

文章编号:1673-1689(2006)03-0025-04

嗜热芽孢杆菌 2004 产 β -甘露聚糖酶产酶 条件优化和酶学性质

马骏双, 姚婷婷, 石贵阳, 王正祥*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对芽孢杆菌 2004 β -甘露聚糖酶进行了产酶条件优化、初步纯化及其酶学性质的研究。条件优化结果: 1.5 g/dL 槐豆胶, 2 g/dL 蛋白胨, 培养温度为 40 °C, 250 mL 三角瓶装液量为 70 mL, 其他因素影响不大。此最佳产酶条件下, 嗜热芽孢杆菌 2004 12 h 的产酶水平平均为 41.92 U/mL, 比原来提高了 30 倍。培养液离心得到上清液, 经硫酸铵沉淀, Sephadex G-200 分子凝胶过滤和 DEAE 纤维素离子交换, 酶比活达到 722 U/mg, 纯化了 23.94 倍, 收率为 35.1 %。该酶的最适反应温度为 70~80 °C; 反应的最适 pH 值为 5.8~6.0; pH 值稳定范围为 4.0~9.0。金属离子 Mg^{2+} 和 K^+ 对酶略有激活作用。适当浓度的 Mg^{2+} 不仅对酶有激活作用, 还对酶的热失活具有保护作用。

关键词: 嗜热芽孢杆菌 2004; β -甘露聚糖酶; 发酵优化; 酶学性质

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Purification and Characterization of β -Mannanase from *Bacillus stearothermophilus* Strain 2004

MA Jun-shuang, YAO Ting-ting, SHI Gui-yang, WANG Zheng-xiang*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Educational; Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The optimal shaking condition for the enzyme production, purification and enzymology of β -mannanase by *Bacillus stearothermophilus* Strain 2004 was investigated. β -mannanase maximum activity of 41.92 U/mL was recorded under the optimal condition of 1.5 %, 2% peptone and 40 °C with the medium working volume of 70 mL in 250 mL flask. The β -mannanase was isolated and purified by using $(NH_4)_2 SO_4$ precipitation, Sephadex G-200 column gel filtration and DEAE-Cellulose DE52 ion-exchange chromatography. The purified enzyme showed a specific activity of 722 U/mg with the purity of 23.94 times over the crude enzyme and the yield of 35.1%. The purified enzyme performed the maximum activity at the range of 70 °C to 80 °C and pH of 5.8~6.2. The enzyme was stable over the range of pH 4.0~9.0. The activity of enzyme was further enhanced by and K^+ and Mg^{2+} . Under a certain concentration, Mg^{2+} had a significant activation on the purified enzyme and protection from thermo-denaturation.

Key words: *Bacillus stearothermophilus* strain 2004; β -mannanase; process optimization; characterization

收稿日期: 2004-10-27; 修回日期: 2005-02-22.

基金项目: 国家“863”计划项目(2003AA241160).

作者简介: 马骏双(1979-), 男, 吉林榆树人, 工学硕士; * 责任作者.

β -1,4-D-甘露聚糖酶,又称为 β -甘露聚糖酶,是一类能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖的内切水解酶,它属于半纤维素酶类。甘露聚糖作为半纤维素第二大组分,在自然界中广泛分布在豆科植物的胚乳和一些植物胶中。丰富的甘露聚糖资源为 β -甘露聚糖酶的研发带来空间:在食品保健^[1-2]方面,它水解甘露聚糖产生的低聚糖为功能性糖类,在胃肠中不能被消化,但可以被人体和动物体中有益细菌吸收,由此改善肠道内菌群组成,增进消化系统功能;在造纸工业上, β -甘露聚糖酶的添加可以改进纸浆的漂白工艺,减少对环境的污染^[3-4];在饲料工业中, β -甘露聚糖酶可以对抗豆类 and 麦类饲料中 β -甘露聚糖的抗营养作用,从而消除其所引起的不良作用,改善猪、鸡等家禽的生长形状^[5-7]。 β -甘露聚糖酶来源广泛,在动物、植物、微生物中都发现有该酶的存在。已报道的产 β -甘露聚糖酶的微生物类群包括:细菌中的芽孢杆菌^[8-11]、假单胞菌^[12]、弧菌^[13],真菌里的曲霉^[14]、木霉^[15]、酵母^[16]和放线菌中的诺卡氏放线菌^[17]等。作者报道了嗜热芽孢杆菌 2004 产 β -甘露聚糖酶发酵条件的优化、初步纯化和酶学性质,为该酶的基因克隆和实际应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜热芽孢杆菌 2004,作者实验室分离并保藏,此菌在 50℃生长良好,而 37℃生长不良。

1.2 培养基

10×无机盐溶液(g/L):Na₂HPO₄ 40;KH₂PO₄ 3;CaCl₂ 3;FeSO₄ 0.1;Na₂CO₃ 25。

种子培养基(g/L):酵母抽提物 5;蛋白胨 10;NaCl 10。

发酵培养基:在无机盐溶液基础上,添加 1.5 g/dL 槐豆胶作为碳源,2 g/dL 蛋白胨为氮源,pH 7.0。

1.3 发酵条件优化

考察不同碳氮源对菌株产酶能力的影响,并采用正交实验设计考察环境因子对菌株产酶能力的影响,选取四因子三水平进行正交实验设计,250 mL 三角瓶摇瓶培养,见表 1。

1.4 酶的分离和纯化

培养 12 h 的培养液于 8 000 r/min 离心 4 min,取上清液。在上清液中缓慢加入硫酸铵至 30% 饱和度,0℃过夜。12 000 r/min 离心 20 min,去除杂蛋白质,于无糖液中补加硫酸铵至饱和度 80%,

0℃过夜,收集沉淀。溶于少量的 pH 5.8,0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液中,对 pH 5.8,0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液透析过夜。上述酶液过 Sephadex G-200 凝胶过滤柱,样品加量 2%,流速 0.25 mL/min,每管收集 1 mL。DEAE 纤维素柱层析,上步收集的酶液加入到经 pH 8.0,0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 平衡的 DEAE 纤维素柱上端,用缓冲液洗脱至 A_{280nm} 不变,开始用 0.5 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,分部收集,测定酶活。蛋白质质量分数的测定采用考马斯亮蓝法^[18]。

表 1 正交设计各因素水平表
Tab. 1 Factor and levels of orthogonal experiment

因 素	水平 1		水平 2		水平 3	
A 发酵温度/℃	A1	40	A2	45	A3	50
B 装液量/mL	B1	30	B2	50	B3	70
C 接种体积分数/%	C1	1	C2	1.5	C3	2
D pH 值	D1	6	D2	7	D3	8

由于还要考虑 A×B,A×C,A×D 的交互作用,所以选择正交表 L₂₇(3¹³)。

1.5 酶活力测定

β -甘露聚糖酶活性分析用槐豆胶作底物。反应混合液体中含有 1.5 mL 用 0.1 mol/L 的醋酸钠缓冲液(pH 5.8)配制的槐豆胶溶液(5 g/L)和 0.1 mL 适当稀释的发酵上清液。该混合液于 70℃保温 10 min,用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[20]测定反应产生的还原糖。酶单位定义为:每分钟释放 1 μmol 还原糖(相当于甘露糖)的酶量为一个酶活力单位^[19]。

1.6 酶学性质

考察温度和 pH 值对酶的稳定性和酶活力的影响,金属离子对酶活的影响都按文献[10]进行,根据实际情况稍作调整。

2 实验结果

2.1 嗜热芽孢杆菌 2004 产 β -甘露聚糖酶发酵条件优化

2.1.1 不同碳源对产酶的影响 以 1/10 体积的 10 倍无机盐溶液为基础,10 g/L 蛋白胨为氮源,分别以槐豆胶(Sigma 公司)、葡萄糖、半乳糖、可溶性淀粉、甘露糖、玉米粉、果胶、黄原胶(质量浓度均为 10 g/L)为碳源进行摇瓶发酵试验,其中槐豆胶最有利于产酶,12 h 取样测定酶活达到 11.637 U/mL,大约是以葡萄糖为碳源的 8 倍,可见此酶是一种诱导型酶。另外果胶和黄原胶也是较好的产

酶诱导物。

2.1.2 不同氮源对产酶的影响 以 1/10 体积的 $10\times$ 无机盐溶液为基础,1 g/L 槐豆胶为碳源,分别添加酵母膏、尿素、豆饼粉、酪素、硫酸铵、氯化铵、酵母抽提物(Oxoid 公司)、蛋白胨(质量浓度均为 10 g/L)为氮源进行摇瓶发酵试验,结果表明牛肉膏、酵母膏和蛋白胨 3 种有机氮源都有利于产酶,12 h 取样测定酶活达到 9.892 U/mL。

2.1.3 碳氮源配比对产酶的影响 以上实验表明,培养基中的碳氮源对菌株 2004 的产酶有明显的影响,为此,对有利于产酶的槐豆胶和蛋白胨的添加量进行了考察。结果表明,当槐豆胶质量浓度从 5 g/L 增至 15 g/L 时,酶活力由 17.77 U/mL 增加至 38.21 U/mL,而蛋白胨则影响不大。当槐豆胶质量浓度继续增加时,培养基黏度增加,不利于菌体生长,产酶水平下降,因此选择在无机盐溶液基础上,添加 1.5 g/dL 槐豆胶,2 g/dL 蛋白胨作为菌株 2004 产 β -甘露聚糖酶的摇瓶发酵培养基。

2.1.4 环境因素对产酶的影响 试验结果经方差分析后表明,装液量的改变对酶活力有明显的影响。在装液量不改变的前提下,接种量和 pH 值对试验结果无显著影响,但接种量改变时,其与发酵温度有交互作用($F_{0.05}(2,6) = 5.14$, $F_{0.05}(4,6) = 4.53$, $F_{0.01}(2,6) = 10.92$, $F_{0.01}(4,6) = 9.15$),由

方差分析及各因子的各水平 K 值大小选取最佳工艺为: A 取 A_2 , B 取 B_1 , C 和 D 两因素对酶活力影响不显著。 $A * B$ 有显著交互作用,所以对 A 和 B 作交互分析。通过交互作用表分析,应选取 $A_1 B_3$,与方差分析的结果相矛盾,但单因子所取水平要服从交互作用所取水平,所以摇瓶发酵产酶的最佳工艺为: $A_1 B_3 C_0 D_0$ (下标为 0 时表示可以任选),即发酵温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,接种体积分数在任选的情况下可选取 1 %,装液量为 70 mL,pH 值在任选的情况下可选取 7.0,因为大多数细菌发酵的 pH 值位于 6.5~7.5 之间。

产酶条件优化最终结果:在无机盐溶液基础上,添加 1.5 g/dL 槐豆胶作为碳源,2 g/dL 蛋白胨为氮源,发酵温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,接种量在任选的情况下可选取 1 %,装液量为 70 mL(250 mL 三角瓶),pH 值在任选的情况下可选取 7.0,在此最佳工艺条件下摇瓶发酵的平均酶活为 41.92 U/mL。

2.2 β -甘露聚糖酶的分离纯化

在酶的纯化过程中,采用了硫酸铵沉淀和 Sephadex G-200 层析的方法。经硫酸铵纯化后,酶的比活力提高了 2.16 倍,收率为 72.77 %。经 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析和 DEAE 纤维素离子交换柱层析后,酶的比活力提高了 23.94 倍,收率为 35.1 %,见表 2。

表 2 嗜热芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化
Tab. 2 Purification of β -mannanase from *Bacillus* 2004

纯化步骤	体积/mL	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比酶活/(U/mg)	得率/%	纯化倍数
粗酶	250	2512	83.3	30.16	100	1.0
硫酸沉淀	13	1828	25.8	65.29	72.77	2.16
Sephadex G-200	20	1030	0.66	156	56.3	5.17
DE-52	9	361	0.5	722	35.1	23.94

2.3 β -甘露聚糖酶的酶学性质

2.3.1 温度对酶活力和酶的稳定性的影响 酶的温度作用范围 50~90 $^{\circ}\text{C}$,最适温度是 70~75 $^{\circ}\text{C}$,40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 h 后酶活没有下降;50 $^{\circ}\text{C}$ 酶的半衰期为 90 min,3 h 后还剩余 20 %;60 $^{\circ}\text{C}$ 保温酶活迅速下降,30 min 就降为原来的 40 %,在更高的温度保温时酶活下降的更迅速,见图 1。

2.3.2 pH 值对酶活力和酶的稳定性的影响 在 pH 5.0~6.0 时酶活达到最大,并出现一平台,在 pH 4.0~9.0 范围内比较稳定,当 pH 值低于 4.0 或高于 9.0 时,稳定性下降,可能此条件影响了酶的正确折叠,见图 2。

万方数据

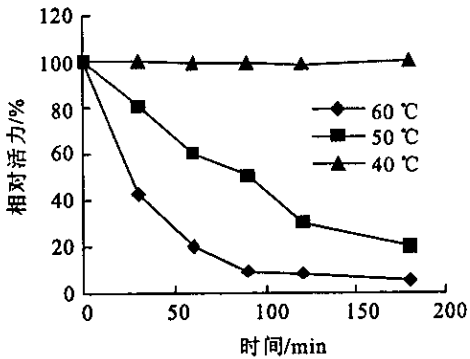


图 1 温度对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响
Fig. 1 Effect of temperature on the stability of β -mannanase from *Bacillus* 2004

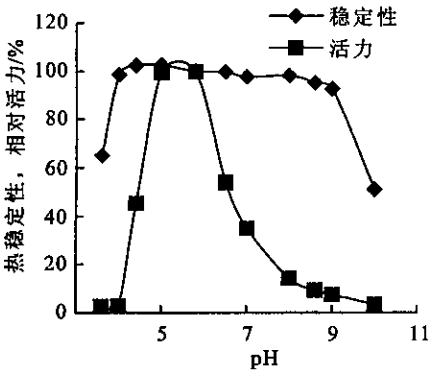


图 2 pH 值对 β -甘露聚糖酶酶活和热稳定性的影响
Fig. 2 Effect of pH on the activity and stability of β -mannanase from *Bacillus* 2004

2.3.3 金属离子对甘露聚糖酶活性的影响

1) 不同金属离子对酶活性的影响:以未加金属离子的酶液的酶活力为 100 %。不同离子对酶的影响见表 4。结果表明,在正常条件下,0.1 mol/L 的 Mg^{2+} 和 K^+ 对甘露聚糖酶有激活作用;相同浓度 Fe^{2+} 、 Co^+ 、 Mn^{2+} 和 Rb^+ 对酶有抑制作用,相同浓度 Al^{3+} 和 Cu^{2+} 对酶有强烈的抑制作用。

表 4 金属离子对 β -甘露聚糖酶活力的影响
Tab. 4 Effect of metal ions on the activity of β -mannanase from *Bacillus* 2004

金属离子	相对活性/%	金属离子	相对活性/%
Ions free	100.00	K^+	107.36
Ca^{2+}	90.42	Na^+	98.76
Fe^{2+}	77.13	Li^+	97.33
Mn^{2+}	66.43	Al^{3+}	33.53
Cu^{2+}	7.58	Mg^{2+}	112.85
Rb^+	56.67	Co^+	83.20

2) 不同浓度的 Mg^{2+} 对酶活性的影响及其对酶热失活的保护作用: Mg^{2+} 浓度在 0.05~0.4 mol/L 时对酶激活作用有加强趋势。适当浓度的 Mg^{2+} 不

仅对酶有激活作用,还对酶的热失活具有保护作用, Mg^{2+} 的存在能将酶的耐热温度提高 20 $^{\circ}C$, 60 $^{\circ}C$ 保温 3 h 的酶活不变,70 $^{\circ}C$ 时酶的半衰期接近 1 h,80 $^{\circ}C$ 保温 30 min 后酶活就降至原来的 25 %,见图 3。

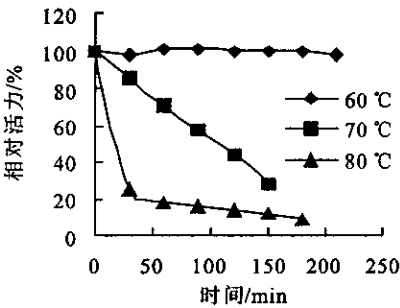


图 3 在 Mg^{2+} 的存在下 β -甘露聚糖热稳定性
Fig. 3 Thermostability of β -mannanase from *Bacillus* 2004 with existence of Mg^{2+}

3 讨 论

不同来源的酶的酶学性质有所不同。地衣芽孢杆菌 NK-27 β -甘露聚糖酶^[10]最适作用温度 60 $^{\circ}C$, 最适作用 pH 值 9.0, 温度和稳定范围分别为 40 $^{\circ}C$ 和 6.0~9.0, 受 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Ni^{2+} 的激活。枯草芽孢杆菌 BM9602 分泌的 β -甘露聚糖酶^[9] 最适温度和最优 pH 值分别为 50 $^{\circ}C$ 和 5.8。该酶在 pH 6.0~8.0 且温度为 50 $^{\circ}C$ 以下时稳定。 Li^+ 对该酶没有激活作用。作者所报道的 β -甘露聚糖酶最适作用温度 70~80 $^{\circ}C$, 最适作用 pH 值 5.0~6.0, 在 pH 4.0~9.0 范围内稳定,适当浓度的 Mg^{2+} 不但对酶有激活作用,而且对酶的热失活具有保护作用。在 Mg^{2+} 的存在下,该酶在 60 $^{\circ}C$ 保温 6 h 酶活不变。可见,嗜热芽孢杆菌 2004 β -甘露聚糖酶在起作用温度和 pH 值方面优于其他来源的同种酶。

参考文献:

[1] 杨文博, 懂树敏, 沈庆, 等. β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌促生长作用[J]. 微生物学通报, 1995, 22 (4): 204—207.

[2] 马延和, 周培谨. 浅谈寡糖的开发和应用[J]. 食品与发酵工艺, 1992, (1): 80—82.

[3] Paice M G, Gurnagual N, Page D H, et al. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14(2): 272—276.

[4] Viikari L, Kantelinen A, Ratto M, et al. *Enzyme in Pulp and Paper Processing* [M]. Washington DC: American Chem Soc, 1991. 11—21.

[5] 赵国琦, 王志跃, 丁健, 等. β -甘露聚糖酶对蛋鸡后期产蛋性能的影响[J]. 中国饲料, 2002, (5): 14—15.

[6] 黄小文, 刘雪山, 徐凤芹. 甘露聚糖酶对大猪生产性能的影响[J]. 饲料研究, 2003, (6): 29—31.

参考文献:

- [1] 杨万兴. 中药缓控释制剂的研究进展[J]. 激光杂志, 2004, 25(3): 94—95.
- [2] 王伟, 杨永新, 李岩. 微球的缓释特性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(3).
- [3] 陆彬主. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [4] 屠锡德, 张均寿, 朱家璧. 药剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002(3).
- [5] 崔正刚, 殷福珊. 微乳化技术及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [6] Mao Shi-rui, Chen Jian-ming, Wei Zhen-ping, et al. Intranasal administration of melatonin starch microspheres[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2004, 272: 37—43.
- [7] Illum L, Fisher A N, Jabbal-Gill I. Bioadhesive starch microspheres and absorption enhancing agents act synergistically to enhance the nasal absorption of polypeptides[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2001, 222: 109—119.
- [8] 王晋, 胡新, 侯新朴. 可生物降解-淀粉纳米粒的研究[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(4): 255—258.
- [9] 侯新朴, 唐晓峰, 胡新, 等. 新型药物载体—淀粉微球的合成及载药研究[J]. 齐齐哈尔轻工大学学报, 1993, 9(4): 17—24.
- [10] Ghania Hamdi, Gilles Ponchel, Dominique Duchene. An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres[J]. **Journal of controlled release**, 1998, 55: 193—201.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [12] 于九皋, 刘延奇. 淀粉微球吸附性能的研究[J]. 离子交换与吸附, 1996, 12(2): 124—128.
- [13] 张燕萍. 变性淀粉制造与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [14] 谢彩锋, 杨连生, 高群玉. 纳米淀粉微球的制备及其在生物医药中的应用. 现代化工, 2004, 24(9): 62—65.

(责任编辑: 杨 萌)

(上接第 28 页)

- [7] 黄振鹏. 用 β 甘露聚糖酶改善单胃动物对大豆的利用[J]. 中国兽医科技, 2002, (4): 6—8.
- [8] 余红英, 孙远明, 王炜军, 等. 枯草芽孢杆菌 SA-22 β -甘露聚糖酶的纯化及其特性(英文)[J]. 生物工程学报, 2003, 19: 327—331.
- [9] 崔福绵, 石家骥. 枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及性质[J]. 微生物学报, 1999, 39: 60—63.
- [10] 杨文博, 佟树敏, 沈庆. 地衣芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 1995, 22: 338—342.
- [11] 田新玉, 徐毅, 马延和, 等. 嗜碱芽孢杆菌 N₁₆₋₅ β -甘露聚糖酶的纯化与性质[J]. 微生物学报, 1993, 32: 115—121.
- [12] Yamaura L, Matsumoto T, Funatsu M, et al. Physiological effects of soybean seed lipoxygenases on insects [J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54: 2425—2427.
- [13] Araki T, Tamaru Y, Morishita T. β -1,4-Mannanases from marine bacteria, *Vibrio spp.* MA-129 and MA-138[J]. **J Gen Appl Microbiol**, 1992, 38: 343—351.
- [14] 朱劼, 邬敏辰. 酸性 β -甘露聚糖酶的固体发酵和一般特性[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 30—32.
- [15] 王和平, 范文斌, 张七斤, 等. 里氏木霉 RutC-30 β -甘露聚糖酶的制备与纯化方法的研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2003, 24(3): 44—48.
- [16] Oda Y, Tonomura K. Characterization of β mannanase and β mannosidase secreted from the yeast *Trichosporon cutaneum* JCM 2947[J]. **Lett Appl Microbiol**, 1996, 22: 173—178.
- [17] 吴襟, 何秉旺. 诺卡氏菌形放线菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 2000, 40: 69—74.
- [18] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [19] Talbot G, Sygusch J. Purification and characterization of thermostable β mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1990, 56: 3505—3510.
- [20] 张龙翔, 张文芳, 李令援. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 140—142.

(责任编辑: 李春丽)