李嘉悦, 陈妙芳, 雷震阳, 等. *B. velezensis* 2-6 来源 β-葡聚糖酶活性蛋白 GxylE-v26 的纯化及酶学特征 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 198−207. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030034

LI Jiayue, CHEN Miaofang, LEI Zhenyang, et al. Purification and Characterization of β-Glucanase Activity Protein GxylE-v26 from *B. velezensis* 2-6[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 198−207. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030034

· 生物工程 ·

B. velezensis 2-6 来源 β-葡聚糖酶活性蛋白 GxylE-v26 的纯化及酶学特征

李嘉悦[1], 陈妙芳[1], 雷震阳[1], 赖震峰[1], 王　磊[1,2,*]

（1.华南农业大学材料与化学工程学院化工与制药系, 绿色农药全国重点实验室, 广东广州 510642;
2.华南农业大学, 广东省木本饲料工程技术研究中心, 广东广州 510642）

摘　要: 目的：以红树林来源具葡聚糖酶活性的菌株 *Bacillus velezensis* 2-6 为研究对象，从其发酵上清液中分离、纯化和鉴定 β-葡聚糖酶活性蛋白，并对其酶学特征进行研究。方法：采用硫酸铵沉淀法和 DEAE 阴离子交换层析法分离菌株 2-6 发酵上清液中的 β-葡聚糖酶活性蛋白，应用 LC-MS/MS 对纯化的活性蛋白进行鉴定。采用 DNS 法对纯化的 β-葡聚糖酶活性蛋白的酶学特征进行分析。采用薄层层析检测 β-葡聚糖酶活性蛋白对底物的降解活性，应用滤纸片法检测活性蛋白对植物病原菌的抑菌活性。结果：菌株 2-6 发酵上清液经 80% 硫酸铵沉淀和 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析纯化后，获得分子量大约为 45 kDa 的蛋白，其 β-葡聚糖酶活性达到 36956.5 U/mg。该蛋白经 LC-MS/MS 分析鉴定为葡萄糖醛酸木聚糖酶，由 423 个氨基酸组成，命名为 GxylE-v26。GxylE-v26 的最适酶反应温度为 60 ℃，最适 pH 为 4，低浓度（1 mmol/L）的 Fe^{2+}对 GxylE-v26 酶活有促进作用，中（10 mmol/L）、高（100 mmol/L）浓度的 Fe^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}和 Ba^{2+}可抑制 GxylE-v26 酶活力。GxylE-v26 可水解昆布多糖，且对金黄色葡萄球菌和菠萝泛菌的生长具有抑制作用，1 mg/mL 的 GxylE-v26 对金黄色葡萄球菌和菠萝泛菌的抑菌圈直径分别为 1 cm 和 1.1 cm。结论：从红树林来源菌株 *Bacillus velezensis* 2-6 的发酵上清液中分离纯化并鉴定得到了具有高效 β-葡聚糖酶活性的蛋白分子 GxylE-v26，该蛋白是一种能耐受较高温度的酸性酶，且对金黄色葡萄球菌和菠萝泛菌的生长均具有抑制作用。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌 2-6, β-葡聚糖酶, DEAE 层析, 葡萄糖醛酸木聚糖酶

中图分类号: Q556^{+}.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0198−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030034

本文网刊:

Purification and Characterization of β-Glucanase Activity Protein GxylE-v26 from *B. velezensis* 2-6

LI Jiayue[1], CHEN Miaofang[1], LEI Zhenyang[1], LAI Zhenfeng[1], WANG Lei[1,2,*]

（1.Department of Chemical Engineering and Pharmacy, College of Materials and Chemical Engineering, South China Agricultural University, National Key Laboratory of Green Pesticides, Guangzhou 510642, China;
2.Guangdong Province Research Center of Woody Forage Engineering Technology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China）

Abstract: Objective: The aim of this work was to purify and identify the β-glucanase active protein from the fermentation supernatant of *Bacillus velezensis* 2-6 which originated from mangrove, and to investigate the enzymatic characteristics of the purified β-glucanase active protein. Methods: The ammonium sulfate precipitation method and DEAE-Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography were used to purify the β-glucanase active protein from the supernatant of *Bacillus velezensis* 2-6. LC-MS/MS analysis was used to identify the purified protein. The enzyme activity of β-glucanase active

收稿日期: 2025−03−05

基金项目: 教育部“蓝火计划”（惠州）产学研联合创新资金项目（CXZJHZ201712）。

作者简介: 李嘉悦（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源与利用, E-mail: 512257378@qq.com。

*** 通信作者:** 王磊（1972−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物资源与利用, E-mail: wanglei@scau.edu.cn。

protein was analyzed using DNS method. Thin layer chromatography was used to detect the degradation level of β-glucanase active protein on laminarin. Filter paper method was used to analyze the antibacterial activity of β-glucanase active protein on pathogenic microorganisms. Results: A protein with a molecular weight of approximately 45 kDa was obtained from strain 2-6 fermentation supernatant by 80% ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography, and the β-glucanase activity of this protein reached 36956.5 U/mg. The purified protein was deduced as glucuronic acid xylanase by LC-MS/MS which consisted of 423 amino acids and named as GxylE-v26. The optimal enzyme reaction temperature of GxylE-v26 was 60 ℃ and the optimal pH was 4. Low concentration of Fe^{2+} (1 mmol/L) could promote the enzyme activity of GxylE-v26 while medium (10 mmol/L) and high (100 mmol/L) concentration of Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} and Ba^{2+} could inhibit the enzyme activity of GxylE-v26. GxylE-v26 could hydrolyze laminarin and exhibit inhibitory effects on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pantoea ananatis*. The inhibition zone diameters of 1 mg/mL GxylE-v26 against *S. aureus* and *P. ananatis* were 1 cm and 1.1 cm, respectively. Conclusion: A β-glucanase active protein, named GxylE-v26, was purified and identified from the fermentation supernatant of *Bacillus velezensis* 2-6 which derived from mangrove. GxylE-v26 was an acid enzyme which could tolerate a certain degree of high temperature and possess antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pantoea ananas*.

Key words: *Bacillus velezensis* 2-6; β-glucanase; DEAE chromatography; glucuronoxylanase

β-葡聚糖酶是通过水解 β-糖苷键使葡聚糖变为小分子低聚糖的酶, 它们存在于许多原核生物和真核生物中, 其分子量基本在 40~140 kDa 的范围内。在植物中, β-葡聚糖酶可以参与细胞壁的合成、重塑和更新, 还能通过降解非自身的葡聚糖结构来调节共生和敌对植物及微生物的相互作用[1]。在细菌和真菌中, β-葡聚糖酶可以与其他水解酶一起参与纤维素的水解[2−3], 协助水解植物细胞壁, 导致植物细胞死亡[4−5] 以及具有免疫刺激活性等[6]。此外, β-葡聚糖酶在抑菌方面也具有巨大的应用潜力, 如 β-1,3-葡聚糖酶可通过水解真菌菌丝上的葡聚糖来抑制菌丝的生长[7]; 来自哈茨木霉的 β-1,3-D-葡聚糖酶能够抑制可可丛植菌的生长[8]; 球毛壳菌、枯草芽孢杆菌通过分泌 β-1,3-葡聚糖酶来抑制稻瘟病菌的生长[9−10]。

β-葡聚糖酶在抑菌及其他各方面具有巨大的应用潜力, 因此具有 β-葡聚糖酶活性的蛋白质在生物质的高效降解和病原菌的生物防治领域均具有重要应用价值。但自然来源的野生菌株大多数产酶活性较低, 人工诱变菌株和基因工程重组菌株由于生物安全因素不适合直接在自然界中使用。因此, 需要挖掘高产 β-葡聚糖酶活性蛋白质的微生物菌株, 尤其是高效且容易培养的芽孢杆菌, 将其开发为高产 β-葡聚糖酶的微生物菌剂, 应用于工业生物质降解和农业生物防治产业。

红树林生态系统是生长在热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落[11], 是陆地与海洋之间过渡的一种特殊生态系统, 因其环境的特殊性, 也是世界上物种多样性最高的生态系统之一。红树林土壤中蕴含着丰富的细菌、真菌等微生物类群[12], 其中富含许多能产生各种生理活性物质的微生物, 如高产生物酶微生物菌株, 其可以产纤维素酶、半纤维素酶、木质素酶、淀粉酶和葡聚糖酶等, 这些酶可以分解红树林生态系统中丰富的木质素、纤维素和淀粉等生物质[13]。这提供了一个发现新的生物酶以及能够高产生物酶的菌株的渠道。本实验室前期构建了红树林来源的微生物菌种库, 为获得高产 β-葡聚糖酶活性蛋白的微生物菌株, 从广东省海陵岛红树林土壤中分离得到了多株具有 β-葡聚糖酶活性蛋白的有益微生物, 其中菌株 *Bacillus velezensis* 2-6 分泌的蛋白具有较高的 β-葡聚糖酶活性, 对其分泌的 β-葡聚糖酶活性蛋白质进行分离纯化和鉴定, 研究其酶学活性特征及应用价值, 有助于挖掘高效产酶菌株、发现具有 β-葡聚糖酶活性的新型蛋白质分子。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

菌株 *B. velezensis* 2-6　分离自广东省海陵岛红树林国家湿地公园土壤样品, 并由本实验室保存; 菌株金黄色葡萄球菌、菠萝泛菌、大肠杆菌、水稻恶苗病菌、新拟盘多毛孢菌　均为本实验室所保藏的菌株; 菌株青枯劳尔氏菌　购买于广东省微生物保藏中心, 编号为 GDMCC 1.1561; 氯化钠、氯化钡、氯化钙、氯化镁、氢氧化钠、氢氧化钾、硫酸铵、乙二胺四乙酸二钠、盐酸、葡萄糖、过硫酸铵、尿素、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯　广州化学试剂厂; 琼脂粉、30% 丙烯酰胺(Acr-Bis)、5×SDS loading buffer　广州鼎国生物技术有限公司; Tryptone、Yeast extract　OXOID 公司; 乙酸、甲醇、乙醇　天津市富宇精细化工有限公司; Omega 细菌提取试剂盒(D3350-1)　OMEGA BIO-TEK 公司; 10×Loading Buffer、DL 2000 bp DNA Marker、DL5000 bp DNA Marker、TaKaRa LA Taq®　TaKaRa 公司; 琼脂糖　Biowest; Tris、Dextran-40、TEMED(NT6033)　生物工程(上海)股份有限公司; 羧甲基纤维素钠　天津市福晨化学试剂厂; 昆布多糖　吉至生物; 3, 5-二硝基水杨酸　安耐吉化学; SDS　广州翔博生物科技有限公司; Glycine　YING MAQ; 考马斯亮蓝 R250　Sigma; BCA 试剂盒(PI208677)　Thermo Scientific; 透析袋(3500 D)　Scientific Specia; DEAE-Sepharose FF (17-0709-01)　AmersahamPharmaciaBiotechAB;Pro-

tein marker(PM2510) SMOBIO; 透析袋(2000 D) 江苏麦格生物科技有限公司; 多菌灵 四川国光农化公司; 氨苄青霉素钠(Amp) 上海源叶生物; β-葡聚糖酶(30000 U/g) 麦克林生物有限公司; 纤维素酶(50000 U/g) 江苏锐阳生物科技有限公司。

JWT-110 电热鼓风干燥箱、LRH-250 生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; RZZ247-2005 高压蒸汽灭菌锅 北京金海鑫压力容器制造有限公司; UV-2800 紫外可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司; ETC811 基因扩增仪 苏州东胜兴业科学仪器有限公司; 043BR56466SDS-PAGE 凝胶电泳仪 BIO-RAD; R1270/R170 冻干机 CHRIST; H1750R 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Q Exactive 高分辨质谱仪、Easy-nLC 1200 高效液相色谱仪 Thermo Scientific; TNG-T98 冷冻浓缩离心干燥器 太仓市华美生化仪器厂; Scientz-10N 钟罩式冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株 2-6 的分子鉴定 采用 16S rDNA 分子标签对从广东省海陵岛红树林土壤中分离得到的具有较高的 β-葡聚糖酶活性蛋白的菌株进行分子鉴定[14], 其中该菌株编号为 2-6。采用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 2-6 的 DNA, 以提取出的 DNA 为模板, 以 Eubac27F(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)和 Eubac1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT)为引物扩增 16S rDNA 基因, PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 复性 30 s、72 ℃ 延伸 1 min, 变性、复性和延伸的过程循环 35 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 由广州擎科生物技术有限公司进行测序。将测序所得 16S rDNA 序列, 经 NCBI 进行 blast 同源性分析, 利用 MEGA7.0 软件 Neighbor-joining 法对目的基因及同源序列构建系统进化树, 对系统发育树进行检验采用自举法(bootstrap), 重复 1000 次, 以确定分离菌株的种属。

1.2.2 β-葡聚糖酶活性蛋白的分离纯化

1.2.2.1 发酵上清液的制备 将菌株 2-6 甘油菌在 LB 平板上划线进行活化, 37 ℃ 培养 16 h, 挑取单菌落, 接种至 50 mL 液体 LB 培养基中, 37 ℃、220 r/min 培养 24 h 得到种子液。按 2% 接种量将种子液接种到 500 mL 的 LB 液体培养基中, 37 ℃、220 r/min 培养 24 h 后, 取适量发酵菌液, 使用紫外分光光度计测定其 OD_{600}, 同时将菌液 4 ℃、8000 r/min 离心, 获得发酵上清液, 对其进行酶活测定后, 用于 β-葡聚糖酶活性蛋白的纯化。

1.2.2.2 β-葡聚糖酶活性蛋白的粗分离 采用硫酸铵分级沉淀法[15] 进行粗蛋白的分离。对菌株 2-6 发酵上清液逐级进行 30%、80% 硫酸铵浓度的沉淀, 然后于 4 ℃、8000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀蛋白。将沉淀溶解在 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中, 用 3500 D 的透析袋透析, 每 4 h 更换一次透析液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH7.5), 共透析 4 次。透析后的粗蛋白用于酶活检测和酶活性蛋白的纯化。

1.2.2.3 β-葡聚糖酶活性蛋白的纯化 用 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析对上述硫酸铵沉淀获得的具有活性的粗蛋白组分进行纯化。首先用去离子水清洗 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱, 后用 5 倍填料体积的 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液平衡后, 将透析后粗蛋白组分上样, 分别用含有 0.1、0.2、0.4、0.6 和 1.0 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液洗脱层析柱, 并收集洗脱液。将洗脱液各组分用 3500 D 透析袋, 于 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中, 置于 4 ℃ 透析除盐后冷冻干燥, 放−20 ℃ 冰箱备用。使用前溶解于 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中。

1.2.3 酶活的测定 采用 DNS 法[16] 对测试样品进行酶活的定量分析。

葡萄糖标准曲线的绘制: 配制 2 mg/mL 的葡萄糖标准溶液, 取不同体积的葡萄糖标准溶液并用蒸馏水补足至 1 mL 配制成终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 葡萄糖溶液。各取 200 μL 上述葡萄糖溶液, 用蒸馏水定容至 1 mL 后加入 2 mL 的 DNS 溶液, 煮沸显色 5 min, 冷却至室温, 在 540 nm 下测定吸光值。以葡萄糖含量为横坐标, OD_{540} 值为纵坐标, 绘制葡萄糖标准曲线, 计算出葡萄糖标准曲线公式为 $y=0.7357x-0.052$, $R^2=0.9901$。

取 100 μL 测试样品和 100 μL 预先煮沸 10 min 的测试样品(空白对照)与 100 μL 1% 底物昆布多糖混合以测定蛋白样品的 β-葡聚糖酶活性, 50 ℃ 水浴反应 30 min 后, 加水定容至 1 mL, 加入 2 mL 的 DNS 并煮沸 5 min 显色, 待降温至室温后, 于 540 nm 测定吸光值, 根据葡萄糖标准曲线计算其还原糖含量并计算样品 β-葡聚糖酶活性。本研究同时也以 Dextran、羧甲基纤维素钠为底物对样品的 α-葡聚糖酶和纤维素酶活性进行了测定, Dextran、羧甲基纤维素钠的浓度均为 1%。同时以 10 mg/mL 的 β-葡聚糖酶和纤维素酶作为阳性对照以比较分离得到的蛋白样品与商品化酶的酶活性。酶活力单位定义为: 在该反应条件下, 平均每分钟催化底物产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量作为一个酶活力单位(U)。计算公式如下:

$$X = N \times \frac{\Delta A}{TV}$$

式中: X 为计算所得的酶活, U/mL; N 为稀释倍数; ΔA 为实验组减去对照组吸光度值所对应葡萄糖标准曲线的还原糖含量, μg; T 为孵育时间, min; V 为酶液体积, mL。

比酶活的计算方法为：

$$比酶活 = \frac{X}{C}$$

式中：比酶活的单位为 U/mg；X 为酶活，U/mL；C 为蛋白浓度，mg/mL。

1.2.4　蛋白浓度的测定　采用 Bradford 法进行蛋白浓度的测定，操作步骤参照《蛋白技术手册》[17]，分别用紫外分光光度计测出不同浓度 BSA 溶液、1.2.2 中粗分离后以及纯化后的蛋白溶液在波长 595 nm 处的吸光度值，根据标准蛋白溶液曲线，计算出蛋白浓度。

1.2.5　SDS-PAGE 凝胶电泳　对 1.2.2 中硫酸铵沉淀后的粗蛋白、DEAE-Sepharose Fast Flow 纯化后的蛋白参照《蛋白质技术手册》[17] 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度为 5%。

1.2.6　β-葡聚糖酶活性蛋白组分的 LC-MS/MS 质谱分析　切取目标蛋白条带委托上海欧易生物医学科技有限公司进行 LC-MS/MS（liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry）质谱分析测序。实验采用 Ultimate 3000nano 超高效液相串联 Q Exactive plus 高分辨质谱仪进行[18]。所得质谱数据经 ProteinPilot 数据库检索分析。

1.2.7　β-葡聚糖酶活性纯化蛋白的酶活特征分析

1.2.7.1　温度对 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白酶活性的影响　为探究纯化蛋白的最适酶反应温度，将浓度为 0.02 mg/mL 的纯化蛋白与同体积的 1% 昆布多糖溶液混合，分别于 10、20、30、40、50、60、70、80、90 ℃ 孵育 30 min，按照 1.2.3 的方法测定酶活（X），与 45 ℃，pH 为 7.5 条件下反应 30 min 测得的酶活（X_0）相比，计算相对酶活：

$$相对酶活(\%) = \frac{X}{X_0} \times 100$$

本实验将浓度为 0.02 mg/L 的酶液分别置于 50、60、70 ℃ 下进行水浴后，每 30 min 取样，与同体积的 1% 昆布多糖溶液混合，孵育 30 min 测定样品的 β-葡聚糖酶活性。与进行水浴前的酶液测得的酶活相比，计算其经不同温度处理后的相对酶活，以探究纯化后蛋白的热稳定性。

1.2.7.2　pH 对 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白酶活性的影响　分别将纯化蛋白溶解在 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10 的 Tris-HCl 缓冲液中，终浓度为 0.02 mg/mL，同时配制成相对应 pH 的 1% 昆布多糖溶液。将两者等体积混合，45 ℃ 孵育 30 min，按照 1.2.3 的方法测定酶活（X），与 45 ℃、pH 为 7 条件下反应 30 min 测得的酶活（X_0）相比，计算不同反应 pH 的相对酶活。

为探究纯化蛋白的 pH 稳定性，分别将纯化蛋白溶解在 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10 的 Tris-HCl 缓冲液中，终浓度为 0.02 mg/mL，然后于室温处理 30 min 后，再加入不同 pH 的 1% 昆布多糖溶液中，45 ℃ 孵育 30 min，然后用 DNS 法测定其酶活，与 pH 为 7 条件下静置 30 min 测得的酶活相比计算其相对酶活。

1.2.7.3　金属离子对 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白酶活性的影响　分别配制浓度为 2、20 和 200 mmol/L 的 $CaCl_2$、$MgCl_2$、$FeCl_2$ 和 $BaCl_2$ 的 Tris-HCl（pH7.5）溶液，分别用上述溶液溶解纯化蛋白至终浓度为 0.02 mg/mL，分别用同体积的 Tris-HCl 缓冲液配制 1% 的昆布多糖溶液，使最终反应体系内离子的浓度分别为 1、10 和 100 mmol/L。测定其 β-葡聚糖酶活性（X），与不含离子的反应条件下测得的酶活（X_0）相比，计算相对酶活。

1.2.7.4　有机溶剂对 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白酶活性的影响　分别配制含有 20%、40%、60% 的甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇及乙酸乙酯的 Tris-HCl（pH7.5）溶液，并分别用上述溶液溶解纯化蛋白至终浓度为 0.02 mg/mL，将酶液与同体积的 Tris 缓冲液配制 1% 的昆布多糖溶液混合，使最终反应体系内有机试剂的浓度分别为 10%、20% 和 30%。测定其 β-葡聚糖酶活性（X），与不含有机试剂的反应条件下测得的酶活相比（X_0），计算相对酶活。

1.2.7.5　去污剂对 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白酶活性的影响　分别配制含有 4%、6%、8% 的 SDS、EDTA、尿素、吐温-20 和 β-巯基乙醇的 Tris-HCl（pH7.5）溶液，并分别用上述溶液溶解纯化蛋白至终浓度为 0.02 mg/mL，分别加入同体积的 Tris 缓冲液配制 1% 的昆布多糖溶液，使最终反应体系内去污剂的浓度分别为 2%、3% 和 4%。测定其 β-葡聚糖酶活性（X），与不含去污剂的反应条件下测得的酶活（X_0）相比，计算相对酶活。

1.2.8　β-葡聚糖酶活性纯化蛋白对昆布多糖的水解　经过上述的实验测得具 β-葡聚糖酶活性蛋白的最适酶反应条件，然后在该条件下采用薄层色谱层析法[19] 分析不同酶解时间下纯化蛋白对昆布多糖的水解程度。点样 20 μL 酶解反应液，对照为 D-葡萄糖溶液。然后将其放入加有 TLC 展开剂的层析缸中，进行展开。展开完全后，将层析板完全浸没在 TLC 显色剂中 3 s，取出层析板，待表面液体沥干后放入 90 ℃ 烘箱中烘干 30 min，直至充分显色。

1.2.9　β-葡聚糖酶活性纯化蛋白的抑菌活性分析　细菌抑制活性分析采用滤纸片法进行：将培养 24 h 的测试菌株加入到冷却至 60 ℃ 左右的培养基中，混匀后倒平板。待平板中的培养基冷却凝固后，按“十”字均匀放置 4 枚大小一样的滤纸片。分别加入 10 μL 5 mg/mL 的氨苄青霉素（Amp，阳性对照），10 μL 的 0.05 mol/L Tris-HCl（pH7.5，阴性对照），以及 1、2 mg/mL 的 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白。置于适合指示菌生长的温度培养 24~48 h，测量并记录产生抑菌圈的直径。

真菌抑制活性分析：将培养 24 h 的真菌培养液

离心，制成悬浮孢子液。将不同指示真菌的孢子悬浮液均匀涂布于固体 PDA 培养基上，按“十”字均匀放置 4 枚大小一样的滤纸片。分别加入 10 μL 10 mg/mL 的多菌灵（阳性对照），10 μL 的 0.05 mol/L Tris-HCl（pH7.5，阴性对照），以及 1、2 mg/mL 的 β-葡聚糖酶活性纯化蛋白。将培养皿置于恒温培养箱内培养 5~7 d，测量并记录产生抑菌圈的直径。

1.3 数据处理

酶活实验均重复 3 次；实验数据使用 IBM SPSS Statistics 26 处理软件进行分析，结果采用平均值±标准差表示；绘图采用 Origin 2021 软件绘制；吸光度值为曲线增长阶段拟合线性方程后计算获得。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株 2-6 的分子鉴定

以菌株 2-6 的基因组 DNA 为模板扩增其 16S rDNA 序列，序列测定结果表明该片段由 1422 bp 组成，与图 1a 的琼脂糖凝胶电泳结果相符。将测序所得序列经 NCBI 进行 blast 比对，利用 mega 7.0 软件构建其与同源菌株的分子进化树（图 1b），依据其同源性比较及进化树分析结果，菌株 2-6 被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*），命名为贝莱斯芽孢杆菌 2-6（*Bacillus velezensis* 2-6）。

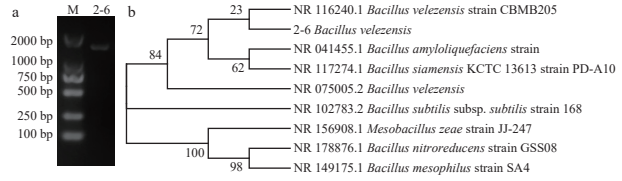


图 1 菌株 2-6 的 16S rDNA PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the 16S rDNA gene from strain 2-6

注：a 为菌株 2-6 的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳结果，其中 M: Marker; b 为菌株 2-6 及其同源序列的 16S rDNA 系统进化树。

2.2 *Bacillus velezensis* 2-6 的 β-葡聚糖酶活性蛋白的分离纯化

2.2.1 β-葡聚糖酶活性蛋白的粗分离 实验采用 30% 和 80% 浓度的硫酸铵对菌株 2-6 发酵上清液中具有葡聚糖酶活性的蛋白质进行粗分离，沉淀所得粗蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 2a 所示。

菌株 2-6 30% 硫酸铵沉淀所得粗蛋白分子量主要在 10~75 kDa 之间，其中 60~75 kDa 范围内蛋白较密集，31 kDa 左右和 45 kDa 左右有明显条带出现。2-6 的 80% 沉淀所得蛋白成分较复杂，主要分布于 7~75 kDa 之间，蛋白条带在 20~75 kDa 范围内较为密集。所有硫酸铵沉淀及上清组分均在 60~75 kDa 范围内出现了条带。

应用 DNS 法检测菌株 2-6 硫酸铵沉淀所得粗蛋白的 α-葡聚糖酶、β-葡聚糖酶和纤维素酶的酶活性，结果如图 2b 所示。经过硫酸铵沉淀后，菌株 2-6 的 80% 硫酸铵沉淀组分的 β-葡聚糖酶活性显著高于对照组商品化的 β-葡聚糖酶活性（P<0.05），比酶活

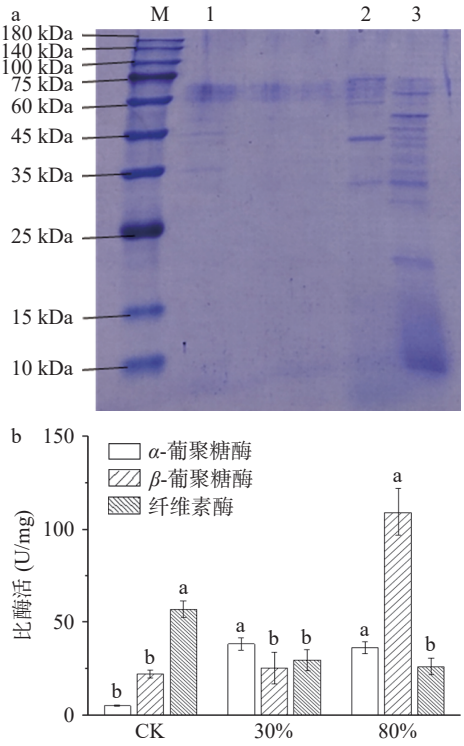


图 2 菌株 2-6 硫酸铵沉淀粗蛋白的分析结果

Fig.2 Results of ammonium sulfate precipitation of crude protein from strain 2-6

注：a 为菌株 2-6 的硫酸铵沉淀粗蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果，其中 M: Marker，泳道 1: 发酵上清液，2: 30% 硫酸铵沉淀蛋白，3: 80% 硫酸铵沉淀蛋白；b 为菌株 2-6 不同硫酸铵沉淀所得粗蛋白的 α-葡聚糖酶、β-葡聚糖酶和纤维素酶的酶活性，其中 CK 为三种酶的阳性对照组，不同小写字母表示与阳性对照差异显著（P<0.05），图 3 同。

大于 100 U/mg。2-6 所得沉淀组分的 α-葡聚糖酶活力均显著高于阳性对照的比酶活（P<0.05），但纤维素酶活力显著低于阳性对照（P<0.05）。综上所述，2-6 的 80% 硫酸铵沉淀蛋白组分酶活最好，后续研究将对其 80% 硫酸铵沉淀所得蛋白进行进一步的分离纯化及酶活研究。

2.2.2 β-葡聚糖酶活性蛋白的纯化 本实验采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析法对菌株 2-6 的 80% 硫酸铵沉淀粗蛋白进行纯化，粗蛋白上样后，分别用含有 0.1、0.2、0.4、0.6 和 1.0 mol/L NaCl 的缓冲液进行洗脱，洗脱曲线如图 3a 所示。对不同洗脱组分进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 3b 所示，0.1 mol/L NaCl 洗脱组分在大约 45 kDa 处出现一条主要蛋白条带，并且该洗脱组分内该蛋白占比约为 95%。使用 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱下的蛋白成分依然很复杂，但是能够看出 60 kDa 左右蛋白得到了富集。使用 0.4 mol/L NaCl 及后续的缓冲液洗脱组分均未看到明显的条带出现。

同时对纯化后得到的蛋白组分进行了 α-葡聚糖酶、β-葡聚糖酶和纤维素酶酶活性测定，结果如图 3c 所示，使用含有不同浓度 NaCl 缓冲液洗脱得到的蛋白均有 β-葡聚糖酶活性，其中使用 0.1 mol/L NaCl

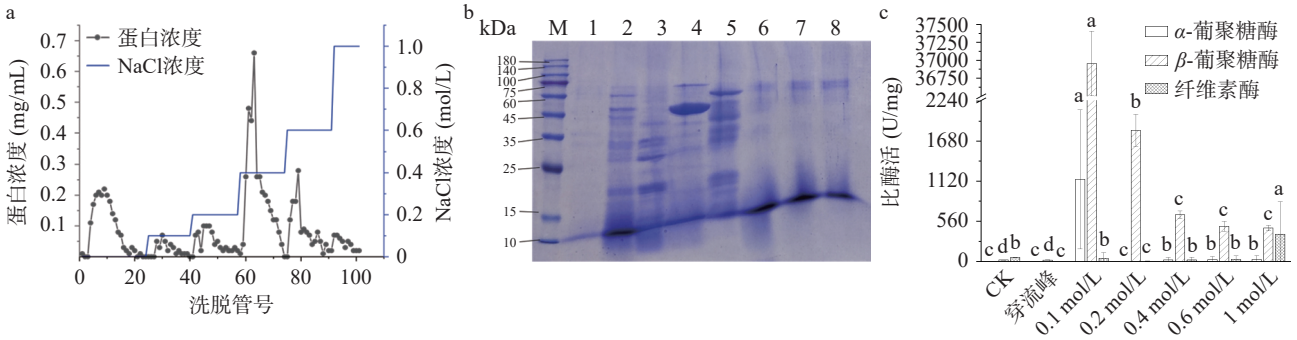


图 3　菌株 2-6 80% 硫酸铵沉淀蛋白 DEAE-Sepharose Fast Flow 纯化及酶活分析

Fig.3　DEAE-Sepharose Fast Flow purification and enzyme activity analysis of strain 2-6 80% ammonium sulfate precipitated protein

注：a 为 DEAE 纯化洗脱曲线；b 为不同洗脱组分的 SDS-PAGE 电泳，其中 M: Marker, 1: 菌株 2-6 发酵上清液，2: 菌株 2-6 80% 硫酸铵沉淀蛋白，3: 穿流峰组分，4: 0.1 mol/L NaCl 洗脱组分，5: 0.2 mol/L NaCl 洗脱组分，6: 0.4 mol/L NaC 洗脱组分，7: 0.6 mol/L NaCl 洗脱组分，8: 1.0 mol/L NaCl 洗脱组分；c 为不同洗脱组分三种酶活性测定结果。

缓冲液洗脱组分的 β-葡聚糖酶活性最高，且显著高于商品化的 β-葡聚糖酶（$P<0.05$），比酶活达到了 36956.5 U/mg。同时，该组分还具有较好的 α-葡聚糖酶活性，比酶活达到了 1147.8 U/mg。在所有洗脱组分中，1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱得到的蛋白具有较好的纤维素酶活性，比酶活为 380.6 U/mg。

综上所述，可以确定 0.1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱组分具有最高效的 β-葡聚糖酶活性，且电泳结果发现，该组分有一条分子量为 45 kDa 的主条带，根据电泳结果推测该蛋白含量大约为 95%，推测该条带的蛋白是一种具有高效 β-葡聚糖酶活性的蛋白质。

2.2.3　β-葡聚糖酶活性蛋白的质谱鉴定　采用 LC-MS/MS 质谱对上述纯化得到的 β-葡聚糖酶活性蛋白进行分析鉴定，该蛋白酶解后的总离子流图结果如图 4 所示。所得质谱数据经 ProteinPilot 数据库检索分析，共鉴定到 335 个肽段和 35 种蛋白质。其中，一个注释为 Glucuronoxylanase 的蛋白质与目标酶特性高度吻合（表 1），共匹配 20 个特异性肽段（图 5 中红色标记），覆盖 423 个氨基酸序列的 58%，同时其分子量为 47.8 kDa 与图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果一致。综上所述，推测本论文所得蛋白为一种 Glucuronoxylanase，并将其命名为 GxylE-v26。但本研究的纯化蛋白表现出显著的 β-葡聚糖酶活性，因此葡萄糖醛酸木聚糖酶 GxylE-v26 可能具有底物广谱性或双功能催化特性[20−23]，且推测 GxylE-v26 可能属于部分成员具有 β-1,3-1,4-葡聚糖酶活性的 GH30 家族[24]，即 GxylE-v26 也具有 β-1,3-1,4-葡聚糖酶活性，但是在本研究当中还未通过实验进行其酶切机理的验证，仍然需要在后续进行更深入的研究来探索与证实。

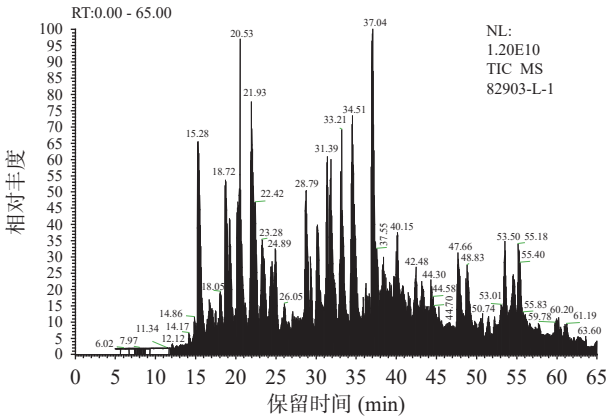


图 4　β-葡聚糖酶活性的蛋白 LC-MS/MS 总离子流图

Fig.4　Total ion flow map of LC-MS/MS for protein with β-glucanase activity

1　MMSSVKKTIC VLLVCFTMLS VMLLGPGVTE VSAASDATVN ISAERQVIRG
51　FGGMNHPAWI GDLTAAQRET AFGNGQNQLG FSVLRIHVDE NRNNWYKEVE
101 TAKSAIKHGA IVFASPWNPP NDMVETFNHN GDTTAKRLRY DKYAAYAQHL
151 NDFVNFMKSN GVNLYAISMQ NEPDYAHEWT WWTPQEILRF MRENAGSINA
201 RVIAPESFQY LKNISDPILN DPQALRNMDI LGTHLYGTQV SQFPYPLFKQ
251 KGGGKELWMT EVYYPNSDNN SADRWPEALG VSEHIHHSMV EGDFQAYVWW
301 YIRRSYGPMK EDGMISKRGY NMAHFSKFVR PGYVRIDATK NPEPNVYVSA
351 YKGDNKVVIV AINKNNTGVN QNFVLQNGTA SQVSRWITSS SSNLQPGTDL
401 KVTDNHFWAH LPAQSVTTFV VKR

图 5　LC-MS/MS 鉴定所得 Glucuronoxylanase 的氨基酸序列

Fig.5　Amino acid sequence of glucuronoxylanase identified by LC-MS/MS

注：标为红色的序列表示与 LC-MS/MS 获得肽段一致的序列。

2.3　GxylE-v26 的酶活特征分析

2.3.1　温度对 GxylE-v26 酶活力的影响

2.3.1.1　GxylE-v26 最适酶反应温度的研究　本研究测定了不同温度下 GxylE-v26 降解昆布多糖的活性，以探索 GxylE-v26 的最适反应温度，研究结果表

表 1　β-葡聚糖酶活性蛋白的质谱鉴定

Table 1　Identification of proteins with β-glucanase activity by mass spectrometry

编码	描述	覆盖率(%)	肽段数	PSMs	特异肽段数	氨基酸数	分子量(kDa)
A7Z5A1	Glucuronoxylanase OS=*Bacillus velezensis* (strain DSM 23117/BGSC 10A6/FZB42) OX=326423 GN=RBAM_018140 PE=3 SV=1	58	20	60	20	423	47.8

明(图 6),在反应温度在 10~60 ℃ 之间,酶活力随着温度的升高而上升,在 60 ℃ 时,相对酶活力达到最高(167%)。反应温度超过 70 ℃ 后,酶活力随着温度的升高而下降,推测过高的反应温度会使蛋白部分变性导致酶活性降低,而当反应温度达到 90 ℃ 时,GxylE-v26 仍能保持 58% 的酶活。综上可得该酶具有较高的最适反应温度,说明该酶在较高温度的工业应用中具有较大的潜力。

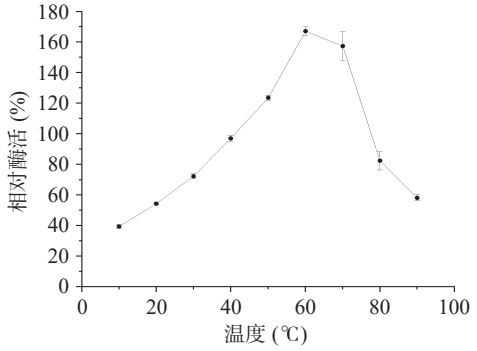


图 6 GxylE-v26 的最适酶反应温度测定

Fig.6 Determination of optimum enzyme reaction temperature of GxylE-v26

2.3.1.2 GxylE-v26 的温度稳定性 本研究测定了 GxylE-v26 在三种不同温度处理不同时间的酶活性,以分析 GxylE-v26 酶的温度稳定性。研究结果(图 7)表明:50 ℃ 处理 150 min 内对 GxylE-v26 的酶活力基本没有影响,在处理 150 min 后依然留有 90% 以上的酶活。而在 60 ℃ 环境下随着处理时间的增加,GxylE-v26 酶活力逐渐降低,在处理时间不超过 60 min 时,可保持 58% 的酶活性,但在处理时间达到 150 min 后,仅能保持 14% 的相对酶活力。该酶在 70 ℃ 环境下处理 30 min 基本丧失酶活力。上述结果说明,该酶对于温度较敏感,可以耐受 50 ℃ 的温度处理。

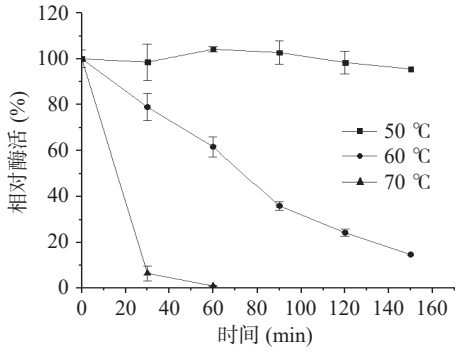


图 7 GxylE-v26 的温度稳定性分析

Fig.7 Analysis of temperature stability of GxylE-v26

GxylE-v26 的最适温度与热稳定性结果的差异可能源于高温下酶构象可能更利于与底物结合,因此在 60 ℃ 时酶活性最高,但长时间暴露导致不可逆变性,导致稳定性下降。在本研究中 GxylE-v26 展现出了 60 ℃ 的最适催化活性和 50 ℃ 下的长期稳定性,同时其在 90 ℃ 保留 58% 活性,体现出具有独特的短时高温耐受性,拓宽了其在高温工业场景的应用潜力,相比于已有报道的 β-葡聚糖酶具有更加优势的特性[25−27]。

2.3.2 pH 对 GxylE-v26 酶活力的影响

2.3.2.1 pH 对 GxylE-v26 活力的影响 如图 8 所示,本研究测定了不同 pH 环境下的 GxylE-v26 的酶活性,其中在 pH4 的酶反应条件下,GxylE-v2 的酶活最高,相对酶活达 120%;在 pH 为 4~6 的环境下,GxylE-v2 的相对酶活均为 100% 以上,说明该酶的最适反应条件为弱酸性环境。但过酸的环境(pH3)会使该酶活性降低。同时,该酶在 pH 为 10 的条件下依然有 57% 的相对酶活。说明该酶是一种弱酸性偏好酶,其 pH 适用范围较广。

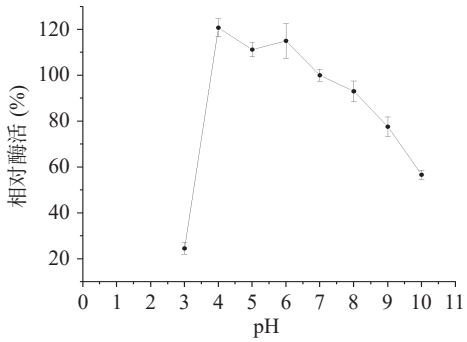


图 8 GxylE-v26 的酶反应最适 pH 测定

Fig.8 Determination of optimal pH for enzyme reaction of GxylE-v26

2.3.2.2 GxylE-v26 的 pH 稳定性 由图 9 的结果可知,pH 中性环境较利于 GxylE-v26 的储存,酸性和碱性的环境都会使该酶的酶活降低,而相较于酸性环境,碱性环境对其酶活造成的损失较大,说明该酶应远离碱性的储存环境。同时,GxylE-v26 在不同 pH 环境下 30 min 后,酶活损失不大,基本都有 65% 以上的酶活性。说明该酶对于环境的酸碱变化不敏感,具有很高的应用潜力。

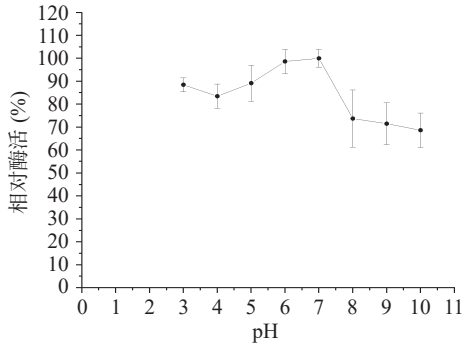


图 9 GxylE-v26 的 pH 稳定性分析

Fig.9 Analysis of pH stability of GxylE-v26

2.3.3 金属离子对 GxylE-v26 活力的影响 本实验设置了三个不同的金属离子浓度梯度,来探究不同金

属离子对 GxylE-v26 酶活性的影响, 结果如图 10 所示, 低浓度(1 mmol/L)的 Ca^{2+}、Mg^{2+}和 Ba^{2+}对于 GxylE-v26 酶活力没有明显影响, 中高浓度的 Ca^{2+}、Mg^{2+}和 Ba^{2+}对于 GxylE-v26 酶活力有抑制作用。Fe^{2+}对于 GxylE-v26 酶活力的影响与浓度相关: 低浓度(1 mmol/L)时对 GxylE-v26 的酶活有促进作用, 中浓度(10 mmol/L)时对 GxylE-v26 酶活有较大程度的抑制, 相对酶活为 50% 左右; 高浓度(100 mmol/L)的 Fe^{2+}极大地抑制了 GxylE-v26 酶活力, 相对酶活降到 10% 以下。Fe^{2+}产生这种双重效应结果的可能原因是低浓度的 Fe^{2+}通过氧化还原调节或辅助因子结合的方式增强催化效率[28−29], 而中高浓度的 Fe^{2+}可能氧化成 Fe^{3+}与羟基自由基(-OH)改变酶结构或 Fe^{2+}与酶表面的羧酸基团结合, 导致不可逆的沉淀或聚集, 抑制酶的活性。

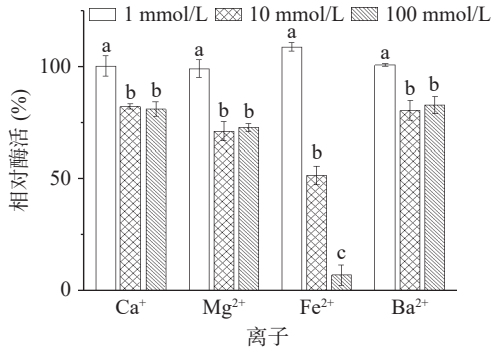


图 10　金属离子对 GxylE-v26 酶活的影响

Fig.10　Impact of metal ions on the enzymatic activity of GxylE-v26

注: 不同小写字母代表组内差异显著(P<0.05), 图 11、图 12 同。

2.3.4　有机溶剂对 GxylE-v26 活力的影响　本实验设置了三个不同的有机试剂浓度梯度, 来判断不同有机试剂对 GxylE-v26 酶活性的影响, 由图 11 可知, 醇类试剂: 甲醇、乙醇和异丙醇对于 GxylE-v26 酶活力均具有抑制作用, 且抑制作用随着有机试剂浓度的升高而增加, 可能与溶剂的极性降低和酶分子脱水效应相关, 导致酶结构松散或与底物结合受阻。三种浓度的乙酸乙酯对 GxylE-v26 酶活性的抑制基本一致, 可能因其低极性难以渗透进酶活性中心, 仅通过表面吸附干扰酶-底物相互作用, 为其在非水相催化中的应用提供可能。低浓度的正丁醇对 GxylE-v26 酶活力影响较小, 中高浓度下对酶活的抑制作用较显著(P<0.05), 且基本一致, 可能与其双亲性结构破坏酶疏水核心相关。

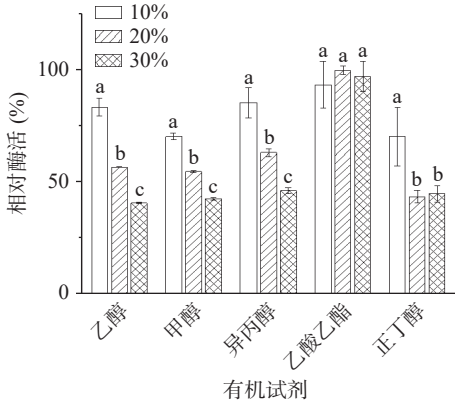


图 11　有机试剂对 GxylE-v26 酶活性的影响

Fig.11　Impact of organic reagents on enzyme activity of GxylE-v26

2.3.5　不同去污剂对 GxylE-v26 活力的影响　本实验分别设置三种不同的去污剂浓度, 分析去污剂对 GxylE-v26 酶活性的影响。由图 12 可知, SDS 浓度为 2% 时, 对 GxylE-v26 酶活力具有促进作用, 相对酶活可达到 122%, 但当浓度为 3% 和 4% 时, SDS 对 GxylE-v26 酶活力具有抑制作用, 相对酶活分别下降为 66% 和 62%。低浓度的 SDS 对 GxylE-v26 酶活的促进作用可能因为 SDS 部分破坏酶表面疏水相互作用[30], 暴露活性中心或增强底物结合效率, 而中高浓度的抑制作用则是因为 SDS 过度变性酶蛋白, 破坏其三级结构。三种浓度的 EDTA 和尿素对 GxylE-v26 的酶活力均具有抑制作用, 且抑制作用随浓度升高而增强。

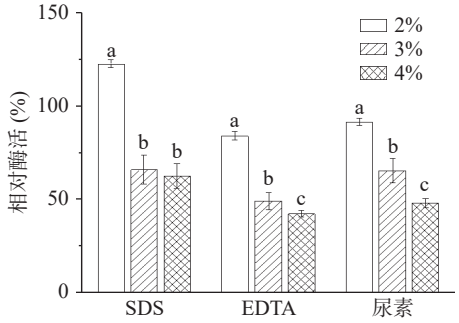


图 12　去污剂对 GxylE-v26 酶活性的影响

Fig.12　Impact of stain remover on enzyme activity of GxylE-v26

2.3.6　水解时间对 GxylE-v26 水解昆布多糖的影响　本实验以 D-葡萄糖为 Marker, 通过薄层色谱层析法检测了 GxylE-v26 不同水解时间对昆布多糖的水解水平。薄层色谱层析结果如图 13 所示, 随着水解

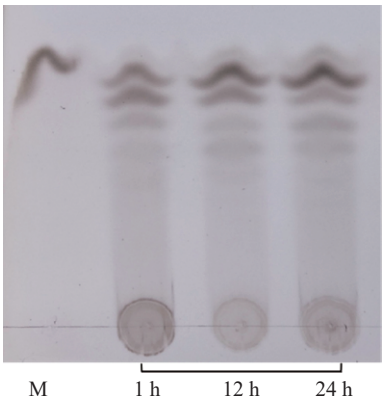


图 13　GxylE-v26 酶水解昆布多糖薄层色谱层析结果

Fig.13　Results of thin layer chromatography of hydrolyzed *Laminaria* polysaccharide by GxylE-v26

注: M: D-葡萄糖, 1 h、12 h 和 24 h: 水解时间分别为 1 h、12 h 和 24 h 的产物。

时间的延长，高分子量多糖条带变浅，低分子多糖条带变深，且在 D-葡萄糖相应的位置出现条带，表示水解产物有单糖出现。推测随着水解时间延长，昆布多糖水解产物内低分子量多糖含量逐步增多，高分子量多糖含量逐步减少，部分昆布多糖被水解为单糖，表明 GxylE-v26 的水解时间越长，昆布多糖水解得越彻底。

2.3.7 GxylE-v26 的抑菌活性测定 本实验以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、青枯菌劳尔氏菌、菠萝泛菌、水稻恶苗病菌和新拟盘多毛孢菌为指示菌，测定了 GxylE-v26 酶对这几种菌的抑制作用。结果如图 14 所示，两种浓度（1 mg/mL 和 2 mg/mL）的 GxylE-v26 对金黄色葡萄球菌和菠萝泛菌的生长均具有抑制作用，1 mg/mL 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 1 cm、对菠萝泛菌的抑菌圈直径为 1.1 cm，2 mg/mL 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 1.1 cm、对菠萝泛菌的抑菌圈直径为 1.2 cm。而 GxylE-v26 对大肠杆菌、青枯菌劳尔氏菌、水稻恶苗病菌和新拟盘多毛孢菌的生长没有抑制作用。推测其对于病原细菌具有一定的抑制作用。

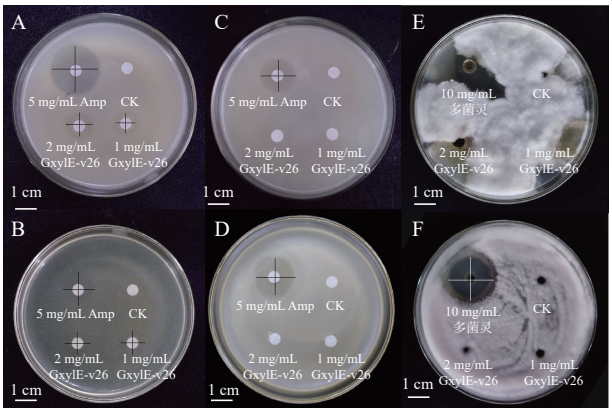


图 14 GxylE-v26 酶的抑菌活性分析

Fig.14 Analysis of antibacterial activity of GxylE-v26

注：CK 代表阴性对照；A：金黄色葡萄球菌，B：菠萝泛菌，C：大肠杆菌，D：青枯菌劳尔氏菌，E：水稻恶苗病菌，F：新拟盘多毛孢菌。

3 结论

本研究以红树林来源具葡聚糖酶活性的 *Bacillus velezensis* 2-6 为研究对象，从其发酵上清液中分离、纯化和鉴定 *β*-葡聚糖酶活性蛋白，结果分离得到了具有高活性（比酶活达 36956.5 U/mg）的 *β*-葡聚糖酶活性蛋白 GxylE-v26。同时对 GxylE-v26 的酶学特征进行研究，发现该酶在 50 ℃ 环境下处理 150 min 后依然有超过 90% 的酶活，且其水解昆布多糖的最适反应温度为 60 ℃，说明 GxylE-v26 是一种能够耐受较高温度的酶，同时 GxylE-v26 的最适酶反应 pH 为 4.0，且 pH 在 4.0~10 的范围内均保持了较高的活性，说明其在反应温度较高以及酸性的工业环境中均具有很大的应用潜力。除此之外，GxylE-v26 在浓度为 1 mg/mL 和 2 mg/mL 时对金黄色葡萄球菌和菠萝泛菌的生长均具有抑制作用，这对 GxylE-v26 在抑菌方面的进一步研究提供了重要依据。

© 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] PERROT T, PAULY M, RAMÍREZ V. Emerging roles of *β*-glucanases in plant development and adaptative responses[J]. Plants, 2022, 11(9): 1119.

[2] WANG Yanxin, LI Ding, DONG Chaonan, et al. Heterologous expression and characterization of a novel glycoside hydrolase family 55 *β*-1,3-glucanase, AcGluA, from *Archangium* sp. strain AC19[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6793−6803.

[3] ULKER A, SPREY B. Characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4-beta-glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 57(3): 215−219.

[4] SPREY B, UELKER A. Isolation and properties of a low molecular mass endoglucanase from *Trichoderma reesei*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 92(3): 253−257.

[5] ABDEEV R M, ABDEEVA I A, BRUSKIN S S, et al. Bacterial thermostable beta-glucanases as a tool for plant functional genomics[J]. Gene, 2009, 436(1−2): 81−89.

[6] BELIK A A, RASIN A B, KUSAYKIN M I, et al. Two GH16 endo-1,3-*β*-D-glucanases from *Formosa agariphila* and *F. algae* bacteria have complete different modes of laminarin digestion[J]. Molecular Biotechnology, 2022, 64(4): 434−446.

[7] 邓欣彤, 胡婕妤, 刘玲丽, 等. 基于酶活性的抑菌作用研究进展[J]. 农产品加工(下半月), 2021(10): 68−72. [DENG Xintong, HU Jieyu, LIU Lingli, et al. Research progress on antibacterial effects based on enzyme activity[J]. Aem Roducts Rocessing, 2021(10): 68−72.]

[8] de MARCO J L, FELIX C R. Purification and characterization of a beta-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2007, 50(1): 21−29.

[9] 陈刚, 杨谦, 刘志华, 等. 病原菌细胞壁诱导下球毛壳菌葡聚糖酶活测定及抑菌试验[J]. 西南林学院学报, 2010, 30(3): 50−53, 58. [CHEN Gang, YANG Qian, LIU Zhihua, et al. Activity and fungal growth inhibition assay of *β*-1,3-glucanase from *Chaetomium globosum* induced by pathogen cell walls[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2010, 30(3): 50−53,58.]

[10] 朱华珺, 周瑚, 任佐华, 等. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 470−478. [ZHU Huajun, ZHOU Hu, REN Zuohua, et al. Extracellular antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* JN005 and its control efficacy on rice leaf blast[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 470−478.]

[11] 高兆明. 红树林纤维素降解菌和菌群及其相关酶类的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011. [GAO Zhaoming. Research on cellulolytic microorganisms, microbial consortia and relative cellulases in mangrove ecosystems[D]. Jinan: Shandong University, 2011.]

[12] 卢文珺, 卢文琼. 红树林微生物来源生物碱的开发利用[J]. 科技视界, 2016(9): 303,319. [LU Wenjun, LU Wenqiong. Devel-

opment and utilization of mangrove microbial source alkaloids[J]. Science & Technology Vision, 2016(9): 303,319.]
[13] BEHERA B C, SETHI B K, MISHRA R R, et al. Microbial cellulases-Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 197−210.
[14] 宋路萍, 杨振苹, 王斌, 等. 基于 16S rDNA 快速鉴定细菌的 PCR 测序方法的建立及其进化关系分析[J]. 中国医药科学, 2020, 10(17): 86−91. [SONG Luping, YANG Zhenping, WANG Bin, et al. Analysis on the establishment of PCR sequencing method for rapid identification of bacteria based on 16S rDNA and its evolutionary relationship[J]. China Medicine and Pharmacy, 2020, 10(17): 86−91.]
[15] 毛淑蕊. 热稳定性 *β*-葡聚糖酶的克隆、表达及定向进化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013. [MAO Shurui. Gene cloning, expression and directed revolution of thermostable *β*-1,3-1,4-glucanase[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.]
[16] 黄彩梅. 纤维素酶和木聚糖酶的分离纯化及其酶学性质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014. [HUANG Caimei. Studies on purification and enzyme characteristics of cellulase and xylanase [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.]
[17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. [WANG J Z, FAN M. Protein technology manual[M]. Beijing: Science Press, 2000.]
[18] 于欣禾, 李明慧, 孙珍. LC-MS/MS 分析结合优化提取工艺探究啤酒中麸质蛋白[J]. 质谱学报, 2022, 43(2): 242−251. [YU X H, LI M H, SUN Z. Analysis of the gluten map in beers by LC-MS/MS combined with optimized extraction protocol[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2022, 43(2): 242−251.]
[19] 杨卫康. 4,6-*α*-葡聚糖转移酶的挖掘、定性及产物特异性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [YANG Weikang. The mining, characterization and product specificity analysis of 4,6-*α*-glucanotransferase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]
[20] RASHAMUSE K J, VISSER D F, HENNESSY F, et al. Characterisation of two bifunctional cellulase-xylanase enzymes isolated from a bovine rumen metagenome library[J]. Current Microbiology, 2013, 66(2): 145−151.
[21] ALVES K J, da SILVA M C P, COTTA S R, et al. Mangrove soil as a source for novel xylanase and amylase as determined by cultivation-dependent and cultivation-independent methods[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(1): 217−228.
[22] CHEN H, YAN X, LIU X, et al. Purification and characterization of novel bifunctional xylanase, XynIII, isolated from *Aspergillus niger* a-25[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(7): 1132−1138.
[23] NAKAMICHI Y, WATANABE M, MATSUSHIKA A, et al. Substrate recognition by a bifunctional GH30-7 xylanase B from *Talaromyces cellulolyticus*[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(6): 1180−1189.
[24] ŠUCHOVÁ K, CHYBA A, HEGYI Z, et al. Yeast GH30 xylanase from *Sugiyamaella lignohabitans* is a glucuronoxylanase with auxiliary xylobiohydrolase activity[J]. Molecules, 2022, 27(3): 751.
[25] 王娜, 林青, 赵余, 等. 高产 *β*-葡聚糖酶里氏木霉的诱变选育、酶学性质及体外模拟消化研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(12): 153−159. [WANG Na, LIN Qing, ZHAO Yu, et al. Mutation breeding, enzymatic properties, and *in vitro* digestibility of *Trichoderma reesei* with high yield of *β*-glucanase[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(12): 153−159.]
[26] 王瑞杰, MCHUNU N P, 牛丹丹, 等. 疏绵状嗜热丝孢菌外切 *β*-葡聚糖酶的基因克隆与酶学特征[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 285−291. [WANG R J, MCHUNU N P, NIU D D, et al. Gene cloning and enzymatic characterization of an exo-*β*-glucanase from *Thermomyces lanuginosus*[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 285−291.]
[27] MAT Y N L, FAZLIN H N H, ILLIAS R M, et al. Expression and biochemical characterization of a novel thermostable alkaline *β*-1,3-1,4-glucanase (lichenase) from an alkaliphilic *Bacillus lehensis* G1[J]. Protein Expression and Purification, 2024, 219: 106486.
[28] 李润佳. Fe(Ⅲ)对河流沉积物氮循环的影响机制[D]. 重庆: 重庆大学, 2022. [LI R J. Impacts of Fe(Ⅲ) on nitrogen cycle in river sediments[D]. Chongqing: Chongqing University, 2022.]
[29] 向婷婷. Fe(Ⅱ)/A-KG 依赖型芳氧烷酸双加氧酶 Sp2 结构与功能的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2023. [XIANG T T. The crystal structures and function analysis of Fe(Ⅱ)/A-KG-dependent aryloxyalkanoate dioxygenase Sp2[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2023.]
[30] 刘璐. 基于 IMM 模型提高玉米秸秆纤维素水解反应效率的机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019. [LIU Lu. Study on mechanism of improving the efficiency of cellulose hydrolysis of corn stover based on IMM model[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.]