

# 产 $\beta$ -甘露糖苷酶菌株的 筛选、鉴定及酶学性质研究

秦玲丽, 李雪晴, 崔堂兵

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:**本研究通过初筛(魔芋粉为唯一碳源并结合刚果红染色法)和复筛(利于对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷法测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力),从采集的森林土壤中筛选产 $\beta$ -甘露糖苷酶的菌株,获得1株酶高产菌株B19。通过显微形态、革兰氏染色、生理生化特征、16S rDNA序列及系统发育进化树分析等方法,将其鉴定为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。菌株B19所产的 $\beta$ -甘露糖苷酶为胞内酶,在37℃、200 r/min条件下培养48 h后,测得的酶活力为1.26 U/mL。初步酶学性质研究表明:该酶的最适反应pH和最适反应温度分别为7.5和50℃,且在pH6.0~8.0和温度45~50℃稳定性较高,浓度为10 mmol/L的 $Mn^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 对该 $\beta$ -甘露糖苷酶具有激活作用,但 $K^+$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 及 $Zn^{2+}$ 抑制酶活力。该菌株可作为产 $\beta$ -甘露糖苷酶的潜在菌株。

**关键词:** $\beta$ -甘露糖苷酶, 筛选, 鉴定, 肠杆菌属, 酶学性质

## Isolation, identification and enzymatic properties of the strain producing $\beta$ -mannosidase

QIN Ling-li, LI Xue-qing, CUI Tang-bing

(School of Biological Science and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The strain B19 with high yield of  $\beta$ -mannosidase was isolated from forest soil sample using first screening (Konjac powder as the sole carbon source and Congo red staining method) and secondary screening (determination of  $\beta$ -mannosidase enzyme activity by p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Mannopyranoside method). The strain was identified as *Enterobacter* sp. by electron microscopy, Gram-staining, physiological and biochemical examination, 16S rDNA sequence and phylogenetic tree analysis. The strain B19 could produce intracellular  $\beta$ -mannosidase, and its activity could be up to 1.26 U/mL when the strain was cultivated 48 h under the condition of 37℃, 200 r/min. The enzymatic properties analysis showed that the optimal pH and temperature of this enzyme were 7.5 and 50℃, respectively. The enzyme exhibited high thermal stability when the temperature ranged from 45 to 50℃, or the pH value ranged from 6.0 to 8.0. The enzyme activity was activated by  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  in concentration of 10 mmol/L, but was inhibited by  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . It might be a good candidate strain in studying  $\beta$ -mannosidase.

**Key words:**  $\beta$ -mannosidase; isolation; identification; *Enterobacter* sp.; enzymatic properties

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)24-0249-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.24.039

$\beta$ -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.25)属于外切水解酶类,又称 $\beta$ -D-甘露糖苷甘露糖水解酶、外切- $\beta$ -D-甘露聚糖酶,它能够催化结合甘露寡聚糖末端非还原性的 $\beta$ -1,4-D-糖苷键,并切下一个甘露糖分子,是甘露聚糖完全降解所必需的水解酶<sup>[1-2]</sup>。

已知产 $\beta$ -甘露糖苷酶的生物有很多,如细菌、真菌、古生菌、酵母等微生物<sup>[3-6]</sup>。 $\beta$ -甘露糖苷酶广泛应用于食品、石油、造纸、制药等领域。在食品行业

中, $\beta$ -甘露糖苷酶被用于咖啡豆发酵处理,降解咖啡豆中的甘露聚糖,以提高咖啡的质量<sup>[7]</sup>;在石油和天然井气的开发过程中,需要 $\beta$ -甘露聚糖酶和 $\beta$ -甘露糖苷酶一起作用降解胶状半乳甘露聚糖以降低粘度,从而利于液压破碎<sup>[8]</sup>;在造纸行业中, $\beta$ -甘露聚糖酶和 $\beta$ -甘露糖苷酶协作降解有色的半纤维素成分,从而加速纸张的漂白<sup>[9]</sup>;制药行业中,因 $\beta$ -甘露聚糖酶转糖基的作用,已经替代化学方法生产功能

收稿日期: 2016-05-27

作者简介: 秦玲丽(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:发酵工程, E-mail: lily900412@163.com。

\*通讯作者: 崔堂兵(1967-),男,博士,教授,研究方向:发酵工程,酶工程,生物制药等方面的研究, E-mail: fetbcui@scut.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(31171732);广东省自然科学基金(S2013010013162)。

性甘露寡糖<sup>[10]</sup>。因此,筛选选育酶活力高的 $\beta$ -甘露糖苷酶产生菌株,具有巨大应用潜力。

本研究从采集的森林土壤样品中筛选分离 $\beta$ -甘露糖苷酶产生菌株,对酶产量最高的菌株 B19 进行生理生化和分子生物学的鉴定,并初步研究其酶学性质,旨在为 $\beta$ -甘露糖苷酶的研究及生产提供菌种资源,同时为构建基因工程菌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

本实验所用的森林土壤样品 采集于河南省信阳市;对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷(p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Mannopyranoside, pNPM) 美国 Sigma 公司;对硝基苯酚(pNP) 天津科密欧公司产品;细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 北京康为世纪生物科技有限公司;胶回收试剂盒、2 × Premix LA Taq 酶、DL2000 DNA Marker TaKaRa 公司(宝生物工程大连有限公司);革兰氏染色试剂盒 广州华奇盛有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

BS224 电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;SP510 全自动高压灭菌锅 日本 YAMATO 公司;GZX-9140 数显鼓风干燥箱 上海博讯实业有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;SKY-200D 恒温摇床 广州科桥实验技术设备有限公司;LRH-250-Z 恒温培养箱 广东省医疗器械厂;PCR 反应扩增仪 东胜创新生物技术有限公司;DDY-8C 型电泳仪 北京六一仪器厂;全自动凝胶成像仪 BIO-RAD 公司;CX 41 光学显微镜 奥林巴斯公司;Eppendorf 冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;超声波细胞破碎仪 美国 SONICS 公司;HH-S 型水浴锅 巩义市予华仪器有限公司。

### 1.2 培养基

1.2.1 富集培养基(%) 魔芋粉 1.0,酵母粉 0.2,蛋白胨 1.0,NaCl 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1,调 pH7.0。

1.2.2 选择培养基(%) 魔芋粉 1.0,NaNO<sub>3</sub> 0.3,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03,NaCl 0.1,CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.005,琼脂粉 1.6,调 pH7.0。

1.2.3 种子培养基(%) 蛋白胨 1.0,酵母粉 0.5,葡萄糖 1.0,NaCl 0.5,pH7.0。

1.2.4 发酵培养基(%) 魔芋粉 1.0,酵母粉 0.2,蛋白胨 1.0,NaCl 0.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1,调 pH7.0。

### 1.3 产 $\beta$ -甘露糖苷酶菌株的分离与筛选

根据参考文献[11]报道的方法并稍做调整进行 $\beta$ -甘露糖苷酶产生菌株的分离与筛选。

1.3.1 样品富集 称取 10.0 g 采集的森林土壤样品到 50 mL/250 mL 富集培养基中(装有数颗灭菌的小玻璃珠),在 37 °C、200 r/min 条件下培养 48 h。

1.3.2 初筛 取 1 mL 培养 48 h 的富集培养基加入到 9 mL 无菌生理盐水中并对其进行梯度稀释。分别取 100  $\mu$ L 稀释 10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 倍的富集培养基涂布到选择培养基上,37 °C 倒置培养至平板上长出菌落,挑取单菌落点种到新的选择培养基上,37 °C 倒置培养 48 h 后,用 1.0 g/L 刚果红溶液染色 30 min,再

用 1.0 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 30 min。挑取刚果红染色后菌落周围形成水解圈的菌株进行划线纯化并保藏在种子培养基斜面上,作为复筛供试菌株。

1.3.3 复筛 将斜面保藏的供试菌株转接到 50 mL/250 mL 的液体种子培养基中,37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h,种子液按 1:100 的比例接入到 50 mL/250 mL 发酵培养基中,37 °C、200 r/min 条件下培养 48 h,收集发酵上清液和菌体,利于对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃甘露糖苷法测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,把产酶最高的菌株作为实验菌株并对其进行菌种鉴定。

### 1.4 菌种鉴定

1.4.1 菌株形态特征 根据参考文献[12],在无菌操作条件下,将实验菌株转接至 LB 培养基平板上,37 °C 条件下倒置培养 24 h,观察菌落的大小、形状、边缘、凹凸度、表面和颜色等特征。

1.4.2 生理生化特征鉴定 参照《常见细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>和《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>进行菌种生理生化鉴定。

1.4.3 16S rDNA 的测定 按照邓毛程等<sup>[15]</sup>介绍的方法并稍有改动,用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取实验菌株的总基因组 DNA,并将其作为 PCR 扩增模板,利用 16S rDNA 测序通用引物,上游引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物 1492R:5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(50  $\mu$ L):2 × Premix LA Taq 酶 25  $\mu$ L;10 mmol/L 上游引物 2  $\mu$ L;10 mmol/L 下游引物 2  $\mu$ L;模板基因组 DNA 1  $\mu$ L;ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。PCR 扩增反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s;57 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 90 s;共 30 个循环;最后 72 °C 保温 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收目的片段送交至广州艾基生物技术有限公司完成测序,同源性序列比对用 NCBI 中的 BLAST 软件进行分析,系统发育进化树用 MEGA 6.06 软件中 Neighbor-Joining 法构建<sup>[16]</sup>。

### 1.5 $\beta$ -甘露糖苷酶活力测定

1.5.1 对硝基苯(pNP)标准曲线绘制 用 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液配制 1.0 mmol/mL 的对硝基苯酚标准液,分别精确量取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.9、1.0 mL 对硝基苯酚标准液,用 pH7.0 的磷酸缓冲液定容至 10 mL,以空白作为参照,测定在 410 nm 的 OD 值,绘制对硝基苯标准曲线<sup>[11]</sup>。

1.5.2  $\beta$ -甘露糖苷酶活力测定 收集发酵培养后的发酵上清液和菌体,并在菌体中加入适量 pH7.0 的磷酸缓冲液,破壁,离心,留上清液即为菌体粗酶液。酶活测定按照张敏等<sup>[17]</sup>介绍的方法并稍有改动,反应体系为:在 50  $\mu$ L 的 5 mmol/L 底物 pNPM (0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液配制)中加入 250  $\mu$ L 待测酶液,于 50 °C 水浴中恒温反应 30 min 后立即加入 2 mL 1.0 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应,在 410 nm 处测定释放的 pNP 的 OD 值。 $\beta$ -甘露糖苷酶活力定义为:在 50 °C 和 pH7.0 条件下,以 1 min 内分解 pNPM 生成 1  $\mu$ mol pNP 所需的酶量定义为一个单位

酶活。

### 1.6 $\beta$ -甘露糖苷酶的酶学性质研究

根据参考文献[18]报道的方法进行 $\beta$ -甘露糖苷酶的酶学性质研究。

1.6.1 pH对酶活力的影响 取适量的粗酶液分别与pH为4.0~10.0的底物pNPM在50℃条件下反应30 min,测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,确定该酶最适反应pH。

1.6.2 温度对酶活力的影响 取适量的粗酶液与底物pNPM分别置于不同温度(30、35、40、45、50、55、60℃)下反应,测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,确定该酶的最适反应温度。

1.6.3 酶的pH稳定性 取适量的粗酶液分别置于pH为4.0~10.0缓冲液中,37℃条件下保温1 h,在最适pH和最适温度下测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,以未处理的粗酶液酶活力作为对照。

1.6.4 酶的温度稳定性 取适量粗酶液分别置于不同温度(40、45、50、55、60℃)下保温10、20、40、60、90、120、150和210 min。在最适pH和最适温度下测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,以未处理的粗酶液酶活力作为对照。

1.6.5 金属离子对酶活力的影响 在底物pNPM中加入不同的金属离子,金属离子的终浓度为10 mmol/L,研究其对 $\beta$ -甘露糖苷酶活力的影响。在最适pH和最适温度的条件下测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,以未加金属离子的粗酶液酶活力作为对照。

### 1.7 数据处理

本实验所有数据都是3次平行实验取其平均值,采用MEGA 6.06和Origin 8.0作图分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选

以魔芋粉为唯一碳源,并结合刚果红染色的方法从选择培养基中分离具有明显水解圈的菌株,多次划线后获得纯菌株,将其进行发酵产酶实验,以pNPM为底物测定 $\beta$ -甘露糖苷酶活力大小,筛选出一株最佳产酶菌株B19。该菌株的水解圈直径为1.71 cm,菌落直径为0.47 cm,水解圈直径与菌落直径的比值为3.64。

### 2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌株B19的形态学观察 将菌株B19在LB固体培养基平板上倒置培养24 h后,在自然光下肉眼可观察,该菌落中等大小,圆形,边缘整齐,中心稍突起,表面光滑,呈淡黄色且无色素产生(图1A);为革兰氏阴性菌(图1B);在扫描电子显微镜和透射电子显微镜下观察该菌呈棒状,菌长约0.6~0.7  $\mu\text{m}$ 、宽约0.6~1.7  $\mu\text{m}$ (图1C和图1D)。

2.2.2 生理生化特性 对筛出的菌株B19做生理生化实验,其生理生化特征结果见表1。

2.2.3 16S rDNA序列分析 经测序,菌株B19的16S rDNA大小为1439 bp(图2),将该序列在NCBI中的BLAST软件进行同源性序列比对分析,根据比对结果选取同源性较高的菌株构建系统发育进化树(图3)。结果表明:该序列与肠杆菌属(*Enterobacter*

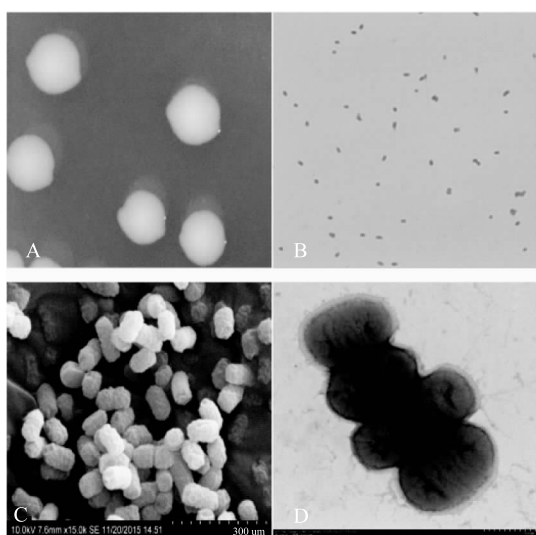


图1 菌株B19的形态

Fig.1 The morphology of strain B19

注:A菌株B19的菌落形态;B菌株B19革兰氏染色后细胞形态(1000 $\times$ );C菌株B19的扫描电镜形态(15000 $\times$ );D菌株B19的透射电镜形态(7000 $\times$ )。

表1 菌株B19主要生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical properties of the strain B19

检测项目	结果	检测项目	结果
葡萄糖酸盐	+	吡啶	-
苯丙氨酸	-	尿素	-
赖氨酸	+	V-P测定	+
鸟氨酸	+	柠檬酸盐利用	-
精氨酸	-	甲基红	-
山梨醇	+	过氧化氢酶	+
核糖醇	+	硝酸盐还原	+
蔗糖	+	H <sub>2</sub> S的产生	-
蜜二糖	+	七叶苷	+
鼠李糖	+	黄色素	-
葡萄糖	+	氧化酶	-
$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷	+	运动性	+

注: +:阳性, -:阴性。

sp.)细菌相似性达99.0%。菌株B19与相关的系统发育树可以看到,B19与*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* M940 (HQ651840)和*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* M354 (HQ651837)亲缘关系最近,综合以上形态和生理生化特征,可以确定菌株B19为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.), GenBanK登录号为KU500561。

### 2.3 $\beta$ -甘露糖苷酶的分布及酶活力测定

将菌株B19于37℃、200 r/min条件下培养48 h,并分别检测了摇瓶发酵上清液和细胞破碎液中的 $\beta$ -甘露糖苷酶活力,以确定 $\beta$ -甘露糖苷酶的分布。结果如表2所示, $\beta$ -甘露糖苷酶主要分布在细胞破碎液中,其酶活力是发酵上清液的331.58倍,说明该菌株所产的 $\beta$ -甘露糖苷酶是胞内酶。与已经报道的 $\beta$ -甘露糖苷酶产生菌株相比较,比如Waino

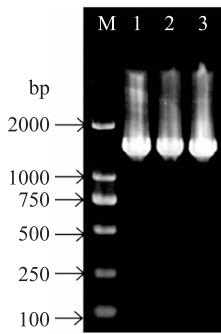


图2 菌株 B19 的 16S rDNA 电泳图

Fig.2 The electrophoretogram of 16S rDNA

注: M; 2000bp Marker; 1~3: PCR 产物。

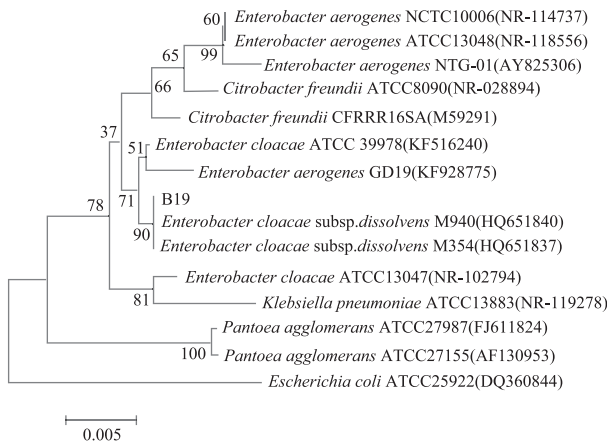


图3 基于 16S rDNA 序列建立的菌株 B19 和相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain B19 and other strains

等<sup>[19]</sup>从自然界筛出一株耐盐耐碱的产 $\beta$ -甘露糖苷酶菌株,其酶活力为0.05 U/mL, Akino 等<sup>[20]</sup>从果树地中分离出一株嗜碱芽孢杆菌(*alkalophilic Bacillus* sp.),所产的 $\beta$ -甘露糖苷酶活力为0.3 U/mL, Gomes 等<sup>[21]</sup>分离出的一株嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*),其 $\beta$ -甘露糖苷酶活力为4.0 nkat/mL。因此,本研究所筛选的菌株 B19 所产的 $\beta$ -甘露糖苷酶活力较高。

表2  $\beta$ -甘露糖苷酶的分布

Table 2 The distribution of  $\beta$ -mannosidase

酶	发酵上清液 (U/mL)	细胞破碎液 (U/mL)	比酶活 <sup>a</sup>
$\beta$ -甘露糖苷酶	0.0038	1.26	331.58

注:a:细胞破碎液/发酵上清液活力。

## 2.4 $\beta$ -甘露糖苷酶的酶学性质研究

2.4.1 pH 对酶活力的影响与 pH 稳定性 如图4所示,来自菌株 B19 的 $\beta$ -甘露糖苷酶的最适反应 pH 为7.5。由图5可知,当 pH 在6.0~8.0 时,该 $\beta$ -甘露糖苷酶具有较高的稳定性,酶活力达70%以上,之后随着 pH 的上升,酶活力迅速下降,说明该菌株产的 $\beta$ -甘露糖苷酶不耐碱。

2.4.2 温度对酶活力的影响与温度稳定性 由图6可知,来自菌株 B19 的 $\beta$ -甘露糖苷酶的最适反应温度

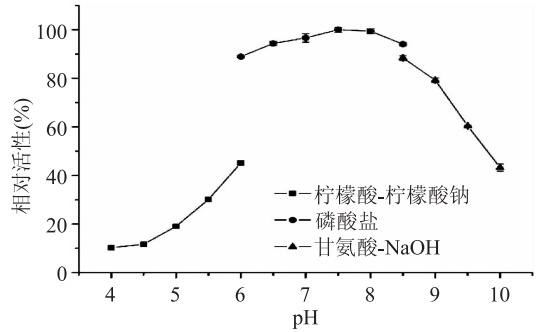


图4 pH 对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on the enzyme activity

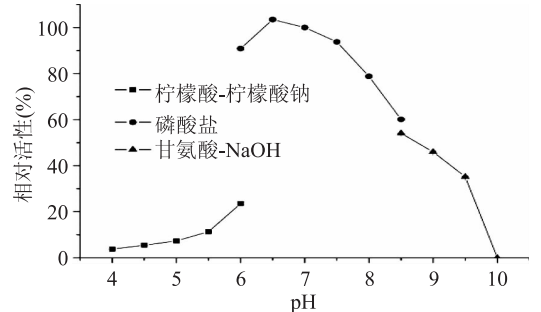


图5 酶的 pH 稳定性

Fig.5 Effect of pH on the stability of enzyme activity

为50℃。如图7所示,该 $\beta$ -甘露糖苷酶在45~50℃保温150 min 后酶活力仍剩余60%以上,而55℃保温150 min 后酶活力就仅剩50%,当在60℃保温150 min 后检测不到酶活力。由此可知,该菌株产的 $\beta$ -甘露糖苷酶的温度耐受性较差。

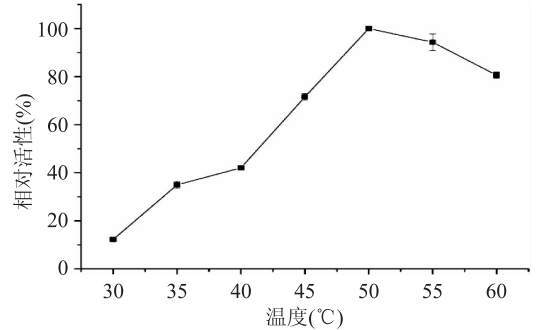


图6 温度对酶活力影响

Fig.6 Effect of temperature on the enzyme activity

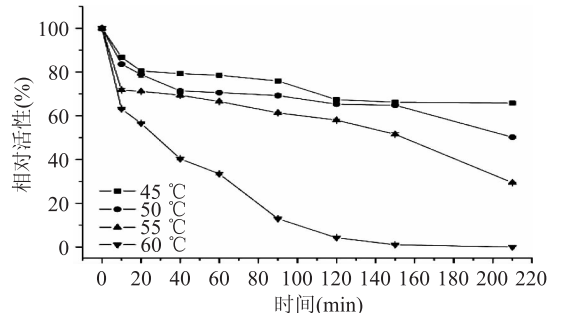


图7 酶的温度稳定性

Fig.7 Thermostability of the enzyme activity

2.4.3 金属离子对 $\beta$ -甘露糖苷酶活力的影响 图8显示不同金属离子在10 mmol/L 的浓度下对 $\beta$ -甘露糖苷酶活力的影响。

糖苷酶活力的影响。可知 10 mmol/L 的  $Mn^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  对该  $\beta$ -甘露糖苷酶活力具有激活作用;  $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  明显的抑制酶活力,  $K^+$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  及  $Co^{2+}$  对该酶活力显示不同程度的抑制作用。

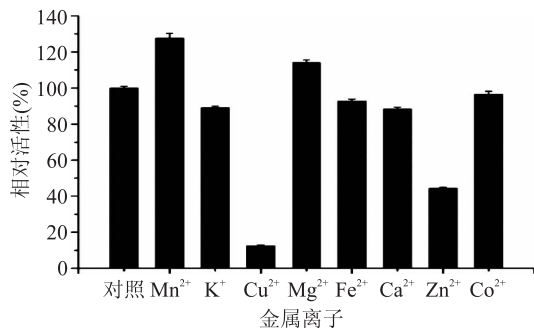


图 8 金属离子对酶活力的影响

Fig.8 Effect of metal ions on the enzyme activity

不同来源的  $\beta$ -甘露糖苷酶,其酶学性质上存在着差异。如杨先芹等<sup>[18]</sup>研究的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的  $\beta$ -甘露糖苷酶,它的最适 pH 为 6.0,最适温度为 30~40 °C 之间,而本研究筛选的酶最适 pH 为 7.5,最适温度为 50 °C。对于金属离子的影响,10 mmol/L 的  $Ca^{2+}$  和  $K^+$  对来源于多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶活力有促进作用<sup>[22]</sup>,而本研究却与之相反,当然在其它的酶学性质上也存在差异性。所以,不同物种或菌株所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶在酶学性质上是有所差异的。

### 3 结论

本研究通过初筛和复筛,从采集的森林土壤中成功分离出一株产  $\beta$ -甘露糖苷酶最高的菌株 B19,通过对菌株 B19 进行显微形态观察、革兰氏染色、生理生化实验、16S rDNA 鉴定、序列同源性比较及系统发育进化树分析,将菌株 B19 鉴定为肠杆菌 (*Enterobacter* sp.)。该菌株所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶为胞内酶,在 37 °C、200 r/min 条件下培养 48 h 所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶为 1.26 U/mL。跟许多关于筛选产  $\beta$ -甘露糖苷酶菌株的研究报道相比,本实验研究的菌株 B19 所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶活力较高。该酶的最适反应 pH 和最适反应温度分别为 7.5 和 50 °C,且在 pH6.0~8.0 和温度 45~50 °C 稳定性较高。本研究筛选的菌株 B19 所产的  $\beta$ -甘露糖苷酶具有良好的应用潜力,同时为后续研究工作构建基因工程菌,以期获得更高的产酶菌株奠定了一定基础。

### 参考文献

[1] Parker K N, Chhabra S R, Lam D, et al. Galactomannanases man2 and man5 from *Thermotoga* species: Growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 330: 238-246.  
 [2] Zahura U A, Rahman M M, Inoue A, et al. Characterization of a beta-D-mannosidase from a marine gastropod, *Aplysia kurodai* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2012, 162

(1-3): 24-33.

[3] Zechel D L, Reid S P, Stoll D, et al. Mechanism, mutagenesis, and chemical rescue of a beta-mannosidase from *Cellulomonas fimi* [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(23): 7195-7204.  
 [4] Kulminskaya A A, Eneiskaya E V, Isaeva-Ivanova L S, et al. Enzymatic activity and  $\beta$ -galactomannan binding property of  $\beta$ -mannosidase from *Trichoderma reesei* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(3-5): 372-377.  
 [5] Miyazaki K. Bifunctional isocitrate - homoisocitrate dehydrogenase: A missing link in the evolution of  $\beta$ -decarboxylating dehydrogenase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 331: 341-346.  
 [6] Oda Y, Tonomura K. Characterization of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase secreted from the yeast *Trichosporon cutaneum* JCM 2947 [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22(2): 173-178.  
 [7] Sachslehner A, Foidl G, Foidl N, et al. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80(2): 127-134.  
 [8] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(2): 175-184.  
 [9] Rixon J H C á, Gilbert J R H á, Hazlewood G P A. A comparison of enzyme - aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 661-667.  
 [10] Parisi G C, Zilli M, Miani M P, et al. High - fiber diet supplementation in patients with irritable bowel syndrome (IBS) - A multicenter, randomized, open trial comparison between wheat bran diet and partially hydrolyzed guar gum (PHGG) [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2002, 47: 1697-1704.  
 [11] 魏全彬.  $\beta$ -甘露糖苷酶产生菌株的分离鉴定、产酶条件优化及其酶学性质研究[D]. 四川农业大学, 2012.  
 [12] 诸葛健. 工业微生物实验与研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007.  
 [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科技出版社, 2001: 66-370.  
 [14] 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.  
 [15] 邓毛程, 李静, 陈维新, 等. 甘蔗醋高产菌株的筛选及鉴定[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 184-186.  
 [16] Hall B G. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(5): 1229-1235.  
 [17] 张敏, 关国华, 江正强, 等. 海栖热袍菌耐高温  $\beta$ -甘露糖苷酶基因的克隆及表达 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(3): 365-368.  
 [18] 杨先芹, 孙丹, 杨文博, 等. 地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株  $\beta$ -甘露糖苷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.  
 [19] Waino M, Ingvorsen K. Production of halostable beta -

(下转第 258 页)

锡:江南大学,2015.

[13]田丰伟,翟齐啸,孙媛媛,等.缓解铅毒性植物乳杆菌 CCFM8661 的微生物学性质及其应用的研究[J].食品安全质量检测学报,2014(4):1010-1015.

[14]Mishra V, Shah C, Mokashe N, et al. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(14):3615-3626.

[15]田丰伟.缓解氧化应激乳酸菌的筛选、表征和功能评价研究[D].无锡:江南大学,2012.

[16]唐雅茹,于上富,国立东,等.一株降胆固醇乳杆菌的筛选及其益生作用的研究[J].食品工业科技,2016,37(1):142-144,152.

[17]杜金城,徐敏,李柏良,等.具有抑制大肠杆菌作用的乳酸菌的初步筛选及其益生潜能的研究[J].食品工业科技,2016(13):1-8.

[18]Halttunen T, Collado M C, El-Nezami H, et al. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution [J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(2):160-165.

[19]Halttunen T, Salminen S, Tahvonen R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 114(1):30-35.

[20]Halttunen T, Kankaanpää P, Tahvonen R, et al. Cadmium removal by lactic acid bacteria[J]. Bioscience Microflora, 2003, 3(22):93-97.

[21]Bian X, Evivie S E, Muhammad Z, et al. *In vitro* assessment of the antimicrobial potentials of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional cheese in Sinkiang China against food-borne pathogens[J]. Food Funct, 2016, 7(2):789-797.

[22]白明,孟祥晨.益生菌抗氧化活性及菌体抗氧化相关成分的分析[J].食品与发酵工业,2009(5):6-11.

[23]Lin M, Yen C. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(4):1460-1466.

[24]Lin M Y, Chang F J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(8):

1617-1622.

[25]Zhai Q, Yin R, Yu L, et al. Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity [J]. Food Control, 2015, 54:23-30.

[26]Zhang S, Liu L, Su Y, et al. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 29(5):5194-5201.

[27]刘洋,郭宇星,潘道东.4种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究[J].食品科学,2012(11):25-29.

[28]葛伟.超声预处理对酪蛋白美拉德反应及其产物功能特性的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.

[29]Wang Y, Yu R, Chou C. Antioxidative activities of soy milk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria [J]. Food Microbiology, 2006, 23(2):128-135.

[30]Naik M M, Dubey S K. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98:1-7.

[31]Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics [J]. Mini Rev Med Chem, 2014, 14(1):84-98.

[32]Beveridge T J, Murray R G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* [J]. J Bacteriol, 1980, 141(2):876-887.

[33]Naik M M, Pandey A, Dubey S K. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B [J]. Biodegradation, 2012, 23(5):775-783.

[34]车驰.新疆酸马奶抗氧化活性乳酸菌的筛选及其特性研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2012.

[35]Kachouri F, Ksontini H, Kraiem M, et al. Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(12):7924-7933.

[36]王刚,田丰伟,刘小鸣,等.2株具有优良体外抗氧化能力乳酸菌的筛选与鉴定[J].食品工业科技,2013(15):149-153.

[37]左玉.脂质过氧化及抗氧化剂抗氧化活性检测方法[J].粮食与油脂,2009(2):39-42.

(上接第253页)

mannanase and beta-mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(5):675-680.

[20]Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of  $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 26:323-327.

[21]Gomes J, Terler K, Kratzer R, et al. Production of

thermostable  $\beta$ -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*; Isolation, partial purification and characterization of the enzyme [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(4):969-975.

[22]Bai X, Hu H, Chen H, et al. Expression of a beta-Mannosidase from *Paenibacillus polymyxa* A-8 in *Escherichia coli* and Characterization of the Recombinant Enzyme [J]. Plos One, 2014, 9(11):e111622.