

北风类芽孢杆菌木葡聚糖酶的表达、性质及在苹果渣木葡寡糖制备中的应用

田嘉欣, 杨 行, 赵玉琪, 闫巧娟, 李延啸, 江正强

Expression and Characterization of Xyloglucanase from *Paenibacillus borealis* and Its Application in the Production of Xylogluco-oligosaccharides from Apple Pomace

TIAN Jiaxin, YANG Hang, ZHAO Yuqi, YAN Qiaojuan, LI Yanyao, and JIANG Zhengqiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060437>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的克隆表达及重组酶性质研究

Cloning, Expression and Characterization of Recombinant β -mannanase from *Bacillus subtilis*

食品工业科技. 2020, 41(6): 88-93, 105 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.06.015>

超声辅助低共熔溶剂提取苹果叶中的总黄酮

Ultrasonic-assisted Deep Eutectic Solvents Extraction of Total Flavonoids from Apple Leaves

食品工业科技. 2020, 41(14): 134-139, 147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.022>

毛壳霉木聚糖酶B (CsXyn11B) 的分泌表达及其在面包中的应用

Secretion Expression of Xylanase B (CsXyn11B) from *Chaetomium* sp. and Its Application in Bread

食品工业科技. 2023, 44(4): 108-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050335>

多粘类芽孢杆菌新普鲁兰酶基因克隆及其在大肠杆菌中的表达

Cloning of Neopullulanase Gene from *Paenibacillus polymyxa* and Its Expression in *Escherichia coli*

食品工业科技. 2020, 41(15): 119-123, 128 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.019>

芽孢杆菌发酵液的抑菌活性及葡聚糖酶的基因克隆、表达分析

Antifungal Activity of *Bacillus* Fermentation Broth, and Gene Cloning, Prokaryotic Expression of Endoglucanase

食品工业科技. 2023, 44(8): 144-152 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070015>

铁皮石斛多糖的低共熔溶剂提取工艺优化

Optimization of Deep Eutectic Solvent Extraction Process of Polysaccharides from *Dendrobium officinale*

食品工业科技. 2024, 45(3): 218-225 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050089>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

田嘉欣, 杨行, 赵玉琪, 等. 北风类芽孢杆菌木葡聚糖酶的表达、性质及在苹果渣木葡寡糖制备中的应用 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(11): 142–150. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060437

TIAN Jiaxin, YANG Hang, ZHAO Yuqi, et al. Expression and Characterization of Xyloglucanase from *Paenibacillus borealis* and Its Application in the Production of Xylogluco-oligosaccharides from Apple Pomace[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(11): 142–150. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060437

· 生物工程 ·

北风类芽孢杆菌木葡聚糖酶的表达、性质及在苹果渣木葡寡糖制备中的应用

田嘉欣¹, 杨行², 赵玉琪¹, 闫巧娟², 李延啸^{2,3,*}, 江正强^{1,4}

(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;

3. 中原食品实验室, 河南漯河 462300;

4. 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)

摘要: 苹果渣含有丰富的木葡聚糖, 是制备具有多种功能活性的木葡寡糖的优良原料, 利用新型木葡聚糖酶水解苹果渣有望实现其高值利用。本研究将北风类芽孢杆菌来源的 GH74 家族木葡聚糖酶基因 (*PbXEG74B*) 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中异源表达, 对其酶学性质进行表征, 进而利用该酶水解苹果渣制备木葡寡糖。结果表明: 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 在大肠杆菌中的表达量为 18.0 U/mL。该酶最适 pH 为 5.5, 最适温度为 55 °C, 在 pH4.5~8.5 和 40 °C 以下具有良好的稳定性。该酶水解木葡聚糖主要产生聚合度 2~9 的寡糖。在最适条件下, 利用 *PbXEG74B* 水解低共熔溶剂预处理的苹果渣能够制得聚合度 2~9 的木葡寡糖, 得率为 2.79 g/100 g 苹果渣, 其中聚合度 2~4、5~6 和 7~9 的寡糖占比分别为 67.0%、11.5% 和 21.5%。木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 的酶学性质和水解特性优异, 在木葡寡糖制备中具有良好的应用潜力, 为苹果渣的高值化利用提供了理论基础和实践依据。

关键词: 北风类芽孢杆菌, 木葡聚糖酶, 苹果渣, 木葡寡糖, 低共熔溶剂

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)11-0142-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024060437



本文网刊:

Expression and Characterization of Xyloglucanase from *Paenibacillus borealis* and Its Application in the Production of Xylogluco-oligosaccharides from Apple Pomace

TIAN Jiaxin¹, YANG Hang², ZHAO Yuqi¹, YAN Qiaojuan², LI Yanxiao^{2,3,*}, JIANG Zhengqiang^{1,4}

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

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

3. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China;

4. College of Food Science and Engineering, Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: Apple pomace (AP) is rich in xyloglucan, serves as a substrate to produce xylogluco-oligosaccharides with various functional activities. The hydrolysis of AP by novel xyloglucanases is conducive to the high-value utilization of AP. In this study, a novel GH74 xyloglucanase gene (*PbXEG74B*) from *Paenibacillus borealis* was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The enzyme was characterized and further used to hydrolyze AP for xylogluco-

收稿日期: 2024-07-01

基金项目: 国家自然科学基金 (22378419)。

作者简介: 田嘉欣 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品酶工程, E-mail: S20223061142@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。

oligosaccharides production. It was expressed in *E. coli* with an expression level of 18.0 U/mL. The optimal conditions of PbXEG74B were pH 5.5 and 55 °C. It showed good stability in the pH range of 4.5~8.5 and temperatures up to 40 °C. The enzyme hydrolyzed xyloglucan to produce xylogluco-oligosaccharides with degrees of polymerization (DP) of 2~9. AP was pretreated with deep eutectic solvents (DESs) and hydrolyzed by PbXEG74B to produce xylogluco-oligosaccharides. Under optimal conditions, the yield of xylogluco-oligosaccharides with DP 2~9 was 2.79 g/100 g AP, containing 67.0%, 11.5%, and 21.5% of xylogluco-oligosaccharides with DP 2~4, 5~6, and 7~9, respectively. PbXEG74B with good enzymatic and hydrolytic properties shows great potential in the high value utilization of AP.

Key words: *Paenibacillus borealis*; xyloglucanase; apple pomace; xylogluco-oligosaccharide; deep eutectic solvents

功能性寡糖的聚合度(degree of polymerization, DP)是影响其功能的重要因素之一,不同聚合度寡糖的作用位置和功能活性往往不同^[1]。例如,低聚合度和多支链的果寡糖有利于近端结肠有益菌的快速增殖,而高聚合度的果寡糖能够促进远端结肠有益菌增殖^[2]。作为一种新型功能性寡糖,木葡寡糖(xylogluco-oligosaccharides, XyGOs)是木葡聚糖(Xyloglucan, XyG)降解得到的寡糖,具有改善食品特性、调节肠道菌群、降低血糖血脂、提高脂质代谢等功能活性^[3-6]。酶解法制备木葡寡糖具有高效可控、绿色环保、操作简单等优点,是木葡寡糖最主要的生产方法。然而,由于木葡聚糖单糖组成丰富,含有较多支链^[7],酶法制备的木葡寡糖主要为高聚合度组分(DP 7~9),而低聚合度组分(DP 2~4)含量很少。因此,开发含有低聚合度组分(DP 2~4)的木葡寡糖能够丰富其功能活性,有助于木葡寡糖的应用与推广。

木葡聚糖酶(EC 3.2.1.151)能够水解由 β -葡萄糖残基通过 β -1,4糖苷键连接的木葡聚糖主链,是木葡聚糖水解过程中最重要的酶,分属糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH) 5、9、12、16、44、45 和 74 家族。利用基因工程菌对木葡聚糖酶进行异源表达是当前研究热点之一。日本纤维弧菌、污染叉丝孔菌和土曲霉等多种微生物来源的木葡聚糖酶在大肠杆菌、毕赤酵母、构巢曲霉等异源宿主中成功表达^[8-10]。其中,米黑根毛霉来源的木葡聚糖酶 RmXEG12A 在毕赤酵母中表达水平达 25700 U/mL,是目前木葡聚糖酶的最高表达水平^[3]。木葡聚糖酶已广泛应用于生物炼制、饲料加工和木葡寡糖生产等领域^[11-13]。目前,用于制备木葡寡糖的木葡聚糖酶多数来源于 GH12 家族,如米黑根毛霉来源的木葡聚糖酶 RmXEG12A^[3]、意大利青霉菌来源的木葡聚糖酶 PiGH12A^[14]和雪白曲霉来源的木葡聚糖酶 XegA^[15]。该家族木葡聚糖酶主要水解未被取代的 β -葡萄糖(G)处的糖苷键,得到聚合度为 7~9 的木葡寡糖。与 GH12 家族不同,一些 GH74 家族木葡聚糖酶能够水解含有 α -1,6-木糖取代基的 β -葡萄糖(X)处的糖苷键,产生聚合度更低(DP 2~4)的寡糖^[16],是更具潜力的木葡寡糖制备酶种。然而,目前关于 GH74 家族木葡聚糖酶的研究多集中于它们的分子结构和酶学性质,其应用研究尚不充分。

苹果渣是苹果汁生产的主要副产物,全球每年产量超 2000 万吨^[17]。苹果渣中含有丰富的木葡聚

糖,是制备木葡寡糖的潜在底物^[18]。然而,苹果渣中的木葡聚糖与纤维素和木质素通过氢键和共价键相连形成木质纤维素,难以直接水解^[19],开发合适的预处理和水解方法对水解苹果渣制备木葡寡糖十分重要。低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DESs)可以破坏木质素、纤维素与半纤维素之间的氢键,使生物质组织结构变得疏松^[20],已成为生物质预处理的重要方法之一。利用天然低共熔溶剂(氯化胆碱/甘油、氯化胆碱/乳酸和碳酸钾/甘油)可以有效去除苹果渣中的果胶^[21]。目前,利用低共熔溶剂处理苹果渣制备木葡寡糖的文献报道较少。

北风类芽孢杆菌(*Paenibacillus borealis*)是一种具有固氮作用的革兰氏阳性菌,能产生多种水解酶,分解酪蛋白、羟甲基纤维素、甲壳素、果胶和蛋黄卵磷脂等^[22]。本研究将北风类芽孢杆菌(*Paenibacillus borealis*)来源的 GH74 家族木葡聚糖酶基因(PbXEG74B)在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中异源表达,对该酶的酶学性质和水解特性进行系统研究,并利用该酶水解 DESs 预处理的苹果渣制备木葡寡糖,旨在提供一种能够用于制备木葡寡糖的新型木葡聚糖酶,为苹果渣的高值化利用提供良好的理论基础和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态 北京全式金生物技术有限公司;木葡聚糖 爱尔兰 Megazyme 公司;纤维二糖(G_2)、纤维三糖(G_3)、纤维四糖(G_4) 阿拉丁试剂(上海)有限公司;木葡七糖(XXXG)、木葡九糖(XLLG,在 X 基础上以 β -1,2糖苷键在木糖残基上连接一个 D-半乳糖残基为 L) 瑞士 Biosynth 公司;聚合度 7~9 木葡寡糖(HPLC $\geq$ 90%) 实验室自制^[3];苹果渣(苹果榨汁后的残渣烘干至恒重,木葡聚糖含量 10%,w/w) 中国汇源果汁集团有限公司;其他试剂若无特殊说明均为分析纯。

TU-1901 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器设备有限责任公司;HZQ-X100 恒温双层振荡培养箱 江苏太仓实验设备厂;JY92-II 超声波细胞粉碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;GL-20B 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;ÄKTA 蛋白纯化系统 美国 GE Healthcare 公司;LEO 1530 VP 型扫描电子显微镜 德国 LEO 公司;Dionex ICS-5000+型离子色谱仪、Dionex Carbopac PA200 美

国 Thermo Fisher 科技公司; MALDI-TOF、Q-TOF 质谱仪 (Ultraflex extreme) 德国 Bruker 公司; 1260 Infinity 型高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 序列和结构分析 在 GenBank 数据库中发掘了一个北风类芽孢杆菌来源的假想蛋白 (No. OMD45931.1), 预测为木葡聚糖酶, 命名为 *PbXEG74B*。利用在线软件 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质的分子量和等电点, 利用 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源性比对, 使用 DNAMAN 进行多序列比对分析并绘图。使用 AlphaFold2 预测 *PbXEG74B* 结构^[23], *PbXEG74B* 蛋白与 *Paenibacillus odorifer* 来源木葡聚糖酶 PoGH74 (PDB: 6MGL) 的催化模块进行结构比对, 模型使用 PyMOL 2.3.1 (<https://pymol.org/>) 进行可视化。

1.2.2 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 的表达 将 GenBank 数据库中来源于北风类芽孢杆菌的木葡聚糖酶基因 (GenBank: No. MPTB01000023.1 96400~99684) 序列委托擎科公司合成至 pET-28a(+) 载体, 得到重组质粒 pET-28a-*PbXEG74B*, 热激转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 平板涂布 (含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 挑取正常生长的阳性转化子, 测序无误后获得重组菌株。将重组菌株接种于 10 mL LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h 左右, 作为种子液。将种子液以体积分数 1% 接种量转接至 200 mL LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养, 当培养液 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 左右时, 添加终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。离心 (10000 r/min、10 min) 收集菌体, 并用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含有 500 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑) 重悬菌体。置于冰水浴中超声破碎, 离心 (10000 r/min、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$) 收集上清液 (即粗酶液)。

1.2.3 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 的纯化 利用 Ni-NTA 亲和层析柱 (1.0 cm $\times$ 10.0 cm) 对木葡聚糖酶进行纯化。用缓冲液 A 平衡亲和层析柱, 粗酶液以 0.5 mL/min 的流速上样, 分别用缓冲液 A 和 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含有 500 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L 咪唑) 洗脱未结合蛋白与杂蛋白, 再用缓冲液 C (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含有 500 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白。洗脱过程在 ÄKTA 蛋白纯化系统上进行, 流速为 1.0 mL/min。收集有酶活组分于 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 (截留分子量 12000 Da) 过夜, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白纯度。

1.2.4 木葡聚糖酶 *PbXEG74B* 的酶活力和蛋白含量测定 木葡聚糖酶酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨

酸 (DNS) 法^[24]: 在 150 μL 0.3% (w/v) 的木葡聚糖溶液 (50 mmol/L 乙酸缓冲液, pH 5.5) 中加入 50 μL 适当稀释的酶液, 55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 200 μL DNS 溶液, 沸水浴 15 min 后加入 200 μL 饱和酒石酸钾钠, 冷却至室温后于 OD₅₄₀ 测定吸光度值, 以葡萄糖作为标准品计算所产生的还原糖量。木葡聚糖酶酶活力定义: 在以上反应条件下每分钟生成 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖计) 所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。蛋白含量测定: 蛋白含量测定参照 Classics 等^[25] 的方法, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白质 ($y=2.67x-0.16$, $R^2=0.9992$, x 为 740 nm 处吸光度, y 为蛋白浓度 mg/mL)。

1.2.5 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 的酶学性质 最适 pH 的测定: 用不同 pH 的缓冲液 (50 mmol/L) 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下按照 1.2.4 中方法测定酶活力, 以最大值为 100%, 分别计算各 pH 下的相对酶活力。所用的缓冲液体系及其 pH 范围为: 柠檬酸 (Citrate) (pH 3.0~4.5)、乙酸 (Acetate) (pH 4.0~6.0)、2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) (pH 5.0~6.5)、3-吗啉丙磺酸 (MOPS) (pH 6.0~8.0)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) (pH 7.0~9.0) 和 2-(环己胺基) 乙磺酸 (CHES) (pH 8.0~10.0)。

pH 稳定性的测定: 分别用不同 pH 的缓冲液 (50 mmol/L) 稀释酶液 (稀释后蛋白浓度大于 1 mg/mL), 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min, 立即冰水浴冷却 30 min, 按照 1.2.4 中方法测定酶活力, 以未经处理的酶液为 100%, 分别计算各 pH 处理后的相对酶活力。

最适温度的测定: 在不同温度 (30、35、40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$) 下按照 1.2.4 中方法测定木葡聚糖酶酶活力, 以最高酶活力为 100%。

温度稳定性的测定: 将酶液用乙酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.5) 稀释 (稀释后蛋白浓度大于 1 mg/mL), 于不同温度 (30、35、40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$) 中保温 30 min, 立即冰水浴冷却 30 min, 按照 1.2.4 中方法测定酶活力, 以未经处理的酶液为 100%, 分别计算各温度处理后的相对酶活力。

底物特异性的测定: 以不同种类的多糖为底物, 按照标准方法测定木葡聚糖酶酶活力, 以 *PbXEG74B* 对木葡聚糖的酶活力为 100%, 分别计算木葡聚糖酶对各种底物的比酶活力。底物包括木葡聚糖、大麦葡聚糖、地衣多糖、昆布多糖、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、普鲁兰多糖、微晶纤维素、壳聚糖、桦树木聚糖、槐豆胶、可溶性淀粉等。

1.2.6 木葡聚糖酶 (*PbXEG74B*) 的水解特性 用乙酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.5) 配制 1% (w/v) 的木葡聚糖溶液, 添加 5 U/mL 的 *PbXEG74B*, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 12 h, 于不同时间点 (0、15、30 min、1、2、4、8、12 h) 取样, 样品于沸水浴中灭酶 5 min。用乙酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 5.5) 配制 1% (w/v) 的木葡七糖

(XXXG)和木葡九糖(XLLG)溶液,添加 5 U/mL 的 *PbXEG74B*,在 35 ℃ 下水解 8 h,样品于沸水浴中灭酶 5 min。薄层层析(TLC)检测条件:样品于 10000×g 离心 3 min,吸取上清液点样于硅胶板上,硅胶板置于展层剂中展层两次,用显色剂完全浸润硅胶板后吹干,烘烤至显色。展层剂为正丁醇:乙酸:水=2:1:1,显色剂为甲醇:硫酸=95:5。标品为葡萄糖、G₂、G₃、G₄ 和聚合度 7~9 木葡寡糖。

1.2.7 DESs 预处理苹果渣与扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)分析 氯化胆碱与甘油摩尔比 1:4 混合,于 80 ℃ 水浴搅拌至透明的均相溶液,得到 DESs。苹果渣与 DESs 质量比 1:7 混合,80 ℃ 水浴搅拌 24 h 后,水洗离心(4 ℃、10000 r/min、15 min)重复三次,收集沉淀 60 ℃ 烘干,过 40 目筛,得到 DESs 预处理的苹果渣(处理组)。以纯水处理的苹果渣为对照组。使用 SEM 观察对照组和处理组的苹果渣显微结构。利用双面胶将样品固定在圆形铝板上,使用喷涂镀膜仪在样品表面镀金,测定时加速电压为 5.00 kV。

1.2.8 木葡聚糖酶(*PbXEG74B*)水解苹果渣生产木葡寡糖 反应体系为 500 mL,底物(对照组和处理组)浓度为 10%(w/v),缓冲体系为乙酸缓冲液(50 mmol/L、pH5.5),*PbXEG74B* 添加量为 200 U/g 底物,在 35 ℃、150 r/min 条件下水解 12 h,水解过程中于不同时间点(0、0.5、1、2、4、8、12 h)取样,沸水浴灭酶 5 min,水解液经 10000×g 离心 5 min,上清液冷冻干燥后得到苹果渣木葡寡糖,室温贮存用于后续分析。

1.2.9 苹果渣木葡寡糖的组成分析 使用高效阴离子交换色谱-安培检测器(high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)分析水解苹果渣产生木葡寡糖的含量。流动相 A 相:蒸馏水,流动相 B 相:1 mol/L NaOH,流动相 C 相:1 mol/L 乙酸钠。洗脱梯度:0~5 min, 10% B+3.5% C; 5~12 min, 10% B+3.5%~30% C 线性增加; 12~12.1 min, 50% B+50% C; 12.1~13 min: B 与 C 线性恢复至 10% B+3.5% C; 13~17 min, 10% B+3.5% C; 流速为 1 mL/min,柱温为 30 ℃。以葡萄糖、G₂、G₃、G₄、XXXG、XLLG 为标准品。根据标准品的出峰时间对样品的聚合度进行定性分析,根据峰面积-浓度标准曲线对样品中的木葡寡糖进行定量分析。木葡寡糖得率计算公式为:

$$\text{木葡寡糖得率(g/100 g 苹果渣)} = \frac{A_1}{A_2}$$

式中: A₁ 为 100 g 苹果渣经预处理和酶解后得到的木葡寡糖质量, A₂ 为 100 g 苹果渣。

苹果渣中木葡聚糖水解释率计算公式为:

$$\text{木葡聚糖水解释率(\%)} = \frac{B_1}{B_2} \times 100$$

式中: B₁、B₂ 分别为木葡寡糖和木葡聚糖含量。

使用电喷雾电离质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF)分析水解 8 h 时样品组成。ESI-MS 方法:气体温度 450 ℃,干燥气 100 kPa,雾化气 1.5 L/min,ESI⁺模式,电压 4000 V。MALDI-TOF 方法:取 1 μL 8 h 的水解样品点在 MALDI 靶上,并立即与 1 μL 浓度为 20 mg/mL 2,5-二羟基苯甲酸(溶剂为 50%(v/v)乙腈)混合,待液滴干燥后用激光轰击。质谱扫描范围:100~2500 m/z;采用正离子模式,电压 29 kV。结合前期实验和质荷比对样品中的主要组分进行定性分析^[18]。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次。数据间显著性分析通过 IBM SPSS Statistics 26.0 软件采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示数据具有显著差异。

2 结果与分析

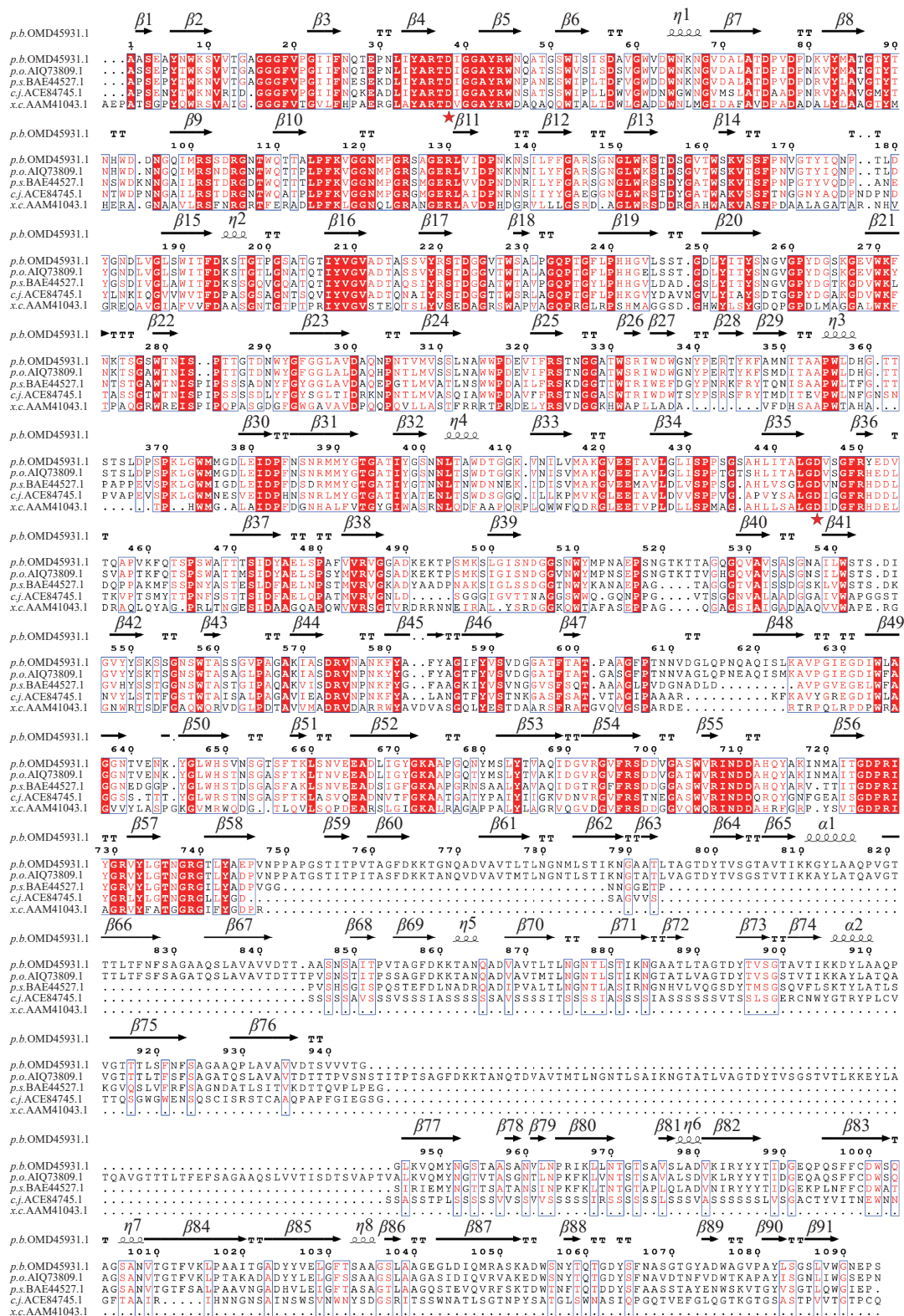
2.1 *PbXEG74B* 的序列与结构分析

PbXEG74B 基因全长为 3285 bp,编码 1094 个氨基酸。ExPASy 分析表明该酶预测分子量和等电点分别为 114.7 kDa 和 5.0。将 *PbXEG74B* 的氨基酸序列与已报道 GH74 家族木葡聚糖酶进行比对(图 1),该酶与 *Paenibacillus odorifer* 来源的木葡聚糖酶(GenBank: AIQ73809.1)相似度为 88.5%,与类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)(GenBank: BAE44527.1)、日本纤维弧菌(*Cellvibrio japonicus*)(GenBank: ACE84745.1)和黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris*)(GenBank: AAM41043.1)来源的木葡聚糖酶序列相似度分别为 64.9%、57.0% 和 36.2%。因此,该酶是一个新型 GH74 家族木葡聚糖酶。利用 AlphaFold2 对该酶分子结构进行预测,*PbXEG74B* 中含有两个 7 叶 β 螺旋结构域,两者形成一个大催化凹槽可以容纳底物,催化残基 Asp38 和 Asp445 位于催化凹槽的中心,为典型的 GH74 家族木葡聚糖酶结构(图 2)。

2.2 *PbXEG74B* 的纯化与酶学性质

PbXEG74B 成功在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达,目的蛋白分泌在胞内,表达量为 18.0 U/mL,粗酶液经 Ni-NTA 亲和层析柱一步纯化得到电泳级纯酶,分子量为 115 kDa,与预测分子量一致(图 3),酶活力回收率为 51.4%,纯化倍数为 2.2。*PbXEG74B* 的最适 pH 为 5.5(图 4a),在 pH4.5~8.5 范围内保持稳定(图 4b);该酶的最适温度为 55 ℃(图 4c),40 ℃ 处理 30 min 仍保留 80% 以上酶活力(图 4d)。*PbXEG74B* 对木葡聚糖的比酶活力最高,为 68.4 U/mg,对其他底物均没有表现出活力。

PbXEG74B 的分子量与大丽轮枝菌(110 kDa)和里氏木霉(105 kDa)来源的 GH74 家族木葡聚糖酶较为相近^[26-27],高于米黑根毛霉(21.9 kDa)和鹿皮

图1 木葡聚糖酶 *PbxEG74B* 与其他来源木葡聚糖酶序列比对Fig.1 Multiple sequences alignment of *PbxEG74B* and other xyloglucanases

注: 相同的残基在红色背景上显示为白色, 保守残基在白色背景上显示为红色, 两个保守的催化残基用红色五角星标记。

曲霉(24.5 kDa)来源的 GH12 家族木葡聚糖酶^[3,28]。这主要是由于 GH74 家族木葡聚糖酶含有碳水化合物结合模块(carbohydrate binding module, CBM)导致分子量偏大。*PbxEG74B* 的最适 pH 低于大部分 GH74 家族的木葡聚糖酶, 如高温单孢菌(pH7.0)^[29]、琼斯氏菌(pH7.5~9.0)^[30] 和类芽孢杆菌(pH6.0~6.5)^[31]

来源的木葡聚糖酶, 但高于 *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* 来源的木葡聚糖酶 (pH4.5)^[32]。*PbxEG74B* 具有良好的 pH 稳定性, 优于米黑根毛霉来源的 *RmXEG12B*(pH5.0~6.5) 和阿维链霉菌来源的 *SaGH74B*(pH6.0~6.5)^[33-34]。*PbxEG74B* 的最适温度高于土曲霉来源的 *Xeg5A*(45 °C)^[35], 温度稳定

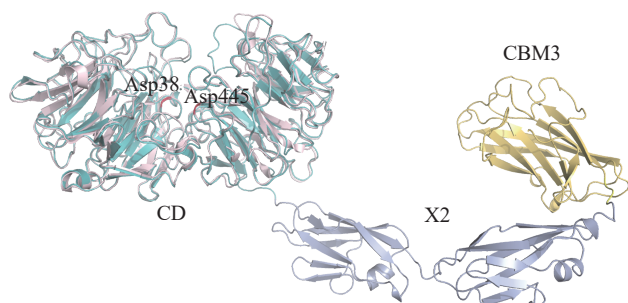
图 2 *PbXEG74B* 与 *PoGH74* 结构比对

Fig.2 Structural comparison between *PbXEG74B* and *PoGH74*
注: 催化残基用红色标注; *PbXEG74B* 与 *PoGH74* 催化模块 (CD) 用蓝色和粉色标注; 碳水化合物结合模块 X2 和 CBM3 分别用紫色和黄色标注。

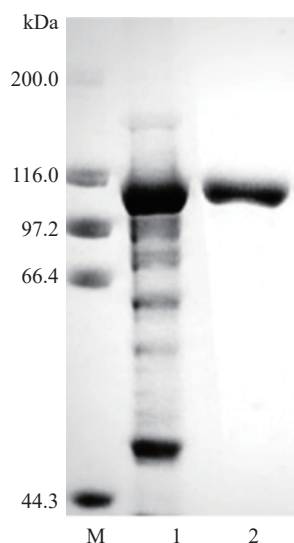
图 3 木葡聚糖酶 *PbXEG74B* 纯化前后电泳

Fig.3 SDS-PAGE of *PbXEG74B* before and after purification
注: M: 高分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: 纯酶液。

性与 *Paenibacillus odorifer* 来源的 *PoGH74* 相似^[36]。*PbXEG74B* 的比酶活力高于大部分 GH74 家族木葡聚糖酶, 如嗜热毁丝菌 (22.6 U/mg) 和烟曲霉 (11.9 U/mg) 来源的木葡聚糖酶^[37-38]。*PbXEG74B* 良好的酶学性质使其具有一定的工业适应性, 有利于从生物质中水解得到木葡寡糖。

2.3 *PbXEG74B* 的水解特性

PbXEG74B 水解木葡聚糖过程如图 5 所示, 水解初期产物以聚合度 8 以上的组分为主, 产生少量三糖和四糖。随着水解时间的延长, 聚合度高于 9 的组分逐渐减少, 聚合度为 2~4 和 9 的寡糖浓度逐渐增加 (图 5a)。以木葡七糖为底物时, XXXG 完全被水解为 X 和 XG (图 5b)。以木葡九糖为底物时, XLLG 无法被水解 (图 5c)。

PbXEG74B 在水解初期就产生了低聚合度的木葡寡糖, 属于过程性内切酶。*PbXEG74B* 不仅能够水解木葡聚糖产生 XXXG、XXLG/XLXG (木葡八糖) 和 XLLG 等高聚合度木葡寡糖, 还能将 XXXG 进一步水解产生聚合度更低的寡糖。目前已报道的

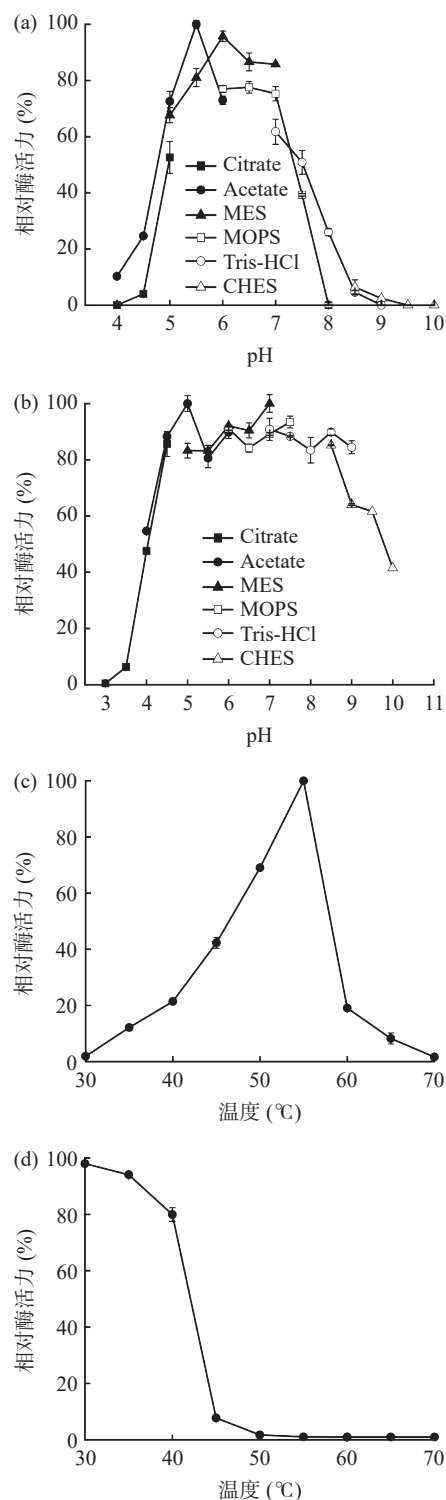
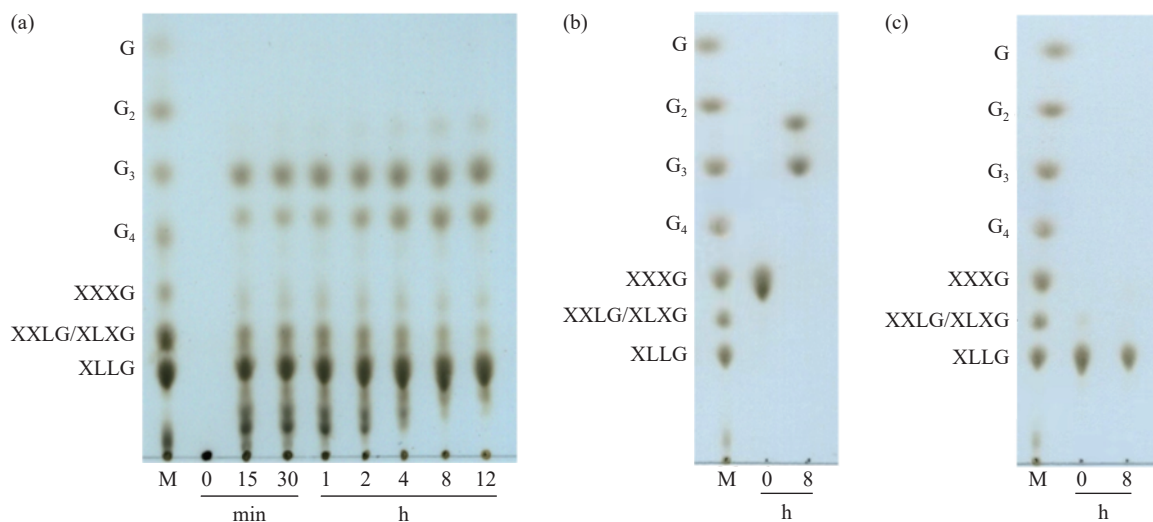
图 4 *PbXEG74B* 的最适 pH(a)、pH 稳定性(b)、最适温度(c)和温度稳定性(d)

Fig.4 Optimal pH (a), pH stability (b), optimal temperature (c) and temperature stability (d) of *PbXEG74B*

GH12 家族木葡聚糖酶仅能在 G 处水解得到 XXXG 型的木葡寡糖, 无法进一步产生聚合度 2~4 的木葡寡糖^[39]。前期研究表明, 木葡聚糖酶-1 亚位点是影响酶水解特性的关键位点^[16]。*PbXEG74B* 的-1 亚位点有 Gly444 残基, 能有效地识别 X 和 G, 因此该酶能够水解 XXXG 产生更低聚合度的寡糖。但 *PbXEG74B* 无法水解 XLLG, 这可能是由于双半乳糖基化阻碍了底物与酶结合^[36]。

图5 木葡聚糖(a)、木葡七糖(b)和木葡九糖(c) *PbXEG74B* 水解产物 TLC 分析Fig.5 TLC analysis of XyG (a), XXXG (b) and XLLG (c) hydrolyzed by *PbXEG74B*

2.4 水解苹果渣制备木葡寡糖

DESs 预处理前后苹果渣的微观结构如图 6 所示。未经处理的苹果渣颗粒表面较为平整, DESs 处理后的苹果渣表面变得粗糙、多孔。疏松多孔的结构增加了 *PbXEG74B* 与苹果渣中木葡聚糖的接触面积。在最适水解条件(10% 底物浓度, 200 U/g 加酶量)下, *PbXEG74B* 水解苹果渣产木葡寡糖的含量随水解时间的延长逐渐增加, 其中聚合度 2~4、7~9 和 >9 的组分含量增加最明显(图 7)。水解 8 h 后, 聚合度 2~9 木葡寡糖得率为 2.79 g/100 g 苹果渣,

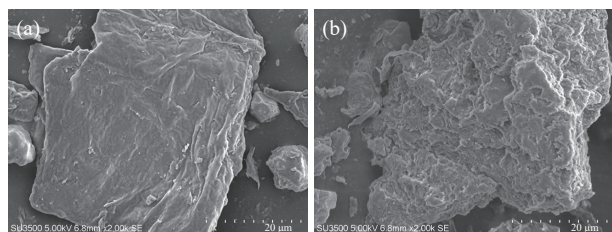


图6 未处理(a)和预处理(b)苹果渣的微观结构(2000×)

Fig.6 Microstructure of untreated (a) and pretreated (b) AP (2000×)

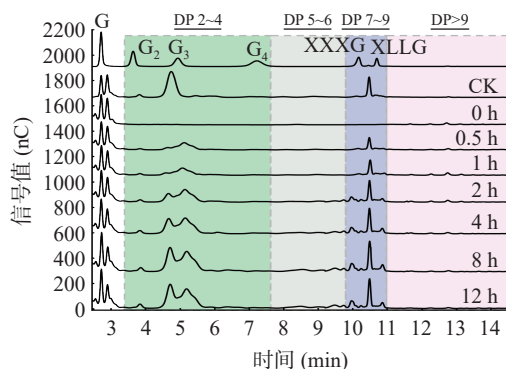


图7 苹果渣木葡寡糖的组分

Fig.7 Composition of AP XyGOs

注: CK: 未预处理的苹果渣水解 8 h; G₂: 纤维二糖; G₃: 纤维三糖; G₄: 纤维四糖; XXXG: 木葡七糖; XLLG: 木葡九糖。

苹果渣中木葡聚糖的水解率达 27.9%。其中, 聚合度 2~4、5~6 和 7~9 的木葡寡糖的得率分别为 1.86、0.32 和 0.60 g/100 g 苹果渣, 占比分别为 67.0%、11.5% 和 21.5%。未预处理的苹果渣(对照组)水解 8 h 后, 聚合度 2~9 的木葡寡糖得率为 1.53 g/100 g 苹果渣, 仅为预处理苹果渣的 55%(表 1)。

表1 *PbXEG74B* 水解苹果渣制备木葡寡糖得率Table 1 Yield of XyGOs in enzymatic hydrolysis of pretreated AP by *PbXEG74B*

水解时间(h)	不同聚合度寡糖得率(g/100 g苹果渣)			木葡寡糖总得率 (g/100 g苹果渣)
	DP 2~4	DP 5~6	DP 7~9	
CK	0.94±0.02 ^c	0.11±0.01 ^d	0.48±0.06 ^{cd}	1.53±0.09 ^c
0.5	0.56±0.02 ^e	0.07±0.01 ^e	0.27±0.00 ^f	0.90±0.00 ^e
1	0.70±0.03 ^d	0.13±0.02 ^{cd}	0.37±0.03 ^e	1.20±0.01 ^d
2	0.95±0.01 ^c	0.15±0.01 ^c	0.44±0.02 ^{de}	1.55±0.00 ^c
4	1.26±0.02 ^b	0.24±0.04 ^b	0.54±0.02 ^{bc}	2.05±0.02 ^b
8	1.86±0.11 ^a	0.32±0.02 ^a	0.60±0.08 ^{ab}	2.79±0.08 ^a
12	1.86±0.04 ^a	0.32±0.03 ^a	0.66±0.03 ^a	2.85±0.10 ^a

注: 同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

氯化胆碱/甘油体系是常用的 DESs, 广泛应用于半纤维素和木质素的提取、分离或去除。经 DESs 处理后, 苹果渣的微观结构发生改变, 致密的纤维结构变得松动, 生物质抗降解屏障受到破坏, 暴露出的木葡聚糖更易与 *PbXEG74B* 结合并被降解。预处理后, 苹果渣木葡寡糖得率为 2.79 g/100 g 苹果渣, 是对照组寡糖得率的 1.8 倍, 表明 DESs 处理效果显著。经 *PbXEG74B* 水解后苹果渣中木葡聚糖水解释率为 27.9%, 效果优于已报道的大部分木葡聚糖酶。Wang 等^[40] 利用太瑞斯梭孢壳霉来源的 GH74 家族木葡聚糖酶水解 DESs 预处理苹果渣, 还原糖产量仅为 1.4 g/100 g 苹果渣。Grishutin 等^[27] 用三种不同来源 GH74 家族木葡聚糖酶水解木葡聚糖, 水解率均低于 27.9%。Shi 等^[41] 利用米黑根毛霉来源的 *RmXEG12A* 水解苹果渣, 木葡聚糖水解释率仅为 23.3%。利用 *PbXEG74B* 水解苹果渣制备的木葡寡糖中, 聚

合度 2~4 木葡寡糖含量明显高于聚合度 7~9 的木葡寡糖含量,这是由于木葡聚糖被 *PbXEG74B* 水解为高聚合度木葡寡糖后,部分高聚合度木葡寡糖继续被水解为低聚合度的木葡寡糖。而米黑根毛霉来源的 GH12 家族木葡聚糖酶 *RmXEG12B* 仅能将木葡聚糖水解释为聚合度 7~10 的高聚合度木葡寡糖^[33]。

2.5 木葡寡糖成分分析

根据 ESI-MS(图 8a)和 MALDI-TOF(图 8b)质谱结果,并结合 Chen 等^[18]的实验结果,分析质荷比 300~1700 范围的木葡寡糖。木葡寡糖中低聚合度寡糖有 $[X+Na]^+$ (m/z 335.0)、 $[XG+Na]^+$ (m/z 497.0)、 $[XX+Na]^+$ (m/z 629.0)、 $[LG+K]^+$ (m/z 659.1)、 $[XXG/LX+Na]^+$ (m/z 791.0)和 $[FG+Na]^+$ (m/z 805.2),高聚合度寡糖有 $[XXGG/LL/LXG+Na]^+$ (m/z 953.6)、 $[XFG+Na]^+$ (m/z 1099.3)、 $[XLXG/XXLG+K]^+$ (m/z 1263.4)。此外,部分寡糖以乙酰化的形式存在,如 $[FG+Ac+Na]^+$ (m/z 847.2)、 $[XFG+Ac+Na]^+$ (m/z 1141.3)、 $[LFG+Ac+Na]^+$ (m/z 1303.3)、 $[XFXG/XXFG+Ac+Na]^+$ (m/z 1435.4)、 $[XLLG+Ac+Na/XFXG/XXFG+Ac+K]^+$ (m/z 1451.5)和 $[XFXG/XXFG+2Ac+Na]^+$ (m/z 1477.5)(在 L 基础上以 α -1,2 糖苷键在半乳糖残基上连接一个 L-岩藻糖残基为 F)。可见,利用 *PbXEG74B* 制备得到的木葡寡糖中至少含有 15 种木葡寡糖,而 *RmXEG12B* 水解苹果渣所得寡糖仅有 XXXG、XXLG/XLG、XXFG/XFXG 和 XLFG^[33]。

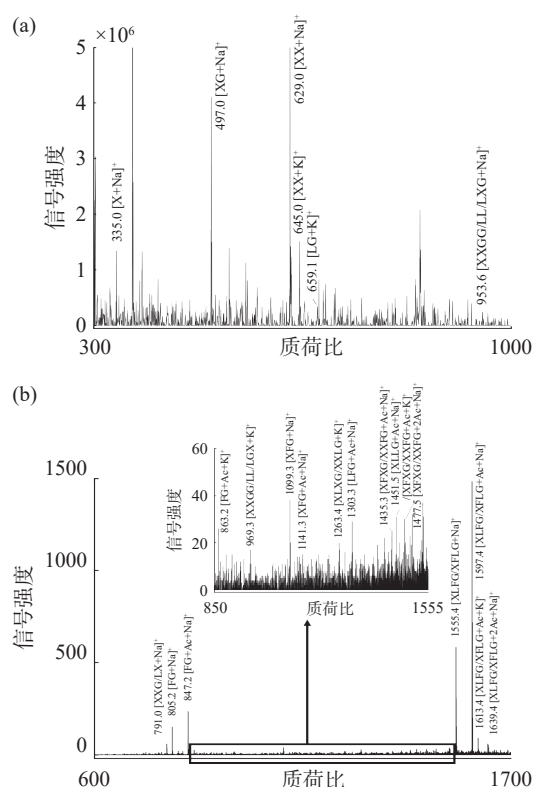


图 8 苹果渣木葡寡糖的 ESI(a)和 MALDI-TOF(b)分析
Fig.8 ESI (a) and MALDI-TOF (b) analysis of AP XyGOs

3 结论

本研究发掘了一个新型 GH74 家族木葡聚糖酶

PbXEG74B, 该酶在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达。*PbXEG74B* 具有良好的酶学性质和水解特性,水解木葡聚糖能够产生聚合度为 2~9 的木葡寡糖。进一步将其应用于水解 DESs 预处理后的苹果渣制备苹果渣木葡寡糖,产物中聚合度 2~4 的木葡寡糖占比达 67.0%,实现了低聚合度木葡寡糖的酶法制备。综上,利用 *PbXEG74B* 水解耦合 DESs 预处理可以实现苹果渣中木葡聚糖的酶法降解,将其转化为高附加值的木葡寡糖,为苹果渣的高值化利用和低聚合度木葡寡糖的制备提供了理论基础和实践依据。

© The Author(s) 2025. 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] ZHU L, QIN S, ZHAI S, et al. Inulin with different degrees of polymerization modulates composition of intestinal microbiota in mice[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(10): fnx075.
- [2] MUELLER M, REINER J, FLEISCHHACKER L, et al. Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 24: 264–275.
- [3] WANG N, LI Y, MIAO M, et al. High level expression of a xyloglucanase from *Rhizomucor miehei* in *Pichia pastoris* for production of xyloglucan oligosaccharides and its application in yoghurt[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 190: 845–852.
- [4] CHEN H, JIANG X, LI S, et al. Possible beneficial effects of xyloglucan from its degradation by gut microbiota[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97: 65–75.
- [5] LANG W, TAGAMI T, KANG H J, et al. Partial depolymerization of tamarind seed xyloglucan and its functionality toward enhancing the solubility of curcumin[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 307: 120629.
- [6] LI X, CHEN Y, SONG L, et al. Partial enzymolysis affects the digestion of tamarind seed polysaccharides *in vitro*: Degradation accelerates and gut microbiota regulates[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 237: 124175.
- [7] JULIAN J D, ZABOTINA O A. Xyloglucan biosynthesis: From genes to proteins and their functions[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 920494.
- [8] ATTIA M A, BRUMER H. New family of carbohydrate-binding modules defined by a galactosyl-binding protein module from a *Cellvibrio japonicus* endo-xyloglucanase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(5): e02634–20.
- [9] SUN P, LI X, DILOKPIPOL A, et al. Fungal glycoside hydrolase family 44 xyloglucanases are restricted to the phylum *Basidiomycota* and show a distinct xyloglucan cleavage pattern[J]. iScience, 2022, 25(1): 103666.
- [10] VITCOSQUE G L, RIBEIRO L F C, DE LUCAS R C, et al. The functional properties of a xyloglucanase (GH12) of *Aspergillus terreus* expressed in *Aspergillus nidulans* may increase performance of biomass degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100: 9133–9144.
- [11] BENKŐ Z, SIKA-AHO M, VIKARI L, et al. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 43(2): 109–114.

- [12] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, MARIA D L B, et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of endo-1,4- β -xylanase, endo-1,4- β -glucanase and xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase produced by *Trichoderma citrinoviride* DSM 33578 (Huvezym® neXo) for all Suidae (Huvepharma EOOD)[J]. *EFSA Journal*, 2024, 22(3): e8643.
- [13] HSIUNG S Y, LI J, IMRE B, et al. Structures of the xyloglucans in the monocotyledon family Araceae (aroids)[J]. *Planta*, 2023, 257(2): 39.
- [14] LI K, BARRETT K, AGGER J W, et al. Bioinformatics-based identification of GH12 endoxyloglucanases in citrus-pathogenic *Penicillium* spp[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2024, 178: 110441.
- [15] DAMÁSIO A R L, RIBEIRO L F C, RIBEIRO L F, et al. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2012, 1824(3): 461–467.
- [16] ARNAL G, STOGIOS P J, ASOHAN J, et al. Substrate specificity, regiospecificity, and processivity in glycoside hydrolase family 74[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(36): 13233–13247.
- [17] GUARDIA L, SUÁREZ L, QUEREJETA N, et al. Apple waste: A sustainable source of carbon materials and valuable compounds[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(20): 17335–17343.
- [18] CHEN M, MAC-BÉAR J, ROPARTZ D, et al. Biorefinery of apple pomace: New insights into xyloglucan building blocks[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 290: 119526.
- [19] FULLERTON C G, PRAKASH R, NINAN A S, et al. Fruit from two kiwifruit genotypes with contrasting softening rates show differences in the xyloglucan and pectin domains of the cell wall[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 537386.
- [20] 田锐, 胡亚洁, 刘巧玲, 等. 低共熔溶剂在木质纤维生物质预处理领域的研究进展[J]. *中国造纸*, 2022, 41(3): 78–86. [TIAN Rui, HU Yajie, LIU Qiaoling, et al. Research progress of deep eutectic solvents in *Lignocellulosic biomass* pretreatment[J]. *China Pulp & Paper*, 2022, 41(3): 78–86.]
- [21] CHEN M, FALOURD X, LAHAYE M. Sequential natural deep eutectic solvent pretreatments of apple pomace: A novel way to promote water extraction of pectin and to tailor its main structural domains[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 266: 118113.
- [22] ELO S, SUOMINEN I, KÄMPFER P, et al. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2): 535–545.
- [23] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583–589.
- [24] MILLER C L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [25] CLASSICS LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265–75.
- [26] SATO S, OHTA K, KOJIMA K, et al. Isolation and characterization of two types of xyloglucanases from a phytopathogenic fungus, *Verticillium dahliae*[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2016, 63(1): 13–18.
- [27] GRISHUTIN S G, GUSAKOV A V, MARKOV A V, et al. Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2004, 1674(3): 268–281.
- [28] RYKOV S V, KORNBERGER P, HERLET J, et al. Novel endo-(1,4)- β -glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 7553–7566.
- [29] POL D, MENON V, RAO M. Biochemical characterization of a novel thermostable xyloglucanase from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp[J]. *Extremophiles*, 2012, 16: 135–146.
- [30] SIANIDIS G, POZIDIS C, BECKER F, et al. Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 121(4): 498–507.
- [31] YAOI K, NAKAI T, KAMEDA Y, et al. Cloning and characterization of two xyloglucanases from *Paenibacillus* sp. strain KM21[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7670–7678.
- [32] SHI H, GUO J, YAN X, et al. Characterization of a xyloglucanase in biodegradation of woody plant xyloglucan from *Caldicellulosiruptor kronotskyensis*[J]. *BioResources*, 2022, 17(1): 673.
- [33] WANG N, LI Y, ZHU C, et al. High-level expression of xyloglucanase B from *Rhizomucor miehei* and its application in the preparation of partially hydrolyzed apple pomace xyloglucan[J]. *Food Bioengineering*, 2022, 1(2): 119–125.
- [34] ICHINOSE H, ARAKI Y, MICHIKAWA M, et al. Characterization of an endo-processive-type xyloglucanase having a β -1, 4-glucan-binding module and an endo-type xyloglucanase from *Streptomyces avermitilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(22): 7939–7945.
- [35] MATSUZAWA T, KAMEYAMA A, NAKAMICHI Y, et al. Identification and characterization of two xyloglucan-specific endo-1,4-glucanases in *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 8761–8773.
- [36] ARNAL G, STOGIOS P J, ASOHAN J, et al. Structural enzymology reveals the molecular basis of substrate regiospecificity and processivity of an exemplar bacterial glycoside hydrolase family 74 endo-xyloglucanase[J]. *Biochemical Journal*, 2018, 475(24): 3963–3978.
- [37] BEREZINA O V, HERLET J, RYKOV S V, et al. Thermostable multifunctional GH74 xyloglucanase from *Myceliophthora thermophila*: High-level expression in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant protein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 5653–5666.
- [38] DAMASIO A R L, RUBIO M V, GONÇALVES T A, et al. Xyloglucan breakdown by endo-xyloglucanase family 74 from *Aspergillus fumigatus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 2893–2903.
- [39] POWLOWSKI J, MAHAJAN S, SCHAPIRA M, et al. Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase[J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(10): 1175–1179.
- [40] WANG B, CHEN K, ZHANG P, et al. Comparison of the biochemical properties and roles in the xyloglucan-rich biomass degradation of a GH74 xyloglucanase and its CBM-deleted variant from *Thielavia terrestris*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5276.
- [41] SHI R, YANG S, WANG N, et al. Synthesis of 2'-fucosyllactose from apple pomace-derived xyloglucan oligosaccharides by an α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. CAU209[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3579–3591.