

椰果内生枯草芽孢杆菌 YZ-21 产 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质研究

张建新,郭祥瑞,穆广亚,冯军厂,常绪路

(河南师范大学 水产学院,河南 新乡 453007)

摘要:[目的] 分离纯化来源于内生枯草芽孢杆菌 YZ-21 的 β -甘露聚糖酶,并研究其酶学性质.[方法] 采用乙醇沉淀法、硫酸铵盐析法、聚乙二醇(PEG)/硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 双水相体系进行分离与纯化,在此基础研究它的酶学性质.[结果] 比较 3 种纯化方法,最优方法为双水相萃取法,在双水相体系为 16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、18% PEG2000、2% NaCl 条件下,纯化倍数最高可以达到 3.06,酶回收率达到 99.26%;酶学性质研究表明, β -甘露聚糖酶的最适反应 pH 为 7.0,最适的反应温度是 40 $^\circ\text{C}$,pH 稳定性在 3.0~7.0,热稳定范围在 35~55 $^\circ\text{C}$ 之间; Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Co^{2+} 对酶都有激活作用,而 Ca^{2+} 激活作用最强, Cu^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , EDTA 对酶有抑制作用.[结论] 利用双水相萃取法较好地纯化了 β -甘露聚糖酶,酶学性质良好,可以广泛应用于饲料添加剂、纸浆漂白和食品加工等领域.

关键词: β -甘露聚糖酶;枯草芽孢杆菌;分离纯化;酶学性质

中图分类号: TQ464

文献标志码: A

β -甘露聚糖酶作为一种内切水解酶^[1-2],可以降解 β -1-4 甘露糖苷键,在动物饲料中,作为饲料添加剂,可以消除抗营养因子,促进动物消化道的吸收,有利于动物的生长^[3-4];在食品行业,可用于果汁澄清;在造纸行业中,能降低对环境污染,改善纸的质量.总之, β -甘露聚糖酶应用于多个行业,有着十分重要的作用^[5-6].

β -甘露聚糖酶在动物、植物和微生物中广泛存在^[7],在动物来源的 β -甘露聚糖酶中,软体动物较为常见,如紫贻贝类^[8-9];植物来源的 β -甘露聚糖酶存在于储藏器官(魔芋球茎^[10-11])和种子(南欧紫荆^[12]);微生物来源的 β -甘露聚糖酶主要发现于细菌中的枯草芽孢杆菌^[13]、假单胞菌^[14]和真菌中曲霉属等^[15]. β -甘露聚糖酶的纯化和酶学性质研究对于酶的应用很重要,刘恒霞^[16]对 *Bacillus subtilis* YH12 产生的 β -甘露聚糖酶利用层析技术进行分离纯化,纯化倍数为 7.1 倍,酶活回收率为 27.3%;pH 6.5、温度 55 $^\circ\text{C}$ 是最适的反应条件.朱劼^[17]对黑曲霉(*Aspergillus niger*) WM20-11 所产的 β -甘露聚糖酶进行了层析纯化研究,纯化倍数达到 15.8,收率 2.2%;最适的 pH 是 3.5,反应温度 70 $^\circ\text{C}$.

本研究从海南椰果中分离得到的一株产 β -甘露聚糖酶内生枯草芽孢杆菌 YZ-21,优化发酵工艺后的产酶水平能达到 126.45 U/mL,是初始酶活的 5 倍左右,具有很好的应用潜力^[18].为进一步研究其酶学性质,通过用乙醇沉淀法,硫酸铵盐析和双水相萃取法进行了分离纯化,得到最优的纯化方法,纯化倍数和收率均较高,为该 β -甘露聚糖酶进一步研究及在工业上的应用奠定了基础.

收稿日期: 2019-03-19; **修回日期:** 2020-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31902361);河南省重点科技攻关(182102110011);河南省自然科学基金(182300410098).

作者简介: 张建新(1974-),男,山东德州人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为微生物酶工程,E-mail: zjxlq@163.com.

通信作者: 常绪路,河南师范大学副教授,博士,E-mail: changxulu@163.com.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本实验室从海南椰果中分离的内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)YZ-21^[9].

1.1.2 主要试剂和仪器

乙醇、聚乙二醇 2000、苯酚、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、NaOH、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、NaCl、 $(\text{Na})_2\text{SO}_3$ 均为分析纯,购自新乡市世纪元公司.

JW-2130HR 高速冷冻离心机:杭州嘉文仪器有限公司;HK-6D 恒温水浴箱:上海恒实科技有限公司;UV-8602 紫外可见分光光度计:岛津仪器杭州有限公司.

1.1.3 培养基

参照张吨^[19]发酵培养基配方.

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备

将菌种过夜培养后转接到发酵培养基中,培养 72 h,离心后的上清液即为粗酶液,保藏于 4 °C 冰箱待用^[20-21].

1.2.2 酶活力的测定

用 pH 7.0 的磷酸缓冲液配置质量分数为 1% 槐豆胶作为底物缓冲液,将底物缓冲液与粗酶液按体积 1:1 混合,在 50 °C 的水浴锅中反应 5 min,反应结束后立即取出冰水浴,加 2 mL 的 DNS 试剂终止反应,沸水浴 5 min,自来水冲洗,最后用蒸馏水定容,在 540 nm 波长处测定吸光度.蛋白质含量测定方法

1.2.3 酶的纯化

乙醇沉淀:参照穆广亚等^[18]采用的乙醇沉淀法.

硫酸铵盐析:参照向冰冰^[22]的盐析方法,测上清液和沉淀酶活力,然后绘制盐析曲线.

双水相萃取:参照孟玲^[23]所用的双水相萃取方法.萃取率的计算参照向冰冰^[22]的方法,并使用超微量分光光度计参照张龙翔^[24]于 $A_{280\text{ nm}}$ 处对蛋白含量进行测定.

1.2.4 酶学性质研究

最适反应温度及热稳定性.把粗酶液在不同的温度下反应 5 min,540 nm 处测定吸光度,计算酶活.确定酶的最适温度^[25],将粗酶液在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C 中分别保温 30 min、60 min、90 min、120 min,然后与底物混合,将没有处理的粗酶液作为 CK 对照.

最适 pH 及 pH 稳定性^[26].分别以不同 pH(3.0~10.0)配置的缓冲液底物,在最适的反应温度下,测定酶活.用不同 pH 的缓冲液与等量粗酶液混合,置于最适的温度,孵育 30 min,调整 pH 为 7.0,测定酶活,没有处理的粗酶液作为对照.

金属离子和 EDTA 对酶活的影响^[27].将金属离子或 EDTA 和粗酶液按照体积 1:1 混合,在最适的温度条件下反应 30 min,然后测酶活,将未加金属离子的酶活设置为 100%.

底物特异性.将纯化酶分别与魔芋精粉、瓜豆胶、槐豆胶反应测定其酶活,以最高酶活为 100%.

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

2.1.1 乙醇沉淀法

把预冷的乙醇和粗酶液混匀,不断用玻璃棒搅拌直至白色絮状沉淀出现后,放置 4 °C 冰箱静置过夜,离心后收集沉淀,分别测定沉淀和上清酶收率,结果如图 1 所示.随着乙醇比例的不断上升,上清的酶收率一直处于直线下降状态,当乙醇比例上升到 140% 时,酶收率低至 3.79%,此时酶活处于失活状态;整体看来,上清酶收率在乙醇浓度较低的情况下,酶收率相对较高,沉淀酶活没有明显变化,最高达 12.59%.所以,乙醇沉

淀法不适合该酶的分离纯化。

2.1.2 硫酸铵盐析法

用硫酸铵盐析法处理粗酶液时,使用不同饱和度的硫酸铵溶液,由图 2 可以看出,硫酸铵饱和度在 20% 和 40% 之间时,上清液的酶收率保持在 80% 以上;当硫酸铵饱和度在 50% 和 80% 之间时,上清酶收率由 80.43% 迅速下降至 45.26%。而沉淀酶的收率,一直处于平缓的水平,硫酸铵盐析也不适合该酶的纯化。

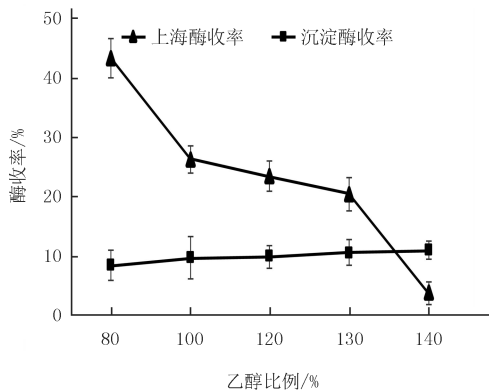


图1 不同乙醇用量下上清与沉淀酶收率

Fig.1 The supernatant and precipitate enzyme yield under different ethanol dosage

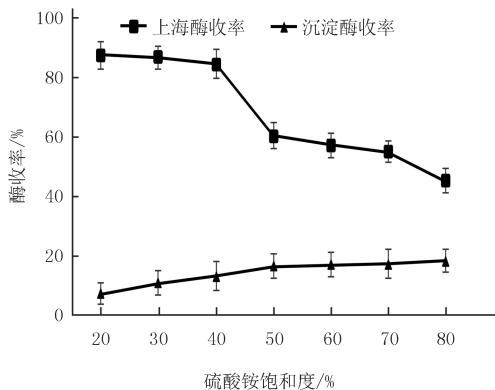


图2 不同硫酸铵饱和度下上清和沉淀酶收率

Fig.2 The supernatant and precipitate enzyme yield under different saturation

2.1.3 双水相萃取法

比较盐种类对酶分配系数 K_e 、酶萃取率 C_e 、总蛋白分配系数 K_p 、蛋白萃取率 C_p 用量的影响,结果如表 1 所示,当选择的盐种类为硫酸铵时,酶萃取率是最高的,达 66.87%,蛋白萃取率为 22.75%,因此,该酶双水相体系中最适盐种类为 $(NH_4)_2SO_4$ 。

表 1 盐种类对酶分离的影响

Tab.1 Effects of metal salts concentration on the enzyme separation

盐种类	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$	盐种类	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$
MgSO ₄	0.58	0.27	13.74	0.87	11.86	NaH ₂ PO ₄	0.92	0.64	37.14	0.38	25.77
KH ₂ PO ₄	0.33	0.69	28.80	1.96	19.55	Na ₂ HPO ₄	0.03	1.57	14.64	2.21	6.41
K ₂ HPO ₄	0.35	4.07	58.85	3.47	54.94	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.38	5.19	66.87	0.76	22.75

设置不同质量分数的 PEG2000,和质量分数 16% $(NH_4)_2SO_4$ 构成双水相,PEG 用量对酶分配系数 K_e 、酶萃取率 C_e 、总蛋白分配系数 K_p 、蛋白萃取率 C_p 用量的影响,结果如表 2 所示,PEG 质量分数为 18% 时,酶萃取率达到 97.79%; PEG 质量分数在 18%~20% 之间,酶萃取率较高,PEG 质量分数高于 20% 时,酶收率开始降低,从而,我们分析,PEG 质量分数较低时, $(NH_4)_2SO_4$ 的盐析作用占主导,酶主要分配在双水相的上相中,随着 PEG 质量分数的升高,双水相间的黏度也增大,从而导致两相之间,分子不易转移。

表 2 PEG 质量分数对酶分离的影响

Tab.2 Effects of PEG concentration on the enzyme separation

PEG 质量分数/%	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$	PEG 质量分数/%	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$
16	0.47	11.13	92.17	0.59	21.65	22	0.25	12.06	93.65	0.71	35.22
18	0.52	16.00	97.79	0.92	32.05	24	0.56	8.33	90.18	1.66	48.24
20	0.72	13.25	95.18	0.63	31.26						

根据前面的条件探索,PEG 2000 最佳质量分数为 18%,因此将 PEG 调整至最佳质量分数,然后使用 14%~22% 不同质量分数的 $(NH_4)_2SO_4$ 进行双水相组合检测纯化效果,结果如表 3 所示,16% 的 $(NH_4)_2SO_4$ 酶萃取率最高达 98.80%,增加 $(NH_4)_2SO_4$ 的质量分数,酶萃取率反而逐渐下降。

表3 硫酸铵质量分数对酶分离的影响

Tab.3 Effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the enzyme separation

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数/%	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数/%	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$
14	0.97	11.29	88.27	1.02	52.84	20	0.64	21.13	93.11	2.51	69.57
16	0.79	105.00	98.80	2.49	67.59	22	0.56	19.75	91.74	1.93	54.30
18	0.69	38.83	96.83	3.88	75.31						

18%质量分数的 PEG2000 和 16%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为双水相的最佳质量分数,在此基础上添加不同质量分数的 NaCl,测定 NaCl 对于分离效果的影响,从表 4 可以看出,质量分数为 2%的 NaCl,酶萃取率最高为 99.26%。

表4 氯化钠质量分数对酶分离的影响

Tab.4 Effects of NaCl concentration on the enzyme separation

NaCl 质量分数/%	R	K_e	$C_e/\%$	K_p	$C_p/\%$
0	1.00	7.14	86.88	5.55	84.73
1	0.93	32.27	97.39	4.62	81.08
2	0.91	148.00	99.26	4.81	81.36
3	0.95	65.67	98.42	4.70	81.69
4	1.00	5.39	84.36	3.86	79.42

2.2 纯化方法对酶分离的影响

比较硫酸铵盐析、乙醇沉淀、双水相萃取 3 种纯化方法对 β -甘露聚糖酶纯化的影响,结果如表 5 所示,采用双水相萃取法酶活力、回收率、纯化倍数都是最高,因此,该酶最适合的纯化方法为双水相萃取法.通过以上研究,最优的双水相体系为质量分数 16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、18% PEG2000、2% NaCl,酶萃取率高达 99.26%,纯化倍数达到 3.06.

表5 不同纯化方法对 β -甘露聚糖酶纯化的影响Tab.5 Effects of different purification methods on β -mannanase purification

纯化步骤	总蛋白质量/mg	总酶活/U	比活/(U · mg ⁻¹)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	20.64	125.37	11.26	100	1
乙醇沉淀	3.62	15.67	10.93	12.5	0.97
硫酸铵盐析	2.74	22.57	24.36	18	2.16
PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.36	124.12	34.47	99	3.06

2.3 酶学性质研究

2.3.1 温度对酶活性和稳定性的影响

如图 3 所示,该酶最适的反应温度为 40 °C.如表 6 所示,该酶在 35~55 °C 范围之内,酶活性相对稳定,在 40 °C 和 45 °C 分别孵育 2 h,相对酶活达到 73.8%和 70.9%.但是在 60 °C 的条件下处理 30 min,相对酶活明显降低,仅为 46.7%。

表6 不同温度处理对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响Tab.6 The effects of temperature on β -mannanase stability

T/°C	相对酶活/%				T/°C	相对酶活/%			
	30 min	60 min	90 min	120 min		30 min	60 min	90 min	120 min
35	95.2	82.7	76.2	69.3	50	76.4	71.5	70.9	66.2
40	95.6	88.5	80.4	73.8	55	75.5	70.6	68.2	65.7
45	87.3	84.3	73.5	70.9	60	46.7	30.2	17.1	10.4

2.3.2 pH 对酶活性和稳定性的影响

结果图 4 所示, pH 在 4.0~7.0 时, 酶活性逐渐上升, pH 为 7.0 时, β -甘露聚糖酶的活性最高, 达到 26.58 U/mL, 之后, 酶活性逐渐下降. 不同的 pH 对酶稳定性的影响, 如图 5 所示, pH 在 5.0~8.0 之间时, 相对酶活较高, 且处在稳定水平.

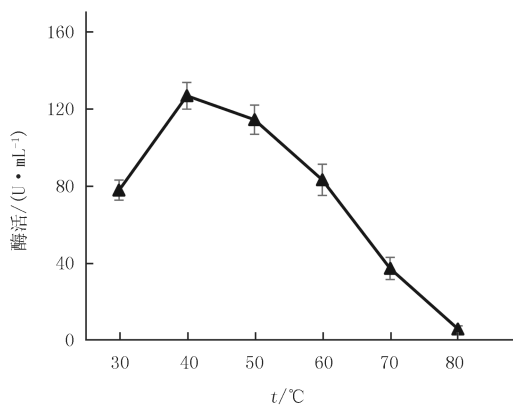


图3 不同温度条件下 β -甘露聚糖酶活

Fig.3 The effects of temperature on β -mannanase activity

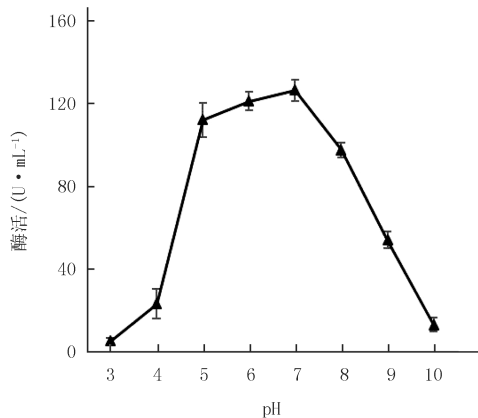


图4 不同pH条件下 β -甘露聚糖酶活

Fig.4 The effects of pH on β -mannanase activity

2.3.3 金属离子和 EDTA 对 β -甘露聚糖酶活的影响

如图 6 所示, 对 β -甘露聚糖酶有促进作用的是 Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Co^{2+} , 且 Ca^{2+} 的激活作用最强, 与对照组相比, 提高了近 63.2%; EDTA 和剩余的 5 种金属离子对该酶有抑制作用, 尤其是 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 对 β -甘露聚糖酶该酶的抑制作用最明显.

2.3.4 β -甘露聚糖酶的底物特异性

结果如图 7 所示, β -甘露聚糖酶与不同底物的特异性, 当底物为瓜豆胶时, 酶活最高, 将其酶活定义为 100%, 并对魔芋粉和槐豆胶的相对酶活进行测定, 当底物为魔芋粉时, 相对酶活为 46.53%; 底物为槐豆胶时, 相对酶活较低, 仅能达到 32.61%.

3 结 论

本文采用乙醇沉淀法、硫酸铵盐析法、聚乙二醇(PEG)/硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 双水相体系进行分离与纯化, 最终得到质量分数为 18% PEG 2000, 16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% NaCl 的双水相萃取法效果显著, 纯化倍数达 3.06, 酶收率高达 99.26%. 进而对它的酶学性质进行研究, 结果发现该 β -甘露聚糖酶的最适温度是 40 $^{\circ}\text{C}$, 在 35~55 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下热稳定性较好, 该酶最适的

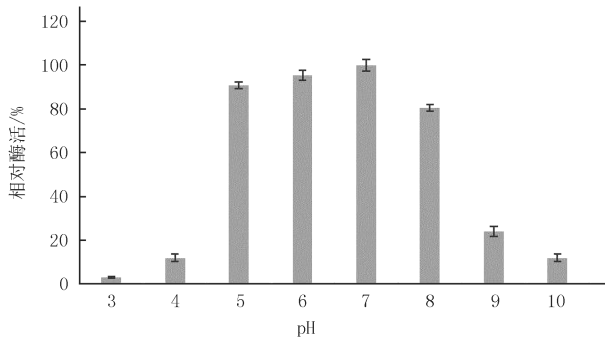
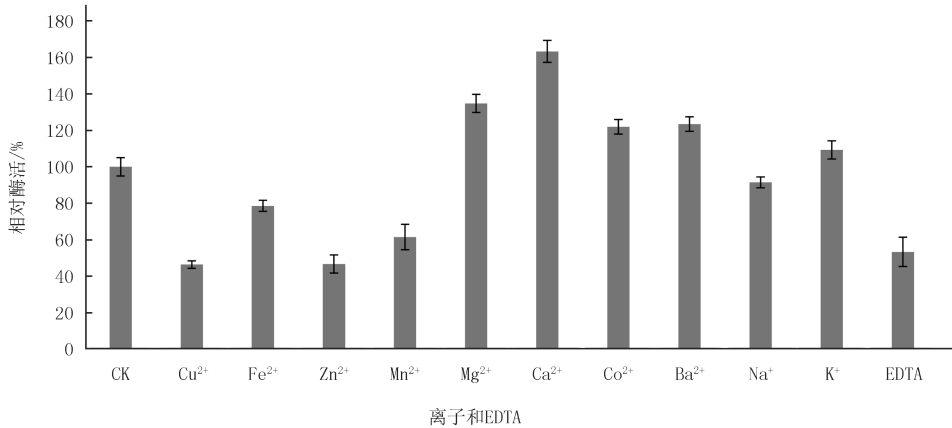


图5 不同pH处理对 β -甘露聚糖酶稳定性的影响

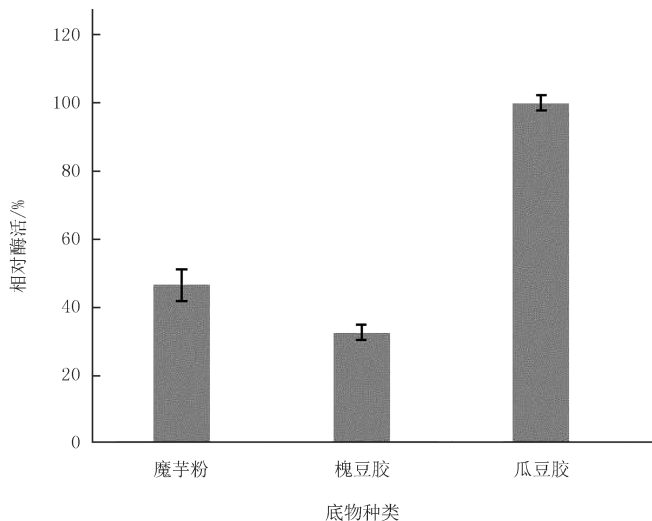
Fig.5 The effects of pH on β -mannanase stability

pH 为 7.0, 在 pH 5.0~8.0 稳定性较好, 适合一些动物的肠胃环境; 金属离子 Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Co^{2+} 对酶有激活作用, 而 Ca^{2+} 激活作用最强, Cu^{2+} , Na^{+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , EDTA 对酶有抑制作用.

图6 常见离子及EDTA对 β -甘露聚糖酶活的影响Fig.6 The effects of ions and EDTA on β -mannanase activity

4 讨论

β -甘露聚糖酶在工业上的应用十分广泛,利用分离纯化技术得到纯的甘露聚糖酶并对其酶学性质进行研究有十分重要的意义.从椰果分离的内生芽孢杆菌 YZ-21 分泌的 β -甘露聚糖酶对半乳甘露聚糖的底物专一性较好^[18],瓜豆胶作底物相比魔芋粉和槐豆胶,有更多的应用范围.一般的 β -甘露聚糖酶底物为魔芋粉,它属于葡萄糖甘露聚糖,而瓜豆胶属于半乳甘露聚糖^[1],目前发现的瓜豆胶底物专化性高

图7 β -甘露聚糖酶的底物特异性Fig.7 The β -mannanase substrate specificity

的 β -甘露聚糖酶报道较少,该酶可用纸浆漂白.造纸用的软木中含有较高的半乳甘露聚糖,不易漂白,添加 β -甘露聚糖酶后,不仅可以使漂白效果更好,而且也降低对环境的污染,所以用瓜豆胶作底物,能更好地应用于工业生产^[28].在饲料的一些组成成分中,大豆、玉米等植物中都含有甘露聚糖,甘露聚糖在动物肠道内不利于动物的消化,甘露聚糖作为饲料中的抗营养因子,对动物的健康不利,从而在饲料添加剂中加入 β -甘露聚糖酶,可以降低消化道内容物的黏度,促进动物的消化吸收,从而提高饲料利用率,而且可以防止致病菌的感染,提高成活率.另外,在水产等饲料制作中通常要求在 90 °C 以上的高温条件制粒,要求有很好热稳定性,否则酶很容易失活,不能充分发挥它的作用.该酶在 60 °C 以上热稳定较差.因此,我们需要通过分子生物学手段来改善热稳定性和酶活性,以提高其应用价值^[29].

参 考 文 献

[1] 周芳.芽孢杆菌 M-21 β -甘露聚糖酶的产生、纯化与性质研究[D].青岛:中国海洋大学,2007.

ZHOU F.Studies on the production,purification and characterization of β -mannanase from Bacillus sp.M-21[D].Tsingtao:Ocean Universi-

- ty of China, 2007.
- [2] 廖婷婷,翟磊,高成华,等.一株产甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶的纯化与性质[J].微生物学报,2011,51(11):1520-1526.
LIAO T T,ZHAI L,GAO C H,et al.Purification and characterization of mannanase from an alkaliphilic mannanase producing bacterium [J].Acta Microbiologica Sinica,2011,51(11):1520-1526.
- [3] 陈智慧,严琳,莫海飞,等.产 β -甘露聚糖酶内生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J].中国畜牧兽医,2017,44(8):2496-2502.
CHEN Z H,YAN L,MO H F,et al.Isolation and identification of endophyte strain producing β -mannanase and the studies of its characterization[J].China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2017,44(8):2496-2502.
- [4] 张芹,毛胜勇,朱伟云. β -甘露聚糖酶在动物生产中的应用[J].畜牧与兽医,2008(2):42-44.
ZHANG Q,MAO S Y,ZHU W Y.Beta-mannase application in animal production[J].Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2008(2):42-44.
- [5] 刘跃.芽孢杆菌产 β -甘露聚糖酶的纯化及其稳定性研究[D].天津:天津大学,2008.
LIU Y.Purification and stabilization of β -mannanase from Bacillus[D].Tianjin:Tian Jin University,2008.
- [6] 杨苗. β -甘露聚糖酶产生菌的筛选鉴定、产酶条件优化及酶学特性研究[D].武汉:湖北工业大学,2016.
YANG M.Screening and identification of β -mannanase production strain and optimization of fermentation conditions and its enzymatic properties[D].Wuhan:Hubei University of Technology,2016.
- [7] 靖德军. β -甘露聚糖酶产生菌株的分离鉴定、产酶条件优化及其酶学性质研究[D].雅安:四川农业大学,2013.
JING D J.Isolation and screening of beta-mannanase producing strain,optimization of fermentation conditions and its enzymatic characterization[D].Ya'an:Sichuan Agricultural University,2013.
- [8] OOTSUKA S,SAGA N,SUZUKI K,et al.Isolation and cloning of an endo- β -1,4-mannanase from Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J].J Biotechnol,2006,125:269-280.
- [9] 张莹莹. β -甘露聚糖酶基因和牛凝乳酶基因黑曲霉工程菌的构建[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
ZHANG Y Y.Construction of β -mannanase gene and bovine prochymosin gene engineering strains of *Aspergillus niger* [D].Harbin:Northeast Agricultural University,2013.
- [10] 史益敏,沈曾佑,张志良,等.魔芋球茎中的 β -甘露聚糖酶[J].植物生理学报,1990,16(3):306-310.
SHI Y M,SHEN C Y,ZHANG Z L,et al. β -mannanase in konjac bulbs[J].Plant Physiology Communications,1990,16(3):306-310.
- [11] 杜先锋,李平.四川白魔芋球茎中甘露聚糖酶部分酶学性质[J].合肥工业大学学报(自然科学版),2000,23(5):679-682.
DU X F,LI P.Some properties of β -mananase from the tubers of *Amorphophallus albus*[J].Journal of Hefei University of Technology (Natural Science),2000,23(5):679-682.
- [12] 陶乐平.南欧紫荆(*Cercis Siliuuustrum* L)种子中甘露聚糖酶的分离、纯化及其动力学性质[J].安徽大学学报(自然科学版),1995(3):81-88.
TAO L P.Isolation ,purification and kinetics characterization of mananase from seeds of *Cercis Siliuuustrum* L[J].Journal of Anhui University (Natural Science),1995(3):81-88.
- [13] SUNIL D,KENT J B,DONALD J N.Endo- β -Mannanase Activity Present in Cell Wall Extracts of Lettuce Endosperm prior to Radicle Emergence[J].Plant Physiol.1997,113:155-161.
- [14] ARAUJO A,WARD O P.Mannanase components from *Bacillus pumilus* [J].Applied and Environment Microbiology,1990,56:1954-1956.
- [15] YAMAURA I,MATSUMOTO T,FUNATSU M,et al.Purification and some properties of endo-1,4-P-D-mannanase from *Pseudomonas* [J].Agricultural Biological Chemistry,1990,54: 2425-2427.
- [16] 刘恒霞.枯草芽孢杆菌 YH12 β -甘露聚糖酶性质表征及基因克隆表达[D].镇江:江南大学,2015.
LIU H X.Characterization,cloning and expression of β -mananase from *Bacillus subtilis* YH12[D].Zhenjiang:Jiangnan University,2015.
- [17] 朱劫.酸性 β -甘露聚糖酶产生、纯化及特性的研究[D].镇江:江南大学,2005.
ZHU J.Studies on production,purification and characterization of acidic β -mananase[D].Zhen Jian:Jiangnan University,2005.
- [18] 穆广亚.椰果中产 β -甘露聚糖酶内生细菌的筛选及酶学特性研究[D].新乡:河南师范大学,2017.
MU G Y.Research on screening of endophytic bacteria producing β -mananase from coconut and its enzymatic properties[D].Xinxiang:Henan Normal University,2017.
- [19] 张吨,张建新,常绪路,等.葡甘聚糖酶高产菌株 *Bacillus subtilis* 的超剂量诱变育种[J].河南师范大学学报(自然科学版),2018,46(2):99-103.
ZHANG D,ZHANG J X,CHANG X L,et al.Overdose mutation breeding of *Bacillus subtilis* for producing glucomannanase[J].Journal of Henan Normal University (Natural Science),2018,46(2):99-103.
- [20] 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.
ZHANG J X,ZHAO D D,LIU Q L,et al.Screening of endophyte strain producing β -mannanase and the analysis of its enzymatic properties[J].Microbiology China,2011,38(8):1172-1178.

- [21] 赵丹丹.产 β -甘露聚糖酶内生菌的筛选及酶学特性研究[D].新乡:河南师范大学,2011.
ZHAO D D.Research on screening of endophytic bacteria producing β -mannanase and its enzymatic properties[D].Xinxiang:Henan Normal University,2011.
- [22] 向冰冰.枯草芽孢杆菌WD23 β -甘露聚糖酶的产生、纯化及性质研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2009.
XIANG B B.Studies on production,purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus subtilis* WD23[D].Harbin:Northeast Forestry University,2009.
- [23] 孟玲,杨丹,朱建星,等.双水相体系萃取植物酯酶的研究[J].沈阳化工学院学报,2006,20(4):254-257.
MENG L,YANG D,ZHU J X,et al.Extraction of plant esterase by two-phase aqueous system[J].Journal of Shenyang Institute of Chemical Technology,2006,20(4):254-257.
- [24] ZHANG L X,LIU J Y,WANG E K.A new method for studying the interaction between chlorpromazine and phospholipid bilayer[J].Biochemical & Biophysical Research Communications,2008,373(2):202-205.
- [25] 刘朝辉,武伟娜,刘跃,等.保护剂提高 β -甘露聚糖酶热稳定性的研究[J].天津大学学报,2008,21(1):114-118.
LIU C H,WU W N,LIU Y,et al.Enhancing the thermostability of β -mannanase by protective additives[J].Journal of Tianjin University,2008,21(1):114-118.
- [26] 白瑞,苏东民,苏东海,等.小麦麸皮内源性 β -木糖苷酶测定及酶学性质[J].食品与机械,2014,30(4):30-33.
BAI R,SU D M,SU D H,et al.Determination and characteristics of β -xylosidase in wheat bran[J].Food & Machinery,2014,30(4):30-33.
- [27] 苏东海,白瑞,苏东民,等.小麦麸皮内源性 β -木糖苷酶的酶学特性[J].粮食与饲料工业,2014,12:10-14.
SU D H,BAI R,SU D M,et al.Enzymatic characteristics of β -xylosidase in wheat bran[J].Cereals & Feed Industry,2014,12:10-14.
- [28] 王静. β -甘露聚糖酶的制备与分离纯化的研究[D].南京:南京林业大学,2012.
WANG J.Production,purification and characteristic of β -mannanase[D].Nanjing:Nanjing Forestry University,2012.
- [29] 赵博.定向进化及定点突变提高枯草芽孢杆菌脂肪酶的活力和立体选择性[D].长春:吉林大学,2009.
ZHAO B.Enhancement of activity and enantioselective of *Bacillus subtilis* lipase by directed evolution and site-directed mutagenesis[D].Changchun:Jilin University,2009.

Purification and properties of β -mannanase produced by *Bacillus subtilis* YZ-21 in coconut fruit

Zhang Jianxin, Guo Xiangrui, Mu Guangya, Feng junchang, Chang Xulu

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to isolate and purify β -mannanase from endogenous *Bacillus subtilis* YZ-21, and further study its enzymatic properties. [Method] Ethanol precipitation method, ammonium sulfate salting out method, polyethylene glycol (PEG)/ ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ dual aqueous phase system were used for separation and purification. On this basis, its enzymatic properties were studied. [Result] The optimal purification method was finally obtained by the two-aqueous phase extraction method. The optimal two-aqueous phase system was 16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 18% PEG 2000, and 2% NaCl. Under this condition, the purification factor could reach 3.06, the enzyme recovery rate reached 99.26%. The optimal reaction pH of β -mannanase is 7.0, the optimal reaction temperature is 40 °C, the pH stability range is 3.0–7.0, and the thermal stability range is below 60 °C; Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Co^{2+} have activation effects, while Ca^{2+} has the strongest activation effect, and Cu^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} and EDTA have inhibitory effects on enzymes. [Conclusion] Using aqueous two-phase extraction, β -mannanase was preferably purified, which has good enzymatic properties, can be widely used in feed additives, pulp bleaching, food processing and the like.

Keywords: β -mannanase; *Bacillus subtilis*; purification; enzymatic property

[责任编辑 王凤产 杨浦]