

# 拟青霉内切 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶基因克隆、 表达及重组酶性质

华承伟\* 谢凤珍 陈晓静

(河南科技学院 生物工程系 河南 新乡 453003)

**摘要:** 采用改造的酿酒酵母表达载体 pYES2-GSL 构建了拟青霉 *Paecilomyces* sp. FLH30 表达 cDNA 文库, 刚果红平板法筛到一内切  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶基因(*PsBg16A*), 全长 cDNA 为 1 217 bp, 完整开放阅读框(ORF) 951 bp, 编码 316 个氨基酸, 属于糖苷水解酶 16 家族。去信号肽的 *PsBg16A* 克隆入表达载体 pET28a(+)并在 *E. coli* BL21 成功表达, 经 16 °C 20%乳糖诱导 24 h, 酶活达 482 U/mL。重组 PsBg16A 可水解大麦葡聚糖、地衣多糖和昆布多糖, 显示 PsBg16A 为典型的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶(EC 3.2.1.6), 重组酶最适 pH 和温度分别为 7.0 和 65 °C, 对大麦葡聚糖、地衣多糖和昆布多糖的  $K_m$  分别为 3.12、4.86 和 10.32 g/L。

**关键词:** 拟青霉,  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶, 基因克隆, 表达, 性质

## Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30

HUA Cheng-Wei\* XIE Feng-Zhen CHEN Xiao-Jing

(School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

**Abstract:** *Saccharomyces cerevisiae* cDNA express library of *Paecilomyces* sp. FLH30 was constructed by re-construction of the vector pYES2-GSL, and full-length cDNA encoding an endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase gene (*PsBg16A*) was screened using Congo red-staining method. The full-length cDNA of *PsBg16A* is 1 217 bp and has an open reading frame of 951 bp. The *PsBg16A* encodes a 316-residue precursor protein with a putative signal peptide, and the deduced amino acid sequence of revealed that this enzyme belongs to glycoside hydrolase family 16. *PsBg16A* without signal peptide was cloned into a vector pET28a(+) and was expressed successfully in *E. coli* BL21(DE3), and the enzyme activity reached 482 U/mL induced by lactose at 16 °C. The purified recombinant PsBg16A with optimum pH at 7.0 and optimum temperature at 65 °C, can randomly hydrolyze barely  $\beta$ -glucan,

\* 通讯作者: ✉ hcwxfxhy@yahoo.cn

收稿日期: 2011-04-20; 接受日期: 2011-06-27

lichenin and laminarin. The results suggested that the enzyme is a typical endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase (EC 3.2.1.6) with broad substrate specificity for  $\beta$ -glucans, and  $K_m$  for  $\beta$ -glucan, lichenin and laminarin were 2.92, 4.35 and 9.88 g/L, respectively.

**Keywords:** *Paecilomyces* sp.,  $\beta$ -1,3(4)-glucanase, Gene clone, Expression, Characterization

$\beta$ -葡聚糖是由  $\beta$ -D-葡萄糖残基通过  $\beta$ -1,3 或  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的多聚糖,是谷类植物细胞壁的主要组分,广泛存在于大麦、黑麦、小麦和稻米等禾本科谷物及酵母<sup>[1]</sup>,与阿拉伯木聚糖、戊聚糖、纤维素、果胶等均属植物细胞壁中的可溶性结构性非淀粉多糖。根据糖苷键连接类型, $\beta$ -葡聚糖可分为  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖(地衣多糖)、 $\beta$ -1,4-葡聚糖(纤维素)、 $\beta$ -1,3-葡聚糖(昆布多糖)和  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖酶在啤酒工业和饲料工业中有重要的应用价值,啤酒工业中应用 $\beta$ -葡聚糖酶,可提高麦汁分离速度、麦汁浸出量和啤酒过滤速度,减少啤酒浑浊度和胶状沉淀物,从而改善啤酒质量。饲料中添加 $\beta$ -葡聚糖酶可改善谷物营养价值,提高饲料转化率和畜禽生长速度,减少动物腹泻率,使大麦等禾谷类作为优质的能量饲料<sup>[3]</sup>。

按照水解 $\beta$ -葡聚糖的特异性可将葡聚糖酶主要分为特异性的 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶(地衣多糖酶, EC 3.2.1.73)、非特异性的 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶(EC 3.2.1.6)、 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(纤维素酶, EC 3.2.1.4)和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(昆布多糖酶, EC 3.2.1.39)等 4 类。 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶专一性催化混合糖苷键中邻近  $\beta$ -1,3-糖苷键的  $\beta$ -1,4-键的水解反应,而不水解  $\beta$ -1,4-葡聚糖。 $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶能水解  $\beta$ -葡聚糖中的  $\beta$ -1,3 或  $\beta$ -1,4-糖苷键,底物包括昆布多糖、地衣多糖及谷物类 D-葡聚糖。迄今,大部分已报道的糖苷水解酶 16 家族的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶主要来源于细菌的芽孢杆菌属<sup>[4-5]</sup>,而  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶主要来源于真菌,如红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)<sup>[6]</sup>、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)<sup>[7]</sup>、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)<sup>[8]</sup>、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)<sup>[9]</sup>等。真菌来源的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶大都热稳定性差,酶作用的最适温度为 40 °C-45 °C,55 °C 下失活,严重限制了糖化工艺的发展,是糖化和啤酒酿造的瓶颈步骤,也

限制在饲料加工中的使用。因此,筛选具有良好热稳定性的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶在啤酒酿造及饲料中具有广阔的应用前景。本文报道拟青霉 *Paecilomyces* sp. FLH30 内切  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶基因克隆、表达及性质研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与载体

拟青霉(*Paecilomyces* sp. FLH30),由河南科技学院分离工程实验室筛选并保藏;酿酒酵母 INVSc1 及载体 pYES2, Invitrogen;载体 pYES2-GSL, 本实验室改造; *E. coli* BL21 及载体 pET28a(+), Novagen;载体 pMD-18 T simple, TaKaRa; *E. coli* JM109, Biomed。

### 1.2 主要试剂

酵母提取物、胰蛋白胨, Oxoid; TRIzol 试剂, Invitrogen; Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen; PrimeScript 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>), Advantage 2 PCR Kit, TaKaRa; DNA 聚合酶 *Pfu*, Promega; T4 DNA 连接酶及其它限制性内切酶, NEB; 质粒提取试剂盒, 北京天根生化科技; 大麦葡聚糖、地衣多糖、昆布多糖、微晶纤维素(Avicel)、CMC-Na、桦木木聚糖、葡萄糖, Sigma; 昆布多糖标准品, Seikagaku; 其它试剂均为分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 拟青霉酿酒酵母表达 cDNA 文库的构建:

(1) 总 RNA 及 mRNA 提取: 拟青霉接种液体诱导培养基于 45 °C、180 r/min 条件下培养 84 h 后, 过滤收集菌体, 参照 TRIzol 和 Oligotex mRNA Mini Kit 说明书分别进行总 RNA 及 mRNA 提取。诱导培养基组成(g/L): 昆布多糖 10.00, 大麦葡聚糖 10.00, 蛋白胨 20.00, 酵母粉 10.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.20, CaCl<sub>2</sub> 0.20, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, pH 自然。

(2) 表达 cDNA 文库构建: 第一链及双链全长

cDNA 合成所需寡核苷酸引物 SMART IV Oligonucleotide、CDS III/3' PCR Primer、5' PCR Primer 和 CDS III/3' PCR Primer 及操作参照 Clontech 公司 Creator SMART cDNA Library Construction Kit 手册进行。纯化的双链 cDNA 与载体 pYES2-GSL (pYES2 载体多克隆位点引入真核生物稀有 *Sfi* I 酶切位点改造而成) 分别经 *Sfi* I 酶切后 16 °C 连接过夜。连接产物用乙醇沉淀后, 重溶于 5  $\mu$ L DEPC 处理的去离子水后电转化酿酒酵母 INVSc1<sup>[10]</sup>, 转化产物涂布含有 2% 棉籽糖的 SC-U (缺少腺嘌呤的最低培养基) 选择性平板上 (0.67% 酵母氮基, 2% 棉籽糖, 0.01% 的腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸和色氨酸, 0.005% 的天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸和缬氨酸, 2% 琼脂, pH 6.0), 30 °C 培养 2–3 d 后, 每个平板加入 5 mL 15% 的甘油, 轻轻刮掉菌落, 分装后于 -70 °C 贮存备用。

(3) 葡聚糖酶基因筛选: 取适当稀释的酿酒酵母表达文库, 涂布筛选平板 (含有 2% 半乳糖, 2% 棉籽糖, 0.5% 大麦葡聚糖的 SC-U 诱导选择性平板), 刚果红法筛选具有透明圈的重组子<sup>[11]</sup>, 进行测序分析。

**1.3.2 序列分析:** 核酸和氨基酸序列分析采用 ExPASy 蛋白质组学工具 (<http://www.expasy.ch/tools/>), 同源性搜索采用 NCBI 的 BLAST 程序, 氨基酸多重序列比对采用 ClustalX 2 程序 (<http://www.clustal.org/download/current/>), 信号肽分析采用 SignalP 3.0 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), 蛋白保守区搜索采用 ScanProsite 在线程序 (<http://www.expasy.ch/tools/ScanProsite>), N-糖基化位点预测采用在线程序 NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)。

**1.3.3 *PsBg16A* 在 *E. coli* 中的表达及重组酶纯化:**

(1) 表达: PCR 扩增去信号肽的 *PsBg16A*, 两对引物分别为: *PsBg16A* NcoIF: 5'-AAGCTTCCATGGTG GCCGCTACGTCCTCATCG-3' (含 *Nco* I 酶切位点); *PsBg16A* NotIR: 5'-CTCGAGGCGGCCGCGCCG GGGTAGACCTTTAGGGAG-3' (含 *Not* I 酶切位点), 扩增产物经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切后, 连接经同样酶

切的 pET-28a(+) 载体, C-末端带有 6 $\times$ His Tag, 以利于纯化。

(2) 纯化: 重组大肠杆菌接种 LB 液体培养基, 经 37 °C 振荡培养至  $OD_{600}$  达 3.0–4.0 之间, 加入乳糖至终浓度 10%, 16 °C 诱导 24 h 后, 10 000 r/min 离心收集菌体, 超声破碎后用 Ni-NTA 柱 (Qiagen) 纯化目标蛋白, SDS-PAGE (12.5%) 检测蛋白纯度<sup>[12]</sup>。

**1.3.4 重组 *PsBg16A* 性质:** 酶活力通过 DNS 测定还原糖法进行<sup>[13]</sup>。酶活力的单位定义为: 65 °C、pH 7.0 的 MES 缓冲液及底物浓度为 1% (*W/V*) 条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量。

(1) 蛋白含量测定参照 Lowry 等的方法<sup>[14]</sup>, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

(2) 最适 pH 和最适温度。65 °C 下, 分别测定重组酶在 pH 2.5–11.0 的 4 种不同缓冲液 (50 mmol/L, 柠檬酸缓冲液 pH 2.5–5.5, MES 缓冲液 pH 5.0–7.0, 磷酸缓冲液 pH 6.0–8.5, 甘氨酸-NaOH 缓冲液 pH 8.5–11.0) 中的酶活, 以最高酶活作为 100%。为考察重组酶在不同 pH 下的稳定性, 一定浓度的酶分别于上述缓冲液 50 °C 保温 30 min 后, 冰浴 30 min 测定残余酶活力, 以未经处理酶的酶活为 100%。分别于 30 °C–100 °C 测定酶活 (50 mmol/L MES 缓冲液 pH 7.0), 以最高酶活作为 100%, 酶液适当稀释后于不同温度下分别保温、定时取样测定残余酶活力, 以未经处理酶的酶活为 100%, 考察其温度稳定性。结果为 3 次试验数据的平均值。

(3) 金属离子及化合物对酶活的影响。于 50 mmol/L pH 7.0 的 MES 缓冲液配制的葡聚糖酶溶液中分别加入不同的金属离子, 使其终浓度为 4 mmol/L, 将酶液在 50 °C 下处理 30 min, 按前述标准方法测定残余酶活力, 以没有添加金属离子的酶液作为对照。结果为 3 次试验数据的平均值。

(4) 底物特异性及产物分析。采用 MES 缓冲液 (50 mmol/L pH 7.0) 配制 1% (*W/V*) 的不同底物溶液, 然后在 65 °C 下反应 10 min, 测定酶活, 考察酶的底物特异性。同时每加入 10 U/mL 的酶于 50 °C 反应 8 h, 定时取样, 煮沸灭酶活后薄层层析 (TLC) 分析水解产物<sup>[15]</sup>。

(5) 动力学参数的测定。分别用 50 mmol/L pH

7.0 MES 缓冲液配制 0.1–10.0 g/L 的底物溶液, 然后加入一定量的葡聚糖酶 65 °C 下反应 5 min, 通过 SigmaPlot Enzyme Kinetics Module 软件, 利用 Lineweaver-Burk 法计算出  $V_{max}$ 、 $K_m$  值。

## 2 结果

### 2.1 葡聚糖酶基因筛选与序列分析

表达文库经适当稀释后涂布纤维质 SC-U 诱导平板, 经刚果红染色及脱色后, 从文库中筛选到多株产葡聚糖酶酿酒酵母重组子(图 1), 随机挑选 3 个重组子提取质粒测序, 结果为同一产葡聚糖酶基因(GenBank 登录号: HQ825092)。其全长 cDNA 为 1 217 bp, 完整开放阅读框(ORF) 951 bp, 编码 316 个氨基酸(图 2)。Motifscan 结果显示, 可能含有 1 个酰胺化位点(Amidation site)、3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site)、11 个 N 端酰基化位点(N-myristoylation site)、2 个 PKC 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylationsite)和 1 个

糖苷水解酶 16 家族保守结构域(Glycosyl hydrolases family 16 domain)。预测成熟蛋白质分子量为 34.2 kD,  $pI$  为 4.97。没有预测到 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Thr/Ser-Zaa, Zaa 非 Pro), SignalP 分析 N 端信号肽为 1–18 aa (QLL-MA)残基(图 2)。

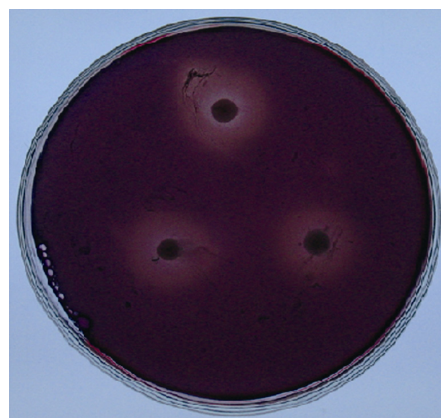


图 1 葡聚糖酶重组酿酒酵母葡聚糖刚果红平板  
Fig. 1 The analysis of recombinant *S. cerevisiae* by glucon-Congo red plate

```

-118   AGGAGACGAAGGGAATTGACGACGACTACTCCCTGCCTTTTCGGCCTGGTGTCTCTCCCGTGTGCATCACTTCGTTG
-43    CTTCGAAGTGTTTTACTTGGTCGCTCCTTGATTGCGGACAAGATGCACATCCGCTCTACCCCTATCCTGTTTTGC
1      M H I R S T P I L F A
33     CGGCCTCTCATCACAGCAGCTCATGGCCGCTACGTCCTCATCGACGACTACGGCCACGGCAACGGCTTCTTCAA
12     G L S S Q Q L M A A Y V L I D D Y G H G N G F F N
108    CAAGTTAAACTTCTTACC GGCGAGGACCTACCCACGGGTTCTGGACTACGTGTCTCGCAACGTCGCCAGGG
37     K F N F F T G E D P T H G F V D Y V S R N V A Q G
137    CGCCGGCTCCTCGGCGAGCGTGGCGACCGGGTCTACATGGGCGTGCAGTACACCAACCCCGCGGATCACGGG
62     A G L L G E R G D R V Y M G V D Y T N P A G S R G
268    CCGACGCTCCGCTCCGCTCGAGTCCAAGAACACCTACGAGCACGGCCTCGTGTCTCATCGACCTCGCCACATGCC
87     R R S V R L E S K N T Y E H G L V V I D L A H M P
343    CGGCTCTGTCTGGCCCTGGCCTGCCTTCTGGGCCCTGGCACCGCCGACTGGCCCTTCGGGCGGAGATCGA
112    G S V C G T W P A F W A L G T A D W P F G G E I D
418    CATCATCGAGGGTGTCAACGACAACCTCCTTCAACCACATGATCCTCCACACCTCCGACGGCTGACCATCAACGA
137    L I E G V N D N S F N H M I L H T S D G C T I N D
493    CGGCGGCTTCAACGGCAACCTGCGCACCTCGAAGTCTACATCTACGCGCCCGGCCAGAACGCCAACGGGGCTG
162    G G F T G N L R T S N C Y I Y A P G Q N A N A G C
568    CGGGATCGAGGCCACCAACCCGACTCCTACGGGCGCGGCTTCAACTCCCTCGGCGGGCATCTACGCTACCGA
187    G I E A T N P D S Y G R G F N S L G G G I Y A T D
643    CCTCACCTCCAACGGCATCTCCATCTGGTTCTTCCCGCGGGCTCCGAGCTGCGCGTCTCGGCGACAACCCGAA
212    L T S N G I S I W F F P R G S E L R V L G D N P N
718    CCCCAGCAACTGGGGCACCCCGCCCAAGTTCGCGGGGCTCCTGCGACTTCGAGTCCAAGTTCACGGGCA
237    P A N W G T P A A K F A G S C D F E S K F N G Q
813    GCGGCTCATCTCGACATCACCTTCTGCGGGACTGGGCGGCTCCGCTTGGGGCATCGGCGGCTGCGCCTCCCG
262    R L I F D I T F C G D W A G S V W G I G G C A S R
888    CGCCGGCAACTGCAACGACTTCGTCAGGACAACCCCTTGCCTTACCGAGTCTACTGGCTCATCAACTCCCT
287    A G N C N D F V Q D N P S A F T E S Y W L I N S L
963    AAAGTCTACCCCGGCTAAGGCGGATGTTTCTTCTGCTGATAGTTTTTGTGTGATGTTCAATCTTTCGGGTT
312    K V Y P G *
1038   TTGCCATGCCAAGTACATATGTAACCCAGAATGGCTGAATGATAACGATCAATGATGCTATTGGAAAAAAAAAAA

```

图 2 *PsBg16A* 核酸及编码氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding *Paecilomyces* sp. FLH30 *PsBg16A*

Note: The signal peptide is underlined. The amino acid with box was a conserved motif of GHs family 16. Poly A is double underlined.

*PsBg16A* 编码的的氨基酸序列和真菌产  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶有较高的序列同源性, 而和来源于 *Paecilomyces thermophile* 糖苷水解酶家族 16 的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶(ADK55597.1)同源性最高, 达 83%, 和其它相似性较高的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶同源比对结果见图 3, 与来源于 *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (EAW23242.1)、*Aspergillus fumigatus* A1163 (EDP55864.1)、*A. clavatus* NRRL 1 (EAW08208.1) 和 *Penicillium chrysogenum* Wisconsin (CAP91414.1) 的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶同源性分别为 66%、64%、61% 和 61%。推测的 *PsBg16A* 活性中心的氨基酸残基 E119E 与来源于细菌糖苷水解酶 16 家族活性位点氨基酸残基 E1DIE 相似, Glu114、Asp116 和 Glu 119

在糖苷水解酶 16 家族和 7 家族高度保守<sup>[16]</sup>。

### 2.2 *PsBg16A* 在 *E. coli* 中的表达及重组酶纯化

以阳性酵母重组质粒为模板, 利用引物 *PsBg16A* NcoIF 和 *PsBg16A* AnotIR PCR 扩增去信号肽的 *PsBg16A* (图 4A), 扩增产物经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切后, 连接经同样酶切的 pET-28a(+)载体, 测序正确的阳性重组质粒命名为 pET28/*PsBg16A* (图 4B)。

阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 重组菌株经 16 °C 20%乳糖诱导 24 h, 酶活达 482 U/mL。经 Ni-NTA 一步纯化, SDS-PAGE 分析纯化产物, 可见单一条带(图 5), 分子量约 36 kD, 比理论计算分子量 34.2 kD 稍大。

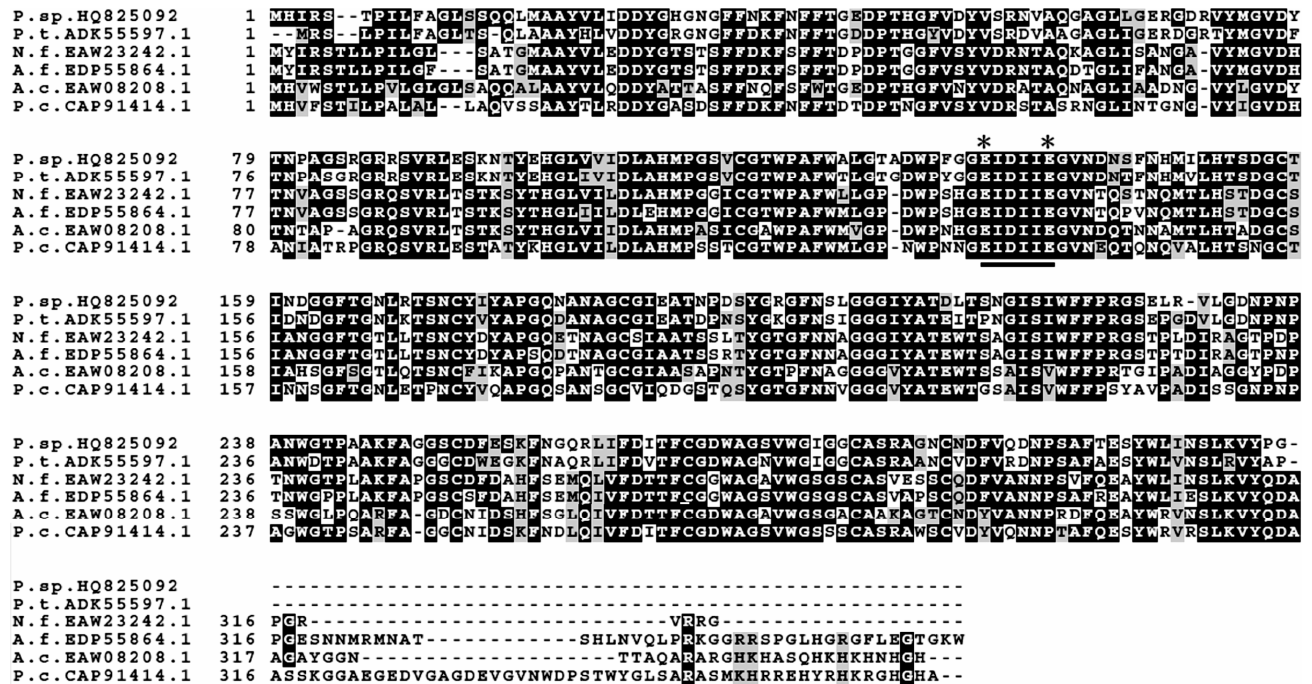


图 3 *PtLic16A* 氨基酸序列同源比对分析

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences for *PsBg16A* and other GH family 16  $\beta$ -glucanases

Note: Numbers on the left are the residue number of the first amino acid acid in each line. Abbreviations and accession numbers of those  $\beta$ -glucanases are as follows: *Paecilomyces* sp. FLH30 (*P. sp.* HQ825092), *Paecilomyces thermophila* (*P. t.* ADK55597.1), *Neosartorya fischeri* NRRL 181 (*N. f.* EAW23242), *Aspergillus fumigatus* A1163 (*A. f.* EDP55864.1), *A. clavatus* (*A. c.* EAW08208.1), *Penicillium chrysogenum* Wisconsin (*P. c.* CAP91414.1). Identical residues are shaded in black, and conserved residues are shaded in gray. The conserved activity site motif is underlined. The putative catalytic nucleophile and acid/base (i.e., E114 and E119) are identified by asterisk.

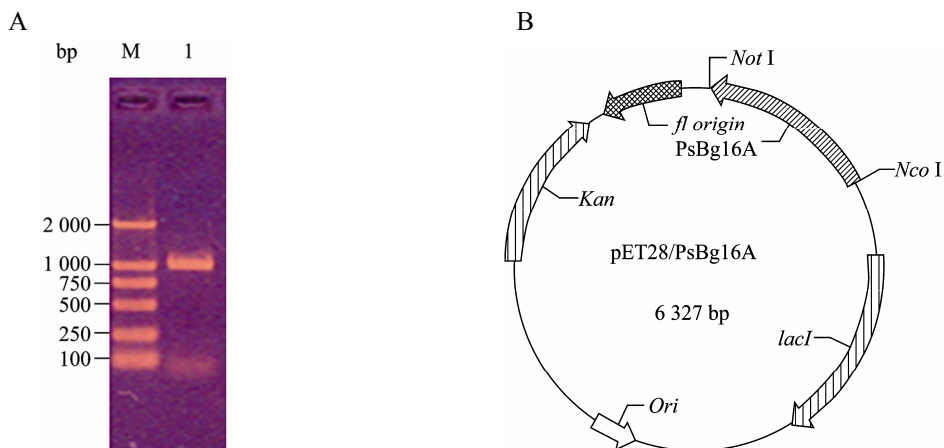


图4 PsBg16A 去信号肽 PCR 扩增产物(A)及阳性重组质粒 pET28/PsBg16A (B)

Fig. 4 Analysis of PCR product without signal peptide PsBg16A by agarose gel electrophoresis and map of vector pET28/PsBg16A

Note: M: DL2000 marker; 1: PCR product without signal peptide PtLic16A.

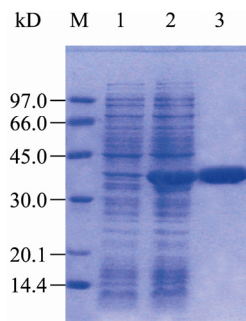


图5 大肠杆菌重组 PsBg16A 表达及纯化 SDS-PAGE 分析  
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression and purification of the recombinant PsBg16A

Note: M: Standard protein molecular weight markers; 1: Uninduced cells; 2: Induced cells; 3: Purified PsBg16A.

## 2.3 重组 PsBg16A 性质

**2.3.1 pH 和温度特性:** 重组葡聚糖酶最适 pH 约 7.0 (图 6A), 最适温度约 65 °C (图 6C)。重组酶在 pH 4.5–9.5 之间相对稳定, 处理 30 min, 相对酶活仍保持在 80.0%以上; 50 °C 保温 60 min, 酶活基本没有损失, 60 °C 处理 60 min, 相对酶活仍保持在 85.0%以上, 70 °C 处理 30 min, 相对酶活仍保持在 72.0%以上, 80 °C 下, 酶快速失活, 处理 60 min, 相对酶活保持在 8.2%以上, 说明该重组酶具有良好的 pH 和温度稳定性。

**2.3.2 金属离子及化合物对重组酶活性的影响:** 不同金属离子和化合物(4 mmol/L)对重组 PsBg16A 活性影响结果显示(表 1): Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、SDS、DTT

表 1 不同金属离子及部分化合物对重组 PsBg16A 活性的影响

Table 1 Effect of various cations and compounds (4 mmol/L) on PsBg16A activity

试剂 Reagents	相对酶活 Relative activity (%)
Control	100.0
Na <sup>+</sup>	102.2
Ag <sup>+</sup>	66.7
Li <sup>+</sup>	106.3
K <sup>+</sup>	104.4
Fe <sup>2+</sup>	85.2
Fe <sup>3+</sup>	24.2
Ca <sup>2+</sup>	77.6
Mg <sup>2+</sup>	87.1
Co <sup>2+</sup>	330.0
Ni <sup>2+</sup>	66.2
Sr <sup>2+</sup>	88.1
Zn <sup>2+</sup>	24.0
Cu <sup>2+</sup>	24.7
Mn <sup>2+</sup>	89.4
Hg <sup>2+</sup>	23.2
SDS	108.2
DTT	118.5
EDTA	51.8
β-Mercaptoethanol	98.3

和 β-巯基乙醇对酶活没有显著影响, 而 Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 和 EDTA 强烈抑制酶活。Ca<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 和 Ag<sup>+</sup> 部分抑制酶活性(< 80%)。Co<sup>2+</sup> 具有显著增加酶活的作用, 可使酶活提高 3.3 倍。

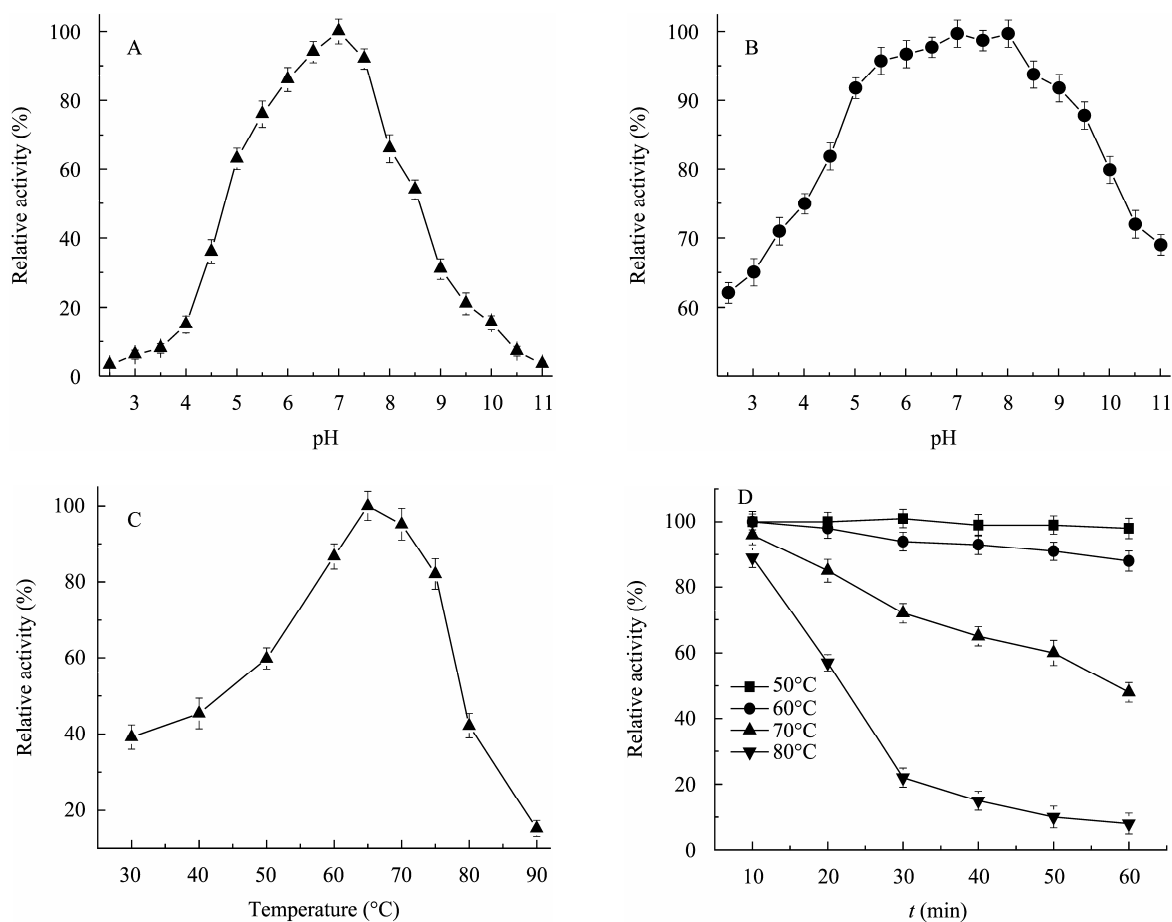


图 6 大肠杆菌重组 PsBg16A 的 pH 和温度特性

Fig. 6 Characterization of pH and temperature for purified recombinant PsBg16A

Note: A: The optimum pH; B: The stability of pH; C: The optimal temperature; D: Thermo stability of PsBg16A. Each value represents the  $\bar{x} \pm s$  of triplicates.

**2.3.3 重组 PsBg16A 的底物特异性:** 重组 PsBg16A 对大麦葡聚糖和地衣多糖具有较高的比酶活, 分别为 7 784 和 5 351 U/mg, 而对昆布多糖比酶活较低, 只有 1 236 U/mg, 对 3 种葡聚糖的  $K_m$  分别为 3.12、4.86 和 10.32 g/L(表 2)。重组 PsBg16A 对 CMC-Na、微晶纤维素和桦木木聚糖没有活性, 说明 PsBg16A

为典型的  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶。

**2.3.4 重组 PsBg16A 水解葡聚糖的 TLC 分析:** 重组 PsBg16A 对 1% (W/V) 的大麦葡聚糖、地衣多糖和昆布多糖的薄层层析(TLC)显示(图 7): 水解 3 种底物的主要产物为葡萄糖、二糖和三糖, 此外还有少量四糖和五糖, 说明 PsBg16A 为内切葡聚糖酶。

表 2 重组 PsBg16A 的底物特异性和动力学参数  
Table 2 Substrate specificity and kinetic parameters of purified recombinant PsBg16A

底物 Substrate	主要连接键 Main linkage (Monomer)	比酶活 Specific activity (U/mg)	米氏常数 $K_m$ (g/L)	最大反应速率 $V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ]
Barley $\beta$ -glucan	1,3-1,4- $\beta$ -(glucose)	7 784	3.12	6 733
Lichenan	1,3-1,4- $\beta$ -(glucose)	5 351	4.86	3 276
Laminarin	1,3- $\beta$ -(glucose)	1 236	10.32	1 491



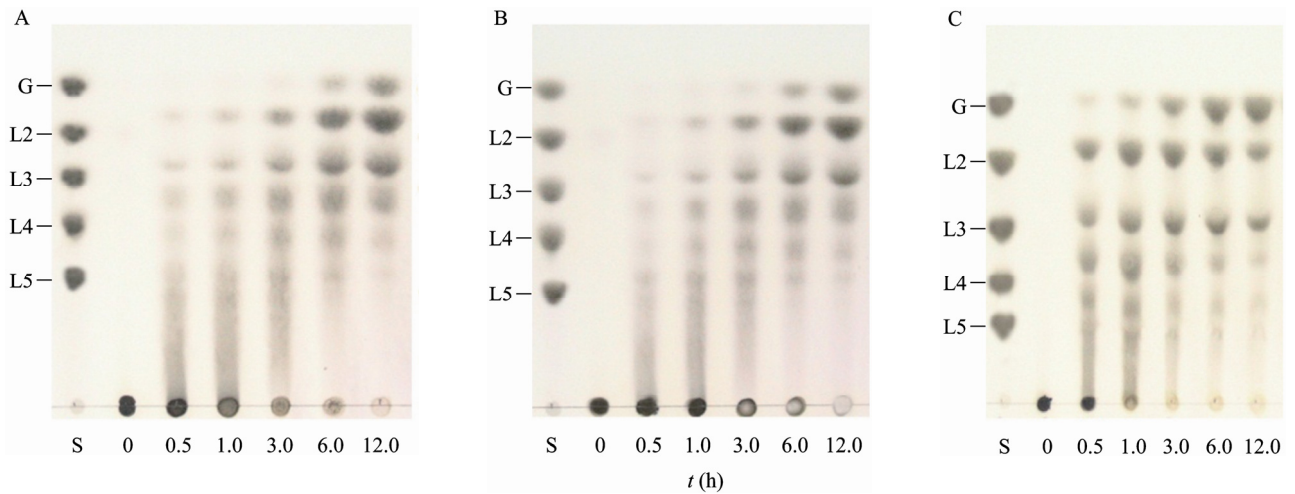


图7 重组 PsBg16A 水解大麦葡聚糖(A)、地衣多糖(B)和昆布多糖(C)的 TLC 分析

Fig. 7 Thin-layer chromatograms of hydrolytic products of 1% (W/V) barley  $\beta$ -glucan (A), 1% (W/V) lichenan (B) and 1% (W/V) laminarin (C) at intervals of up to 12 h

Note: Standards are glucose and L2-L5 (lane S).

### 3 讨论

来源于细菌的部分  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶大多属于糖苷水解酶 81 家族, 对大麦葡聚糖和地衣多糖仅有微弱的活性, 严格来说, 应归类于内切  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.39)。大部分  $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶最适 pH 在偏酸性范围(4.0–6.5), 最适温度在 40 °C–60 °C 之间<sup>[7,17–18]</sup>, 而重组 PsBg16A 最适 pH 温度分别为 7.0 和 65 °C, 其最适温度要低于我们测定粗酶液的最适温度 70 °C (数据未给出), 可能与蛋白的折叠及翻译后修饰有关。重组 PsBg16A 最适 pH 在中性, 瘤胃动物中 pH 一般需保持在中性及偏碱性, 以便于瘤胃微生物消化纤维素, 因此, 本重组葡聚糖酶用于饲料中, 可以最大限度发挥其水解  $\beta$ -葡聚糖的作用。

利用 SWISS-MODEL 在线服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 的自动建模模式, 基于 *P. chrysosporium* 昆布多糖 16A (PDB ID, 2w39) 预测了重组 PsBg16A 的 3D 结构, 理论结果显示, 本重组葡聚糖酶和其它 16 家族的糖苷水解酶分别由两个 8 个反向平行的  $\beta$ -折叠组成一个  $\beta$ -三明治和 13 个短的螺旋及环 (Loop) 组成, 其中的 Cys95–Cys273、Cys137–Cys233、Cys153–Cys176 和 Cys250–Cys270 组成 4 个二硫键, 可能与酶蛋白的

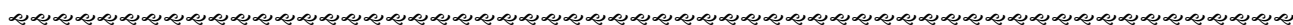
构象及热稳定性有关。

### 参考文献

- [1] Buliga GS, Brant DA, Fincher GB. The sequence statistics and solution conformation of a barley (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan[J]. Carbohydrate Research, 1986, 157: 139–156.
- [2] McCarthy T, Hanniffy O, Savage AV, et al. Catalytic properties and mode of action of three endo-beta-glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble beta-1,4-and beta-1,3;1,4-linked glucans[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1/3): 141–148.
- [3] 杨培龙, 姚斌, 范云六. 饲料用非淀粉多糖水解酶转基因植物的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9): 29–34.
- [4] Huang HQ, Yang PL, Luo HY, et al. High-level expression of a truncated 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 95–103.
- [5] 李永仙, 谢焱, 朱林江, 等. 淀粉液化芽孢杆菌  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆及表达[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4): 542–548.
- [6] Bang ML, Villadsen I, Sandal T. Cloning and characterization of an endo- $\beta$ -1,3(4)glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(2): 215–222.



- [7] Boyce A, Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1, 3(4)- $\beta$ -glucanase from *Rhizomucor miehei*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4): 835–841.
- [8] Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, et al. Hydrolysis of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 898–906.
- [9] Martín-Cuadrado AB, del Dedo JE, de Medina-Redondo M, et al. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1, 3- $\beta$ -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(1): 188–200.
- [10] Ausubel MM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. 5th ed. New York: Greene Pub Associates, 2002: 512–514.
- [11] 肖志壮, 王婷, 汪天虹, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶III基因的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 391–396.
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [14] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265–275.
- [15] 孙子羽, 迟乃玉, 王宇, 等. 低温生淀粉糖化酶菌株RS01分离及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 798–802.
- [16] Luo HY, Yang J, Ying PL, et al. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo- $\beta$ -1, 3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 1015–1023.
- [17] Totsuka A, Usui T. Separation and characterization of the endo- $\beta$ -(1→3)-D-glucanase from *Rhizoctonia solani*[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1986, 50(3): 543–550.
- [18] Allardyce BJ, Linton SM. Purification and characterisation of endo- $\beta$ -1,4-glucanase and laminarinase enzymes from the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* and the aquatic crayfish *Cherax destructor*[J]. The Journal of Experimental Biology, 2008, 211(14): 2275–2287.



**征订启事**

**2012年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订**

	<p>《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。</p>
	<p>《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。</p>
	<p>《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价58.00元, 年价696元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。</p>
	<p>《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。</p>
<p>订阅</p>	<p>欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。</p>
	<p>汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物所 B401</p>
	<p>收信人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn</p>
	<p>请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。</p>