

β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用研究进展

魏夏森, 余赛男, 张哲一, 高海燕*, 秦臻*
(上海大学生命科学学院, 上海 200444)

摘要: β -1,3-葡聚糖酶是一类能够特异性水解 β -1,3-葡聚糖中 β -1,3-糖苷键的酶类, 其水解生成的产物为一系列不同大小的寡糖或单糖。 β -1,3-葡聚糖酶在食品功能性寡糖制备、果蔬保鲜、生物医药、植物抗病等领域具有重要应用价值。已发现的 β -1,3-葡聚糖酶主要归属于12个糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)家族, 包括GH16、GH17、GH55、GH64、GH81、GH128和GH132等。 β -1,3-葡聚糖酶广泛存在于细菌、真菌、植物和昆虫中, 因来源和序列进化关系的差异, 其结构和催化功能也呈现多样性。酶的结构与功能是探索酶催化反应机理、挖掘酶催化特性以及酶分子改造研究的基础。因此, 本文从 β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用等方面, 对国内外 β -1,3-葡聚糖酶的研究现状进行综述, 以期对 β -1,3-葡聚糖酶相关基础研究及应用开发提供参考。

关键词: β -1,3-葡聚糖酶; 糖苷水解酶; 结构与功能; 催化机制; 应用

Research Progress on Structure, Function and Application of β -1,3-Glucanases

WEI Xiasen, YU Sainan, ZHANG Zheyi, GAO Haiyan*, QIN Zhen*
(School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: β -1,3-Glucanases are enzymes that specifically hydrolyze β -1,3-glycosidic linkages bonds in β -1,3-glucan to generate a range of oligosaccharides or monosaccharides. β -1,3-Glucanases have important potential applications in functional oligosaccharide preparation, fruit and vegetable preservation, biopharmaceuticals, and plant disease resistance. β -1,3-Glucanases belonging to 12 glycoside hydrolase (GH) families have been identified, including GH16, GH17, GH55, GH64, GH81, GH128 and GH132. β -1,3-Glucanases are widely distributed in bacteria, fungi, plants and insects, which exhibit diverse structures and catalytic functions due to differences in sources and sequence evolution. Structural and functional studies of enzymes are the basis for exploring the catalytic mechanism, enzyme properties, and molecular modification. Therefore, this paper reviews the current state of research on the structure, function and application of β -1, 3-glucanases, in order to provide a reference for the basic research and application of β -1,3-glucanases.

Keywords: β -1,3-glucanases; glycoside hydrolases; structure and function; catalytic mechanism; application

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220820-235

中图分类号: Q814.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)15-0269-09

引文格式:

魏夏森, 余赛男, 张哲一, 等. β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 269-277.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220820-235. <http://www.spkx.net.cn>

WEI Xiasen, YU Sainan, ZHANG Zheyi, et al. Research progress on structure, function and application of β -1,3-glucanases[J]. Food Science, 2023, 44(15): 269-277. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220820-235. <http://www.spkx.net.cn>

β -1,3-葡聚糖是一类广泛存在于自然界中的高分子多糖, 其主链由葡萄糖单元通过 β -1,3-糖苷键连接。一些天然

β -1,3-葡聚糖同时还含有不同比例和大小的通过 β -1,6-糖苷键连接的支链。例如褐藻中的昆布多糖侧链含有30%

收稿日期: 2022-08-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172160; 31972120)

第一作者简介: 魏夏森(1998—)(ORCID: 0000-0003-4093-2569), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品酶学。

E-mail: 1543594335@qq.com

*通信作者简介: 高海燕(1975—)(ORCID: 0000-0002-1114-3387), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: gaohy@shu.edu.cn

秦臻(1987—)(ORCID: 0000-0003-2133-8572), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品酶学。

E-mail: qin_zhen@shu.edu.cn

左右的 β -1,6连接支链结构,并因此具有水溶性^[1]。天然 β -1,3-葡聚糖广泛分布于真菌、细菌和植物中,常见的 β -1,3-葡聚糖包括昆布多糖、可得然多糖、酵母葡聚糖、茯苓多糖、香菇多糖、胍胍质等。由于 β -1,3-糖苷键的连接方式及分子间的氢键相互作用,长链 β -1,3-葡聚糖在天然状态下通常会呈现不同的螺旋型三级结构^[2],这些特殊的三级结构赋予 β -1,3-葡聚糖多样的生物功能,包括调节免疫力^[3]、促进肠道益生菌增殖^[4]、调节血糖平衡及降低胆固醇^[5]等。 β -1,3-葡聚糖的生物活性及其特殊的三级结构使其在食品、日化、医疗等领域受到广泛关注。

β -1,3-葡聚糖酶是一类能够水解以 β -1,3-糖苷键连接的葡聚糖的酶系,在 β -1,3-葡聚糖的生物降解、重构以及开发应用中发挥着重要作用。自然界中, β -1,3-葡聚糖酶广泛分布于古生菌、细菌、真菌、高等植物及动物中。 β -1,3-葡聚糖酶在食品和医药领域有着广泛的应用价值,如制备低分子量 β -1,3-葡寡糖、降低啤酒发酵液黏度、抑制果蔬采后病原真菌等。尽管目前研究者对 β -1,3-葡聚糖酶的表达纯化、分子结构、酶学性质、催化机制等做了大量研究,然而不同类型 β -1,3-葡聚糖的复杂结构限制了 β -1,3-葡聚糖酶的广泛应用。不同家族、不同作用模式的 β -1,3-葡聚糖酶系需要协同参与复杂 β -1,3-葡聚糖的高效降解。因此,充分认识不同类型 β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能、催化模式,对于 β -1,3-葡聚糖酶的应用及进一步的分子改造具有重要意义。本文总结典型 β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用领域的研究进展,旨在为其后续催化机理研究及其在食品、医药等领域的应用提供参考。

1 β -1,3-葡聚糖酶的分类及其催化机制

β -1,3-葡聚糖酶根据其催化方式可以分为内切型和外切型两种类型。内切 β -1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.39)又被称为昆布多糖酶,是一种专一性水解 β -1,3-葡聚糖糖链中 β -1,3-糖苷键的酶类,在自然界 β -1,3-葡聚糖的分解、重构中发挥关键生物学功能,在 β -1,3-葡聚糖酶系中具有重要意义。内切 β -1,3-葡聚糖酶从糖链内侧水解 β -1,3-葡聚糖,产生一系列不同聚合度的寡糖。外切 β -1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.58)则从糖链的非还原端逐一水解 β -1,3-葡聚糖底物,水解产物一般为葡萄糖或单一寡糖,在 β -1,3-葡聚糖的降解过程中起辅助作用。

基于其序列进化关系,根据CAZy数据库(<http://www.cazy.org/>)的分类,已发现的 β -1,3-葡聚糖酶可归属于12个糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)家族。其中,内切 β -1,3-葡聚糖酶可以归属于9个GH家族(图1):GH16、GH17、GH55、GH64、GH81、GH128、GH152、GH157和GH158;已发现的外切

β -1,3-葡聚糖酶可以归属于6个GH家族:GH3、GH5、GH17、GH55、GH128和GH132。

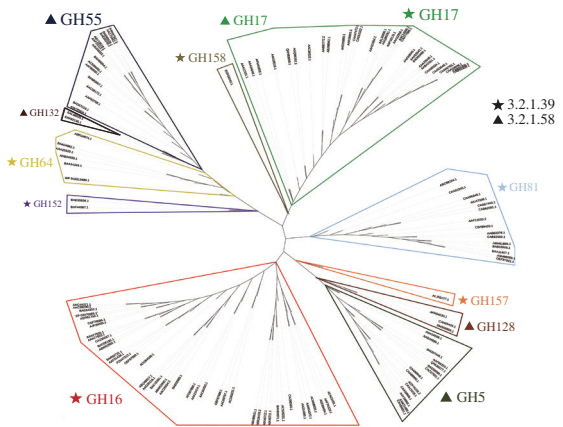
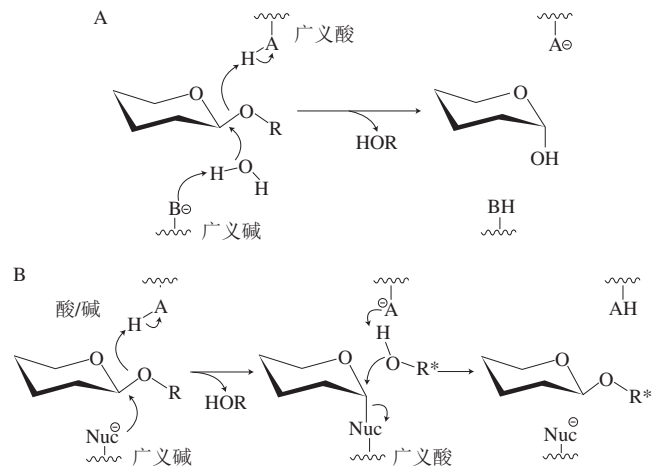


图1 CAZy数据库中已鉴定的 β -1,3-葡聚糖酶系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of identified β -1,3-glucanases in the CAZy database

β -1,3-葡聚糖酶具有两种水解机制,分别是保留型机制和反转型机制^[6]。保留型水解机制的催化过程分为两个步骤,首先,活性中心的谷氨酸残基作为广义酸(质子供体),给糖苷键氧提供一个质子来切去离去基团,使 β -1,3-糖苷键断裂,并形成酶-糖基中间体。随后,活性中心的谷氨酸残基作为广义碱,协助水分子攻击酶-糖基中间体的异头碳位置。最终,底物的 β -1,3-糖苷键被水解,形成最终的水解产物。异头碳的两次反转导致底物的构象得到保留,因此称为保留型机制。反转型机制的 β -1,3-葡聚糖酶涉及两个保守的催化残基,分别为广义酸及一个广义碱。在反应历程中,广义酸首先提供一个质子给底物的异头碳,同时广义碱从水分子中去除一个质子,增加了其亲核性,促进其攻击异头物的中心,从而使糖键断裂,生成水解产物(图2)。



A.反转型机制; B.保留型机制。图中Nuc,广义酸; B,广义碱。

图2 糖苷水解酶两种催化机制^[6]

Fig. 2 Two catalytic mechanisms of glycoside hydrolase^[6]

2 β -1,3-葡聚糖酶的来源及制备

β -1,3-葡聚糖酶主要来源于真菌、细菌、植物、昆虫以及软体动物中。表1统计了目前已报道的具有应用潜力的不同来源的典型 β -1,3-葡聚糖酶。目前已报道的产 β -1,3-葡聚糖酶的细菌主要有热球菌 (*Pyrococcus furiosus*)^[7]、多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)^[8]、芽孢杆菌 (*Bacillus lehensis* G1)^[9]、链霉菌 (*Streptomyces* sp.)^[10]等。真菌和植物也是 β -1,3-葡聚糖酶的重要来源, 主要包括烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)^[11]、棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)^[12]、白腐菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)^[13]、大麦^[14]、葡萄^[15]等。天然来源的 β -1,3-葡聚糖酶资源丰度、性质稳定, 显示出特定的催化活性, 表现出独特的应用潜力, 如土壤芽孢杆菌 (*Paenibacillus terrae*)^[16]产生的 β -1,3-葡聚糖酶可有效抑制植物病原真菌的生长, 在植物保护等方面发挥重要的作用; 来源于魁蚶 (*Arca inflata*)^[17]的 β -1,3-葡聚糖酶活力较高, 对肿瘤坏死因子等表现出免疫增强效果。来源于哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)^[18]的 β -1,3-葡聚糖酶是生产 β -1,3-寡糖苷的理想候选酶, 可用于寡糖的工业制备。

除了发掘具有优良特性的天然来源 β -1,3-葡聚糖酶, 异源重组表达技术也可以用于 β -1,3-葡聚糖酶的挖掘和制备, 从而扩展其来源、提高表达量、扩大 β -1,3-葡聚糖酶的应用范围。目前, β -1,3-葡聚糖酶的重组表达制备宿主主要包括大肠杆菌、毕赤酵母、芽孢杆菌等。大肠杆菌表达系统相对于酵母表达系统来说技术更成熟、操作相对简单, 被广泛应用于新型 β -1,3-葡聚糖酶的发掘和制备, 例如拮抗酵母 (*Pichia guilliermondii*)^[19]、驼鹿瘤胃微生物宏基因组^[20]、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[21]等来源的 β -1,3-葡聚糖酶都是通过大肠杆菌重组制备获得。来源于稻瘟病菌的 β -1,3-葡聚糖酶MoGluB可通过大肠杆菌系统高效表达, 并表现出抗真菌的作用^[22]。虽然大肠杆菌原核表达具有生长迅速、成本低廉等优点, 但是, 由于原核表达系统无法识别真核转录和翻译元件, 并且不具有翻译后加工修饰功能, 会导致部分真核基因无法被有效表达。因此, 近年来研究者也常用真核表达系统表达 β -1,3-葡聚糖酶, 例如毕赤酵母、芽孢杆菌等表达体系^[23]。毕赤酵母在诱导表达过程中, 自身所分泌的蛋白量较少, 因此目的蛋白的表达量相对较高, 但由于部分 β -1,3-葡聚糖酶对于酵母细胞壁具有水解作用, 因此, 其适用性需要进一步实验验证。异源重组表达技术目前已成为 β -1,3-葡聚糖酶酶学研究及制备应用的重要方法。同时, 结合结构生物学、分子生物学、定向进化等研究方法对异源重组表达得到的 β -1,3-葡聚糖酶进行分子改造, 可进一步提高酶的催化

性能及应用价值。Feng Jianwei等^[24]从堆肥中发现了一种嗜热 β -1,3-葡聚糖酶, 通过定点突变使160位氨基酸由赖氨酸变为谷氨酸, 使其酶活力提高了17%。Muhammed等^[25]利用modeler和I-TASSER程序对一种来源于酵母 *Wickerhamomyces normus* NCYC 434的 β -1,3-葡聚糖酶进行同源建模, 随后通过SPDBViewer和AUTO-MUTE增强模型的热稳定性, 发现突变体E186R的热稳定性最好, 其熔解温度提高了9.58 K。

表1 具有应用潜力的典型 β -1,3-葡聚糖酶

GH家族	来源	制备方法	底物	酶活力/(U/mg)	应用潜力	参考文献
GH16	昆虫	天然纯化	昆布多糖	4 480	催化活力较高	[7]
GH5	魁蚶 (软体动物)	天然纯化	昆布多糖	90.01	增强免疫能力	[8]
GH16	细菌	原核表达	昆布多糖	236	植物保护	[10]
GH55	真菌	真核表达	可得然多糖	198.57 U/mL	制备寡糖	[11]
GH17	植物	真核表达	昆布多糖	96.4	植物保护	[12]
GH64	真菌	原核表达	酵母葡聚糖	8.18	植物保护、制备寡糖	[13]
GH16	细菌	真核表达	昆布多糖	10.8	植物保护、食品防腐	[16]
GH5	真菌	真核表达	可得然多糖	292.56	制备寡糖	[17]
GH16	细菌	原核表达	昆布多糖	376.73	制备寡糖	[18]
GH16	真菌	真核表达	昆布多糖	1 531.27	制备寡糖, 发展成健康食品	[19]
GH50	细菌	原核表达	可得然多糖	23.4	制备寡糖	[20]

3 β -1,3-葡聚糖酶的结构与催化机制

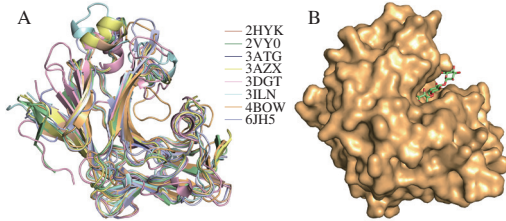
3.1 内切型 β -1,3-葡聚糖酶

内切型 β -1,3-葡聚糖酶又称昆布多糖酶, 可以特异性地从 β -1,3-葡聚糖链内部随机水解切断 β -1,3-糖苷键, 产生长短不一的低聚糖。已有报道的内切型 β -1,3-葡聚糖酶主要分布于GH16、GH17、GH64与GH81 4个GH家族。到目前为止, GH16、GH17、GH64、GH81、GH128与GH158 6个GH家族的内切型 β -1,3-葡聚糖酶结构和催化机制已得到解析, 而GH55、GH152、GH157中鲜有关于内切型 β -1,3-葡聚糖酶结构的报道, 其详细的催化机制还有待进一步明确。

3.1.1 GH16家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶

目前已报道的GH16家族 β -1,3-葡聚糖酶全部为内切型, 广泛分布于细菌、真菌及古生菌中, 以细菌来源为主。GH16家族 β -1,3-葡聚糖酶三级结构富含 β -折叠, 这些链弯曲折叠成两个面对面反向平行的片层结构, 构成一个供长链底物结合的狭长催化凹槽。GH16家族 β -1,3-葡聚糖酶三维结构整体呈一种果冻卷结构, 又称三明治夹心结构 (图3)。Fibriansah等^[26]于2007年报道了一例来源于 *Nocardiopsis* sp.的GH16家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶 (BgIF) 结构, 将其定义为经典的三明治 β -折叠果冻卷结构。GH16家族的 β -1,3-葡聚糖酶遵循典型的保留水解机制, 在反应历程中会形成不稳定的酶-糖基中间体^[27]。

GH16家族 β -1,3-葡聚糖酶的底物特异性与催化凹槽构造直接相关,对不同的底物具有不同的水解能力,例如,来源于海洋细菌*Zobellia galactanivorans*的 β -1,3-葡聚糖酶ZgLamA对昆布多糖底物(laminarin)的催化效率要比对混合链葡聚糖(mixed-linkage glucan, MLG)(β -1,3-1,4-葡聚糖)高将近22倍。这是由于ZgLamA催化中心呈现出弯曲凹槽的构象,有利于结合螺旋型的 β -1,3-葡聚糖而不是直线型的 β -1,3-1,4-葡聚糖(图3B)。



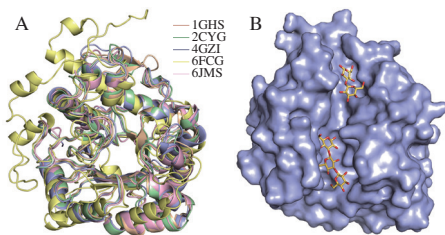
A. GH16家族已知晶体结构的 β -1,3-葡聚糖酶三维结构叠加对比。BglF PDB ID: 2HYK; Lam16 PDB ID: 2VY0; BglII PDB ID: 3ATG; TmLam PDB ID: 3AZX; CurdI PDB ID: 3DGT; LamR PDB ID: 3ILN; ZgLamA PDB ID: 4BOW; Laminarinase PDB ID: 6JH5。B.来源于*Z. galactanivorans*的 β -1,3-葡聚糖酶与一个昆布三糖的复合物晶体结构(ZgLamA PDB ID: 4BOW)。

图3 GH16家族典型 β -1,3-葡聚糖酶结构^[26,28-34]

Fig. 3 Typical β -1,3-glucanase structure of GH16 family^[26,28-34]

3.1.2 GH17家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶

GH17家族 β -1,3-葡聚糖酶包括内切型和外切型两种,且大部分是内切型,主要来源于植物。目前,得到结构解析的GH17家族 β -1,3-葡聚糖酶均为内切型。GH17家族蛋白呈典型的(β 1 α)8TIM(triose-phosphate isomerase)桶状结构(图4),由8个 α -螺旋和8个 β -折叠环绕而成,在整个酶的表面形成了一个能够容纳长链底物的狭长催化凹槽并贯穿而过。桶状结构核心区域的 β 链是高度保守的,主要差异都发生在蛋白外围的环结构和螺旋结构处。GH17家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶与GH16家族类似,遵循典型的保留型水解反应机制,反应历程中会形成不稳定的酶-糖基中间体。



A. GH17家族所有已知晶体结构的 β -1,3-葡聚糖酶三维结构叠加对比。Bgl32 PDB ID: 1GHS; Mus a 5 PDB ID: 2CYG; GluB20-2 PDB ID: 4GZI; FbGH17A PDB ID: 6FCG; pollen allergen CJP38 PDB ID: 6JMS。B.来源于*Solanum tuberosum*的 β -1,3-葡聚糖酶与昆布多糖的复合物晶体结构(GluB20-2 PDB ID: 4GZI)。

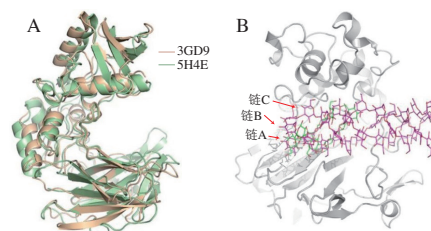
图4 GH17家族典型 β -1,3-葡聚糖酶结构^[14,35-38]

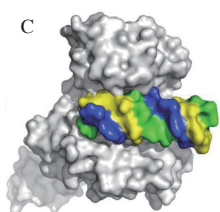
Fig. 4 Typical β -1,3-glucanase structure of GH17 family^[14,35-38]

Wojtkowiak等^[35]获得了马铃薯内切型 β -1,3-葡聚糖酶(GLUB20-2)突变体E259A与昆布多糖共结晶的晶体结构(图4B),这是研究者得到的首个GH17家族糖苷水解酶与寡糖分子的复合晶体结构。即使将其活性位点突变,GLUB20-2E259A仍具有残存活性,质谱分析揭示该突变体用两种方式切割了昆布六糖,分别产生两个昆布三糖分子或者一个昆布四糖分子和一个昆布二糖分子。GLUB20-2的催化凹槽形成了两端开口中间弯曲的峡谷型几何构象,该构象排除了直线型底物如 β -1,4-葡聚糖与结合位点结合的可能,这表明活性位点裂隙的几何形状决定了酶的底物特异性。

3.1.3 GH64家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶

目前,已报道的GH64家族蛋白全部为内切型 β -1,3-葡聚糖酶,主要来源于细菌。GH64家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶又称为昆布五糖型 β -1,3-葡聚糖酶,特点是催化水解 β -1,3-葡聚糖的水解产物以昆布五糖为主。GH64家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶遵循典型的反转型催化机制,催化中心附近的天冬氨酸残基作为广义碱,而谷氨酸残基作为广义酸参与水解反应。Wu等^[39]获得了一种来源于马特链霉菌(*Streptomyces matensis*)的GH64家族 β -1,3-葡聚糖酶(LPHase)。LPHase由两个结构域组成,C末端是由 α -螺旋和 β -折叠构成的 α/β 结构域,N末端是由两组反向平行的 β -折叠组成的结构域,两个结构域之间形成了U型催化凹槽(图5)。Qin Zhen等^[40]报道了一种来源于巴伦氏芽孢杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*)的GH64家族 β -1,3-葡聚糖酶(PbBgl64A)与昆布六糖的结合形式,即两条寡糖链形成一个螺旋,同时与PbBgl64A的催化凹槽结合(图5B、C)。这两条链的构象与三螺旋 β -1,3-葡聚糖中的三螺旋结构几乎相同。这表明 β -1,3-葡聚糖可以直接以三螺旋形式结合在GH64家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶的催化凹槽中。GH64家族 β -1,3-葡聚糖酶与三螺旋 β -1,3-葡聚糖底物的结合方式与植物病程相关抗真菌甜蛋白和 β -1,3-葡聚糖螺旋糖链的结合方式相似,表明这是一种糖苷水解酶直接结合多糖四级结构底物的新型结合方式^[41-42]。





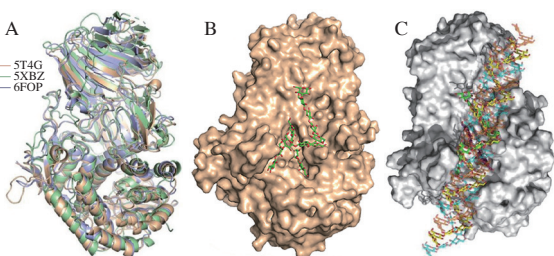
A. GH64家族部分已知晶体结构的 β -1,3-葡聚糖酶三维结构叠加对比。LPHase PDB ID: 3GD9; Cbei_2825 PDB ID: 5H4E。B、C.来源于*P. barengoltzii*的 β -1,3-葡聚糖酶与三螺旋糖链的复合物晶体结构。

图5 GH64家族典型 β -1,3-葡聚糖酶结构^[39-40]

Fig. 5 Typical β -1,3-glucanase structure of GH64 family^[39-40]

3.1.4 GH81家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶

GH81家族蛋白广泛分布于细菌、真菌、植物和古生菌中，且全部为内切型 β -1,3-葡聚糖酶。到目前为止，已有3种GH81家族 β -1,3-葡聚糖酶的晶体结构得到解析，分别是来自耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*) 的BhGH81、来自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的CtLam81A^[43]和来自米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 的RmLam81A^[44]。GH81家族内切型 β -1,3-葡聚糖酶由3个结构域组成，其中N端结构域呈现 β -折叠夹层结构，包含两组反向平行的 β -折叠片层。C端结构域呈现典型的(α)₆-桶状结构。N端和C端中间的小结构域包含2个反向平行的 β -折叠和2个 α -螺旋。3个结构域共同组成了一条纵向的狭长催化凹槽(图6)。



A. GH81家族部分已知晶体结构的 β -1,3-葡聚糖酶三维结构叠加对比。BhGH81 PDB ID: 5T4G; RmLam81A PDB ID: 5XBZ; Cthe_0660 PDB ID: 6FOP。B.来源于*B. halodurans*的 β -1,3-葡聚糖酶与糖链的复合物晶体结构(BhGH81 PDB ID: 5T4G); C.来源于*B. halodurans*的 β -1,3-葡聚糖酶与三螺旋糖链的结合模式。

图6 GH81家族典型 β -1,3-葡聚糖酶结构^[44,46]

Fig. 6 Typical β -1,3-glucanase structure of GH81 family^[44,46]

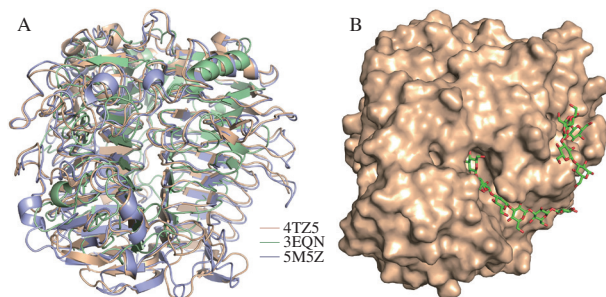
Ma Junwen等^[45]报道了一种来源于米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 的GH81家族 β -1,3-葡聚糖酶(RmLam81A)，揭示了其底物识别和催化机制。研究表明RmLam81A可以结合三螺旋 β -1,3-葡聚糖，遵循典型的反转型水解机制，通常是通过一步反应实现的，催化中心的保守天冬氨酸残基作为广义酸质子化糖苷键上的氧原子，而谷氨酸残基作为广义碱则对其去质子化，从而使糖苷键断裂完成水解过程。Pluvinage等^[46]报道了一种来源于耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*) 的GH81家族

β -1,3-葡聚糖酶(BhGH81)，将542位谷氨酸突变为谷氨酰胺或者将466位天冬氨酸突变为天冬酰胺，BhGH8均完全失活，这表明Glu542和Asp466是其关键催化残基。此外，该酶与多糖链的复合结构表明其至少能结合两个单独的 β -1,3-葡聚糖链(图6B)，这意味着该酶可能可以直接与三螺旋 β -1,3-葡聚糖结合(图6C)。

3.2 外切型 β -1,3-葡聚糖酶

外切型 β -1,3-葡聚糖酶的水解模式是从 β -1,3-葡聚糖糖链末端开始，依次切断糖链的 β -1,3-糖苷键，产生葡萄糖或单一寡糖。已发现的外切型 β -1,3-葡聚糖酶可以归属于6个GH家族：GH3、GH5、GH17、GH55、GH128和GH132，其中大部分属于GH55以及GH5家族。目前GH5、GH55、GH128家族的外切型 β -1,3-葡聚糖酶晶体结构均已得到解析，而GH3、GH17与GH132家族则鲜有结构解析。

GH55家族 β -1,3-葡聚糖酶主要来源于细菌及真菌，且绝大部分属于外切型。GH55家族蛋白具有两个平行的右手 β -螺旋结构域，构成一种类似于胸腔肋骨的结构，N末端和C末端的分别有7个和10个由右旋 β -螺旋结构域组成的线圈，并通过一段氨基酸残基连接，该残基包括两个反向平行的 β -折叠，催化位点位于两个结构域之间(图7A)。Bianchetti等^[47]发现来源于链霉菌的(*Streptomyces* sp.)的外切型 β -1,3-葡聚糖酶(sacteLam55A)，其底物复合物结构显示GH55家族外切型 β -1,3-葡聚糖酶具有一个口袋型催化凹槽，具有6个糖基结合位点，能够从糖链非还原末端逐一切断葡萄糖单糖(图7B)。GH55家族蛋白遵循反转催化机制，广义酸首先提供一个质子给底物异头碳，同时广义碱从水分子中夺走一个质子，增加了其亲核性，促进其攻击异头物的中心，从而断裂糖苷键，产生水解产物。Papageorgiou等^[48]发现了来源于嗜热毛壳菌 (*Chaetomium thermophilum*) 的 β -1,3-葡聚糖酶(CtLam55)，通过结构比较和定点突变确定了Glu654是关键催化残基。



A. GH55家族部分已知晶体结构的 β -1,3-葡聚糖酶三维结构叠加对比。SacteLam55A PDB ID: 4TZ5; PcLam55A PDB ID: 3EQN; CtLam55 PDB ID: 5M5Z。B.来源于*Streptomyces* sp.的 β -1,3-葡聚糖酶与昆布多糖的复合物晶体结构(sacteLam55A PDB ID: 4TZ5)。

图7 GH55家族典型 β -1,3-葡聚糖酶结构^[13,47-48]

Fig. 7 Typical β -1,3-glucanase structure of GH55 family^[13,47-48]

3.3 GH128家族 β -1,3-葡聚糖酶

在近年来的研究中,还发现了一些新型的 β -1,3-葡聚糖酶,在CAZy数据库中归属于GH128家族。GH128家族 β -1,3-葡聚糖酶属于GH-A超家族,具有碳水化合物结合区域和($\alpha\beta$)8-桶状结构^[49],且该桶状结构是所有已知GH128家族中最短的,平均仅有240个氨基酸残基^[50],该家族兼具内切型和外切型 β -1,3-葡聚糖酶。

Santos等^[50]利用序列相似性网络聚类将GH128家族分为7个亚群,并对每种亚群的底物结合方式进行分析,发现GH128家族 β -1,3-葡聚糖酶的底物结合模式与疏水关节紧密相关,并且在这7种亚群中,糖链会以“弯曲状”和“扁平状”这两种不同的形态与酶进行结合,此外第三亚群的GH128家族 β -1,3-葡聚糖酶还可以直接与三螺旋 β -1,3-葡聚糖糖链结合。

3.4 其他家族 β -1,3-葡聚糖酶

除了上述家族典型的 β -1,3-葡聚糖酶外,在GH3及GH5家族中也发现了少量的外切 β -1,3-葡聚糖酶,它们具有典型的($\beta\alpha$)8-TIM桶状结构,均遵循保留型催化机制。GH132家族 β -1,3-葡聚糖酶被称为SUN-蛋白,被发现存在于丝状真菌和酵母中^[51]。目前关于GH132家族蛋白的相关报道较少,尚不清楚其蛋白结构和催化机理。GH158家族 β -1,3-葡聚糖酶隶属于GH-A超家族,目前仅有一例GH158家族 β -1,3-葡聚糖酶的结构解析被报道。Déjean等^[52]获得了一种来源于单形拟杆菌(*Bacteroides uniformis*)的GH158家族 β -1,3-葡聚糖酶(BuGH158),其由一个N末端的($\beta\alpha$)8-TIM桶结构域和一个C末端免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)样结构域组成。此外,该酶对可得然多糖与昆布多糖具有较高水解活性。

4 β -1,3-葡聚糖酶的应用

4.1 β -1,3-葡聚糖酶在抗真菌中的应用

果蔬在采后运输、贮藏和销售期间的腐烂、劣变等问题是影响果蔬品质、保存期和人体食用安全性的重要因素。由植物病原真菌引起的腐败是果蔬采后损失的主要原因。真菌是一种真核生物,细胞壁是真菌细胞生存的必要条件,细胞壁的降解会导致真菌细胞失去渗透压平衡,因此破坏细胞壁完整性成为一种潜在的抗真菌手段。 β -1,3-葡聚糖酶是生防微生物分泌的一种重要抑菌蛋白,植物自身在抵御真菌侵染过程中也会诱导产生 β -1,3-葡聚糖酶^[53]。 β -1,3-葡聚糖酶能够降解细胞壁 β -1,3-葡聚糖糖链,致使病原菌菌丝断裂或畸形,造成病原真菌原生质泄漏,同时抑制其孢子萌发。此外,这一过程还可以释放真菌细胞壁碎片诱导物,诱发植物免疫诱抗作用,间接促进植物寄主体内植保素的积累,增加其抗病

能力^[54]。基于 β -1,3-葡聚糖酶的生物防治手段能够有效防治植物真菌病害,具有不产生抗药性、只针对靶病原菌而不伤害其他有益生物、无农药残留、无毒无污染等优势。因此,探索 β -1,3-葡聚糖酶在果蔬采后保鲜中的作用,发展基于 β -1,3-葡聚糖酶的新型绿色生物防腐保鲜剂是果蔬绿色保鲜技术的潜在发展趋势之一。娄树宝等^[55]测定了大豆叶片 β -1,3-葡聚糖酶的活性和对霉菌的抑菌作用,结果表明,在接种大豆疫霉菌48 h后,植物体 β -1,3-葡聚糖酶活性达到峰值,利用接种48 h后提取的 β -1,3-葡聚糖酶粗酶液进行抑菌实验,发现 β -1,3-葡聚糖酶粗酶液对大豆疫霉菌的菌丝生长和孢子萌发有明显的抑制作用。陈小云等^[56]研究表明, β -1,3-葡聚糖酶对于苹果、梨、香蕉等水果采摘后抑菌抗病有明显的效果,可以很好地防止真菌造成的采后腐烂,这一特点可以为热带水果贮藏保鲜所利用。Rajninec等^[57]发现来自叉叶茅膏菜(*Drosera binata*)的 β -1,3-葡聚糖酶粗蛋白对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢(*Alternaria solani*)和梨孢镰刀菌(*Fusarium poae*)的生长有抑制作用。

4.2 β -1,3-葡聚糖酶制备功能性低聚糖

β -1,3-葡寡糖也被称为昆布寡糖,是一种具有良好生物活性的食品功能因子,具有调节机体免疫力、抗感染、调节肠道菌群平衡等活性。由可得然多糖或昆布多糖水解制备的 β -1,3-葡寡糖可作为一种新型益生元应用于功能食品开发。此外,一些小分子质量的可溶性 β -1,3-低聚糖可以作为免疫激活剂诱导植物产生免疫反应,从而提高植物抗病性。而 β -1,3-葡聚糖酶水解 β -1,3-葡聚糖制备 β -1,3-低聚糖具有特异性强且副产物少等优点,被认为是一种有潜力的低聚糖生产方法。Wang Yanxin等^[22]发现GH55家族 β -1,3-葡聚糖酶(AcGluA)能够将昆布多糖水解为一系列寡糖,而高剂量的寡糖可以诱导水稻幼苗产生免疫反应,从而对稻瘟病产生抗性,这说明 β -1,3-葡聚糖酶的水解产物具有显著的生防效果,对 β -1,3-低聚糖的应用具有一定指导作用。Li Kuikui等^[58]从纤维化纤维微细菌(*Cellulosimicrobium cellulans*)克隆纯化得到了一种新型的 β -1,3-葡聚糖酶(GcGluE),对其进行底物特异性和水解产物分析,发现该酶对可得然多糖表现出最高水解活性,水解产物主要为二糖和三糖。此外,可得然多糖经过匀质化预处理后,GcGluE对其降解效率将提高7.1倍,具有一定应用潜力。Gao Minjie等^[18]获得了来源于哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的 β -1,3-葡聚糖酶,在发酵118 h后酶活力最高可达198.57 U/mL。根据该酶的特性,建立了酶法水解 β -1,3-葡聚糖制备多功能低聚糖的方法,这使 β -1,3-葡聚糖酶在工业化生产低聚糖方面具有一定的应用前景。

4.3 β -1,3-葡聚糖酶酿酒工业中的应用

β -1,3-葡聚糖酶除了在抗真菌及寡糖制备中具有重要作用,

还可以应用于酿酒工业中。在酿酒工业中,大麦是生产啤酒的主要原料,而生产加工过程中,某些微生物分泌到胞外的高聚 β -1,3-葡聚糖增加了发酵液的黏度,造成过滤困难,最终可能在啤酒中形成絮状凝胶,使啤酒产量下降并增加酿酒成本。吕丽丽等^[59]研究发现,如果在发酵过程中加入适当的 β -1,3-葡聚糖酶,则可以显著降低高聚葡聚糖的含量,从而降低发酵液黏度,达到精益啤酒和改善过滤工艺的目的。

4.4 β -1,3-葡聚糖酶制备酵母原生质体

酵母菌细胞壁的主要化学成分是 β -葡聚糖,一类是构成酵母菌细胞壁的骨架且含量较多的 β -1,3-葡聚糖,另一类是起填充作用的含量较少的 β -1,6-葡聚糖。制备酵母菌原生质体的关键在于分解细胞壁中不溶的 β -1,3-葡聚糖,因此 β -1,3-葡聚糖酶是制备原生质体的重要制剂^[60]。段会轲等^[61]利用木霉菌株LE02所产的 β -1,3-葡聚糖酶对啤酒酵母葡聚糖进行酶解增溶,通过 β -1,3-葡聚糖酶酶解技术和超滤分离技术还可以获得大分子质量的水溶性酵母葡聚糖。

4.5 β -1,3-葡聚糖酶清除生物被膜

生物被膜是指由微生物和其胞外分泌物组成的复合组织。鼠伤寒沙门氏菌、假单胞菌等食品中关键的腐败菌会产生生物被膜,生物被膜会导致常用的消毒剂、抗生素的杀菌效果减弱,造成食品安全隐患。 β -1,3-葡聚糖作为念珠酵母菌生物被膜的重要成分之一,在胞外基质发挥耐药性的过程中起到了重要作用。而 β -1,3-葡聚糖酶在清除生物被膜方面具有一定功效,可以在食品工业中对腐败菌起到一定的控制作用。Nett等^[62]研究发现用低浓度的 β -1,3-葡聚糖酶处理念珠菌后,显著增强了抗真菌药物氟康唑和两性霉素B对于该菌的作用效果。Mitchell等^[63]也通过实验证明,随着胞外基质中 β -1,3-葡聚糖的水解,抗真菌药物的敏感性也逐渐增强,这说明 β -1,3-葡聚糖酶在清除生物被膜方面有一定功效。

4.6 β -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶协同作用

β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶均具有降解真菌细胞壁 β -1,3-葡聚糖和几丁质以及肽聚糖的作用,二者在防御植物病虫害方面具有广谱抗性,能够减少化学农药的使用,降低环境污染。Mauch等^[64]发现几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶联合作用时的抑菌效果优于单个酶,表明二者在抑制病原菌生长的过程中发挥协同作用。Cota等^[65]对西红柿进行感染互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)抗病实验时,发现 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶协同作用能够显著抵御此类病菌对西红柿贮藏时的影响。这说明 β -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶在果蔬后抑菌保鲜方面具有协同效应,比单个菌种抑菌能力更强,具有良好的应用前景。

5 结 语

β -1,3-葡聚糖酶因能够特异性水解 β -1,3-葡聚糖,在功能性寡糖制备、果蔬保鲜、生物医药、植物抗病等领域都具有重要的应用前景。目前研究者已对一系列不同家族 β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用展开研究。在此背景下,如何获得具有良好应用性能的新型 β -1,3-葡聚糖酶并实现其高效发酵制备,将是 β -1,3-葡聚糖酶后续研究的重点。但由于天然 β -1,3-葡聚糖底物的复杂性,现有 β -1,3-葡聚糖酶对于不同类型底物的催化效率还有待进一步提高,部分不溶性 β -1,3-葡聚糖底物的酶解仍然存在一定困难。此外,酶结构与功能的研究是探索酶催化机理、挖掘酶的催化特性以及进行酶分子改造研究的重要基础。针对天然 β -1,3-葡聚糖底物的复杂性以及 β -1,3-葡聚糖酶系的多样性,研究不同 β -1,3-葡聚糖酶家族对于底物的结合差异和催化机理,明确 β -1,3-葡聚糖酶对于复杂葡聚糖分子的底物识别机制,探索基于 β -1,3-葡聚糖酶的多酶组合催化体系,是实现 β -1,3-葡聚糖酶高效应用的发展趋势。

参考文献:

- [1] KADAM S U, TIWARI B K, O'DONNELL C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(1): 24-31. DOI:10.1111/ijfs.12692.
- [2] MIYOSHI K, UEZU K, SAKURAI K, et al. Proposal of a new hydrogen-bonding form to maintain curdlan triple helix[J]. Chemistry & Biodiversity, 2004, 1(6): 916-924. DOI:10.1002/cbdv.200490073.
- [3] 傅赟彬, 赵小明, 杜显光. 可德兰多糖及其衍生物的生物活性和应用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 315-319.
- [4] SHIMIZU J, TSUCHIHASHI N, KUDOH K, et al. Dietary curdlan increases proliferation of bifidobacteria in the cecum of rats[J]. Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(2): 466-469. DOI:10.1271/bbb.65.466.
- [5] 于永华, 徐飞飞, 林琳, 等. 燕麦 β -葡聚糖降血脂作用的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(2): 486-491. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2022.02.034.
- [6] DAVIES G, HENRISSAT B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases[J]. Structure, 1995, 3(9): 853-859. DOI:10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- [7] ILARI A, FIORILLO A, ANGELACCIO S, et al. Crystal structure of a Famil16 endoglucanase from the hyperthermophile basis of substrate recognition[J]. FEBS Journal, 2009, 276(4): 1048-1058. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06848.x.
- [8] YUAN Y, ZHANG X, ZHANG H, et al. Degradative GH5 β -1,3-1,4-glucanase PpBglu5A for glucan in *Paenibacillus polymyxa* KF-1[J]. Process Biochemistry, 2020, 98: 183-192. DOI:10.1016/j.procbio.2020.08.008.
- [9] JAAFAR N R, KHOIRI N M, ISMAIL N F, et al. Functional characterisation and product specificity of endo- β -1,3-glucanase from alkalophilic bacterium, *Bacillus lehensis* G1[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 140: 109625. DOI:10.1016/j.enzmictec.2020.109625.

- [10] SHI P, YAO G, YANG P, et al. Cloning, characterization, and antifungal activity of an endo-1,3- β -D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(5): 1483-1490. DOI:10.1007/s00253-009-2187-1.
- [11] HARTL L, GASTEBOIS A, AIMANIANDA V, et al. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(2): 185-191. DOI:10.1016/j.fgb.2010.06.011.
- [12] DA SILVA AIRES R, STEINDORFF A S, RAMADA M H S, 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. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.09.001.
- [13] ISHIDA T, FUSHINOBU S, KAWAI R, et al. Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(15): 10100-10109. DOI:10.1074/jbc.M808122200.
- [14] VARGHESE J N, GARRETT T P, COLMAN P M, et al. Three-dimensional structures of two plant β -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(7): 2785-2789. DOI:10.1073/pnas.91.7.2785.
- [15] ROMERO I, FERNANDEZ-CABALLERO C, GONI O, et al. Functionality of a class I β -1,3-glucanase from skin of table grapes berries[J]. Plant Science, 2008, 174(6): 641-648. DOI:10.1016/j.plantsci.2008.03.019.
- [16] YU W Q, ZHENG G P, QIU D W, et al. *Paenibacillus terrae* NK3-4: a potential biocontrol agent that produces β -1,3-glucanase[J]. Biological Control, 2019, 129: 92-101. DOI:10.1016/j.biocontrol.2018.09.019.
- [17] LI C, WEN Y, HE Y, et al. Purification and characterization of a novel β -1,3-glucanase from *Arca inflata* and its immune-enhancing effects[J]. Food Chemistry, 2019, 290: 1-9. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.03.131.
- [18] GAO Minjie, YAN Jiajun, ZHAO Yue, et al. Expression of a thermostable β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* in *Pichia pastoris* and use in oligoglucosides hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2021, 107: 74-82. DOI:10.1016/j.procbio.2021.05.010.
- [19] ZHANG D, SPADARO D, VALENTE S, et al. Cloning, characterization and expression of an exo-1,3- β -glucanase gene from the antagonistic yeast, *Pichia guilliermondii* strain M8 against grey mold on apples[J]. Biological Control, 2011, 59(2): 284-293. DOI:10.1016/j.biocontrol.2011.06.018.
- [20] KALYANI D C, REICHENBACH T, ASPEBORG H, et al. A homodimeric bacterial exo- β -1,3-glucanase derived from moose rumen microbiome shows a structural framework similar to yeast exo- β -1,3-glucanases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 143: 109723. DOI:10.1016/j.enzmictec.2020.109723.
- [21] YI P, YAN Q, JIANG Z, et al. A first glycoside hydrolase family 50 endo- β -1,3-D-glucanase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 108: 34-41. DOI:10.1016/j.enzmictec.2017.09.002.
- [22] WANG Yanxin, ZHAO Yuqiang, WANG Xiaowen, et al. Functional characterization of the novel laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase MoGluB and its biocontrol of *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(33): 9571-9584. DOI:10.1021/acs.jafc.1c03072.
- [23] 程政翔. β -1,3-葡聚糖酶在毕赤酵母中的表达[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013: 5-10.
- [24] FENG Jianwei, XU Shenyuan, FENG Ruirui, et al. Identification and structural analysis of a thermophilic β -1,3-glucanase from compost[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2021, 8(1): 102-112. DOI:10.1186/s40643-021-00449-4.
- [25] MUHAMMED M T, SON Ç D, İZGÜ F. Three dimensional structure prediction of panomyococin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Wickerhamomyces anomalus* NCYC 434 and the computational site-directed mutagenesis studies to enhance its thermal stability for therapeutic applications[J]. Computational Biology and Chemistry, 2019, 80: 270-277. DOI:10.1016/j.compbiolchem.2019.04.006.
- [26] FIBRIANSAH G, MASUDA S, KOIZUMI N, et al. The 1.3 angstrom crystal structure of a novel endo- β -1,3-glucanase of glycoside hydrolase family 16 from *alkaliphilic Nocardiopsis* sp. strain F96[J]. Proteins, 2007, 69(3): 683-690. DOI:10.1002/prot.21589.
- [27] VUONG T V, WILSON D B. Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(2): 195-205. DOI:10.1002/bit.22838.
- [28] ILARI A, FIORILLO A, ANGELACCIO S, et al. Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*-structural basis of substrate recognition[J]. The FEBS Journal, 2009, 276(4): 1048-1058. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06848.x.
- [29] ODA M, INABA S, KAMIYA N, et al. Structural and thermodynamic characterization of endo-1,3- β -glucanase: insights into the substrate recognition mechanism[J]. BBA-Proteins Proteomics, 2018, 1866(3): 415-425. DOI:10.1016/j.bbapap.2017.12.004.
- [30] JENG W Y, WANG N C, LIN C T, et al. Crystal structures of the laminarinase catalytic domain from *Thermotoga maritima* MSB8 in complex with inhibitors essential residues for β -1,3- and β -1,4-glucan selection[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(52): 45030-45040. DOI:10.1074/jbc.M111.271213.
- [31] HONG T Y, HSIAO Y Y, MENG M, et al. The 1.5 angstrom structure of endo-1,3- β -glucanase from *Streptomyces sioyaensis*: evolution of the active-site structure for 1,3- β -glucan-binding specificity and hydrolysis[J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2008, 64: 964-970. DOI:10.1107/s0907444908021550.
- [32] BLEICHER L, PRATES E T, GOMES T C F, et al. Molecular basis of the thermostability and thermophilicity of laminarinases: X-ray structure of the hyperthermostable laminarinase from *Rhodothermus marinus* and molecular dynamics simulations[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(24): 7940-7949. DOI:10.1021/jp200330z.
- [33] LABOUREL A, JAM M, JEUDY A, et al. The β -glucanase ZgLamA from *Zobellia galactanivorans* evolved a bent active site adapted for efficient degradation of algal laminarin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(4): 2027-2042. DOI:10.1074/jbc.M113.538843.
- [34] YANG J, XU Y Q, MIYAKAWA T, et al. Molecular basis for substrate recognition and catalysis by a marine bacterial laminarinase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(23): 15. DOI:10.1128/aem.01796-20.
- [35] WOJTKOWIAK A, WITEK K, HENNIG J, et al. Structures of an active-site mutant of a plant 1,3- β -glucanase in complex with oligosaccharide products of hydrolysis[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2013, 69: 52-62. DOI:10.1107/s0907444912042175.
- [36] RECEVEUR-BRECHOT V, CZJZEK M, BARRE A, et al. Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- β -1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome[J]. Proteins, 2006, 63(1): 235-242. DOI:10.1002/prot.20876.
- [37] UNFRIED F, BECKER S, ROBB C S, et al. Adaptive mechanisms that provide competitive advantages to marine bacteroidetes during microalgal blooms[J]. ISME Journal, 2018, 12(12): 2894-2906. DOI:10.1038/s41396-018-0243-5.

- [38] TAKASHIMA T, TAKU T, YAMANAKA T, et al. Crystal structure and biochemical characterization of CJP38, a β -1,3-glucanase and allergen of *Cryptomeria japonica* pollen[J]. Molecular Immunology, 2019, 116: 199-207. DOI:10.1016/j.molimm.2019.10.016.
- [39] WU H M, LIU S W, HSU M T, et al. Structure, mechanistic action, and essential residues of a GH-64 enzyme, laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(39): 26708-26715. DOI:10.1074/jbc.M109.010983.
- [40] QIN Zhen, YANG Dong, YOU Xin, et al. The recognition mechanism of triple-helical β -1,3-glucan by a β -1,3-glucanase[J]. Chemical Communications, 2017, 53(67): 9368-9371. DOI:10.1039/c7cc03330c.
- [41] GHOSH R, CHAKRABARTI C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein[J]. Planta, 2008, 228(5): 883-890. DOI:10.1007/s00425-008-0790-5.
- [42] HENRISSAT B, GARRON M L. How a glycoside hydrolase recognizes a helical polyglucan[J]. Structure, 2017, 25(9): 1319-1321. DOI:10.1016/j.str.2017.08.004.
- [43] KUMAR K, CORREIA M A S, PIRES V M R, et al. Novel insights into the degradation of β -1,3-glucans by the cellulosome of *Clostridium thermocellum* revealed by structure and function studies of a family 81 glycoside hydrolase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 890-901. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.003.
- [44] ZHOU Peng, CHEN Zhongzhou, YAN Qiaojuan, et al. The structure of a glycoside hydrolase family 81 endo- β -1,3-glucanase[J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2013, 69: 2027-2038. DOI:10.1107/s090744491301799x.
- [45] MA Junwen, QIN Zhen, ZHOU Peng, et al. Structural insights into the substrate recognition and catalytic mechanism of a fungal glycoside hydrolase family 81 β -1,3-glucanase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 153: 109948. DOI:10.1016/j.enzmictec.2021.109948.
- [46] PLUVINAGE B, FILLO A, MASSEL P, et al. Structural analysis of a family 81 glycoside hydrolase implicates its recognition of β -1,3-glucan quaternary structure[J]. Structure, 2017, 25(9): 1348-1359. DOI:10.1016/j.str.2017.06.019.
- [47] BIANCHETTI C M, TAKASUKA T E, DEUTSCH S, et al. Active site and laminarin binding in glycoside hydrolase family 55[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(19): 11819-11832. DOI:10.1074/jbc.M114.623579.
- [48] PAPAGEORGIOU A C, CHEN J, LI D. Crystal structure and biological implications of a glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2017, 1865(8): 1030-1038. DOI:10.1016/j.bbapap.2017.05.002.
- [49] JIA X, WANG C, DU X, et al. Specific hydrolysis of curdlan with a novel glycoside hydrolase family 128 β -1,3-endoglucanase containing a carbohydrate-binding module[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 253: 117276-117286. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.117276.
- [50] SANTOS C R, COSTA P, VIEIRA P S, et al. Structural insights into β -1,3-glucan cleavage by a glycoside hydrolase family[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(8): 920-929. DOI:10.1038/s41589-020-0554-5.
- [51] GASTEBOIS A, AIMANIANDA V, BACHELLIER-BASSI S, et al. SUN proteins belong to a novel family of β -(1,3)-glucan-modifying enzymes involved in fungal morphogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(19): 13387-13396. DOI:10.1074/jbc.M112.440172.
- [52] DÉJEAN G, TAMURA K, CABRERA A, et al. Synergy between cell surface glycosidases and glycan-binding proteins dictates the utilization of specific β (1,3)-glucans by human gut *Bacteroides*[J]. mBio, 2020, 11(2): 1-21. DOI:10.1128/mBio.00095-20.
- [53] YAN F, YE X L, LI C H, et al. Isolation, purification, gene cloning and expression of antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* MG-3[J]. Food Chemistry, 2021, 349: 7. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129130.
- [54] FESEL P H, ZUCCARO A. β -Glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 90: 53-60. DOI:10.1016/j.fgb.2015.12.004.
- [55] 娄树宝, 彭东君, 王辉. 大豆 β -1,3-葡聚糖酶的抑菌活性[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008(3): 27-29. DOI:10.3969/j.issn.1002-2090.2008.03.008.
- [56] 陈小云, 李坚斌, 林莹, 等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在热带水果保鲜中的应用[J]. 食品工业科技[J]. 食品工业科技, 2008(5): 294-296. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2008.05.078.
- [57] RAJNINEC M, FRATRIKOVA M, BOSZORADOVA E, et al. Basic β -1,3-glucanase from *Drosera binata* exhibits antifungal potential in transgenic tobacco plants[J]. Plants, 2021, 10(8): 1747-1762. DOI:10.3390/plants10081747.
- [58] LI Kuikui, CHEN Wei, WANG Wenxia, et al. Effective degradation of curdlan powder by a novel endo- β -1,3-glucanase[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 122-130. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.08.048.
- [59] 吕丽丽, 王瑞宾, 王家林, 等. 高效 β -葡聚糖酶对麦汁过滤速度的影响[J]. 酿酒科技, 2010(3): 75-77. DOI:10.13746/j.njkj.2010.03.028.
- [60] 林开江, 阮丽娟, 王龙英. 用纤维素酶制备酵母菌原生质体的研究[J]. 科技通报, 1996, 12(2): 118-121.
- [61] 段会轲, 熊善柏, 刘海梅. 酵母 β -1,3-葡聚糖的酶法增溶及产物分析[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 185-189. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.01.037.
- [62] NETT J, LINCOLN L, MARCHILLO K, et al. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(2): 510-520. DOI:10.1128/aac.01056-06.
- [63] MITCHELL K F, TAFF H T, CUEVAS M A, et al. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-albicans *Candida* Biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(4): 1918-1920. DOI:10.1128/aac.02378-12.
- [64] MAUCH F, MAUCH-MANI B, BOLLER T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3): 936-942. DOI:10.1104/pp.88.3.936.
- [65] COTA I E, TRONCOSO-ROJAS R, SOTELO-MUNDO R, et al. Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(1): 42-50. DOI:10.1016/j.scienta.2006.12.005.