

研究报告

Bacillus subtilis BE-91 生长及其胞外表达 β -甘露聚糖酶的发酵条件优化

成莉凤[△] 戴小阳[△] 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】优化枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BE-91 生长及其胞外表达 β -甘露聚糖酶的发酵条件。【方法】对影响菌株生长和发酵的主要因素(C 源、N 源、起始 pH、温度等)进行单因素试验后,采用正交试验法研究 *B. subtilis* BE-91 生长培养条件和摇瓶发酵条件的优化组合。【结果】优化生长条件为: 0.3%牛肉膏、0.2%酵母膏、0.1%葡萄糖、0.4%魔芋精粉、0.5% NaCl, 初始 pH 6.0、培养温度 35 °C; 胞外表达 β -甘露聚糖酶活力的摇瓶发酵条件优化组合为: 0.7%魔芋精粉、0.4%大豆蛋白胨、0.1% (NH₄)₂SO₄、0.5% NaCl, 发酵温度 35 °C 和起始 pH 6.0; 优化条件下发酵 10 h, β -甘露聚糖酶活力最高达 432.4 IU/mL, 比国内外已有相关菌株报道的发酵时间缩短了 14–86 h, 最高酶活力提高了 5 倍以上。【结论】*B. subtilis* BE-91 生长与发酵周期短、胞外表达 β -甘露聚糖酶的活力高, 是酶制剂产业具有重大开发价值的菌种资源。

关键词: *Bacillus subtilis* BE-91, β -甘露聚糖酶, 生长条件, 发酵条件

Optimization of growth and shake flask fermentation conditions of *Bacillus subtilis* BE-91 producing extracellular β -mannanase

CHENG Li-Feng[△] DAI Xiao-Yang[△] 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] We optimize the growth conditions of *Bacillus subtilis* BE-91 and its shake flask fermentation conditions producing extracellular β -mannanase. [Methods] Single-factor experiments were used to optimize the main factors (such as carbon source, nitrogen source, pH, temperature and so on) affecting the growth of *B. subtilis* BE-91 and its extracellular β -mannanase production in shake flask fermentation. Based on one-factor-at-a-time experiment, orthogonal tests were applied to obtain the optimal combination. [Results] The optimum growth conditions of *B. subtilis* BE-91 showed as

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; Fax: 86-731-88998528; ✉: ibfclzc@189.cn

[△]共同第一作者

收稿日期: 2015-09-23; 接受日期: 2015-11-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-03

follows: 0.3% beef extract, 0.2% yeast extract, 0.1% glucose, 0.4% konjac powder, 0.5% NaCl, initial pH of 6.0, and culture temperature of 35 °C. The optimum conditions for extracellular β -mannanase production were as follows: 0.7% konjac power, 0.4% soybean peptone, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% NaCl, initial pH of 6.0 and fermentation temperature of 35 °C. Under the optimized conditions, the highest extracellular β -mannanase production of *B. subtilis* BE-91 was 432.4 IU/mL in 10 h. Its extracellular β -mannanase production was more than 5-fold higher than that from other relevant strains reported, and the time appeared 14–86 h shorter than others. **[Conclusion]** *B. subtilis* BE-91 has advantage in short cultivation time and high extracellular production of β -mannanase, so it is the specious resources with potential use in the enzyme preparation industry.

Keywords: *Bacillus subtilis* BE-91, β -Mannanase, Growth condition, Fermentation condition

β -甘露聚糖酶(β -Mannanase, EC3.2.1.78)是一类能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖, 生成甘露二糖、三糖等小分子物质的水解酶^[1]。结合甘露糖苷酶(β -Mannosidase, EC3.2.1.25)、半乳糖苷酶(α -Galactosidase, EC3.2.1.22)、葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC3.2.1.21)、乙酰甘露聚糖脂酶(Acetylmannan esterase, EC3.2.1.6)等支链酶的协同作用, 可彻底降解甘露聚糖^[2]。目前, β -甘露聚糖酶已广泛应用于食品、医药、饲料、造纸、印染、纺织及石油开采等领域^[3-5]。

β -甘露聚糖酶普遍存在于自然界中, 但微生物生产的 β -甘露聚糖酶是主要来源。迄今, 已有许多关于微生物生产 β -甘露聚糖酶的报道, 例如: 细菌中的芽孢杆菌 (*Paenibacillus thiaminolyticus*、*Bacillus nealsonii* PN-11、*Bacillus pumilus* GBSW19)^[6-8]等; 真菌中的萨托菌 (*Neosartorya fischeri* P1)^[9]、篮状菌 (*Talaromyces leycettanus*)^[10]等, 曲霉如构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans* XZ3)^[11]、黑曲霉 (*Aspergillus niger* BK01)^[12]等; 放线菌中的链霉菌 (*Streptomyces tendae*)^[13]等。微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有活性高, 成本低, 来源稳定, 提取方便以及比动植物更广的作用 pH、温度范围和底物适应性等显著特点, 易被理论研究和工业化生产应用。随着 β -甘露聚糖酶的工业化需求不断增长, 如何利用微生物资源高效生产能适用于不同工业领域的 β -甘露聚糖酶业已成为专家学者们关注的焦点, 选育优良菌株并优化其产 β -甘露聚糖酶的工艺

条件是高效生产的基础。

本项目组选育到一个能同时高产耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶和木聚糖酶的半纤维降解高效菌株 *B. subtilis* BE-91^[14-15], 前期已对该菌木聚糖酶的发酵工艺、分离纯化和酶学性质等进行了系统研究^[16-17]。本研究拟在单因素试验基础上, 采用正交试验法优化 *B. subtilis* BE-91 的生长条件和胞外表达 β -甘露聚糖酶的摇瓶发酵条件, 为开发 *B. subtilis* BE-91 在酶制剂产业的应用价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

半纤维降解高效菌株 *B. subtilis* BE-91 (曾用编号: CXJZ11-01)由中国农业科学院麻类研究所酶工程项目组选育并保存。

1.2 培养基

选择平板: 在标准 LB 固体培养基(g/L, 胰蛋白胍 10, 氯化钠 10, 酵母提取物 5, 琼脂 15, 加水至 1 L, NaOH 调整 pH 为 7.4–7.6, 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min)配方的基础上, 添加 5 g/L 魔芋胶、0.5 g/L 曲利苯兰。

生长培养基、发酵培养基配方通过正交试验确定。

1.3 主要试剂

魔芋胶(纯度>95%), 成都路特实业有限公司; 魔芋精粉(食品级), 湖南龙山天食有限责任公司; 曲利苯兰和甘露糖, 美国 Sigma 公司; 3,5-二硝基

水杨酸, 国药集团。

1.4 主要仪器

酶标仪(MLtiskan GO), 美国 Thermo Scientific 公司; 分析天平(MS32000LE), 瑞士梅特勒公司; pH 计(HI9025), 意大利 HANNA 公司; 水浴摇床 (THZ-82), 中国荣华仪器公司。

1.5 菌种培养及 β -甘露聚糖酶粗酶液制备

取真空保存的 *B. subtilis* BE-91 菌种一环, 接种于 6 mL 生长培养基, 35 °C 静置培养 5.5 h; 稀释涂于选择平板, 35 °C 培养 18 h, 挑取优良单菌落接种于 6 mL 生长培养基, 35 °C 静置培养 6 h, 即为一级培养菌悬液。将一级菌悬液接种于盛有 100 mL 培养液的小三角瓶, 35 °C、180 r/min 振荡培养至指数生长期, 即为二级菌悬液。按接种量 2% 接种于 300 mL 发酵培养基, 35 °C、180 r/min 振荡培养。按相关实验步骤的时间要求取样(10 mL 发酵液), 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为 β -甘露聚糖酶粗酶液。

1.6 β -甘露聚糖酶活力测定

参照 Akino 等方法^[18], 用魔芋胶和 pH 6.5 0.025 mol/L 柠檬酸-0.05 mol/L NaH_2PO_4 缓冲液配制 5 g/L (质量体积比)的底物, 取 1 mL 适当稀释的酶液与 2 mL 预热的底物充分混匀, 65 °C 反应 10 min, DNS 法测还原糖生成量。用灭活的酶液做相同处理作对照。 β -甘露聚糖酶活力定义: 底物每分钟释放相当于 1 μmol 甘露糖的还原糖所需酶量为 1 个酶活力单位(以 IU 表示)。

1.7 生长培养条件优化

1.7.1 单因素试验: 分别以培养温度(30、35、37 和 40 °C)和起始 pH (4.5–8.0, 间隔 0.5)为变量, 固定其他生长培养条件, 转接摇瓶后, 在适当的培养时间点取样, 以测得的菌液 OD_{600} 为衡量指标进行优化水平评价。每组试验设置 3 个重复。

1.7.2 正交试验: 根据培养基的主要成分 C 源、N 源和无机盐 3 因素设计正交实验 $L_9(3^3)$ 方案(表 1)^[19-20], 以 OD_{600} 值为衡量指标, 结合极差和方差分析评价生长培养基成分优化组合。每组试验设置

表 1 生长培养基 $L_9(3^3)$ 正交试验因素及水平
Table 1 Factors and levels for orthogonal array design $L_9(3^3)$

Test number	Factor A	Factor B	Factor C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

Note: Factor A: Nitrogen source; Level 1, 0.3% beef extract+0.2% yeast extract; Level 2, 0.5% beef extract; Level 3, 0.4% beef extract+0.1% yeast extract. Factor B: Carbon source; Level 1, 0.1% glucose+0.4% konjac powder; Level 2, 0.5% glucose; Level 3, 0.5% konjac powder. Factor C: Inorganic salt; Level 1, 0.35% NaCl +0.1% KH_2PO_4 +0.05% MgSO_4 ; Level 2, 0.1% KH_2PO_4 +0.05% MgSO_4 ; Level 3, 0.5% NaCl .

分 3 个重复。

1.8 发酵条件优化

1.8.1 单因素试验: 以发酵培养基 C 源浓度 (0–0.9%)、起始 pH (4.5–8.0, 间隔 0.5)和发酵温度 (30、35、37 和 40 °C)为变量, 固定其他发酵条件, 进行单因素试验。以发酵 12 h 的胞外 β -甘露聚糖酶活力为衡量指标。评价发酵条件优化水平。每组试验设置 3 个重复。

1.8.2 正交试验: 在单因素试验基础上, 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$ 方案(表 2)^[19-20], 以胞外 β -甘露聚糖酶活力为衡量指标, 结合极差和方差分析评价发酵条件优化组合。每组试验设置 3 个重复。

1.9 *B. subtilis* BE-91 的生长规律和产酶规律测定

采用试验确定的优化生长和发酵条件, 按照方法 1.5 菌种培养流程进行 *B. subtilis* BE-91 发酵, 从发酵培养基培养第 6 h 开始取样, 每小时取样一次, 测定 OD_{600} 和胞外 β -甘露聚糖酶活力。

表 2 发酵工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及水平
Table 2 Factors and levels for orthogonal array design $L_9(3^4)$

Test number	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Note: Factor A: Carbon source; Level 1, 0.5% konjac powder; Level 2, 0.6% konjac powder; Level 3, 0.7% konjac powder. Factor B: Nitrogen source; Level 1, 0.4% soybean peptone+0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Level 2, 0.2% soybean peptone+0.2% yeast extract+0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Level 3, 0.2% soybean peptone+0.2% beef extract+0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Factor C: pH; Level 1: pH 5.5; Level 2: pH 6.0; Level 3: pH 6.5. Factor D: Temperature; Level 1, 33 °C; Level 2, 35 °C; Level 3, 37 °C.

1.10 数据分析

每个检测指标重复 3 次, 取平均值。利用 Excel 2007 和统计分析软件 SAS 9.0 对 3 次重复试验结果进行分析并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 生长培养条件优化

2.1.1 单因素对菌种生长的影响: 测定在不同培养温度和起始 pH 条件下 *B. subtilis* BE-91 的生长趋势。(1) 培养温度: 从图 1 可以看出, 不同温度明显影响了 *B. subtilis* BE-91 生长。35 °C 条件下培养, *B. subtilis* BE-91 的指数生长期呈现在接种后第 4–8 h; 40 °C 条件下, *B. subtilis* BE-91 接种 4 h 后, OD_{600} 不增长, 甚至负增长; 在 30 °C 和 37 °C 条件下, *B. subtilis* BE-91 的对数生长曲线的斜率远不及 35 °C。因此, 可以肯定, 35 °C 是 *B. subtilis* BE-91 的适宜生长温度; 若要进行扩大培养或发酵取 6–8 h 菌龄比较合适。(2) 起始 pH: 从表 3 可以看出, 当起始 pH 为 4.5–8.0, 培养第 8 h 的菌液 OD_{600}

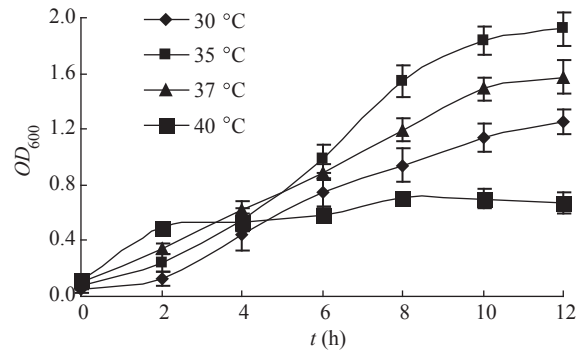


图 1 温度对 *B. subtilis* BE-91 生长的影响

Figure 1 Effects of temperature on *B. subtilis* BE-91 growth

表 3 起始 pH 对 *B. subtilis* BE-91 生长的影响
Table 3 Effects of initial pH on *B. subtilis* BE-91 growth

pH	OD_{600}	
	Culture in 6 h	Culture in 8 h
4.5	0.670 ^{Bab}	0.722 ^{Aa}
5.0	0.703 ^{Bb}	1.046 ^{CDb}
5.5	0.837 ^{Dc}	1.214 ^{Dc}
6.0	0.900 ^{Ed}	1.356 ^{Ecd}
6.5	0.816 ^{Dc}	1.300 ^{DEc}
7.0	0.782 ^{Cc}	1.108 ^{Db}
7.5	0.640 ^{Aa}	0.890 ^{Lb}
8.0	0.635 ^{Aa}	0.788 ^{Ba}

Note: ^{A, B, C, D, E} in the same line statistically different significance ($P < 0.05$) among different levels in the same culture time. ^{a, b, c, d} in the same line statistically different extreme significance ($P < 0.01$) among different levels in the same culture time.

值都大于第 6 h 的菌液 OD_{600} 值, 说明 *B. subtilis* BE-91 的适宜生长 pH 范围比较宽; 当起始 pH 6.0 时, 培养第 6 h 和第 8 h 的菌液 OD_{600} 值均较其余 pH 组大, 说明起始 pH 6.0 更适合于该菌生长。

2.1.2 多因素正交试验: 在单因素试验的基础上, 对 N 源、C 源和无机盐进行正交试验。结合极差和方差分析(表 4 和表 5)的结果可知: 影响 *B. subtilis* BE-91 生长的因素主次顺序为: 无机盐 > N 源 > C 源; 在选定的条件下, 优化生长培养基组合为 0.3% 牛肉膏 + 0.2% 酵母膏、0.1% 葡萄糖 + 0.4% 魔芋精粉、0.5% NaCl。

表4 $L_9(3^3)$ 正交试验数据极差分析
Table 4 Range analysis for orthogonal array design $L_9(3^3)$

Test number	N source	C source	Inorganic salt	OD_{600}
1	1	1	1	0.945
2	1	2	2	0.425
3	1	3	3	0.955
4	2	1	2	0.345
5	2	2	3	0.841
6	2	3	1	0.836
7	3	1	3	1.125
8	3	2	1	0.730
9	3	3	2	0.352
K1	2.325	2.415	2.511	
K2	2.022	1.996	1.122	
K3	2.207	2.143	2.921	
k1	0.775	0.805	0.837	
k2	0.674	0.665	0.374	
k3	0.736	0.714	0.974	
R	0.101	0.140	0.600	

Primary and secondary factors: C>B>A
Optimization levels: A₁B₁C₃

表5 $L_9(3^3)$ 正交试验数据方差分析
Table 5 Variance analysis for orthogonal array design $L_9(3^3)$

Source of variation	DF	SS	MS	F value	P
Model	8	1.837	0.230	39.42	<0.0001**
A	2	0.057	0.029	4.93	0.0197*
B	2	0.077	0.039	6.64	0.0069**
C	2	1.702	0.851	146.12	<0.0001**
Error	18	0.105	0.006		
Corrected total	26	1.942			

Note: *: Statistically significant level variance ($P<0.05$); **: Statistically extremely significant level variance ($P<0.01$).

2.2 发酵条件优化

2.2.1 单因素对菌种产 β -甘露聚糖酶的影响:分析不同发酵温度、pH和魔芋精粉的浓度对产酶的作用效果。(1) 发酵温度:从图2可以看出,35℃条件下发酵,*B. subtilis* BE-91胞外表达 β -甘露聚糖酶活力最高为307.2 IU/mL。该实验结果的差异与上述“培养温度”实验结果雷同。说明35℃是*B. subtilis* BE-91生长及其胞外表达 β -甘露聚糖酶的优化温度条件。(2) 发酵pH:培养基的pH主要通过影响细胞膜所带电荷及细胞对营养物质的利用,改变培养基中有机化合物的离子化作用程度,从而促进或抑制微生物的生长和代谢。从图3可以看出,pH 6.0条件下发酵,*B. subtilis* BE-91产 β -甘露聚糖酶活力最高为305.8 IU/mL。该实验结果的差异与上述“起始pH”实验结果雷同。说明pH 6.0是*B. subtilis* BE-91生长及其胞外表达 β -甘露聚糖酶的优化pH条件。(3) 魔芋精粉浓度:由图4可知,当发酵培养基的魔芋精粉浓度<0.7%时,*B. subtilis* BE-91产 β -甘露聚糖酶随着魔芋精粉含量增大而迅速升高;魔芋精粉浓度>0.7%时,随着魔芋精粉含量增大,*B. subtilis* BE-91产 β -甘露聚糖酶迅速降低。这可能是因为魔芋精粉含量高,导致培养基黏度过大,不利于发酵体系的传质和溶氧,从而影响菌株产酶。当培养基不含魔芋精粉时,发酵液中几乎检测不到 β -甘露聚糖酶活力。因此,可以推断魔芋精粉在*B. subtilis* BE-91产 β -甘露聚糖酶过程中

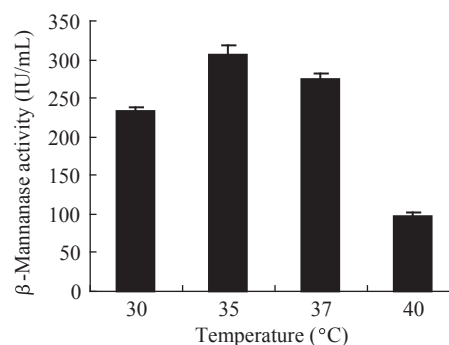


图2 温度对 β -甘露聚糖酶合成的影响

Figure 2 Effects of temperature on β -mannanase production

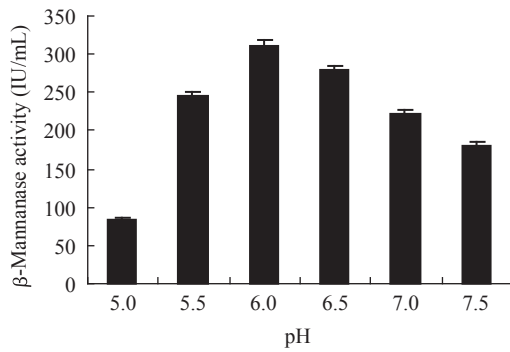


图3 pH对 β -甘露聚糖酶合成的影响
Figure 3 Effects of pH on β -mannanase production

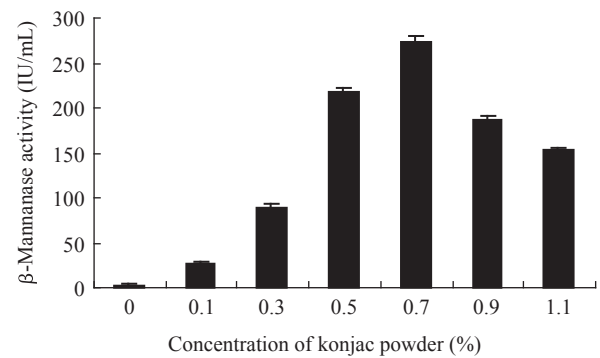


图4 魔芋精粉浓度对 β -甘露聚糖酶合成的影响
Figure 4 Effects of konjac powder concentration on β -mannanase production

表6 $L_9(3^4)$ 正交试验数据极差分析
Table 6 Range analysis for orthogonal array design $L_9(3^4)$

Test number	C source	N source	pH	Temperature	β -Mannanase activity (IU/mL)
1	1	1	1	1	203.4
2	1	2	2	2	244.5
3	1	3	3	3	203.4
4	2	1	2	3	213.7
5	2	2	3	1	215.9
6	2	3	1	2	208.0
7	3	1	3	2	324.3
8	3	2	1	3	233.1
9	3	3	2	1	296.9
K1	651.3	741.4	644.5	716.2	586.3
K2	637.6	693.5	755.1	776.8	662.7
K3	854.3	708.3	743.6	650.2	651.2
k1	217.1	247.1	214.8	238.7	
k2	212.5	231.2	251.7	258.9	
k3	284.8	236.1	247.9	216.7	
R	72.2	16.0	36.9	42.2	

Primary and secondary factors: A>D>C>B

Optimization levels: A₃B₁C₂D₂

表 7 $L_9(3^4)$ 正交试验数据方差分析
Table 7 Variance analysis for orthogonal array design $L_9(3^4)$

Source of variation	DF	SS	MS	F value	P
Model	10	46 239.28	4 623.93	59.89	<0.000 1**
A	2	29 470.52	14 735.26	190.84	<0.000 1**
B	2	1 204.41	602.21	7.80	<0.000 1**
C	2	7 405.65	3 702.82	47.96	<0.000 1**
D	2	8 023.29	4 011.641	51.96	<0.000 1**
Error	16	1 235.38	77.211		
Corrected total	26	47 474.656			

Note: **: Statistically extremely significant level variance ($P < 0.01$).

不仅作为营养成分的碳源,还可能是重要的诱导物。

2.2.2 多因素正交试验: 在单因素试验的基础上,对 C 源、N 源、发酵温度和发酵 pH 进行正交试验。表 6 和表 7 结果表明: 影响因素的主次顺序为 C 源 > 温度 > pH > N 源; 在选定的条件下, 最优发酵条件组合为: 0.7% 魔芋精粉、0.4% 大豆蛋白胨和 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、发酵温度 35 °C 和发酵 pH 6.0。

2.3 产酶时间进程

与菌体生长相比, *B. subtilis* BE-91 菌株分泌 β -甘露聚糖酶具有明显的同步效应(图 5), 约 6 h 菌株进入指数生长期, 10 h 达到最高峰, OD_{600} 约为 2.5。同时, β -甘露聚糖酶的产生在 10 h 达到了最高值 432.4 IU/mL, 之后有小幅降低。据此, 初步

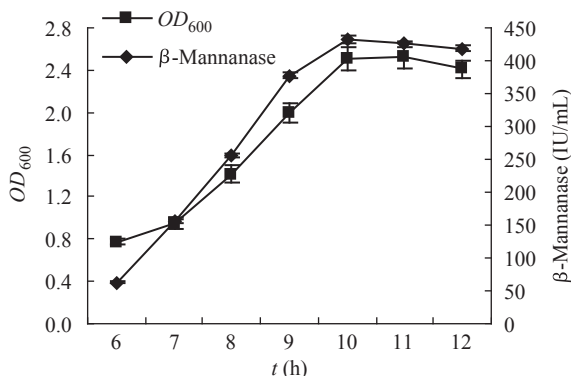


图 5 *B. subtilis* BE-91 的产酶进程

Figure 5 β -Mannanase production course of *B. subtilis* BE-91

确定在该培养条件下, *B. subtilis* BE-91 菌株分泌 β -甘露聚糖酶的最佳时间为 10 h。

3 结论

前期研究已表明, *B. subtilis* BE-91 胞外表达 β -甘露聚糖酶的最适 pH 为 6.0, 最适反应温度和热稳定性均大于 60 °C, 属于典型的耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶^[14]。本研究获得的优化生长条件为: 0.3% 牛肉膏、0.2% 酵母膏、0.1% 葡萄糖、0.4% 魔芋精粉、0.5% NaCl, 初始 pH 6.0、培养温度 35 °C; 胞外表达 β -甘露聚糖酶活力的摇瓶发酵条件优化组合为: 0.7% 魔芋精粉、0.4% 大豆蛋白、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5% NaCl, 发酵温度 35 °C 和起始 pH 6.0。优化条件下发酵 10 h, β -甘露聚糖酶活力最高达 432.4 IU/mL。与国内外已有相关报道相比^[21-23], 发酵时间缩短了 14-86 h、最高酶活力提高了 5 倍以上。由于本实验的发酵培养基采用价格低廉的魔芋精粉兼做碳源和产酶诱导物, 大大节省了 β -甘露聚糖酶的生产成本^[24]。因此, *B. subtilis* BE-91 培养与发酵周期短、胞外表达 β -甘露聚糖酶的活性高, 是酶制剂产业具有重大开发价值的菌种资源。本研究中的最适生长温度和发酵温度相同(均为 35 °C), 最适生长和发酵的初始 pH 值也相同(均为 6.0)。由于二者的主要外界环境参数相同, 不仅减轻了菌体生长和发酵产酶同步最优化的技术难度, 还可简化实际生产的操作流程。

本研究的目标菌株 *B. subtilis* BE-91 在发酵 10 h 产 β -甘露聚糖酶达到 432.4 IU/mL, 较国内外其他报道具有产酶早、酶活力高的优势。综合考虑产量和生产成本, 利用 *B. subtilis* BE-91 生产耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶, 值得进一步中试^[25]。

参考文献

- [1] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(4): 197-216
- [2] Malgas S, van Dyk JS, Pletschke BI. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(8): 1167-1175
- [3] Wu G, Bryant MM, Voitle RA, et al. Effects of β -mannanase in corn-soy diets on commercial leghorns in second-cycle hens[J]. *Poultry Science*, 2005, 84(6): 894-897
- [4] Ramachandran P, Zhao ZP, Singh R, et al. Characterization of a β -1,4-mannanase from a newly isolated strain of *Pholiota adiposa* and its application for biomass pretreatment[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(9): 1817-1824
- [5] Adiguzel A, Nadaroglu H, Adiguzel G. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(8): 5292-5298
- [6] Dhawan S, Singh R, Kaur R, et al. A β -mannanase from *Paenibacillus* sp.: optimization of production and its possible prebiotic potential[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015. DOI: 10.1002/bab.1419
- [7] Chauhan PS, Tripathi SP, Sangamwar AT, et al. Cloning, molecular modeling, and docking analysis of alkali-thermostable β -mannanase from *Bacillus nealsonii* PN-11[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(21): 8917-8925
- [8] Zang HY, Xie SS, Wu HJ, et al. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 78: 1-9
- [9] Wang CH, Luo HY, Niu CF, et al. Biochemical characterization of a thermophilic β -mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1217-1228
- [10] 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
- [11] Lu HQ, Luo HY, Shi PJ, et al. A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3: functional roles of carbohydrate-binding module and Thr/Ser-rich linker region[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 2155-2163
- [12] Huang JW, Chen CC, Huang CH, et al. Improving the specific activity of β -mannanase from *Aspergillus niger* BK01 by structure-based rational design[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014, 1844(3): 663-669
- [13] Yoo HY, Lee JH, Yang XG, et al. A novel bacterial mannanase from *Streptomyces tendae*: purification, characterization and application to hydrolysis of spent coffee ground[C]. *Proceedings of the 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. San Diego, CA: SBFC, 2015
- [14] Cheng LF. Study on breeding of β -mannanase overproducing strain, purification and properties of β -mannanase[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007 (in Chinese)
成莉凤. β -甘露聚糖酶高产菌株筛选及酶的纯化与性质研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2007
- [15] Xu JF. Diversity, cloning and expression of xylanase gene from *Bacillus subtilis* BE-91[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2010 (in Chinese)
徐君飞. 枯草芽孢杆菌 BE-91木聚糖酶基因多样性及其克隆与表达研究[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2010
- [16] 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
- [17] 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
- [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] Li YY, Hu CR. *Experimental Design and Data Processing*[M]. 2nd Edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 124-127 (in Chinese)
李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 124-127
- [20] Du LY, Wang H, Jin G, et al. Storage of *Oenococcus oeni* in liquid nitrogen[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1263-1269 (in Chinese)
杜立业, 王华, 金刚, 等. 酒球菌液氮超低温保存[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1263-1269
- [21] Wang J, Li X, Zhu JJ, et al. Effects of medium components on β -mannanase production by *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2013, 37(1): 101-104 (in Chinese)
王静, 李鑫, 朱均均, 等. 培养基组成对里氏木霉合成 β -甘露聚糖酶的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(1): 101-104
- [22] Yang XQ, Sun D, Yang WB, et al. Studies on the production of β -mannanase by *Bacillus licheniformis* NK-27[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2002, 35(2): 117-120 (in Chinese)
杨先芹, 孙丹, 杨文博, 等. 地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株 β -甘露聚糖酶的产酶条件及粗酶性质[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2002, 35(2): 117-120
- [23] El-Sharounya EE, El-Toukhy NMK, El-Sersy NA, et al. Optimization and purification of mannanase produced by an alkaliphilic-thermotolerant *Bacillus cereus* N1 isolated from Bani Salama Lake in Wadi El-Natron[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 315-323
- [24] Blibech M, Ghorbel RE, Chaari F, et al. Improved mannanase production from *Penicillium occitanis* by fed-batch fermentation using acacia seeds[J]. *ISRN Microbiology*, 2011, 2011: 938347. DOI: 10.5402/2011/938347
- [25] Yan Y, Yang SQ, Fan GS, et al. Optimization of xylanase production from *Malbranchea cinnamomea* by solid state fermentation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(8): 1339-1346 (in Chinese)
严焯, 杨绍青, 范光森, 等. 樟绒枝霉 (*Malbranchea cinnamomea*) 固体发酵产木聚糖酶的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(8): 1339-1346