



# 湖羊瘤胃微生物 GH9 家族葡聚糖酶基因 *IDSGLUC9-25* 的表达与功能表征

徐晓锋<sup>1,2,3</sup>, 韩俊彦<sup>1,2,3</sup>, 丁钰杰<sup>1</sup>, 廖静<sup>1</sup>, 高德英<sup>2</sup>, 张骥<sup>3</sup>, 王佳堃<sup>2</sup>, 尹尚军<sup>1</sup>,  
王谦<sup>2\*</sup>, 徐洁皓<sup>1\*</sup>

- 1 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100
- 2 浙江大学动物科学学院 奶业科学研究所, 浙江 杭州 310058
- 3 杭州云心质力生物科技有限公司, 浙江 杭州 310018

徐晓锋, 韩俊彦, 丁钰杰, 廖静, 高德英, 张骥, 王佳堃, 尹尚军, 王谦, 徐洁皓. 湖羊瘤胃微生物 GH9 家族葡聚糖酶基因 *IDSGLUC9-25* 的表达与功能表征[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 755-766.

XU Xiaofeng, HAN Junyan, DING Yujie, LIAO Jing, GAO Deying, ZHANG Ji, WANG Jiakun, YIN Shangjun, WANG Qian, XU Jiehao. Heterologous expression and characterization of a GH9 glucanase gene *IDSGLUC9-25* from rumen microbiota in Hu sheep[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 755-766.

**摘要:**【目的】葡聚糖酶是饲用添加剂的重要成分, 本研究旨在从湖羊消化道微生物中挖掘性质优良的 GH9 家族葡聚糖酶基因, 用于研发新型饲用酶制剂。【方法】从湖羊瘤胃微生物 cDNA 中扩增 *IDSGLUC9-25* 基因, 在大肠杆菌中进行异源表达, 对重组蛋白进行诱导表达和纯化, 研究重组蛋白的酶学性质和底物水解模式。【结果】*IDSGLUC9-25* 基因编码 527 个氨基酸, 包含一个 CeID<sub>N</sub> 结构和一个 GH9 家族催化结构域; 重组蛋白 rIDSGLUC9-25 分子量约为 62.7 kDa, 最适反应温度和 pH 分别为 40 °C 和 6.0, 在 30–50 °C 下活性较高, 在 pH 4.0–8.0 范围内能够保持较高的稳定性, 经 pH 4.0–8.0 缓冲液处理 1 h 后残余活性均大于 90%; 底物谱分析表明, rIDSGLUC9-25 能催化大麦 β-葡聚糖、苔藓地衣多糖、魔芋胶和木葡聚糖, 比活性分别为 (443.55±24.48)、(65.56±5.98)、(122.37±2.85) 和 (159.16±7.73) U/mg; 利用薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析水解产物发现, rIDSGLUC9-25 降解大麦葡聚糖主要生成纤维三糖 (占总还原糖 64.19%±1.19%) 和纤维四糖 (占总还原糖 26.24%±0.12%), 催化地衣多糖主要生成纤维三糖 (占总还原糖 78.46%±0.89%)。【结

资助项目: 浙江省研发攻关计划(2022C02043); 浙江省“生物工程”一流学科自设课题(ZS2023008)

This work was supported by the Research and Development Research Program of Zhejiang Province (2022C02043) and the Zhejiang Provincial Top Discipline of Biological Engineering (ZS2023008).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Jiehao, xujiehao@zju.edu.cn; WANG Qian, Emirata14@zju.edu.cn

Received: 2023-07-31; Accepted: 2023-10-13; Published online: 2023-10-20

论】本研究报道了一种来自密螺旋体属细菌的内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶 *IDSGLUC9-25* (EC 3.2.1.4), 能高效催化多糖底物生成纤维三糖和纤维四糖, 为研发饲用酶制剂和制备低聚寡糖建立基础。

关键词: 湖羊; 消化道微生物; 葡聚糖酶; *IDSGLUC9-25*; 纤维寡糖

## Heterologous expression and characterization of a GH9 glucanase gene *IDSGLUC9-25* from rumen microbiota in Hu sheep

XU Xiaofeng<sup>1,2,3</sup>, HAN Junyan<sup>1,2,3</sup>, DING Yujie<sup>1</sup>, LIAO Jing<sup>1</sup>, GAO Deying<sup>2</sup>, ZHANG Ji<sup>3</sup>, WANG Jiakun<sup>2</sup>, YIN Shangjun<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>2\*</sup>, XU Jiehao<sup>1\*</sup>

1 College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

2 Institute of Dairy Science, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3 Start Bioservices Co., Ltd., Hangzhou 310018, Zhejiang, China

**Abstract: [Objective]** Glucanases serve as one of the main components in feed additives. This study identified and characterized a novel GH9 glucanase gene derived from rumen microbiota in herbivores, aiming to provide a reference for the research and development of feed enzymes. **[Methods]** We obtained the *IDSGLUC9-25* gene from the rumen fluid cDNA of Hu sheep and heterologously expressed it in *Escherichia coli*. The recombinant protein was induced for expression by isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, purified, and then subjected to functional characterization. **[Results]** *IDSGLUC9-25* encoded a protein consisting of 527 amino acid residues, which included a CelD\_N domain and a GH9 family catalytic domain. The recombinant r*IDSGLUC9-25* protein exhibited a molecular weight of approximately 62.7 kDa and the highest enzymatic activity at 40 °C and pH 6.0. The enzyme displayed robust catalytic activity within the temperature range of 30–50 °C. After preincubation at pH 4.0–8.0 for 1 h, r*IDSGLUC9-25* retained the relative activity over 90%. The substrate spectrum analysis revealed that r*IDSGLUC9-25* exhibited specific activities against barley  $\beta$ -glucan, moss lichenan, konjac gum, and xyloglucan, with the activities of (443.55±24.48), (65.56±5.98), (122.37±2.85), and (159.16±7.73) U/mg, respectively. The hydrolysis assay showed that r*IDSGLUC9-25* primarily catalyzed the hydrolysis of  $\beta$ -glucan into cellotriose (representing 64.19%±1.19% of total reducing sugars) and cellotetraose (representing 26.24%±0.12% of total reducing sugars). Additionally, the enzyme predominantly generated cellotriose from the hydrolysis of lichenan (representing 78.46%±0.89% of total reducing sugars). **[Conclusion]** This study characterizes *IDSGLUC9-25*, an endo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) derived from *Treponema* sp. The enzyme exhibited robust activity in the conversion of polysaccharides into cellotriose and cellotetraose, establishing a foundation for the development of feed enzymes and functional oligosaccharides preparation.

**Keywords:** Hu sheep; gastrointestinal microbiota; glucanase; *IDSGLUC9-25*; cellooligosaccharides

纤维素、半纤维素等非淀粉多糖(non-starch polysaccharides, NSPs)是谷物饲料中重要的抗营养因子。其中  $\beta$ -葡聚糖是半纤维素的主要成分之一。饲料中  $\beta$ -葡聚糖溶解后会变得黏稠, 形成网状结构, 使得消化道中的营养素被这种结构所“捕获”, 从而减少了其与消化酶之间的接触, 影响动物对饲料的消化吸收<sup>[1]</sup>。分析其化学成分可知,  $\beta$ -葡聚糖是由  $\beta$ -D-葡萄糖残基通过  $\beta$ -1,3 和  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成的线性多糖。饲料中添加  $\beta$ -葡聚糖酶等碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes)能有效消除 NSPs 的抗营养作用; 同时, 反应生成的纤维寡糖能促进乳酸菌、双歧杆菌等益生菌增殖, 益生菌发酵后能释放大量短链脂肪酸降低肠道内 pH 值, 从而抑制致病菌生长, 维持机体肠道微生态稳定<sup>[2]</sup>。

$\beta$ -葡聚糖酶是指一类能够裂解葡聚糖的  $\beta$ -1,3、 $\beta$ -1,4 或  $\beta$ -1,6 糖苷键产生纤维寡糖和葡萄糖的糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)<sup>[3]</sup>, 包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和葡萄糖苷酶, 主要分布在 GH5、GH8、GH9、GH16 和 GH55 等家族<sup>[4]</sup>。根据底物类型和水解方式差异<sup>[5]</sup>, 内切葡聚糖酶可进一步分为内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(endo- $\beta$ -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4)、内切- $\beta$ -1,3(4)-葡聚糖酶[endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase, EC 3.2.1.6]、内切- $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(endo- $\beta$ -1,3-glucanase, EC 3.2.1.39)、内切- $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶/地衣多糖酶(endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase/lichenase, EC 3.2.1.73)和木葡聚糖酶(xyloglucanase, EC 3.2.1.151)等。

牛、羊、骆驼等反刍动物的消化道被认为含有丰富的 CAZymes<sup>[6-7]</sup>。然而由于瘤胃环境严格厌氧且存在多种消化液等复杂条件, 其中绝大多数瘤胃微生物仍难以纯培养。随着深度测序和多组学技术的快速发展, 基于目标 CAZymes 的基因序列来筛选获得新型酶制剂已取得较大

进展<sup>[8-10]</sup>。本课题组前期采用宏基因组学、宏转录组学等多组学分析技术获取了大量来自湖羊瘤胃微生物的 CAZymes 基因序列, 其中 238 万多个单基因(unigenes)中 2.65%为糖苷水解酶, 与纤维素降解相关的功能基因主要分布于 GH3、GH5 和 GH9 家族<sup>[11]</sup>。目前, 有关湖羊消化道微生物来源的葡聚糖酶已开展一系列功能表征, 其中大部分为 GH5 家族葡聚糖酶<sup>[12-13]</sup>。不同于 GH5 家族的“保留型(retaining)”催化机制, GH9 家族葡聚糖酶采用“反转型(inverting)”方式催化多聚糖底物<sup>[14]</sup>, 表征 GH9 家族功能基因有望获得性质优良的葡聚糖酶。因此, 本研究从湖羊瘤胃微生物中克隆获得一个 GH9 家族葡聚糖酶基因 *IDSGLUC9-25*, 并在大肠杆菌中进行异源表达, 研究重组蛋白的酶学性质和底物水解模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

湖羊瘤胃微生物总 cDNA<sup>[11]</sup>、表达质粒 pET-28a(+)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3), 均为本实验室保存; 多糖和纤维寡糖购自 Megazyme 公司; Super Pfx DNA 聚合酶购自康为世纪生物科技(北京)有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 蛋白 Marker、6×His Tagged Ni-NTA agarose、卡那霉素(kanamycin, Kan)和异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; ClonExpress® II One step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.2 重组菌株构建

利用 *IDSGLUC9-25* 基因特异性引物对(下划线为表达载体同源臂序列) F (5'-ATGGGT CGCGGATCCGAATTCA-TGAAAGAGTCAGA AATTTT-3')和 R(5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTCTC

GAGTCTTAC-GCGCGCAAGCAGAT-3')，用 Super Pfx DNA 聚合酶以湖羊瘤胃微生物总 cDNA 为模板进行扩增。PCR 产物纯化与经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-28a(+) 混合后，使用 ClonExpress® II One step Cloning Kit 进行同源重组，热激转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞并涂布于含 50 µg/mL Kan 的 LB 平板，37 °C 培养 16–20 h<sup>[12-13]</sup>。使用 T7 引物进行菌落 PCR 扩增，验证完成后提取阳性质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.3 序列分析

利用 ExPasy Compute pI/Mw tool ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 预测蛋白等电点与理论分子量，利用 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 和 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测蛋白信号肽和功能结构域，利用 SWISS-MODEL 对蛋白质三级结构进行同源建模 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)，利用 MEGA 7.0 工具进行系统进化树构建。

### 1.4 重组大肠杆菌的诱导表达与纯化

重组工程菌 BL21(DE3)/pET28a/*IDSGLUC9-25* 以 1% 的接种量加至 500 mL LB 培养基中，37 °C、180 r/min 培养  $OD_{600}$  达到 0.6–1.0，加入 250 µL 1 mol/L IPTG 并置于 16 °C、100 r/min 诱导 16 h。4 °C、5 000×g 离心 10 min 以收集菌体，用 50 mL 1×PBS 缓冲液重悬洗涤菌体后以相同条件再次收集菌体，弃去上清。菌体中加入 50 mL 无菌 1×PBS 缓冲液(其中含有 1 mL Triton X-100) 充分重悬，使用超声破碎仪(苏州珀西瓦尔实验设备有限公司)以 15% 功率，在运行 1.5 s/暂停 6 s 条件下破碎 15 min 获得粗酶液。

将亲和 Ni-NTA agarose 填料以 1:50 (体积比) 与上述粗酶液混合，加入 1 mL 1 mol/L 咪唑，置于冰上并以 100 r/min 振荡孵育 1 h。孵育完成后

将粗酶液缓慢倒入亲和层析柱中并使用磷酸缓冲液(分别含 20、50、250 mmol/L 咪唑)梯度洗脱目标蛋白，并使用 10 kDa Millipore Amicon® Ultra 超滤柱去除目标蛋白中的残余咪唑并浓缩蛋白以获得纯化蛋白。纯化蛋白用于 SDS-PAGE 和底物催化分析。

### 1.5 酶学性质分析

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法测定葡聚糖酶活性<sup>[15]</sup>。采用 Bradford 法测定蛋白浓度<sup>[16]</sup>。1 个酶活力单位(U) 定义为每分钟(min)产生 1 µmol 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶蛋白量。分别配制 10 mg/mL 的大麦 β-葡聚糖、苔藓地衣多糖、罗望子木葡聚糖、魔芋胶、羧甲基纤维素钠、海带多糖、象牙果甘露聚糖和桦木木聚糖底物，取 20 µL 酶液(约 0.4 µg 蛋白)与 50 µL 上述底物混合，在最适条件下反应 15 min 后测定还原糖生成量。以灭活的酶进行底物催化反应作为对照组，试验组和对照组分别设置 4 个重复( $n=4$ )。

#### 1.5.1 最适温度

将 20 µL (约 1 µg 蛋白，下同)酶液与 50 µL 0.5% 葡聚糖底物充分混合，分别在 20–80 °C 下反应 15 min，反应结束后加入 70 µL DNS 溶液于 95 °C 下孵育 10 min，待冷却至室温后使用酶标仪测定  $OD_{540}$ 。在对照组加入 20 µL 失活酶液，其余条件保持一致，设置 4 组平行试验。以最高活性时的温度作为 100%，计算不同温度下的相对活性。

#### 1.5.2 最适 pH

将 20 µL 酶液与 50 µL 分别配制在 pH 2.2–10.0 缓冲液(柠檬酸/磷酸缓冲液 pH 2.2–8.0; Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0–9.0; 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液 pH 9.0–10.0)的 0.5% 葡聚糖底物充分混合，在最适温度下反应 15 min 测定催化活性。以最高活性时的 pH 作为 100% 计算不同 pH 下的相对活性。

### 1.5.3 热稳定性

将酶液在分别置于 30、40、50 °C 下各保温 5、10、15、20、30 和 60 min 后, 将 20  $\mu$ L 酶液与 50  $\mu$ L 最适 pH 0.5% 葡聚糖底物充分混合后, 在最适温度下反应 15 min, 测定催化活性。以未经热处理的酶活性为 100%, 计算各温度下的残余活性。

### 1.5.4 pH 稳定性

将酶液以 1:1 的比例与 pH 值为 2.2–10.0 缓冲液混合, 冰上放置 60 min 后, 将 20  $\mu$ L 酶液与 50  $\mu$ L 最适 pH 0.5% 葡聚糖底物充分混合后, 在最适温度下反应 15 min, 测定催化活性。以未经 pH 缓冲液处理的酶活性为 100%, 计算各 pH 下的残余活性。

## 1.6 水解产物测定

以大麦  $\beta$ -葡聚糖、苔藓地衣多糖为底物, 在 5 mL 底物中分别加入 2 mL 酶液(含有 16.8  $\mu$ g 蛋白)。反应在 37 °C 下进行, 分别在 0、5、10、20、30 min 和 1、3、6、12、24、48 h 间隔取样 600  $\mu$ L 于离心管中, 95 °C 处理 15 min 终止反应。4 °C、10 000 $\times$ g 离心取上清液用于底物水解分析, 设置 3 组平行试验。

采用薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)初步分析 IDSGLOC9-25 水解产物, 取 0.7  $\mu$ L 反应产物与 0.5 mg/mL 标准品混合物[葡萄糖(G1)、纤维二糖(G2)、纤维三糖(G3)、纤维四糖(G4)、纤维五糖(G5)及纤维六糖(G6)]点于玻璃薄层板(glass TLC plate, Merck)上, 反应产物重复上样 12 次, 标准品混合物重复上样 6 次。流动相为正丁醇:乙酸:水(5:2:3, 体积比), 充分展开后取出, 置于通风橱待其完全干燥后均匀喷上显色液(硫酸:乙醇=5:95, 体积比), 待其干燥后 105 °C 显色 10 min, 拍照记录。

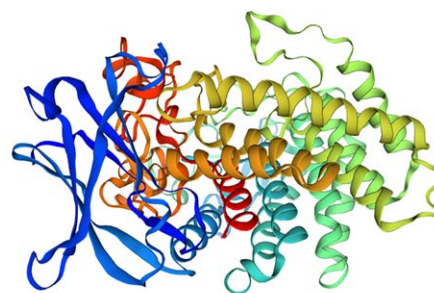
进一步采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析水解产物。利用 Asahipak NH2P-50 4E 色谱柱(Shodex 公司)和

LC-1200 高效液相色谱仪(Agilent 公司), 流动相为 65% 乙腈, 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL/min, 采用 RID-20A 示差折光检测器分析底物水解样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆与序列分析

从湖羊瘤胃微生物 cDNA 中扩增得到一个葡聚糖酶基因 IDSGLOC9-25 (GenBank 登录号: MT832759.1), 测序结果与目标序列一致。其开放阅读框长度为 1 584 bp, 编码 527 个氨基酸(amino acid, aa), 理论分子量为 58.2 kDa。序列分析显示, IDSGLOC9-25 包含一个 CelD\_N 结构域(1–86 aa)和一个 GH9 家族催化结构域(96–523 aa), 未发现信号肽序列。同源建模显示, IDSGLOC9-25 的催化结构域呈现( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> 桶状结构(图 1), 属于 GH9 家族的典型特征<sup>[17]</sup>。序列比对表明, IDSGLOC9-25 与来自密螺旋体属(*Treponema* sp.) GH9 蛋白(GenBank 登录号: MBQ1795108.1)序列相似度最高(81.63%), 推测 IDSGLOC9-25 可能来自密螺旋体属细菌。系统发育进化树表明(图 2), IDSGLOC9-25 被归入 GH9 家族, 与 GH5 家族葡聚糖酶稍远, IDSGLOC9-25 与 MBQ1795108.1、ABB51609.1 和 ACY24809.1 等 GH9 家族蛋白聚成一簇, 相似



IDSGLOC9-25<sub>1</sub> CelD\_N<sub>86</sub> 96 GH9 523 527

图 1 IDSGLOC9-25 蛋白同源建模

Figure 1 Homology modeling of IDSGLOC9-25.

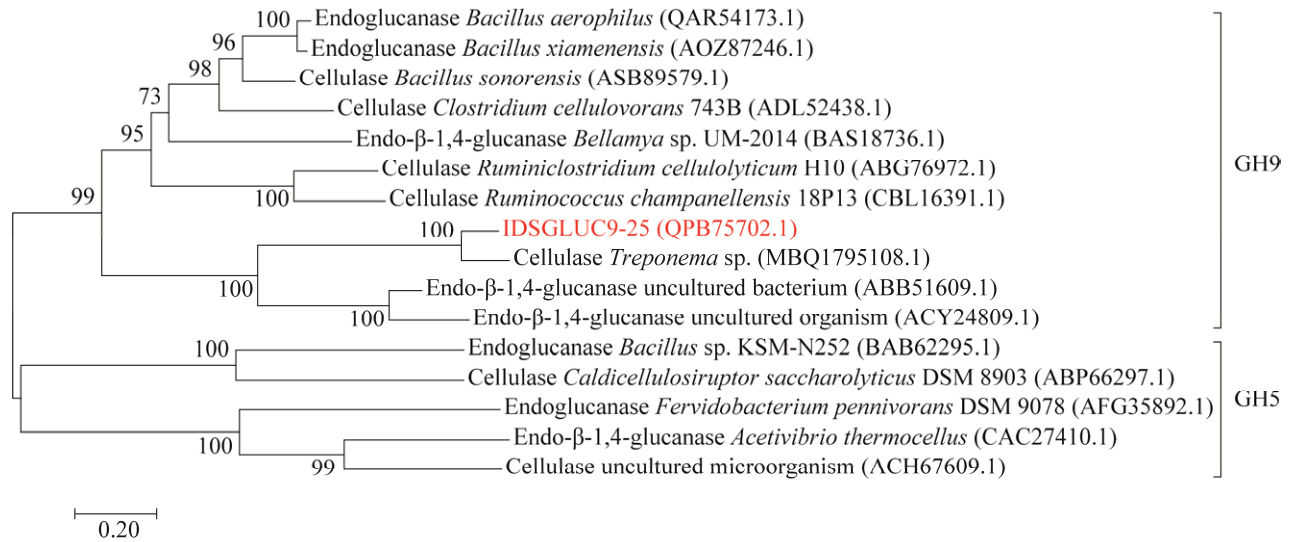


图 2 IDSGLUC9-25 系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of IDSGLUC9-25. Multiple sequence alignment was performed to generate a phylogenetic tree using MEGA 7.0 and the maximum likelihood (ML) statistical method based on the WAG correction model. The tree was drawn to scale (length=0.2), and branch length was measured according to the number of substitutions per site.

性分别为 81.63%、41.37%和 41.23%。其中，MBQ1795108.1 的功能未被报道，ABB51609.1 和 ACY24809.1 均为内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶<sup>[18-19]</sup>，提示 IDSGLUC9-25 的活性可能与这 2 个酶相似。

## 2.2 重组蛋白表达与活性底物谱分析

SDS-PAGE 结果显示，工程菌 BL21/pET28a/IDSGLUC9-25 表达的粗蛋白经亲和层析分析，获得了分子量约为 62.7 kDa 的 rIDSGLUC9-25 重组蛋白(图 3)，这与其理论分子量(约 58.2 kDa)和表达载体序列总和(约 4.5 kDa)相一致。活性底物谱分析显示，rIDSGLUC9-25 能催化大麦  $\beta$ -葡聚糖、苔藓地衣多糖、魔芋胶和罗望子木葡聚糖，其中对大麦  $\beta$ -葡聚糖的催化活性最高，达  $(443.55 \pm 24.48)$  U/mg (表 1)。然而，该蛋白对羧甲基纤维素钠、海带多糖、象牙果甘露聚糖和桦木木聚糖底物无催化活性。由此可见，rIDSGLUC9-25 对主链为  $\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Glc}$  和  $\text{Glc}1\beta \rightarrow 4\text{Glc}$  大麦  $\beta$ -葡聚糖、苔藓地衣多糖、木葡聚糖和魔芋胶具有较高的

催化活性，但对  $\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Glc}$  结构的海带多糖没有活性。此外，rIDSGLUC9-25 对  $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{Man}$

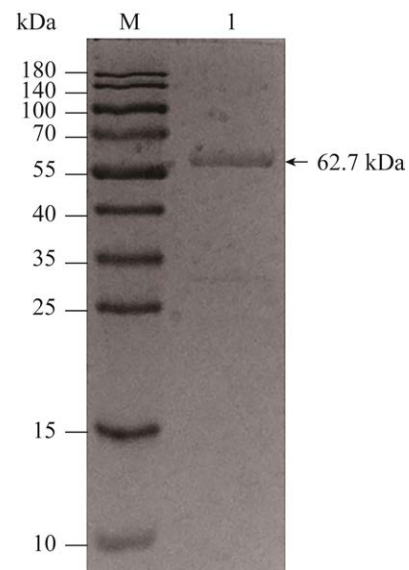
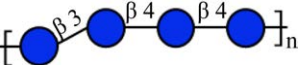
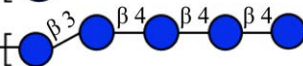
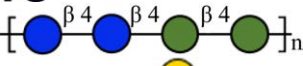
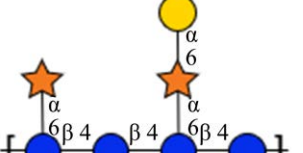
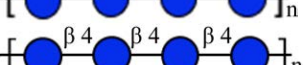
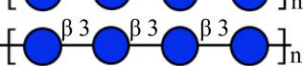
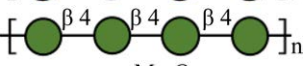
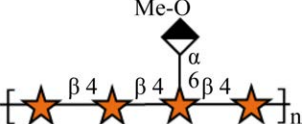


图 3 SDS-PAGE 分析重组蛋白 rIDSGLUC9-25

Figure 3 SDS-PAGE analysis of recombinant rIDSGLUC9-25. Lane M: Protein marker; Lane 1: Purified rIDSGLUC9-25.

表 1 rIDSGLUC9-25 活性底物谱

Table 1 Substrate spectrum of rIDSGLUC9-25

Substrates (10 mg/mL)	Typical structures	Specific activities (U/mg)
Barley $\beta$ -glucan		443.55±24.48
Icelandic moss lichenan		65.56±5.98
Konjac gum		122.37±2.85
Tamarind xyloglucan		159.16±7.73
Carboxyl methyl cellulose		NA
<i>Laminaria digitata</i> laminarin		NA
Ivory nut mannan		NA
Beechwood xylan		NA

●: Glucose; ●: Mannose; ●: Galactose; ★: Xylose; ◆: Glucuronic acid; Me-O: Methyl. Data represent the mean±SD ( $n=4$ ); NA: Not active.

或 Xyl $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Xyl 组成的甘露聚糖或木聚糖也没有降解作用, 提示 rIDSGLUC9-25 是一种特异性催化多聚糖主链的 Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc 糖苷键的糖苷水解酶, 即葡聚糖酶。

### 2.3 rIDSGLUC9-25 的酶学性质分析

酶学性质分析显示, rIDSGLUC9-25 的最适反应温度为 40 °C, 在 30–50 °C 范围内具有较高的催化活性(>70%), 但当温度升高至 60 °C 时, 其催化活性迅速丧失(图 4A)。热稳定性分析显示, rIDSGLUC9-25 在 40 °C 以下较为稳定, 40 °C 处理 1 h 后, 剩余 62.58%±1.10% 的残余活性, 然而在 50 °C 下处理 10 min 后酶活完全消失(图 4B)。rIDSGLUC9-25 的最适反应 pH 为 6.0, 在 pH 5.0–6.0 范围内催化活性较高(>80%) (图 4C)。pH 稳定性结果显示, rIDSGLUC9-25 在 pH 4.0–8.0 范围内能够保持较高的稳定性, 处理

1 h 后残余活性均能保持在 90% 以上(图 4D)。以上结果表明, rIDSGLUC9-25 是一种弱酸性中温酶。

### 2.4 rIDSGLUC9-25 水解产物分析

TLC 结果表明, 反应初期 rIDSGLUC9-25 降解大麦葡聚糖生成聚合度较高的水解产物, 反应 1 h 后产物中检测到少量纤维三糖(G3)和纤维四糖(G4); 随着反应继续进行, rIDSGLUC9-25 进一步催化聚合度较高的寡糖生成小分子产物, 且产物中 G3 和 G4 大量累积(图 5A)。rIDSGLUC9-25 水解苔藓地衣多糖的过程与大麦葡聚糖相类似, 区别在于反应终产物主要为 G3 (图 5B)。以木葡聚糖和魔芋胶为底物时, rIDSGLUC9-25 处理 30 min 后几乎检测不到降解产物; 反应 1–48 h 后, 高聚合度寡糖含量持续积累, 反应终产物主要为聚合度 $\geq$ 6 的寡糖(图 5C、5D)。

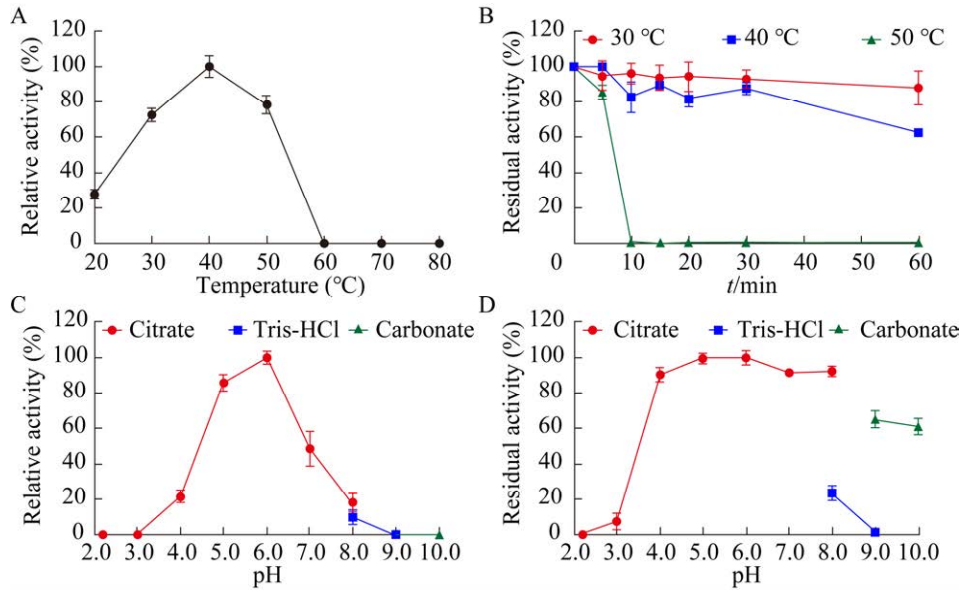


图 4 rIDSGLUC9-25 的酶学性质

Figure 4 Enzymatic properties of rIDSGLUC9-25. A: The optimal temperature. B: Thermostability. C: The optimal pH. D: pH stability. Data represent the mean $\pm$ SD ( $n=4$ ).

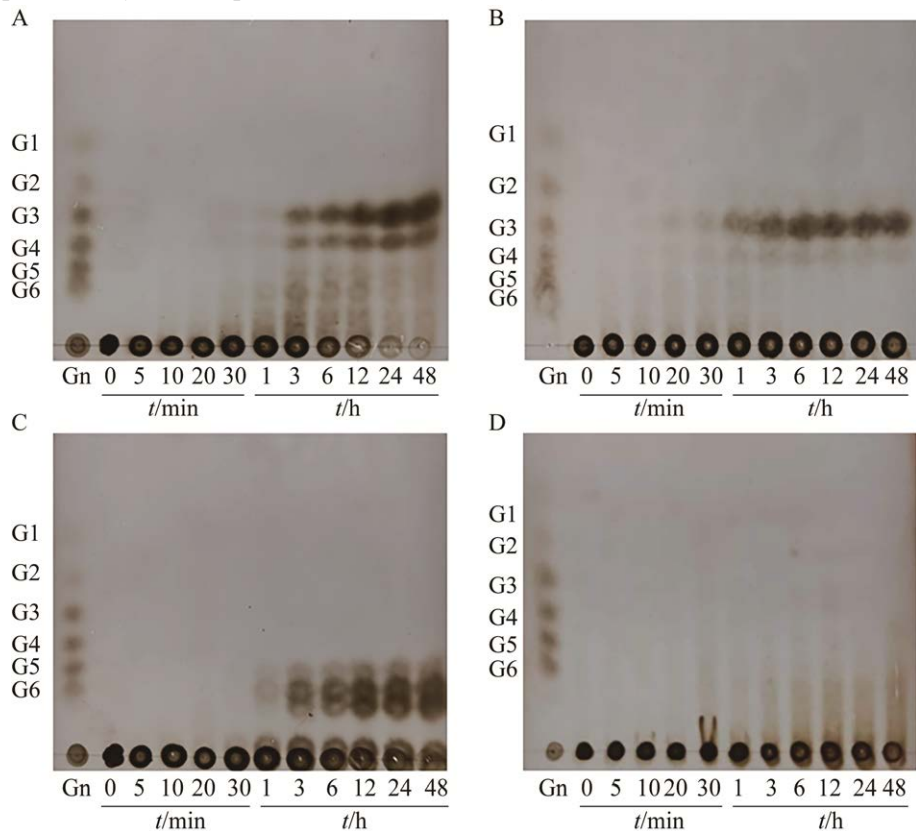


图 5 TLC 分析 rIDSGLUC9-25 水解产物

Figure 5 Analysis of hydrolytic products released by rIDSGLUC9-25 using TLC. A: Barley  $\beta$ -glucan. B: Icelandic moss lichenan. C: Xyloglucan. D: Konjac gum. Gn: Cellooligosaccharides with different degree of polymerization ( $n=2-6$ ); G1: Glucose; G2: Cellobiose; G3: Cellotriose; G4: Cellotetraose; G5: Cellopentaose; G6: Cellosehexaose.



进一步利用 HPLC 分析底物水解产物得知, rIDSGLUC9-25 快速从葡聚糖中释放 G3 和 G4, 同时生成微量纤维五糖(G5)、纤维二糖(G2)和葡萄糖(G); 催化 24 h 后达到反应平衡点, G3 和 G4 的产量分别为  $(8.72 \pm 0.08)$  mmol/L 和  $(3.57 \pm 0.03)$  mmol/L, 占总还原糖的  $64.19\% \pm 1.19\%$  和  $26.24\% \pm 0.12\%$  (图 6A、6B)。rIDSGLUC9-25 催化地衣多糖主要生成 G3, 同时生成微量的 G4、G2 和 G; 其中, G3 在反应 24 h 后达到平衡值, 含量为  $(3.50 \pm 0.14)$  mmol/L, 占总还原糖的  $78.46\% \pm 0.89\%$ , 然而 G4 在反应 3 h 后即达到平衡, 含量为  $(0.50 \pm 0.09)$  mmol/L, 占总还原糖的  $15.50\% \pm 0.67\%$ , 之后直至反应结束其在体系中的含量趋于稳定(图 6C、6D)。

### 3 讨论与结论

葡聚糖酶能够高效水解葡聚糖类 NSPs, 在饲料、食品和纺织工业等领域具有重要应用价值。葡聚糖酶广泛存在各种微生物中, 目前已从芽孢杆菌属细菌分离出较多编码  $\beta$ -葡聚糖酶基因, 如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)等<sup>[20-24]</sup>。牛、羊等草食动物采食植物性饲料生产优质的肉与奶制品, 主要得益于其消化道微生物具有高效的纤维降解与转化能力。基于多组学分析和筛选技术的快速发展, 研究人员从牛<sup>[25-26]</sup>、羊<sup>[14-15]</sup>等反刍动物消化道微生物中挖掘得到多个

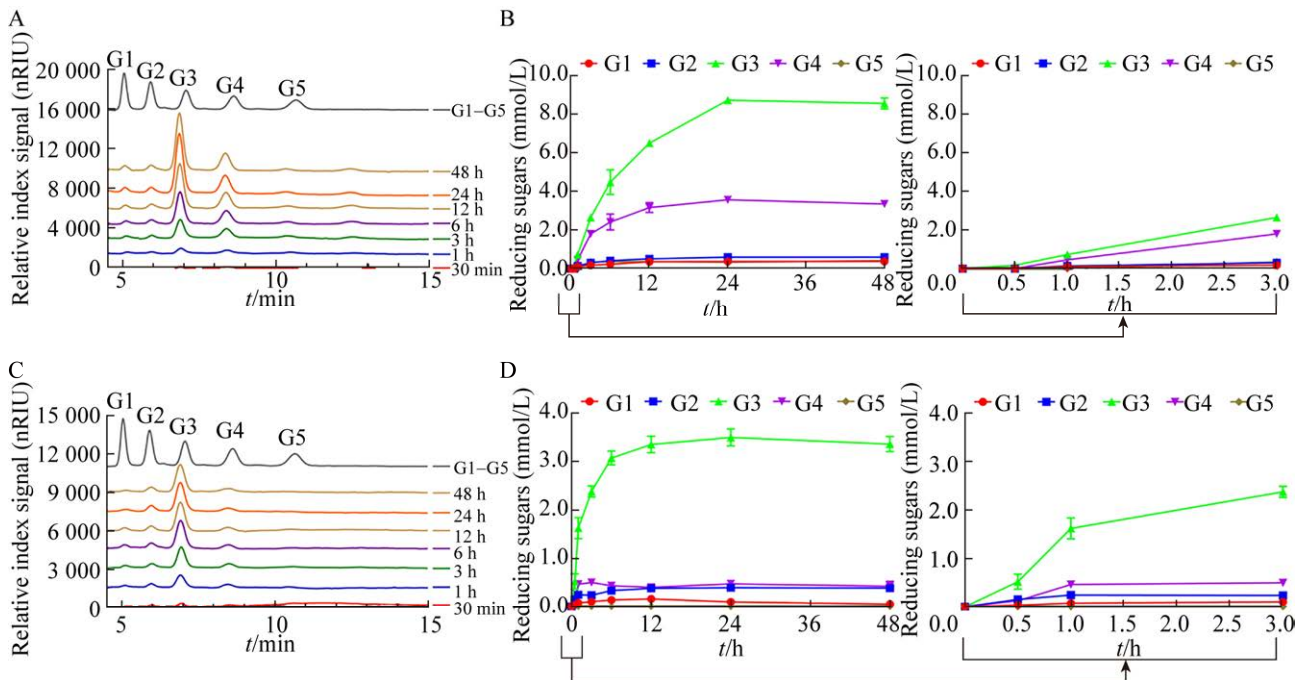


图 6 HPLC 分析 rIDSGLUC9-25 水解产物

Figure 6 Analysis of hydrolytic products released by rIDSGLUC9-25 using HPLC. A: HPLC profiles of hydrolyzed barley  $\beta$ -glucan. B: Reducing sugars pattern of hydrolyzed barley  $\beta$ -glucan. C: HPLC profiles of hydrolyzed icelandic moss lichenan. D: Reducing sugars pattern of hydrolyzed icelandic moss lichenan. Data points from the first 3 h of each hydrolytic reaction are shown separately to provide a clearer representation of this phase. Data represent the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). G1: Glucose; G2: Cellobiose; G3: Cellotriose; G4: Cellotetraose; G5: Cellopentaose.

GH5 葡聚糖酶。本研究从湖羊瘤胃微生物中筛选获得一个葡聚糖酶基因 *IDSGLUC9-25*，该蛋白序列与来自密螺旋体属(*Treponema* sp.) GH9 蛋白(WP\_074929933.1)序列相似度最高，亲缘关系较近(图 2)，推测 *IDSGLUC9-25* 可能来自密螺旋体属细菌。密螺旋体属是一个涉及木质纤维素降解的菌属<sup>[27]</sup>，但目前尚未有密螺旋体属来源的内切葡聚糖酶的相关报道。本研究为密螺旋体属来源葡聚糖酶的性质研究提供参考。

重组葡聚糖酶 r*IDSGLUC9-25* 在中温(30–50 °C)、弱酸性(pH 5.0–6.0)条件下催化活性较高(图 4)。另有报道显示，多个消化道来源的 CAZymes 均表现出在中温、弱酸性中发挥高效催化作用，例如 Cel-1<sup>[25]</sup>、Cel5A-h38、Cel5A-h49<sup>[12]</sup>、CMC-1<sup>[26]</sup>、*IDSGLUC5-26* 及 *IDSGLUC5-37*<sup>[13]</sup> 等葡聚糖酶和 ORF6<sup>[28]</sup>、XYN-LXY<sup>[29]</sup> 等木聚糖酶。这可能是微生物及其活性酶与反刍动物消化道的温度(38–41 °C)和 pH (pH 5.0–7.5)环境相适应的结果。然而，工业生产中某些特定工艺对目标酶蛋白的热稳定性有较高要求，例如饲料制粒环节要求酶分子能耐受 80–110 °C 热处理，保持较高残余催化活性。因此，后续研究需要进一步采用定点突变<sup>[30]</sup>、定向进化<sup>[31]</sup> 或分子环化<sup>[32]</sup> 等酶工程手段提升 r*IDSGLUC9-25* 的热稳定性。

本研究使用的葡聚糖底物主链为纤维三糖(Glcβ1→3Glcβ1→4Glcβ1→4Glcβ1→3Glc)或纤维四糖(Glcβ1→3Glcβ1→4Glcβ1→4Glcβ1→4Glcβ1→3Glc)经 Glcβ1→3Glc 连接而成，而地衣多糖主链为纤维三糖经 Glcβ1→3Glc 连接而成。r*IDSGLUC9-25* 水解这 2 个底物的产物主要生成 G3 和 G4 (图 5、图 6)，这与 Cel5A-h38<sup>[12]</sup> 和 *IDSGLUC5-37*<sup>[13]</sup> 的产物特征相一致，高度符合内切-β-1,3-1,4-葡聚糖酶(EC 3.2.1.73)的水解模式。然而，本研究中的 r*IDSGLUC9-25* 却对主链为 Glcβ1→4Glc 或 Manβ1→4Man 连接的木葡聚

糖和魔芋胶表现出较高催化作用(表 1，图 5)，提示 r*IDSGLUC9-25* 仍属于典型的内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)。多数研究表明，内切葡聚糖酶水解底物生成聚合度为 2–5 的纤维寡糖<sup>[12-13,33-34]</sup>，这些纤维寡糖能有效促进双歧杆菌(*Bifidobacterium* sp.)、乳杆菌(*Lactobacillus* sp.) 等益生菌增殖<sup>[35-36]</sup>。本研究中的 r*IDSGLUC9-25* 能水解葡聚糖和地衣多糖生成 G3，分别占总还原糖的 64.19%±1.19% 和 78.46%±0.89%，显著高于 Cel5A-h49<sup>[12]</sup>、*IDSGLUC5-37*<sup>[13]</sup> 等已报道的葡聚糖酶。同时，反应生成的 G3 持续稳定存在于反应体系中，有利于对其开展进一步的分离纯化。

综上所述，本研究从湖羊密螺旋体属细菌中获得了—个新型葡聚糖酶基因 *IDSGLUC9-25* 并在大肠杆菌中进行异源表达。重组蛋白 r*IDSGLUC9-25* 的最适反应温度和 pH 分别为 40 °C 和 pH 6.0，在 pH 4.0–8.0 内较为稳定。该酶能高效催化大麦 β-葡聚糖生成纤维三糖和纤维四糖，催化地衣多糖生成纤维三糖，同时能催化木葡聚糖和魔芋胶生成聚合度较高的纤维寡糖，是一种内切 β-1,4-葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)，可用于研发饲用酶制剂和功能性寡糖制备。

## 参考文献

- [1] BECKMANN L, SIMON O, VAHJEN W. Isolation and identification of mixed linked β-glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4-β-glucanase activities[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2006, 46(3): 175-185.
- [2] LeBLANC JG, CHAIN F, MARTÍN R, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, COURAU S, LANGELLA P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 1-10.
- [3] LI Z, DONG Y, XIAO X, ZHOU XH. Mechanism by which β-glucanase improves the quality of fermented

- barley flour-based food products[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 126026.
- [4] BERNARD H, GIDEON D. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1997, 7(5): 637-644.
- [5] GOLDENKOVA-PAVLOVA IV, TYURIN AA, MUSTAFAEV ON. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 3951-3965.
- [6] SU MC, HAO ZY, SHI HB, LI TT, WANG HH, LI Q, ZHANG Y, MA YJ. Metagenomic analysis revealed differences in composition and function between liquid-associated and solid-associated microorganisms of sheep rumen[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 851567.
- [7] XUE MY, WU JJ, XIE YY, ZHU SL, ZHONG YF, LIU JX, SUN HZ. Investigation of fiber utilization in the rumen of dairy cows based on metagenome-assembled genomes and single-cell RNA sequencing[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 11.
- [8] TROCHINE A, BELLORA N, NIZOVOY P, DURAN R, GREIF G, de GARCÍA V, BATTHYANY C, ROBELLO C, LIBKIND D. Genomic and proteomic analysis of *Tausonia pullulans* reveals a key role for a GH15 glucoamylase in starch hydrolysis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4655-4667.
- [9] HUANG HQ, ZHENG ZG, ZOU XX, WANG ZX, GAO R, ZHU J, HU YH, BAO SX. Genome analysis of a novel polysaccharide-degrading bacterium *Paenibacillus algicola* and determination of alginate lyases[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 388.
- [10] ARIAENEJAD S, MALEKI M, HOSSEINI E, KAVOUSI K, MOOSAVI-MOVAHEDI AA, SALEKDEH GH. Mining of camel rumen metagenome to identify novel alkali-thermostable xylanase capable of enhancing the recalcitrant lignocellulosic biomass conversion[J]. Bioresource Technology, 2019, 281: 343-350.
- [11] HE B, JIN SW, CAO JW, MI L, WANG JK. Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 1-15.
- [12] CAO JW, DEN Q, GAO DY, HE B, YIN SJ, QIAN LC, WANG JK, WANG Q. A novel bifunctional glucanase exhibiting high production of glucose and cellobiose from rumen bacterium[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 136-145.
- [13] GAO DY, SUN XB, FANG Y, HE B, WANG JH, LIU JX, WANG JK, WANG Q. Heterologous expression and characterization of two novel glucanases derived from sheep rumen microbiota[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(5): 1-14.
- [14] GIDEON D, BERNARD H. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases[J]. Structure, 1995, 3(9): 853-859.
- [15] MICHAEL JB, PETER B, KAISA P. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. Journal of Biotechnology, 1992, 23(3): 257-270.
- [16] MARION MB. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] KHADEMI S, GUARINO LA, WATANABE H, TOKUDA G, MEYER EF. Structure of an endoglucanase from termite, *Nasutitermes takasagoensis*[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2002, 58(4): 653-659.
- [18] PANG H, ZHANG P, DUAN CJ, MO XC, TANG JL, FENG JX. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase[J]. Current Microbiology, 2009, 58(4): 404-408.
- [19] BELOQUI A, NECHITAYLO TY, LÓPEZ-CORTÉS N, GHAZI A, GUAZZARONI ME, POLAINA J, STRITTMATTER AW, REVA O, WALICZEK A, YAKIMOV MM, GOLYSHINA OV, FERRER M, GOLYSHIN PN. Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 5934-5946.
- [20] FURTADO GP, RIBEIRO LF, SANTOS CR, TONOLI CC, de SOUZA AR, OLIVEIRA RR, MURAKAMI MT, WARD RJ. Biochemical and structural characterization of a  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(5): 1202-1206.
- [21] MASILAMANI R, SHARMA OP, MUTHUVEL SK, NATARAJAN S. Cloning, expression of  $\beta$ -1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: *in vitro* and *in silico* analysis[J]. Bioinformation, 2013, 9(19): 958-962.

- [22] TENG D, WANG JH, FAN Y, YANG YL, TIAN ZG, LUO J, YANG GP, ZHANG F. Cloning of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 705-712.
- [23] MAO SR, LU ZX, ZHANG C, LU FX, BIE XM. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(3): 960-975.
- [24] NIU QH, ZHANG G, ZHANG L, MA YL, SHI Q, FU WW. Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 121(5): 503-508.
- [25] DADHEECH T, SHAH R, PANDIT R, HINSU A, CHAUHAN PS, JAKHESARA S, KUNJADIYA A, RANK D, JOSHI C. Cloning, molecular modeling and characterization of acidic cellulase from buffalo rumen and its applicability in saccharification of lignocellulosic biomass[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 73-81.
- [26] WU DW, WANG SM, VINITCHAIKUL P, ZHU YX, ZHOU XY, GU ZB, LENG J, GOU X, DENG MY, SUN LY, MAO HM, YANG SL. Directed modification of a ruminal cellulase gene (*CMC-1*) from a metagenomic library isolated from Yunnan gayal (*Bos frontalis*)[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(5): 1117-1126.
- [27] BANIÉL A, AMATO KR, BEEHNER JC, BERGMAN TJ, MERCER A, PERLMAN RF, PETRULLO L, REITSEMA L, SAMS S, LU A, SNYDER-MACKLER N. Seasonal shifts in the gut microbiome indicate plastic responses to diet in wild geladas[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 1-20.
- [28] WANG JK, SUN ZY, ZHOU Y, WANG Q, YE JA, CHEN ZM, LIU JX. Screening of a xylanase clone from a fosmid library of rumen microbiota in Hu sheep[J]. *Animal Biotechnology*, 2012, 23(3): 156-173.
- [29] WANG Q, LUO Y, HE B, JIANG LS, LIU JX, WANG JK. Characterization of a novel xylanase gene from rumen content of Hu sheep[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(7): 1424-1436.
- [30] HAN C, LIU YF, LIU MY, WANG SQ, WANG QQ. Improving the thermostability of a thermostable endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* by engineering the conserved noncatalytic residue and N-glycosylation site[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3361-3368.
- [31] NAKATANI K, KATANO Y, KOJIMA K, TAKITA T, YATSUNAMI R, NAKAMURA S, YASUKAWA K. Increase in the thermostability of *Bacillus* sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(10): 1715-1723.
- [32] SUN XB, CAO JW, WANG JK, LIN HZ, GAO DY, QIAN GY, PARK YD, CHEN ZF, WANG Q. SpyTag/SpyCatcher molecular cyclization confers protein stability and resilience to aggregation[J]. *New Biotechnology*, 2019, 49: 28-36.
- [33] RYKOV SV, KORNBERGER P, HERLET J, TSURIN NV, ZOROV IN, ZVERLOV VV, LIEBL W, SCHWARZ WH, YAROTSKY SV, BEREZINA OV. Novel endo-(1,4)- $\beta$ -glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18): 7553-7566.
- [34] KIM DY, KIM J, LEE YM, BYEON SM, GWAK JH, LEE JS, SHIN DH, PARK HY. Novel, acidic, and cold-adapted glycoside hydrolase family 8 endo- $\beta$ -1,4-glucanase from an Antarctic lichen-associated bacterium, *Lichenicola cladoniae* PAMC 26568[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 935497.
- [35] KALIDAS NR, SAMINATHAN M, ISMAIL IS, ABAS F, MAITY P, ISLAM SS, MANSHOOR N, SHAARI K. Structural characterization and evaluation of prebiotic activity of oil palm kernel cake mannanoligosaccharides[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 348-355.
- [36] PHiROM-ON K, APIRAKSAKORN J. Development of cellulose-based prebiotic fiber from banana peel by enzymatic hydrolysis[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 101083.