

微生物来源的 β -甘露聚糖酶的研究与应用进展

郑豪蕾, 王晓倩, 李玉梅, 高娟

(济南大学 生物科学与技术学院, 山东 济南 250022)

摘要 甘露聚糖是软木半纤维素的主要组成成分, 广泛存在于植物组织中。 β -甘露聚糖酶是最关键的甘露聚糖降解酶, 以内切方式催化甘露聚糖中 β -1,4-连接的甘露糖苷键的水解。 β -甘露聚糖酶在植物、动物、真菌、细菌和放线菌中均存在。微生物来源的 β -甘露聚糖酶能在较宽的pH和温度范围中发挥催化活性, 因此在食品、制药、饲料、造纸、生物炼制等行业具有广泛的应用前景。从 β -甘露聚糖酶的微生物来源、分类、酶学性质、分子改造和实际应用等方面进行综述, 并对微生物来源的 β -甘露聚糖酶的未来研究方向进行展望, 为微生物 β -甘露聚糖酶的研究与应用提供理论基础。

关键词 微生物 β -甘露聚糖酶; 酶学性质; 分子改造; 工业应用

中图分类号 Q936

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study and Application of Microbial β -mannanases

ZHENG Haolei, WANG Xiaoqian, LI Yumei, GAO Juan

(School of Biological Sciences and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, China)

Abstract Mannan is the main component of cork hemicellulose and widely exists in plant tissues. β -Mannanase is the most critical mannan-degrading enzyme, which catalyzes the hydrolysis of β -1,4-linked mannosidic bonds in mannans in an endo-acting manner. β -Mannanases are found in plants, animals, bacteria, fungi and actinomycetes. Microbial derived β -mannanase can exert catalytic activity in a wide range of pH and temperature, so it has a wide range of application prospects in food, pharmaceutical, feed, paper, biorefinery and other industries. In the present article, the microbial origin, classification, enzymatic properties, molecular modification and practical application of β -mannanases were reviewed, the future research direction of microbial β -mannanases was prospected. This review will provide a theoretical basis for the research and application of microbial β -mannanase.

Key words microbial β -mannanase; enzymatic property; molecular modification; industrial application

1 引言

甘露聚糖是半纤维素的重要组成成分, 广泛存在于硬木、软木及豆科植物的种子中^[1]。甘露聚糖可以作为结构多糖参与维持植物细胞结构的完整性, 也作为贮存多糖存在于多种植物种子的胚乳和营养组织的液泡中^[2]。不同植物来源的甘露聚糖结构差异较大。按照单糖组成及连接方式的不同, 甘露聚糖可以分为以

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 国家自然科学基金-山东省联合基金项目(U1806222)资助

通讯作者: 高娟, 女, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物酶学, E-mail: bio_gaoj@ujn.edu.cn。

下四类:线性甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖^[3]。甘露聚糖结构复杂,其完全降解需要多种水解酶协同作用(图1)。甘露聚糖降解酶包括 β -1,4-D-甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78), β -1,4-D-甘露糖苷酶(EC 3.2.1.25), β -1,4-D-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)、 α -1,6-D-半乳糖苷酶(EC3.2.1.22)、甘露聚糖乙酰酯酶(EC3.1.1.6)等^[4]。甘露聚糖降解酶包含不同的糖基水解酶(GH)家族成员,如GH1、GH2、GH3、GH5、GH26、GH27、GH113等。其中, β -1,4-D-甘露聚糖酶(β -甘露聚糖酶)是甘露聚糖水解过程中最关键的酶。 β -甘露聚糖酶以内切方式随机水解 β -甘露聚糖主链上的 β -1,4-糖苷键,产生不同聚合度的寡糖,如甘露寡糖、葡甘露寡糖、半乳甘露寡糖和半乳葡甘露寡糖等。随后, β -甘露糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶作为外切酶,水解这些寡糖非还原端的 β -1,4-糖苷键,释放甘露糖和葡萄糖。 α -半乳糖苷酶催化水解半乳甘露寡糖和半乳甘露聚糖中以 α -1,6-糖苷键连接的半乳糖侧链,甘露聚糖乙酰酯酶则可以水解半乳葡甘露聚糖中的乙酰基侧链。在这一系列酶的协同作用下,甘露聚糖被降解成寡糖和单糖。

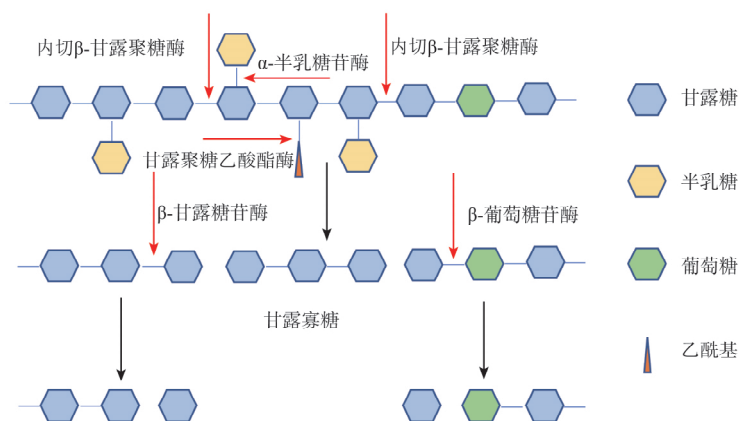


图1 甘露聚糖降解过程图^[5]

近年来的研究表明, β -甘露聚糖酶在石油勘探、洗涤、纺织、食品、动物饲料和生物乙醇炼制等领域具有广泛的应用价值。 β -甘露聚糖酶在自然界中广泛存在,在豆类植物、蜗牛等低等动物、细菌、真菌等微生物中均有发现^[6],其中微生物来源的 β -甘露聚糖酶种类最丰富。微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有产量高、成本低、提取简单等优势,被认为具有较大的应用潜力。本文将从微生物中 β -甘露聚糖酶的来源、性质、应用等方面进行综述,并对微生物来源的 β -甘露聚糖酶的未来研究方向进行展望。

2 β -甘露聚糖酶在微生物中的来源分布

多数微生物来源的 β -甘露聚糖酶属于胞外酶。在甘露聚糖的诱导下微生物产生 β -甘露聚糖酶,并将其分泌至环境中用以降解甘露聚糖。由于微生物来源的 β -甘露聚糖酶稳定性高、培养容易、生产成本低、易于基因操作等优点,大多数商品化的 β -甘露聚糖酶都来源于微生物。细菌来源的 β -甘露聚糖酶最早从芽孢杆菌属(*Bacillus*)发现^[7],后来在双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)等发现。例如,郭金玲等^[8]以魔芋粉为唯一碳源筛选出高产胞外 β -甘露聚糖酶的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。在放线菌中,链霉菌属(*Streptomyces*)和诺卡菌属(*Nocardioideis*)显示出明显的甘露聚糖降解能力。邱振华等^[9]从放线菌中的链霉菌中得到 β -甘露聚糖酶。真菌 β -甘露聚糖酶主要来源于曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和木霉属(*Trichoderma*),其它真菌如毛壳菌属(*Chaetomium*)及根毛霉属(*Rhizomucor*)等分泌的 β -甘露聚糖酶也被报道。例如,Jianhua Xie等^[10]发现了来自横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)的 β -甘露聚糖酶基因,Cunduo Tang等^[11]从米曲霉RIB40(*A. oryzae*)中得到 β -甘露聚糖酶,Cai等^[12]从酸性废水中分离到的嗜松青霉(*P. pinophilum*)菌株中得到了 β -甘露聚糖酶基因。此外,一些特殊生境中的微生物也被报道具有 β -甘露聚糖酶活性。例如,极端嗜热枯草芽孢杆菌、嗜热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacterium aotearoense* P8G3 #4、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、嗜热真菌莱特塔拉菌(*Talaromyces leycettanus*)等都被报道能够分泌嗜热 β -甘露聚糖酶,这些酶具有良好的工业应用潜力。

3 微生物 β -甘露聚糖酶的分类及催化机制

根据氨基酸序列相似性,在 CAZy 数据库(<http://www.cazy.org/>)中将 β -甘露聚糖酶分为四个糖苷水解酶家族,即 GH5、GH26、GH113 和 GH134 家族。大部分动植物和真菌来源的 β -甘露聚糖酶和部分细菌来源的 β -甘露聚糖酶属于 GH5 家族。多数细菌 β -甘露聚糖酶和少数真菌 β -甘露聚糖酶属于 GH26 家族。GH113 家族的 β -甘露聚糖酶主要来源于脂环酸芽孢杆菌等少数细菌。直到 2015 年,Shimizu 等^[13]才第一次在构巢曲霉(*A. nidulans*)中发现了 GH134 家族的 β -甘露聚糖酶,随后在微孢根霉(*R. microsporus*)和链霉菌中也发现 GH134 家族的 β -甘露聚糖酶。GH5、GH26 和 GH113 家族的 β -甘露聚糖酶的分子结构和催化机制均类似。这三个家族的 β -甘露聚糖酶均属于 GH-A 超家族,呈现典型的 $(\beta/\alpha)_8$ -TIM 桶状结构(图 2)。它们的催化机制为保留型,反应过程遵循经典的 Koshland 双置换机制,异头碳的构象被保留(图 3)。催化位点是两个高度保守的谷氨酸残基,分别作为亲核试剂和广义酸碱分布在催化凹槽内的第 4 和第 7 个 β 折叠上。此外,这些 β -甘露聚糖酶催化凹槽的-1 位均含有一个保守的色氨酸残基,作为疏水基团稳定底物糖环。GH134 家族 β -甘露聚糖酶的催化机制与其它三个家族的 β -甘露聚糖酶不同。对来源于链霉菌属的 GH134 家族 β -甘露聚糖酶 SsGH134 研究可知^[14],该酶的 α/β 折叠方式与 GH22 家族的 C 型溶菌酶相似。该酶的催化机制为反转型,第 45 位的谷氨酸残基和第 57 位的天冬氨酸分别作为广义酸和广义碱,反应后底物异头碳的构象发生转变。



图 2 β -甘露聚糖酶的三维结构特征:以枯草芽孢杆菌中 Man26 为例(PDB 登录号:2WHK)^[15]

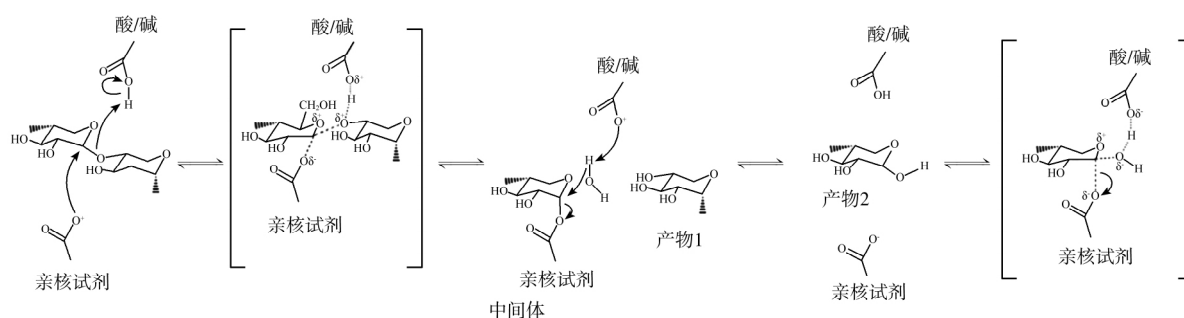


图 3 β -甘露聚糖酶的催化机制^[16]

4 微生物来源 β -甘露聚糖酶的水解性质

β -甘露聚糖酶水解甘露聚糖,可产生分子量减小的甘露聚糖、甘露寡糖(mannooligosaccharides, MOS)及甘露糖。来源于米黑根毛霉(*R. miehei*)的 β -甘露聚糖酶 mMan5A 降解瓜尔豆胶,产物的重均分子量为 25 ku^[17]。一些 β -甘露聚糖酶的水解产物主要为聚合度在 2~6 之间的甘露寡糖。而肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)来源的 β -甘露聚糖酶水解甘露聚糖产生甘露糖^[18]。多数 β -甘露聚糖酶催化水解的最小底物为甘露三糖,可以将其降解为甘露二糖和甘露糖;也有一些 β -甘露聚糖酶具有糖苷酶活性,可以催化水解甘露二糖产生甘露糖。此外,两个最新发现的 GH134 家族的 β -甘露聚糖酶的最小水解底物为甘露五糖^[19,20]。

5 微生物来源 β -甘露聚糖酶的理化性质

来自不同微生物的 β -甘露聚糖酶的分子量、最适温度、最适 pH、比活力、抑制剂与激活剂等存在一定的差异(表 1)。

5.1 微生物来源 β -甘露聚糖酶的分子量

微生物来源 β -甘露聚糖酶的分子量一般集中在 30~55 ku 之间^[21]。例如来自耐高温芽孢杆菌属 β -甘

露聚糖酶 ManS2 的分子量为 38 ku^[22]。从降解海藻的海洋细菌 KIT-YO10 分离出的 β -甘露聚糖酶的分子量为 44.3 ku^[23]。但也存在低分子量的 β -甘露聚糖酶,如从青霉 Pol6 分离纯化后得到的 β -甘露聚糖酶分子量为 18 ku^[24]。

5.2 微生物来源 β -甘露聚糖酶的最适温度

不同工业生产对 β -甘露聚糖酶的最适温度要求不同。例如,果汁澄清通常在低温下进行,而石油钻井作业时,要求 β -甘露聚糖酶能在较高的温度下发挥催化活性。微生物中 β -甘露聚糖酶的最适温度一般在 40~65 °C 之间^[4],超过最适温度酶活性逐渐下降,有的 β -甘露聚糖酶具有耐高温的性质,如从热泉中筛选出的极端嗜热枯草芽孢杆菌,其分泌的耐高温 β -甘露聚糖酶最适温度为 50 °C,可耐受 90 °C 高温^[25]。有的低温活性酶最适温度为 40 °C,在 20 °C 仍具有较好的活性^[26]。

5.3 微生物来源 β -甘露聚糖酶的最适 pH

微生物中 β -甘露聚糖酶的最适 pH 在 4.0~7.0 之间^[4],但细菌与真菌的最适 pH 范围有所差异。细菌中的 β -甘露聚糖酶最适 pH 偏碱性,在 6.0~9.0 较稳定^[27]。而有的细菌分泌的 β -甘露聚糖酶其最适 pH 值高达 9.5,并能在碱性 pH 范围内保持稳定^[28]。真菌 β -甘露聚糖酶的最适 pH 值较细菌的低,一般 pH 在 4.5~5.5 之间^[6]。有的真菌 β -甘露聚糖酶 pH 在 3.0~7.0 时保持了较高活力,能适应较宽的酸性 pH 范围^[12]。

5.4 β -甘露聚糖酶的动力学参数

一般以刺槐豆胶、瓜尔胶、魔芋粉为底物测定微生物来源的 β -甘露聚糖酶的米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})。吴襟等人^[29]以槐豆胶、瓜尔胶、魔芋胶为底物,计算来自诺卡氏菌形放线菌(*Nocardioform Actinomycetes*)的 β -甘露聚糖酶 ManNA 的 K_m 和 V_{max} 值,其中以槐豆胶为底物的 K_m 值最小,为 1.75 mg·mL⁻¹, V_{max} 值为 2 485 μ mol·min⁻¹·mg⁻¹,说明 ManNA 对槐豆胶有很好的亲和力。将来自枯草芽孢杆菌 YH12 的 β -甘露聚糖酶以刺槐豆胶为底物,测得其 K_m 值为 30 mg·mL⁻¹, V_{max} 为 16 666.7 U·mg⁻¹^[30]。Parakram Singh Chauhan 纯化来自芽孢杆菌 PN11 的 β -甘露聚糖酶,以刺槐豆胶、瓜尔豆胶和椰油甘露聚糖为底物,测得该酶对刺槐豆胶的亲和力最高, K_m 值和 V_{max} 分别为 7.22 mg·mL⁻¹、750.41 μ mol·mL⁻¹·min⁻¹^[31]。

5.5 微生物来源 β -甘露聚糖酶的抑制剂与激活剂

不同化学试剂、金属离子对不同微生物来源的 β -甘露聚糖酶作用不同。 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ 对来自枯草芽孢杆菌 BE-91 甘露聚糖酶具有显著的激活作用, K^+ 和 Fe^{3+} 对酶活影响不大, Ba^{2+} 和 Pb^{2+} 对酶活性有显著的抑制作用^[32]。而对于来自链霉菌属的 β -甘露聚糖酶, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对其有明显的抑制作用^[33]。 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对来自青霉菌 Pol6 的 β -甘露聚糖酶 ManIII 有明显的激活作用,而 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、EDTA 对其有明显的抑制作用^[24]。

6 微生物来源 β -甘露聚糖酶的异源表达及分子改造

由于天然菌株诱导产生 β -甘露聚糖酶所需底物昂贵且耗时长,通过基因克隆技术将 β -甘露聚糖酶基因克隆到异源宿主细胞中表达,从而实现 β -甘露聚糖酶快速、大量的生产,越来越受到人们的关注。大肠杆菌和毕赤酵母分别是细菌和真菌来源的 β -甘露聚糖酶最常用的异源表达宿主。此外,枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌、解脂耶氏酵母等也可用于细菌 β -甘露聚糖酶的克隆表达。米曲霉和里氏木霉等也被报道用于真菌 β -甘露聚糖酶的异源表达。一些动植物细胞也可作为微生物 β -甘露聚糖酶的表达宿主。韦跃华等人^[50]将里氏木霉内切 β -甘露聚糖酶基因基因转化到毕赤酵母中,得到具有较高酶活力的菌株。Huiying Luo 等人^[41]从双孢真菌中克隆 β -甘露聚糖酶,并使其在毕赤酵母中表达,所得酶活性达到 500 U·mL⁻¹,并且对胃蛋白酶和胰蛋白酶以及大多数金属离子和几种化学试剂具有很高的抵抗力。邱振华等人^[9]从链霉菌中克隆 β -甘露聚糖酶 S221 基因并在大肠杆菌中表达,所得酶 pH 在 5.0~9.0 之间较稳定,且具有抗蛋白酶降解的特性。从芽孢杆菌 CFR1601 中克隆得到 GH26 家族的 β -甘露聚糖内切酶基因并在大肠杆菌 BL21 中表达,所得酶具有金属依赖性,且耐热性良好^[55]。Kaira 等^[56]将来源于芽孢杆菌的 β -甘露聚糖酶 ManB-1601 在大肠杆菌中表达,对发酵条件优化后该酶的表达水平达 8 406 U·mL⁻¹(1 U 定义为标准反应条件下每分钟释放 1 μ mol 甘露糖所需的酶量),是目前报道的大肠杆菌表达 β -甘露聚糖酶的最高酶活水平。来源于真菌的

RmMan5A 在毕赤酵母中异源表达,经过 168 h 的高密度发酵后,得到迄今为止报道的最高的 β -甘露聚糖酶表达水平,其酶活达到 $85\ 200\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (1 U 定义为标准反应条件下每分钟释放 $1\ \mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量)^[57]。

表 1 部分微生物来源的 β -甘露聚糖酶的酶学性质

来源	菌种拉丁名	最适 pH	pH 稳定性	最适温度 /℃	温度 稳定性	$K_m/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/(\text{s}^{-1})$	参考文献
细菌								
鞘氨醇单胞菌 JB13	<i>Sphingomonas</i>	6.5	60%/pH4.0~8.0/1 h	40	50%/45℃/15 min	5.0(刺槐豆胶)	211.90(刺槐豆胶)	[26]
克劳氏芽孢杆菌 S10	<i>B. clausii</i>	9.5	50%/pH7.0~11.5/6 h	75	80%/80℃/1 h	0.62(魔芋葡甘露聚糖)	1 238.90(魔芋葡甘露聚糖)	[34]
类芽胞杆菌 DZ3	<i>Paenibacillus</i>	5.0	80%/pH5.0~7.0/1 h	60	100%/60℃/1 h	1.05(葡甘露聚糖)	—	[35]
枯草芽孢杆菌 WY34	<i>B. subtilis</i>	6.0	90%/pH5.5~10.1/30 min	65	90%/60℃/30 min	7.60(刺槐豆胶)	640.40(刺槐豆胶)	[36]
尼氏芽孢杆菌 PN-11	<i>B. nealsonii</i>	8.8	85%/pH5.0~10.0/3 h	65	100%/60℃/3 h	7.22(刺槐豆胶)	—	[31]
链球菌 CGMCC 7283	<i>Streptococcus</i>	6.0	50%/pH8.0/32 h	80	50%/80℃/46 h	—	—	[37]
短小芽孢杆菌 GBSW19	<i>B. pumilus</i>	6.5	60%/pH5.0~11.0/1 h	65	50%/60℃/12 h	2.14(刺槐豆胶)	—	[38]
干酪乳杆菌 HDS-01	<i>Lactobacillus casei</i>	5.0	50%/pH5.0~7.0/3 h	40	80%/60℃/1 h	2.68(刺槐豆胶)	40.10(刺槐豆胶)	[39]
肺炎克雷伯菌 SS11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.0	70%/pH7.0~10.6/30 min	70	100%/60℃/60 min	1.66(刺槐豆胶)	1 190.47(刺槐豆胶)	[40]
肠杆菌 N18	<i>Enterobacteriaceae</i>	7.5	60%/pH3.0~10.0/4 h	50	95%/50℃/1 h	3.427(刺槐豆胶)	—	[18]
真菌								
双孢真菌 MEY-1	<i>Agaricus bisporus</i>	1.0~1.5	92%/pH0.5~11.0/1 h	65	70%/60℃/1 h	1.56(刺槐豆胶)	—	[41]
绿木霉 UKM1	<i>T. virens</i>	5.0	60%/pH3.0~9.0/30 min	70	60%/20~60℃/30 min	1.49(刺槐豆胶)	—	[42]
米曲霉	<i>A. oryzae</i>	6.0	75%/pH5.0~10.0/90 min	30	50%/90℃/30 min	1.10(魔芋粉)	620(魔芋粉)	[43]
嗜热毁丝霉	<i>Myceliophthora thermophila</i>	6.0	88%/pH4.0~10.0/24 h	60	50%/60℃/14.4 h	2.22(角豆半乳甘露聚糖)	—	[44]
草酸青霉 GZ-2	<i>P. oxalicum</i>	4.0	80%/pH3.0~7.0/30 min	80	50%/60℃/58 h	7.60(刺槐豆胶)	1 463.50(刺槐豆胶)	[45]
瓶霉菌属 P13	<i>Phialophora</i>	1.5	60%/pH1.5~7.0/2 h	60	83%/55℃/2 h	2.50(刺槐豆胶)	—	[46]
黑曲霉 BK01	<i>A. niger</i>	4.5	50%/pH4.5/56 h	80	98%/70℃/4 h	0.60(魔芋葡甘聚糖)	215(魔芋葡甘聚糖)	[47]
新萨托菌属 HBFH9	<i>Neosartorya</i>	4.0	75%/pH2.0~10.0/1 h	60	80%/50℃/1 h	1.26(角豆胶)	—	[48]
构巢曲霉	<i>A. nidulans</i>	6.0	—	30	—	1.20(葡甘露聚糖)	390(葡甘露聚糖)	[13]
宇佐美曲霉 YL-01-78	<i>A. usamil</i>	3.0	pH3.0~7.0/1 h	70	85%/60℃/1 h	1.36(刺槐豆胶)	—	[49]

续表 1 部分微生物来源的 β -甘露聚糖酶的酶学性质

来源	菌种拉丁名	最适 pH	pH 稳定性	最适温度 /℃	温度 稳定性	$K_m/(mg \cdot mL^{-1})$	$k_{cat}/(s^{-1})$	参考文献
青霉菌 PoI6	<i>Penicillium</i>	4.0	70%/pH4.0~ 10.0/24 h	40	50%/70℃/30 min	17.94(刺槐豆胶)	28.13(刺槐豆胶)	[24]
里氏木霉	<i>Trichoderma reesei</i>	5.0	90%/pH5.0~ 6.0/24 h	80	50%/70℃/30 min	—	—	[50]
米黑根毛霉	<i>R. miehei</i>	7.0	pH4.0~ 10.0/30 min	65	90%/60℃/30 min	—	—	[17]
嗜松青霉 C1	<i>P. pinophilum</i>	4.0	60%/pH3.0~ 10.0/1 h	70	100%/50℃/1 h	5.60(刺槐豆胶)	—	[12]
放线菌								
链霉菌 (MnSt)	<i>Streptomyces</i>	5.0~12.5	80%/pH 12.0/24 h	50	100%/60℃/1 h	0.05(豆胶半乳 甘露聚糖)	—	[51]
链霉菌属 CS428	<i>Streptomyces</i>	12.5	pH5.0~ 12.5/24 h	60	100%/60℃/1 h	1.01(刺槐豆胶半乳 甘露聚糖)	—	[52]
链霉菌 K11	<i>Streptomyces</i>	6.0	65%/pH5.0~ 9.0/1 h	52	85%/50℃/1 h	101.01(角豆胶)	—	[9]
链霉菌属 NRRL B~24484	<i>Streptomyces</i>	4.0~6.5	80%/pH3.0~ 10.0/90 min	40	30%/100℃/2 h	2.80(葡 甘露聚糖)	340(葡 甘露聚糖)	[14]
链霉菌 属 S27	<i>Streptomyces</i>	7.0	80%/pH5.0~ 9.0/1 h	65	100%/50℃/1 h	0.16(刺槐豆胶)	—	[53]
鲜黄链 霉菌 NR	<i>S. galbus</i>	6.5	90%/pH5.5~ 7.5/1 h	40	80%/50℃/30 min	—	—	[54]

注:“—”表示未测。

蛋白质融合表达目前也用于 β -甘露聚糖酶的异源表达。将来自不同蛋白质的部分基因片段整合在一起,经过基因克隆和表达,可以产生具有新的酶学特性的融合蛋白。例如将来自蓝状菌(*Talaromyces*)的 β -甘露聚糖酶基因与木聚糖酶基因进行融合并在毕赤酵母中表达,产生新的同时具有 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶活性的融合酶^[1]。这种融合酶提高了木聚糖酶的热稳定性,有利于降解半纤维素,促进 β -甘露聚糖酶在工业生产中的应用。此外,密码子优化也被用于进一步提高 β -甘露聚糖酶的异源表达水平。Lv 等^[58]将芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶基因进行密码子优化并与改造的 α -因子信号肽连接,该融合蛋白在毕赤酵母中表达,较改造前表达水平提高了 2 倍。Eom 等^[59]将枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶与六种不同的 C 端信号肽融合后,使用 ATP 结合盒在大肠杆菌中进行分泌表达,发现其中一个信号肽可以有效提高该酶的分泌表达量。Tang 等^[49]利用双质粒系统 pPIC9K、pPICZ α 在毕赤酵母中表达宇佐美曲霉 β -甘露聚糖酶 *AuMan5A*,其表达水平较单质粒系统 pPIC9K 的表达水平提高了 1.4 倍。

为了满足工业需要,理想的 β -甘露聚糖酶应具有比活性高、热稳定性好、在广泛 pH 范围内具有催化活性以及对化学试剂、金属离子耐受性强等特点。由于大多数天然 β -甘露聚糖酶不具备这些性质,研究者一直致力于对 β -甘露聚糖酶进行分子改造,以增强其稳定性和活性。

Huang 等^[3]以晶体结构为基础,对黑曲霉 β -甘露聚糖酶 *ManBK* 进行理性设计以提高其酶活性。其中, Y216W 突变体的比活力比野生酶增加了 $18 \pm 2.7\%$ 。动力学数据显示, Y216W 突变体和野生型酶的耐热性和最适温度相似,但 Y216W 突变体对魔芋胶和瓜尔豆胶的 k_{cat} 值高于野生型酶。适当的氨基酸取代可以促进底物进入底物结合槽并将其保持在其中,从而提高酶的底物亲和力和催化效率。Li 等人^[60]通过基于计算机预测进行分子对接模拟和结合自由能的计算,根据预测结果对 *Auman5A* 进行理性设计,通过定点突变得到了突变体 *Auman5A* Y111F 和 *Auman5A* Y115F。将野生酶 *Auman5A* 及其突变体在毕赤酵母中表达。突变体 *Auman5A* Y111F 和 *Auman5A* Y115F 的 pH 和温度曲线类似于野生酶。以瓜尔豆胶作为底物时,与野生酶相比, reAuMan5AY115F 和 reAuMan5AY111F 的 K_m 值下降约 47%, 它们的催化效率分别提高了 0.7

和0.5倍。Li等^[61]通过易错PCR和DNA shuffling技术改造米黑根毛霉 β -甘露聚糖酶RmMan5A,经过两轮筛选后,得到了在高温和酸性条件下具有优异催化活性的突变体mRmMan5A。与野生型酶相比,该突变体的最适温度提高了10℃,最佳pH向酸性范围偏移了2.5单位。此外,在高温、酸性反应条件下,该突变体对不同甘露聚糖底物的催化效率(k_{cat}/K_m)较野生酶相比增加了三倍以上。研究结果提示该酶可能在生物精炼工业中具有应用潜力。对芽孢杆菌属MK-2的 β -甘露聚糖酶Bman26进行随机诱变以获得具有更高比活力的酶。在易错PCR的帮助下,构建突变体文库并得到三个比活力显著增强的突变体。其中K291E的比活力较野生酶提高3.5倍。L211I和Q112R突变体对魔芋葡甘露聚糖的催化效率分别提高了约80%和200%。对突变体的结构和功能分析表明,以突变体Q112R为例,突变体的Gln112和Thr75之间不能形成氢键,这种小的构象变化可能会导致底物结合和某些酶特性的显著变化^[62]。Couturier等人^[63]使用随机诱变对柄孢霉的GH26家族的 β -甘露聚糖酶PaMan26A进行分子改造,得到5个比活力显著提高的突变体。其中双突变体PaMan26A-P140L/D416G的 k_{cat}/K_m 较野生酶增加了30%。这是由于P140L突变引起接头柔性增加,而D416G突变则促进底物进入活性位点,从而使PaMan26A-P140L/D416G的催化效率提高。三重突变体PaMan5A-W36R/I195T/V256A的催化效率较野生酶增加了1.8倍。

7 微生物来源 β -甘露聚糖酶的应用

7.1 在食品行业的应用

近年来,由于消费者健康意识的增加,对天然果汁消费的偏好有所增加。然而生果汁粘稠、浑浊,通常在储存期间沉淀。因此在果汁生产过程中必须进行澄清处理。天然果汁的粘度和浊度主要由果胶、淀粉、纤维素和半纤维素引起。使用微生物来源的多糖降解酶水解这些化合物,除了能使果汁具有良好的储存稳定性,还可以生产出更适合消费者口味的果汁。 β -甘露聚糖酶通过水解果汁中半纤维素的甘露聚糖部分,降低其粘度并释放其中的水分,促进果汁的流出并增加果汁产量。不同的研究调查了 β -甘露聚糖酶降低不同果汁(如苹果、葡萄、猕猴桃、桃、石榴和橙汁)的粘度和浊度的效果。从绿色魏斯氏菌LB37(*Weissella viridescens*)中分离到的 β -甘露聚糖酶对不同水果的果汁澄清有效,与对照相比,葡萄、桃、橙子、石榴、猕猴桃和苹果的澄清率分别为112.7%、108.97%、107.8%、110.0%、117.21%和109.2%^[64]。从香肠样品中分离出一种来自短小芽孢杆菌M27的耐热、耐碱性 β -甘露聚糖酶。这种 β -甘露聚糖酶在30~80℃和pH 3~11的范围内高度稳定。在不同的果汁中,用该 β -甘露聚糖酶澄清苹果汁的产率最高,达154%^[65]。Zhao等^[66]从干酪乳杆菌HDS-01中分离的 β -甘露聚糖酶可显著提高不同果汁(梨汁、橙汁和苹果汁)的澄清度和产量。与对照组相比,干酪乳杆菌HDS-01粗 β -甘露聚糖酶处理产生的苹果汁、橙汁和梨汁的产量比分别为132.5%、156%和151.04%。对于橙汁澄清,与对照相比,应用纯化的干酪乳杆菌HDS-01 β -甘露聚糖酶可获得(47.55±0.02)%的澄清度和(188.20±0.40)%的产率。对于苹果汁的澄清,使用HDS-01 β -甘露聚糖酶的澄清度为(72.30±0.04)%,产率为(150.96±0.40)%^[39]。陈伟等^[48]将柿子、葡萄、橘子、苹果、桃子等水果样品榨汁处理,将2 mL β -甘露聚糖酶NsMan5B添加到10 g果汁中,将灭活的酶加入果汁中作为对照,在660 nm波长处测定吸光度,发现 β -甘露聚糖酶NsMan5B能提高除了橘子汁外其它果汁的澄清度,其中对柿子汁澄清度的提高效果最好。

7.2 在畜牧行业的应用

家禽饲料一般为玉米-豆粕或小麦-豆粕类型。饲料中含有的非淀粉多糖如 β -甘露聚糖是家禽的抗营养因子,不易被家禽消化,增加家禽的肠道粘度。研究表明,在家禽饲料中添加 β -甘露聚糖酶可以提高家禽体重和饲料利用率,并能够改善家禽肠道环境,提高家禽免疫力。

在饲喂不同水平半乳甘露聚糖的肉鸡日粮中, β -甘露聚糖酶提高生长性能和回肠可消化能(IDE),降低肠道粘度。并且这种有益作用与膳食中半乳甘露聚糖的浓度相关。齐珂珂等^[67]通过在日粮中添加0、50 mg/kg和100 mg/kg β -甘露聚糖酶,发现添加50 mg/kg和100 mg/kg β -甘露聚糖酶的猪体重分别比不添加增加了0.11%和9.20%,添加100 mg/kg β -甘露聚糖酶的猪日采食量增加了8.33%,饲料增重比降低8.46%。C. Kong等^[68]也证明了 β -甘露聚糖酶对肉鸡增重、能量利用率有正效应。说明添加 β -甘露聚糖酶一定程度上能增加家禽的体重和饲料利用率。

β -甘露聚糖酶可以分解 β -甘露聚糖产生甘露寡糖,减少 β -甘露聚糖与水分子的结合,促进家禽肠道蠕动,防止食物堆积。甘露寡糖可以与大肠杆菌等有害菌表面外源凝集素结合,抑制有害菌与肠道上的受体接触,有效阻止病原菌的繁殖,同时作为营养物质促进有益菌如双歧杆菌和乳酸菌大量增殖,保持肠道环境的酸碱平衡。乔海云等^[69]在饲料中分别添加 0.03%、0.06%、0.1% 的 β -甘露聚糖酶,发现,随着 β -甘露聚糖酶浓度的增加,无论是公鸡还是母鸡,其肠道中的大肠杆菌显著减少,乳酸杆菌的数量逐渐增加,pH 降低。黄铁生^[70]通过向日粮中添加 β -甘露聚糖酶后将肉鸡空腹宰杀,测定其免疫器官指数和 NDV 抗体水平,发现较对照组,实验组法氏囊指数、脾脏指数、胸腺指数、抗体水平都得到不同程度的提高。脾脏是外周免疫器官,法氏囊和胸腺是中枢免疫器官,该实验说明 β -甘露聚糖酶分解甘露聚糖产生的甘露寡糖对机体免疫力具有增强作用。

7.3 在造纸行业的应用

大多数纸浆来自软木,其中含有约 15%~20% 的以半乳甘露聚糖的形式存在的半纤维素。在造纸过程中通常对纸浆进行漂白,也就是用化学物质处理植物纤维达到去除木质素或木质素脱色的效果,从而增加白度。这一过程通常需要使用二氧化氯释放氧原子氧化木质素发色集团。尽管随着工艺的优化,漂白废水毒性较低,对环境污染较小,但二氧化氯制备的方法需要大量的化学药品,工艺复杂。研究表明也可以通过使用半纤维素酶降解纤维表面的半纤维素如木聚糖和甘露聚糖,打开纸张纤维的结构,使木质素易于去除,从而减少后续步骤中使用的化学药品量。 β -甘露聚糖酶对软木纸浆中的半乳甘露聚糖具有高度特异性,因此可以应用于纸浆和造纸工业。

β -甘露聚糖酶在纸张漂白中一般与木聚糖酶协同使用。Amany L. Kansoh 等^[54]依次或同时添加木聚糖酶和甘露聚糖酶对软木牛皮纸浆进行酶促预处理,发现同时处理比逐步处理在 8 h 内具有更大的水解活性,它防止了由于较长的反应时间而导致的纸浆纤维的进一步水解。Patel 和 Dudhagara 等^[71]预先用变异白蚁菌 UD-6(*Isoptericola variabilis*)来源的木聚糖酶、 β -甘露聚糖酶、果胶酶的混合物处理稻草浆,然后用 0.25% EDTA、0.5% H_2O_2 进行漂白,该处理能增加酚类化合物、还原糖和疏水化合物的释放,并降低卡伯值,可以减少漂白过程中化学品的使用,具有成本效益和环境友好性。

由于纸浆漂白通常在碱性和高温条件进行,具有热稳定性且能在广泛 pH 值范围内具有活性的酶在纸浆和造纸工业中具有重要的应用价值。在硫酸盐法制浆工艺中,还要求酶能抵抗蛋白酶的水解。Man5A 能抵抗糜蛋白酶、胰蛋白酶、胶原酶、蛋白酶 K 和枯草杆菌素 A 的水解,在共同孵育 30 或 60 min 后,其催化效率保持在 97% 以上^[72]。从 *Bacillus* sp. CSB39 中分离并鉴定了一种耐高温的 β -甘露聚糖酶 MnCSB39。除了在较宽的 pH 值和温度范围内具有活性外,该酶还具有尿素、盐、表面活性剂和蛋白酶耐受性,MnCSB39 耐盐性的提高使其非常适合用于纸浆的生物漂白^[73]。

7.4 在石油钻井行业的应用

由于全球能源需求和供应之间的差距不断扩大,开采石油和天然气经常进行油井压裂。在钻井作业中,需要向油井中加入含有甘露聚糖瓜尔豆胶的压裂液,形成高渗透通道,促进增产。而压裂完成后需要迅速破胶。酶制剂具有高催化能力,加入耐热的 β -甘露聚糖酶将增稠剂降解,从而达到破胶的目的。由于深井中存在地热梯度,耐高温的 β -甘露聚糖酶特别适合石油钻井作业。使用这种酶可以防止瓜尔豆胶在地表水解,而只有井深的环境温度适合酶的活性。大量的研究工作都集中在这种耐热 β -甘露聚糖酶的分离和表征上。据报道,一种新的来自嗜热链球菌的 β -甘露聚糖酶 DtManB 因在高温(80 °C)下表现出良好的活性和稳定性,而在低温下活性低,适合石油钻井作业。即使在不同添加剂存在下,DtManB 也能有效降低羟丙基瓜尔胶溶液的粘度。此外,DtManB 可以充分破坏交联压裂液^[37]。来源于真菌 *Talaromyces trachyspermus* 的热稳定性良好的甘露聚糖酶 TtMan5A 的最适温度为 85 °C,在很宽的 pH 范围内具有良好的催化活性,在钻井作业中具有应用潜力^[74]。从新型肠杆菌 N18 菌株中纯化得到耐盐并且在低温范围内具有活性的 β -甘露聚糖酶,并测试其对含有瓜尔豆胶的压裂液的水解。在 10 min 内,压裂剂的粘度降低了 95% 以上。该酶的最适温度为 50 °C,在 20 °C 时保留 50% 的酶活性,表明该酶在温度低且化学凝胶破坏剂无活性的油井中可能非常有效^[18]。

7.5 在生物乙醇生产中的应用

目前,生物乙醇主要通过微生物发酵木质纤维素材料产生。植物细胞壁一般需要预处理,然后利用微生物水解酶进行酶解。由于甘露聚糖是木质纤维素材料的组成成分,甘露聚糖降解相关的酶可使甘露聚糖降解为甘露糖,然后酵母将甘露糖发酵得到生物乙醇。棕榈仁饼是一种富含甘露聚糖的生物资源,可用于发酵糖提取。优化 β -甘露聚糖酶负载量、时间、pH值、温度和棕榈仁饼浓度等条件的影响,结果表明在最佳条件下 β -甘露聚糖酶水解棕榈仁饼,可发酵糖的总产量为 $71.54 \pm 2.54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该可发酵糖由糖霜梭菌 N1-4 发酵,产生总计 $3.27 \pm 1.003 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生物丁醇^[75]。Li等^[76]用源自米黑根毛霉的 β -甘露聚糖酶 mRmMan5A 处理蒸汽爆破预处理后的棕榈仁饼,以生产低聚甘露糖。mRmMan5A 将超过 80% 的甘露聚糖转化为低聚甘露糖。该研究进行了千克规模的低聚甘露糖生产,产率为 26.1%,说明 mRmMan5A 可用于生物转化富含甘露聚糖的生物质。当 β -甘露聚糖酶与其他碳水化合物降解酶结合使用时,对木质纤维素生物质的生物转化率增高。例如,在商品酶混合物 Novozymes R188 和 Celluclast R1.5 L 中添加嗜热真菌嗜热毁丝霉分泌的 β -甘露聚糖酶 MtMan26A,可有效水解预处理的山毛榉锯末,使总糖释放量增加 13%,葡萄糖释放量增加 12%^[44]。

7.6 在洗涤剂添加剂中的应用

富含甘露聚糖的瓜尔豆胶、刺槐豆胶、魔芋胶等常常被作为增稠剂,应用于洗发水、发胶、口香糖、牙膏等提高黏度。但由于甘露聚糖和纤维素分子具有很强的亲和力,一旦沾染到衣物上,就很难清理。且甘露聚糖会吸附小颗粒型污渍,长时间不清洗,衣物就会变黄。 β -甘露聚糖酶通过降解甘露聚糖为甘露寡糖,使其与纤维素分离,从而起到洗涤作用。近来,碱性 β -甘露聚糖酶在洗涤剂中被用作去污促进剂。使用从肺炎克雷伯菌 SS11 菌株中分离的 β -甘露聚糖酶 ManSS11 进行洗涤性能实验。在洗涤过程结束时对水解产物分析表明, β -甘露聚糖酶在去除刺槐豆胶和粉尘固定菌株时的去污力为 $(80.5 \pm 1.07)\%$,单独使用洗涤剂时去污力仅为 $(30.6 \pm 0.86)\%$ ^[40]。在另一项研究中,用沾有巧克力冰淇淋和番茄酱的棉布测试了源自芽孢杆菌 CFR1601 的 β -甘露聚糖酶的清洁能力。与单独使用洗涤剂相比,与 β -甘露聚糖酶结合的洗涤剂显示出更强的去污能力^[77]。David等^[78]研究了尼氏芽孢杆菌 PN-11 菌株分泌的蛋白酶和 β -甘露聚糖酶作为洗涤剂添加剂的潜力。当使用 β -甘露聚糖酶或蛋白酶时,酶与洗涤剂具有良好的相容性,并且在不同种类的污渍上的洗涤剂性能均能得到改善。然而,当 β -甘露聚糖酶和蛋白酶结合使用时,脱色效率更高。

7.7 在甘露寡糖制备中的应用

研究表明甘露寡糖(MOS)作为益生元可促进肠道有益菌如乳酸杆菌和双歧杆菌的生长。MOS 具有免疫调节及抗过敏作用,此外还被报道具有良好的抗肿瘤活性。研究者采用微生物来源的 β -甘露聚糖酶降解甘露聚糖,制备具有多种生物学活性的 MOS。 β -甘露聚糖酶水解魔芋粉、瓜尔豆胶、田青胶、椰子壳、棕榈粕中的甘露聚糖,生成 MOS。酶法制备甘露寡糖具有高效、特异性强、环境友好等优点,且不破坏低聚糖组成单元的化学结构。者园园等^[79]从耐热枯草芽孢杆菌中克隆出 β -甘露聚糖酶在毕赤酵母中进行表达,该酶酶解魔芋粉、角豆胶生成甘露低聚糖。产黄青霉(*P. chrysogenum*)来源的 β -甘露聚糖酶 PcMan26A 水解魔芋粉得到魔芋甘露寡糖,产品得率为 86.2%,产物主要为聚合度大于 4 的甘露寡糖^[80]。

8 展望

微生物来源的 β -甘露聚糖酶广泛应用于饲料、洗涤剂、生物炼制和纺织等行业,具有广泛的应用前景。目前,国内外已有一些商业化的微生物 β -甘露聚糖酶。例如,来源于枯草芽孢杆菌 WL-1 菌株的 CTCzyme、来源于黑曲霉的 Gamanase 已被用作饲料添加剂。为了满足 β -甘露聚糖酶在不同领域的应用,未来有如下研究重点:(1) 发掘新的产 β -甘露聚糖酶的菌株,特别是能适应极端环境的菌株,例如耐酸、耐冷、耐热、耐盐的产 β -甘露聚糖酶菌株;(2) 对现有的 β -甘露聚糖酶进行结构解析和分子改造,以期得到酶活性高、稳定性好、能耐受有机溶剂及金属离子的突变体;(3) 优化 β -甘露聚糖酶异源表达体系,提高 β -甘露聚糖酶的表达水平,以满足工业生产的要求;(4) 拓展 β -甘露聚糖酶的商业应用范围,尤其是工业生产过程中取代化学品的使用,以满足绿色生产的需求。

参 考 文 献

- [1] 孔海洋, 蒋肖, 王苑, 等. β -甘露聚糖酶 Man5A 和木聚糖酶 Tlxyn11B 的融合表达[J]. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1849-1858.
- [2] MOREIRA L R S, FILHO E X F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(2): 165-178.
- [3] HUANG J W, CHEN C C, HUANG C H, et al. Improving the specific activity of β -mannanase from *Aspergillus niger* BK01 by structure-based rational design[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2014, 1844(3): 663-669.
- [4] 张蕊, 朱虹, 周峻沛, 等. β -甘露聚糖酶分子生物学研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(5): 34-46.
- [5] ERGUN B G, CALIK P. Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 39(1): 1-36.
- [6] 张婕, 赵敏. β -甘露聚糖酶的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(2): 248-250.
- [7] 吴襟, 何秉旺. 微生物 β -甘露聚糖酶[J]. 微生物学通报, 1999(2): 134-136.
- [8] 郭金玲, 张丹阳, 樊雪莲, 等. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选及魔芋低聚糖制备工艺的研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 123-127.
- [9] 邱振华, 石鹏君, 刘素纯, 等. 来源于链霉菌 *Streptomyces fradiae* var. k11 的抗蛋白酶甘露聚糖酶的基因克隆与鉴定[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(4): 114-120.
- [10] XIE J, HE Z, WANG Z, et al. Efficient expression of a novel thermophilic fungal β -mannosidase from *Lichtheimia ramosa* with broad-range pH stability and its synergistic hydrolysis of locust bean gum[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(4): 416-423.
- [11] TANG C-D, SHI H-L, TANG Q-H, et al. Genome mining and motif truncation of glycoside hydrolase family 5 endo- β -1,4-mannanase encoded by *Aspergillus oryzae* RIB40 for potential konjac flour hydrolysis or feed additive[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016 (93/94): 99-104.
- [12] CAI H, SHI P, LUO H, et al. Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(6): 551-557.
- [13] SHIMIZU M, KANEKO Y, ISHIHARA S, et al. Novel β -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans** [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(46): 27914-27927.
- [14] SAKAI K, KIMOTO S, SHINZAWA Y, et al. Characterization of pH-tolerant and thermostable GH 134 β -1,4-mannanase SsGH134 possessing carbohydrate binding module 10 from *Streptomyces* sp. NRRL B-24484[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(3): 287-294.
- [15] TAILFORD L E, DUCROS V M, FLINT J E, et al. Understanding how diverse β -mannanases recognize heterogeneous substrates[J]. Biochemistry, 2009, 48(29): 7009-7018.
- [16] DAWOOD A, MA K. Applications of microbial β -mannanases[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 598630-598646.
- [17] LI Y X, YI P, WANG N N, et al. High level expression of β -mannanase (RmMan5A) in *Pichia pastoris* for partially hydrolyzed guar gum production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 1171-1179.
- [18] YOU J, LIU J F, YANG S-Z, et al. Low-temperature-active and salt-tolerant β -mannanase from a newly isolated *Enterobacter* sp. strain N18[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(2): 140-146.
- [19] JIN Y, PETRICEVIC M, JOHN A, et al. A β -mannanase with a lysozyme-like fold and a novel molecular catalytic mechanism[J]. ACS Central Science, 2016, 2(12): 896-903.
- [20] YOU X, QIN Z, LI Y-X, et al. Structural and biochemical insights into the substrate-binding mechanism of a novel glycoside hydrolase family 134 β -mannanase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2018, 1862(6): 1376-1388.
- [21] 那金, 王瑶, 郭尚旭, 等. 异源表达细菌 β -甘露聚糖酶研究进展[J]. 农学学报, 2017, 7(12): 18-21.
- [22] SEESOM W, THONGKET P, YAMAMOTO T, et al. Purification, characterization, and overexpression of an endo-1,4- β -mannanase from thermotolerant *Bacillus* sp. SWU60[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(3): 53-64.
- [23] HAKAMADA Y, OHKUBO Y, OHASHI S. Purification and characterization of β -Mannanase from *Reinekea* sp. KIT-YO10 with trans-glycosylation activity[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(4): 722-728.
- [24] BLIBECH M, GHORBEL R E, FAKHFAKH I, et al. Purification and characterization of a low molecular weight of beta-mannanase from *Penicillium occitanis* Pol6[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(4): 1227-1240.
- [25] 罗长财, 缪静, 李国莹, 等. 一株产耐高温 β -甘露聚糖酶菌株的筛选鉴定[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(2): 233-237.
- [26] ZHOU J, ZHANG R, GAO Y, et al. Novel low-temperature-active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4- β -mannanase from a new *Sphingomonas* strain[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(5): 568-574.
- [27] 张丹阳, 吕育财, 田毅红, 等. 枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的克隆表达及重组酶性质研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 88-93.
- [28] 汤文晶, 李松, 马忠宝, 等. 碱性 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 50-54.

- [29] 吴襟, 段子渊, 高启禹, 等. 诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的水解特性[J]. 微生物学通报, 2006(4): 31-35.
- [30] LIU H X, GONG J S, LI H, et al. Biochemical characterization and cloning of an endo-1,4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* YH12 with unusually broad substrate profile[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(5): 712-721.
- [31] CHAUHAN P S, SHARMA P, PURI N, et al. Purification and characterization of an alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 and its application in mannooligosaccharides preparation having prebiotic potential[J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(6): 927-936.
- [32] CHENG L, DUAN S, FENG X, et al. Purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Bacillus subtilis* BE-91: potential application in inflammatory diseases[J]. BioMed Research International, 2016(3): 1-7.
- [33] ABDEL-FATTAH A F, HASHEM A M, ISMAIL A, et al. Purification and some properties of β -mannanase from *Aspergillus Oryzae* NRRL 3448[J]. Journal of Applied Sciences Research, 2009, 5(12): 2067-2073.
- [34] ZHOU C, XUE Y, MA Y. Characterization and high-efficiency secreted expression in *Bacillus subtilis* of a thermo-alkaline β -mannanase from an alkaliphilic *Bacillus clausii* strain S10[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 124-142.
- [35] CHANDRA M R S, LEE Y S, PARK I H, et al. Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2011, 54(3): 325-331.
- [36] JIANG Z, YUN W, LI D, et al. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(1): 88-96.
- [37] HU K, LI C X, PAN J, et al. Performance of a new thermostable mannanase in breaking guar-based fracturing fluids at high temperatures with little premature degradation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1215-1226.
- [38] ZANG H, XIE S, WU H, et al. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in mannooligosaccharides (MOS) production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 78: 1-9.
- [39] ZHAO D, ZHANG X, WANG Y, et al. Purification, biochemical and secondary structural characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 and juice clarification potential[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 826-834.
- [40] SINGH S, SINGH G, KHATRI M, et al. Thermo and alkali stable β -mannanase: characterization and application for removal of food (mannans based) stain[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 536-546.
- [41] LUO H, WANG Y, WANG H, et al. A novel highly acidic beta-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(3): 453-461.
- [42] CHAI S Y, ABU BAKAR F D, MAHADI N M, et al. A thermotolerant endo-1,4- β -mannanase from *Trichoderma virens* UKM1: cloning, recombinant expression and characterization[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 125: 49-57.
- [43] SAKAI K, MOCHIZUKI M, YAMADA M, et al. Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(8): 3237-3245.
- [44] KATSIMPOURAS C, DIMAROGONA M, PETROPOULOS P, et al. A thermostable GH26 endo- β -mannanase from *Myceliophthora thermophila* capable of enhancing lignocellulose degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(19): 8385-8397.
- [45] LIAO H, LI S, ZHENG H, et al. A new acidophilic thermostable endo-1,4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*[J]. BMC Biotechnology, 2014, 14(1): 90-101.
- [46] ZHAO J, SHI P, LUO H, et al. An acidophilic and acid-stable β -mannanase from *Phialophora* sp. P13 with high mannan hydrolysis activity under simulated gastric conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(5): 3184-3190.
- [47] BIEN-CUONG D, THI-THU D, BERRIN J G, et al. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 59-70.
- [48] 陈伟, 谷新晰, 黄蕾, 等. 嗜热甘露聚糖酶毕赤酵母工程菌的表达及该酶在果汁澄清中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 81-87.
- [49] TANG C D, GUO J, LI J F, et al. Enhancing expression level of an acidophilic β -mannanase in *Pichia pastoris* by double vector system[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(2): 561-569.
- [50] 韦跃华, 毛爱军, 何永志, 等. 里氏木霉内切- β -甘露聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 2005(6): 26-31.
- [51] YOO H Y, PRADEEP G C, KIM S W, et al. A novel low-molecular weight alkaline mannanase from *Streptomyces tendae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 20(3): 453-461.
- [52] PRADEEP G C, CHO S S, CHOI Y H, et al. An extremely alkaline mannanase from *Streptomyces* sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannooligosaccharides[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(5): 84-92.
- [53] SHI P, YUAN T, ZHAO J, et al. Genetic and biochemical characterization of a protease-resistant mesophilic β -mannanase from *Streptomyces* sp. S27[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(3): 451-458.
- [54] KANSO A L, NAGIEB Z A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103-114.
- [55] SRIVASTAVA P K, APPU RAO G A R, KAPOOR M. Metal-dependent thermal stability of recombinant endo-mannanase (ManB-

- 1601) belonging to family GH 26 from *Bacillus* sp. CFR1601[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 84: 41-49.
- [56] KAIRA G S, PANWAR D, KAPOOR M. Recombinant endo-mannanase (ManB-1601) production using agro-industrial residues: development of economical medium and application in oil extraction from copra[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209: 220-227.
- [57] 李延啸. 米黑根毛霉和微孢根霉 β -甘露聚糖酶的分子改造、高效表达及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [58] LV J, CHEN Y, PEI H, et al. Cloning, expression, and characterization of β -mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(8): 2326-2340.
- [59] EOM G T, OH J Y, PARK J H, et al. Secretory production of enzymatically active endo- β -1,4-mannanase from *Bacillus subtilis* by ABC exporter in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(8): 999-1005.
- [60] LI J, WEI X, TANG C, et al. Directed modification of the *Aspergillus usarii* β -mannanase to improve its substrate affinity by in silico design and site-directed mutagenesis[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(4): 693-700.
- [61] LI Y-X, YI P, YAN Q-J, et al. Directed evolution of a β -mannanase from *Rhizomucor miehei* to improve catalytic activity in acidic and thermophilic conditions[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 143-154.
- [62] ZHANG W, LIU Z, ZHOU S, et al. Cloning and expression of a β -mannanase gene from *Bacillus* sp. MK-2 and its directed evolution by random mutagenesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 124: 70-78.
- [63] COUTURIER M, FÉLIU J, BOZONNET S, et al. Molecular engineering of fungal GH5 and GH26 beta-(1,4)-mannanases toward improvement of enzyme activity[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e79800-e79808.
- [64] ADIGUZEL G, SONMEZ Z, ADIGUZEL A, et al. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4 mannanase from *Weissella viridescens* LB37 and its application in fruit juice clarification[J]. *European Food Research and Technology*, 2016, 242(5): 769-776.
- [65] ADIGUZEL A, NADAROGLU H, ADIGUZEL G. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(8): 5292-5298.
- [66] ZHAO D, WANG Y, NA J, et al. The response surface optimization of β -mannanase produced by *Lactobacillus casei* HDS-01 and its potential in juice clarification[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(2): 1-6.
- [67] 齐珂珂, 许美芳, 胡向东, 等. β -甘露聚糖酶对断奶仔猪生产性能和免疫指标及肠道微生物菌群的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2014(1): 54-58.
- [68] KONG C, LEE J, ADEOLA O. Supplementation of β -mannanase to starter and grower diets for broilers[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2011, 91: 389-397.
- [69] 乔海云, 王海宏, 丁宏标. 甘露聚糖酶对肉鸡肠道微生物和免疫指标的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(2): 15-19.
- [70] 黄铁生, 达剑森. β -甘露聚糖酶对肉鸡生长性能及免疫功能的影响[J]. *中国家禽*, 2016, 38(22): 62-3.
- [71] PATEL K, DUDHAGARA P. Compatibility testing and enhancing the pulp bleaching process by hydrolases of the newly isolated thermophilic *Isotripora variabilis* strain UD-6[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2020, 38(1/6): 144-160.
- [72] LIU Q, YANG P, LUO H, et al. A novel endo-1,4- β -mannanase from *Bispora antennata* with good adaptation and stability over a broad pH range[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(6): 1442-1453.
- [73] REGMI S, PRADEEP G C, CHOI Y H, et al. A multi-tolerant low molecular weight mannanase from *Bacillus* sp CSB39 and its compatibility as an industrial biocatalyst[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 92: 76-85.
- [74] SUZUKI K, MICHIKAWA M, SATO H, et al. Purification, cloning, functional expression, structure, and characterization of a thermostable beta-mannanase from *Talaromyces trachyspermus* and its efficiency in production of mannooligosaccharides from coffee wastes[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2018, 65(2): 13-21.
- [75] SHUKOR H, ABDESHAHIAN P, AL-SHORGANI N K N, et al. Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 257-264.
- [76] LI Y X, YI P, LIU J, et al. High-level expression of an engineered β -mannanase (mRmMan5A) in *Pichia pastoris* for manno-oligosaccharide production using steam explosion pretreated palm kernel cake[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 30-37.
- [77] SRIVASTAVA P K, KAPOOR M. Cost-effective endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601 and its application in generation of oligosaccharides from guar gum and as detergent additive[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2014, 44(4): 392-417.
- [78] DAVID A, SINGH CHAUHAN P, KUMAR A, et al. Coproduction of protease and mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11 in solid state fermentation and their combined application as detergent additives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 1176-1184.
- [79] 者园园, 苗华彪, 吴倩, 等. 耐热 β -甘露聚糖酶的异源表达及低聚寡糖制备研究[J]. *饲料研究*, 2021, 44(23): 63-68.
- [80] 甄红敏, 华晓晗, 马俊文, 等. 产黄青霉 β -甘露聚糖酶的高效表达、性质及应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(8): 98-105.

(责任编辑: 刘庆松)