



研究报告

沙质微泡菌 β -1,3(4)-葡聚糖酶的克隆表达及酶学性质马俊文¹ 江正强² 李晨霞² 闫巧娟^{*1}¹ 中国农业大学工学院 中国轻工业食品生物工程重点实验室 北京 100083² 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

摘要:【背景】 β -葡聚糖是自然界中广泛存在的非淀粉多糖,是谷类植物细胞壁的主要成分。 β -葡聚糖酶能够水解 β -葡聚糖生成低聚合度的寡糖,在食品、饲料、造纸等领域发挥着重要的作用。【目的】从海洋细菌沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)中克隆到一个 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因,在大肠杆菌中可溶表达,研究其相关酶学性质。【方法】以沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)基因组 DNA 为模板,克隆一个 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因(MaGlu16A),构建重组表达载体 pET-28a-MaGlu16A 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达,通过 Ni-NTA 亲和层析纯化后进行酶学性质研究。【结果】MaGlu16A 的最适 pH 和最适温度分别为 pH 6.0 和 40 °C,在 pH 5.0–10.5 和 35 °C 以下稳定。对 EDTA 具有较高的抵抗性,在 1 mmol/L 和 10 mmol/L EDTA 浓度下仍保持 99.3%和 82.5%的酶活力。该酶能够有效水解可得然多糖、昆布多糖、大麦葡聚糖、地衣多糖、燕麦葡聚糖和酵母葡聚糖,水解产物主要为葡萄糖、二糖、三糖和四糖。【结论】海洋细菌沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)来源 β -1,3(4)-葡聚糖酶的克隆表达及酶学性质的测定为 β -葡聚糖酶的挖掘及 β -葡寡糖的制备奠定了基础。

关键词: 沙质微泡菌, β -1,3(4)-葡聚糖酶, 表达, 性质

Cloning, expression and characterization of an β -1,3(4)-glucanase from *Microbulbifer arenaceus*MA Jun-Wen¹ JIANG Zheng-Qiang² LI Chen-Xia² YAN Qiao-Juan^{*1}¹ Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China² College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] β -glucan is a non-starch polysaccharide, widely existed in nature, especially in cell wall of cereal plants. β -glucanase can catalyze β -glucan into β -glucooligosaccharides, it plays an important role in food, feed and papermaking industry. [Objective] Gene of β -1,3(4)-glucanase from marine bacteria *Microbulbifer arenaceus* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and its enzymatic characteristics and hydrolysis properties were studied. [Methods] The β -1,3(4)-glucanase gene (MaGlu16A) was cloned from the genomic DNA of *Microbulbifer arenaceus* and the recombinant plasmid (pET-28a-MaGlu16A) was constructed. The recombination strain was successfully expressed in

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31630096)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-62736918; E-mail: yanqj@cau.edu.cn

Received: 25-10-2019; **Accepted:** 18-02-2020; **Published online:** 18-03-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31630096)

***通信作者:** Tel: 010-62736918; E-mail: yanqj@cau.edu.cn

收稿日期: 2019-10-25; **接受日期:** 2020-02-18; **网络首发日期:** 2020-03-18

E. coli BL21(DE3), and purified by Ni-NTA affinity chromatography, then enzymatic characteristics was studied. **[Results]** The optimal pH of MaGlu16A was 6.0 and optimal temperature was 40 °C. It was stable between pH 5.0 and 10.5, and below 35 °C. The enzyme showed obvious resistance to EDTA, and it could maintain 99.3% and 82.5% activity at the concentration of 1 mmol/L and 10 mmol/L. In addition, MaGlu16A showed broad substrate specificity. It could hydrolyze not only curdlan and laminarin but also barley β -glucan, lichenan, oat β -glucan, and yeast β -glucan, whose hydrolytic products were mainly glucose, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide. **[Conclusion]** Cloning, expression and characterization of β -1,3(4)-glucanase from marine bacteria *Microbulbifer arenaceus* could provide a basis for the exploration of β -glucanase and preparation of β -glucan oligosaccharides.

Keywords: *Microbulbifer arenaceus*, β -1,3(4)-glucanase, Expression, Characterization

β -葡聚糖是一类自然界中广泛存在的非淀粉多糖,是由 β -D-葡萄糖残基通过 β -1,3 和 β -1,4 混合糖苷键连接的多糖聚合物。 β -葡聚糖是禾本科高等植物(谷物类,如大麦、燕麦、大米、高粱、小麦等)细胞壁的主要成分^[1],大麦中含量尤为丰富,约占其胚乳细胞壁的 70% (质量比)^[2]。由于禾本科植物细胞壁结构的复杂性,其生物降解需要多种酶的协同作用^[3], β -葡聚糖酶是其中较为重要的一类酶。

β -葡聚糖酶能够催化 β -葡聚糖的水解。根据水解方式的不同, β -葡聚糖酶可分为四大类:(1) β -1,3-1,4-葡聚糖酶(地衣多糖酶,EC 3.2.1.73),特异性水解 β -1,3-1,4-葡聚糖中 3-O-取代葡萄糖残基上的 β -1,4-糖苷键^[4];(2) β -1,4-葡聚糖酶(内切- β -1,4-葡聚糖酶,EC 3.2.1.4;外切- β -1,4-葡聚糖酶,EC 3.2.1.74),水解纤维素糖链无定型区的 β -1,4-糖苷键^[5];(3) β -1,3-葡聚糖酶(内切- β -1,3-葡聚糖酶,EC 3.2.1.39;外切- β -1,3-葡聚糖酶,EC 3.2.1.58),专一性水解 β -1,3-葡聚糖中的 β -1,3-糖苷键^[6];(4) β -1,3(4)-葡聚糖酶(EC 3.2.1.6),具有广泛的底物特异性,能够水解 β -1,3-1,4-葡聚糖和 β -1,3-葡聚糖中的 β -1,3 或 β -1,4-糖苷键^[3]。在 CAZy (<http://www.cazy.org/>)数据库中,大多数 β -葡聚糖酶属于 GH16 家族,其中 β -1,3(4)-葡聚糖酶的研究相对较少。

β -1,3(4)-葡聚糖酶能够水解混合键的 β -葡聚糖,在食品行业^[7-8]、饲料行业^[9-10]和植物疾病防治^[11]中具有重要的应用。目前已报道的 β -1,3(4)-

葡聚糖酶主要来源于土壤微生物,如环状芽胞杆菌(*Bacillus circulans*)^[12]、类芽胞杆菌(*Paenibacillus* sp.)^[13]、炭色孢腔菌(*Cochliobolus carbonum*)^[14]、特异腐质霉(*Humicola insolens*)^[3]、拟青霉(*Paecilomyces* sp.)^[15]、红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)^[16]、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)^[17]和棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)^[18]等。除此之外,仅有一个来源于海洋假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. PE2) β -1,3(4)-葡聚糖酶(GluA)^[19]的报道。与陆地相比,海洋环境以高盐、高压、低温和稀营养为特征,海洋微生物长期适应复杂的海洋环境而生存,因而可能具有其独具的特性。

沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)是一株从渤海海水中筛选得到的琼胶降解菌^[20],能够高效地降解琼脂,生产新琼四糖。截至目前已有多种微泡菌来源糖苷水解酶的报道,如几丁质酶(chitinase)^[21]、酯酶(esterase)^[22]、琼脂糖酶(β -agarase)^[23]和 α -淀粉酶(α -amylase)^[24]等,然而尚无沙质微泡菌来源 β -1,3(4)-葡聚糖酶的报道。为此,本文主要研究沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)来源 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因的克隆与表达,并进一步研究其酶学性质,为 β -1,3(4)-葡聚糖酶在食品、饲料等方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceus*)由本实验室自行筛选并保藏^[20]。

1.2 主要试剂和仪器

载体 pET-28a(+), Invitrogen 公司; 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞, 博迈德生物技术公司; TransStart Fast *Pfu* DNA Polymerase, 北京全式金生物技术公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, NEB 公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, AxyGen 公司; 亲和层析柱(Ni-NTA), GE 公司; 可得然多糖、昆布多糖、地衣多糖、大麦葡聚糖、燕麦葡聚糖、酵母葡聚糖, Sigma 公司; 昆布多糖标准品, Mezayme 公司。

MyCycler PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器设备有限公司; 蛋白纯化系统, 上海青浦沪西仪器厂; Kieselgel 60 硅胶板, E. Merck 公司; 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)系统, Agilent Technologies 公司。

1.3 方法

1.3.1 β -1,3(4)-葡聚糖酶保守序列扩增

以沙质微孢菌(*Microbulbifer arenaceus*)基因组 DNA 为模板, 通过两段保守氨基酸序列: LVWSDEFDG 和 SGEIDIME, 设计简并引物

DP-F/R (表 1)进行 β -1,3(4)-葡聚糖酶保守序列扩增。PCR 反应体系: 10 \times LA Buffer 5 μ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 DP-F/R (10 μ mol/L)各 8 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, *LA Taq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 12 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收后连接克隆载体 pMD-19T 并测序。

1.3.2 β -1,3(4)-葡聚糖酶全长序列 TAIL-PCR 扩增

根据扩增得到的保守序列, 分别设计基因上游与下游 3 条特异性引物 sp1-F/R、sp2-F/R 和 sp3-F/R (表 1)。采用 TAIL-PCR 方法^[20], 应用 4 条 LAD 引物及一条嵌套的特异性引物 AC (表 1)通过三轮 PCR 扩增已知序列片段的侧翼序列。扩增得到的序列测序后拼接, 并通过 NCBI 中 Open reading frame finder (ORF finder)项目得到 β -1,3(4)-葡聚糖酶全长序列。

根据得到的 β -1,3(4)-葡聚糖酶全长序列, 设计上下游引物 MaGlu16A-F/R, 以沙质微孢菌(*Microbulbifer arenaceus*)基因组为模板扩增 β -

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

名称	目的	引物序列
Name	Purpose	Primers sequence (5'→3')
DP-F	保守序列扩增	YTNGTNTGGWSNGAYGARTTYGAYGGN
DP-R	Conserved sequence amplification	YTCCAIDATRTCDATYTCNCCNSW
LAD1	TAIL-PCR 扩增	ACGATGGACTCCAGAVNVNNGGAA
LAD2	TAIL-PCR amplification	ACGATGGACTCCAGABNBNNNGGTT
LAD3		ACGATGGACTCCAGAVNVNNGGAA
LAD4		ACGATGGACTCCAGABDNBNNGCGT
AC		ACGATGGACTCCAGA
sp1-F		CACGCCCCAACTCCTCCG
sp2-F		GGAGAGCCTCACATACCCGCTTTACA
sp3-F		GAAATTGACGTACTGGAATCCTACGGC
sp1-R		GCTCAACAGCCAGAAAGCGTTGG
sp2-R		GGTGTGGATCTTGATGGTGCCCG
sp3-R		GGATTGATGAAGCCTTCGCTCCAG
MaGlu16A-F	全长序列扩增	GGGATTCCATATGTGTGGCAGTGGTGGTAAAC
MaGlu16A-R	Full-length sequence amplification	CCCATTCAAGCTTTTACTTGGTGAGTTTCACATCGTCC

注: Y: C 或 T; N: A、T、C 或 G; W: A 或 T; S: G 或 C; R: A 或 G; D: A、G 或 T; 酶切位点以下划线标识。

Note: Y=C/T; N=A/T/G/C; W=A/T; S=G/C; R=A/G; D=A/G/T; Restriction sites are underlined.

1,3(4)-葡聚糖酶基因序列。PCR 反应体系: 10×TransStart Fast *Pfu* Buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Fast *Pfu* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L, 补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收后, 与 pET-28a(+)用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 采用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 构建重组表达载体 pET-28a-MaGlu16A, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选出含有目的基因的阳性转化子并提取质粒。

1.3.3 β -1,3(4)-葡聚糖酶的序列分析

开放阅读框(open reading frame, ORF)利用 NCBI ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找; 利用 CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析结构域; 利用在线软件 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析其信号肽序列; 利用 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)查找其相似序列; 利用在线软件 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析基因编码的氨基酸、蛋白质的分子量及等电点等; 使用 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对分析, 并使用 BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)形成序列比对图。

1.3.4 β -1,3(4)-葡聚糖酶(MaGlu16A)的重组表达及纯化

重组质粒 pET-28a-MaGlu16A 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 挑取单菌落在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。以 1%的接种量转接至 300 mL 上述培养基中, 当培养液 OD₆₀₀ 达到 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16 °C 诱导 16 h。

9 000 r/min 离心 5 min 收集菌体细胞后将其重悬于缓冲液 A (20 mmol/L pH 8.0 磷酸盐,

500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)中, 超声破碎(功率 300 W, 时间 20 min, 工作 3 s, 停 4 s)后 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即得粗酶液。使用 Ni-NTA 柱(1×5 cm)纯化重组蛋白, 以 0.5 mL/min 流速上样。层析柱预先用 10 个柱体积的缓冲液 A 平衡。采用含有 50–100 mmol/L 咪唑的缓冲液 B (20 mmol/L pH 8.0 磷酸盐, 500 mmol/L NaCl, 50/100 mmol/L 咪唑)以 1.0 mL/min 流速线性洗脱目的蛋白, 测定 OD₂₈₀ 收集目的蛋白。纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 检测纯度。

1.3.5 MaGlu16A 酶活力及蛋白浓度的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法^[25]测定酶活力: 取 350 μ L 4% (质量体积比)的可得然多糖底物置于离心管中预热 5 min, 加入 50 μ L 适当稀释的酶液(3 mg/mL, 稀释 500 倍), 40 °C 反应 20 min 后, 加入 600 μ L DNS, 沸水浴 10 min, 待冷却后在 540 nm 处测定反应液中的还原糖含量。酶活力定义: 在上述反应条件下, 反应每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

参照 Lowry 法^[26]测定蛋白的含量, 以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准蛋白。

1.3.6 MaGlu16A 基本酶学性质测定

最适 pH 及 pH 稳定性测定: 不同 pH 值的缓冲体系(citrate, pH 3.5–6.0; sodium phosphate, pH 6.0–8.0; Tris-HCl, pH 7.0–9.0; CHES, pH 8.0–10.0; 甘氨酸-NaOH, pH 10.0–11.0)中制备 4% (质量体积比)的可得然多糖底物, 按照标准方法测定不同 pH 值下的酶活力, 以酶活力最高点为 100%, 分别计算不同 pH 值条件下的相对酶活力。pH 稳定性测定用上述不同 pH 值的缓冲液将酶液稀释至约 1 mg/mL 于 30 °C 保温 30 min, 然后迅速将样品置于冰水浴中冷却 30 min, 按照标准方法测定其残余酶活力, 以未经处理的纯酶液作为对照。

最适温度及温度稳定性测定: 用最适 pH 值的缓冲液配制 4% (质量体积比)的可得然多糖底物, 分别在不同温度条件下(20–70 °C)测定酶反应最

适温度。以酶活力最高点为 100%，分别计算不同温度条件下的相对酶活力。纯酶液用 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)稀释至约 1 mg/mL 后，置于不同温度(20–70 °C)下保温 180 min，分别在 0、5、15、30、60、120 和 180 min 取样，按照标准方法测定其残余酶活力，以未经处理的纯酶液作为对照。

1.3.7 金属离子及化合物对 MaGlu16A 酶活力的影响

金属离子及化合物对酶活力影响测定：用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液将纯酶液稀释至约 1 mg/mL，分别加入 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的金属离子及化合物，将混合液置于 30 °C 保温 30 min，冰浴 30 min 后，按照标准方法测定其残余酶活力，以未加入金属离子及化合物处理的酶液作为对照。

1.3.8 MaGlu16A 底物特异性和动力学常数测定

底物特异性测定：用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液分别配制 1% (质量体积比)的可得然多糖(curdlan)、昆布多糖(laminarin)、地衣多糖(lichenan)、大麦葡聚糖(barley β -glucan)、燕麦葡聚糖(oat β -glucan)、酵母葡聚糖(yeast β -glucan)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、微晶纤维素(avicel)和桦木木聚糖(birchwood xylan)，按照标准方法测定酶活力，考察酶对不同底物的特异性。

动力学参数的测定：用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液配制不同浓度的可得然多糖(curdlan)、昆布多糖(laminarin)、地衣多糖(lichenan)、大麦葡聚糖(barley β -glucan)、燕麦葡聚糖(oat β -glucan)和酵母葡聚糖(yeast β -glucan)，按照标准方法于 40 °C 反应 5 min 后测定其酶活力，通过 GraFit 软件计算出米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

1.3.9 MaGlu16A 的水解特性

用 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液分别配制 1% (质量体积比)的可得然多糖(curdlan)、昆布多糖(laminarin)、地衣多糖(lichenan)、大麦葡聚糖(barley β -glucan)、燕麦葡聚糖(oat β -glucan)和酵母葡聚糖(yeast β -glucan)，分别加入 1 U/mL 的

MaGlu16A，在 35 °C 条件下进行水解。分别在 5、15、30、60、120、240、480、720 和 1 440 min 取样，薄层层析法(thin-layer chromatography, TLC)分析水解产物。展层剂为正丁醇:乙酸:水=2:1:1 (体积比)，显色剂为浓硫酸:甲醇=5:95 (体积比)。

不同时间间隔的样品，经 HPLC 进行定量分析，以葡萄糖和昆布寡糖作为标准品。色谱柱：Shodex-Sugar KS-802 (8.0×300 mm)；检测器：示差折光检测器；流动相：纯水；进样量：10 μ L；流速：0.8 mL/min；柱温：65 °C。

1.3.10 数据处理及分析

采用 Origin 8.5 进行数据统计和图片处理，数据均为 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因的克隆及序列分析

根据保守氨基酸序列设计简并引物(DP-F/R)，以 *Microbulbifer arenaceus* 基因组 DNA 为模板扩增得到约为 400 bp 的保守序列(图 1A)。根据已知的保守序列设计特异性引物，通过 TAIL-PCR 方法扩增得到 β -1,3(4)-葡聚糖酶全长序列(MaGlu16A)(图 1B)。MaGlu16A 全长 1 566 bp，编码 521 个氨基酸，含有一段 N 端信号肽(1–19 aa)。经 ExPASy 分析可知该蛋白的理论预测分子量和等电点分别为 65 kD 和 4.18。BLAST 蛋白序列比对表明(图 2)，

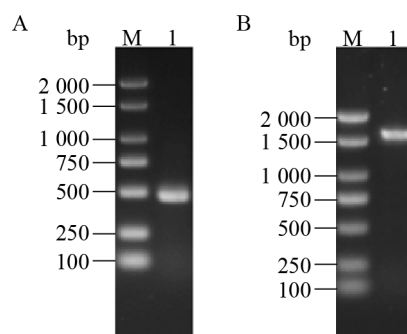


图 1 MaGlu16A 保守序列(A)和全长序列(B)的 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR products of conserved sequence (A) and complete sequence (B) of MaGlu16A

注：M：DL2000 DNA Marker；1：PCR 扩增产物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products.

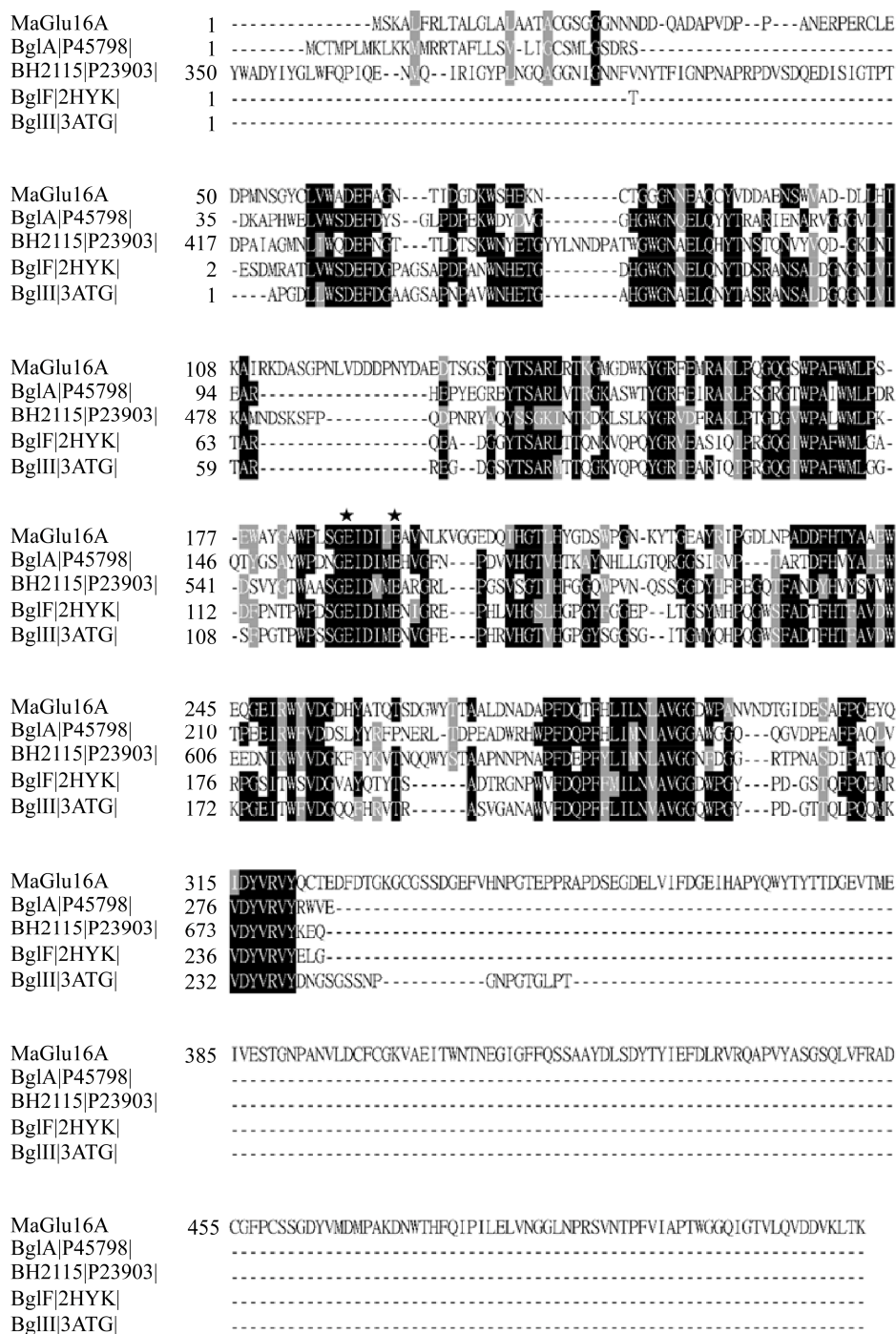


图2 MaGlu16A 多重序列比对

Figure 2 Multiple sequence alignment of MaGlu16A

注: MaGlu16A 多重序列比对序列分别为: BglA, 海洋红嗜盐菌来源的 β -1,3-1,4-葡聚糖(GenBank 登录号: P45798); BH2115, 环状芽孢杆菌来源的 β -1,3-葡聚糖酶(GenBank 登录号: P23903); BglF, 拟诺卡氏菌来源的 β -1,3-葡聚糖酶(PDB 登录号: 2HYK); BglIII, 纤维化纤维微菌来源的 β -1,3-葡聚糖酶(PDB 登录号: 3ATG)。两个保守的催化残基用黑色五角形标记。

Note: Sequences were deduced from the following GenBank accession numbers: BglA, β -1,3-1,4-glucanase (P45798) from *Rhodothermus marinus*; BH2115, β -1,3-glucanase (P23903) from *Bacillus circulans* WL-12; BglF, β -1,3-glucanase (PDB: 2HYK) from *Nocardiopsis* sp. F96; BglIII, β -1,3-glucanase (PDB: 3ATG) from *Cellulosimicrobium cellulans*. The two conserved catalytic residues are marked by black pentagrams.

MaGlu16A 与 GH16 家族海洋红嗜热盐菌 (*Rhodothermus marinus*) 来源的 β -葡聚糖酶(BglA) 相似性最高为 40.51% (GenBank 登录号: P45798.1)^[27]; 与环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*) (GenBank 登录号: P23903.1)^[28]和斑节对虾(*Penaeus monodon*) (GenBank 登录号: Q8N0N3.1)^[29]来源的 β -1,3-葡聚糖酶相似性分别为 40.2%和 35.1%。MaGlu16A 只有一个催化结构域组成, 其中催化残基序列[-E(Glu188)-E(Glu193)-]在 GH16 家族是保守的^[30]。

2.2 重组 β -1,3(4)-葡聚糖酶(MaGlu16A)的表达及纯化

重组 β -1,3(4)-葡聚糖酶(MaGlu16A)经 1 mmol/L IPTG 于 16 °C 诱导 16 h 后, 4 °C、9 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。菌体用缓冲液 A 重悬后超声破壁, 在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 即得到粗酶液。粗酶液经 Ni-NTA 一步纯化得到电泳纯酶, 纯化过程中目标蛋白的回收率及纯化倍数见表 2, 酶活力回收率为 54.2%, 酶的比活力由 26.6 U/mg 提高到 58.5 U/mg, 纯化倍数为 2.2 (表 2)。SDS-PAGE 分析在 66 kD 处显示单一条带, 与预测分子量 65 kD 相近(图 3)。

表 2 MaGlu16A 纯化表

Table 2 Purification summary of MaGlu16A

纯化步骤 Step	总酶活 Total activity (U) ^a	总蛋白 Total protein (mg) ^b	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification factor (fold)	回收率 Recovery yield (%)
粗酶液 Crude enzyme	366.9	13.8	26.6	1.0	100.0
亲和层析 Ni-NTA	175.4	3.0	58.5	2.2	54.2

注: ^a: 酶活力测定以 4% (质量体积比) 可得然多糖(curdlan)为底物, 在 50 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸缓冲液体系下, 于 40 °C 反应 20 min; ^b: 蛋白含量用 Lowry 法^[26]测定, 以牛血清蛋白(BSA)为标准。

Note: ^a: Enzyme activity was determined in 50 mmol/L citrate buffer pH 6.0 at 40 °C for 20 min using 4% curdlan as the substrate; ^b: Protein concentration was determined by the Lowry method^[26] with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

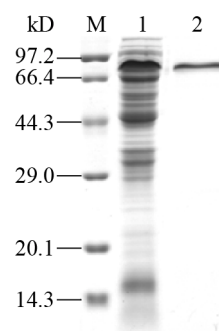


图 3 β -1,3(4)-葡聚糖酶(MaGlu16A)纯化图

Figure 3 SDS-PAGE analysis of purified MaGlu16A

注: M: 低分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: Ni-NTA 纯化。

Note: M: Low molecular weight standard protein; 1: Crude enzyme; 2: Purified by Ni-NTA.

2.3 MaGlu16A 的酶学性质

MaGlu16A 基本酶学性质如图 4 所示。最适 pH 为柠檬酸 pH 6.0 (图 4A), 在 pH 5.0–10.5 范围内能保持 80%以上酶活力(图 4B)。MaGlu16A 在 40 °C 时酶活力最高(图 4C)。在 25、30 和 35 °C 保温 180 min, MaGlu16A 仍能保持 80%以上酶活力; 在 40 °C 保温 60 min 能保持 65%酶活力, 保温 180 min 则剩余 30%酶活力; MaGlu16A 在 50 °C 和 55 °C 保温 5 min 仅残留 20%左右酶活力, 保温 60 min 则酶快速失活(图 4D)。

2.4 金属离子及化合物对 MaGlu16A 酶活力影响

不同浓度的金属离子及化合物对 MaGlu16A 酶活力影响如表 3 所示。在 1 mmol/L 浓度时, Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Co^{2+} 能够明显地激活 MaGlu16A, 酶活力分别提高了 19.5%、25.4%、14.9%、17.2%和 18.7%。 Cu^{2+} 、SDS 和 DTT 则抑制了 MaGlu16A 的活性, 酶活力分别降低了 19.1%、20.3%和 17.4%。此外, 金属离子及化合物在 10 mmol/L 浓度时, Fe^{3+} 和 SDS 抑制 MaGlu16A 活性, 酶活力分别降低了 31.4%和 51.7%。EDTA 对 MaGlu16A 活性无显著影响, 在 1 mmol/L 和 10 mmol/L 浓度时仍保持 99.3%和 82.5%的酶活力。不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、DTT 对 MaGlu16A 酶活力的影响均无明显差异。

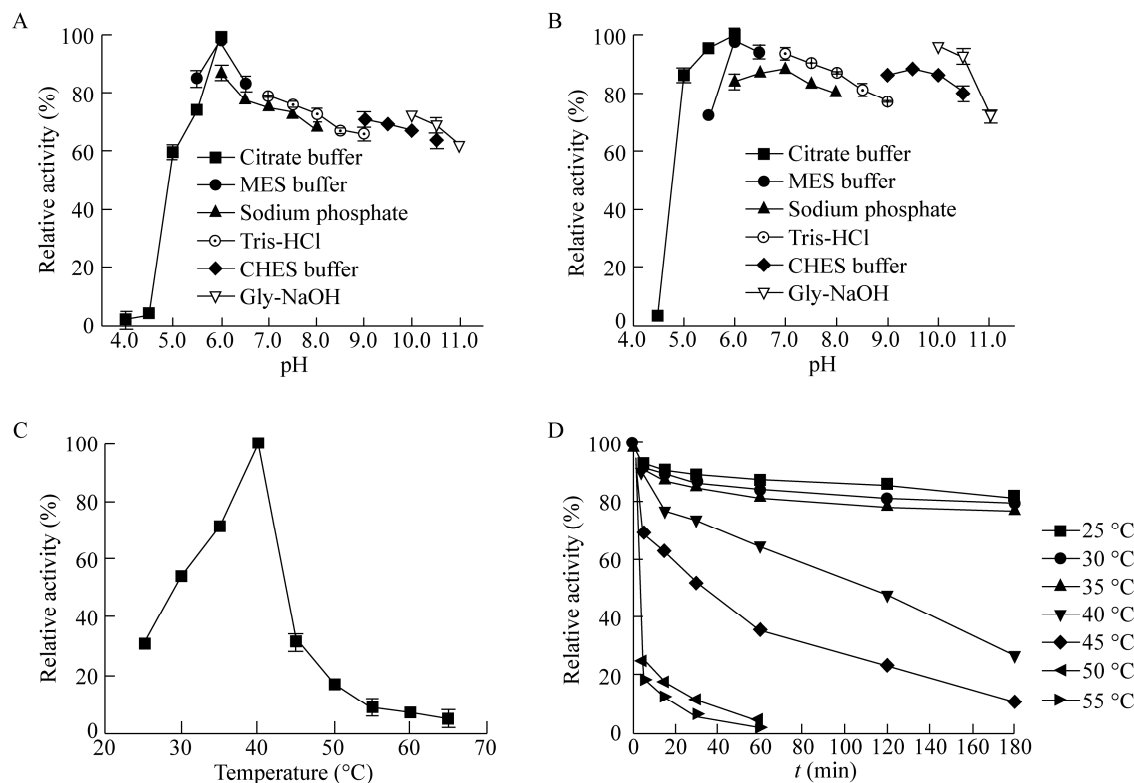


图 4 MaGlu16A 的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)
Figure 4 Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C) and thermostability (D) of MaGlu16A

表 3 不同浓度金属离子及化合物对 MaGlu16A 的影响
(相对酶活力, %)

Table 3 Effect of metal ions and chemicals of different concentrations on the activity of MaGlu16A (relative activity, %)

金属离子及化合物	浓度 Concentrations (mmol/L)	
Metal ions and chemicals	1	10
Control	100	100
Ba ²⁺	94.7±0.17	82.9±0.15
Cu ²⁺	80.9±0.49	78.0±0.62
Na ⁺	119.5±0.34	78.6±0.34
Mg ²⁺	125.4±0.3	81.3±0.11
Mn ²⁺	114.9±0.13	79.2±0.28
Zn ²⁺	97.6±0.32	93.8±0.17
Fe ³⁺	117.2±0.28	68.6±0.22
Co ²⁺	118.7±0.05	96.1±0.34
Ni ²⁺	93.6±0.30	70.6±0.11
EDTA	99.3±0.32	82.5±0.22
SDS	79.7±0.13	48.3±0.27
DTT	82.6±0.11	78.6±0.32

2.5 MaGlu16A 底物特异性及动力学参数

MaGlu16A 对不同底物的底物特异性及动力学参数如表 4 所示。MaGlu16A 对可得然多糖(curdan)具有最高酶活力(100%), 对昆布多糖和地衣多糖的相对酶活力较为相近, 分别为 60.4%和 62.6%。同时, 对大麦葡聚糖(barly β -glucan)和燕麦葡聚糖(oat glucan)的相对酶活力分别为 50.9%和 51.4%, 而对酵母葡聚糖仅有 13.3%的相对酶活力。此外, MaGlu16A 对 CMC-Na、微晶纤维素和桦木木聚糖没有活性, 表明 MaGlu16A 是一个典型的 β -1,3(4)-葡聚糖酶。另外, 该酶对可得然多糖、昆布多糖和酵母葡聚糖的 K_m 分别为 1.8、1.9 和 5.6 mg/mL。

2.6 MaGlu16A 的水解特性

MaGlu16A 水解可得然胶、昆布多糖、地衣多糖、大麦葡聚糖、燕麦葡聚糖及酵母葡聚糖的水解特性分析如图 5 所示。TLC 分析表明, MaGlu16A

表 4 MaGlu16A 的底物特异性及动力学常数

Table 4 Substrate specificity and kinetic parameters of MaGlu16A

底物 Substrate	连接方式 Main linkage	相对酶活力 Relative activity (%)	K_m^a (mg/mL)	V_{max}^a ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)
可得然胶 Curdlan	β -1,3-	100.00	1.8 ± 0.1	72.5 ± 1.9
昆布多糖 Laminarin	β -1,3-	60.38	1.9 ± 0.1	55.6 ± 1.2
大麦葡聚糖 Barley β -glucan	β -1,3-1,4-	50.88	3.8 ± 0.1	83.6 ± 1.4
地衣多糖 Lichenan	β -1,3-1,4-	62.61	4.3 ± 0.1	125 ± 1.8
燕麦葡聚糖 Oat β -glucan	β -1,3-1,4-	51.41	3.6 ± 0.1	81.3 ± 1.2
酵母葡聚糖 Yeast β -glucan	β -1,3-1,6-	13.31	5.6 ± 0.2	11.0 ± 0.2

注: ^a: 上述底物的动力学常数在 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液 pH 6.0 中, 于 40 °C 条件下反应 5 min. K_m 和 V_{max} 通过 GraFit 软件计算.

Note: ^a: The kinetic parameters were determined for the different substrates of above-mentioned at 40 °C in 50 mmol/L citrate buffer pH 6.0 for 5 min. The apparent Michaelis constant (K_m) and V_{max} were calculated with the software "GraFit".

水解可得然多糖和昆布多糖的主要产物为葡萄糖、二糖和三糖; 水解地衣多糖、大麦葡聚糖、燕麦葡聚糖及酵母葡聚糖的产物还有少量的四糖, 说明 MaGlu16A 为内切葡聚糖酶。

HPLC 分析表明: MaGlu16A 水解可得然多糖 24 h, 葡萄糖和二糖含量分别为 2.5 mg/mL 和 3.8 mg/mL; 水解昆布多糖 24 h, 其葡萄糖和二糖含量分别为 3.1 mg/mL 和 3.6 mg/mL, 而水解大麦葡聚糖主要以三糖为主, 其含量为 3.5 mg/mL, 葡萄糖含量为 2.2 mg/mL。此外, 水解地衣多糖、燕麦葡聚糖及酵母葡聚糖 24 h, 其葡萄糖含量分别为 2.8、3.1 和 1.2 mg/mL。

3 讨论与结论

近年来, β -葡聚糖酶因其在食品^[8,31-32]和饲料^[9,33]等行业的广泛应用而备受关注。目前, 除了假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. PE)^[19] β -1,3(4)-葡聚糖酶来源于海洋微生物, 其余已报道的 β -1,3(4)-葡聚糖酶均来源于土壤微生物^[2-3,16-18]。本文研究了海洋琼胶降解细菌沙质微泡菌(*Microbulbifer arenaceous*)来源的 β -1,3(4)-葡聚糖酶(MaGlu16A)的基因克隆表达、酶学性质及水解特性。MaGlu16A 只含有一个 GH16 家族催化结构域, 与海洋红嗜热盐菌(*Rhodothermus marinus*)来源的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(BglA)具有最高的相似性(40.51%), 表明该酶是一个新颖的 β -葡聚糖酶。

MaGlu16A 在 pH 6.0 条件下具有最高酶活力, 与嗜热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)^[30]的 β -1,3(4)-葡聚糖酶(Lic16A)一致, 但比炭色胞腔菌(*Cochliobolus carbonum*)^[14]和特异腐质霉(*Humicola insolens* Y1)^[3]的 β -1,3(4)-葡聚糖酶的最适 pH 高。此外, MaGlu16A 在 pH 5.0–10.5 范围内具有较好的 pH 稳定性, 在 pH 11.0 时残余酶活力仍保持其最大酶活力的 60%以上, 比特异腐质霉(*Humicola insolens* Y1)^[3](pH 5.0–9.0)和嗜热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)^[30](pH 5.5–10.0) β -1,3(4)-葡聚糖酶的 pH 稳定性范围要宽。MaGlu16A 最适温度为 40 °C, 35 °C 时能够保持 80%以上酶活力。相比于拟青霉(*Paecilomyces* sp.)^[2](70 °C, <65 °C)、嗜热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*) (70 °C, <65 °C)^[30]和脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus* sp. A4)^[34](55 °C, <60 °C) β -1,3(4)-葡聚糖酶, MaGlu16A 具有较低的最适温度和稳定性。此外, Mg^{2+} 在 1 mmol/L 浓度时对 MaGlu16A 的活性具有显著的激活作用, 酶活力提高了 25.4%。当 EDTA 的浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 时, MaGlu16A 能够保持其最大酶活力的 99.3%和 82.5%, 表明该酶不具有金属离子依赖性。MaGlu16A 对可得然多糖(curdlan)的动力学参数(K_m 和 V_{max})分别为 1.8 mg/mL 和 72.5 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。 K_m 值与米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)^[35]来源的

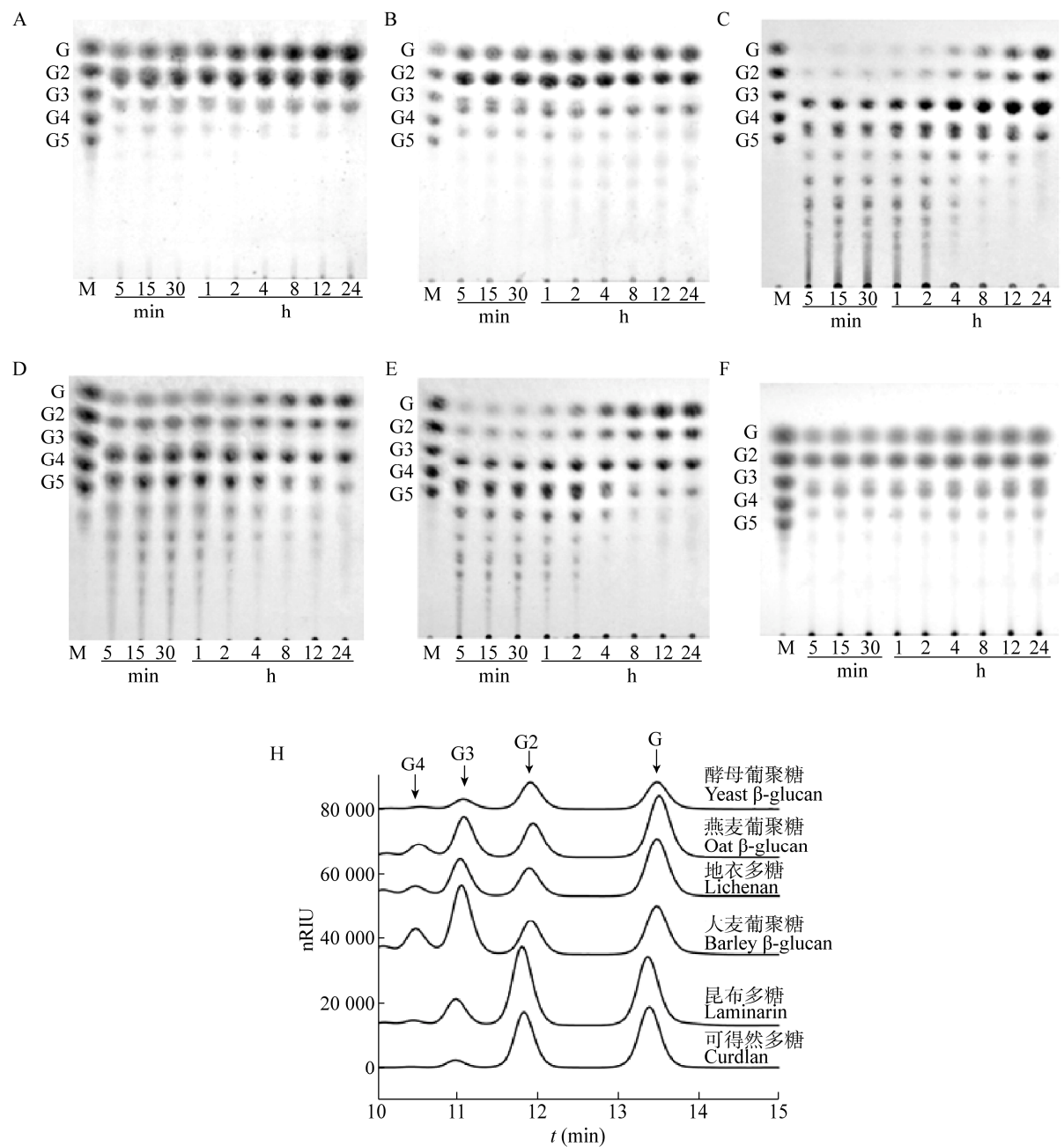


图 5 MaGlu16A 水解特性分析

Figure 5 Hydrolysis properties of MaGlu16A

注: 可得然多糖(A)、昆布多糖(B)、大麦葡聚糖(C)、地衣多糖(D)、燕麦葡聚糖(E)和酵母葡聚糖(F)的水解历程; H: 不同底物水解 24 h 的 HPLC 分析. G: 葡萄糖; G2: 昆布二糖; G3: 昆布三糖; G4: 昆布四糖; G5: 昆布五糖.

Note: Hydrolysis time course of curdlan (A), laminarin (B), barley β -glucan (C), lichenin (D), oat β -glucan (E) and yeast β -glucan (F); H: HPLC analysis of different substrates hydrolysed at 24 h. G: Glucose; G2: Laminaribiose; G3: Laminaritriose; G4: Laminaritetraose; G5: Laminaripentaose.

β -1,3(4)-葡聚糖酶(1.87 mg/mL)相似, 低于其他大多 β -1,3(4)-葡聚糖酶, 如 Agl9A^[34]的 4.98 mg/mL、Bgl^[36]的 2.96 mg/mL 和 Bgl16C^[37]的 7.58 mg/mL 和 PsBgl16A^[15]的 3.12 mg/mL, 说明 MaGlu16A 具有较好的底物亲和力和较高的催化效率。MaGlu16A 显示了宽泛的底物特异性, 不仅可以水解可得然多糖和昆布多糖等 β -1,3-键连接的底物, 对大麦葡聚糖、地衣多糖、燕麦葡聚糖酶和酵母葡聚糖等 β -1,3-1,4-键连接的底物也具有水解能力。MaGlu16A 对不同底物的水解产物稍有差异, 主要以葡萄糖、二糖、三糖为主, 其中大麦葡聚糖、地衣多糖、燕麦葡聚糖和酵母葡聚糖还能产生少量四糖。MaGlu16A 宽泛的底物特异性及水解作用使其在 β -葡寡糖的制备上具有潜在应用。

本文从沙质微孢菌(*Microbulbifer arenaceous*) 中克隆得到一个 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因, 并成功在大肠杆菌中表达。MaGlu16A 最适 pH 和最适温度分别为 pH 6.0 和 40 °C, 在 pH 5.0–10.5 范围内保持稳定, 表明该酶具有较好的 pH 稳定性。此外, MaGlu16A 对不同的 β -葡聚糖底物均有较高的水解作用, 在食品、饲料等工业具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Tan HZ, Feng DY. Application of β -glucan and β -glucanase in feed[J]. Livestock and Poultry Industry, 2005(3): 18-21 (in Chinese)
谭会泽, 冯定远. 饲料中的 β -葡聚糖和 β -葡聚糖酶的应用[J]. 畜禽业, 2005(3): 18-21
- [2] Hua CW, Yi HX, Jiao LX. Cloning and expression of the endo-1,3(4)- β -glucanase gene from *Paecilomyces* sp. FLH30 and characterization of the recombinant enzyme[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(9): 1807-1812
- [3] Li JY, Xu XX, Shi PJ, et al. Overexpression and characterization of a novel endo- β -1,3(4)-glucanase from thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 138: 63-68
- [4] Sun JT, Wang HX, Lv WP. Cloning and expression of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(3): 1235-1242
- [5] Bernardi AV, de Gouvêa PF, Gerolamo LE, et al. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 150: 1-11
- [6] Santana ML, Paulo EM, Bispo JA, et al. Production and partial characterization of β -1,3-glucanase obtained from *Rhodotorula oryzzicola*[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(2): 165-171
- [7] Planas A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1543(2): 361-382
- [8] Zhang B, Liu Y, Yang HY, et al. Biochemical properties and application of a novel β -1,3-1,4-glucanase from *Paenibacillus barengoltzii*[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 68-75
- [9] Niu CT, Li XY, Xu X, et al. Research progresses in microbial 1,3-1,4- β -glucanase: protein engineering and industrial applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(7): 1234-1246 (in Chinese)
钮成拓, 李昕玥, 许鑫, 等. 微生物 1,3-1,4- β -葡聚糖酶蛋白改造及工业应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1234-1246
- [10] Mathlouthi N, Ballet N, Larbier M, et al. Influence of beta-glucanase supplementation on growth performances and digestive organs weights of broiler chickens fed corn, wheat and barley-based diet[J]. International Journal of Poultry Science, 2011, 10(2): 157-159
- [11] Britto DS, Pirovani CP, Andrade BS, et al. Recombinant β -1,3-1,4-glucanase from *Theobroma cacao* impairs *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(9): 5417-5427
- [12] Asano T, Taki J, Yamamoto M, et al. Cloning and structural analysis of *bglM* gene coding for the fungal cell wall-lytic β -1,3-glucan-hydrolase BglM of *Bacillus circulans* IAM1165[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(6): 1246-1255
- [13] Hong TY, Meng M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5/6): 472-478
- [14] Görlach JM, van der Knaap E, Walton JD. Cloning and targeted disruption of *MLG1*, a gene encoding two of three extracellular mixed-linked glucanases of *Cochliobolus carbonum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 385-391
- [15] Hua CW, Xie FZ, Chen XJ. Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the endo- β -1,3(4)-glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30[J]. Microbiology China, 2011, 38(11): 1657-1665 (in Chinese)
华承伟, 谢凤珍, 陈晓静. 拟青霉内切 β -1,3(4)-葡聚糖酶基因克隆、表达及重组酶性质[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1657-1665
- [16] Bang ML, Villadsen I, Sandal T. Cloning and

- characterization of an endo- β -1,3(4)glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(2): 215-222
- [17] Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, et al. Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 898-906
- [18] da Silva Aires R, Steindorff AS, Ramada MHS, et al. Biochemical characterization of a 27 kDa 1,3- β -D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1219-1223
- [19] Kitamura E, Kamei Y. Molecular cloning of the gene encoding β -1,3(4)-glucanase a from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. PE2, an essential enzyme for the degradation of *Pythium porphyrae* cell walls[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 630-637
- [20] Ma JW, Yan QJ, Yi P, et al. Biochemical characterization of a truncated β -agarase from *Microbulbifer* sp. suitable for efficient production of neoagarotetraose[J]. Process Biochemistry, 2019, 87: 119-127
- [21] Lee HJ, Lee YS, Choi YL. Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 303
- [22] Lee YS. Isolation and characterization of a novel cold-adapted esterase, MtEst45, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 218
- [23] Su Q, Jin TY, Yu Y, et al. Extracellular expression of a novel β -agarase from *Microbulbifer* sp. Q7, isolated from the gut of sea cucumber[J]. AMB Express, 2017, 7: 220
- [24] Lee YS, Park DJ, Choi YL. Characterization of maltotriose production by hydrolyzing of soluble starch with α -amylase from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(9): 3901-3911
- [25] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [26] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275
- [27] Spilliaert R, Hreggvidsson GO, Kristjansson JK, et al. Cloning and sequencing of a *Rhodothermus marinus* gene, *bglA*, coding for a thermostable β -glucanase and its expression in *Escherichia coli*[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 224(3): 923-930
- [28] Yahata N, Watanabe T, Nakamura Y, et al. Structure of the data encoding β -1,3-glucanase A1 of *Bacillus circulans* WL-12[J]. Gene, 1990, 86(1): 113-117
- [29] Sritunyaluksana K, Lee SY, Söderhäll K. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(3): 237-245
- [30] Fuchs KP, Zverlov VV, Velikodvorskaya GA, et al. Lic16A of *Clostridium thermocellum*, a non-cellulosomal, highly complex endo- β -1,3-glucanase bound to the outer cell surface[J]. Microbiology, 2003, 149(4): 1021-1031
- [31] Chen ZX, Liu XQ, Zhang B, et al. Purification and characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Aspergillus awamori* and its application in preparation of glucooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(1): 45-52 (in Chinese)
- 陈子贤, 刘学强, 张彬, 等. 泡盛曲霉 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的纯化、性质及其用于制备 β -葡寡糖[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 45-52
- [32] Bi J. Application of β -glucanase in beer production[J]. China Brewing, 2011(9): 105-106 (in Chinese)
- 毕静. β -葡聚糖酶在啤酒生产中的应用研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 105-106
- [33] Gao Y, Chen N, He JN, et al. Application of β -glucanase in animal feed[J]. China Feed Additive, 2018(2): 1-5 (in Chinese)
- 高研, 陈宁, 何俊娜, 等. β -葡聚糖酶在动物饲料中的应用[J]. 中国饲料添加剂, 2018(2): 1-5
- [34] Bai Y, Wang J, Zhang Z, et al. A novel family 9 β -1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(1): 251-259
- [35] Boyce A, Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4): 835-841
- [36] Yang PL, Shi PJ, Wang YR, et al. Cloning and overexpression of a *Paenibacillus* β -glucanase in *Pichia pastoris*: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(1): 58-66
- [37] Chen XY, Meng K, Shi PJ, et al. High-level expression of a novel *Penicillium* endo-1,3(4)- β -D-glucanase with high specific activity in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(6): 869-876