

地衣芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质

杨文博 佟树敏 沈庆

(南开大学微生物学系, 天津, 300071)

摘要 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) NK-27 菌株发酵产生的 β -甘露聚糖酶 (β -mannanase) 经硫酸铵盐析沉淀, 两次 DEAE 纤维素和 Sephadex G-100 离子交换柱层析以及制备 PAGE 等步骤, 获得了凝胶电泳均一的样品。用 SDS-凝胶电泳测得纯化后的 β -甘露聚糖酶分子量为 26kD, 用凝胶聚焦电泳测得等电点 PI 为 5.0。酶反应的最适 pH 为 9.0, 最适温度为 60℃, 稳定 pH 为 6.0—9.0, 稳定温度为 40℃。金属离子中 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 对该酶有一定的激活作用; 而 Sn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ag^{+} 和 Hg^{2+} 对该酶有强烈的抑制作用。NK-27 菌株的 β -甘露聚糖酶对魔芋葡聚糖和角豆胶半乳糖甘露聚糖的 K_m 值分别为 7.14 和 5.56 $mg \cdot ml^{-1}$; V_{max} 分别为 200.53 和 157.45 $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

关键词 β -甘露聚糖酶, 地衣芽孢杆菌

近年来, 国内外先后报道了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* K-50)^[1]、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* F-25)^[2]、卡塞尔黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus* FL2121)^[3]、嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alcalophilus* N-16、AM001)^[4,5] 等细菌产生 β -甘露聚糖酶, 并对酶的分离纯化和酶学性质进行了研究。由于 β -甘露聚糖酶不仅可以作为多糖糖链结构分析中必要的工具酶, 而且经 β -甘露聚糖酶水解植物胶后产生的低聚糖 (Oligosaccharide, 亦称寡糖) 是人体和动物体肠道中有益细菌——双歧杆菌的促生长因子^[6], 对维护人体健康大有裨益。因此, 该酶的研究、应用和开发已引起人们的兴趣。我们分离筛选的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) NK-27 菌株也具有产生 β -甘露聚糖酶的能力, 该酶的分离纯化及酶学性质报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*) NK-27 菌株, 本室分离并保藏。

1.2 摇瓶发酵培养基(%)

魔芋粉 2, 豆饼粉 4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.4,

KH_2PO_4 0.03, $MgCl_2$ 0.06, $CaCl_2$ 0.3, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, Na_2CO_3 0.25, pH7.0, 0.15 MPa 灭菌 30min。

1.3 摇瓶发酵产酶

500ml 锥形瓶装培养基 50ml, 37℃, 150r/min 往复式摇床振荡培养 48h, 收集发酵液。

1.4 试剂

DEAE-纤维素 (DE23)(Whatman 产品), Sephadex G-100 (瑞典进口分装), SDS (分析纯)、甘氨酸(华美生物工程公司), PEG 6000 (日本进口分装), 已知分子量标准蛋白质、载体两性电解质 (Ampholyte Carrier) pH 3.5—10 (中科院上海生化所), 魔芋粉 (成都魔芋精粉厂), 豆饼粉(天津酶制剂厂), 其它试剂均为国产分析纯。

1.5 β -甘露聚糖酶活力测定

参照 Akino^[7] 方法, 在 0.9ml 0.5%(W/V) 角豆胶底物中 (pH9.0, 0.05mol/L 甘氨酸- $NaOH$ 缓冲液配制) 加入适当稀释的酶液 0.1 ml, 50℃ 水浴反应 10min, 用 DNS 法测定产生的还原糖量。酶活力定义为: 在上述反应条件下, 每分钟释放出 1 μmol 相当于甘露聚糖的还

本文系南开大学科学发展基金项目
1994-12-14 收稿

原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.6 蛋白质测定

Lowry^[7] 法和测定 A_{280nm} , 以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

1.7 酶的分离和纯化

1.7.1 硫酸铵盐析: 发酵液于 4℃ 11000 × g 离心 30min 去除菌体和残渣, 在上清液中缓慢加入硫酸铵至 30% 饱和度, 4℃ 过夜, 11000 × g 离心, 去除杂蛋白, 于上清液中缓慢补加硫酸铵至饱和度 80%, 4℃ 过夜, 收集沉淀, 溶于少量 pH9.0、0.01mol/L tris-HCl 缓冲液中, 经蒸馏水透析检查无铵离子后, 再经同样缓冲液透析, 计算收率。

1.7.2 第一次 DEAE 纤维素柱层析^[9]: 透析后酶液加入到经上述缓冲液平衡过的 DEAE-纤维素层析柱上端, 用缓冲液洗至 A_{280nm} 不变, 改用以同样缓冲液配制的 0—0.5 mol/L NaCl (各 300ml) 进行梯度洗脱, 流速 7.5ml/10min, 分部收集, 分别测定 A_{280nm} 及酶活力, 合并酶活性峰各管中的酶液, 测定合并酶液的蛋白量及酶活力。

1.7.3 Sephadex G-100 柱层析^[10]: 上述合并酶液于 4℃ 对 0.1mol/L NaCl-0.01mol/L tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液透析后浓缩 50 倍, 加至预先用同样缓冲液平衡过的 Sephadex G-100 柱, 洗脱并分部收集, 流速 4ml/min, 分别测定各收集管和合并酶活性峰管酶液的 A_{280nm} 和酶活力。

1.7.4 第二次 DEAE-纤维素 (DE23) 柱层析: 方法同前。收集液用 PEG 6000 进行浓缩。

1.8 酶学性质

1.8.1 酶分子量测定: SDS-PAGE 电泳法^[8,11], 电泳后用不同蛋白质分子量对数对 R_f 作图, 求出 β -甘露聚糖酶的分子量。

1.8.2 酶的等电点测定: 凝胶电聚焦电泳法^[10]。

1.8.3 酶的 K_m 值及 V_{max} 测定:^[10] 在 pH9.0 的 0.05mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中, 以魔芋粉和角豆胶为底物, 用 Lineweaver-Burk 作图

法求出酶对两种底物的 K_m 和 V_{max} 。

1.8.4 温度对酶活力的影响: 在不同温度下用常规法测定酶活力。

1.8.5 酶的热稳定性: 酶液在不同温度下保温 30min 后按常规法测定酶活力。

1.8.6 pH 对酶活力的影响: 以下列不同 pH 值的缓冲液配制底物和稀释酶液, 按常规法测定酶活力。pH4.0—5.0 (0.05mol/L HAc-NaAc); pH 6.0—8.0 (0.05 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4); pH9.0—10.5 (0.05mol/L 甘氨酸-NaOH); pH 11—12 (0.05 mol/L Na_2CO_3 -NaOH)。

1.8.7 酶的 pH 稳定性: 酶液与上述不同 pH 值的缓冲液于 50℃、保温 30min 后, 按常规法测定酶活力。

1.8.8 金属离子对酶活力的影响^[9]: 用 1×10^{-3} mol/L 的各种金属离子溶液(除 $AgNO_3$ 和醋酸铅外, 其它均为金属氯化物)与酶液在 37℃ 保温 30min 后, 以未加金属离子的酶液为对照, 常规法测定酶活力。

2 结果

2.1 β -甘露聚糖酶的分离和纯化

2.1.1 硫酸铵分步盐析: 从表 1 所列结果可看出, 在 80% 以上的饱和度中酶收率已不再增加, 表明 80% 硫酸铵饱和度已将酶蛋白沉淀完全, 而在 30% 硫酸铵饱和度时酶活力和收率很低, 视为发酵液中的杂蛋白。

表 1 不同饱和度硫酸铵中 β -甘露聚糖酶的收率

硫酸铵饱和度(%)	总酶活力 $\times 10^3(u)$	收率(%)
30	0.003	0.07
40	0.237	5.1
50	1.292	27.8
60	2.357	50.7
70	2.892	62.2
80	3.185	68.5
90	3.185	68.5

2.1.2 β -甘露聚糖酶的柱层析纯化: 经三次柱层析 (DEAE-纤维素 \rightarrow Sephadex G100 \rightarrow DEAE-纤维素) 已将 NK-27 菌株产生的 β -甘

表 2 地衣芽孢杆菌 NK-27 β -甘露聚糖酶的纯化

步骤	体积 (ml)	总酶活力 $\times 10^3$ (u)	总蛋白 $\times 10^2$ (mg)	比活力 (u/mg)	收率 (%)	提纯倍数
粗酶液	659	53.38	76.44	6.98	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	39	22.74	6.34	35.86	42.6	5.14
DEAE-纤维素 (DE 23) 层析	165	8.38	1.71	49.1	15.7	7.03
Sephadex G-100 层析	108	3.56	0.63	56.54	6.7	8.10
DEAE-纤维素 (DE 23) 层析	187	0.94	0.13	70.1	1.8	10.04

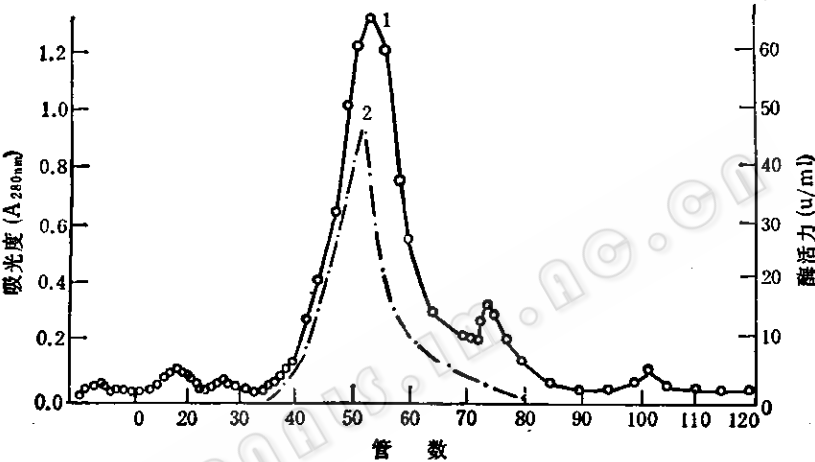


图 1 β -甘露聚糖酶 Sephadex-100 柱层析
1. A_{280nm} , 2. 酶活力

露聚糖酶基本纯化(图 1)。柱层析洗脱液经 PEG 6000 浓缩后获得纯化后的酶液 3.0ml。各步提纯结果列于表 2。酶样品其比活力为 70.1u/mg, 收率 1.8%, 提纯 10.04 倍。

2.2 β -甘露聚糖酶的酶学性质

2.2.1 酶的分子量: 经 SDS-PAGE 电泳后, 从电泳图谱(图 2)可以看出, 酶蛋白呈一条蛋白带, 表明 NK-27 菌株所产生的 β -甘露聚糖酶为一种组分。用已知标准蛋白质的分子量对数对 Rf 值作图, 求出酶样品的分子量为 26 kD。

2.2.2 酶的等电点: 用凝胶电聚焦电泳法测得 β -甘露聚糖酶的等电点 PI 为 5.0。

2.2.3 β -甘露聚糖酶的动力学常数: 用 Lineweaver-Burk 作图法求得 β -甘露聚糖酶对魔

芋葡萄糖甘露聚糖和角豆胶半乳甘露聚糖的 Km 值分别为 7.14mg/ml 和 5.56mg/ml; V_{max} 分别为 $200.53\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $157.45\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2.4 温度对酶活力和酶稳定性的影响: 图 3、图 4 的结果表明, 酶的最适反应温度为 60℃, 经 30—80℃ 梯度保温 30min 后, 30—50℃ 区间酶的稳定性最佳。随温度升高, 酶失活严重, 超过 70℃ 酶几乎完全失活, 说明该酶对高温敏感。

2.2.5 pH 对酶活力和酶稳定性的影响: 从图 5 可看出酶的最适 pH 值为 9.0, 高于 9.0 酶活力急速下降。但低于 9.0 酶活力和耐受性则相对稳定。在 pH6—8 的范围内能保持 90% 左右的酶活力。我们认为这对于使用该酶水解

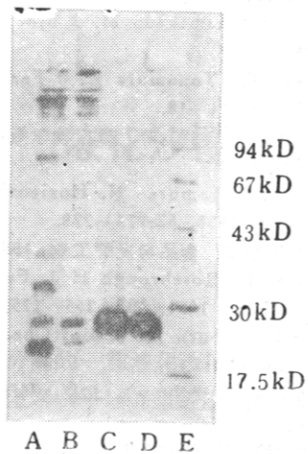


图 2 β -甘露聚糖酶 SDS-PAGE 电泳图谱
A. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析样品 B. NK-27 β -甘露聚糖酶纤维
素柱层析样品 C. D. NK-27 β -甘露聚糖酶三次柱
层析后样品 E. 标准分子量蛋白
94kD: 磷酸化酶 B 67kD: 牛血清白蛋白 43kD: 肌动
蛋白 30kD: 碳酸酐酶 17.5kD: TMV 外壳蛋白

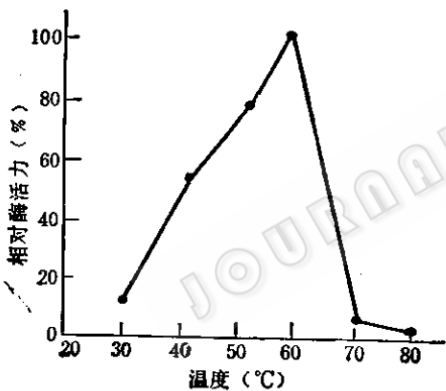


图 3 温度对 β -甘露聚糖酶的影响

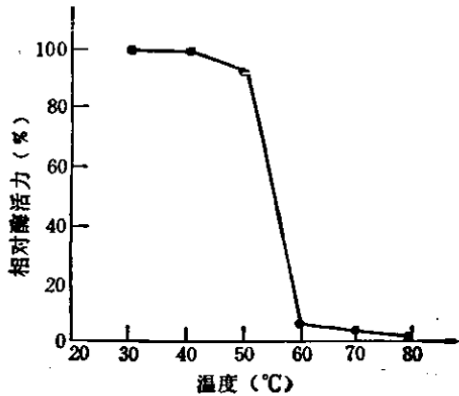


图 4 温度对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响

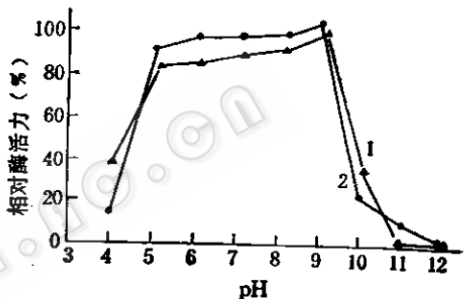


图 5 pH 对 β -甘露聚糖酶活性和稳定性的影响
1. 酶活力, 2. 酶稳定性

魔芋粉、角豆胶等植物胶制取低聚糖较为有利, 因为中性的水解条件可避免因过酸或过碱而带来的后提取脱盐工艺。

2.2.6 金属离子对酶活力的影响: 表 3 结果表明, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 和 K^{+} 对该酶有一定的激活作用; Li^{+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶有抑制作用; 而 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Sn^{2+} 对酶有强烈的抑制作用。

表 3 金属离子对 β -甘露聚糖酶活力的影响			
金属离子 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)	相对活力 (%)	金属离子 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)	相对活力 (%)
对照	100.0	Li^{+}	78.7
Mg^{2+}	116.7	Ba^{2+}	78.7
Ca^{2+}	109.3	Pb^{2+}	77.8
Fe^{2+}	108.3	Cu^{2+}	74.1
Ni^{2+}	107.4	Al^{3+}	36.1
Co^{2+}	101.5	Ag^{+}	30.5
K^{+}	101.3	Hg^{2+}	23.7
Na^{+}	100.0	Zn^{2+}	14.1
Mn^{2+}	92.6	Sn^{2+}	4.4

3 讨论

不同微生物所产生的 β -甘露聚糖酶在酶的组分、分子量、等电点、最适 pH 值、最适温度以及 K_m 、 V_{\max} 均有所差异^[4]。嗜碱芽孢杆菌 AM001^[7]、嗜碱芽孢杆菌 N16-5^[4] 产生 3 种不同分子量的 β -甘露聚糖酶; 卡塞尔黄肠球菌 FL2121 产生 2 种大分子量的 β -甘露聚糖酶 (M-1 和 MII 分子量分别为 142000 和

137000)^[3]。本文报道的地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株的 β -甘露聚糖酶经纯化后只获得 1 种具有活力的酶蛋白。在最适温度、稳定 pH 值、等电点和分子量等酶学性质方面与 Emi 报道的 *B. subtilis* K-50^[1] 菌株所产 β -甘露聚糖酶较为接近。

根据本文的试验结果, NK-27 菌株的 β -甘露聚糖酶的最适反应温度为 60℃, 但其在 60℃ 时酶活力的稳定性却很差, 而 30—40℃ 稳定性最佳。该酶的最适 pH 为 9, 但 pH7 时仍可保持 97.9% 的酶活力, 这对于在常温、中性 pH 值条件下应用该酶进行植物胶酶解制取低聚糖或许更为有利。

参 考 文 献

[1] Emi S, Fukumoto J, Yamamoto T. Agric Biol

chem, 1972, 36:991—1001.

- [2] Araki T, Kitamikado M. J Biochem, 1982, 91 (4):1181—1186.
- [3] Komaki T, Tonomura K. J Ferment Bioeng, 1993, 76 (1):14—18.
- [4] 田新玉, 徐毅, 马延和, 等. 微生物学报, 1993, 33(2): 115—121.
- [5] Akino T, Nskamura N, Horiroschi K. Agric Biol chem, 1988, 52:773—779.
- [6] 马延和, 周培瑾. 食品与发酵工业, 1992, 1: 80—82.
- [7] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L, et al. J Biol Chem, 1951, 193: 265—275.
- [8] Weber K, Osborn M. J Biol Chem, 1969, 244 (16): 4406—4412.
- [9] 林卓坤主编. 色谱法(一), 北京. 科学出版社, 1982, 42—60.
- [10] 张树政主编. 酶学研究技术, 北京. 科学出版社, 1987, 42—54, 195—200.
- [11] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化试验方法和技术 北京. 高教出版社, 1981, 112—119.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF β -MANNANASE FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Yang Wenbo Tong Shumin Shen Qing

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin, 300071)

Abstract The β -mannanase was yield by *Bacillus licheniformis* Nk-27 the β -mannanase was purified to SDS-PAGE homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, twice DEAE-Cellulose column chromatography, Sephadex G-100 column gel filtration. Molecular weight and P_i values of the β -mannanase were 26000 and 5.0 by SDS-PAGE and PAGEIEF. The optimum conditions for enzyme activity were pH9.0, temperature 60℃. Its showed a high stability at temperature 40℃.

The activity of enzyme were enhanced by Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , and were strongly inhibited by Sn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} . The michaelis constants (K_m) values for Konjak-glucomannan and locust bean-galactomannan were 7.14mg/ml and 5.56mg/ml. Maximum velocities (V_{\max}) for saccharides were $200.53 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $157.45 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Key words β -mannanase, *Bacillus licheniformis*