

枯草芽孢杆菌中性内切 β -甘露聚糖酶的纯化及性质*

李文玉 董志扬 崔福绵

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BM9602 产生的中性内切 β -甘露聚糖酶(endo- β -1,4-D-mannan mannanohydrolase, EC 3.2.1.78)经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素(DE22)离子交换柱层析,得到电泳纯的样品,提纯了 45.5 倍,收率为 5.9%。用 SDS-PAGE 测得该酶的分子量为 35kD。用 PAGEIEF 测得其等电点 pI 为 4.5。酶反应的最适 pH 为 5.8,最适温度为 50℃。该酶在 pH6.0~8.0,50℃ 以下稳定。金属离子 Hg^{2+} 和 Ag^+ 对酶活性强烈抑制。酶对槐豆胶、羟丙基瓜胶、田菁胶和魔芋粉的 K_m 值分别为 3.8、14.9、11.3 和 2.4mg/mL, V_{max} 值分别为 24.5、86.5、38.4 和 19.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。酶水解甘露聚糖为甘露寡糖(不含单糖)。

关键词 β -甘露聚糖酶 枯草芽孢杆菌 纯化与性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0420-24

内切 β -甘露聚糖酶(endo- β -1,4-mannan mannanohydrolase, EC 3.2.1.78)随机水解甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖以及半乳葡甘露聚糖中的 β -1,4-甘露糖苷键^[1],生成一系列低分子量的寡糖。这些寡糖对人体和动物体肠道内的双歧杆菌等有益微生物的生长有促进作用,因而被称为双歧杆菌的促生长因子^[2,3]。 β -甘露聚糖酶在工业上也有广泛的应用,例如:用于从豆类植物种子中提炼植物油,降低咖啡、巧克力和可可液的粘性^[4,5],与木聚糖酶协同作用可用于造纸工业中软木浆的漂白^[5]。 β -甘露聚糖酶还可以作为多糖链结构分析中的工具酶。 β -甘露聚糖酶的来源非常广泛,包括植物^[6]、细菌^[7]、真菌^[8]和放线菌^[9],甚至软体动物^[10]。微生物的 β -甘露聚糖酶多为胞外酶,只有极少数例外,如粘球噬纤维菌和解甘露聚糖气杆菌产生胞内 β -甘露聚糖酶^[11],野油菜黄单胞菌产生的 β -甘露聚糖酶是结合在细胞膜或细胞壁上的^[12]。

前文^[13]报道了该菌株中性 β -甘露聚糖酶的产生。所产中性 β -甘露聚糖酶水解甘露聚糖生成甘露寡糖而不生成单糖,这不同于已报道的碱性 β -甘露聚糖酶^[14],就应用而论,更具特色。本文报道该酶的纯化及性质。

1 材料和方法

1.1 粗酶液的制备

见前文^[13]。

* 微生物资源前期开发国家重点实验室客座课题

作者简介 李文玉(1972—),女,河北省保定人,中国科学院微生物研究所硕士,现为中国科学院生物物理研究所研究实习员,主要从事细胞摄铁的信号通路研究

收稿日期:1999-01-12,修回日期:1999-05-26

1.2 中性 β -甘露聚糖酶活力的测定

见前文^[13]。每分钟释放 $1\mu\text{mol}$ 相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为一个酶活力单位。

1.3 蛋白质浓度测定

Lowry 法^[15]或测定 A_{280} 以牛血清白蛋白为标准绘制标准曲线。

1.4 主要试剂

DEAE-纤维素 DE2X (Whatman), 槐豆胶 (Sigma), 魔芋粉 (四川成都生物公司), 丙烯酰胺 (Serva), N,N'-甲叉丙烯酰胺 (Sigma), 低分子量标准蛋白 (Pharmacia), 其它试剂均为国产分析纯。

2 结果和讨论

2.1 中性 β -甘露聚糖酶的纯化

向粗酶液中加入硫酸铵, 收集 20% ~ 80% 饱和度的蛋白沉淀。将沉淀溶于 pH5.8, 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液中。于 4℃, pH5.8, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 12 h 后, 更换缓冲液, 继续透析 12 h。将透析酶液加到预先用 pH5.8, 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 DEAE-纤维素 DE22 层析柱 (2cm × 50cm) 上端, 用同一缓冲液洗至 A_{280} 不变, 改用同样缓冲液配制的 0 ~ 0.5mol/L NaCl 溶液 (各 250mL) 梯度洗脱, 分部收集。分别测定酶活力和 A_{280} , 结果见图 1。收集 28 和 29 管。上述各步提纯结果列于表 1。

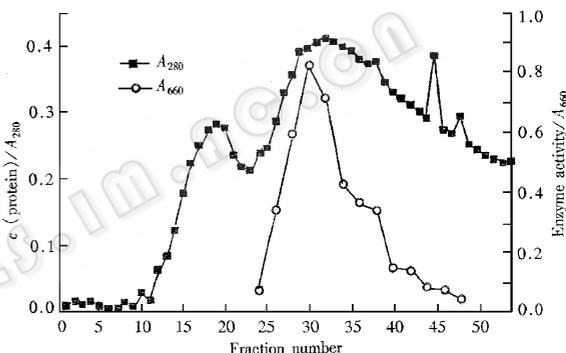


图 1 β -甘露聚糖酶 DEAE-纤维素柱层析

Fig. 1 Chromatography of the β -mannanase on DEAE-Cellulose DE22 column

表 1 枯草芽孢杆菌 BM9602 中性 β -甘露聚糖酶的纯化结果

Table 1 Purification of β -mannanase from *Bacillus subtilis* BM9602

Step	Volume /mL	Total activity /u	Total protein /mg	Specific activity (u/mg)	Recovery /%	Purification /fold
Crude enzyme	440	39864	2640	15.1	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	12	21949	380.4	57.7	55	3.8
DEAE-Cellulose chromatography	30	2350	3.42	687.1	5.9	45.5

2.2 非变性盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳测蛋白纯度

按 Davis 方法^[16], 凝胶浓度为 10%, 电流 4mA/管。用 0.01% 的考马斯亮蓝 R250 染色 2h, 用脱色液 (15% 乙醇、1.5% 甘油、10% 乙酸) 浸泡脱色过夜, 得到一条带 (图 2)。

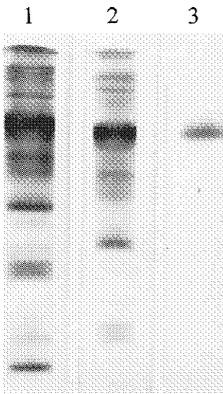


图2 蛋白纯度 PAGE 分析

Fig.2 PAGE analysis of protein purity

1. Crude enzyme ;
2. Dialyzed enzyme ;
3. Purified enzyme.

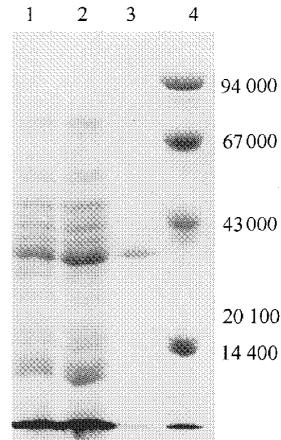


图3 β -甘露聚糖酶 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE of β -mannanase

1. Crude enzyme ;
2. Dialyzed enzyme ;
3. Purified enzyme ;
4. Protein marker.

2.3 酶的基本性质

2.3.1 酶的分子量 :用 SDS-PAGE 电泳法测定分子量^[17](图3),测得中性 β -甘露聚糖酶分子量为 35kD。

2.3.2 酶的等电点 :用 PAGEIEF 测得 β -甘露聚糖酶的等电点为 4.5。

2.3.3 pH 和温度对酶活力及稳定性的影响 :在 pH4.0~9.0 的缓冲液(pH4.0~6.5 为 0.05mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 ;pH7.0~8.0 为 0.05mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液 ;pH9.0 为 0.05mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液)中,测定酶活力。其最适 pH 为 5.8。

酶液与不同 pH 值的缓冲液(pH9.0~10.5 为 0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液)于 37℃ 保温 6 h 后,测定酶活力。结果表明酶在 pH6.0~8.0 最稳定。

2.3.4 温度对酶活力及稳定性的影响 :于不同温度测定酶活力,结果表明,酶作用最适温度为 50℃。

酶液在不同温度下保温 30min 后测定酶活力。结果表明,酶在 50℃ 以下稳定。

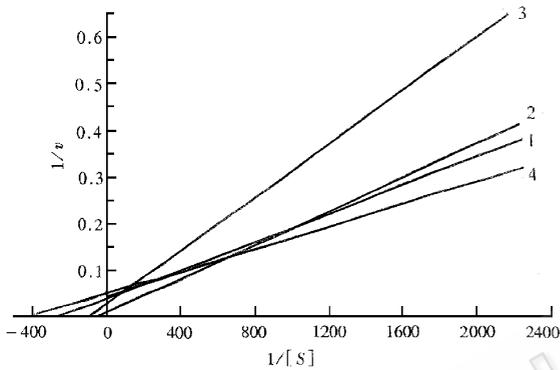
2.3.5 金属离子对酶活力的影响 :在金属离子(1.0mmol/L)存在下测定酶活力。由表 2 结果可看出,金属离子 Hg^{2+} 和 Ag^+ 对酶活力有强烈抑制。

2.3.6 酶的 K_m 值及 V_{\max} 的测定 :以不同浓度的槐豆胶、羟丙基瓜胶、田菁胶和魔芋粉为底物,测定酶活力。用 Lineweaver-Burk 作图法(图4)求得 β -甘露聚糖酶对上述四种底物的米氏常数 K_m 值分别为 3.8、14.9、11.3 和 2.4mg/mL,最大速度 V_{\max} 值分别为 24.5、86.5、38.4 和 19.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

表 2 金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effects of various ions on the activity of β -mannanase

Metal ion	Relative activity/ %	Metal ion	Relative activity/ %
—	100	Zn ²⁺	49.8
Na ⁺	98.9	Mn ²⁺	62.1
K ⁺	97.8	Ca ²⁺	79.1
Li ⁺	116.0	Al ³⁺	54.4
Fe ²⁺	57.9	Co ²⁺	55.1
Mg ²⁺	80.9	Hg ²⁺	11.8
Cu ²⁺	58.6	Ag ⁺	19.8

图 4 β -甘露聚糖酶的 Lineweaver-Burk 图Fig. 4 Lineweaver-Burk graph of β -mannanase

1. Locust bean gum as substrate ;
2. Guar gum as substrate ,
3. Sesbania gum as substrate ;
4. Konjac gum as substrate .

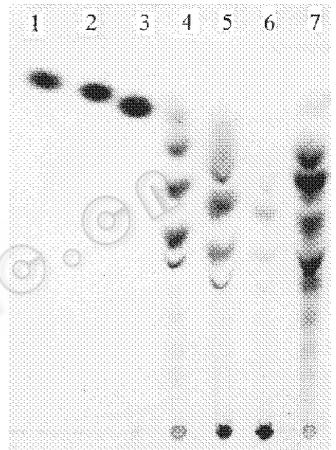


图 5 水解产物薄层层析图

Fig. 5 Thin layer chromatography graph of the products by hydrolyzing

1. Nannose ;
2. Glucose ;
3. Galactose ;
4. Hydrolysate of locust bean gum ;
5. Hydrolysate of guar gum ;
6. Hydrolysate of sesbania gum ;
7. Hydrolysate of konjac gum .

2.3.7 酶解产物的分析 :分别于 0.9mL 浓度为 0.05% 的槐豆胶、羟丙基瓜胶和田菁胶和魔芋粉中加入 0.1mL 酶液,于 50℃ 保温 24h,反应混合物沸水浴处理 30min 后离心,收集上清液,用薄层层析法进行分析,图 5 结果表明,产物为甘露寡糖,不含单糖。

参 考 文 献

- [1] McCleary B V. *Methods Enzymol* ,1998 ,**160** :596~610.
- [2] Hill M J. *Dietary Fibre*. London :Applied Science Publishers ,1983. 255~274.
- [3] Kobayashi Y ,Echigen R ,Mada M , *et al* . *Intestinal Flora and Food Factors*. Tokyo :Gakkai Shuppan Centre ,1987. 79~87.
- [4] Belitz H D ,Grosch W. *Food Chemistry*. Berlin :Springer Verlag ,1987 ,73~127.
- [5] Francoise M ,Ghakis C ,Dupont C , *et al* . *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** :4656~4658.
- [6] Sugiyama N ,Shimahara H ,Andoh T , *et al* . *中国微生物学杂志* 1997,3,379. 中国微生物学联合会编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [7] Emi S ,Fukumoto J ,Yamamoto T. *Agric Biol Chem* ,1972 **36** :991~1001.
- [8] Reese E T ,Shibata Y. *Microbiol* ,1965 **11** :167~183.
- [9] Takahashi R ,Kusakabe I ,Kobayashi H ,et al. *Agric Biol Chem* ,1984 **48** :2189~2195.
- [10] Yamaura I ,Nosaki Y ,Matsumoto T ,et al. *Biosci Biotech Biochem* ,1996 **60** :674~676.
- [11] 黄秀梨.应用微生物 ,1987 **3** :24~27.
- [12] Rebert F H , et al. *Arch Microbiol* ,1979 **122** :297~299.
- [13] 崔福绵 ,石家骥 ,鲁茁壮.微生物学报 ,1999 **39**(1) :60~63.
- [14] 田新玉 ,徐毅 ,马延和 ,等.微生物学报 ,1993 **33**(2) :115~121.
- [15] Lowry O H ,Rosebrough N J ,Farr A L ,et al. *J Biol Chem* ,1951 **193** :265.
- [16] Davis B J ,Ann N Y. *Acad Sci* ,1964 **121** :404.
- [17] Laemli V K. *Nature* ,1970 **227** :680.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENDO- β -1,4-MANNANASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* BM9602

Li Wenyu Dong Zhiyang Cui Fumian

(Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract : An extracellular neutral endo- β -mannanase(endo- β -1,4-D-mannan mannanohydrolase , EC 3.2.1.78) of *Bacillus subtilis* BM9602 was purified to electrophoretic homogeneity by ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose DE22 chromatography with 45.5 fold and 5.9% yield.

It's molecular weight and pI value were 35 kD by SDS-PAGE and 4.5 by isoelectric focusing , respectively. The enzyme was the most active at pH 5.8. The optimum temperature of the enzyme activity was 50°C . The enzyme was stable at pH 6.0~8.0 and below 50°C . The activity of the enzyme was inhibited by Hg²⁺ ,Ag⁺ strongly. For various substrates ,such as locust bean gum ,guar gum ,sesbania gum and konjac gum ,K_m and V_{max} value of the enzyme were 3.8 ,14.9 ,11.3 ,2.4mg/mL and 24.5,86.5,38.4,19.8 μ mol. min⁻¹. mg⁻¹ ,respectively. The enzyme hydrolyze various plant β -mannans ,with valuable oligosaccharides and without monosaccharide.

Key words : β -mannanase ,*Bacillus subtilis* ,purification and characterization

重 要 声 明

凡本刊刊出的稿件 ,除在本刊出版使用外 ,还要以《光盘版》等多种形式出版使用 ,作者如不同意 ,敬请来稿时声明。

从 2000 年开始 ,凡被本刊录用的稿件 ,编辑部将及时发出录用通知 ,对未被录用的稿件 ,将及时函告 ,并说明原因 ,稿件一律不退 ,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部