

• 综 述 •

微生物 1,3-1,4- β -葡聚糖酶蛋白质改造及工业应用研究进展

钮成拓^{1,2}, 李昕玥², 许鑫^{1,2}, 包敏^{1,2}, 李永仙^{1,2}, 刘春风^{1,2}, 郑飞云^{1,2}, 王金晶^{1,2}, 李崎^{1,2,3}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122

钮成拓, 李昕玥, 许鑫, 等. 微生物 1,3-1,4- β -葡聚糖酶蛋白质改造及工业应用研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1234–1246.

Niu CT, Li XY, Xu X, et al. Research progresses in microbial 1,3-1,4- β -glucanase: protein engineering and industrial applications. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1234–1246.

摘 要: 1,3-1,4- β -葡聚糖酶 (E.C.3.2.1.73) 是一种重要的工业用酶, 其可以通过特异性切割毗邻 β -1,3-糖苷键的 β -1,4-糖苷键将 β -葡聚糖或地衣多糖降解为纤维三糖和纤维四糖。微生物 β -葡聚糖酶属于糖苷水解酶家族 16, 其三维结构为卷心蛋糕状的逆向 β -片层结构。文中综述了近几年来 β -葡聚糖酶在工业上的应用情况及酶蛋白质工程改造的研究进展, 并对其研究前景进行了展望。

关键词: 1,3-1,4- β -葡聚糖酶, 工业应用, 蛋白质改造, 稳定性, 催化性质

Research progresses in microbial 1,3-1,4- β -glucanase: protein engineering and industrial applications

Chengtuo Niu^{1,2}, Xinyue Li², Xin Xu^{1,2}, Min Bao^{1,2}, Yongxian Li^{1,2}, Chunfeng Liu^{1,2}, Feiyun Zheng^{1,2}, Jinjing Wang^{1,2}, and Qi Li^{1,2,3}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 1,3-1,4- β -glucanase (E.C.3.2.1.73) is an important industrial enzyme which cleave β -glucans into oligosaccharides through strictly cutting the β -1,4 glycosidic bonds in 3-O-substituted glucopyranose units. Microbial 1,3-1,4- β -glucanase belongs to retaining glycosyl hydrolases of family 16 with a jellyroll β -sandwich fold structure. The

Received: November 9, 2018; **Accepted:** January 24, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31571942, 31601558, 31771963), Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (No. 111-2-06), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP11841).

Corresponding author: Qi Li. Tel: +86-510-85918176; E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31571942, 31601558, 31771963), 高等学校学科创新引智计划 (No. 111-2-06), 江南大学基本科研计划青年基金 (No. JUSRP11841) 资助。

present paper reviews the industrial application and protein engineering of microbial β -glucanases in the last decades and forecasts the research prospects of microbial β -glucanases.

Keywords: 1,3-1,4- β -glucanase, industrial application, protein engineering, stability, catalytic property

生物质资源是地球上最丰富的资源之一, 其主要以纤维素和半纤维素等多糖形式存在^[1]。目前认为针对多糖的有效降解主要有如下两个手段, 一为加速纤维素和半纤维素的释放, 二为将多糖快速水解为寡糖^[2-4]。糖苷水解酶是降解多糖的主要酶系, 决定了其在工业上具有广泛的应用价值, 例如在食品行业 (果汁行业、大豆产品开发、啤酒行业和酒类产品)、饲料行业、农业工业副产品加工 (生产生物燃料等) 和农副产品废品降解等^[5]。

β -葡聚糖是自然界多糖的重要组成部分, 其是禾本科植物 (特别是高价值经济作物, 如大麦、黑麦、高粱、大米和小麦) 细胞壁的重要多糖组分^[6]。 β -葡聚糖是多达 1 200 个 β -D-葡萄糖残基通过 1,3- β -糖苷键和 1,4- β -糖苷键连接形成的线性多糖 (其中 β -1,3 糖苷键的比例占 25%–30%), 其结构与冰岛地衣 *Cetraria islandica* 地衣多糖相似^[7]。 β -葡聚糖可分为水溶性 β -葡聚糖和水不溶性 β -葡聚糖, 其中水溶性 β -葡聚糖主要存在于谷物完整胚乳细胞壁中, 而水不溶性 β -葡聚糖则与蛋白质结合存在于谷物胚乳细胞间^[6,8]。水溶性 β -葡聚糖溶于水后具有分子量大和黏度大等特点, 给工业生产带来很多困难^[6]。目前根据切割糖苷键类型的不同将降解 β -葡聚糖的糖苷水解酶分为以下 4 种: 1,4- β -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4)、1,3- β -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.39)、1,3(4)- β -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.6) 和 1,3-1,4- β -葡聚糖酶 (EC 3.2.1.73)。在 4 种 β -葡聚糖降解酶中, 1,3-1,4- β -葡聚糖酶 (下称 β -葡聚糖酶) 的催化活性最高, 因此具有最广泛的应用价值。 β -葡聚糖酶通过特异性切割 1,3- β -糖苷键毗邻的 1,4- β -糖苷键将 β -葡聚糖或地衣多糖降解为以纤维三糖和纤维四糖为主的低聚葡萄糖^[9], 因此

可以消除 β -葡聚糖黏度高的特点, 在以谷物为主要原料的行业中有重要应用价值^[6,10]。基于此作用, β -葡聚糖酶作为半纤维素酶系的重要组成部分在生物质能源的生产过程中同样可以与其他酶系协同作用将木质纤维素降解为可发酵性糖^[11-12]或生物燃料^[13]。另一方面, β -葡聚糖酶降解 β -葡聚糖产生的低聚葡萄糖作为益生元对人体具有有益的性质^[14-16]。

β -葡聚糖酶主要来源于高等植物和微生物, 然而植物酶和微生物酶的结构特点完全不同。植物 β -葡聚糖酶属于糖苷水解酶家族 17, 为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构^[6,17]; 而微生物 β -葡聚糖酶属于糖苷水解酶家族 16, 为三明治夹心结构^[18]。微生物 β -葡聚糖酶的热稳定性和催化活性均优于植物来源酶^[10], 然而目前筛选得到微生物 β -葡聚糖酶的热稳定性、pH 耐受性和催化活性依旧不能满足工业上的应用要求。近年来通过定点突变等蛋白质工程改造手段对 β -葡聚糖酶进行改造已经取得一定成效, 部分酶在工业上取得了良好的应用效果。在之前研究中, Planas^[10]和孙军涛等^[19]分别对 β -葡聚糖酶的结构、催化机制、理化性质和部分酶学性质改造的工作进行了综述, 而钮成拓等^[20]对 β -葡聚糖酶催化活性提高的方法和成果进行了总结。文中总结了本实验室和其他研究团队对 β -葡聚糖酶的研究工作, 主要对微生物 β -葡聚糖酶的工业应用情况和蛋白质工程改造进行了综述, 旨在为高效 β -葡聚糖酶制剂的构建提供参考。

1 β -葡聚糖酶的工业应用

β -葡聚糖在工业应用上会造成不利影响, 同时也是一种重要的非淀粉多糖。基于 β -葡聚糖酶的作用方式和产物特点, β -葡聚糖酶主要在 3 类

工业中具有应用价值。在第一类应用领域中, β -葡聚糖的存在不利于工业操作, 而 β -葡聚糖酶通过降解 β -葡聚糖消除其不利作用从而促进工业生产, 例如啤酒和饲料行业。在第二类应用领域中, 以通过 β -葡聚糖酶降解作用得到的低聚葡萄糖作为主要目标产物, 例如益生元行业。在第三类应用领域中, 以 β -葡聚糖酶降解得到的低聚葡萄糖作为底物供进一步生物技术加工, 如生物乙醇和生物柴油行业。

1.1 酒类行业

在啤酒酿造过程中, 麦芽内源 β -葡聚糖酶在麦芽烘焙和麦汁糖化过程失去活力, 大量 β -葡聚糖残留在麦汁中, 导致麦汁黏度过高, 且其会与麦汁中高分子量蛋白质结合压紧麦糟, 使麦汁过滤困难^[6,21-22]。在啤酒发酵过程中, β -葡聚糖无法被酵母利用且会诱使酵母过早沉降, 影响发酵效果。在成品啤酒中, β -葡聚糖会与残留蛋白质结合形成雾状物质, 影响成品啤酒的非生物稳定性^[6,23], β -葡聚糖的残留同时是造成成品啤酒泡沫挂杯性和泡沫稳定性差的主要原因^[24]。研究者将筛选得到的微生物 β -葡聚糖酶在啤酒酿造过程中进行了应用, 取得了良好的效果。Bai 等^[25]和 Chaari 等^[26]分别将脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus* sp. A4 和青霉菌 *Penicillium occitanis* Pol6 来源 β -葡聚糖酶在麦汁协定糖化过程中进行了应用, 发现相同活力微生物 β -葡聚糖酶和商业酶 (Ultraflo 或 Finizym) 的添加对于麦汁过滤速度的提高和麦汁黏度的降低效果几乎相同。钮成拓等^[6,27]将特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis* CGX5-1 来源 β -葡聚糖酶添加在麦汁协定糖化过程开始阶段, 最后将过滤时间和麦汁黏度分别降低了 29.7% 和 12.3%, 其应用效果优于两种商业酶。研究者将小孢根霉 *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*^[28] 和埃默森篮状菌 *Talaromyces emersonii*^[29-31] 来源 β -葡聚糖酶在麦汁糖化过程中进行了应用, 同样

取得了良好的效果。

在葡萄酒酿造过程中, 葡萄皮/果肉细胞壁多糖和污染灰葡萄孢属微生物的葡萄产生的多糖会与蛋白质结合形成难溶性颗粒状物质, 导致葡萄酒过滤困难, 影响葡萄酒的澄清度, 影响成品葡萄酒的非生物稳定性^[6,32]。Liauberes 等^[33]将含 β -葡聚糖酶的复合酶制剂在葡萄酒生产过程中进行应用, 发现酶制剂的添加不仅使葡萄酒的澄清、过滤更为容易, 同时减少了过滤助剂的使用量。在皮渣浸泡之后的葡萄汁中添加 β -葡聚糖酶使发酵后的葡萄酒具有更理想的香气^[34]。

1.2 饲料行业

在饲料行业中, 大麦在饲料中的应用逐渐规模化。然而, 谷物中的 β -葡聚糖在动物肠道中无法被有效吸收和利用 (动物肠道缺乏降解 β -葡聚糖相关酶类)^[35-36], 与此同时 β -葡聚糖较高的持水性会导致哺乳动物及禽畜类肠道内液体黏稠, 作为“抗营养因子”阻碍饲料营养成分被动物肠道吸收, 影响饲料利用效率和动物营养吸收效率^[37]。 β -葡聚糖存在于动物肠道中同时为肠道有害细菌的繁殖提供营养, 而有害细菌的繁殖也会竞争性消耗饲料营养, 造成动物肠道菌群失调并影响动物营养吸收, 最终导致动物胃肠道疾病^[38]。对于饲料中 β -葡聚糖的降解关键酶为 1,3-1,4- β -葡聚糖酶还是 1,4- β -葡聚糖酶在前期研究中颇有争议。针对此问题, Fernandes 等^[39]在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中重组表达了热纤梭菌 *Clostridium thermocellum* 来源 1,3-1,4- β -葡聚糖酶 (CtGlc16A) 和 1,4- β -葡聚糖酶 (CtCel8A) 并将两种酶添加在肉鸡饲料中, 结果发现 CtGlc16A 对于以大麦为主的饲料黏度降低能力远优于 CeCel8A, 这说明 1,3-1,4- β -葡聚糖酶是提高大麦饲料营养价值的关键酶。经过研究发现, β -葡聚糖酶添加于肉鸡饲料中不仅可以提高饲料利用效率, 同时肉鸡的日增重速度、肠道黏度和饲养成本均优于未添加酶对照组^[40-42]。

近年来发现 β-葡聚糖酶在饲料中的添加同时具有以下功效：1) 新型低价值向日葵或油菜籽在饲料中有效利用^[43]；2) 缓解蛋鸡使用小麦饲料时的骨质矿化现象^[44]；3) 表达高耐热 β-葡聚糖酶的转基因大麦在饲料中添加与传统玉米饲料效果相似^[45]；4) β-葡聚糖酶可以提升动物氧化还原稳态，促进动物肠道营养吸收，从而提升动物免疫力^[46]。Clarke 等^[47]将 β-葡聚糖酶添加于肥育猪饲料中，其明显改善猪的营养吸收率和生长情况，进一步研究发现，和对照组肥育猪相比添加 β-葡聚糖酶大麦饲料组肥育猪肠道营养吸收相关基因均明显上调。Guan 等进一步将多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* CP7 来源 β-葡聚糖酶在仔猪腮腺中进行了异源表达，发现转基因猪对 β-葡聚糖和其他营养物质的摄取和吸收能力明显提高，降低了 β-葡聚糖的抗营养因子作用^[37,48]。Zhang 等^[49]将耐酸 β-葡聚糖酶基因在玉米中进行了异源表达，转基因玉米 β-葡聚糖酶酶活是非转基因玉米对应 β-葡聚糖酶酶活的 236 倍，且其最适 pH 值为 4.0，符合动物消化系统酸性环境，这为玉米在饲料中的高效应用奠定了基础。

1.3 益生元行业

通过 β-葡聚糖酶将 β-葡聚糖降解为低聚葡萄糖，对人体健康产生益处。研究发现，摄入低聚葡萄糖可以降低血清胆固醇^[50]、提高机体免疫力^[51]、提高人体抗菌消炎和抗氧化能力^[52]。与此同时，低聚葡萄糖可以促进人体肠道内有益微生物（主要为双歧杆菌和乳杆菌等）的选择性生长，缓解或治愈人类相关疾病^[53-54]。Cho 等^[55]和 Chaari 等^[56]分别将芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. 和青霉菌 *P. occitanis* Pol6 来源 β-葡聚糖酶进行固定化并用于低聚葡萄糖的生产，发现固定酶具有和游离酶相同的酶学性质且酶活稳定性较好，得到的低聚葡萄糖具有较高的抗氧化能力，且对大肠杆菌 *E. coli*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、肺炎克雷伯氏

菌 *Klebsiella pneumonia* 和鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella thyphimurium* 具有较高的抑菌活性。Kim 等^[14]进一步将聚合度为 3 和 4 的低聚葡萄糖添加在糖尿病大鼠的饲料中，发现其可以显著降低大鼠的胆固醇含量，这说明低聚葡萄糖具备抗高胆固醇血症、抗高甘油三酯血症和降血糖等功效，可为新型生物健康产品开发奠定基础。

1.4 生物燃料行业

随着近年来对能源需求的提升，通过酶法将生物质能源降解生产生物燃料成为研究热点^[57]。降解生物质的酶系主要包括纤维素酶系和半纤维素酶系^[4]。在半纤维素酶系中，β-葡聚糖酶(地衣多糖酶)可与木聚糖酶、昆布多糖酶等协同作用降解半纤维素，为生物乙醇或生物柴油的生产奠定基础^[3,58-59]。尽管目前研究主要集中在纤维素降解酶系中，但是从经济效益的角度来看同时利用半纤维素(木质纤维素中含量第二高的多糖组分)可以取得更好的经济价值。与此同时，半纤维素通常包裹着纤维素，只有将半纤维素降解后才能启动纤维素的降解过程^[60]。由此可见，作为一种重要的半纤维素降解酶，β-葡聚糖酶是一种降解生物质资源生产生物燃料的重要酶类。

近年来研究者已经筛选得到多株具有发达的降解木质纤维素酶系的菌株。通过色谱分析发现其中具有较高木质纤维素降解能力的一株烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Z5 中 β-葡聚糖酶具有最高的酶活^[3]。Li 等^[13]将 β-葡聚糖酶与木聚糖酶进行协同作用，将玉米秸秆降解为木糖、低聚葡萄糖和葡萄糖，从而供酵母菌株转化生成生物乙醇，结果发现碳水化合物向生物乙醇的转化率达到 84%。Menon 等^[61]采用碱性嗜热单胞菌属 *Thermomonospora* sp. 来源 β-葡聚糖酶与 β-葡萄糖苷酶协同作用，以地衣多糖为底物生产生物乙醇产量达到 0.450 2–0.480 2 g/g，达到理论转化率的 93%–96%。

1.5 其他行业

β -葡聚糖酶在生物防治、制糖行业等领域同样具有一定效果。在生物防治领域, β -葡聚糖酶可以通过降解或抑制真菌细胞壁 1,3- β -葡聚糖的合成抑制真菌细胞的生长周期, 从而抑制真菌生长^[6]。Enrique 等^[62]分析了市售 β -葡聚糖酶对于常见葡萄酒污染酵母(如白色隐球菌 *Cryptococcus albidus*、布鲁塞尔德克酵母菌 *Dekkera bruxellensis*、膜醭毕赤酵母 *Pichia membranifaciens*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、拜尔接合酵母 *Zygosaccharomyces bailii* 和双孢酵母 *Z. bisporus*)的影响, 发现 β -葡聚糖酶对布鲁塞尔德克酵母 *D. bruxellensis* 和拜耳接合酵母 *Z. bailii* 具有明显抑制作用, 与此同时酶在葡萄酒中的添加对葡萄酒品质并没有影响。在制糖工业中, 被肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* 污染的蔗糖液体会产生大量高黏度 β -葡聚糖, β -葡聚糖酶添加在甘蔗制糖过程中可以迅速除去榨糖物料中的 β -葡聚糖, 大幅减少蔗糖的损失, 提高了经济效益^[63]。

2 β -葡聚糖酶的酶学性质改造

β -葡聚糖酶在工业上的高效应用取决于其能否在工业应用环境中维持较高的催化活性。工业应用环境通常存在一些不利于酶应用的特点, 例如高温、pH 环境等。在啤酒行业和饲料行业中, β -葡聚糖酶通常应用于麦汁糖化过程中或添加于饲料中。麦汁糖化温度通常从 48 °C 逐渐提升至 78 °C, 而饲料造粒温度在 60–90 °C。与此同时, 麦汁是一种弱酸性液体 (pH 5.0–5.5), 而动物消化系统通常也为酸性环境。对 β -葡聚糖酶酶学性质进行改造使其更适应工业应用环境将更有利于其在工业上的应用效果。近年来, 研究者通过新酶筛选、非理性/半理性/理性改造、计算机模拟等手段对 β -葡聚糖酶的酶学性质进行了分析和改造, 取得了一定成果。

2.1 新酶筛选

芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. 是 β -葡聚糖酶的主要来源, 其分子量通常在 25–30 kDa^[64]。绝大部分芽孢杆菌属 β -葡聚糖酶的最适 pH 值集中在 pH 6–7.5, 最适温度集中在 45–65 °C, 而比活力值通常在 1 200–4 500 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ^[10]。以 β -葡聚糖为底物时 β -葡聚糖酶的 K_m 值为 1.2–1.5 mg/mL, 而以地衣多糖为底物时酶的 K_m 值为 0.8–2 mg/mL^[65–67]。近年来, 研究者逐步从非芽孢杆菌属 (Non-*Bacillus* sp.) 中分离得到大量 β -葡聚糖酶。和芽孢杆菌属来源 β -葡聚糖酶相比, 非芽孢杆菌微生物来源酶通常具有一些具备其他功能的蛋白质区域^[68]。然而, 目前发现绝大部分非芽孢杆菌属微生物来源 β -葡聚糖酶的酶学性质与芽孢杆菌属微生物来源酶性质相似, 其最适 pH 值和最适温度集中在 pH 6.0–10 和 45–60 °C^[68–70]。热纤梭菌 *C. thermocellum*^[36]、埃默森篮状菌 *T. emersonii*^[31] 和嗜热拟青霉 *Paecilomyces thermophilum*^[71] 来源的 β -葡聚糖酶的最适温度分别达到 80 °C、80 °C 和 70 °C, 其最适 pH 值分别为 6.6–10、4.8 和 7.0, 然而其催化活性较低。

2.2 β -葡聚糖酶的热稳定性改造

Planas 已经对 β -葡聚糖酶热稳定性的改造进行了一定的描述。研究发现蛋白质 N 端和钙离子对 β -葡聚糖酶热稳定性有重要影响。Borriss 等^[65–66,72] 发现将淀粉液化芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 来源 β -葡聚糖酶 N 端 16 个氨基酸替换地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 来源酶对应区域可以大幅提升酶的热稳定性, 进一步分析发现酶 N 端 Gln1、Thr2、Ser5 和 Phe7 位点通过构建 N 端-核心区域氢键网络和 N 端-C 端氢键网络维持 β -葡聚糖酶的稳定性的^[73]。Pons 等^[74] 将 β -葡聚糖酶分子内部二硫键 Cys61-Cys90 打断, 发现二硫键对酶的催化性质和稳定性均没有太大影响。钙离子的丧失会大幅降低 β -葡聚糖酶的热稳定性, 而其对酶的催化性

质几乎没有影响。Keitel 等^[75]采用 Na^+ 替代杂交酶 H (A16-M) 中的 Ca^{2+} , 结果酶在高温下的半衰期显著下降。通过差示量热法, Gargallo 等^[76]发现钙离子的存在明显改变了 β -葡聚糖酶在高温下的解折叠过程。 β -葡聚糖酶在钙离子存在时高温解折叠过程中出现了一个中间体状态, 为两步解折叠, 而当钙离子不存在时其为一步解折叠。对于 Asp51-Arg64 无规卷曲的精氨酸突变实验发现 Asn57 为高温下不稳定性氨基酸, 将其突变为精氨酸后酶的热稳定性有所提升^[73]。

近年来研究者进一步通过非理性、半理性和理性手段对 β -葡聚糖酶的热稳定性进行了改造。张秀艳等^[77]采用随机突变结合 DNA 改组技术对枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* ZLF-1A5 来源 β -葡聚糖酶进行体外进化改造并建立一种高通量筛选耐高温 β -葡聚糖酶的方法, 获得的 EGs1 和 EGs2 突变体的 T_m 值和野生酶相比分别提高了 3 °C 和 5 °C^[78]。Chen 等^[79]对产琥珀酸丝状杆菌 *Fibrobacter succinogenes* 来源 β -葡聚糖酶氨基酸保守序列进行了分析和突变研究, 发现 Gly63 对酶热稳定性有较大作用。Gargallo 等^[76]对芽孢杆菌属来源 β -葡聚糖酶进行了分子动力学模拟研究, 发现 β -葡聚糖酶 N 端和 C 端区域的根平均偏差值 (Root mean square deviation, RMSD) 偏高, 说明其酶 N/C 两端有较高的结构柔性, 可能对于酶的热稳定性有影响。在此基础上, Wen 等^[80]和李卫芬等^[81]分别将产琥珀酸丝状杆菌 *F. succinogenes* 和热纤梭菌 *C. thermocellum* 来源 β -葡聚糖酶的 N 端和 C 端区域逐步截去, 发现 β -葡聚糖酶 N 端和 C 端区域对酶热稳定性有一定贡献且具有叠加效应。

近年来本研究室对芽孢杆菌来源 β -葡聚糖酶进行了一系列改造, 成功获得了热稳定性提高的酶突变体。秦久福等^[82]采用易错 PCR 技术对淀粉液化芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* BS5582 来源 β -葡聚糖酶进行定向进化改造, 得到的 3 株酶突变体

的 T_m 值和野生酶相比分别提高了 2.2 °C、5.5 °C 和 3.5 °C。钮成拓等^[83]采用亚硝酸作为修饰剂对淀粉液化芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* BS5582 来源 β -葡聚糖酶进行了化学修饰研究, 推测酶蛋白质表面赖氨酸对酶的热稳定性有重要影响。在此基础上, 采用定点突变方法将特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis* CGX5-1 来源 β -葡聚糖酶表面赖氨酸, 发现 20 位、117 位和 165 位赖氨酸突变后其蛋白质总能量值和氢键数量均优于野生酶, K20S/K117S/K165S 组合突变体的最适温度和 T_{50} 值与野生酶相比分别提高了 15 °C 和 14 °C^[6,84]。基于蛋白质结构和柔性分析, 钮成拓等在 β -葡聚糖酶三维结构中引入了二硫键 N31C-T187C 和 P102C-N125C, 其 T_m 值和野生酶相比分别提高了 1.4 °C 和 2.3 °C^[85]。 β -葡聚糖酶自身二硫键对于热稳定性没有影响, 然而该两对二硫键的引入成功提高了 β -葡聚糖酶的 T_m 值。对 β -葡聚糖酶结构中的二硫键进行分析, 发现二硫键 Cys61-Cys90 主要处于蛋白质凹侧 β -片层区域, 结构相对稳定, 打断其对于酶结构稳定性影响较小。二硫键 N31C-T187C 和 P102C-N125C 主要连接 β -葡聚糖酶高柔性区域, 通过分子动力学模拟发现将其引入酶结构后可以一定程度降低酶的整体柔性。因此在合适的位置引入二硫键可以提高 β -葡聚糖酶的热稳定性。为了解析 β -葡聚糖酶热稳定性关键区域和氨基酸位点, 钮成拓等^[6,86]建立了一种基于同源蛋白质氨基酸序列比对、空间结构区域化和分子动力学模拟的突变热点区域分析法 (Spatial compartmentalization of mutational hotspots) 对微生物 β -葡聚糖酶热稳定性关键区域和氨基酸位点进行了分析, 发现 β -葡聚糖酶结构凸侧钙离子结合区域与酶热稳定性具有较高的相关性, 这说明该区域可能是微生物 β -葡聚糖酶热稳定性关键区域。通过定点突变方法将该区域内 6 个氨基酸位点突变为高耐热 β -葡聚糖酶对应

氨基酸位点,发现 40 位、43 位、46 位和 205 位氨基酸位点对酶热稳定性具有重要的影响,说明这 4 个位点可能为酶热稳定性关键氨基酸位点。采用迭代饱和突变手段对这 4 个氨基酸位点进行改造,得到的组合突变酶 E46P/S43E/H205P/S40E 的最适温度、 T_m 值和 T_{50} 值与野生酶相比分别提高了 20 °C、13.8 °C 和 14.5 °C,其在 60 °C 和 70 °C 的半衰期是野生酶的 3.86 倍和 7.13 倍^[6]。最后钮成拓^[6,27]将上述酶热稳定性有利突变位点进行了组合突变,得到的组合突变体的最适温度、 T_{50} 值和 T_m 值分别达到 70 °C、81.7 °C 和 56.2 °C,和野生酶相比分别提高了 25 °C、19.7 °C 和 15.9 °C。其在 60 °C 和 70 °C 的半衰期达到 153.2 min 和 99.6 min,是野生酶对应值的 4.71 倍和 9.05 倍。对野生酶和组合突变酶蛋白质结构进行比较和分析,发现钙离子结合区域带有更多负电,和钙离子的结合更加紧密,同时组合突变酶蛋白质中有序二级结构所占比例也有大幅提高,从而提升酶的热稳定性。根据结合突变热点区域分析法所得结果和钙离子替换实验,推测 β -葡聚糖酶与钙离子结合的紧密度与酶热稳定性有重要关联。

2.3 β -葡聚糖酶的催化性质改造

β -葡聚糖酶特异性切割 β -葡聚糖的催化机制为包含一个亲核氨基酸和一个广义酸/碱氨基酸的双位移机制 (Double displacement mechanism)^[6],其催化机制和底物特异性识别位点在 Planas 发表的综述^[10]中已有明确描述。尽管较多微生物能够分泌 β -葡聚糖酶,但是其催化性质依旧不能满足工业应用水平。目前对于 β -葡聚糖酶催化性质的改造方法主要采用蛋白质工程改造。对近年来研究者对 β -葡聚糖酶催化性质改造工作进行分析,发现酶 N/C 端改造和酶催化活性中心内关键分子内作用力的形成对 β -葡聚糖酶的催化性质有重要影响。毛淑蕊等^[87-88]采用易错 PCR 手段对高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* YC-9 来源 β -葡聚糖酶

进行了定向进化,得到的 K142N/Q203L/N214D 三突变体的催化活性达到 474.6 U/mL,和野生酶相比提高了 48.6%,同时其 pH 性质和热稳定性均没有影响。Wen 等^[80]将产琥珀酸丝状杆菌 *F. succinogenes* β -葡聚糖酶 C 端截断,并在毕赤酵母 *P. pastoris* 中进行了表达,结果发现截断酶的 k_{cat} 值是全长酶的 3-4 倍。在毕赤酵母 *P. pastoris* 中表达的截断酶是一种糖基化酶,其比活力值达到 (10 800±200) U/mg,而对于底物地衣多糖的亲合力 (K_m 值) 和全长酶没有差别。

本研究室在对 β -葡聚糖酶进行热稳定性改造的同时,发现部分氨基酸位点的变化对酶的催化性质造成影响。针对 β -葡聚糖酶赖氨酸改造过程中,发现 20 位、117 位和 165 位赖氨酸突变为丝氨酸后其比活力值和 k_{cat} 值与野生酶相比分别提高了 58.1% 和 34.6%,而其 K_m 值有一定程度的降低^[84]。通过突变热点区域分析法改造得到的 E46P/S43E/H205P/S40E 突变位点的引入将 β -葡聚糖酶的比活力值和 k_{cat} 值从 2 490.1 U/mg 和 137.4 /s 分别提高至 4 093.8 U/mg 和 187.4 /s, K_m 值从 297 μ mol/L 降低至 271 μ mol/L。最后得到的组合突变酶的比活力值则进一步提高至 4294.1 U/mg^[86]。对于野生酶和酶突变体的结构 (特别是催化活性中心) 进行分析和比较,尽管突变位点位于蛋白质表面,但是改造后突变酶的二级结构,特别是催化活性中心部分发生了改变。酶突变体催化活性中心有序二级结构比例稍有提高,柔性降低,部分与底物结合氨基酸位点所处微环境发生变化,并形成了部分关键氢键 (如 E109-Q119 和 W103-E105 等),这可能是突变提高 β -葡聚糖酶催化性质的主要原因^[27]。

2.4 β -葡聚糖酶的 pH 性质改造

β -葡聚糖酶在酒类^[89]、饲料^[90]和生物燃料^[91]生产行业中主要应用在酸性环境,而在洗涤剂等行业中通常需要适应碱性环境^[92],因此这需要 β -

葡聚糖酶具有不同的 pH 性质。尽管在 BRENDA 等酶数据库中能够找到一些最适 pH 值为 pH 4–5 的 β -葡聚糖酶, 然而其热稳定性或者催化活性均存在缺陷。目前针对 β -葡聚糖酶的耐酸性或耐碱性的蛋白质改造的研究较少。江正强等^[93]采用易错 PCR 手段对嗜热拟青霉 *P. thermophilum* 来源 β -葡聚糖酶的耐酸性进行了分析, 发现 56 位和 263 位氨基酸对于酶的最适 pH 值改变有重要影响, 发现突变体 PtLic16AM2 的最适 pH 值(pH 5.0)和野生酶(pH 7.0)相比有所降低。在本研究室对特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis* CGX5-1 来源 β -葡聚糖酶进行改造过程中, 组合突变酶的最适 pH 值从 6.5 降低至 6.0。对蛋白质结构进行分析, 发现酶突变体的蛋白质表面带有更多的负电荷, 这可能是酶最适 pH 值向酸性环境移动的主要原因^[27,85]。

3 总结与展望

β -葡聚糖酶是一种重要的工业用酶, 在酒类、饲料、益生元等行业中具有重要应用价值。现代工业生产中的高温、酸性/碱性 pH 环境等对 β -葡聚糖酶的热稳定性、pH 性质和催化活性提出了更高的要求。近年来通过蛋白质工程改造技术在提高 β -葡聚糖酶热稳定性和催化性质等领域已经取得了一系列成果, 但是目前得到的 β -葡聚糖酶酶学性质依然存在缺陷, 尤其是 β -葡聚糖酶的耐酸性不足, 严重阻碍了其在工业上的应用。因此, 通过蛋白质工程改造技术进一步提高 β -葡聚糖酶的酶学性质, 使其更贴合于工业生产, 将更有利于其在工业中发挥作用。

REFERENCES

- [1] Gupta A, Verma JP. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew Sust Energ Rev*, 2015, 41: 550–567.
- [2] Viladot JL, Canals F, Batllori X, et al. Long-lived glycosyl-enzyme intermediate mimic produced by formate re-activation of a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *Biochem J*, 2001, 355: 79–86.
- [3] Liu DY, Li J, Zhao S, et al. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 149.
- [4] Tsuji A, Tominaga K, Nishiyama N, et al. Comprehensive enzymatic analysis of the cellulolytic system in digestive fluid of the sea hare *Aplysia kurodai*. Efficient glucose release from sea lettuce by synergistic action of 45 kDa endoglucanase and 210 kDa β -glucosidase. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65418.
- [5] Goldenkova-Pavlova IV, Tyurin AA, Mustafaev ON. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide-hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(9): 3951–3965.
- [6] Niu CT. Study on the thermostability of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus* species[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016 (in Chinese).
钮成拓. 芽孢杆菌属来源 1,3-1,4- β -葡聚糖酶的热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [7] Wood PJ. Cereal β -glucans: structure, properties and health claims//McCleary BV, Prosky L, eds. *Advanced Dietary Fibre Technology*. Oxford: Blackwell Science, 2008: 315–327.
- [8] Gajdošová A, Petrušáková Z, Havrlentová M, et al. The content of water-soluble and water-insoluble β -D-glucans in selected oats and barley varieties. *Carbohydr Polym*, 2007, 70(1): 46–52.
- [9] Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995, 3(9): 853–859.
- [10] Planas A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *BBA -Protein Struct Mol Enzym*, 2000, 1543(2): 361–382.
- [11] Wilson CM, Rodriguez Jr M, Johnson CM, et al.

- Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated *Populus* and switchgrass. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 179.
- [12] Chen CC, Huang JW, Zhao PY, et al. Structural analyses and yeast production of the β -1,3-1,4-glucanase catalytic module encoded by the *licB* gene of *Clostridium thermocellum*. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 71: 1–7.
- [13] Li X, Kim TH, Nghiem NP. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technol*, 2010, 101(15): 5910–5916.
- [14] Kim KH, Kim YO, Ko BS, et al. Over-expression of the gene (*bglBC1*) from *Bacillus circulans* encoding an endo- β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-glucanase useful for the preparation of oligosaccharides from barley β -glucan. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(22): 1749–1755.
- [15] Kim JY. Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene (*bglBC1*) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17): 1445–1449.
- [16] Cerda LA, Valenzuela SV, Diaz P, et al. New GH16 β -glucanase from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 releases a complex pattern of mixed-linkage oligomers from barley glucan. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 63(1): 51–56.
- [17] Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1996, 316: 695–696.
- [18] Keitel T, Simon O, Borriss R, et al. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(11): 5287–5291.
- [19] Sun JT, Wang HX, Lv WP, et al. Development on 1,3-1,4- β -glucanases gene cloning, expression and thermostability. *Food Ferment Ind*, 2010, 36(6): 107–111 (in Chinese)
- 孙军涛, 王洪新, 吕文平, 等. 1,3-1,4- β -葡聚糖酶基因克隆表达及其耐热性研究进展. *食品与发酵工业*, 2010, 36(6): 107–111.
- [20] Niu CT, Wang JJ, Li YX, et al. Method optimization of catalytic activity of bacteria producing β -1,3-1,4-glucanase. *Chem Life*, 2012, 32(3): 263–267 (in Chinese).
- 钮成拓, 王金晶, 李永仙, 等. 细菌编码 β -1,3-1,4-葡聚糖酶催化活性优化方法. *生命的化学*, 2012, 32(3): 263–267.
- [21] Liu XL. Characterization and heterologous expression of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus tequilensis*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- 刘晓玲. 特基拉芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的异源表达及其性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [22] Bamforth CW, Martin HL. The degradation of β -glucan during malting and mashing: the role of β -glucanase. *J Inst Brew*, 1983, 89(4): 303–307.
- [23] Tian HX. Study on the influence of additive enzymes on the no-biological stability of beer[D]. Qingdao: Qingdao University of Technology, 2011 (in Chinese).
- 田红荀. 外加酶制剂对啤酒非生物稳定性的影响[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2011.
- [24] Tian HX, Wang JL, Ge XP. Research progress of the non-biological stability of beer. *Liquor Mak*, 2010, 37(6): 14–17 (in Chinese)
- 田红荀, 王家林, 葛晓萍. 啤酒非生物稳定性的研究进展. *酿酒*, 2010, 37(6): 14–17.
- [25] Bai YG, Wang JS, Zhang ZF, et al. A novel family 9 β -1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(1): 251–259.
- [26] Chaari F, Belghith-Fendri L, Blibech M, et al. Biochemical characterization of a lichenase from *Penicillium occitanis* Pol6 and its potential application in the brewing industry. *Process*

- Biochem, 2014, 49(6): 1040–1046.
- [27] Niu CT, Liu CF, Li YX, et al. Production of a thermostable 1,3-1,4- β -glucanase mutant in *Bacillus subtilis* WB600 at a high fermentation capacity and its potential application in the brewing industry. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 28–34.
- [28] Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochem*, 2006, 7: 23.
- [29] McCarthy TC, Lalor E, Hanniffy O, et al. Comparison of wild-type and UV-mutant β -glucanase-producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(5): 125–134.
- [30] McCarthy T, Hanniffy O, Lalor E, et al. Evaluation of three thermostable fungal endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. *Process Biochem*, 2005, 40(5): 1741–1748.
- [31] Wang K, Luo HY, Shi PJ, et al. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1448–1456.
- [32] Morata A, Somolinos S, Calderón F, et al. Polysaccharides release by selected for ageing yeasts on red wines lees. Effect of the addition of x-glucanases (in Spanish). *Congresos y Jornadas*, 2005: 193–194.
- [33] Liauberes RMC, Pan Q. Promotion effect of enzyme on wine fining and filtration. *Sino-Over Grapev Wine*, 2007, (4): 58–59 (in Chinese).
Liauberes RMC, 潘婧. 酶对葡萄酒澄清和过滤的增效作用. *中外葡萄与葡萄酒*, 2007, (4): 58–59.
- [34] van Rensburg P, Pretorius IS. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations: a review. *S Afr J Enol Vitic*, 2000, 21: 52–73.
- [35] Beckmann L, Simon O, Vahjen W. Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities. *J Basic Microbiol*, 2010, 46(3): 175–185.
- [36] Ribeiro T, Lordelo MM, Prates JAM, et al. The thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum* improves the nutritive value of highly viscous barley-based diets for broilers. *Brit Poultry Sci*, 2012, 53(2): 224–234.
- [37] Guan LZ, Sun YP, Xi QY, et al. β -Glucanase specific expression in the parotid gland of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2013, 22(4): 805–812.
- [38] White WB, Bird HR, Sunde ML, et al. Viscosity of β -D-glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks. *Poultry Sci*, 1983, 62(5): 853–862.
- [39] Fernandes VO, Costa M, Ribeiro T, et al. 1,3-1,4- β -Glucanases and not 1,4- β -glucanases improve the nutritive value of barley-based diets for broilers. *Anim Sci Technol*, 2016, 211: 153–163.
- [40] Wang ZP, Yu DY. The influence of NSP enzyme in barley based diet on pig performance. *China Feed*, 2001, (10): 19–20 (in Chinese).
王宗沛, 余东游. 大麦型饲料中添加非淀粉多糖酶对生长猪促生长效应的研究. *中国饲料*, 2001, (10): 19–20.
- [41] Adeola O, Cowieson AJ. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J Anim Sci*, 2011, 89(10): 3189–3218.
- [42] Luo ZC, Gao QQ, Li XL, et al. Cloning of LicB from *Clostridium thermocellum* and its efficient secretive expression of thermostable β -1,3-1,4-glucanase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(2): 562–570.
- [43] Amerah AM, van de Belt K, van der Klis JD. Effect of different levels of rapeseed meal and sunflower meal and enzyme combination on the performance,

- digesta viscosity and carcass traits of broiler chickens fed wheat-based diets. *Animal*, 2015, 9(7): 1131–1137.
- [44] Olgun O, Altay Y, Yildiz AO. Effects of carbohydrase enzyme supplementation on performance, eggshell quality, and bone parameters of laying hens fed on maize- and wheat-based diets. *Brit Poultry Sci*, 2018, 59(2): 211–217.
- [45] Von Wettstein D, Warner J, Kannangara CG. Supplements of transgenic malt or grain containing (1,3-1,4)- β -glucanase increase the nutritive value of barley-based broiler diets to that of maize. *Brit Poultry Sci*, 2003, 44(3): 438–449.
- [46] Zhang J, Gao Y, Lu QP, et al. Proteome changes in the small intestinal mucosa of growing pigs with dietary supplementation of non-starch polysaccharide enzymes. *Proteome Sci*, 2016, 15: 3.
- [47] Clarke LC, Sweeney T, Curley E, et al. Effect of β -glucanase and β -xylanase enzyme supplemented barley diets on nutrient digestibility, growth performance and expression of intestinal nutrient transporter genes in finisher pigs. *Anim Feed Sci Technol*, 2018, 238: 98–110.
- [48] Guan LZ, Cai JS, Zhao S, et al. Improvement of anti-nutritional effect resulting from β -glucanase specific expression in the parotid gland of transgenic pigs. *Transgenic Res*, 2016, 26(1): 1–11.
- [49] Zhang YH, Xu XL, Zhou XJ, et al. Overexpression of an acidic endo- β -1,3-1,4-glucanase in transgenic maize seed for direct utilization in animal feed. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e81993.
- [50] Yang JL, Kim YH, Lee HS, et al. Barley β -glucan lowers serum cholesterol based on the up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase activity and mRNA abundance in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2003, 49(6): 381–387.
- [51] Daou C, Zhang H. Oat beta-glucan: its role in health promotion and prevention of diseases. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2012, 11(4): 355–365.
- [52] Chaari F, Belghith-Fendri L, Zaouri-Ellouzi S, et al. Antibacterial and antioxidant properties of mixed linkage beta-oligosaccharides from extracted β -glucan hydrolysed by *Penicillium occitanis* EG_L lichenase. *Nat Prod Res*, 2016, 30(12): 1353–1359.
- [53] Hughes SA, Shewry PR, Gibson GR, et al. *In vitro* fermentation of oat and barley derived β -glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(3): 482–493.
- [54] Jaskari J, Kontula P, Siitonen A, et al. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(2): 175–181.
- [55] Cho HJ, Jang WJ, Moon SY, et al. Immobilization of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus* sp. on porous silica for production of β -glucooligosaccharides. *Enzyme Micro Technol*, 2018, 110: 30–37.
- [56] Chaari F, Belghith-Fendri L, Ellouz-Chaabouni S. Production and *in vitro* evaluation of oligosaccharides generated from lichenan using immobilized *Penicillium occitanis* lichenase. *J Mol Catal B Enzym*, 2015, 116: 153–158.
- [57] Debez A, Belghith I, Friesen J, et al. Facing the challenge of sustainable bioenergy production: Could halophytes be part of the solution? *J Biol Eng*, 2017, 11: 27.
- [58] Linton SM, Greenaway P. Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *J Exp Biol*, 2004, 207(23): 4095–4104.
- [59] Manavalan A, Adav SS, Sze SK. iTRAQ-based quantitative secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Proteom*, 2011, 75(2): 642–654.
- [60] Solomon KV, Haitjema CH, Henske JK, et al. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science*, 2016, 351(6278): 1192–1195.
- [61] Menon V, Divate R, Rao ML. Bioethanol production

- from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. and thermotolerant yeast. *Fuel Process Technol*, 2011, 92(3): 401–406.
- [62] Enrique M, Ibáñez A, Marcos JF, et al. β -Glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts. *J Food Sci*, 2010, 75(1): M41–M45.
- [63] Yao MF, Chang GW, Wei HQ, et al. Experimental study on application of dextranase in cane sugar manufacture. *Sugarcane Canesugar*, 2015, (6): 18–22 (in Chinese).
姚满芳, 常国炜, 韦红桥, 等. 葡聚糖酶在甘蔗制糖过程的应用试验研究. *甘蔗糖业*, 2015, (6): 18–22.
- [64] Furtado GP, Ribeiro LF, Santos CR, et al. Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochem*, 2011, 46(5): 1202–1206.
- [65] Borriss R, Zemek J. [β -1,3-1,4-glucanase in spore-forming microorganisms. IV. Properties of some *Bacillus*- β -glucan-hydrolases (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriell Naturwiss*, 1981, 136(1): 63–69.
- [66] Olsen O, Borriss R, Simon O, et al. Hybrid *Bacillus* (1,3-1,4)- β -glucanases: Engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Mol General Genet*, 1991, 225(2): 177–185.
- [67] Taberero C, Coll PM, Fernández-Abalos JM, et al. Cloning and DNA sequencing of bgaA, a gene encoding an endo- β -1,3-1,4-glucanase, from an alkalophilic *Bacillus* strain (N137). *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(4): 1213–1220.
- [68] Flint HJ, Martin J, McPherson CA, et al. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and β (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol*, 1993, 175(10): 2943–2951.
- [69] Schimming S, Schwarz WH, Staudenbauer WL. Properties of a thermoactive β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Clostridium thermocellum* expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177(1): 447–452.
- [70] Tsai LC, Shyur LF, Lee SH, et al. Crystal structure of a natural circularly permuted jellyroll protein: 1,3-1,4- β -d-glucanase from *Fibrobacter succinogenes*. *J Mol Biol*, 2003, 330(3): 607–620.
- [71] Yang SQ, Yan QJ, Jiang ZQ, et al. Biochemical characterization of a novel thermostable β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(13): 5345–5351.
- [72] Borriss R, Olsen O, Thomsen KK, et al. Hybrid *bacillus* endo-(1-3,1-4)- β -glucanases: construction of recombinant genes and molecular properties of the gene products. *Carl Res Commun*, 1989, 54: 41–54.
- [73] Pons J, Querol E, Planas A. Mutational analysis of the major loop of *Bacillus* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolases. Effects on protein stability and substrate binding. *J Biol Chem*, 1997, 272(20): 13006–13012.
- [74] Pons J, Planas A, Querol E. Contribution of a disulfide bridge to the stability of 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Protein Eng Des Select*, 1995, 8(9): 939–945.
- [75] Keitel T, Meldgaard M, Heinemann U. Cation binding to a *Bacillus* (1,3-1,4)- β -glucanase Geometry, affinity and effect on protein stability. *FEBS J*, 1994, 222(1): 203–214.
- [76] Gargallo R, Cedano J, Mozo-Villarias A, et al. Study of the influence of temperature on the dynamics of the catalytic cleft in 1,3-1,4- β -glucanase by molecular dynamics simulations. *J Mol Model*, 2006, 12(6): 835–845.
- [77] Zhang XY, He GQ. Study on stability of microbial β -glucanase. *J Zhejiang Uni: Agric Life Sci*, 2017, 33(4): 387–391 (in Chinese).
张秀艳, 何国庆. 微生物源 β -葡聚糖酶的稳定性研究. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2007,

- 33(4): 387–391.
- [78] Zhang XY. Studies on the directed evolution and thermostability of β -glucanase[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006 (in Chinese).
张秀艳. β -葡聚糖酶的定向进化及热稳定性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [79] Chen JL, Tsai LC, Wen TN, et al. Directed mutagenesis of specific active site residues on *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- β -D-glucanase significantly affects catalysis and enzyme structural stability. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17895–17901.
- [80] Lie-Fen S, Chen JL, Yang NS. A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- β -D-glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry*, 2005, 44(25): 9197–9205.
- [81] Li WF. Study on the mechanism for thermostability of beta-glucanase from *Clostridium thermocellus*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005 (in Chinese).
李卫芬. 热纤维梭菌 β -葡聚糖酶热稳定性机制的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [82] Qin JF, Li Q, Li YX, et al. Thermostable *Bacillus amyloliquefaciens* β -1,3-1,4-glucanase: *in vitro* evolution. *J Biotechnol*, 2010, 150(S1): S537–S538.
- [83] Niu CT, Zhu LJ, Wang JJ, et al. Simultaneous enhanced catalytic activity and thermostability of a 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus amyloliqueformis* by chemical modification of lysine residues. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(12): 2453–2460.
- [84] Niu CT, Zhu LJ, Zhu P, et al. Lysine-based site-directed mutagenesis increased rigid β -sheet structure and thermostability of mesophilic 1,3-1,4- β -glucanase. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(21): 5249–5256.
- [85] Niu CT, Zhu LJ, Xin X, et al. Rational design of disulfide bonds increases thermostability of a mesophilic 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus terquilensis*. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0154036.
- [86] Niu CT, Zhu LJ, Xu X, et al. Rational design of thermostability in bacterial 1,3-1,4- β -glucanases through spatial compartmentalization of mutational hotspots. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(3): 1085–1097.
- [87] Mao SR, Gao P, Lu ZX, et al. Engineering of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9 to improve its catalytic efficiency. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(1): 109–115.
- [88] Mao SR, Lu ZX, Zhang C, et al. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(3): 960–975.
- [89] Owuama CI, Asheno I. Studies on malting conditions for sorghum. *Food Chem*, 1994, 49(3): 257–260.
- [90] Luo HY, Yang J, Yang PL, et al. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo- β -1,3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(4): 1015–1023.
- [91] Mosier NS, Hendrickson R, Brewer M, et al. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 125(2): 77–97.
- [92] Yang SQ, Hao X, Yan QJ, et al. Purification and characterization of a novel alkaline β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(10): 1487–1495.
- [93] Jia HY, Li YN, Liu YC, et al. Engineering a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Paecilomyces thermophila* to improve catalytic efficiency at acidic pH. *J Biotechnol*, 2012, 159(1/2): 50–55.

(本文责编 郝丽芳)