

枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及性质

崔福绵 石家骥 鲁茁壮^①

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 由土壤中分离出一株产中性 β -甘露聚糖酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ,编号 BM9602。该菌在液体培养条件下 ,产生中性 β -甘露聚糖酶。多糖能作为碳源 ,而单糖不能作为碳源 ;有机氮源优于无机氮源。产酶最适培养基组成 :魔芋粉 4% ,牛肉蛋白胨和酵母膏各 1%。产酶最适培养条件 :培养基起始 pH8.5 ,35℃ ,振荡培养 36 h。以槐豆胶为底物 ,培养滤液中性 β -甘露聚糖酶活力为 96IU/mL。酶在 pH5.0~10.0 和 50℃ 下稳定 ,作用最适条件为 pH6.0 和 50℃ ,水解魔芋粉和槐豆胶均产生寡聚糖。

关键词 中性 β -甘露聚糖酶 ,枯草芽孢杆菌 ,产生及性质

分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)01-0060-63

甘露聚糖为参与维持人体正常肠道条件的双歧杆菌和乳细菌的一种最好的生长因子^[1]。这一发现促进了对 β -甘露聚糖酶的研究。国内继马延和^[2]、田新玉^[3]和杨文博^[4,5]报道嗜碱芽孢杆菌(*Alkaliphilic Bacillus* sp.)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)所产碱性 β -甘露聚糖酶(Alkaline β -mannanase)的研究之后 ,我们研究了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BM9602 中性 β -甘露聚糖酶(Neutral β -mannanase)的产生。该菌在液体培养条件下产酶迅速 ,培养周期短 ,并且所产酶在中性条件下具有将甘露聚糖水解释生成寡聚糖的能力。本文报道该菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及一般性质。

1 材料和方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BM 9602 ,本实验室中分离得到。菌在含蛋白胨 1% ,牛肉膏、酵母膏、葡萄糖和氯化钠均为 0.5% 的琼脂斜面培养基上 ,35℃ 培养 12 h 后使用。

1.2 液体种子的制备

250 mL 三角瓶装 30 mL 含魔芋粉、牛肉蛋白胨和酵母膏均为 1% 的液体培养基(起始 pH7.0) , 1×10^5 Pa 灭菌 30 min ,接种斜面菌一环 ,35℃ 旋转式摇床上振荡(280r/min) 培养 12 h 后使用。

1.3 酶的制备

250 mL 三角瓶装 30 mL 含魔芋粉 4% ,牛肉蛋白胨和酵母膏均为 1% 的液体培养基(起始 pH8.5) ,同上灭菌后接液体种子悬液 1.5 mL ,同上条件培养 36 h。培养滤液即

^①北京师范大学生物系生物化学专业 1997 届毕业实习学生

收稿日期 :1997-08-29 ,修回日期 :1998-03-02

为中性 β -甘露聚糖酶溶液。

1.4 中性 β -甘露聚糖酶活力的测定

吸取 0.5% 槐豆胶 (Sigma 公司产品) 胶状液 (以 0.05mol/L, pH6.0 磷酸缓冲液为溶剂配制) 0.9 mL 于试管中, 50°C 水浴中预热 5 min, 加入适当稀释的酶液 0.1 mL, 保温 10 min。采用 Somogyi^[6] 试剂法测定水解产生的还原糖。

在上述条件下, 每分钟由底物释放出 $1\mu\text{mol}$ 还原糖 (以甘露糖计) 所需酶量定义为一个酶活力单位 (IU)。

2 结果和讨论

2.1 酶的产生条件

2.1.1 碳源对产酶的影响: 分别以不同量的单糖和甘露聚糖为碳源进行产酶实验。试验

结果表明, 甘露糖、半乳糖、葡萄糖和阿拉伯糖 4 种单糖作为碳源, 该菌不产酶。选每种聚糖最适用量的酶活力数据列于表 1。魔芋粉效果

最佳, 当用量为 4% 时, 酶活力达 96IU/mL。

2.1.2 氮源对产酶的影响: 比较了不同量的 5 种有机氮源和 4 种无机氮源对产酶的影响。选每种氮源最适用量的酶活力数据列于表 2。除尿素外, 其它有机氮源优于无机氮源。最适氮源为牛肉蛋白胨。在酶大量生产中, 兼顾生产成本, 可选择铵盐作为氮源。

表 2 氮源对产酶的影响

Table 2 Effect of various nitrogen sources on the production of neutral β -mannanase

氮源及用量 Nitrogen source/%	酶活力 Activity/(IU/mL)	氮源及用量 Nitrogen source/%	酶活力 Activity/(IU/mL)
尿素 Urea 0.1	63	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3	75
谷氨酸钠 Sodium glutamate 1.0	82	NH ₄ Cl 0.3	75
多肽 Polypeptone 1.0	89	NH ₄ NO ₃ 0.3	75
大豆蛋白胨 Soytone 1.0	90	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.3	79
牛肉蛋白胨 Beef peptone 1.0	96	Control	0

2.1.3 酵母膏用量对产酶的影响: 试验不同量酵母膏对产酶的影响。由表 3 可以看出, 随着酵母膏用量的增加, 酶活力相应增高。用量为 1% 时, 酶活力最高。

2.1.4 pH 对产酶的影响: 将培养基起始 pH 调至不同值, 进行培养。结果见表 4。产酶适宜起始 pH 为 8.0~9.0, 最适为 8.5。

2.1.5 温度对产酶的影响: 于不同温度条件下进行培养。由表 5 可见, 产酶适宜温度范围较宽 (33~37°C), 最适为 35°C。

表 3 酵母膏用量对产酶的影响

Table 3 Effect of concentrations of yeast extract on the production of neutral β -mannanase

酵母膏用量 Yeast extract/%	0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25
酶活力 Activity/(IU/mL)	18	42	60	81	96	96

2.1.6 产酶时间过程 :于不同培养时间取样,测定酶活力。表6结果表明,该菌产酶迅速,培养周期短。培养12 h酶活力已达47IU/mL,为最高酶活力96IU/mL的49%。培养36 h达到最高峰。比文献报道枯草芽孢杆菌^[7,8]产中性 β -甘露聚糖酶、嗜碱芽孢杆菌^[1,2]产碱性 β -甘露聚糖酶培养时间均短。

2.2 酶的一般性质

2.2.1 酶作用最适 pH :于不同 pH 条件下进行酶反应。图1结果表明,酶作用适宜 pH 为 5.5~6.5,最适为 pH6.0。

2.2.2 酶作用最适温度 :于不同温度条件下进行酶反应。由图2可以看出,酶作用适宜温度为 45℃~55℃;最适温度为 50℃。

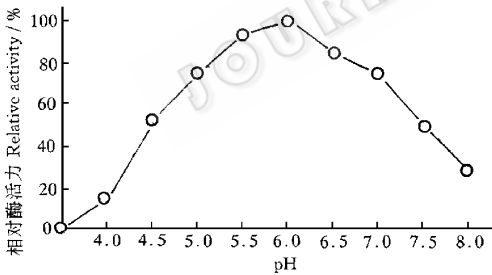


图1 pH对酶作用的影响

Fig.1 Effect of pH on the enzyme activity

表4 pH对产酶的影响

Table 4 Effect of pH on the production of neutral β -mannanase

培养基起始 pH Initial pH	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
酶活力 Activity/(IU/mL)	64	72	80	87	94	96	91	60	20

表5 温度对产酶的影响

Table 5 Effect of temperature on the production of neutral β -mannanase

培养温度 <i>t</i> /°C	25	28	30	33	35	37	40
酶活力 Activity/(IU/mL)	46	71	82	92	96	94	51

表6 产酶的时间过程

Table 6 Time course of neutral β -mannanase production

培养时间 <i>t</i> /h	6	12	18	24	30	36	40
酶活力 Activity/(IU/mL)	24	47	71	88	91	96	96

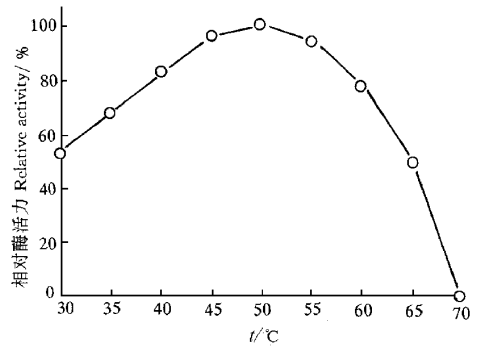


图2 温度对酶作用的影响

Fig.2 Effect of temperature on the enzyme activity

2.2.3 pH对酶稳定性的影响 :将酶于不同 pH 的缓冲液中,40℃保温4 h。图3测定结果表明,酶稳定 pH 范围较宽,为 5.0~10.0。

2.2.4 温度对酶稳定性的影响 :酶于 0.05mol/L, pH6.0 的磷酸缓冲液中,在不同温度保温 15min。由图4测定结果可以看出,该酶热稳定性较差,60℃保温 15min,酶活力仅剩余 22%。

2.2.5 酶水解魔芋粉和槐豆胶 :取 0.5% 的魔芋粉和槐豆胶胶状液(用蒸馏水配制,调 pH6.0)10mL 于试管中,各加纯酶 60IU,45℃保温 16h。水解液除去残渣及剩余多糖并浓缩后经硅胶板层析。层析结果表明,该酶水解甘露聚糖生成寡聚糖。

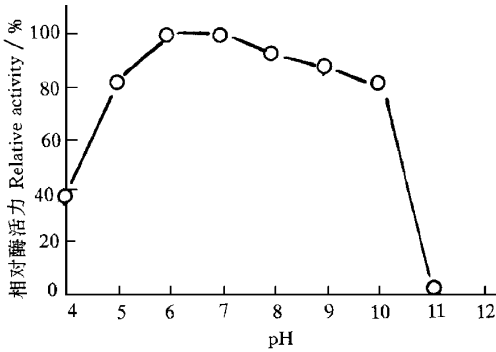


图3 酶的 pH 稳定性

Fig. 3 Effect of pH on the stability of enzyme

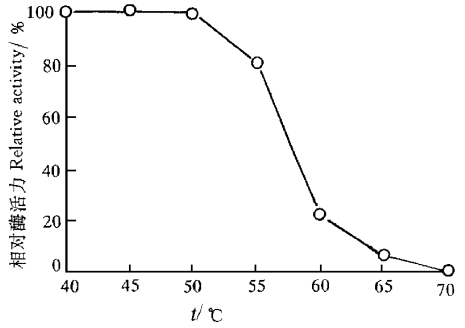


图4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the stability of enzyme

致谢 周慧玲教授鉴定菌种,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(3):773~779.
- [2] 马延和, 田新玉, 周培瑾等. *微生物学报*, 1991, **31**(6):443~448.
- [3] 田新玉, 徐毅, 马延和等. *微生物学报*, 1993, **33**(2):115~121.
- [4] 杨文博, 沈庆, 佟树敏. *微生物学通报*, 1995, **22**(3):154~157.
- [5] 杨文博, 佟树敏, 沈庆等. *微生物学通报*, 1995, **22**(4):204~207.
- [6] Somogyi M. *J Biol Chem*, 1952, **195**(1):19~23.
- [7] Emi S, Fukumoto J, Yamamoto T. *Agric Biol Chem*, 1972, **36**(6):991~1001.
- [8] Emi S, Fukumoto J, Yamamoto T. *Agric Biol Chem*, 1971, **35**(12):1891~1898.

PRODUCTION OF NEUTRAL BATA-MANNANASE BY *BACILLUS SUBTILIS* AND ITS PROPERTIES

Cui Fumian Shi Jiaji Lu Zhuozhuang

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

Abstract Neutral β -mannanase was produced by *Bacillus subtilis* BM9602 isolated from a soil. For this strain the neutral β -mannanase was produced only when polysaccharides were used as a carbon source. Organic nitrogen source was superior to inorganic nitrogen source on the enzyme production. The optimum liquid medium consisted of 4% konjak powder, 1% each of beef peptone and yeast extract. The optimum culture conditions were initial pH 8.5, temperature 35°C and cultivation time 36h. Enzyme activity of culture filtrate to 0.5% galactomannan polysaccharide was 96 IU/mL per minute at pH 6.0 and 50°C for 10min. The optimum pH and temperature for enzyme action were 6.0 and 50°C respectively. The enzyme was stable below 50°C and pH 5.0~10.0. The enzyme hydrolyzed konjak powder and locust bean gum to form oligosaccharides.

Key words Neutral β -mannanase, *Bacillus subtilis*, Production and properties