



研究报告

链霉菌来源 D-甘露糖异构酶的性质及其在制备 D-甘露糖中的应用

华晓晗¹ 李延啸² 马俊文² 刘海杰¹ 闫巧娟² 江正强^{*1}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院 中国轻工业食品生物工程重点实验室 北京 100083

2 中国农业大学工学院 北京 100083

摘要:【背景】D-甘露糖具有多种功能活性,在食品、医药、饲料等行业应用广泛。D-甘露糖异构酶可以催化 D-果糖与 D-甘露糖之间的相互转化,在 D-甘露糖的酶法制备中具有应用潜力。【目的】克隆一个链霉菌(*Streptomyces* sp.)来源的 D-甘露糖异构酶基因(*ssMIaseA*)并在大肠杆菌中表达,研究其酶学性质,并用于制备 D-甘露糖。【方法】从链霉菌(*Streptomyces* sp.)中发掘一个 D-甘露糖异构酶基因(*ssMIaseA*),构建重组表达质粒 pET-28a-*ssMIaseA* 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,经 Ni-NTA 亲和层析纯化后测定酶学性质,利用高效液相色谱对 SsMIaseA 制备 D-甘露糖进行研究。【结果】SsMIaseA 与嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)来源的 D-甘露糖异构酶 ManI 相似性最高,为 60.2%。该酶比酶活为 525 U/mg,分子量约为 45 kD,最适 pH 和温度分别为 7.5 和 45 °C,在 pH 6.5–10.0 范围内和 45 °C 以下保持稳定。该酶对甘露糖具有最高催化活性,其次是果糖、塔罗糖和塔格糖。利用 SsMIaseA 转化 600 g/L D-果糖,反应 8 h 达到平衡,生成 185 g/L D-甘露糖,转化率为 31%。【结论】SsMIaseA 作为新型 D-甘露糖异构酶为 D-甘露糖的酶法制备奠定了基础。

关键词:链霉菌, D-甘露糖, D-甘露糖异构酶, 酶学性质

Characterization of a D-mannose isomerase from *Streptomyces* sp. and its application in the preparation of D-mannoseHUA Xiaohan¹ LI Yanxiao² MA Junwen² LIU Haijie¹ YAN Qiaojuan²
JIANG Zhengqiang^{*1}

1 Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] D-mannose with many functional activities has been widely used in food, medicine, feed, etc. D-mannose isomerase can catalyze the reversible reaction between D-fructose and D-mannose, and has application potential in the enzymatic preparation of D-mannose. [Objective] The D-mannose isomerase gene (*ssMIaseA*) from *Streptomyces* sp. was cloned and expressed in *Escherichia*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31901627)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62737689; E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 17-09-2020; Accepted: 05-11-2020; Published online: 22-01-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31901627)

*通信作者: Tel: 010-62737689; E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-09-17; 接受日期: 2020-11-05; 网络首发日期: 2021-01-22

coli, and its enzymatic properties were studied and used to prepare D-mannose. **[Methods]** The D-mannose isomerase gene (*ssMIaseA*) from *Streptomyces* sp. was cloned and the recombinant expression plasmid pET-28a-*ssMIaseA* was constructed and expressed into *E. coli* BL21(DE3). After purification by Ni-NTA affinity chromatography, the enzyme properties were determined, and the preparation of D-mannose from SsMIaseA was analyzed by high performance liquid chromatography. **[Results]** SsMIaseA shared the highest homology of 60.2% with ManI from *Thermobifida fusca*. The specific activity of the enzyme was 525 U/mg, and the molecular weight was about 45 kD. Its optimal pH and temperature were 7.5 and 45 °C, respectively. It was stable in the range of pH 6.5–10.0 and below 45 °C. It had the highest catalytic activity for mannose, followed by D-fructose, D-talose and D-tagatose. SsMIaseA was used to convert 600 g/L D-fructose and the reaction reached equilibrium at 8 h, producing 185 g/L D-mannose with a conversion rate of 31%. **[Conclusion]** SsMIaseA as a new D-mannose isomerase has potential in the enzymatic preparation of D-mannose.

Keywords: *Streptomyces* sp., D-mannose, D-mannose isomerase, enzymatic characterization

肥胖和糖尿病等慢性疾病往往是由于不合理的饮食习惯引起的, 如高糖或高脂食品的过量摄入^[1]。为了减少食品中糖的含量, 一些低热量且具有功能的单糖常用作糖替代品应用于食品工业中^[2]。D-甘露糖是一种低热量的单糖, 热量仅为 3.75 kcal/g, 甜度分别是蔗糖和葡萄糖的 60%和 86%, 在自然界中多以甘露聚糖和糖蛋白的组成单体形式存在^[3]。许多研究表明, 甘露糖具有抑制肿瘤细胞生长^[4]、预防尿路感染^[5]、抑制 I 型糖尿病^[6]、预防饮食引起的肥胖^[7]等多种功能活性。同时, 甘露糖还可用作抗肿瘤药^[8]、甘露糖醇^[9]、维生素^[10]的合成前体。

甘露糖可以通过植物降解提取^[11]和葡萄糖化学转化^[12]的方法生产, 但由于能耗高、反应条件苛刻、易形成副产物、下游纯化困难等问题, 上述 2 种方法的应用均具有局限性^[3]。因此, 利用酶法转化甘露糖逐渐受到广泛关注。目前, 能够制备甘露糖的酶有 4 种^[13], 分别是 D-来苏糖异构酶(EC 5.3.1.15)、D-甘露糖异构酶(EC 5.3.1.7)、纤维二糖 2-差向异构酶(EC 5.1.3.11)和 D-甘露糖 2-差向异构酶(EC 5.1.3.-), 它们均属于 N-乙酰-D-葡糖胺-2-差向异构酶(N-Acetyl-D-Glucosamine-2-Epimerase, AGE 超家族异构酶)。其中, D-来苏糖异构酶可以转化果糖为甘露糖, 但催化过程需要 Mn^{2+} 或 Co^{2+} 参与^[14-15]; 纤维二糖 2-差向异构酶^[16]和甘露糖 2-差向异构酶^[17]能够催化葡萄糖 C-2 位的差向异构化

生成甘露糖, 但甘露糖的转化率不高, 并且纤维二糖 2-差向异构酶的催化产物中有果糖产生。与其他 3 种酶相比, 甘露糖异构酶催化果糖生成甘露糖时不需要金属离子的参与, 甘露糖转化率一般在 25%–35%, 被认为是甘露糖生产中最有潜力的异构酶^[3]。

D-甘露糖异构酶是一种醛酮异构酶, 能够可逆地催化甘露糖和果糖之间的相互转化。目前已报道的甘露糖异构酶主要来源于细菌, 如嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophila*)^[18]、水田芹黄单胞菌(*Xanthomonas rubrilineans*)^[19]、嗜色链霉菌(*Streptomyces aerocolorigenes*)^[20]、放射土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)^[21]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[22]、洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)^[23]等。除洋葱假单胞菌(*P. cepacia*) D-甘露糖异构酶的最适 pH 表现为弱酸性外^[23], 大多数 D-甘露糖异构酶在 pH 7.0–8.0 范围内有最高酶活力^[18-19]。已报道的 D-甘露糖异构酶通常能在 pH 6.0–7.5 保持稳定。放射土壤杆菌(*A. radiobacter*) D-甘露糖异构酶在 pH 5.8–10.5 下处理 3 h 后残余酶活力仍保持在 80%以上^[21]。D-甘露糖异构酶的最适温度较低(30–60 °C), 一般在 50 °C 以下比较稳定^[21-22,24]。

为了发掘新的 D-甘露糖异构酶, 许多 D-甘露糖异构酶基因克隆并表达在异源宿主中。大肠杆菌是 D-甘露糖异构酶异源表达最常用的宿主, 肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)^[24]、嗜热裂孢菌

(*Thermobifida fusca*)^[25]、地中海海单胞菌(*Marinomonas mediterranea*)^[26]、大肠杆菌(*E. coli* BL21)^[27]来源的 D-甘露糖异构酶已经在大肠杆菌中成功表达。

链霉菌(*Streptomyces* sp.)是一类革兰氏阳性的丝状土壤放线菌,能产多种抗生素和酶^[28]。本文从链霉菌基因组中发掘出一个功能未知的蛋白序列(GenBank 登录号为 WP_123499006.1),预测为 AGE 超家族异构酶;将该蛋白编码基因在大肠杆菌中表达,研究其酶学性质,并利用重组酶转化果糖制备甘露糖,以期为甘露糖的酶法生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3),博迈德生物技术公司;表达载体 pET-28a(+),Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

引物 *Eco*R I 和 *Not* I, 生工生物工程(上海)股份有限公司;Fast *Pfu* DNA 聚合酶,北京全式金生物技术公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶,NEB 公司;亲和层析柱料(Ni-NTA),GE Healthcare 公司;甘露糖、果糖,北京拜尔迪生物技术公司;果糖测试盒,南京建成生物研究所;其他试剂均为分析纯。

MyCycler PCR 自动扩增仪、Power Pac BasicTM 型电泳仪、Aminex HPX-87C 色谱柱,Bio-Rad 公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器设备有限公司;ÄKTA 蛋白纯化系统,GE Healthcare 公司;高效液相色谱(High-Performance Liquid Chromatography)、Agilent G7162A 型示差检测器,Agilent Technologies 公司。

1.3 方法

1.3.1 D-甘露糖异构酶基因的克隆和表达

根据 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中链霉菌(*Streptomyces* sp.)基因组信息,检索到一段预测为 AGE 超家族异构酶的基因(*ssMIaseA*)

(GenBank 登录号为 WP_123499006.1),将该基因交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。根据基因序列信息,设计上游引物 *ssMIaseAF* (5'-GATCCTCCGGAATTCATGTCAGCTGAATTTAGTACTGAAAGGG-3')和下游引物 *ssMIaseAR* (5'-GGATACAAGCGGCCGCTTAGCTCAGACGTGACGCAGC-3'),以合成的 *ssMIaseA* 基因为模板进行 PCR 扩增,以便于在引物的 5'和 3'末端分别插入 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点(下划线表示)。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times TransStart Fast *Pfu* Buffer 10 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, Fast *Pfu* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂凝胶回收试剂盒回收纯化后,与表达载体 pET-28a(+)用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切,构建重组质粒并转入大肠杆菌 DH5 α 中,筛选阳性转化子并提取质粒。

将重组质粒 pET-28a-*ssMIaseA* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取单菌落接种于 20 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h 作为种子液。将 1% 种子液接种于 300 mL 上述培养基中至菌体密度 OD_{600} 处于 0.6–0.8 之间,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,在 20 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下诱导过夜。

1.3.2 重组 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 的纯化

诱导结束后的培养基于 10 000 \times g 条件下离心 5 min,收集菌体重悬于缓冲液 A (20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑),超声破壁(功率 270 W, 工作时间 15 min, 工作 3 s, 停 4 s)后 10 000 \times g 离心 10 min,上清液即为粗酶液。将粗酶液上样于由缓冲液 A 平衡好的 Ni-NTA 亲和柱,流速 0.5 mL/min。利用 ÄKTA 蛋白纯化系统纯化蛋白,流速为 1 mL/min。分别利用缓冲液 A 和缓冲液 B (20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑)洗脱未结合蛋白和弱结合蛋白,再用 5 个柱体积的缓冲

液 C (20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白, 收集 D-甘露糖异构酶活力高的组分。在磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.5) 中透析过夜, 采用 SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

1.3.3 SsMIaseA 酶活力和蛋白含量的测定

D-甘露糖酶活力的测定: 利用磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 配制浓度为 1% (质量体积分数) 的甘露糖底物, 将 900 μ L 甘露糖底物与 100 μ L 0.008 mg/mL 酶液于 1.5 mL 离心管中均匀混合, 在 45 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 10 min, 反应结束后立即沸水浴 5 min 灭活。按照果糖测试盒的使用说明, 将 50 μ L 灭活后的溶液于 5 mL 显色剂混合均匀, 沸水浴 8 min, 冷却至室温, 于 285 nm 的波长下测定吸光值, 以 1 mg/mL 果糖溶液为标准品。D-甘露糖异构酶酶活力单位(U)定义为在上述条件下每分钟产生 1 μ mol 果糖所需要的酶量。

蛋白含量的测定: 参照 Lowry 等^[29]的方法, 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。

1.3.4 SsMIaseA 分子量的测定

采用 SDS-PAGE 法和 Sephacryl S-100 HR 凝胶过滤法分别测定 SsMIaseA 的分子量。SDS-PAGE 分析参照 Laemmli^[30]的方法, 浓缩胶和分离胶浓度分别为 4.5% 和 12.5%, 利用考马斯亮蓝 R-250 染色。通过凝胶过滤层析测定活性蛋白的分子量。标准蛋白及目的蛋白上样于凝胶柱 (1.0 cm \times 100 cm), 用 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (含有 150 mmol/L NaCl) 以 0.5 mL/min 的流速洗脱, 收集洗脱液于 280 nm 下测定吸光值。所用标准蛋白分别为: 溶菌酶 (Lysozyme, 14.4 kD), α -胰凝乳蛋白酶原 A (α -Chymotrypsinogen A, 25.6 kD), 胎球蛋白 (Fetuin from Fetal, 48.9 kD), 牛血清白蛋白 (Albumin Bovine Serum, 66.2 kD), 磷酸化酶 B (Phosphorylase B, 97.2 kD)。

1.3.5 SsMIaseA 酶学性质的测定

最适 pH 及 pH 稳定性的测定: 利用不同 pH 的 6 种缓冲液 (50 mmol/L) 配制 1% (质量体积分数,

下同)果糖, 在 45 $^{\circ}$ C 下反应 10 min, 沸水浴灭活 5 min 后测定残余酶活力。以测定的所有缓冲液不同 pH 下的最高酶活力值为 100%, 分别计算各 pH 下的相对值。所用的缓冲体系及 pH 范围如下: 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0–6.0), 醋酸缓冲液 (pH 4.0–6.0), 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0–8.0), Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0–9.0), CHES 缓冲液 (pH 8.0–10.0), CAPS 缓冲液 (pH 10.0–11.0)。pH 稳定性的测定是利用上述不同 pH 的缓冲液体系 (50 mmol/L) 将酶液稀释适当倍数 (稀释后酶液的蛋白浓度在 1 mg/mL 以上), 35 $^{\circ}$ C 下保温 30 min, 立即冰水浴冷却 30 min, 在最适条件 (45 $^{\circ}$ C, pH 7.5) 下测定残余酶活力。以未保温条件下测定的酶液酶活力为 100%, 分别计算各 pH 下的相对酶活力。

最适温度及温度稳定性的测定: 最适 pH 缓冲液配制 1% 果糖, 在不同温度 (30–70 $^{\circ}$ C) 下反应 10 min, 沸水浴灭活。以最高酶活力为 100%, 分别计算各温度下的相对酶活力。温度稳定性的测定是将酶液用 50 mmol/L 缓冲液稀释后, 于不同温度 (30–70 $^{\circ}$ C) 下保温 30 min, 立即冰水浴冷却 30 min, 在最适条件下测定残余酶活力, 以未经处理酶液的酶活力为对照, 分别计算各温度的残余酶活力占对照组酶活力的百分比。

1.3.6 金属离子及化合物对 SsMIaseA 酶活力的影响

将纯酶液用磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 适当稀释 (稀释后酶液的蛋白浓度在 1 mg/mL 以上), 与不同金属离子和化合物 (终浓度 1 mmol/L) 混匀, 在 35 $^{\circ}$ C 下保温 30 min, 立即冰水浴处理 30 min, 以相同条件下未加入金属离子和化合物的酶液为对照, 在最适条件下测定残余酶活力。以对照酶活力为 100%, 计算不同金属离子和化合物处理下的相对酶活力和比酶活力。金属离子及化合物包括 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 、 Ba^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、EDTA、SDS、 β -巯基乙醇和 CTAB。

1.3.7 SsMIaseA 底物特异性和动力学常数的测定

分别以不同单糖(D-甘露糖、D-果糖、D-阿卓糖、D-阿洛糖、D-鼠李糖、D-塔罗糖、D-塔格糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-来苏糖和 D-木酮糖)和二糖(乳果糖、依匹乳糖、甘露二糖和蔗糖)为底物,测定 SsMIaseA 的底物特异性。利用 50 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制 1% (质量体积分数)的不同底物,在 45 °C 下反应 10 min,反应结束后沸水浴 5 min,通过高效液相色谱(HPLC)分析测定产物的浓度,以上述各单糖和二糖为标准品。SsMIaseA 对各底物酶活力的定义为每分钟转化底物产生 1 μmol 相应产物所需要的酶量。

动力学常数的测定:利用 50 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制不同浓度的甘露糖(40–120 mmol/L)和果糖(80–280 mmol/L),于 45 °C 水浴锅中反应 5 min,结束后沸水浴灭酶 5 min。利用高效液相色谱测定各底物浓度下的酶活力。通过 GraFit 软件计算 K_m 和 V_{\max} 。

1.3.8 SsMIaseA 转化甘露糖条件的优化

以果糖为底物,考察加酶量、底物浓度和转化时间 3 个因素对 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 转化果糖能力的影响。选择不同加酶量(5–70 U/mL)转化 500 mg/mL 的果糖,反应体系 10 mL,在 35 °C 下过夜,结束后沸水浴灭酶 5 min,利用 HPLC 分析混合溶液中甘露糖的含量,确定最佳加酶量。其他条件不变,以不同浓度的果糖(200–800 g/L)为底物,考察 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 能转化甘露糖的最大底物浓度。最终在所确定的最佳加酶量和底物浓度下,分别在不同时间(0.25–12 h)定点取样,确定 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 转化果糖为甘露糖所需要的时间。

1.3.9 高效液相色谱(HPLC)分析

将待测样品过 0.22 μm 滤膜后上样,利用 HPLC-RID (Agilent 1260 Infinity II)检测转化产物的含量。色谱柱为 Aminex HPX-87C (7.8 mm \times 300 mm),以超纯水为流动相,柱温为 85 °C,流速 0.6 mL/min。标准品为 D-甘露糖和 D-果糖。

1.3.10 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 5 和 Origin 8.5 进行数据整理并作图,每组数据均有 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 D-甘露糖异构酶基因(ssMIaseA)的克隆与序列分析

在 NCBI 数据库中发掘到了一段 AGE 超家族异构酶基因,预测为 D-甘露糖异构酶。合成并利用 PCR 技术扩增出一条长度为 1 302 bp 的基因片段(ssMIaseA),该基因片段共编码 433 个氨基酸,成熟蛋白预测分子量和等电点 pI 分别为 47.6 kD 和 5.58。利用 BLAST 中的蛋白数据库进行序列比对发现(图 1),该基因编码的蛋白与嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)来源的 D-甘露糖异构酶 ManI (GenBank 登录号为 WP_061783687.1)^[25]相似性最高,为 60.2%;其次,与耐盐嗜热裂孢菌(*Thermobifida halotolerans*, WP_068690975.1)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*, WP_007249212.1)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, AJH12524.1)^[27]和地中海海单胞菌(*Marinomonas mediterranea*, WP_013661626.1)^[26]来源的 D-甘露糖异构酶的相似性分别为 58.6%、50.1%、45.7% 和 30.8%,表明该酶可能是一个新型 D-甘露糖异构酶。将 SsMIaseA 的氨基酸序列与已有结构报道的 D-甘露糖异构酶 SeYihS^[24]和 Marme_2490^[26]进行比对,His278 (对应 SeYihS 的 His248 和 Marme_2490 的 His251)作为广义碱,在异构化步骤中将质子从 C1 转移到 C2 位置,并且 Arg83、His205、Glu281、Trp341 和 His408 被证实与底物结合有关。

2.2 重组 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 的表达及纯化

链霉菌 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 成功在大肠杆菌中可溶表达。粗酶液用 ÄKTA 蛋白纯化系统洗脱后得到电泳级纯酶,纯化结果见表 1。纯化后,酶活力回收率为 75.3%,酶液比酶活由

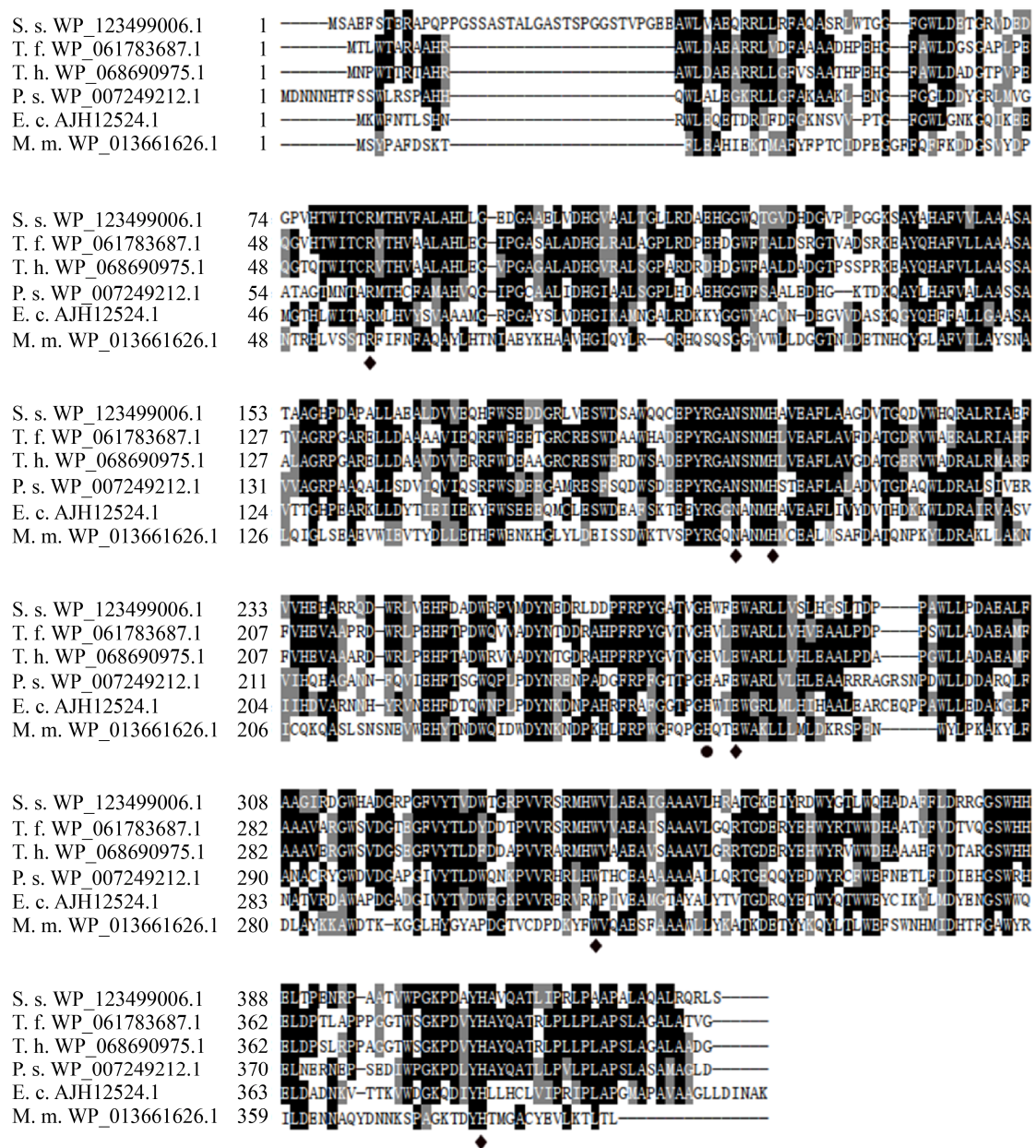


图 1 链霉菌 D-甘露糖异构酶 SsMlaseA 与其他 D-甘露糖异构酶的多重序列比对

Figure 1 Multiple alignment of amino acid sequences of SsMlaseA and other D-mannose isomerases

注: 黑色阴影表示相同残基, 灰色阴影表示保守残基。多重序列比对中的所用序列分别为: 嗜热裂孢菌 D-甘露糖异构酶(T. f. WP_061783687.1)、耐盐嗜热裂孢菌 D-甘露糖异构酶(T. h. WP_068690975.1)、丁香假单胞菌 D-甘露糖异构酶(P. s. WP_007249212.1)、大肠杆菌 D-甘露糖异构酶(E. c. AJH12524.1)和地中海单胞菌 D-甘露糖异构酶(M. m. WP_013661626.1)。催化残基(His255)用圆表示, 与底物结合相关的残基用菱形表示

Note: Black shading represents identical residues, while gray shading shows similar residues. The sequences used were: D-mannose isomerase from *Thermobifida fusca* (T. f. WP_061783687.1), D-mannose isomerase from *Thermobifida halotolerans* (T. h. WP_068690975.1), D-mannose isomerase from *Pseudomonas syringae* (P. s. WP_007249212.1), D-mannose isomerase from *Escherichia coli* (E. c. AJH12524.1), and D-mannose isomerase from *Marinomonas mediterranea* (M. m. WP_013661626.1). Catalytic residues (His255) is represented by circles, and residues related to substrate binding are noted by diamonds

表 1 重组 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 纯化表

Table 1 Purification summary of recombinant D-mannose isomerase SsMIaseA

纯化步骤 Step	总酶活 Total activity (U) ^a	总蛋白 Total protein (mg) ^b	比酶活 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery yield (%)
粗酶液 Crude enzyme	44 032.2	98.7	445.9	1.0	100.0
Ni-NTA	33 156.2	63.2	525.0	1.2	75.3

注:^a:酶活力的测定是在 50 mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液体系下,以 1% (质量体积分数)甘露糖底物于 45 °C 条件下反应 10 min;

^b: 蛋白含量的测定参照 Lowry^[30]法,以 BSA 为标准蛋白

Note: ^a: The enzyme activity was measured in 50 mmol/L pH 7.5 phosphate buffer with 1% (W/V) mannose as substrate at 45 °C for 10 min; ^b: The determination of protein concentration refers to Lowry^[30] method with BSA as the standard

445.9 U/mg 上升至 525.0 U/mg, 纯化倍数为 1.2。SDS-PAGE 结果表明在 45 kD 附近显示单一条带(图 2), S-100 凝胶过滤层析法测得该酶在天然状态下的分子量为 45.6 kD, 表明 SsMIaseA 为单亚基蛋白。

2.3 SsMIaseA 的酶学性质

SsMIaseA 基本酶学性质结果见图 3。SsMIaseA 的最适 pH 为 7.5, 在 pH 7.0–8.0 之间有 90%以上相对酶活力, 在 pH 6.5–10.0 处理 30 min 仍有 80%以上酶活力;该酶在 45 °C 时酶活力最高, 45 °C 以下仍能够保持稳定, 并且在 40 °C 以下仍有 90%以上的酶活力, 温度升高至 50 °C 时 SsMIaseA 相对酶活力仅剩 30%。

不同金属离子及化合物对 SsMIaseA 酶活力的影响如表 2 所示。在 Na⁺、K⁺和 β-巯基乙醇存在下,

SsMIaseA 酶活力分别增加了 11.1%、12.6%和 16.0%; 但 Zn²⁺、Co²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、SDS 和 CTAB 不同程度地抑制该酶活性, Ag⁺对 SsMIaseA 有较强的抑制作用, 酶活力降低了 46.7%。其他金属离子及化合物对 SsMIaseA 酶活力的影响不明显。

SsMIaseA 对几种单糖和二糖的底物特异性见表 3。结果表明, SsMIaseA 对甘露糖的催化活性最高(100.0%), 其次为果糖, 比酶活为 188.8 U/mg, 该酶对塔罗糖的相对酶活力为 21.3%, 而对塔格糖的相对酶活力仅为 5.9%。该酶对其他单糖和二糖没有催化活性。

由动力学常数(表 4)可知 SsMIaseA 对甘露糖和果糖的 K_m 分别为 53.9 和 132.0 mmol/L, 表明 SsMIaseA 对甘露糖的亲合力高于果糖。当以甘露糖为底物时, k_{cat}/K_m 值为 0.008, 是果糖的 2.7 倍, 说明 SsMIaseA 对甘露糖底物的催化效率更高。

2.4 SsMIaseA 转化甘露糖条件的优化

加酶量、D-果糖浓度和转化时间对 SsMIaseA 转化果糖为甘露糖的影响如图 4 所示。甘露糖的产量随加酶量的增加而增加, 当加酶量为 40 U/mL 时, 甘露糖产量达到 150 g/L, 再增加酶量对甘露糖的产量无明显影响(图 4A)。利用 40 U/mL 的 SsMIaseA 转化 200–800 g/L 的果糖, 当果糖浓度高于 600 g/L 时, 转化率出现明显下降, 从 30%降低至 26.4%, 而此时甘露糖的产量仅有少量增加; 果糖浓度在 200–600 g/L 时, 转化率一直保持在

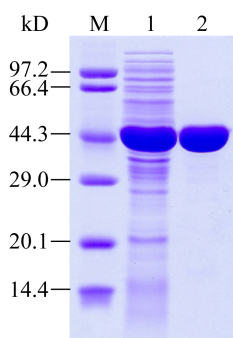


图 2 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 的纯化图

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purified SsMIaseA

注: M: 低分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: 纯酶液

Note: M: Low molecular weight standard protein; 1: Crude enzyme; 2: Purified SsMIaseA

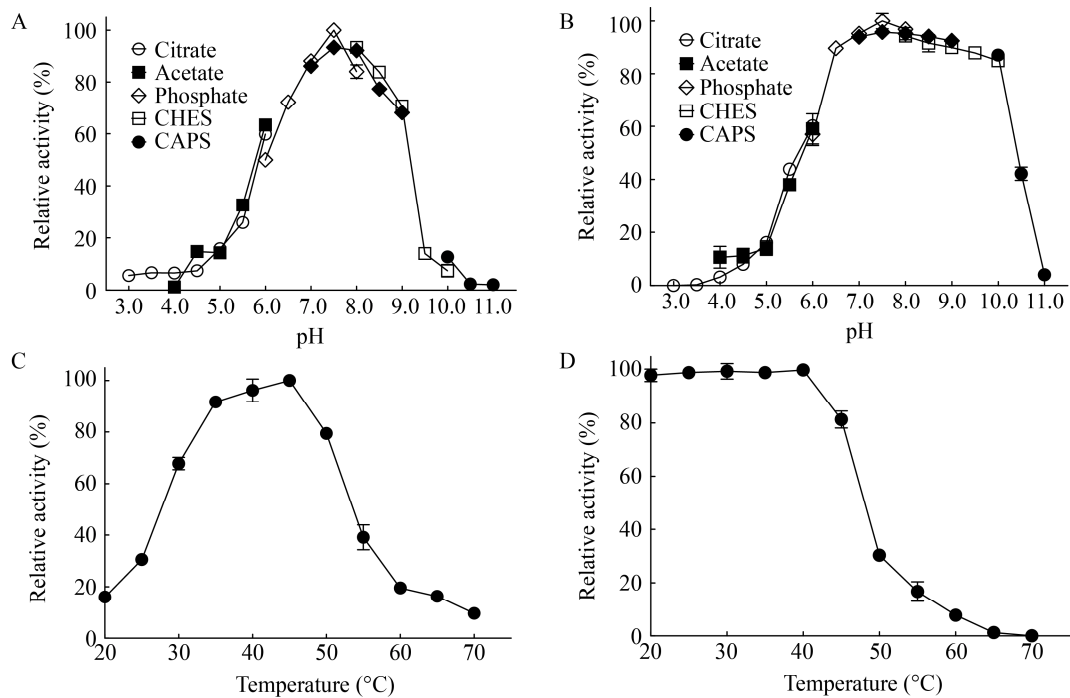


图 3 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)
Figure 3 Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C), and thermostability (D) of SsMIaseA

表 2 不同金属离子及化合物对 SsMIaseA 酶活力的影响
Table 2 Effect of different metal ions and chemical reagents on the enzyme activity of purified SsMIaseA

金属离子及化合物	比酶活 ^a	相对酶活力
Metal ions and chemical reagents	Specific activity ^a (U/mg)	Relative activity (%)
Control	525.0±1.2	100.0
Ni ⁺	541.6±0.3	103.2
Mg ²⁺	508.4±1.6	96.8
Mn ²⁺	509.6±1.9	97.1
Ba ²⁺	544.0±1.6	103.6
Na ⁺	583.1±1.3	111.1
K ⁺	591.4±1.0	112.6
Cu ²⁺	526.2±0.6	100.2
Ag ⁺	279.7±1.3	53.3
Cr ²⁺	536.9±0.3	102.3
Zn ²⁺	427.8±0.3	81.5
Co ²⁺	417.2±3.8	79.5
Fe ²⁺	388.7±0.6	74.0
Fe ³⁺	400.6±1.3	76.3
Ca ²⁺	456.3±2.2	86.9
SDS	433.7±3.2	82.6
EDTA	539.2±2.9	102.7
β-mercaptoethanol	609.1±3.5	116.0
CTAB	443.2±1.3	84.4

注：^a：此酶活为在最适条件下测定的酶活力与蛋白浓度的比值
Note: ^a: The specific activity is the ratio of enzyme activity to protein concentration measured under optimal conditions

30%左右(图 4B)，因此选择 600 g/L 的果糖为 SsMIaseA 转化甘露糖的最适底物浓度。用 40 U/mL 的 SsMIaseA 转化 600 g/L 果糖，在 0–12 h 之间定点取样，从图 4C 可以看出，随着转化时间的增加，甘露糖和转化率都有了明显的增加，反应进行到 8 h 时达到平衡，此时生成了 185 g/L 的甘露糖，转化率为 31%。果糖生成甘露糖异构化的平衡常

表 3 SsMIaseA 底物特异性
Table 3 Substrate specificity of SsMIaseA

底物	比酶活	相对酶活力
Substrate	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
甘露糖 Mannose	514.2±15.2	100.0
果糖 Fructose	188.8±9.3	36.7
塔罗糖 Talose	109.7±2.6	21.3
塔格糖 Tagatose	30.5±1.1	5.9

注：SsMIaseA 对 D-阿卓糖、D-阿洛糖、D-鼠李糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-来苏糖、D-木酮糖、乳果糖、依匹乳糖和蔗糖没有活性
Note: SsMIaseA had no activity on D-altrose, D-allose, D-rhamnose, D-glucose, D-galactose, D-lyxose, D-xylulose, lactulose, epilactose and sucrose

表 4 SsMIaseA 的动力学常数

Table 4 Kinetic parameters of SsMIaseA

底物 Substrate	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{s}\cdot\text{mmol})$)
甘露糖 Mannose	523.1 ± 13.5	53.9 ± 3.4	0.415	0.008
果糖 Fructose	432.0 ± 5.8	132.0 ± 4.2	0.343	0.003

注：动力学常数是用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)配制不同浓度的底物，于 45 °C 条件下反应 5 min 测定酶活力。 K_m 和 V_{\max} 通过 GraFit 软件计算

Note: The kinetic parameters were determined for the different substrates at 45°C in 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.5) for 5 min. The apparent Michaelis constant (K_m) and V_{\max} were calculated with the software “GraFit”

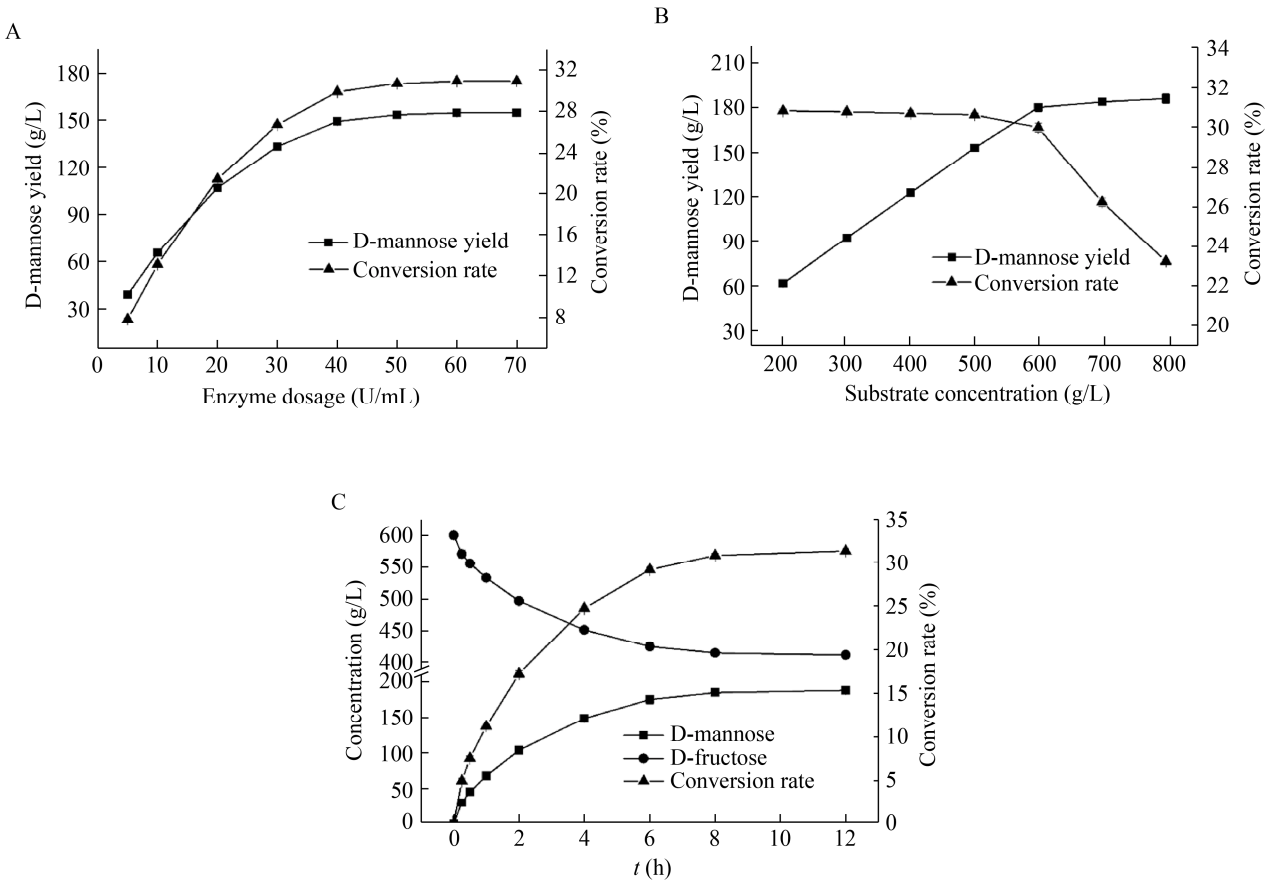


图 4 加酶量(A)、D-果糖浓度(B)和转化时间(C)对 SsMIaseA 生产甘露糖的影响

Figure 4 Effects of enzyme dosage (A), D-fructose concentration (B) and conversion time (C) on mannose production by SsMIaseA

注：A：加酶量(5–70 U/mL)，将不同加酶量的 SsMIaseA 与 500 g/L 果糖混合，并在 45 °C 下反应 12 h；B：果糖浓度(400–800 g/L)，将 40 U/mL SsMIaseA 与不同浓度的果糖混合，45 °C 下反应 12 h；C：转化时间(0.25–12.00 h)，将 40 U/mL 酶液与 600 g/L 果糖在 45 °C 下反应 12 h，在不同的时间点取样

Note: A: Enzyme dosages (5–70 U/mL). Different dosage of SsMIaseA was mixed with 500 g/L fructose, and the reaction was performed at 45 °C for 12 h; B: D-fructose concentration (400–800 g/L). 40 U/mL SsMIaseA was mixed with different concentrations of fructose, and the reaction was conducted at 45 °C for 12 h; C: Conversion time (0.25–12.00 h). The enzyme (40 U/mL) was mixed with 600 g/L fructose, and the reaction was performed at 45 °C for 12 h, and samples were taken at different times

数 K 不受温度的影响, 其表达式为: $K=c(\text{甘露糖})/c(\text{果糖})^{[20]}$ 。根据反应达到平衡时甘露糖和果糖的浓度, 估算出平衡常数 K (生成甘露糖) 为 0.45。

3 讨论

近年来, 甘露糖因其具有多种功能活性, 在食品、医药和饲料等行业有着广泛应用^[3,31-32]。本文从链霉菌基因组中发现了一个 D-甘露糖异构酶, 其氨基酸序列与嗜热裂孢菌(*T. fusca*)来源的 D-甘露糖异构酶 ManI 相似性最高, 为 60.2%。将该基因成功在大肠杆菌中异源表达, 重组 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 经 Ni-NTA 亲和层析一步纯化得到纯酶, 比酶活为 525.0 U/mg, 显著高于其他大肠杆菌表达的 D-甘露糖异构酶, 如嗜热裂孢菌来源的 ManI (69.2 U/mg)^[25]和大肠杆菌来源的 MI (10.52 U/mg)^[33]。该酶(SsMIaseA)是一个单亚基蛋白, 分子量为 45.6 kD。目前所报道的 D-甘露糖异构酶大多数为单亚基蛋白, 分子量在 42.0–51.4 kD 之间。此外, 部分 D-甘露糖异构酶为多聚体, 如放射土壤杆菌 M-1 (90 kD)^[21]、大肠杆菌 K-12 (160 kD)^[34]和大肠杆菌 BL21 (274.5 kD)^[22]来源的 D-甘露糖异构酶分别是二聚体、四聚体和六聚体。

SsMIaseA 的最适 pH 为 7.5, 在 pH 7.0–8.0 范围内表现出较高的催化活性。这与大多数 D-甘露糖异构酶相似, 如水田芹黄单胞菌(*X. rubrilineans*)^[19]来源的 D-甘露糖异构酶, 但洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)^[23] D-甘露糖异构酶的最适 pH 为 6.2, 是迄今发现的唯一一个偏酸性的 D-甘露糖异构酶。此外, 大肠杆菌的 2 种 D-甘露糖异构酶 MIase^[22]和 EcYihS^[24]的最适 pH 为 7.0。SsMIaseA 在 6.5–10.0 范围内处理 30 min 仍有 80% 以上的残余酶活力, 而且在 pH 6.0 时仍有 60% 的酶活力。比嗜糖假单胞菌(*P. saccharophila*)^[18]和大肠杆菌^[34] D-甘露糖异构酶的 pH 范围更宽。该酶最适温度为 45 °C, 在 45 °C 以下保持稳定。SsMIaseA 的最适温度与大多数 D-甘露糖异构酶相似(30–50 °C), 明显高于地中海海单胞菌(*M. mediterranea* NBRC

103028)^[26] (30 °C) 和水田芹黄单胞菌(*X. rubrilineans* S-48)^[19] (30 °C) D-甘露糖异构酶。与放射土壤杆菌(*A. radiobacter* M-1)^[21] (60 °C, <55 °C) 和嗜热裂孢菌(*T. fusca* MB10003)^[25] (60 °C, <60 °C) D-甘露糖异构酶相比, SsMIaseA 的最适温度和稳定性要低。 β -巯基乙醇对 SsMIaseA 激活作用最高, SsMIaseA 酶活力提高了 16%, 而 Ag^+ 对该酶有强烈抑制作用。EDTA 处理后, SsMIaseA 的酶活力并没有明显变化, 表明该酶不具有金属离子依赖性。SsMIaseA 对甘露糖的催化活性最高, 其次为果糖。此外, SsMIaseA 对 D-塔格糖和 D-塔罗糖具有催化能力, 这与地中海海单胞菌(*M. mediterranea* NBRC 103028)^[26] D-甘露糖异构酶相似。大肠杆菌(*E. coli*)来源的 EcYihS 和肠道沙门氏菌(*S. enterica*)来源的 SeYihS 可以转化 D-来苏糖^[24]。SsMIaseA 对果糖的 K_m 和 V_{\max} 分别为 132.0 mmol/L 和 432.0 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, K_m 值与大肠杆菌 BL21 来源的 D-甘露糖异构酶(123.3 mmol/L)^[27] 相近, 远低于肠道沙门氏菌来源的 D-甘露糖异构酶 SeYihS (292 mmol/L) 和大肠杆菌 K-12 来源的 D-甘露糖异构酶 EcYihS (276 mmol/L)^[24], 表明该酶对果糖有较好的亲和力。

目前报道的 D-甘露糖异构酶制备甘露糖的转化率在 20%–35%^[13]。利用 SsMIaseA 转化 600 g/L 果糖, 经过 8 h 生成 185 g/L 甘露糖, 转化率为 31%, 处于较高水平。SsMIaseA 转化果糖的最适浓度为 600 g/L, 普遍高于其他来源的 D-甘露糖异构酶, 如大肠杆菌 JM109 (180 g/L)^[33] 和大肠杆菌 BL21 (400 g/L)^[27]。大肠杆菌 D-甘露糖异构酶 MIase^[22] 转化 600 g/L 果糖时, 甘露糖的产量为 150 g/L。然而本文使用 SsMIaseA 时甘露糖的产量为 185 g/L, 表明 SsMIaseA 在转化高浓度果糖时具有较好的应用潜力。大多数 D-甘露糖异构酶对甘露糖的转化率在 25% 左右, 如链霉菌(*S. aerocolorigenes*)^[17]、放射形土壤杆菌(*A. radiobacter* M-1)^[21] 和嗜热裂孢菌(*T. fusca* MB10003)^[25] D-甘露糖异构酶。此外,

SsMIaseA 转化果糖的时空产率为 23.1 g/(L·h), 高于一些其他用于甘露糖制备的酶, 如 *Caldanaerobius polysaccharolyticus*^[35] 来源的 D-来苏糖异构酶 [6.4 g/(L·h)] 和 *Runella slithyformis*^[17] 来源的甘露糖 2-差向异构酶 [2.5 g/(L·h)]。

4 结论

本文从链霉菌中克隆了一个 D-甘露糖异构酶基因, 并在大肠杆菌中异源表达; 该酶与嗜热裂孢菌(*T. fusca*) D-甘露糖异构酶相似性最高, 为 60.2%; 重组 D-甘露糖异构酶 SsMIaseA 具有较高的比酶活(525 U/mg), 该酶最适 pH 和温度分别为 7.5 和 45 °C, 在中性至碱性范围内有较好的稳定性; 在最适条件下, SsMIaseA 转化果糖生产甘露糖的时空产率为 23.1 g/(L·h), 最终转化率为 31%, 该酶为甘露糖的酶法制备提供了依据。

REFERENCES

- [1] Huang JW, Yu LN, Zhang WL, Zhang T, Guang CE, Mu WM. Production of D-mannose from D-glucose by co-expression of D-glucose isomerase and D-lyxose isomerase in *Escherichia coli*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(13): 4895-4902
- [2] Oh DK. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(1): 1-8
- [3] Hu X, Shi YN, Zhang P, Miao M, Zhang T, Jiang B. D-Mannose: properties, production, and applications: an overview[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(4): 773-785
- [4] Gonzalez PS, O'Prey J, Cardaci S, Barthet VJA, Sakamaki JI, Beaumatin F, Roseweir A, Gay DM, Mackay G, Malviya G, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J]. Nature, 2018, 563(7733): 719-723
- [5] Lenger SM, Bradley MS, Thomas DA, Bertolet MH, Lowder JL, Sutcliffe S. D-mannose vs other agents for recurrent urinary tract infection prevention in adult women: a systematic review and meta-analysis[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2020, 223(2): 265.e1-265.e13
- [6] Zhang DF, Chia C, Jiao X, Jin WW, Kasagi S, Wu RQ, Konkel JE, Nakatsukasa H, Zanvit P, Goldberg N, et al. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology[J]. Nature Medicine, 2017, 23(9): 1036-1045
- [7] Sharma V, Smolin J, Nayak J, Ayala JE, Scott DA, Peterson SN, Freeze HH. Mannose alters gut microbiome, prevents diet-induced obesity, and improves host metabolism[J]. Cell Reports, 2018, 24(12): 3087-3098
- [8] Kamel MM, Ali HI, Anwar MM, Mohamed NA, Soliman AM. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45(2): 572-580
- [9] Saloranta T, Peuronen A, Dieterich JM, Ruokolainen J, Lahtinen M, Leino R. From mannose to small amphiphilic polyol: perfect linearity leads to spontaneous aggregation[J]. Crystal Growth & Design, 2016, 16(2): 655-661
- [10] Chen FE, Zhao JF, Xiong FJ, Xie B, Zhang P. An improved synthesis of a key intermediate for (+)-biotin from D-mannose[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(16): 2461-2464
- [11] Monteiro AF, Miguez IS, Silva JPRB, Da Silva ASA. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 10939
- [12] Hu H, Liu SR, Zhang WZ, An JH, Xia HA. Efficient epimerization of glucose to mannose over molybdenum-based catalyst in aqueous media[J]. Chemistry Select, 2020, 5(5): 1728-1733
- [13] Wu H, Zhang WL, Mu WM. Recent studies on the biological production of D-mannose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21/22): 8753-8761
- [14] Yu LN, Zhang WL, Zhang T, Jiang B, Mu WM. Efficient biotransformation of D-fructose to D-mannose by a thermostable D-lyxose isomerase from *Thermosediminibacter oceanii*[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(12): 2026-2033
- [15] Guo ZR, Long LK, Ding SJ. Characterization of a D-lyxose isomerase from *Bacillus velezensis* and its application for the production of D-mannose and L-ribose[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 149
- [16] Park CS, Kim JE, Choi JG, Oh DK. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and its application in the production of mannose from glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(6): 1187-1196
- [17] Saburi W, Sato S, Hashiguchi S, Muto H, Iizuka T, Mori H. Enzymatic characteristics of D-mannose 2-epimerase, a new member of the acylglucosamine 2-epimerase superfamily[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6559-6570
- [18] Palleroni NJ, Doudoroff M. Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1956, 218(1): 535-548
- [19] Takasaki Y, Tanabe O, Takano S. Studies on the isomerization of sugars by bacteria. Part VIII. Purification and some properties of mannose isomerase from *Xanthomonas rubriligneans* S-48[J]. Agricultural and

- Biological Chemistry, 1964, 28(9): 601-609
- [20] Takasaki Y. Kinetic and equilibrium studies on D-mannose-D-fructose isomerization catalyzed by mannose isomerase from *Streptomyces aerocoligines*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31(4): 435-440
- [21] Hirose J, Maeda K, Yokoi H, Takasaki Y. Purification and characterization of mannose isomerase from *Agrobacterium radiobacter* M-1[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(3): 658-661
- [22] Hu X, Zhang P, Miao M, Zhang T, Jiang B. Development of a recombinant D-mannose isomerase and its characterizations for D-mannose synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 328-335
- [23] Allenza P, Morrell MJ, Detroy RW. Conversion of mannose to fructose by immobilized mannose isomerase from *Pseudomonas cepacia*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990, 24/25(1): 171-182
- [24] Itoh T, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. Crystal structure of YihS in complex with D-mannose: structural annotation of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* yihS-encoded proteins to an aldose-ketose isomerase[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(5): 1443-1459
- [25] Takafumi K, Sumiko M, Satoshi K, Hitoshi M, Yousuke K, Yoshiyuki K. Characterization of mannose isomerase from a cellulolytic actinobacteria *Thermobifida fusca* MBL10003[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2014, 61(1): 21-25
- [26] Saburi W, Jaito N, Kato K, Tanaka Y, Yao M, Mori H. Biochemical and structural characterization of *Marinomonas mediterranea* D-mannose isomerase Marme_2490 phylogenetically distant from known enzymes[J]. Biochimie, 2018, 144: 63-73
- [27] Hu X, Zhang T, Mu WM, Miao M, Jiang B. Cloning and expression of D-mannose isomerase from *Escherichia coli* BL21 and its application for D-mannose production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 58-63 (in Chinese)
- 胡兴, 张涛, 沐万孟, 缪铭, 江波. D-甘露糖异构酶的克隆表达及酶法制备 D-甘露糖[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 58-63
- [28] Lakshmi ES, Rao MRN, Sudhamani M. Response surface methodology-artificial neural network-based optimization and strain improvement of cellulase production by *Streptomyces* sp.[J]. Bioscience Journal, 2020, 36(4): 1390-1402
- [29] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275
- [30] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [31] Wei ZW, Huang LF, Cui L, Zhu X. Mannose: good player and assister in pharmacotherapy[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 129: 110420
- [32] Han Y, Renu S, Patil V, Schrock J, Feliciano-Ruiz N, Selvaraj R, Renukaradhya GJ. Mannose-modified chitosan-nanoparticle-based *Salmonella* subunit oral vaccine-induced immune response and efficacy in a challenge trial in broilers[J]. Vaccines, 2020, 8(2): 299
- [33] Gao XQ, Zhang CX, Chen XB, Wang LL, Yi H. The mannose isomerase gene cloning and function analysis in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(11): 219-222,237 (in Chinese)
- 高小倩, 张春晓, 陈晓波, 王丽丽, 仪宏. 大肠杆菌甘露糖异构酶(MI)基因克隆及功能研究[J]. 生物技术通报, 2010(11): 219-222,237
- [34] Stevens FJ, Stevens PW, Hovis JG, Wu TT. Some properties of D-mannose isomerase from *Escherichia coli* K12[J]. Journal of General Microbiology, 1981, 124(1): 219-223
- [35] Wu H, Chen M, Guang CE, Zhang WL, Mu WM. Characterization of a recombinant D-mannose-producing D-lyxose isomerase from *Caldanaerobius polysaccharolyticus*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109553