



# 浸麻类芽孢杆菌葡甘露聚糖降解酶的异源表达及功能研究

孟嘉仪, 张国晶, 周凤恩, 王楠, 周义发, 原野\*

东北师范大学生命科学学院, 吉林 长春 130024

孟嘉仪, 张国晶, 周凤恩, 王楠, 周义发, 原野. 浸麻类芽孢杆菌葡甘露聚糖降解酶的异源表达及功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3129-3143.

MENG Jiayi, ZHANG Guojing, ZHOU Feng'en, WANG Nan, ZHOU Yifa, YUAN Ye. Heterologous expression and characterization of novel glucomannan-degrading enzymes from *Paenibacillus macerans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3129-3143.

**摘要:**【目的】克隆表达浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)的葡甘露聚糖降解酶, 研究其性质和功能, 丰富葡甘露聚糖降解酶资源, 了解浸麻类芽孢杆菌降解葡甘露聚糖机制。【方法】检索浸麻类芽孢杆菌的葡甘露聚糖降解酶基因, 构建重组菌株, 表达纯化重组酶, 系统研究其功能及在降解葡甘露聚糖中的作用。【结果】克隆表达了 5 个葡甘露聚糖降解酶组分。结果显示 *PmMan1* 和 *PmMan2* 为内切  $\beta$ -甘露聚糖酶, *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 为外切  $\beta$ -葡萄糖苷酶。其中 *PmGlc1* 只能水解 *pNP* $\beta$ Glc, *PmGlc2* 能水解二糖和人参皂苷的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键, 而 *PmGlc3* 对  $\beta$ -葡萄糖苷键的选择性较为广泛。*PmMan1*、*PmMan2*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 能够降解葡甘露寡糖, *PmMan1* 和 *PmMan2* 可以降解葡甘露聚糖。共同降解葡甘露聚糖时, *PmGlc2* 和 *PmGlc3* 与 *PmMan2* 具有协同效应, 且 *PmGlc3* 与 *PmMan2* 的协同作用更为显著。【结论】从浸麻类芽孢杆菌中获得了 4 种葡甘露聚糖降解酶, 阐明了该菌葡甘露聚糖降解酶系成员的作用, 丰富了酶资源和理论研究成果的同时, 为酶法制备活性葡甘露寡糖提供了有效工具。

**关键词:** 浸麻类芽孢杆菌;  $\beta$ -甘露聚糖酶;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 葡甘露聚糖

资助项目: 中央高校基本科研业务费(2412022XK011); 吉林省科技厅医药健康专项(20200504005YY); 吉林省自然科学基金(20200201190JC)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2412022XK011), the Jilin Provincial Department of Science and Technology Medicine and Health Project (20200504005YY), and the Natural Science Foundation of Jilin Province (20200201190JC).

\*Corresponding author. E-mail: yuany268@nenu.edu.cn

Received: 2022-11-27; Accepted: 2023-02-27; Published online: 2023-03-03

# Heterologous expression and characterization of novel glucomannan-degrading enzymes from *Paenibacillus macerans*

MENG Jiayi, ZHANG Guojing, ZHOU Feng'en, WANG Nan, ZHOU Yifa, YUAN Ye\*

School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin, China

**Abstract:** [Objective] We cloned, expressed, and characterized the glucomannan-degrading enzymes from *Paenibacillus macerans*, aiming to enrich the glucomannan-degrading enzyme resources and decipher the mechanism of glucomannan degradation by *P. macerans*. [Methods] We retrieved the glucomannan-degrading enzyme genes and constructed recombinant strains to express the recombinant enzymes. The roles of the purified proteins in the degradation of glucomannan were then studied. [Results] We cloned and expressed five glucomannan-degrading enzymes, among which *PmMan1* and *PmMan2* were endo- $\beta$ -mannanases, and *PmGlc1*, *PmGlc2*, and *PmGlc3* were exo- $\beta$ -glucosidases. *PmGlc1* only hydrolyzed *pNP* $\beta$ Glc, and *PmGlc2* hydrolyzed  $\beta$ -1,6-glucosidic bonds in disaccharides and ginsenosides. *PmGlc3* hydrolyzed a wide range of  $\beta$ -glucosidic bonds. *PmMan1*, *PmMan2*, *PmGlc2*, and *PmGlc3* degraded glucomannan oligosaccharides, and *PmMan1* and *PmMan2* degraded glucomannan. In the degradation of glucomannan, *PmGlc2* and *PmGlc3* had synergistic effects with *PmMan2*, and the synergistic effect was more significant between *PmGlc3* and *PmMan2*. [Conclusion] We obtained four glucomannan-degrading enzymes from *P. macerans* and clarified the role of the enzymes in glucomannan degradation. The findings enrich the enzyme resources and theoretical research achievements and provide an effective tool for enzymatic preparation of active glucomannan oligosaccharides.

**Keywords:** *Paenibacillus macerans*;  $\beta$ -mannanase;  $\beta$ -glucosidase; glucomannan

葡甘露聚糖是一种可溶性半纤维素类多糖，在自然界中含量丰富<sup>[1-2]</sup>。几个世纪以来，人们一直食用葡甘露聚糖，尤其是魔芋葡甘露聚糖 (konjac glucomannan, KGM)<sup>[3]</sup>。KGM 由 D-葡萄糖和 D-甘露糖按 1.0:1.4–1.0:1.6 的比例通过  $\beta$ -1,4-糖苷键形成主链，在葡萄糖和甘露糖的 C-3 或 C-6 位可能存在分支<sup>[4]</sup>。除大分子 KGM 外，其降解形成的低分子量的 KGM 产物也具有某些生理活性，如免疫调节、抗氧化、促进益生菌的生长等<sup>[5]</sup>，可开发为功能食品。酶解法因其生物相容性、选择性和有效性被广泛用于降解

KGM 等多糖。

$\beta$ -甘露聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶是葡甘露聚糖生物降解所需要的酶类。 $\beta$ -甘露聚糖酶是酶解葡甘露聚糖的核心酶，其作用位点是葡甘露聚糖主链的  $\beta$ -1,4-甘露糖苷键，产物为葡甘露寡糖<sup>[6-7]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用位点是葡萄糖苷键或葡萄糖-甘露糖苷键。目前， $\beta$ -葡萄糖苷酶与  $\beta$ -甘露聚糖酶协同降解 KGM 的报道较少。使用复合酶水解 KGM 能降低酶的使用成本，提高水解效率，具有重大的应用价值。因此寻找具有优良性质的 KGM 降解酶意义重大。

微生物是寻找多糖降解酶的重要来源。浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)<sup>[8]</sup>广泛存在于接触半纤维素的环境如反刍动物瘤胃<sup>[9]</sup>中,从中可能发现新的葡甘露聚糖降解酶。本研究验证了浸麻类芽孢杆菌能够降解代谢 KGM,对 NCBI 数据库检索表明该菌含有多个葡甘露聚糖降解酶基因。因此,在研究中重组表达了这些酶组分,系统研究了其性质和功能,并分析了各组分在降解 KGM 中的作用。为开发葡甘露寡糖产品和研究 KGM 的结构提供了重要的工具,同时丰富了  $\beta$ -甘露聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

即用型无缝克隆试剂盒购自于生工生物工程(上海)股份有限公司。槐二糖(Glc- $\beta$ -1,2-Glc)、昆布二糖(Glc- $\beta$ -1,3-Glc)、纤维二糖(Glc- $\beta$ -1,4-Glc)和龙胆二糖(Glc- $\beta$ -1,6-Glc)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。*pNP $\alpha$ Man*、*pNP $\beta$ Man*、*pNP $\alpha$ Araf*、*pNP $\alpha$ Arap*、*pNP $\alpha$ Xyl*、*pNP $\beta$ Xyl*、*pNP $\alpha$ Glc*、*pNP $\beta$ Glc*、*pNP $\alpha$ Gal*、*pNP $\beta$ Gal*、*pNP $\alpha$ Fuc*、*pNP $\alpha$ Rha* 和魔芋胶购自上海源叶生物科技有限公司。碳酸钠、醋酸钠、冰乙酸、正丁醇、氯化钠等购自北京化工厂。葡甘露寡糖购自湖北帝柏化工有限公司。

PCR 仪 ETC-811 (东胜兴业科学仪器有限公司)、酶标仪 Infinite F50 (帝肯)、立式压力蒸汽灭菌器 HVE-50 (平山制作所)、高效液相(HPLC)系统 LC-20Ai (岛津)、高效阴离子色谱(high performance anion chromatography, HPAEC) ICS-5000<sup>+</sup> (赛默飞世尔科技有限公司)。

#### 1.1.2 样品、菌株和载体

浸麻类芽孢杆菌 ATCC 8244 购自北京百欧博伟生物技术有限公司, *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞和 pET-28a(+)购自生工生

物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 浸麻类芽孢杆菌降解葡甘露聚糖的研究

在 50 mL 以魔芋胶为唯一碳源的培养基(魔芋胶 5 g/L,磷酸氢二钾 7 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,硫酸铵 2 g/L,柠檬酸钠 0.5 g/L,硫酸镁 0.1 g/L)中按 1%接种量(体积比)加入浸麻类芽孢杆菌,于 30 °C 条件下振荡培养,分别在 0、12、24、36、48、72 h 取样。利用高效凝胶渗透色谱法(high performance gel permeation chromatography, HPGPC) (系统:岛津高效液相 LC-20Ai;检测器:示差折光检测器;色谱柱:TSK-gel G3000PW<sub>XL</sub>)检测魔芋胶在降解过程中分子量分布的变化,利用比浊法测定菌体生长量,绘制生长曲线。

### 1.3 葡甘露聚糖降解酶基因序列分析

通过 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi))查找浸麻类芽孢杆菌中葡甘露聚糖降解酶的基因序列,预测基因序列的所属家族,并与 CAZy 数据库里相应家族中已表征的酶通过 Clustal Omega 软件([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/))进行氨基酸序列同源性分析对比<sup>[10]</sup>。

### 1.4 重组菌株的构建

将活化后的浸麻类芽孢杆菌接种于 LB 培养基,培养 12 h 后取 1–5 mL 新鲜菌液,使用 TIANamp Bacteria DNA 试剂盒提取基因组 DNA。根据目的基因序列设计特定的引物扩增目的基因,引物序列见表 1。通过无缝克隆方法将目的基因与 pET-28a(+)载体连接,并将连接产物转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,筛选阳性克隆,测序正确后置于-80 °C 保存。

### 1.5 重组酶的表达、纯化及鉴定

37 °C 条件下,培养重组菌至  $OD_{600}$  为 0.6–0.8。加入 IPTG (终浓度  $0.5 \times 10^{-3}$  mol/L)于 16 °C 下继续诱导表达 16 h。5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,重悬于破碎缓冲液中。使用细胞破碎仪裂解细胞,4 °C、12 000 r/min



的人参皂苷底物和  $0.5 \times 10^{-6}$  mol/L 的重组酶。37 °C 反应 12 h 后加入等体积水饱和正丁醇进行萃取, 取上层。利用薄层层析 (thin layer chromatography, TLC) 法鉴定酶解产物。展层剂为正丁醇:乙酸乙酯:水=4:4:1 (体积比), 显色剂为 5% 硫酸-乙醇溶液。

### 1.9 重组酶水解葡甘露寡糖能力的测定

以葡甘露寡糖(甘露糖和葡萄糖以  $\beta$ -糖苷键连接而成的聚合度在 2–10 之间的混合物)为底物研究重组酶降解寡糖的能力。向 200  $\mu$ L  $20 \times 10^{-3}$  mol/L 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液反应体系中加入 40  $\mu$ g 寡糖和  $0.1 \times 10^{-9}$  mol/L 重组酶。37 °C 反应 12 h, 100 °C 加热 5 min 后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。利用薄层层析法鉴定酶解产物。展层剂为正丁醇:冰乙酸:甲醇:水=5:14:2:1 (体积比), 显色剂为 5% 硫酸-乙醇溶液。

### 1.10 重组酶水解葡甘露聚糖能力的测定

以魔芋胶为底物研究重组酶降解葡甘露聚糖的能力。向 500  $\mu$ L  $20 \times 10^{-3}$  mol/L 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液反应体系中加入 1 mg 魔芋胶和  $1 \times 10^{-9}$  mol/L 重组酶。35 °C 反应 12 h, 100 °C 加热 5 min 后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。用二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)法测定反应后样品中还原糖含量<sup>[13]</sup>。

### 1.11 酶学性质分析

以葡甘露寡糖为底物研究重组酶 *PmMan1* 和 *PmMan2* 的酶学性质, 以 *pNP $\beta$ Glc* 为底物研究重组酶 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 的酶学性质。重组酶的最适 pH 测定范围为 2.0–11.0。pH 2.0–6.0 使用醋酸-醋酸钠缓冲液; pH 6.0–8.0 使用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液; pH 8.0–11.0 使用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 缓冲液浓度均为  $20 \times 10^{-3}$  mol/L。把最高的酶活力定义为 100%, 其他 pH 条件下测得的酶活力与之对比。pH 稳定性测定时, 把各 pH 条件下孵育前的重组酶测

得的酶活力定义为 100%, 孵育后的酶活力与孵育前进行对比。最适温度测定范围为 20–90 °C, 使用  $20 \times 10^{-3}$  mol/L 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液, 把重组酶在最适温度下的酶活定义为 100%, 其他温度下的酶活与其相比。热稳定性研究中, 反应体系在不同的温度下分别孵育 0、0.5、1、2、4、6、8、12 h, 把未在相对应温度下孵育的重组酶测得的酶活力定义为 100%, 孵育后的重组酶测得的酶活与之比较。

### 1.12 组合酶降解魔芋葡甘露聚糖

根据重组酶对葡甘露寡糖和葡甘露聚糖的降解结果, 以 *PmMan2* 为核心酶, 使用不同组合方式降解魔芋胶(表 2), 研究重组酶在共同降解葡甘露聚糖中发挥的作用。方法同 1.10。

## 2 结果与分析

### 2.1 浸麻类芽孢杆菌降解葡甘露聚糖

如图 1 所示, 魔芋胶在浸麻类芽孢杆菌降解过程中, 含量逐渐减少且分子量逐渐降低, 48 h 后被彻底降解。浸麻类芽孢杆菌的生长曲线与魔芋胶分子量变化过程一致, 该菌在 24–48 h 期间快速生长, 48 h 后由于碳源魔芋胶耗尽, 菌体几乎不再生长。结果表明浸麻类芽孢杆菌含有能够表达葡甘露聚糖降解酶的基因。

表 2 酶解魔芋胶的组合方式

Table 2 Combinations of recombinases to degrade konjac gum

Groups	<i>PmMan2</i>	<i>PmMan1</i>	<i>PmGlc2</i>	<i>PmGlc3</i>
1	+	–	–	–
2	+	+	–	–
3	+	–	+	–
4	+	–	–	+
5	+	+	+	–
6	+	+	–	+
7	+	–	+	+
8	+	+	+	+

+: Inclusion of enzyme in the system; –: Absence of enzyme in the system.

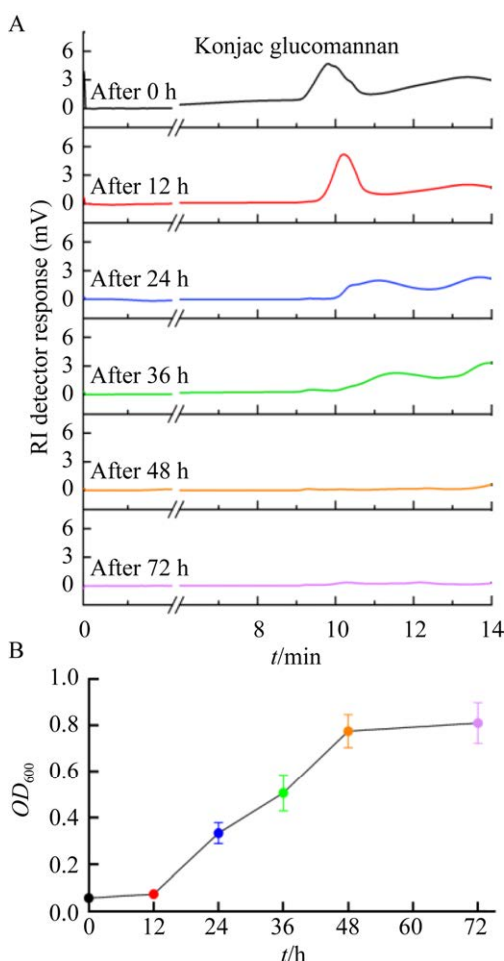


图 1 浸麻类芽孢杆菌降解魔芋胶

Figure 1 Degradation of konjac gum by *Paenibacillus macerans*. A: Analysis of degradation products by HPGPC. B: The growth curve of *Paenibacillus macerans*. The error bar represents the standard deviation of at least three independent repeats of data. The same below.

## 2.2 浸麻类芽孢杆菌葡甘露聚糖降解酶基因的生物信息分析

NCBI 数据库中检索到浸麻类芽孢杆菌中含有 3 个假定的  $\beta$ -甘露聚糖酶, 分别命名为 *PmMan1* (GenBank: MUG24820)、*PmMan2* (GenBank: KFN10059) 和 *PmMan3* (GenBank: MUG24039) 及 5 个假定的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 分别命名为 *PmGlc1* (GenBank: MUG23209)、*PmGlc2*

(GenBank: MUG25318)、*PmGlc3* (GenBank: MUG25541)、*PmGlc4* (GenBank: MUG22456) 和 *PmGlc5* (GenBank: MUG23236)。 *PmMan1* 未鉴定出其所属糖苷酶家族, *PmMan2* 属于糖苷水解酶家族 113 (GH113), *PmMan3* 属于 GH26, *PmGlc1*、*PmGlc2*、*PmGlc3*、*PmGlc4* 和 *PmGlc5* 均属于 GH3。

将上述酶的序列分别与相应家族中 5 个已报道的氨基酸序列进行比对, 结果见表 3<sup>[14-19]</sup>。 *PmMan2* 和 *PmMan3* 分别与 *Bacillus* sp. N16-5 和 *Paenibacillus* sp. BME-14 中能够水解魔芋胶的  $\beta$ -甘露聚糖酶 *BaMan113A* 和 *PsMan26B* 相似度最高, 推测 *PmMan2* 和 *PmMan3* 在水解葡甘露聚糖中将发挥重要作用。*PmGlc1* 与 *Acetivibrio thermocellus* ATCC 27405 来源的 *BglB* 相似度最高, *BglB* 可以水解 *pNP $\beta$ Glc*、*pNP $\beta$ Xyl*、水杨苷和熊果苷等糖苷, 推测 *PmGlc1* 可能具有水解糖苷类物质的能力。与 *PmGlc2*、*PmGlc3*、*PmGlc4* 和 *PmGlc5* 相似度最高的酶都是  $\beta$ -1,3/1,4 葡萄糖苷酶, 因此推测这 4 种葡萄糖苷酶也可能具有水解葡甘露聚糖或寡糖中  $\beta$ -1,3/1,4 葡萄糖苷键的活性。

## 2.3 重组酶的异源表达、纯化及鉴定

以提取的浸麻类芽孢杆菌总基因组为模板, 以表 1 中序列为引物, 成功扩增出目的基因 *pmman1*、*pmman2*、*pmman3*、*pmglc1*、*pmglc2* 和 *pmglc3*, *pmglc4* 和 *pmglc5* 未能成功扩增。将获得的的目的基因与载体连接后转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 成功构建了 6 个重组菌株。获得纯酶后, SDS-PAGE 检测结果如图 2 所示, *PmMan1*、*PmMan2*、*PmMan3*、*PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中实现了可溶性表达, 且纯度较高, 重组蛋白的分子量与理论分子量基本一致。

表 3 重组酶氨基酸序列比对

Table 3 Comparison of the amino acid sequences of recombinases

Enzymes	GenBank No.	Sources	Similarity (%)	References
<i>PmMan2</i>	AML27062	<i>Bacillus</i> sp. N16-5	58.33	[14]
<i>PmMan3</i>	ACS92711	<i>Paenibacillus</i> sp. BME-14	41.88	[15]
<i>PmGlc1</i>	ABN52488	<i>Acetivibrio thermocellus</i> ATCC 27405	38.79	[16]
<i>PmGlc2</i>	AAO78673	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	41.02	[17]
<i>PmGlc3</i>	ALJ47754	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	35.22	[18]
<i>PmGlc4</i>	ABL78891	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	39.59	[19]
<i>PmGlc5</i>	ABL78891	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	34.92	[19]

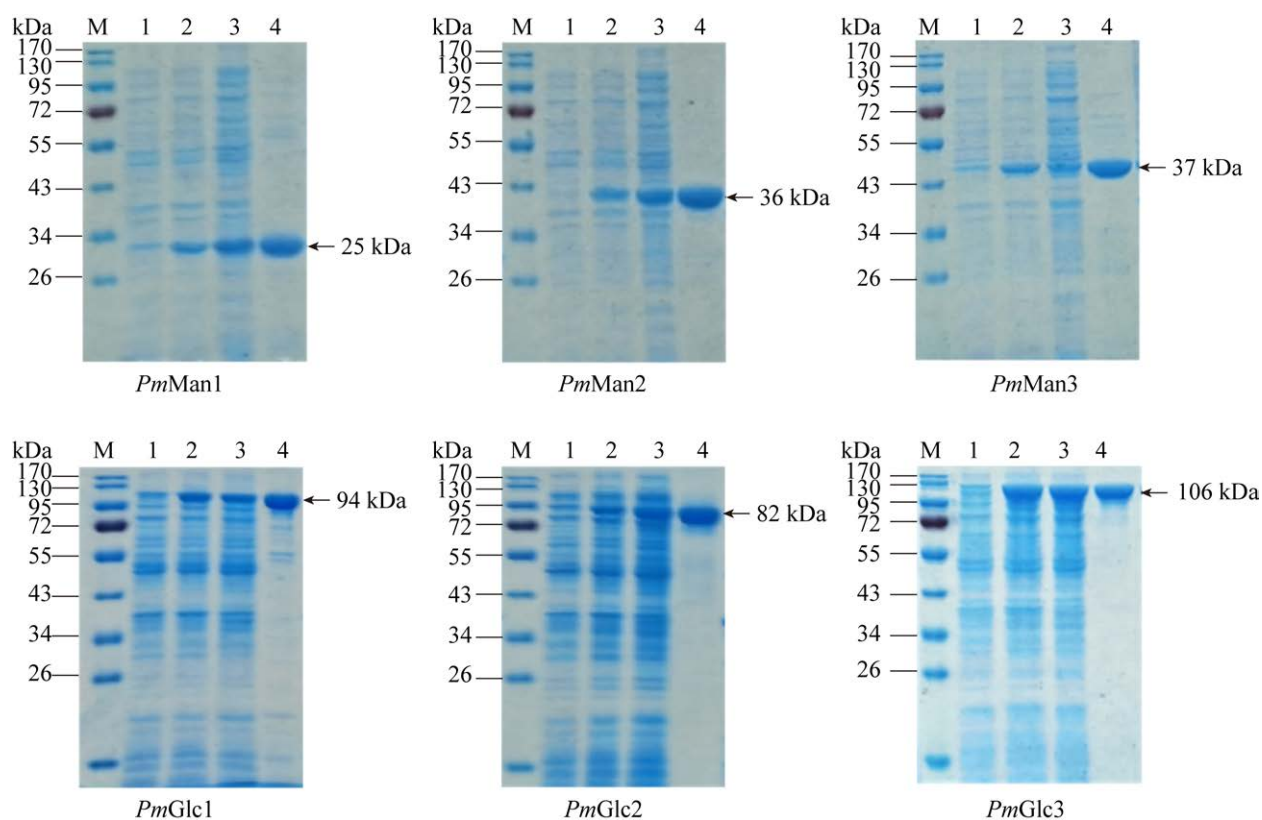


图 2 重组酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 Analysis of recombinases by SDS-PAGE. Line M: Protein molecular weight markers; Line 1: Culture lysate before IPTG induction; Line 2: Culture lysate after IPTG induction; Line 3: Supernatant of the bacteria lysate; Line 4: Purified enzyme.

## 2.4 重组酶的功能研究

### 2.4.1 重组酶对 *pNP*-糖苷底物的选择性

以 12 种 *pNP*-糖苷为底物, 分析上述 6 种重组糖苷酶的选择性, 结果见表 4。表中结果显示, *PmMan1* 和 *PmMan2* 不能水解提供的任何 *pNP*-糖苷底物, 包括 *pNP* $\alpha$ Man 和 *pNP* $\beta$ Man, 分析其可

能为内切甘露聚糖酶或其底物为一定聚合度的甘露寡糖。*PmMan3* 对 *pNP* $\alpha$ Gal 有水解功能, 可能同时具有外切  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性。*PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 均能专一水解 *pNP* $\beta$ Glc, 表明这 3 种酶可能具有外切  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性。其中, *PmGlc1* 比酶活最高, 为 780 U/mg。

表 4 重组酶对不同 *p*NP-糖苷底物的比酶活Table 4 Specific activity of recombinases on different *p*NP glycoside substrates (U/mg)

Substrates	<i>PmMan1</i>	<i>PmMan2</i>	<i>PmMan3</i>	<i>PmGlc1</i>	<i>PmGlc2</i>	<i>PmGlc3</i>
<i>p</i> NP $\alpha$ Man	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\beta$ Man	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Araf	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Arap	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Xyl	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\beta$ Xyl	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Glc	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\beta$ Glc	–	–	–	782±26.40	2.23±0.14	3.11±0.09
<i>p</i> NP $\alpha$ Gal	–	–	23.9±1.39	–	–	–
<i>p</i> NP $\beta$ Gal	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Fuc	–	–	–	–	–	–
<i>p</i> NP $\alpha$ Rha	–	–	–	–	–	–

–: Not detected.

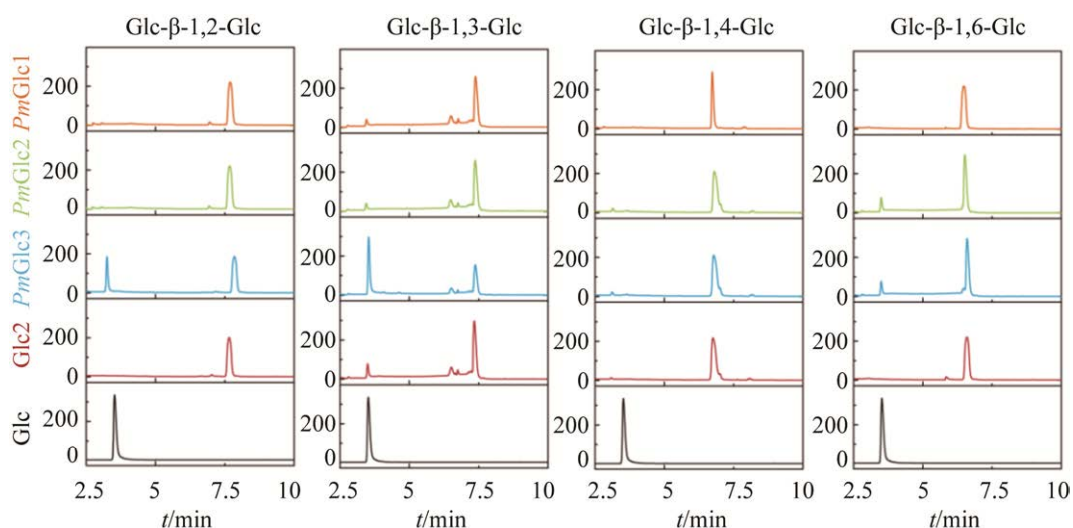
#### 2.4.2 重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶对 $\beta$ -葡二糖底物的选择性

以不同连接方式的葡二糖为底物,进一步分析葡萄糖苷酶 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 的键型选择性。如图 3 所示, *PmGlc1* 不能水解任何  $\beta$ -葡二糖; *PmGlc2* 能够微弱水解龙胆二糖, 为外切  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷酶; *PmGlc3* 可以水解槐二糖、昆布二糖和龙胆二糖, 为选择性广泛的外切

$\beta$ -葡萄糖苷酶。 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 对纤维二糖均无活性。

#### 2.4.3 重组葡萄糖苷酶对人参皂苷底物的选择性

以含有葡萄糖链的人参皂苷 Rb1、Rd、Gyp XVII 和 Re 为底物研究重组葡萄糖苷酶对人参皂苷的选择性。人参皂苷结构及其转化结果如图 4 所示, *PmGlc1* 不能水解人参皂苷。 *PmGlc2* 只

图 3 HPAEC 分析重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶对二糖底物的作用Figure 3 Effects of recombinant  $\beta$ -glucosidase on disaccharide substrates by HPAEC.



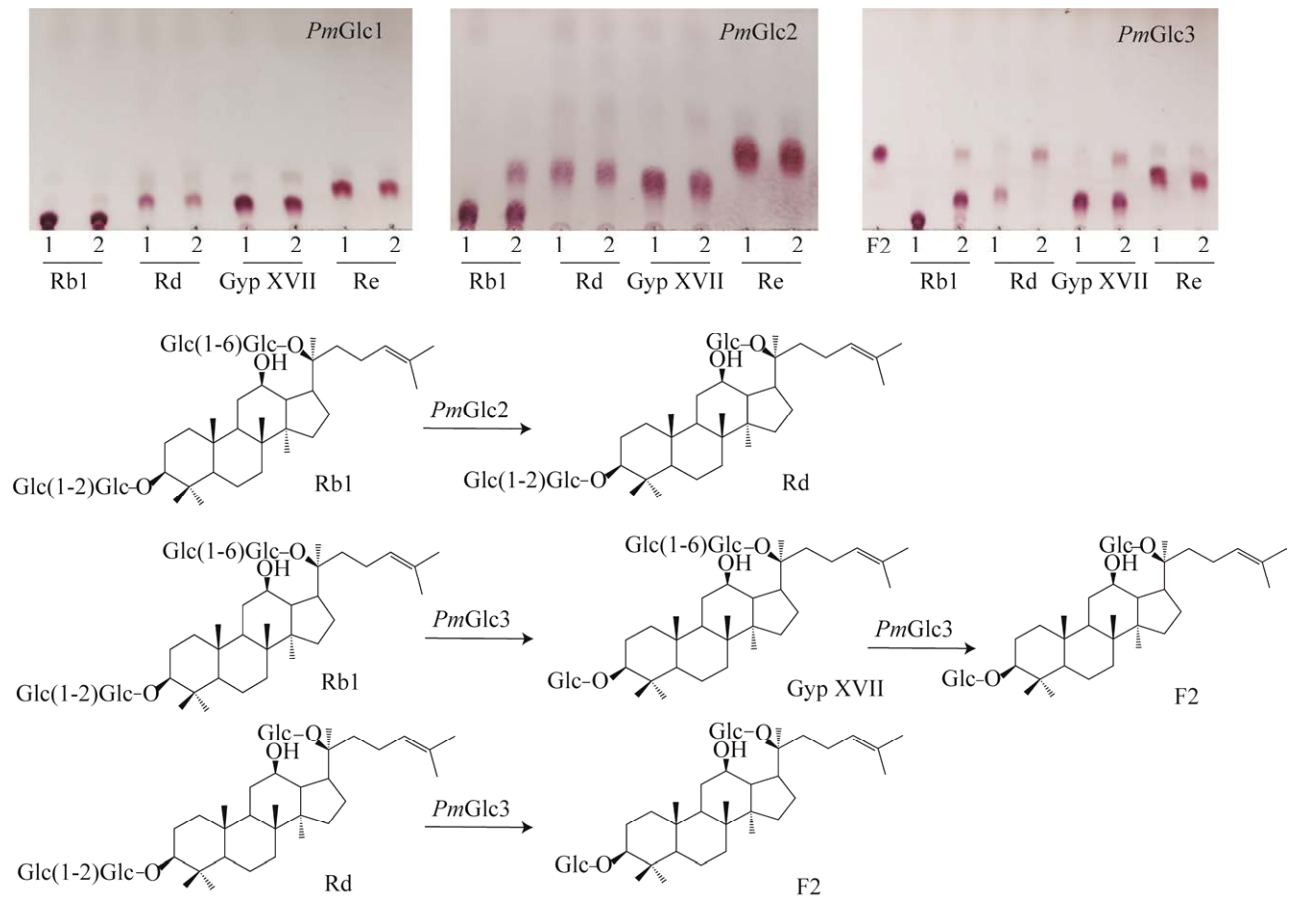


图 4 TLC 检测重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶转化人参皂苷的功能

Figure 4 Analysis of the function of  $\beta$ -glucosidase on ginsenosides by TLC. Line 1: Substrate before conversion; Line 2: Product after conversion.

能微弱水解 Rb1 生成 Rd, 与上述水解葡二糖的结果一致, 表明 *PmGlc2* 是专一性较好的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷酶。*PmGlc3* 可以完全水解 Rb1 和 Rd 并分别生成 Gyp XVII 和 F2, 同时可以继续微弱水解 Gyp XVII 生成 F2。这表明 *PmGlc3* 为外切  $\beta$ -1,2/6-葡萄糖苷酶, 且水解  $\beta$ -1,2-糖苷键的能力较强, 这与其水解葡二糖的结果一致。

#### 2.4.4 重组酶降解葡甘露寡糖

以葡甘露寡糖为底物, 分析 6 种重组酶降解寡糖的能力, 葡甘露寡糖是甘露糖和葡萄糖以  $\beta$ -糖苷键按一定比例随机连接而成的聚合度在 2–10 之间的混合物。结果如图 5 所示, *PmMan1*、*PmMan2*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 均能降解葡甘露寡

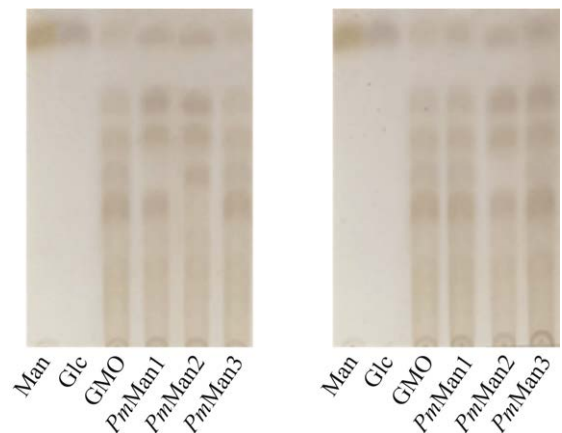


图 5 TLC 检测重组酶转化葡甘露寡糖的产物

Figure 5 TLC analysis of the products of glucomanosaccharides converted by recombinases.

糖,而 *PmMan3* 和 *PmGlc1* 不能水解葡甘露寡糖。*PmMan1* 作用于聚合度较小的底物,而 *PmMan2* 作用于聚合度较大的底物,*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 能作用于聚合度较小的葡甘露寡糖以释放葡萄糖。

#### 2.4.5 重组酶降解葡甘露聚糖

使用 6 种重组酶分别降解魔芋胶,通过 DNS 检测释放的还原糖量,分析重组酶对葡甘露聚糖的水解能力。结果如表 5 所示, *PmMan2* 对葡甘露聚糖的水解能力约为 *PmMan1* 的 2 倍,而 *PmMan3* 无法水解魔芋胶。而在 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 的反应体系中,未能检测出还原糖的增加,表明 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 不能水解魔芋胶为代表的高或大分子量葡甘露聚糖。

综合上述结果, *PmGlc1* 仅对 *pNPβGlc* 活性较高,而对葡二糖、人参皂苷、葡甘露寡糖和葡甘露聚糖均无活性,分析其为芳基-β-葡萄糖苷酶。*PmMan3* 只能作用于 *pNPαGal*,对葡甘露寡糖和葡甘露聚糖均无水解活性,不作用于甘露糖苷类物质,初步鉴定为外切 α-半乳糖苷酶,本文不再对其进行深入研究。

表 5 DNS 法检测重组酶对魔芋胶的比酶活

Table 5 Specific activity of recombinases on konjac glucomannan by DNS

Recombinases	Specific activity (U/mg)
<i>PmMan1</i>	2.67±0.28
<i>PmMan2</i>	5.24±0.31
<i>PmMan3</i>	–
<i>PmGlc1</i>	–
<i>PmGlc2</i>	–
<i>PmGlc3</i>	–

–: Not detected.

## 2.5 重组酶的酶学特性表征

### 2.5.1 最适 pH 值和 pH 稳定性

研究结果(图 6)显示, *PmMan1*、*PmMan2*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 的最适 pH 为 6.0, *PmGlc1* 的最适 pH 为 7.0。4 °C 孵育 24 h 后,一般酶活力保持在初始酶活的 60%以上为酶在该 pH 条件下稳定性较好。*PmMan1* 和 *PmMan2* 在 pH 4.0–10.0 的范围内稳定性较好; *PmGlc1* 在 pH 5.0–10.0 的范围稳定性较好; *PmGlc2* 和 *PmGlc3* 均在 pH 5.0–9.0 的范围稳定性较好。

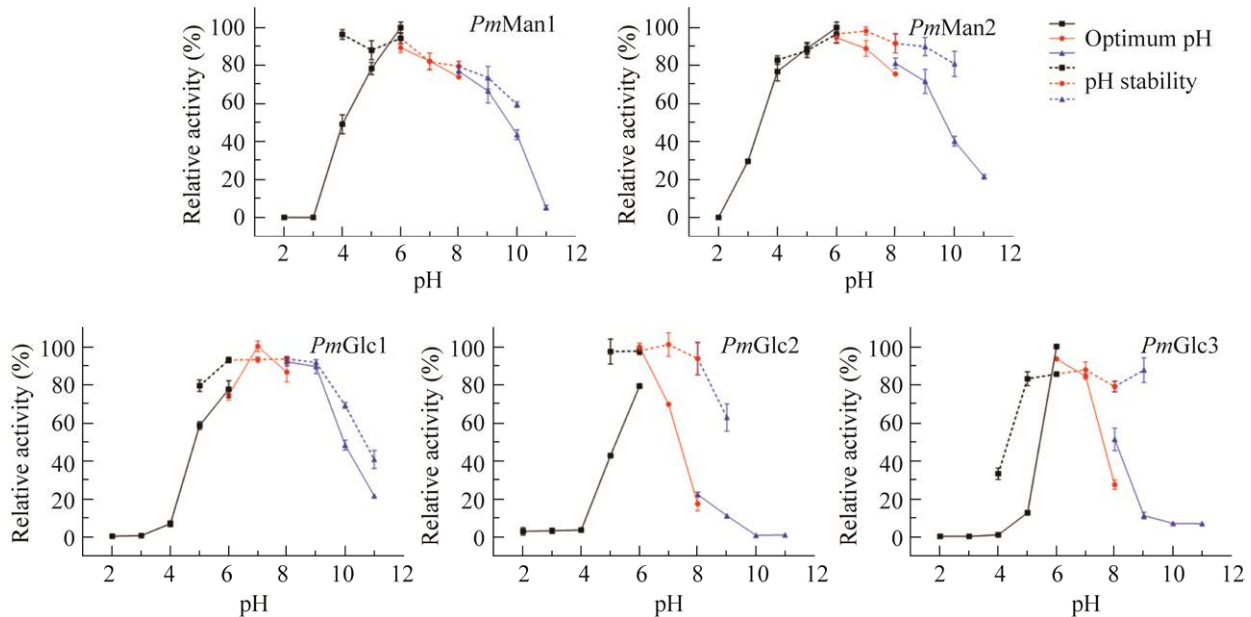


图 6 重组酶的最适 pH 和 pH 稳定性曲线

Figure 6 Optimum pH and pH stability curves of recombinases. ■: HAc-NaAc buffer; ●:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  buffer; ▲: NaOH-Gly buffer.

### 2.5.2 最适温度和温度稳定性

研究结果(图 7)显示, *PmMan1* 和 *PmMan2* 的最适温度为 50 °C, *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 的最适温度分别为 50、45 和 40 °C。

*PmMan1* 只在 35 °C 条件下具有较好的稳定

性, 45 °C 孵育 0.5 h 后活力不足初始酶活的 50%, 4 h 后活力完全丧失。*PmMan2*、*PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 在 35–40 °C 具有一定的稳定性, 孵育 12 h 后酶活力保持在 50% 以上(图 8)。由此可知, 浸麻类芽孢杆菌葡甘露聚糖降解酶温

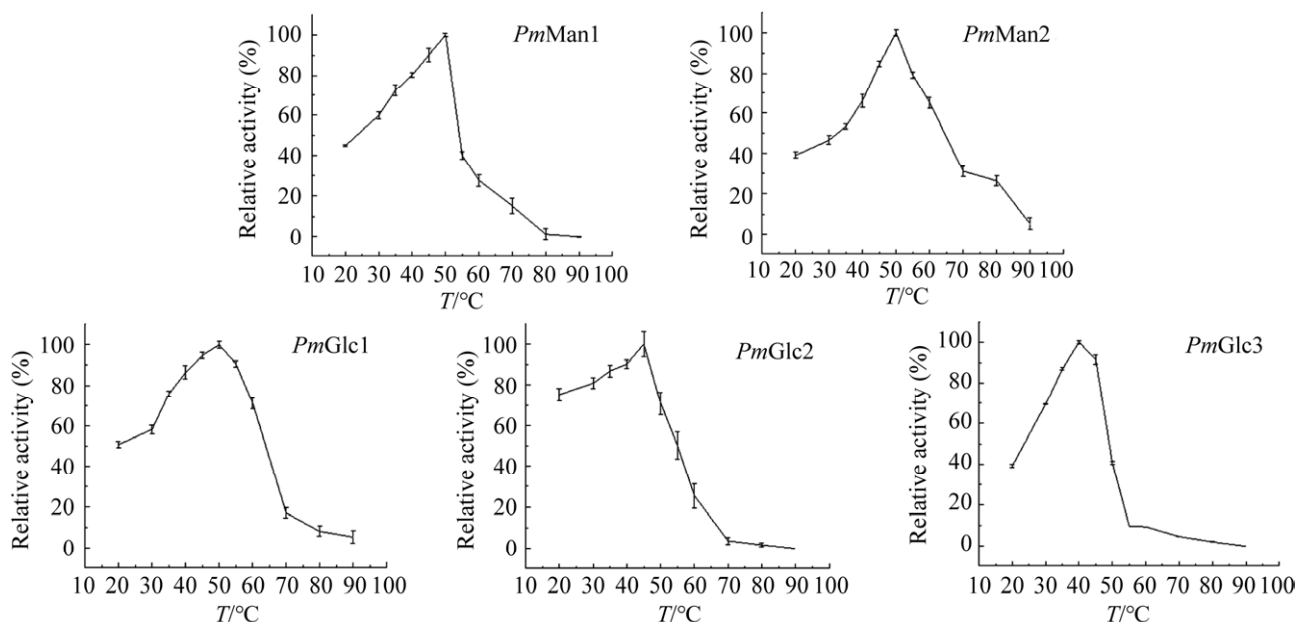


图 7 重组酶的最适温度曲线

Figure 7 Optimum temperature curves of recombinases.

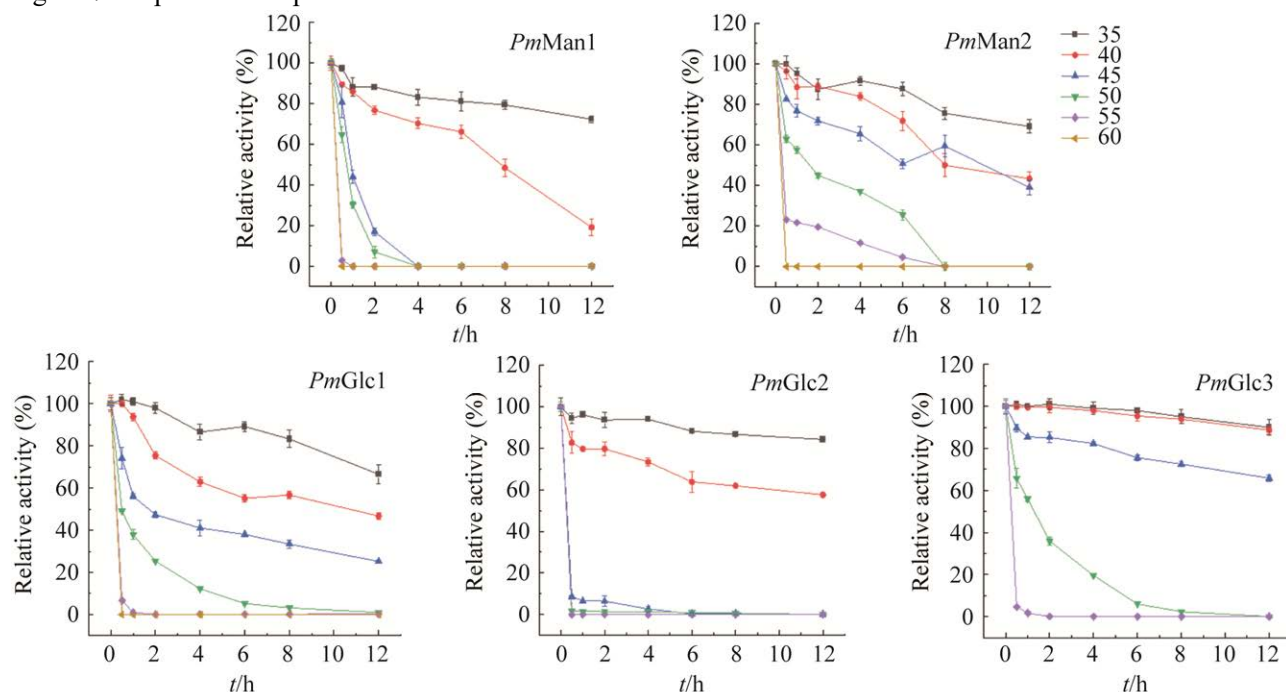


图 8 重组酶的温度稳定性曲线

Figure 8 Temperature stability curves of recombinases.

度耐受能力较弱, 在 35 °C 左右条件下稳定性较好。

## 2.6 重组酶组合降解葡甘露聚糖

以魔芋胶为底物酶活力最高的  $\beta$ -甘露聚糖酶 *PmMan2* 为核心酶, 分析其与另外 3 种酶协同降解葡甘露聚糖的作用。结果如图 9 所示, *PmMan1* 和 *PmMan2* 同时作用魔芋胶未能显示协同增效, 可能是由于 2 个酶都属于内切  $\beta$ -甘露聚糖酶, 竞争性结合底物的结合位点, 无法有效促进葡甘露聚糖的降解。*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 与 *PmMan2* 都显示有协同作用, 可能因为两者能够水解 *PmMan2* 所释放的葡甘露寡糖。*PmGlc2* 为专一性较好的  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷酶, *PmGlc3* 底物选择性比 *PmGlc2* 更广泛, 除  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键外还可以水解  $\beta$ -1,3-葡萄糖苷键, 因此加入 *PmGlc3* 比加入 *PmGlc2* 释放的还原糖量更多, 与 *PmMan2* 的协同作用更明显。综上所述, *PmMan2* 和 *PmGlc3* 在降解葡甘露聚糖中发挥重要作用。

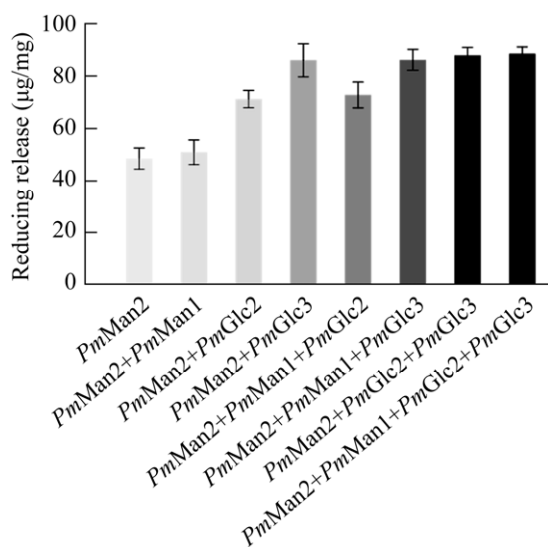


图 9 重组酶协同降解魔芋胶

Figure 9 Synergistic effects of recombinases on degradation of konjac gum. The error bar represents the standard deviation of at least three independent repeats of data.

## 3 讨论与结论

葡甘露聚糖酶主要存在于微生物中, 由文献报道可知, 类芽孢杆菌属是产葡甘露聚糖酶较多的一类细菌<sup>[20-21]</sup>。Hu 等<sup>[22]</sup>从魔芋甘露聚糖培养基中发现并鉴定出 6 种可以高效降解魔芋甘露聚糖的多黏类芽孢杆菌。浸麻类芽孢杆菌是类芽孢杆菌属中降解多糖能力较强的物种之一<sup>[23]</sup>, 但是目前关于其降解葡甘露聚糖和葡甘露聚糖降解酶系的研究未见报道。本研究以魔芋葡甘露聚糖为唯一底物培养浸麻类芽孢杆菌, 发现该菌可以完全降解葡甘露聚糖, 因此, 浸麻类芽孢杆菌中可能含有新的降解葡甘露聚糖的酶。NCBI 数据库中检索到该菌基因组中共注释有 3 个假定的  $\beta$ -甘露聚糖酶和 5 个  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因。本研究中共克隆表达出 3 种  $\beta$ -甘露聚糖酶 *PmMan1*、*PmMan2* 和 *PmMan3* 及 3 种  $\beta$ -葡萄糖苷酶 *PmGlc1*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3*, 并利用一系列的苯基糖苷、人参皂苷、葡二糖、葡甘露寡糖和多糖为底物系统研究了这些重组酶的底物专一性。研究表明, *PmMan1*、*PmMan2* 对所有的 *pNP*-糖苷底物均无活性, 但能降解葡甘露寡糖和葡甘露聚糖, 分析其可能为内切葡甘露聚糖酶。*PmMan3* 只能降解 *pNP* $\alpha$ Gal, 不能降解葡甘露寡糖和葡甘露聚糖, 鉴定其为外切  $\alpha$ -半乳糖苷酶; *PmGlc1* 对 *pNP* $\beta$ Glc 活性较高, 而对葡二糖、人参皂苷、葡甘露寡糖和葡甘露聚糖均无活性, 分析其为芳基- $\beta$ -葡萄糖苷酶。*PmGlc2* 和 *PmGlc3* 能降解 *pNP* $\beta$ Glc、葡二糖、人参皂苷及葡甘露寡糖, 分析其可能为外切- $\beta$ -葡萄糖苷酶。综合以上结果, 从浸麻类芽孢杆菌中获得了 4 种新的葡甘露聚糖降解酶, 分别为 *PmMan1*、*PmMan2*、*PmGlc2* 和 *PmGlc3*, 在降解葡甘露聚糖中发挥重要作用。

目前, 关于微生物中  $\beta$ -1,4-甘露聚糖酶的研究

究较多。地衣芽孢杆菌中的一种  $\beta$ -1,4-甘露聚糖酶能降解魔芋葡甘露聚糖和刺槐豆胶,产物主要为不同聚合度的甘露寡糖(M2–M6)及甘露糖,以甘露戊糖(M5)为底物时,其水解能力较弱,产物是 M2 和 M3<sup>[24]</sup>。北里孢菌属中的一种内切  $\beta$ -1,4-甘露聚糖酶对葡甘露聚糖的降解产物也主要为甘露二糖、三糖和四糖,且对半乳甘露聚糖的降解能力高于葡甘露聚糖<sup>[25]</sup>。除  $\beta$ -1,4-甘露聚糖酶外,半乳糖苷酶和葡萄糖苷酶等在降解甘露聚糖尤其杂甘露聚糖中也发挥重要的作用。WANG 等<sup>[26]</sup>的研究发现, $\alpha$ -半乳糖苷酶和甘露聚糖酶共同作用可使半乳甘露聚糖的降解效率提高 3 倍。Margolles-Clark 等<sup>[27]</sup>发现 2 种半乳糖苷酶与甘露聚糖酶和甘露糖苷酶共同水解半乳甘露聚糖时效率最高。但关于葡萄糖苷酶降解葡甘露聚糖及葡甘露聚糖酶系的研究却少之又少。2002 年邓立红<sup>[28]</sup>使用黑曲霉发酵液降解魔芋葡甘露聚糖时,分析了水解过程中产物的变化,推测发酵液中的  $\beta$ -甘露聚糖酶、 $\beta$ -甘露糖苷酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶可能在水解魔芋葡甘露聚糖时具有协同作用。2013 年 Mikkelsen 等<sup>[29]</sup>从里氏木霉中克隆表达出 1 种甘露聚糖酶和 2 种葡聚糖酶,其中甘露聚糖酶对葡甘露聚糖的活性与本研究的 *PmMan2* 较为接近,这 3 种酶均能一定程度水解魔芋葡甘露聚糖,但未对三者之间的协同作用进行研究。

本研究克隆表达了浸麻类芽孢杆菌的葡甘露聚糖降解酶,并对其中降解葡甘露寡糖和葡甘露聚糖效果较好的 4 种酶进行了不同组合,分析了其在降解葡甘露聚糖中的作用。研究发现,同时使用 *PmMan1* 和 *PmMan2* 降解魔芋胶,未产生协同作用。而 Han 等<sup>[30]</sup>的研究发现来源于嗜热厌氧细菌的 *Man5A* 和 *Man5B* 在降解葡甘露聚糖时具有协同作用。可见不同来源和种类的葡甘露聚糖酶之间存在不同的相互作用。本研究发现 *PmGlc3* 虽然不能水解葡甘露聚糖,但其能显著

促进 *PmMan2* 降解葡甘露聚糖,表明 *PmMan2* 和 *PmGlc3* 之间具有协同作用。

本研究的成果不仅丰富了葡甘露聚糖酶系,在以后的深入研究中,利用这些酶可以分析葡甘露聚糖的精细结构和制备活性葡甘露寡糖,促进葡甘露聚糖的理论和应用研究。

## 参考文献

- [1] GÓMEZ B, MÍGUEZ B, YÁÑEZ R, ALONSO JL. Manufacture and properties of glucomannans and glucomannooligosaccharides derived from konjac and other sources[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(10): 2019-2031.
- [2] MALGAS S, van DYK JS, PLETSCHE BI. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase and  $\alpha$ -galactosidase[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(8): 1167-1175.
- [3] YE SX, ZONGO AWS, SHAH BR, LI J, LI B. Konjac glucomannan (KGM), deacetylated KGM (da-KGM), and degraded KGM derivatives: a special focus on colloidal nutrition[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(44): 12921-12932.
- [4] DEVARAJ DR, REDDY KC, XU BJ. Health-promoting effects of konjac glucomannan and its practical applications: a critical review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 126: 273-281.
- [5] LIU JH, XU QH, ZHANG JJ, ZHOU XX, LYU F, ZHAO PC, DING YT. Preparation, composition analysis and antioxidant activities of konjac oligo-glucomannan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 130: 398-404.
- [6] JANA UK, SURYAWANSHI RK, PRAJAPATI BP, SONI H, KANGO N. Production optimization and characterization of manno oligosaccharide generating  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 308-314.
- [7] CHAUHAN PS, SHARMA P, PURI N, GUPTA N. A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(7): 1459-1467.
- [8] LIANG TW, WU CC, CHENG WT, CHEN YC, WANG CL, WANG IL, WANG SL. Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus*

- macerans* TKU029[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(2): 933-950.
- [9] 邓慧媛, 李志忠, 张凯, 李建喜. 奶牛瘤胃液中浸麻类芽孢杆菌的分离鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(6): 246-249.
- DENG HY, LI ZZ, ZHANG K, LI JX. Isolation and identification of *Paenibacillus macerans* strain from cows rumen fluid[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(6): 246-249 (in Chinese).
- [10] SIEVERS F, HIGGINS DG. Clustal omega for making accurate alignments of many protein sequences[J]. *Protein Science*, 2018, 27(1): 135-145.
- [11] 黄颖, 姚雪妍, 刘腾飞, 米硕甫, 孙丽超, 辛凤姣. 新型耐热  $\beta$ -1,4-木糖苷酶的重组表达及酶学性质[J]. *微生物学报*, 2019, 59(4): 689-699.
- HUANG Y, YAO XY, LIU TF, MI SF, SUN LC, XIN FJ. Biochemical characterization of a novel thermostable  $\beta$ -1,4-xylosidase from *Caldicellulosiruptor owensensis* OL[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(4): 689-699 (in Chinese).
- [12] 沈风飞, 缪婷婷, 张晓晓, 尹爱国, 石鹏君, 徐波. 嗜热古菌 *Thermofilum adornatum* 来源的高温热激活  $\beta$ -葡萄糖苷酶 TaBgl3 的原核表达及酶学性质研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2555-2567.
- SHEN FF, MIAO TT, ZHANG XX, YIN AG, SHI PJ, XU B. Expression and characterization of thermo-activated  $\beta$ -glucosidase TaBgl3 from *Thermofilum adornatum*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2555-2567 (in Chinese).
- [13] McCLEARY BV, McGEOUGH P. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- $\beta$ -xylanase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(5): 1152-1163.
- [14] SONG YJ, SUN WY, FAN YL, XUE YF, LIU DD, MA CP, LIU WT, MOSHER W, LUO XG, LI ZY, MA WJ, ZHANG TC. Galactomannan degrading enzymes from the mannan utilization gene cluster of alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 and their synergy on galactomannan degradation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(42): 11055-11063.
- [15] ZHANG R, ZHOU JP, GAO YJ, GUAN YP, LI JJ, TANG XH, XU B, DING JM, HUANG ZX. Molecular and biochemical characterizations of a new low-temperature active mannanase[J]. *Folia Microbiologica*, 2015, 60(6): 483-492.
- [16] WILSON CM, RODRIGUEZ M Jr, JOHNSON CM, MARTIN SL, CHU TM, WOLFINGER RD, HAUSER LJ, LAND ML, KLINGEMAN DM, SYED MH, RAGAUSKAS AJ, TSCHAPLINSKI TJ, MIELENZ JR, BROWN SD. Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated *Populus* and switchgrass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 179.
- [17] XU J, BJURSELL MK, HIMROD J, DENG S, CARMICHAEL LK, CHIANG HC, HOOPER LV, GORDON JI. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis[J]. *Science*, 2003, 299(5615): 2074-2076.
- [18] WU M, McNULTY NP, RODIONOV DA, KHOROSHKIN MS, GRIFFIN NW, CHENG JY, LATREILLE P, KERSTETTER RA, TERRAPON N, HENRISSAT B, OSTERMAN AL, GORDON JI. Genetic determinants of *in vivo* fitness and diet responsiveness in multiple human gut *Bacteroides*[J]. *Science*, 2015, 350(6256): aac5992.
- [19] ALVES LF, MELEIRO LP, SILVA RN, WESTMANN CA, GUAZZARONI ME. Novel ethanol- and 5-hydroxymethyl furfural-stimulated  $\beta$ -glucosidase retrieved from a Brazilian secondary Atlantic forest soil metagenome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2556.
- [20] LI YF, CALLEY JN, EBERT PJ, HELMES EB. *Paenibacillus lentus* sp. nov., a  $\beta$ -mannanolytic bacterium isolated from mixed soil samples in a selective enrichment using guar gum as the sole carbon source[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 4): 1166-1172.
- [21] DHAWAN S, SINGH R, KAUR R, KAUR J. A  $\beta$ -mannanase from *Paenibacillus* sp.: optimization of production and its possible prebiotic potential[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, 63(5): 669-678.
- [22] HU L, ZHU X, SHANG L, TENG Y, LI J, LI B. Inhibit the intrinsic bacteria from konjac glucomannan hydrosol for its improved viscosity stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106197.
- [23] GUPTA A, MURARKA A, CAMPBELL P, GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol in *Paenibacillus macerans*: metabolic pathways and environmental determinants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(18): 5871-5883.

- [24] SONGSIRIRITTHIGUL C, BURANABANYAT B, HALTRICH D, YAMABHAI M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 20.
- [25] RAHMANI N, KASHIWAGI N, LEE J, NIIMI-NAKAMURA S, MATSUMOTO H, KAHAR P, LISDIYANTI P, YOPI, PRASETYA B, OGINO C, KONDO A. Mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of manno oligosaccharides from mannan polymers[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 100.
- [26] WANG H, LUO H, LI J, BAI Y, HUANG H, SHI P, YAO B. An  $\alpha$ -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with  $\beta$ -mannanase[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8376-8382.
- [27] MARGOLLES-CLARK E, TENKANEN M, LUONTERI E, PENTTILÄ M. Three alpha-galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 240(1): 104-111.
- [28] 邓立红. 黑曲霉合成  $\beta$ -甘露聚糖酶及制备功能性甘露低聚糖的研究[D]. 长沙: 中南林学院硕士学位论文, 2002.
- DENG LH. Study on the synthesis of  $\beta$ -mannanase and functional manno oligosaccharides by *Aspergillus niger*[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry and Technology, 2002 (in Chinese).
- [29] MIKKELSON A, HANNU MAAHEIMO, TERHI KH. Hydrolysis of konjac glucomannan by *Trichoderma reesei* mannanase and endoglucanases Cel7B and Cel5A for the production of glucomanno oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 372: 60-68.
- [30] HAN YJ, DODD D, HESPERN CW, OHENE-ADJEI S, SCHROEDER CM, MACKIE RI, CANN IKO. Comparative analyses of two thermophilic enzymes exhibiting both beta-1,4 mannosidic and beta-1,4 glucosidic cleavage activities from *Caldanaerobius polysaccharolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(16): 4111-4121.