姚琪, 孙丹阳, 闫巧娟, 等. 黑曲霉 β-甘露聚糖酶的高效重组表达、表征及在水解咖啡渣中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 156−162. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120221

YAO Qi, SUN Danyang, YAN Qiaojuan, et al. Efficient Recombinant Expression and Characterization of β-Mannanase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Coffee Grounds[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 156−162. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120221

· 生物工程 ·

# 黑曲霉 β-甘露聚糖酶的高效重组表达、表征及在水解咖啡渣中的应用

姚　琪[1], 孙丹阳[2], 闫巧娟[1], 李延啸[1,3,*], 江正强[2,4]

（1.中国农业大学工学院, 北京 100083;
2.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;
3.南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏南京 210023;
4.中原食品实验室, 河南漯河 462300）

**摘　要:** 咖啡渣是速溶咖啡生产过程中产生的主要副产物，含有丰富的半乳甘露聚糖，利用甘露聚糖酶能够将其水解为具有多种功能活性的甘露糖和甘露寡糖，有效提高产品附加值。本研究将黑曲霉（*Aspergillus niger*）来源的 β-甘露聚糖酶基因（*AnMan26*）在黑曲霉工程菌（FBL-B）中进行重组表达，表征了该酶的酶学性质，进而将其用于水解咖啡渣制备甘露糖和甘露寡糖。结果表明：重组黑曲霉经 168 h 高密度发酵后，甘露聚糖酶产酶水平达 1830 U/mL。该酶的最适 pH 为 5.0，最适温度为 45 ℃，在 pH3.0~7.0 和 45 ℃ 以下保持稳定。将 *An*Man26 和 α-半乳糖苷酶复配水解微波处理后的咖啡渣，水解 8 h 后咖啡渣中甘露聚糖的水解率为 42.3%，水解产物得率为 20.3%，主要成分为甘露糖（44.1%）、甘露二糖（2.5%）、甘露三糖（10.9%）和甘露六糖（1.5%）。该酶具有优良的酶学性质，能够有效水解咖啡渣制备甘露糖和甘露寡糖，为咖啡渣的高值化利用提供了理论和实践基础。

**关键词:** 黑曲霉, β-甘露聚糖酶, 高效表达, 酶学性质, 咖啡渣

**中图分类号:** Q814.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0156−07

**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2024120221　　本文网刊:

# Efficient Recombinant Expression and Characterization of β-Mannanase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Coffee Grounds

**YAO Qi[1], SUN Danyang[2], YAN Qiaojuan[1], LI Yanxiao[1,3,*], JIANG Zhengqiang[2,4]**

（1.College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2.Key Laboratory of China National Light Industry and Food Bioengineering, College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
3.College of Food Science and Engineering/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;
4.Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China）

**Abstract:** Coffee grounds, the major by-product generated during the production of instant coffee, are rich in galactomannan. Mannanase can hydrolyze this compound into mannose and manno-oligosaccharides with various functional activities, thereby effectively increasing the added value of coffee grounds. In this study, the β-mannanase gene (*AnMan26*) from *Aspergillus niger* was recombinantly expressed in the engineered *A. niger* strain FBL-B. The enzymatic

**收稿日期:** 2024−12−17

**基金项目:** 国家自然科学基金（22378419）; 中国农业大学 2115 人才工程。

**作者简介:** 姚琪（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品生物加工, E-mail: S20233071534@cau.edu.cn。

*** 通信作者:** 李延啸（1989−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品生物加工, E-mail: liyanxiao2012@cau.edu.cn。

properties of the enzyme were characterized, and it was then employed to hydrolyze coffee grounds for the production of mannose and manno-oligosaccharides. The results showed that the recombinant *A. niger* produced mannanase at an expression level of 1830 U/mL after high-density fermentation for 168 h. The optimum pH of the enzyme was 5.0 and the optimum temperature was 45 ℃. The enzyme remained stable within a pH range of 3.0~7.0 and at temperatures below 45 ℃. A combination of *An*Man26 and α-galactosidase was used to hydrolyze the microwave-treated coffee grounds. After 8 h of hydrolysis, the hydrolysis rate of galactomannan in the coffee grounds reached 42.3%, with a hydrolysate yield of 20.3% coffee grounds. The main components of the hydrolysate were mannose (44.1%), mannobiose (2.5%), mannotriose (10.9%), and mannohexaose (1.5%). The excellent properties of *An*Man26 enable the effective hydrolysis of coffee grounds to produce mannose and manno-oligosaccharides, providing both theoretical and practical basis for the high-value utilization of coffee grounds.

**Key words:** *Aspergillus niger*; β-mannanase; high efficient expression; enzymatic properties; coffee grounds

咖啡渣是速溶咖啡生产过程中产生的主要副产物, 每吨咖啡豆会产生 650 公斤咖啡渣[1]。目前, 大部分咖啡渣通过填埋方式处理, 造成严重的资源浪费和环境负担。咖啡渣中含有丰富的半乳甘露聚糖, 含量可达 40% 以上(以干基计)[2]。这些半乳甘露聚糖主要由通过 β-1,4 糖苷键连接的甘露聚糖主链和通过 α-1,6 糖苷键连接的半乳糖侧链组成, 半乳糖侧链的取代度为 1% 左右[3]。因此, 咖啡渣是制备甘露糖和甘露寡糖的优良原料之一。将咖啡渣中的半乳甘露聚糖转化为高附加值的甘露糖和甘露寡糖一直是食品领域研究热点之一。

β-甘露聚糖酶是一种可以水解甘露聚糖主链中 β-1,4 糖苷键的糖苷水解酶, 是降解甘露聚糖制备甘露糖和甘露寡糖过程中最重要的酶[4]。甘露聚糖酶广泛存在于植物、动物和微生物中, 其中微生物是 β-甘露聚糖酶的最主要来源。在芽孢杆菌属(*Bacillus*)[5]、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)[6]、脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)[7] 和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)[8] 等细菌和青霉属(*Penicillium*)[9]、毛壳菌属(*Penicillium*)[10]、曲霉属(*Aspergillus*)[11] 等真菌中均发现 β-甘露聚糖酶存在。利用 β-甘露聚糖酶水解富含甘露聚糖的底物生产甘露糖和甘露寡糖已成为 β-甘露聚糖酶的一个重要应用领域。与物理和化学降解方法相比, 酶法降解更加绿色环保, 作用条件更温和, 操作更方便[12]。目前, 已有一些研究利用 β-甘露聚糖酶水解甘露聚糖底物制备甘露糖和甘露寡糖。例如, 米曲霉(*A. oryzae*)来源的 β-甘露聚糖酶可以水解槐豆胶产生甘露糖、甘露三糖和聚合度(degree of polymerization, DP)更高的甘露寡糖[13]; 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)来源的 β-甘露聚糖酶酶解角豆胶可以产生 DP 2~5 的甘露寡糖[14]。但是, 利用 β-甘露聚糖酶水解咖啡渣制备甘露糖和甘露寡糖的研究相对较少。因此, 发掘一种能够有效水解咖啡渣的 β-甘露聚糖酶, 对咖啡渣的高值化利用至关重要。

黑曲霉具有分泌蛋白能力强和培养简单的优点, 是重要的蛋白质表达系统之一[15]。美国食品药品监督管理局将其列为公认安全的(Generally Regarded As Safe, GRAS)菌种, 可用于表达多种食品酶制剂[16]。目前, 利用黑曲霉表达系统表达甘露聚糖酶的研究很少, 且表达水平较低, 难以满足甘露聚糖酶的工业应用需求。例如, 葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)来源的两种 β-甘露聚糖酶在黑曲霉中异源表达, 产酶水平分别仅为 521 和 84 U/mL[17]; 棘孢曲霉(*A. aculeatus*)来源的 β-甘露聚糖酶(*man*1)在黑曲霉中表达, 表达水平仅 995 U/mL[18]。因此, 实现 β-甘露聚糖酶在黑曲霉表达系统中高效表达具有重要意义。

在前期研究中, 发现黑曲霉来源的甘露聚糖酶 *An*Man26 具有优良的水解特性, 能够水解多种甘露聚糖底物(槐豆胶、香豆胶等)制备甘露寡糖[19]。因此, 本研究以该酶为研究对象, 将其导入黑曲霉工程菌 FBL-B 中进行高效表达, 进而研究了该酶的酶学性质, 并与 α-半乳糖苷酶复配水解咖啡渣制备甘露糖和甘露寡糖, 以期为咖啡渣高值化利用提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α(DE3)　北京博迈德科技发展有限公司; 载体 pPIC9K　美国 Invitrogen 公司; pPIC9K-*AnMan26* 质粒　本实验室构建并保藏[19]; 黑曲霉 FBL-B(Δ*gla*A, Δ*amy*A、Δ*aamy*、Δ*pyr*G、*Hyg*B+、*Ble*+)　作者所在实验室构建并保藏[20]; α-半乳糖苷酶(500 U/mL)　夏盛(北京)生物技术有限公司; 槐豆胶(locust bean gum, LBG)　美国 Sigma-Aldrich 公司; 干咖啡渣(半乳甘露聚糖含量 48%, w/w)　临沧云佳咖啡有限公司; 甘露糖(M1)、甘露二糖(M2)、甘露三糖(M3)、甘露四糖(M4)、甘露五糖(M5)、甘露六糖(M6)　爱尔兰 Megazyme 公司; 质粒提取试剂盒　聚合美生物科技(北京)有限公司; 限制性内切酶(20000 U/mL)　NEB(北京)有限公司; 胶回收试剂盒　南京诺维赞生物技术公司; 无缝克隆试剂盒　全式金生物技术有限公司; 其他试剂均为市售国产分析纯。

5 L 发酵罐　上海国强生化工程装备有限公司; AKTA 蛋白纯化系统　美国 GE Healthcare 公司; ICS-5000+高效阴离子交换色谱仪　美国 Thermo 公

司; Dionex CarboPac PA200 碳水化合物分析柱　美国 Thermo 公司。

### 1.2　实验方法

1.2.1　培养基的配制　CD 高渗培养基(w/v): 34.22% 蔗糖, 0.3%$NaNO_3$, 0.2%KCl, 0.1%$KH_2PO_4$, 0.05% $MgSO_4·7H_2O$, 0.001%$FeSO_4·7H_2O$, pH5.5, 2% 琼脂; 摇瓶培养基(w/v): 3% 脱脂豆粉, 3% 玉米浆, 5% 葡萄糖, pH5.5。DPY 培养基(w/v): 2% 葡萄糖, 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母浸粉, 0.5%$KH_2PO_4$, 0.05% $MgSO_4·7H_2O$; 高密度发酵培养基(w/v): 4% 脱脂豆粉, 3% 玉米浆, 5% 玉米淀粉水解物, 2% 葡萄糖, 1% 硫酸铵, 0.5%$CaCl_2$, 0.3%$KH_2PO_4$, pH5.5; 补料培养基(w/v): 30% 玉米淀粉水解物, 1% 玉米浆, 0.1% $KH_2PO_4$。

1.2.2　*β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)在黑曲霉中表达　以重组质粒 pPIC9K-*AnMan26* 为模板, *AnMan26*F (5′-GTCTGCACAGGGTTGGCAATGTTCGCCAAATTGTCCCTC-3′)和 *AnMan26*R(5′-TTGATGATTTCAGTAACGTTAAGTTTAAGCCCCCTCCCAGTTCA-3′)为引物扩增 *β*-甘露聚糖酶基因 *AnMan26*。PCR 扩增体系如下: 4 μL dNTPs, 5 μL Fast pfu10× buffer, 0.2 μmol/L *AnMan26*F, 0.2 μmol/L *AnMan26*R, 1 μL Fast pfu 聚合酶, 20 ng 重组质粒(pPIC9K-*AnMan26*)。PCR 扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 34 个循环, 72 ℃ 再延伸 10 min。产物经过 1% 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化, 通过无缝克隆将该基因片段与黑曲霉载体 Blunt-*pyr*G 连接, 得到重组质粒 Blunt-*pyr*G-*AnMan26*, 导入大肠杆菌 DH5*α* 感受态细胞中扩增质粒。利用 *Not*I 和 *Xho*I 对重组质粒进行双酶切, 醇沉回收后转化到黑曲霉 FBL-B 原生质体细胞中, 随后接种于 CD 高渗培养基中, 置于 34 ℃ 培养箱 5~7 d, 直至长出肉眼可见的菌落。用无菌牙签挑取单一转化子接种于 20 mL 摇瓶培养基, 34 ℃ 发酵 5~7 d 后取发酵液, 测定酶活力。

1.2.3　高密度发酵产 *β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)　将黑曲霉转化子接种于 10 mL DPY 培养基, 34 ℃ 培养 72 h, 作为一级种子液。将一级种子液接种于 300 mL DPY 培养基(接种量 5%, v/v), 34 ℃ 培养 60 h, 作为二级种子液。将二级种子液接种(二级种子液与高密度发酵培养基体积比 1∶10)到 5 L 发酵罐中(装有 3 L 高密度发酵培养基), 进行高密度发酵。发酵 48 h 后, 每 24 h 补加 200 mL 补料培养基, 发酵 96 h 后, 每 24 h 补加 100 mL 补料培养基, 共发酵 168 h。发酵期间, 发酵温度为 34 ℃, 搅拌桨转速 300 r/min, 发酵液 pH5.5, 通过调节通气量使发酵液溶氧大于 5%。每 24 h 取样, 测定发酵液酶活力和蛋白浓度。

1.2.4　*β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)的纯化　将高密度发酵所得发酵液离心(10000×g, 10 min), 收集上清液在 4 ℃ 下于 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH9.0)中透析 12 h, 随后于 10000×g 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。使用 Q-Sepharose Fast Flow 柱(10×50 mm)纯化 *β*-甘露聚糖酶。首先用 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH9.0)平衡柱子 1~2 h, 将粗酶液上样于平衡好的 Q-Sepharose Fast Flow 柱, 流速 0.5 mL/min; 随后用含有 0~500 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH9.0)洗脱目的蛋白, 流速 1.0 mL/min。洗脱过程在 AKTA 蛋白纯化系统上进行, 收集有酶活的组分, 在柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH5.0)中 4 ℃ 下透析 12 h, 得到纯酶液。分别计算粗酶液和纯酶液的总酶活力、总蛋白含量、比酶活力、纯化倍数和回收率。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白质纯度, 用去糖基化酶 PNGase-F 处理纯酶液, 利用在线软件 NetNGlyc 1.0 Server( https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/)分析蛋白糖基化现象。

1.2.5　*β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)酶活力和蛋白浓度的测定　酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸[21](3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法: 在 900 μL 槐豆胶溶液(0.5%, w/v, 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH5.0)中加入 100 μL 用柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH5.0)适当稀释的酶液, 混合均匀后在 45 ℃ 下反应 10 min, 加入 1 mL DNS 试剂, 沸水浴 15 min 后迅速冷却, 加入 1 mL 40%(w/v)的酒石酸钾钠溶液, 在 540 nm 下测定吸光度。在上述反应条件下, 每分钟生成 1 μmol 还原糖(以甘露糖为标准)所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白, 参照 Lowry 法测定酶液中的蛋白浓度[22]。比酶活力定义为 1 mg 酶蛋白所具有的酶活力单位。

1.2.6　*β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)的酶学性质　最适 pH 的测定: 按照标准方法在不同 pH 条件下测定 *β*-甘露聚糖酶的酶活力, 以酶活力最大值为 100%, 计算各 pH 下的相对酶活力。所用缓冲液包括 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH3.0~6.0)和 50 mmol/L 3-吗啉丙磺酸(MOPS)缓冲液(pH6.0~8.0)。

pH 稳定性测定: 分别利用上述缓冲液稀释酶液(稀释后蛋白含量大于 1 mg/mL), 置于 30 ℃ 下处理 30 min, 按照标准方法测定不同 pH 下的残余酶活力, 以未经处理的酶液为对照。

最适温度测定: 按照标准方法测定 30~80 ℃ 下的酶活力, 以酶活力最大值为 100%, 计算各温度下的相对酶活力。

温度稳定性测定: 用 50 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH5.0)稀释酶液(稀释后蛋白含量大于 1 mg/mL), 在不同温度下(30~80 ℃)保温 30 min, 按照标准方法测定不同温度下的残余酶活力, 以未经处理的酶液为对照。

1.2.7　*β*-甘露聚糖酶(*An*Man26)水解咖啡渣　咖啡渣预处理: 将一定量的咖啡渣放入多功能粉碎机,

粉碎后过 60 目筛。取 5 g 粉碎后的咖啡渣，加入 100 mL 蒸馏水，置于微波炉中微波处理一定时间，过滤得到固体，置于 105 ℃ 烘干至恒重后，置于干燥器内备用。依次优化处理的微波功率（175、350、525 和 700 W，处理时间 5 min）和处理时间（1、2.5、5、7.5 和 10 min，微波功率 350 W），以水解后甘露糖和甘露寡糖产量来评估微波预处理效果。

水解咖啡渣：将 5 g 微波处理后的咖啡渣与 100 mL 柠檬酸缓冲液（50 mmol/L，pH5.0）混合，加入 β-甘露聚糖酶和 α-半乳糖苷酶，加酶量分别为 400 和 40 U/mL，在 40 ℃、200 r/min 下水解 8 h，水解过程中于不同时间点（0.5、1、2、4、8 h）取样，沸水浴灭酶 15 min，10000×g 离心 10 min，上清液冷冻干燥后得到水解产物，将水解产物贮存在 25 ℃ 下用于后续分析。利用公式（1）计算水解产物得率，利用公式（2）计算咖啡渣中半乳甘露聚糖水解率。

$$\text{水解产物得率}(\%) = \frac{m_0}{m} \times 100 \qquad \text{式（1）}$$

$$\text{咖啡渣中半乳甘露聚糖水解率}(\%) = \frac{m_1 + m_2}{m_3} \times 100 \qquad \text{式（2）}$$

式中：m 表示咖啡渣原料质量，g；$m_0$ 表示水解产物质量，g；$m_1$ 表示甘露糖质量，g；$m_2$ 表示甘露寡糖质量，g；$m_3$ 表示咖啡渣中半乳甘露聚糖质量，g。

1.2.8　咖啡渣水解产物组分分析　将水解产物用纯水适当稀释后过 0.22 μm 滤膜，利用高效阴离子交换色谱仪 ICS5000-安培检测器进行组成分析[23]。色谱柱为 CarboaPac PA200（4.0×250 mm），柱温 30 ℃。流动相 A：纯水；流动相 B：1 mol/L NaOH；流动相 C：1 mol/L 乙酸钠。洗脱条件如下：0~5 min，90% A+10%B；5~15 min，85%A+10%B+5%C；15~16 min，50%B+50%C；16~19 min，90%A+10%B，流速 1.0 mL/min。以甘露糖、甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖、甘露五糖、甘露六糖为标准品。

### 1.3　数据处理

所有实验均重复 3 次，实验结果以平均值和标准差的形式表示。使用 SPSS 19 软件对数据进行处理，采用单因素方差分析（ANOVA）。采用邓肯检验对数据进行显著性分析，$P<0.05$ 说明差异显著。利用 Origin 2019b 软件进行图片绘制。

## 2　结果与分析

### 2.1　β-甘露聚糖酶（*An*Man26）在黑曲霉中高效表达

以重组质粒 pPIC9K-*AnMan26* 为模板，PCR 扩增目的基因，得到长度为 954 bp 的目的片段，经 *Not*I 和 *Xho*I 双酶切后，与同样经过双酶切的载体 Blunt-*pyr*G 连接，得到重组表达载体 Blunt-*pyr*G-*AnMan26*。将 Blunt-*pyr*G-*AnMan26* 转化至黑曲霉工程菌 FBL-B 中，成功实现 *AnMan26* 的表达，随后对转化子进行筛选，选取摇瓶发酵酶活力最高（630 U/mL）的转化子在 5 L 发酵罐中进行高密度发酵。随着发酵进行，发酵液中 β-甘露聚糖酶的酶活力和蛋白含量均逐渐增加。发酵 168 h 后，β-甘露聚糖酶的酶活力达 1830 U/mL，蛋白浓度达 3.44 mg/mL（图 1a）。SDS-PAGE 分析表明，发酵开始后在 66 kDa 附近检测到弥散的蛋白条带，即为 β-甘露聚糖酶蛋白条带，且蛋白条带逐渐变粗（图 1b）。

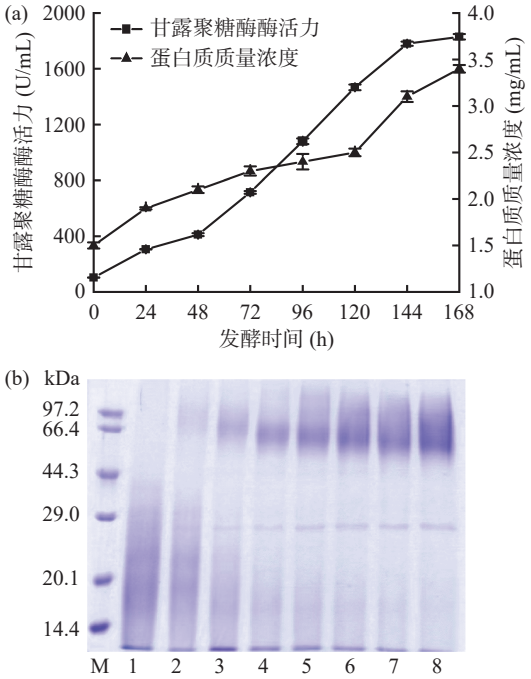



图 1　β-甘露聚糖酶（*An*Man26）高密度发酵历程（a）及 SDS-PAGE 分析（b）

Fig.1　High density fermentation of β-mannanase (*An*Man26) (a) and SDS-PAGE analysis (b)

注：M：低相对分子质量标准蛋白质；泳道 1~8 分别为 0、24、48、72、96、120、144、168 h 的发酵上清液。

目前仅有少数 β-甘露聚糖酶在黑曲霉中成功表达，但这些甘露聚糖酶的产酶水平较低。例如，里氏木霉（*Trichodermareesei*）来源的 β-甘露聚糖酶在黑曲霉中的产酶水平仅为 20 U/mL[24]，葡萄穗霉来源的两种 β-甘露聚糖酶在黑曲霉中的产酶水平分别仅为 521 和 84 U/mL[17]。本研究将黑曲霉来源的 β-甘露聚糖酶（*An*Man26）在黑曲霉工程菌中表达后产酶水平达 1830 U/mL，明显高于其他已报道 β-甘露聚糖酶在黑曲霉中的产酶水平。

### 2.2　β-甘露聚糖酶（*An*Man26）的纯化

粗酶液经 Q-Sepharose 阴离子交换层析一步纯化得到电泳级纯酶，纯化倍数为 1.4，纯酶比酶活力 218.5±23.8 U/mg，回收率 32.6%（表 1）。经 SDS-PAGE 分析，该酶在 66 kDa 附近呈弥散条带（图 2），可能是该酶在黑曲霉表达过程中出现糖基化修饰所导致。经去糖基化酶 PNGase-F 处理后，弥散条带变为单一条带，分子量为 40 kDa，与预测的分子量一致。

用 NetNGlyc 1.0 Server 软件在线分析 β-甘露聚糖酶 *An*Man26 中的 N-糖基化修饰位点。发现

表 1 β-甘露聚糖酶(*An*Man26)的纯化

Table 1 Purification of β-mannanase (*An*Man26)

| 纯化步骤 | 总酶活力(U) | 总蛋白含量(mg) | 比酶活力(U/mg) | 纯化倍数 | 回收率(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 粗酶液 | 21325.0±873.0 | 132.1±1.6 | 161.4±9.4 | 1.0 | 100.0 |
| Q-Sepharose阴离子交换层析(纯酶) | 6948.0±159.8 | 31.8±1.8 | 218.5±23.8 | 1.4 | 32.6 |

注: 总酶活力(U)=酶液酶活力(U/mL)×酶液体积(mL); 总蛋白含量(mg)=酶液蛋白浓度(mg/mL)×酶液体积(mL); 比酶活力(U/mg)=总酶活力(U)/总蛋白含量(mg); 纯化倍数=纯酶比酶活力(U/mg)/粗酶比酶活力(U/mg); 回收率(%)=纯酶总酶活力(U)/粗酶总酶活力(U)×100。

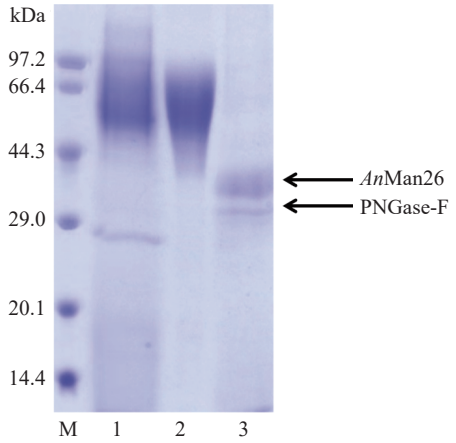



图 2 β-甘露聚糖酶(*An*Man26)的纯化电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purification of β-mannanase (*An*Man26)

注: M: 低相对分子质量标准蛋白质; 泳道 1: 粗酶液; 泳道 2: 纯酶液; 泳道 3: *An*Man26 去糖基化。

*An*Man26 存在 4 个天然 N-糖基化位点, 分别是 $Asn^{3}$-$Gln^{4}$-$Thr^{5}$、$Asn^{124}$-$Val^{125}$-$Ser^{126}$、$Asn^{134}$-$Gly^{135}$-$Thr^{136}$、$Asn^{305}$-$Asp^{306}$-$Thr^{307}$, 其中第 305 位的 NDT 发生糖基化修饰的可能性较小, 而第 3 位 NQT、第 124 位 NVS 和第 134 位 NGT 发生糖基化修饰的可能性较大。在之前研究中, 发现该酶在毕赤酵母表达中也发生糖基化现象[19]。通常, 真核表达的蛋白质都会有不同程度的糖基化修饰。例如, 喜热梭孢壳来源的 β-甘露聚糖酶 *Mt*Man1 存在 1 个 N-糖基化位点[25], 嗜热毛壳菌来源的 β-甘露聚糖酶 *Ct*Man26 存在 1 个 N-糖基化位点[26], 它们在毕赤酵母中表达后分子量分别为 60 和 55 kDa, 但经去糖基化酶处理后分子量均降低至 50 kDa, 与预测分子量一致。

### 2.3 *An*Man26 的酶学性质

*An*Man26 的最适 pH 为 5.0(图 3a), 在 pH3.0~7.0 下具有良好的稳定性, 处理 30 min 后, 仍保留 70% 以上的残余酶活力(图 3b)。该酶的最适温度为 45 ℃(图 3c), 在 45 ℃ 以下具有良好的稳定性, 处理 30 min 后仍有 80% 以上的残余酶活力(图 3d)。

与在毕赤酵母中表达相比, *An*Man26 在黑曲霉中的最适 pH 没有发生变化[19]。*An*Man26 能够在 pH3.0 下仍保持 70% 以上的残余酶活力, 说明该酶具有良好的耐酸性, 明显优于枯草芽孢杆菌 YZ-21 来源的 β-甘露聚糖酶 ManA(pH3.0 下残余酶活力为 15%)[27] 和多粘类芽孢杆菌(*P. polymyxa*)来源的 *Pp*Man26A(pH3.0 下残余酶活力几乎为 0)[28]。

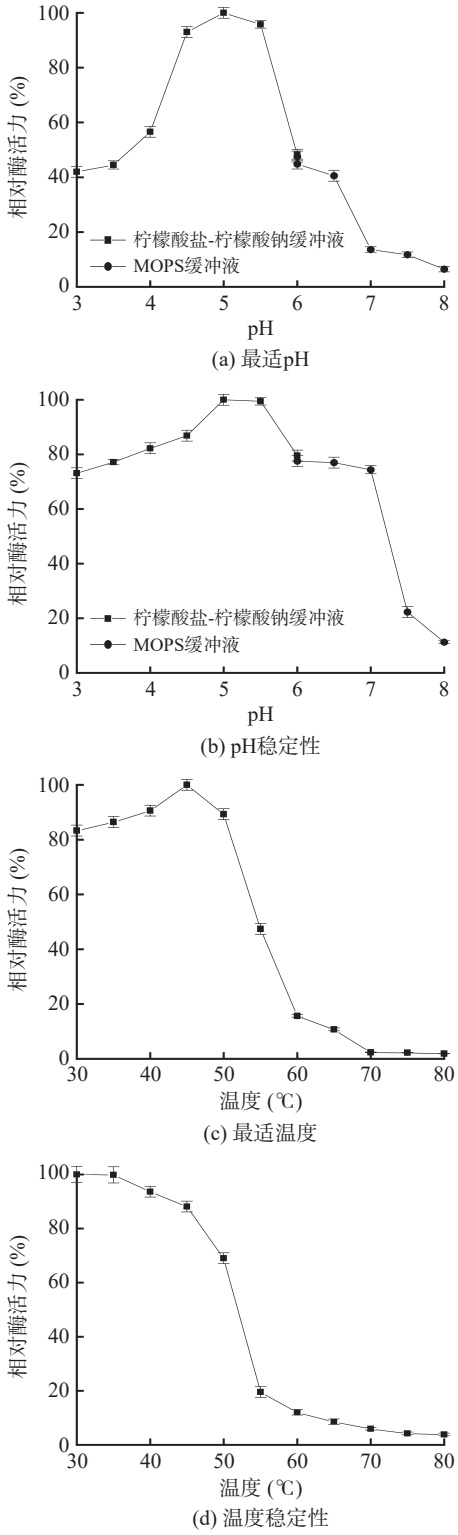



图 3 *An*Man26 的最适 pH(a)及 pH 稳定性(b)、最适温度(c)及温度稳定性(d)

Fig.3 *An*Man26 optimum pH (a) and pH stability (b), optimal temperature (c) and temperature stability (d)

*An*Man26 的最适温度为 45 ℃，低于米黑根毛霉（*Rhizomucor miehei*）β-甘露聚糖酶 *Rm*Man5A（55 ℃）[29] 和热焦曲霉（*A. calidoustus*）β-甘露聚糖酶 ManAC（70 ℃）[30]。*An*Man26 在 45 ℃ 以下保持稳定，相较于多粘类芽孢杆菌 A-8 来源的 β-甘露聚糖酶 ManB（40 ℃）[31] 和鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium* sp.）GN25 来源的 β-甘露聚糖酶（37 ℃）[32]，*An*Man26 具有良好的热稳定性。

### 2.4　*An*Man26 制备咖啡渣甘露寡糖

为提高 β-甘露聚糖酶对咖啡渣的水解效率，对咖啡渣进行微波预处理。经单因素条件优化，预处理最佳条件为微波功率 350 W、处理时间 5 min（图 4）。在此条件下，利用 *An*Man26 和 α-半乳糖苷酶复配水解咖啡渣 8 h，水解产物的得率为 20.3%，咖啡渣中半乳甘露聚糖的水解率达 42.3%。高效阴离子交换色谱分析表明，所得水解产物由甘露糖、甘露二糖、甘露三糖和少量的甘露四糖和甘露六糖组成，其中甘露糖含量为 44.1%（w/w），甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖和甘露六糖的含量分别为 2.5%、10.9%、0.5% 和 1.5%（表 2）。

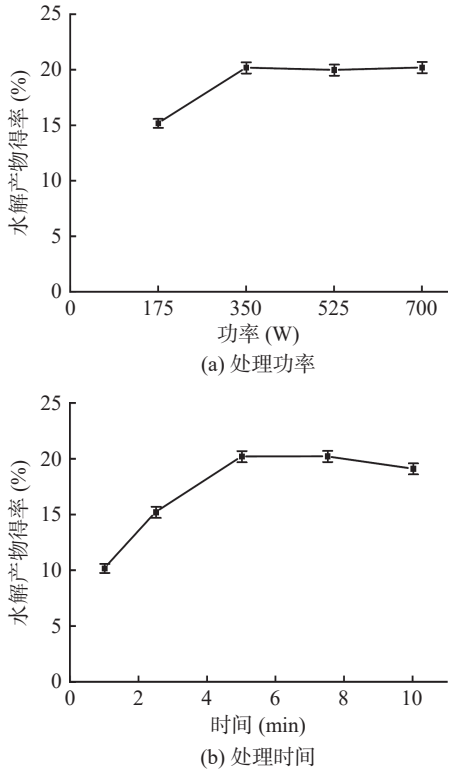



图 4　处理功率和处理时间对水解产物得率的影响

Fig.4　Effect of treatment power and time on hydrolysate yield

处理功率和处理时间是微波处理效果的两大影响因素。经微波处理后的咖啡渣内部结构更松散，增加甘露聚糖酶与底物的接触面积。微波处理方法相比于蒸汽爆破等其他物理化学方法，具有装备复杂性低、能耗低的优点[33]。在最佳微波处理条件下（350 W，5 min），咖啡渣的水解率达 42.3%，水解产物得率达 20.3%，效果优于已报道的大部分 β-甘露聚糖酶。Yoo 等[34] 利用链霉菌（*Streptomycetaceae* sp.）来源的 β-甘露聚糖酶 Man147 水解咖啡渣，咖啡渣中的甘露聚糖水解率仅为 18%。Chiyanzu 等[35] 用棘孢曲霉来源的 β-甘露聚糖酶和纤维素酶复配水解咖啡渣，甘露寡糖的产量为 14.64%。因此，利用微波处理咖啡渣后进行 *An*Man26 和 α-半乳糖苷酶复配水解是一种有效的制备甘露糖和甘露寡糖的方法。

表 2　甘露糖和甘露寡糖（DP≤6）各组分在咖啡渣水解物中含量

Table 2　Content of mannose and manno-oligosaccharides (DP≤6) in the hydrolysate of coffee grounds

| 水解时间（h） | 含量（%） | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M6 |
| 0.5 | 17.2±0.1 | 3.6±0.1 | 7.6±0.0 | 2.4±0.1 | 0.9±0.1 |
| 1 | 30.8±0.0 | 3.6±0.0 | 9.3±0.0 | 3.0±0.0 | 1.5±0.1 |
| 2 | 41.4±0.1 | 2.4±0.1 | 10.4±0.0 | 1.7±0.1 | 2.0±0.1 |
| 4 | 42.5±0.0 | 2.8±0.1 | 10.9±0.1 | 1.7±0.0 | 1.9±0.0 |
| 8 | 44.1±0.0 | 2.5±0.0 | 10.9±0.0 | 0.5±0.1 | 1.5±0.0 |

注：M1~M6分别为：甘露糖、甘露二糖、甘露三糖、甘露四糖、甘露六糖。

## 3　结论

本研究利用黑曲霉工程菌 FBL-B 成功表达黑曲霉来源 β-甘露聚糖酶 *An*Man26，经高密度发酵，产酶水平达 1830 U/mL。该酶具有优异的耐酸性（pH3.0 下仍保持 70% 以上活性）和良好的热稳定性（45 ℃ 以下稳定），在食品、饲料等领域具有很好的应用潜力。进一步采用微波预处理（350 W，5 min）结合 *An*Man26 与 α-半乳糖苷酶复配水解工艺，咖啡渣水解率达 42.3%，产物得率达 20.3%。*An*Man26 可以将农业副产物咖啡渣转化为具有多种功能活性的甘露糖和甘露寡糖产品，在咖啡渣高值化利用等方面具有良好的应用前景。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献

[1] SARATALE D G, BHOSALE R, SHOBANA S, et al. A review on valorization of spent coffee grounds (SCG) towards biopolymers and biocatalysts production[J]. Bioresource Technology, 2020, 314: 123800.

[2] TSAFRAKIDOU P, MOUTSOGLOU A, PRODROMIDIS P, et al. Aqueous ammonia soaking pretreatment of spent coffee grounds for enhanced enzymatic hydrolysis: A bacterial cellulose production application[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023, 33: 101121.

[3] LÓPEZ-LINARES J C, GARCÍA-CUBERO M T, COCA M, et al. Efficient biobutanol production by acetone-butanol-ethanol fermentation from spent coffee grounds with microwave assisted dilute sulfuric acid pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2021, 320: 124348.

[4] DHAWAN S, KAUR J. Microbial mannanases: An overview of production and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2007, 27(4): 197−216.

[5] LIU Wenting, MA Cuiping, LIU Weidong, et al. Functional

and structural investigation of a novel β-mannanase *Ba*Man113A from *Bacillus* sp. N16-5[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 899−909.
[6] CORDEIRO R L, PIROLLA R A S, PERSINOTI G F, et al. N-glycan utilization by *Bifidobacterium* gut symbionts involves a specialist β-mannosidase[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(4): 732−747.
[7] XIA Wei, LU Haiqiang, XIA Mengjuan, et al. A novel glycoside hydrolase family 113 endo-β-1,4-mannanase from *Alicyclobacillus* sp. strain A4 and insight into the substrate recognition and catalytic mechanism of this family[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(9): 2718−2727.
[8] PHAKEENUYA V, RATANAKHANOKCHAI K, KOSUGI A, et al. A novel multifunctional GH9 enzyme from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 exhibiting endo/exo functions of cellulase, mannanase and xylanase activities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(5): 2079−2096.
[9] BANGORIA P, PATEL A, SHAH A R. Characterization of a fungal α-galactosidase and its synergistic effect with β-mannanase for hydrolysis of galactomannan[J]. Carbohydrate Research, 2023, 531: 108893.
[10] NATH S, KANGO N. Optimized production and characterization of endo-β-mannanase by *Aspergillus niger* for generation of prebiotic mannooligosaccharides from guar gum[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 14015.
[11] SAKAI K, MOCHIZUKI M, YAMADA M, et al. Biochemical characterization of thermostable β-1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(8): 3237−3245.
[12] YAMABHAI M, SAK-UBOL S, SRILA W, et al. Mannan biotechnology: From biofuels to health[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(1): 32−42.
[13] JANA U K, SURYAWANSHI R K, PRAJAPATI B P, et al. Production optimization and characterization of mannooligosaccharide generating β-mannanase from *Aspergillus oryzae*[J]. Bioresource Technology, 2018, 268: 308−314.
[14] 者园园, 苗华彪, 吴倩, 等. 耐热 β-甘露聚糖酶的异源表达及低聚寡糖制备研究[J]. 饲料研究, 2021, 44(23): 63−68. [ZHE Yuanyuan, MIAO Huabiao, WU Qian, et al. Heterologous expression of thermotolerant β-mannanase and preparation of oligosaccharides[J]. Feed Research, 2021, 44(23): 63−68.]
[15] WÖSTEN H A B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 59: 65−70.
[16] SRIVASTAVA P K, KAPOOR M. Production, properties, and applications of endo-β-mannanases[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(1): 1−19.
[17] 杨家兴, 王华明, 路福平. 葡萄穗霉中 β-甘露聚糖酶基因在黑曲霉中的表达及酶学性质[J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1242−1255. [YANG Jiaxing, WANG Huaming, LU Fuping. Expression in *Aspergillus niger* and characterization of β-mannanases from *Stachybotrys chartarum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(8): 1242−1255.]
[18] van ZYL P J, MOODLEY V, ROSE S H, et al. Production of the *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-beta-mannanase in *A. niger*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(4): 611−617.
[19] WANG Nannan, LIU Jun, LI Yanxiao, et al. High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β-mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum[J]. Process Biochemistry, 2021, 100: 90−97.
[20] HAN Susu, XUE Yibin, YAN Qiaojuan, et al. Development of a two-enzyme system in *Aspergillus niger* for efficient production of N-acetyl-β-D-glucosamine from powdery chitin[J]. Bioresource Technology, 2024, 393: 130024.
[21] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426−428.
[22] LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265−275.
[23] ZHANG Z Q, KHAN N M, NUNEZ K M, et al. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(9): 4104−4110.
[24] 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.
[25] 施鑫磊, 方韵颖, 尉俏女, 等. 一种来源于喜热梭孢壳的耐热型 β-甘露聚糖酶[J]. 微生物学报, 2021, 61(9): 2815−2828. [SHI Xinlei, FANG Yunying, WEI Qiaonü, et al. Characterization of a hyperthermostable β-mannanase from *Thermothelomyces thermophilus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(9): 2815−2828.]
[26] 张怡然, 谷新晰, 谈苏慧, 等. 嗜热毛壳菌甘露聚糖酶 Ct Man26 的性质及其在甘露寡糖制备中的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(21): 157−165. [ZHANG Yiran, GU Xinxi, TAN Suhui, et al. Characterization of mannanase Ct Man26 from *Chaetomium thermophilum* and its application in mannooligosaccharide preparation[J]. Food Science, 2024, 45(21): 157−165.]
[27] 和子涵, 穆广亚, 贾一然, 等. 椰果内生枯草芽孢杆菌 YZ-21 甘露聚糖酶基因的克隆、表达及酶学性质研究[J]. 饲料工业, 2023, 44(15): 71−78. [HE Zihan, MU Guangya, JIA Yiran, et al. Cloning, expression and enzymatic properties of mannanase gene from *Bacillus subtilis* YZ-21 in coconut[J]. Feed Industry, 2023, 44(15): 71−78.]
[28] GAO Juan, ZHENG Haolei, WANG Xiaoqian, et al. Characterization of a novel GH26 β-mannanase from *Paenibacillus polymyxa* and its application in the production of mannooligosaccharides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 165: 110197.
[29] KATROLIA P, YAN Q J, ZHANG P, et al. Gene cloning and enzymatic characterization of an alkali-tolerant endo-1,4-β-mannanase from *Rhizomucor miehei*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(2): 394−401.
[30] SUN Dengyue, ZHANG Jie, LI Chao, et al. Biochemical and structural characterization of a novel thermophilic and acidophilic β-mannanase from *Aspergillus calidoustus*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 150: 109891.
[31] BAI Xi, HU Hong, CHEN Huaping, et al. Expression of a β-mannosidase from *Paenibacillus polymyxa* A-8 in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111622.
[32] ZHANG Rui, ZHOU Junpei, GAO Yajie, et al. Molecular and biochemical characterizations of a new low-temperature active mannanase[J]. Folia Microbiologica, 2015, 60(6): 483−492.
[33] ZHAO Xuebing, ZHOU Yujie, ZHENG Guangjian, et al. Microwave pretreatment of substrates for cellulase production by solid-state fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(5): 1557−1571.
[34] YOO H Y, PRADEEP G C, LEE S K, et al. Understanding β-mannanase from *Streptomyces* sp. CS147 and its potential application in lignocellulose based biorefining[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(12): 1894−1902.
[35] CHIYANZU I, BRIENZO M, GARCÍA-APARICIO M P, et al. Application of endo-β-1,4,D-mannanase and cellulase for the release of mannooligosaccharides from steam-pretreated spent coffee ground[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(7): 3538−3557.