

# 重组海栖热袍菌极耐热甘露聚糖酶的纯化和性质研究

张 敏 江正强\* 李里特

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

**摘 要:** 研究了海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) MSB8 甘露聚糖酶基因 (TM\_1227)的克隆、重组酶的纯化和性质。该基因全序列 2010 bp, 编码 669 个氨基酸, 分子量为 76.827 kD。根据氨基酸同源性分析, 该  $\beta$ -甘露聚糖酶与 *Thermotoga* sp. RQ2 来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶(GenBank 登录号 ACB09927.1)同源性最高, 为 99%。重组转化子经 IPTG 诱导酶比活可达 39.7 U/mg 蛋白。粗酶液经金属亲和层析, 得到电泳纯甘露聚糖酶。以槐豆胶为底物时, 该酶的最适反应温度和 pH 分别为 95°C 和 pH 8.0, 85°C 处理 30 min 酶活保存 50% 以上, 很有潜力用于高温、偏碱性的造纸工业。对椰子甘露聚糖和槐豆胶的主要水解产物是不同聚合度的甘露寡糖, 几乎没有单糖生成, 适合生产低聚甘露糖。

**关键词:** 海栖热袍菌, 甘露聚糖酶, 表达, 高温酶

## Purification and Characterization of a Recombinant Thermostable $\beta$ -mannanase from *Thermotoga maritima*

ZHANG Min JIANG Zheng-Qiang\* LI Li-Te

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

**Abstract:** A  $\beta$ -mannanase gene (TM\_1227) from *Thermotoga maritima* MSB8 was cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant  $\beta$ -mannanase was purified and characterized. The gene consists of 2010 bp, and the translated protein encodes 669 amino acids and its molecular mass is approximately 76.827 kD. Homology analysis of the deduced amino acid sequences showed that the enzyme shared 99% identity with  $\beta$ -mannanase from *Thermotoga* sp. RQ2. The mannanase activity was up to 39.7 U/mg after the recombinant *E. coli* BL21 was induced by IPTG. Crude enzyme solution was purified to homogeneity by Ni-NTA agarose. Its optimum temperature and pH was 95°C and pH 8.0 respectively for LBG. The enzyme remained over 50% activity after treated at 85°C for 30 min. The above properties showed great potential of its application in paper industry. The mannanase hydrolyzed copra mannan and LBG to give various sizes of oligosaccharides, and almost no mannose was detected by TLC, which was suitable for mannooligosaccharides production.

**Keywords:** *Thermotoga maritima*,  $\beta$ -mannanase, Expression, Thermostable enzyme

半纤维素是自然界中继纤维素之后存在量最多的杂聚物生物资源。根据糖链组成,半纤维素可分为木聚糖、甘露聚糖、阿拉伯半乳聚糖或阿拉伯聚糖。其中最具代表性和重要性的两种半纤维素是木聚糖和甘露聚糖。 $\beta$ -1,4-内切甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)随机切断半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳葡萄甘露聚糖或纯甘露聚糖主链。甘露聚糖酶的产生菌种类繁多,已报道的能产甘露聚糖酶的微生物有细菌、真菌等,其中一些细菌<sup>[1]</sup>、真菌<sup>[2]</sup>的甘露聚糖酶基因已克隆、表达并进行了酶的纯化和性质分析,且这些甘露聚糖酶的性质存在差异。

甘露聚糖酶有广泛的工业应用价值。它可以用于生产甘露低聚糖,用作非营养型食品添加剂;甘露聚糖酶对果汁的提取和液化均有积极的作用;在咖啡豆的榨取中,甘露聚糖酶可以降低粘度,增加咖啡的香气、口感和外观<sup>[3]</sup>;而甘露聚糖酶最主要的应用前景是在造纸工业中,可以增加木质素的去除率,减少化学试剂的使用,降低对环境的污染。尽管如此,甘露聚糖酶的应用仍被低生产率及高生产成本、酶耐热性差所限制。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)最适生长温度 80°C,1999 年 Nelson 等人完成了其基因组序列测定<sup>[4]</sup>。该菌的开放阅读框 TM\_1227 在 GenBank 中根据同源性的预测会产生  $\beta$ -甘露糖苷酶。Chhabra 等人将该基因导入大肠杆菌发现有  $\beta$ -甘露聚糖酶活性<sup>[5]</sup>,但没有系统研究该酶的性质;本文主要研究了该重组酶的纯化和性质,为其工业应用提供有价值的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

槐豆胶、瓜儿豆胶、桦木木聚糖、羧甲基纤维素钠(Sigma);魔芋粉(葡萄甘露聚糖占 90%, W/W)(四川大州吴风集团);干椰粉(海南椰风集团);Ni-NTA agarose(Qiagen);其他试剂同文献[6]。

### 1.2 菌株及其培养和基因组 DNA 的提取方法同文献[6]。

### 1.3 甘露聚糖酶基因克隆

根据海栖热袍菌 MSB8 的 TM\_1227 基因序列和表达载体 pET-28a(+)的多克隆位点设计正向引物 P1: 5'-CCATGGGTAGATTTATGTTTCATTTT-3' (下划线处为 *Nco* 酶切位点);反向引物 P2: 5'-AAGCTTCATACCTCCTGTTCTTTTAT-3' (下划线处为 *Hind*

酶切位点)。以基因组 DNA 为模板,PCR 条件为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环后 72°C 延伸 10 min。其余方法同文献[6]。

### 1.4 重组蛋白的诱导表达<sup>[6]</sup>

磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)悬浮细胞。

### 1.5 酶活和蛋白浓度的测定及 SDS-PAGE

$\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定参照 DNS 法<sup>[7]</sup>: 在 0.9 mL 0.5%(W/V)槐豆胶(50 mmol/L pH 8.0 MOPS),加入适当稀释的酶液 0.1 mL, 70°C 反应 10 min, 用 DNS 试剂测定产生的还原糖量,同时以 D-甘露糖作标准。酶活力单位(U)定义为:上述反应条件下,每分钟产生 1  $\mu$ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

蛋白含量的测定采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白绘制标准曲线。

SDS-PAGE 按照标准方法进行。分离胶 10%,浓缩胶 4.5%,考马斯亮蓝染色显示蛋白带,低分子量标准蛋白与样品在同一条件下电泳。

### 1.6 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的纯化

10 mL 粗酶液过 0.22  $\mu$ m 滤膜,然后以 0.1 mL/min 的速度过用缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0 磷酸缓冲液, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)平衡好的 Ni-NTA agarose (1 cm $\times$ 5 cm),上样后封柱 1 h;用相同缓冲液以 1.0 mL/min 的流速洗去未吸附的蛋白及其他杂质,然后用 60 mmol/L 咪唑洗至基线,再用 60 mmol/L~200 mmol/L 的咪唑梯度洗脱,收集目标蛋白,待洗脱峰趋于平缓后用 0.5 mol/L 咪唑溶液洗脱吸附的杂质,最后用缓冲液平衡柱料。

### 1.7 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质

最适反应 pH 在 70°C 不同缓冲体系中测定。选择的 pH 范围及体系如下(50 mmol/L): (Citrate 2.5~6.5; Acetate 4~5.5; MES 5~7; Phosphate 6~8; MOPS 6~8.5; Tris-HCl 7~9; CHES 8~11; CAPS 9~11),通过比较这些缓冲体系下纯酶活力差异,得出酶反应的最适 pH;用上述不同缓冲体系将纯酶稀释到适当倍数,70°C 保温 30 min,冰水浴冷却 30 min 后测定在最适 pH 条件下的残余酶活力,得出酶的 pH 稳定性。通过测定最适 pH 条件下 30°C~100°C 的酶活得到酶的最适反应温度;纯酶用最适 pH 体系适当稀释后在各温度保温 30 min,冰水浴冷却 30 min 后分析残余酶活力,以确定酶的温度稳定性。各种化学试剂对酶活力的影响:将溶于 50 mmol/L pH 8.0

MOPS 缓冲液的 1 mmol/L 各种化学试剂与纯酶在 70°C 保温 30 min, 测定分析残余酶活力。

### 1.8 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的底物特异性

用不同来源的甘露聚糖和其他一些常用的聚糖及人工合成的底物作为测定酶活的底物进行分析。聚糖底物浓度为 0.5%, 与纯酶在 50 mmol/L pH 8.0 的 MOPS 缓冲体系中 70°C 条件下反应 10 min, 酶作用释放的还原糖量通过 DNS 方法测定。人工底物的浓度为 5 mmol/L。

### 1.9 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的水解特性

水解条件参照 Jiang 等的方法<sup>[8]</sup>并稍加改动, 用 50 mmol/L pH 8.0 MOPS 缓冲液, 水解温度 70°C。TLC 条件: 硅胶板(60F 254, E.Merk, 德国)在 2:1:1 的正丁醇-乙酸-水系统中展层 2 次, 在其表面均匀喷洒 5%硫酸甲醇溶液, 吹干在 130°C 显色。标准为甘露寡糖混合物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的克隆和表达

利用引物 P1 和 P2 扩增到与 TM\_1227 大小大约一致的 2 kb 片段(图略)。对构建的测序用重组转化子, *Nco* 和 *Hind* 酶切, 目的基因(2010 bp)已连接到 pMD 18-T 载体(2692 bp)(图 1)。

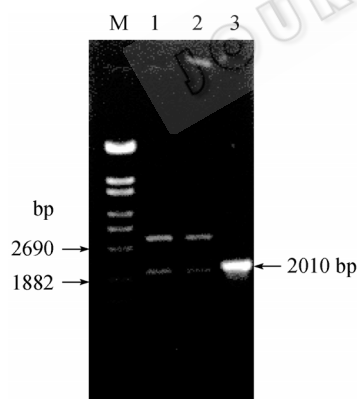


图 1 重组质粒酶切电泳图

Fig. 1 The recombinant plasmids digested with *Nco*I and *Hind*III

M: -EcoT 14I digest Marker; 1,2: 重组质粒 *Nco*I, *Hind*III 双酶切; 3: PCR 产物

M: -EcoT 14I digest Marker; 1,2: Recombinant plasmids digested with *Nco*I and *Hind*III; 3: PCR products

在NCBI数据库进行基因同源性分析, 该甘露聚糖酶基因与Parker等登录的海栖热袍菌的 $\beta$ -甘露糖

苷酶基因(GenBank登录号Y17980.1)的同源性是 99%, 也就是说Parker等人认为这是一段甘露糖苷酶序列。与*Thermotoga* sp. RQ2 的一个碳水化合物结合模型 27、*Thermotoga petrophila* RKU-1 和 *Thermotoga neapolitana*的甘露聚糖酶基因(GenBank 登录号分别是CP000969.1 的TRQ2\_1591 片段、CP000702.1 的Tpet\_1542 片段、AY033477.1)同源性为 99%、94%、81%, 这与 3 株菌均是栖热袍菌属有很大关系; 其次与*Bacillus licheniformis* ATCC 14580 的一个属于第 5 族的序列(GenBank登录号CP000002.3 的BL01229 基因片段)的同源性是 67%; 与*Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -1,4-甘露聚糖酶(GenBank登录号AF038547.2)的同源性是 66%。

将  $\beta$ -甘露聚糖酶基因连接于 pET-28a(+)的 *Nco*I 和 *Hind* 位点并转化大肠杆菌 BL21 表达, 选取经菌落PCR和酶切检测的阳性转化子, 经诱导培养后, 检测酶活为 30.5 U/mL 发酵液, 酶比活 39.7 U/mg 蛋白。

从电泳图判断(图 2), 重组菌在 77 kD 附近蛋白带明显增多, 进一步确认该  $\beta$ -甘露聚糖酶基因已在大肠杆菌中表达。将该基因翻译成蛋白质, 根据氨基酸同源性分析, 该甘露聚糖酶属于 5 族, 除与 *Thermotoga* sp. RQ2、*Thermotoga petrophila* RKU-1

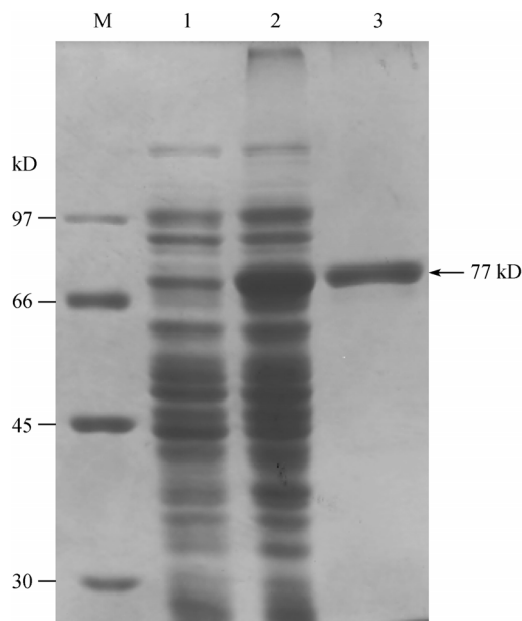


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of the recombinant  $\beta$ -mannanase

M: 低分子量标准蛋白; 1: BL21-pET28(+)对照; 2: 粗酶; 3: 纯酶

M: Low molecular weight standard; 1: BL21-pET28(+) control;

2: Crude lysate; 3: Pure enzyme

和 *Thermotoga neapolitana* 来源的甘露聚糖酶 (GenBank 登录号分别是 ACB09927.1、ABQ47550.1 和 AAK53459.1) 的同源性分别是 99%、95% 和 84%，与 GenBank 中登录的其他来源的甘露聚糖酶的同源性小于 54%。

2.2 重组β-甘露聚糖酶的纯化

粗酶液经一步金属亲和层析，得到电泳纯 β-甘露聚糖酶(图 2)。纯化过程中目标蛋白的回收率及纯化倍数如表 1 所示，酶活力回收率为 16.6%，酶比活由 39.7 U/mg 提高到了 243.9 U/mg，纯化倍数为 6.1。

2.3 重组β-甘露聚糖酶的酶学性质

pH 对酶活力的影响见图 3A，该酶的最适 pH 值

为 pH 8.0，当 pH 处于 7~10 之间时，该酶均有较高的相对酶活。pH 稳定性的结果如图 3B，当 pH 在 4.5~10 之间时，酶液在 70℃ 下是比较稳定的，处理 30 min 后酶活力能保存在 70% 以上，说明该酶在较宽的 pH 范围具有很好的温度稳定性，而且碱的耐受性较好。

温度对酶活力的影响如图 4A，酶的最适反应温度为 95℃，100℃ 时的酶活力相当于最高值的 89%，温度降低时，酶活力下降较快，90℃ 时的酶活力下降了 34%，85℃ 的酶活力是 57%，说明该酶属于高温酶。温度稳定性的结果如图 4B，酶液在低于 70℃ 时稳定，处理 30 min 后几乎没有酶活力损失，

表 1 重组 β-甘露聚糖酶纯化表					
Table 1 Summary of the recombinant β-mannanase purification					
纯化步骤 Steps	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (U)	比活 Specific activity (U/mg)	回收率 Yield (%)	纯化倍数 Purification (fold)
粗酶 Crude lysate	1227.6	48722.9	39.7	100	1
Ni 亲和柱 Ni-NTA	33.2	8098.8	243.9	16.6	6.1

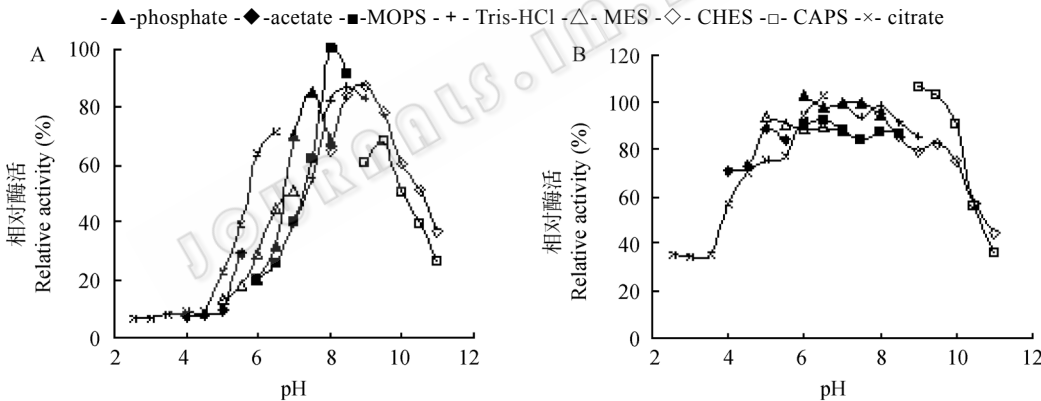


图 3 重组 β-甘露聚糖酶的最适 pH(A)和 pH 稳定性(B)  
Fig. 3 Effect of pH on the recombinant β-mannanase activity (A) and stability (B)

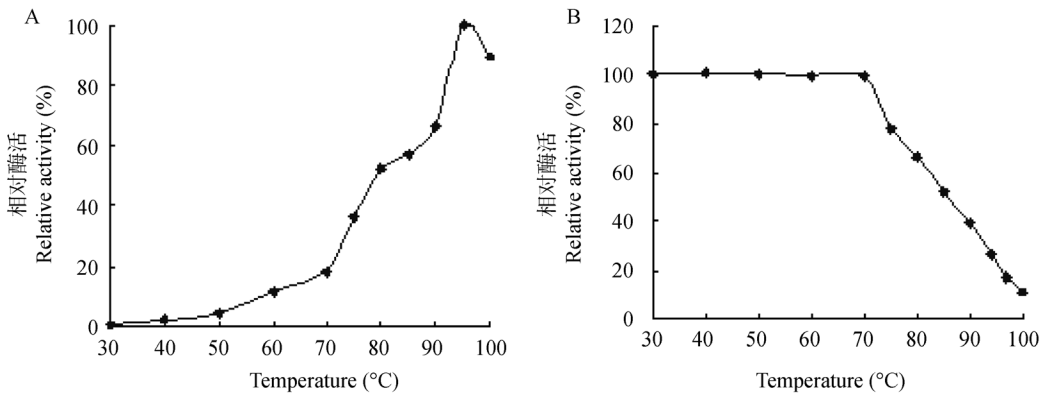


图 4 重组 β-甘露聚糖酶的最适温度(A)和温度稳定性(B)  
Fig. 4 Effect of temperature on the recombinant β-mannanase activity (A) and stability (B)

85°C 处理后酶活力保存 50% 以上, 说明该酶具有较好的温度稳定性。

不同菌所产甘露聚糖酶的性质不同, 比如来源于 *Thermotoga neapolitana* 5068 的甘露聚糖酶的最适 pH 是 6.9<sup>[9]</sup>, 比本研究甘露聚糖酶的最适 pH 稍低, 而 *Streptomyces ipomoea* 所产甘露聚糖酶的最适 pH 7.5<sup>[10]</sup>; 尽管一些温度较高的甘露聚糖酶已被研究<sup>[9,11-13]</sup>, 比如来源于 *Thermotoga neapolitana* 5068 的甘露聚糖酶的最适温度 90°C~92°C<sup>[9]</sup>, 但该酶是目前报道的最耐热的甘露聚糖酶之一。该甘露聚糖酶的耐热性和宽的 pH 稳定范围是其突出的优点, 很适用于造纸工业中的纸浆处理。

在酶学性质方面, 与 Chhabra 等人的研究<sup>[5]</sup>比, 本文还研究了一些金属离子和化合物对酶活的影响, 其中 SDS、WRK 和 Li<sup>+</sup>对酶的正向影响最强, 分别能使酶活升高 68.6%、50.9%和 49.1%, 此外, Co<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、EDTA 和 NBS 也能够明显提高甘露聚糖酶的活力, 分别提高了 33.5%、22.4%、19.4%、11.1%、10.4%、22.1%和 19.7%; Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和 Hg<sup>2+</sup>能够显著抑制  $\beta$ -甘露聚糖酶的酶活力, 使其酶活力分别降低到 16.7%、28.1%、37.8%、43.1%、56.7%和 66.6%; 而 Sr<sup>2+</sup>、DTT、巯基乙醇等对酶活力的影响较小, 变化在 5% 以内。

在金属离子的影响方面, 不同甘露聚糖酶对同种金属离子的敏感程度不尽相同。如枯草芽孢杆菌 WY34 的甘露聚糖酶可被 Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>及 Ag<sup>+</sup>强烈抑制, 使酶活低于 50%<sup>[8]</sup>; 而 5H 的被 Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>强烈抑制, 其他金属离子则对其酶活性无甚影响<sup>[14]</sup>。1 mmol/L 和 5 mmol/L 的 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>会抑制 *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 的甘露聚糖酶活性<sup>[13]</sup>, 而多种金属离子(Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>)和 EDTA 基本不影响或稍微提高 *Aspergillus sulphureus* 甘露聚糖酶的活性<sup>[2]</sup>。

#### 2.4 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的底物特异性

纯酶对各种底物的相对活力见表 2。该酶对不同底物都表现出一定水解能力, 以槐豆胶为对照 (100%), 魔芋粉是 118.3%, 而对椰子甘露聚糖的相对酶活力也有近 80%, 同时对瓜儿豆胶、脱脂椰粉的相对酶活力分别是 57.9%和 57%, 但是该酶对非甘露聚糖底物如微晶纤维素、淀粉、CMC、梓木木聚糖没有活力, 表明该酶作用的底物结构要求有甘

露聚糖链。而且对人工底物 *p*NP- $\beta$ -Galactopyranoside、*o*NP- $\beta$ -Galactopyranoside、*p*NP- $\beta$ -Mannopyranoside、*p*NP- $\beta$ -Fucopyranoside 也没有活力, 进一步表明该酶的专一性。

表 2 重组  $\beta$ -甘露聚糖酶的底物特异性  
Table 2 Substrate specificity of the recombinant  $\beta$ -mannanase

底物 Substrate	比活 Specific activity(U/mg)	相对酶活 Relative activity (%) <sup>a</sup>
槐豆胶 Locust bean gum	243.9	100.0
魔芋粉 Konjac powder	288.4	118.3
瓜儿豆胶 Guar	141.3	57.9
椰子甘露聚糖 Copra mannan	188.9	77.4
脱脂椰粉 De-fatted copra powder	139.1	57.0

注: 以对槐豆胶的酶活为 100%

Note: The activity for locust bean gum was defined as 100%

#### 2.5 重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的水解特性

为给低聚甘露糖的生产提供有价值的参考数据, 本文首次研究了该酶的水解特性。该甘露聚糖酶对椰子甘露聚糖的水解产物主要是甘露四糖、甘露三糖和甘露二糖, 而对槐豆胶则产生了一系列不同聚合度的甘露寡糖(图 5), 说明该酶为内切甘露聚糖酶。本文还研究了该酶对甘露寡糖的作用模式, 如图 6 所示, 该酶几乎不能水解甘露三糖及甘露二糖, 但能缓慢的水解甘露四糖, 水解甘露五糖主要产生甘露四糖、甘露三糖和甘露二糖。

多数甘露聚糖酶水解甘露聚糖的产物以甘露三糖及甘露二糖为主, 但也有少数甘露聚糖酶水解甘露聚糖可以得到甘露单糖, 比如枯草芽孢杆菌 5H 产的甘露聚糖酶水解槐豆胶可得到甘露单糖<sup>[14]</sup>。因此, 甘露聚糖酶可用于生产甘露低聚糖, 后者可作为促进人类肠道益生菌生长的功能性食品添加剂。对于大部分甘露聚糖酶而言, 在水解反应中要求底物是聚合度至少为 4 的甘露寡糖才能观察到明显的水解率<sup>[15]</sup>。在本研究中, 该酶对甘露三糖完全没有水解作用, 仅能缓慢水解甘露四糖, 可以几乎将甘露五糖完全水解成甘露四糖、甘露三糖和甘露二糖。此现象可由转糖基机理解释。

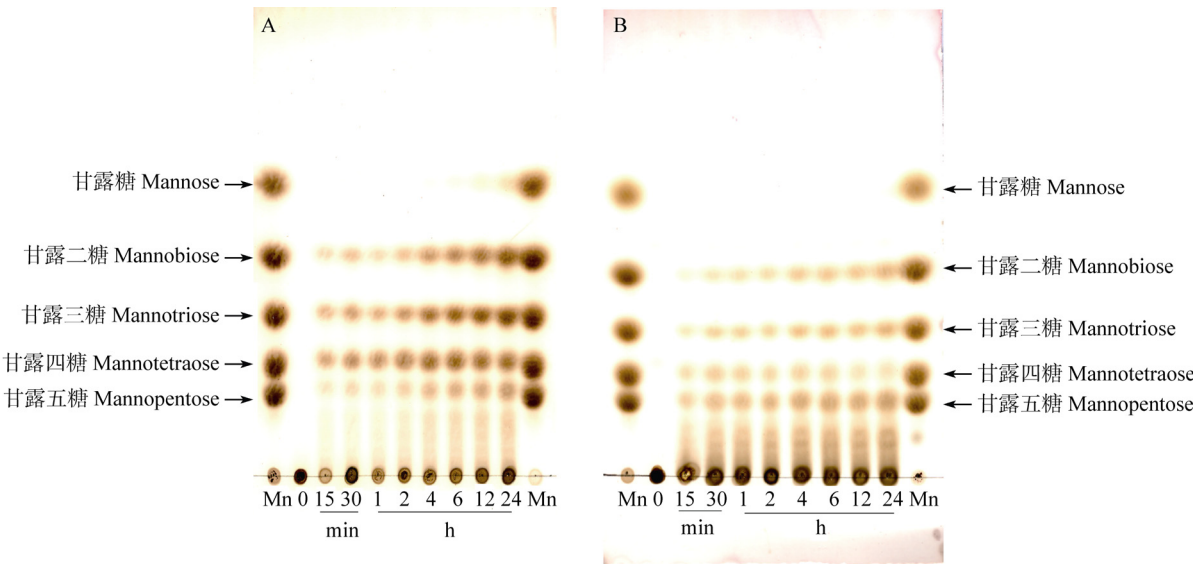


图 5 重组  $\beta$ -甘露聚糖酶水解椰子甘露聚糖和槐豆胶的产物薄层层析图  
Fig. 5 Thin-layer chromatography of hydrolyzate of copra mannan (A) and locust bean gum (B) by the recombinant  $\beta$ -mannanase

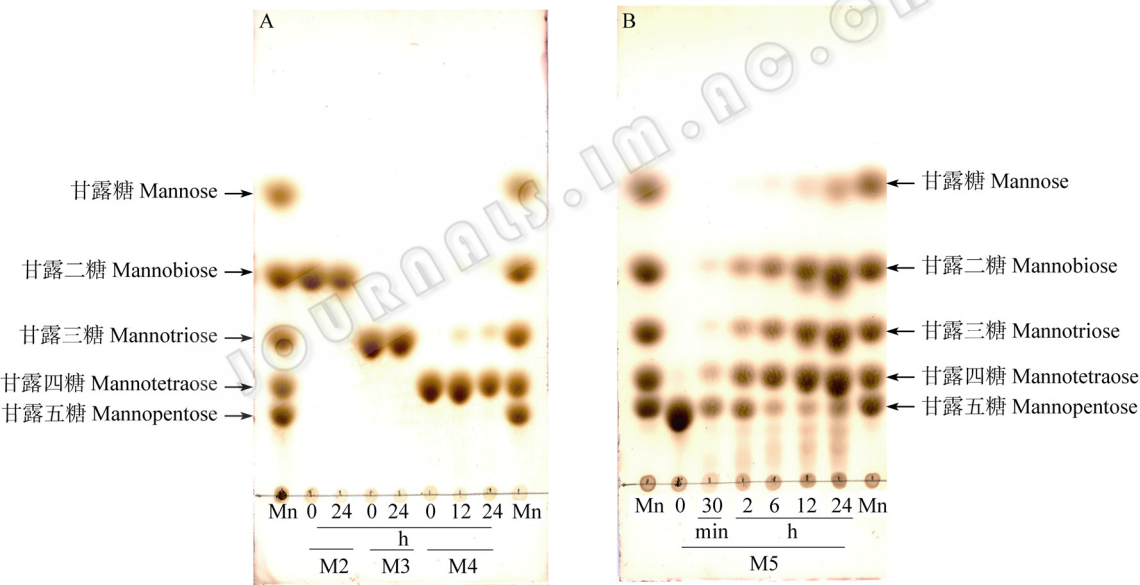


图 6 重组  $\beta$ -甘露聚糖酶水解甘露寡糖的产物薄层层析图

Fig. 6 Thin-layer chromatography of hydrolyzate of mannooligosaccharides (A and B) by the recombinant  $\beta$ -mannanase  
注：M2、M3、M4、M5 分别为甘露二糖、三糖、四糖和五糖  
Note: M2, M3, M4, M5 indicates mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentose, respectively

3 结论

本文将海栖热袍菌的属于 5 族的  $\beta$ -甘露聚糖酶基因(TM\_1227)成功在大肠杆菌中高效表达。纯酶的性质研究发现, 该酶的最适温度 95℃、最适 pH 8.0, 对于需要在高温和碱性环境进行的一些工业应用, 比如食品、造纸, 该酶是有很大潜力的; 某些金属离

子和化合物还能使该酶的活性增加; 该酶专一作用于甘露聚糖的主链, 对椰子、槐豆胶水解产生不同聚合度的甘露寡糖。

参 考 文 献

[1] Sunna A, Gibbs MD, Chin CWJ, *et al.* A gene encoding a novel multidomain  $\beta$ -1,4-mannanase from *Caldibacillus*

- cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 664–670.
- [2] Chen XL, Cao YH, Ding YH, *et al.* Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus*  $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2007, **128**: 452–461.
- [3] Nunes FM, Coimbra MA. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. *Carbohydrate Polymers*, 1998, **37**: 283–285.
- [4] Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, *et al.* Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 1999, **399**: 323–329.
- [5] Chhabra SR, Shockley KR, Ward DE, *et al.* Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 545–554.
- [6] 张 敏, 江正强, 唐 萃, 等. 海栖热袍菌耐高温  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2008, **35**(4): 1–5.
- [7] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 1959, **31**: 426–428.
- [8] Jiang ZQ, Wei Y, Li DY, *et al.* High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*, 2006, **66**: 88–96.
- [9] Duffaud GD, McCutchen CM, Leduc P, *et al.* Purification and characterization of extremely thermostable  $\beta$ -mannanase,  $\beta$ -mannosidase, and  $\alpha$ -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 169–177.
- [10] Montiel MD, Hernández M, Rodríguez J, *et al.* Evaluation of an endo- $\beta$ -mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **58**: 67–72.
- [11] Lüthi E, Jasmat NB, Grayling RA, *et al.* Cloning, sequencing analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a  $\beta$ -mannanase from the extremely thermophilic bacterium “*Caldocellum saccharolyticum*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(3): 694–700.
- [12] Ethier N, Talbot G, Sygusch J. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable  $\beta$ -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(11): 4428–4432.
- [13] Gibbs MD, Reeves RA, Sunna A, *et al.* Sequencing and expression of a  $\beta$ -mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, and characteristics of the recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 1999, **39**: 351–357.
- [14] Khanongnuch C, Asada K, Tsuruga H, *et al.*  $\beta$ -mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, **86**: 461–466.
- [15] Sachslehner A, Haltrich D. Purification and some properties of a thermostable acidic endo- $\beta$ -1,4-D-mannanase from *Sclerotium(Athelia) rolfsii*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **177**: 47–55.

稿件书写规范

## 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写  $X$ , 也不用  $Mean$ 。标准差用英文小写  $s$ , 不用  $SD$ 。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用  $SE$ 。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。