

·研究简报·

琼胶降解菌 AT-22 的筛选和产酶性质

汤海青¹, 管斌¹, 王雪鹏¹, 陈丽红¹, 欧昌荣², 胡文浪¹

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003; 2. 宁波大学生命学院, 浙江宁波 315211)

摘要:从青岛近海的红藻(*Gelidium amansii*)中分离筛选到1株高活力的海洋琼胶降解菌 AT-22, 对其生长、产酶特性和酶活力影响因素进行初步研究。结果表明, AT-22 所产琼胶酶为诱导酶, 0.2% 葡萄糖的添加对菌株产酶有抑制作用。该酶作用的最适 pH 值为 6.0~7.0, 最适温度为 40℃, 最适底物质量分数为 1%~1.2%, Ca^{2+} 的添加对酶促反应有较弱的促进作用, 而 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 等有不同程度的抑制作用。

关键词: 琼胶降解菌; 诱导酶; 酶学性质

中图分类号: S986.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)02-0216-04

已有研究表明, 琼胶低聚糖具有抗氧化等重要的生理功能^[1]。酶降解是制备低聚糖的一个重要途径, 由于其具有特异性, 可选择性地酶解切断特定链, 从而制得特定的低聚糖。并且反应条件温和, 降解过程易于控制, 在多糖降解中运用日益增多^[2]。利用从海洋微生物中提取到的琼胶降解酶制备琼胶低分子量活性片段, 成为琼胶工业高值化研究的重要方向。本研究对1株来自海洋的琼胶降解菌株及其酶学性质进行分析, 旨在为琼胶酶的进一步工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 培养基组成

1.1.1 2216E 海洋细菌培养基 蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 磷酸高铁 0.1 g/L, 琼脂 0.2 g/L, 陈海水 1 000 mL, pH 7.2~7.6, 121℃灭菌 20 min。

1.1.2 分离培养基 硫酸铵 5 g/L, 氯化镁 2 g/L, 磷酸高铁 0.1 g/L, 氯化钠 20 g/L, 水 1 000 mL, 琼脂 15 g/L, pH 7.2~7.6, 121℃灭菌 20 min。

1.1.3 摇瓶发酵培养基 琼脂 0.2 g/L, 其他成分同分离培养基(1.1.2)。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 取样及样品处理 用无菌三角瓶取近海退潮处的红藻(*Gelidium amansii*), 将红藻打碎匀浆, 25℃振荡发酵培养 7 d。

1.2.2 初筛 以琼胶作为唯一碳源, 分离筛选琼胶降解菌。将发酵的海藻浆液稀释涂布在分离平板上, 25℃培养 48 h, 根据菌落周围透明圈的大小初步判断菌株的琼胶降解能力。

1.2.3 复筛 将形成透明圈较大的菌株进行划线分离, 得

到纯培养物。接种至发酵培养基中, 于 25℃条件下, 150 r/min 振荡培养 48 h, 检测发酵液的产酶活力。

1.3 酶活力测定

将发酵液在 4℃下, 经 9 000 r/min 离心 20 min, 取上清液作为粗酶液。反应体系为: 酶液 1 mL, 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 7.0, 含 0.5% 琼胶)1 mL, 40℃反应 0.5 h, 水解产生的还原糖采用 DNS 法测定^[3]。酶活力单位定义为在 40℃, pH 7.0 条件下 1 mL 酶液每分钟产生 1 μg 还原糖(以半乳糖计)所需要的酶量。

1.4 生长曲线和产酶曲线的测定

将发酵液每隔 6 h 取样, 于 620 nm 下比色, 根据菌液的浊度来判断菌体的生物量; 同时测定粗酶液中酶活和还原糖含量的变化。

1.5 葡萄糖对产酶阻遏性的研究

在培养基中添加 0.2% 葡萄糖, 对菌株 AT-22 的生长和产酶曲线进行研究。

1.6 基本酶学性质的研究

取一定量的粗酶液, 分别检测温度、pH、金属离子对酶活的影响, 同时检测酶对温度和 pH 的稳定性。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从青岛近海的红藻中筛选到多株具有琼胶降解活性的菌株, 经摇瓶复筛得到一株产琼胶酶活力最高的菌株 AT-22, 达到 360 U/mL(图 1)。该菌在平板上生长, 能够大量分泌胞外酶降解琼胶, 在菌落周围形成凹陷的透明圈。用

收稿日期: 2004-01-09; 修订日期: 2004-08-10。

作者简介: 汤海青(1978-), 女, 硕士, 从事工业微生物开发与应用工作。

Lugol 氏碘液覆盖菌落周围,透明圈内的琼胶因被降解而不能着色,透明圈外的琼胶与碘结合呈深黄色。该菌为革兰氏阴性菌,菌体杆状,在 2216E 培养基上产暗红色色素。

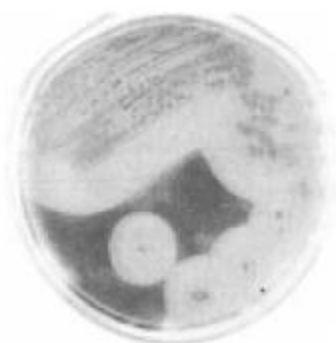


图1 AT-22 菌株在平板上生长 48 h

Fig.1 AT-22 stain growing on plate for 48 h

2.2 菌株的生长曲线和产酶曲线

AT-22 菌株所产琼胶降解酶为诱导酶,只有在培养环境中添加琼胶的情况下,AT-22 才能产生琼胶降解酶,并导致培养基粘度迅速下降,还原糖含量增加,最佳发酵时间为 36 h(图 2)。

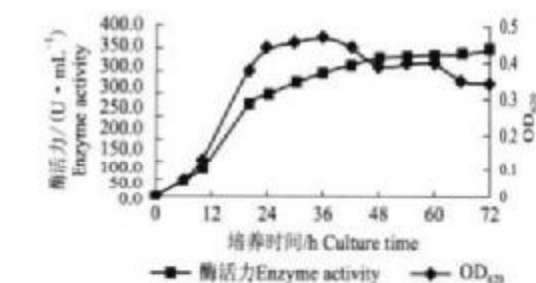
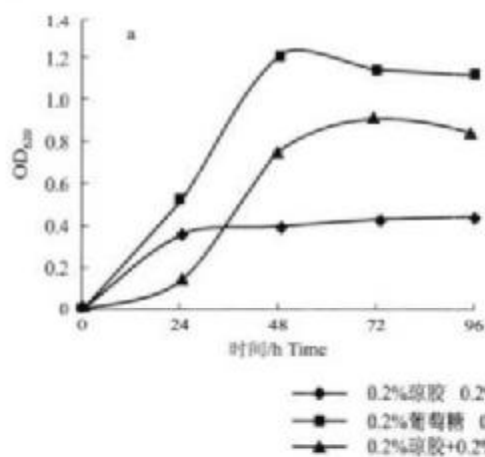


图2 AT-22 菌株生长、产酶和培养液中还原糖的变化

Fig.2 Culture curve, enzyme production and reduced sugar change of strain in AT-22

2.3 葡萄糖对产酶阻遏性的研究

将 AT-22 接种至碳源分别为 0.2% 琼胶、0.2% 葡萄糖、0.2% 琼胶 + 0.2% 葡萄糖的液体发酵培养基,每隔一定时间测生长情况和发酵液酶活力,结果见图 3a、3b。将振荡发酵培养基中的碳源以葡萄糖为唯一碳源时,菌体繁殖旺盛,但琼胶酶活力极差,在加入琼脂的发酵培养基中同时加入葡萄糖,由于碳源的丰富使菌体生长相对于单一琼胶碳源组更加迅速,但在生长前期,葡萄糖的存在使菌株优先利用小分子单糖,抑制菌株产酶。

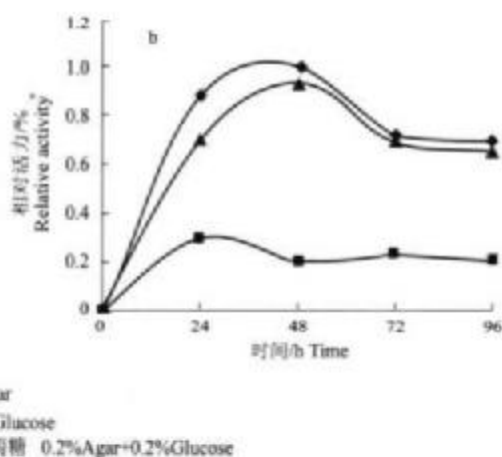


图3 葡萄糖的添加对 AT-22 生长(a)与产酶(b)的影响

Fig.3 Effects of glucose on growth(a) and enzyme production(b) of AT-22

2.4 AT-22 产琼胶酶基本理化性质的研究

2.4.1 酶促反应的最适 pH 在 pH 3.0~8.0,测得各 pH 时琼胶酶活力,以酶活力最高值为 100% 对照,结果见图 4。从图看出,该酶在微酸性条件下具有较高的酶活力。

2.4.2 酶的酸碱稳定性 不同 pH 的酶反应体系在 40℃ 恒温水浴中分别保温 0、30 min、60 min 后,按常规方法测定酶活力,以酶活力最高值为 100% 对照(图 5)。该酶在 pH 6.0~7.0 时有较好的稳定性,当反应体系的 pH 超出此范围,向酸或碱方向移动时,酶活力迅速丧失。

2.4.3 酶促反应的最适温度 在温度 20~60℃ 内,测得各温度下琼胶酶活力,结果见图 6。从图看出,酶反应的最适温度在 30~40℃,当反应温度上升至 50℃ 以上时,酶活力迅速下降。

2.4.4 酶的热稳定性 将酶液在不同温度下分别保温 0、20 min、40 min、60 min 后,按常规方法测定酶活力,以酶活力最高值为 100% 对照(图 7)。在 30~40℃ 时,该酶能保持较好的稳定性,当酶液在 50℃ 保温 20 min 后,酶活力迅速丧失。在 60℃ 处理 1 h 酶活力完全丧失。

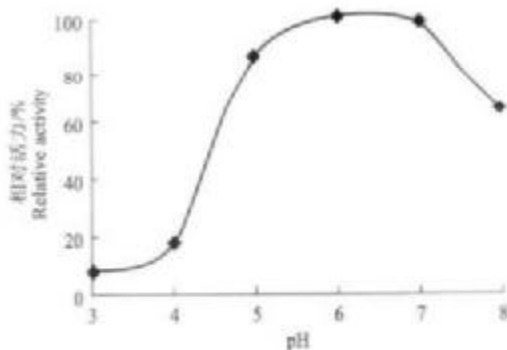


图4 pH对琼胶酶活力的影响
Fig.4 Effect of pH on enzyme activity of agarase

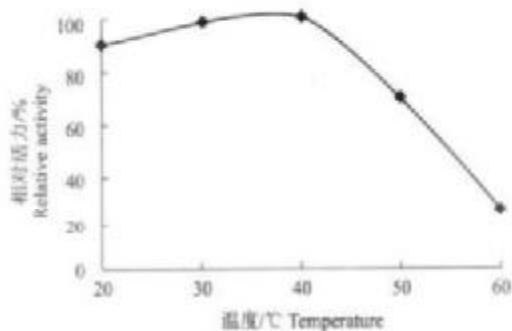


图6 温度对琼胶酶活力的影响
Fig.6 Effect of temperature on enzyme activity

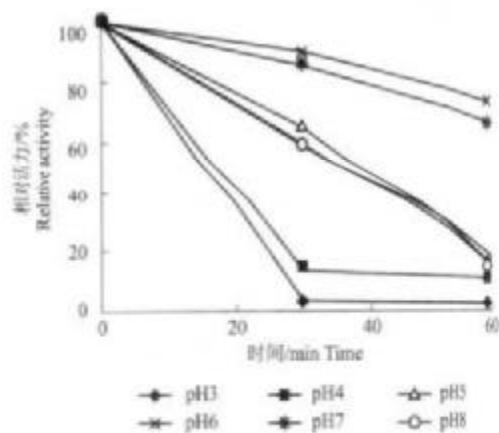


图5 琼胶酶的pH稳定性
Fig.5 pH stability of agarase

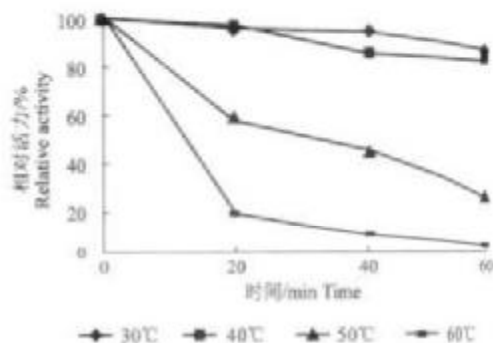


图7 琼胶酶温度稳定性
Fig.7 Temperature stability of agarase

2.4.5 酶的底物特异性 取一定量的粗酶液分别与0.5%琼胶、0.5%κ-卡拉胶、0.5%褐藻胶溶液反应,按常规方法测酶活。该酶对琼胶底物具有相对的专一性,对所选用的其他几种多糖均无作用,见表1。

表1 酶的底物特异性
Tab.1 Substrate specificity of agarase

底物 Substrate	琼胶 Agar	κ-卡拉胶 κ-Carrageenan	褐藻胶 Alginate	纤维素 Cellulose
酶活/(U·mL ⁻¹) Enzyme activity	370.2	0.0	0.0	0.0

2.4.6 底物浓度对酶促反应的影响 在琼胶底物质量分数为0.2%~1.2%时,测得各底物浓度下琼胶酶活力,结果见图8。从图看出,酶活力随底物浓度的增加而直线增加,当底物浓度超过1.0%时,酶活力增加缓慢并趋近饱和。可见该酶作用的最适底物浓度为1%~1.2%。但是考虑到琼胶独特的凝胶性,质量分数0.5%以上的琼胶溶液,加热溶解

后温度降至37℃即可形成稳定的凝胶,因此在实验方法中仍选用0.5%的底物质量分数。

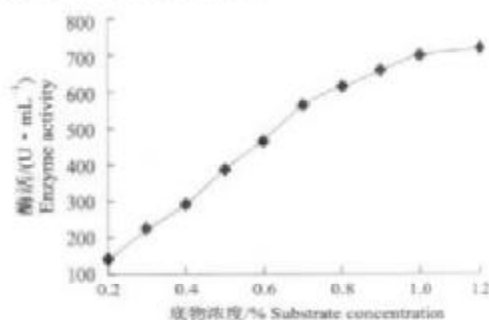


图8 底物浓度对酶促反应的影响
Fig.8 Effect of substrate on enzyme activity

2.4.7 金属离子对酶促反应的影响 在酶反应体系中分别加入终浓度为5 mmol/L的不同金属阳离子,按常规方法测酶活力,结果见表2。 K^+ 和 Ca^{2+} 对酶促反应有促进作用,其

中 Ca^{2+} 的促进作用最为明显,相对酶活力为123%;而 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 等有不同程度的抑制作用。

表2 金属离子对酶活力的影响
Tab.2 Effects of metal ions on enzymatic activity

金属离子 Ion	浓度/(mmol·L ⁻¹) Final concentration	pH	相对酶活/% Relative activity
K ⁺	5.0	7.0	110
Ca ²⁺	5.0	7.0	123
Mg ²⁺	5.0	7.0	101
Fe ³⁺	5.0	7.0	77
Mn ²⁺	5.0	7.0	65
Cu ²⁺	5.0	7.0	34
Zn ²⁺	5.0	7.0	32
Hg ²⁺	5.0	7.0	27
Control	0.0	7.0	100

3 讨论

由于琼胶降解菌大多数为来自海洋的革兰氏阴性菌,受海洋特殊生长环境的影响,产酶性状多不稳定^[4]。本研究得到一株高活力的海洋琼胶降解菌 AT-22,该菌在发酵培养基中36 h达到产酶高峰,产酶能力较高而且稳定。酶的最适作用温度为40℃,最适作用pH值为6.0~7.0,作用条件较为温和,在低于40℃的条件下能够保持较好的酶活力,具有一定的生产潜力。对其产酶条件的优化、酶活力的提高、酶蛋白结构的剖析、酶基因的克隆及序列分析等尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐强,薛长刚,赵雪,等. 酸解法制备琼胶低聚糖及其抗氧化性评价[J]. 中国海洋药物杂志, 2002, 85: 19-22.
- [2] 毛文君,林洪,管华诗. 琼胶寡糖的制备及其¹³C-NMR研究[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 582-584.
- [3] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Anal Chem, 1959, 31: 426-428.
- [4] 杜宗军,王祥红,李筠,等. 琼胶酶研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(1): 64-67.

Selection and enzymatic study on an agarolytic bacterium AT-22

TANG Hai-qing¹, GUAN Bin¹, WANG Xue-peng¹, CHEN Li-hong¹, OU Chang-rong², HU Wen-lang¹
(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The agar-decomposing strain AT-22 was isolated and selected from some species of red algae (*Gelidium amansii*) in the coastal water of Qingdao. The growth and enzymeology properties were studied. The results show that the strain is a gram-negative rod strain which grows singly, producing crater-like depression zones surrounding central colonies of strain AT-22 on the agar plate, and producing red pigment on the 226E culture medium. The agarase produced by AT-22 is an inducible enzyme. When growing in the liquid culture medium containing agar as sole carbon source, it breaks down the agar rapidly, causing the increase of reduced sugar concentration and decrease of fermentation medium mucosity, and the production of agarase reaches maximum at 36 h. The enzyme producing ability will be restrained by addition of 0.2% glucose in culture medium containing 0.2% agar, whereas its growth will be stimulated abundantly at the same time. The agarase produced by strain AT-22 appears to be a very specific enzyme and not a nonspecific glycosidase, inactive against polysaccharides such as κ -carrageenan, cellulose and alginate. The optimal pH is at 6.0-7.0 and temperature 40℃, stable in the pH range of 6.0-7.0, and falling off rather rapidly over 50℃. The optimal concentration of agar substrate is 1.0%-1.2%, addition of Ca^{2+} will greatly promote the enzyme activity, whereas under the presence of Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} . The agarase activity is reduced.

Key words: agar-decomposing bacteria; inducible enzyme; enzymeology properties