产 β-mannanase 内生菌的诱变育种和酶学特性研究

张建新[1]，张吨，王海磊[1]，胡文波[1]，韩科芳[1]，朱岩昆[1]，赵杰[1]，聂国兴[1]
(1. 河南师范大学生命科学学院，河南新乡 453007) (2. 周口科技职业学院，河南周口 466000)

摘要：以实验室筛选的产 β-甘露聚糖酶的黄豆内生菌 *Bacillus subtilis* HD-1（54.6 U/mL）为出发菌株，分别采用紫外线，硫酸二乙酯，紫外线-光复活和紫外线-硫酸二乙酯对其进行诱变，结果表明，以紫外线-硫酸二乙酯复合诱变效果最好，获得一株高产 β-甘露聚糖酶的突变菌株 *Bacillus subtilis* UD-20，酶活达 89.5 U/mL，比出发菌株提高了 63.9%，遗传性能稳定。该 β-甘露聚糖酶的最适反应温度和 pH 分别为 50 ℃和 7.0，该酶在 50 ℃以下，pH 5.0~8.0 之间稳定性较好，属于中性酶。亚铁离子和钴离子对酶有较强的激活作用，相对酶活分别提高了 13.2%和 31.7%，但锰离子对酶有强烈的抑制作用，相对酶活仅有对照组的 55.6%；金属离子钾、钙、钴和钡都能增强酶热稳定性，其中钴离子的增强效果最为明显，残余酶活约是对照组的 1.5 倍。

关键词：内生菌；β-甘露聚糖酶；诱变；酶学特性；热稳定性
文章篇号：1673-9078(2012)10-1331-1335

Mutation Breeding of a β-Mannanase-producing Endophytic Bacteria and its Enzymatic Characterization

ZHANG Jian-xin[1], ZHANG Dun[2], WANG Hai-lei[1], HU Wen-bo[1], HAN Ke-fang[1]
ZHU Yan-kun[1], ZHAO Jie[1], NIE Guo-xing[1]
(1.School of Life Sciences, Henan Normal University, Henan, Xinxiang, 453007, China)
(2.Zhoukou University of Science and Technology, Henan, Zhoukou, 466000, China)

Abstract: The mutagenic effects of the ultraviolet ray, diethyl sulfate's single factor and ultraviolet-diethyl sulfate compound mutagenesis on *Bacillus subtilis* HD-1 (54.6 U/mL) were studied. Results of enzyme activity showed that ultraviolet-diethyl sulfate compound mutagenesis was better. A mutant strain, named *Bacillus subtilis* UD-20 with high-level β-mannanase production was obtained after ultraviolet-diethyl sulfate compound mutagenesis from *Bacillus subtilis* HD-1 which was an endophytic bacteria screened from soybean seeds. The β-mannanase activity of *Bacillus subtilis* UD-20 increased 63.9% compared with that of the original strain *Bacillus subtilis* HD-1 (54.6 U/ml) and was stable during the generations. The optimal temperature for β-mannanase activity was 50 ℃ and the enzyme was stable up to 50 ℃. The optimal pH for enzyme activity was 7.0 and the enzyme demonstrated broad pH stability within a pH range of 5.0~8.0. The β-mannanase activity was activated by Fe^{2+} (113.2%) and Co^{2+} (131.7%), but strongly inhibited by Mn^{2+} (55.6%). The β-mannanase stability was increased by K^{+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, among which Co^{2+} (150%) showed the best effect on the enzyme stability.

Key words: endophytes; β-mannanase; mutagenesis; enzymatic characterization; thermostability

β-甘露聚糖酶（β-1,4-D-mannanase）是一种广谱诱导型多功能半纤维素酶类，已经被广泛应用于食品、饲料、医药、造纸等诸多领域，成为一种极其重要的工业酶制剂[1]。但目前的低产量和高成本严重限制了β-甘露聚糖酶的应用[2]，因此，通过诱变育种来选育高产 β-甘露聚糖酶的菌株是非常必要的。廖晓霞等[3]通过紫外诱变使米曲霉 U180-26 的产酶能力比出发菌株提高了 3.1 倍，王永等[4]利用紫外线、硫酸二乙酯和 ^{60}Co-γ 复合诱变处理，使蜡样芽孢杆菌 SKS4360 产异甘露聚糖酶的酶活提高 1.0 倍，采用物理诱变剂和化学诱变剂交替处理，能够充分利用了各种诱变剂的不同理化特性和不同作用方式，从而扩大诱变幅度，提高了诱变效率。

国外有报道产 β-甘露聚糖酶的内生菌，包括内生真菌[5]和内生细菌[6~7]，但没有专门对内生菌产酶特性进行深入研究。本实验室从黄豆种子中分离 3 株能够产生 β-甘露聚糖酶的内生菌，其中一株枯草芽孢杆菌

收稿日期：2012-05-22
基金项目：河南省重点科技攻关(112102110118)，河南省教育厅科技攻关（2010A180014）
作者简介：张建新（1974-），男，博士，副教授，从事微生物酶制剂研究
通讯作者：聂国兴（1971-），男，博士，教授，主要从事动物营养研究

HD-1 酶活为 54.6 U/mL[8]。本文将从内生菌 HD-1 出发，采用多种诱变剂对其进行诱变，筛选出高产、稳产 β-甘露聚糖酶的突变菌株，并对该菌株所产 β-甘露聚糖酶的酶学特性进行深入研究，为其后续研究和生产应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

出发菌株是由本实验室筛选的一株产β-甘露聚糖酶黄豆内生菌HD-1[8]，酶活为54.6 U/mL，被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)HD-1（GenBank登录号为HQ329104）。

1.1.2 试剂

曲利苯蓝（trypan blue）购于sigma公司，硫酸二乙酯购于成都贝斯特试剂有限公司，瓜豆胶购于苏州欧宏化工科技有限公司，3,5-二硝基水杨酸(DNS)购于北京索莱宝科技有限公司，其它试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 培养基

斜面培养基(g/L)：瓜豆胶 10，酵母膏 5，蛋白胨 5，硫酸镁 0.3，琼脂 15；活化培养基(g/L)：酵母膏 5，蛋白胨 5，氯化钠 5；分离培养基(g/L)：在斜面培养基中加入0.01%的曲利苯蓝（trypan blue）；种子培养基(g/L)：瓜豆胶 10，酵母膏 5，蛋白胨 5，氯化钾 1，磷酸氢二钾 2，硫酸镁 0.3；发酵培养基(g/L)：瓜豆胶 10，酵母膏 2，磷酸氢二钾 2，硫酸镁 0.3，氯化钠 1，硫酸铵 5，吐温80 1；以上培养基用1 mol/L的HCl或NaOH调节pH为7.0~7.2，121 ℃湿热灭菌20 min。

1.2 方法

1.2.1 产β-甘露聚糖酶内生菌的诱变育种

出发菌株生长曲线：将甘油保藏的菌种HD-1接种于活化培养基，活化后转接到种子培养基，再以2%的接种量接种于发酵培养基，每隔2 h取一次样，于600 nm处测吸光度，以OD 600为纵坐标，培养时间为横坐标作图，得到出发菌株生长曲线。

紫外线诱变：根据出发菌株的生长曲线，选择对数中前期的菌液制成菌悬液，参照施巧琴等[9]人的方法对其进行紫外线诱变，将菌悬液放在紫外灯下，距离30 cm处照射不同时间，进行梯度稀释涂平板，每个梯度做3个重复，37 ℃培养12 h，计算并统计死亡率。

硫酸二乙酯诱变：硫酸二乙酯诱变参照施巧琴等[9]人的方法进行，先用1 %的硫酸二乙酯处理菌悬液不同时间，再用不同浓度的硫酸二乙酯处理菌悬液，以确定硫酸二乙酯的最佳处理时间和处理计量。按照紫外线诱变的方法计算死亡率，制作死亡率曲线和筛选优势突变菌株。

紫外线-光复活诱变：紫外线-光复活诱变参照施巧琴等[9]人的方法进行，菌悬液经紫外线照射后，暴露在日光中光复活一定时间，接着用更大剂量的紫外线照射，然后再让其光照复活，经过多次紫外线-光照复活交替处理，可以增加变异率，提高变异幅度。

紫外线-硫酸二乙酯复合诱变：紫外线-硫酸二乙酯复合诱变参考文献[9~10]提供的方法，综合紫外线和硫酸二乙酯单因子诱变结果，确定复合诱变最佳方案，先用紫外线处理菌悬液一段时间，再用适当浓度的硫酸二乙酯处理一段时间。用黑布包裹于4 ℃冰箱过夜放置，红光下稀释涂平板，筛选高产、稳产β-甘露聚糖酶的突变菌株。

β-甘露聚糖酶高产突变菌株初筛、复筛及遗传稳定性研究：菌体计数以后，参照文献[10~11]的方法进行初筛，挑取水解圈直径大、透明度高的菌落接入斜面培养基，进行保藏。将经过初筛获得的正突变菌株接种于发酵培养基，37 ℃，180 r/min震荡培养72 h，DNS法测酶活。将筛选的高产突变菌株UD-20传代7次，以第一代酶活为100%，DNS法测各代酶活，分析传代结果。

1.2.2 β-甘露聚糖酶酶活测定

参照文献[12~13]的方法加以改动，在 25 mL 的刻度管中加入 0.9 mL 1.0%的槐豆胶底物(用 0.1 mol/L，pH 7.0 的磷酸缓冲液配制)中和 0.1 mL 适当稀释的酶液，50 ℃水浴准确反应 5 min，迅速加入 2 mL DNS 终止反应，沸水浴 5 min 充分显色，流水迅速冷却至室温，用蒸馏水定容至 25 mL，540 nm 测吸光度，该方法又叫 DNS 法。

β-甘露聚糖酶酶活力定义，在以上反应条件下，每分钟产生相当于 1 μmol D-甘露糖的还原糖基所需要的酶量定义为 1 个酶活性单位(U/mL)。

1.2.3 β-甘露聚糖酶酶学特性研究

（1）温度对β-甘露聚糖酶的影响：最适反应温度测定：将酶-底物（用pH 7.0，0.2 mmol/L的磷酸钠缓冲液配置）反应体系在不同温度(30~70 ℃)下水浴反应5 min后，DNS法测定酶活，以最高酶活为100%；温度稳定性测定：将酶液于不同温度(30~70 ℃)水浴锅中，保温处理不同时间后，再将酶-底物反应体系于50 ℃水浴反应5 min后，DNS法测残余酶活。

（2）pH对β-甘露聚糖酶的影响：最适pH的测定：用pH 4.0~10.0缓冲液配制底物，再将酶-底物反应体系于50 ℃水浴反应5 min后，DNS法测酶活，以最高酶活为100%；pH稳定性的测定：将酶液与前述不同pH缓冲

液混合后，40 ℃处理30 min，再将酶-底物反应体系于50 ℃水浴反应5 min后，DNS法测残余酶活。

（3）金属离子对β-甘露聚糖酶的影响：利用4.0 mmol/L的金属离子分别与酶液按1:1的比例混合，使其终浓度分别为2.0 mmol/L，对照组用蒸馏水代替金属离子，测定金属离子对酶活的影响；另外，利用4.0 mmol/L的金属离子分别与酶液按1:1的比例混合，其终浓度分别为2.0 mmol/L，对照组用蒸馏水代替金属离子，50 ℃保温30 min，DNS法测剩残余酶活，检验金属离子对酶稳定性的影响。

2 结果与分析

2.1 产β-甘露聚糖酶内生菌的诱变育种结果

2.1.1 出发菌株生长曲线

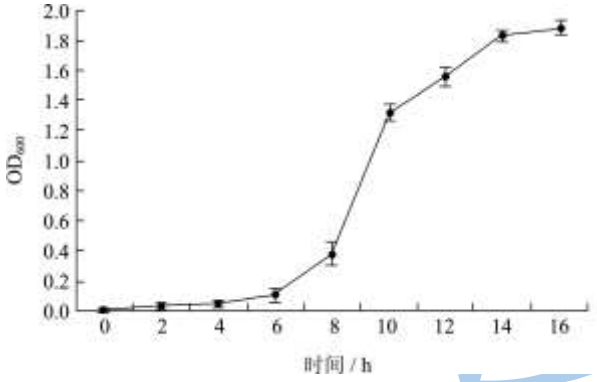


图1 菌体OD_{600}随培养时间的变化

Fig.1 Changes of microbial OD_{600} with culture time

从图1可以看出，出发菌株HD-1摇床培养6~8 h达到对数中期，10~12 h达到稳定期，6 h左右的菌活力最强，不产生芽孢，利于诱变。选取此时的菌液进行适当稀释，制成单细胞菌悬液进行诱变。

2.1.2 紫外线诱变结果

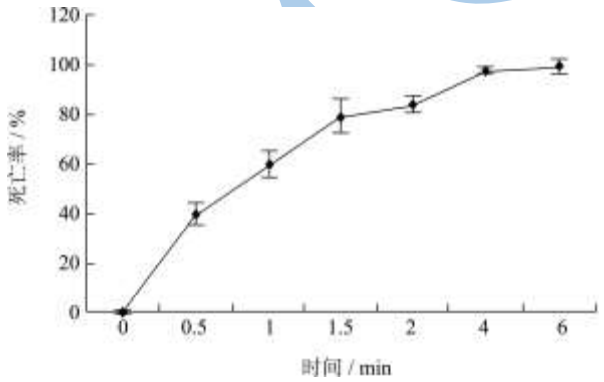


图 2 紫外线诱变死亡率曲线

Fig.2 The curve of death rate after UV exposure time

由图2可以看出，出发菌株为芽孢杆菌，对UV照射的耐受性较强，紫外处理6 min致死率才达到99.5%，根据育种工作者长期研究和实践经验[9]，较大的处理剂量有利于筛选到产量提高幅度大的菌株。为减少筛选工作量和保证有较好的诱变效果，本文选择6 min为最佳照射时间；初筛和复筛结果显示，有6个突变菌株酶活提高幅度超过20%，占筛选菌株的6%，最高酶活比出发菌株提高了37%。

2.1.3 硫酸二乙酯诱变结果

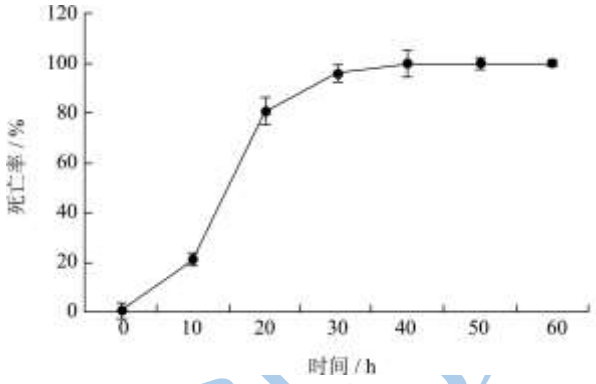


图 3 硫酸二乙酯诱变时间死亡率曲线

Fig.3 The death rate curve of DES induction time

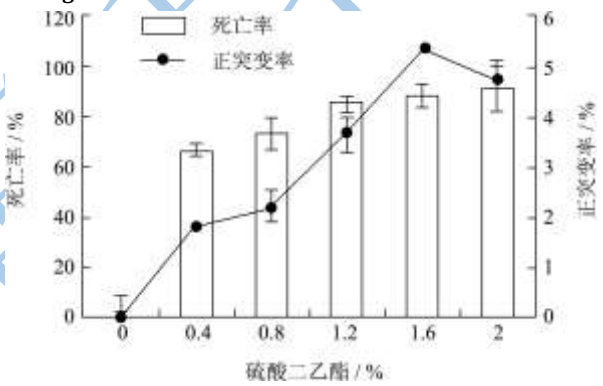


图 4 不同 DES 剂量致死率和正突变率的曲线

Fig.4 The forward mutation rate and death rate curve of DES treating dosage

由图 3 可知，出发菌株对硫酸二乙酯也有较强的耐受性，1%的硫酸二乙酯处理 50 min，其致死率才达到 98.2%，由图 4 可知，随着 DES 处理剂量加大，正突变率也在增加。但硫酸二乙酯水溶液 40 ℃的半衰期为 30 min，而出发菌株的最适培养温度为 37 ℃，要保证 99%致死率和较高的正突变率，本实验选择 1.6%的 DES 处理 40 min。初筛和复筛结果显示 DES 单因子诱变效果不如紫外线，正突变率较低，仅有 2%的突变菌株酶活提高幅度达到 20%，最高酶活比出发菌株提高了 38%。

2.1.4 紫外线-光复活诱变结果

紫外线照射后，光复活能使一些接近死亡的菌体存活下来，但代谢失调现象将得不到回复，从而将突变体保留下来，提高了突变率。但是初筛和复筛结果显示，经过紫外线光复活诱变后其酶活仅比出发菌株提高33%（图5），差于紫外线单因子诱变结果，没有达到预期效果。

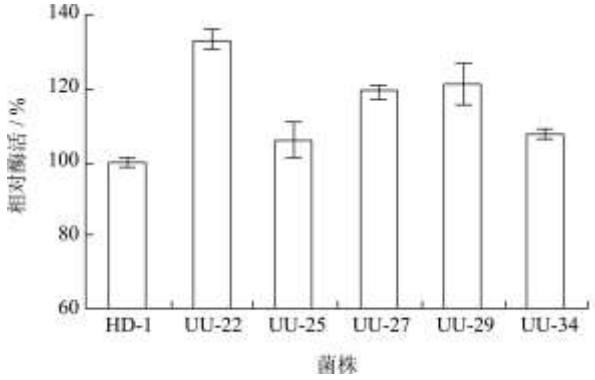


图 5 紫外线-光复活诱变部分菌株酶活

Fig.5 The activity of strains after UV-VIS compound mutation

2.1.5 紫外线-硫酸二乙酯复合诱变结果

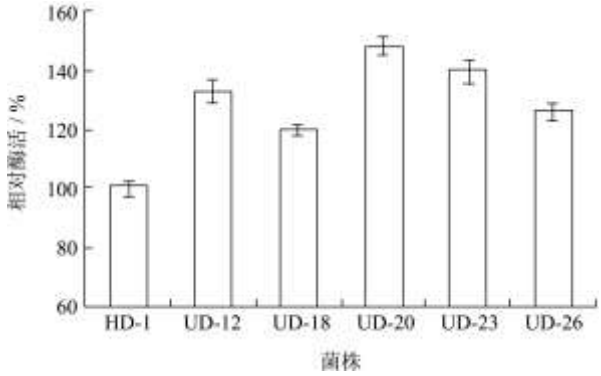


图 6 图 DES-UV 复合诱变部分菌株酶活

Fig.6 The enzyme activity of strains after UV-DES compound mutation

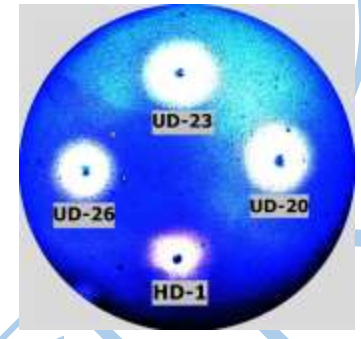


图 7 UV-DES 诱变部分菌株的水解圈情况

Fig.7 The clear circle of some strains after UV-DES compound mutation

初筛和复筛结果（图 6 和图 7）显示紫外线-硫酸二乙酯复合诱变效果明显好于前面几种诱变方法，水解圈增大显著，酶活力大幅度提高；有 8%的突变菌株酶活提高幅度在 20%以上，其中 UD-20 的酶活(89.5 U/mL)比出发菌株 HD-1 提高了 63.9%，把它作为高产突变菌株继续研究。

2.1.6 高产突变菌株 UD-20 遗传稳定性研究

UD-20 遗传稳定性研究结果显示，传代 7 次酶活稳定在 98.5%~101.9%之间，无显著差异，说明其遗传性能稳定。

表 1 稳定性实验结果

Table 1 The results of genetic stability

传代次数	相对酶活/%	差异显著性	
1	100.0 ± 2.6	a(0.05)	A(0.01)
2	100.9 ± 2.1	a	A
3	101.9 ± 5.1	a	A
4	99.0 ± 0.4	a	A
5	100.2 ± 1.0	a	A
6	98.5 ± 3.5	a	A
7	101.3 ± 0.2	a	A

2.2 β-甘露聚糖酶酶学性质研究

2.2.1 温度对β-甘露聚糖酶的影响

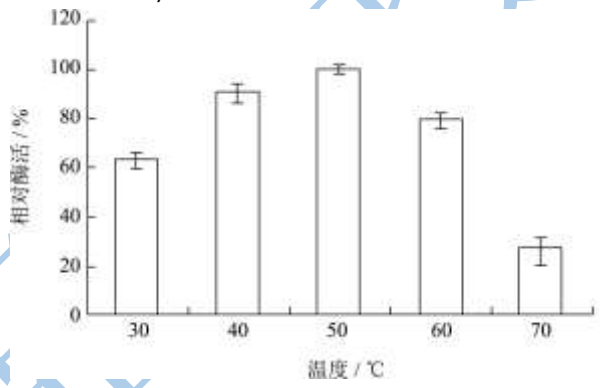


图8 不同反应温度对酶活的影响

Fig.8 The effect of temperature on β-mannanase activity

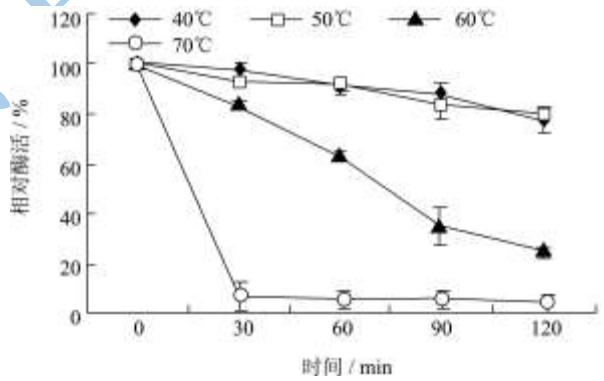


图 9 不同反应温度对酶稳定性的影响

Fig.9 The effect of temperature on β-mannanase stability

温度对酶活的影响如图8所示，该酶的最适反应温度为50 ℃，在40~60 ℃之间均有较高的酶活（>80%）。温度对酶稳定性的影响如图9所示，该酶在50 ℃时相当稳定，保温120 min后仍有80 %的残余酶活；60 ℃保温60 min后酶活仍有63%的残余酶活。说明该酶属于中温型酶，热稳定性较好，为其进一步在生产中的应用奠定了基础。

2.2.2 pH对β-甘露聚糖酶的影响

pH对酶活和酶稳定性的影响如图10所示，该酶的最适反应pH为7.0，在pH 5.0~8.0之间酶活维持在80%以上；该酶在pH 5.0~8.0之间保温60 min，酶活均在80%

以上。说明该酶不仅有宽泛的使用范围，并且在pH 5.0~8.0之间具有较好的稳定性，为该酶的进一步推广应用提供了保障。

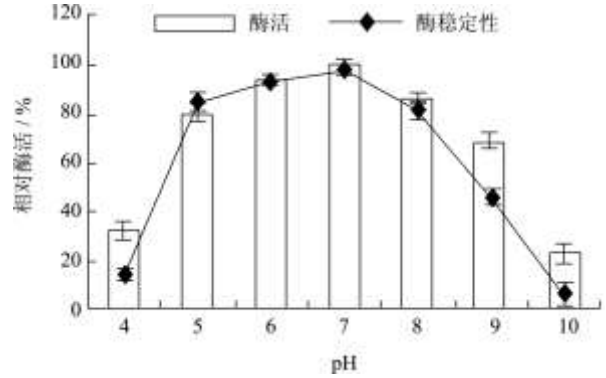


图 10 不同 pH 对 β−甘露聚糖酶酶活和酶稳定性的影响

Fig.10 The effect of pH on β-mannanase activity and stability

2.2.3 金属离子对β-甘露聚糖酶的影响

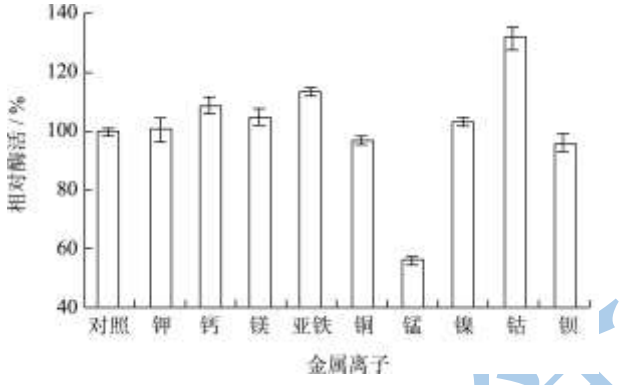


图 11 金属离子对酶活性的影响

Fig.11 The effect of metal ions on β-mannanase activity

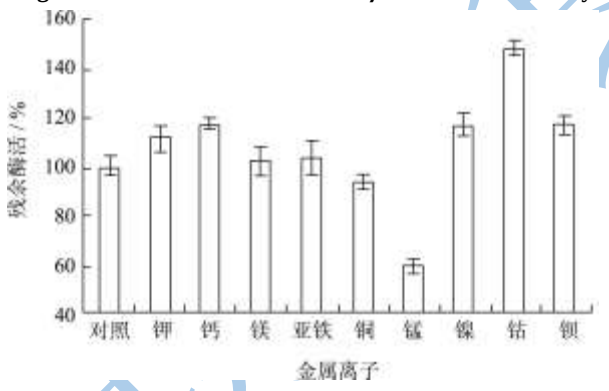


图 12 金属离子对酶稳定性的影响

Fig.12 The effect of metal ions on β-mannanase stability

金属离子对酶活的影响如图11所示，亚铁离子和钴离子对酶有明显的激活作用，分别使酶活提高了13.2%和31.7%；但是锰离子对酶有极强的抑制作用，其它浓度的离子对酶活影响不大。金属离子对酶热稳定性的影响图12所示，金属离子钾、钙、镍、钴和钡能增强酶的热稳定性，其中以钴离子的增强效果最为明显，酶活约为对照组的1.5倍。通过添加离子来提高酶的热稳定性，对该酶的进一步推广应用具有重要的现实意义。

3 结论

3.1 复合诱变能使各种诱变剂产生协同效应，从而扩大突变位点范围，效果往往好于单因子诱变[14]，本文以实验室筛选的产 β-甘露聚糖酶的黄豆内生菌 HD-1 为出发菌株，分别采用了单因子诱变和复合诱变对其进行处理，最终以紫外线-硫酸二乙酯复合诱变效果最好，获得一株高产 β-甘露聚糖酶的突变菌株 *Bacillus subtilis* UD-20，酶活达 89.5 U/mL，比出发菌株提高了 63.9%，遗传性能稳定。

3.2 高产突变菌株UD-20所产β-甘露聚糖酶的最适反应温度和pH分别为50 ℃和7.0，该酶在50 ℃以下，pH 5.0~8.0之间稳定性较好，属于中性β-甘露聚糖酶。亚铁离子和钴离子对该酶有较强的激活作用，但同浓度的锰离子对酶有强烈的抑制作用。酶的失活是限制酶制剂工业生产和应用的重要因素，添加保护剂是目前工业上提高酶稳定性的最重要手段。本文研究证实，添加金属离子钾、钙、钴和钡都能增强β-甘露聚糖酶的热稳定性，其中钴离子的增强效果最为显着，残余酶活约是对照组的1.5倍。添加金属离子提高酶热稳定性的研究，为该酶的进一步生产应用提供了理论依据，也为其他酶制剂的稳定化提供参考依据。

3.3 近20多年来，已从不同植物的内生菌及其代谢产物中发现了多种新奇生物活性物质[15]，枯草芽孢杆菌UD-20来源于植物内生菌，所产β-甘露聚糖酶应该具有与众不同的特性，下一步还要对该菌株的最佳培养基，培养条件以及酶的底物特异性和水解产物做深入地研究，为其进一步工业化生产奠定基础。

参考文献

[1] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2007, 27: 197-216

[2] Cai H, Shi P, Huang H, et al. An acidic β-mannanase from *Penicillium* sp. C6: gene cloning and over-expression in Pichia pastoris [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(12): 2813-2819

[3] 廖晓霞, 张学武.紫外线诱变对β-甘露聚糖酶产酶菌株的影响研究[J].现代食品科技,2010,26(8):788,801-804

[4] 王永,田春华,竹磊,等.产异甘露聚糖酶菌株的复合诱变[J].江西农业学报,2011,23(6):113-115

[5] Promputtha I, Hyde K D, McKenzie E H C, et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes [J]. Fungal Diversity, 2010, 41(1): 89-99

[6] Cho K M, Hong S Y, Lee S M, et al. A cel44C-man26A gene of endophytic *PaeniBacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains [J]. Appled Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(3): 618-630

[7] Kima D Y, Hama S J, Leea H J, et al. A highly active endo-*β*-1, 4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(4-5,7): 365-370

[8] 张建新,赵丹丹,刘起丽,等.产*β*-甘露聚糖酶内生菌的筛选及酶学特性分析[J].微生物学通报,2011,38(8):1172-1178

[9] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学(第三版)[M].北京:科学出版社,2009

[10] 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

[11] 马向东,柯涛,熊兰,等.一种鉴定多糖水解酶类及其产生菌的新方法[J].微生物学报,2007,46(6):1102-1104

[12] Summpunn P, Chaijan S, Isarangkul D, et al. Characterization, gene cloning, and heterogeneous expression of *β*-mannanase from thermophilic *Bacillus subtilis* [J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(1): 86-93

[13] 赵凯,许鹏举,谷广烨.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学,2008,29(8):534-536

[14] 李莹,戈梅,王旻,等.雄甾烯二酮转化菌的诱变育种[J].中国医药工业杂志,2003,34(7):322-324

[15] 杨胜远,陆兆新,孙力军,等.爬山虎内生菌的鉴定及其谷氨酸脱羧酶酶学特性[J].南京农业大学学报,2007,30(2):122-12

现代食品科技