

一株产甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶的纯化与性质

廖婷婷^{1,2}, 翟磊^{1,2}, 高成华^{1,2}, 薛燕芬¹, 马延和^{1*}

¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

² 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 【目的】筛选性能良好的产碱性甘露聚糖酶的菌株, 对菌株进行多项分类鉴定, 分离纯化所产甘露聚糖酶并进行性质研究。【方法】利用碱性魔芋粉培养基分离纯化产甘露聚糖酶的嗜碱菌, 通过形态特征观察、生理生化测定、16S rRNA 序列分析等实验确定菌株的分类地位。利用硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和分子筛层析得到电泳纯的酶, 分析了酶的最适温度、最适 pH、温度和 pH 稳定性、NaCl 以及金属离子等的耐受性。【结果】从我国内蒙古碱湖样品中分离得到一株产碱性甘露聚糖酶的菌株 HMTS15, 经过多项分类鉴定显示其是与 *Bacillus agaradhaerens* DSM 8721 不同的新菌株。菌株 HMTS15 所产的甘露聚糖酶反应的最适 pH 为 10.0, 最适温度 75 °C。【结论】多项分类结果鉴定菌株为 *Bacillus agaradhaerens* HMTS15。该菌株产生的碱性甘露聚糖酶与同类其他来源的酶相比具有更好的热稳定性和 pH 适应性, 有进一步的研究价值。

关键词: 嗜碱芽胞杆菌, 碱性甘露聚糖酶, 多项分类, 纯化, 性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1520-07

甘露聚糖是地球上含量仅次于木聚糖的一类半纤维素, 广泛存在于木材和各种植物组织中^[1]。甘露聚糖是通过 β -1,4-D-甘露糖连接成线状多聚体, 在多糖的侧链上主要有葡萄糖基、半乳糖基等取代基, 从而形成甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖等^[2]。 β -甘露聚糖酶能够水解甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖等以 β -1,4-D-甘露吡喃糖为主链的甘露聚糖, 是甘露聚糖水解中最关键的一类酶^[1]。目前细菌^[3]、真菌^[4]、植物^[5]、动物^[6]来源的甘露聚糖酶均已得到了不同程度的研究, 并将其广泛应用于食品、医药、造纸、饲料、石油破胶及精细化工等领域^[7]。

目前已有低成本、高活力的甘露聚糖酶成功的应用于工业生产, 而饲料业、造纸业、石油破胶等行

业中, 不仅需要高活力的酶, 还需要酶在酸性环境、碱性环境或高温条件下保持稳定的酶学特性。极端微生物来源的甘露聚糖酶由于能够在特定的苛刻条件下保持稳定并发挥较大的酶活而引起了研究者们极大的兴趣^[3]。本文主要就生产碱性 β -甘露聚糖酶的极端微生物进行分离筛选, 从内蒙古哈马太盐碱湖中筛选到了一株产碱性甘露聚糖酶性质良好的菌株 HMTS15。对菌株 HMTS15 进行了多项分类的研究, 对其所产甘露聚糖酶进行分离纯化并对纯酶的性质进行了研究。该菌株所产的甘露聚糖酶在高温、高盐、碱性条件下具有较高的酶活, 并且表现出来较好的温度稳定性和广泛的 pH 稳定性, 为工业用酶的开发以及极端来源甘露聚糖酶嗜碱机制的后续研究提供了材料和科学依据。

基金项目: 中国科学院创新项目 (KSCXZ-EW-G-3)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807590; Fax: +86-10-64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

作者简介: 廖婷婷 (1983-), 女, 新疆人, 硕士研究生, 主要从事极端甘露聚糖酶的研究。E-mail: zjuliaott@gmail.com

收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-05-13

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基:嗜碱菌 HMTS15 为本实验室分离自中国内蒙古哈马太盐碱湖(盐度 8.5%, pH 为 9.93)。基础培养基: Yeast extract 5 g, Polypeptone 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 50 g, 蒸馏水 900 mL, 高温灭菌后加入灭过菌的 10% Na_2CO_3 100 mL。产酶培养基: 在基础培养基中加入瓜尔豆胶 5 g/L, 其余成分同基础培养基, 高温灭菌后加入无菌的 10% Na_2CO_3 。

1.1.2 主要试剂和仪器:瓜尔豆胶购自美国西格玛奥德里奇公司; 槐豆胶购自美国西格玛公司; Protein Assay 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。Axioskop 40 相差显微镜购自德国 ZEISS 公司; DU800 分光光度计购自美国贝克曼公司; AKTA FPLC 快速蛋白液相色谱系统购自美国安玛西亚公司; Bio-Rad PowerPac 200 蛋白电泳仪购自美国伯乐公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 菌株多项分类鉴定

1.2.1 形态学特征: KOH 法确定菌株的革兰氏反应。相差显微镜观察菌体形态、大小。

1.2.2 生长特征: 在 4 °C - 50 °C 范围内测定菌株 HMTS15 在各个温度下的生长量; 在最适生长温度下, 测定菌株在不同 pH 培养基中的生长量; 在最适生长温度和最适 pH 条件下, 测定不同 NaCl 浓度下菌株的生长量。菌株的生长量以 OD_{600} 表征。

1.2.3 生理生化特征: 参照文献方法 [8] 测定了 HMTS15 菌株的氧化酶、过氧化氢酶、酯酶、酪素、淀粉酶、明胶水解、硫化氢产生、吲哚产生以及硝酸盐和亚硝酸盐还原性质。

1.2.4 糖醇利用: 在基础培养基中加入 10 g/L 的糖醇, 接种后振荡培养 2 d 后测定菌液吸光度 (OD_{600}), 与基础培养基相比较, 吸光值加倍或更多为阳性, 吸光值增加不足 1 倍为弱阳性, 其余为阴性。

1.2.5 16S rRNA 基因序列分析: 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行菌落 PCR, 引物序列如下: 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3'; 1492r: 5'-ACGGCAACCTTGTTACGAGTT-3'。PCR 产物送测序, 将得到的序列用 GenBank 中的 BLAST 进行比对分析。

1.2.6 DNA 的 G + C mol% 含量测定: 基因组 DNA 的提取参照 Kim^[9] 所述方法进行, G + C mol% 含量测定采用热变性温度法 (T_m 值法)。

1.3 酶的检测

1.3.1 甘露聚糖酶活力的测定: DNS 法测定酶活^[10], 底物为 0.5% 的槐豆胶, 反应时间 10 min。酶活力单位定义为: 每分钟释放 1 μ mol 甘露糖所需的酶量。

1.3.2 蛋白含量测定: 使用 Bio-Rad Protein Assay 试剂盒进行测定, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3.3 SDS-PAGE: 参照汪家政等^[11] 的方法。

1.3.4 活性电泳: 蛋白样品无需煮沸直接上样。按常规电泳方法在 4 °C 环境中电泳。完毕后漂洗。之后将胶覆盖于含 0.5% 魔芋粉的固体培养基表面, 60 °C 保温 15 min 左右, 取出后将固体培养基置于 0.1% 的刚果红溶液中染色 10 min, 再转入 1 mol/L 的 NaCl 溶液中清洗。背景为红色, 甘露聚糖酶存在的区域显示为一条无色透明条带。

1.4 酶的分离纯化

1.4.1 粗酶液制备: 将新鲜菌液按 1% 的接种量接入 500 mL 产酶培养基中, 37 °C、200 r/min 摇瓶培养 66 h, 11000 \times g 离心 10 min, 上清即为粗酶液。

1.4.2 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀: 粗酶液中加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4 °C 静置过夜。10000 \times g 离心 15 min, 将沉淀溶解于 pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, HiTrap desalting 脱盐柱脱盐。

1.4.3 离子交换层析: 将脱盐后的酶液加到用 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 充分平衡的 DEAE 阴离子交换柱上 (DEAE 柱料为 GE 公司产品), 然后用 Tris-HCl 缓冲液平衡, 之后用 0 - 1.0 mol/L NaCl (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 进行梯度洗脱, 流速为 2 mL/min, 合并含有甘露聚糖酶活力的组分。

1.4.4 凝胶过滤: 将上述所得活力组分用超滤离心管浓缩至 500 μ L。然后将样品加到 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 预平衡的 Superdex 200 10/300 GL 柱 (GE 公司产品) 进行分子筛层析, 用相同的缓冲液洗脱, 流速为 0.5 mL/min。

1.5 酶的性质研究

1.5.1 最适反应 pH: 用 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲液 (pH 4.0 - 8.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸, pH 8.0 - 8.5 Tris-盐酸, pH 8.5 - 10.5 甘氨酸-NaOH, pH 11.0 - 12.0 Na_2HPO_4 -NaOH) 分别配制不同 pH 的底物溶液, 按

标准方法测定酶活。以酶活力最高者为 100%。

1.5.2 最适反应温度: 分别在 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C、85 °C 下按照标准方法测定酶活。以酶活力最高者为 100%。

1.5.3 酶的 pH 稳定性: 将酶液分别在 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲溶液(同 1.5.1)中室温放置 4 h,按标准方法测定残余酶活。以初始酶活为 100%。

1.5.4 酶的温度稳定性: 将酶液分别在 55 °C、60 °C、65 °C 温度下保温 30 min、60 min、90 min、120 min,按标准方法测定残余酶活。

1.5.5 NaCl 浓度对酶活性的影响: 底物溶液中加入不同浓度 NaCl,按标准方法测定残余酶活。以不含 NaCl 底物反应酶活为 100%。

1.5.6 金属离子和其他化合物对酶活性的影响: 酶液中分别加入终浓度为 2 mmol/L 的不同金属离子,5 mmol/L 和 10 mmol/L EDTA 和 SDS,40 °C 保温 1 h,按标准方法测定残余酶活。以初始酶活为 100%。

1.5.7 酶动力学测定: 以不同浓度的槐豆胶为底物,按照标准方法测定酶活力。根据产物的量计算反应初速度,将不同底物的浓度和测定的反应初速度采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行双曲线非线性回归分析,获得 K_m 值和 V_{max} 。

2 结果和分析

2.1 菌株分离与形态学特征

菌株 HMTS15 为不规则短杆状(图 1),大小为

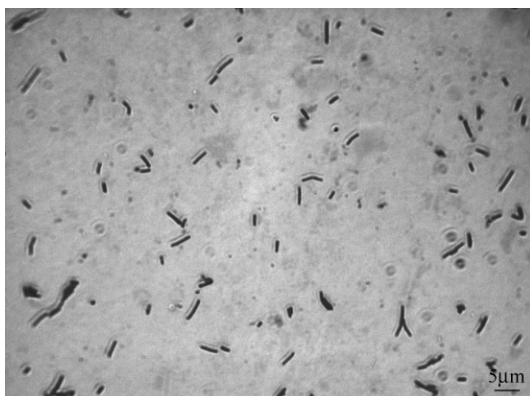


图 1 菌株 HMTS15 细胞形态(1000 ×)

Fig. 1 Phase contrast micrograph of strain HMTS15 showing the cell morphology (1000 ×). Bar, 5 μm .

2.0 μm – 5.0 μm × 0.5 μm – 1.0 μm ,革兰氏阳性。菌落呈圆形,乳黄色,表面平坦,边缘不整齐。

2.2 菌株生长特性

菌株 HMTS15 能在 pH7.0 – 11.0 的条件下生长,最适生长 pH 为 9.5;生长的温度范围为 10 °C – 45 °C,最适生长温度 37 °C;最高能耐受 18% 的 NaCl,在含有 8% NaCl 条件下生长量最高。

2.3 菌株生理生化特性与糖醇利用

菌株 HMTS15 能够分解淀粉、酪蛋白,不能分解明胶、Tween20、Tween40、Tween60、Tween80。氧化酶、触媒、硝酸盐还原结果为阳性,硫化氢产生、吲哚产生试验结果为阴性。HMTS15 能够利用可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、果胶、果糖、甘露聚糖、木糖、木聚糖、支链淀粉和甘露醇,不能利用乳糖和纤维素。(表 1)

表 1 HMTS15 菌株与近缘标准菌株形态学和生理学差异比较

Table 1 Different morphological and physiological characteristics of strain HMTS15 and related species

Characteristics	Stains designations		
	1	2	3
Temp. range for growth (°C)	10 – 45	10 – 45	15 – 45
pH range for growth	7.0 – 11.0	8.0 – 11.0	8.0 – 11.0
NaCl range for growth (% w/v)	0 – 18	0 – 16	0 – 16
Hydrolysis of Starch	+	+	–
Gelatin	–	+	+
Tween40	–	+	+
Tween60	–	+	+
Utilization of			
Lactose	–	w	ND
Cellulose	–	+	ND
Mol% G + C	40.0	39.2	42.4

Strains designations: 1. strain HMTS15; 2. *B. agaradhaerens* DSM8721 [12]; 3. *B. clarkia* DSM8720 [12]. + positive, – negative, w weak, ND no data.

2.4 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

菌株 HMTS15 与 *Bacillus* 属成员具有较高的序列相似性,用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树表明与 *Bacillus agaradhaerens* DSM8721 亲缘关系最近,相似性达到了 99.2% (图 2)。

2.5 菌株基因组 DNA 的 G + C mol% 含量

通过测定得到 HMTS15 菌株 DNA 的 T_m 值为 69.9 °C,从而计算出 G + C mol% 为 40.0。

2.6 酶的分离纯化

阴离子交换柱 DEAE-sepharose fast flow 进行层析分离时目的组分在 NaCl 浓度为 0.4 – 0.5 mol/L 之间洗脱下来。最终电泳纯的酶比活达到

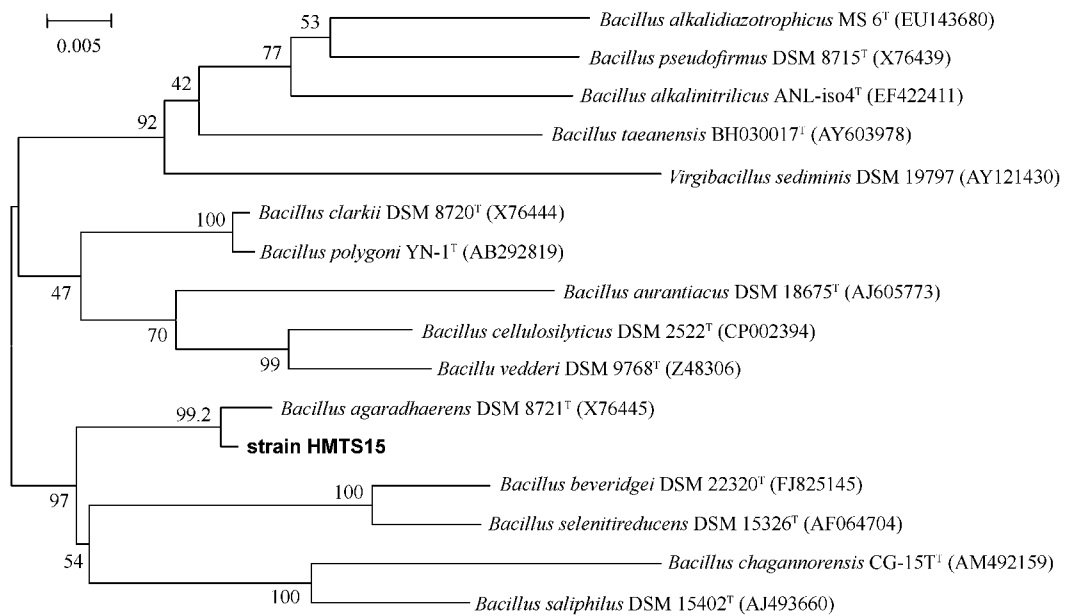


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 HMTS15 与相关菌株的系统发育树

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain HMTS15 and related species. Accession numbers are shown in parentheses. The number at each branch point represents the bootstrap percentages. Bar, 0.5% substitutions per nucleotide position.

644.67 U/mg, 纯化了 11.7 倍, 收率达到 24.8%。纯化过程的电泳图见图 3。

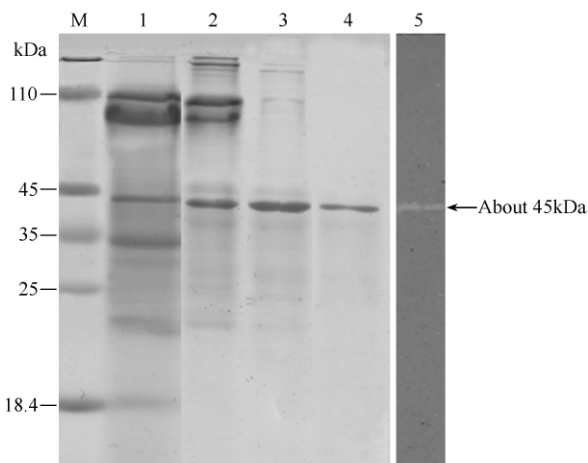


图 3 纯化过程 SDS-PAGE 以及活性电泳图

Fig.3 SDS-PAGE and Native-PAGE of samples from different steps of purification. 1. Culture supernatant; 2. DEAE-sepharose; 3. first Superdex 200; 4. second Superdex 200; 5. Native-PAGE with activity overlay.

2.7 甘露聚糖酶性质

菌株 HMTS15 产生的甘露聚糖酶的最适反应 pH 与温度分别为 10.0 (图 4-A) 和 75℃ (图 4-B); 在 55℃ 和 60℃ 保温 120 min 酶活基本没有丧失, 在

65℃ 保温酶失活较快, 30 min 后残余酶活接近 60% (图 4-C); 该酶在 pH 6.5 - 11.0 的范围内都具有较好的稳定性, 常温放置 4 h 残余酶活超过 65% (图 4-D); 对 NaCl 有一定耐受性, 15% NaCl 中残余酶活超过 50% (图 4-E)。EDTA 对酶活性有强烈的抑制作用, Mg²⁺、Ca²⁺ 对酶活有一定的激活作用, SDS 对酶活的影响不显著 (表 2)。

表 2 金属离子、EDTA、SDS 对酶活的影响

Table 2 Effect of metal ion, EDTA and SDS on activity of the mannanase from strain HMTS15

Metal ion/agent	Relative activity/%
FeSO ₄	49.99 ± 8.59
MnCl ₂	38.02 ± 9.35
MgCl ₂	103.17 ± 2.61
CaCl ₂	108.9 ± 6.96
ZnSO ₄	81.66 ± 11.07
AgNO ₃	23.09 ± 13.06
HgCl ₂	29.37 ± 1.59
PbSO ₄	100.08 ± 6.59
(CH ₃ COO) ₂ Pb	70.03 ± 6.51
EDTA (5mmol)	31.79 ± 15.6
EDTA (10mmol)	37.07 ± 10.98
SDS (5mmol)	87.08 ± 4.47
SDS (10mmol)	95.18 ± 4.18

以槐豆胶为底物时, 菌株 HMTS15 所产甘露聚糖

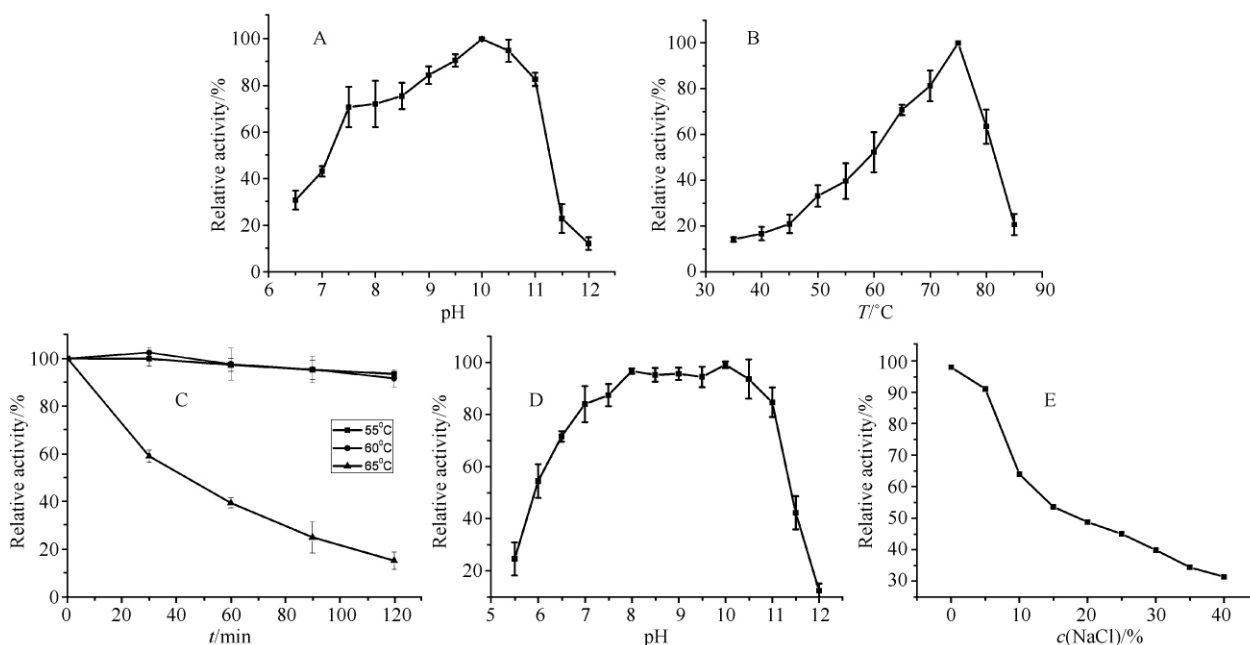


图4 各种因素对菌株 HMTS15 甘露聚糖酶的影响

Fig. 4 Effect of some factors on the activity and stability of the mannanase from strain HMTS15. (A) pH profile; (B) Temperature profile; (C) Thermal stability; (D) pH stability; (E) NaCl tolerance.

酶的 K_m 为 2.7 mg/mL, V_{max} 值为 725 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。

3 讨论

随着甘露聚糖酶在实际生产生活中的应用越来越广,各种来源的甘露聚糖酶的研究持续升温。近年来关于甘露聚糖酶的研究很多,细菌来源的甘露聚糖酶中最适 pH 中性和偏酸性的甘露聚糖酶研究的较多,而碱性甘露聚糖酶相对研究较少,但是碱性甘露聚糖酶在洗涤剂^[13]、造纸^[3]等工业实际应用中具有中性和酸性甘露聚糖酶无可比拟的优势。嗜碱芽胞杆菌是碱性甘露聚糖酶的重要来源,本研究报告分离自我国内蒙古盐碱湖的产甘露聚糖酶的菌株 HMTS15 即属于嗜碱芽胞杆菌属,其系统发育分析表明菌株 HMTS15 与 *Bacillus agaradhaerens* 的亲缘关系最近,并且具有同 *B. agaradhaerens* DSM 8721 相似的一系列特征,包括革兰氏染色、菌落形态、菌株形态、糖醇的利用、(G + C) mol% 等。这些基本特征都表明菌株 HMTS15 同 DSM8721 菌株属于同一种。但是其与 DSM 8721 菌株相比也存在一些明显的差异:*B. agaradhaerens* DSM8721 不能在 pH 7.0 生长,而菌株 HMTS15 可以在 pH7.0 的条件下生长;*B.*

agaradhaerens DSM8721 可以水解明胶、Tween40 和 Tween60,可以利用纤维素,但是菌株 HMTS15 不能水解和利用上述物质。因此,菌株 HMTS15 可能代表 *Bacillus agaradhaerens* 中与 DSM 8721 不同的新菌株。

1987 年 Akino T^[14-15] 首次报道了 *Bacillus* sp. AM001 产生的胞外碱性甘露聚糖酶,此后又有多种不同的来源于嗜碱芽胞杆菌的碱性甘露聚糖酶被报道,包括 Bettiol^[16] 等申请专利的来自 *Bacillus agaradhaerens* 的甘露聚糖酶, Ma Yanhe^[3] 等报道的来自 *Bacillus* sp. N16-5 的甘露聚糖酶, Takeda N^[17] 等报道的来自 *Bacillus* sp. strains JAMB-602 的甘露聚糖酶和 Hatade^[14,18] 等报道的来自 *Bacillus* sp. JAMB-750 的甘露聚糖酶。本文所研究的甘露聚糖酶的性质同已报道的酶性质有一定的优越性,具体数据比较见表 3。

由表中数据我们可以看出,来自 HMTS15 菌株的甘露聚糖酶在最适温度、最适 pH、温度稳定性和 pH 稳定性上都优于或者接近于同类的其他酶,在造纸和制浆工业展示了非常好的应用潜力。此外,该甘露聚糖酶高的最适反应 pH 和良好的 pH 耐受性也是研究酶分子嗜碱机理的一个很好的资源。

表3 代表性碱性甘露聚糖酶性质比较

Table 3 Overview of various characteristics of Alkaline β -mannanase

Organism	pH opt	pH stability	Temp. (opt.)	Thermal stability
<i>B. sp.</i> AM001	9.0	7.0–9.0	65 °C	60 °C ^a
	8.5	8.0–9.0	60 °C	50 °C ^a
<i>B. agaradhaerens</i>	8–10	ND	60 °C	ND
<i>B. sp.</i> N16–5	9.5	8.5–10 ^b	70 °C	60 °C
<i>B.</i> JAMB-602	9	6–11 ^c	65 °C	The half-life was 2 h at 55 °C and 27 min at 60 °C
<i>B. sp.</i> JAMB-750	10	6.0–10.5 ^d	55 °C	The half-life was 117 min at 50 °C and 65 min at 60 °C
Strain HMTS15	10	7.0–11	75 °C	60 °C

a. The enzyme solutions were incubated at various temperatures for 30 min. b. The enzyme solutions were incubated in various buffers at 50 °C for 60 min. c. The enzyme was preincubated at the indicated pH buffers either at 40 °C for 30 min or 4 °C for 24 h. d. The enzyme was preincubated at the indicated pH buffers either at 40 °C for 30 min.

该酶对 NaCl 有比较好的耐受性,15% NaCl 存在的条件下还有超过 50% 的残余酶活,在同类碱性甘露聚糖酶中这一性质报道很少。NaCl 对酶活的影响在嗜盐菌来源的酶中报道的较多,比如 Wang^[19] 等报道的来自近海的 *Pantoea agglomerans* 所产甘露聚糖酶在 1 mol/L 的 NaCl (约 5.8%) 存在的条件下酶活无损失;Meenakshi^[20] 等报道的来自印度拉贾斯坦邦沙漠的 *Bacillus sp.* MG-33 所产甘露聚糖酶在 3 mol/L NaCl (约 17.4%) 存在的情况下残余酶活超过 50%;Mudau^[21] 等报道的来自晒盐场的 *Scopulariopsis candida* strains LMK004 和 LMK008 所产的甘露聚糖酶在 NaCl 浓度 15% 的条件下残余酶活分别为 50% 和 80%。本文所报道的酶在耐盐性方面同已报道的酶相比也有一定的优势。还有一个比较有趣的现象是该菌最适的生长 NaCl 浓度为 8%,而该菌所产的甘露聚糖酶的酶活却随着 NaCl 浓度的增加而降低。这可能与菌的生长环境和长期的进化有关。该菌分离自内蒙古的盐碱湖,取样时湖水的盐度为 8.5%,由于内陆湖的盐度同降雨量蒸发量等直接相关,一年四季中变化量较大,所以不论是菌还是酶在进化过程中都形成了较为宽广的 NaCl 适应性,该菌在 0–8% NaCl 的条件下都生长较好,而该酶在 0–8% NaCl 存在的条件下残余酶活也都超过 70%。

该酶已经做了质谱鉴定,得到了部分氨基酸的序列,目前正在根据氨基酸的序列设计简并引物调取该酶的基因以便进行深入的研究。

参考文献

- [1] Kansoh AL, Nagieb ZA. Xylanase and Mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, 85(2):103–114.
- [2] Dhawan S, Kaur J. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(4):197–216.
- [3] Ma Y, Xue Y, Dou Y, Xu Z, Tao W, Zhou P. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* N16-5. *Extremophiles*, 2004, 8(6):447–454.
- [4] Gübitz GM, Lischnig T, Stebbing D, Saddler JN. Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(5):491–495.
- [5] Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, Liu P, Nonogaki H. A novel endo- β -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiology*, 2004, 134(3):1080–1087.
- [6] Xu BZ, Sellos D, Janson JC. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(6):1753–1760.
- [7] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(5):355–383.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001:349–400.
- [9] Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(22):6115–6116.
- [10] Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2):257–268.
- [11] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社, 2002:77–122.
- [12] Nielsen P, Fritze D, Priest FG. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 1995, 141(7):1745–1761.
- [13] Hatada Y, Takeda N, Hirasawa K, Ohta Y, Usami R, Yoshida Y, Grant WD, Ito S, Horikoshi K. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* strains JAMB-750, its expression in *B. subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*, 2005, 9(6):497–500.
- [14] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of β -mannosidase and β -mannanase by an alkaliphilic *Bacillus*

- sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1987, 26(4): 323-327.
- [15] Akino T, Kato C, Horikoshi K. The cloned β -mannanase gene from alkaliphilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two β -mannanase in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 1989, 152(1):10-15.
- [16] Bettiol JLP, Showell MS. Detergent compositions comprising a mannanase and a protease. United States: US 6 376 445 B1. Apr. 23, 2002.
- [17] Takeda N, Hirasawa K, Uchimura K, Nogi Y, Hatada Y, Akita M, Usami R, Yoshida Y, Grant WD, Ito S, Horikoshi K. Alkaline Mannanase from a novel species of alkaliphilic *Bacillus*. *The Japanese Society of Applied Glycoscience*, 2004, 51(3):229-236.
- [18] Takeda N, Hirasawa K, Uchimura K, Nogi Y, Hatada Y, Usami R, Yoshida Y, Grant WD, Ito S, Horikoshi K. Purification and enzymatic properties of a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strains JAMB-750. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, 4(2):67-74.
- [19] Wang J, Shao Z, Hong Y, Li C, Fu X, Liu Z. A novel β -mannanase from *Pantoea agglomerans* A021: gene cloning, expression, purification and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(10):1777-1784.
- [20] Meenakshi, Singh G, Bhalla A, Hoondal GS. Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. *BioResources*, 2010, 5(3):1689-1701.
- [21] Mudau, Maria M, Setati, Evodia M. Partial purification and characterization of endo- α ,4 mannanases from *Scopulariopsis candida* strains isolated from solar salterns. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(13):2279-2285.

Purification and characterization of mannanase from an alkaliphilic mannanase producing bacterium HMTS15

Tingting Liao^{1,2}, Lei Zhai^{1,2}, Chenghua Gao^{1,2}, Yanfen Xue¹, Yanhe Ma^{1*}

¹ Lab of Extremophiles, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

² Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To isolate and identify an alkaliphilic mannanase producing bacterium, purify and characterize mannanase thereof. [Methods] Mannanase-producing alkaliphilic bacterium HMTS15 was isolated by alkaline agar with konjak from water sample of Hamatai Lake in Inner Mongolia, China. The morphological, biochemical and physiological characteristics and 16S rRNA gene were analyzed to identify the taxonomic position of strain HMTS15. Mannanase produced by strain HMTS15 was purified by four steps including $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, cellulose DEAE-sepharose, twice Superdex 200. The enzyme properties including optimal temperature, optimal pH, thermal stability, pH stability, NaCl tolerance, metal ion tolerance, EDTA and SDS tolerance were tested. [Results] Strain HMTS15 was Gram-positive rod. Its growth pH ranged from 7.0 to 11.0 and growth temperature ranged from 10 °C to 45 °C. The G + C content of the DNA was 40 mol%. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequence comparisons indicated that strain HMTS15 was a member of *Bacillus*. The extracellular mannanase from strain HMTS15 was purified as a single band with molecular weight of about 45 kD on SDS-PAGE. The optimal catalytic activity was showed at 75 °C and pH 10. The mannanase was stable up to 60 °C and retained about 60% residual activity at 65 °C for 30 min. The ions Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} and EDTA inhibited the activity of the mannanase. [Conclusion] Polyphasic taxonomy revealed that strain HMTS15 was a new member of *Bacillus agaradhaerens*. The alkaline mannanase produced by strain HMTS15 hold the valuable property in stability at high temperature and broad range of pH.

Keywords: Alkaliphilic *Bacillus*, Alkaline mannanase, polyphasic taxonomy, purification, properties

(本文责编:王晋芳)

Supported by the CAS Innovation Project (KSCXZ-EW-G-3)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807590; Fax: +86-10-64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

Received: 13 April 2011/Revised: 13 May 2011