

嗜碱芽孢杆菌 N16-5 β -甘露聚糖酶的纯化与性质*

田新玉 徐毅 马延和 周培瑾

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) N16-5 产生的三种胞外碱性 β -甘露聚糖酶 (β -mannanase) 经硫酸铵沉淀、两次 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析、羟基磷灰石吸附柱层析及制备 PAGE 等步骤, 得到了凝胶电泳均一的样品。用 SDS-PAGE 测得纯化的 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 的分子量分别为 51000、38000 和 34700 道尔顿。用 PAGEIEF 测得等电点 pI 分别为 4.3、2.5 和 2.5。酶反应的最适 pH 为 9.0 (M-1) 和 10.0 (M-2 和 M-3); 三种酶的最适温度均为 70℃; 稳定 pH 为 10.0 左右 (M-1 和 M-2)、8.0—10.0 (M-3); M-1、M-2 和 M-3 的稳定温度分别为 40、55 和 50℃。金属离子 Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 Mn^{2+} 对三种酶均有抑制作用。 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 对魔芋葡糖甘露聚糖作用的 K_m 分别为 2.9、1.7 和 12.5 mg/ml, V_{max} 值分别为 27500、47500 和 15700 $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 β -甘露聚糖酶 M-1 水解魔芋葡糖甘露聚糖产生单糖、双糖、三糖和四糖等低聚糖。

关键词 β -甘露聚糖酶; 嗜碱芽孢杆菌

β -甘露聚糖酶 [β -1,4-D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78] 是一种水解甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖 (1 $\rightarrow$ 4) β -D 甘露吡喃糖的酶。已知产生 β -甘露聚糖酶的微生物包括: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[1]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)^[2]、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)^[3]、陆生梭孢菌 (*Thielavia terrestris*)^[4]、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)^[5]、木霉 (*Trichoderma* sp.)^[6] 和链霉菌 (*Streptomyces* sp.)^[7] 等。这些微生物产生的 β -甘露聚糖酶最适 pH 一般在酸性或中性范围。

少数微生物产生的 β -甘露聚糖酶已经纯化, 有几种微生物的甘露聚糖酶被纯化分离出几个组分^[4,8]。1988 年, Akino 等人报道了嗜碱芽孢杆菌产生的碱性 β -甘露聚糖酶^[9]。

自然界合成的化合物中植物半纤维素的数量仅次于纤维素。豆科植物种子、针叶树木材、绿色咖啡豆等都含有大量的甘露聚糖, 一些植物胶, 如田菁胶、角豆胶、魔芋精粉等几乎完全是由半乳糖或葡萄糖与甘露糖组成的甘露聚糖。利用碱性 β -甘露聚糖酶对上述植物材料进行深加工和综合利用具有很大的潜在应用价值。酶反应在碱性条件下进行, 又可以增加半纤维素在水中的溶胀性, 从而利于酶的作用。

本文报道从碱湖分离得到的嗜碱芽孢杆菌所产生的碱性 β -甘露聚糖酶的纯化及性质。

本文于 1991 年 9 月 27 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目

材料和方法

(一) 菌种与培养

从内蒙古自治区乌杜淖碱湖采集泥水样品,经分离、筛选获得产碱性 β -甘露聚糖酶的菌株 N16-5,经鉴定为嗜碱芽孢杆菌(*Alkalophilic Bacillus*)。产酶用培养基组成为(g/L):角豆胶(Locust bean gum) 15.0,有机氮 15.0,酵母膏 2.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 80.0, Na_2CO_3 10.0(分别灭菌)。500ml 三角瓶装 100 ml 上述培养基,灭菌后接种,于 37℃,220r/min 摇床振荡培养 48 小时,收集培养液。

(二) 主要仪器及试剂

J2-21 高速离心机及 DU-7 型紫外分光光度计(Beckman), DEAE-Sephadex A-25, 载体两性电解质和已知分子量标准蛋白质(Pharmacia), 羟基磷灰石(中国科学院生物物理研究所), 魔芋精粉(四川成都生物所公司)和角豆胶(Sigma)。其他试剂均为分析纯。

(三) 酶活力测定

β -甘露聚糖酶活力参照 Akino 的方法测定^[9]。以 0.5ml, 0.5%(W/V) 角豆胶作底物(用 pH10.0, 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液配制), 加入 0.1ml 稀释酶液, 70℃ 保温 10 分钟, 用二硝基水杨酸试剂测产生的还原糖。定义在上述反应条件下, 每分钟释放 1 μ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

(四) 蛋白质测定

按 Bradford 方法^[9]或测定 A_{280} , 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

(五) 电泳分析

盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)参照 Davis 方法^[10], 分子量测定用 SDS-凝胶电泳法和梯度凝胶电泳方法^[11,12], 测等电点用薄层等电聚焦电泳(PAGEIEF)方法^[13]。

(六) 甘露聚糖水解产物的检测

β -甘露聚糖酶 M-1 降解魔芋葡萄甘露聚糖的产物在新华 1 号滤纸上进行纸层析, 溶剂系统: 正丁醇:吡啶:水 = 6:4:3 (v/v), 用 $AgNO_3$ 试剂浸湿法显色。

结 果

(一) 碱性 β -甘露聚糖酶的纯化

1. 硫酸铵沉淀: 培养液于 4℃, 10000 $\times$ g 离心 30 分钟, 除去菌体, 于上清液中缓慢加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4℃ 静置过夜, 离心, 沉淀物溶于少量缓冲液(pH8.0, 0.05mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) 中, 并对同样缓冲液透析。

2. DEAE-Sephadex A-25 柱层析: 将透析酶液(72ml) 加到预先用上述缓冲液平衡过的 DEAE-Sephadex A-25 层析柱(ϕ 2.6 $\times$ 30cm) 上端, 用缓冲液洗至 A_{280} 不变, 改用以同样缓冲液配制的 0—0.4mol/L NaCl (各 500ml) 梯度洗脱, 流速 10ml/10min, 分部收集, 分别测定酶活力和 A_{280} , 合并酶活性峰(45—75 管)并于 4℃ 对缓冲液透析。按同样方法进行第二次 DEAE-Sephadex A-25 柱层析, 结果示于图 1。

3. 羟基磷灰石柱层析: 将上步酶加到预先用 pH8.0, 0.01mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4

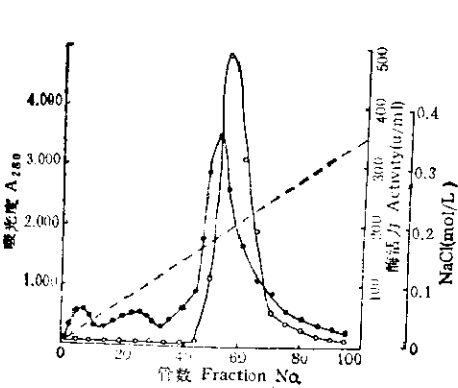


图1 β -甘露聚糖酶的第二次 DEAE-Sephadex A-25 柱层析图

Fig. 1 Second chromatography of the β -mannanases on DEAE-Sephadex A-25 column
●—● A_{280} ; ○—○ Activity; ——— NaCl concentration

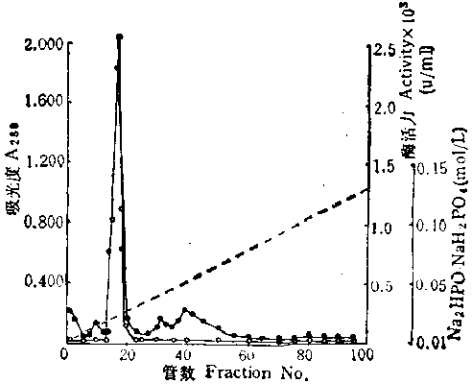


图2 β -甘露聚糖酶羟基磷灰石柱层析图

Fig. 2 Chromatography of the β -mannanases on hydroxyapatite column
●—● A_{280} ; ○—○ Activity

缓冲液平衡过的羟基磷灰石柱层析柱($\phi 1.0 \times 19\text{cm}$)上端,然后用10 ml 上述缓冲液洗涤,至 A_{280} 不变,改用离子梯度 $0.01\text{--}0.15\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ (各250ml)洗脱,流速 10ml/h ,30分钟收集一管,分别测定酶活力和 A_{280} ,根据酶活力收集14—20管洗脱液(图2),并对 $\text{pH}8.0$, 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液透析,然后用Sephadex G-15干粉浓缩至 2.0ml 。上述各步提纯结果列于表1。

表1 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 β -甘露聚糖酶的纯化

Table 1 Purification of β -mannanases from alkalophilic *Bacillus* N16-5

步骤 Step	体积 Volume (ml)	总酶活力 Total activity $\times 10^3(\text{u})$	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (u/mg)	收率 Recovery (%)	提纯倍数 Purification (fold)
粗酶液 Extract	2690	779	2277	342	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Precipitation	72	539	420	1283	69	3.7
DEAE-Sephadex A-25 chromatography	325	133	81	1641	17	4.7
DEAE-Sephadex A-25 chromatography	350	63	28	2257	8.1	6.6
Hydroxyapatite	34	50	8.6	5895	6.5	17.2

4. PAGE 制备及酶的纯度:上述浓缩酶液经 Disc-PAGE 检测表明有三条具有 β -甘露聚糖酶活性的蛋白带(图3)。用厚的平板 PAGE ($3 \times 100 \times 300\text{mm}$) 制备电泳进一步纯化了三种 β -甘露聚糖酶组份,从胶板上切下具酶活力的蛋白带,用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液提取,分别获得 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3。这三种 β -甘露聚糖酶在 Disc-PAGE 上均为一条带(图3)。

(二) 酶的基本性质

1. 酶的分子量:用 SDS-PAGE 和浓度梯度(4—30%) PAGE 测定分子量。电泳后

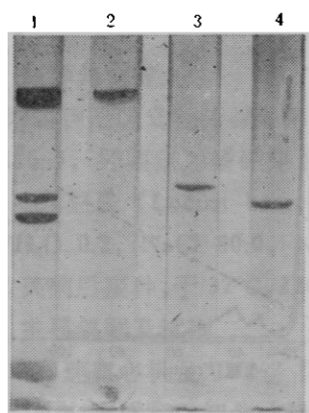


图3 纯化酶的电泳图谱

Fig. 3 Disc-PAGE of the purified enzymes

1. 羟基磷灰石柱层析 Hydroxyapatite chromatography; 2. β -mannanase M-1; 3. β -mannanase M-2; 4. β -mannanase M-3

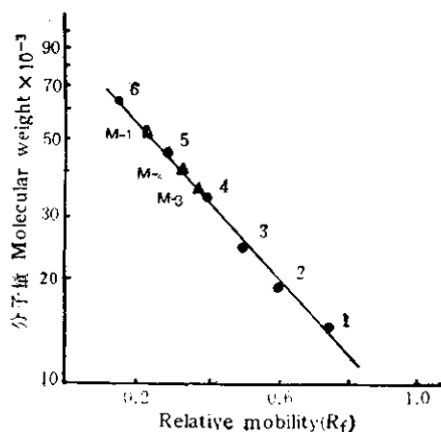
图4 SDS-PAGE 测定 β -甘露聚糖酶分子量

Fig. 4 Determination of molecular weight

of β -mannanases by SDS-PAGE

1. Lysozyme (14300); 2. β -lactoglobulin (18400); 3. Trypsinogen (24000); 4. Pepsin (34700); 5. Albumin (45000); 6. Albumin Bovine (66000)

不同蛋白分子量对数对 R_f 值作图(图4), 求出 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 的分子量分别为 51000、38000 和 34700 道尔顿。两种方法测得酶的分子量相近, 因而表明 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 均由一条肽链组成。

2. 酶的等电点: 由薄层凝胶等电聚焦法测得 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 的等电点 pI 分别为 4.3、2.5 和 2.5。

3. pH 和温度对酶活力和稳定性的影响: 在 pH 4.0—12.0 的缓冲液 (pH 4.0—5.0, 0.05 mol/L 醋酸-醋酸钠; pH 6.0—8.0, 0.05 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 ; pH 9.0—10.5, 0.05 mol/L 甘氨酸- NaOH ; pH 11.0—12.0, 0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaOH) 中按常规方法测定酶活力, pH-活力曲线如图 5-A, β -甘露聚糖酶 M-1 的最适 pH 为 9.0, 而 M-2 和 M-3 在 pH 10.0 表现出最大酶活力。

在不同温度, 按常规法测定 β -甘露聚糖酶活力, 获得温度-活力曲线, β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 的最适温度均为 70°C (图 5-B)。

测定酶的 pH 稳定性是将酶液与上述不同 pH 缓冲液在 50°C 保温 30 分钟, 然后按常规方法测定酶活力。结果(图 5-C) 表明 β -甘露聚糖酶 M-1 和 M-3 在 pH 10.0 时最稳定, M-2 稳定 pH 范围在 8.0—11.0, 酶活力保持 95%—100%, 低于 pH 8.0 酶不稳定。

酶的热稳定性测定是将酶液在不同温度下保温 30 分钟, 然后按常规方法测定酶活力。结果(图 5-D) 表明 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2 和 M-3 稳定温度分别为 30—40°C, 30—55°C 和 30—50°C, 80°C 时三种酶均完全失活。

4. 金属离子对酶活力的影响: 用 1×10^{-3} mol/L 的金属离子溶液(除 AgNO_3 和醋酸铅外其他均为金属氯化物)与酶液在 37°C 保温 30 分钟, 然后按常规方法测定酶活力, 以未加入金属离子的酶活力作为 100%。 Ag^+ , Hg^{2+} 和 Mn^{2+} 对 β -甘露聚糖酶 M-1、M-2

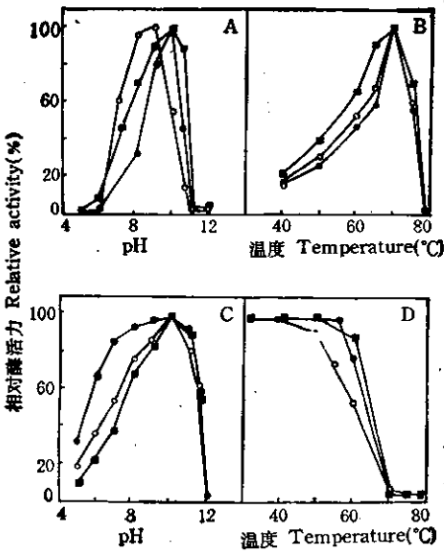


图5 pH和温度对 β -甘露聚糖酶活力和稳定性的影响
Fig. 5 Effects of pH and temperature on activities and stabilities

(A) 不同pH酶活力 Enzyme activities at various pH; (B) 不同温度酶活力 Enzyme activities at various temperatures; (C) 不同pH下酶稳定性 Enzyme stabilities at various pH; (D) 不同温度下酶稳定性 Enzyme stabilities at various temperatures
○—○ M-1; ●—● M-2; ■—■ M-3

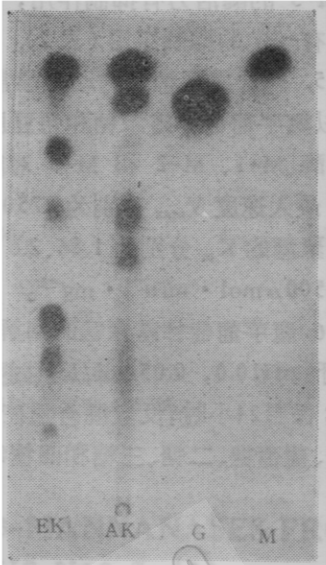


图6 β -甘露聚糖酶 M-1 水解魔芋多糖产物的纸层析图谱

Fig. 6 Paper chromatogram of the products from konjak by the enzyme M-1

EK: 酶解魔芋多糖产物 Products from konjak by the enzyme M-1;
AK: 酸解魔芋多糖产物 Products from konjak by acid
G: Glucose; M: Mannose

表2 金属离子对 β -甘露聚糖酶活力的影响

Table 2 Effect of various metal ions on β -mannanase activity

金属离子 Metal ion (1.0mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)		
	M-1	M-2	M-3
—	100	100	100
Cu ¹⁺	105	104	108
Pb ²⁺	101	86.1	102
Ni ²⁺	100	87.1	80.3
Ca ²⁺	94.4	92.7	97.6
Mg ²⁺	92.3	86.4	100
Sn ²⁺	87.7	90.9	92.2
Zn ²⁺	79.9	87.5	68.4
Fe ²⁺	78.3	84.3	95.2
Co ²⁺	59.2	98.9	100
Cd ²⁺	54.2	79.8	62.5
Mn ²⁺	36.0	31.9	32.7
Hg ²⁺	26.6	24.3	16.6
Ag ⁺	17.5	35.4	28.5

和 M-3 的酶活力有抑制作用; Cd^{2+} 和 Co^{2+} 对 M-1、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对 M-3 的酶活力也有一定的抑制作用(表 2)。

5. β -甘露聚糖酶的动力学常数: 在 pH 10.0 的 0.05 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中,以魔芋葡萄甘露聚糖和角豆胶半乳甘露聚糖为底物,用 Lineweaver-Burk 作图法求得三种酶 M-1、M-2 和 M-3 对魔芋葡萄甘露聚糖的 K_m 值分别为 2.9、1.7 和 12.5 mg/ml; 最大速度 $V_{\max}$ 分别为 27500、47500 和 15700 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。对角豆胶半乳甘露聚糖的 K_m 分别为 1.86、2.6 和 2.1 mg/ml; 最大反应速度 $V_{\max}$ 分别为 29000、81100 和 6500 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

6. 魔芋葡萄甘露聚糖的酶解产物: 1.0ml 1% (W/V) 的魔芋葡萄甘露聚糖溶液(溶于 pH10.0, 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中),加入 0.1ml M-1 酶液(10u),于 50℃ 保温24小时,反应混合物在新华 1 号滤纸上进行纸层析(图 6),反应的主要产物为甘露糖、葡萄糖、二糖、三糖和四糖等低聚糖。

讨 论

微生物产生的半纤维素酶的一个明显特点是含有几个降解底物的酶组份,真菌陆生梭孢菌 *T. terrestris* 产生 5 种降解甘露聚糖的酶^[1];嗜碱芽孢杆菌 AM001 产生的 β -甘露聚糖酶有三个分子量不同的酶组份^[9],而嗜碱芽孢杆菌 N16-5 至少产生三种分子量不同的 β -甘露聚糖酶。

纯化的 *Bacillus* N16-5 的 β -甘露聚糖酶与其他 *Bacillus* 菌株 β -甘露聚糖酶性质的比较列于表 3。可以看出菌株 N16-5 的三种 β -甘露聚糖酶最适 pH 范围在 9.0—10.0, *Bacillus* AM001 的酶最适 pH 为 8.5—9.0^[9],枯草芽孢杆菌的酶为 6.0^[1],而一些真菌 β -甘露聚糖酶最适 pH 更低,一般在 pH 3.0—5.5^[4]。

Bacillus N16-5 的 β -甘露聚糖酶最适温度为 70℃,高于其他两株芽孢杆菌的酶的最适温度。*Bacillus* AM001 酶的等电点 pI 范围为 5.1—5.9, *B. subtilis* 的酶为 5.2,而 *Bacillus* N16-5 的 β -甘露聚糖酶的等电点 pI 范围在 4.3—2.5, M-2 和 M-3 的等电点 2.5,是迄今报道的 β -甘露聚糖酶中最低的。

β -甘露聚糖酶 M-1 水解魔芋甘露聚糖的主要产物为单糖、二糖、三糖和四糖等低聚糖。这些糖的定量分析以及该酶应用的可能性正在进一步研究中。

表 3 不同芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶性质的比较

Table 3 Some properties of β -mannanases from different *Bacillus* strains

菌株 Strain	<i>B. subtilis</i> ^[1]	<i>Bacillus</i> AM 001 ^[9]	<i>Bacillus</i> N16-5
最适 Optimum pH	6.0	8.5—9.0	9.0—10.0
稳定 Stability pH	5.0—9.0	7.0—9.0	8.0—10.0
最适温度 Optimum temperature (°C)	60	60	70
失活温度 Temperature for inactivity (°C)	80	80	80
等电点 pI	5.2	5.9—5.1	4.3—2.5
分子量 Molecular weight ($\times 10^3$)	22	58—42	51—34.7

参 考 文 献

- [1] Emi, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 36: 991—1001, 1972.
[2] Ratto, M. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 10: 651—664, 1988.
[3] Robert, F. H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 122: 297—299, 1979.
[4] Araujo, A. et al.: *J. Ind. Microbiol.*, 6: 269—274, 1990.
[5] Park, G. G. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2709—2716, 1987.
[6] Reese, E. T. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 11: 167—193, 1965.
[7] Takahashi, R. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2943—2950, 1984.
[8] Akino, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 52: 773—779, 1988.
[9] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72: 248—254, 1976.
[10] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427, 1964.
[11] Laemmli, V. K.: *Nature*, 227: 680, 1970.
[12] 张龙翔等: 生化试验方法和技术, 第 119—124 页, 高教出版社, 北京, 1981 年。
[13] 杨寿钧: 酶学研究技术(张树政等主编), 第 195—200 页, 科学出版社, 北京, 1987 年。

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β -MANNANASES FROM ALKALOPHILIC *BACILLUS* N16-5

Tian Xinyu Xu Yi Ma Yanhe Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Three extracellular alkline β -mannanases from an alkalophilic *Bacillus* N16-5 were purified to electrophoretic homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, DEAE-Sephadex A-25 chromatography, hydroxyapatite chromatography and preparative electrophoresis. Molecular weights and pI values of the β -mannanases (M-1, M-2 and M-3) were 51000, 38000 and 34700 by SDS-PAGE and 4.3, 2.5 and 2.5 by PAGEIEF, respectively.

The optimum pH for enzyme catalysis were 9.0 for M-1 and 10.0 for M-2 and M-3, respectively. All of three enzymes were the most active at 70°C. The activities of three enzymes were strongly inhibited by Ag^{1+} , Hg^{2+} and Mn^{2+} . Michaelis constants (K_m) of the enzyme M-1, M-2 and M-3 for mannanase from konjak were 2.9, 1.7 and 12.5 mg/ml, maximum velocities ($V_{\max}$) for the saccharide were 27500, 47500 and 15700 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. Konjak was hydrolyzed by the enzyme M-1, and major components in digests were mono-, di-, tri- and tetra-saccharides.

Key words β -mannanase; Alkalophilic *Bacillus*