



专论与综述

粘细菌产生的水解酶类研究进展

徐欣^{1,2} 李安章¹ 徐帅帅¹ 姚青³ 朱红惠^{*1,2}

1 广东省微生物研究所 广东省科学院 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室
广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC) 广东 广州 510070

2 华南农业大学农学院 广东 广州 510642

3 华南农业大学园艺学院 广东 广州 510642

摘要: 粘细菌隶属于 δ 变形菌纲(*Deltaproteobacteria*), 是重要的药源微生物类群, 但是其分离培养困难, 严重限制了粘细菌资源的发掘和开发利用。粘细菌是微生物捕食者, 通过产生丰富多样的胞外水解酶, 如淀粉酶、蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶、磷酸酶、蛋白酶等来裂解其他微生物或分解纤维素等作为营养物质来源。目前, 粘细菌分离纯化技术主要是利用被捕食菌或纤维素诱导法。可以说, 粘细菌胞外水解酶是研究其分离培养方法的物质基础。然而, 目前研究者们对粘细菌产生的水解酶类关注较少。本文主要对粘细菌产生的水解酶种类、性质及其功能进行归纳总结, 为今后粘细菌分离培养技术和开发利用等相关研究提供参考。

关键词: 粘细菌, 水解酶, 难培养微生物

Research progress on hydrolytic enzymes produced by Myxobacteria

XU Xin^{1,2} LI Anzhang¹ XU Shuaishuai¹ YAO Qing³ ZHU Honghui^{*1,2}

1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Microbial Culture Collection Center (GDMCC), Guangzhou, Guangdong 510070, China

2 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

3 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: *Myxobacteriales* belongs to *Deltaproteobacteria*, which is an important group of pharmaceutical-producing microorganisms. However, the isolation and purification of myxobacteria are

Foundation items: Key Area Research and Development Project of Guangdong Province (2018B020206001); Science and Technology Project of Guangdong Province (2019B030316009); Guangzhou Industry-University-Research Collaborative Innovation Major Project (201704020088); Guangzhou Science and Technology Plan Pearl River Science and Technology New Star Project (201806010065)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-87137669; E-mail: zhuhh@gdim.cn

Received: 09-01-2020; **Accepted:** 22-06-2020; **Published online:** 30-09-2020

基金项目: 广东省重点领域研发计划(2018B020206001); 广东省科技计划(2019B030316009); 广州市产学研协同创新重大专项(201704020088); 广州市科技计划珠江科技新星项目(201806010065)

***通信作者:** Tel: 020-87137669; E-mail: zhuhh@gdim.cn

收稿日期: 2020-01-09; **接受日期:** 2020-06-22; **网络首发日期:** 2020-09-30

difficult, which severely limits the exploration and utilization of myxobacteria resources. Myxobacteria are microbial predators, which produce a variety of extracellular hydrolases, such as amylase, protease, chitinase, cellulase, phosphatase, protease etc., to lyse other microorganisms or decompose cellulose as nutrients source. At present, the isolation and purification technology of myxobacteria are mainly based on predator-prey interaction or cellulose induction. Hereby, extracellular hydrolase of myxobacteria is the material basis for studying its isolation and cultivation methods. However, the hydrolases produced by myxobacteria have been less concerned. In this paper, the types, properties and functions of the hydrolases produced by myxobacteria are summarized, which would provide reference sense for the related researches on the isolation and cultivation techniques. Moreover, the exploitation and utilization of myxobacteria resources were also discussed.

Keywords: Myxobacteria, hydrolase, uncultured bacteria

粘细菌是一类具有复杂多细胞行为的革兰氏阴性细菌, 在细胞的生长、摄食、运动和发育等方面具有显著的社会性特征^[1]。粘细菌单细胞形态呈杆状, 其显著特点是可以形成肉眼可见的子实体结构。粘细菌属于变形杆菌门(*Proteobacteria*)的 δ 分支, 包括 3 个亚目, 即孢囊杆菌亚目(*Cystobacterineae*)、堆囊菌亚目(*Sorangineae*)和小囊菌亚目(*Nannocystineae*)^[2]。目前粘细菌目共有 11 个科 30 个属(表 1) 66 个正式定名的种。

依据对生物大分子的降解特性, 粘细菌可分

为两大类群: 溶细胞类群(*Bacteriolytic Group*)和溶纤维素类群(*Cellulolytic Group*)^[3]。两个类群对于底物的偏好明显不同, 前者主要降解利用其他微生物的活细胞; 后者不能降解利用活细胞(可以降解死细胞), 却能分解利用纤维素^[4]。目前绝大多数粘细菌种属属于溶细胞类群, 溶纤维素类群只有堆囊菌属(*Sorangium*)和 *Byssovorax* 这 2 个属^[5-6]。

研究发现粘细菌的基因组普遍大于其他细菌的基因组, 其中纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*) So0157-2 具有最大的细菌基因组(14.78 Mb)^[7], 其次

表 1 粘细菌目的分类

Table 1 Classification of *Myxococcales*

Suborder <i>Cystobacterineae</i>		Suborder <i>Sorangineae</i>		Suborder <i>Nannocystineae</i>	
A	Family <i>Myxococcaceae</i>	E	Family <i>Polyangiaceae</i>	J	Family <i>Nannocystaceae</i>
01	<i>Myxococcus</i>	14	<i>Polyangium</i>	25	<i>Nannocystis</i>
02	<i>Corallococcus</i>	15	<i>Byssovorax</i>	26	<i>Enhygromyxa</i>
03	<i>Pyxicoccus</i>	16	<i>Chondromyces</i>	27	<i>Plesiocystis</i>
04	<i>Aggregicoccus</i>	17	<i>Aetherobacter</i>	28	<i>Pseudenhygromyxa</i>
05	<i>Simulacricoccus</i>	18	<i>Racemicystis</i>	K	Family <i>Haliangiaceae</i>
B	Family <i>Cystobacteraceae</i>	19	<i>Jahnella</i>	29	<i>Haliangium</i>
06	<i>Cystobacter</i>	20	<i>Sorangium</i>	L	Family <i>Kofleriaceae</i>
07	<i>Archangium</i>	F	Family <i>Sandaracinaceae</i>	30	<i>Kofleria</i>
08	<i>Hyalangium</i>	21	<i>Sandaracinus</i>		
09	<i>Melittangium</i>	G	Family <i>Phaselicystidaceae</i>		
10	<i>Stigmatella</i>	22	<i>Phaselicystis</i>		
11	<i>Vitosangium</i>	H	Family <i>Labilitrichaceae</i>		
C	Family <i>Vulgatibacteraceae</i>	23	<i>Labilithrix</i>		
12	<i>Vulgatibacter</i>	I	Family unassigned		
D	Family <i>Anaeromyxobacteraceae</i>	24	<i>Minicystis</i>		
13	<i>Anaeromyxobacter</i>				

是纤维堆囊菌(*S. cellulosum*) Soce56 (13.03 Mb)^[8]。较大的基因组为粘细菌产生丰富多样的酶类和次级代谢产物提供了遗传基础。目前, 粘细菌在天然产物发掘、生物防治等应用领域日益引起关注, 已成为重要的微生物资源类群^[9]。

粘细菌在自然界中分布广泛, 丰度和多样性都较高。但由于其自身特性的限制, 不能利用传统的稀释平板法分离, 所以粘细菌的分离纯化是一大难题。对海洋、陆地或不常见的栖息地进行的免培养研究表明, 未培养的粘细菌数量远远高于已培养菌株的数量^[10]。

利用被捕食菌促进粘细菌子实体形成和诱导粘细菌的分离是目前主流的粘细菌分离方法。粘细菌是微生物中的捕食者, 大多数粘细菌能通过独特的“狼群式”群体行为(Wolf-Pack)和滑行运动来主动捕食多种“猎物”微生物, 包括细菌、丝状真菌、小型藻类等, 并能利用猎物裂解后的小分子产物作为其唯一的营养来源进行生长^[11-12]。“狼群式”捕食假说认为, 在细胞密度高的情况下, 粘细菌细胞分泌各种各样的水解酶, 在细胞外环境中聚集在一起以提高酶浓度, 共同发挥裂解作用, 产生一个共享的水解产物池, 便于单个细胞吸收裂解产物实现生长繁殖^[13]。粘细菌可以产生多种多样的酶类, 包括蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、几丁质酶、木聚糖酶、明胶酶、糊精酶、琼脂糖酶等, 它们是粘细菌捕食能力及分离纯化技术的物质基础。深入研究粘细菌水解酶类, 有利于加深对粘细菌营养需求、代谢机制和捕食行为的了解, 可为开发和改进粘细菌分离技术提供参考, 也有利于推动粘细菌及其所产酶类在工业和农业等领域的开发应用。

1 纤维素酶

纤维素酶在自然界中广泛分布, 是细菌、真菌、线虫和植物的生物合成产物^[14-16]。纤维素的完全降解是通过 β -1,4-内切葡聚糖酶和 β -1,4-外切葡聚糖酶的作用而发生。内切作用酶攻击纤维

素链内部, 而外切酶攻击纤维素链的还原或非还原端以生成纤维二糖或葡萄糖^[17-18]。1997 年, Pedraza-Reyes 等发现粘细菌 *Myxococcaceae* sp. AL-1 分泌一种具有壳聚糖酶-纤维素酶活性的蛋白, 这是首次在粘细菌中发现同时具有壳聚糖酶-纤维素酶双功能酶活的酶; 该酶属于糖苷水解酶家族 5, 在粘细菌生长稳定期最大限度地分泌, 能够降解纤维素荧光衍生物 4-甲基伞形酮- β -D-纤维二糖苷和 4-甲基伞形酮- β -D-纤维三糖苷, 在 42 °C 具有最大降解活性; 氨基末端测序表明, 纯化的壳聚糖酶-纤维素酶与革兰氏阳性枯草芽孢杆菌菌株 DLG、PAP115 和 168 产生的内切纤维素酶具有 70% 以上的序列一致性^[19-20]。基因组分析数据表明, *Myxococcaceae* sp. AL-1 含有一个至少由 5 种纤维素酶组成的细胞外多纤维素分解系统, 其产量受生长周期的调节^[21]。对其中的 *cel9* 基因进行克隆表达, 该基因编码一个分子量为 67 kD 的纤维素酶; 该纤维素酶在菌株生长稳定期产生, 微晶纤维素可明显增强其表达; Cel9 蛋白在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中已成功表达, 纯化的 Cel9 蛋白生化特性与嗜热细菌产生的纤维素酶生化特性相似; 位于基因 *cel9* 下游的基因 *cel48* 编码另一种纤维素酶, 该酶在大肠杆菌中进行了表达及纯化, 发现其与细菌来源的糖基水解酶家族 48 的纤维二糖水解酶具有相似的生化特性, 研究表明, *Myxococcaceae* sp. AL-1 产生的这两种纤维素酶以协同的方式对微晶纤维素进行降解^[22]。后续研究表明, 在粘细菌菌株 AL-1 降解纤维素的过程中, 一种非催化氨基酸 Asp446 在 Cel9 蛋白中起着至关重要的结构作用, 而蛋白 TmcR 会抑制 *cel9-cel48* 基因簇的表达^[23-24]。

Hou 等以堆囊菌属为研究对象, 发现其水解纤维素活性与细胞表面相关联, 并在细胞表面形成一个大的多酶复合体, 该复合体是生长在细胞表面的突起结构, 这可能是导致纤维素降解的原因; 通过凝胶色谱测定分离的纤维素水解复合物

分子量为 1 000–2 000 kD, 至少含有纤维素酶和木聚糖酶活性, 该发现为纤维素水解酶在好氧环境中的应用提供了新的思路和发展方向^[25]。堆囊菌属是一类具有独特的水解纤维素能力的粘细菌, 但目前没有任何一个纤维素酶从堆囊菌属中分离纯化, 纤维堆囊菌细胞表面的多酶复合体结构中具有多种生物活性的水解酶类, 其来源的水解酶类可能进一步解释降解机制。纤维素作为一种重要的可再生资源, 其降解对可持续发展和改善环境问题具有重要的意义, 堆囊菌属来源的纤维素酶可能在纤维素降解工业化生产中具有重要的应用价值。

2 木聚糖酶

木聚糖酶是一类糖苷酶(α -糖苷水解酶, EC 3.2.1.x), 催化木聚糖中 1,4- β -D-木聚糖键的内水解, 参与木糖的产生^[26]。木聚糖酶的底物是木聚糖, 木聚糖是植物细胞中主要的结构多糖, 是自然界中较为丰富的多糖^[27]。在大多数木聚糖酶中, 最佳催化活性是在中温或接近中温温度(约 40–60 °C), 而冷活性木聚糖酶的最佳温度在 20–30 °C^[26]。Wang 等从纤维堆囊菌(*S. cellulorum*) So9733-1 中克隆了一个长度为 1 209 bp 的木聚糖酶基因 *xynA*, 其 GC 含量为 52.27%, 低于已报道的大多数粘细菌基因组 DNA 的 GC 含量(67%–72%), 从而认为 *xynA* 可能源自其他细菌种类; 将基因 *xynA* 在大肠杆菌中进行重组表达, 经亲和层析得到重组蛋白 r-XynA, 该重组酶的最佳温度为 30–35 °C, 5 °C 时的活性为 33.3%, 0 °C 时的活性为 13.7%, 在 50 °C 孵育 20 min 后活性丧失 80%, 表明 r-XynA 是一种低温活性木聚糖酶, 具有较低的热稳定性, Ca^{2+} 的存在可以增强 r-XynA 的活性; r-XynA 能水解山毛榉木聚糖、桦木木聚糖和木糖寡糖(木糖三糖、木糖四糖和木糖戊糖), 主要产物为木糖和木糖二糖^[28]。这是首次在纤维堆囊菌中分离纯化出木聚糖酶, 该酶的发现与纤维堆囊菌具有水解纤维素的活性相关。纤维

堆囊菌能够有效分解利用纤维素的能力一直受到研究者的广泛关注, 纤维堆囊菌来源的木聚糖酶对探究其降解机制具有重要的科学意义。但纤维堆囊菌作为一种难分离难培养的粘细菌, 其分离纯化周期较长, 这也为后续的研究工作带来很多困难。

3 淀粉酶

淀粉酶是一种重要的工业酶, 广泛应用于工业生产, 如制糖、动物营养、食品、发酵、纺织、造纸、生物能源等行业^[29]。淀粉酶是糖苷水解酶(Glycoside Hydrolase, GH)的一类, 通过水解 α -1,4-和 α -1,6-糖苷键将淀粉降解成糖基。粘细菌能降解利用大分子物质来满足自身生长的营养需求, 对多糖(如淀粉)具有良好的利用能力。1995 年 Fárez-Vidal 等首次从珊瑚状粘球(*Myxococcus coralloides*) D 中分离出一种淀粉酶, 该酶被鉴定为典型的 α -淀粉酶, 分子量为 22.5 kD, 最适温度 45 °C, 最适 pH 8.0, 最终水解产物为葡萄糖和麦芽糖^[30]。

近几年, 崔中利团队从粘细菌 *Corallococcus* sp. EGB 中克隆表达了多种新型的胞外淀粉酶。在 2015 年报道了一种新型的 α -淀粉酶 AmyC, 纯化后的重组淀粉酶 rAmyC 是一种特殊的糖化 α -淀粉酶, 催化机制与典型的 α -淀粉酶不同, AmyC 能水解各种淀粉和大于 G4 的麦芽低聚糖, 生成葡萄糖和麦芽糖四糖而不产生其他低聚糖; 其具有微弱但显著的 α -1,6 键裂解活性和转糖基化活性, 在 50 °C 时表现出最大的水解活性^[31]。AmyM 是从 *Corallococcus* sp. EGB 中克隆的一种形成麦芽六糖的外淀粉酶, 分子质量为 43 kD, 不依赖 Ca^{2+} , 属于糖苷水解酶家族 13; 对 AmyM 水解淀粉的终产物进行分析表明, 麦芽六糖占麦芽糖低聚糖产量的 59.4%; 因其具有耐盐、高活性、独特的底物特异性和最终产物谱等特征, 该酶在淀粉加工技术中具有广泛的应用前景^[32]。AmyM 在大肠杆菌中表达水平较低(1.4 mg/L), 随后在毕赤酵母(*Pichia*

pastoris) GS115 中表达量提高至 220 mg/L, 有利于其在工业生产中使用^[33]。在毕赤酵母中进行表达的还有一种来源于 *Corallococcus* sp. EGB 的新型脱支酶 IsoM, 其序列比对表明, IsoM 为典型的异淀粉酶, 属于 GH13 家族; IsoM 对支化淀粉的 α -1,6-糖苷键具有较高的脱支效率, 对 α -1,4-糖苷键无活性; IsoM 是一个潜在的抗性淀粉生产者, 产率为 70.9%, 可与商业普鲁兰酶(Promozyme®D2)相当, 还能与 AmyM 结合提高麦芽六糖的产量, 因此, IsoM 是淀粉高效转化的潜在候选者^[34]。*Corallococcus* sp. EGB 还分泌一种新型淀粉酶 CoMA, 该酶最突出的特点是能催化麦芽糖低聚糖(\geq G3)和可溶性淀粉转化为麦芽糖作为唯一的水解产物; 此外, 该酶还可以水解 γ -环糊精和普鲁兰多糖, CoMA 对 α -1,4-糖苷键显示出水解和转糖基化作用, 但对 α -1,6-糖苷键没有作用^[35]。葡萄糖基转移被认为是生产高水平麦芽糖而不产生葡萄糖的主要糖化反应^[36]。*Corallococcus* sp. EGB 中还有一种新型的葡糖淀粉酶(GlucaM), 并在大肠杆菌中进行了异源表达, rGlucAM 分子量约为 73 kD, 在 pH 7.0、温度 50 °C 时活性最佳, 耐高浓度盐和多种有机溶剂^[37]。GlucAM 属于 GH15 家族, 与珊瑚状珊瑚球菌(*Corallococcus coralloides*) DSM2259 的 GH15 家族葡糖淀粉酶序列相似度高达 96%, 与已知功能验证的葡萄糖淀粉酶无相似之处; GlucAM 具有广泛的底物特异性, 与其他葡糖淀粉酶的不同在于其对可溶性淀粉和直链淀粉有更高的活性, 对 α -环糊精也有一定的活性, rGlucAM 可以作用于淀粉、直链淀粉、支链淀粉、糖原等不同的底物和麦芽低聚糖, 是产生葡萄糖的良好催化剂^[38]。GlucAM 的活性不依赖于 Ca^{2+} 的存在, 但是 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 K^{+} 对该酶的活性有促进作用, 有少量报道表明 K^{+} 对葡糖淀粉酶活性有刺激作用^[39-40]。*Corallococcus* sp. EGB 还编码一种 4- α -葡聚糖转移酶(CcGtase), 是糖苷水解酶家族 77 中的新成员, 产物分析表明, rCcGtase 可以将麦芽

低聚糖和淀粉转化为线性聚合度低(Degree of Polymerization, DP<12)的麦芽低聚糖而不生成环糊精, 只有在葡萄糖存在的情况下才能观察到对淀粉的转移作用^[41]。*Sandaracinus amylolyticus* DSM 53668 是 1995 年分离出来的新型可降解淀粉粘细菌, 直到 2016 年对其全基因组进行测序后发现, 在其完整基因组中含有 15 个 α -淀粉酶和 2 个 γ -淀粉酶基因, 通过系统发育分析发现, 其中 10 个 α -淀粉酶和 1 个 γ -淀粉酶基因是通过其他细菌的水平基因转移获得的, 而这些淀粉酶都未被分离纯化^[42]。

上述研究结果表明, 粘细菌是新型淀粉酶的良好来源, 特别是珊瑚球菌属, 其来源的淀粉酶种类多样, 可满足不同工业生产的需要, 成为工业淀粉酶新来源。但粘细菌中其他种属产生的淀粉酶都未被分离纯化。自 19 世纪粘细菌被发现以来, 因其独特的社会性行为 and 生理特性, 对其各方面的研究进展都比较缓慢。随着分子生物学学科的发展, 基因组学受到研究者的关注, 通过基因功能预测可以挖掘粘细菌中未被研究的功能酶基因, 可为粘细菌产生的水解酶类的研究带来突破性的进展。

4 葡萄糖苷酶

内切型 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo- β -N-acetylglucosamidases, ENGases, EC 3.2.1.96)可由一系列生物体产生, 从细菌到真菌, 再到包括人类在内的高级物种, 其能够作用于糖蛋白, 水解附着的 N-聚糖^[43]。橙色标桩菌(*Stigmatella aurantiaca*) DW4 在营养生长过程中分泌一种新型的 ENGase, 被命名为 ENGase St, 经纯化后分子量约为 27 kD, 这是首个来源于粘细菌的 ENGase; 该酶作用于 N-链连接的聚糖的二乙酰壳多糖部分, 对低聚甘露糖苷型糖类天冬酰胺和糖蛋白具有很高的活性, 还可以水解杂合型和复杂型糖类天冬酰胺, 但不能作为胞壁质水解酶^[44]。随后在黄色粘球菌(*M. xanthus*) DK1622 的营养生长过程中也发现了

具有相同底物特异性的 ENGase 活性, 被命名为 ENGase Mx; 同时初步探讨了该酶在细胞中的生物功能, 功能之一是参与外源 N-糖基蛋白的降解, 为细胞发育提供营养物质, 另一功能可能是与蛋白酶对肽的作用相同, 内切糖苷酶可能从天然或外来 N-糖基蛋白中释放出离散的寡糖, 从而产生一系列的发育信号^[45]。粘细菌产生的 ENGase 在细胞中的生物功能还不明确, 需要更进一步的研究进行验证。

5 脂肪酶/酯酶

细菌能产生不同种类的脂解酶, 包括羧酸酯酶(EC 3.1.1.1)和脂肪酶(EC 3.1.1.3), 统称为“脂解酶”, 能够水解疏水性的羧酸酯, 释放脂肪酸和甘油^[46]。酯酶作用于水溶性底物, 倾向于短的脂肪酸链; 而脂肪酶作用于脂质界面, 其主要底物为不溶于水的长链甘油三酯^[47-48]。对黄色粘球菌(*M. xanthus*) DK1622 基因组完整序列进行生物信息学分析发现, 该基因组中有大量假定的脂肪酶基因, 编码 3 个不同家族的脂解酶: Patatin 脂肪酶、 α/β 水解酶和 GDSL 脂肪酶; 在 3 个脂肪酶家族中各选择 ORF3852、ORF5522 和 ORF4569 在大肠杆菌中进行异源表达, 底物特异性分析表明, 这些酶优先水解短链脂肪酸酯, 对对硝基苯乙酸酯催化活性最高^[49]。黄色粘球菌具有广泛的“捕食”范围, 其分泌的脂解酶可以除去“猎物”的膜屏障, 释放脂肪酸, 还可能清空“猎物”的细胞质内容物^[49]。粘细菌在“捕食猎物”过程中, 其分泌的脂解酶可能发挥重要作用。

纤维堆囊菌对各种大分子物质具有良好的降解能力, 包括许多不同种类的多糖和脂质, 但目前对降解大分子物质中所涉及的酶类研究较少。与大分子物质的广泛降解能力一致, 纤维堆囊菌基因组包含许多开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 预测编码不同的水解酶; 对纤维堆囊菌(*S. cellulorum*) Soce56 基因组序列分析发现, 有 45 个 ORF 编码各种脂肪酶/酯酶(EC 3.1.1.x), 这些 ORF

的编码产物与已生化鉴定的脂肪酶/酯酶的序列相似度都很低, 并且目前尚无任何一个被表征^[8]。2011 年, Cheng 等从纤维堆囊菌(*S. cellulorum*) So0157-2 中克隆了一个脂肪酶基因 *lipA*, 并在大肠杆菌中进行表达纯化, 对重组酶进行生化表征发现, r-LipA 是一种冷适应脂肪酶, 水解短链或中链脂肪酸(≤ 10)的对硝基苯基酯, 对对硝基苯醋酸酯活性最高; 该酶在商业洗涤剂和有机溶剂的存在下仍然保持了大部分活性, 表明其具有潜在的工业应用前景, 这是首个从纤维堆囊菌中分离纯化出来的脂肪酶^[50]。纤维堆囊菌的基因组普遍大于其他细菌, 其基因组含有大量编码脂解酶的 ORF, 而且与已知的脂解酶具有很低的相似性, 表明来源于纤维堆囊菌的脂解酶可能具有独特的活性, 纤维堆囊菌可能成为新型脂肪酶资源的筛选菌株。

6 蛋白酶

蛋白酶能够催化水解蛋白质, 根据在蛋白质底物上的作用位点, 可分为内肽酶和外肽酶; 根据其催化机理, 又分为丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和金属蛋白酶^[51]。早在 1965 年, 来源于粘细菌的蛋白酶被分离纯化, Ensign 等从 *Myxococcaceae* sp. AL-1 中分离纯化出一个分子量为 8.7 kD 的蛋白酶, 被命名为蛋白酶 I, 该酶具有蛋白水解活性并能够裂解多种细菌细胞壁^[52]。蛋白酶 I 是一种小分子量的蛋白水解酶, 通过水解糖肽键来溶解细菌细胞壁^[53]。1972 年, 从 *Myxococcaceae* sp. AL-1 中分离纯化出第 2 个胞外蛋白酶, 被命名为蛋白酶 II, 分子量约为 17 kD, 也是一种分子量较小的蛋白酶, 蛋白酶 II 的最佳 pH 值为 8.5–9.0, 该酶对赖氨酸氨基侧的特定肽键具有特异性裂解作用^[54]。1978 年, Gnosspeilius 从变绿粘球菌(*Myxococcus virescens*) S1H 中分离纯化出一个分子量约为 26 kD 的蛋白酶 SII, 肽水解活性表明, 该酶的主要作用靶点为含有非极性侧链氨基酸的肽键, 该蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家

族, 在 pH 值为 8.0 时具有最佳的水解活性, 四乙酸乙二胺能迅速灭活该酶, 二价阳离子能部分恢复其活性^[55]。1994 年, Dumont 等从黄色粘球菌 DK101 中分离纯化出一个具有弹性蛋白降解活性的金属蛋白酶 MAP1, 分子量为 40 kD, 该酶由单肽链组成^[56]。此外, 黄色粘球菌 DK101 中分离纯化出 2 个酸性蛋白酶, 一个是类似凝乳酶的胞外酸性内切蛋白酶, 分子量为 45 kD, SDS-PAGE 和 N 端序列分析 3 种底物的水解产物, 这 3 种底物含有被凝乳酶识别的独特敏感键, 发现该蛋白酶能特异性地裂解 Phe-Met 键, 该酶很容易从培养上清液中获得^[57]。另一个是在细胞营养生长期间分泌的酸性内切蛋白酶 MAEP, 分子量约为 12 kD, 在酸性条件下(pH 5.9)裂解 κ -酪蛋白的 Phe-Met 键^[58]。

在食品工业中使用的蛋白酶中, 天冬氨酸蛋白酶如凝乳酶(EC.3.4.23.4)可特异性裂解 κ -酪蛋白中的 Phe-Met 键, 从而引发牛奶凝结, 可用于奶酪的制作^[59]。微生物来源的凝乳酶容易产生和分离纯化, 生物技术可以提高微生物凝乳酶的产量, 是奶酪行业中新酶来源的良好选择^[60]。黄色粘球菌 DK1622 在生长发育过程中分泌一种胞外蛋白酶 Mcp, 在 pH 值为 6.0 时, 该蛋白酶具有使 κ -酪蛋白发生凝血的水解活性, 并被天冬氨酸蛋白酶的抑制性抑制剂所抑制; 该蛋白酶的水解活性在发育周期中受到时间的调节, 在饥饿后的 9 h 内大量增加^[61]。黄色粘球菌 422 分泌一种新型的凝乳酶, 分子量为 40 kD, pI 为 5.0; 在 pH 6.0、37 °C 条件下凝乳活性最高, 该酶在 65 °C 加热 12 min 后完全失活^[62]。随后, 有研究者将黄色粘球菌菌株 422 中的凝乳酶基因进行克隆表达, 26 个 ORF 只有 3 个基因(*cltA*、*cltB* 和 *cltC*)编码的蛋白在大肠杆菌、酿酒酵母和毕赤酵母表达系统中表现出胞内凝乳能力^[63], 结果表明黄色粘球菌菌株 422 具有奶酪生产凝乳酶来源的潜在用途。

脯氨酸内肽酶(Prolyl Endopeptidase, PEP)是一种丝氨酸蛋白酶, 具有水解蛋白内部脯氨酸残

基羧基侧肽键的能力, 有研究表明用合适的脯氨酸内肽酶进行口腔治疗具有减轻乳糜泻患者终生完全排斥谷蛋白这一负担的潜力^[64]。2005 年, 在黄色粘球菌 ATCC 25232 中发现了一种具有治疗前景的脯氨酸内肽酶 Mx PEP, 该酶具有良好的体外谷蛋白解毒特性, 并研制了含有该酶的药剂量的典型肠溶胶囊^[65-66]。但 Mx PEP 易受酸性 pH 和胃蛋白酶的影响, 因此最适合在十二指肠腔内环境进行谷蛋白解毒; 从而利用食品级干酪乳杆菌作为载体, 在小肠环境的体外模型中给药, 将完整的酶输送到十二指肠的系统, 干酪乳杆菌在维持产生和分泌 Mx PEP 能力的同时, 在模拟胃肠道运输中存活了下来, 因此, 干酪乳杆菌在未来有望成为将 Mx PEP 输送到乳糜泻患者十二指肠的良好载体^[67]。后续研究又将 Mx PEP 在大肠杆菌中进行了重组表达、纯化和表征, 重组酶的单体分子量为 70 kD, 等电点约为 6.3, 最佳的 pH 值和温度分别为 7.5 和 37 °C, 在 pH 为 6.0–8.5 范围内活性稳定, 热稳定性达 37 °C; 重组酶用于谷蛋白水解的初步研究结果表明有望用于生物活性肽的制备^[68]。粘细菌产生的蛋白酶具有多种功能, 首先发挥营养作用, 粘细菌可以利用蛋白质作为碳和能量的来源; 其次, 可以调节饥饿过程中粘细菌子实体和孢子的形成^[69]; 还具有作为奶酪生产和医学治疗剂的潜在用途。

粘细菌产生多种具有应用功能的蛋白酶, 特别是粘球菌属, 其来源的蛋白酶在医学治疗方面具有重要的研究价值, 有望成为治疗乳糜泻患者的有效药剂, 该方面研究具有重要意义。

7 磷酸酶

蛋白磷酸酶可分为 3 个家族: 磷蛋白磷酸酶(Phosphoprotein Phosphatase, PPP)、金属离子依赖性蛋白磷酸酶(Metal-Dependent Protein Phosphatase, PPM)和蛋白酪氨酸磷酸酶(Protein Tyrosine Phosphatase, PTP), PPP 家族包括 PP1、PP2A 和 PP2B 成员, PPM 家族的典型成员有 PP2C^[70]。在

粘细菌中,已经鉴定出大量的 Ser/Thr 蛋白激酶,其中许多是生长发育所必需的^[71]。蛋白激酶能在细胞信号转导和调控中发挥重要作用,而磷酸酶可以控制信号转导通路的磷酸化,磷酸酶的存在对细胞间的信号转导是必需的。粘细菌中磷酸酶的报道,最早是以黄色粘球菌为研究对象研究了磷酸酶的定位和分泌^[72-73]。粘细菌具有营养生长、聚集、子实体形成、粘孢子形成和萌发等复杂的生命周期。1987 年, Gonzalez 等以珊瑚状粘球菌(*M. coralloides*) D 为研究对象,报道了磷酸盐对其生命周期不同阶段的影响及其生命周期中磷酸酶活性的变化,发现高浓度的磷酸盐会抑制子实体的形成^[74]。1990 年, Weinberg 等为了了解黄色粘球菌体内磷酸调节的作用机制,研究了黄色粘球菌发育过程中磷酸酶的表达,发现黄色粘球菌在孢子萌发期比营养细胞发育期表达更高水平的磷酸酶,不同的磷酸酶活性可以作为子实体形成和萌发阶段的生化指标^[75]。2001 年, Treuner-Lange 等发现黄色粘球菌中的基因 *pph1* 编码一种 PP2C 型的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶,属于 PPM 家族;纯化的 Pph1 蛋白对 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 具有依赖性;该酶与真核生物 PP2C 磷酸酶具有较强的同源性,属于一类新的细菌性蛋白磷酸酶。*pph1* 基因突变株会引起菌株营养生长、细胞运动、聚集和产孢等方面的缺陷,在饥饿诱导的发育条件下,该突变体的聚集减少,不能形成具有活孢子的子实体^[76]。2009 年, García-Hernández 等在黄色粘球菌中发现蛋白磷酸酶 Pph2,该酶属于 PPP 家族,能够作用于磷酸化的 Ser、Thr 和 Tyr 残基,是一种依赖于锰的参与能量代谢的蛋白磷酸酶;*pph2* 基因突变株在聚集、产孢量和萌发效率方面存在缺陷^[77]。2011 年, Kimura 等从黄色粘球菌中发现了第 3 个蛋白磷酸酶 Pph3,该酶属于 PPM 家族,表现出 PP2C 型的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶酶学特性,对 Mn^{2+} 具有依赖性;饥饿条件下 *pph3* 基因突变株发育不成熟,孢子量减少^[78]。上述对黄色粘球菌中蛋白磷酸

酶的研究表明,在饥饿条件下,蛋白磷酸酶 Pph1、Pph2 和 Pph3 一起参与了磷酸化蛋白的去磷酸化反应,该反应对于黄色粘球菌中子实体和孢子的形成是必需的。2012 年, Mori 等从黄色粘球菌中发现一个酪氨酸磷酸酶 PhpA, *phpA* 基因突变体与野生型相比,产生了更多的胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS), PhpA 可能负向调节黄色粘球菌中 EPS 的产生^[79]。在黄色粘球菌中,胞外多糖对于细胞间粘附和子实体的形成至关重要。2014 年, Sasaki 等从黄色粘球菌中发现 2 个磷酸酶 PrpA 和 ApaH,其与磷酸蛋白磷酸酶和四磷酸二腺苷(Ap_4A)水解酶具有同源性;两者均表现出对硝基苯基磷酸盐、 Ap_nA 和 ATP 的磷酸酶水解活性, Mn^{2+} 和 Co^{2+} 会影响酶活性^[80]。

粘细菌中的磷酸酶研究主要是以黄色粘球菌为研究对象。黄色粘球菌复杂的多细胞行为需要大量信号转导机制的参与,以协调细胞运动和导致形态发生和分化的基因表达模式的顺序变化。生物体利用一系列的信号转导系统来感知和响应环境的变化,由真核类蛋白激酶和磷酸酶介导的蛋白磷酸化是环境信号传递的一个关键机制。磷酸酶可以催化磷酸化蛋白的去磷酸化,对解析粘细菌生长发育过程中的信号传递系统起着至关重要的作用。

8 粘细菌产生水解酶与生物防治作用

近年来,粘细菌的生物防治作用日益引起重视。2011 年, Kim 等发现一株粘球菌(*Myxococcus*)能抑制 3 种病原真菌的孢子萌发和菌丝生长;盆栽试验中,该粘细菌对由尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)侵染引发的辣椒炭疽病具有良好的防治效果;在田间试验中,粘细菌抗炭疽病活性并未长期保持,但可能成为一种有前途的生物防治剂^[81]。2015 年, Dahm 等从森林土壤中分离到 30 株粘细菌,发现这些粘细菌能有效抑制松树幼苗病害真菌的生长,对人参锈腐菌(*Cylindrocarpus destructans*)具有最强的抑制效果;盆栽实验表明,其中一些

粘细菌能有效抑制水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)对松苗的侵害^[82]。2017年, Li等分离到的珊瑚球菌属(*Corallococcus*) EGB对多种植物病原真菌表现出有效的生物防治作用; 盆栽实验中, 珊瑚球菌属菌株 EGB对由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)侵染引发的黄瓜枯萎病具有良好的防治效果, 能显著降低发病率, 并且该菌株胞外上清酶液能够有效地降低气传病原真菌稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)对水稻苗的感染能力^[83]。2018年, Li等分离筛选得到一株粘球菌属(*Myxococcus*) BS, 盆栽试验发现其可以利用捕食作用有效降低由软腐病菌(*Pectobacterium carotovorum*)侵染引起的马蹄莲软腐病的发病率, 并能促进马蹄莲植株的生长, 增加后代块茎数量^[84]。

粘细菌具有重要的生物防治潜力, 但目前粘细菌在生物防治机制方面的研究并不多。与次生代谢物相比, 粘细菌产生的胞外水解酶受到的关注较少。然而, 粘细菌产生丰富的胞外水解酶类, 在生物防治过程中可能发挥了重要作用。Dahm等从森林土壤中分离的粘细菌对松树幼苗主要真菌致病菌有广泛的生物防治特性, 这些粘细菌都产生胞外酸性和中性蛋白水解酶^[82]。珊瑚球菌属菌株 EGB具有有效的抗病原真菌活性, 盆栽实验中能显著防治稻瘟病; 抗真菌机制研究发现, 菌株 EGB分泌一种 β -1,6-葡聚糖酶, 能有效裂解真菌细胞壁, 从而达到抗真菌的效果, 并认为 β -1,6-葡聚糖酶可发展成为一种很有前途的新的广谱抗真菌制剂^[83]。菌株 EGB还分泌一种几丁质溶解酶 CcCti1, 属于 GH18 家族, 产物分析表明 CcCti1 可以将胶体几丁质水解为 N-乙酰化壳六糖, CcCti1 对植物病原菌稻瘟病菌表现出高效的裂解活性, 在几丁质转化和真菌病害的生物防治方面具有潜在的应用价值^[85]。在粘细菌 *Myxococcaceae* sp. AL-1 中发现的几丁质酶和 β -1,4-葡聚糖酶活性, 也被认为与抗真菌活性相关。

粘细菌作为微生物界的捕食者, 其强大的捕

食能力使得其在农业领域具有潜在的研究价值。早在 70 多年前, 粘细菌的捕食行为就被发现了, 但对其分子机制一直知之甚少。随着对粘细菌捕食机制的研究, 越来越多的证据表明其产生的水解酶类在捕食过程中起着重要作用^[86-87]。粘细菌产生的胞外水解酶类与其捕食特性密切相关, 粘细菌在生物防治方面具有巨大的应用潜力。

9 总结与展望

粘细菌在自然界中广泛分布, 因其强大的捕食能力、独特的生活史和社会性行为具有重要的研究意义。与其他细菌相比, 粘细菌能产生多种多样的胞外水解酶来分解纤维素、淀粉、葡聚糖、纤维素、几丁质等大分子物质。溶纤维类群的粘细菌具有独特的降解纤维素的能力, 与降解机制相关的纤维素酶和木聚酶已引起了广泛关注。纤维堆囊菌产生的脂肪酶具有一些新特性, 被认为是一种良好的工业脂肪酶资源。溶细胞类群中, 珊瑚球菌属分泌的几丁质酶、葡聚糖酶具有强大的抑菌活性, 可能作为一种新型的生物防治菌, 在植物病原菌的防治中具有潜在的应用前景。除此以外, 珊瑚球菌属可产生多种新型的淀粉酶, 表明粘细菌可作为工业淀粉酶的良好来源。黄色粘球菌产生的蛋白酶具有多种功能, 有潜力用于治疗剂的脯氨酰内肽酶和用于奶酪产业的凝乳酶。黄色粘球菌具有复杂的社会行为, 其信号传递系统已被广泛研究, 其中涉及的多种蛋白磷酸酶被表征, 该酶在黄色粘球菌复杂的生命周期中扮演多种角色。粘细菌产生的水解酶类功能多样, 具有重要的科学意义和应用潜力。

粘细菌产生丰富多样的水解酶类为筛选辅助菌和合适的培养基提供依据。不同的粘细菌捕食菌谱及捕食嗜好不同, 熟悉掌握粘细菌产生的水解酶的种类及特性, 选择合适的辅助菌, 通过辅助菌的诱导, 可从土壤或其他生境中分离得到更多的粘细菌资源, 为后续粘细菌的研究奠定基

础。粘细菌作为一个特殊的细菌群体,其庞大的基因组为其产生丰富多样的代谢产物提供了遗传基础,越来越多的酶类产物从基因组中克隆表达,但仍有大量有用的信息值得深入挖掘。

REFERENCES

- [1] Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(1): 70-102
- [2] Spröer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(3): 1255-1262
- [3] Yan ZC, Wang B, Li YZ, Gong X, Zhang HQ, Gao PJ. Morphologies and phylogenetic classification of cellulolytic Myxobacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(1): 104-109
- [4] Li YZ, Li J, Zhou L, Zhang Y, Hu W, Chen Q. Isolation and identification of myxobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(6): 652-656 (in Chinese)
李越中, 李健, 周璐, 张勇, 胡玮, 陈琦. 我国粘细菌 (Myxobacteria) 资源的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2000, 40(6): 652-656
- [5] Morgan AD, MacLean RC, Hillesland KL, Velicer GJ. Comparative analysis of *Myxococcus* predation on soil bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(20): 6920-6927
- [6] Reichenbach H, Lang E, Schumann P, Spröer C. *Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(10): 2357-2363
- [7] Han K, Li ZF, Peng R, Zhu LP, Zhou T, Wang LG, Li SG, Zhang XB, Hu W, Wu ZH, et al. Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulosum* genome from an alkaline milieu[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 2101
- [8] Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer Mo, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, et al. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1281-1289
- [9] Hoffmann T, Krug D, Bozkurt N, Duddela S, Jansen R, Garcia R, Gerth K, Steinmetz H, Müller R. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria[J]. Nature Communications, 2018, 9: 803
- [10] Mohr KI. Diversity of Myxobacteria—we only see the tip of the iceberg[J]. Microorganisms, 2018, 6(3): 84
- [11] Reichenbach H. The ecology of the myxobacteria[J]. Environmental Microbiology, 1999, 1(1): 15-21
- [12] Rosenberg E, Keller KH, Dworkin M. Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 129(2): 770-777
- [13] Berleman JE, Kirby JR. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 942-957
- [14] Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC Jr, Warren RAJ. Domains in microbial β -1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families[J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(2): 303-315
- [15] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. The Biochemical Journal, 1993, 293(3): 781-788
- [16] Bayer EA, Chanzyt H, Lamed R, Shoham Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1998, 8(5): 548-557
- [17] Béguin P, Aubert JP. The biological degradation of cellulose[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(1): 25-58
- [18] Teeri TT. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases[J]. Trends in Biotechnology, 1997, 15(5): 160-167
- [19] Pedraza-Reyes M, Gutiérrez-Corona F. The bifunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism *Myxobacter* sp. AL-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases[J]. Archives of Microbiology, 1997, 168(4): 321-327
- [20] Hedges A, Wolfe RS. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(2): 844-853
- [21] Avitia CI, Castellanos-Juárez FX, Sánchez E, Téllez-Valencia A, Fajardo-Cavazos P, Nicholson WL, Pedraza-Reyes M. Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(24): 7058-7064
- [22] Ramírez-Ramírez N, Romero-García ER, Calderón VC, Avitia CI, Téllez-Valencia A, Pedraza-Reyes M. Expression, characterization and synergistic interactions of *Myxobacter* sp. AL-1 Cel9 and Cel48 glycosyl hydrolases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(3): 247-257
- [23] Téllez-Valencia A, Sandoval AA, Pedraza-Reyes M. The non-catalytic amino acid Asp₄₄₆ is essential for enzyme activity of the modular endocellulase Cel9 from *Myxobacter* sp. AL-1[J]. Current Microbiology, 2003, 46(4): 307-310
- [24] Ramírez-Ramírez N, Castellanos-Juárez FX, Espinosa VE, Castellano LE, Téllez-Valencia A, Pedraza-Reyes M. Role of the novel protein TmcR in regulating the expression of the *cel9-cel48* operon from *Myxobacter* sp. AL-1[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 95(3): 239-248
- [25] Hou PB, Li YZ, Wu BH, Yan ZC, Yan BX, Gao PJ. Cellulolytic complex exists in cellulolytic myxobacterium *Sorangium*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006,

- 38(1/2): 273-278
- [26] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(1): 3-23
- [27] Prade RA. Xylanases: from biology to biotechnology[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1996, 13(1): 101-132
- [28] Wang SY, Hu W, Lin XY, Wu ZH, Li YZ. A novel cold-active xylanase from the cellulolytic myxobacterium *Sorangium cellulosum* So9733-1: gene cloning, expression, and enzymatic characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1503-1512
- [29] Jabbour D, Sorger A, Sahm K, Antranikian G. A highly thermoactive and salt-tolerant α -amylase isolated from a pilot-plant biogas reactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(7): 2971-2978
- [30] Fárez-Vidal ME, Fernández-Vivas A, González F, Arias JM. Properties and significance of an α -amylase produced by *Myxococcus coralloides* D[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78(1): 14-19
- [31] Wu JL, Xia BJ, Li ZK, Ye XF, Chen QZ, Dong WL, Zhou J, Huang Y, Cui ZL. Molecular cloning and characterization of a novel GH13 saccharifying α -amylase AmyC from *Corallococcus* sp. EGB[J]. Starch, 2015, 67(9/10): 810-819
- [32] Li ZK, Wu JL, Zhang BY, Wang F, Ye XF, Huang Y, Huang Q, Cui ZL. AmyM, a novel maltohexaose-forming α -amylase from *Corallococcus* sp. strain EGB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 1977-1987
- [33] Li ZK, Wu JL, Wang T, Zheng WW, Qiao Y, Huang Y, Cui ZL. Efficient production and characterization of maltohexaose-forming α -amylase AmyM secreted from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Starch, 2018, 70(11/12): 1700312
- [34] Li Z, Ji K, Zhou J, Ye XF, Wang T, Luo X, Huang Y, Cao H, Cui ZL, Kong Y. A debranching enzyme IsoM of *Corallococcus* sp. strain EGB with potential in starch processing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 1300-1309
- [35] Zhou J, Li ZK, Zhang H, Wu JL, Ye XF, Dong WL, Jiang M, Huang Y, Cui ZL. Novel maltogenic amylase CoMA from *Corallococcus* sp. strain EGB catalyzes the conversion of maltooligosaccharides and soluble starch to maltose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(14): e00152-18
- [36] Pishtiyski I, Zhekova B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(2): 109-114
- [37] Li ZK, Ji K, Dong WL, Ye XF, Wu JL, Zhou J, Wang F, Chen QZ, Fu L, Li SH, et al. Cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of a novel glucoamylase GlucaM from *Corallococcus* sp. strain EGB[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 129: 122-127
- [38] Huntley S, Zhang Y, Treuner-Lange A, Kneip S, Sensen CW, Søgaaard-Andersen L. Complete genome sequence of the fruiting myxobacterium *Corallococcus coralloides* DSM 2259[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(11): 3012-3013
- [39] Wei YT, Wang XB, Liang JY, Li X, Du LQ, Huang RB. Identification of a halophilic α -amylase gene from *Escherichia coli* JM109 and characterization of the recombinant enzyme[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(7): 1061-1065
- [40] Koç Ö, Metin K. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(23): 3414-3424
- [41] Li ZK, Zheng WW, Zhang L, Wang YX, Zhang YJ, Qiao Y, Luo X, Huang Y, Cui ZL. Gene expression and biochemical characterization of a GH77 4- α -glucanotransferase CcGtase from *Corallococcus* sp. EGB[J]. Starch, 2019, 71(9/10): 1800254
- [42] Sharma G, Khatri I, Subramanian S. Complete genome of the starch-degrading myxobacteria *Sandaracinus amylolyticus* DSM 53668^T[J]. Genome Biology and Evolution, 2016, 8(8): 2520-2529
- [43] Fairbanks AJ. The ENGases: versatile biocatalysts for the production of homogeneous N-linked glycopeptides and glycoproteins[J]. Chemical Society Reviews, 2017, 46(16): 5128-5146
- [44] Bourgerie S, Karamanos Y, Grard T, Julien R. Purification and characterization of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the culture medium of *Stigmatella aurantiaca* DW4[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(20): 6170-6174
- [45] Barreaud JP, Bourgerie S, Julien R, Guespin-Michel JF, Karamanos Y. An endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase, acting on the Di-N-acetylchitobiosyl part of N-linked glycans, is secreted during sporulation of *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(4): 916-920
- [46] Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10(5): 491-508
- [47] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. Biochemical Journal, 1999, 343(1): 177-183
- [48] Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 15(1): 29-63
- [49] Moraleda-Muñoz A, Shinkets LJ. Lipolytic enzymes in *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(8): 3072-3080
- [50] Cheng YY, Qian YK, Li ZF, Wu ZH, Liu H, Li YZ. A novel

- cold-adapted lipase from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2: gene cloning, expression, and enzymatic characterization[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(10): 6765-6780
- [51] Mothe T, Sultanpuram VR. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*[J]. 3 Biotech, 2016, 6: 53
- [52] Ensign JC, Wolfe RS. Lysis of bacterial cell walls by an enzyme isolated from a *Myxobacter*[J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90(2): 395-402
- [53] Ensign JC, Wolfe RS. Characterization of a small proteolytic enzyme which lyses bacterial cell walls[J]. Journal of Bacteriology, 1966, 91(2): 524-534
- [54] Wingard M, Matsueda G, Wolfe RS. Myxobacter AL-1 protease II: Specific peptide bond cleavage on the amino side of lysine[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 112(2): 940-949
- [55] Gnosspeilius G. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 133(1): 17-25
- [56] Dumont L. Purification de l'élastase MAP1 de *Myxococcus xanthus*: étude physico-chimique et enzymatique, recherche de son gène et de sa fonction biologique[D]. France: Université de Limoges, 1993
- [57] Carias JR, Raingeaud J, Mazaud C, Vachon G, Lucas N, Cenatiempo Y, Julien R. A chymosin-like extracellular acidic endoprotease from *Myxococcus xanthus* DK101[J]. FEBS Letters, 1990, 262(1): 97-100
- [58] Lucas N, Mazaud-Aujard C, Bremaud L, Cenatiempo Y, Julien R. Protein purification, gene cloning and sequencing of an acidic endoprotease from *Myxococcus xanthus* DK101[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 222(2): 247-254
- [59] Lemes AC, Pavón Y, Lazzaroni S, Rozycki S, Brandelli A, Kalil SJ. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development[J]. LWT-Food Science And Technology, 2016, 66: 217-224
- [60] Zhao X, Cai M, Yang ZJ, Luo TQ, Sarwar A, Megrou S, Aziz T, Yang ZN. Purification and characterization of a novel milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GSBa-1[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(11): 2447-2457
- [61] Petit F, Guespin-Michel JF. Production of an extracellular milk-clotting activity during development in *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(15): 5136-5140
- [62] Poza M, Sieiro C, Carreira L, Barros-Velázquez J, Villa TG. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30(12): 691-698
- [63] Poza M, Prieto-Alcedo M, Sieiro C, Villa TG. Cloning and expression of *clt* genes encoding milk-clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6337-6341
- [64] Marti T, Molberg Ø, Li Q, Gray GM, Khosla C, Sollid LM. Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: Chemical and immunological characterization[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005, 312(1): 19-26
- [65] Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I, Khosla C. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for celiac sprue therapy[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 92(6): 674-684
- [66] Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue[J]. The Biochemical Journal, 2004, 383(2): 311-318
- [67] Alvarez-Sieiro P, Martin MC, Redruello B, del Rio B, Ladero V, Palanski BA, Khosla C, Fernandez M, Alvarez MA. Generation of food-grade recombinant *Lactobacillus casei* delivering *Myxococcus xanthus* prolyl endopeptidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6689-6700
- [68] Kocazorbaz EK, Zihnioglu F. Purification, characterization and the use of recombinant prolyl oligopeptidase from *Myxococcus xanthus* for gluten hydrolysis[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 129: 101-107
- [69] Rolbetzki A, Ammon M, Jakovljevic V, Konovalova A, Søggaard-Andersen L. Regulated secretion of a protease activates intercellular signaling during fruiting body formation in *M. xanthus*[J]. Developmental Cell, 2008, 15(4): 627-634
- [70] Kennelly PJ. Protein phosphatases—A phylogenetic perspective[J]. Chemical Reviews, 2001, 101(8): 2291-2312
- [71] Hanlon WA, Inouye M, Inouye S. Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 23(3): 459-471
- [72] Voelz H, Ortigoza RO. Cytochemistry of phosphatases in *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 1968, 96(4): 1357-1365
- [73] Nicaud JM, Breton A, Younes G, Guespin-Michel J. Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: an approach to study of a secretory mechanism[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1984, 20(5): 344-350
- [74] Gonzalez F, Arias JM, Montoya E. Phosphatase activities in the life cycle of *Myxococcus coralloides* D[J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133(8): 2327-2332

- [75] Weinberg RA, Zusman DR. Alkaline, acid, and neutral phosphatase activities are induced during development in *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2294-2302
- [76] Treuner-Lange A, Ward MJ, Zusman DR. Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(1): 126-140
- [77] García-Hernández R, Moraleda-Muñoz A, Castañeda-García A, Pérez J, Muñoz-Dorado J. *Myxococcus xanthus* Pph2 is a manganese-dependent protein phosphatase involved in energy metabolism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(42): 28720-28728
- [78] Kimura Y, Mori Y, Ina Y, Takegawa K. Enzymatic and functional analysis of a protein phosphatase, Pph3, from *Myxococcus xanthus*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(10): 2657-2661
- [79] Mori Y, Maeda M, Takegawa K, Kimura Y. PhpA, a tyrosine phosphatase of *Myxococcus xanthus*, is involved in the production of exopolysaccharide[J]. Microbiology, 2012, 158(10): 2546-2555
- [80] Sasaki M, Takegawa K, Kimura Y. Enzymatic characteristics of an ApaH-like phosphatase, PrpA, and a diadenosine tetraphosphate hydrolase, ApaH, from *Myxococcus xanthus*[J]. FEBS Letters, 2014, 588(18): 3395-3402
- [81] Kim ST, Yun SC. Biocontrol with *Myxococcus* sp. KYC 1126 against anthracnose in hot pepper[J]. The Plant Pathology Journal, 2011, 27(2): 156-163
- [82] Dahm H, Brzezińska AJ, Wrótniak-Drzewiecka W, Golińska P, Różycki H, Rai M. Myxobacteria as a potential biocontrol agent effective against pathogenic fungi of economically important forest trees[J]. Dendrobiology, 2015, 74: 13-24
- [83] Li ZK, Ye XF, Chen PL, Ji K, Zhou J, Wang F, Dong WL, Huang Y, Zhang ZG, Cui ZL. Antifungal potential of *Coralloccoccus* sp. strain EGB against plant pathogenic fungi[J]. Biological Control, 2017, 110: 10-17
- [84] Li ZK, Wang T, Luo X, Li XM, Xia CY, Zhao YQ, Ye XF, Huang Y, Gu XY, Cao H, et al. Biocontrol potential of *Myxococcus* sp. strain BS against bacterial soft rot of calla lily caused by *Pectobacterium carotovorum*[J]. Biological Control, 2018, 126: 36-44
- [85] Li ZK, Xia CY, Wang YX, Li X, Qiao Y, Li CY, Zhou J, Zhang L, Ye XF, Huang Y, et al. Identification of an endo-chitinase from *Coralloccoccus* sp. EGB and evaluation of its antifungal properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 1235-1243
- [86] Evans AGL, Davey HM, Cookson A, Currinn H, Cooke-Fox G, Stanczyk PJ, Whitworth DE. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo[J]. Microbiology, 2012, 158(11): 2742-2752
- [87] Thiery S, Kaimer C. The predation strategy of *Myxococcus xanthus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 2