

产 β -甘露聚糖酶内生菌的筛选及酶学特性分析

张建新¹ 赵丹丹¹ 刘起丽³ 聂国兴¹ 张吨¹ 胡文波¹ 明红^{2*}

(1. 河南师范大学 生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 新乡医学院 生命科学技术系 河南 新乡 453003)

(3. 河南科技学院 资源与环境学院 河南 新乡 453003)

摘要: 采用富集培养的方法从黄豆种子中分离出 17 株内生菌菌株, 利用刚果红染色法筛选出 3 株产 β -甘露聚糖酶的内生菌。摇瓶培养并分别测定其酶活力, 其中一株酶活力较高, 达 54.59 U/mL。经生理生化性质测定及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。酶学性质分析发现, 该酶最适作用温度和 pH 分别为 30 °C-50 °C 和 7.0, 在 50 °C 保温 2 h 酶活仍保留 68%, pH 5.0-9.0 条件下保温 1 h 酶活仍保留 64% 以上; Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ba^{2+} 、 K^+ 对该酶有激活作用, 其中以 Ca^{2+} 的激活作用最为明显, 使酶活提高了 31%, Mn^{2+} 和 EDTA 对该酶有抑制作用。

关键词: β -甘露聚糖酶, 黄豆, 枯草芽孢杆菌, 酶学性质

Screening of endophyte strain producing β -mannanase and the analysis of its enzymatic properties

ZHANG Jian-Xin¹ ZHAO Dan-Dan¹ LIU Qi-Li³ NIE Guo-Xing¹ ZHANG Dun¹
HU Wen-Bo¹ MING Hong^{2*}

(1. School of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

(3. School of Resources & Environment Sciences, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Seventeen endophyte strains were isolated from soybean seeds by enrichment culture, and three endophyte strains producing β -mannanase were screened using Congo red dye method. By the shaking-flask culture, a strain of bacterium with the highest enzyme activity of 54.59 U/mL was obtained, and it was identified as *Bacillus subtilis* by the analysis of morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences. Enzymic properties of the β -mannanase revealed

that the optimal temperature and pH were 30 °C–50 °C and 7.0, respectively. The enzyme activity still remained 68% when the enzyme was treated at 50 °C for 2 h; and more than 64% enzyme activity was remained after 1 h treatment at pH 5.0–9.0. In addition, the enzyme can be activated by Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , and Ca^{2+} which has the most significant effect on the enzyme activity to improve 31% of activity. But, Mn^{2+} and EDTA could inhibit the enzyme activity.

Keywords: β -mannanase, Soybean, *Bacillus subtilis*, Enzymatic properties

β -甘露聚糖酶(β -1,4-D-mannanmann-ohydrolase, EC3.2.1.78)被广泛应用于饲料、食品行业、造纸废水处理和石油行业等^[1-3]。近年来随着豆类产品在食品和饲料中得到广泛应用,甘露聚糖的抗营养作用受到关注^[4]。

虽然 β -甘露聚糖酶的应用前景广阔,但目前的低产量和高成本限制了其应用的范围和规模,能改变这种状况的最佳途径之一是筛选和培育高产 β -甘露聚糖酶的菌株^[5]。目前国内外有许多关于筛选产 β -甘露聚糖酶菌株的报道,但大多限于从土壤或水体中分离的菌株^[6-9]。自 1898 年 Vogl 从黑麦草种子内分离出第一株内生真菌以来^[10],植物内生菌作为一种新的微生物资源受到了广泛关注。有研究显示,从植物内生菌分离的生物活性物质中有 51%是以前没有发现的化合物,这对开拓生物活性物质来源的新领域具有重大的意义^[11-12]。自然界中甘露聚糖主要存在植物种子中,如田菁、黄豆和刺槐豆种子及魔芋的块茎中甘露聚糖含量都超过 20%^[13],理论上这些高含甘露聚糖的植物组织内可能存在产 β -甘露聚糖酶的内生菌株,但国内外未见相关报道。本研究从黄豆种子的内生菌中筛选出产 β -甘露聚糖酶的菌株,并对其酶学特性进行了初步研究,为该酶以后在实际中应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试样品

成熟的黄豆种子购于超市。

1.2 试剂

瓜豆胶、魔芋粉、槐豆胶购于郑州世纪美食品添加剂有限公司,酵母膏、蛋白胨、3,5-二硝基水杨酸(DNS)、苯酚、NaOH、 Na_2SO_3 、NaClO、无水乙醇购于新乡市化玻站,菌株 JM109 为本实验室保藏,

DNA 凝胶回收试剂盒、*Taq* 酶购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.3 培养基

参照董桂清等人^[8]报道的培养基配方并做调整。

富集培养基(W/V): 魔芋粉 0.5%, 瓜豆胶 0.5%, $MgSO_4$ 0.03%, KCl 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, 琼脂 0.5%, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

分离培养基(W/V): 瓜豆胶 0.5%, $MgSO_4$ 0.03%, K_2HPO_4 0.2%, NaCl 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, 琼脂 1.5%, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

种子培养基(W/V): 瓜豆胶 1%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, $MgSO_4$ 0.03%, KCl 0.1%, $FeSO_4$ 0.001%, K_2HPO_4 0.2%, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

活化培养基(W/V): 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基(W/V): 瓜豆胶 1%, 酵母膏 0.2%, $MgSO_4$ 0.03%, $FeSO_4$ 0.001%, K_2HPO_4 0.2%, NaCl 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, Tween-80 0.1%, pH 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.4 黄豆种子内生细菌的分离和产酶菌的筛选

1.4.1 黄豆种子内生菌的提取: 将黄豆种子于 30 °C 催芽 24 h, 按照周怡等^[15]的方法对黄豆种子进行表面消毒。将表面消毒的黄豆种子置于灭菌研钵中充分研磨,加适量无菌水混匀后静置 20 min,取上清液 1 mL 加入富集培养基,32 °C、180 r/min 培养 48 h。取 1 mL 富集培养液,进行梯度稀释后均匀地涂布在分离培养基平板上,32 °C 倒置培养过夜,根据菌落的颜色和形态挑取单菌落进行纯化培养。接种于固体种子培养基斜面 4 °C 保存备用。

1.4.2 产酶菌株的初筛: 将筛选得到的单菌落点接种于分离培养基平板上,倒置培养 24 h 后,用 1.0 g/L

刚果红溶液染色 30 min, 产 β -甘露聚糖酶的菌落周围形成黄色的水解圈, 背景是红色, 水解圈的大小可以初步检测酶活的高低。

1.4.3 菌株的复筛: 将初筛得到的菌株接入摇瓶发酵培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床培养 72 h 后用 DNS 法测定酶活^[14], 作为进一步筛选的依据。

1.4.4 培养方法和粗酶液的制备: 将斜面保藏的菌种接入到活化培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 按 3% 的比例接种到种子培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 然后将种子按 3% 的比例接入发酵培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 72 h, 收集发酵液, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液为粗酶液。

1.5 甘露聚糖酶活力测定

1.5.1 甘露糖标准曲线的绘制: 按照蒙海林^[14]的方法绘制甘露聚糖标准曲线。

1.5.2 甘露聚糖酶活力测定: 以 1% (W/V) 的槐豆胶作为底物(用 0.2 mol/L、pH 7.0 的磷酸钠缓冲液配制), 在 0.9 mL 底物中加入 0.1 mL 粗酶液, 置 50 °C 水浴反应 5 min, 加入 DNS 试剂 2 mL, 沸水浴 2 min 显色, 然后以流水迅速冷却, 用蒸馏水定容至 25 mL。以不加粗酶液的空白液调零, 在 540 nm 处测定吸光度。

上述反应条件下, 每分钟释放 1 μ mol/L 相当于 β -甘露糖的还原糖基所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.6 菌株的鉴定

按照黄俊丽^[16]的方法和条件提取本实验分离菌株 HD₁ 基因组 DNA 并进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后与载体 pMD19-T 连接, 转化至大肠杆菌 JM109。由上海联合基因公司完成 HD₁ 的 16S rDNA 部分序列测序, 采用 BLAST 软件在 GenBank 上进行同源性比较, 以 ClustalW 进行序列多重比对后, 用 MEGA 4.0 构建系统发育树, 并结合其生理生化特征进行鉴定。

1.7 β -甘露聚糖酶酶学性质研究

1.7.1 温度对酶活力的影响: 摇瓶发酵后提取粗酶液, 分别在 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 下测定 β -甘露聚糖酶的酶活力。每个处理做 3 个平行, 重复 3 次, 以下试验处理相同。

1.7.2 温度对酶活稳定性的影响: 将粗酶液分别置于 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 恒温水浴中分别保温 30、60、90、120 min 后, 在 50 °C 测定残留酶活力(以未经处理的酶液作对照)。

1.7.3 pH 对酶活力的影响: 用 pH 3.0–10.0 (pH 3.0–6.0, 0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.2 mol/L NaH₂PO₄ 缓冲液; pH 7.0–8.0, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液; pH 9.0–10.0, 0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 的缓冲液配制不同 pH 值的底物, DNS 法测定 β -甘露聚糖酶的酶活力。

1.7.4 pH 对酶活稳定性的影响: 将等量酶液和 pH 5.0–9.0 的缓冲液混合并置于 50 °C 恒温水浴中保温 1 h, 调 pH 为 7.0 后测定残留酶活力(以未经处理的酶液作对照)。

1.7.5 离子与 EDTA 对酶活力的影响: 将酶液与等量离子或 EDTA 溶液混合, 使相应的离子或 EDTA 浓度达到 2 mmol/L, 于 50 °C、pH 7.0 保温 30 min 后, 测定金属离子或 EDTA 存在下的 β -甘露聚糖酶的酶活力(以未经处理的酶液作对照)。

2 结果与分析

2.1 黄豆种子内生菌的分离与产酶菌株的初筛

黄豆种子表面消毒后共分离出 17 株内生菌菌株, 分别命名为 HD₁–HD₁₇。根据刚果红染色后生成透明圈的大小筛选出 3 株产 β -甘露聚糖酶的内生菌菌株, 分别为 HD₁、HD₈ 和 HD₁₂, 如图 1 所示。

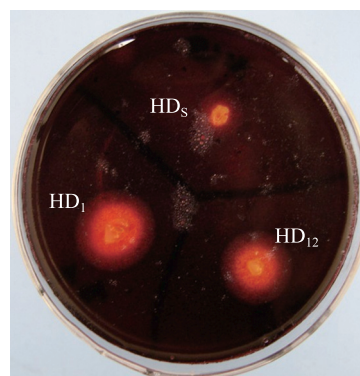


图 1 β -甘露聚糖酶水解圈

Fig. 1 Hydrolyzed circle caused by β -mannanase

2.2 产酶菌株的复筛

将初筛菌株进行摇瓶发酵产酶实验, 测其酶活力, HD₁、HD₈和 HD₁₂平均分别为 54.59、9.70 和 13.72 U/mL。其中菌株 HD₁ 平均酶活力明显优于菌株 HD₈ 和 HD₁₂ 的酶活力, 为本研究的供试菌株, 如图 2 所示。

2.3 HD₁ 菌株的鉴定

提取菌株 HD₁ 基因组 DNA, 通过 PCR 得到菌株 HD₁ 的 16S rDNA, 如图 3 所示。由上海联合基因公司测得 HD₁ 的 16S rDNA 部分序列长度为

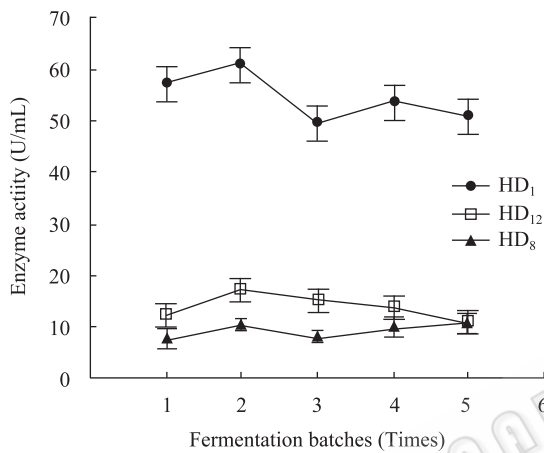


图 2 复筛菌株的酶活力

Fig. 2 Enzyme activity of secondary screening strains

1 472 bp, GenBank 登录号为 HQ329104。BLAST 比对发现 HD₁ 的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌属细菌相似度最高, 用 ClustalW 软件与该属已鉴定的菌株进行多重比对后, 用 MEGA 4.0 构建系统发育树, 如图 4 所示, 菌株 HD₁ 与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 关系最近, 同源性达 99%。参照东秀珠等《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》, 并结合 HD₁ 的形态特征、培养特征及生理生化指标测定等表型鉴定结果(表 1), 初步将 HD₁ 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

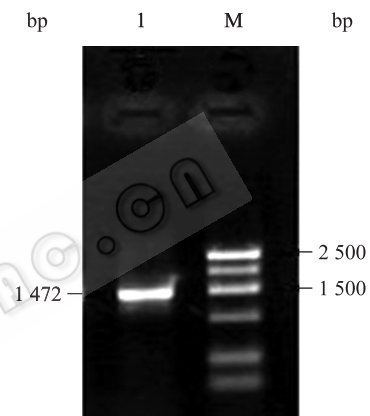


图 3 HD₁ 的 16S rDNA 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of amplification of 16S rDNA of HD₁

Note: M: Marker; 1: Amplification of 16S rDNA.

表 1 HD₁ 的生理生化特征

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of HD₁

测定项目 Items	菌株特性 Characteristics	测定项目 Items	菌株特性 Characteristics	测定项目 Items	菌株特性 Characteristics
形状 Shape	杆状 Rod	甲基红 Methyl red	-	水解淀粉 Hydrolysis of starch	+
孢子 Spore	+	硫化氢产生 Production of H ₂ S	-	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
革兰氏染色 Gram stain	+	卵磷脂酶 Lecithinase	-	水解酪素 Hydrolysis of casein	+
过氧化氢酶 Catalase	+	15 °C 生长 Growth at 15 °C	+	利用木糖 Usage of xylose	+
V-P 反应 V-P reaction	+	50 °C 生长 Growth at 50 °C	+	利用甘露糖 Usage of mannose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	7% NaCl 生长 Growth at 7% NaCl	+	利用葡萄糖 Usage of glucose	+
酪氨酸分解 Decomposition of tyrosine	-	10% NaCl 生长 Growth at 10% NaCl	+	利用阿拉伯糖 Usage of arabinose	+
柠檬酸盐利用 Usage of citrate	+	pH 5.7 生长 Growth at pH 5.7	+		
吲哚产生 Indole production	-	pH 6.8 生长 Growth at pH 6.8	+		

Note: +: Denote positive reaction; -: Denote negative reaction.

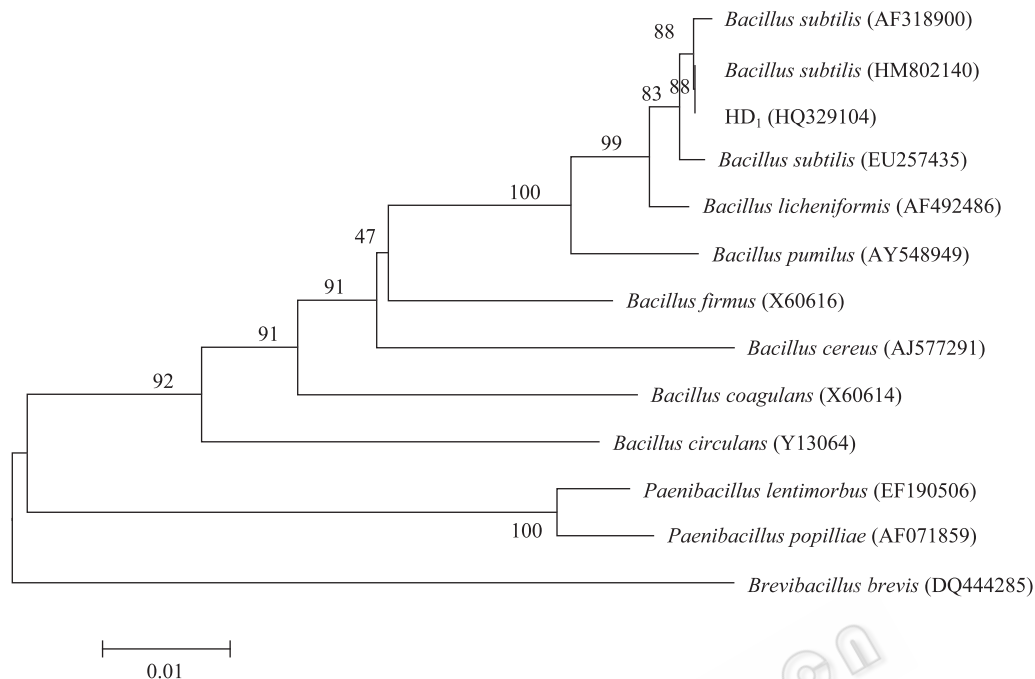


图 4 菌株 HD₁ 的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree for 16S rRNA sequence of HD₁

Note: Bar: 1% nucleotide divergence. Those in parentheses are the GenBank accession number.

2.4 β-甘露聚糖酶酶学性质

2.4.1 温度对酶活力的影响: 每种酶都有其最适的作用温度, 不同温度下对酶活力测定结果表明, 该酶在 30 °C–60 °C 都具有较高的酶活力, 但在 70 °C 酶活力几乎完全丧失, 如图 5 所示。经 SPSS11.0 软件分析, 该酶的酶活力在 30 °C–50 °C 之间无显著性差异, 表明该酶的最佳作用温度为 30 °C–50 °C。

2.4.2 温度对酶稳定性的影响: 由表 2 可以看出, 该酶在 30 °C–50 °C 下保温 30 min 酶活基本上不损失, 保温 2 h 酶活仍保留 68% 以上; 但 60 °C 保温 30 min 酶活已下降 60% 以下, 保温 2 h 酶活基本丧失。由此可知该酶在 30 °C–50 °C 范围内酶活力具有较好的稳定性, 这就为该酶在中低温环境中的应用打下了基础。

2.4.3 pH 对酶活力的影响: 不同 pH 值对酶活力的影响如图 6 所示, 该酶的最适 pH 为 7.0, 在 pH 5.0–9.0 都具有较高的酶活力。

2.4.4 pH 对酶稳定性的影响: 由图 7 可知, 该酶在 pH 5.0–8.0 下保温 1 h 酶活基本上不损失; 在 pH 9.0

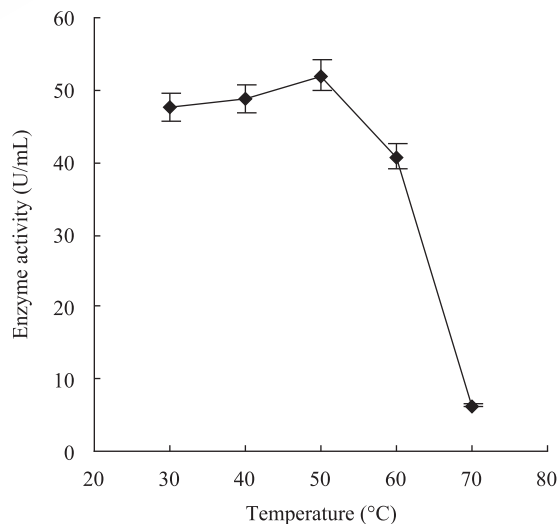


图 5 温度对酶活力的影响曲线

Fig. 5 Effect of temperature on enzyme activity

下保温 1 h 残留酶活力仍有 64%。这就说明该酶不仅有宽泛的 pH 使用范围, 并且在 pH 5.0–9.0 范围内稳定性强, 为该酶在更广泛领域的应用提供了前提。

表 2 温度对酶稳定性的影响				
Table 2 Effect of temperature on enzyme stability				
温度 Temperature (°C)	残留酶活力 Relative enzyme activity (%)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
30	96.76	89.63	81.63	72.69
40	95.90	84.87	73.87	68.10
50	96.33	88.21	70.21	68.72
60	93.34	57.04	12.11	5.56

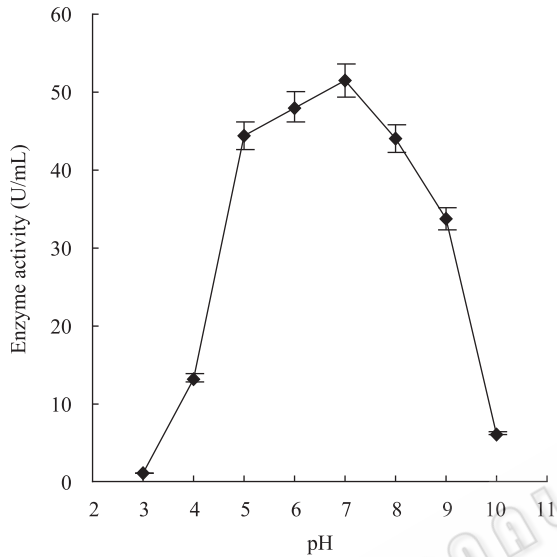


图 6 pH 对酶活力的影响曲线
Fig. 6 Effect of pH on enzyme activity

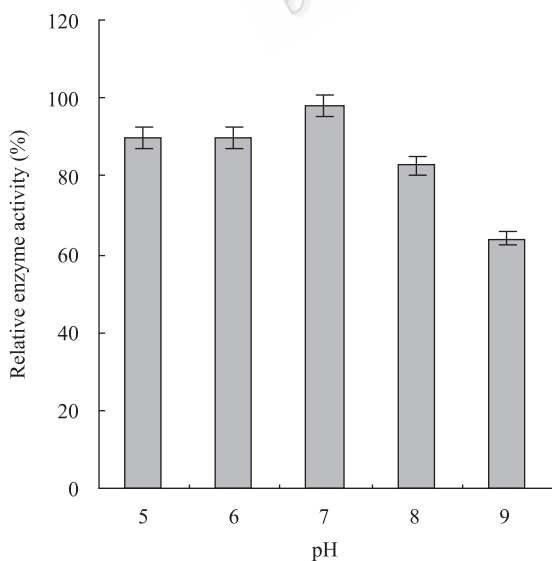


图 7 pH 对酶活稳定性的影响
Fig. 7 Effect of pH on enzyme stability

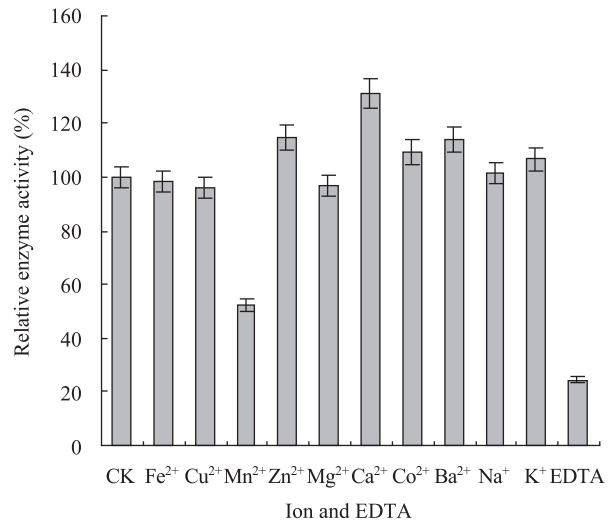


图 8 离子与 EDTA 对酶活力的影响
Fig. 8 Effect of ion and EDTA on enzyme activity

2.4.5 离子与 EDTA 对酶活力的影响: 结果如图 8 所示, 添加 Zn²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、K⁺对该酶具有激活作用, 其中以 Ca²⁺的激活作用最为明显, 达 131%; 而 Mn²⁺和 EDTA 对该酶有强烈的抑制作用。Fe²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Na⁺对酶活没有明显的影响。

3 讨论

目前, 植物内生菌研究已经成为应用微生物研究的热点^[17], 最初主要集中于拮抗菌的筛选, 近几年更关注于产生物活性物质菌株的分离, 但在产酶菌株筛选方面国内外还未见相关报道, 本研究首次在富含甘露聚糖的黄豆种子中分离到产 β -甘露聚糖酶的内生菌株, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌, 说明内生菌和植物之间存在相互依存的关系。这就为拓宽植物内生菌的应用范围, 为更多内生菌资源的开发提供了新的思路 and 理论依据。该内生菌产生的 β -甘露聚糖酶最适反应温度为 30 °C–50 °C, 且酶活力稳定, 在 pH 5.0–9.0 比较宽的范围都有较高的酶活性和稳定性, 表明该酶属于中性 β -甘露聚糖酶, 这些特性为其在饲料工业、食品行业和环保等方面的应用奠定了基础。本研究分离的内生菌与同类产中性 β -甘露聚糖酶的初始菌株相比酶活相对较高^[6], 有较好的研究和应用价值。虽然该酶的酶活力距离应用的要求还有一定的差距, 但可以通过诱变育种和

结合分子手段构建高效表达的工程菌, 或者优化发酵条件提高产量, 以达到实际应用的目的。

参 考 文 献

- [1] Paice MG, Gurnagual N, Page DH, et al. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(4): 272-276.
- [2] 乔欣君, 邹晓庭. β -甘露聚糖酶的营养功能及在动植物生产中的应用[J]. *饲料研究*, 2006(2): 53-55.
- [3] 许牡丹, 杨伟东, 许宝红, 等. 微生物 β -甘露聚糖酶的制备与应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 9(27): 31-34.
- [4] 乔海云, 王海宏, 丁宏标, 等. 甘露聚糖酶对肉鸡肠道微生物和免疫指标的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(2): 15-19.
- [5] 周骏江, 熊波, 汪倬, 等. 产 β -甘露聚糖酶菌株的筛选及其产酶培养基的优化[J]. *广西轻工业*, 2009(4): 22-23.
- [6] Heck JX, de Barros Soares LH, Ayub MAZ. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(4): 417-423.
- [7] Mudau MM, Setati ME. Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(6): 447-481.
- [8] 董桂清, 余钧池, 罗永侦, 等. β -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, 23(4): 20-21.
- [9] 崔福绵, 石家骥, 鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生与性质[J]. *微生物学报*, 1999, 39(1): 60-63.
- [10] Vogl AE. Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen[J]. *Zeit Nahrungsmittel Untersuchung Hyg Warenkunde*, 1898, 12: 25-29.
- [11] Leuchtman A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes[J]. *Nat Toxins*, 1992, 1(3): 150-162.
- [12] 黄瑞虎, 刘会强, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 植物内生菌及其宿主植物研究概况[J]. *新疆师范大学学报: 自然科学版*, 2008(1): 76-79.
- [13] 陈小兵, 丁宏标, 乔宇. β -甘露聚糖酶的酶学性质、工农业应用及基因工程研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2005(增): 156-159.
- [14] 蒙海林, 张云开, 凌敏, 等. β -甘露聚糖酶产生菌的选育[J]. *现代食品科技*, 2006, 22(2): 73-75.
- [15] 周怡, 毛亮, 张婷婷, 等. 大豆内生芽孢杆菌的分离和促生菌株的筛选及鉴定[J]. *大豆科学*, 2009, 28(3): 502-506.
- [16] 黄俊丽, 包凌霞, 王贵学. β -甘露聚糖酶产生菌的分离、鉴定及产 β -甘露聚糖酶最适条件的研究[J]. *生物技术通报*, 2009(7): 166-170.
- [17] Storb GA. Endophytes as sources of bioactive products microbes and infection[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544.