

专题研究专栏

编者按:酶作为一种生物催化剂,具备高效性、专一性及催化条件温和、无污染等特点,在现代食品生产中扮演着重要角色。酶工程技术是生物工程最重要的组成部分,该技术的每一次重大突破都直接促进了人类科学技术的进步;而新酶的发现、酶特性的研究、酶制剂的制备以及酶的固定化、酶的修饰与改造及酶反应器等,一直是酶工程研究领域的重点与热点。本期的3篇研究论文,从酶的产生、性质及固定化特点等方面入手,分别就 β -葡萄糖苷酶的性质及结构解析、葡聚糖酶的发酵条件优化,以及蔗糖异构酶的固定化方法等方面展开深入探讨,以期为新酶源的开发、新型酶制剂的研制、固定化酶反应器等酶工程技术的发展及其在食品工业中的应用提供基础数据和理论参考。

(主持人:李秀婷教授)

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.01.004

文章编号:2095-6002(2019)01-0020-08

引用格式:黄平,吴世旺,江正强,等.巴伦葛兹类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶的表达、酶学性质及结构解析[J].食品科学技术学报,2019,37(1):20-27.



HUANG Ping, WU Shiwang, JIANG Zhengqiang, et al. Expression, biochemical characterization and structure resolution of β -glucosidase from *Paenibacillus barengoltzii*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(1):20-27.

巴伦葛兹类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶的表达、酶学性质及结构解析

黄平, 吴世旺, 江正强, 杨绍青*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:从克隆巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 中克隆得到一个 β -葡萄糖苷酶基因,并在大肠杆菌中进行了异源表达,研究了重组酶的酶学性质,进一步解析了该酶的晶体结构。研究表明,该酶的最适温度和 pH 值分别为 50 °C 和 7.5。该酶底物特异性较广,能够水解 β -1,2- β -1,3- β -1,4- β -1,6-糖苷键等在内的多种糖苷键,对昆布多糖、大麦 β -葡聚糖和地衣多糖等聚糖均有水解作用。晶体结构信息表明,该酶呈现糖苷水解酶(GH)3 家族典型的多结构域结构,其催化口袋由类似 $(\alpha/\beta)_5$ 的三明治结构域和 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶结构域中间的 loop 构成,其中芳香氨基酸残基 Trp748 侧链提供-1 位结合位点,Trp749 侧链提供+1 位结合位点,Trp131 侧链提供+2 位结合位点,这些芳香氨基酸残基形成了一个小的口袋和疏水性环境,不利于转糖苷反应。

关键词:巴伦葛兹类芽孢杆菌; β -葡萄糖苷酶;异源表达;酶学性质;晶体结构

中图分类号:TS201.3;Q814

文献标志码:A

纤维素是由 β -D-葡萄糖残基通过 β -1,4-糖苷键连接而成的直链多糖,一般含有 3 000 ~ 10 000 个葡萄糖残基。通常将能水解裂纤维素的 β -1,4-糖苷键

的酶称为纤维素酶。纤维素酶按其催化作用特点分为三类:内切-1,4- β -D-葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)、外切- β -1,4-D-葡聚糖酶(EC 3.4.1.91)、 β -葡萄糖苷酶

收稿日期:2018-12-28

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31571774)。

第一作者:黄平,男,博士研究生,研究方向为酶晶体结构。

*通信作者:杨绍青,男,教授,博士,主要从事食品酶的发掘、特性、结构解析及分子改造等方面的研究。

(EC 3.2.1.21)。内切- β -1,4-*D*-葡聚糖酶也称为内切葡聚糖酶、内切-1,4- β -葡聚糖酶,在纤维素的内部无定形位点随机切割 β -1,4-糖苷键,产生各种长度的低聚糖;外切- β -1,4-葡聚糖酶也称外切葡聚糖酶、外切纤维二糖水解酶、1,4- β -纤维二糖水解酶,水解纤维素或纤维四糖的 β -1,4-糖苷键,从非还原性末端依次切下纤维二糖分子; β -葡萄糖苷酶也称龙胆二糖酶、纤维二糖酶、苦杏仁酶,可以将纤维二糖等纤维寡糖末端非还原端的 β -*D*-葡萄糖残基水解,释放 β -*D*-葡萄糖^[1]。若将纤维素降解成最终产物 β -*D*-葡萄糖,至少需要3种纤维素酶的共同作用。内切葡聚糖酶作用于纤维素的非结晶区,通过外切葡聚糖酶将其水解成纤维二糖和三糖,最后通过 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖水解释成 β -*D*-葡萄糖。纤维二糖是内切酶和外切酶的抑制剂,通过加入 β -葡萄糖苷酶可以有效降低抑制作用,提高纤维素降解率。

本研究克隆了巴伦葛兹类芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*) CAU904 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶基因并在大肠杆菌中表达,研究了重组 β -葡萄糖苷酶(PbBglu3)的酶学性质,进一步解析了其晶体结构,初步阐明了其催化机制,希望为后续该酶的理性设计提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

ExTaq DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA polymerase、限制性内切酶、低分子量标准蛋白质、DNA Marker、PrimeScript Reverse Transcriptase (RNase H-),购自 TaKaRa 公司;T4 DNA ligase,购自 NEB 公司;琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒,购自北京博迈德公司;高纯质粒小量制备试剂盒,购自北京天根生化公司;Ni-IDA agarose,购自 GE 公司;薄层层析 Gel Plate F254,购自 Merck 公司;大麦 β -葡聚糖、地衣多糖、昆布多糖、桦木木聚糖、微晶纤维素、CMC、pNP- β -Xylopyranoside、pNP- α -Galactopyranoside、pNP- β -Galactopyranoside、pNP- β -Glucopyranoside、pNP- α -Glucopyranoside,购自 Sigma 公司;纤维寡糖、昆布寡糖,购自 Megazyme 公司;结晶筛选试剂盒,购自 Hampton 公司。

巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 为本实验室筛选保藏;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3),购自北京博迈德公司;pET-28a(+),购自

Novagen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养和基因组 DNA 的提取

斜面培养基上活化的单菌落接入液体培养基,45℃摇瓶培养3d,离心收集适量菌体(12 000 r/min,3 min)。基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶基因克隆

根据巴伦葛兹类芽孢杆菌基因组(NZ_KE159654.1)中 β -葡萄糖苷酶基因序列和表达载体 pET-28a(+)的多克隆位点,设计正向引物 BgluF: 5'-TGACTGCTAGCATGAGCAAATCGATGTTAGGTGTT-3'(下划线处为 Nhe I 酶切位点);反向引物 BgluR: 5'-TGACTCTCGAGTTAAA TAAACTCGATCACTCAATCTCC-3'(下划线处为 Xho I 酶切位点)。以基因组 DNA 为模板,PCR 条件为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 3 min, 34 个循环后 72℃ 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。将目的片段连接至 pMD-19T 载体,热激转化 *E. coli* DH5 α ,筛选阳性菌落,提取 T/A 克隆质粒,经酶切鉴定后,测序验证。将测序正确的重组质粒用 Nhe I 和 Xho I 酶切后,回收目的片段,连接至 pET-28a(+)载体,转化 *E. coli* BL21,在含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板筛选阳性转化子。

1.2.3 PbBglu3 的诱导表达及纯化

挑取阳性转化子于 10 mL LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素)培养基中,37℃振荡培养至对数生长期。以体积分数 1% 的接种量转接到 300 mL 相同培养基中,37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,16℃诱导培养 20 h 后,离心收集菌体。菌体用 20 mL 的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)悬浮,超声破碎(200 W,破碎 3 s,间歇 4 s,破碎 90 次)3 个循环。将破碎后的菌体离心(10 000 r/min,10 min),收集上清液,即粗酶液。

PbBglu3 采用 Ni-IDA 亲和层析进行纯化,将粗酶液以 0.5 mL/min 流速上样于经过缓冲液 A 预平衡的 Ni-IDA 层析柱。用缓冲液 A 以 1 mL/min 洗涤柱子至流穿液 OD₂₈₀ 小于 0.05 时,用缓冲液 B 液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑,pH 值 8.0) 进行洗脱,SDS-PAGE 检测蛋白质纯度。

1.2.4 酶活力和蛋白浓度测定

酶活力测定:75 μ L 15 mmol/L 底物 pNPG(蒸馏

水配制),加 150 μL MOPS(morpholino propanesulfonic acid)(pH 值 6.5 ~ 8.0)缓冲液(50 mmol/L, pH 值 7.5),50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 4 min 后,加入 25 μL 适当稀释的酶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,加 750 μL 的饱和硼酸钠溶液终止反应,冷却后测定 OD_{405} 。

1 个酶活力单位(U)定义:在实验条件下,每分钟生成的 1 μmol pNP 所需要的酶量。

蛋白含量的测定采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白绘制标准曲线。

1.2.5 PbBglu3 的最适 pH 值和 pH 值稳定性测定

最适 pH 值测定:50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,在 pH 值 4.0 ~ 10.5 的不同缓冲体系中测定酶活力。缓冲体系分别为 Citrate(pH 值 4.0 ~ 6.0)、Acetate(pH 值 4.0 ~ 4.5)、Bis-Tris (bis-(2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethyl) methane) (pH 值 5.5 ~ 7.5)、MOPS、HEPES (z-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid)(pH 值 6.5 ~ 8.5)、Tris-HCl(pH 值 7.0 ~ 9.0)、CHES(N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid)(pH 值 8 ~ 10.5),以酶活力最高点为 100%。pH 值稳定性测定是用不同缓冲体系将纯酶稀释适当倍数,50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,冰水浴中冷却 30 min 后,按照标准方法测定残余酶活力,以未经处理的酶液为对照,计算残余酶活力占对照酶活力的百分比。

1.2.6 PbBglu3 的最适温度及温度稳定性测定

最适温度的测定是以 50 mmol/L, pH 值 7.5 MOPS 缓冲液将 PbBglu3 稀释适当倍数后,分别在不同温度下(30 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$)测定酶活力,以酶活力最高点为 100%。温度稳定性的测定是用同样的缓冲液将 PbBglu3 稀释适当倍数后,分别置于不同温度下处理 30 min,冰水浴冷却 30 min 后,按照标准方法测定残余酶活力,以未经处理的酶液为对照,计算残余酶活力占对照酶活力的百分比。

1.2.7 PbBglu3 底物特异性测定

PbBglu3 的底物特异性测定是以 pNP-糖苷(pNP- α -D-galactopyranoside、pNP- β -D-galactopyranoside、pNP- α -D-glucopyranoside、pNP- β -D-glucopyranoside、pNP- β -D-xylopyranoside)、低聚糖及糖苷类化合物(纤维寡糖、昆布寡糖、龙胆二糖、槐糖、乳糖、苦杏仁苷和水杨苷)和聚糖(桦木木聚糖、昆布多糖、地衣多糖、大麦葡聚糖、几丁质、羧甲基纤维素钠和结晶纤维素)为反应底物测定酶活力。酶活力测定方法为 225 μL 5 mmol/L pNP-糖苷类底物,或

10 mg/mL 低聚糖及糖苷类化合物底物,或 10 mg/mL 聚糖类底物(均用 50 mmol/L, pH 值 7.5 MOPS 缓冲液配制),50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 4 min 后,加入 25 μL 适当稀释的酶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,加 750 μL 的饱和硼酸钠溶液终止反应,冷却后分别测定 OD_{410} 、葡萄糖(使用葡萄糖氧化酶试剂盒测定)和还原糖(采用 DNS 法)。对于纤维二糖、龙胆二糖、昆布二糖和槐糖等二糖,1 个酶活力单位(U)为,在测定条件下每分钟生成的 2 μmol 葡萄糖所需的酶量。

1.2.8 PbBglu3 的水解特性测定

采用 TLC(薄层层析法)对 PbBglu3 水解纤维寡糖、昆布寡糖和昆布多糖生成的水解产物进行分析。在 10 mg/mL 水解底物(用 50 mmol/L, pH 值 7.5 MOPS 缓冲液配制)中加入 5 U/mL 的 PbBglu3,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h,定时取样,沸水浴煮沸 5 min,终止反应。冷却后离心取上清液分析水解情况,展层剂为正丁醇:水:乙酸,三者体积比为 2:1:1;显色剂为甲醇:硫酸,体积比为 95:5。

1.2.9 PbBglu3 的晶体筛选及结构解析

PbBglu3 结晶初筛质量浓度为 18 mg/mL,缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl, pH 值 8.0。结晶试剂盒为 Hampton Research 公司的 Crystal ScreenTM、IndexTM、PEG/IonTM 和 SaltRxTM 以及北京博亚结晶公司的 BCR。采用坐滴气相扩散法进行结晶条件筛选和优化。

于上海同步辐射光源生物大分子线站收集 X-射线衍射数据,使用 HKL2000 软件对数据进行前期处理。以 *Thermotoga neapolitana* 来源的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶 TnBgl3B(PDB:2X40)为模板^[2],利用 Phenix 软件包进行分子置换^[3],得到 PbBglu3 初始结构。经 Phenix. autobuilding 重建,多轮 COOT^[4] 手工调整与 Phenix. Refine 精修完善后获得最终的结构模型。

2 结果与讨论

2.1 β -葡萄糖苷酶基因的克隆和表达结果分析

利用引物 BgluF 和 BgluR,扩增得到一条 2799 bp 的片段。该基因编码 932 个氨基酸,预测无信号肽序列及理论分子量和等电点分别为 102.2 kDa 和 5.02。经 NCBI BLAST 比对分析,该酶的氨基酸序列与来源于坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)的 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶(AJK27091.1)相似性最高,为 59%。结构域分析显示,该 PbBglu3 含有 GH3 家族的特征结构域、一

个FnIII型纤连蛋白结构域和一个CBM6结构域。

将该基因插入到 pET-28a(+) 载体 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点之间,构建重组表达载体 pET28-PbBglu3。重组载体转化入 *E. coli* BL21(DE3) 进行 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 检测能够可溶性表达。

2.2 PbBglu3 的纯化结果分析

粗酶液经亲和层析得到电泳级纯酶,PbBglu3 纯化结果见表1。由表1可知,PbBglu3 纯化了15.9倍,回收率为57%,比酶活力为119.6 U/mg。该酶

的比酶活力高于来源于 *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810^[5] (4.60 U/mg)、*Aspergillus terreus*^[6] (42.37 U/mg)、*Aspergillus fumigatus* Z5^[7] (101.7 U/mg) 和 *Myceliophthora thermophila*^[8] (97.7 U/mg) 的 β -葡萄糖苷酶的比酶活力,但低于来源于 *Thermotoga naphthophila* RUK-10^[9] (2 851.7 U/mg)、*Talaromyces leycettanus* JCM 12802^[10] (905 U/mg)、*Penicillium purpurogenum* KJS506^[11] (857 U/mg) 和 *Neurospora crassa*^[12] (143.27 U/mg) 的 β -葡萄糖苷酶的比酶活力。

表1 PbBglu3 纯化结果

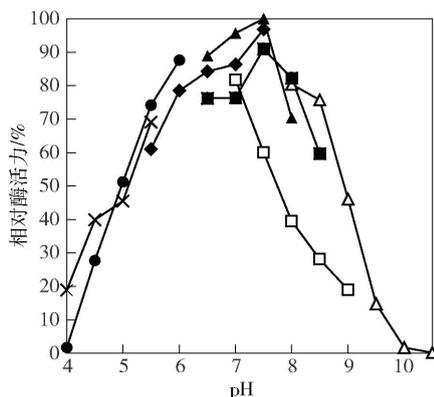
Tab.1 Purification summary of PbBglu3

纯化步骤	总酶活力/U	m(总蛋白)/mg	比酶活力/(U·mg ⁻¹)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	1 373.8	182.8	7.5	1	100
Ni-IDA	789.4	6.6	119.6	15.9	57

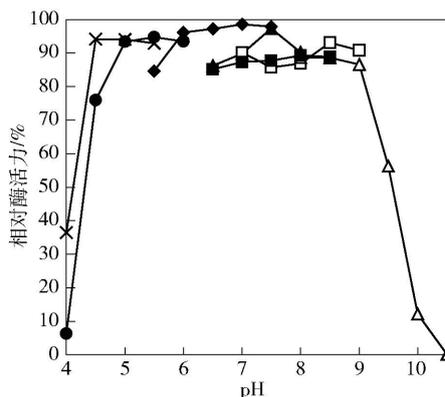
2.3 pH 值对 PbBglu3 酶活力和稳定性的影响

pH 值对 PbBglu3 的酶活力和稳定性影响结果见图1。图1(a)中,PbBglu3 的最适 pH 值为7.5,在 pH 值4.5~9.0 范围内处理30 min,可以保持80%以上的酶活力(图1(b)),表现出良好的 pH 值稳定

性。大多 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 值偏酸性,而本研究中 β -葡萄糖苷酶与 *Paenibacillus* sp. C7^[13] 和 *Bacillus* sp.^[14] 的 β -葡萄糖苷酶特性相似,具有偏碱性的最适 pH 值。这一特性使其在洗涤剂、化妆品和酿酒等行业中具有潜在应用价值。



(a) pH 值对酶活力的影响



(b) pH 值对酶的稳定性的影响

柠檬酸缓冲液(●),乙酸缓冲液(×),Bis-Tris 缓冲液(◆),MOPS 缓冲液(▲),Tris-HCl 缓冲液(□),HEPES 缓冲液(■),CHES 缓冲液(△)。

图1 pH 值与 PbBglu3 的酶活力及稳定性的关系

Fig.1 Effect of pH on activity and stability of PbBglu3

2.4 温度对 PbBglu3 酶活力和稳定性的影响

温度对 PbBglu3 酶活力和稳定性影响结果见图2。图2(a)中,PbBglu3 的最适温度为50℃。在温度不高于50℃条件下均很稳定,残余酶活在95%以上,当温度高于50℃时酶活力迅速下降(图2(b))。大多 β -葡萄糖苷酶的最适温度和温度稳定性普遍在40~100℃。该酶的最适温度与来源于

Mucor circinelloides NBRC 4572 的 β -葡萄糖苷酶(50℃)一致^[15],但是显著低于 *Thermofilum pendens* β -葡萄糖苷酶(90℃)^[16]。PbBglu3 的最适温度处于中等水平,温度稳定性并不突出。

2.5 PbBglu3 的底物特异性分析

PbBglu3 底物特异性分析结果见表2。表2表明,对于 pNP 糖苷类底物,PbBglu3 对 pNP- β -D-

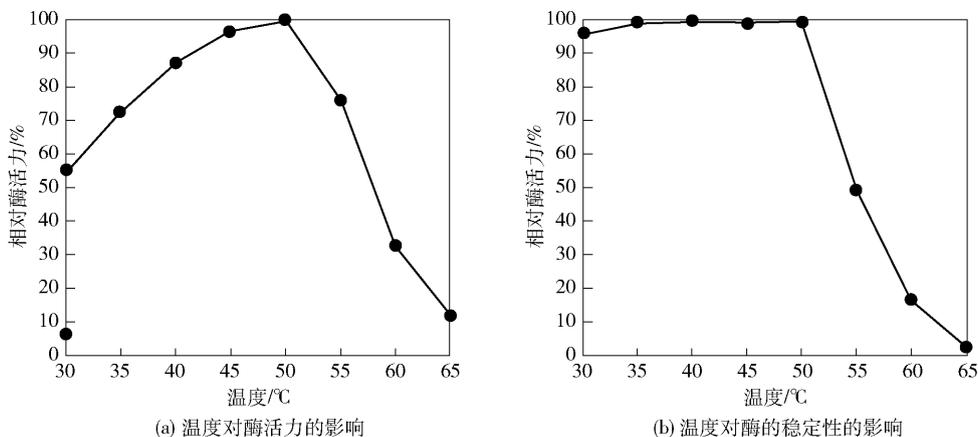


图2 温度与PbBglu3的酶活力及稳定性的关系

Fig. 2 Effect of temperature on activity and stability of PbBglu3

表2 PbBglu3的底物特异性

Tab. 2 Substrate specificity of PbBglu3

底物	比酶活力/ (U·mg ⁻¹)	相对酶 活力/%
糖苷类化合物		
pNP-β-D-glucopyranoside	119.6	100
pNP-α-D-glucopyranoside	ND	ND
pNP-β-D-galactopyranoside	ND	ND
pNP-α-D-galactopyranoside	ND	ND
pNP-β-D-xylopyranoside	2.3	1.9
糖苷和低聚糖		
Cellobiose(纤维二糖)	8.8	7.6
Cellotriose(纤维三糖)	9.0	7.7
Cellotetraose(纤维四糖)	21.9	18.9
Laminaribiose(昆布二糖)	3.9	3.3
Laminaritriose(昆布三糖)	16.2	13.9
Gentiobiose(龙胆二糖)	10.5	10.5
Sophorose(槐糖)	4.6	4.0
Amygdalin(苦杏仁苷)	7.4	6.2
Salicin(水杨苷)	6.8	5.7
Lactose(乳糖)	ND	ND
聚糖		
Laminarin(昆布多糖)	8.0	6.9
Barley glucan(大麦葡聚糖)	4.7	4.0
Lechnin(地衣多糖)	4.8	4.0
Xylan(木聚糖)	ND	ND
Chitin(几丁质)	ND	ND
Carboxymethylcellulose sodium(羧甲基纤维素钠)	ND	ND
Avicel(结晶纤维素)	ND	ND

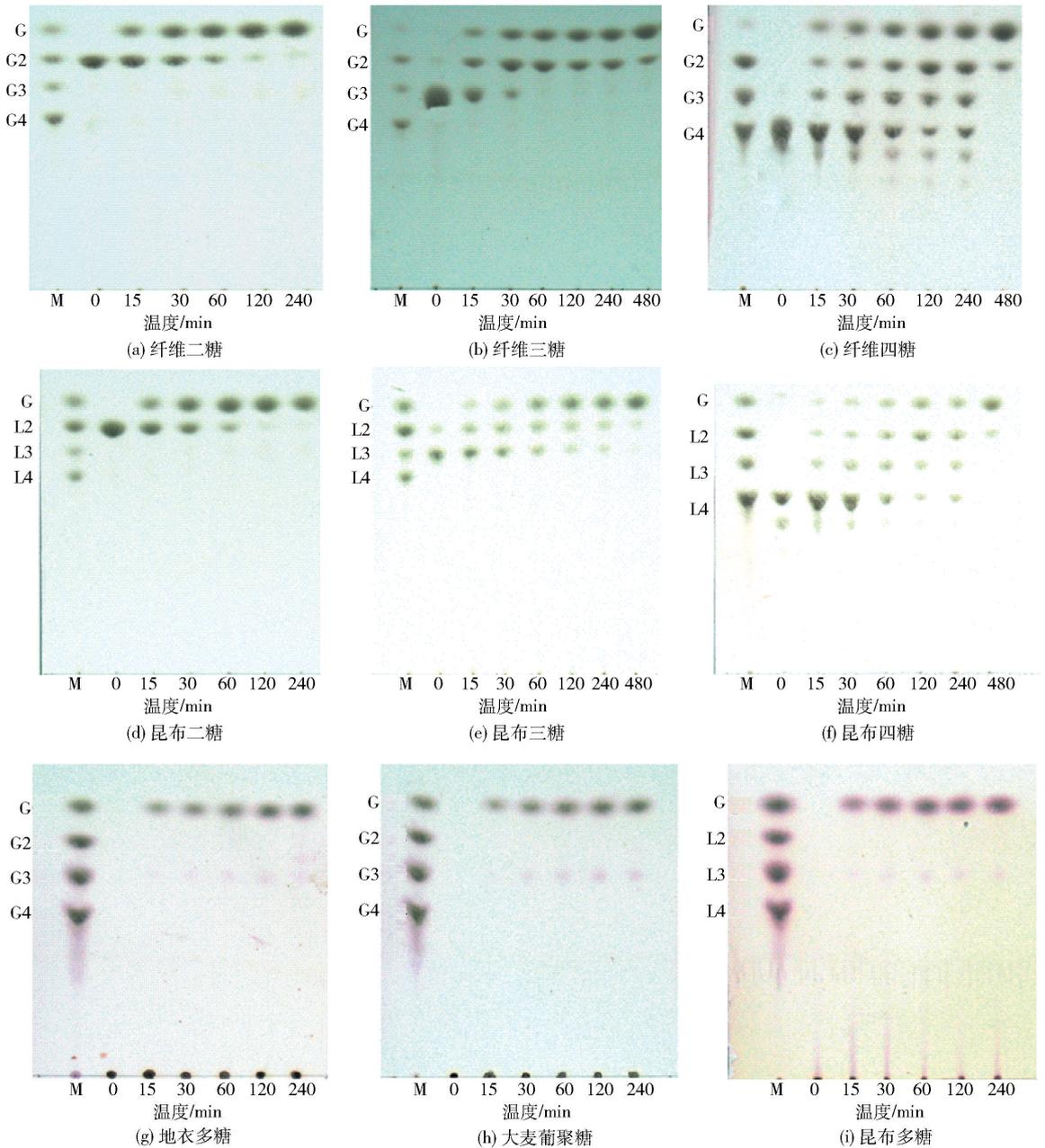
glucopyranoside 表现出很高的活性,同时对 pNP-β-D-xylopyranoside 有较弱的水解活性,但对 pNP-α-D-glucopyranoside、pNP-α-D-galactopyranoside 和 pNP-β-D-galactopyranoside 没有水解活性。对于低聚糖及糖苷类化合物底物,该酶对纤维二糖(β-1,4-糖苷键连接)、纤维三糖(β-1,4-糖苷键连接)、纤维四糖(β-1,4-糖苷键连接)、昆布二糖(β-1,3-糖苷键连接)、昆布三糖(β-1,3-糖苷键连接)、龙胆二糖(β-1,6-糖苷键连接)、槐糖(β-1,2-糖苷键连接)、苦杏仁苷(β-1,6-糖苷键连接)和水杨苷(β-1,4-糖苷键连接)均具有活性,但没有乳糖水解活性。对于聚糖类底物,该酶对昆布多糖、大麦葡聚糖和地衣多糖均具有一定的水解活性,对木聚糖、几丁质、羧甲基纤维素钠和结晶纤维素没有水解活性。大麦葡聚糖是由纤维三糖或纤维四糖通过 β-1,3-糖苷键连接成的分支多糖,地衣多糖是由纤维三糖分子以 β-1,3-糖苷键连接成的直链多糖,而昆布多糖则是通过 β-1,3 和 β-1,6-糖苷键连接形成的分支多糖。由此可知,PbBglu3 能够作用于 β-1,2、β-1,3、β-1,4 和 β-1,6 等多种糖苷键,因此 PbBglu3 属于第三类底物特异性较宽的 β-葡萄糖苷酶。

2.6 PbBglu3的水解特性分析

PbBglu3 水解特性分析结果见图3。图3表明,PbBglu3 对纤维寡糖(聚合度2-4)、昆布寡糖(聚合度2-4)、地衣多糖、大麦葡聚糖和昆布多糖的最终产物都是葡萄糖。PbBglu3 水解多糖的过程中只有单糖生成,说明其具有外切 β-1,3-葡聚糖酶和 β-1,3-1,4-葡聚糖酶的活性。

2.7 PbBglu3的晶体结构分析

PbBglu3 晶体结构解析结果见图4。PbBglu3 晶



M: 标准; G: 葡萄糖; G₂: 纤维二糖; G₃: 纤维三糖; G₄: 纤维四糖; L₂: 昆布二糖; L₃: 昆布三糖; L₄: 昆布四糖。

图3 PbBglu3 水解产物分析

Fig. 3 TLC analysis of hydrolysis products by PbBglu3

体空间群为 $P2_12_12_1$, 衍射数据最终分辨率为 1.73 Å。PbBglu3 的总体结构如图 4(a)。图 4(a) 中, 每个不对称单元 (ASU) 中含有一个蛋白分子, 呈现 GH3 家族典型的多结构域结构, 类似 $(\alpha/\beta)_5$ 的三明治结构域、Fn III 结构域、 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶结构域和 CBM6 结构域。该酶的结合位点位于折叠桶结构域和三明治结构域的中间, 其催化氨基酸 E168 和 D747 分别位于这两个结构域。该酶形成一个催化口袋 (图 4(b)), 能够特异地结合糖链的非还原

端。与 GH3 家族的另一个结构已经解析的 β -葡萄糖苷酶 TnBgl3B^[2] 不同的是, 该酶的 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶结构域被移到了 C 端, 紧接着 CBM6 结构域 (图 4(c))。该 CBM6 结构域的存在对底物的结合具有一定的影响, 它们的空间相对位置依然保守, 只是形成了一段较大的 linker, 由两个反向平行的 β -折叠卷构成 (图 4(d))。相对于其他 β -葡萄糖苷酶较短的 linker, 该酶在此对应区域具有较大的柔性, 有利于酶催化过程中 $(\alpha/\beta)_5$ 的三明治结构域和 Fn III 结构域之间发生

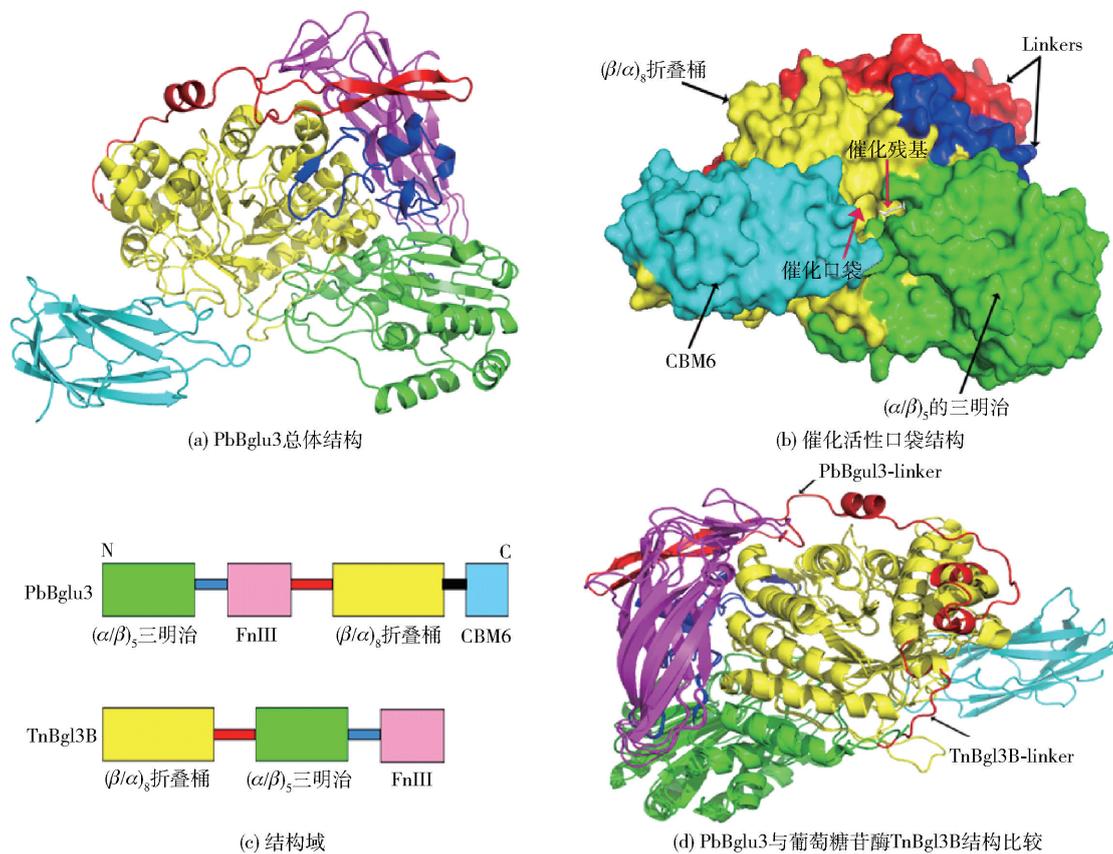


图4 PbBglu3 的总体结构、结构域分析及其比较

Fig. 4 Analysis of overall structure and structure domain of PbBglu3, and structure comparison with other β -glucosidase

移动,使酶能够与底物更好结合在一起。分析发现,芳香氨基酸残基 Trp748 侧链提供-1 位结合位点,Trp749 提供+1 位结合位点,Trp131 提供+2 位结合位点,这些位点的存在形成了一个小的口袋和疏水环境,不利于转糖苷反应的进行,这在结构上也解释了 PbBglu3 转糖苷作用弱的原因。

3 结论

从巴伦葛兹类芽孢杆菌 CAU904 中克隆表达得到一个 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶(PbBglu3),该酶与来源于 *Vibrio campbellii* GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的同源性最高,为 59%。PbBglu3 的最适 pH 值为 7.5,最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。该酶具有较宽的底物特异性范围,能够水解 β -1,2- β -1,3- β -1,4- β -1,6-糖苷键等多种类型糖苷键。PbBglu3 还能够水解昆布多糖、大麦 β -葡聚糖和地衣多糖,产物均为 β -D-葡萄糖。通过 X-射线晶体衍射法解析了 PbBglu3 的晶体结构,结构信息显示其含有 4 个结构域,同时解释了该酶转糖苷作用弱的结构基础。

参考文献:

- [1] SANGRILA S, MAITI T K. Cellulase production by bacteria; a review [J]. *British Microbiology Research Journal*, 2013, 3(3): 235–258.
- [2] POZZO T, PASTEN J L, KARLSSON E N, et al. Structural and functional analyses of β -glucosidase 3B from *thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(3): 724–739.
- [3] ADAMS P D, AFONINE P V, BUNKOCZI G, et al. Phenix: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution [J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2010, 66(2): 213–221.
- [4] EMSLEY P, COWTAN K. Coot: model-building tools for molecular graphics [J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2004, 60(112): 2126–2132.
- [5] ASHA P, JOSE D, SINGH I S B. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose [J]. *Bioresour Technology*, 2016, 213: 245–248.
- [6] YAN F Y, XIA W, ZHANG X X, et al. Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its applica-

- tion in the hydrolysis of soybean isoflavones [J]. J Zhejiang University (Science B), 2016, 17(6):455–464.
- [7] LIU D Y, ZHANG R, YANG X, et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33 [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 1–15.
- [8] ZHAO J, GUO C, TIAN C, et al. Heterologous expression and characterization of a GH3 β -glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(2):511–527.
- [9] KONG F, YANG J, ZHEN Z, et al. Gene cloning and molecular characterization of a β -glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10: an effective tool for synthesis of galacto-oligosaccharide and alkyl galactopyranosides [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2015, 31(5):774–780.
- [10] XIA W, XU X, QIAN L, et al. Engineering a highly active thermophilic β -glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 1–12.
- [11] GAO L, GAO F, ZHANG D, et al. Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 658–661.
- [12] PEI X, ZHAO J, CAI P, et al. Heterologous expression of a GH3 β -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides [J]. Protein Expression and Purification, 2016, 119: 75–84.
- [13] SHIPKOWSKI S, BRENCHLEY J E. Characterization of an unusual cold-active β -glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolases from the *Psychrophilic* isolate *Paenibacillus* sp. strain C7 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4225–4232.
- [14] 李松, 杨倩, 范李龙, 等. 碱性 β -葡萄糖苷酶产生菌株的筛选、鉴定及部分酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 180–184.
- [15] KATO Y, NOMURA T, OGITA S, et al. Two new β -glucosidases from ethanol-fermenting fungus *Mucor Circinelloides* NBRC 4572: enzyme purification, functional characterization, and molecular cloning of the gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 10045–10056.
- [16] LI D, LI X, DANG W, et al. Characterization and application of an acidophilic and thermostable β -glucosidase from *Thermofilum pendens* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(5):490–496.

Expression, Biochemical Characterization and Structure Resolution of β -Glucosidase from *Paenibacillus barengoltzii*

HUANG Ping, WU Shiwang, JIANG Zhengqiang, YANG Shaoqing*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A β -glucosidase gene from *Paenibacillus barengoltzii* CAU904 was cloned and heterologously expressed in *E. coli*. The recombinant enzyme was purified and biochemically characterized, and its crystal structure was further resolved. The enzyme had the highest activity at 50 °C and pH 7.5. It exhibited broad substrate specificity on various substrates, including laminarin, barley β -glucan, lichenan, et al. (containing β -1,2, β -1,3, β -1,4 and β -1,6 linkages). Crystal structure analysis revealed that the enzyme exhibited typical glycoside hydrolyase family 3 enzymes, having multiple domain structures. The catalytic packet of the enzyme was composed by a $(\alpha/\beta)_5$ sandwich domain and a $(\beta/\alpha)_8$ folding barrel domain linked by a loop region. The side chain aromatic amino acids Trp748 and Trp749 were functioned as -1 and +1 binding site, respectively, while Trp131 was functioned as +2 site. These aromatic amino acids formed a narrow pocked and a hydrophobic environment, which could diminish its transglycosylation activity.

Keywords: *Paenibacillus barengoltzii*; β -glucosidase; heterologous expression; biochemical characterization; crystal structure

(责任编辑:叶红波)