



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150015

饲用耐酸抗蛋白酶 β -甘露聚糖酶的筛选分离及酶学性质

张文会, 孙同韦, 张会图, 王海宽, 王洪彬, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 工业酶国家工程实验室, 天津市工业微生物重点实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: β -甘露聚糖酶作为饲料添加剂, 不仅可以有效降解并消除饲料中的抗营养因子, 还可以进一步增强动物的免疫反应并调控动物胃肠道中的微生态平衡。然而目前已发现的大部分 β -甘露聚糖酶的酸稳定性差, 并且容易被动物肠道中的蛋白酶所降解, 因此很难在实际应用中发挥理想的效果。本研究从一株高产蛋白酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中分离纯化到一种新型 β -甘露聚糖酶, 并对其酶学性质进行了研究; 结果显示: 该酶的最适作用温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最适催化pH为5.5, Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对该酶有明显的激活作用。稳定性研究表明: 采用pH 2.0的酸性缓冲液处理1 h后, 残余酶活仍能保持70%以上; 进一步采用20 U/mL的猪胰蛋白酶处理2 h, 残余酶活仍在60%以上, 表明该酶不仅具有较好的酸稳定性, 还对来源于猪胰腺的蛋白酶具有一定的抗性。这些研究结果显示: 该酶作为一种新发现的 β -甘露聚糖酶, 在饲料行业中具有较好的研究前景和应用价值。

关键词: β -甘露聚糖酶; 枯草芽孢杆菌; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q814 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2015)06-0007-05

Screening of Acid-and-protease-resistant β -mannanase for Feed and the Characterization of the β -mannanase

ZHANG Wenhui, SUN Tongwei, ZHANG Huitu, WANG Haikuan, WANG Hongbin, LU Fuping
(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: β -mannanases, which can be used as feed additives could not only eliminate the antinutritional factors in feed, but also enhance animal immune response and balance the micro-ecology of animal gastrointestinal tract. However, most of the previously reported β -mannanases hardly show satisfactory efficacy in practical application due to their poor acid stability and susceptibility to digestive proteases. In the present research, a novel β -mannanase was isolated from the fermentation broth of a *Bacillus subtilis* strain, which can simultaneously overproduce proteases. The purified β -mannanase exhibited optimal activity at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH 5.5. It can also be activated by the metal ions of Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} . In addition, the β -mannanase showed high acid stability and resistance to trypsin digestion. After one hour incubation in the acid buffer (pH 2.0) and a succession of two-hour treatment with porcine pancreatic protease (20 U/mL), the remained activities of the β -mannanase still reached more than 70% and 60% of the highest activity. These superior properties make the newly isolated β -mannanase a good candidate for feed additive.

Key words: β -mannanase; *Bacillus subtilis*; purification; enzymatic properties

近年来, 随着人们环保意识的增强以及绿色饲料的兴起, 对 β -甘露聚糖酶在饲料工业的应用已成为一个新的研究热点^[1]。甘露聚糖占饲料中非淀粉多糖

的30%, 是目前大量应用的玉米/豆粕型饲料中主要的抗营养因子^[2]。它们能结合大量的水分, 使采食动物消化道中食糜的体积增大、黏度增加、养分与消化

收稿日期: 2015-01-22; 修回日期: 2015-04-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2013BAD10B01-5)

作者简介: 张文会(1989—), 女, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn.

道内源酶的作用降低、营养物质的消化率下降,造成动物生长受阻、饲料转化率降低,从而使其代谢受到抑制^[3]。在饲料中添加甘露聚糖酶能有效消除它们的抗营养作用,提高动物的生产性能^[4]。另外,添加 β -甘露聚糖酶后,在动物体内能够产生甘露寡糖,可进一步刺激和增强动物的免疫反应,调控动物胃肠道微生态环境,促进有益菌生长,抑制有害菌黏附^[5]。目前已发现的 β -甘露聚糖酶种类很多,其中不乏催化性能优良的高比活 β -甘露聚糖酶^[6-8]。而真正应用于饲料添加剂的 β -甘露聚糖酶则为数不多,并且很难发挥理想效果。究其原因,是由于大部分 β -甘露聚糖酶的酸稳定性较差,难以耐受单胃动物消化道中的强酸环境以及消化道中由酸性至中性的变化过程;另外也有一些 β -甘露聚糖酶由于受到消化液中蛋白酶的降解作用而迅速失活^[9]。因此,寻找具有耐酸、抗蛋白酶特性的新型 β -甘露聚糖酶是解决这一问题的关键所在。

本研究以寻找适合用于饲料添加剂的新型 β -甘露聚糖酶为目标,从一株可大量分泌表达蛋白酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TCCC11286中筛选分离到一种具有耐酸抗蛋白酶特性的 β -甘露聚糖酶。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TCCC11286,本实验室保藏。

1.2 主要试剂

胰蛋白酶,上海伯奥公司;角豆胶、甘露糖, Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

从国内3个商家所购买的 β -甘露聚糖酶酶粉分别标记为A、B、C。

1.3 培养基

β -甘露聚糖酶产生菌筛选培养基(g/L):角豆胶 5,蛋白胨 2,酵母浸出物 2, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25,琼脂 2。

牛奶筛选培养基(g/L):牛肉膏 5,蛋白胨 10, NaCl 5,脱脂奶粉 30,琼脂 20, pH 7.0~7.2。

LB培养基(g/L):酵母浸出物 5,胰蛋白胨 10, NaCl 10。

摇瓶发酵培养基(g/L):魔芋粉 10,酵母膏 2, MgSO_4 0.3, FeSO_4 0.01, K_2HPO_4 2, NaCl 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,吐温 80 1, pH 7.0~7.2。

1.4 蛋白酶及 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选

蛋白酶产生菌的筛选:通过LB固体培养基三区划线将来自实验室的枯草芽孢杆菌菌株在37℃培养24h,进行纯化和活化。将平板上长出的单菌落依次点接到牛奶筛选培养基上,37℃培养24h,产生蛋白酶的菌落周围将会出现透明圈,保存透明圈较大的菌株。

β -甘露聚糖酶产生菌的筛选:将初筛得到的蛋白酶产生菌株依次点接到牛奶筛选培养基上、 β -甘露聚糖酶产生菌筛选培养基上,37℃培养24h,将0.1%刚果红溶液倾倒在长出菌落的筛选平板上,10~15min后倒去刚果红溶液,用1mol/L的NaCl溶液反复冲洗2~3次;然后加入1mol/L NaCl溶液静置15min后倒掉,此时,产生 β -甘露聚糖酶的菌落周围将会出现透明圈,保存透明圈较大的菌落。

1.5 β -甘露聚糖酶酶活的测定

β -甘露聚糖酶能将甘露聚糖降解成寡糖和单糖。具有还原性末端的寡糖和有还原基团的单糖在沸水浴条件下可以与DNS试剂发生显色反应。反应液颜色的强度与酶解产生的还原糖量成正比,而还原糖的生成量又与反应液中 β -甘露聚糖酶的活力成正比。因此,通过分光比色测定反应液颜色的强度,可以计算反应液中 β -甘露聚糖酶的活力。

酶活单位定义:在pH 5.5、50℃条件下,每分钟内底物降解释放1 μmol D-甘露糖所需要的酶量为1个酶活单位U。

酶活测定:取0.5mL适当稀释的酶液加入1.5mL 0.5%角豆胶溶液,50℃保温20min,加入2mL DNS,沸水浴10min,冷却至室温后用去离子水定容至15mL;空白对照:0.5mL适当稀释的酶液加入2mL DNS,50℃保温20min,加入1.5mL角豆胶溶液,沸水浴10min,冷却至室温后用去离子水定容至15mL。在波长550nm的条件下测定吸光度。

1.6 β -甘露聚糖酶的纯化

1.6.1 粗酶液的制备

将枯草芽孢杆菌 TCCC11286 接种于发酵培养基的摇瓶中,37℃、170 r/min 培养 48 h。将发酵液在4℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即为粗酶液。

1.6.2 硫酸铵盐析

采用分步盐析法。粗酶液中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至50%饱和度,4℃静置过夜,4℃、8 000 r/min 离心20 min,弃沉淀;上清液继续添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至80%

饱和度,4℃静置过夜,离心,沉淀备用。

1.6.3 阴离子交换层析

将沉淀用 pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液溶解,透析袋透析脱盐,上样至已用乙酸-乙酸钠缓冲液平衡过的 Hitrap Q HP 阴离子柱(5 cm × 5 cm)上,阶段洗脱。用含有 1 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液以 0~100% 的梯度进行洗脱,流量为 0.5 mL/min,收集洗脱峰,测定各管的 β -甘露聚糖酶活性。合并较高酶活性的收集液,透析,并利用超滤管进行浓缩。

1.6.4 凝胶过滤层析

将离子交换层析后的 β -甘露聚糖酶的活性组分收集浓缩,然后上样至预先用乙酸-乙酸钠缓冲液平衡好的分子筛(Superdex 200 10/300 GL)上,用相同的缓冲液进行洗脱,流量为 0.5 mL/min,收集浓缩含有 β -甘露聚糖酶活性组分。对各步纯化组分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

1.7 β -甘露聚糖酶酶学性质的测定

1.7.1 最适反应温度及温度稳定性

采用 pH 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液配制 β -甘露聚糖酶活性测定反应体系,将反应体系分别置于 30~75℃ 的温度下进行酶促反应,测定其酶活力。酶活力最高的温度为最适反应温度,其酶活力设为 100%,计算其他温度下的相对酶活力。将酶液分别置于 30~75℃ 处理 60 min 后,测定酶活力,以 0℃ 下处理的 β -甘露聚糖酶酶活力定为 100%,计算各温度处理后的相对酶活力,分析其温度的稳定性。

1.7.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性

采用 pH 2~12 的 0.2 mol/L 的缓冲液(pH 2.0~8.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸, pH 9~10 甘氨酸-NaOH, pH 11.0~12.0 Na_2HPO_4 -NaOH)配制 β -甘露聚糖酶的催化反应体系,将反应体系于 50℃ 反应 15 min 后测定酶活力,酶活力最高的 pH 为最适 pH,其酶活力设为 100%,计算其他 pH 条件下的相对酶活力。采用 pH 2~12 的不同的缓冲液处理酶液 1 h 后,测定酶活力,以酶活力最大的 pH 下的酶活力设为 100%,计算各 pH 处理下的相对酶活力,分析其 pH 的稳定性。

1.7.3 不同金属离子与化学试剂对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响

分别用 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的金属离子溶液及其他化学试剂溶解酶解底物,测定酶活力,以未添加任何金属离子和化学试剂的底物下测得的酶活力为 100%,计算加入金属离子和其他化学试剂下的相对酶活力,研究金属离子和其他化学试剂对该酶活力的影响。

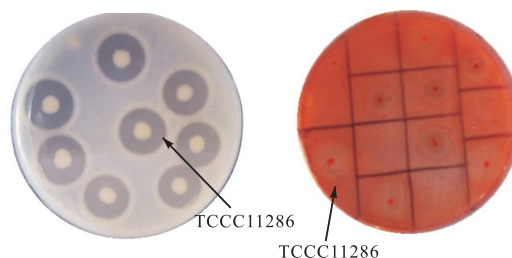
1.8 β -甘露聚糖酶的耐酸抗蛋白酶测试

将纯化后的 β -甘露聚糖酶与市面上的商业酶(编号 A、B、C)进行耐酸抗蛋白酶比较实验。1 mL 酶液加入到 9 mL 50 mmol/L pH 2.0 的甘氨酸-盐酸缓冲液中,37℃、120 r/min 孵育 1 h,测定酶活力,以未处理过的酶活力定为 100%,计算各酶液处理后的相对酶活力,分析其稳定性。各取上述孵育液 1 mL,加入到含有 0.1% 胰蛋白酶的 9 mL 20 mmol/L pH 5.5 乙酸-乙酸钠缓冲液中,37℃ 继续孵育 2 h,测定酶活力。以未经胰蛋白酶处理过的上述孵育液酶活力定为 100%,计算其处理后的相对酶活力,分析其稳定性。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶和 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选

蛋白酶产生菌的筛选结果如图 1(a) 所示,产蛋白酶的菌落周围会形成透明圈。 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选结果如图 1(b) 所示,产 β -甘露聚糖酶的菌落周围会形成透明圈。



(a) 产蛋白酶菌株的筛选 (b) 产 β -甘露聚糖酶菌株的筛选

图 1 产 β -甘露聚糖酶和蛋白酶菌株的筛选

Fig. 1 Isolation of strains producing the new β -mannanase and protease

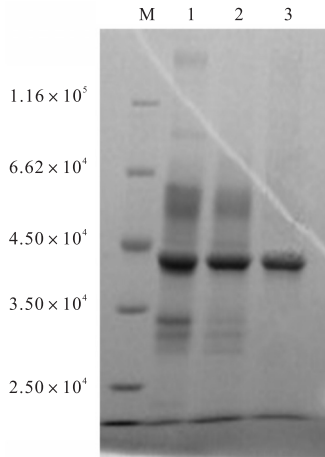
2.2 β -甘露聚糖酶的纯化

将枯草芽孢杆菌 TCC11286 摇瓶发酵,收集粗酶液,利用 80% 的硫酸铵盐析离心后上清液中的 β -甘露聚糖酶酶活力最低,透析液在过阴离子交换柱时出现 3 个峰,并且只有第 2 个峰收集液测到 β -甘露聚糖酶的酶活力,将收集液经过凝胶过滤层析纯化后,比酶活由 560 U/mg 提高到 8 232.6 U/mg,纯化倍数达到 14.7 倍,回收率为 47%。SDS-PAGE 结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,纯化后的 β -甘露聚糖酶是相对分子质量为 3.7×10^4 的单一一条带。

2.3 β -甘露聚糖酶酶学性质分析

将 β -甘露聚糖酶纯酶液分别在不同 pH 的缓冲体系中测定其酶活力,以 pH 为横坐标,相对酶活力

为纵坐标绘制曲线,结果如图 3 所示, β -甘露聚糖酶的最适 pH 为 5.5,且在 pH 2.0~10.0 范围内,酶活力保持在 60% 以上.因此 β -甘露聚糖酶在 pH 2.0~10.0 之间比较稳定,有比较宽的 pH 稳定范围,有很好的耐酸特性.该酶比已报道的酶更具有酸、碱稳定性^[10],这一特点更有利于该酶在饲料添加剂中的使用.



M. 蛋白质 Marker;1. 透析液;2. 离子交换层析液;3. 凝胶过滤层析液

图 2 各个纯化步骤样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 SDS-PAGE of the mannanase sample in each purification procedure

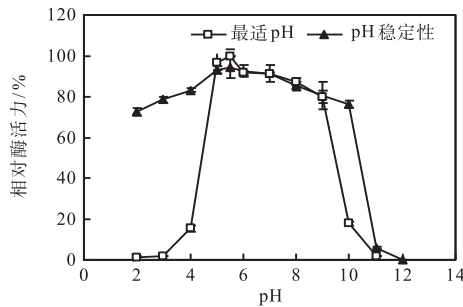


图 3 β -甘露聚糖酶的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 3 The optimal pH and pH stability of the new β -mannanase

在不同的温度(30~70 °C)下测定 β -甘露聚糖酶纯酶液的酶活力,并计算相对酶活力.以温度为横坐标,相对酶活力为纵坐标绘制曲线,结果如图 4 所示.结果表明: β -甘露聚糖酶的最适反应温度为 50 °C,且在 30~60 °C 范围内,酶活力保持在 60% 以上,在 60 °C 以上 β -甘露聚糖酶的酶活力降到 40% 以下.该酶的最适温度与大部分的来源于枯草芽孢杆菌的 β -甘露聚糖酶相似,而 *B. subtilis* 168 的最适反应温度却是 37 °C^[11]. β -甘露聚糖酶的温度稳定性有

利于饲料添加剂的保存与运输.

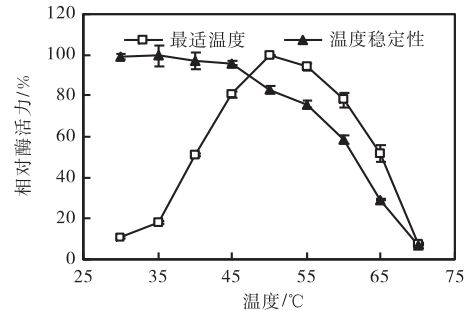


图 4 β -甘露聚糖酶的最适温度及温度稳定性

Fig. 4 The optimum temperature and thermal stability of the new β -mannanase

不同浓度的化学试剂及金属离子对 β -甘露聚糖酶活性的影响结果如图 5 所示.对于不同金属离子和化学试剂对 β -甘露聚糖酶活性的影响结果表明:金属离子 Hg^{2+} 和 Ag^+ 、表面活性剂 SDS、吐温 20、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)对该 β -甘露聚糖酶有不同程度上的抑制作用, Na^+ 、 Ni^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、乙二胺四乙酸(EDTA)对该酶的酶活力基本没有影响, Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对该酶有明显的激活作用.作为饲料添加剂,这一特性有利于抵抗胰蛋白酶和胃蛋白酶^[12-14].

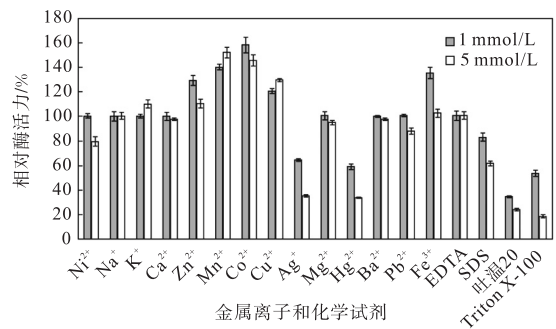


图 5 不同浓度的化学试剂及金属离子对 β -甘露聚糖酶活性的影响

Fig. 5 Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of the new β -mannanase

2.4 β -甘露聚糖酶的耐酸抗蛋白酶测试

用分离纯化到的 β -甘露聚糖酶进行耐酸抗蛋白酶的测试,并与国内所售的 3 种 β -甘露聚糖酶进行比较,结果如图 6 所示.枯草芽孢杆菌 TCCC11286 产的 β -甘露聚糖酶耐酸相对酶活力在 70% 以上,抗蛋白酶相对酶活力在 60% 以上,均高于其他 3 种 β -甘露聚糖酶.因此,枯草芽孢杆菌 TCCC11286 合成的 β -甘露聚糖酶的耐酸抗蛋白酶活性较优,该酶在饲料添加剂的应用中具有很大的潜能.

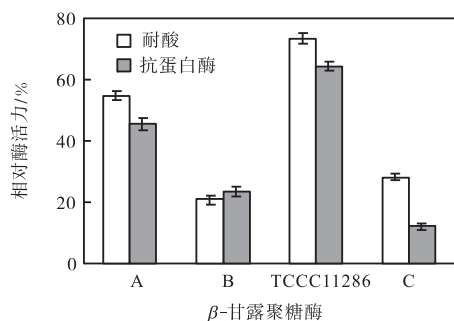


图6 β -甘露聚糖酶的耐酸和抗蛋白酶实验结果

Fig. 6 Acid and protease resistance experiment of the new β -mannanases

3 结论

本研究从一株高产蛋白酶的枯草芽孢杆菌中分离纯化到一种新型 β -甘露聚糖酶,其最适反应温度为 55 °C,最适 pH 为 5.5,在 pH 2~10 的范围内稳定性较好, Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对该酶有明显的激活作用,此外,其具有良好的耐酸抗蛋白酶的特性,因此 *Bacillus subtilis* TCCC11286 所合成的 β -甘露聚糖酶是非常有价值的饲料添加剂原料,可进行深入研究,以实现 β -甘露聚糖酶的工业化应用.虽然该酶的酶活力距离应用的要求还有一定的差距,但可以通过优化发酵条件或者诱变育种和结合分子手段构建高效表达的工程菌提高产量,以达到实际应用的目的.

参考文献:

- [1] 龙健儿,陈一平. β -甘露聚糖酶的研究现状[J]. 微生物学杂志,1998,18(3):44-49.
- [2] Cai Hongying, Shi Pengjun, Luo Huiyang, et al. Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(6): 551-557.
- [3] 王金伟,夏中生,何仁春,等. 饲料中添加非淀粉多糖酶对断奶仔猪生长性能和血清生化指标的影响[J]. 粮食与饲料工业,2013(2):44-47.
- [4] Li Yihang, Chen Xiang, Chen Yiqun, et al. Effects of β -mannanase expressed by *Pichia pastoris* in corn-soybean meal diets on broiler performance, nutrient digestibility, energy utilization and immunoglobulin levels[J]. Animal Feed Science and Technology, 2010, 159(1): 59-67.
- [5] de Vries R. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(1): 10-20.
- [6] Jiang Zhengxiang, Wei Yun, Li Daoyi, et al. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(1): 88-96.
- [7] Mudau M M, Setati M E. Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments[J]. Current Microbiology, 2006, 52(6): 447-481.
- [8] 崔福绵,石家骥,鲁茁壮. 枯草芽孢杆菌中性 β -甘露聚糖酶的产生及性质[J]. 微生物学报,1999,39(1): 60-63.
- [9] 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.
- [10] Ma Yanhe, Xue Yanfen, Dou Yuetan, et al. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5[J]. Extremophiles, 2004, 8(6): 447-454.
- [11] El-Helow E R, Khatib A A. The development of a *Bacillus subtilis* 168 culture condition for enhanced and accelerated beta-mannanase production[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1995, 43(4): 289-299.
- [12] Mendoza N S, Arai M, Kawaguchi T, et al. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10(5): 551-555.
- [13] Yang Peilong, Li Yanan, Wang Yaru, et al. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: Gene cloning, expression and enzymatic characterization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(1): 85-94.
- [14] Zhang Min, Chen Xiulan, Zhang Zhijia, et al. Purification and functional characterization of endo- β -mannanase MAN5 and its application in oligosaccharide production from konjac flour[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5): 865-873.

责任编辑:郎婧