

芽孢杆菌 N-6的鉴定及其产-甘露聚糖酶最适条件的研究

张清霞¹ 周洪友² 唐文华¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010019)

摘要 为获得产酶量高、产酶快的菌株, 采用碘液染色法从土样分离到 1 株产-甘露聚糖酶量高的菌株 *Bacillus* sp. N-6, 通过 16 S rDNA 序列相似性比较及生理生化性状鉴定为枯草芽孢杆菌; 为得到最佳产酶配方进行了发酵条件优化。结果表明: 100 mL 培养基加入 2 g 魔芋粉、1 g 酵母粉、1 g 豆饼粉, 起始 pH 8.0, 32 150 r/min 振荡培养 18 h, 产酶量最高, 达 316.53 U/mL。该酶在 pH 5.0~9.0 和 40~55 下稳定, 作用最适条件 pH 6.0 和 50。Co²⁺ 对酶有激活作用, Fe³⁺、Ag⁺ 和 EDTA 对酶有较强抑制作用。

关键词 甘露聚糖酶; 枯草芽孢杆菌; 鉴定

中图分类号 Q 93-331; Q 939.124

文章编号 1007-4333(2006)03-0036-05

文献标识码 A

Identification and optimization of *Bacillus* sp. N-6 for -mannanase production

Zhang Qingxia¹, Zhou Hongyou², Tang Wenhua¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Agriculture, Agricultural University of Inner Mongolia, Huhhot 010019, China)

Abstract N-6 strain of high extracellular -mannanase activity was isolated from soil samples by iodine dyed method in order to obtain the strain which rapidly produced mannanase. The strain was identified as *Bacillus subtilis* by 16S rDNA BLAST in the Genbank, morphological and physiological characteristics analysis. The result showed that the activity was 316.53 U/mL in the 100 mL culture medium, containing 2 g Konjak powder, 1 g yeast extract, 1 g bean cake powder. The optimal pH, temperature, agitation speed and culture time were 8.0, 32, 150 r/min and 18 h, respectively. The activity was stable at pH 5.0~9.0 and below 55. The optimal condition of the enzyme was pH 6.0 and 50, respectively. The enzyme activity was enhanced by Co²⁺ and was inhibited by Fe³⁺, Ag⁺ and EDTA.

Key words -mannanase; *Bacillus subtilis*; identification

-甘露聚糖酶来源广泛, 在动植物和微生物中都有该酶存在^[1-8]。其中芽孢杆菌因产酶量高、产酶周期短、耐热和抗逆性强而受关注。国内报道了许多其产酶菌株的筛选和产酶条件的优化, 但绝大多数菌株活力低、产酶周期长^[2,9]; 国外对其产酶条件的优化研究较少^[10]。本研究旨在筛选产酶活力高、产酶周期短的菌株, 并通过优化发酵条件提高甘露聚糖酶的产量, 为生产应用和后续研究提供理论依据。

-甘露聚糖酶 (EC3.2.1.78) 是内切水解酶, 催

化水解半纤维素中的半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳葡甘露聚糖和甘露聚糖主链上的-1,4-甘露糖苷键^[1]; 另一方面, 可降解植物胶的低聚糖可用作双歧杆菌促生长因子等保健食品及饲料工业中抗营养因子的开发等^[2-4]。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从内蒙、北京、江苏、河北等地采集的土样中, 按照 Williams 报道的多糖染料和多糖底物反应生成

收稿日期: 2005-10-14

基金项目: 澳大利亚国际农业中心资助项目 (PHT/1998/140)

作者简介: 张清霞, 博士研究生, E-mail: zqx817@126.com; 唐文华, 教授, 通讯作者, 主要从事植物病害生物防治研究,

E-mail: wenhuatang@sohu.com

透明圈检测半纤维素降解的方法^[11]分离得到 9 株供试菌株。

1.2 培养基

1.2.1 角豆胶平板培养基 角豆胶 0.5 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.2 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1 g, 琼脂粉 1 g, pH 7.0, 加水至 100 mL。

1.2.2 发酵产酶培养基 魔芋粉 2 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 1 g, pH 7.0 ~ 7.2, 加水至 100 mL, 32 °C, 150 r/min 振荡培养 12 h。如无特殊说明,甘露聚糖酶的制备均采用此培养基。

1.2.3 基本培养基 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.4 g, KH_2PO_4 0.03 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.06 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, Na_2CO_3 0.25 g, 加水至 100 mL。

1.3 中性甘露聚糖酶活力测定

吸取 0.5 g/100 mL 角豆胶胶状液(用 pH 6.0 0.1 mol/L 柠檬酸和 0.2 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 缓冲液配制),加 0.1 mL 适当稀释的酶液,50 °C 水浴反应 5 min 后,DNS 法测定酶解液的还原糖基增加量^[12]。酶活力单位定义:在上述反应条件下,每分钟释放 1 μ mol 甘露糖的还原基所需的酶量为 1 个酶活力单位,U。发酵液经 12 000 r/min 离心 10 min,上清为粗酶液。

1.4 菌株的鉴定

1) 16S rDNA 的克隆与分析。

菌株 N-6 用 Luria-Bertani(LB)液体培养基培养 8~10 h,离心收集菌体,采用 CTAB 法提取细菌总基因组 DNA^[13]。

采用 1 对保守引物 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') 和 1387R (5'-GGGCGGTGATGTACAAAGC-3')^[14]扩增目标菌的 16S rDNA,这对引物可扩增 1.3 kb 的 16S rDNA 序列。PCR 扩增反应条件:94 °C 变性 5 min,94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,循环数 35,72 °C 充分延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后连接 *Eco*R 酶切的克隆载体 pBluscript SK⁺,转化 *Escherichia coli* DH5,并测序(上海申能博彩生物科技有限公司)。采用 BLAST 软件对序列进行同源性比较。菌株 N-6 16S rDNA 序列已递交 Genbank,登陆号为 AY800557。实验操作参照《分子克隆实验指南》^[15]。

2) 生理生化性状的测定。

依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteri-

ology》第 9 版和 Gordon《芽孢杆菌属》中芽孢杆菌属的特征对菌株进行生理生化性状鉴定。

1.5 主要试剂

酵母粉(英国 Oxoid 公司),角豆胶(美国 Sigma 公司),Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶和 T4 连接酶(日本 Takara 公司),其他试剂均为国产分析纯。

2 结果

2.1 产酶菌株的平板筛选和酶活力筛选

通过平板筛选得到水解圈直径/菌落直径(H/C) > 1 的 127 株菌,将初筛得到的菌株进行发酵产酶实验,测定酶活力,表 1 列出了 9 株产 α -甘露聚糖酶较高的菌株,其中 N-6 产酶活力最高,培养 24 h 酶活力达到 121.4 U/mL,因此将其作靶标进行下一步研究。

表 1 α -甘露聚糖酶产生菌的筛选

Table 1 Screening of α -mannanase production bacteria

菌株	H/C 值	α -甘露聚糖酶活力/(U/mL)
N-6	1.60	121.40
Z-2	1.78	41.82
B-S	1.56	38.05
B-9	1.35	35.45
G10	1.24	33.07
Z-30	1.80	26.89
H-9	5.00	26.18
G14	1.50	24.63
Z-4	2.75	21.43

2.2 N-6 菌株的鉴定

菌株 N-6 的 16S rDNA 序列通过 BLAST 比与 *Bacillus* sp. 同源性最高达到 99%,将与菌株 N-6 同源的 16S rDNA 利用 DNAMAN 软件分析可知,它与 *Bacillus subtilis* Z-2 和 *B. subtilis* BS-1 遗传距离最近。但是在芽孢菌属中细菌亲缘关系都是比较密切的,单纯依靠 16S rDNA 的分析并不能完全将细菌鉴定到种,而必须结合生理生化特征。表 2 列出了 N-6 菌株形态学和生理学特点。菌株 N-6 杆状,产芽孢,好氧或兼性厌氧,革兰氏染色呈阳性的菌,生长温度范围为 15~50 °C。有鞭毛,在 pH 5.7,7% (质量分数) NaCl 条件下均可生长,过氧化氢酶、V-P 反应、淀粉水解、碳水化合物利用、柠檬

酸钠、酪胺、硝酸盐反应呈阳性;丙二酸钠、马尿酸钠、酪氨酸反应呈阴性。结合以上综合性状,鉴定为革兰氏阳性菌中枯草芽孢杆菌,将其命名为 *Bacillus subtilis* N-6(图1)。

表2 *B. subtilis* N-6 菌株形态学和生理学特点

Table 2 Morphological and physiological characteristics of strain N-6

生理生化特性	反应	生理生化特性	反应
形状	杆状	木糖	+
孢子	+	甘露糖	+
革兰氏染色	+	水解淀粉	+
运动性	+	硝酸盐还原	+
过氧化氢酶	+	产黑色素	-
厌氧生长	-	葡萄糖	-
V-P 反应	+	酪氨酸	-
在 15 生长	+	柠檬酸三钠	+
在 50 生长	+	丙二酸钠	-
7% 氯化钠生长	+	马尿酸钠	-
pH 5.7 生长	+	水解酪氨酸	-
碳水化合物利用		水解酪胺	+
葡萄糖	+	石蕊牛奶	产酸 胨化
阿拉伯糖	+		

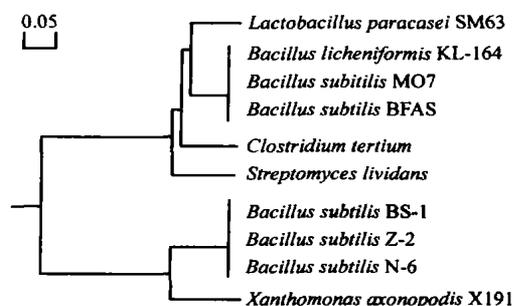


图1 芽孢杆菌 *B. subtilis* N-6 的聚类分析树状图

Fig. 1 Dendrogram of *B. subtilis* N-6

2.3 菌株 N-6 产酶条件的优化

为了增强菌株 N-6 的产酶能力,对不同碳源和氮源对酶活性的影响进行了研究。以无机盐溶液为基础配方,1 g/100 mL 蛋白胨为氮源,进行产酶实验,结果如图2所示,其中1 g/100 mL 魔芋粉诱导的胞外甘露聚糖酶产量最高,达到 28.12 U/mL。仍以无机盐溶液为基础配方,2 g/100 mL 魔芋粉为碳源,对不同氮源对产酶的影响进行了研究(图3)。

供试的几种氮源对该酶诱导作用相当,其中1 g/100 mL 豆饼粉和1 g/100 mL 酵母粉最有利于产酶,酶活性达到 92.56 U/mL。

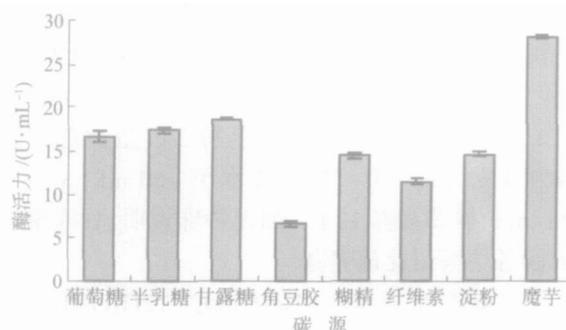


图2 不同碳源的产酶活力

Fig. 2 Effect of different C sources on mannanase production

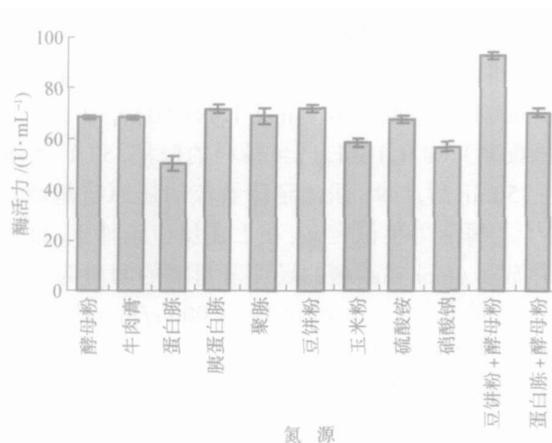


图3 不同氮源的产酶活力

Fig. 3 Effect of different N sources on mannanase production

测定在 25、28、30、32 和 37 温度条件下的产酶,结果表明 32 培养时产酶量最高,达到 177.3 U/mL,37 培养产酶量最低,115.22 U/mL。

据文献报道^[16],培养基的起始 pH 对甘露聚糖酶的产生影响较大,将 pH 调至 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 进行培养,表明产酶最适 pH 为 8.0。

2.4 产酶的时间过程

采用优化后的发酵培养基配方培养菌株 N-6,接菌后 3 h 开始定期取样,测定酶活力(图4),在培养初期该菌产酶迅速,培养 18 h 酶活力就达到最高峰,继续培养则酶的活力开始下降,这一结果比国内外文献报道的产酶时间短^[6,10]。

2.5 粗酶的性质

1) pH 对酶活力和稳定性的影响。在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 条件下按常规方法测定酶活

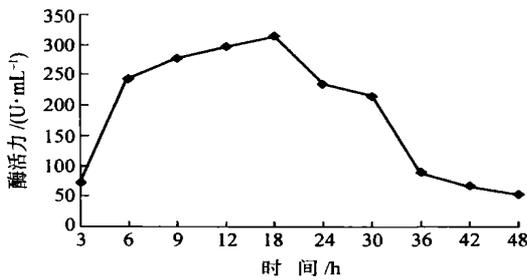


图 4 产酶的时间过程

Fig. 4 Time course of mannanase production

力,做出酶活力曲线,由图 5 可以看出,酶作用的最适 pH 为 6.0,可见该酶是一种中性甘露聚糖酶。稳定性是将酶液与上述不同 pH 缓冲液混和,40 保温 4 h 后,测定残余酶活力,酶稳定 pH 范围较宽,在

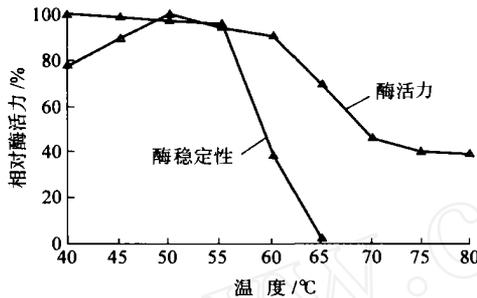


图 5 温度和 pH 对 -甘露聚糖酶活力和稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature and pH on mannanase activities and stabilities

表 3 不同金属离子和螯合剂对酶活力影响

Table 3 Effect of metal ions and EDTA on -mannanase activity %

化合物	相对活性	化合物	相对活性
None	100	CoSO ₄ · 7H ₂ O	112
CaCl ₂	93	MnCl ₂ · 4H ₂ O	90
MgCl ₂ · 6H ₂ O	94	AgNO ₃	8
CuSO ₄ · 5H ₂ O	72	KCl	94
Pb(Ac) ₂ · 3H ₂ O	79	FeCl ₃ · 6H ₂ O	37
ZnCl ₂	87	EDTA	35
FeSO ₄ · 7H ₂ O	72	SDS (0.1 %)	74

2.6 酶解产物的分析

魔芋粉是由甘露糖和葡萄糖(4 3)组成,而角豆胶成分是甘露糖和半乳糖(4 1),甘露聚糖酶的水解产物为甘露寡糖,不含单糖;而用盐酸可以将它们最终降解成单糖,主要是甘露糖(图 6)。

pH 5.0 ~ 9.0 均稳定。

2) 温度对酶活力及稳定性的影响。分别在 35、40、45、50、55 和 60 下测定酶活力,酶的最适反应温度为 50。酶液在不同温度下保温 15 min 后,在 50 测定酶活力(图 5),在 40 ~ 55 酶活力保持稳定,高于 55 酶的活力迅速下降。

3) 金属离子及螯合剂对酶活力影响。酶液与不同的金属离子和螯合剂(1 mol/L)在 40 保温 30 min,然后按常规方法测定残余酶的活力,结果如表 3 所示,Co²⁺ 可以增强酶的活性,Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺ 和 Mn²⁺ 对甘露聚糖酶的活力影响较小,Cu²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 和 Fe²⁺ 对酶的活力抑制作用为 20% 左右,Fe³⁺ 和 EDTA 有较强的抑制作用达到 60%,而 Ag⁺ 对酶的活力抑制作用最强达到 90%。

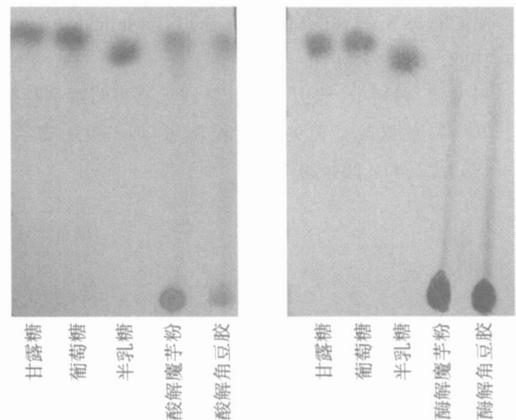
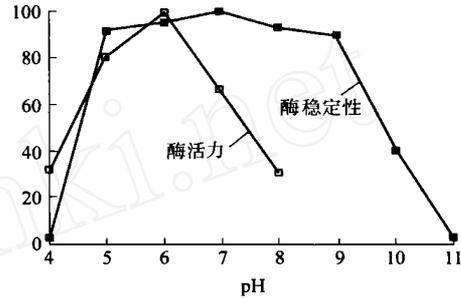


图 6 水解产物薄层层析结果

Fig. 6 Thin layer chromatography graph of the products by hydrolyzing

3 结论

Bacillus subtilis N-6 产生的甘露聚糖酶是一种中性酶。该酶产酶时间短,在 32 振荡培养 18 h 就达到最高峰。比文献报道的枯草芽孢杆菌^[16]和

地衣芽孢杆菌^[2]产甘露聚糖酶的培养时间均短。对产酶条件进行优化,结果表明以2 g/100 mL的魔芋粉,1 g/100 mL酵母粉,1 g/100 mL的豆饼粉,pH 8.0,32 150 r/min振荡培养产酶活力最高。-甘露聚糖酶将甘露多糖水解为甘露寡糖,笔者采用烟草-花叶病和甜瓜-白粉病2种体系,以明确甘露寡糖是否可以作为诱导剂诱导寄主产生抗病性,结果表明可以诱导植物产生系统获得抗性(SAR),而甘露寡糖的生产成本高,目前尚未产业化,因此甘露聚糖酶的应用有很大的潜力。

参 考 文 献

- [1] Bourgauli R, Bewley J D. Variation in its C-terminal amino acids determines whether endo- α -mannanase is active or inactive in ripening tomato fruits of different cultivars [J]. *Plant physiology*, 2002, 130:1254-1262
- [2] 杨先芹,孙丹,杨文博,等. 地衣芽孢杆菌 NK-27 菌株-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)*, 2002, 35(2): 117-120
- [3] Tang C M, Waterman L D, Smith M H, et al. The *cel4* gene of *Agaricus bisporus* encodes a α -mannanase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2298-2303
- [4] Xu B Z, Sellos D, Janson J C. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) α -mannanase gene [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 1753-1760
- [5] McCleary B V. α -D-Mannanases [J]. *Methods Enzymol*, 1988, 160:596-610
- [6] 杨文博,佟树敏,沈庆,等. α -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. *微生物学报*, 1995, 22(4): 204-207
- [7] Wong K Y, Saddler J N. Applications of Hemicellulases in the Food, Feed, and Pulp and Paper Industries [M]. London: Portland Press, 1993: 127-143
- [8] 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
- [9] 熊聆,干信. α -甘露聚糖酶产生菌 R10 发酵条件研究 [J]. *湖北工学院学报*, 2004, 19(1): 17-19
- [10] Waino M, Ingvorsen K. Production of halostable α -mannanase and α -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52: 675-680
- [11] Williams A G. Staining reactions for the detection of hemicellulose-degrading bacteria [J]. *FEMS Microbiol Letter*, 1983, 20: 253-258
- [12] Akino T, NaKamura N, Horikoshi K. Characterization of three α -mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 773-779
- [13] Del sal G, Manfioletti G, Schneider C. A one-tube plasmid DNA miniprep preparation suitable for sequencing [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(20): 9878
- [14] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 759-799
- [15] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. (第3版). 黄培堂,等译. 北京:科学出版社, 2002: 87-103
- [16] 崔福绵,石加骥,鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 α -甘露聚糖酶的产生及性质 [J]. *微生物学报*, 1999, 39(1): 60-63