



鲤源产 β -甘露聚糖酶 *Bacillus velezensis* HF-14109 的分离鉴定及其酶学和生物学特性研究

张建新, 陈永艳, 和子涵, 武婧玉, 李梦, 黄梦媛, 孟晓林, 常绪路, 冯军厂*

河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007

张建新, 陈永艳, 和子涵, 武婧玉, 李梦, 黄梦媛, 孟晓林, 常绪路, 冯军厂. 鲤源产 β -甘露聚糖酶 *Bacillus velezensis* HF-14109 的分离鉴定及其酶学和生物学特性研究. 微生物学报, 2022, 62(8): 3062–3078.

Zhang Jianxin, Chen Yongyan, He Zihan, Wu Jingyu, Li Meng, Huang Mengyuan, Meng Xiaolin, Chang Xulu, Feng Junchang. Isolation and identification of β -mannanase-producing *Bacillus velezensis* HF-14109 from common carp (*Cyprinus carpio* L.) and analysis of the enzymatic characteristics of the enzyme and biological characteristics of the strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3062–3078.

摘要: 【目的】以黄河鲤为材料, 从其肠道内分离具有产 β -甘露聚糖酶功能的益生菌。【方法】采用平板水解圈法初筛, 摇瓶发酵法复筛获得产 β -甘露聚糖酶的菌株, 通过形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因序列和比较基因组分析对该菌株进行鉴定, 并用 DNS 定糖法测定酶学活性, 用耐高温、耐酸、耐胆盐和平板打孔扩散法对其益生特性进行研究, 用滤纸片法、腹腔注射法等对其生物安全性进行评价。【结果】本研究通过刚果红染色从鲤肠道中分离筛选出产 β -甘露聚糖酶的细菌 62 株, 其中 HF-14109 菌株产酶能力最强。通过形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因序列和比较基因组分析对该菌株进行鉴定, 确定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。酶学性质研究发现, 该酶最适反应温度为 45 °C、最适 pH 为 6.0, 在温度 20–80 °C、pH 4.0–9.0 范围内都较为稳定; Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 对该酶具有激活作用, 而 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶具有抑制作用; 对魔芋粉、瓜尔胶和槐豆胶都有较好的降解能力。生物学特性研究表明, HF-14109 对酸、高温、胆盐具有较好的耐性, 对大肠杆菌(*Escherichia coli*) EC 05、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) ET 03、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) SA 16、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) Ah 01 等均有抑制作用。安全性评价显示, 用 10^7 、 10^8 、 10^9 浓度 HF-14109 菌悬液对黄河鲤腹腔注

基金项目: 国家自然科学基金(31902361); 河南省重点科技攻关项目(222102110143, 212102110106)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31902361) and by the Key Scientific and Technological Problems in Henan Province (222102110143, 212102110106)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3326569; E-mail: fjc15290022@126.com

Received: 2 December 2021; Revised: 4 April 2022; Published online: 14 April 2022

射后, 未出现死亡及异常状况; 该菌株对庆大霉素、卡那霉素、克林霉素、氟霉素、红霉素、链霉素、四环素、万古霉素、氨苄西林等均不具有耐药性。【结论】本研究从黄河鲤(*Cyprinus carpio*)肠道筛选到一株产 β -甘露聚糖酶的贝莱斯芽孢杆菌 HF-14109, 具有较高的酶活性和良好的酶学性质、益生特性和安全性, 可作为潜在消除水产饲料中甘露聚糖抗营养因子的功能益生菌。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; β -甘露聚糖酶; 肠道细菌; 酶学性质; 功能益生菌

Isolation and identification of β -mannanase-producing *Bacillus velezensis* HF-14109 from common carp (*Cyprinus carpio* L.) and analysis of the enzymatic characteristics of the enzyme and biological characteristics of the strain

ZHANG Jianxin, CHEN Yongyan, HE Zihan, WU Jingyu, LI Meng, HUANG Mengyuan, MENG Xiaolin, CHANG Xulu, FENG Junchang*

College of Fisheries, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

Abstract: [Objective] Probiotics producing β -mannanase were isolated from the intestine of *Cyprinus carpio*. [Methods] The strain with high β -mannanase production was screened based on the transparent hydrolysis circle on the screening plate and shake flask fermentation. Through morphological observation, physiological and biochemical tests, 16S rRNA gene sequencing, and comparative genomics-based analysis, the strain was identified. The enzyme activity was evaluated with the dinitrosalicylic acid (DNS) method. The tolerance to temperature, acid, and bile salt, and bacteriostasis (Oxford cup method) of the strain were tested, and then the biosafety was evaluated with the filter paper method and intraperitoneal injection method. [Results] A total of 62 strains producing β -mannanase were isolated from *C. carpio*, among which HF-14109 was prominent in the enzyme production and was identified as *Bacillus velezensis*. The optimal reaction temperature and pH for the enzyme were 45 °C and 6.0. It was stable at 20–80 °C and pH 4.0–9.0. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , and Ba^{2+} can activate the enzyme, while Mn^{2+} and Ca^{2+} inhibited the enzyme. It can degrade konjac powder, guar gum, and sophora bean gum. HF-14109 showed tolerance to acid, high temperature, and bile salt and suppressed *Escherichia coli* EC 05, *Edwardsiella tarda* ET 03, *Staphylococcus aureus* SA 16, *Aeromonas hydrophila* Ah 01, among other bacteria. No death or abnormality occurred to the *C. carpio* injected with 10^7 – 10^9 CFU/mL HF-14109 suspension. It demonstrated no resistance to gentamicin, kanamycin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin, and ampicillin. [Conclusion] HF-14109 with high production of β -mannanase was isolated from *C. carpio* and the enzyme demonstrated high activity, good enzymatic properties and probiotic properties, and safety. HF-14109 can be used to remove mannan in aquatic feed.

Keywords: *Bacillus velezensis*; β -mannanase; intestinal bacteria; enzymatic properties; functional probiotics

随着全球水产养殖业的快速发展, 鱼粉等优质动物蛋白资源的紧缺已成为制约水产养殖业发展的重要因素。植物蛋白源如豆粕、菜粕、棉粕等, 因其资源量大, 价格低, 被开发用以降低或取代鱼粉的使用量^[1]。然而, 植物蛋白源存在非淀粉多糖(如纤维素、半纤维素)等抗营养因子, 限制了其在水产饲料中的广泛使用。甘露聚糖是植物蛋白源半纤维素成分之一, 由D-甘露糖、D-半乳糖和D-葡萄糖等单糖合成的线性或支链聚合物, 占植物饲料总质量的0.08%–36.70%^[2–3]。甘露聚糖具有黏度、表面活性及持水性等物理特性, 畜禽和水产动物采食后会在消化道内吸收大量水分形成凝胶状, 增加食糜黏度, 造成动物饱腹感增加并降低采食量, 而且通过增加肠道内容物的粘度, 削弱消化酶的扩散和对流运输, 降低动物对营养物质的吸收, 从而降低生长性能^[4–5]。另外, 甘露聚糖也可能被免疫细胞上的模式识别受体(PRR)识别, 刺激细胞因子的产生和淋巴细胞的增殖, 从而消耗大量的能量和营养物质, 影响动物的健康和生长性能^[6]。由于畜禽和水产动物消化道中缺乏相应的内源性消化酶, 甘露聚糖很难充分降解或根本没有降解^[7]。

β -甘露聚糖酶(β -mannanase, EC 3.2.1.78)是一类能够水解含有 β -1,4-糖苷键的内切水解酶, 能够水解甘露聚糖、葡甘露聚糖或半乳甘露聚糖^[8–9]。 β -甘露聚糖酶在自然界中普遍存在, 已从植物、动物及微生物中分离出来, 微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有成本低、易获取、安全度高等特点受到了广泛关注。研究发现, 饲料中添加 β -甘露聚糖酶不仅能降低动物食糜黏度, 提高营养物质的消化率, 而且能提高小肠绒毛高度和杯状细胞数量, 增大吸收表面积, 提高肠对营养物质的吸收效率等, 促进动物的生长和提升机体免疫力^[10–12]。此

外, β -甘露聚糖酶的水解产物甘露寡糖(mannan-oligosaccharide, MOS)作为益生元也广泛应用于水产养殖过程中^[13–14]。

黄河鲤是我国重要的经济养殖鱼类, 也是河南省的特色鱼类, 因此, 我们从黄河鲤肠道筛选出1株具有 β -甘露聚糖酶活性的有益菌株, 并对该菌株进行了鉴定, 对其酶学性质、生物学特性和安全性进行了研究, 以期将其作为水产饲料中消除甘露聚糖等抗营养因子的功能益生菌, 从而发挥菌酶协同作用, 减少药物使用量, 促进黄河鲤生态健康养殖。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物

黄河鲤成鱼购买于郑州中牟河南省水产技术推广站水产养殖基地, 饲喂的商品饲料中甘露聚糖含量约为0.5%。

1.1.2 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) EC 05、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) ET 03、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) SA 16、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) Ah 01均由本实验室保存。

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母浸粉 5, 琼脂 15, pH 7.2

分离培养基(g/L): 瓜尔胶 5, 魔芋粉 5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4$ 0.3, NaCl 1, 硫酸铵 5, 琼脂 15, pH 7.0–7.2

种子培养基(g/L): 魔芋粉 5, 酵母浸粉 5, 蛋白胨 5, $MgSO_4$ 0.3, NaCl 1, K_2HPO_4 0.2, pH 7.0–7.2

发酵培养基(g/L): 魔芋粉 5, $MgSO_4$ 0.3, K_2HPO_4 0.2, 酵母浸粉 5, 蛋白胨 5, NaCl 1, 硫酸铵 5, pH 7.0–7.2

1.1.4 主要试剂及仪器

超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);PCR仪(Eppendorfs公司);细菌DNA提取试剂盒、2000 DNA Marker、*Taq* 酶购自北京宝日医生物技术有限公司;氯霉素、链霉素等抗生素药敏片购买于杭州滨和微生物试剂有限公司;魔芋粉、瓜尔胶、槐豆胶购买于安徽酷尔生物工程有限公司;胰蛋白胨、葡萄糖、酵母提取物、牛肉膏、氯化钠、磷酸氢二钾、硫酸镁等购买于北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 菌株的分离和纯化

将购买回来的黄河鲤(1 000 g左右)立刻用75%的酒精体表擦拭,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,在无菌条件下,将黄河鲤的中肠、后肠的肠道及其内容物研磨后溶于PBS中,稀释至合适浓度后在分离培养基平板上涂布,放在30 °C恒温培养箱中培养48–72 h。挑取形态、颜色不同的单菌落,纯化后,斜面4 °C保存。

1.3 产 β -甘露聚糖酶菌株的初筛和复筛

将纯化后的菌株按照文献[15]用刚果红染色法进行平板初筛,在30 °C、200 r/min下制备粗酶液,用DNS法复筛。

1.4 β -甘露聚糖酶菌株的鉴定

1.4.1 细菌形态特征观察及生理生化鉴定

将分离纯化的菌株划线并接种于LB培养基,30 °C培养24 h,观察并记录菌落形态;同时,进行革兰氏染色,在光学显微镜和扫描电镜下观察菌株细胞的形态特征。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[16],对目的菌株进行生理生化鉴定,如革兰氏染色试验、吲哚试验、甲基红试验、接触酶试验等。

1.4.2 分子生物学鉴定

使用TaKaRa提取试剂盒提取HF-14109细

菌总DNA。参照文献[17–18]的方法扩增菌株16S rRNA基因,送金唯智生物科技有限公司测序。将测得的16S rRNA基因序列上传至NCBI中进行BLAST分析,使用MEGA 6软件构建系统进化树。在TYGS (<http://ggdc.dsmz.de/home.php>)和JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>)分析平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)和DNA-DNA杂交(DNA-DNA hybridization, DDH)。

1.5 酶活力和酶学性质分析

酶学性质按照先前的研究^[19]略做修改:将菌种30 °C、200 r/min培养8 h后,按1%的接种量接种到发酵培养基中,30 °C、200 r/min培养72 h后,5 000 r/min离心10 min,收集上清液即为粗酶液。粗酶液用双水相萃取法[16% (NH₄)₂SO₄、18% PEG 2000和2% NaCl的双水相体系]对粗酶液进行纯化,透析膜(MD34-2 500)透析后,用于酶学性质分析。

甘露糖标准曲线的制作:配制一系列不同浓度的甘露糖标准溶液:0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 mg/mL。取5 mL标准溶液与2 mL DNS试剂混匀,在沸水浴中显色5 min,最后迅速取出后放入流水上冷却至室温,调空白对照为零,在分光光度计上测定540 nm波长下的吸光值,以OD₅₄₀为纵坐标,以相应的甘露糖标准液为横坐标,制作甘露糖标准曲线。

β -甘露聚糖酶活性测定参见文献[20],并略作修改。向3 mL 3 mg/mL槐豆胶溶液(pH 5.5、0.2 mol/L Na₂HPO₄缓冲液–0.2 mol/L NaH₂PO₄缓冲液)中加入2 mL粗酶液,50 °C准确反应5 min,加入2 mL DNS试剂,在沸水浴中显色5 min,流水上冷却至室温,测定OD₅₄₀值。酶活单位定义:一个酶活单位(U)即在pH 5.5、50 °C条件下每分钟催化水解槐豆胶底物产生

1 μmol 甘露糖所需的酶量。 β -甘露聚糖酶酶活力单位(U/mL)= $N \times C \times 10 \times 1\,000 / M \times T \times V$, 其中 N : 粗酶液的稀释倍数, C : 由甘露糖标准曲线得到的甘露糖含量(mg/mL), 10 : 反应的总体积(mL), M : 甘露糖的分子量, T : 反应时间(min), V : 加入的粗酶液的体积。

1.5.1 最适温度和热稳定性的测定

在 20–60 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内、 pH 7.0 条件下, 测定 β -甘露聚糖酶酶活力, 分析酶的最适反应温度; 将 β -甘露聚糖酶分别在在 30–90 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30、60、90、120 min, 然后在最适条件下测定酶的残余活性, 以未处理的相对酶活力为 100%, 计算处理后的相对酶活。

1.5.2 最适 pH 和 pH 稳定性的测定

按照文献[21]配制不同 pH 值(pH 2.0–10.0, 间隔 1.0)的缓冲液, 在最适反应温度下, 测定 β -甘露聚糖酶的酶活力, 分析最适反应 pH。所需不同 pH 缓冲液如下: 0.1 mol/L 磷酸氢二钠–柠檬酸缓冲液(pH 2.0–5.0); 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠–磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0–8.0); 0.2 mol/L 的甘氨酸–氢氧化钠缓冲液(pH 8.0–10.0)。将 β -甘露聚糖酶用不同 pH 缓冲液稀释后最适温度下水浴 30 min, 以未处理的相对酶活力为 100%, 计算处理后的相对酶活。

1.5.3 金属离子对酶活性的影响

在酶解反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 不同的金属离子溶液, 以不添加金属离子时的相对酶活力为 100%, 在最适反应条件下测 β -甘露聚糖酶的相对酶活力。

1.5.4 酶动力学参数的测定

参照文献[21]的方法, 分别以魔芋粉、瓜尔胶和槐豆胶为底物, 用 DNS 法在最适条件下测定酶活, 计算每个底物浓度下酶反应的初速度, 采用 GraphPad Prism 软件进行非线性拟合, 计

算 K_m 和 V_{max} 值。

1.6 细菌 HF-14109 的生物学特性

1.6.1 耐酸试验

用不同 pH 值(pH 2.0–7.0, 间隔 1.0)的缓冲液, 配制 LB 液体培养基, 将菌液按照 10%接种量分别接种到不同 pH 值的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 h 后, 以 pH 7.0 作为对照, 梯度稀释至合适浓度, 取 100 μL 均匀涂布于 LB 平板上, 平板菌落计数法计数, 计算存活率。所需不同 pH 缓冲液如下: 0.1 mol/L 磷酸氢二钠–柠檬酸缓冲液(pH 2.0–5.0); 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠–磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0–7.0)。

1.6.2 耐胆盐试验

配置 LB 液体培养基, 分别添加 0.02%、0.03%、0.05%、0.10%、0.30% 的猪胆盐, 将菌液按照 10%接种量接种, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 2 h, 以未添加猪胆盐的作为空白对照, 计算存活率。

1.6.3 耐高温试验

在灭菌的试管中加入菌液 5 mL, 将试管分别放置于 28、37、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中水浴 30 min, 以未处理的作为空白对照, 计算存活率。

1.6.4 抑菌试验

采用平板打孔扩散法^[22]测定 HF-14109 菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌的抑菌活性, 并略做修改。分别取活化后的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌, 用 PBS 调整浓度至 1×10^6 CFU/mL, 取 100 μL 均匀涂布于 LB 平板上, 用牛津杯打孔, 随后每孔加入 30 μL 培养好的 HF-14109 菌液(1×10^7 CFU/mL), 测量抑菌圈直径大小, 以抑菌圈直径评价 HF-14109 菌株的抑菌作用。

1.7 抗生素敏感试验

按照 Farhat-Khemakhem 等^[23]的方法, 测定 HF-14109 菌株对庆大霉素、卡那霉素、克林霉素、氯霉素、红霉素、链霉素、四环素、万古霉素和氨苄西林的敏感性, 并略做修改。用 PBS 调整 HF-14109 菌株浓度至 1×10^6 CFU/mL, 取 100 μ L 均匀涂布于 LB 平板上, 静置 30 min, 用镊子将抗生素药敏片放置于平板表面, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 测量抑菌圈直径。

1.8 安全性试验

试验鱼用商品饲料饲养 2 周后, 选择规格相同的健康鲤, 随机分为 4 组 ($n=10$), 设置 3 个平行, 用腹腔注射法, 分别注射浓度为 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} CFU/mL 的菌悬液 0.2 mL, 对照组注射 0.2 mL 生理盐水。随后放到原水环境中继续饲养, 连续 7 d 观察试验鱼的状态及死亡情况。

1.9 饲喂试验

1.9.1 饲料的制备

商品饲料购自通威生物科技有限公司(中国河南省), 其甘露聚糖含量为 0.5%。将 HF-14109 菌株按照 1% 的接种量在发酵培养基中 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 72 h, 根据 OD_{600} 确定菌液的浓度, 平板稀释涂布法计算该浓度下的菌液中的活菌数。5 000 r/min 离心 10 min, 去除上清, 用 PBS 洗涤 2 次。把 HF-14109 菌株设置不同的浓度 (10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/g), 将其菌体用 PBS 悬浮后, 均匀地喷洒到商品饲料中, 阴凉处晾干, 饲料每 3 d 制作一批, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中暂时保存, 定期检测饲料中菌株的存活率。

1.9.2 饲喂试验

饲喂试验在地下水循环系统进行, 试验鱼随机分为 4 组, 每组 3 个重复 ($n=30$)。对照组饲喂商品饲料, 其余 3 组添加不同浓度 HF-14109 菌株的饲料 (10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/g),

正式试验前, 各处理组先以商品饲料预饲 2 周, 其他基础条件相同。正式试验开始后对黄河鲤的初体重 (IBW) 进行测量 (精确到 0.01), 每天 8:00、12:00、17:00 定时投喂, 每日观察并记录各处理组鲤的状态。在正式试验开始 30 d 后, 测量鲤的末体重 (FBW) 并计算其增重率 (WGR)、特定生长率 (SGR)、饲料系数 (FCR)。

$$\text{增重率 (WGR, \%)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$$

$$\text{特定生长率 (SGR, \%)} = (n W_t - \ln W_0) / t \times 100$$

$$\text{饲料转化率 (FCR)} = I_d / (W_t - W_0)$$

公式中: W_t 为试验鱼最终的体重, t 是饲喂天数, W_0 是试验鱼的初始体重, I_d 为试验鱼的摄食量。

2 结果与分析

2.1 β -甘露聚糖酶产生菌的分离筛选

利用刚果红染色法通过是否产生透明圈来筛选甘露聚糖水分解菌。在本研究中, 从肠道分离纯化后的样品用 1% 刚果红染色, 在菌落周围能够形成透明水解圈的即为可能产 β -甘露聚糖酶的菌株, 共有 62 株, 进一步摇瓶发酵复筛发现产 β -甘露聚糖酶的菌株 7 株 (图 1)。通过 16S rRNA 基因快速筛选发现 HF-14109 与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 同源性高, 具有潜在益生菌的特性, 因此我们选择 HF-14109 为试验对象, 进行后续的研究。

2.2 HF-14109 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态特征

经划线分离观察菌落形态可知, HF-14109 菌株在 LB 培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 单菌落呈圆形, 乳白色, 表面干燥, 边缘粗糙, 轻微反光, 易挑起 (图 2A); 经革兰氏染色呈革兰氏阳性, 杆状, 单个存在或链状排列 (图 2B、2C)。

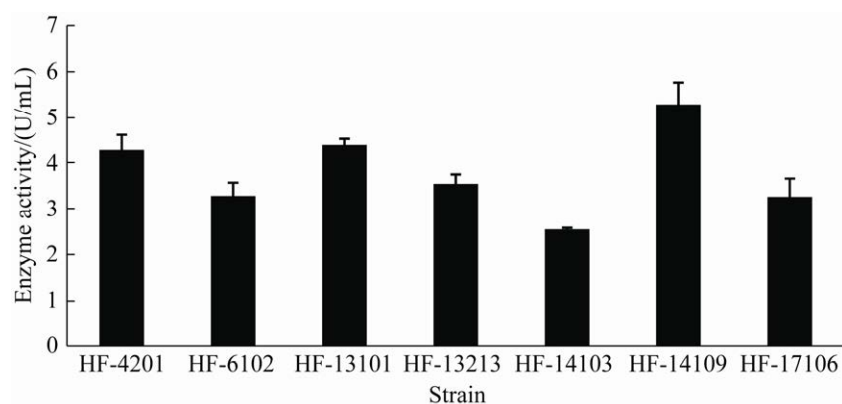


图 1 部分菌株复筛 β -甘露聚糖酶酶活

Figure 1 The β -mannanase activity of some strains.

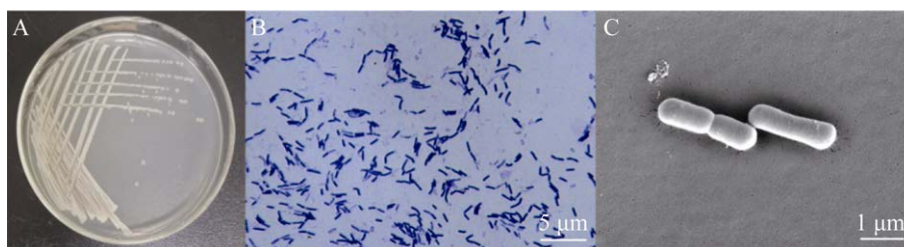


图 2 HF-14109 菌株形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain HF-14109. A: colony morphology; B: optical microscope (1 000 \times); C: scanning electron microscope (15 000 \times).

2.2.2 HF-14109 菌株的生理生化特征

由表 1 可知, HF-14109 菌株能够利用糖原、乳糖产酸, 不能利用松二糖、蜜二糖产酸, 不能产生精氨酸双水解酶, 不能水解 Tween 20 和

Tween 80。HF-1410 与 *B. velezensis* CR-502^T 的生理生化特征比较如表 1 所示。两者生理生化特征基本相同, 可初步判断该菌株为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 的菌。

表 1 HF-14109 菌株生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain HF-14109

Physiological and biochemical indexes	HF-14109	<i>B. velezensis</i> CR-502 ^T	<i>B. subtilis</i> CECT 39 ^T	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	<i>B. siamensis</i> PD-A10 ^T
Acid in API system from:					
Melibiose	-	-	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	+
Glycogen	+	+	-	ND	+
Turanose	-	-	+	+	-
Hydrolysis of:					
Tween 20	-	-	+	+	ND
Tween 80	-	-	+	ND	ND
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	ND

+: positive; -: negative; ND: not determined.

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析

HF-14109 菌株的 16S rRNA 基因序列上传到 NCBI 与已知菌株 16S rRNA 基因序列进行比对, 该 1 493 bp 的 16S rRNA 基因片段(序列号: MV828880)与已知的菌株 *Bacillus velezensis*、*Bacillus siamensis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 处在系统进化树的同一分支上(图 3), HF-14109 菌株与 *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T 相似度 99.86%, *Bacillus velezensis* CR-502^T 相似度为 99.85%, *Bacillus subtilis*

NCIB 3610^T 相似度 99.71%。结合菌体的形态特征和生理生化特征, 可初步判断该菌株为 *B. velezensis*。

2.2.4 全基因组序列的测定和生物信息学分析

HF-14109 菌株全基因组预测发现有 2 个甘露聚糖酶基因, 碱基数量分别为 1 083 bp 和 378 bp。HF-14109 菌株全基因组序列测定后进行了 ANI 和 DDH 分析。从表 2 数据可知 HF-14109 与 *B. velezensis* CBMB205 的 ANI_b 为 98.10%、ANI_m 为 98.34% 及 DDH 为 86.6%; 与

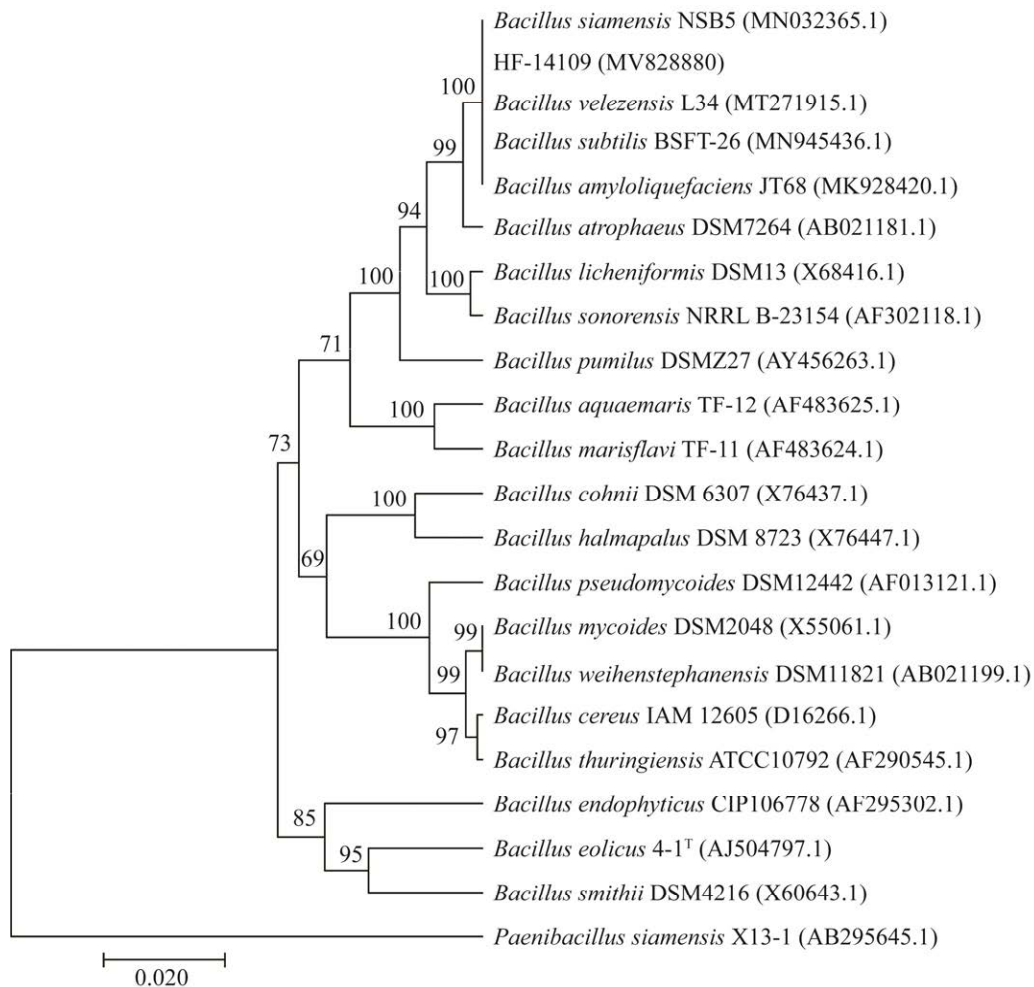


图 3 HF-14109 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of strain HF-14109 based on the 16S rRNA gene sequence. Numbers at notes indicate the levels of bootstrap support based on data for 1 000 replicates; Numbers in parenthesis represented GenBank accession No.; the scale bar represents 0.020 nucleotide substitutions per site.

表 2 HF-14109 菌株基于全基因组与相近种比较的 ANI 值和 DDH 结果

Table 2 ANI values and DDH results of strain HF-14109 based on comparison of whole genome and similar species

Genome	Accession number	ANIb/%	ANIm/%	DDH/%	Coverage/%
<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	CP011937	98.10	98.34	86.60	100.0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> WF02	CP053376	97.37	97.75	79.50	99.9
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	AJVF01000001	94.06	94.44	56.70	75.1
<i>Bacillus subtilis</i> 168	000964	76.41	84.62	20.90	67.7

B. amyloliquefaciens WF02 的 ANIb 为 97.37%、ANIm 为 97.75% 及 DDH 为 79.50%。根据这些数值,表明 HF-14109 与 *B. velezensis* 亲缘关系最近,结合形态学观察、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析,最终确定 HF-14109 为 *B. velezensis*。

2.3 β -甘露聚糖酶的表达与纯化

菌株 HF-14109 发酵粗酶液经双水相萃取、透析后,用 SDS-PAGE 检测。电泳结果(图 4)显示, β -甘露聚糖酶蛋白分子量为 27.82 kDa,其大小与碱基数量为 1 083 bp 的 β -甘露聚糖酶蛋白分子量预测相符,纯化后的酶液基本无杂蛋白,基本达到电泳纯。

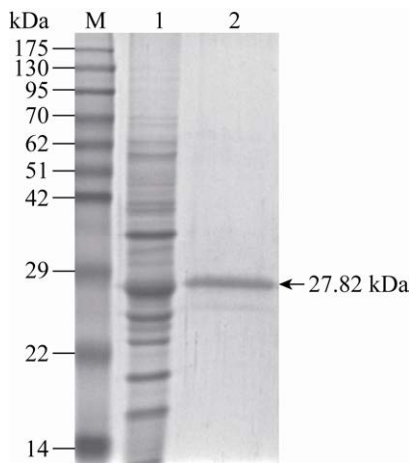
图 4 β -甘露聚糖酶蛋白表达与纯化 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of β -mannanase expression and purification. M: protein molecular weight markers; 1: expression of β -mannanase; 2: purified enzyme β -mannanase.

2.4 β -甘露聚糖酶酶学性质研究

2.4.1 温度对 β -甘露聚糖酶活性和稳定性的影响

在 20–60 °C 的温度范围内,测定 β -甘露聚糖酶对槐豆胶底物的活性(图 5),酶的最适反应温度是 45 °C。酶的稳定性通过酶在不同温度、不同时间间隔的温育来确定,由图 6 可知,该酶在 20–50 °C 下保温 30 min 酶活基本上不损失,保温 2 h 后,酶活仍保留 50% 以上;但 55 °C 保温 30 min 酶活迅速下降,因此可知该酶在 20–50 °C 范围内酶活力具有较好的稳定性。

2.4.2 pH 对 β -甘露聚糖酶活性和稳定性的影响

由图 7 可以发现, β -甘露聚糖酶最适反应 pH 为 6.0,在 pH 4.0–9.0 展现出 60% 以上相对活性,当 pH 低于 4.0 或高于 9.0 时,酶活力迅速下降。pH 稳定性分析发现, β -甘露聚糖酶在 pH 4.0–9.0 范围内保存 30 min 后,该酶仍保持

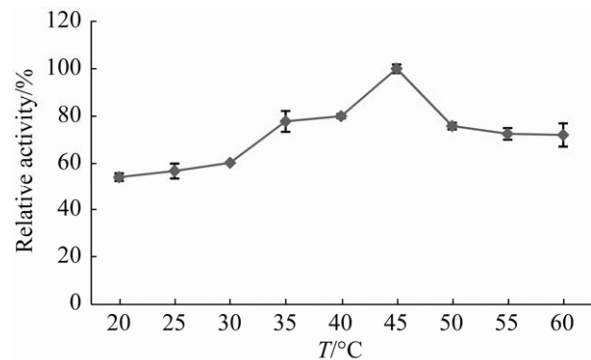
图 5 温度对 β -甘露聚糖酶活性的影响

Figure 5 Effects of temperature on the activity of β -mannanase.

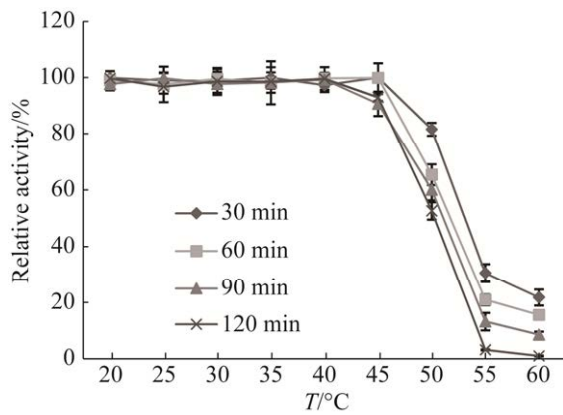


图 6 不同温度处理对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响
Figure 6 The effect of temperature on β -mannanase stability.

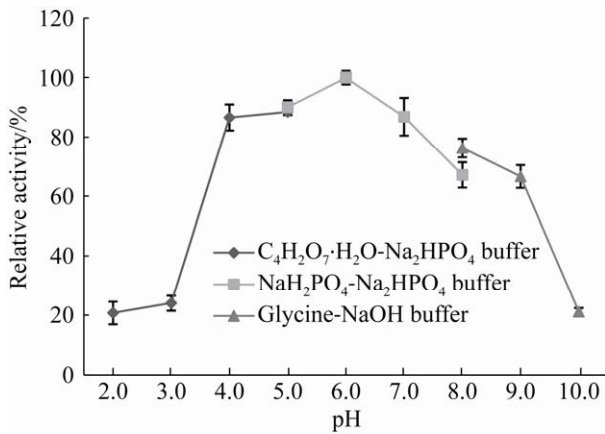


图 7 pH 对 β -甘露聚糖酶活性的影响
Figure 7 Effects of pH on the activity of β -mannanase.

70%以上的残余活力;当 pH 降到 4.0 以下或 9.0 以上时,该酶丧失大部分活性(图 8),表明该酶能在 pH 4.0–9.0 稳定保存。

2.4.3 金属离子和 EDTA 对酶活的影响

不同金属离子对 β -甘露聚糖酶活性的影响见图 9,添加 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 对该酶具有激活作用,其中以 Fe^{3+} 的激活效果最为明显;而 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 对 β -甘露聚糖酶具有抑制作用;与大多数报道一致,大部分金属离子对该酶没有明显的影响。EDTA 还可以抑制 β -甘露聚糖

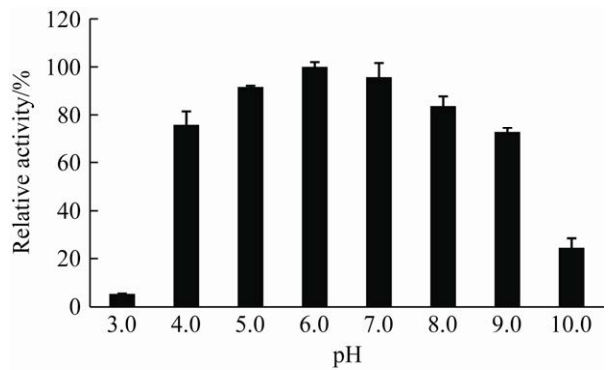


图 8 不同 pH 处理对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响
Figure 8 The effects of pH on β -mannanase stability.

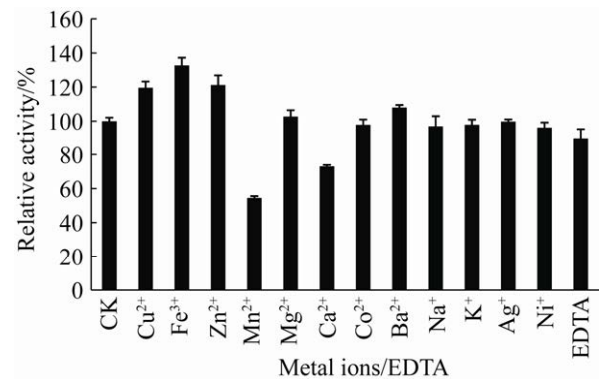


图 9 金属离子和 EDTA 对 β -甘露聚糖酶活性的影响
Figure 9 Effect of metals and EDTA on β -mannanase xylanases.

酶的部分活性,则说明该酶可能是一种金属依赖酶,它需要一些金属离子来维持酶的活性构象。

2.4.4 酶动力常数的测定

本试验最适条件下测定不同底物(魔芋粉、瓜尔胶、槐豆胶)浓度下酶的反应速率,通过使用 Michaelis Menten 方程非线性拟合,作出 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图(图 10),计算得到以魔芋粉为底物时 $K_m=3.36$ mg/mL、 $V_{max}=13.48$ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$;以瓜尔胶为底物时 $K_m=7.32$ mg/mL、 $V_{max}=7.30$ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$;以槐豆胶为底物时 $K_m=7.08$ mg/mL、 $V_{max}=7.38$ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。可见,该酶对魔芋粉的亲和力较强。

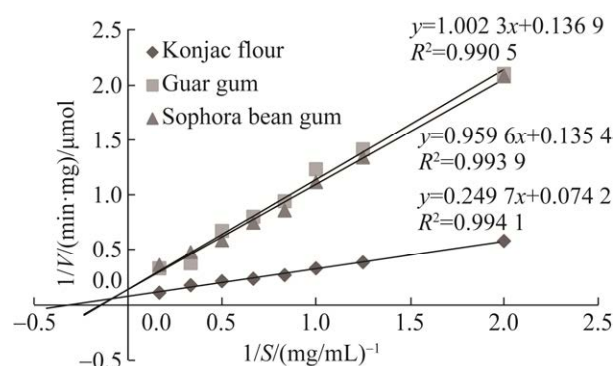


图 10 β -甘露聚糖酶动力学

Figure 10 Enzyme kinetics of β -mannanase.

2.5 HF-14109 菌株的抑菌性试验

平板扩散法检测了 HF-14109 菌株对不同种类微生物生长的抑制能力(图 11)。HF-14109 菌株对所选择的 4 种测试菌都具有抑菌作用, 其

中对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强, 达到 32.45 mm; 对嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌的抑制作用次之, 对大肠杆菌的抑制相对较弱, 但也达到 16.75 mm。通过革兰氏染色发现, 金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌, 大肠杆菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌为革兰氏阴性菌。可知, HF-14109 菌株不仅对革兰氏阳性菌有抑制作用, 对革兰氏阴性菌也有抑制作用。

2.6 HF-14109 菌株的药敏试验

HF-14109 菌株对抗菌药物的药敏试验结果显示(表 3), 该菌株对试验所用的 9 种抗生素药物均表现为敏感(S), 不具有耐药性。

2.7 HF-14109 菌株的耐酸试验

如表 4 所示, HF-14109 菌株在不同 pH 条件下处理 2 h 后, 以 pH 7.0 处理 2 h 后的活菌

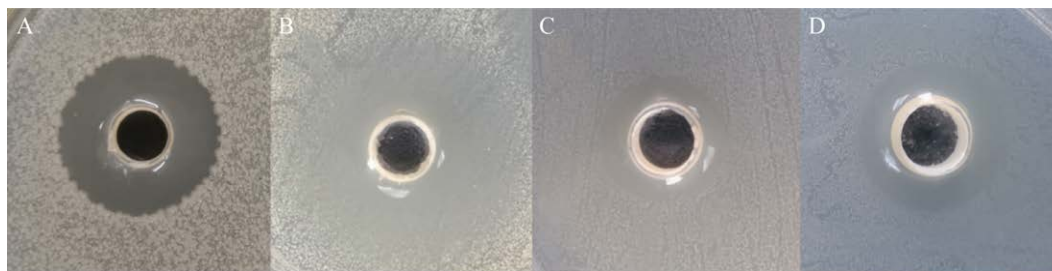


图 11 HF-14109 菌株对 4 种病原菌的抑制效果

Figure 11 The inhibitory effect of strain HF-14109 on four pathogens. A: *A. hydrophila*; B: *S. aureus*; C: *E. coli*; D: *E. tarda*.

表 3 HF-14109 菌株的药物敏感性试验结果

Table 3 Antibiotic sensitivities of strain HF-14109

Antibiotic name	Content/(μg /tablets)	Inhibition zone diameter/mm	Susceptibility
Gentamicin	10	31.4 \pm 1.4	S
Kanamycin	30	31.6 \pm 1.0	S
Clindamycin	20	28.8 \pm 0.8	S
Chloramphenicol	30	32.5 \pm 1.1	S
Erythromycin	15	35.0 \pm 0.7	S
Streptomycin	10	28.3 \pm 0.5	S
Tetracycline	30	31.0 \pm 0.8	S
Vancomycin	30	34.0 \pm 0.1	S
Ampicillin	10	39.3 \pm 0.8	S

表 4 HF-14109 菌株耐酸试验结果

Table 4 Results of acid resistance test of strain HF-14109

pH	Final pH	Bacterial counts/(CFU/mL)	Survival rate/%
7.0	6.95±0.20	7.60×10 ⁸	100.0
6.0	5.99±0.30	7.65×10 ⁸	101.0
5.0	5.04±0.10	6.78×10 ⁸	89.2
4.0	4.07±0.40	5.41×10 ⁸	71.1
3.0	3.11±0.10	1.54×10 ⁸	20.2
2.0	2.13±0.10	8.60×10 ⁷	11.3

数为对照, 随 pH 下降, HF-14109 菌株存活率逐渐降低。pH 4.0–6.0 处理 2 h 后, 存活率均在为 70% 以上; pH 3.0 处理 2 h 后, 存活率明显下降, 仅为 19.33%。因此可知, HF-14109 菌株能在中性和偏酸环境中生长较好, 耐酸性能力差。

2.8 HF-14109 菌株的耐温性试验

由表 5 可知 HF-14109 菌株在不同温度下处理 30 min 后, 以 28 °C 水浴 30 min 的活菌数为对照, 随温度的升高, HF-14109 菌株的存活率逐渐下降。在 37–60 °C 条件下水浴 30 min, 存活率为 70% 以上; 而 70 °C 和 80 °C 处理 30 min, 存活率为 42.92% 和 41.01%; 而 90 °C 处理 30 min, 存活率明显下降, 仅为 17.2%。因此可知 HF-14109 菌株能耐受 80 °C 高温, 可作为潜在饲料添加剂的备选菌株。

表 5 HF-14109 菌株耐温性试验结果

Table 5 Results of temperature tolerance test of strain HF-14109

Temperature/°C	Bacterial counts/(CFU/mL)	Survival rate/%
28	5.67×10 ⁸	100.0
37	5.20×10 ⁸	91.7
50	4.25×10 ⁸	75.0
60	4.03×10 ⁸	71.1
70	2.43×10 ⁸	42.9
80	2.33×10 ⁸	41.0
90	9.75×10 ⁷	17.2

2.9 HF-14109 菌株的耐胆盐试验

由表 6 可知 HF-14109 菌株在添加不同剂量的胆盐条件下处理 2 h 后, 以不加胆盐的活菌数为对照, 随胆盐浓度的升高, HF-14109 菌株的存活率明显下降。在添加 0.02%–0.05% 的胆盐液体中处理 2 h, 存活率为 60% 以上; 在添加胆盐为 0.1% 时, 存活率迅速下降。因此, 可知 HF-14109 菌株在胆盐浓度为 0.05% 以下时较为稳定。

2.10 HF-14109 菌株的安全性试验

通过腹腔注射法检测 HF-14109 菌株对黄河鲤的生物安全性, 结果表明, 鲤在注射浓度为 1.0×10⁷、1.0×10⁸、1.0×10⁹ CFU/mL 的菌悬液后, 各处理组表现均未出现死亡及其他异常现象, 表明 HF-14109 对鲤具有良好的生物安全性。

2.11 HF-14109 菌株对黄河鲤生长性能的影响

饲料中添加不同浓度的 HF-14109 菌株饲喂 30 d 对黄河鲤的影响如表 7。结果表明, 饲料中添加 HF-14109 对黄河鲤的生长有明显的促进作用, 随着 HF-14109 添加量的增加, WGR、SGR 呈先升高后降低的趋势, 而 FCR 呈现先降低后增高的趋势。10⁸、10⁹ CFU/g 处理组的 WGR、SGR 显著高于对照组 ($P < 0.05$), FCR 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 6 HF-14109 菌株耐胆盐试验结果

Table 6 Results of bile salts resistance test of strain HF-14109

Bile salt concentration/%	Bacterial counts/(CFU/mL)	Survival rate/%
0.00	8.90×10 ⁸	100.00
0.02	6.45×10 ⁸	87.70
0.03	2.70×10 ⁸	72.10
0.05	1.85×10 ⁸	60.60
0.10	1.20×10 ⁸	23.50
0.30	5.00×10 ⁷	7.56

表 7 HF-14109 菌株对鲤生长性能的影响

Table 7 Effect of strain HF-14109 on growth performance of common carp

Groups	IBW/g	FBW/g	WGR/%	SGR/%	FCR
Control	37.52±2.00	67.73±10.00 ^b	73.35±12.70 ^b	2.50±0.60 ^c	1.36±0.20 ^a
10 ⁷ CFU/mL	37.48±1.90	68.05±6.60 ^b	75.49±8.10 ^b	2.59±0.30 ^{bc}	1.31±0.10 ^{ab}
10 ⁸ CFU/mL	37.49±2.20	74.31±8.90 ^a	89.26±7.50 ^a	3.19±0.30 ^a	1.09±0.10 ^c
10 ⁹ CFU/mL	37.83±2.20	72.20±7.60 ^a	87.31±7.40 ^a	3.08±0.30 ^{ab}	1.12±0.10 ^{bc}

In the same row, values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

3 讨论

近年来, 益生菌作为抗生素替代品在水产养殖中得到广泛的应用, 其中芽孢杆菌能产生多种营养物质, 分泌多种酶类和抗逆性强等特点成为水产养殖中应用最广泛的益生菌之一。研究表明, 水产土著芽孢杆菌能降低对水产养殖动物的应激性刺激, 适应水产动物的消化道及养殖水体环境, 有助于发挥其益生功能^[24], 因此, 我们迫切需要开发水产土著益生芽孢杆菌。

本研究从鲤肠道中分离出产 β -甘露聚糖酶的 HF-14109 菌株, 通过形态学观察、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列和比较基因组学的方法发现 HF-14109 菌株与 *B. velezensis*、*Bacillus siamensis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 的亲缘关系非常近, 无法准确区分其分类地位^[25-29], 再结合全基因组 ANI 和 DDH 分析^[30-31], 最终确定 HF-14109 菌株为 *Bacillus velezensis*。

一般来说, 能够在肠道中发挥作用的益生菌必须拥有较强的对酸和胆盐的耐受性^[32-33]。动物肠道内胆盐的质量分数约为 0.03%–0.30%^[34]。Takanashi 等^[35]研究发现淡水鱼源菌株对牛胆盐耐受性远远低于海水鱼源和乳制来源的菌株。杨红玲等^[36]发现斜带石斑鱼中分离的乳酸菌 EA-1 和 Y4-2 在胆盐浓度为 0.1% 培养 1 h 时, 存活率不足 1%。本研究也有类似的发现, 微生

物对胆盐的耐受性不仅与种类有关, 还受到宿主生存环境的影响^[34]。HF-14109 菌株对猪胆盐的耐受性不高, 可能是淡水鱼类肠道中胆盐浓度或胆盐类型与陆生动物不同, 存在物种差异性。本研究中 HF-14109 在 pH 为 4.0–7.0 时稳定性较好, 表明该菌能在中性偏酸的环境中生存, 适合在肠道环境中繁殖。饲料制粒工艺需要高温处理, HF-14109 菌株的耐温性也是制约其应用价值的重要因素, HF-14109 菌株经过 80 °C 的高温处理 30 min, 剩余活菌数达到 2.33×10^8 CFU/mL, 可见该菌具有良好的耐热性能, 具有作为水产饲料功能益生菌的潜力。

HF-14109 产 β -甘露聚糖酶最适反应温度为 45 °C, 在 20–50 °C 较为稳定, 该酶最适反应 pH 为 6.0, 在 pH 4.0–9.0 较为稳定, 在酶学性质方面与之前报道的 β -甘露聚糖酶^[37-39]相似, 在弱酸性至中性范围内具有较好的效果, 能适应水生动物肠道环境, 有利于该酶在水生动物肠道中生存, 也有利于该酶的储存和运输。EDTA 对该酶有一定抑制作用, 说明该酶可能是一种金属依赖酶, 需要一些金属离子来维持酶的活性构象。本研究发现 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对酶的活性有明显的促进作用, 而 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 则明显起抑制作用。因此, 该 β -甘露聚糖酶在使用的过程中可适当增加 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等金属离子的含量, 严格控制 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 等有抑制作用的金属

离子的添加。魔芋粉的主要成分是葡甘聚糖, 瓜尔胶和槐豆胶的主要成分是半乳甘露聚糖, 但二者在化学组成的主要区别在于乳糖支链分支单元数, 槐豆胶平均每 4 个甘露糖单元才有 1.5 个乳糖支链, 瓜尔胶分支单元数为槐豆胶的 2 倍。通过该酶对魔芋粉、瓜尔胶、槐豆胶的动力常数测定, 说明该酶对葡甘聚糖的特异性最好, 对半乳甘露聚糖也有较好的水解效果, 具有广谱适用性, 能有效水解鱼类饲料中的葡甘聚糖和聚半乳糖甘露糖, 提高饲料利用率。

B. velezensis 作为生防菌常用来拮抗动植物中的病原菌^[40-41]。Zhang 等^[42]研究发现从罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道分离出来的 *B. velezensis* LF01 添加到饲料中不但能产生一些抗菌物质来增强罗非鱼对无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)感染的抵抗力、减少肠道中机会性病原体, 还能促进罗非鱼的生长。从虹鳟养殖水分离的 *B. velezensis* V4 拮抗杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)作用显著, 可能是由于 V4 基因组中含有很多参与合成具有抗真菌或抗菌活性的次级代谢物的基因簇^[43]。从鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肠道分离的 *B. velezensis* JW 对鱼类致病菌具有广泛的抗菌活性, 全基因组测序分析发现了 4 个细菌素基因簇, 可能会增强 *B. velezensis* JW 与其他胃肠道微生物竞争的能力, 抑制病原菌, 促进草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)健康生长^[44]。本研究也发现该菌不但能促进黄河鲤的生长, 还对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌都具有较好的抑菌活性, 表明 *B. velezensis* HF-14109 可能具有多个抗菌活性的基因簇, 能产生某种抗菌物质抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的活性。本研究得到了 *B. velezensis* HF-14109 全基因序列, 下一步将对其功能基因进行分析来探究 *B. velezensis* HF-14109 拮抗大肠杆菌、金

黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌的机制。

益生菌不仅要对相关病原菌具有拮抗作用, 还要对水产生物具有良好的安全性。芽孢杆菌作为常用的益生菌菌源, 但仍有部分菌株存在安全隐患, 如杨移斌等^[45]发现一株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)对罗非鱼具有致病性。本研究对 HF-14109 进行生物安全性评价, 结果显示该菌以 10^8 - 10^{10} CFU/mL 感染鲤均未出现不良症状, 表明该菌具有良好的生物安全性; 同时药敏试验结果显示该菌对本试验所用的所有抗生素药物敏感, 表明该菌在使用中向周围环境传递耐药基因的可能性很小, 在水产养殖中有广泛的应用前景。

综上所述, 本研究从黄河鲤肠道筛选到 1 株产 β -甘露聚糖酶的 *B. velezensis* HF-14109 具有作为消除水产饲料中甘露聚糖抗营养因子的潜力。根据全基因组测序结果, 分析了其潜在的甘露聚糖酶基因, 后续实验将对该菌全基因组进行更深入的研究, 研究其合成 β -甘露聚糖酶和拮抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的机制, 为研究该菌作为潜在饲料添加剂提供理论指导。

参考文献

- [1] Torrecillas S, Terova G, Makol A, Serradell A, Valdenegro-Vega V, Izquierdo M, Acosta F, Montero D. Dietary phytochemicals and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: effects on gill structure and health and implications on oxidative stress status. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 663106.
- [2] 王东升, 张露露. 甘露聚糖酶提高家禽日粮中 β -甘露聚糖营养价值的作用机理. *饲料与畜牧*, 2017(19): 48-54.
Wang DS, Zhang LL. Mannanase improves the level of in poultry diet β -mechanism of mannan nutritional value. *Feed and Animal Husbandry*, 2017(19): 48-54. (in Chinese)

- [3] 殷运菊, 闫昭明, 陈清华, 刘明峰. β -甘露聚糖酶的结构、特性及其在畜禽生产中的应用. *动物营养学报*, 2021, 33(5): 2535–2543.
Yin YJ, Yan ZM, Chen QH, Liu MF. Structure and characteristics of β -mannanase and its application in livestock and poultry production. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(5): 2535–2543. (in Chinese)
- [4] Knudsen KEB. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 2014, 93(9): 2380–2393.
- [5] Blackburn NA, Johnson IT. The effect of guar gum on the viscosity of the gastrointestinal contents and on glucose uptake from the perfused jejunum in the rat. *The British Journal of Nutrition*, 1981, 46(2): 239–246.
- [6] Tiwari UP, Fleming SA, Abdul Rasheed MS, Jha R, Dilger RN. The role of oligosaccharides and polysaccharides of xylan and mannan in gut health of monogastric animals. *Journal of Nutritional Science*, 2020, 9: e21.
- [7] Kiarie EG, Steelman S, Martinez, Livingston K. Significance of single β -mannanase supplementation on performance and energy utilization in broiler chickens, laying hens, turkeys, sows, and nursery-finish pigs: a meta-analysis and systematic review. *Translational Animal Science*, 2021, 5(4): txab160.
- [8] De Petkowicz CL, Reicher F, Chanzy H, Taravel FR, Vuong R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44(2): 107–112.
- [9] Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 1817–1830.
- [10] Vangroenweghe F, Poulsen K, Thas O. Supplementation of a β -mannanase enzyme reduces post-weaning diarrhea and antibiotic use in piglets on an alternative diet with additional soybean meal. *Porcine Health Management*, 2021, 7: 8.
- [11] 毛培, 刘芦鹏, 王占彬, 马文锋. 甘露聚糖酶和纤维素酶对玉米-小麦-豆粕型日粮的体外消化评价. *家畜生态学报*, 2020, 41(9): 43–46.
Mao P, Liu LP, Wang ZB, Ma WF. Effects of mannanase and cellulase on the enzymolysis efficiency in wheat-corn-soybean meal diet by *in vitro* method. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2020, 41(9): 43–46. (in Chinese)
- [12] Ferreira HC Jr, Hannas MI, Albino LFT, Rostagno HS, Neme R, Faria BD, Xavier ML Jr, Rennó LN. Effect of the addition of β -mannanase on the performance, metabolizable energy, amino acid digestibility coefficients, and immune functions of broilers fed different nutritional levels. *Poultry Science*, 2016, 95(8): 1848–1857.
- [13] Magouz FI, Bassuini MI, Khalafalla MM, Abbas R, Sewilam H, Aboelenin SM, Soliman MM, Amer AA, Soliman AA, Van Doan H, Dawood MAO. Mannan oligosaccharide enhanced the growth rate, digestive enzyme activity, carcass composition, and blood chemistry of thinlip grey mullet (*Liza ramada*). *Animals*, 2021, 11(12): 3559.
- [14] Park Y, Kim H, Won S, Hamidoghli A, Hasan MT, Kong IS, Bai SC. Effects of two dietary probiotics (*Bacillus subtilis* or *licheniformis*) with two prebiotics (mannan or fructo oligosaccharide) in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(2): 316–327.
- [15] 张建新, 赵丹丹, 刘起丽, 聂国兴, 张吨, 胡文波, 明红. 产 β -甘露聚糖酶内生菌的筛选及酶学特性分析. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1172–1178.
Zhang JX, Zhao DD, Liu QL, Nie GX, Zhang D, Hu WB, Ming H. Screening of endophyte strain producing β -mannanase and the analysis of its enzymatic properties. *Microbiology China*, 2011, 38(8): 1172–1178. (in Chinese)
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] 任建雯, 罗云艳, 冯印印, 韩猛, 安航, 崔传斌, 张家韬, 李斌, 杨洋, 安德荣. 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 的分离鉴定及细菌素、抗菌肽基因簇挖掘. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 742–754.
Ren JW, Luo YY, Feng YY, Han M, An H, Cui CB, Zhang JT, Li B, Yang Y, An DR. Isolation and identification of *Bacillus velezensis* RJW-5-5 and gene cluster mining of bacteriocin and RiPPs. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 742–754. (in Chinese)
- [18] Bhatt K, Lal S, Srinivasan R, Joshi B. Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3332–3339.
- [19] 张建新, 郭祥瑞, 穆广亚, 冯军厂, 常绪路. 椰果内生枯草芽孢杆菌 YZ-21 产 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质研究. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 48(3): 95–102.

- Zhang JX, Guo XR, Mu GY, Feng JC, Chang XL. Purification and properties of β -mannanase produced by *Bacillus subtilis* YZ-21 in coconut fruit. *Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition*, 2020, 48(3): 95–102. (in Chinese)
- [20] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 饲料添加剂 β -甘露聚糖酶活力的测定 分光光度法: GB/T 36861—2018. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [21] 张建新, 张吨, 王海磊, 韩科芳, 赵杰, 聂国兴. 内生菌产 β -mannanase 条件优化及底物特异性研究. *食品研究与开发*, 2013, 34(16): 100–104.
Zhang JX, Zhang D, Wang HL, Han KF, Zhao J, Nie GX. Optimal conditions for β -mannanase production by endophytic bacteria and enzymatic substrate specificity. *Food Research and Development*, 2013, 34(16): 100–104. (in Chinese)
- [22] 徐淑琴, 马祥兆, 陈晓慧, 贺曦, 贺晓龙, 冶贵生. 藏羊源贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究. *饲料研究*, 2021, 44(13): 114–118.
Xu SQ, Ma XZ, Chen XH, He X, He XL, Ye GS. Study on the isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* isolated from Tibetan sheep. *Feed Research*, 2021, 44(13): 114–118. (in Chinese)
- [23] Farhat-Khemakhem A, Blibech M, Boukhris I, Makni M, Chouayekh H. Assessment of the potential of the multi-enzyme producer *Bacillus amyloliquefaciens* US573 as alternative feed additive. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(3): 1208–1215.
- [24] 胡娟. 水产土著芽孢杆菌在鲤鱼和斑马鱼中的益生效应评价研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
- [25] Zheng TW, Liu L, Nie QW, Hsiang T, Sun ZX, Zhou Y. Isolation, identification and biocontrol mechanisms of endophytic bacterium D61-A from *Fraxinus hupehensis* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 2021, 158: 104621.
- [26] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(7): 2104–2109.
- [27] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [28] 刘洋, 刘晓昆, 陈文浩. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)物种名称的“前世今生”. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 230–232.
Liu Y, Liu XK, Chen WH. “Past and present” species name of *Bacillus velezensis*. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(7): 230–232. (in Chinese)
- [29] 缪伏荣, 陈鑫珠, 李忠荣, 刘景. 一株茶渣分解菌 Fb 的分离及其应用. *福建农业学报*, 2021, 36(4): 480–489.
Miao FR, Chen XZ, Li ZR, Liu J. Isolation and application of microbes capable of decomposing tea dregs. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36(4): 480–489. (in Chinese)
- [30] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kuo HP. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(Pt 3): 671–675.
- [31] Ye M, Tang XF, Yang R, Zhang HF, Li FS, Tao FZ, Li F, Wang ZG. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(3): 500–505.
- [32] 孙世鑫, 李科, 骆鹏飞, 俞兰秀, 莫小叶, 孙海燕, 张丽君, 刘冬. 制备富含 γ -氨基丁酸酸奶的乳酸菌筛选及相关特性分析. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 106–114, 285.
Sun SX, Li K, Luo PF, Yu LX, Mo XY, Sun HY, Zhang LJ, Liu D. Screening and characteristics of lactic acid bacteria for preparing γ -aminobutyric acid-rich yogurt. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(3): 106–114, 285. (in Chinese)
- [33] 王家川, 张德锋, 王亚军, 梁焯强, 熊秀玲, 石存斌, 王芳, 刘丽娟. 一株鳊鱼源产酶芽孢杆菌的筛选、鉴定及其生物学特性. *农业生物技术学报*, 2021, 29(3): 558–570.
Wang JC, Zhang DF, Wang YJ, Liang CQ, Xiong XL, Shi CB, Wang F, Liu LJ. Screening, identification and biological characteristics of an enzyme-producing *Bacillus* strain isolated from *Siniperca chuatsi*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(3): 558–570. (in Chinese)
- [34] 杨晓宇, 张七斤, 于晨龙, 陈光明, 苏日娜, 吕天星. 不同来源乳酸菌的耐酸耐胆盐试验. *动物医学进展*, 2014, 35(2): 73–77.
Yang XY, Zhang QJ, Yu CL, Chen GM, Su RN, Lv TX. Tolerance assays to acid and bile salt of *Lactobacillus*

- from different sources. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(2): 73–77. (in Chinese)
- [35] Takanashi S, Miura A, Abe K, Uchida J, Itoi S, Sugita H. Variations in bile tolerance among *Lactococcus lactis* strains derived from different sources. *Folia Microbiologica*, 2014, 59(4): 289–293.
- [36] 杨红玲, 孙云章, 叶继丹, 常建波, 陈政强, 林文燕. 2 株鱼源乳酸菌的生物学特性研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(8): 25–30.
Yang HL, Sun YZ, Ye JD, Chang JB, Chen ZQ, Lin WY. Biological characteristics of two lactic acid bacteria from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2008, 36(8): 25–30. (in Chinese)
- [37] Pongsapipatana N, Damrongteerapap P, Chantorn S, Sintuprapa W, Keawsompong S, Nitisinprasert S. Molecular cloning of *kman* coding for mannanase from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW₂₋₃ and its hybrid mannanase characters. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 89: 39–51.
- [38] 成莉凤, 冯湘沅, 段盛文, 郑科, 刘正初. 一种耐热偏酸性 β -甘露聚糖酶基因克隆与高效表达. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2143–2150.
Cheng LF, Feng XY, Duan SW, Zheng K, Liu ZC. Cloning and efficient expression of a thermostable and weak acidic β -mannanase gene. *Microbiology China*, 2015, 42(11): 2143–2150. (in Chinese)
- [39] 唐嘉婕, 郭苏, 王伟, 魏巍, 魏东芝. 短小芽孢杆菌耐碱性 β -甘露聚糖酶基因的异源表达及其酶学特性. 微生物学报, 2015, 55(11): 1445–1457.
Tang JJ, Guo S, Wang W, Wei W, Wei DZ. Alkaline-adapted beta-mannanase of *Bacillus pumilus*: gene heterologous expression and enzyme characterization. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(11): 1445–1457. (in Chinese)
- [40] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634–3649.
Zhang DF, Gao YX, Wang YJ, Liu C, Shi CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634–3649. (in Chinese)
- [41] 谭寿湖, 张琦敏, 林振业. 贝莱斯芽孢杆菌 ZC16 的分离鉴定及生防效果评价. 现代农业科技, 2021(16): 121–124.
Tan SH, Zhang QM, Lin ZY. Isolation and identification of *Bacillus velezensis* ZC16 and evaluation of its biocontrol effect. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021(16): 121–124. (in Chinese)
- [42] Zhang DF, Gao YX, Ke XL, Yi MM, Liu ZG, Han XQ, Shi CB, Lu MX. *Bacillus velezensis* LF01: *in vitro* antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(21/22): 9023–9035.
- [43] Gao XY, Liu Y, Miao LL, Li EW, Sun GX, Liu Y, Liu ZP. Characterization and mechanism of anti-*Aeromonas salmonicida* activity of a marine probiotic strain, *Bacillus velezensis* V4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3759–3768.
- [44] Yi YL, Zhang ZH, Zhao F, Liu H, Yu LJ, Zha JW, Wang GX. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 322–330.
- [45] 杨移斌, 余琳雪, 刘永涛, 杨秋红, 苏志俊, 宋怿, 艾晓辉. 罗非鱼源蜡样芽孢杆菌分离、鉴定及药敏特性研究. 淡水渔业, 2017, 47(4): 51–56.
Yang YB, Yu LX, Liu YT, Yang QH, Su ZJ, Song Y, Ai XH. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Bacillus cereus* from tilapia. *Freshwater Fisheries*, 2017, 47(4): 51–56. (in Chinese)

(本文责编 李磊)