利用重组β-葡萄糖苷酶高效合成龙胆二糖

邓晶晶，张瑾，郭丽琼，叶志伟，郑倩望，林俊芳*，邹苑*

（华南农业大学食品学院，广东省微生态制剂工程技术研究中心，广东广州 510642）

摘要：龙胆二糖是低聚龙胆糖的主要成分，具有卓越的益生元功能。为提高龙胆二糖生物合成效率、降低生产成本，本文从黑曲霉中克隆得到β-葡萄糖苷酶基因，利用毕赤酵母表达系统实现了该酶的重组表达；通过Ni-NTA亲和层析纯化获得重组酶，并对其酶学性质进行表征。以葡萄糖为底物，通过单因素及正交试验对底物浓度、温度、pH值及酶液添加量等关键参数进行优化。结果表明，纯化后的重组β-葡萄糖苷酶比酶活为197.59 U·mg^{-1}，最适温度和最适pH值分别为60 ℃和4.5。龙胆二糖合成工艺优化结果表明，在酶液添加量105 U·g^{-1}、底物质量浓度850 g·L^{-1}、温度60 ℃、pH值5.0条件下反应48 h，得到的龙胆二糖的产量可达163.40 g·L^{-1}，转化率是19.22%。综上，本研究经重组表达的β-葡萄糖苷酶具有较高的酶活性，且该酶可高效催化合成龙胆二糖，为龙胆二糖的生物制备提供理论依据。

关键词：β-葡萄糖苷酶；龙胆二糖；生物合成；酶学性质

文章编号：1673-9078(2026)10-19-28 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1842

Efficient Synthesis of Gentiobiose Using Recombinant β-Glucosidase

DENG Jingjing, ZHANG Jin, GUO Liqiong, YE Zhiwei, ZHENG Qianwang, LIN Junfang*, ZOU Yuan*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Gentiobiose is the main component of gentio-oligosaccharides, and it has excellent prebiotic functions. To improve the biosynthetic efficiency of gentiobiose and reduce production costs, the β-glucosidase gene was cloned from *Aspergillus niger*, and its recombinant expression was achieved using the *Pichia pastoris* expression system. The recombinant enzyme was purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity chromatography, and its enzymatic properties were characterized. Using glucose as the substrate, key reaction parameters, including substrate concentration, temperature, pH, and enzyme dosage, were first evaluated by single-factor experiments, followed by optimization using an orthogonal experimental design. The results indicated that the specific activity of the purified recombinant β-glucosidase was 197.59 U·mg^{-1}, and the optimal temperature and optimal pH were 60 ℃ and 4.5, respectively. The optimized conditions for gentiobiose synthesis demonstrated that, at an enzyme dosage of 105 U·g^{-1}, a substrate concentration of 850 g·L^{-1}, a temperature of 60 ℃ , and a pH of 5.0 for 48 h, the yield of gentiobiose reached 163.40 g·L^{-1} and the conversion rate was 19.22%. In conclusion, the recombinantly expressed β-glucosidase exhibited high enzymatic activity and efficiently catalyzed the synthesis of gentiobiose, thereby providing a theoretical foundation for its biological preparation.

Key words: β-glucosidase; gentiobiose; biosynthesis; enzymatic properties

引文格式：

邓晶晶,张瑾,郭丽琼,等.利用重组β-葡萄糖苷酶高效合成龙胆二糖[J].现代食品科技,2026,42(10):19-28.

DENG Jingjing, ZHANG Jin, GUO Liqiong, et al. Efficient synthesis of gentiobiose using recombinant β-glucosidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 19-28.

收稿日期：2025-12-22；修回日期：2026-03-01；接受日期：2026-03-03

基金项目：国家自然科学基金项目（32272785）；广东省重点领域研发计划项目（2022B0202050002）

作者简介：邓晶晶（2002-），女，硕士研究生，研究方向：食品生物技术，E-mail：2254858129@qq.com

通讯作者：邹苑（1989-），女，博士，副教授，研究方向：食品科学与工程，E-mail：zouyuan@scau.edu.cn；共同通讯作者：林俊芳（1962-），男，博士，教授，研究方向：精准食品营养与健康，E-mail：linjf@scau.edu.cn

龙胆二糖是低聚龙胆糖的主要成分，由两分子 D-吡喃葡萄糖通过 β-1,6 糖苷键相连形成的二糖[1]，除了在食品工业中作为有效的风味修饰剂，用于平衡咖啡因和多酚的尖锐苦感，优化整体风味层次外[2,3]；其核心应用价值在于卓越的益生元功能：龙胆二糖能完整抵达结肠并被双歧杆菌等有益菌群优先利用，能促进益生菌增殖、抑制有害菌，进而调控肠道菌群平衡，保障机体健康[4]。此外，龙胆二糖具备甜度低、热量低以及良好的保湿性与加工适应性[5]，使其可作为理想的低升糖指数食品配料，满足糖尿病等特殊人群需求。这些特性凸显了其可作为益生元、低升糖甜味剂和风味改良剂的潜力，在功能性食品和药物研发领域展现出独特的价值与广阔前景。

然而，目前龙胆二糖的提取主要从龙胆属植物等天然原料中分离提纯，存在原料资源稀缺、提取流程复杂、产率极低等问题[6]，难以满足工业化需要。化学合成法是以淀粉为原料进行酸水解制备[7]，其反应需要高温高压，易产生异构体等副产物，对分离纯化造成困难，且可能带来环境污染与食品安全问题。而酶法生物合成以其条件温和、专一性强及环境友好的特点成为更有潜力的替代途径[8]。

β-葡萄糖苷酶具有水解与转糖苷的双重催化活性，在动物、植物以及微生物体内均存在[9]。该酶不仅可以将像纤维二糖这类由葡萄糖构成的二糖水解为单糖，还可以在高底物浓度下通过转糖苷作用将葡萄糖残基转移至受体分子的羟基上，形成新的糖苷键[10]，这为龙胆二糖的合成提供了可能。根据其结构特征主要分为糖苷水解酶 GH1 家族和 GH3 家族，其中来自微生物的此类酶多属于这两个家族[11]。在众多的产酶微生物中，黑曲霉所产的 β-葡萄糖苷酶具有较好的酶活性质[12]。然而，天然提取的 β-葡萄糖苷酶往往存在酶活低、产量有限、稳定性不佳及提取成本高等问题，严重制约了其工业化应用进程。

本研究采用基因工程技术从黑曲霉中克隆 β- 葡萄糖苷酶基因，利用酵母表达系统进行表达，并对其催化特性进行了研究，以葡萄糖为底物建立了酶法合成龙胆二糖的技术体系，实现了龙胆二糖的高效转化，为龙胆二糖的生物合成提供理论依据与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种和质粒

黑曲霉菌株、毕赤酵母 GS115 菌株、表达载体 pPIC9K，华南农业大学食品学院实验室保存；克隆载体 pMD^{TM}-19T，宝日医生物技术（北京）有限公司；大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，北京擎科生物技术股份有限公司。

1.1.2 主要试剂

反转录试剂盒 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix，北京全式金生物技术有限公司；限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ，宝日医生物技术（北京）有限公司；Ni-NTA 填料，上海生工生物工程有限公司；DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒，广州美基生物科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；龙胆二糖标品，甄准生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

ETC-811 PCR 仪，北京东胜创新生物科技有限公司；SKJH-1109 超净工作台，上海苏坤实业有限公司；LC-2030 高效液相色谱仪（检测器：RID-2A 示差检测器），日本株式会社岛津制作所。

1.3 试验方法

1.3.1 β-葡萄糖苷酶基因的获取

根据 GenBank 数据库中黑曲霉 β- 葡萄糖苷酶的 cDNA 序列（GenBank：JX127252.1），设计相应的克隆引物，上游引物：5′-ATGAGGTTCACTTTGATCGAG-3′；下游引物：5′-TTAGTGAACAGTAGGCAGAGA-3′。采用 STE 法提取黑曲霉总 RNA，使用反转录试剂盒制备 cDNA 模板，用于 PCR 扩增。扩增条件：95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 15 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min 20 s，72 ℃终延伸 5 min，共 35 个循环。将 PCR 产物切胶回收后进行末端加 A，并与克隆载体 pMD-19T 连接，转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中，并用含氨苄青霉素（Amp）的 LB 抗性平板筛选阳性克隆，提取质粒并测序，获得克隆载体 pMD-19T-AnBgl。

1.3.2 重组表达载体的构建

采用同源重组法构建毕赤酵母表达载体。在目的基因两端设计同源臂引物，同时需要去除前端信号肽。上游引物：5′-GAGAGGCTGAAGCTTACGTAATGGCTGATGAATTGGCCTACTCC-3′；下游引物：5′-ATGTCTAAGGCGAATTAATTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAACAGTAGGCAGAGACG-3′，下划线部分表示同源臂。PCR 扩增后回收产物，获取带有同源臂的目的基因片段，并与用 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切处理的毕赤酵母表达空载体 pPIC9K 连接，转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中，并用含 Amp 的 LB 抗性平板筛选阳性克隆，提取质粒并测序，获得表达载体 pPIC9K-AnBgl。

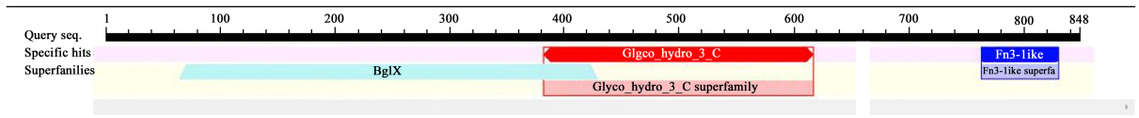


图 1 黑曲霉 β-葡萄糖苷酶 *AnBgl* 结构域预测

Fig.1 Domain prediction of *Aspergillus Niger* β-glucosidase *AnBgl*

1.3.3 毕赤酵母重组菌株的获取

将经 *Bgl* II 酶切处理的表达载体，转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中，涂布于 MD 平板上进行筛选，30 ℃培养 2 d，挑选单菌落进行 PCR 鉴定。

1.3.4 毕赤酵母重组菌株的诱导表达

将重组菌株接种于YPD培养基中，30 ℃过夜培养，接种 2%（*V*/*V*）的菌液于 BMGY 培养基中，30 ℃培养至对数期后离心收集菌泥，用超纯水重悬后转接至 BMMY 培养基中发酵培养，每天加入 2%（*V*/*V*）甲醇诱导表达。

1.3.5 重组β-葡萄糖苷酶的纯化

采用 Ni-NTA 亲和层析法，对重组 β-葡萄糖苷酶进行纯化。将诱导培养好的发酵液离心收集上清，加入 2 mL NiNTA 填料，在 4 ℃条件下搅拌以吸附目的蛋白，转移至层析柱中，往填料里加入 2 mL pH 值 8.0 的 PBS 缓冲液，水平振荡后自然沉降，拧开下端塞子，使液体自然流出，收集洗涤液，重复此步骤 3 次。加入洗脱缓冲液进行洗脱，收集洗脱液，并用 pH 值 5.0 的缓冲液透析，用超滤管浓缩即得纯化后的酶液。

1.3.6 重组β-葡萄糖苷酶酶活力测定

参考先天敏等[13]的方法进行测定。重组 β-葡萄糖苷酶酶活定义：在最适条件下，每分钟催化反应生成 1 μmol 对硝基苯酚（pNP）所需要的酶量称为一个酶活力单位（U）。

1.3.7 重组β-葡萄糖苷酶酶学性质

1.3.7.1 重组β-葡萄糖苷酶的最适温度和热稳定性的测定

按 1.3.6 酶活测定方法测定 30~80 ℃范围内重组 β-葡萄糖苷酶的酶活，确定最适温度；并测定在此温度范围内保温 2 h 后的残余酶活，以评估其热稳定性。

1.3.7.2 重组β-葡萄糖苷酶的最适pH值和pH值稳定性的测定

按 1.3.6 酶活测定方法将酶液置于 pH 值 3.5~7.0 测定重组 β-葡萄糖苷酶的最适 pH 值及在此 pH 值范围内处理 2 h 后的残余酶活，以评估其 pH 值稳定性。

1.3.7.3 重组β-葡萄糖苷酶的动力学参数测定

以不同浓度的对硝基苯酚-β-D-葡萄糖苷为底物，在最适条件下测定其酶活力，并计算 K_m 和 k_{cat} 值。

1.3.8 重组β-葡萄糖苷酶生物合成龙胆二糖单因素探究

考察底物质量浓度、温度、pH 值及酶液添加量对龙胆二糖合成的影响，以龙胆二糖产量为指标，进行单因素试验探究。设置单因素试验条件：底物质量浓度（250、350、450、550、650、750、850 g·L^{-1}）；温度（35、40、45、50、55、60 ℃）；pH 值（4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5）；酶液添加量（35、70、105、140 U·g^{-1}）。每次试验固定其他三个因素，所有反应体系均定容至 5 mL，反应 48 h 后，在 100 ℃加热 10 min 终止反应，用高效液相色谱测定龙胆二糖产量。

1.3.9 正交试验优化龙胆二糖合成条件

利用正交试验优化龙胆二糖合成条件，并根据处理结果的最优搭配方案进行产量验证，每组重复 3 次，用高效液相色谱测定龙胆二糖产量。

1.3.10 龙胆二糖高效液相色谱检测条件

色谱柱：Hypersil APS-2 色谱柱（5 μm，250×4.6 mm）；柱温：30 ℃；进样量：10 μL；流量：1.0 mL·min^{-1}；流动相：82%乙腈。

1.3.11 数据处理

使用 Origin 2018 软件进行实验数据的绘图，SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。实验设置三个平行重复，实验结果以平均值 ± 标准误差的形式呈现。

2 结果与讨论

2.1 β-葡萄糖苷酶基因克隆及序列分析

经过 PCR 扩增、转化、测序后，获得了一条全长 2 544 bp 的 DNA 片段，将该基因编码的氨基酸序列与 NCBI 上的相应序列（GenBank：AFW98805.1）相比同源性高达 96.70%，证明该基因是黑曲霉 β-葡萄糖苷酶基因 *AnBgl*。利用 ExPASy 生物信息学网站中的 ProtParam 工具对其进行理化性质的分析，结果显示该酶由 848 个氨基酸组成，理论分子量为 92.24 kDa，理论等电点 *p*I 值是 4.7。使用 NCBI 数据库中的 CD-SEARCH 进行结构域预测分析，结果如图 1 所示，该基因编码的蛋白质含 3 个结构域，与大部分的糖苷水解酶第 3 家族（GH3）的结构域相似，由此可说明，

该酶属于 GH3 家族糖苷酶。

2.2 表达载体的构建及菌株的筛选

用 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切处理表达空载体，并在目的基因两端添加同源臂，采用同源重组的方法构建表达载体，转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5*α* 中，随机挑取 10 个单克隆进行电泳检测（图 2a 所示）。选取条带大小符合预期的阳性克隆进行测序，结果表明该片段序列与原序列一致，表明已成功构建 pPIC9K-AnBgl 表达载体。使用限制性内切酶 *Bgl* II 对 pPIC9K-AnBgl 表达载体进行酶切使其线性化，转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中，挑取单菌落进行电泳验证（图 2b 所示），结果显示泳道 1 是毕赤酵母 GS115 原始条带，泳道 2 的条带大小约为 3 000 bp，即 2 544 bp 目的基因片段 +500 bp 载体自带片段，表明目的基因已整合至毕赤酵母 GS115 中，获得具有外源基因的毕赤酵母表达菌株，可用于后续的表达。

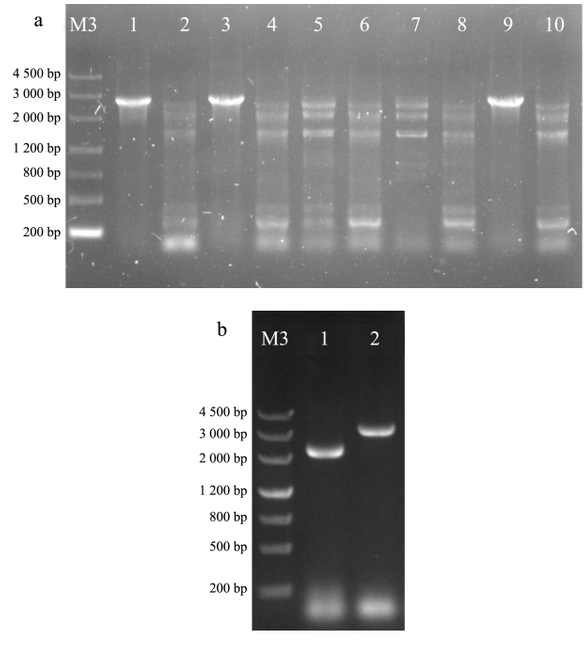


图 2 表达载体及工程菌株的电泳鉴定

Fig.2 Electrophoretic identification of expression vectors and engineered strains

注：a：pPIC9K-AnBgl 表达载体转化子鉴定图（M3：DNA Marker 3，200~4 500 bp；1~10：pPIC9K-AnBgl）；b：GS115-pPIC9K-AnBgl 工程菌株鉴定图（M3：DNA Marker 3，200~4 500 bp；1：GS115 原始菌株，2：GS115-pPIC9K-AnBgl）。

2.3 重组*β*-葡萄糖苷酶的诱导表达及纯化

将重组毕赤酵母菌株经甲醇诱导表达后，离心收集上清，对粗酶液进行纯化，并用 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定，如图 3 所示，重组 *β*-葡萄糖苷酶分子量大小约为 140 kDa，因毕赤酵母会对蛋白进行糖基化修饰，所以实际的蛋白大小会比理论预测的分子量 99 kDa 大。杨宏宇[14]在使用毕赤酵母表达植酸酶时也具有类似的现象，经糖基化修饰后其分子量从 63 kDa 增至 83 kDa。对表达的重组 *β*- 葡萄糖苷酶进行糖基化位点预测可知，其存在 15 个潜在的糖基化修饰位点，分别为 N44、N194、N235、N298、N305、N337、N370、N425、N506、N525、N547、N624、N641、N673、N695。由于毕赤酵母的 N-糖链为高甘露糖型（$Man_nGlcNAc_2$），绝大多数为 Man_8~Man_{14}，分子量约为 1.8~2.9 kDa，因此使用毕赤酵母表达后其实际分子量会高于预测值。对蛋白浓度进行测定，纯化前总蛋白含量为 800 mg，纯化后为 33 mg，纯化后的重组 *β*- 葡萄糖苷酶比酶活达到 197.59 U·mg^{-1}，纯化倍数是 7.02 倍。其催化效率显著优于传统发酵获得的 *β*- 葡萄糖苷酶[15]。这一结果表明，重组表达系统为实现高纯度、高活性 *β*- 葡萄糖苷酶的规模化制备提供了最优路径。

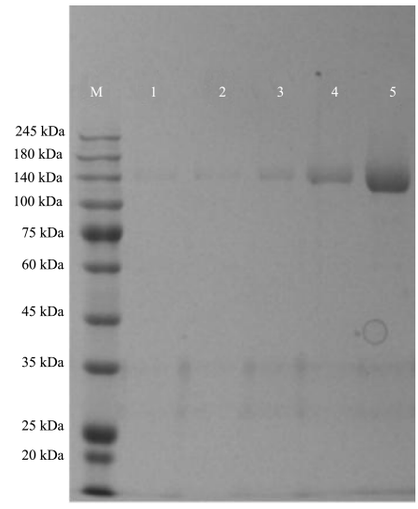


图 3 重组 *β*-葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE identification of recombinant *β*-glucosidase

注：M：蛋白 Marker；1：使用 PBS 缓冲液第一次洗涤后的溶液；2：使用 PBS 缓冲液第二次洗涤后的溶液；3：使用 PBS 缓冲液第三次洗涤后的溶液；4：粗酶液；5：纯化后的酶液。

表 1 重组*β*-葡萄糖苷酶纯化结果

Table 1 Purification results of recombinant *β*-glucosidase

	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U·mg^{-1})	纯化倍数
纯化前	22 500	800	28.13	1.00
纯化后	6 520	33	197.59	7.02

2.4 重组β-葡萄糖苷酶酶学性质

2.4.1 重组β-葡萄糖苷酶的最适温度和热稳定性的测定

由图 4a 可知，温度对该重组 β-葡萄糖苷酶酶活影响具有双面性，在温度达到 60 ℃之前，升高温度可以加快反应速率，超过 60 ℃之后继续升高温度，酶促反应速度迅速下降，这是因为高温会使酶变性失活，破坏酶的高级结构[16,17]。该酶在 60 ℃时具有最高催化活性，说明该温度是其最适反应温度。由图 4b 可知，在温度为 50 ℃时保温 2 h，酶活力仍可保持在 85% 以上，说明该酶具有一定的耐热性，能够适应中温反应体系，适合生物质转化、食品发酵等连续生产。

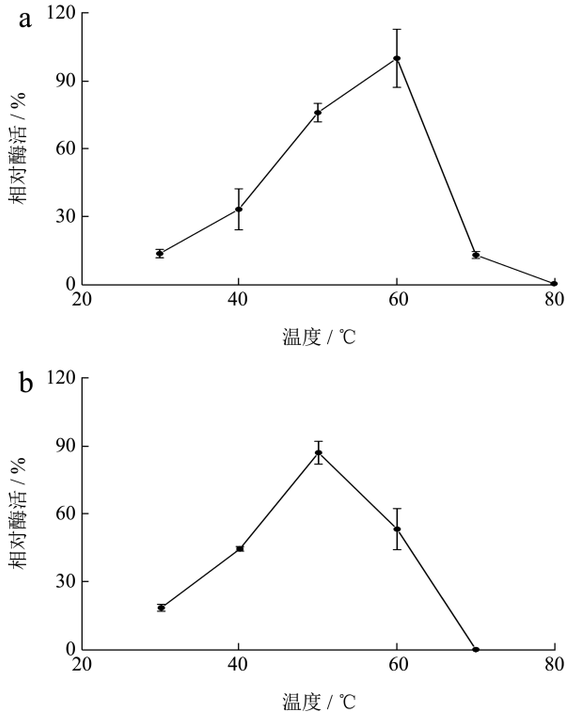


图 4 温度对重组 β-葡萄糖苷酶酶活影响

Fig.4 The influence of temperature on the enzymatic activity of recombinant β-glucosidase

注：a：最适温度；b：温度稳定性。

2.4.2 重组β-葡萄糖苷酶的最适pH值和pH值稳定性的测定

由图 5a 可知，重组 β-葡萄糖苷酶在 pH 值为 4.5 时相对酶活最高，说明其属于酸性酶，这一性质与大多数真菌来源的 β-葡萄糖苷酶的性质相似。例如来源于陆生伊萨酵母的 β-葡萄糖苷酶的在 pH 值为 4.5 时催化效率最高[18]。Chang 等[19]在 3.0~8.0 的 pH 值范围内测定黑曲霉来源的 β-葡萄糖苷酶的活性，结果表明在其在 pH 值为 4.5 时活性最好。说明该酶在相近的反应环境中具有普遍适应性。通过比较两者的基因长度及扩增引物序列等，本研究的 β-葡萄糖苷酶与 Chang 等研究的 β-葡萄糖苷酶基因具有差异，但最适 pH 值都为 4.5，这可能是因为黑曲霉来源的 β-葡萄糖苷酶家族的保守特性，最适 pH 值主要与其活性中心关键氨基酸残基的解离状态有关。尽管基因序列存在差异，但不同 β-葡萄糖苷酶基因编码的酶可能保留了活性中心的保守结构，从而表现出相似的最适 pH 值。而在中性及碱性条件下，重组 β-葡萄糖苷酶不具有酶活，说明过度碱性条件下会导致酶蛋白构象改变甚至使其失活[20,21]。将重组 β-葡萄糖苷酶置于不同 pH 值下保温 2 h，由图 5b 可知，在最适 pH 值 4.5 时酶活依然可以保持 98% 以上，说明其在弱酸的条件下具有较好的催化特性和稳定性。

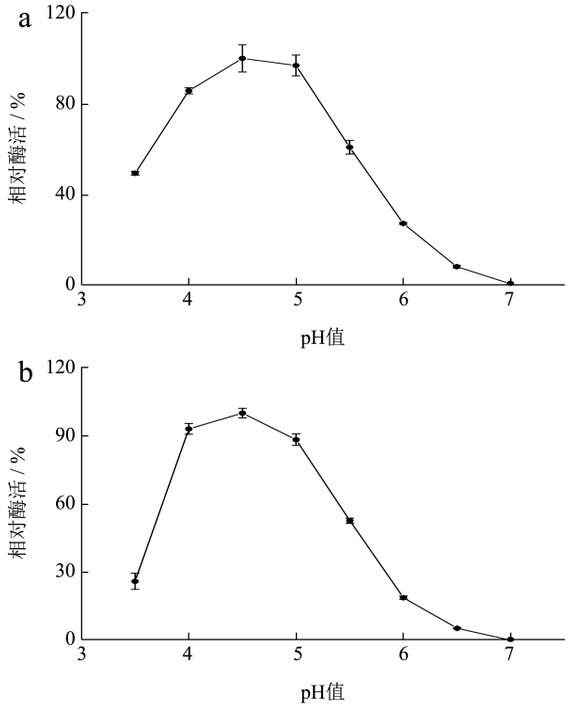


图 5 pH值对重组 β-葡萄糖苷酶酶活影响

Fig.5 The influence of pH value on the enzymatic activity of recombinant β-glucosidase

注：a：最适 pH 值；b：pH 值稳定性。

2.4.3 重组β-葡萄糖苷酶的动力学参数测定

在 60 ℃、pH 值 4.5 条件下与不同浓度的对硝基苯酚-β-葡萄糖苷反应，测定重组 β-葡萄糖苷酶酶活力，利用 GraphPad Prism 8.0 中的 Michaelis-Menten 方程对不同底物浓度下的反应速率进行非线性拟合，计算得到该酶的 V_{max} 为 2 499 μmol·min^{-1}、K_m 为 2.35 mmol·L^{-1}、k_{cat} 为 104.90 s^{-1}、k_{cat}/K_m 为 44.66 L·mmol^{-1}·s^{-1}。酶与底物的亲和力可通过 K_m 值衡量，该值越低，

表明酶与底物亲和性越强。本研究中重组酶的 K_m 为 2.35 mmol·L^{-1}，远低于天然获得的 *β*-葡萄糖苷酶对同一底物的 K_m 值 41.67 mmol·L^{-1}[22]，表明本研究的重组酶对通用底物对硝基苯酚-*β*-葡萄糖苷的亲和力强，水解的催化效率高，说明其可能对结构相似的天然 *β*-葡萄糖苷类底物，例如纤维二糖、食品中糖苷类风味前体也有较好的结合与催化能力[23]。

2.5 重组*β*-葡萄糖苷酶生物合成龙胆二糖单因素探究

为明确关键反应条件对重组 *β*-葡萄糖苷酶合成龙胆二糖效率的影响规律，探究了底物质量浓度、温度、pH 值及酶液添加量等关键因素对龙胆二糖产率的影响。在龙胆二糖的逆水解合成反应中，底物质量浓度是关键因素，直接影响着 *β*-葡萄糖苷酶转糖苷能力。如图 6a 所示，在低底物质量浓度时，龙胆二糖的生成量会随着底物质量浓度的增加而升高，这是因为在低底物浓度下 *β*-葡萄糖苷酶会倾向于发生水解反应[24]，而随着底物质量浓度升高，葡萄糖分子与酶活性中心结合概率以及糖基－酶中间体与受体葡萄糖碰撞概率增加，提升了糖基转移形成龙胆二糖的效率。在底物质量浓度为 750 g·L^{-1} 时，龙胆二糖产量最高，为 47.94 g·L^{-1}。而当底物质量浓度增至 850 g·L^{-1} 时，龙胆二糖的生成量降至 34.83 g·L^{-1}，这可能是因为葡萄糖的溶解度有限，底物过量后反而影响与酶的充分结合。刘玲玲[25]研究底物质量浓度对龙胆低聚糖产量影响也具有类似的趋势。

除了底物质量浓度外，反应温度是影响酶催化活性的另一关键参数。如图 6b 所示，温度从 35 ℃升高时，龙胆二糖产量逐渐增加，在 55 ℃达到峰值，为 61.63 g·L^{-1}。继续升高温度，产量开始下降。说明在龙胆二糖的合成过程中，重组 *β*-葡萄糖苷酶的最适温度为 55 ℃。相比于其他高温酶，例如来源于嗜热栖热菌的 *β*-葡萄糖苷酶，其最适温度可达 95 ℃[26]，可以降低能耗，且副产物较少，产物纯度更高。

反应体系的酸碱环境也对酶的构象与催化活性有决定性影响。由于重组 *β*-葡萄糖苷酶属于嗜酸酶，其最适 pH 值处于酸性范围，如图 6c 所示，当 pH 值为 4.5 时，龙胆二糖的产量最高，为 106.32 g·L^{-1}，说明其在酸性条件下具有良好的催化稳定性。

最后对反应体系中另一个关键变量酶液添加量进行了考察。如图 6d 所示，在底物质量浓度 750g·L^{-1}、温度 55 ℃、pH 值 4.5 条件下，当酶的添加量从 35 U·g^{-1} 增至 105 U·g^{-1} 时，龙胆二糖的产量从 47.78 g·L^{-1} 显著提升至 118.75 g·L^{-1}。继续添加酶量至 140 U·g^{-1}，产量仅微增至 122.73 g·L^{-1}，增幅不足 3.5%，说明在酶量为 105 U·g^{-1} 时底物与酶结合已趋于饱和。从工业生产的成本考虑，选择使用酶添加量为 105 U·g^{-1}。与类似的研究相比，Wang 等[27]使用 900 U·g^{-1} 的酶量在适宜条件下将 800 g·L^{-1} 的葡萄糖转化为 130 g·L^{-1} 的龙胆低聚糖，所使用的酶量是本研究的 8.57 倍，这表明本工艺的酶利用效率更高，更具经济性。

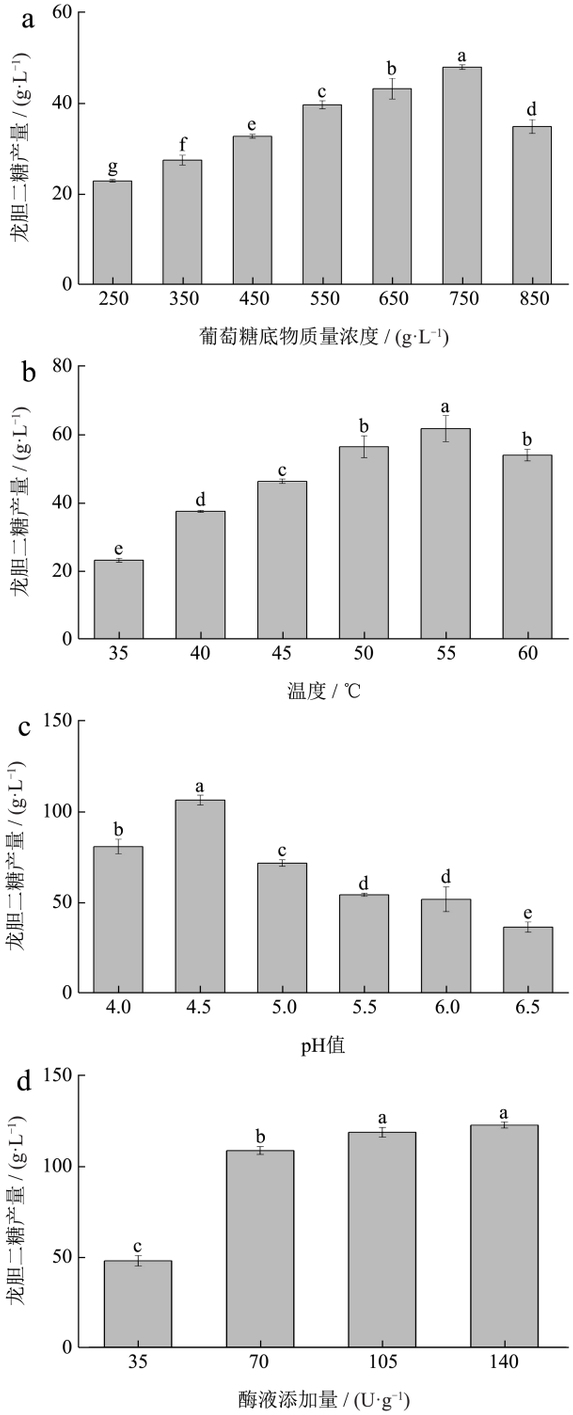


图 6 不同反应条件对龙胆二糖产量的影响

Fig.6 The influence of different reaction conditions on the yield of gentiobiose

注：不同小写字母表示具有显著差异（$P<0.05$）。

2.6 龙胆二糖合成条件正交试验优化

2.6.1 龙胆二糖合成条件正交试验设计

表 2 正交试验因素水平设计

Table 2 Orthogonal experimental factors and horizontal design

水平	A 底物质量浓度/(g·L^{-1})	B pH 值	C 温度/℃
1	650	4.0	50
2	750	4.5	55
3	850	5.0	60

根据单因素探究实验结果，以龙胆二糖产量为指标，选择葡萄糖质量浓度（A）、pH 值（B）以及温度（C）三个因素进行三因素三水平正交试验，确定龙胆二糖合成的最优条件。正交试验因素水平设计如表 2 所示。

由表 3 方差分析表可知，各因素对龙胆二糖合成产量的影响依次为：A 底物质量浓度＞B pH 值＞C 温度，其中底物质量浓度与 pH 值对龙胆二糖的产量影响极显著（P＜0.01）。由表 4 可知，通过极差分析，龙胆二糖合成的最优组合是 A3B3C3，即龙胆二糖合成的最优条件是酶液添加量 105 U·g^{-1}、底物质量浓度 850 g·L^{-1}、在温度 60 ℃、pH 值 5.0 条件下反应 48 h。

表 3 正交试验方差分析表

Table 3 Analysis of variance of orthogonal experiment

来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
修正模型	13 213.07	6	2 202.18	25.02	0	***
底物质量浓度/(g·L^{-1})	10 098.07	2	5 049.03	57.37	0	***
pH 值	2 226.13	2	1 113.07	12.65	0	***
温度/℃	888.87	2	444.44	5.05	0.02	*
误差	1 760.12	20	88.01			
修正后总计	14 973.19	26				

注：* 表示影响显著（P＜0.05）；*** 表示影响极显著（P＜0.001）。

表 4 正交试验极差分析表

Table 4 Range analysis of orthogonal experiments

序号	A 底物质量浓度/(g·L^{-1})	B pH 值	C 温度/℃	龙胆二糖产量/(g·L^{-1})
1	1	3	3	143.10
2	3	2	1	158.69
3	3	1	3	175.66
4	2	3	1	154.18
5	3	3	2	169.16
6	2	2	3	134.30
7	1	2	2	108.56
8	2	1	2	134.70
9	1	1	1	110.15
K1	361.81	420.51	423.02	
K2	423.18	401.55	412.41	
K3	503.50	466.43	453.06	
k1	120.60	140.17	141.01	
k2	141.10	133.85	137.47	
k3	167.83	155.48	151.02	
R	47.23	21.63	13.55	
最优	A3	B3	C3	

表 5 以葡萄糖为底物合成龙胆二糖/低聚龙胆糖的现状

Table 5 Current status of gentiobiose or gentiooligosaccharides synthesis using glucose as the substrate

β-葡萄糖苷酶来源	反应条件	转化率/%	参考文献
Coral Microorganisms	以 800 g·L^{-1} 的葡萄糖为反应底物，酶用量 40 U·g^{-1} 葡萄糖，在 40 ℃、pH 值 7.0 条件下反应	5.38 ± 0.40	[29]
Aspergillus niger CMI CC324262	以 800 g·L^{-1} 葡萄糖为底物，在温度 60 ℃、pH 值 4.5、酶液添加量为 60 U·g^{-1}、添加 1 mmol·L^{-1} 的 K^+ 条件下反应 48 h	6.25	[25]
Thermus caldophilus GK24	以 800 g·L^{-1} 的葡萄糖为底物，在温度 70 ℃、pH 值 8.0~9.0、酶液添加量为 40 U·mL^{-1} 条件下反应 72 h	11	[30]
Thermotoga sp. KOL6	以 1 000 g·L^{-1} 葡萄糖为反应底物，在温度 80 ℃、pH 值 6.0、酶液添加量为 500 U·g^{-1} 条件下反应 48 h	14.43	[31]
Prunus dulcis	以 900 g·L^{-1} 的葡萄糖为底物，酶用量为 210 IU，在 65 ℃、pH 值 4.0 条件下反应 120 h	15	[32]
Trichoderma viride	以 800 g·L^{-1} 的葡萄糖为反应底物，在温度 60 ℃、pH 值 5.0、酶液添加量为 900 U·g^{-1} 条件下反应	16.25	[27]
Thermotoga maritima STB25	以 480 g·L^{-1} 的葡萄糖为底物，加入纯化酶液，在 80 ℃、pH 值 5.5 条件下反应 24 h	18.01	[33]
T. cellulolyticus	以 800 g·L^{-1} 葡萄糖底物，在温度 60 ℃、pH 值 4.5、酶液添加量为 400 U·g^{-1} 条件下反应 60 h	19.36	[28]

2.6.2 龙胆二糖合成条件正交试验验证

根据正交试验结果，对龙胆二糖合成的最优条件进行验证，结果表明龙胆二糖的产量达到 163.40 g·L^{-1}，底物转化效率为 19.22%。目前已有研究报道利用 β-葡萄糖苷酶的转糖苷作用从高浓度的葡萄糖液中合成龙胆二糖。如表 5 所示，在高浓度葡萄糖底物下龙胆二糖的转化率在 5.38%~19.36% 之间。多数获得较高转化率的研究依赖于高酶添加量（400~900 U·g^{-1}）。例如，徐星豪[28]使用溶纤维素菌来源 β-葡萄糖苷酶，在 800 g·L^{-1} 葡萄糖中添加 400 U·g^{-1} 的葡萄糖酶液获得 19.36% 的转化率。绿色木霉来源的 β-葡萄糖苷酶在添加量为 900 U·g^{-1} 条件下可将 800 g·L^{-1} 的葡萄糖转化为 130 g·L^{-1} 龙胆二糖，转化率为 14.86%[27]。而低酶量（40~60 U·g^{-1}）对应的转化率普遍偏低。本研究采用的酶的添加量仅为高转化率文献中酶用量的约 1/9~1/4，转化率仍接近较高水平。这一结果说明该重组酶在催化效率上具有明显优势，有助于大幅降低酶的使用成本，为龙胆二糖的生物合成提供了更具经济可行的技术参考。

2.6.3 龙胆二糖产物验证

根据液相检测结果看，龙胆二糖标准品在 13.40 min 出峰，而在高浓度葡萄糖液制备龙胆二糖的反应液中，13.40 min 左右也有峰出现。

核磁共振波谱图如图 8 所示。由图 8a 可知，^{1}H-NMR（400 MHz，D_2O）δ：4.55（d, J=7.9 Hz，1H），4.41（d, J=7.9 Hz, 1H），4.10（dd, J=11.5, 2.0 Hz, 1H），3.81（dd, J=12.4, 2.2 Hz, 1H），3.74（dd, J=11.4, 5.9 Hz, 1H），3.62（dd, J=12.4, 5.8 Hz, 1H），3.52（ddd, J=8.7，6.1, 2.1 Hz, 1H），3.37（td, J=6.7，3.5 Hz, 4H），3.29（d, J=9.2 Hz, 1H），3.26~3.18（m，1H），3.15（t, J=8.5 Hz, 1H）。

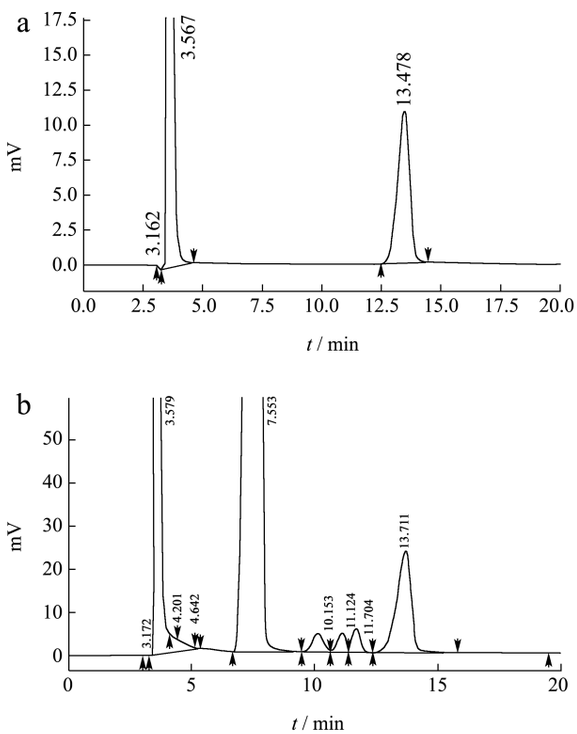


图 7 HPLC 检测龙胆二糖的出峰图

Fig.7 Chromatogram of gentiobiose detected by HPLC

注：a：龙胆二糖标品图；b：高浓度葡萄糖液制备龙胆二糖图。

由图 8b 可知，^{13}C-NMR（100 MHz，D_2O）δ：102.64（C-1′），95.93（C-1），75.87（C-3′），75.59（C-5′，

3），74.84（C-2′），73.98（C-2），73.04（C-5），69.57（C-4′），69.42（C-4），68.76（C-6），60.67（C-6′）。

由耦合常数 J=7.9 Hz 可知，组分中存在 β-1,6 糖苷键，数据与田军等[34]研究基本对应。根据以上数据并结合液相图谱，可确认产物为龙胆二糖。

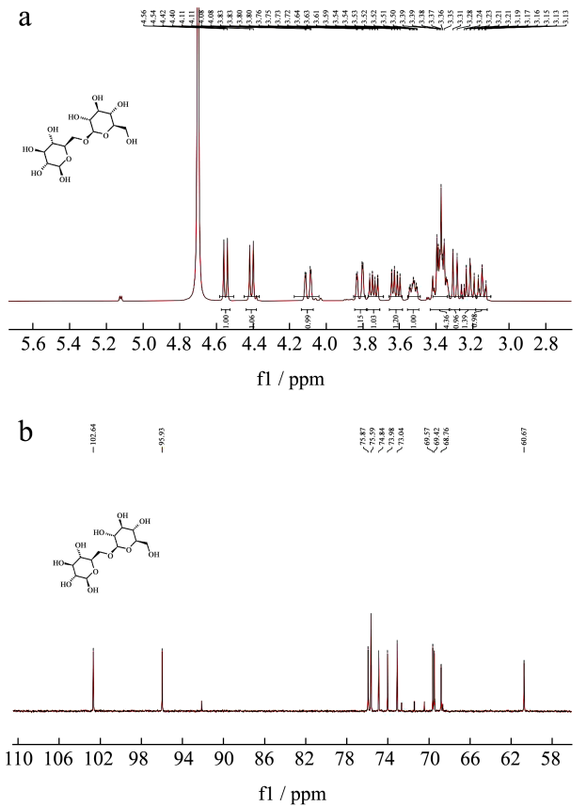


图 8 龙胆二糖的核磁共振波谱图

Fig.8 Nuclear magnetic resonance spectrum of gentiobiose

注：a：龙胆二糖的 ^{1}H-NMR 图；b：龙胆二糖的 ^{13}C-NMR 图。

3 结论

本研究从黑曲霉中成功克隆获得了 β-葡萄糖苷酶基因，经测序可知，该基因全长 2 544 bp，编码 848 个氨基酸。构建了毕赤酵母表达载体，并获取了重组表达菌株，经表达发酵后对粗酶液进行纯化，纯化后的重组 β-葡萄糖苷酶的比活力为 197.59 U·mg^{-1}，纯化倍数为 7.02 倍。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定，该酶的分子量大小为 140 kDa。其最适温度为 60 ℃，最适 pH 值为 4.5。以对硝基苯酚-β-葡萄糖苷为底物时，K_m 为 2.35 mmol·L^{-1}。以葡萄糖为反应底物，将纯化后的酶液应用于龙胆二糖的合成，通过单因素探究及正交试验优化确定了龙胆二糖合成的最优条件为在酶液添加量 105 U·g^{-1}、底物质量浓度 850 g·L^{-1}、温度 60 ℃、pH 值 5.0 条件下反应 48 h，得到的龙胆二糖的产量可达 163.40 g·L^{-1}，转化率是 19.22%。本研究为龙胆二糖的制备提供了一种高效、低成本的酶法工艺。该重组 β-葡萄糖苷酶催化性能优良，且毕赤酵母表达体系具备规模化发酵的优势，为其工业化应用奠定了基础。未来可通过酶分子改造与过程调控相结合的策略，进一步提高转化率与经济性，同时可开展反应体系的放大试验，探索连续化生产工艺，推动龙胆二糖生产的工业化进程。

参考文献

[1] UCAR R A, PÉREZ-DÍAZ I M, DEAN L L, et al. Gentiobiose and cellobiose content in fresh and fermenting cucumbers and utilization of such disaccharides by lactic acid bacteria in fermented cucumber juice medium [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 5798-5810.

[2] GIBSON G R, PROBERT H M, VAN LOO J, et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics [J]. Nutrition Research Reviews, 2004, 17(2): 259-275.

[3] DANIEL R M, DANSON M J, EISENTHAL R, et al. The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications [J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2008, 12(1): 51-59.

[4] LU X X, ZOU J Q, FENG X R, et al. Oligosaccharides with different glycosidic bonds regulate gut microbiota: differential modulation of bacterial and fungal communities and their metabolism *in vitro* [J]. Food Research International, 2025, 221(3): 117481.

[5] 尤新.功能食品配料-新型低聚糖[J].食品科学,1995,16(11):41-44.

[6] NAKAKUKI T. Development of functional oligosaccharides in Japan [J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2003, 15(82): 57-64.

[7] 王良东,陈建文.淀粉深加工产品-功能性甜味剂[J].粮食与油脂,2013,26(2):50-52.

[8] WEI X, SHENG L L, MU W M, et al. Enzymatic preparation of gentiooligosaccharides by a thermophilic and thermostable β-Glucosidase at a high substrate concentration [J]. Foods, 2022, 11(3): 357.

[9] 何成,吴言,孟春雨,等.新型β-葡萄糖苷酶*BglD2*异源表达及水解虎杖苷能力[J].生物工程学报,2021,37(2):580-592.

[10] QIN Y L, ZHANG Y K, HE H Y, et al. Screening and identification of a fungal β-glucosidase and the enzymatic synthesis of gentiooligosaccharide [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(8): 1012-1019.

[11] CAIRNS J R K, MAHONG B, BAIYA S, et al. β-glucosidases: multitasking, moonlighting or simply misunderstood? [J]. Plant Science, 2015, 241: 246-259.

[12] ZHOU Y S, DUAN Y, CHEN L M, et al. Engineering dispersed mycelium morphology in *Aspergillus niger* for enhanced mycoprotein production via CRISPR/Cas9-mediated genome

editing [J]. Bioresource Technology, 2025, 432: 132652.
[13] 先天敏,陈介南,张林.黑曲霉改良株C112产β-葡萄糖苷酶的诱导及条件优化[J].中南林业科技大学学报,2013,33(11):154-161.
[14] 杨宏宇.脯氨酸氨肽酶在毕赤酵母中的高效表达及其特性表征[D].无锡:江南大学,2017.
[15] 何小艳,郭倩,胡骏鹏,等.响应面法优化黑曲霉产β-葡萄糖苷酶的发酵工艺[J].化学与生物工程,2025,42(5):43-48.
[16] ADEKANMBI A A, DALE L, SHAW L, et al. Differential temperature sensitivity of intracellular metabolic processesand extracellular soil enzyme activities [J]. Biogeosciences, 2023, 20(11): 2207-2219.
[17] NIU K L, YAN L M, GE J, et al. Artificial trimerization of β-glucosidase for enhanced thermostability and activity via computational redesign [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 286: 138275.
[18] GONZÁLEZ-POMBO P, FARIÑA L, CARRAU F, et al. A novel extracellular β-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 385-389.
[19] CHANG J J, WANG J, LI Z H, et al. High-level expression of β-glucosidase in *Aspergillus niger* ATCC 20611 using the *Trichoderma reesei* promoter Pcdna1 to enhance cellulose degradation [J]. Fermentation-Basel, 2024, 10(9): 461.
[20] XIE Y F, YAN X R, LI C Z, et al. Characterization and insight mechanism of an acid-adapted β-glucosidase from *Lactobacillus paracasei* and its application in bioconversion of glycosides [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1334695.
[21] KARA H. Biochemical properties of oregano β-glucosidase supports *Onites* L. as a feed additive [J]. Indian Journal of Animal Research, 2025, 59(1): 48-54.
[22] 李晓东,周明,杨丽娜,等.黑曲霉β-葡萄糖苷酶的酶学特性研究[J].微生物学杂志,2014,34(3):14-18.
[23] HE J J, LI Y Y, SUN X H, et al. Characterization of a novel hyperthermophilic GH1 β-glucosidase from *Acidilobus* sp. and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides [J]. Microorganisms, 2024, 12(3): 533.
[24] XIA W, BAI Y G, SHI P J. Improving the substrate affinity and catalytic efficiency of beta-glucosidase bgl3A from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 by rational design [J]. Biomolecules, 2021, 11(12): 1882.
[25] 刘玲玲.β-葡萄糖苷酶转化葡萄糖制备低聚龙胆糖的研究[D].无锡:江南大学,2009.
[26] AKRAM F, UL HAQ I, KHAN M A, et al. Cloning with kinetic and thermodynamic insight of a novel hyperthermostable β-glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10^{T} with excellent glucose tolerance [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2016, 124: 92-104.
[27] WANG F, WU J, CHEN S. Preparation of gentiooligosaccharides using *Trichoderma viride* β-glucosidase [J]. Food Chemistry, 2018, 248: 340-345.
[28] 徐星豪.低聚龙胆糖制备用酶的基因挖掘、重组表达及复配应用[D].无锡:江南大学,2020.
[29] SU H F, ZHANG Q, YU K F, et al. A novel neutral and mesophilic β-glucosidase from coral microorganisms for efficient preparation of gentiooligosaccharides [J]. Foods, 2021, 10(12): 2985.
[30] KIM T Y, LEE D S, SHIN H J. Gentiobiose synthesis from glucose using recombinant β-glucosidase from *Thermus caldophilus* GK24 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2003, 8(3): 210-212.
[31] XIA W, SHENG L L, MU W M, et al. Enzymatic preparation of gentiooligosaccharides by a thermophilic and thermostable β-Glucosidase at a high substrate concentration [J]. Foods, 2022, 11(3): 357.
[32] DA SILVA A S, MOLINA J F, TEIXEIRA R S S, et al. Synthesis of disaccharides using β-glucosidases from *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *Prunus dulcis* [J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(11): 1717-1723.
[33] LIU X, LI Z X, JIANG Z H, et al. Gly343 mutation enhances gentiobiose conversion efficiency of GH3 family β-glucosidase from *Thermotoga maritima* STB25 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2026, 344(2): 150555.
[34] 田军,吴凤锷,丘明华,等.匙叶翼首花的化学成分[J].天然产物研究与开发,2000,12(1):35-38.