



## 研究报告

## 土壤中产木聚糖酶菌株的筛选及发酵条件优化

赵龙妹<sup>\*1</sup> 张兰<sup>2</sup> 曹慧<sup>1</sup> 董惠心<sup>1</sup> 杜东晓<sup>1</sup> 李旺<sup>1</sup> 李元晓<sup>1</sup> 曹平华<sup>1</sup> 何万领<sup>1</sup>

1 河南科技大学动物科技学院 河南 洛阳 471023

2 西南民族大学生命科学与技术学院 四川 成都 610041

**摘要:**【背景】木聚糖广泛存在于木质纤维类生物质中,是世界上含量最丰富的半纤维素,利用产酶微生物对木质纤维类生物质进行发酵处理是木质纤维类生物质资源化和能源化的有效手段。【目的】通过产木聚糖酶菌株的筛选鉴定、酶学特性分析和发酵条件优化,获得开发多纤维农林废弃物生产新型多元化饲料添加剂的材料。【方法】利用青藏高原土壤筛选产木聚糖酶菌株,通过形态学观察和 rDNA ITS 区域序列分析鉴定菌株 XC70 种属,对其所产酶的酶学特性及该菌的生长规律和产酶规律进行分析,并利用单因素法和正交试验法优化其发酵条件。【结果】菌株 XC70 经形态学和分子生物学方法鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。菌株 XC70 所产木聚糖酶的最适反应条件为: pH 5.0, 70 °C, 温度低于 50 °C 时稳定性较好,具备一定的耐酸性, Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>对木聚糖酶活力具有促进作用( $P < 0.05$ ),在发酵 54 h 后菌体量和上清液酶活力大小均达到高峰。经过单因素法和正交试验法优化后确定了该菌的最优发酵条件为: 蛋白胨 7 g/L, 玉米秸秆 50 g/L, KCl 4 g/L, 培养基初始 pH 4.0, 28 °C, 摇床转速 200 r/min, 接种量 2%。在此发酵条件下,木聚糖酶活力可达到 1 489.33 U/mL,与优化前相比提高了 3 倍多。【结论】从青藏高原土壤中筛选获得的菌株 XC70 具有一定的产木聚糖酶能力,其所产生的酸性木聚糖酶可用于降解多纤维物质开发新型饲料添加剂,具有一定的应用潜力和开发价值。

关键词: 木聚糖, 木聚糖酶, 草酸青霉, 发酵条件优化, 土壤

## Screening and fermentation conditions optimization of xylanase-producing strain from soil

ZHAO Longmei<sup>\*1</sup> ZHANG Lan<sup>2</sup> CAO Hui<sup>1</sup> DONG Huixin<sup>1</sup> DU Dongxiao<sup>1</sup>LI Wang<sup>1</sup> LI Yuanxiao<sup>1</sup> CAO Pinghua<sup>1</sup> HE Wanling<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

2 College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu, Sichuan 610041, China

**Abstract:** [Background] Xylan which widely exists in lignocellulosic biomass is the most abundant

**Foundation items:** Doctoral Scientific and Research Start-Up Fund from Henan University of Science and Technology (13480076); Key Research and Development and Promotion Projects of Henan Province (Research and Development of Key Science and Technologies) (212102110174)

**\*Corresponding author:** E-mail: zhaolongmei@126.com**Received:** 31-12-2020; **Accepted:** 01-04-2021; **Published online:** 06-05-2021**基金项目:** 河南科技大学博士科研启动基金(13480076); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(212102110174)**\*通信作者:** E-mail: zhaolongmei@126.com**收稿日期:** 2020-12-31; **接受日期:** 2021-04-01; **网络首发日期:** 2021-05-06

hemicellulose in the world. It is an effective way for the resource and energy utilization of lignocellulosic biomass to utilize enzyme producing microorganisms to ferment lignocellulosic biomass. **[Objective]** The aim of this experiment was to obtain materials for producing multiple feed additives from multi fiber agricultural and forestry wastes by screening and identifying xylanase producing strains, analyzing enzymatic characteristics and optimizing fermentation conditions. **[Methods]** The xylanase producing strains were screened from the soil of Qinghai-Tibet Plateau. The strain XC70 were identified by morphological observation and rDNA ITS sequence analysis. The enzymatic characteristics, growth and enzyme production attributes of the strain were analyzed, and the fermentation conditions were optimized by single factor method and orthogonal test method. **[Results]** The strain XC70 was identified as *Penicillium oxalicum* by morphological and molecular biological methods. The results showed that the optimal reaction conditions of xylanase produced by XC70 were pH 5.0, 70 °C, the xylanase had good stability when the temperature was lower than 50 °C, and it showed some acid resistance.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  promoted the xylanase activity ( $P<0.05$ ). After 54 h of fermentation, the biomass and enzyme activity of supernatant reached the peak. Through single factor method and orthogonal test method, the optimal fermentation conditions were determined as follows: peptone 7 g/L, corn straw 50 g/L, KCl 4 g/L, initial pH 4.0, 28 °C, shaking speed 200 r/min, inoculum size 2%. Under these conditions, the xylanase activity reached 1 489.33 U/mL, which was three times higher than that before optimization. **[Conclusion]** The strain XC70 screened from the soil of Qinghai-Tibet Plateau has certain acidic xylanase-producing capacity, which can be used to degrade multi fiber materials and develop new feed additives, and this has certain application potential and development value.

**Keywords:** xylan, xylanase, *Penicillium oxalicum*, optimization of fermentation conditions, soil

木聚糖是世界上含量最丰富的半纤维素<sup>[1-2]</sup>, 广泛存在于木质纤维类物质中, 我国农业和食品加工业副产物种类多、数量大, 包括较多的木质纤维类物质, 如玉米芯、秸秆、稻壳、果渣等<sup>[3-4]</sup>, 其中含有丰富的木聚糖, 具有较大的开发应用潜力。酶解木聚糖是木聚糖高效开发利用的有效手段之一, 不仅能够将大分子木聚糖分解为单糖和寡糖, 生成的寡糖还可作为益生元促进有益菌的生长<sup>[5-6]</sup>。因此, 可通过酶解法开发木聚糖含量丰富的农林废弃物, 再使用富含低聚木糖(Xylooligosaccharides, XOS)的酶解液发酵益生菌, 从而开发新型多元化饲料添加剂, 以作为抗生素替代品, 用于维护动物肠道健康, 提高动物生产性能。自然界中微生物源的木聚糖酶更适合作为酶制剂进行开发利用, 其中具有特殊性能如嗜酸、嗜碱、耐高温或低温的木聚糖酶得到越来越多的关注, 此类酶多由特殊环境中的微生物所分泌<sup>[7]</sup>。青藏高原是目前全球海拔最高、面积最大的生态系统, 具有地势高、纬度低、地域辽阔的特点, 这也造就了其特有的复杂多样的生态环

境<sup>[8-10]</sup>。土壤微生物是土壤的重要组成部分, 也是地球上多样性最高、物种最丰富的生物类群之一, 参与了土壤中几乎所有的物质循环, 与土壤生态系统存在着密切的互作关系<sup>[8,11]</sup>。青藏高原独有的地理和气候特点以及复杂多样的生态环境形成了多样性较高的土壤微生态系统, 土壤微生物通过对土壤中纤维素、半纤维素、蛋白质等有机质进行降解和利用, 从而推动土壤物质循环, 因此, 青藏高原土壤中含有丰富的有机质降解菌, 包括产纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶等酶类的微生物<sup>[12-13]</sup>, 有望从中筛选到具有特殊性能的产木聚糖酶菌株。对微生物发酵条件进行优化可提高功能蛋白的分泌水平, 在单因素优化试验的基础上进行正交试验, 可考虑到不同因素之间的交互作用, 弥补单因素试验的不足。因此, 本研究利用青藏高原土壤为样品, 筛选产木聚糖酶菌株, 分析所产木聚糖酶的酶学特性以及该菌的生长规律和产酶规律, 并对其发酵条件进行单因素和正交优化, 以期非常规饲料资源及新型饲料添加剂的开发提供物质和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

土壤样品来源: 青藏高原高寒草甸土壤, 采集于青海省海北州门源县。

采样方法: 采用梅花形采样法, 采集高寒草甸 0–10 cm 深处土壤, 过 2 mm 土壤筛, 装入采样袋,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 主要仪器

电子精密天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 恒温摇床, 上海苏坤实业有限公司; 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; ReadMax-1000F 型酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司。

### 1.3 主要试剂和培养基

自制木聚糖: 利用碱法提取干玉米芯中木聚糖<sup>[14]</sup>; DNS 试剂: 参照文献<sup>[15]</sup>及《中华人民共和国国家标准饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法(GB/T 23874-2009)》<sup>[16]</sup>进行配制, 常温条件下静置 7 d 后使用, 有效期为 6 个月。真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他化学试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

筛选培养基(g/L): 自制木聚糖 5.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50,  $\text{KCl}$  0.50,  $\text{NaNO}_3$  3.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 琼脂粉 20.00, 0.11 MPa 灭菌 25 min, 倒平板备用。产酶发酵基础培养基(g/L): 自制木聚糖 5.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50,  $\text{KCl}$  0.50,  $\text{NaNO}_3$  3.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 0.11 MPa 灭菌 25 min。

### 1.4 产木聚糖酶菌株的筛选

使用无菌水对土壤样品进行溶解并 10 倍比梯度稀释, 取稀释 100 倍的样品 200  $\mu\text{L}$  均匀涂布于筛选培养基上,  $28^{\circ}\text{C}$  培养 48–72 h, 挑选生长良好的单菌落进行分离纯化并点接种到筛选培养基,  $28^{\circ}\text{C}$  培养 72 h, 使用 1 mg/mL 刚果红染色 2–4 h, 再使用 1 mol/L  $\text{NaCl}$  溶液进行洗脱, 根据水解圈直径大小选取具有较强木聚糖降解能力的菌株。

将初筛所得菌株接种到产酶发酵基础培养基,  $28^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 72 h 后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 使用 DNS 法<sup>[15]</sup>测定其木聚糖酶活力, 根据酶活力大小选取目的菌株。

### 1.5 产木聚糖酶菌株的鉴定

#### 1.5.1 形态学特征

观察菌株生长于固体培养基上的形态并进行镜检。

#### 1.5.2 分子生物学鉴定

使用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株的基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 使用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增 rDNA ITS 区域序列。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 基因组 DNA 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ ,  $2 \times \text{Taq PCR Mix}$  25  $\mu\text{L}$ , 纯化水 19  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 扩增产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后, 在 NCBI 网站上将序列信息与 GenBank 中已知序列进行比对, 使用 MEGA X 软件通过邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树, 对菌株进行鉴定, 并将序列信息上传至 NCBI 数据库。

### 1.6 木聚糖酶学特性分析

#### 1.6.1 木聚糖酶活力测定

同 1.4 获得的发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 所获得的上清液即为粗酶液, 木聚糖酶活力测定方法参考《中华人民共和国国家标准饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法(GB/T 23874-2009)》<sup>[16]</sup>, 使用 DNS 法<sup>[15]</sup>进行测定。木聚糖酶活力定义: 在一定温度和 pH 条件下, 每分钟水解 1% 自制木聚糖生成 1  $\mu\text{g}$  木糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。

#### 1.6.2 最适温度的测定

在 pH 5.0 条件下, 分别将粗酶液与 1% 自制木聚糖溶液混合物在 20、30、40、50 和  $60^{\circ}\text{C}$  条件下反应后测定木聚糖酶活力, 确定最适反应温度。

### 1.6.3 最适 pH 的测定

在 70 °C 条件下,分别测定粗酶液与 1%自制木聚糖溶液混合物在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 条件下反应的木聚糖酶活力,确定最适 pH。

### 1.6.4 温度稳定性

将粗酶液分别在 20、30、40、50、60、70 和 80 °C 条件下保温 60 min,然后在最适反应条件下测定剩余木聚糖酶活力,分析其热稳定性。

### 1.6.5 pH 稳定性

将粗酶液分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 条件下处理 60 min,然后在最适反应条件下测定木聚糖酶剩余活力,分析其酸碱稳定性。

### 1.6.6 金属离子对木聚糖酶活力的影响

分别将粗酶液加入到终浓度为 5 mmol/L 的 NaCl、KCl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MnSO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub> 溶液中,测定其木聚糖酶活力,以未加金属离子作为对照,分析不同金属离子对木聚糖酶活力的影响。

### 1.6.7 菌株生长曲线和产酶情况的分析

使用优化后的培养基,以 1%接种量在 28 °C、200 r/min 条件下进行发酵培养,每隔 6 h 或 12 h 取一次样,12 000 r/min 离心 10 min 后测定 2 mL 发酵液中菌体湿重及上清液中的木聚糖酶活力,分析菌株的生长情况和产酶规律。

## 1.7 菌株发酵培养基条件的优化

### 1.7.1 氮源对菌株产酶的影响

分别选取豆粉、蛋白胨、酵母粉、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、尿素为培养基氮源,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.2 金属离子对菌株产酶的影响

分别选取 CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、KCl、NaCl、FeSO<sub>4</sub> 为培养基中的金属盐,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.3 碳源对菌株产酶的影响

分别选取葡萄糖、麸皮、玉米秸秆、蔗糖、木聚糖为培养基碳源,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.4 氮源浓度对菌株产酶的影响

分别以 1、2、3、5、7 g/L 蛋白胨作为培养基氮源,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.5 金属盐溶液浓度对菌株产酶的影响

在培养基中分别添加 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 g/L KCl,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.6 碳源浓度对菌株产酶的影响

分别以 10、20、30、40、50 g/L 玉米秸秆作为培养基碳源,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.7.7 培养基正交优化

在单因素试验结果的基础上,采用正交试验优化发酵培养基,选取 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表,因素水平如表 1 所示。

## 1.8 菌株培养条件的优化

### 1.8.1 初始 pH 对菌株产酶的影响

在上述优化基础上,分别调整培养基初始 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,以 1%接种量、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.8.2 培养温度对菌株产酶的影响

在上述优化基础上,分别在 23、28、33 和 38 °C 条件下,以初始 pH 4.0、1%接种量、200 r/min 发酵培养 72 h,测定上清液中木聚糖酶活力。

### 1.8.3 摇床转速对菌株产酶的影响

在上述优化基础上,分别将振荡培养的转速调整为 170、200 和 230 r/min,以初始 pH 4.0、1%接种量、28 °C 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 The factors and their assigned levels of orthogonal test (g/L)

水平 Levels	因素 Factors		
	玉米秸秆 Corn straw	蛋白胨 Peptone	氯化钾 KCl
1	20	2	2
2	40	5	3
3	50	7	4



### 1.8.4 接种量对菌株产酶的影响

在上述优化基础上,分别以 0.5%、1%、2%、3%、4%接种量进行接种,在初始 pH 4.0、28 °C、200 r/min 条件下发酵培养 72 h 后测定木聚糖酶活力。

### 1.9 数据统计分析

试验数据使用 Excel 2010 统计软件进行初步整理和统计,并用绘图软件 SigmaPlot 12.0 绘制折线图和柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 产木聚糖酶菌株的筛选和鉴定

通过平板初筛,获得多株产木聚糖酶菌株,结合透明圈大小及发酵菌液上清液的木聚糖酶活力大小,最终筛选获得产木聚糖酶活力较大的目的菌株 XC70,如图 1 所示,该菌发酵液上清的木聚糖酶活力为 362.99 U/mL。



图 1 菌株 XC70 在平板上的透明圈

Figure 1 Transparent hydrolytic zones of strain XC70 grown on the plate

菌株 XC70 的菌落形态如图 2A 所示,菌丝白色,若培养时间延长,可见灰绿色孢子,菌落中心略微凸起,有少量放射状褶皱,绒状质地,背面呈浅橘色,其镜检结果如图 2B 所示,分生孢子梗顶端具有 2 个左右扫帚状分枝,其上着生小梗,小梗顶端可见单个或成串的分生孢子,孢子呈圆形或椭圆形,无色。

菌株 XC70 的 rDNA ITS 区域序列经测序后,在 NCBI 网站上与 GenBank 中已知序列进行比对,通过邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育进化树如图 3 所示,结合形态学特征,将菌株 XC70 鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*),并将其序列信息上传至 NCBI 数据库,登录号(GenBank Accession Number)为 MW725154。

### 2.2 木聚糖酶酶学特性分析

#### 2.2.1 最适反应温度和 pH

如图 4A 所示,菌株 XC70 所产木聚糖酶的最适反应温度为 70 °C,在 40–60 °C 能发挥 70%以上的酶活。

如图 4B 所示,该木聚糖酶的最适反应 pH 值为 5.0,属于酸性木聚糖酶,在 pH 4.0、6.0 时分别能够发挥接近 80%、70%的酶活。

#### 2.2.2 温度稳定性和 pH 稳定性

如图 4C 所示,该木聚糖酶在 20 °C 条件下稳定性较好,在 30 °C 和 40 °C 条件下处理 60 min 后仍能发挥 90%以上的酶活,50 °C 处理 60 min 后剩余酶活为 57%,在 60 °C 和 70 °C 条件下处理 60 min 后酶活损失较大,剩余酶活分别为 21%和 15%。

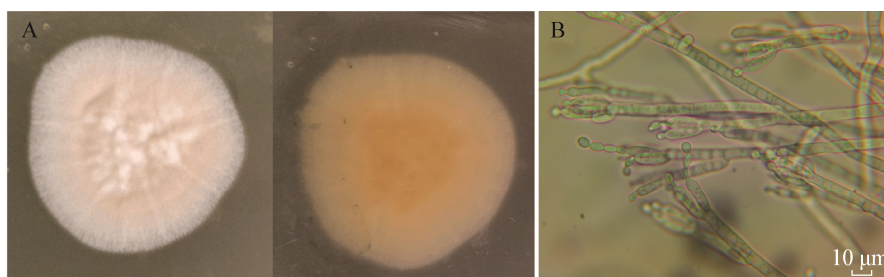


图 2 菌株 XC70 的菌落形态(A)和镜检图(B)

Figure 2 Cology morphology (A) and light microscopy image (B) of strain XC70

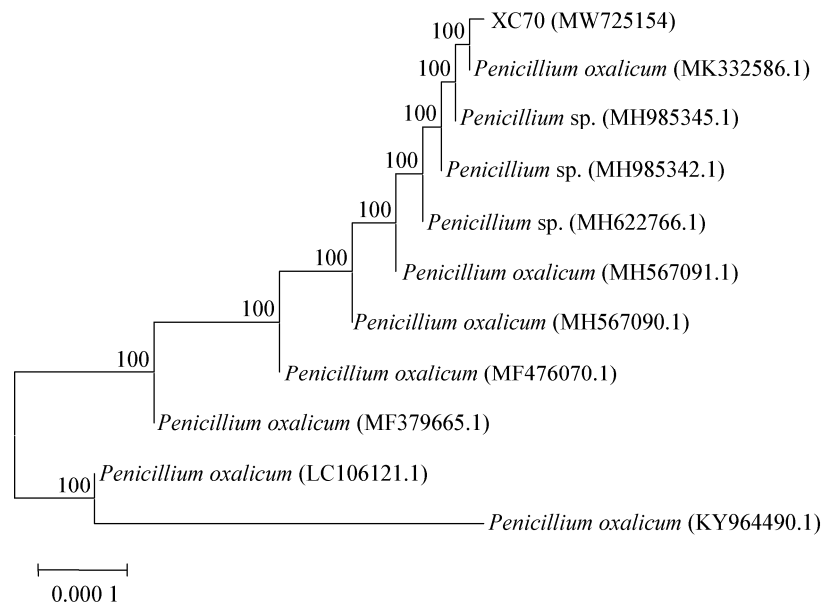


图3 菌株XC70系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of strain XC70

注: 括号中内容表示菌株的序列登录号; 分支点数字表示置信度; 标尺表示遗传距离

Note: The contents in parentheses are accession numbers of the strain; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance

如图4D所示, 该木聚糖酶在pH 5.0条件下稳定性较好, 在pH 3.0、4.0条件下处理60 min后能发挥90%以上的酶活, pH 2.0处理60 min后剩余酶活为37%, pH 6.0条件下处理60 min后能够发挥接近60%酶活, 在pH 7.0、8.0条件下处理60 min后分别剩余56%、49%的酶活, 说明该酶具备较好的耐酸性。

### 2.2.3 金属离子对酶活的影响

如图5所示,  $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 对木聚糖酶活力具有显著的促进作用( $P < 0.05$ ),  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$ 对木聚糖酶活力具有显著的抑制作用( $P < 0.05$ )。

### 2.2.4 菌株生长情况和产酶规律

如图6所示, 发酵液上清的木聚糖酶活力和菌量均在发酵54 h后达到高峰。菌株的生长经历了0–18 h的迟缓期、18–30 h的对数期、30–54 h的稳定期及54–102 h的衰亡期; 在此期间, 酶活力在0–30 h增长相对较慢, 30–54 h增长较快, 54–66 h

缓慢下降, 随后酶活快速下降。总体而言, 酶活力的增长稍晚于菌重的增长, 说明菌株XC70所产木聚糖酶是其生长过程中的次级代谢产物, 在菌株生长发育后期进行分泌。

## 2.3 菌株发酵培养基条件的优化

### 2.3.1 氮源及其浓度对菌株产酶的影响

如图7A所示, 以蛋白胨为培养基氮源时, 发酵后上清液中木聚糖酶活力较高, 当培养基的氮源为硫酸铵时, 发酵上清液中木聚糖酶活力较低, 因此选取蛋白胨为培养基氮源。

如图7B所示, 与1、2、3和7 g/L蛋白胨相比, 当培养基中蛋白胨浓度为5 g/L时, 菌株XC70发酵后上清液中木聚糖酶活力最大, 为513.60 U/mL。

### 2.3.2 不同金属离子及其浓度对菌株产酶的影响

如图7C所示, 当培养基中的金属离子为 $\text{K}^+$ 时, 发酵液上清中木聚糖酶活力较高; 当金属离子为 $\text{Ca}^{2+}$ 时, 发酵液上清中木聚糖酶活力较低, 因此选取 $\text{K}^+$ 作为培养基金属离子。

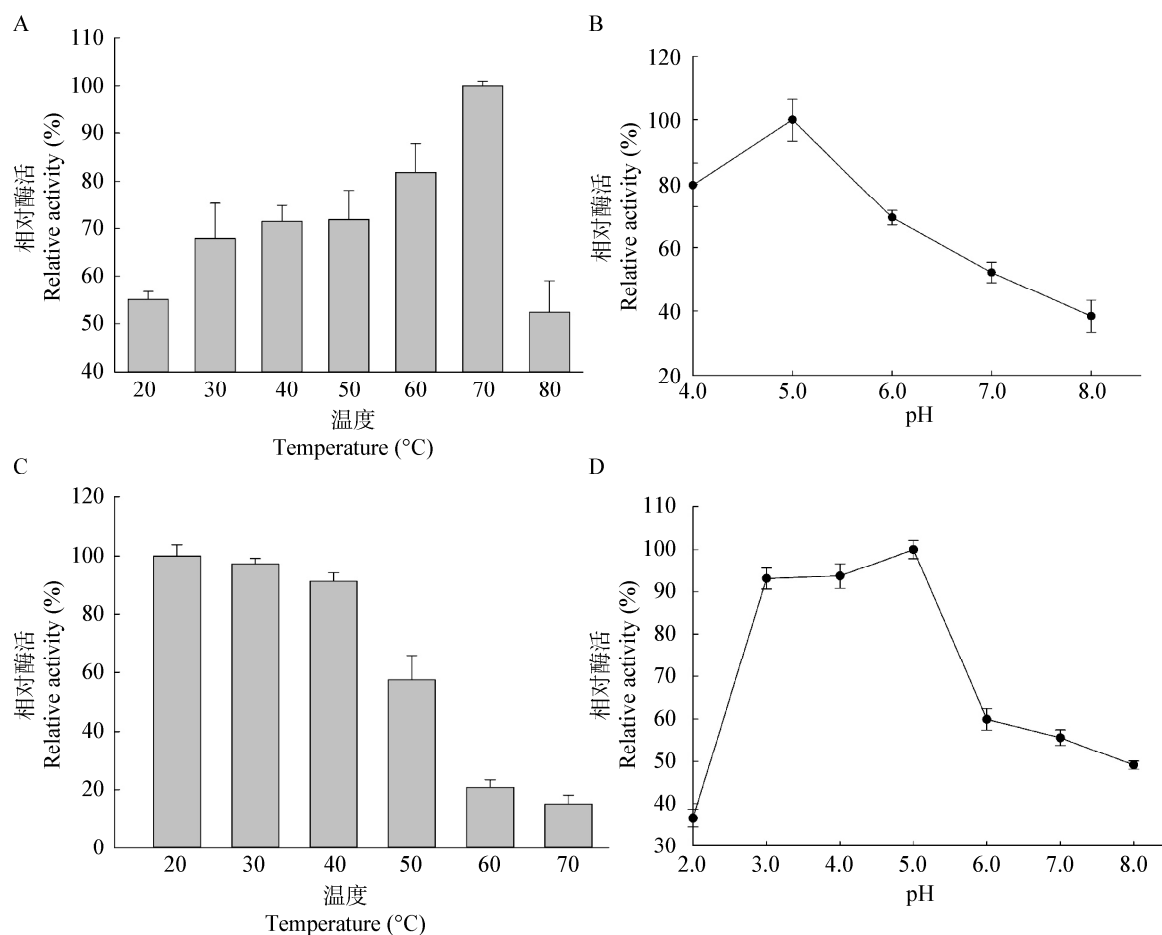


图4 菌株XC70所产木聚糖酶的酶学特性分析

Figure 4 The enzymatic characteristics of xylanase produced by XC10

注: A: 最适反应温度; B: 最适反应 pH; C: 温度稳定性; D: pH 稳定性

Note: A: Optimal reaction temperature; B: Optimal reaction pH; C: Thermal stability; D: pH stability

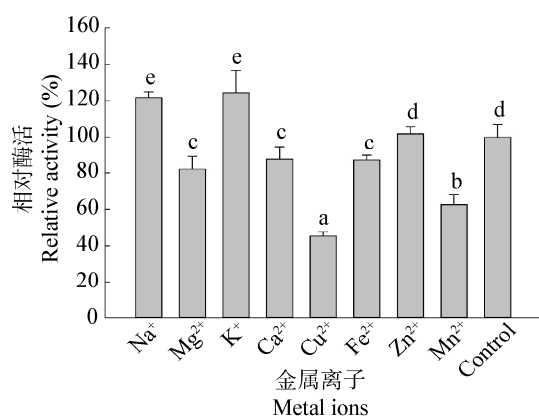


图5 金属离子对木聚糖酶活力的影响

Figure 5 Effect of metal ions on xylanase activity

注: 数据柱形标注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Note: Value columns with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below

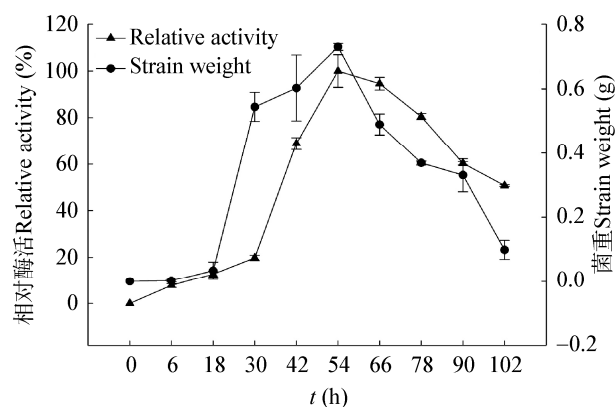


图6 菌株XC70生长和产酶规律

Figure 6 Growth and enzyme production attributes of XC70

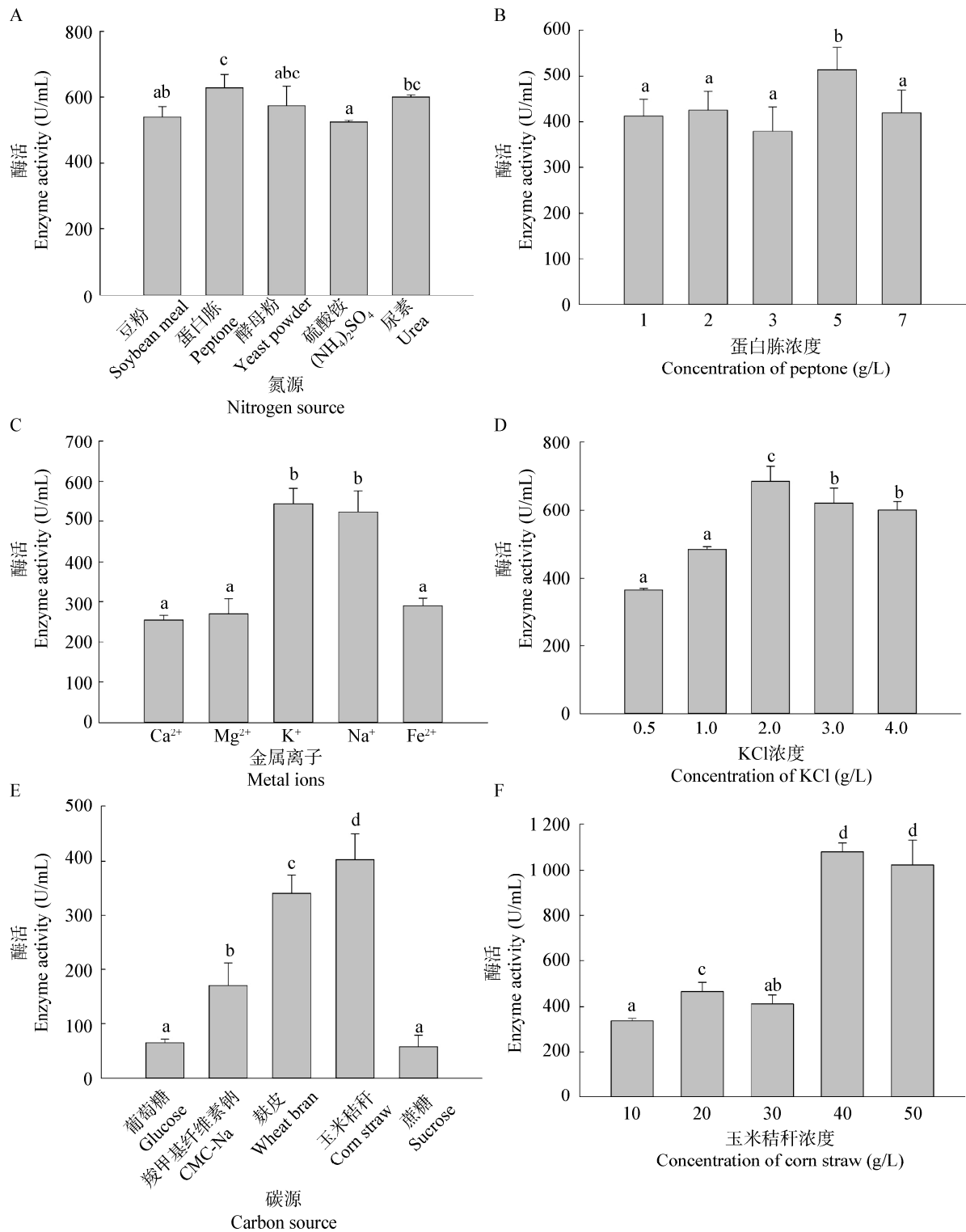


图 7 发酵培养基单因素优化结果

Figure 7 The results of single factor optimization of fermentation medium

注: A: 氮源; B: 蛋白胨浓度; C: 金属离子; D: KCl 浓度; E: 碳源; F: 玉米秸秆浓度

Note: A: Nitrogen source; B: Concentration of peptone; C: Metal ions; D: Concentration of KCl; E: Carbon source; F: Concentration of corn straw

表 2 发酵培养基正交优化试验结果

Table 2 Orthogonal test results of the optimization of fermentation medium

试验号 No.	因素 Factors			木聚糖酶活力 Xylanase (U/mL)
	A: 玉米秸秆 Corn straw	B: 蛋白胨 Peptone	C: 氯化钾 KCl	
1	1	1	1	669.28
2	1	2	2	676.89
3	1	3	3	1 030.83
4	2	1	2	388.00
5	2	2	3	1 119.59
6	2	3	1	1 083.56
7	3	1	3	1 140.62
8	3	2	1	956.41
9	3	3	2	1 100.33
$K_1$	2 377	2 197.9	2 709.25	
$K_2$	2 591.15	2 752.89	2 165.22	
$K_3$	3 197.36	3 214.72	3 291.04	
$k_1$	792.33	732.63	903.08	
$k_2$	863.72	917.63	721.74	
$k_3$	1 065.79	1 071.57	1 097.01	
$R$	273.46	338.94	375.27	
主次顺序	C>B>A			
Primary and secondary order				
最优组合	$A_3B_3C_3$			
Optimal combination				

如图 7D 所示, 与 0.5、1.0、3.0 和 4.0 g/L KCl 相比, 当培养基中 KCl 浓度为 2 g/L 时, 菌株 XC70 发酵后上清液中木聚糖酶活力最大, 为 684.37 U/mL。

2.3.3 碳源及其浓度对菌株产酶的影响

如图 7E 所示, 以玉米秸秆为培养基碳源时, 发酵后上清液中木聚糖酶活力较高, 若以葡萄糖和蔗糖作为培养基碳源, 发酵后上清液中木聚糖酶活力较低, 结果说明与单糖或双糖相比, CMC、麸皮和玉米秸秆类的纤维多聚体具有促进菌株产酶的能力, 可诱导微生物分泌相应的降解酶, 因此选取玉米秸秆作为培养基碳源。

如图 7F 所示, 与 10、20、30 和 50 g/L 玉米秸秆相比, 当培养基中玉米秸秆浓度为 40 g/L 时, 菌株 XC70 发酵后上清液中木聚糖酶活力最大, 为 1 081.00 U/mL。

2.3.4 培养基条件的正交优化

根据上述单因素试验优化结果, 对培养基条件中的氮源、碳源和金属离子进行正交优化, 分析其

对产酶情况的影响, 结果如表 2 所示。各因素对菌株 XC10 产酶情况的影响顺序为: 金属离子>氮源>碳源, 最优组合为  $A_3B_3C_3$ , 即玉米秸秆 50 g/L、蛋白胨 7 g/L、KCl 4 g/L。经试验验证, 发现最优组合条件下, 菌株 XC70 发酵后上清液中木聚糖酶活力大小为 1 095.76 U/mL。

2.4 菌株培养条件的优化

2.4.1 初始 pH 对菌株产酶的影响

如图 8A 所示, 当培养基初始 pH 值为 4.0 时, 发酵上清液中木聚糖酶活力较高, 达到 788.39 U/mL; 当 pH 值低于 4.0 或高于 4.0 时, 酶活力均发生下降, 而在 pH 值低于 4.0 情况下, 酶活力下降较快, 说明过酸会严重影响菌株 XC70 的生长, 继而影响其产酶, 因此将培养基初始 pH 值定为 4.0。

2.4.2 培养温度对菌株产酶的影响

如图 8B 所示, 当培养温度为 28 °C 时, 发酵

上清液中木聚糖酶活力较高, 达到 952.15 U/mL; 当培养温度下降到 18 °C 时, 发酵上清液中酶活力仍然能达到 700.48 U/mL; 当培养温度升高到 38 °C 时, 发酵上清液中酶活力下降到 232.20 U/mL, 说明该菌能够耐受一定程度的低温, 与样品采集地的常年低温有关, 而培养温度升高到 38 °C 时就会影响菌株的产酶, 因此将培养温度定为 28 °C。

#### 2.4.3 摇床转速对菌株产酶的影响

如图 8C 所示, 当转速设置为 200 r/min 时, 发酵上清液中木聚糖酶活力较高, 达到 1 375.96 U/mL; 当转速为 170 r/min 和 230 r/min 时, 发酵上清液中木聚糖酶活力分别为 884.10 U/mL 和 1 277.64 U/mL。真菌培养过程中的转速会直接影响到菌株的生长及

活性物质的分泌, 转速过低, 发酵液中的溶氧降低, 不利于真菌的生长; 转速过高, 菌丝易发生断裂, 影响真菌的生长和产酶, 其中发酵液的溶氧对真菌的生长更加重要。因此, 将发酵转速定为 200 r/min。

#### 2.4.4 接种量对菌株产酶的影响

如图 8D 所示, 当接种量为 2% 时, 发酵上清液中木聚糖酶活力较高, 达到 1 489.33 U/mL; 当接种量低于或高于 2% 时, 均会影响菌株 XC70 的生长和产酶。在菌株的发酵培养过程中, 若接种量过低, 则菌株生长较慢, 不利于高效产酶; 若接种量过高, 则菌株短时间内大量增殖, 营养物的大量快速利用及代谢产物的大量分泌均会影响产酶。因此, 将接种量定为 2%。

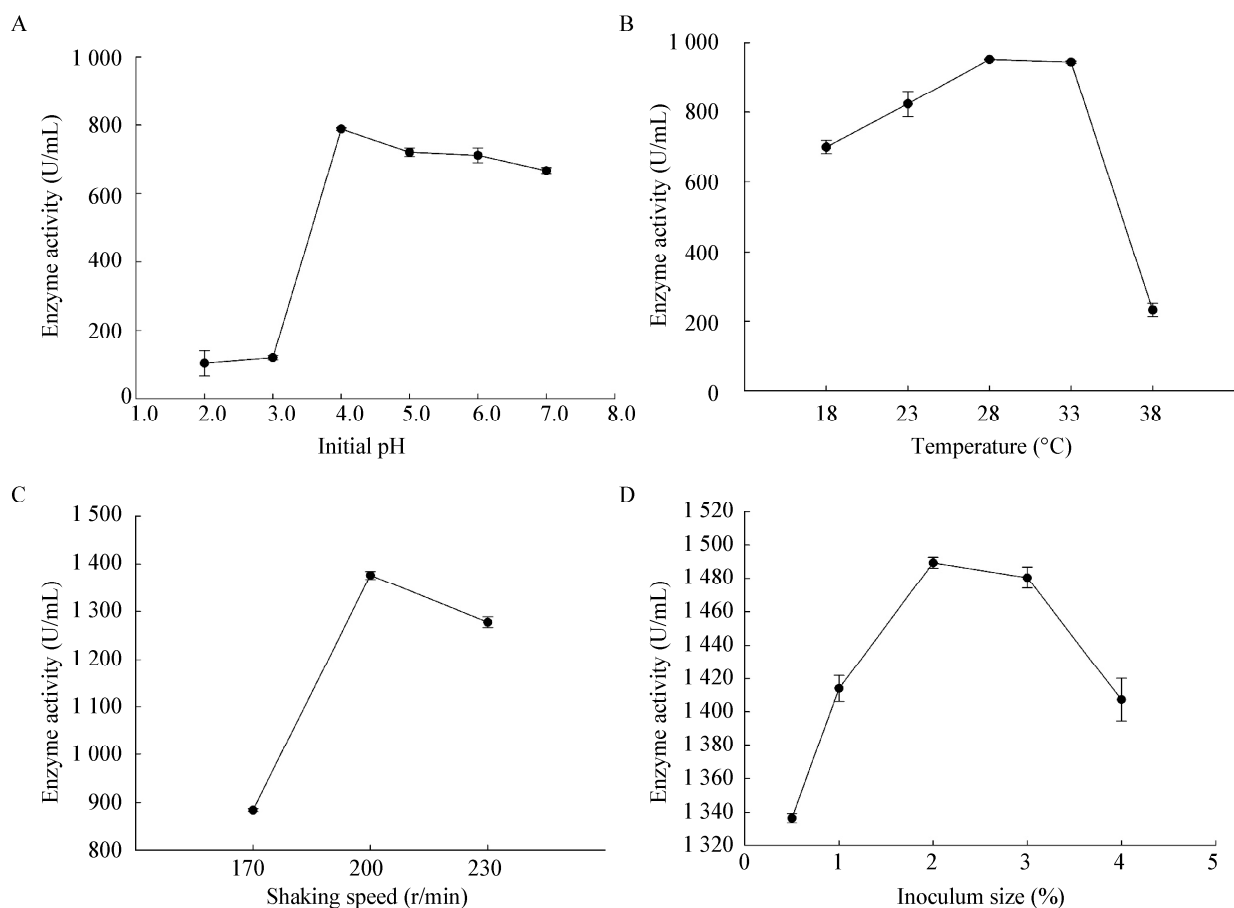


图 8 培养条件优化结果

Figure 8 The results of optimization of culture condition

注: A: 初始 pH; B: 温度; C: 转速; D: 接种量

Note: A: Initial pH; B: Temperature; C: Shaking speed; D: Inoculum size

### 3 讨论

#### 3.1 自然界中产酶菌株的筛选

青藏高原独特的气候和地理环境,造就了其生态系统包括土壤、河流水等环境中复杂多样的微生物资源,而高寒草甸常年的低温及植被覆盖使其土壤微生态环境中蕴藏着多种低温纤维分解菌。已有相关报道关于青藏高原土壤或河水中功能微生物筛选的研究,其中包括部分产纤维素酶蜡样芽孢杆菌<sup>[17]</sup>、产淀粉酶萎缩芽孢杆菌<sup>[18]</sup>及产漆酶真菌<sup>[19]</sup>等,也有关于青藏高原牦牛粪便中纤维分解菌和产酶功能菌的筛选和特性分析<sup>[20-21]</sup>,而这些研究仅仅获取了青藏高原特殊环境中的极少部分功能微生物资源。若要开发多纤维农林废弃物生产新型多元化饲料添加剂,则需要进一步从自然界中筛选产酶菌株。

本研究从青藏高原土壤中筛选到产木聚糖酶真菌,其所产木聚糖酶在酸性条件下稳定性较好,而且具有一定低温酶的特性。通常,最适反应温度低于 45 °C 属于低温酶<sup>[22]</sup>,它们主要来源于低温环境中的低温菌。有研究从青藏高原牦牛粪便中筛选到产低温木聚糖酶链霉菌,该酶的最适反应条件为 15 °C 和 pH 4.0,与本研究筛选获得的草酸青霉所产木聚糖酶的特性相似,都属于酸性木聚糖酶;但在已报道的研究中,也有较多极端环境微生物分泌碱性酶<sup>[23-24]</sup>。本研究中产酶真菌所产木聚糖酶的最适反应温度为 70 °C,虽然比其他低温环境中筛选到的产酶菌所产酶的最适反应温度高,但是该酶在 40–60 °C 之间能发挥 70%以上的酶活,在 20 °C 和 30 °C 分别能够发挥 50%和 60%以上的酶活。有报道从深海海底的低温海泥样品中筛选到产蛋白酶的铜绿假单胞菌,其所产蛋白酶的最适反应温度为 60 °C,而且在 20–50 °C 之间较稳定<sup>[25]</sup>,与本研究中草酸青霉所产木聚糖酶的特点相似,都是来源于低温环境的微生物分泌出最适反应温度偏高的酶,其原因可能有以下几点:(1) 该酶在菌株低温生长过程中并不分泌表达,相关的编码基因处于沉默状

态,当外界环境条件改变对该菌产生刺激时会激活相关基因编码,最终表达相应的蛋白质并分泌<sup>[26]</sup>;(2) 与适冷酶的催化机制相关,一般而言,适冷酶在低温具有高的催化效率,主要是由其特有氨基酸序列组成松散且具柔性的蛋白质结构所决定的,其使适冷酶具有反应温度低和对热敏感的特点<sup>[27]</sup>,推测本研究中木聚糖酶较高的反应温度可能与其氨基酸组成有关,而热稳定性差则与其结构松散相关。此现象说明微生物所产酶的资源非常丰富,分泌表达出的酶或其他活性物质只是一部分,还有很多活性蛋白没有被表达出来,可通过分析微生物的全基因组信息来挖掘酶和其他活性蛋白质资源<sup>[28]</sup>。

#### 3.2 菌株发酵条件的优化

功能微生物产活性物质的分泌量与发酵条件密切相关<sup>[29]</sup>。发酵条件的优化主要包括两部分:一是培养基组成的优化,包括培养基碳源、氮源和金属离子种类的选取以及浓度的确定;二是培养条件的优化,包括培养温度、初始 pH、摇床转速或发酵罐转速、接种量等。对菌株发酵条件进行适当优化能够提高酶的产量,优化方法主要有单因素法、正交试验法以及响应面法。单因素法较简便,但是无法考虑不同因素之间的交互作用,正交试验法和响应面法能够在有限的试验量条件下较全面地分析各因素之间的交互作用,因此,目前较多的是将单因素法和正交试验法或响应面法联合起来优化发酵条件。有学者研究了不同碳源添加剂对里氏木霉产木聚糖酶的影响,发现以甜菜碱作为碳源添加剂时酶活可高达 469 U/g 干重<sup>[30]</sup>;也有研究通过响应面法优化了芽孢杆菌产纤维素酶水平,纤维素酶活力从 0.14 IU/mL 提高到 0.37 IU/mL<sup>[31]</sup>。本研究中产酶菌的发酵条件经优化后,酶活得到了较大提升,与发酵前相比提高了 3 倍多。

#### 3.3 木聚糖酶在多纤维物质资源开发中的应用潜力

木聚糖普遍存在于木质纤维类物质中,阻碍纤

纤维素酶与纤维素的接触,是木质纤维类物质降解过程的限速障碍<sup>[32-33]</sup>,有效降解木聚糖能够促进木质纤维类物质的完全降解,因此,木聚糖酶是木质纤维类物质降解的关键酶之一,木聚糖酶的开发有助于多纤维农林废弃物资源的增值转化。木聚糖经木聚糖酶降解后能够生成低聚木糖,低聚木糖可作为益生元促进肠道益生菌的增殖,维护肠道微生态区系的平衡<sup>[34]</sup>,而产酶益生菌的增殖又能够促进木聚糖的降解,形成良性循环。因此,无论是在多纤维物质的开发利用还是动物胃肠道健康等方面,木聚糖酶都有非常大的应用潜力。有研究利用 *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 所产木聚糖酶降解预处理玉米芯生产低聚木糖,结果发现产物中的低聚木糖主要是木二糖、木四糖和木五糖,而且体外试验发现所产低聚木糖能够促进益生菌 *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 的生长<sup>[35]</sup>。由于低聚木糖在食品、饲料等行业中的巨大应用潜力,使用木聚糖酶水解低成本的农林食品等轻工业副产物(棉秸、玉米芯、麦秸、甘蔗渣和烟草茎等)来生产低聚木糖成为研究热点<sup>[36]</sup>。研究发现,木聚糖水解产物中的木糖量会影响低聚木糖的产量和纯度<sup>[37]</sup>,而现阶段的研究也较多地集中于开发新型且具有特色的木聚糖酶,用于高效开发低成本木质纤维类物质生产低聚木糖<sup>[36]</sup>。本研究筛选到的草酸青霉所产的酸性木聚糖酶较适合在单胃动物胃肠道的酸性环境中发挥作用,补充内源酶的不足,增进动物健康。

#### 4 结论

本研究从青藏高原高寒草甸土壤中筛选到一株产木聚糖酶菌株 XC70,经形态学和分子生物学方法将其鉴定为草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。菌株 XC70 所产木聚糖酶的最适反应条件为 pH 5.0 和 70 °C,具有一定耐酸性,并在低温条件下表现出一定活性,Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>对木聚糖酶活力具有显著促进作用,Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>对木聚糖酶活力具有显著抑制作用。菌株 XC70 在发酵 54 h

后,菌量和木聚糖酶活力达到最大值,经过单因素和正交试验优化,最优发酵条件为:蛋白胨 7 g/L,玉米秸粉 50 g/L, KCl 4 g/L,培养基初始 pH 4.0, 28 °C,摇床转速 200 r/min,接种量 2 %。在此发酵条件下,木聚糖酶活力可达到 1 489.33 U/mL,与优化前相比提高了 3 倍多。该产酶菌的筛选及其所产木聚糖酶的分析,为多纤维物质资源的开发以及新型饲料添加剂的研发奠定了基础。

#### REFERENCES

- [1] Walia A, Guleria S, Mehta P, Chauhan A, Parkash J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review[J]. 3 Biotech, 2017, 7(11): 1-12
- [2] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(3/4): 326-338
- [3] Bi YY, Gao CY, Wang HY, Wang P, Wang YJ. Research on the present situation and corresponding strategies of off-field straw collection and comprehensive utilization in China[J]. Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning, 2019, 40(9): 1-11 (in Chinese)  
毕于运, 高春雨, 王红彦, 王萍, 王亚静. 我国农作物秸秆离田多元化利用现状与策略[J]. 中国农业资源与区划, 2019, 40(9): 1-11
- [4] Shi Y, He P, Chen MB. Research on the development and utilization of fruit dregs[J]. Feed Industry, 2007, 28(1): 54-56 (in Chinese)  
石勇, 何平, 陈茂彬. 果渣的开发利用研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(1): 54-56
- [5] Lian ZN, Wang YE, Luo J, Lai CH, Yong Q, Yu SY. An integrated process to produce prebiotic xylooligosaccharides by autohydrolysis, nanofiltration and endo-xylanase from alkali-extracted xylan[J]. Bioresource Technology, 2020, 314: 123685
- [6] Sepulchro AGV, Pellegrini VOA, Briganti L, De Araujo EA, De Araujo SS, Polikarpov I. Transformation of xylan into value-added biocommodities using *Thermobacillus composti* GH10 xylanase[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 247: 116714
- [7] Singh D, Thakur S, Thayil SM, Kesavan AK. Characterization of a cold-active, detergent-stable metalloproteinase purified from *Bacillus* sp. S1DI 10 using response surface methodology[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216990
- [8] Liu YX, Cao PX, Ma HM, Liu X. Research progress on soil microbial diversity and its influencing factors in



- Qinghai-Tibet Plateau[J]. Environmental Ecology, 2019, 1(6): 1-7 (in Chinese)
- 刘怡萱, 曹鹏熙, 马红梅, 刘星. 青藏高原土壤微生物多样性及其影响因素研究进展[J]. 环境生态学, 2019, 1(6): 1-7
- [9] Wang BL, French HM. Permafrost on the Tibet plateau, China[J]. Quaternary Science Reviews, 1995, 14(3): 255-274
- [10] Zhao LM. Research progress on soil microbial diversity in Qinghai-Tibet Plateau[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(14): 6-12 (in Chinese)
- 赵龙妹. 青藏高原土壤微生物多样性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 6-12
- [11] Tang T, Mao T, Guo J, Wang FF, Fang GB, Lin XM, Kuang H, Sun GZ, Duan YY, Guo XL, et al. Effects of biocontrol strain BZJN1 and streptopropen on physicochemical properties and bacteria structure of rhizosphere soil of *Atractylodes macrocephala*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(14): 3414-3421 (in Chinese)
- 唐涛, 毛婷, 郭杰, 王帆帆, 方国斌, 林先明, 匡辉, 孙光忠, 段媛媛, 郭晓亮, 等. 生防菌 BZJN1 和苯甲·丙环唑对白术根际土壤细菌群落组成及理化特性的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3414-3421
- [12] Lin L, Qin N, Chen MM, Shi R, Feng L, Huang DT, Yang Q. A survey of cellulolytic bacteria in Qinghai-Tibet Plateau: isolation, identification and characterization[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2020, 29(2): 1995-2000
- [13] Xie ZL, Gao HY, Zhang Q, Wang H, Liu Y. Cloning of a novel xylanase gene from a newly isolated *Fusarium* sp. Q7-31 and its expression in *Escherichia coli*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(1): 405-417
- [14] Zhao LM, Dai D, Zhang L, Zhang TY, Qin YN. Screening and identification of a xylanase-producing bacterium from yak[J]. Chinese Journal of Microecology, 2019, 31(4): 389-395 (in Chinese)
- 赵龙妹, 代地, 张兰, 张腾月, 秦亚宁. 牦牛源木聚糖酶产生菌的筛选和鉴定[J]. 中国微生物生态学杂志, 2019, 31(4): 389-395
- [15] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [16] GB/T 23874-2009. National standard of the People's Republic of China for Determination of xylanase activity in feed additives-Spectrophotometric method[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese)
- GB/T 23874-2009. 中华人民共和国国家标准饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- [17] He T, Li N, Huang XF, Yang ZR, Zhang J. Initial studies on isolation and identification of cellulase-producing strain from Qinghai-Tibetan Plateau alpine wetland and enzymatic production[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(4): 112-117 (in Chinese)
- 何特, 李妮, 黄小菲, 杨志荣, 张杰. 青藏高原高寒湿地产纤维素酶菌株的分离、鉴定和产酶的初步研究[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(4): 112-117
- [18] Quan SJ, Ma H, Liu DH, Xie FH. The isolation and identification of amylase-producing strains from Qinghai-Tibetan Plateau and its amylase characteristics[J]. Henan Science, 2015, 33(3): 384-388 (in Chinese)
- 权淑静, 马焕, 刘德海, 解复红. 青藏高原土壤产淀粉酶菌株的分离、鉴定及产酶特性研究[J]. 河南科学, 2015, 33(3): 384-388
- [19] Li X. Study on screening and biological function of producing laccase fungus in alpine meadow[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2019 (in Chinese)
- 李欣. 高寒草地土壤产漆酶真菌筛选及其生物功能的研究[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2019
- [20] Mao T, Wei YQ, Yang HJ, Niu YY, Chen J, Wang ZY. Screening of cellulolytic bacterium from yak faeces and the optimization of cellulase production conditions[J]. Journal of China Agricultural University, 2019, 24(11): 106-116 (in Chinese)
- 毛婷, 魏亚琴, 杨红建, 牛永艳, 陈娟, 王治业. 牦牛粪便中纤维素降解菌的筛选及产酶优化[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(11): 106-116
- [21] Leng Y. Diversity and potential applications of the yak dung-degrading microbes in the Qinghai-Tibet Plateau[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiaotong University, 2014 (in Chinese)
- 冷艳. 青藏高原牦牛粪降解微生物多样性及其应用研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2014
- [22] Park JW, Oh YS, Lim JY, Roh DH. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing beta-galactosidase[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2006, 44(4): 396-402
- [23] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(4): 735-750
- [24] Zhang GS, Ma XJ, Niu FJ, Dong MX, Feng HY, An LZ, Cheng GD. Diversity and distribution of alkaliphilic psychrotolerant bacteria in the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region[J]. Extremophiles, 2007, 11(3): 415-424
- [25] Shu H. Enzymatic characterization of deep-sea strain *Pseudomonas aeruginosa* and hydrolysis application of elastase[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2016 (in Chinese)
- 舒会. 深海铜绿假单胞菌的产酶特性及弹性蛋白酶应用

- 研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2016
- [26] Yang KM, Gao XD, Gu JF. Research progress of activating silencing gene clusters to explore microbial secondary metabolites[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2015, 10(1): 77-80 (in Chinese)  
杨康敏, 高向东, 顾觉奋. 激活沉默基因簇发掘微生物次级代谢产物的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2015, 10(1): 77-80
- [27] Papaleo E, Tiberti M, Invernizzi G, Pasi M, Ranzani V. Molecular determinants of enzyme cold adaptation: comparative structural and computational studies of cold- and warm-adapted enzymes[J]. Current Protein & Peptide Science, 2011, 12(7): 657-683
- [28] Han CZ, Zhu YP, Xu X. Prediction for CAZymes from *Trichoderma reesei* QM6a genome[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2018, 31(4): 705-710 (in Chinese)  
韩长志, 祝友朋, 许僖. 全基因组预测里氏木霉 QM6a 的碳水化合物活性酶类蛋白[J]. 西南农业学报, 2018, 31(4): 705-710
- [29] Özer CO, Kılıç B. Optimization of pH, time, temperature, variety and concentration of the added fatty acid and the initial count of added lactic acid bacteria strains to improve microbial conjugated linoleic acid production in fermented ground beef[J]. Meat Science, 2021, 171: 108303
- [30] Taherzadeh-Ghahfarokhi M, Panahi R, Mokhtarani B. Optimizing the combination of conventional carbonaceous additives of culture media to produce lignocellulose-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* in solid state fermentation of agricultural residues[J]. Renewable Energy, 2019, 131: 946-955
- [31] Padilha IQM, Carvalho LCT, Dias PVS, Grisi TCSL, Silva FLHD, Santos SFM, Araújo DAM. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2015, 32(1): 35-42
- [32] Hu JG, Arantes V, Saddler JN. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(36): 1-14
- [33] Penttilä PA, Imai T, Hemming J, Willför S, Sugiyama J. Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose-hemicellulose composites[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 190: 95-102
- [34] Figueroa-González I, Quijano G, Ramírez G, Cruz-Guerrero A. Probiotics and prebiotics: perspectives and challenges[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(8): 1341-1348
- [35] Boonchuay P, Takenaka S, Kuntiya A, Techapun C, Leksawasdi N, Seesuriyachan P, Chaiyaso T. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 129: 61-68
- [36] Mano MCR, Neri-Numa IA, Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 17-37
- [37] Reddy SS, Krishnan C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 65: 237-245