

文章编号: 1001-411X(2001)02-0086-03

β -甘露聚糖酶的产酶菌种、条件及部分性质研究

杨幼慧¹, Alan M McKAY²

(1 华南农业大学食品科学系, 广东 广州 510642;

2 Dept. of Food Science, the Queen's Univ. of Belfast, Newforge Lane, Belfast BT9 5PX, Northern Ireland)

摘要: 利用刚果红平板筛选法从芽孢杆菌属中筛选到 1 株产 β -甘露聚糖酶的理想菌株, 即枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) NCIMB 11034。该菌产酶条件以槐豆胶或魔芋胶作为碳源、以酵母抽提物作为氮源、25℃培养 27 h 为宜。该酶最适作用温度 60℃, 最适作用 pH 5.4, 60℃保温 3 h 酶活性不损失, 有较好的应用前景。

关键词: 枯草杆菌; β -甘露聚糖酶; 菌种筛选; 产酶条件; 酶学性质

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

双歧杆菌是维持人体健康的优势菌群。已研究证实: 魔芋甘露低聚糖不但能非常有效地促进双歧杆菌的生长, 而且还能优化肠内菌群结构, 其性能优于其他多种低聚糖, 开发前景广阔^[1]。魔芋低聚糖来源于魔芋葡甘聚糖的不完全水解产物。据研究报道: β -甘露聚糖酶可作用于植物中的各种 β -葡萄糖聚糖的主链, 形成 2~10 个单糖分子构成的葡-甘型或甘-甘型低聚糖^[2]。所以, 筛选耐热、高活性的 β -甘露聚糖酶的产生菌是开发魔芋低聚糖的关键。本文对芽孢杆菌属的 10 种 26 菌株进行筛选, 并对其中优良菌株的产酶条件及酶学性质进行研究, 以期对开发魔芋低聚糖用酶提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验菌种来自于英国女王大学食品系酶学研究室和华南农业大学食品系微生物教研室。

1.2 培养基

发酵培养基: 5 g/L 槐豆胶或魔芋胶、1 g/L 酵母抽提物、10 g/L 蛋白胨。

氮源培养基: 5 g/L 氮源、5 g/L 槐豆胶、1 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、pH 6.5~6.8。

1.3 培养方法及粗酶液的提取

将斜面菌种接入有关培养基中, 于 25℃摇瓶培养(180 r/min)至对数生长期, 按 $\varphi = 30$ mL/L 接种量接到同一培养基中, 于同样条件下培养 24~48 h。将菌液于 6 000 r/min、4℃下离心 15 min, 取上清液测定酶活性。

1.4 β -甘露聚糖酶的平板筛选法

在 30℃培养 2 d 的双层琼脂平板(1 g/L 酵母抽

提物、10 g/L 蛋白胨作底层培养基, 上面覆盖 2 g/L 魔芋胶培养基)上倒一层刚果红水溶液(1 g/L)、静置 5 min, 然后将刚果红溶液弃掉, 用自来水缓慢冲洗平板, 检测是否产生黄色水解圈, 作为产 β -甘露聚糖酶的初步检测^[3]。

1.5 酶活力测定

β -甘露聚糖酶活性分析用槐豆胶作底物。反应混合溶液中含有 0.45 mL 用 0.1 mol/L 的醋酸钠缓冲液(pH 5.8)配制的槐豆胶溶液(5 g/L)和 0.05 mL 适当稀释的发酵上清液。该混合液于 50℃保温 10 min, 用 DNS 法测定反应产生的还原糖。

β -甘露糖苷酶活性分析用 *p*-硝基苯- β -D-吡喃甘露糖苷(PNPM)作底物。测定方法按 Duffaud 等^[4]进行。

β -葡萄糖苷酶活性分析用 *p*-硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)作底物。测定方法按 Arisan-Atac 等^[4]进行。

酶单位定义为每分钟释放 1 μ mol 还原糖(相当于甘露糖)的酶量为一个酶活力单位。

1.6 酶作用的最适温度、最适 pH 及热稳定性测定

酶作用最适 pH 测定, 采用在不同 pH (pH 3.6~6.0 为醋酸缓冲液, pH 6.0 以上采用磷酸钾缓冲液)下, 按酶活性测定方法测定酶活性。酶的最适温度测定, 在不同温度(30~70℃)下按酶活性测定方法测定酶活力。酶的热稳定性测定, 将酶液置于不同温度水浴中保温 3 h, 每隔 1 h 取样在流水中冷却后, 按酶活性测定方法测定残留酶活性, 用未经热处理的酶液作对照。

2 结果与分析

2.1 细菌产 β -甘露聚糖酶能力比较

平板法筛选结果表明, 10 种共 26 株芽孢杆菌中

有 17 株具有产 β -甘露聚糖酶的能力. 在不同受检菌株中, *Bacillus subtilis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. polymyxa* 产酶菌株数较多(表 1). 平板筛选中发现, *Bacillus subtilis* 菌株产生的黄色水解圈普遍较大, 表明其产酶能力较强.

表 1 芽孢杆菌(*Bacillus*)产 β -甘露聚糖酶能力检测
Tab. 1 Detection of β -mannanase on *Bacillus* by Congo Red assay

菌 名	受检菌株数	产 β -甘露聚糖酶菌株数
organism	No. of detected strain	No. of β -mannanase-producing strain
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	2
<i>B. coagulans</i>	3	0
<i>B. laterosporus</i>	1	0
<i>B. lentus</i>	1	0
<i>B. licheniformis</i>	2	2
<i>B. pantothenicus</i>	1	0
<i>B. polymyxa</i>	1	1
<i>B. pulvificiens</i>	1	0
<i>B. pumillis</i>	1	0
<i>B. subtilis</i>	13	12

在上述试验基础上, 对产酶能力强的菌株用含有 5 g/L 魔芋胶的发酵培养基做进一步筛选, 经 25℃ 摇瓶培养 24 h, 测定培养基上清液中 β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 β -葡糖苷酶活性. 结果表明: *B. subtilis* 中 NRRL356 与 NCIMB11034 菌株产 β -甘露聚糖酶能力相当, 但 NRRL356 产 β -甘露糖苷酶较 NCIMB11034 高出 7 倍多; SA-22 菌株产 β -甘露聚糖酶能力低于 NRRL356 和 NCIMB11034 近 1/3, 且有一定产 β -甘露糖苷酶和 β -葡糖苷酶的能力. 综合比较以 NCIMB11034 作为生产甘露低聚糖的菌株较好(表 2).

表 2 上清液中 β -甘露聚糖酶、 β -甘露糖苷酶和 β -葡糖苷酶活性(U/mL)
Tab. 2 β -Mannanase β -mannosidase and β -glucosidase activity in supernatant fluids

菌株	β -甘露聚糖酶	β -甘露糖苷酶	β -葡糖苷酶
strain	β -Mannanase	β -mannosidase	β -glucosidase
<i>B. subtilis</i> NRRL 356	2.4	0.019 2	0
<i>B. subtilis</i> NCIMB 11034	2.3	0.002 7	0.001 1
<i>B. subtilis</i> SA-22	1.7	0.008 1	0.013 0

2.2 碳源对 NCIMB11034 产 β -甘露聚糖酶的影响
在发酵培养基中加入不同种类的碳源($\rho = 5$ g/L), 测定发酵液中的酶活力(表 3). 从表 3 看出, 除葡萄糖外, 所试的其他 4 种碳源均可作为菌株产酶的碳源, 但以槐豆胶和魔芋胶产酶较高. 当以葡萄

糖作碳源时, 菌体生物量虽较高, 但无 β -甘露聚糖酶产生.

进而以槐豆胶为碳源进行浓度试验. 结果表明, 随着槐豆胶浓度增大, 产酶量持续增加, 当槐豆胶浓度达到 $\rho = 5$ g/L 时, 产酶达最高水平, 但继续增加槐豆胶浓度, 产酶量增加不明显(图 1A).

2.3 氮源对 NCIMB11034 产 β -甘露聚糖酶的影响
在培养基中分别加入不同氮源进行产酶试验, 结果表明, 供试的 5 种氮源均可作为菌株产酶的氮源, 其中以酵母抽提物效果最好, 产 β -甘露聚糖酶达 2.1 U/mL, NaNO_3 与蛋白胨效果稍差, 其产酶分别为 1.8 和 1.5 U/mL, NH_4Cl 与牛肉抽提物效果最差, 产酶分别仅 1.3 和 0.9 U/mL.

表 3 碳源对 NCIMB11034 产生 β -甘露聚糖酶的影响
Tab. 3 Effect of carbon source on β -mannanase production of NCIMB11034

碳 源	β -甘露聚糖酶活性	ρ (细胞 cell)
carbon source	β -mannanase activity / (U $\cdot$ mL $^{-1}$)	/ (mg $\cdot$ L $^{-1}$)
槐豆胶 locust bean gum	2.6	150
地衣多糖 lichenin	1.1	70
魔芋胶 konjac gum	2.3	137
瓜尔胶 guar gum	0.3	86
葡萄糖 glucose	0.0	98

2.4 培养温度和时间对 NCIMB 11034 产酶的影响
培养温度对产酶有着较大的影响. 当于 25℃ 下发酵, 产酶速度较慢, 27 h 时酶活性达最大; 而在 37℃ 下, 产酶速度加快, 但产酶量有所降低(图 1B).

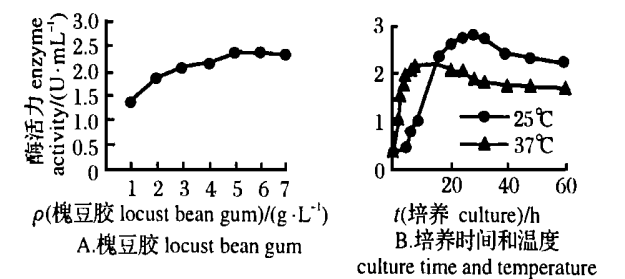


图 1 不同因素对 NCIMB11034 产 β -甘露聚糖酶的影响
Fig. 1. Effects of different factors on β -mannanase production of NCIMB11034

2.5 酶作用的最适温度、最适 pH 及热稳定性
将 NCIMB11034 菌株于上述优选条件下获得的粗酶液进行下列研究.

- (1) 酶作用最适 pH: 从图 2A 看出, 酶的最适 pH 为 5.4. 高于或低于 5.4, 酶活力迅速下降.
- (2) 酶作用的最适温度: 在 30~60℃ 范围内, 随温度升高, 酶活力增大, 当温度超过 60℃ 时则略有下降, 表明该酶最适作用温度为 60℃(图 2B).

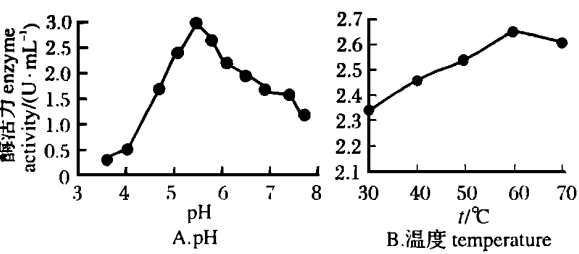


图 2 pH 和温度对 NCIMB11034 β -甘露聚糖酶活性的影响
Fig. 2 Effects of pH and temperature on β -mannanase activity of NCIMB11034

2.6 酶的热稳定性

结果如图 3 所示, 60℃保温 3 h, 酶活力维持不变. 65℃以上, 酶活力不稳定, 温度越高, 酶活力维持时间越短. 65℃保温 1 h, 酶活力没有损失, 保温 2 h 后, 酶保留 85% 活性; 80℃保温 3 h 后, 酶只残留 20% 活性.

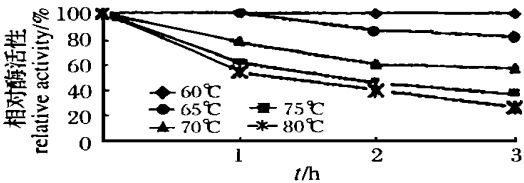


图 3 NCIMB 11034 β -甘露聚糖酶的热稳定性
Fig. 3 Effect of temperature on stability of β -mannanase of NCIMB11034

3 讨论

魔芋胶是由葡萄糖和甘露糖残基通过 β -1, 4 糖苷键连接而成的高分子多糖. 为保证魔芋胶的降解产物为低聚糖, 不含或少含单糖(葡萄糖和甘露糖), 要求所用菌种的 β -甘露聚糖酶活性高, 且不产 β -甘露糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶, 或该两种酶活性极低. NCIMB11034 的产酶性能表明, 该菌胞外 β -甘露糖苷

酶和 β -葡萄糖苷酶的活性很低, 符合生产魔芋低聚糖的这一基本要求. 该酶的耐热性好, 60℃保温 3 h, 酶活性仍不损失, 比报道的菌株耐热温度提高 10℃^[9], 这对于在魔芋甘露聚糖酶解过程中防止杂菌污染和加快降解速度有重要作用, 也有利于保持酶解速率的稳定.

从 NCIMB11034 产 β -甘露聚糖酶的条件分析, 该酶在含有 β -糖苷键的碳源中培养才有活性(表 3), 表明该酶的合成受底物诱导. 适当降低发酵温度有利于 β -甘露聚糖酶的合成, 这可能是因为该酶的 mRNA 不够稳定所致^[9]. 该菌对氮源的利用范围较宽, 生产中可考虑用 NaNO_3 取代部分酵母抽提物和蛋白胨, 不仅可降低成本, 还有利于减少蛋白胨和酵母抽提物给粗酶液带来的异味.

参考文献:

[1] 马延和, 周培瑾. 浅谈寡糖的开发和应用[J]. 食品与发酵工业, 1992, (1): 80-82.
[2] DUFFAUD G D, MCCUTHEN C M, LEDUC P, et al. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -Galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068[J]. Appl Environ Microbio, 1997, 63: 169-177.
[3] DOWNIE B, HILHORST H W M, BEWLEY J D. A new assay for quantifying endo- β -D-mannanase activity using congo red dye[J]. Phytochemistry, 1994, 36(4): 829-835.
[4] ARISAN-ATAC I, HODITS R, KRISTUFEK D, et al. Purification and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 58-62.
[5] ARAUJO A, WARD O P. Mannanase components from *Bacillus pumilus*[J]. Appl and Environ Microbio, 1990, 56: 1 954-1 956.
[6] 郭 勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 46-50.

Study on Strain and Conditions of β -Mannanase-Production and Partial Properties of β -Mannanase

YANG You-hui¹, Alan M McKAY²

(1 Dept. of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2. Dept. of Food Science, the Queen's Univ. of Belfast, Newforge Lane, Belfast BT9 5PX, Northern Ireland)

Abstract: A range of *Bacillus subtilis* strains and other *Bacillus* species were screened using Congo red assay for β -mannanase. *Bacillus subtilis* NCIMB11034, which can produce high β -mannanase, was selected from 26 strains of *Bacillus*. The optimal pH and temperature of β -mannanase were 5.4 and 60℃, respectively. β -mannanase retained 100% residual activity after 3 h incubation at 60℃.

Key words: *Bacillus subtilis*; β -mannanase; strain screening; conditions of β -mannanase-production; properties of β -mannanase

【责任编辑 柴 焰】