

研究报告

一种耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶基因克隆与高效表达

成莉凤 冯湘沅 段盛文 郑科 刘正初*

(中国农业科学院 麻类研究所 湖南 长沙 410205)

摘要:【目的】克隆半纤维素降解高效菌株 *Bacillus subtilis* BE-91 的甘露聚糖酶基因并进行原核表达,对表达产物进行酶学性质研究。【方法】采用 PCR 扩增法从 *B. subtilis* BE-91 菌株中克隆 β -甘露聚糖酶基因,分别连接到 pEASY-E1 和 pET28a 载体,导入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行诱导表达。用 DNS 法对工程菌株的胞内和胞外 β -甘露聚糖酶进行定量分析,选取胞外甘露聚糖酶活力高的组分进行酶学性质研究。【结果】从 *B. subtilis* BE-91 菌株中克隆的 β -甘露聚糖酶基因(GenBank 登录号: KP277209)在 *E. coli* 中获得高效表达,工程菌株 pEASY-man/BL 产胞外 β -甘露聚糖酶的活性可达 229.1 IU/mL;该基因序列全长 960 bp,包含 319 个氨基酸的编码序列和一个终止密码子;表达产物的最适反应温度为 65 °C,最适反应 pH 为 6.0,属于耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶;该酶稳定温度 ≤ 65 °C,稳定 pH 为 4.5–7.0;1 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶有激活作用,而 Ba^{2+} 和 Pb^{2+} 有强烈抑制作用。【结论】*B. subtilis* BE-91 拥有珍贵的 β -甘露聚糖酶基因资源,其胞外表达产物的耐热偏酸性酶学性质在开发饲料添加剂方面具有潜在的应用前景。

关键词: 枯草芽孢杆菌, β -甘露聚糖酶, 基因克隆, 原核表达, 酶学性质

Cloning and efficient expression of a thermostable and weak acidic β -mannanase gene

CHENG Li-Feng FENG Xiang-Yuan DUAN Sheng-Wen ZHENG Ke

LIU Zheng-Chu*

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: [Objective] The β -mannanase gene (*man*) from *Bacillus subtilis* BE-91 which is an efficient strain for hemi-cellulose degradation was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), then the enzymatic properties of the β -mannanase (Man) were studied. [Methods] The *man* was amplified from *B. subtilis* BE-91 by PCR, respectively linked to pEASY-E1 and pET28a, and finally expressed in *E. coli* BL21(DE3). After comparing the extracellular and intracellular β -mannanase activities from the gene engineering strains, the β -mannanase with highest activity was selected to study the enzymatic properties fully. [Results] The *manA* (GenBank: KP277209) was 960 bp in length, including a termination codon and encoded 319 amino acids. The highest activity of the extracellular β -mannanase

基金项目: 国家创新工程项目(No. ASTIP-IBFC08); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022209D); 国家现代农业产业技术体系建设专项项目(No. CARS-19-E24)

*通讯作者: Tel: 86-731-88998535; 信箱: ibfclzc@189.cn

收稿日期: 2015-04-21; 接受日期: 2015-07-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-01

from pEASY-*man*/BL strain was 229.1 IU/mL. The optimal temperature and pH of the β -mannanase were 65 °C and 6.0. The catalytic activity of the enzyme was stable at no more than 65 °C and pH 4.5–7.0 after being incubated for 30 min. It was promoted by Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Ca^{2+} , while inhibited seriously by Ba^{2+} and Pb^{2+} at concentration of 1 mmol/L. **[Conclusion]** A precious β -mannanase gene has been excavated from *B. subtilis* BE-91, and its expression product with properties of thermostability and weak acidity may be available for feed additive.

Keywords: *Bacillus subtilis*, β -Mannanase, Gene cloning, Prokaryotic expression, Enzymatic property

β -甘露聚糖酶(β -Mannanase EC3.2.1.78)能以内切方式水解 β -D-1,4-吡喃甘露糖苷键, 其降解产物的非还原末端为甘露糖, 作用底物包括葡萄糖甘露聚糖、半乳甘露聚糖及 β -甘露聚糖等^[1]。目前已被广泛应用于纺织、饲料、食品、造纸、医药及石油开采等行业^[2-5]。

微生物来源的 β -甘露聚糖酶已有许多报道, 例如: 芽孢杆菌、假单胞杆菌、弧菌, 真菌里的黑曲霉、木霉、青霉、梭胞菌、酵母、假蜜环菌和放线菌中的链霉菌和诺卡氏菌等^[6-9]。近年来, 随着基因组学和蛋白质组学技术的进步, 大量 β -甘露聚糖酶基因序列在 GenBank 登录, 部分 β -甘露聚糖酶通过不同方法已经获得了蛋白质的三维结构^[10-11], 但由于各行业需求的 β -甘露聚糖酶热稳定性、pH 耐受性、底物嗜好等酶学特征均有不同程度的差异, 因此筛选适用于不同行业的新型 β -甘露聚糖酶制剂仍是关注焦点之一^[12]。

项目组前期选育到一株半纤维素高效降解菌株 *Bacillus subtilis* BE-91, 其同时高产胞外木聚糖酶(408 U/mL)和甘露聚糖酶(3 050 U/mL)的特征预示着该菌在制浆造纸和饲料加工行业具备潜在的应用前景^[13-16]。本研究拟根据已在 GenBank 登录的来源于 *B. subtilis* 的 β -甘露聚糖酶基因核心序列设计引物, 从 *B. subtilis* BE-91 中克隆 β -甘露聚糖酶基因, 并构建原核表达体系, 对表达产物的酶学性质进行研究, 以期开发新型 β -甘露聚糖酶制剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

实验所用菌株及载体详见表 1。

表 1 菌株和载体
Table 1 Strains and vectors

菌株或载体 Strains and vectors	主要特性 Main properties	来源 Source
<i>B. subtilis</i> BE-91	能高效降解半纤维素	本项目组分离与保存
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^{-}ompT hsdS_B(r_B^{-}m_B^{-}) gal dcm$ (DE3)	购自 Novagen 公司
pET28a	T7/lac, Kan ⁺ 等	购自 Novagen 公司
pEASY-E1	T7/lac, Amp ⁺ , N 端 6×His 等	购自 TransGen 公司
pET28a/BL	携带 pET28a 空载体的工程菌株	本实验构建
pEASY- <i>man</i> /BL	携带 pEASY- <i>man</i> 重组质粒的工程菌株	本实验构建
pET28a- <i>man</i> /BL	携带 pET28a- <i>man</i> 重组质粒的工程菌株	本实验构建

1.2 主要试剂

KOD plus ver2.0、*Hind* III、*Bam*H I、*rTaq* 和 dNTPs 购自 TOYOBO 生物科技有限公司; UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(No. SK1201)购自生工生物工程上海(股份)有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; DNA Marker III 购自天根生化科技(北京)有限公司; 蛋白质 Marker (No. SM0671) 购自 Fermentas 公司; 魔芋胶(葡甘聚糖纯度>95%) 购自成都路特实业有限公司; 其它常规生化试剂均为分析纯的国药集团试剂。

1.3 培养基

改良肉汤培养基^[17], LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10。

1.4 菌种培养

B. subtilis BE-91 菌种的活化及产酶: 从本项目组保存的斜面保藏菌挑取一环 *B. subtilis* BE-91 菌种接种至 5 mL 改良肉汤培养基, 充分摇匀, 35 °C 静置培养 5–6 h。稀释涂固体改良肉汤培养基平板, 35 °C 静置培养 18–20 h, 分离单菌落。挑选典型菌落接种于 5 mL LB 培养基, 35 °C、180 r/min 培养过夜, 供基因组 DNA 提取。

pEASY-*man*/BL 的诱导产酶: 挑选 *manA* 基因插入正确的转化子接种到含 100 mg/L Amp 的 5 mL LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养 15 h。取 0.5 mL 菌液接种到含 100 mg/L Amp 的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养。当 OD_{600} 约为 0.6, 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 28 °C、120 r/min 诱导 21 h。

pET28a-*man*/BL 的诱导产酶: 挑选 *manA* 基因插入正确的转化子接种到含 30 mg/L Kan 的 5 mL LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养 15 h。取 0.5 mL 菌液接种到含 30 mg/L Kan 的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养。当 OD_{600} 约为 0.6, 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 28 °C、120 r/min 诱导 21 h。

1.5 *manA* 基因的扩增

根据来源于芽孢杆菌的 β -甘露聚糖酶基因 EU918394 和 DQ309335 的核心序列用软件 Primer premier 5 设计引物。正向引物 F: 5'-CGCGGATCCGCGCATACTGTGTCGCCTGTG-3' (*Bam*H I 酶切位点), 反向引物 R: 5'-CGCAAGCTTTCCTCAACGATTGGCGTTAAAG-3' (*Hind* III 酶切位点)。

基因组 DNA 提取参照 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行。以 *B. subtilis* BE-91 菌株基因组 DNA 为模板, 用 F-R 引物扩增 *manA* 基因。扩增体系参照 KOD 试剂说明书, 扩增条件: 95 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1.5 min,

35 个循环; 72 °C 10 min。用相同体积 ddH₂O 代替基因组 DNA 模板, 其余扩增体系和扩增条件相同的处理组作阴性对照。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。

1.6 表达体系的构建

pEASY-*man*/BL 菌株构建: 对 PCR 产物进行加 A 处理(反应体系为: 10×Buffer 2 μ L, *rTaq* 酶(1 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 3 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1 μ L, PCR 产物 13.5 μ L, 72 °C 保温 30 min。回收 *man* 加 A 产物后, 与 pEASY-E1 进行连接, 导入到 *E. coli* BL21(DE3), 通过含有 100 mg/L Amp 的选择平板对重组子进行筛选。

pET28a-*man*/BL 菌株构建: 将 PCR 产物和质粒分别进行双酶切, 酶切体系为: DNA 16 μ L, 10×Buffer 2 μ L, *Bam*H I 1 μ L, *Hind* III 1 μ L。回收酶切目的片段后, 构建重组质粒 pET28a-*man*, 导入到 *E. coli* BL21(DE3), 通过含有 30 mg/L Kan 的选择平板对重组子进行筛选。

1.7 β -甘露聚糖酶活力测定

用 pH 6.5 的 0.025 mol/L 柠檬酸-0.05 mol/L NaH₂PO₄ 缓冲液配制 0.5 g/L 魔芋胶, 取适当稀释倍数的酶液 1 mL 与 2 mL 预热的底物充分混匀, 55 °C 反应 10 min, 加 2 mL DNS 后沸水浴显色 2 min, 加 ddH₂O 定容到 15 mL。以灭活的酶液做相同处理为对照, 测定 OD_{540} 的吸光值。酶活力定义: 底物每分钟释放相当于 1 μ mol 甘露糖的还原糖所需酶量为 1 个酶活力单位(以 IU 表示)^[18]。

1.8 SDS-PAGE 电泳

参照 Laemmli 方法改进^[19]。浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白带。以相对迁移率为横坐标, 蛋白质分子量的对数为纵坐标作图, 计算目标蛋白的表观分子量。蛋白质分子量标准依次为: 170、130、95、72、55、43、34、26、17、10 kD。

1.9 粗酶液性质的测定

最适反应温度及最适 pH 测定: 相同的反应体

系在不同的温度梯度(50–70 °C, 间隔 5 °C)反应, 其他条件按标准方法测定酶活力。用不同 pH 梯度 (pH 4.0–8.0, 间隔 0.5)的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液配制底物, 其它条件按标准方法测定酶活力。

热稳定性及 pH 稳定性测定: 将胞外粗酶液置于各温度梯度(20–75 °C, 间隔 5 °C)保温 30 min, 按标准方法测定剩余酶活力。将胞外粗酶液置于各 pH 梯度(pH 3.0–8.5, 间隔 0.5)的 0.025 mol/L 柠檬酸-0.05 mol/L Na₂HPO₄ 缓冲液 4 °C 保温 30 min, 按标准酶活力测定方法测定剩余酶活力。

金属离子对酶活力的影响: 在胞外粗酶液中分别添加 Cu²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Al³⁺、K⁺、Mg²⁺、Ba²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺和 NH₄⁺至终浓度为 1 mmol/L, 4 °C 保温 30 min, 测定剩余酶活。设定不额外添加金属离子的对照组酶活力为 100%, 计算各金属离子条件下的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 *manA* 基因扩增

以 *B. subtilis* BE-91 菌株基因组 DNA (图 1)为模板, 用 F-R 引物扩增目的基因。经 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 目的片段大小为 960 bp (图 2)。

2.2 重组子构建与检测

结合质粒双酶切(*Bam*H I 和 *Hind* III)、质粒 PCR 和菌落 PCR 3 种方法对阳性克隆子所含目的基因片段进行检测, 其目的片段大小基本一致, 说明

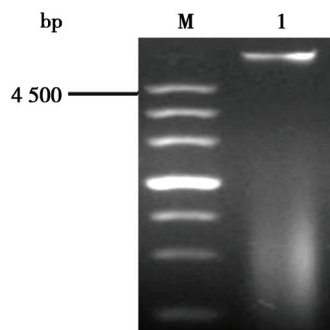


图 1 *B. subtilis* BE-91 基因组 DNA 电泳图
Figure 1 Electrophoretogram of genomic DNA of *B. subtilis* BE-91

Note: 1: Genomic DNA; M: DNA marker III.

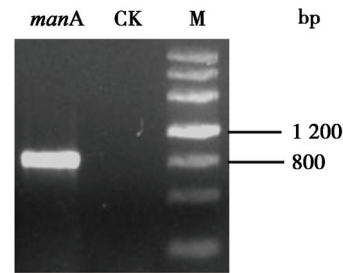


图 2 *manA* 基因扩增电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of amplification of *manA* gene

Note: *manA*: Product by PCR amplification; CK: Negative control; M: DNA marker III.

其插入片段正确(图 3)。

将验证后的重组子进行核酸测序, 并在 GenBank 登录(登录号: KP277209)。该基因全长 960 bp, 包含一个终止子和编码 319 个氨基酸。其注释的蛋白质序列前端无信号肽, 理论分子量为 36.2 kD, pI 为 5.35。将注释的蛋白质序列进行 BLASTp 比对, 其与在 GenBank 登录的 4 个 β -1,4-Mannanase 的氨基酸序列(WP_015715339.1、WP_032727113.1 和 WP_038828152.1, *B. subtilis*; AEO79931.1, *Bacillus pumilus*)一致性为 100%, 并且包含一个糖基水解酶 26 家族的催化结构域, 属于 GH26 家族。

2.3 β -甘露聚糖酶的表达

用 IPTG 诱导表达基因工程菌株 pEASY-*man*/

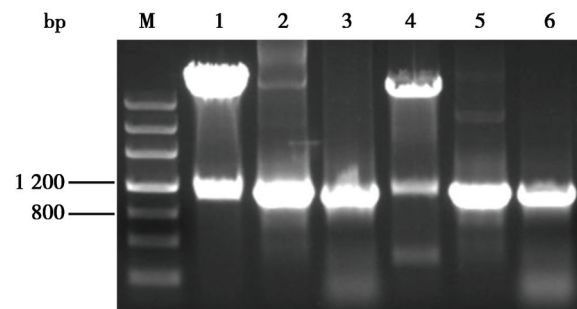


图 3 重组子检测电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of recombinant detection

Note: M: DNA marker III; 1: Double digestion of pET28a-*man* plasmid; 2: PCR of pET28a-*man* plasmid; 3: PCR of pET28a-*man*/BL; 4: Double digestion of pEASY-*man* plasmid; 5: PCR of pEASY-*man* plasmid; 6: PCR of pEASY-*man*/BL.

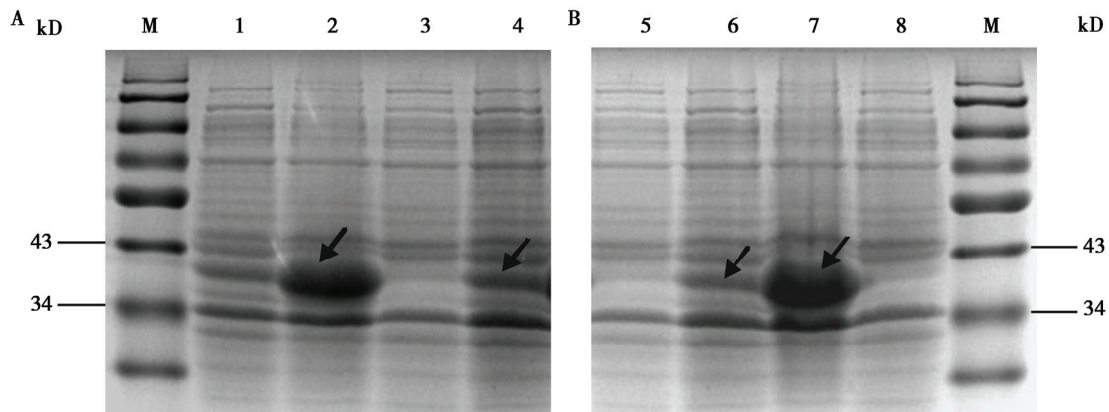


图4 pEASY-*man*/BL 菌株(A)和 pET28a-*man*/BL 菌株(B) β -甘露聚糖酶的表达效果

Figure 4 Expression of β -mannanase of strain pEASY-*man*/BL (A) and strain pET28a-*man*/BL (B)

注: 1: pEASY/BL 菌体蛋白; 2: pEASY-*man*/BL 菌体蛋白; 3: pEASY/BL 发酵液上清蛋白; 4: pEASY-*man*/BL 菌株发酵液上清蛋白; 5: pET28a/BL 发酵液上清蛋白; 6: pET28a-*man*/BL 发酵液上清蛋白; 7: pET28a-*man*/BL 菌体蛋白; 8: pET28a/BL 菌体蛋白; M: 蛋白质分子量标准.

Note: 1: Crude cell lysate of pEASY/BL; 2: Crude cell lysate of pEASY-*man*/BL; 3: Crude culture supernatant of pEASY/BL; 4: Crude culture supernatant of pEASY-*man*/BL; 5: Crude culture supernatant of pET28a/BL; 6: Crude culture supernatant of pET28a-*man*/BL; 7: Crude cell lysate of pET28a-*man*/BL; 8: Crude cell lysate of pET28a/BL; M: Protein molecular weight ladders.

BL 和菌株 pET28a-*man*/BL, 并对其表达的 β -甘露聚糖酶进行 SDS-PAGE 电泳检测和酶活力分析。与阴性对照菌株 pEASY/BL 和菌株 pET28a/BL 相比, 基因工程菌株 pEASY-*man*/BL 和菌株 pET28a-*man*/BL 在 34–43 kD 相同位置出现了特异蛋白谱带(图 4), 与预测的重组蛋白质条带大小(38.5 kD)基本一致, 说明 *man* 基因在两个表达体系均获得表达。

pEASY-*man*/BL 菌株诱导 10 h 产胞外 β -甘露聚糖酶最高, 其粗酶活为 229.1 IU/mL, 是 pET28a-*man*/BL 菌株(4.2 IU/mL)的 54.5 倍(表 2)。

表 2 不同基因工程菌株产 β -甘露聚糖酶的比较

Table 2 Comparison of β -mannanase activity produced by different genetic engineer strains (Unit: IU/mL)

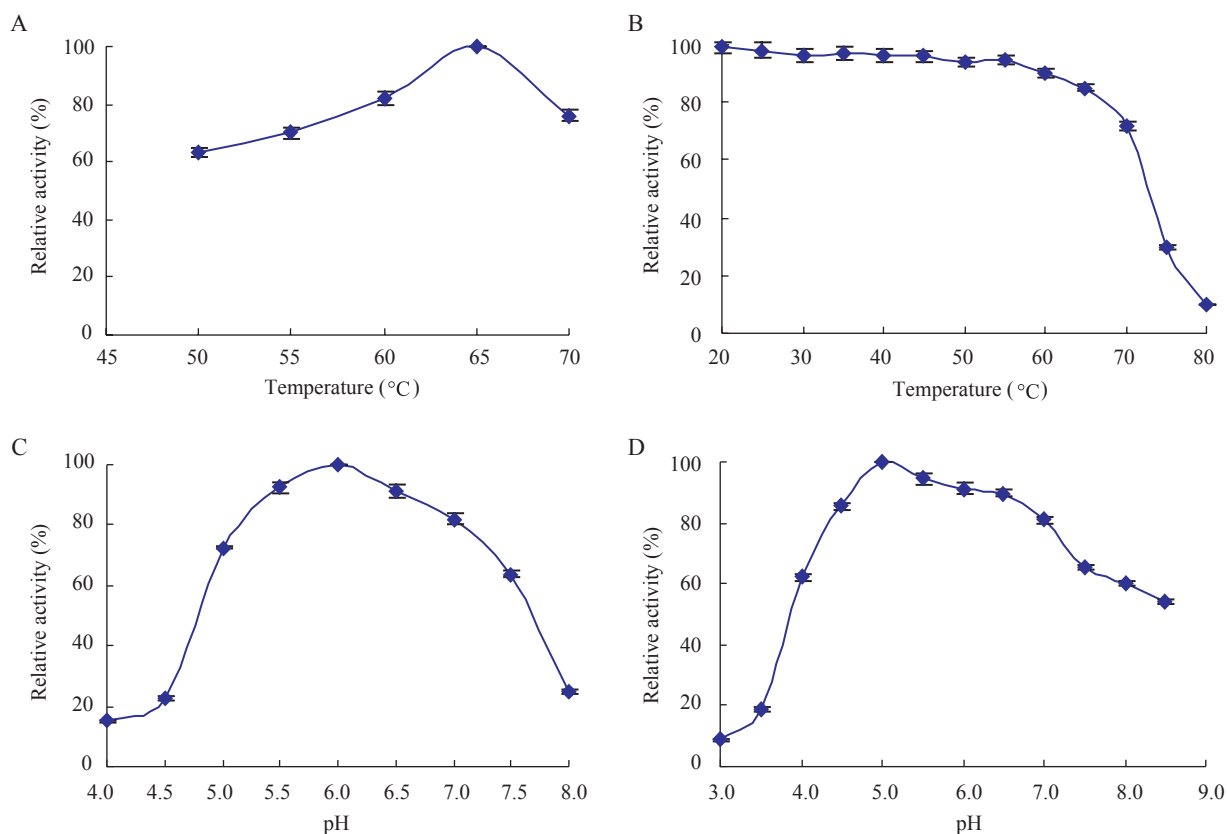
时间 Time (h)	pEASY- <i>man</i> /BL		pET28a- <i>man</i> /BL	
	胞内酶 Intracellular	胞外酶 Extracellular	胞内酶 Intracellular	胞外酶 Extracellular
8	12.3±0.07	185.6±1.97	30.2±0.07	4.0±0.09
10	19.5±0.07	229.1±3.01	51.7±2.01	4.2±0.05
12	8.6±0.10	192.4±4.23	64.3±1.87	3.6±0.07
14	8.3±0.11	160.9±3.23	50.3±1.42	2.7±0.08

2.4 β -甘露聚糖酶的酶学性质

胞外酶的粗酶液性质分析结果如图 5 和表 3 所示。不同温度条件下测定 β -甘露聚糖酶活力, 相对酶活的峰值出现在 65 °C (图 5A), 说明该酶最适反应温度为 65 °C。将该酶置于不同温度下孵育 30 min 后, 测定其剩余酶活力的结果显示(图 5B), 在 20–65 °C 保温时, 剩余酶活力在 80% 以上, 可以认为具有较好的热稳定性; 当处理温度提高至 70 °C 以上, 该酶迅速失活。

不同 pH 条件下测定 β -甘露聚糖酶活力的结果显示, 其最适反应 pH 为 6.0 (图 5C), pH 4.5–7.0 稳定性较好(图 5D)。因此, 根据酶学性质理论, 该酶属于耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶。

由表 3 可以看出: 1 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Al^{3+} 均对 β -甘露聚糖酶有激活作用, 其中 Mn^{2+} 的作用最强; 相同浓度的 K^+ 、 Fe^{3+} 和 NH_4^+ 对 β -甘露聚糖酶活力无明显作用, 而 Ba^{2+} 和 Pb^{2+} 对 β -甘露聚糖酶有强烈抑制作用。因此, 在实际应用中要防止 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等重金属离子污染。

图5 温度和 pH 对 β -甘露聚糖酶活力的影响Figure 5 Effect of temperature and pH on β -mannanase activity

注: A: 最适温度曲线; B: 稳定温度曲线; C: 最适 pH 曲线; D: 稳定 pH 曲线。

Note: A: The optimum temperature curve; B: The thermal stability curve; C: The optimum pH curve; D: The pH stability curve.

表3 金属离子对 β -甘露聚糖酶活力的影响
Table 3 Effect of different metal ions to β -mannanase activity

金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)	金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)
Blank	100	Cu ²⁺	136±2.7
K ⁺	99±1.8	Mg ²⁺	107±1.0
NH ₄ ⁺	101±1.4	Ba ²⁺	53±0.5
Ca ²⁺	119±2.5	Pb ²⁺	64±0.9
Zn ²⁺	115±2.7	Fe ³⁺	99±1.9
Mn ²⁺	188±4.1	Al ³⁺	121±2.4

3 结论与讨论

本研究从半纤维素高效降解菌株 *B. subtilis* BE-91 克隆到一个耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶基因, 并进行了原核高效表达, pEASY-man/BL 菌株产胞外 β -甘露聚糖酶活力最高达到 229.1 IU/mL。据报道, 一种来源于地衣芽孢杆菌 W10 的甘露聚糖酶基因用 pET22b 载体的原核表达, 其甘露聚糖酶活力为 19.73 U/mL^[20]。一种来源于链霉菌 *Streptomyces fradiae* var. k11 的甘露聚糖酶基因用 pET28a 载体的原核表达, 其甘露聚糖酶活力仅为 0.57 U/mL^[21]。一种来源于枯草芽孢杆菌 A33 的甘露聚糖酶基因用 pRSET-A 载体进行原核表达, 其甘露聚糖酶在菌体中表达后部分以不溶性包涵体的形式存在, 极少部分以可溶性蛋白形式存在于表达细菌的细胞内^[22]。

因此, 本研究对来源于 *B. subtilis* BE-91 的 β -甘露聚糖酶基因用 pEASY-E1 载体进行原核表达, 与国内同类研究^[23-24]相比, 其检测到的胞外 β -甘露聚糖酶活力高几倍甚至数十倍之多, 通过高密度培养、表达条件优化等途径还有望进一步提高。

本研究发掘的耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶具备在饲料工业的应用前景。该酶的稳定温度为 65 °C, 与其他微生物来源的 β -甘露聚糖酶 (*Penicillium occitanis* Pol6 为 40 °C; *Bacillus circulans* NT6.7 和 *B. subtilis* B36 均为 50 °C; *Paenibacillus* sp. DZ3 和 *Neosartorya fischeri* P1 均为 60 °C)^[25-29]相比, 其耐热温度高。该酶的稳定 pH 为 4.5-7.0, 其稳定 pH 属于偏酸性的酶学特性适宜动物肠道环境, 适宜开发成畜禽、水生动物饲料添加剂^[12,30]。

参考文献

- [1] Chauhan PS, Puri N, Sharma P, et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 1817-1830
- [2] Pan X, Zhou JG, Tian A, et al. High level expression of a truncated β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(3): 565-570
- [3] Nunes FM, Reis A, Domingues MRM, et al. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(9): 3428-3439
- [4] Kong C, Lee JH, Adeola O. Supplementation of β -mannanase to starter and grower diets for broilers[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2011, 91(3): 389-397
- [5] Comfort DA, Chhabra SR, Connors SB, et al. Strategic biocatalysis with hyperthermophilic enzymes[J]. *Green Chemistry*, 2004, 6(9): 459-465
- [6] Liu ZH, Qi W, He ZM. Optimization of β -mannanase production from *Bacillus licheniformis* TJ-101 using response surface methodology[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2008, 22(3): 355-362
- [7] He YX, Song Y, Cao H, et al. Purification and characterization of β -mannanase atMAN47 from *Armillariella tabescens*[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(10): 1455-1459 (in Chinese)
何艳喜, 宋影, 曹红, 等. *Armillariella tabescens* EJLY2098 β -甘露聚糖酶 atMAN47 的纯化及酶学性质分析[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1455-1459
- [8] Bhoria P, Singh G, Hoondal GS. Optimization of mannanase production from *Streptomyces* sp. PG-08-03 in submerged fermentation[J]. *BioResources*, 2009, 4(3): 1130-1138
- [9] Wu J, Duan ZY, Gao QY, et al. Hydrolytic properties of β -mannanase from *Nocardioform actinomycetes*[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(4): 31-35 (in Chinese)
吴襟, 段子渊, 高启禹, 等. 诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的水解特性[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(4): 31-35
- [10] Liu Y, Mao AJ, Li H, et al. Cloning and homology analysis of beta-mannanase gene from the collection of *Bacillus subtilis* group[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(5): 845-850 (in Chinese)
刘勇, 毛爱军, 李辉, 等. 枯草芽孢杆菌群 β -甘露聚糖酶基因克隆及同源性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 845-850
- [11] Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Recent advances and prospect on structural biology of β -mannanase-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(9): 1131-1137 (in Chinese)
赵月菊, 薛燕芬, 马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望[J]. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1131-1137
- [12] Liu XD, Yang PL, Liu YC, et al. Studies on the gene cloning and its enzymology characteristics of a neutral β -Mannanase from *Paenibacillus* sp. A1[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11(5): 60-65 (in Chinese)
刘小丹, 杨培龙, 刘永超, 等. 一种来源于 *Paenibacillus* sp. A1 的中性 β -甘露聚糖酶基因克隆及其酶学性质研究[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(5): 60-65
- [13] Liu ZC, Xu JF, Duan SW, et al. Expression of modified xynA gene fragments from *Bacillus subtilis* BE-91[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 139-145
- [14] Guo G, Liu ZC, Xu JF, et al. Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(4): 419-428
- [15] Liu ZC, Dai XY, Zhang JZ, et al. Screening of a xylanase high-producing strain and its rapid separation and purification[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(4): 901-906
- [16] Gao HY, Liu ZC, Duan SW, et al. Coexpression of β -mannanase and xylanase genes in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(3): 344-352 (in Chinese)
高海有, 刘正初, 段盛文, 等. β -甘露聚糖酶和木聚糖酶基因在大肠杆菌中共表达[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(3): 344-352
- [17] Liu ZC, Duan SW, Sun QX, et al. A rapid process of ramie bio-degumming by *Pectobacterium* sp. CXJZU-120[J]. *Textile Research Journal*, 2012, 82(15): 1553-1559
- [18] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 26(4): 323-327
- [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [20] Qiu ZH, Shi PJ, Liu SC, et al. Gene cloning and characterization of a protease-resistant β -mannanase rooted in *Streptomyces fradiae* var. k11[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(4): 114-120 (in Chinese)
邱振华, 石鹏君, 刘素纯, 等. 来源于链霉菌 *Streptomyces fradiae* var. k11 的抗蛋白酶甘露聚糖酶的基因克隆与鉴定[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(4): 114-120
- [21] Zhang QX, Huang SS, Tong YH, et al. Cloning and expression of β -mannanase gene from *Bacillus licheniformis* W10[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2010, 31(4): 77-81 (in Chinese)
张清霞, 黄姗姗, 童蕴慧, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 β -甘露聚糖酶基因的克隆与表达[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2010, 31(4): 77-81
- [22] Zhang XW, Tian ZJ, Wu YY, et al. The cloning and expression of β -mannanase gene in *E. coli*[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition)*, 2005, 31(6): 605-608 (in Chinese)
张学文, 田志坚, 吴永尧, 等. β -甘露聚糖酶基因克隆与在大肠杆菌中表达[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2005, 31(6): 605-608
- [23] Chang HY, Fan DD, Luo YE, et al. Optimization of recombinant

- E. coli* high-density fermentation for expressing human-like Collagen II [J]. *Microbiology China*, 2009, 36(6): 870-874 (in Chinese)
常海燕, 范代娣, 骆艳娥, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白 II 条件优化[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(6): 870-874
- [24] Zhang S, Wang M, Han ML, et al. Optimization of fermentation and induction conditions of recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET30a(+) hrpNEcc[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(10): 44-49 (in Chinese)
张姝, 王敏, 韩梅琳, 等. 基因重组大肠杆菌表达 HrpNEcc 蛋白的发酵条件及诱导条件优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(10): 44-49
- [25] Blibech M, Ghorbel RE, Fakhfakh I, et al. Purification and characterization of a low molecular weight of β -mannanase from *Penicillium occitanis* Pol6[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(4): 1227-1240
- [26] Piwpankaew Y, Sakulsirirat S, Nitisinprasert S, et al. Cloning, secretory expression and characterization of recombinant β -mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7[J]. *Springerplus*, 2014, 3(1): 430
- [27] Li YN, Meng K, Wang YR, et al. A β -mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2006, 61(11/12): 840-846
- [28] Chandra MRS, Lee YS, Park IH, et al. Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2011, 54(3): 325-331
- [29] Yang H, Shi PJ, Lu HQ, et al. A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 283-289
- [30] Yang PL, Yao B. Research and development of enzymes used in feed[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(12): 1844-1851 (in Chinese)
杨培龙, 姚斌. 饲料用酶制剂的研究进展与趋势[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1844-1851

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.2158)