

碱性 β -甘露聚糖酶的产生条件及一般特性*

马延和 田新玉 周培瑾 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由我国内蒙乌杜淖碱湖中分离到一株能产 β -甘露聚糖酶的嗜碱芽孢杆菌 (Alkaliphilic *Bacillus* sp.), 产酶的最适培养基为(%): 槐豆胶 2.0, 谷氨酸钠 1.5, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, NaCl 8.0及 Na_2CO_3 1.0。产酶的最适温度和pH分别为 32℃和 10.0, 酶的最适反应温度和pH分别为 70℃和 9.5—10.0, 该酶在 pH9.0—10.0 范围内稳定。酶对魔芋粉和槐豆胶的水解产物主要为寡糖。

关键词 嗜碱芽孢杆菌; β -甘露聚糖酶

β -甘露聚糖酶 (1.4- β -D-mannan mannohydrolase, EC3. 2. 1.78) 属于半纤维素酶, 可以把葡萄糖甘露聚糖、半乳甘露聚糖及 β -甘露聚糖等植物多糖降解为甘露寡糖^[1]。该酶广泛存在于动物、植物及微生物中, 自60年代初已有许多关于微生物产生 β -甘露聚糖酶的报道, 其中细菌有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[2]、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)^[3]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[4]及链霉菌 (*Streptomyces* sp.)^[5], 真菌包括溜曲霉 (*Aspergillus tamaris*)^[6]、瘤盖干酪菌 (*Tyromyces palustris*) 及雪白根霉 (*Rhizopus niveus*)^[7]等。1987年 Akino 等首次报道了由嗜碱微生物产生碱性 β -甘露聚糖酶^[8], 并提出了应用的可能性^[9]。

甘露寡糖能促进人体肠道正常菌群的生长发育^[9], 这对提高人体的健康水平具有重要意义, 为 β -甘露聚糖酶在食品、医药方面的应用开辟了前景。目前 β -甘露聚糖酶也正试图用于造纸工业中对半纤维素的处理^[10], 国内尚未见有关报道。本文报道从我国碱湖中分离的一株嗜碱芽孢杆菌产生碱性 β -甘露聚糖酶的适宜条件及酶

的一般特性。

材料和方法

(一) 样品来源

样品采自我国内蒙乌杜淖碱湖的黑色底泥, 其pH为9.5。

(二) 培养基及培养条件

1. 富集和分离培养基: 采用 Horikoshi 培养基^[11]。

2. 产酶培养基(g/L): 槐豆胶(SIGMA) 20.0, 酵母膏(OXOID) 2.0, 谷氨酸钠 15.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 80.0 及 Na_2CO_3 10.0 (分别灭菌)。

3. 培养条件: 500 ml 三角瓶装入 100 ml 培养基, 37℃、230r/min 旋转摇床振荡培养 2 天, 接种量 1%(V/V)。在固体培养基上, 于 37℃ 培养 2 天。

(三) 菌种筛选

自样品中经富集、分离及纯化得到的嗜碱菌株, 在产酶培养基中培养 2 天, 用 DNS 试剂^[12]测定培养液水解魔芋粉(成都生物所提供, 以 pH 9.6、0.05 mol/L gly-

本文于 1990 年 4 月 25 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

NaOH 缓冲液配成 0.5% 的溶液) 所产生的相当于 D-甘露糖的还原糖量, 以确定 β -甘露聚糖酶的产生菌株。

(四) 粗酶的制备

将产酶菌株接种于产酶培养基中, 37°C 振荡培养 40 小时, 离心 ($10000 \times g$, 4°C) 20 分钟, 收集上清液, 慢慢加入固体硫酸铵至 80% 的饱和度, 4°C 静置过夜, 再离心 20 分钟 ($10000 \times g$, 4°C) 收集沉淀物, 用 0.01 mol/L gly-NaOH 缓冲液 (pH 9.0) 溶解并在 4°C 于同一缓冲液中透析过夜, 即为 β -甘露聚糖酶的粗酶液。

(五) 测定方法

1. 酶活力的测定: 浓度为 0.5% 的槐豆胶溶液 (pH 9.6、0.05 mol/L gly-NaOH 缓冲液配制) 0.9 ml, 加 0.1 ml 用蒸馏水作适当稀释的粗酶液于 70°C 保温 10 分钟, 用 Somogyi-Nelson 方法^[13,14]测定还原糖, 一个酶活力单位定为在上述条件下, 每分钟水解出 1 μ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖的量。进行发酵条件实验时, 以离心 ($10000 \times g$, 4°C, 20 分钟) 后的发酵液作为粗酶液, 测定酶活力。

2. 菌体生长测定: 用 721 型分光光度计, 在波长 660 nm 下, 测定培养液中菌体的光密度, 以未接种的培养基等量稀释作空白对照。

(六) 酶水解产物分析

0.5% 的魔芋粉或槐豆胶 10 ml, 加入相当于 10 u 的粗酶液, 55°C 保温 8 小时, 用高效液相色谱仪 (HPLC201, Waters Inc.) 进行产物分析, 色谱条件, 柱: Sugar-park-I (0.65 \times 30 cm), 流动相: 水, 流速: 0.7 ml/min, 检测器: R2: 8X, 柱温: 90°C。

结 果

(一) 菌株 N16-5 的形态及生理生化特征

自样品中共分离到 60 株嗜碱菌株, 有 22 株产 β -甘露聚糖酶, 其中菌株 N16-5 产酶量较高。该菌在产酶培养基中, 细胞杆状 (0.6—0.8 \times 2.0—5.0 μ m), 革兰氏染色阴性, 周生鞭毛, 运动, 芽孢端生, 椭圆形 (1.0—1.2 \times 1.5—2.0 μ m), 氧化酶阴性, 接触酶阳性。根据 Bergey 氏细菌学鉴定手册^[15], 菌株 N16-5 属于芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属。其具体的分类地位将进一步研究。

(二) 菌株 N16-5 产生 β -甘露聚糖酶的条件

1. 不同碳源对产酶的影响: 改变产酶培养基中碳源种类及浓度, 进行产酶试验, 结果见表 1。凡含甘露聚糖类的底物, 均可作为产酶的碳源, 其中以 2% 的槐豆胶为最好。

2. 不同氮源对产酶的影响: 改变产酶培养基中氮源组成及浓度进行产酶试验, 结果见表 2, 有机氮均可作为菌株 N16-5 产酶的氮源, 其中以 1.5% 的谷氨酸钠为最好。在所采用的无机氮源中, 除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 外, 均不能使菌体产酶。

3. Na_2CO_3 浓度及 pH 对产酶的影响: Na_2CO_3 对许多嗜碱菌的生长是必需的^[11], 并对培养基的 pH 具有一定的缓冲作用。用不同浓度 Na_2CO_3 的产酶培养基进行产酶试验, 结果表明产酶的最适 Na_2CO_3 浓度为 0.8—1.0%, 但在 0.8—1.6% 的范围内对产酶影响不大。

用 1 mol/L NaOH 代替 Na_2CO_3 调节产酶培养基的 pH 进行产酶试验, 结果见图 1。菌株 N16-5 的生长与产酶并非必需 Na_2CO_3 , 只需较高的 pH, 由图 1 看出, 菌体生长和产酶的 pH 范围大致相同, 最适初始 pH 都为 9.7—10.5。

4. 培养温度对产酶的影响: 产酶的温度试验在温度梯度振荡培养器 (ADVANTEC TN-3F) 上进行, 每支 L 型培养管

表 1 不同碳源对产酶的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the enzyme production

碳 源 Carbon sources	浓 度 Conc. (%)	酶 活 力 Activity (u/ml)
葡萄糖 Glucose	1.0	0
甘露糖 Mannose	1.0	0
半乳糖 Galactose	1.0	0
棉子糖 Raffinose	1.0	0
魔芋粉 Konjac powder	0.5	24.1
	1.0	58.6
	2.0	93.8
	3.0	67.8
椰肉粉 Coprameal powder	1.0	44.4
槐豆胶 Locust bean gum	1.0	105.3
	2.0	160.1
	3.0	113.2
瓜豆胶 Guar gum	1.0	12.1
可溶淀粉 Soluble starch	1.0	0

表 2 不同氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on the enzyme production

氮 源 Nitrogen sources	浓 度 Conc. (%)	酶 活 力 Activity (u/ml)
水解酪素 Casamino acid	1.0	57.0
酪蛋白 Casein	1.0	72.6
牛肉汁 Beef extract	1.0	51.4
细菌蛋白胨 Bacteriological peptone	1.0	63.6
多蛋白胨 Polypeptone	1.0	62.8
	2.0	104.4
	3.0	77.5
胰蛋白胨 Tryptone	1.0	88.9
大豆粉 Soybean flour	1.0	62.0
谷氨酸钠 Sodium glutamate	0.5	102.8
	1.0	136.5
	1.5	158.7
	2.0	148.5
尿素 Urea	1.0	60.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	35.7
NH_4Cl	1.0	0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	3.2
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	1.0	0

装产酶培养基 10ml, 温度范围设定为 15—50℃。结果表明, 菌体生长与产酶的温度范围都为 20—45℃, 最适温度都为 32—37℃ (图 2)。

5. NaCl 浓度对产酶的影响: 用一系列不同 NaCl 浓度的产酶培养基进行产酶试验, 结果如图 3, 表明 NaCl 在一定范围内促进菌体生长及酶的产生, 产酶的最适

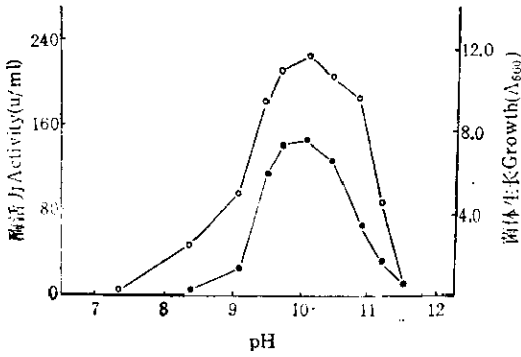


图 1 起始 pH 对产酶的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on the enzyme production

●—● 酶活力 Activity; ○—○ 菌体生长 Growth

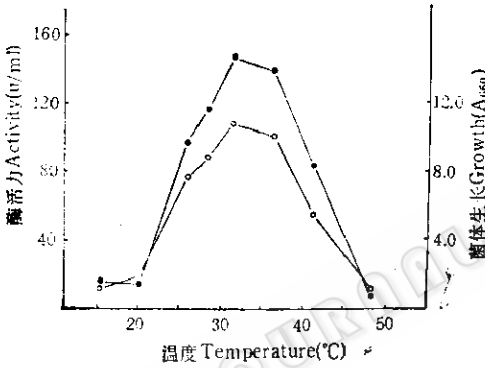


图 2 培养温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the enzyme production

●—● 酶活力 Activity; ○—○ 菌体生长 Growth

NaCl 浓度为 7—10%。

6. 菌体生长与酶产生的关系: 发酵期间, 定时取样 2ml, 进行酶活力、菌体生长及 pH 测定。结果如图 4, 菌株 N16-5 在 24 小时即达到了菌体生长的对数期末期, 生长的停滞期为产酶的高峰期 (24—48 小时), pH 在生长的对数期从 9.7 降至 8.9, 然后又逐渐升高至 9.8。

(三) 粗酶的性质

1. pH 对酶活力及稳定性的影响: 在不同的 pH 条件下测定酶活力, 结果如图 5-a, 该酶在 pH9.0—11.0 之间具有较高的

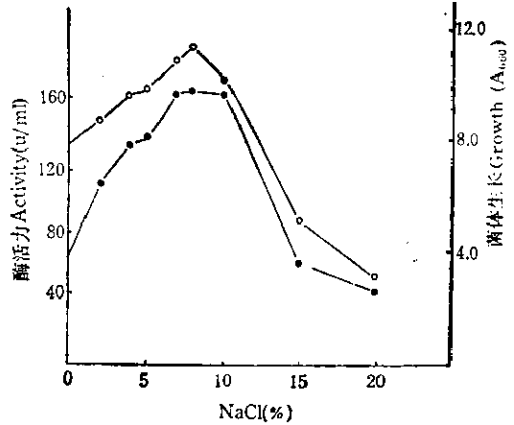


图 3 NaCl 浓度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of NaCl concentration on the enzyme production

●—● 酶活力 Activity; ○—○ 菌体生长 Growth

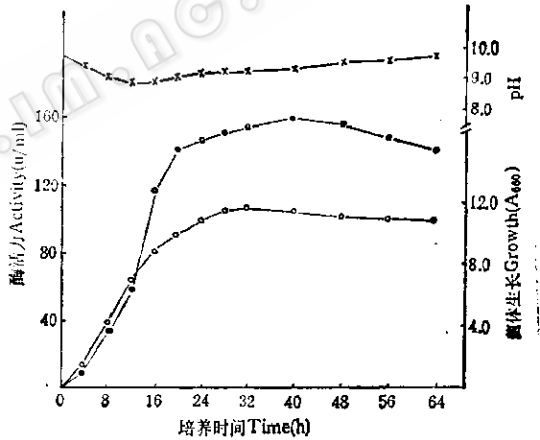


图 4 酶产生的时间过程

Fig. 4 Time course of the enzyme production

●—● 酶活力 Activity; ○—○ 菌体生长 Growth; ×—× pH

酶活力, 最适反应 pH 为 9.5—10.0。将粗酶液在不同 pH 条件下, 于 50°C 保温 30 分钟, 然后测定残余酶活力, 结果如图 5-b, 该酶在 pH9.0—10.0 之间最稳定。

2. 温度对酶活力及稳定性的影响: 在不同的温度下测定酶活力, 结果如图 6-a, 该酶的最适反应温度为 70°C。将酶稀释液 (pH 9.6) 分别在不同温度 (40、50、60 和

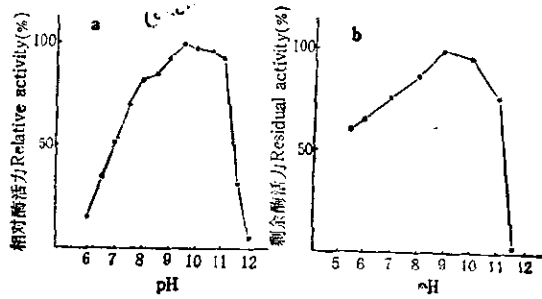


图5 pH对酶活力(a)及稳定性(b)的影响

Fig. 5 Effect of pH on enzyme activity (a) and stability (b)

pH5.0—8.0: 磷酸盐缓冲液 Phosphate buffer (0.2mol/L)

pH8.6—10.0: 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 Gly-NaOH buffer (0.05mol/L)

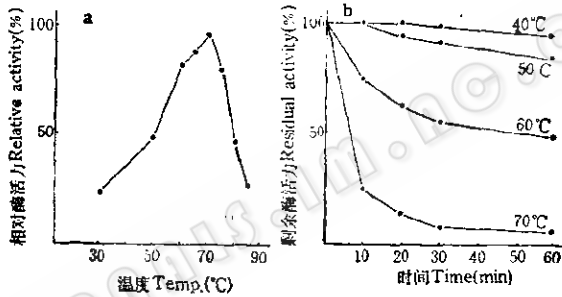
pH11.0—12.0: 磷酸盐-氢氧化钠缓冲液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ buffer (0.05mol/L)

图6 温度对酶活力(a)及稳定性(b)的影响

Fig. 6 Effect of temperature on enzyme activity (a) and stability (b)

70°C)的恒温水浴中保温,结果表明,在此条件下,该酶在40和50°C时都较稳定,70°C保温10分钟,活力剩余26.6%,保温30分钟,酶活力剩余8%(图6-b)。在有底物保护时,酶反应进行1小时完全不失活。

3. Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 离子浓度对酶活力的影响: 分别在不同的离子浓度下测定酶活力,结果表明, Mg^{2+} 在一定浓度下(25 mmol/L)对酶有激活作用,而 Na^+ 、 K^+ 无激活作用。

4. 酶对不同底物的水解产物分析: 高效液相色谱分析表明,该酶水解魔芋粉和槐豆胶的产物均为一系列的寡糖,其中魔芋粉的酶解产物中二糖、三糖和四糖的得率分别为15%、34%和5.5%。

讨 论

细菌的 β -甘露聚糖酶已有很多研究^[2-4,10],但迄今仅有一株嗜碱菌(AM-001)产生碱性 β -甘露聚糖酶的报道^[8],与之相比,菌株N16-5的产酶情况有以下特点:(1)最适碳源为槐豆胶(Locust bean gum);(2)最适氮源为谷氨酸钠;(3)最适NaCl浓度为7—10%。在最适条件下,菌株N16-5产酶可达160 μ /ml,大大高于国外所报道的酶活力水平^[8,10]。该酶的最适反应温度和pH,在迄今所发现的 β -甘露聚糖酶中都是最高的(70°C和pH10.0)。该酶水解魔芋粉和槐豆胶的主要产物,与所报道的 β -甘露聚糖酶一致^[3,12],为一系

列寡糖,表明该酶为内切型酶。另外,该酶也能水解瓜豆胶(Guar gum)、田菁胶(Sesbania gum)及椰肉粉(Coprimeal powder)等,但不能水解酵母甘露聚糖(Yeast mannan),因为酵母甘露聚糖主要为 α -型结构^[16]。

参 考 文 献

- [1] Tipdon, R. S. et al.: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32: 299—316, Academic Press, New York, 1976.
- [2] Emi, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 36: 911—1001, 1972.
- [3] Dekker, R. F. H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 122: 297—299, 1979.
- [4] Araki, T.: *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, 27: 89—98, 1983.
- [5] Takajashi, R. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2189—2195, 1984.
- [6] Civas, A. et al.: *Biochem. J.*, 219: 857—863, 1984.
- [7] Reese, E. T. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 11: 167—183, 1965.
- [8] Akino, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 323—327, 1987.
- [9] Akino, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 52: 773—779, 1988.
- [10] Ratto, M. et al.: *Biotechnol. Letters*, 10: 661—664, 1988.
- [11] Horikoshi, K. et al.: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1982.
- [12] Bernfeld, P.: *Methods in Enzymology*, 1: 149—154, 1955.
- [13] Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 160: 61—68, 1945.
- [14] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153: 375—380, 1944.
- [15] Peter, H. A. Sneath: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, ed. Peter H. A. Sneath, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.
- [16] Corin, P. A. J. et al.: *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 23: 367—417, Academic Press, New York, 1968.

PRODUCTION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE β -MANNANASE

Ma Yanhe Tian Xinyu Zhou Peijin Wang Dazhen

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

An alkalophilic *Bacillus* sp. producing β -mannanase was isolated from Wudunor soda lake of China. The optimal medium for the enzyme production was composed of 2% locust bean gum, 1.5% sodium glutamate, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8% NaCl and 1.0% Na_2CO_3 . The optimal cultivation temperature and initial pH for the enzyme production were 32°C and 10.0

respectively. The optimal pH and temperature for the enzyme reaction were 9.5—10.0 and 70°C, respectively. The hydrolysis products of konjac powder and locust bean gum with the enzyme were a series of oligosaccharides.

Key words

Alkalophilic *Bacillus* sp.; β -Mannanase