

CBM 融合位置对 AuMan5A 酶学性质的影响

袁风娇¹, 王春娟¹, 李雪晴¹, 李剑芳¹, 邬敏辰^{*2}

(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: 为探讨碳水化合物结合结构域(CBM) 不同融合位置对 *Aspergillus usamii* 5 家族 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 酶学性质的影响, 将 *Thermotoga maritima* 27 家族 CBM 分别融合至其 C 和 N 末端, 构建出融合酶基因 *Auman5A-cbm27* 和 *cbm27-Auman5A*。将 *Auman5A* 和融合酶基因分别在 *Pichia pastoris* GS115 中表达, 分析比较表达产物 AuMan5A、AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的酶学性质。结果表明: AuMan5A、AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的最适温度 T_{opt} 分别为 70、70 °C 和 60 °C; 其中 AuMan5A-CBM27 在 68 °C 及以下保温 1 h 残余酶活均大于 85%, 与原酶相比, 其热稳定性提高了约 8 °C, 而 CBM27-AuMan5A 在 58 °C 及以下保持稳定, 与原酶相比, 降低了 2 °C。3 种酶的最适 pH 均为 4.0; AuMan5A 在 pH 值 2.5~7.5 范围内保持稳定, 2 种融合酶在 pH 2.0~9.0 内均能保持稳定。与 AuMan5A 相比, AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 对角豆胶的 K_m 分别降低了 45.0% 和 26.3%。通过比较 3 种酶的酶学性质, 证实 CBM 不同融合位置对 AuMan5A 酶学性质具有重要影响。

关键词: β -甘露聚糖酶; 碳水化合物结合域; 融合位置; 酶学性质

中图分类号: TS 201.25 文章编号: 1673-1689(2019)04-0001-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.001

Effect of Fusion Position of Carbohydrate-Binding Module on the Enzymatic Properties of AuMan5A

YUAN Fengjiao¹, WANG Chunjuan¹, LI Xueqing¹, LI Jianfang¹, WU Minchen^{*2}

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

Abstract: AuMan5A, a glycoside hydrolase family 5 β -mannanase of *Aspergillus usamii*, only consists of a catalytic domain. To explore the effect of fusion position of carbohydrate-binding module on the enzymatic properties of AuMan5A, two fusion genes, *Auman5A-cbm27* and *cbm27-Auman5A*, were constructed as designed theoretically by separately linking family 27 CBM of *Thermotoga maritima* β -mannanase into C- and N-termini of AuMan5A. After *Auman5A* and two fusion genes were expressed in *Pichia pastoris* GS115, enzymatic properties of the expressed products, AuMan5A, AuMan5A-CBM27 and CBM27-AuMan5A, were analyzed and compared. The results showed that the temperature optima (T_{opt}) of three β -mannanases were 70, 70 and 60 °C,

收稿日期: 2016-09-08

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(SJLX16-0472)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。E-mail: bioch@163.com

引用本文: 袁风娇, 王春娟, 李雪晴, 等. CBM 融合位置对 AuMan5A 酶学性质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 1-7.

respectively. AuMan5A-CBM27 was thermostable at 68 °C, while AuMan5A and CBM27-AuMan5A were at 60 and 58 °C. Besides, three β -mannanases displayed the same pH optimum of 4.0. AuMan5A was stable at a pH range of 2.5~7.5, while AuMan5A-CBM27 or CBM27-AuMan5A was at pH 2.0~9.0. Compared with that of AuMan5A, K_m values of AuMan5A-CBM27 and CBM27-AuMan5A towards locust bean gum decreased by 45.0% and 26.3% respectively. It was demonstrated in this work that the fusion of CBM27 and its position into AuMan5A played significant roles in its enzymatic properties.

Keywords: β -mannanase, carbohydrate-binding module, fusion position, enzymatic properties

β -甘露聚糖酶 (EC 3.2.1.78) 是一类能够水解甘露聚糖主链中 β -1,4-D-甘露糖苷键的内切水解酶,属于半纤维素酶类。大部分 β -甘露聚糖酶由催化结构域和非催化结构域组成,碳水化合物结合结构域(Carbohydrate-binding module, CBM) 即为一种典型的非催化结构域,一般位于酶的 N 端或 C 端^[1]。研究证明,CBM 可促进酶识别特定底物或底物的某个区域,从而提高酶的催化效率并增强底物亲和力,同时在提高酶稳定性等方面有着重要作用。如今,融合酶技术作为一项具有广泛应用前景的技术已在酶分子改造,提高酶活性、热稳定性、底物特异性等方面取得很大进展^[2]。构建融合酶最简单的方式就是通过连接肽将两个或多个蛋白域首尾相连,从而获得具有不同功能的融合酶。然而,ZHAO 等^[3]发现来自 *Clostridium stercorarium* 的木聚糖酶中有两个不同家族的 CBM 结构分别位于其 N 端和 C 端,当除去其 N 端 CBM 时,突变酶的 T_{90} 降低 10 °C,而除去 C 端 CBM 时酶的稳定性却没有明显变化,因此认为该酶中主要是 N 端的 CBM 对其稳定性起作用。JIN 等^[4]将 *Pectobacterium chrysanthemi* 的纤维素酶基因 (*Cel5Z*; Ω) 和 *Clostridium thermocellum* 的木聚糖酶基因 (*XynX*) 融合构建双功能酶时发现,只有将 *Cel5Z* 整合到 *XynX* 的 C 末端时,融合酶才拥有双功能酶活性。PHAM 等^[5]将 *Aspergillus niger* *Cellobiohydrolase B* 的 CBM 融合到 *Aspergillus terreus* β -甘露聚糖酶的 C 末端,结果表明重组 Man-CBM 的 K_m 值降为 0.9 mg/mL,明显低于 Man 的 K_m 值 (1.3 mg/mL),且前者的热稳定性较后者也有明显的提高。由此可见,构建融合酶时,CBM 融合位置对其酶学性质有重要影响。

作者所在实验室已成功克隆了一株来自 *Aspergillus usamii* YL-01-78 5 家族的 β -甘露聚糖酶基因 *Auman5A*,在对该基因及其编码的氨基酸序

列进行生物信息学分析时发现,此基因编码的 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 是一个不含 CBM 的单结构域蛋白^[6]。BORASTON 等^[7]研究证明,来自 *Thermotoga maritima* 27 家族的 CBM 可以特异性地结合甘露聚糖,并对酶的催化域具有热保护作用。本研究将 CBM27 通过来源于 *Trichoderma reesei* 纤维二糖水解酶 I 的连接肽分别融合至 AuMan5A 的 C 末端及 N 末端,并成功将融合 β -甘露聚糖基因 *Auman5A-cbm27* 和 *cbm27-Auman5A* 在毕赤酵母 GS115 中表达,分析 CBM27 融合前后以及不同融合位置对 AuMan5A 酶学性质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和培养基 表达质粒 pPIC9K、*E. coli* JM109、DH5 α 和 *Pichia pastoris* GS115 由作者所在实验室保藏;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*, 由本实验室构建和保藏;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。

1.1.2 主要试剂 rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,均购自大连 TaKaRa 公司;EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Geneticin G418、250 bp ladder marker 和 protein Marker,购自上海 Sangon 公司;角豆胶、D-甘露糖, Sigma 公司产品;DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-75, Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 *Auman5A* 序列 (GenBank: HQ839639) 及连接肽 (GenBank: GL985084) 与

CBM27 编码基因序列,设计扩增融合酶基因 *Auman5A-cbm27* 和 *cbm27-Auman5A* 所需的 8 条

PCR 引物(表 1),委托上海 Sangon 公司合成。

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

Table 1 PCR Primers for the amplification of fusion enzyme genes *Auman5A-cbm27* and *cbm27-Auman5A*

名称	序列(5'→3')	长度/bp	备注
AC-F1	<u>GAATTC</u> TCCTTCGCCAGCACCTC	23	<i>EcoR</i> I 位点
AC-R1	TAGACGAGGTTGTCGTCGTCGATGATACGG GAGGAGGAGTGTTGTACCGCCGGCACTAT	60	重叠区
TC-F1	GACGACAACCTCGTCTAGGACCTCGTCGAC GCCTCCACCGCCTGGAGGTAGCGCAAGATA	60	重叠区
TC-R1	<u>GCGGCCGC</u> CTATGTTCTTTTATAAAGTCTCAC	32	<i>Not</i> I 位点
TC-F2	<u>GAATTC</u> GCAAGATACGTGTTGGC	23	<i>EcoR</i> I 位点
TC-R2	AGACGAGGTTGTCGTCGTCGATGATACGGG AGGAGGAGTGTTGTACCGCCTGTTCTTT	59	重叠区
CA-F2	ACGACGACAACCTCGTCTAGGACCTCGTCG ACGCCTCCACCGCCTGGAGGTAGCTCCTT	59	重叠区
CA-R2	<u>GCGGCCGC</u> TTAGGCACTATC	20	<i>Not</i> I 位点

注:方框内为酶切位点,下划线为重叠区

1.2.2 重组表达质粒的构建 以 pUCm-T-*Auman5A* 为模板,AC-F1、AC-R1 为引物 PCR 获得基因片段 A1;以 pUCm-T-*cbm27* 为模板,TC-F1、TC-R1 为引物 PCR 获得基因片段 C1;然后以 A1 和 C1 互为引物和模板第 2 轮重叠 PCR 初步合成 *Auman5A-cbm27* 基因,再加入引物 AC-F1 和 TC-R1,进行第 3 轮 PCR 扩增 *Auman5A-cbm27* 基因。同理,利用 3 轮重叠 PCR,扩增合成 *cbm27-Auman5A* 基因。将纯化的目的 PCR 产物与克隆质粒 pUCm-T 连接获重组质粒 pUCm-T-*Auman5A-cbm27* 和 pUCm-T-*cbm27-Auman5A*,转化 *E.coli* JM109,蓝白斑筛选和 DNA 测序。将测序正确的重组质粒分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,割胶回收目的基因,与经同样双酶切的 pPIC9K 连接,获得重组表达质粒 pPIC9K-*Auman5A-cbm27* 和 pPIC9K-*cbm27-Auman5A*,转化 *E.coli* DH5 α ,DNA 测序验证。

1.2.3 β -甘露聚糖酶的表达和纯化 分别将 pPIC9K-*Auman5A*、pPIC9K-*Auman5A-cbm27* 和 pPIC9K-*cbm27-Auman5A* 用 *Sal* I 线性化,电击转化毕赤酵母感受态细胞,具体操作参照基因脉冲仪(Bio-Rad 公司)说明书。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。整合有空 pPIC9K 质粒的毕赤酵母 GS115 做空白对照。 β -甘露聚糖酶的具体纯化方法参照文献[8]。SDS-PAGE 分析重组表达产

物,Bradford 法^[9]测定蛋白质含量。

1.2.4 β -甘露聚糖酶活性的测定 在 20 mL 具塞试管中加入 2.4 mL 5 mg/mL 角豆胶溶液(用 pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制),50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min;再加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,准确反应 15 min;加入 2.5 mL DNS 试剂,在沸水浴显色 7 min,测定 OD₅₄₀ 值。在上述条件下,每分钟产生 1 μmol 还原糖(以 D-甘露糖计)所需的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。

1.2.5 β -甘露聚糖酶酶学性质分析

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。将酶液用缓冲液适当稀释后,分别置于 45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 下,保温 1 h,测定不同温度下样品酶的活性。酶的热稳定性定义为残余酶活性在 85%以上所对应的温度范围。

采用蛋白热移位(PTS)法测定 AuMan5A、AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的熔解温度(melting temperature, T_m)。具体方法参见文献[10],并略作修改。按照 PTS Kit 操作手册将蛋白质样品和荧光染料混合,利用罗氏 LightCycler 480 II 实时定量 PCR 系统,在 50~95 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内,以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率,在激发和发射波长分别为 533 nm 和 640 nm 下检测荧光信号,绘制熔解曲线;

利用“Tm calling”分析方法获得衍生熔解曲线,其峰值对应的温度即为 T_m 值。

2) pH 对酶活性的影响:用 pH 2.5~6 的缓冲液配制 0.5% (质量体积比) 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 2~10.5、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。

3) β -甘露聚糖酶催化效率的测定:分别用 pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制不同浓度 (1.0~10 mg/mL) 的角豆胶溶液,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,计算酶的动力学常数 k_{cat} 和 K_m 及催化效率 k_{cat}/K_m 值。

1.3 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果与分析

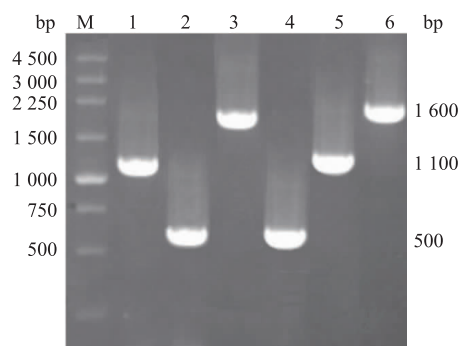
2.1 重组表达质粒的构建

以 pUCm-T-*Auman5A* 为模板,经过第 1 轮 PCR 扩增,获得长度约为 1 100 bp 的基因片段 A1 (图 1 泳道 1);以 pUCm-T-*cbm27* 为模板,经第 2 轮 PCR 扩增,获得长度约为 550 bp 的基因片段 C1 (图 1 泳道 2);经过第 3 轮 PCR 扩增,获得长度约为 1 600 bp 的 *Auman5A*-*cbm27* (图 1 泳道 3)。同上,采用 3 轮 PCR 扩增分别获得长度约为 550 bp 的 C2、1 100 bp 的 A2 和 1 600 bp 的 *cbm27*-*Auman5A* (图 1 泳道 4、5 和 6)。基因测序结果显示融合基因 *Auman5A*-*cbm27* 和 *cbm27*-*Auman5A* 长度均为 1 610 bp (含 *EcoR* I、*Not* I 酶切位点),与预期一致。将它们分别克隆至 pPIC9K,转化 *E.coli* DH5 α 。经上海 Sangon 公司测序,测序结果都包含 1 638 bp 的目的基因和 pPIC9K 质粒上醇氧化酶基因 AOX1 约 500 bp 的序列,表明 2 种重组表达质粒 pPIC9K-*Auman5A*-*cbm27* 和 pPIC9K-*cbm27*-*Auman5A* 构建成功。

2.2 重组 β -甘露聚糖酶的表达和纯化

挑选在 YPD-G418 (4.0 mg/mL) 平板上长势良好,分别整合有 *Auman5A*、*Auman5A*-*cbm27* 和 *cbm27*-*Auman5A* 的毕赤酵母单菌落转化子,按 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册进行常

规诱导表达,分别筛选得到 3 个产酶活性最高的重组子 GS115/*Auman5A*、GS115/*Auman5A*-*cbm27* 和 GS115/*cbm27*-*Auman5A* (图 2 泳道 1~3),按 1.2.4 方法测定粗酶液的酶活性分别为 338、432、217 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。

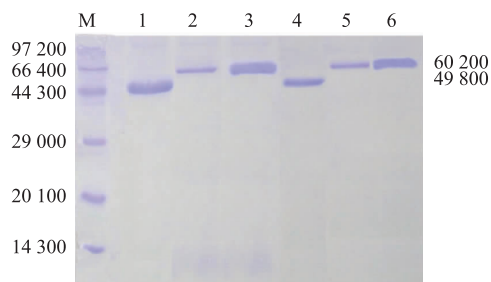


M: DNA 标准; 1: A1; 2: C1; 3: *Auman5A*-*cbm27*; 4: C2; 5: A2; 6: *cbm27*-*Auman5A*

图 1 融合酶基因 *Auman5A*-*cbm27* 和 *cbm27*-*Auman5A* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of two fusion mannanase gene, *Auman5A*-*cbm27* and *cbm27*-*Auman5A*

分别通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、阴离子交换层析、超滤及凝胶过滤层析将筛选得到的 3 个菌株诱导得到的培养上清液进行纯化,并对纯化后的样品进行 SDS-PAGE 分析。纯化后的 reAuMan5A、reAuMan5A-CBM27 和 CBM27-reAuMan5A 分别在约 49.8×10^3 、 60.2×10^3 、 60.2×10^3 (表观分子量) 显示出单一条带 (图 2 泳道 4~6)。按 1.2.3 方法测得纯化后的 3 个酶的比酶活分别为 230.6、280.3、281.1 U/mg。



M: 标准; 1~3: 表达上清液; 4~6: 纯化甘露聚糖酶

图 2 表达上清液和纯化酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE Analysis of the expressed supernatants and purified mannanases

2.3 重组 β -甘露聚糖酶酶学性质分析与讨论

2.3.1 温度对甘露聚糖酶活性的影响 按 1.2.5 方法分别测定了温度对 AuMan5A、AuMan5A-CBM27、CBM27-AuMan5A 活性的影响(图 3)。由图3(a)可见, AuMan5A、AuMan5A-CBM27 的 T_{opt} 均为 70℃, 而 CBM27-AuMan5A 的 T_{opt} 较 AuMan5A 降低了约 10℃。由图 3 (b) 可见, AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 分别在 68℃和 58℃及以下保持稳定, 较 AuMan5A 分别提高了 8℃和降低了 2℃。结果表明: 当 CBM27 融合在 AuMan5A 的 C 末端时才对酶的催化中心发挥出热保护作用。然而, XU 等^[11]

将来自 *Thermotoga marimita* GH10 家族耐热的木聚糖酶 C 端的 CBM2 融合至来自 *Aspergillus niger* GH11 家族木聚糖酶的 N 端时发现, 融合酶的 T_{opt} 提高了 2℃, 催化效率提高了 4.5 倍。因此, 有研究者认为 CBM 及其融合位置对于酶稳定性的影响还存在争议, 酶的热稳定性除了与 CBM 有关外, 还与其本身的氨基酸序列有关, 当 CBM 位于酶特定的位置时, 会与其本身的氨基酸形成氢键等相互关系, 从而使酶的稳定性提高。因此, CBM 对酶分子稳定性提高的机制还有待于进一步研究。

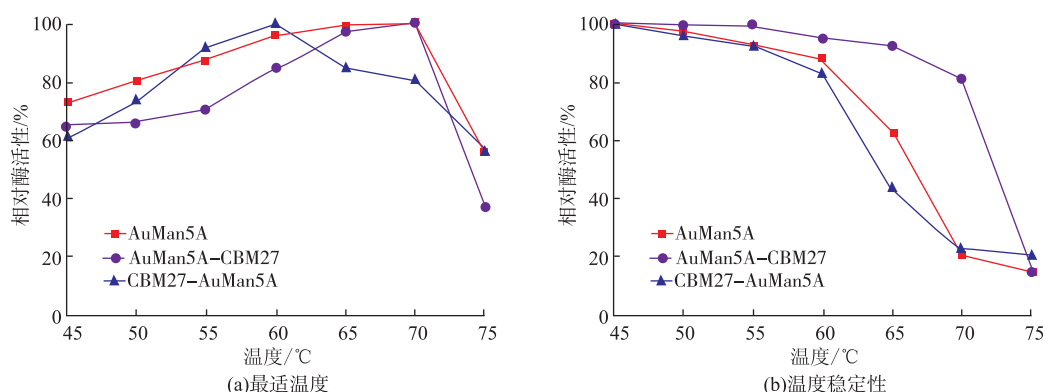


图 3 温度对 3 种重组 β -甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the activities of three recombinant β -mannanases

溶解温度 T_m 表示在温度上升过程中蛋白质三维结构发生解折叠到一半时对应的温度, T_m 值越高, 蛋白质热稳定性越高, 因此 T_m 值是评价蛋白质耐热性的重要参数^[12]。由图 4 可知, AuMan5A、AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的 T_m 值分别为 66.5、74.2、61.3℃, 与酶的热稳定性数据基本保持一致。

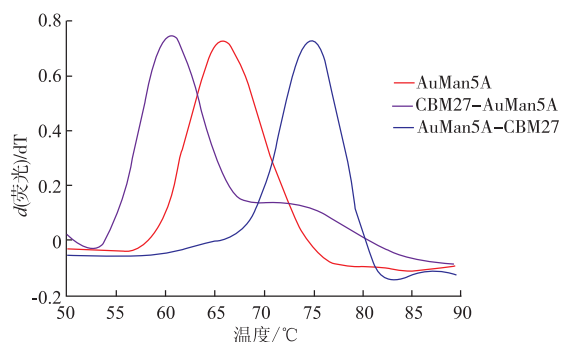
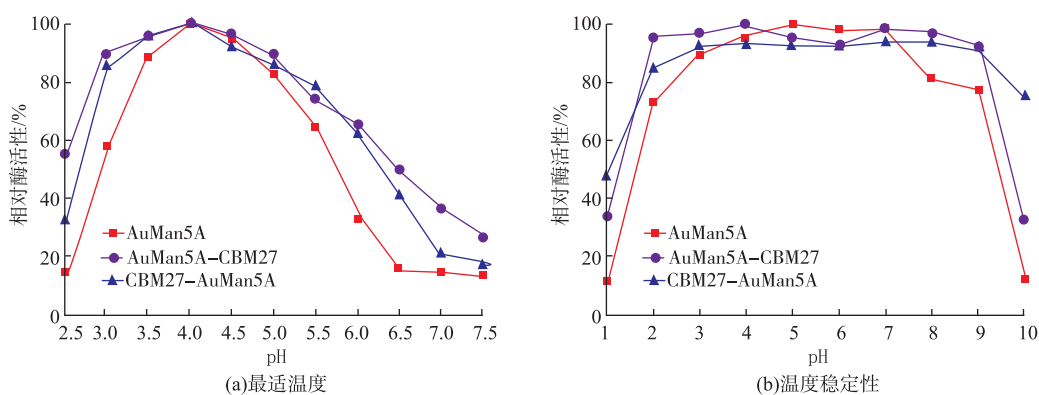


图 4 AuMan5A、AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的热变性曲线

Fig. 4 Thermal denaturation curves of AuMan5A, AuMan5A-CBM27 and CBM27-AuMan5A

2.3.2 pH 对甘露聚糖酶活性的影响 按 1.2.5 方法分别测定了 pH 对 AuMan5A、AuMan5A-CBM27、CBM27-AuMan5A 活性的影响(图 5)。由图5(a)可见, 野生型酶和融合酶的最适 pH 均为 4.0, AuMan5A 在 pH 值 2.5~7.5 范围内保持稳定(图 5 (b))。而 AuMan5A-CBM27、CBM27-AuMan5A 均在 pH 2.0~9.0 范围内具有较好的稳定性。由此可见, 将 CBM27 融合至 C 或 N 末端均拓宽了 AuMan5A 的反应 pH 值范围。

2.3.3 酶动力学常数分析 按 1.2.5 方法测定了 3 种 β -甘露聚糖酶水解角豆胶的动力学常数 K_m 和 k_{cat} (表 2)。分析结果表明 AuMan5A-CBM27 和 CBM27-AuMan5A 的催化效率(k_{cat}/K_m)较 AuMan5A 均有不同程度的提高, 但 AuMan5A-CBM27 的催化效率最高。因此, 不论 CBM27 融合至 AuMan5A 的 C 末端或 N 末端都可以提高 β -甘露聚糖酶的催化效率, 当位于 C 末端时催化效率的提高幅度更大。研究证明, CBM27 可以特异性地结合甘露聚糖, 并对酶的催化结构域起热保护作用, 且大部分 CBM 都

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

具有结合纤维晶体的表面,并通过与带电氨基酸间形成的氢键网络,以及催化结构域堆积作用与不溶性底物结合,从而增强底物亲和力和催化效率^[6]。

表 2 3 种 β -甘露聚糖对底物的动力学参数Table 2 Kinetic parameters of three β -mannanases

β -甘露聚糖	$K_m/(mg/mL)$	k_{cat}/s^{-1}	$k_{cat}/K_m/(mL \cdot mg^{-1} \cdot s^{-1})$
AuMan5A	1.71	372.10	217.60
AuMan5A-CBM27	0.94	243.04	258.55
CBM27-AuMan5A	1.26	294.41	233.66

3 结 语

基于融合蛋白设计的融合酶技术是分子酶工

程的一个研究热点,已逐渐应用于多功能酶的构建与应用^[13],并显示出重要的理论和应用研究价值。本实验成功构建了融合 β -甘露聚糖酶基因 *Auman5A-cbm27* 和 *cbm27-Auman5A*,并在毕赤酵母 GS115 中实现表达。通过研究发现融合酶与亲本酶在酶学性质和动力学常数等方面的差别表明,CBM27 融合位置的变化,对融合酶的酶学性质有显著的影响。实验结果证明,重组融合酶 reAuMan5A-CBM27 具有热稳定性高、pH 稳定范围广、底物亲和力和催化效率高等优点,在工业化生产中有着巨大的应用潜力。本实验对 CBM 融合位置对酶功能的影响的研究为其他融合酶基因的开发和应用提供了新的思路和策略。

参考文献:

- [1] GUILLEN D, SANCHEZ S, RODRIGUEZ-SANOJA R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(5): 1241-1249.
- [2] YAN Kaizhou, LU Bin, LIANG Yuting, et al. The application of fusion enzyme an chrater modification and the constructing of multiple functional enzyme[J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(7): 69-75. (in Chinese)
- [3] ZHAO G, ALI E, ARAKI R, et al. Function of the family-9 and family-22 carbohydrate-binding modules in a modular beta-1, 3-1,4-glucanase/xylanase derived from *Clostridium stercoarum* Xyn10B[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(8): 1562-1567.
- [4] JIN M A, YOUNG K K, WOO J L, et al. Evaluation of a novel bifunctional xylanase-cellulase constructed by gene fusion[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(7): 989-995.
- [5] PHAM T A, BERRIN J G, RECORD E, et al. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus mannanase*: Role of a carbohydrate-binding module[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 148(4): 163-170.
- [6] TANG C D, GUO J, WU M C, et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel acidophilic beta-mannanase gene, *Auman5A*, from *Aspergillus usami* YL-01-78[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27(12): 2921-2929.
- [7] BORASTON A B, REVETT T J, BORASTON C M, et al. Structural and thermodynamic dissection of specific mannan recognition by a carbohydrate binding module, TmCBM27[J]. *Structure*, 2003, 11(6): 665-675.

- [8] LI J F,ZHAO S G,TANG C D,et al. Cloning and functional expression of an acidophilic β -mannanase gene (*Anmat5A*) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*[J]. **J Agric Food Chem**,2012,60(3):765-773.
- [9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Anal Biochem**,1976,72:248-254.
- [10] ZHANG H M,LI J F,WANG J Q,et al. Determinants for the improved thermostability of a mesophilic family 11 xylanase predicted by computational methods[J]. **Biotechnol Biofuels**,2014,7:3.
- [11] XU W,LIU Y,YE Y,et al. C-Terminal carbohydrate-binding module 9_2 fused to the N-terminus of GH11 xylanase from *Aspergillus niger*[J]. **Biotechnology Letters**,2016,38(10):1739-1745.
- [12] JANG M K,LEE S W,LEE D G,et al. Enhancement of the thermostability of a recombinant β -agarase, AgaB, from *Zobellia galactanivorans* by random mutagenesis[J]. **Biotechnology Letters**,2010,32(7):943-949.
- [13] GUO N,ZHENG J,WU L S,et al. Engineered bifunctional enzymes of endo-1,4-beta-xylanase/endo-1,4-beta-mannanase were constructed for synergistically hydrolyzing hemicellulose[J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**,2013,97:311-318.

会 议 消 息

会议名称:第 16 届全国均相催化会议

会议时间:2019.9.26-30

会议地点:武汉

主 办 方:中国化学会

承 办 方:1:中国化学会催化专业委员会 2:武汉大学

会议主题:高效、绿色、可持续的新催化理念与应用

大会主席:雷爱文

预计规模:500

联 系 人:阴国印

电子邮箱:yinguoyin@whu.edu.cn

电 话:18086049409

地 址:湖北省武汉市武昌区八一路 299 号 430072

会议内容:(1)均相催化剂的设计、合成及其催化反应应用;(2)生物催化与仿生催化;(3)均相催化在材料化学中的应用;(4)均相催化与多相催化的交叉与融合;(5)均相催化的工业应用;(6)均相催化反应机理研究,理论计算化学的应用;(7)均相催化与纳米催化及光、电催化反应等领域的交叉与融合;(8)均相催化相关的科普和教改等成果。