

β -甘露聚糖酶的研究进展

徐 扬¹, 刘起丽², 聂国兴¹, 韩科芳¹, 张建新^{1*}

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南科技学院 资源与环境学院, 河南 新乡 453003)

摘要: β -甘露聚糖酶属于半纤维素酶类, 是一种广谱诱导型多功能酶, 广泛存在于动植物和微生物中, 其主要水解产物为甘露寡糖, 在动物生产、饲料、食品、医药、石油开采及生物技术方面广泛应用。对 β -甘露聚糖酶的来源、生产、纯化、分子特性、作用机制以及微生物诱变育种等方面的研究概况进行了综述, 并对 β -甘露聚糖酶的应用前景进行了分析。

关键词: β -甘露聚糖酶; 微生物生产; 分离纯化

中图分类号: S816.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)04-0034-04

Advances in Research on β mannanase

XU Yang¹, LIU Qi-li², NIE Guo-xing¹, HAN Ke-fang¹, ZHANG Jian-xin^{1*}

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. College of Resource and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: β -mannanase enzymes are hemicellulose, which is a broad spectrum of inducible multi-functional enzyme widely distributed in plants, animals, and microorganisms. The main hydrolysis products are manna oligosaccharides. In the paper, the researches on the source, production, purification, molecular properties, mechanism and microbiological aspects of breeding of β -mannanase were reviewed. The application prospects of β -mannanase were also discussed.

Key words: β -mannanase; Microbial production; Separation and purification

β -甘露聚糖酶(β -mannanase)是一类能够水解含有甘露糖苷键的甘露聚糖(包括异甘露聚糖)的内切水解酶^[1], 其主要水解产物为单糖、二糖、三糖、四糖等低聚糖^[2]。甘露聚糖酶水解甘露多糖, 获得的甘露寡糖具有很好的生物调节功能, 如: 促进肠道益生菌的生长、减轻便秘、促进营养物质吸收、提高饲料能量利用率、改善饲料转化率、降低饲料增重比以及提高动物生产性能等。目前已在动物生产、饲料、食品、医药、石油开采以及生物技术等多方面得到广泛应用。鉴于此, 特对 β -甘露聚糖酶的来源、生产、微生物诱变育种、作用机制等方面的研究概况进行了综述。

1 β -甘露聚糖酶的来源

β -甘露聚糖酶的来源非常广泛, 普遍存在于动

植物和微生物中。许多已发芽的植物种子(如: 芦笋、咖啡、胡萝卜和魔芋等)^[3], 以及番茄果实和种子^[4]中都含有 β -甘露聚糖酶。 β -甘露聚糖酶的微生物源种类最为丰富, 且具有活性高、成本低、提取方便以及pH值、温度范围和底物专一性等特点, 已在工业生产和理论研究中得到了广泛应用。

国内外对于甘露聚糖酶及其生产菌的研究开始于20世纪70年代末, 初步统计已发现100余种产酶微生物, 包括细菌、真菌和放线菌等。其中研究较多的是细菌中的芽孢杆菌、假单胞菌、枯草杆菌^[5], 真菌中的曲霉菌、里氏木霉菌^[6], 以及放线菌中的链霉菌等。不同的菌株来源的 β -甘露聚糖酶性质不同, 可为酸性、中性和碱性的 β -甘露聚糖酶。相比之下, 动物源的种类较少, 且大多数属于软体动物, 如

收稿日期: 2010-12-03

基金项目: 河南省教育厅科技攻关(2010A180014); 河南师范大学青年科学基金(2008qk16); 河南师范大学大学生创新性实验计划(2009278)

作者简介: 徐扬(1991-), 女, 河南郑州人, 在读本科生, 研究方向: 微生物酶制剂。E-mail: xuyang8099@163.com

* 通讯作者: 张建新(1974-), 男, 山东陵县人, 副教授, 博士, 主要从事微生物酶制剂研究。E-mail: zjx1q1@163.com

Haliotis discus hannai(皱纹盘鲍)、*Littorina brevicula*(滨螺)和*Mytilusedulis*(紫贻贝)^[7]等。

2 β-甘露聚糖酶的微生物生产及选育

随着对β-甘露聚糖酶研究的不断深入,它的许多新优点、新作用陆续被发现,β-甘露聚糖酶的生产也就显得尤为重要。因微生物来源的β-甘露聚糖酶具有活性高、成本低、提取方便等诸多优点,而成为研究重点。早期的研究工作主要集中在高效产酶菌株的选育、发酵条件优化、酶的纯化等方面。随着基因工程和蛋白质工程技术的广泛应用,对β-甘露聚糖酶的生产研究开始转向酶基因的克隆表达和活性位点改造等方面。

2.1 β-甘露聚糖酶的微生物生产现状

研究表明,大多数微生物的β-甘露聚糖酶都是胞外诱导酶^[8],很少以组成酶形式存在,必须在培养基中添加β-甘露聚糖(如魔芋粉或槐豆胶等)时才能被诱导合成β-甘露聚糖酶。产酶培养基常用的碳源有角豆胶、魔芋粉等,氮源有豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、谷氨酸钠等。另外,不同微生物合成β-甘露聚糖酶对无机盐的要求也不尽相同。

随着微生物生产研究的不断深入,高产菌株的发现和发酵条件的优化,β-甘露聚糖酶的微生物工业生产进程进一步加速。邬敏辰等^[9]以黑曲霉(*Aspergillus niger*) LW2129菌株三角瓶固态发酵试验为基础,经曲盘固态发酵试验进一步放大到30 m³固态发酵罐生产的产业化规模,酶活性可达每克干曲26725~29218 IU。庄童琳等^[10]利用苹果量大、低成本等特点,采用黑曲霉SL-08对苹果渣进行固态发酵,既是一种有效的生物转化方式,又可用于β-甘露聚糖酶的生产,取代了豆粕与麸皮等常规原料,为降低β-甘露聚糖酶的工业化生产成本提供了可靠依据。以上2个研究都是利用固态发酵技术和优化发酵条件等方法,成功实现了产业化生产的初步探索,为以后大规模生产打下了良好的基础。

2.2 产β-甘露聚糖酶微生物的选育技术研究

为了满足产业化生产的要求,国内外许多学者对β-甘露聚糖酶的微生物选育技术进行了大量研究。选育的主要手段是通过诱变育种的方式进行菌种改造,是使用最为广泛、简便、快速、有效的方法,常用的诱变剂可分为物理、化学和生物诱变剂三大类。

Soledad等^[11]以黑曲霉UAM-GS1为出发菌株,采用紫外诱变的诱导方式,将其产β-甘露聚糖酶的活性从154 U/L提高到501 U/L。罗强等^[12]通过离子注入与紫外复合诱变育种,获得了1株酶活

性为105 U/mL的枯草芽孢杆菌(M-66菌株)。李剑芳等^[13]采用紫外和亚硝基胍反复诱变技术,获得了1株黑曲霉突变株L-761,其液体发酵生产的酶活性为143 U/mL。廖晓霞等^[14]经自然筛选、紫外诱变,选育出一株米曲霉U18026,其产酶能力是未诱变的出发株(119 U/mL)的4.1倍。

从上述酶活性值可以看出,目前虽然已经通过各种物理、化学方法对微生物进行诱变育种,获取了较高产菌株,但菌株产酶活性仍普遍较低,高产菌株的报道相对较少。盛金萍等^[15]发现的高产菌株是以黑曲霉(*A. niger*) LW-1为原始出发菌株,采用自然分离、微波与甲基磺酸乙酯(EMS)双重诱变,获得的1株高产、稳产的突变株WS-2007。试验结果表明,该突变株液体摇瓶发酵产酶活性高达3261 U/mL,为出发菌株(1027 U/mL)的3.18倍。张树飞等^[16]也用同样的方法,获得了1株高产和稳产酸性β-甘露聚糖酶的E-30菌株,其产酶活性达36675 U/g,是原始出发菌株(17048 U/g)的2.15倍。

由此可见,经过先进、复杂的诱变育种手段改造的高产菌株,其产酶活性显著增强,可以达到普通菌株产酶活性的十倍甚至数十倍。诱变育种技术本身简单、快速,并且高效和实用,有可能延伸出成本更低、产酶效益更高的诱导手段。今后的研究方向应集中在高产菌株诱变育种方法的研究上,特别是产酸性β-甘露聚糖酶的菌株研发上,通过不断改进现有诱导工艺,开发全新诱导技术,才能进一步加速产业化的实际应用进程。

2.3 基因工程技术在产β-甘露聚糖酶微生物生产中的应用

利用基因工程技术,可开发产酶活性高且适应性强的微生物菌种。近年来,β-甘露聚糖酶分子生物学的研究取得了较大进展,已有多种微生物和动植物的β-甘露聚糖酶基因被克隆和表达,这些为开发新的、能满足饲料工业需要的产酶菌提供了条件。韦跃华等^[17]利用基因工程方法从里氏木霉(*T. reesei*)基因组中克隆到一种β-甘露聚糖酶基因,将其转化到毕赤酵母的基因组中,发酵结果表明,甘露聚糖酶的活力可达12.5 IU/mL。谭秀华等^[18]克隆到一种β-甘露聚糖酶基因,构建毕赤酵母表达重组子,获得了该酶的诱导表达,测得最高酶活性为41.8 IU/mL。黄生平^[19]也利用毕赤酵母表达系统首次实现了对植酸酶和甘露聚糖酶的共分泌表达,并对这2种酶的相关酶学性质作了初步研究,显示了良好的工业应用前景。

利用基因工程和蛋白质工程的方法构建新型高

效的工程菌是目前的研究热点,它能克服天然来源的 β -甘露聚糖酶难以同时满足工业生产对酶活性、反应温度和 pH 等多方面的实际需求的缺点,可以按照实际生产的需要改变酶分子适应性。但是,这些研究目前都处于实验室研究阶段,并且酶活性普遍低于原始菌株,只有借助于不断发展的分子生物学技术,进一步研究如何创建高效、省时、低成本的克隆表达技术,才能更好地为实际生产服务。

3 β -甘露聚糖酶的分离提纯

β -甘露聚糖酶的分离目前一般采用盐析、水溶性非离子型聚合物沉淀法、双水相萃取、聚焦层析及高压液相层析等方法^[20]。余红英等^[21]利用双水相萃取直接从枯草芽孢杆菌发酵液中提取 β -甘露聚糖酶,萃取率为 98.79%。嗜热杆菌(*Thermotoga neapolitana*) 5068 中稳定的 α -半乳糖苷酶和 β -甘露聚糖酶可以通过离子交换、疏水相互作用和凝胶过滤等方法相结合获得^[22]。朱劫等^[23]用黑曲霉(*A. niger*) WM 20-11 固态发酵成熟曲,经磷酸缓冲液浸提、硫酸铵分步盐析、DEAE-Sepharosefast flow 阴离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析等分离纯化手段,回收率为 5.2%。随着技术发展, β -甘露聚糖酶的分离提纯已向产业化靠近,配合其微生物生产的发展必将进一步适应实际生产的需要。

4 β -甘露聚糖酶的作用机制及分子生物学研究进展

4.1 β -甘露聚糖酶的作用机制

β -甘露聚糖酶是水解 β -1,4-D-吡喃甘露糖为主链的内切水解酶,作用底物主要是半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳葡萄甘露聚糖以及甘露聚糖。同时,底物的物理状态会影响 β -甘露聚糖酶的水解作用,若底物呈结晶状态,则不易被水解。 β -甘露聚糖酶水解甘露聚糖后,将水解产物通过高效液相色谱(HPLC)或纸层析方法分析,可知水解产物主要是低聚糖(一般 2~10 个残基),不同来源的酶和底物反应后,水解产物的聚合度大小也不相同。

4.2 β -甘露聚糖酶的分子生物学特征

近年来,随着对 β -甘露聚糖酶研究与应用的不不断深入,其分子生物学研究也取得了突破性进展。目前,对 β -甘露聚糖酶的分子生物学研究主要集中在微生物的 β -甘露聚糖酶方面,已经有十几种微生物的 β -甘露聚糖酶基因分子生物学结构被解析,大部分 β -甘露聚糖酶有催化域和非催化域两部分组

成,催化域折叠成 TIM 桶状结构,参与底物的结合和催化;非催化域是碳水化合物结合域,采用经典的三明治结构,可以增强结合有纤维素的甘露糖水解释能力,但复杂的 β -甘露聚糖酶不止具有 1 个催化域^[24]。依照催化域序列相似性,目前已发现的 80 多个甘露聚糖酶可以被划分到糖苷水解酶家族 5、26 和 113,糖苷水解酶家族 5、26 和 113 都是糖苷水解酶超家族 A 的成员^[25]。Ximenes 等^[26]从厌氧真菌 *Orpinomyces* sp. PG-2 中克隆出 1 个甘露聚糖酶基因,基因大小为 1924 bp,编码 579 个氨基酸残基。对其进行的结构分析发现,该酶蛋白包括 1 个甘露聚糖酶的催化元件、1 个碳水化合物结合元件和 1 个真菌类的非催化的锚定元件。李炫等^[27]采用 N 端缺失方法研究了 manA 的活性,结果表明,删除了 manA N 端 111 bp 的翻译产物依然具有酶活性,删除 N 端 141 bp 的翻译产物则无酶活性,manA N 端 111~141 bp 可能具有重要意义。而王溪森等^[28]研究表明,删除甘露聚糖酶基因 3' 端 246 bp 后甘露聚糖酶依然具有酶活性,说明甘露聚糖酶基因 3' 端的部分序列不是酶所必需的。某些甘露聚糖酶基因有信号肽结构,毛绍名等^[29]从能够降解魔芋多糖的枯草杆菌中克隆到 1 个 β -甘露聚糖酶基因,经预测该基因包含 1 个完整的 ORF,编码 1 个长 360 个氨基酸残基的多肽,在 N 端有 1 个信号肽序列。

5 β -甘露聚糖酶的研究展望

β -甘露聚糖酶能有效地降解饲料中的甘露聚糖,提高饲料的消化率,提高动物生长性能。 β -甘露聚糖酶降解甘露聚糖的产物甘露寡糖,还能改善肠道微生态环境,提高动物免疫功能。 β -甘露聚糖酶具有广阔的应用前景,但就我国而言, β -甘露聚糖酶的研究大多数仍处于实验室研究阶段,应用于实际生产的较少。为了使 β -甘露聚糖酶更好地服务于人们的生产生活,在目前已有的基础上,应该继续推进对于 β -甘露聚糖酶研究。一方面,继续从动植物和微生物中,特别是极端微生物中寻找更多性质优良的 β -甘露聚糖酶,提高质量,同时充分利用结构生物学手段,加深对其结构和功能的认识,为其定向进化和改造奠定理论基础;另一方面,应用研究不能仅满足于实验室研究阶段,应不断提高产酶菌株的产酶水平或构建外源高表达体系,开发出活性高、耐高温性能好、成本低、更符合养殖业要求的 β -甘露聚糖酶,才能更好地应用于我国畜牧业生产中。

参考文献:

- [1] Schomburg D, Salzmann M. *Ezyme handbook* [J]. Springer Verlag Berlin Heideberg, 1991(4): 1-5.
- [2] Akino T, Nakamura N and Horikoshi K. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. *Appl Microbiol Biot Technol*, 1987, 26(4): 323-327.
- [3] Marraccinni P, Rogers W J, Allard C, *et al.* Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee grains [J]. *Planta*, 2001, 213: 296.
- [4] Filichkin S A, Leonard J M, Monters A, *et al.* A novel endo- β -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1080.
- [5] Ma Yanhe, Xue Yanfen, Dou Yuetan, *et al.* Characterization and gene cloning of a novel mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N165 [J]. *Extremophiles*, 2004, 8: 447.
- [6] Hagglund P, Eriksson T, Collen A, *et al.* A cellulose binding module of the *Trichoderma reesei* β -mannanase Man5A increases the mannan hydrolysis of complex substrates [J]. *Biotechnol*, 2003, 101: 37.
- [7] Xu Bingze, Sellos D, Janson J C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel β -mannanase gene [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 1753.
- [8] 陈权军, 邓岳松, 罗永发, 等. 新型饲料添加剂 β -甘露聚糖酶 [J]. *中国家禽*, 2007, 29(3): 60-61.
- [9] 邬敏辰, 徐春梅, 李剑芳. β -甘露聚糖酶固态发酵的产业化生产技术 [J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(3): 64-67.
- [10] 庄童琳, 郭凤霞, 刘成, 等. 黑曲霉固态发酵苹果渣产 β -甘露聚糖酶的工艺优化 [J]. *生物技术*, 2010, 20(1): 69-73.
- [11] Soledad De Nicolás Santiago, Carlos Regalado González, Blanca Garé Almenárez, *et al.* Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* mutants [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2005, 9(1): 50-60.
- [12] 罗强, 孙启玲, 张兴宇, 等. β -甘露聚糖酶菌株的复合诱变选育及发酵条件的优化 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2003, 40(1): 44-48.
- [13] 李剑芳, 王斌林, 邬敏辰. 黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶的发酵工艺 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9): 19-21.
- [14] 廖晓霞, 张学武. 紫外线诱变对 β -甘露聚糖酶产酶菌株的影响研究 [J]. *现代食品科技*, 2010, 26(8): 801-804.
- [15] 盛金萍, 邬敏辰. β -甘露聚糖酶高产菌株的双重诱变育种 [J]. *食品工业科技*, 2007, 28(12): 118-123.
- [16] 张树飞, 邬敏辰. 酸性 β -甘露聚糖酶高产菌株的诱变育种 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(2): 346-350.
- [17] 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, 21(6): 878-883.
- [18] 谭秀华, 武玉永, 马立新, 等. 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 543-546.
- [19] 黄生平, 汪昌丽, 张桂敏, 等. 植酸酶和甘露聚糖酶双功能毕赤酵母工程菌的构建和产酶分析 [J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 280-284.
- [20] Ferreira H M, Filho E X F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4 [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 57: 23-29.
- [21] 余红英, 孙远明, 王伟军, 等. 枯草芽孢杆菌 SA-2213-甘露聚糖酶的纯化及其特性 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(3): 327-331.
- [22] Duffaud G D, McCutchen C M, Leduc P, *et al.* Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic *Eubacterium Thermotoga neapolitana* 5068 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 169-177.
- [23] 朱劼, 李剑芳, 邬敏辰. 黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶的纯化及部分性质研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2007, 30(1): 55-59.
- [24] 赵月菊, 薛燕芬, 马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望 [J]. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1131-1137.
- [25] Zhang Y, Ju J, Peng H, *et al.* Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Allicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH2A [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(46): 31551-31558.
- [26] Ximenes E A, Chen Huizhong, Kataeva I A, *et al.* A mannanase, ManA, of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. PG-2 has carbohydrate binding and docking modules [J]. *Can J Microbiol*, 2005, 51: 559.
- [27] 李炫, 彭克勤, 刘正初. 欧文氏杆菌 CXJZ95-198 甘露聚糖酶基因 N 端缺失表达 [J]. *湖南农业科学*, 2010(11): 16-18.
- [28] 王溪森, 刘正初, 李斌, 等. 甘露聚糖酶基因 3' 端缺失研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3496-3497.
- [29] 毛绍名, 章怀云. β -甘露聚糖酶分子生物学研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(6): 995-997.