

# 嗜热小孢根霉GH134家族甘露聚糖酶基因的克隆表达及在果汁加工中的应用

刘学<sup>1</sup>, 韩璞<sup>2</sup>, 陈伟<sup>1</sup>, 田洪涛<sup>1</sup>, 谷新晰<sup>1\*</sup>

(1.河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000; 2.河北保定第二中学, 河北保定 071000)

**摘要:** 本研究从浓香大曲中筛选出1株嗜热真菌HBFH10, 经鉴定为小孢根霉 (*Rhizopus microsporus*)。利用兼并引物, 从菌株HBFH10中获得1个新型甘露聚糖酶基因 (*RmMan134*), 该基因全长552 bp, 无内含子, 编码183个氨基酸和1个终止密码子。*RmMan134*酶蛋白分子由1个信号肽序列(1~19 aa)和GH134家族的催化区组成。经异源表达后, 重组*RmMan134*的最适反应温度为50℃, 最适反应pH值为6.0, 具有较强的热稳定性和pH值稳定性。*RmMan134*成熟蛋白分子质量约为18.5 kDa, 存在糖基化修饰。经动力学性质测定, 以魔芋胶为底物时, 该酶的 $V_{\max}$ 为57.1  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ,  $K_m$ 为0.66 mg/mL。重组酶*RmMan134*对橙汁的澄清效果最为明显, 澄清度提高了23.8%, 其次苹果汁提高了11%, 桃汁提高了7%左右。除此之外, 添加重组酶使得葡萄汁的出汁率提高了7%左右。综上所述, 甘露聚糖酶*RmMan134*在果汁加工中具有较好的应用前景。

**关键词:** 大曲; 嗜热真菌; 小孢根霉; 甘露聚糖酶; GH134家族; 果汁加工

## Cloning and Expression of a Novel GH134 $\beta$ -Mannanase Gene from Thermophilic Fungus *Rhizopus microsporus* and Its Application in Juice Processing

LIU Xue<sup>1</sup>, HAN Pu<sup>2</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, TIAN Hongtao<sup>1</sup>, GU Xinxi<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2. NO.2 High School of Baoding, Baoding 071000, China)

**Abstract:** A thermophilic fungus, named HBFH10, was isolated from Luzhou-flavor *Daqu* and identified as *Rhizopus microsporus*. A new  $\beta$ -mannanase gene (*RmMan134*) from *Rhizopus microsporus* HBFH10, was cloned using degenerate primers, expressed, and characterized. The cloned *RmMan134* gene had a total length of 552 bp without introns, encoding 183 amino acids and one stop codon. The expressed enzyme was composed of one signal peptide sequence of 19 amino acid residues and the catalytic region of the GH134 family. The optimal pH and temperature for the recombinant enzyme were 6.0 and 50 °C, respectively. It had high thermal and pH stability. Its molecular mass was estimated to be approximately 18.5 kDa, and it was a glycosylated molecule. When konjac gum was used as the substrate, the  $K_m$  and  $V_{\max}$  values of *RmMan134* were 0.66 mg/mL and 57.1  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ , respectively. *RmMan134* exhibited the best clarification efficiency for orange juice, resulting in a 23.8% increase in its clarity, followed apple juice (11%) and peach juice (7%). Moreover, *RmMan134* significantly increased the yield of grape juice by about 7%. Overall, *RmMan134* has good application prospects in juice processing.

**Keywords:** *Daqu*; thermophilic fungus; *Rhizopus microsporus*; mannanase; GH134 family; juice processing

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220928-312

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 16-0177-08

引文格式:

刘学, 韩璞, 陈伟, 等. 嗜热小孢根霉GH134家族甘露聚糖酶基因的克隆表达及在果汁加工中的应用[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 177-184. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220928-312. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901631); 保定市教育科学研究“十四五”规划项目(2202076)

第一作者简介: 刘学(1996—)(ORCID: 0000-0002-6200-159X), 女, 硕士, 研究方向为食品酶资源的开发与应用。

E-mail: 3230325154@qq.com

\*通信作者简介: 谷新晰(1982—)(ORCID: 0000-0001-8161-3340), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品酶制剂的开发与应用。E-mail: helloguxinxi@163.com

LIU Xue, HAN Pu, CHEN Wei, et al. Cloning and expression of a novel GH134  $\beta$ -mannanase gene from thermophilic fungus *Rhizopus microsporus* and its application in juice processing[J]. Food Science, 2023, 44(16): 177-184. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20220928-312. <http://www.spkx.net.cn>

$\beta$ -甘露聚糖酶 (EC 3.2.1.78) 是一类作用于 $\beta$ -1,4-甘露糖苷键的内切水解酶, 广泛分布于软体动物、植物和微生物中, 其中微生物来源的甘露聚糖酶资源最为丰富<sup>[1-3]</sup>。作为一种新兴的食品加工用酶, 甘露聚糖酶可应用在寡糖的制备<sup>[4]</sup>、面包品质的改良<sup>[5]</sup>、乳制品增稠加工<sup>[6]</sup>及果汁饮料稳定性等领域<sup>[7]</sup>。Shimizu等<sup>[8]</sup>在构巢曲霉中首次发现了一个全新的甘露聚糖酶家族, 归类为GH134家族。不同家族的甘露聚糖酶之间差异较大, 但是GH5、GH26和GH113家族甘露聚糖酶的分子结构却表现出较大的相似性, 呈典型的 $(\beta/\alpha)_8$ -TIM桶状结构, 属于GH-A超家族<sup>[9-11]</sup>。而GH134家族甘露聚糖酶的分子结构表现出明显差异, 其结构主要是呈现一种 $\alpha/\beta$ 折叠结构<sup>[12]</sup>。目前, GH5家族和GH26家族来源的甘露聚糖酶被进行了广泛研究, 而另外两个家族, 尤其是GH134家族甘露聚糖酶报道的信息较少。到目前为止, 只有数个GH134家族甘露聚糖酶被报道, 这使得该类家族甘露聚糖酶的信息极为有限, 限制了该类酶的进一步应用。

大曲是中国特有的一类糖化发酵剂<sup>[13]</sup>, 在发酵食品的生产中已经使用了几个世纪, 菌种具有较高的生物安全性能<sup>[14]</sup>。大曲往往被用在谷物的固态发酵生产中, 谷物中富含纤维素、半纤维、淀粉和果胶等多种物质, 这为多种微生物的生长提供了丰富的底物<sup>[15-17]</sup>, 同时固态发酵生产温度偏高 (50~70 °C), 大曲中功能微生物的挖掘已成为研究热点。

近年来, 由于消费者对健康、天然、绿色诉求的不断增强, 果汁饮料市场迅速扩大。目前, 果胶酶<sup>[18]</sup>、淀粉酶<sup>[19]</sup>和纤维素酶<sup>[20]</sup>等广泛应用于果汁加工中。然而由于水果种类众多, 造成不同水果出汁率、澄清度的因素存在差异, 挖掘新型果汁加工用酶一直是人们追求的目标。Nadaroglu等<sup>[21]</sup>首次对甘露聚糖酶在果汁中的应用进行探索, 发现甘露聚糖酶可以在果汁澄清中发挥重要作用。本课题组前期探究了GH5家族甘露聚糖酶NsMan5B对果汁澄清效果的评价<sup>[22]</sup>, 发现除橘子汁外, 该重组酶对其他果汁的澄清度都有不同程度的提高, 其中柿子汁澄清度提高了31.8%, 苹果汁、桃汁、葡萄汁的澄清度分别提高7%、4%和4%。而关于GH134家族的甘露聚糖酶在果汁加工的应用还鲜有相关报道。

本研究拟对嗜热真菌小孢根霉 (*Rhizopus microsporus*, Rm) HBFH10中GH134家族甘露聚糖酶基因进行克隆、表达及酶学性质的研究, 探究其在果汁加工过程中的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大曲来自河北凤来仪酒业有限公司; 毕赤酵母GS115和质粒pPIC9k均由本实验室保存。

*Trans I*-T1、Fast *pfu* DNA聚合酶 北京全式金生物技术有限公司; *T*<sub>4</sub> DNA酶和*EcoR* I、*Not* I、*Bgl* II限制酶 宝生物工程 (大连) 有限公司; 蛋白定量试剂盒 美国Bio-Rad公司; 真菌基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒 北京索莱宝科技有限公司; 角豆胶、魔芋粉、瓜尔豆胶 美国Sigma公司; 羧甲基纤维素钠、果胶 绿叶生物科技有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

BMGY (buffered glycerol-complex) 培养基、BMMY (buffered methanol-complex) 诱导培养基、MD (minimal dextrase) 琼脂板参照毕赤酵母表达手册; 筛选培养基: 10.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8.0 mg/L MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.3 g/L魔芋粉, pH 6.0; 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基购自北京陆桥技术股份有限公司。

### 1.2 仪器与设备

立式高速低温离心机 日本Hitachi公司; Tprofessional聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 德国Biotetra公司; TU-1810紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 电穿孔仪 美国伯乐公司; 蛋白超滤系统 德国Sartorius公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 嗜热真菌筛选

将1 g大曲样品充分与100 mL无菌水混匀, 取上层菌液涂布至筛选培养基平板, 并置于45 °C培养箱中培养2~5 d。挑取单菌落接种至PDA平板中, 并分别在19 °C和45 °C条件下, 观察其生长情况, 参照嗜热真菌筛选标准, 选取能够在45 °C正常生长, 而在19 °C不能生长的真菌, 4 °C保存备用。

#### 1.3.2 菌株的鉴定

将45 °C培养的单个菌株 (HBFH10) 接种在PDB培养基中, 30 °C培养72 h后, 离心收集菌体。利用真菌基因组提取试剂盒进行总DNA的提取, -20 °C保藏备用。菌株鉴定采用内转录间隔区 (internal transcriptional spacer, ITS) 鉴定方法, 将扩增获得的PCR产物 (800 bp) 连接至pEASY-T3载体中, 并热激转化至

*Trans1-T1*宿主, 阳性转化子送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。采用MEGA7.0软件构建进化树, 进行菌株的分类分析。

### 1.3.3 GH134家族甘露聚糖酶兼并引物设计及甘露聚糖酶基因的克隆

从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中, 收集已知GH134家族的氨基酸序列, 通过比对分析设计GH134家族的兼并引物: *Man134UF-AAAYTTYGGYATHHTTYAARCARAAAYTGG*和*Man134UR-ACRTCVAACCCARAARCGMGTRTCRTC*, 采用兼并引物扩增GH134家族基因的部分序列, 通过琼脂糖电泳检测扩增产物, 将符合大小的片段和pEASY-T3载体进行连接, 并转化至*Trans1-T1*宿主, 阳性转化子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

参考*Rm ATCC 62417*中的假使蛋白(CEG81741.1)序列, 设计引物: *RmMan134F-ATGCTCGTCAAGTACTTTGCTCTTTTCC*和*RmMan134R-TTAGATAGGGGTAACGTCGACCCAG*, 将PCR扩增产物进行回收后连接pEASY-T3载体, 并转入*Trans1-T1*宿主, 阳性转化子由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.3.4 *RmMan134*基因生物信息分析

使用Vector NTI 11.0软件对测序结果进行分析。使用FGENESH(<http://linux1.softberry.com/>)软件对基因的内含子和外显子位点进行预测分析。使用BLAST工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对基因序列进行比对分析。使用ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线工具预测酶蛋白的分子质量和等电点。使用SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)软件进行酶蛋白信号肽位点分析。使用NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)在线工具进行酶蛋白分子的N-糖基化位点分析。

### 1.3.5 重组甘露聚糖酶菌株的构建

依据*RmMan134*基因序列设计表达引物*RmMan134PF-CGGAATTCAGACCCGCGATAGAGGCCACTAC*和*RmMan134PR-GAATGCGCCGCTTAGATAGGGGTAACGTCGACCCAG*, 进行PCR构建pMD<sup>TM</sup>19T-*RmMan134*质粒, 随后与质粒pPIC-9k分别进行EcoR I和Not I双酶切处理, 并进行连接构建重组表达质粒pPIC9k-*RmMan134*, 阳性转化子由生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析。提取pPIC9k-*RmMan134*质粒并利用限制性酶Bgl II线性化, 将产物电转化至GS115感受态, 参照毕赤酵母表达手册方法和酶活性筛选方法对转化子进行筛选, 获得阳性转化子。

### 1.3.6 重组菌株诱导表达及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析

挑取阳性转化子至50 mL酵母浸出粉胨葡萄糖培养基中, 30 °C、250 r/min培养12 h后, 以1% (V/V)的接种量转接种于200 mL BMGY中, 30 °C摇床培养48 h。离心收集菌体并转接至200 mL BMMY培养基, 添加并维持甲醇终体积分数为0.5%, 30 °C摇床培养72 h。离心收集发酵液, 即为粗酶液, 进行酶活力测定及SDS-PAGE分析。

### 1.3.7 酶活力测定

参考Miller<sup>[23]</sup>的3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)方法。取100  $\mu$ L适当稀释酶液和900  $\mu$ L 5 mg/mL角豆胶溶液, 在pH 5.0 50 mmol/L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中, 50 °C反应10 min后, 加入1.5 mL DNS终止反应。对照则在加入1.5 mL DNS后, 补加100  $\mu$ L稀释酶液。沸水浴5 min并冷却至室温后在540 nm波长处测定吸光度。以每分钟生成1  $\mu$ mol甘露糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(IU)。

### 1.3.8 甘露聚糖酶酶学性质分析

#### 1.3.8.1 pH值对重组酶*RmMan134*活性的影响

在pH 2.0~12.0范围条件下, 按照1.3.7节方法测定重组酶*RmMan134*酶活力, 以酶活力最高值为100%, 探究该酶的pH值工作区间。在pH 2.0~12.0条件下, 将重组酶*RmMan134*在37 °C处理1 h后, 测定酶活力, 以未进行处理的酶活力为100%, 探究重组酶的pH值耐受性。

#### 1.3.8.2 温度对重组酶*RmMan134*活性的影响

在30~70 °C范围条件下, 按照1.3.7节方法测定重组酶*RmMan134*酶活力, 以酶活力最高值为100%, 测定重组酶的反应温度范围。将重组酶在50 °C和60 °C下, 分别孵育0、5、10、20、30 min和60 min, 测定酶活力, 以未处理酶活力值为100%, 探究该酶的热稳定性。

#### 1.3.8.3 重组酶*RmMan134*动力学参数及底物特异性测定

按照1.3.7节方法, 以不同质量浓度角豆胶(10、8、6、5、4、3、2 mg/mL和1 mg/mL)为底物测定重组酶*RmMan134*酶活力, 依据米氏方程双倒数法(Lineweaver-Burk法)求得 $K_m$ 和 $V_{max}$ 。

按照1.3.7节方法, 测定重组酶*RmMan134*对不同底物(角豆胶、魔芋胶、果胶、羧甲基纤维素钠和木聚糖)的降解能力, 探究重组酶的底物特异性。

### 1.3.9 重组酶*RmMan134*在果汁加工中的应用

选取新鲜、完整、成熟的橙子、杏、葡萄、苹果和桃, 进行清洗、晾干处理, 参照朱丹实等<sup>[24]</sup>方法制备果浆。每10 g果浆添加2 mL酶溶液(对照组添加2 mL蒸馏水替代)混匀, 50 °C条件下酶解1 h, 保存4 °C备用。

果汁出汁率测定<sup>[25]</sup>: 酶解后的果浆经200目滤布过滤15 min, 收集果汁并测定其体积。出汁率按下式计算:

$$\text{出汁率}/\% = \frac{\text{酶解后果汁流出量}}{\text{酶解前果浆量}} \times 100$$

果汁澄清度测定<sup>[26]</sup>: 经8 000 r/min离心12 min后, 取上清液在波长660 nm处测定透光度, 蒸馏水为对照, 以透光率(%)表示。

果汁总还原糖测定<sup>[27]</sup>: 采用DNS比色法进行果汁还原糖的测定, 以每毫升果汁中葡萄糖含量(mg/mL)表示。

#### 1.4 数据分析与处理

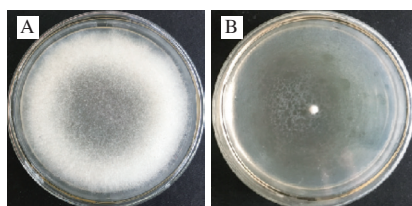
实验重复测定3次, 利用Excel 2019和SPSS 19.0软件对测定结果进行统计分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜热菌HBFH10的分离及鉴定

从河北省风来仪酒业有限公司大曲中筛选获得1株真菌HBFH10, 经菌株生长温度测定结果(图1A、B)可知, 菌株HBFH10在19℃下无法正常生长, 而能够在45℃条件下正常生长, 符合嗜热真菌生长温度特点要求, 判定HBFH10菌为嗜热真菌。

使用ITS1和ITS4引物进行18S基因间隔区域的扩增, 最终获得800 bp左右PCR产物。利用BLAST软件分析发现与*Rm* strain D4-1(GQ502280.1)一致性最高, 为99%, 通过进化树分析菌株HBFH10属于*Rm*, 最终将该菌命名为*Rm* HBFH10。



A. 45℃培养菌落形态; B. 19℃培养菌落形态; C. 基于ITS序列进化树。  
图1 菌株HBFH10菌落形态及进化树

Fig. 1 Morphology and evolutionary tree of strain HBFH10

### 2.2 甘露聚糖酶*RmMan134*基因序列分析

经对多条GH134氨基酸序列对比发现, 该家族甘露聚糖酶存在2个保守区域, 如图2所示。保守I区序列(NFGIFKQNW), 活性催化位点位于该区域中, 该区域结构主要为Loop结构, 由于Loop结构具有较强的柔性特点, 这为底物的识别及催化提供了便利; 保守II区序列(DDTRFWVD), 该区域相对而言最为保守, 该区

域主要是 $\beta$ 折叠片结构。在上述两区域设计GH134家族的兼并引物。本研究利用兼并引物Man134UF和Man134UR对*Rm* HBFH10基因组DNA进行扩增, 获得1个基因保守片段, 测序结果表明该基因为GH134家族的甘露聚糖酶基因的部分序列, 并且与菌株*Rm* ATCC 52813基因组中的假使蛋白基因(CEG81741.1)序列一致性为98%。进一步分析发现*RmMan134*基因由552 bp碱基组成, 没有内含子序列, 编码183个氨基酸和1个终止密码子。

*RmMan134*基因与已报道的GH134家族甘露聚糖酶的一致性对比分析, 该基因与已报道GH134家族基因的氨基酸序列一致性较低(<69.6%), 表明*RmMan134*基因具有一定的新颖性, 具有理论研究价值。其中与甘露聚糖酶*AoMan134*(XP\_023093135.1)一致性为45.2%, 与甘露聚糖酶*SsMan134*(PDB, 5JTS)一致性为51.6%, 与甘露聚糖酶*RmMan134A*(MF538624)一致性为69.6%, 与甘露聚糖酶*AnMan134*(ANID\_02710)一致性为51%。*RmMan134*具有 $\alpha\beta$ 结构, 属于Clan-A超家族, 含有催化保守氨基酸(E55和D67), 分别位于第2个和第3个 $\alpha$ 螺旋结构中。

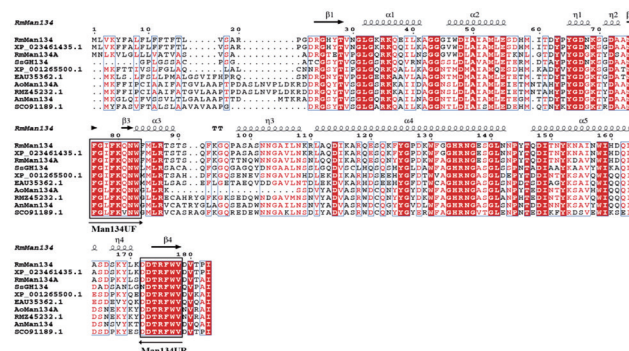


图2 甘露聚糖酶*RmMan134*序列对比分析  
Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *RmMan134*

### 2.3 重组菌*RmMan134*基因诱导表达及产物的SDS-PAGE分析

表达质粒pPIC9k-*RmMan134*经*Bgl* II限制酶线性化后, 电击转入毕赤酵母GS115感受态细胞, 在MD平板上培养, 挑取48个转化子进行小管诱导, 毕赤酵母采用两段法进行异源基因诱导表达。从48个转化子中筛选得到32株具有甘露聚糖酶活力的转化子。将重组菌株进行诱导表达之后, 对细胞发酵液进行酶活力检测, 发酵液中酶活力为7.8 U/mL。发酵酶液800 mL经12 000×g离心10 min去除酵母细胞及培养基, 收集上清液, 之后将上清酶液进行膜包(10 kDa)浓缩处理, 使浓缩后的酶液为30 mL左右。经SDS-PAGE检测重组酶*RmMan134*表观分子量约为22 kDa(图3), 比理论分子量18.5 kDa偏大, 经糖基化预测分析发现*RmMan134*酶蛋白分子存在1个N-糖基化位点(NKSG)。

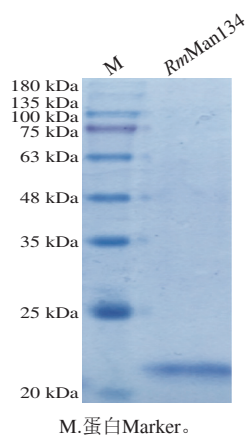
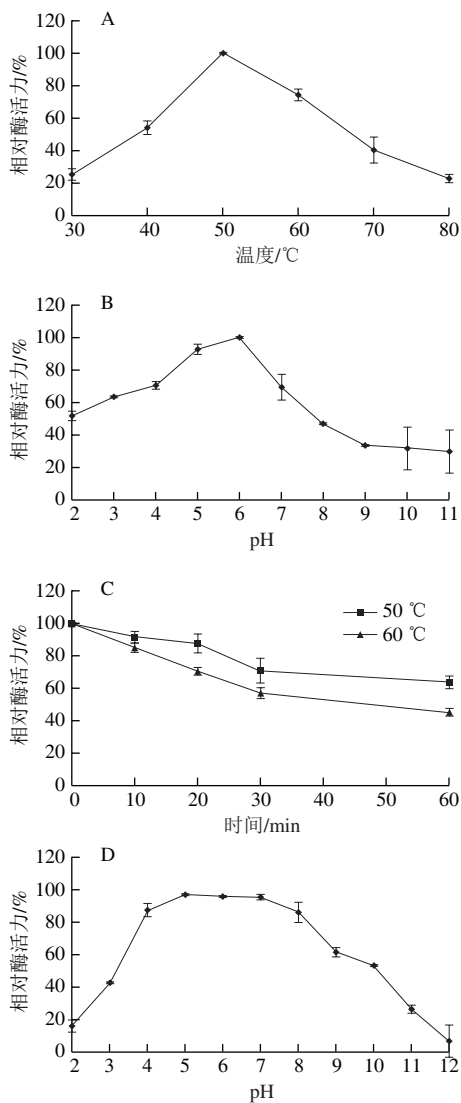


图3 重组甘露聚糖酶*RmMan134*的SDS-PAGE分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *RmMan134*

#### 2.4 重组酶*RmMan134*酶学特性分析



A.最适温度; B.最适pH值; C.温度稳定性; D. pH值稳定性。

图4 温度和pH值对甘露聚糖酶*RmMan134*活性的影响

Fig. 4 Effects of pH and temperature on the activity of *RmMan134*

重组酶*RmMan134*的最适反应温度为50 °C (图4A), 该酶的反应温度范围较广, 30~80 °C都能够检测到该酶活力, 在70 °C反应下具有30%以上酶活力, 在80 °C时能够维持20%以上活力。

由图4B可知, 重组酶*RmMan134*具有较广的pH值作用范围, 在pH 2.0~11.0范围内都表现出一定的酶活力, 该酶的最适反应pH 6.0, 在酸性范围内 (3.0<pH<7.0) 酶活力较高, 能够维持60%以上酶活力。随着pH值的逐渐升高, 酶活力也随之降低。

分析重组酶*RmMan134*的热稳定性研究发现 (图4C), 在50 °C条件下, 重组酶*RmMan134*处理1 h后, 能够维持60%以上酶活力; 而60 °C处理1 h后, 酶活力损失约60%。分析其pH值耐受性发现 (图4D), 该酶在pH 4.0~8.0范围内处理1 h后酶活力基本维持稳定, 即使在碱性条件下 (7.0<pH<11.0) 依然能够维持75%以上酶活力, 而在强碱条件下, 重组酶极不稳定, 酶活力丧失较明显。

将重组酶*RmMan134*对角豆胶活性定义为100%, 则对底物魔芋胶、果胶、CMC-Na和木聚糖的活力分别为114.8%、44.9%、7.2%和19.6%。以魔芋胶为底物时, 设定底物质量浓度的倒数 (1/[S]) 为横坐标, 以反应速率倒数 (1/V) 为纵坐标, 获得双倒数曲线:  $Y=0.0116X+0.0175$ ,  $R^2=0.998$ , 计算酶的动力学参数  $V_{max}$  为  $57.1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ,  $K_m$  为  $0.66 \text{ mg/mL}$ 。

#### 2.5 重组甘露聚糖酶*RmMan134*对5种果汁的影响

如表1所示, 除了杏汁和葡萄汁外, 重组酶*RmMan134*对其他果汁的澄清度都有不同程度的提高, 其中橙汁提高的最为明显, 提高了23.8%。其次苹果汁提高了11%, 桃汁提高了7%左右。一般来说, 果汁加工用酶可以通过有效降解果汁中的纤维素、半纤维和果胶等成分, 而提高果汁的澄清度, 但是水果中还存在单宁、花青素及其他多酚物质, 它们会和加入的酶蛋白分子交联在一起, 降低果汁的澄清度<sup>[28]</sup>。因此, 果汁加工用酶的最终应用效果, 往往是上述两个效果的叠加。因而, 在酶解杏汁和葡萄汁时, 很有可能是杏汁和葡萄汁中的单宁及多酚物质与重组酶*RmMan134*交联在一起, 影响了果汁的澄清度。除此之外, 重组甘露聚糖酶的添加使得葡萄汁出汁率提高了7%左右, 而重组酶并未增加上述5种水果的总还原糖量。

表1 重组甘露聚糖酶*RmMan134*对不同水果出汁率、澄清度和还原糖的影响

Table 1 Effect of recombinant *RmMan134* on the yield, clarity and reducing sugar concentration of various fruits

水果 (5 g)	指标	对照组	实验组 ( <i>RmMan134</i> )
橙子	质量/g	10.40±0.09	10.24±0.06
	出汁率/%	—	98.85
	澄清度/%	30.82±0.78	53.82±4.96**
	总还原糖/(mg/mL)	11.75±0.02	11.73±0.03
杏	质量/g	8.67±0.50	8.86±0.29
	出汁率/%	—	102.19
	澄清度/%	15.46±0.08	10.72±0.28**
	总还原糖/(mg/mL)	9.75±0.24	9.86±0.86
葡萄	质量/g	10.17±0.39	10.89±0.19*
	出汁率/%	—	107.08
	澄清度/%	88.14±2.78	71.96±3.67**
	总还原糖/(mg/mL)	12.08±0.01	12.08±0.02
苹果	质量/g	11.38±0.11	11.37±0.09
	出汁率/%	—	99.91
	澄清度/%	81.95±4.36	92.48±0.15*
	总还原糖/(mg/mL)	12.40±0.01	12.43±0.03
桃	质量/g	10.69±0.47	10.73±0.12
	出汁率/%	—	100.37
	澄清度/%	79.26±2.06	86.16±0.80**
	总还原糖/(mg/mL)	11.67±0.02	11.79±0.01**

注: \*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ ; —. 无效果。

### 3 讨论

本研究成功从浓香大曲中筛选获得了1株嗜热真菌HBFH10, 经鉴定为*Rm*。目前, 微孢根霉菌种在食品生产中起着重要作用, 已从*Rm*中获得了淀粉酶<sup>[29]</sup>、植酸酶<sup>[30]</sup>和脂肪酶<sup>[31]</sup>等。本研究从嗜热真菌*Rm* HBFH10中克隆得到一个新的甘露聚糖酶基因(*RmMan134*)。

甘露聚糖酶分为GH5、GH26、GH113和GH134家族, 其中GH5家族的甘露聚糖酶主要为一些真菌来源的甘露聚糖酶, 而GH26主要包括一些细菌来源的甘露聚糖酶, 这两类是甘露聚糖酶报道最多的酶家族来源。有研究<sup>[10]</sup>报道了一个新甘露聚糖酶(*AaManA*), 它属于一个全新的糖苷水解酶家族(GH113), 相对于前两个家族而言, GH113家族甘露聚糖酶的分极有限, 继而限制了该家族酶的进一步挖掘。Shimizu等<sup>[8]</sup>从*Aspergillus nidulans*中获得了一个新甘露聚糖酶(*Man134*), 它的氨基酸序列、结构及催化机制与其他甘露聚糖酶家族存在明显差异, 最终将其归为一个新的糖苷水解酶家族(GH134), 该家族甘露聚糖酶的发现为甘露聚糖的降解找到一把全新的钥匙。GH134家族的酶氨基酸序列长度非常短, 一般长度为180 aa左右<sup>[32]</sup>, 远低于其他3类家族的300~500 aa, 这一特点使得只需要30%左右的氨基酸材料就可以合成出所需要的甘露聚糖

酶, 这一特性非常令人兴奋。在本研究中, 甘露聚糖酶*RmMan134*除含有GH134家族的催化结构域外, 还含有一个18 aa组成的信号肽序列, 这使得该蛋白可以分泌到细胞之外参与糖类的代谢活动。经多条序列比对分析发现, GH134家族甘露聚糖酶N端往往含有信号肽序列特征, 与GH5和GH26家族相似, 这也说明该类家族也很可能在微生物中广泛分布。

重组酶*RmMan134*的最适pH值为6.0, 这与GH134家族其他 $\beta$ -甘露聚糖酶最适pH值十分相似, 如来源于*A. nidulans*的甘露聚糖酶最适pH值为6.0, 来源于*A. orzae*的甘露聚糖酶最适pH值为6.0<sup>[33]</sup>, 来源于*Streptomyces* sp. NRRL B-24484的甘露聚糖酶最适pH值为5.0<sup>[34]</sup>, 但是它们的pH值作用范围存在较为显著差异, 如同样来源*Rm*的甘露聚糖酶*RmMan134A*的最适pH值为5.0, 在pH 7.0~11.0碱性条件下往往表现出非常低的酶活力, 甚至会丧失全部酶活力, 而对于甘露聚糖酶*RmMan134*来说, 依然能保持20%~70%以上酶活力, 同样的差异与*Streptomyces* sp. NRRL B-24484的甘露聚糖酶也比较明显。*RmMan134*更适合在中性pH值环境发挥作用, 这两个同功酶的存在使得*Rm*对环境具有较强适应能力。*RmMan134*与*RmMan134A*具有相同的最适温度(50℃), 而其他已报道的3个酶的反应温度在30~40℃之间, 再次证明嗜热真菌*Rm* HBFH10是生产高温酶制剂的优良菌株。进一步分析发现, *RmMan134*较*RmMan134A*具有较高的酶反应温度和较好的热稳定性。在反应温度为80℃时, *RmMan134*表现出20%酶活力, 而*RmMan134A*则丧失酶活力。且酶热稳定性能的差异依然明显, *RmMan134*在60℃条件下处理30 min依然可以维持50%左右酶活力, 而*RmMan134A*酶活力基本消失。重组酶*RmMan134*是目前GH134家族反应温度最高的酶, 与已报道其他家族的嗜热甘露聚糖酶反应温度还有较大差距, 但随着研究的进一步深入, GH134家族来源的嗜热甘露聚糖酶应该很快会被挖掘出来。

果汁的黏度和浑浊度主要受到果胶、淀粉、纤维素和半纤维素种类和含量的影响, 而不同果汁中存在差异。甘露聚糖作为一种重要的半纤维广泛存在于植物果实中, 依据其组成特点, 可分为线性甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖。甘露聚糖酶可有效的降解甘露聚糖, 目前已成为果汁加工中一种新型酶制剂而被加以利用, 如在胡萝卜汁<sup>[35]</sup>、奇异果汁<sup>[36]</sup>、苹果汁<sup>[37]</sup>等多种果汁的生产中起到了较好的作用效果。鉴于GH134家族甘露聚糖酶的最适底物为葡甘露聚糖, 因此推测很可能是水果中甘露聚糖种类造成了重组甘露聚糖酶*RmMan134A*对不同果汁澄清效果的差异, 其中对橙

汁的澄清效果最为明显,使橙汁澄清度提高了约76%,优于来自*Lactobacillus casei* HDS-01甘露聚糖酶的澄清效果<sup>[38]</sup>,相似的差异在*P. acidilactici* (M17)来源的甘露聚糖酶也有所体现。分析发现*L. casei* HDS-01菌的甘露聚糖酶属于GH26家族,而GH26家族和GH134家族采用不同的催化机制,同时作用底物也存在差异,这很可能是造成上述差异的主要原因,而更信服的结论仍需进一步进行研究。

## 4 结 论

本研究成功从浓香大曲中筛选出嗜热真菌*Rm* HBFH10,并从该菌中挖掘到了1个假使蛋白,经分析为新型GH134家族甘露聚糖酶(*RmMan134*)。研究发现,重组甘露聚糖酶*RmMan134*在pH 6.0和50 °C下表现出了最佳活性,并且在从酸性到碱性的广泛pH值范围内具有较高活性(2.0~11.0),在宽泛pH值范围内和在50 °C条件下具有出色的稳定性。另外,重组酶*RmMan134*可以有效地澄清橙汁、桃汁和苹果汁,其中可使橙汁的澄清度提高约76%。

## 参考文献:

- [1] DAWOOD A, MA K. Applications of microbial  $\beta$ -mannanases[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8(15): 1-17. DOI:10.3389/fbioe.2020.598630.
- [2] 谈苏慧,卢海强,陈伟,等. 1株产甘露聚糖酶嗜热真菌的鉴定,酶学性质表征及转录组学分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 65-72. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200911-141.
- [3] YUAN J S, YANG X, LAI J, et al. The endo- $\beta$ -mannanase gene families in arabidopsis, rice, and poplar[J]. *Functional Integrative Genomics*, 2007, 7(1): 1-16. DOI:10.1007/s10142-006-0034-3.
- [4] LIU Z, NING C, YUAN M, et al. High-efficiency expression of a superior  $\beta$ -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic mannooligosaccharides[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 311(5): 123482-123491. DOI:10.1016/j.biortech.2020.123482.
- [5] FERRERO C. Hydrocolloids in wheat bread making: a concise review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 68(7): 15-22. DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.11.044.
- [6] MUDGIL D, BARAK S, KHATKAR B S. Development of functional yoghurt via soluble fiber fortification utilizing enzymatically hydrolyzed guar gum[J]. *Food Bioscience*, 2016, 14(3): 28-33. DOI:10.1016/j.fbio.2016.02.003.
- [7] LV R, KONG Q, MOU H, et al. Effect of guar gum on stability and physical properties of orange juice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98(5): 565-574. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.031.
- [8] SHIMIZU M, KANEKO Y, ISHIHARA S, et al. Novel  $\beta$ -1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(46): 27914-27927. DOI:10.1074/jbc.M115.661645.
- [9] HUANG J W, CHEN C C, HUANG C H, et al. Improving the specific activity of  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus niger* BK01 by structure-based rational design[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844(3): 663-669. DOI:10.1016/j.bbapap.2014.01.011.
- [10] 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[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(46): 31551-31558. DOI:10.1074/jbc.M803409200.
- [11] HOGG D, WOO E J, BOLAM D N, et al. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(33): 31186-31192. DOI:10.1074/jbc.M010290200.
- [12] 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  $\beta$ -mannanase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2018, 1862(6): 1376-1388. DOI:10.1016/j.bbagen.2018.03.016.
- [13] ZHENG X W, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. *Daqu*-a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 117(1): 82-90. DOI:10.1002/j.2050-0416.2011.tb00447.x.
- [14] 唐佳代,刘力萍,龙亚飞,等. 不同感官特性酱香大曲真菌群落结构与理化特性[J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 193-198. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210813-177.
- [15] DU H, WANG X, ZHANG Y, et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese *Daqu* starter[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297(5): 32-40. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.020.
- [16] 黄晓宁,刘晶晶,韩北忠,等. 基于酶学特性筛选大曲来源芽孢杆菌用于强化酿酒[J]. *食品科学*, 2021, 42(10): 218-224. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200407-073.
- [17] 文章,程鹏,陈才,等. 白酒大曲真菌群落结构多样性研究技术与进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(5): 17-22. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2020.05.004.
- [18] PATEL V B, CHATTERJEE S, DHOBLE A S. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(8): 3338-3354. DOI:10.1111/1750-3841.16233.
- [19] FAR B E, AHMADI Y, KHOSROSHAHI A Y, et al. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 10(3): 350-358. DOI:10.34172/apb.2020.043.
- [20] BHARDWAJ N, KUMAR B, AGRAWAL K, et al. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 1-34. DOI:10.1186/s40643-021-00447-6.
- [21] NADAROGLU H, ADIGUZEL G, ADIGUZEL A, et al. A thermostable-endo- $\beta$ -(1,4)-mannanase from *Pediococcus acidilactici* (M17): purification, characterization and its application in fruit juice clarification[J]. *European Food Research and Technology*, 2017, 243(2): 193-201. DOI:10.1007/s00217-016-2735-8.
- [22] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181109-112.
- [23] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428. DOI:10.1021/ac60147a030.
- [24] 朱丹实,张越怡,党悦怡,等. 加工过程对NFC苹果汁营养品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(4): 100-107. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.04.014.

- [25] DEMIR N, NADAROGLU H, TASGIN E, et al. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(4): 939-946. DOI:10.1007/s13213-011-0217-6.
- [26] 王迪, 杨远帆, 黄高凌, 等. 柚苷酶处理对琯溪蜜柚果汁澄清度和营养品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(9): 100-109. DOI:10.16429/j.1009-7848.2014.09.026.
- [27] 刘彩华, 曾嘉童, 包竹君, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(9): 2892-2900. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.09.019.
- [28] VAILLANT F, MILLAN A, DORNIER M, et al. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration[J]. *Journal of Food Engineering*, 2001, 48(1): 83-90. DOI:10.1016/S0260-8774(00)00152-7.
- [29] VIJAYARAGHAVAN P, REMYA C S, VINCENT S G P. Production of  $\alpha$ -amylase by *Rhizopus microsporus* using agricultural by-products in solid state fermentation[J]. *Research Journal of Microbiology*, 2011, 6(4): 366-375. DOI:10.3923/jm.2011.366.375.
- [30] SATO V S, JORGE J A, OLIVEIRA W P, et al. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(2): 177-187. DOI:10.4014/jmb.1308.08087.
- [31] ANVARI M. Extraction of lipase from *Rhizopus microsporus* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning[J]. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 2015, 29(4): 723-731. DOI:10.1080/13102818.2015.1042406.
- [32] LIU W, MA C, LIU W, et al. Functional and structural investigation of a novel  $\beta$ -mannanase BaMan113A from *Bacillus* sp. N16-5[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182(7): 899-909. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.075.
- [33] SAKAI, KIYOTA, YAMADA, et al. Biochemical characterization of thermostable beta-1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3237-3245. DOI:10.1007/s00253-017-8107-x.
- [34] SAKAI K, KIMOTO S, SHINZAWA Y, et al. Characterization of pH-tolerant and thermostable GH 134  $\beta$ -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. DOI:10.1016/j.jbiosc.2017.10.009.
- [35] GURLER H N, YILMAZER C, ERKAN S B, et al. Applicability of recombinant *Aspergillus sojae* crude mannanase enzyme in carrot juice production[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(8): 1-11. DOI:10.1111/jfpp.14603.
- [36] 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. DOI:10.1007/s00217-015-2584-x.
- [37] ADIGUZEL A, NADAROGLU H, ADIGUZEL G. Purification and characterization of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(8): 5292-5298. DOI:10.1007/s13197-014-1609-y.
- [38] ZHAO D, ZHANG X, WANG Y, et al. Purification, biochemical and secondary structural characterisation of  $\beta$ -mannanase from *Lactobacillus casei* HDS-01 and juice clarification potential[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154(7): 826-834. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.157.