

不同类型连接肽对 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 酶学性质的影响

王春娟¹, 唐诗涵¹, 邬敏辰^{*2}, 董运海¹, 杭宜岭¹, 李剑芳¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以柔性肽 F(GGGGS)₃ 或刚性肽 R(EAAAK)₃ 为连接肽, 将海栖热胞菌 27 家族碳水化合物结合域(CBM27) 与宇佐美曲霉 5 家族 β -甘露聚糖酶(AuMan5A)的 C 末端融合, 探讨不同类型连接肽对 AuMan5A 酶学性质的影响, 获取具有优良酶学性质的融合酶。采用重叠 PCR 技术扩增融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27*, 分别将 *Auman5A* 和融合酶基因在毕赤酵母 GS115 中进行表达, 分析表达产物 reAuMan5A、reAuMan5A-F-C 和 reAuMan5A-R-C 的酶学性质。结果表明: 该 3 种 β -甘露聚糖酶对角豆胶的 K_m 值分别为 1.7、1.9 和 0.9 mg/mL。3 种酶的最适温度 T_{opt} 分别为 70、65 和 70 °C; reAuMan5A-F-C 和 reAuMan5A-R-C 在 70 °C 的半衰期 $t_{1/2}^{70}$ 分别为 36 min 和 124 min, 较 reAuMan5A 的 ($t_{1/2}^{70}=9$ min) 延长了 3 倍和 12.8 倍。reAuMan5A-R-C 具有底物亲和力强、热稳定性高和 pH 稳定范围广等特点, 在食品、饲料、医药和能源等领域有着巨大的应用潜力。

关键词: 连接肽; β -甘露聚糖酶; 融合酶; 底物亲和力; 热稳定性

中图分类号: TS 201.25 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)09-0938-06

Effects of Different Types of Peptide Linkers on the Enzymatic Properties of β -Mannanase

WANG Chunjuan¹, TANG Shihan¹, WU Minchen^{*2}, DONG Yunhai¹, HANG Yiling¹, LI Jianfang¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A family 27 carbohydrate-binding module (CBM27) of *Thermotoga maritima* MSB8 was linked to the C-terminus of a glycoside hydrolase family 5 β -mannanase of *Aspergillus usamii* YL-01-78 (AuMan5A) by using a flexible peptide linker F (GGGGS)₃ or a rigid peptide linker R (EAAAK)₃. By overlapping PCR technique, two fusion enzyme genes, *Auman5A-F-cbm27* and *Auman5A-R-cbm27*, was amplified. The gene *Auman5A* and two fusion genes were expressed in *Pichia pastoris* GS115, respectively. And then, the enzymatic properties of the recombinant

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX-1170)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。

E-mail: bioch@163.com

引用本文: 王春娟, 唐诗涵, 邬敏辰, 等. 不同类型连接肽对 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 酶学性质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(09): 938-943.

β -mannanases, reAuMan5A, reAuMan5A-F-C and reAuMan5A-R-C, were analyzed. As a result, the K_m of reAuMan5A-R-C towards locust bean was 0.9 mg/mL, which was much smaller than those of reAuMan5A (1.7 mg/mL) and reAuMan5A-F-C (1.9 mg/mL). The temperature optimum (T_{opt}) of reAuMan5A-F-C was 65 °C, which was 5 °C lower than that (70 °C) of reAuMan5A or reAuMan5A-R-C. The half-lives at 70 °C ($t_{1/2}^{70}$) of reAuMan5A-F-C and reAuMan5A-R-C were 36 and 124 min, respectively, which were about 4- and 13.8 folds longer than that ($t_{1/2}^{70}=9$ min) of reAuMan5A. In this study, the fusion enzyme reAuMan5A-R-C was obtained with strong substrate affinity, high thermostability and wide range of pH stability. It will be a potential candidate for industrial processes, such as food, animal feed, energy, pharmaceuticals and so on.

Keywords: peptide linker, β -Mannanase, fusion enzyme, substrate affinity, thermostability

自然界中多数蛋白质或酶由多个模块或结构域组成,各模块间的连接通常需要借助连接肽,以避免其互相干扰而影响整体结构的稳定及功能的发挥^[1-2]。连接肽是指模块间存在的一段肽,其长度从几个到上百个氨基酸残基(一般为5~25个)不等,常见的连接肽可分为柔性和刚性两大类^[3]。柔性连接肽通常由多个非极性氨基酸(如甘氨酸)残基和极性的丝氨酸和苏氨酸残基组成。在融合蛋白技术中最常用的柔性连接肽是由Huston等^[4]提出的(GGGGS)_n($n \leq 6$)序列。刚性连接肽是由易形成稳定二级结构的氨基酸残基所组成,如许多天然的刚性连接肽形成 α -螺旋结构^[2]。最常用人工合成的 α -螺旋刚性连接肽为(EAAAK)_n($n \leq 6$)^[5]。张献伟等^[6]研究表明,当 $n=3$ 时,连接肽能较好地维持酶蛋白的稳定性以及发挥其催化活性。

β -甘露聚糖酶是一种内切型水解酶(endo- β -1,4-D-mannanases, EC 3.2.1.78),随机切割甘露聚糖分子主链内部的 β -1,4-D-甘露糖苷键,在诸多工业领域有着巨大的应用潜力^[7-8]。然而,目前大多数商品化的 β -甘露聚糖酶均存在催化效率低、酶学性质差和使用成本高等缺陷,严重制约了其工业化应用^[9]。据文献报道,27家族碳水化合物结合域(CBM27)能特异性地结合甘露聚糖,并对 β -甘露聚糖酶催化结构域具有一定的热保护作用^[10]。因此,将CBM27与催化结构域融合能有效地改善 β -甘露聚糖酶的酶学性质。

作者所在实验室克隆了宇佐美曲霉 YL-01-78 5 家族 β -甘露聚糖酶基因 *Auman5A*, 由该基因编码的 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 是一种只含催化结构域的蛋白质^[11]。作者选择柔性肽 F(GGGGS)₃ 和刚性

肽 R(EAAAK)₃ 为连接肽,构建融合 β -甘露聚糖基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27*。分别将 *Auman5A* 和融合酶基因在毕赤酵母 GS115 中表达,并分析 CBM27 融合前后以及不同类型连接肽对 AuMan5A 酶学性质的影响。结果显示,重组融合酶 reAuMan5A-R-C 具有优良的酶学性质,产该酶的重组酵母菌株有望用于 β -甘露聚糖酶的工业化生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 DH5 α 菌株、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 菌株和表达质粒 pPIC9K: 购自 Invitrogen 公司;克隆质粒 pUCm-T: 购自上海 Sangon 公司;重组质粒 pUCm-T-*Auman5A*、pUCm-T-*cbm27* 和 pPIC9K-*Auman5A*: 由作者所在实验室构建和保藏。

1.1.2 主要试剂和培养基 限制性内切酶、*rTaq* DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker: 购自大连 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒和 Geneticin G418: 购自上海 Sangon 公司;角豆胶和甘露糖: Sigma 公司产品;DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-75: Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;其它试剂均为分析纯。LB、MD、YPD、YPD-G418、BMGY 和 BMMY 培养基的配制参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.2 方法

1.2.1 融合酶基因的扩增 根据 *Auman5A* 序列

(GenBank:HQ839639) 及连接肽和 CBM27 编码基因序列, 设计扩增融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27* 所需的 PCR 引物, 见表 1, 委托上海 Sangon 公司合成。

采用重叠 PCR 技术扩增 *Auman5A-F-cbm27*

和 *Auman5A-R-cbm27*, 具体流程见图 1。将 PCR 扩增所获的融合酶基因分别与克隆质粒 pUCm-T 连接, 分获重组质粒 pUCm-T-*Auman5A-F-cbm27* 和 pUCm-T-*Auman5A-R-cbm27*, 转化 *E. coli* JM109, 阳性转化子的测序结果与设计的一致。

表 1 扩增融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27* 的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for the amplification of *Auman5A-F-cbm27* and *Auman5A-R-cbm27*

引物名称	引物序列(5'-3')	长度/bp	备注
<i>man5A-f</i>	GAATTC TCCTTCGCCAGCACCTC	23	<i>EcoR</i> I 位点
<i>F-cbm27-r</i>	CTGGCGGTGGTGGTTCTGCTGGTGGTGGATCCGCAAGATA	40	重叠区
<i>F-cbm27-f</i>	AACCACCACCGCCAGAACCCACCACCGGCACTATCAATA	41	重叠区
<i>R-cbm27-r</i>	CTTTAGCCGCTGCTTCTTTTGGCGCAGCTTCGGCACTATCA	41	重叠区
<i>R-cbm27-f</i>	AGAAGCAGCGGCTAAAGAAGCGGCGGCAAAAGCAAGATAC	40	重叠区
<i>cbm27-r</i>	GCGGCCGCCTATGTTCTTTATAAAAGTCTCAC	32	<i>Not</i> I 位点

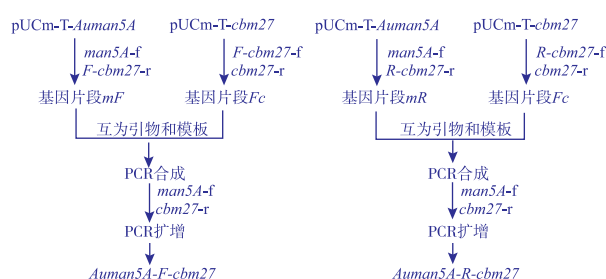


图 1 扩增融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27* 的流程

Fig. 1 Amplification of the fusion enzyme genes *Auman5A-F-cbm27* and *Auman5A-R-cbm27*

1.2.2 重组表达质粒的构建 将 pUCm-T-*Auman5A-F-cbm27* 和 pUCm-T-*Auman5A-R-cbm27* 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 割胶回收目的条带, 与经同样双酶切的 pPIC9K 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 。经通用引物 5'-*AOX1* 和 3'-*AOX1* PCR 筛选鉴定, 送上海 Sangon 公司测序, 测序正确的重组表达质粒分别命名为 pPIC9K-*Auman5A-F-cbm27* 和 pPIC9K-*Auman5A-R-cbm27*。

1.2.3 重组 β -甘露聚糖酶的表达和纯化 分别将 pPIC9K-*Auman5A*、pPIC9K-*Auman5A-F-cbm27* 和 pPIC9K-*Auman5A-R-cbm27* 用 *Sal* I 线性化, 电转化 *P. pastoris* GS115。重组毕赤酵母的鉴定、多拷贝筛选和诱导表达等参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册。诱导表达上清液用 75%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 离心收集沉淀, 溶于适量 20

mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 7.0); 经透析、超滤浓缩 (膜截留相对分子质量 10 000, Millipore 公司), 上样 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱 (2.0 cm $\times$ 20 cm), 用含 0.1~1.0 mol/L NaCl 的上述磷酸缓冲液梯度洗脱, 分步收集洗脱液; 合并具有 β -甘露聚糖酶活性的洗脱液, 超滤浓缩至 1.0 mL, 上样 Sephadex G-75 凝胶层析柱 (1.6 cm $\times$ 80 cm) 进行纯化。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物, Bradford 法^[12]测定蛋白质含量。

1.2.4 β -甘露聚糖酶活性的测定 酶活性测定参见文献[13]并略作修改。在 2.4 mL 0.5 g/dL 角豆胶溶液 (pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制) 中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 加入 2.5 mL DNS 试剂, 沸水浴显色 7 min, 测定 OD₅₄₀ 值。在上述反应条件下, 1 个 β -甘露聚糖酶活性单位 (U) 定义为每分钟释放 1 μmol 还原糖 (以甘露糖计) 所需的酶量。

1.3 重组 β -甘露聚糖酶酶学性质的分析

1.3.1 温度对酶活性的影响 在不同温度 (50~80 $^{\circ}\text{C}$) 下, 按 1.2.4 方法测定酶活性。最适温度 T_{opt} 定义为最高酶活性 (以相对酶活性 100% 计) 所对应的温度。将酶液置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 0~140 min, 按 1.2.4 方法测定残余酶活性, 未经处理酶液的酶活性以 100% 计。酶的半衰期 $t_{1/2}$ 定义为: 经 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理残余酶活性为 50% 时所对应的时间。

1.3.2 pH 对酶活性的影响 用 pH 2.5~6 的缓冲液

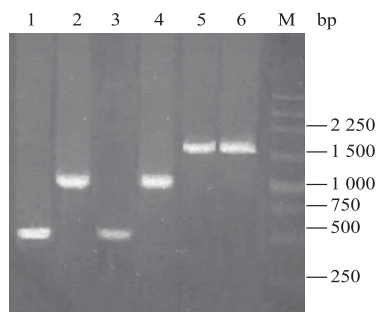
配制 0.5 g/dL 角豆胶溶液,按 1.2.4 方法测定酶活性。最适 pH 定义为最高酶活性所对应的 pH 值。将酶液在 pH 2~9.5、40 °C 处理 60 min,按 1.2.4 方法测定残余酶活性。酶的 pH 稳定性定义为残余酶活性在 85% 以上所对应的 pH 范围。

1.3.3 酶动力学常数的测定 以 1.0~10 mg/mL 的角豆胶溶液(pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制)为底物,在酶各自的最适温度下按 1.2.4 方法测定其酶活性。采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算 β -甘露聚糖酶的 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

以 pUCm-T-*cbm27* 为模板、*F-cbm27-f* 和 *cbm27-r* 为引物,PCR 扩增获长度约为 550 bp 的基因片段 *Fc*,见图 2 泳道 1。同时以 pUCm-T-*Auman5A* 为模板、*man5A-f* 和 *F-cbm27-r* 为引物,扩增获得长度约为 1.1 kb 的基因片段 *mF*,见图 2 泳道 2。最终采用重叠 PCR 技术,先以 *mF* 和 *Fc* 互为引物和模板合成完整的融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27*,再加入引物 *man5A-f* 和 *cbm27-r*,扩增获得长度约为 1.6 kb 的 *Auman5A-F-cbm27*,见图 2 泳道 5。同理,采用 3 轮 PCR 扩增分别获得长度约为 550 bp 的 *Rc*、1.1 kb 的 *mR* 和 1.6 kb 的 *Auman5A-R-cbm27*,见图 2 泳道 3、4 和 6。测序结果表明,*Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27* 长度均为 1 610 bp,核苷酸序列与预期一致。将它们分别克隆至 pPIC9K,获得重组表达质粒 pPIC9K-*Auman5A-F-cbm27* 和 pPIC9K-*Auman5A-R-cbm27*。



1: 基因片段 *Fc*; 2: 基因片段 *mF*; 3: 基因片段 *Rc*; 4: 基因片段 *mR*; 5: 融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27*; 6: 融合酶基因 *Auman5A-R-cbm27*; M: DNA Marker

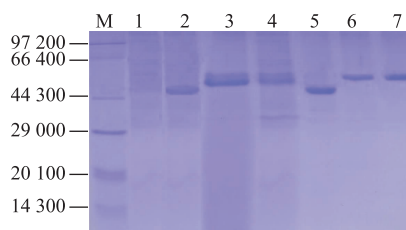
图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析 (1.0 g/dL)

Fig. 2 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis (1.0 g/dL)

2.2 重组 β -甘露聚糖酶的表达和纯化

挑选若干在 YPD-G418 (4.0 mg/mL) 平板上生长良好的单菌落,按照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册进行诱导表达 (30 °C 培养 96 h, 每隔 24 小时添加终体积分数 1.0% 的甲醇),按 1.2.4 方法测定上清液酶活性,分别筛选到 3 个产 reAuMan5A、reAuMan5A-F-C 和 reAuMan5A-R-C 活性最高的重组酵母 GS115/*Auman5A*、GS115/*Auman5A-F-c* 和 GS115/*Auman5A-R-c*,见图 3 泳道 2~4,其表达上清液酶活性分别为 33.8、29.5、18.2 U/mL,而在空白对照 GS115/pPIC9K 上清液中未检测到 β -甘露聚糖酶活性,见图 3 泳道 1。

分别取上述 3 个重组酵母的诱导表达上清液,采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、阴离子交换层析和凝胶层析进行纯化。SDS-PAGE 分析显示,纯化的 reAuMan5A、reAuMan5A-F-C 和 reAuMan5A-R-C 分别约在 49 800、58 400 和 58 400 (表观相对分子量) 处呈现单一蛋白质条带,见图 3 泳道 5~7。按 1.2.4 方法测得电泳纯酶的比活性分别为 230.6、153.3、341.7 U/mg。

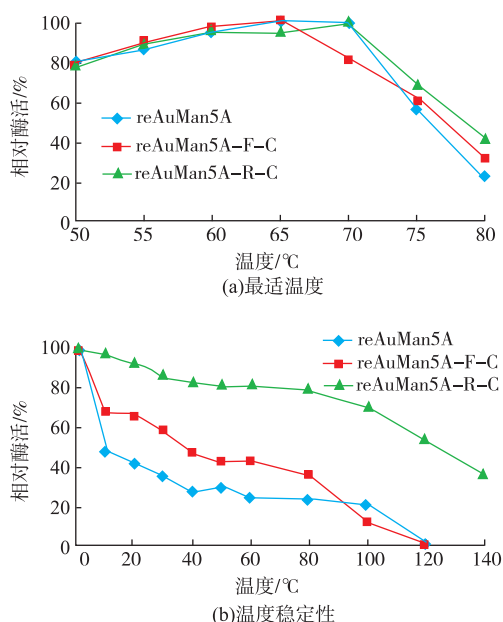


M: 蛋白质 Marker; 1: 空质粒酵母表达上清液; 2~3: 重组酵母表达上清液; 4~6: 纯化上清液。

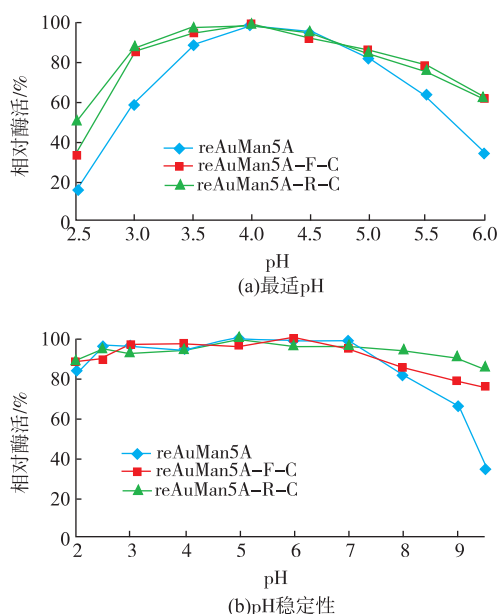
图 3 诱导表达上清液和纯化酶的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 Analysis of the expression supernatants and purified enzymes by SDS-PAGE

2.3 重组 β -甘露聚糖酶酶学性质的分析

2.3.1 最适温度和热稳定性 按 1.3.1 方法分析了温度对 3 种 β -甘露聚糖酶活性的影响,结果见图 4。由图 4a 可见, reAuMan5A 和 reAuMan5A-R-C 的最适温度 T_{opt} 均为 70 °C; 而 reAuMan5A-F-C 的 T_{opt} 为 65 °C。由图 4b 可见, reAuMan5A-R-C 的热稳定性最高,其 t_{70}^{70} 长达 124 min, 分别是 reAuMan5A-F-C ($t_{70}^{70}=36$ min) 和 reAuMan5A ($t_{70}^{70}=9$ min) 的 3.4 倍和 13.8 倍。推测 α -螺旋刚性连接肽 R(EAAAK)₃ 使得融合酶 reAuMan5A-R-C 的整体结构更加稳定。

图4 温度对3种重组 β -甘露聚糖酶活性的影响Fig. 4 Effects of temperature on the activities of three recombinant β -mannanases

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性 按 1.3.2 方法分析了 pH 值对 3 种 β -甘露聚糖酶活性的影响, 结果见图 5。由图 5a 可知, 3 种酶的最适 pH 均为 4.0。由图 5b 可见, reAuMan5A-R-C 的 pH 稳定范围最广 (pH 2~9.5), reAuMan5A-F-C 的次之 (pH 2.5~8.0), reAuMan5A 的最窄 (pH 2.5~7.5)。

图5 pH对3种重组 β -甘露聚糖酶活性的影响Fig. 5 Effects of pH on the activities of three recombinant β -mannanases

2.3.3 酶动力学常数的测定 在 3 种酶各自的 T_{opt} 下按 1.3.3 方法测得 reAuMan5A、reAuMan5A-F-C 和 reAuMan5A-R-C 对角豆胶的 K_m 值分别为 1.7、1.9、0.9 mg/mL, V_{max} 值分别为 290.7、223.2、375.3 U/mg。与 reAuMan5A 相比, reAuMan5A-R-C 的 K_m 值降低了 47%。推测 α -螺旋刚性连接肽 R 较柔性连接肽 F 能更好地将各结构域分开并保持其独立的功能, 使 CBM27 与底物更易结合, 从而提高了酶的底物亲和力。

3 结 语

融合酶在功能和应用方面有着众多的优势, 如集多个功能域于一体的多功能酶; 另外, 在高效表达和纯化等方面融合酶也有优势^[14]。构建融合酶最常用的方法有两种: 直接的顺序融合和借助连接肽的顺序融合。前者将两种酶的编码基因首尾直接相连, 在合适的宿主中表达^[15]。然而, 表达的多肽链其氨基酸残基之间的相互作用有时会影响融合酶各结构域的正确折叠, 从而导致融合酶活性受损或完全丧失。研究证实, 在两个结构域之间引入连接肽能弥补直接顺序融合的缺陷^[3]。An 等^[16]将木聚糖酶 XynX 与葡聚糖酶 Cel5Z 融合, 发现当 XynX 与 Cel5Z 直接顺序融合时没有酶活性, 而当它们之间借助富含丝氨酸/苏氨酸的连接肽顺序融合时具有双重催化活性。连接肽的氨基酸组成、长度及是否糖基化都会影响融合酶的稳定性和功能。Guo 等^[17]采用不同长度的刚性连接肽 (EAAAK)_n ($n=2\sim4$) 将木聚糖酶和甘露聚糖酶融合, 当 $n=3$ 时, 融合酶具有双重功能且催化效率最高。Lu 等^[18]研究表明, 在融合酶 β -葡聚糖酶-木聚糖酶 (Glu-Xyl) 中插入柔性连接肽 (GGGGS)_n ($n\leq 3$) 或刚性连接肽 (EAAAK)_n ($n\leq 3$), 其活性得到明显改善, 其中 (EAAAK)₃ 使 Glu 和 Xyl 的催化效率分别高于亲本 262% 和 31%。

作者选择 F(GGGGS)₃ 和 R(EAAAK)₃ 为连接肽, 构建了融合酶基因 *Auman5A-F-cbm27* 和 *Auman5A-R-cbm27*。分别将 *Auman5A* 和融合酶基因在毕赤酵母 GS115 中实施表达, 并分析了 CBM27 融合前后以及两种类型连接肽对 AuMan5A 酶学性质的影响。结果表明, 重组融合酶 reAuMan5A-R-C 具有底物亲和力强、热稳定性高和 pH 稳定范围广等特点, 在食品、饲料、医药和能源等领域有着巨大

的应用潜力,产该酶的重组酵母菌株有望用于 β -甘露聚糖酶的工业化生产。

参考文献:

- [1] CHEN X,ZARO J L,SHEN W C. Fusion protein linkers:property,design and functionality[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013,65(10):1357-1369.
- [2] GEORGE R A,HERINGA J. An analysis of protein domain linkers;their classification and role in protein folding[J]. **Protein Engineering**,2003,15(11):871-879.
- [3] HUANG Ziliang,ZHANG Chong, WU Xi,et al. Recent progress in fusion enzyme design and applications[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2012,28(4):393-409.(in Chinese)
- [4] HUSTON J S,LEVINSON D,MUDGETT-HUNTER M,et al. Protein engineering of antibody binding sites;recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**,1988,85(16):5879-5883.
- [5] ARAI R,WRIGGERS W,NISHIKAWA Y,et al. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering[J]. **Proteins**,2004,57(4):829-838.
- [6] ZHANG Xianwei,ZHANG Guanguan, WU Zhenfang,et al. Peptide linkers optimized recombinant enzyme gene of XynB-ManA and its co-expression in pK15 cells[J]. **Scientia Agricultura Sinica**,2012,46(22):4774-4783.(in Chinese)
- [7] YANG H,SHI P,LU H,et al. A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers[J]. **Food Chemistry**,2015,173:283-289.
- [8] ALBRECHT S,VAN MUISWINKEL G C J,XU J,et al. Enzymatic production and characterization of konjac glucomannan oligosaccharides[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2011,59(23):12658-12666.
- [9] ZHANG Wei,WANG Yawei,CHEN Feng,et al. Gene synthesis,expression and characterization of a thermostable endo- β -1,4-mannanase[J]. **China Biotechnology**,2014,34(8):41-46.(in Chinese)
- [10] DOS SANTOS C R,PAIVA J H,MEZA A N,et al. Molecular insights into substrate specificity and thermal stability of a bacterial GH5-CBM27 endo-1,4- β -D-mannanase[J]. **Journal of Structural Biology**,2012,177(2):469-476.
- [11] TANG C,GUO J,WU M,et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel acidophilic β -mannanase gene,*Auman5A*, from *Aspergillus usami* YL-01-78[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2011,27(12):2921-2929.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72(1/2):248-254.
- [13] ZHAO Mei,WEI Xihuan,WANG Chunjuan,et al. Gene cloning and expression of a thermostable β -mannanase and its enzymatic properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(6):590-596.(in Chinese)
- [14] ZHOU B H,XING L,WU W,et al. Small surfactant-like peptides can drive soluble proteins into active aggregates[J]. **Microbial Cell Factories**,2012,11:10.
- [15] DOI N,YANAGAWA H. Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution[J]. **FEBS Letters**,1999,453(3):305-307.
- [16] AN J M,KIM Y K,LIM W J,et al. Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2005,36(7):989-995.
- [17] GUO N,ZHENG J,WU L,et al. Engineered bifunctional enzymes of endo-1,4- β -xylanase/endo-1,4- β -mannanase were constructed for synergistically hydrolyzing hemicellulose[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2013,97:311-318.
- [18] LU P,FENG M G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2008,79(4):579-587.