

β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望

赵月菊^{1,2}, 薛燕芬¹, 马延和^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所极端微生物实验室, 北京 100101)

(²中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 β -甘露聚糖酶是一种半纤维素水解酶, 广泛存在于动植物和微生物中, 在造纸、纺织印染、洗涤、食品、饲料、医药和石油开采等工业中有着广阔的应用前景。 β -甘露聚糖酶往往由催化域和非催化域两部分组成的。催化域折叠成 TIM 桶状结构, 参与底物的结合和催化; 碳水化合物结合域, 作为最常见的一种非催化域, 采用经典的 β 三明治结构, 可以增强结合有纤维素的甘露糖水解能力。本文主要对组成 β -甘露聚糖酶的各个模块三维结构特征和功能进行了系统的综述。

关键词: β -甘露聚糖酶; 催化域; 碳水化合物结合域; 结构功能

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1131-07

β -甘露聚糖酶[β -1,4-D-mannan mannanohydrolase; EC 3.2.1.78]是一类能够水解甘露聚糖和异甘露聚糖中的 β -1,4-D-甘露糖苷键的水解酶。 β -甘露聚糖酶来源广泛, 普遍存在于微生物、植物和动物中, 有着广阔的应用前景。在造纸工业中, β -甘露聚糖酶可运用于纸浆的漂白工艺。在纺织工业中, β -甘露聚糖酶用于降解天然纤维中的半纤维素胶质, 并能有效地去除纺织印染产品上黏附的多余染料, 以取代常规的化学处理工艺, 降低了能耗和对环境的污染。在洗涤工业中, β -甘露聚糖酶可用作洗涤剂添加剂。在饲料工业中, β -甘露聚糖酶是一种环保型饲料添加剂, 减轻环境污染, 消除抗营养因子的作用, 提高饲料利用率, 减少抗生素等化学药品的使用。在食品工业中, β -甘露聚糖酶可用于降解植物胶, 生产功能性低聚糖之一的低聚甘露糖, 也可用于食品的加工、贮藏和果汁澄清。 β -甘露聚糖酶作为工具酶, 可以水解天然甘露多糖类物质, 通过测定水解产物中多糖类物质的种类和比例, 推知多糖结构。

β -甘露聚糖酶还可用作油井压裂液的优质生物破乳剂^[1]。

β -甘露聚糖酶有着广阔的应用价值和前景, 这是人们一直不懈地探索研究 β -甘露聚糖酶巨大推动力。开发利用自然界半纤维素资源热潮的兴起和 β -甘露聚糖酶潜在应用价值认识逐步的加深在 β -甘露聚糖酶研究起到了推波助澜的作用。早期的研究主要集中在产酶菌株的筛选和发酵条件的优化、酶的分离纯化和性质的研究、酶水解作用机理以及酶基因克隆和外源表达等方面。随着研究的深入, 人们发现天然来源的 β -甘露聚糖酶往往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, 不能直接应用于生产实践中, 因此天然酶的改造成为获得工业用酶另一种有效途径。

特别是随着蛋白质工程(protein engineering)的蓬勃发展, 通过分子生物学、结构生物学和计算生物化学, 在掌握蛋白质结构与功能关系的基础上, 经过计算机辅助的分子设计, 按照人类的需要, 产生性质

基金项目: 国家 973 项目 (2003CB716001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

作者简介: 赵月菊(1981-), 女, 河北人, 博士研究生, 从事碱性甘露聚糖酶嗜碱机制研究。E-mail: zhaoyj@im.ac.cn

收稿日期: 2009-03-10; 修回日期: 2009-04-29

优良的酶分子已经成为可能^[2]。依照酶的晶体结构信息,人们通过计算模拟等手段研究酶的活性位点特性,与底物的结合性质以及极端条件适应性。掌握了活性位点和底物结合特性,有助于提高酶的催化活性以及改变底物特异性。同时,解析了酶分子适应极端环境的结构基础,有助于改变酶分子适应各生产工艺中对于温度、pH 及其盐度等因子的特殊要求。随着结构生物学的发展壮大和研究的逐步深入,在上述各个方面的研究取得了许多突破性的进展。仅以改造酶的热稳定性为例:早在上世纪 90 年代末,在结构和突变研究的基础上,一个简单的从谷氨酸到谷氨酰胺的突变成功使得磷酸丙糖异构酶的热稳定性提高了 26℃^[3];Fenel 等人通过基于结构的理性设计在一个工业用途的木聚糖酶结构中引入两个二硫键几个位点的突变使得目的酶的热稳定性提高了 20℃左右^[4,5]。

结构生物学是进行蛋白质功能定向改造强有力的支撑。为了更好的服务于 β-甘露聚糖酶的定向改造,利用蓬勃发展的结构生物学来阐明 β-甘露聚糖酶的结构与功能关系成为近来研究的新的热点并取得了一定的进展。本文在目前已有的研究基础上,就 β-甘露聚糖酶在结构生物学研究方面的新进展做一简要综述,为进一步研究提供参考。

1 β-甘露聚糖酶的结构研究概况

1998 年,来自褐热单胞菌(*Thermobifida fusca* KW3)的 β-甘露聚糖酶(TfMan5A)的结构得到了解析,这是第一个报道的 β-甘露聚糖酶晶体结构^[6]。随着结构生物学的发展和 β-甘露聚糖酶研究的深入,至今已得到了 9 个不同来源的 β-甘露聚糖酶的晶体结构(表 1)。通过对这些结构的解析,主要从底物结合模式、底物特异性和适应极端环境的结构基础等方面对 β-甘露聚糖酶进行了详细的阐述。

表 1 已报道结构的 β-甘露聚糖酶

Sources	PDB code	Reference
Bacteria		
<i>Thermobifida fusca</i> KW3	1BQC	[6]
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	1J9Y	[7]
<i>Bacillus</i> sp. JAMB-602	1WKY	[8]
<i>Cellulomonas fimi</i>	2BVY	[9]
<i>Bacillus subtilis</i> Z-2	2QHA	[10]
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Tc-12-31	3CIV	[11]
Fungus		
<i>Hypocrea jecorina</i> RutC-30	1QNO	[12]
Plant		
<i>Lycopersicon Esculentum</i>	1RH9	[13]
Animal		
<i>Mytilus edulis</i>	2COH	[14]

表 2 一些微生物源的 β-甘露聚糖酶模块分布^[18]

Table 2 Module arrangement of some microbial β-mannanases

Microbial species	Protein	Module arrangement	Reference
<i>Aspergillus sulphureus</i>	ManN	CD5	[19]
<i>Bacillus circulans</i> CGMCC1416	ManB48	CD5	[20]
<i>Bacillus circulans</i> CGMCC1554	Man5A	CD5	[21]
<i>Bacillus</i> sp. JAMB-602	Man5A	CD5	[8]
<i>Bacillus subtilis</i> Z-2	BCman	CD26	[10]
<i>Bacillus</i> sp. JAMB-750	Man26A	CD26/CBM23/MBM/CTIX/MAR	[22]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ManF	CD5/CBM27	[23]
<i>Bispora</i> sp. MEY-1	Man5A	CD5	[24]
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	ManA	ORF1/ ? /CBM3B/CD5/CBM3b/ORF3	[25]
<i>Caldocellum saccharolyticum</i> Rt8B.4	ManA	CD26/ ?	[26]
<i>Cellulomonas fimi</i>	Man26A	CD26/LP/CBM23	[27]
<i>Cellvibrio japonicus</i>	Man5A	CD5/CBM2a	[28]
	Man5B	CD5/CBM5	
	Man5C	CD5/CBM10/	
<i>Cellvibrio japonicus</i>	Man26B	CD26	[29]
	Man26C	CD26	
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Man5K	LP/DM/CD5	[30]
<i>Clostridium thermocellum</i>	Man26B	CD26/LP/DM	[31]
<i>Cryptopygus antarcticus</i>	CaMan	CD5	[32]
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Man26A	CD44/FN3/CD26/CBM3	[33]
<i>Piromyces</i> sp.	ManA	CD/DM	[34]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MANA	CD26	[35]
<i>Rhodothermus marinus</i>	ManA	CD26	[36]
<i>Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum</i>	ManA	LP/CD/CBM16/SLH	[37]
<i>Trichoderma reesei</i>	Man5A	CD5/LP/CBM1	[28]
<i>Vibrio</i> sp.	ManA	CD5	[38]

CD :catalytic domain with family number ;CBM :carbohydrate binding module with family number ;CTIX :collagen type IX alpha I chain ;DM :dockerin module ;FN3 :fibronectin type III like repeat ;LP :leader peptide ;MAR :membrane anchor region of Gram positive surface protein ;MBM :mannan binding module ;ORF :open reading frame ;SLH :surface layer like protein region ;? :domain of unknown function.

通常大部分 β -甘露聚糖酶是由催化域和非催化域两个在结构上独立的模块组成的^[15-17]。也有一些 β -甘露聚糖酶构成比较复杂,不止具有一个非催化域(表 2)。下面从各个组成模块切入,逐一介绍它们的结构和功能特点。

2 β -甘露聚糖酶的催化域(catalytic domain)

依照催化域序列相似性^[39],目前已发现的 80 多个 β -甘露聚糖酶可以被划分到糖苷水解酶家族 5_26 和 113^[11]。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,它们的催化域采用相同的折叠方式并且遵循相同的催化机制。也就是说所有的 β -甘露聚糖酶,尽管在催化域序列上存在一定的差异,但是它们的催化域都是采用 TIM 桶状结构(图 1)并且它们均遵循保留催化机制。

(β/α)₈-TIM 桶状结构是由八个 β 折叠和八个 α 螺旋交替排列组成,其中八个 β 折叠片段排列在一起组成一个桶状结构,连接这些 β 折叠的 α 螺旋围绕在桶的外沿。但这并不意味着所有的已知结构的 β -甘露聚糖酶都毫无变化的采用经典的桶状结构,源自紫贻贝中的 β -甘露聚糖酶用加长的环状结构来取代了位于桶状结构的第五和第六个 α 螺旋^[14]。

β -甘露聚糖酶的活性位点是两个谷氨酸,作为酸碱催化位点和亲核催化位点,分别位于第 4 个和第 7 个 β 折叠的 C 末端,在所有的 β -甘露聚糖酶中绝对保守。

8 个保守的氨基酸构成了 β -甘露聚糖酶的活性口袋,虽然在一级序列上不同的 β -甘露聚糖酶表现出了一定的差异,但是它们的空间位置和功能相同。我们以第 1 个报道结构的 TfMan5A 为例来说明各个氨基酸的相互位置和作用。这 8 个氨基酸分别为 Arg50, His86, Asn127, Glu128, His196, Tyr198, Glu225 和 Trp254,同时在整个糖苷水解酶家族 5 中这 8 个

位点都是保守的。Glu128 和 Glu225 分别位于 β_4 和 β_7 折叠 C 末端,作为酸碱催化位点和亲核催化位点;His86 位于 β_3 折叠 C 末端可以介导 HO-C(3) 的识别;Arg50、Asn127、His196 和 Tyr198 分别位于 β_2 折叠 C 末端、 β_4 折叠 C 末端、 β_6 折叠 C 末端,起到稳定活性位点的环境影响催化氨基酸的解离状态;Trp254 位于 β_8 折叠 C 末端,为吡喃环的 α 面提供一个疏水作用面(图 2)^[6]。



Fig. 1 典型的(β/α)₈-TIM 桶状结构

Fig. 1 Typical structure of (β/α)₈-TIM barrel from the top view.

除了了解活性口袋的关键氨基酸及作用外,人们还试图探寻 β -甘露聚糖酶的底物结合模式(substrate binding model)。目前,多个酶和底物复合物的结构得到了解析。结合模式主要有两种:一种情况就是甘露糖基采用在热力学有利的⁴C₁ 的构型,如甘露三糖与 *Thermomonospora fusca* 的 β -甘露聚糖酶 TfMan5A 的 -4, -3 和 -2 结合位点便是采用这种构型;另一种甘露糖基采用¹S₅ 扭船构象(skew-boat conformation),如甘露糖基在西红柿中的 β -甘露聚糖酶 LeMan 的 -1 结合位点采用这种结合模式。

随着越来越多来自极端环境的 β -甘露聚糖酶被报道,一些酶的结构得到了解析,如 *Thermomonospora*

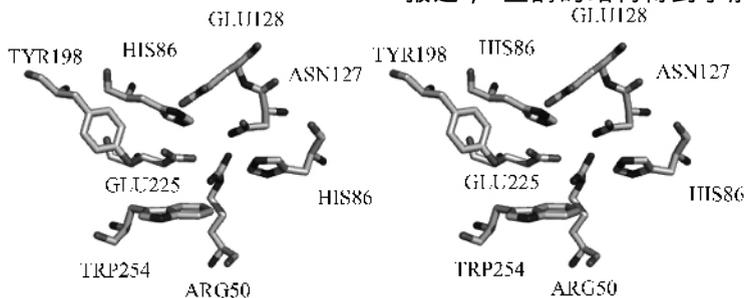


图 2 热褐单胞菌 β -甘露聚糖酶(TfMan5A)活性口袋的立体图

Fig. 2 Stereoview of the active site pockets of TfMan5A.

fusca 的嗜热 β -甘露聚糖酶 TfMan5A(最适温度为 80℃), *Bacillus* sp. JAMB-602 的嗜碱 β -甘露聚糖酶 B602Man5A(最适 pH 为 9)和 *Bacillus* sp. N165 的嗜碱 β -甘露聚糖酶 B165Man5A(最适 pH 为 9.5)^[40]。探寻与 β -甘露聚糖酶的嗜极性质相关的结构特征是一个新的研究角度。至今有四篇文章涉及到了这个问题,在不同程度上进行了论述。在热稳定性的结构基础研究方面取得了一定的进展。早在 1998 年, Hilge 等就尝试着从结构出发寻找与嗜热 β -甘露聚糖酶 TfMan5A 的热稳定性相关的特征。研究表明 TfMan5A 相对于中温酶而言,增加了平均每个氨基酸参与的离子键相互作用的数目^[6]。另外,在 Yan 等对于 *Bacillus subtilis* 的 β -甘露聚糖酶 BCman 的研究提到了相比较其他的 β -甘露聚糖酶,BCman 展示出较高的热稳定性,这归功于其结构中形成的二硫键以及锌离子和 His-Glu-His 的相互作用^[10]。人们也在试图解密 β -甘露聚糖酶的碱适应性的结构基础。为此,两个源自芽孢杆菌的碱性 β -甘露聚糖酶 B602Man5A 和 B165Man5A 的结构都得到了解析。这部分工作处于起步阶段,本实验室围绕 B165Man5A 的碱适应性的机制这一课题展开工作,并取得了一定的进展。

3 β -甘露聚糖酶碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module)

除了催化域外,有些 β -甘露聚糖酶还含有碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM)。源自 *Cellulomonas fimi* 的 β -甘露聚糖酶是第一个报道的含有 β -甘露聚糖结合模块的 β -甘露聚糖酶^[41]。CBM 的存在被认为可以增强酶对于结合有纤维素的甘露糖水解能力^[42]。根据序列相似性和三维结构, CBM 划分为不同的家族^[43],至今已报道了 53 个家族。与糖苷水解酶家族划分类似,相近的 CBM 家族又被分为超家族(superfamily or clan)。

虽具备相似的催化域,但是 β -甘露聚糖酶在是否存在碳水化合物结合模块和其出现的位置方面存在差异^[44]。碳水化合物结合域在存在、分布和种类上没有明显的规律可循。我们以微生物源的 β -甘露聚糖酶的 CBM 分布来简要说明一下这一特点(表 2)。在含有碳水化合物结合域的 β -甘露聚糖酶中碳水化合物结合域的分布的位置和种类各异,与其来源没有相关性。如同样源自芽孢杆菌属, *Bacillus* sp. JAMB-602 中的 β -甘露聚糖酶不含碳水化合物结合域(CBM),而 *Bacillus* sp. JAMB-750 中的 β -甘露聚

糖酶有一个属于家族 23 的碳水化合物结合域(CBM)。3 个同样源自 *Cellvibrio japonicus* 中的 β -甘露聚糖酶, Man5A、Man5B 和 Man5C,碳水化合物结合域的种类仍不同。

目前,仅有两个 β -甘露聚糖酶的碳水化合物结合域结构得到了解析。一个位于 *Thermotoga maritima* 的 β -甘露聚糖酶(Man5)C 末端的碳水化合物结合域(TmCBM27),另一个是 *Cellvibrio japonicus* 的 β -甘露聚糖酶(CjMan5C)的碳水化合物结合域(CjCBM35)。

TmCBM27 是一个 β 三明治(β sandwich)结构,由 13 个 β 折叠,一个小的 α 螺旋和一个钙离子构成(图 3-A)。这种折叠方式与家族 2, 3, 4, 6, 9, 15, 17, 22 和 29 的 CBM 相似,在各个家族的 CBM 中极为普遍。它的结合位点的独特结构影响其对于多糖底物的识别^[45]。

CjCBM35 是第一个报道结构的属于家族 35 的碳水化合物结合域,它也采用典型的 β 三明治(β sandwich)结构(图 3-B)。它的显著特点是,与大部分的 CBM 不同,它不是刚性的蛋白,而是在结合底物时构象发生显著变化^[46]。

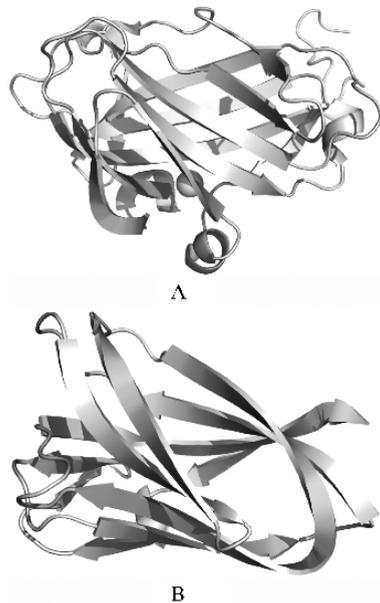


图 3 已报道的 β -甘露聚糖酶中的碳水化合物结合域结构图

Fig.3 Structure of TmCBM27 (A) and CjCBM35(B). The figure was prepared using PyMOL.

4 其他模块

除了前面提到的催化域和碳水化合物结合域外,有的 β -甘露聚糖酶具有其他的非催化结构域。

如来自 *C. fimi* 的 β -甘露聚糖酶含有一个假定的 S 层同源(SLH, S-layer homology)模块和两个功能未知的模块^[9]。另外一些来着厌氧细菌和真菌的 β -甘露聚糖酶含有锚定结构域(dockerin module)^[18], 可以将 β -甘露聚糖酶固定在微生物细胞的表面或是将其连接到诸如纤维小体这样的多酶复合物上^[16-47-49]。对于 β -甘露聚糖酶这些结构域的结构和功能认知相对于催化域和碳水化合物结合域要少很多。

5 展望

近几十年来对半纤维素资源的开发利用和甘露寡糖益生价值的发现, 以及 β -甘露聚糖酶工业应用领域的拓展, 大大推动了 β -甘露聚糖酶研究的发展。国内外对 β -甘露聚糖酶的研究近年来有一定的进展, 取得了一系列重要成果和较好的经济和社会效益。

半纤维素酶在蓬勃发展的生物技术产业中扮演着举足轻重的角色, 但目前关于半纤维素酶的研究主要关注木聚糖水解酶, 与之相比, β -甘露聚糖酶的研究没有得到足够重视^[18]。因此为了缓解环境和能源压力更为充分的利用丰富的半纤维素资源同时为了使 β -甘露聚糖酶更好的服务于生产生活的各个相关领域, 在已有成果的基础上, 我们应该继续推进对于 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, 以期能直接应用于各个领域。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。因为往往自然分离纯化的酶难以满足苛刻的工业生产过程或是实际需要, 酶的改造就成为一种非常有效的替代途径。另一方面, 应用研究不能仅满足于实验室小试阶段, 应不断提高产酶菌株的产酶水平或构建外源高表达体系, 掌握 β -甘露聚糖酶合成的调控机理进而推动工业化推广应用。

参考文献

[1] 吴襟, 何秉旺. 微生物 β -甘露聚糖酶. 微生物学通报 (*Microbiology*), 1999, 26(2): 134 - 136.

[2] 朱俊晨, 王小菁. 酶的分子设计、改造与工程应用. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2004, 24(8): 32 - 37.

[3] Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, et al. Structural and mutagenesis studies of *leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering*, 1999, 12(3): 243 - 250.

[4] Fenel F, Leisola M, Jäis J, et al. A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4-b-xylanase II. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(2): 137 - 143.

[5] Xiong H, Fenel F, Leisola M, et al. Engineering the thermostability of *Trichoderma reesei* endo-1,4-b-xylanase II by combination of disulphide bridges. *Extremophiles*, 2004, 8(5): 393 - 400.

[6] Hilge M, Gloor SM, Rypniewski W, et al. High-resolution native and complex structures of thermostable beta-mannanase from *Thermomonospora fusca* substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure*, 1998, 6(11): 1433 - 1444.

[7] Hogg D, Woo EJ, Bolam DN, et al. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(33): 31186 - 31192.

[8] Akita M, Takeda N, Hirasawa K, et al. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 2004, 60(Pt 8): 1490 - 1492.

[9] Le Nours J, Anderson L, Stoll D, et al. The structure and characterization of a modular endo-beta-1,4-mannanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*, 2005, 44(38): 12700 - 12708.

[10] Yan XX, An XM, Gui LL, et al. From structure to function: insights into the catalytic substrate specificity and thermostability displayed by *Bacillus subtilis* mannanase BCman. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 379(3): 535 - 544.

[11] Zhang Y, Ju J, Peng H, et al. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(46): 31551 - 31558.

[12] Sabini E, Brzozowski AM, Dauter M, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 1999, 55(Pt 5): 1058 - 1060.

[13] Bourgault R, Oakley AJ, Bewley JD, et al. Three-dimensional structure of (1,4)-beta-D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit. *Protein Science*, 2005, 14(5): 1233 - 1241.

[14] Larsson AM, Anderson L, Xu B, et al. Three-dimensional crystal structure and enzymic characterization of beta-mannanase Man5A from blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 357(5): 1500 - 1510.

- [15] Henrissat B , Callebaut I , Fabrega S , et al. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1995 92(15) :7090 – 7094 .
- [16] Perret S , Belaich A , Fierobe H-P , et al. Towards Designer Cellulosomes in *Clostridia* : Mannanase Enrichment of the Cellulosomes Produced by *Clostridium cellulolyticum* . *Journal of Bacteriology* 2004 , 186(19) :6544 – 6552 .
- [17] Warren RA. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* , 1996 50 :183 – 212 .
- [18] Dhawan S , Kaur J. Microbial mannanases : an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 2007 27(4) :197 – 216 .
- [19] Chen X , Cao Y , Ding Y , et al. Cloning , functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-mannanase in *Pichia pastoris* . *Journal of Biotechnology* , 2007 , 128(3) :452 – 461 .
- [20] Li Y , Yang P , Meng K , et al. Gene cloning , expression and characterization of a novel beta-mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008 , 18(1) :160 – 166 .
- [21] Yang P , Li Y , Wang Y , et al. A novel beta-mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554 : gene cloning , expression and enzymatic characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2008 .
- [22] Hatada Y , Takeda N , Hirasawa K , et al. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750 , its expression in *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles* 2005 9(6) :497 – 500 .
- [23] Ethier N , Talbot G , Sygusch J. Gene cloning , DNA sequencing , and expression of thermostable beta-mannanase from *Bacillus stearothermophilus* . *Applied and Environmental Microbiology* , 1998 64(11) :4428 – 4432 .
- [24] Luo H , Wang Y , Wang H , et al. A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1 : gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris* . *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009 82(3) :453 – 461 .
- [25] Sunna A , Gibbs MD , Chin CW , et al. A gene encoding a novel multidomain beta-1 , 4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66(2) :664 – 670 .
- [26] Gibbs MD , Elinder AU , Reeves RA , et al. Sequencing , cloning and expression of a beta-1 , 4-mannanase gene , manA , from the extremely thermophilic anaerobic bacterium , *Caldicellulosiruptor* Rt8B. 4. *FEMS Microbiology Letters* , 1996 , 141(1) :37 – 43 .
- [27] Stoll D , Stalbrand H , Warren RA. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi* . *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 65(6) :2598 – 2605 .
- [28] Hogg D , Pell G , Dupree P , et al. The modular architecture of *Cellvibrio japonicus* mannanases in glycoside hydrolase families 5 and 26 points to differences in their role in mannan degradation. *Biochemical Journal* , 2003 , 371(Pt 3) :1027 – 1043 .
- [29] Cartmell A , Topakas E , Ducros VM , et al. The *Cellvibrio japonicus* mannanase CJMAN26C displays a unique exo-mode of action that is conferred by subtle changes to the distal region of the active site. *Journal of Biological Chemistry* 2008 .
- [30] Franco PF , Ferreira HM , Filho EX. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2004 40(Pt 3) :255 – 259 .
- [31] Kurokawa J , Hemjinda E , Arai T , et al. Sequence of the *Clostridium thermocellum* mannanase gene man26B and characterization of the translated product. *Bioscience , Biotechnology , and Biochemistry* 2001 65(3) :548 – 554 .
- [32] Song JM , Nam KW , Kang SG , et al. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active beta-1 , 4-D-mannanase from the Antarctic springtail , *Cryptopygus antarcticus* . *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B , Biochemistry and Molecular Biology* 2008 , 151(1) :32 – 40 .
- [33] Cho KM , Hong SY , Lee SM , et al. A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006 73(3) :618 – 630 .
- [34] Millward-Sadler SJ , Hall J , Black GW , et al. Evidence that the *Piromyces* gene family encoding endo-1 , 4-mannanases arose through gene duplication. *FEMS Microbiology Letters* , 1996 , 141(2-3) :183 – 188 .
- [35] Braithwaite KL , Black GW , Hazlewood GP , et al. A non-modular endo-beta-1 , 4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* . *Biochemical Journal* , 1995 , 305(Pt 3) :1005 – 1010 .
- [36] Politz O , Krah M , Thomsen KK , et al. A highly thermostable endo-(1 , 4)-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus* . *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000 53(6) :715 – 721 .
- [37] Cann IK , Kocherginskaya S , King MR , et al. Molecular cloning , sequencing , and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* . *Journal of Bacteriology* , 1999 , 181(5) :1643 – 1651 .

- [38] Tamaku Y , Akaki T , Morishita T , et al. Cloning , DNA sequencing , and expression of the beta-1 4-mannanase gene from a marine bacterium , *Vibrio* sp. strain MA-138. *Journal of Fermentation and Bioengineering* ,1997 ,83(2) : 201 – 205 .
- [39] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* , 1991 280(Pt 2) 309 – 316 .
- [40] Zhao Y , Zhang Y , Gao F , et al. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline beta-mannanase from the alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Acta Crystallographica , Section F : Structural Biology and Crystallization Communications* 2008 64(Pt 10) 957 – 959 .
- [41] Stoll D , He S , Withers SG , et al. Identification of Glu-519 as the catalytic nucleophile in beta-mannosidase 2A from *Cellulomonas fimi*. *Biochemical Journal* ,2000 ,351 Pt 3 : 833 – 838 .
- [42] Benech R-O , Li X , Patton D , et al. Recombinant expression , characterization , and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo-beta-1 , 4-mannanase. *Enzyme and Microbial Technology* ,2007 ,41(6-7) :740 – 747 .
- [43] Boraston AB , Bolam DN , Gilbert HJ , et al. Carbohydrate binding modules : fine tuning polysaccharide recognition , 2004 382 769 – 781 .
- [44] Ximenes EA , Chen H , Kataeva IA , et al. A mannanase , ManA , of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. *Canadian Journal of Microbiology* 2005 51(7) 559 – 568 .
- [45] Boraston AB , Revett TJ , Boraston CM , et al. Structural and thermodynamic dissection of specific mannan recognition by a carbohydrate binding module , TmCBM27. *Structure* 2003 , 11(6) 665 – 675 .
- [46] Tunnicliffe RB , Bolam DN , Pell G , et al. Structure of a mannan-specific family 35 carbohydrate-binding module : evidence for significant conformational changes upon ligand binding. *Journal of Molecular Biology* ,2005 ,347(2) :287 – 296 .
- [47] Shallom D , Shoham Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 2003 6(3) 219 – 228 .
- [48] Halstead JR , Vercoe PE , Gilbert HJ , et al. A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiology* ,1999 ,145(Pt 11) 3101 – 3108 .
- [49] Tamaru Y , Karita S , Ibrahim A , et al. A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Journal of Bacteriology* 2000 ,182(20) 5906 – 5910 .

Recent advances and prospect on structural biology of β -mannanase-A review

Yueju Zhao^{1 2} , Yanfen Xue¹ , Yanhe Ma^{1*}

(¹ Laboratory of Extremophiles , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

(² Graduate School , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract β -mannanases (β -1 4-D-mannanase , EC 3.2.1.78) , as a hemicellulose hydrolase , are widely distributed in bacteria , fungi , plants and even animals . They can randomly hydrolyze the β -1 4-mannosidic linkages in mannan and heteromannan and have great potential in the food/feed , pulp/paper , medicine , oil exploitation and detergent industries . Most β -mannanases often display a modular organization and usually contain structurally discrete catalytic and non-catalytic modules . Catalytic domains of these enzymes share a (β/α)₈-barrel fold , which play important roles in substrate binding and catalysis . Carbohydrate binding modules , as the most common non-catalytic modules , fold as β -sandwich and facilitate the targeting of these enzymes to polysaccharide . In this review , a brief introduction is given concerning structural characteristics and function of these β -mannanase modules .

Keywords : β -mannanase ; catalytic module ; carbohydrate binding module ; structural characteristics ; function

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the National programs for High Technology Research and Development of China (2003CB716001)

* Corresponding author . Tel/Fax : + 86-10-64807616 ; E-mail : mayanhe@im.ac.cn

Received : 10 March 2009 / Revised 29 April 2009