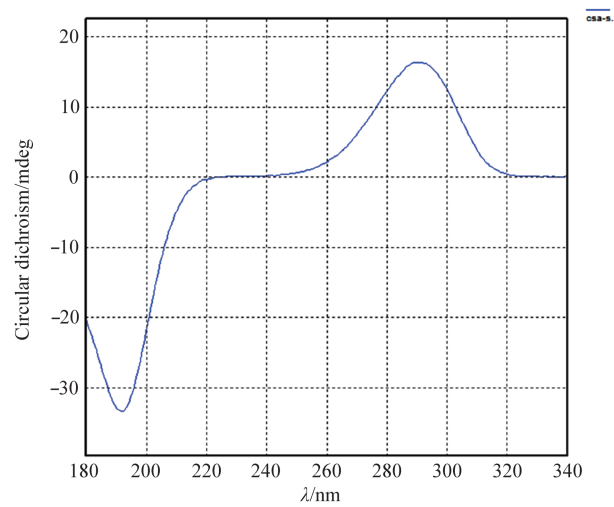


Fig. 13 CD spectra of standard CSA

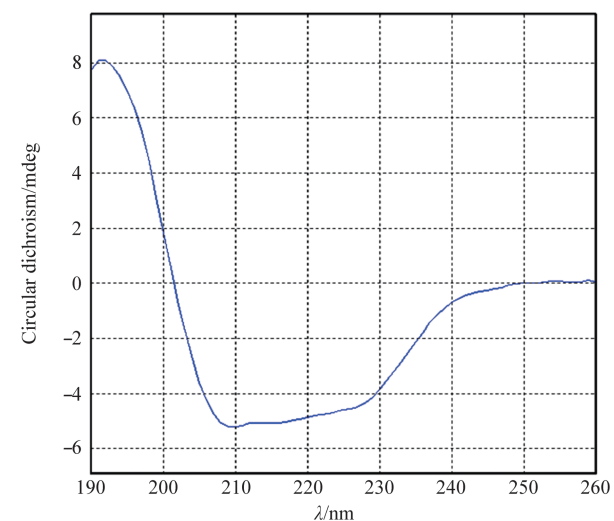


Fig. 14 Far ultraviolet CD spectra of β-glucosidase

Table 3 The analytical diagram of the secondary structure of β-glucosidase

Interval/nm	BGL secondary structure content/%			
	α-helices	β-sheet	β-turn	Random coil
190 ~ 260	15.9	44.1	18.1	27.2

2.13 *L. acidophilus* BGL的三维结构建模

根据 *L. acidophilus* BGL 编码基因的测序结果 (ATGCTCACAATAAGATAAATATTTATATAAAGATGGAAAAAGATTCTTTTATTTAGCAGATACATGTTGGGGTGCTTTCGGTAGTATTGATATGCCGATTGGCGCTATTATCTTGATTGCGGTAAAGCTGCAGGTTTTAACACGATTCAAATCAATGTTTTG

CGTCAATGGGATTCAAGCTTACCAATCAGAGA
GCCGTTTGCTATTACTAATCATGAAGATGGTAC
TTATGAATATGATTTTAATAAAATTAATGAATCA
TACTTTGACAATGCAGTTAAGATGTTGGAAGA
AATGCAAAAAAGAGATATGGTTCCGGCTTTAG
TTCTTTTATGGGGTAATTTTGTTCCTAACATG
GATGAGTAGATTTATTAAGAATAATATTATGCCT
TTTGAACAAATCAAATCATATGTTACTTATGTAG
TGAATAAATTTAAGAGATTAAATCCGATTTGGA
TTGTTAGTGGGGATGTTGGTTTTACAGATATGA
AAGGACAAAAGAAAGATCCTGCGATTAAATAC
TATCGTGAAGTAATTAATAACTGCCCAAGAGATT
GATCCAGAAGATTTATATACTTTTCATATCAATG
GTGAATCAACTGAAGTTCCAGATGAATTATTCA
AGAAGACAGATTTCTTTTTCTATCAATCAGGCC
ATGGATATACTGGTCAATCTACAGCATATACAAT
CCCACAAAAAATGCGTAAAGATAACTATGGAG
GCCCAATCATTGATGCAGAACTTTGTTATGAAG
GACTAACTAAAATGAAGGCTCCGACTGCTGAA
CGATATAGTGCTTTTGATGTTAGAAGGGCTGCT
TGCGGTGCAGTACTTTCTGGTGCAGATGCCGG
ATTAGGATATGGCAGTTTTGGTATTTGGCCATG
GAAAGATACTGTACGTCCTGAAGAAAAGTTAG
ATTCTAACTTTAATGTACAGTTAGTACCATATGA
TTGGCGAGATTGTTTGACTTTCCGTGGTGCAA
AAGATGTGGGATTTATTAAGATTTTATCAGTG
AGTATGCTTCTAATGGATTAAATCCAATTAATGA
TCCAGTTAAAGATAATCCAGAAATTAGAGCTGC
TCAAAATGATAAGTATATTTTTATTTATTTACCA
ACTTCAGGAATTATTAATTTTGATGATTTAGGA
ATTAAGGTTAATGAATGTAAGATAATGGATCTT
GATAAGCGTCGAATTATTCAAGGTAAAGTTGA
AAATAATGTTTTACAAATGTCATCTGTTATTGAA
GACGAATTAGTAATTGTAGGAAAG), 以糖苷水
解酶 (glycoside hydrolase, PDB 号 5MSY.A) 为模
板 (*L. acidophilus* BGL 和模板的序列比对结果见
图 15), 模拟 BGL 三维模型. 利用拉氏图
(Ramachandran plot) 评价方法评价模型合理性.
Ramachandran plot 用于阐述蛋白质三维结构中肽键
内 α 碳原子和羰基碳原子间的键的旋转度 (ψ) 对
α 碳原子和氮原子之间的键的旋转度 (φ), 以指明
蛋白质或者肽类中氨基酸的允许和不允许的构象.
主链构型中的 φ、ψ 二面角可以从 Ramachandran
plot 中读出, 当不低于 90% 的 φ、ψ 二面角分布在

允许区的时候,则为正常分布^[40].如图16所示,该模型98.5%以上的残基位于合理区域(允许区)内,不合理残基数量非常少,且不合理的残基基本位于蛋白质结构外侧,远离活性中心.根据90%的临界评价原则^[41],可看出模型从构型上来看较为

Protein Align : Pairwise Percentage Identity

Tue Sep 01 17:01:29 2020 (MOE 2019.01, Protein Align 2019.01)

The table value at row i, column j equals the number of residue matches between sequences i and j, divided by the length of sequence j.

Chains	1	2
1:5MSY.A		21.8
2:BGLp	20.1	

5MSY.A	GAQKKTKQTYIPWSNGKLWSEEGRYLKHENGTPFFWLGETGWLLPERLNRDEAEYYLEQ
BGLp	MLTTKDKYL.YKDGKRFYLDTCWGAFGSIDMPDWRYLDS
5MSY.A	CKRRGYNVIQVQLNNVPS.MNIYQYSMTDGYN..FKINQKGVYGYDMDHYIIRTAA
BGLp	RKAAGFNTIQINVLQWDSLLPIREFAITNHEDGTIEYDFNKINESYFDNAVKMLEEMQ
5MSY.A	KKGLYIGMVCINGSPVSHGEMN.....VDQAKAYGKFLAERYKDEPNIIWFIGGDI
BGLp	KRDMVPALVLLWGNFVPNTWMSRFIKNNIPFEQIKSYVTYVVKFK.RFNPIWIVSGDV
5MSY.A	RGDVKTAEWEALATSIKAIKDNHLMTHFPRGRTTSATWFNNAPWLDNMFQS
BGLp	GFTDMKGQKDDPAIKYREVIKTAQIDPEDLYTFHINGESTFVP.DELFKTDFFFYQS
5MSY.A	GHRRYQGRFGDGYPIEENTEEDNWRFRVSMAMKPMKPVIDGEPIYEEIPHLHDENEL
BGLp	GHGYTGQSTA...YTIPQKMRKDNVGGPIIDAELCYEGLTKMKAPTAER..YSAFDVRRRA
5MSY.A	LWKDYDVRRYAYWSVFAFGSFGHTYGHNSIMQFIKPGVG.GAYGAKKPMYDALNDPGYNQM
BGLp	AWR..AVLSGADAGLGYSGFIWPKDTPRPEEKLSNFNQVLPYDWRDCLTFRGAKDV
5MSY.A	KYLKNLMLTFPFERVPDQSVIAGQNGERYDRAIATRGNDYLMVNYNTRGPMEDVFSKIS
BGLp	GFIKDFISEYASNLNIPNDPKDNPEIR.....AAQNDKYIFIYLPSTSGIINF...DL
5MSY.A	GAKKNAMWYTTKDGKLEYIGFDNGVHKFQHDSSGYSSGNDHVLIVDSSKDYVKDCYQI
BGLp	GIKVNECKIMDLKRRRIQGVENNVLQM.....SSVIEDELIVGK.....
5MSY.A	DTHE
BGLp	

Fig. 15 The protein align between BGL sequence and the template 5MSY.A

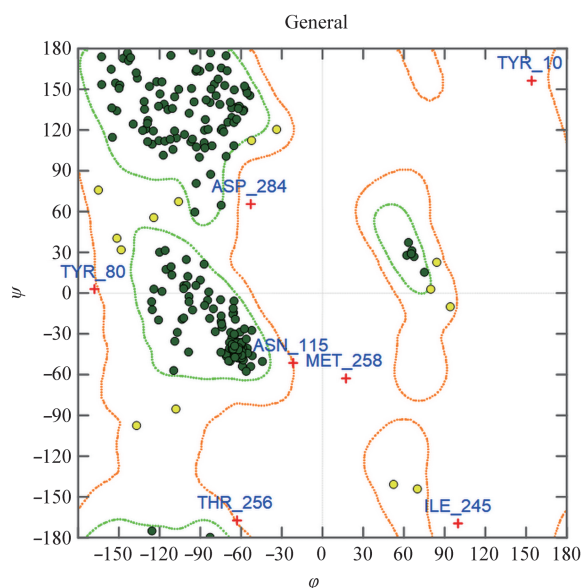


Fig. 16 Ramachandran plot of BGL protein model

稳定,说明BGL的三维结构模型构建合理、较为可靠.图17显示,*L. acidophilus* BGL蛋白有8个β折叠和8个α螺旋,整体呈现为圆锥形.

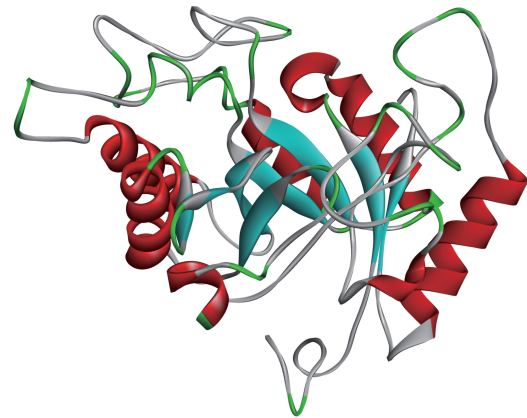


Fig. 17 3D structure model of BGL

3 结 论

采用PCR体外扩增技术获得*L. acidophilus* GIM1.208 β-葡萄糖苷酶的目的基因,构建PET-28a(+)表达载体,并在大肠杆菌中成功表达,利用镍柱等蛋白质纯化技术,得到纯度达90%以上的蛋白质样品,并探究其酶学性质与蛋白质结构,结果表明重组BGL的分子质量为52 ku,纯化后蛋白质浓度为1.88 g/L,二级结构包括15.9% α螺旋、44.1% β折叠、18.1% β转角、27.2%无规则卷曲,它的三维结构显示该蛋白质有8个β折叠和8个α螺旋,整体呈现为圆锥形.*L. acidophilus* BGL具有良好的葡萄糖耐受性与NaCl耐受性,最适反应温度为47℃,最适反应pH为5.6,在20℃~50℃范围内和pH 2.2~6.0间有较高的稳定性,乙酸乙酯、甲醇对酶活性抑制作用明显,Fe³⁺、Fe²⁺对酶有明显激活作用.本研究为*L. acidophilus*来源BGL的功能发掘及*L. acidophilus* GIM1.208应用开发提供了重要参考指导.

参 考 文 献

- [1] Yamano T, Tanida M, Nijjima A. Effects of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* strain la1 on autonomic nerves and blood glucose in rats. *Life Sciences*, 2006, **79**(20): 1963-1967
 - [2] 汤悦,谢智银,许阿荔,等.乳酸菌在动物营养中的应用与研究进展. *畜牧与饲料科学*, 2018, **39**(5): 39-42
- Tang Y, Xie Z Y, Xu A L, et al. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2018, **39**(5): 39-42

- [3] Wang Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. Food Res, Int., 2009, **42**: 8-12
- [4] Zhao W, Liu Y, Kwok L Y, *et al.* The immune regulatory role of *Lactobacillus acidophilus*: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. Food Bioscience, 2020, **36**: 100656
- [5] Oliveira R P, Santos B V, Costa L, *et al.* Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic sub-strates submitted to chemical pre-treatments. In-dustrial Crops and Products, 2017, **95**: 453-459
- [6] Siddiqi M Z, Cui C H, Park S K, *et al.* Comparative analysis of the expression level of recombinant ginsenoside- transforming β -glucosidase in gras hosts and mass production of the ginsenoside rh2-mix. Plos One, 2017, **12**(4): e0176098
- [7] Grade L C, Moreira A A, Varea G D S, *et al.* Soybean β -Glucosidase immobilised on chitosan beads and its application in soydrink increase the aglycones. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2014, **57**(5): 766-773
- [8] Sahay S. Enzymes in Food Biotechnology. Pittsburgh: Academic Press, 2019: 73-92
- [9] 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 等. 微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展. 食品工业科技, 2019, **40**(16): 329-335
Zhang Y Y, Su M, Piao C H, *et al.* Science and Technology of Food Industry, 2019, **40**(16): 329-335
- [10] 何旭. 分子对接法研究橡胶籽 β -葡萄糖苷酶的底物特异性及热稳定性[D]. 海南: 海南大学, 2018
He X. Study on Substrate Specificity and Thermal Stability of The β -Glucosidase From *Hevea brasiliensis* Seeds by Molecular Docking[D]. Hainan: Hainan University, 2018
- [11] Wilkowska A, Pogorzelski E. Aroma enhancement of cherry juice and wine using exogenous glycosidases from mould, yeast and lactic acid bacteria. Food Chemistry, 2017, **237**: 282-289
- [12] 何传雨. 牛源多杀性巴氏杆菌荚膜和毒力相关基因的克隆及序列分析[D]. 新疆: 石河子大学, 2011
He C Y. Cloning and Sequence Analysis of Capsule and Virulence-related Gene of *Pasteurella multocida* From Bovine[D]. Xinjiang: Shihezi University, 2011
- [13] 高玉霞. 柑橘黄龙病PCR检测引物比较及其外膜蛋白抗体的研制[D]. 江西: 赣南师范学院, 2015
Gao Y X. Comparison of PCR Primers for Detection Citrus Huanglongbing and Development Antibody of Its Outer Membrane Protein[D]. Jiangxi: Gannan Normal University, 2015
- [14] 先天敏. 黑曲霉C112产 β -葡萄糖苷酶的条件优化及酶学性质研究[D]. 湖南: 中南林业科技大学, 2013
Xian T M. The Optimization of Conditions for Producing β -Glucosidase by The Improved Strain *Aspergillus niger* c112 and Enzymatic Characterization[D]. Hunan: Central South University of Forestry & Technology, 2013
- [15] 刘群, 管政兵, 蔡宇杰, 等. *Bacillus altitudinis* SYBC hb4 碱性 β -葡萄糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质研究. 食品与生物技术学报, 2017, **36**(11): 1203-1209
Liu Q, Guan Z B, Cai Y J, *et al.* Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, **36**(11): 1203-1209
- [16] 张玉梅. 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及其基因的体外扩张[D]. 河北: 河北科技师范学院, 2014
Zhang Y M. Enzymatic Properties of β -Glucosidase and Amplification of Its Gene *In vitro* From *Trichoderma viride*[D]. Hebei: Hebei Normal University of Science & Technology, 2014
- [17] Daniel R M, Danson M J, Eienthal R, *et al.* The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. Extremophiles, 2008, **12**: 51-59
- [18] 李志华. 产 β -葡萄糖苷酶乳酸菌菌株的特性研究[D]. 吉林: 延边大学, 2014
Li Z H. Study on Characteristics of Lactic Acid Bacteria Strains Producing β -Glucosidase[D]. Jilin: Yanbian University, 2014
- [19] Quinn Z K Z, Chen X D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *kluyveromyces lactis*. Biochemical Engineering Journal, 2001, **9**(1): 33-40
- [20] 吴鹏. 基因重组酒香酵母菌株高产 β -葡萄糖苷酶的高密度液态发酵模型及酶学性质研究[D]. 湖北: 华中农业大学, 2012
Wu P. Studies on The Properties and High-density Liquid Fermentation Model of β -Glucosidase From *Brettanomyces* sp. Obtained by Genome Shuffling[D]. Hubei: Huazhong Agricultural University, 2012
- [21] 杨芯卓. 嗜热微生物来源的葡萄糖苷酶和木糖苷酶性质及功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014
Yang X Z. Molecular Characterization and Functional Analysis of Glucosidases and Xylosidases from Thermophilic Microorganisms[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014
- [22] 刘文龙, 王兴吉, 盛花开, 等. β -葡萄糖苷酶的生产菌筛选及酶学特性. 中国酿造, 2017, **36**(9): 120-122
Liu W L, Wang X J, Sheng H K, *et al.* China Brewing, 2017, **36**(9): 120-122
- [23] 李蕊伽. 芦荟皮 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质和功能基团研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017
Li R J. Isolation, Purification and Properties, Modification of Groups of β -Glucosidase From Leaf Skin of *Aloe vera*[D]. Chongqing: Southwest University, 2017
- [24] Kaur J, Chadha B S, Kumar B A, *et al.* Purification and characterization of β -glucosidase from *melanocarpus* sp. mtcc 3922. Bioresource Technology, 2007, **98**(1): 74-81
- [25] Kim J D, Lee C G. Purification and characterization of extracellular beta-glucosidase from *sinorhizobium kostiense* afk-13 and its algal lytic effect on *anabaena flos-aquae*. Journal Microbiology and Biotechnology, 2007, **17**(5): 745-752
- [26] Parry N J, Beever D E, Owen E, *et al.* Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *thermoascus aurantiacus*. Biochemical Journal, 2001, **353**(Pt 1): 117-127
- [27] Villena M A, Iranzo J F Ú, Gundllapalli S B, *et al.* Characterization of an exocellular β -glucosidase from *debaryomyces pseudopolymorphus*. Enzyme Microb Technol, 2006, **39**: 229-234
- [28] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, *et al.* Characterization and

- comparison of β -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. *Enzyme Microb Technol*, 2004, **35**(1): 58-66
- [29] 刘晓静. 白蚁肠道元基因组来源 β -葡萄糖苷酶bgl 2、bgl 15、bgl 17酶学性质研究[D]. 江苏:江苏科技大学, 2015
- Liu X J. Characterization of β -Glucosidase bgl 2, bgl 15 and bgl 17 From Metagenome of Termite Gut[D]. Jiangsu: Jiangsu University of Science and Tehnology, 2015
- [30] Cairns J R K, Esen A. β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, **67**(20): 3389-3405
- [31] Becker V E, Evans H J. The influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on β -galactosidase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **191**(1): 95-104
- [32] 施赛铃. 解纤维芽孢杆菌来源的适冷木聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的异源表达及酶学性质研究[D]. 江苏:江苏大学, 2017
- Shi S L. Heterologous Expression and Characterization of Cold-adapted Xylanase and β -Glucosidase From *Bacillus cellulosityticus*[D]. Jiangsu: Jiangsu University, 2017
- [33] Akram F, Haq I U, Mukhtar H. Gene cloning, characterization and thermodynamic analysis of a novel multidomain hyperthermophilic gh family 3 β -glucosidase (tnbglB) from thermotoga naphthophila rku-10t. *Process Biochemistry*, 2018, **66**: 70-81
- [34] Leite R S R, Prado H F A, Cabral H, *et al.* Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms thermoascus aurantiacus e aureobasidium pullulans in agricultural wastes. *Enzyme Microb Technol*, 2008, **43**(6): 391-395
- [35] Singhanian C R R, Patel A K, Sukumaran R K, *et al.* Role and significance of β -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol*, 2013, **127**: 500-507
- [36] Burg B V D. Extremophiles as a source fro novel enzymes. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(3): 213-218
- [37] 张露, 温睿, 李雪, 等. 大腹园蛛黏液蛋白 ASG2 C 端功能模块的克隆表达及圆二色谱分析. *生物学杂志*, 2018, **35**(6): 16-21
- Zhang L, Wen R, Li X, *et al.* *Journal of Biology*, 2018, **35**(6): 16-21
- [38] Goodenough P W, Clark D C, Durrant A J, *et al.* Structural analysis by circular dichroism of some enzymes involved in plant cell wall degradation. *FEBS Letters*, 1991, **282**(2): 355-358
- [39] 林凯蕾. 圆二色谱预测蛋白质二级结构组成方法评析[D]. 上海:复旦大学, 2012
- Lin K L. Evaluation and Analysis of Methods for Predicting Protein Secondary Structure Composition by Circular Dichroism Spectroscopy[D]. Shanghai: Fudan University, 2012
- [40] 郑荣, 吕瞰. 毒素 DON 单链抗体的同源建模及与 DON 结合的分子模拟研究. *化学学报*, 2011, **69**(23): 2882-2888
- Zheng R, Lü T. Homology modeling of anti-don scfv antibody and molecular simulation study between scfv and its antibody don. *Acta Chimica Sinica*, 2011, **69**(23): 2882-2888
- [41] Gao Y D, Huang J F. An extension strategy of discovery studio 2.0 for non-bonded interaction energy automatic calculation at the residue level. *Zoological Reserarch*, 2011, **32**(3): 262-266

Heterologous Expression, Purification and Enzymatic Properties of *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 β -glucosidase*

YU Yi-Hong, DING Xiao-Juan, DING Zhu-Hong**, SONG Yu-Ting, WANG Yi

(School of Liquor & Food Engineering, Guizhou University, National Forestry and Grassland Bureau Prickly Pear Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Store and Processing of Guizhou Province, Guiyang 550025, China)

Abstract *Lactobacillus acidophilus* is a kind of probiotics. The previous research found that β -glucosidase (BGL) produced by *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 has high activity. In order to elucidate its structure and characteristics, the target gene of *Lactobacillus acidophilus* GIM1.208 BGL was obtained with PCR and successfully expressed in *E. coli*. Protein samples with a purity of more than 90% was obtained by nickel affinity chromatography. Then the secondary structure of BGL was detected by circular dichroism spectroscopy (CD) and its tertiary structure was analyzed by homology modeling method. The enzymatic properties of *Lactobacillus acidophilus* BGL was also studied. The results show that the molecular mass of *Lactobacillus acidophilus* BGL is 52 ku, the concentration after purification is 1.88 g/L. The secondary structure of *Lactobacillus acidophilus* BGL includes 15.9% α -helix, 44.1% β -sheet, 18.1% β -turn, and 27.2% random coil. Homology modeling analyzation showed that 8 β -sheets and 8 α -helices were included in 3D structure of *Lactobacillus acidophilus* BGL, and the whole protein is conical in shape. *Lactobacillus acidophilus* BGL has good glucose tolerance and NaCl tolerance. The optimal temperature and the optimal pH of this enzyme is 47°C and 5.6, respectively. *Lactobacillus acidophilus* BGL has high stability in the range of 20°C–50°C and pH 2.2–6.0. The inhibitory effect of ethyl acetate and methanol on enzyme activity is obvious, and Fe^{3+} and Fe^{2+} have significant activation effect on enzyme. These results provide important reference basis for the subsequent functional exploration and application research of *Lactobacillus acidophilus* BGL.

Key words β -glucosidase, heterologous expression, purification, enzymatic properties, CD spectroscopy, homology modeling

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0226

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31860446), Guizhou Provincial Science and Technology Fund (Qiankehe Foundation [2019] 1104) and Guizhou Provincial Science and Technology Project (Qiankehe Platform Talent [2018] 5781).

** Corresponding author.

Tel: 86-13595028312, E-mail: 457950584@qq.com

Received: July 8, 2020 Accepted: September 9, 2020