

# $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌的分离鉴定和酶学性质

李长影 孔雯 王家昕 高剑锋 李晓华

中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

**摘要** 从工厂废液中分离并筛选到了1株产 $\beta$ -甘露聚糖酶的菌株CYS4,其摇瓶培养液的酶活力为11.0 U/mL。经形态观察、生理生化试验及16S rDNA序列分析鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。酶学性质研究表明:该酶的最适反应pH值为7.0,在pH值为5.0~11.0时能保持很好的稳定性,酶活力在80%以上;该酶的最适反应温度为60℃,在温度低于40℃时基本稳定,保温3h酶活力仍然有70%以上; $\text{Na}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等金属离子对该酶有激活作用, $\text{Hg}^{2+}$ 对酶活有一定的抑制作用。

**关键词**  $\beta$ -甘露聚糖酶;分离;鉴定;酶学性质

**中图分类号** Q 939 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0138-05

$\beta$ -甘露聚糖酶是一类能够水解含有 $\beta$ -1,4-*D*-甘露糖主链的内切水解酶,属于半纤维素酶类,在植物、动物和微生物中广泛存在<sup>[1-6]</sup>,作用底物主要是半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳葡萄甘露聚糖以及甘露聚糖<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -甘露聚糖酶水解甘露多糖,获得的甘露低聚糖有很好的生物调节功能,能有效降低人体胆固醇水平,减轻便秘、降低血糖,是良好的食品添加剂,国外现已广泛用于保健食品中;在造纸工业中,用酶法代替传统的碱法处理纸浆, $\beta$ -甘露聚糖酶能有效地除去纸浆中的半纤维素、改善纸质;在纺织工业中用作天然纤维中半纤维素胶质的降解,并能有效地除去纺织印染产品上粘附的多余的染料,以取代常规的化学处理工艺,降低能耗和对环境的污染<sup>[8-11]</sup>。近年来随着对自然界半纤维素资源的开发及其在饲料工业和养殖业中的应用, $\beta$ -甘露聚糖酶的开发和利用研究进入了一个新阶段。

本研究从工厂废液中分离产 $\beta$ -甘露聚糖酶的菌株,并对菌株进行鉴定和酶学性质的研究,为甘露聚糖酶的广泛应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验样品采集于宜昌一致魔芋生物科技有限公司魔芋生产基地的工厂废液。

魔芋粉和魔芋胶由宜昌一致魔芋生物科技有限公司提供,甘露糖购于上海源聚生物科技有限公司,3,5-二硝基水杨酸(DNS)购于上海化学试剂有限公司,pMD18-T载体克隆试剂盒及Taq DNA聚合酶及其缓冲液购于大连宝生物工程有限公司(TaKa-Ra),其他试剂均为分析纯。

### 1.2 培养基

**富集培养基:**魔芋精粉5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5g, 蒸馏水1000 mL, pH 7.0~7.2。

**分离培养基:**魔芋精粉5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g,  $\text{KCl}$  5g,  $\text{NaNO}_3$  3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g, 琼脂18g, 蒸馏水1000 mL, 自然pH。

**种子培养基:**魔芋精粉10g, 酵母膏5g, 蛋白胨3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g,  $\text{KCl}$  5g,  $\text{NaNO}_3$  3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g, 蒸馏水1000 mL, 自然pH。

**发酵培养基:**魔芋精粉15g, 大豆蛋白胨8g, 酵母粉4g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g, 蒸馏水1000 mL, 自然pH。

**LB培养基:**胰蛋白胨10g, 酵母膏5g,  $\text{NaCl}$  5g, 蒸馏水1000 mL, pH 7.0。

**LA培养基:**胰蛋白胨10g, 酵母膏5g,  $\text{NaCl}$  5g, 琼脂18g, 蒸馏水1000 mL, pH 7.0。

收稿日期: 2010-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070087)、湖北省自然科学基金项目(2008CDB076)和中南民族大学招标项目(YZZ10003)

李长影, 硕士研究生, 研究方向: 生物制药与分子微生物, E-mail: lichangying87@163.com

通讯作者: 李晓华, 博士, 教授, 研究方向: 微生物与基因工程, E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

### 1.3 $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌的筛选和粗酶液的制备

取 200  $\mu$ L 样品液于富集培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 将富集液用无菌水梯度稀释后涂布于固体分离培养基上, 倒置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后, 用刚果红溶液<sup>[12]</sup>染色 5 min, 观察菌落周围有无透明圈, 作为菌株产  $\beta$ -甘露聚糖酶能力的初步检测标准, 挑取透明圈大的单菌落进行划线纯化。

将初筛得到的菌株接入种子培养基培养 12 h 后, 按 2% 的接种量转接到发酵培养基中培养 24 h 收集发酵液, 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液为粗酶液。用 DNS 法测定酶活力, 作为进一步筛选的依据。

### 1.4 菌株的鉴定

1) 常规生理生化鉴定。参照文献[13], 对分离纯化的菌株进行菌落形态和培养特征的观察以及主要生理生化试验。

2) 分子生物学方法鉴定。菌株基因组 DNA 的提取参照链霉菌操作手册, 采用 16S rDNA 通用引物 F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 F2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') 扩增目标菌的 16S rDNA 序列。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L) 为: 模板 DNA 1  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 引物浓度为 20  $\mu$ mol/L 各 1  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶 0.25  $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 2  $\mu$ L, 无菌双蒸水 13.75  $\mu$ L, 混匀。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后与载体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 并测序。将所得序列运用 NCBI 的 BALST 程序在 GenBank 基因库中进行同源性比对及鉴定。

### 1.5 $\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定

以 0.5% 的魔芋胶为底物 (用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸钠缓冲液配制), 参照 Akino 等<sup>[14]</sup> 的 DNS 法, 在 0.9 mL 底物中加入 0.1 mL 粗酶液, 在 55  $^{\circ}$ C 下水浴反应 10 min, 加入 2.0 mL DNS 试剂, 在沸水中煮沸 5 min, 迅速冷却后加蒸馏水定容至 25 mL, 以空白液调零, 在波长 540 nm 处测吸光度。每次做有底物无酶的空白试验。

酶活力单位定义为: 在上述反应条件下, 以 0.5% 魔芋胶为底物, 每分钟释放 1  $\mu$ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位, U。

### 1.6 酶学性质的研究

$\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质分析采用粗酶液

测定。

1) 最适反应 pH。采用不同缓冲体系配成一系列浓度 0.05 mol/L 的缓冲液, 缓冲体系和 pH 范围分别为: KCl-HCl 缓冲液 (pH 2.0); 甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH 3.0); 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0~5.0); 磷酸缓冲液 (pH 6.0~8.0); 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 9.0~10.0); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH 缓冲液 (pH 11.0~12.0)。分别在 pH 2.0~12.0 条件下测定酶活力, 以最大值为 100%, 在其他条件下测得的酶活力相对于最大酶活力的百分数即为该酶的相对酶活力。

2) pH 稳定性。将酶液与不同 pH 缓冲液混合, 37  $^{\circ}$ C 保温 2 h 后按标准方法测定剩余酶活力。

3) 最适温度。在 pH 7.0、0.05 mol/L 的磷酸钠缓冲液体系中, 反应 10 min, 在不同温度下 (0~100  $^{\circ}$ C) 测定甘露聚糖相对酶活力。

4) 温度稳定性。酶液在 pH 7.0、0.05 mol/L 的磷酸钠缓冲液体系中, 不同温度下 (20~70  $^{\circ}$ C) 保温不同时间后立即冰水浴冷却, 然后按标准方法测定不同温度处理后的剩余酶活力 (用未经处理的酶液作对照)。

5) 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响。将金属离子和 EDTA 与酶液一同 37  $^{\circ}$ C 保温 2 h 后, 测定样品的剩余酶活力, 以不添加任何金属离子和螯合剂的酶活力为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 $\beta$ -甘露聚糖酶菌株的筛选

通过魔芋粉底物平板筛选法, 从工厂废液中筛选到多株降解魔芋的菌株, 其中 CYS4 菌株的摇瓶培养液的粘度下降快, 菌落周围有大的透明圈; 将纯化的菌株摇瓶发酵 24 h 后培养液中  $\beta$ -甘露聚糖酶活力达到 11.0 U/mL。

### 2.2 酶活力测定的回归方程

分别取 1 mg/mL 甘露糖标准液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 置于 25 mL 具塞试管中, 以蒸馏水补足 2.0 mL, 加入 2.0 mL DNS 试剂。

置沸水浴中煮沸 5 min, 显色, 然后以流水迅速冷却, 用蒸馏水定容至 25 mL, 以空白液调零, 在 540 nm 处测定吸光度, 结果显示: 吸光值 (Y) 与甘露糖浓度 (X) 呈正相关, 回归方程为:

$$Y = 15.836X - 0.0429$$

相关系数  $R^2 = 0.9977$ 。

### 2.3 菌株的鉴定

通过形态观察, CYS4 菌株在魔芋分离培养基上培养 24 h 后, 菌落表面粗糙、边缘波状、呈不透明淡褐色、不易挑起、杆状, 革兰氏阳性。

CYS4 菌株的生理生化特性研究结果见表 1。

表 1 CYS4 的生理生化特征<sup>1)</sup>

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of CYS4

项目 Items	CYS4 Strain	项目 Items	CYS4 Strain
伏-普试验 V. P test	+	淀粉 Amylum	+
甲基红试验 M. R test	-	4 °C	-
吲哚试验 Indole test	-	20 °C	+
柠檬酸盐试验 Citrate test	-	30 °C	+
硫化氢试验 H <sub>2</sub> S test	-	40 °C	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	50 °C	+

1) + 表示阳性或生长; - 表示阴性或不生长。4~50 °C 指生长温度。+ means positive or growth; - means negative or no growth; 4-50 °C indicates growth temperature.

CYS4 菌株经生理生化特性研究表明: 柠檬酸盐试验、甲基红试验、吲哚试验和硫化氢试验均呈阴性, 伏-普试验呈阳性。

以 CYS4 菌株基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增得到 1 条大小约为 1.6 kb DNA 谱带。经北京三博远志生物技术有限公司进行测序, 测得的序列提交 NCBI (登录号为 HM480486) 进行 BLAST 同源序列比对, 序列同源性分析表明: CYS4 菌株与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 16S rDNA 具有 99% 的同源性 (图 1), 结合生理生化特性, 初步确定菌株 CYS4 为枯草芽孢杆菌。

### 2.4 酶学性质

1) pH 对酶活力的影响。从图 1 可知: 酶促反应的最适 pH 为 7.0; 在 pH 4.0~7.0 随 pH 值的升高, 酶活力急剧升高; pH 值小于 4.0, 酶活力较低, pH 4.0 时的酶活力仅为 pH 7.0 的 4.6%; 在 pH 7.0~12.0 之间随 pH 值的升高, 酶活力急剧下降, 在 pH 12.0 时的酶活力仅为 pH 7.0 的 0.8%。

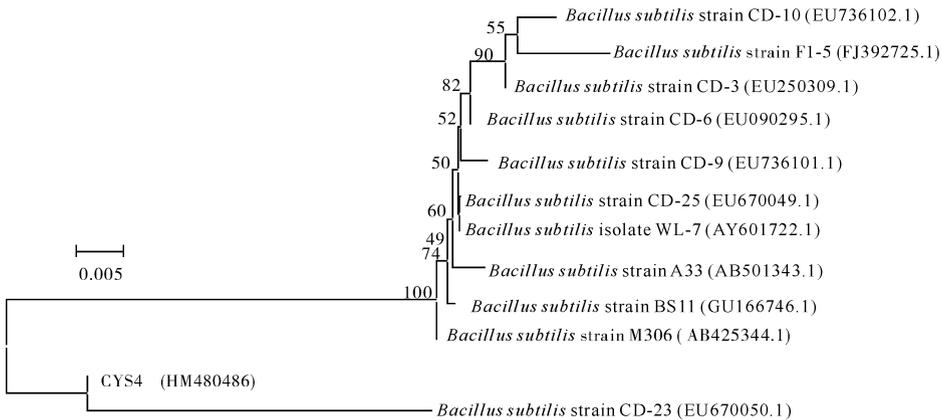
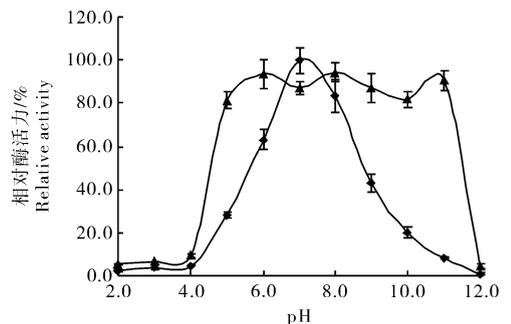


图 1 CYS4 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of CYS4 system

2) pH 对酶稳定性的影响。将酶液与不同 pH 缓冲液混合后, 在 37 °C 下保温 2 h 后立即冰水浴冷却, 测定酶活力 (用未经处理的酶液作对照)。结果 (图 2) 显示: 在 pH 5.0~11.0, 相对酶活力都在 80% 以上, 表明该酶在 pH 5.0~11.0 范围内比较稳定; 当 pH 值小于 4.0 或大于 11.0 时, 酶活力迅速下降, 相对酶活力都在 10% 以下。

3) 温度对酶活力的影响。在不同温度条件下测定 β-甘露聚糖酶的酶活力, 结果 (图 3) 显示: CYS4 菌株产生的 β-甘露聚糖酶在反应温度为 60 °C 时酶活力最大; 在 0~60 °C 之间随反应温度的升高, 酶活



◆不同 pH 下的酶活力 Activity of β-mannase determined at different pH buffers; ▲不同 pH 保温 2 h 后的剩余酶活力 Residual activity of β-mannase at different pH buffers for 2 hours.

图 2 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on mannase activity

力逐渐升高;反应温度为 0 °C 时,酶活力仅为 60 °C 的 7.9%;大于 60 °C 时酶活力迅速下降,100 °C 时的酶活力仅为 60 °C 的 10.5%。

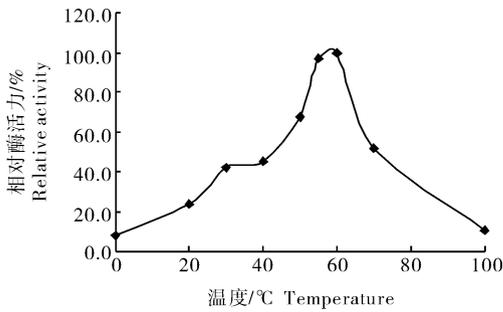


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on mannase activity

4) 温度对酶稳定性的影响。将酶液分别置于不同温度下保温不同时间后立即冰水浴冷却,然后测定甘露聚糖酶活力(用未经处理的酶液作对照)。结果(图 4)显示:该酶在 20 和 40 °C 时相对稳定,保温 3 h 后仍然有 70% 以上的酶活力;随着温度的升高,酶活力下降较快,>55 °C 保温 30 min 后酶活力已不足 40%,但随着保温时间的延长,酶活力变化较小。

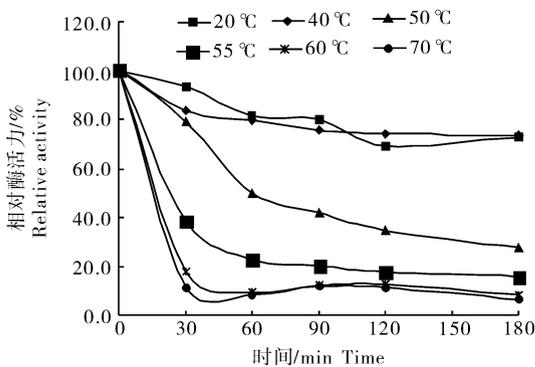


图 4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the stability of mannase

5) 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响。将金属离子、EDTA 与酶液一同 37 °C 保温 2 h 后,测定甘露聚糖酶的剩余活力(用未加金属离子和 EDTA 的酶液作对照)。由图 5 可以看出,金属阳离子螯合剂 EDTA 对酶影响较小,有微弱的激活作用;Hg<sup>2+</sup> 对该酶有一定的抑制作用,使酶活力下降了 13%;其他金属离子(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 和 Li<sup>+</sup>) 都对酶有不同程度的激活作用,其中 Mn<sup>2+</sup> 使酶活力提高了 23%,而 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 也使酶活力提高 10% 以上。

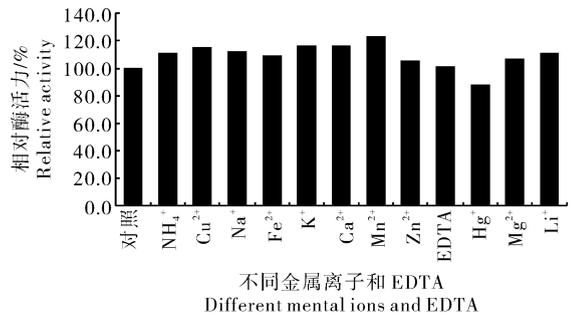


图 5 不同金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of mental ions and EDTA on mannase activity

### 3 讨论

甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分,在自然界分布广泛,丰富的甘露聚糖资源为  $\beta$ -甘露聚糖酶的研究带来广阔的前景。近年来随着对自然界半纤维素资源的开发和魔芋低聚糖保健价值的发现,以及  $\beta$ -甘露聚糖酶工业应用领域的拓展,大大推动了  $\beta$ -甘露聚糖酶研究的发展。

本研究从宜昌一致魔芋生物科技有限公司魔芋生产加工厂的废液中分离得到 1 株魔芋降解菌。经常规的形态观察、生理生化分析和 16S rDNA 序列同源性分析,初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。CYS4 菌株摇瓶发酵 24 h 后酶活力达到 11.0 U/mL,高于国内一些文献的报道<sup>[9-10]</sup>。不同来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶的酶学性质存在一定差异,CYS4 菌株产生的  $\beta$ -甘露聚糖酶最适 pH 为 7.0,最适反应温度为 60 °C,比已报道的菌株 *B. subtilis* BM9602 的最适反应温度高 10 °C;该酶在 pH 5.0~11.0 范围内有较高的稳定性,其 pH 应用范围也比已报道的 *Bacillus subtilis* M50 宽,耐碱性能较高,有利于魔芋的深加工,在造纸业中有利于生产高质量的纸,减少碱液的用量和氯的污染。该酶在低于 40 °C 时比较稳定,保温 3 h 后仍然有 70% 以上的酶活力,有利于酶的运输与保藏。此外,研究还发现 Na<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 等金属离子对该酶有激活作用,Hg<sup>2+</sup> 对酶活有一定的抑制作用,与陈一平等<sup>[15]</sup> 的研究相比较,不同之处在于金属离子对该酶的影响作用较小,该特性为酶的纯化和工业化生产提供了良好的基础。据报道,魔芋低聚糖促进双歧杆菌生长效果优于乳果糖、大豆低聚糖及低聚异麦芽糖等低聚糖<sup>[16]</sup>。因此,*Bacillus subtilis* CYS4 所产的  $\beta$ -甘露聚糖酶具有良好的酶学特性,适合应用于魔芋低聚糖的制备,具有较大的工业化潜力。

## 参 考 文 献

- [1] 段蕾,高润池,许波,等.  $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌的分离鉴定及酶学特性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10311-10314.
- [2] 于艳梅,吴志新,陈孝焯,等. 魔芋甘露寡糖对黄颡鱼非特异性免疫功能及生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 351-355.
- [3] 杨先芹,孙丹,杨文博,等. 地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株  $\beta$ -甘露聚糖酶的产酶条件及粗酶性质[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2002, 35(2): 117-122.
- [4] TANG C M, WATERMAN L D, SMITH M H, et al. The *cel4* gene of *Agaricus bisporus* encodes a  $\beta$ -mannanase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2298-2303.
- [5] XU B Z, SELLOS D, JANSON J C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*)  $\beta$ -mannanase gene[J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 1753-1756.
- [6] 张清霞,王英,张力群,等. 甘露寡糖和金针菇发酵液提取物诱导甜瓜抗白粉病反应研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(1): 87-91.
- [7] 毛绍名,章怀云.  $\beta$ -甘露聚糖酶分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 995-997.
- [8] 张闻,汪立平,汪之和. 甘露聚糖酶产生菌 F1-5 的鉴定及发酵条件研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 288-293.
- [9] 杨文博,沈庆,佟树敏. 产  $\beta$ -甘露聚糖酶地衣芽孢杆菌的分离筛选及发酵条件[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 60-63.
- [10] 董桂清,余钧池,罗永侦,等.  $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌的筛选和酶学性质研究[J]. 广西轻工业, 2007(4): 20-21.
- [11] AKINO T, NAKAMURA N, HORIKOSHI K. Production of  $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. Appl Microbiol Biotech, 1987, 26: 323-327.
- [12] DOWNIE B, HILHORST H W M, BEWLEY J D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -D-mannanase activity using congored dye[J]. Phyto Chemistry, 1994, 36(4): 829-835.
- [13] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学试验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 120-123.
- [14] AKINO T, NAKAMURA N, HORIKOSHI K, et al. Characterization of three  $\beta$ -mannanase of an alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. Agric Biol Chem, 1988, 52: 773-779.
- [15] 陈一平,龙健儿,廖连华,等. 芽孢杆菌 M50 产生  $\beta$ -甘露聚糖酶的条件研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 62-68.
- [16] 向进乐,陈文品,刘勤晋. 魔芋低聚糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2004(1): 20-23.

## Isolation, identification and enzymatic characterization of $\beta$ -mannanase producing strain

LI Chang-ying KONG Wen WANG Jia-xin GAO Jian-feng LI Xiao-hua

College of Life Science/Key Lab for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

**Abstract** A  $\beta$ -mannanase producing strain CYS4 was isolated from factory waste liquid and its enzyme activity reached 11.0 U/mL in the culture liquid of shaking flask. CYS4 was identified as *Bacillus subtilis* based on morphological observation, physiological and biochemical experiments and phylogenetic analysis with 16S rDNA sequence. Enzymatic characterization showed that the optimum pH for the enzyme was 7.0, it was stable between pH 5.0 and pH 11.0, the enzyme activity is more than 80%, and the optimum temperature was 60 °C, it was stable under 40 °C, the enzyme was still more than 70% after 3 hours. The enzyme activity was activated by  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , but inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ .

**Key words**  $\beta$ -mannanase; isolation; identification; enzymatic characterization

(责任编辑: 张志钰)