

卡拉胶降解菌 M-2 的筛选与产酶性质

牟海津, 江晓路, 蒋 萱, 管华诗
(青岛海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘 要:从多种海藻表面分离筛选到具有较高卡拉胶降解活性的菌株 M-2, 对该菌株所产卡拉胶降解酶的部分酶学性质和酶解产物进行分析。研究表明, M-2 所产卡拉胶降解酶为诱导酶, 具有热不稳定性, 反应的最适温度为 32~38 ℃, 而最适 pH 为 6~8; 酶的反应活性受多种离子的影响。经基体辅助激光解吸电离——飞行时间质谱测试, 酶解卡拉胶终产物以四糖和六糖为主, 该酶为 κ -卡拉胶酶。

关键词:卡拉胶; 卡拉胶降解酶; 酶学性质; 酶解产物

中图分类号:Q93-3

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0251-04

卡拉胶是一类从红藻中提取出来的硫酸胶体多糖。目前 80% 的卡拉胶用于食品及与食品相关的工业, 其余 20% 用于医药和化妆品领域。研究表明, 卡拉胶降解形成的寡糖片段具有多种新型生理活性, 如抗病毒、抗肿瘤等^[1]。利用从海洋微生物中提取到的卡拉胶降解酶制备卡拉胶低分子量活性片段, 成为卡拉胶工业高值化研究的重要方向。本文对 1 株来自海洋的卡拉胶降解菌株进行研究, 获得了具有较高活性的卡拉胶酶, 对其基本酶学性质进行分析, 为工业化生产奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

食品级卡拉胶(粒度: 100 目; 强度: > 800 g/cm²), 烟台海藻工业公司生产。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 初筛 以卡拉胶作为唯一碳源, 制备卡拉胶选择培养基, 从多种海藻表面分离卡拉胶降解菌, 根据菌落周围透明圈的大小初步判断菌种的卡拉胶降解能力。

1.2.2 复筛 选取降解活力较高的菌株进行纯化, 接种至 2216E 液体培养基中, 于 32 ℃ 条件下, 165 r/min

振荡培养 24 h, 检测发酵液的产酶活力。经反复实验后, 筛选出酶活最高的菌种 M-2。

1.2.3 产酶活力的测定方法 发酵液经离心去除菌体后, 取上清液与底物反应, 根据还原糖的产生判断卡拉胶降解酶的活力。1 个酶活力单位(U)定义为在 32 ℃, 每 min 产生 1 μ g 还原糖(以半乳糖计)所需要的酶量。

1.3 菌种生长曲线和产酶曲线的测定

M-2 菌株发酵液每隔 4 h 取样, 于 660 nm 下比色, 根据菌液的浊度来判断菌体的生物量。同时测定 M-2 菌株发酵液的酶活变化曲线。

1.4 酶学性质的研究

分别检测温度、pH、金属离子、NaCl 浓度、EDTA 及 (NH₄)₂SO₄ 含量对酶活的影响。检测酶对温度和 pH 的稳定性。

1.5 酶解产物分析

酶解底物 24 h 后, 通过乙醇分级法得到卡拉胶寡聚糖产物。利用基体辅助激光解吸电离——飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对寡聚糖片段的分子量进行分析。

测试条件: 利用 2, 5-二羟基苯甲酸(DHB)为基体, 样品制备采用液滴干燥法, 将样品与基体适量混合后, 取 0.5 μ L 置于样品靶上, 室温下干燥、结晶, 调节激光能量, 累加扫描 30 次以上得到质谱图。

收稿日期: 2001-09-13.

作者简介: 牟海津(1973-), 男, 讲师, 硕士, 从事海洋微生物活性物质研究工作。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从海洋环境中筛选到多株具有卡拉胶降解活性的菌株,经初筛、复筛和反复验证后得到产酶活力最高的菌株 M-2。该菌为革兰氏阴性菌,菌体杆状, $(1.8 \sim 4.2) \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$,在 2216E 培养基上产橙黄色色素,氧化酶反应阴性。

M-2 菌株所产卡拉胶降解酶为诱导酶,只有在培养环境中添加卡拉胶的情况下,M-2 才能产生卡拉胶降解酶,并导致培养基粘度迅速下降,还原糖含量增加。

2.2 菌种的生长曲线和产酶曲线

菌株 M-2 的生物量在 32 h 达到最高值,此后逐渐走向衰亡期(见图 1)。而发酵液中的产酶活性在 36 h 达到最高。

2.3 酶的作用条件

该酶反应的最适温度在 $32 \sim 38^\circ\text{C}$ (图 2),而最适 pH 在 $6 \sim 8$ (图 3),在 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中,酶的反应活性达到最高。

NaCl 含量对酶活具有较大影响,当 NaCl 浓度低于 0.1 mol/L 时,酶活随 NaCl 浓度的增加而有所提高;而继续增加 NaCl 浓度后,酶活便迅速地降低(图 4),当 NaCl 浓度达到 0.5 mol/L 时,酶活仅为 8.5 U/mL 。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量对 M-2 的酶活产生明显的影响,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 80 mmol/L 时,酶活的损失

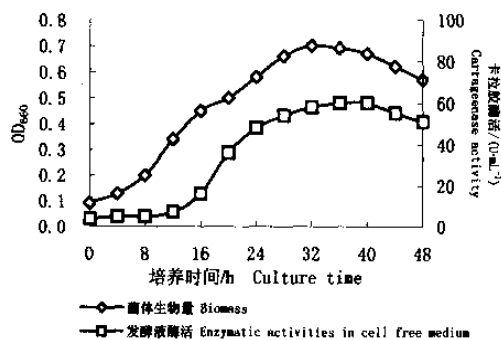


图 1 M-2 生长曲线和产酶活的变化

Fig.1 Culture curve and enzyme production of strain M-2

程度达到 80%(图 5)。

由表 1 可以看出,在 1 mmol/L 的作用浓度下, K^+ 和 Ca^{2+} 对酶活具有一定程度的促进作用,而 Al^{3+} 、 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对酶活具有极为强烈的抑制作用。EDTA 则可以完全抑制该酶的活性。

2.4 酶的稳定性实验

酶在不同的温度下分别处理 10 min 和 30 min 后,某残余酶活力由图 6 显示,该酶在 50°C 以下表现出较高的活性,经 55°C 处理 30 min 或 60°C 处理 10 min 后酶活将完全丧失。

表 1 金属离子对酶活的影响

Table 1 Effects of metal ions on enzymatic activities

离子 Ion	酶活/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) Enzymatic activity	离子 Ion	酶活/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) Enzymatic activity
Fe^{3+}	19	Ba^{2+}	60
Al^{3+}	2	Co^{2+}	58
Zn^{2+}	25	Ca^{2+}	66
Hg^{2+}	0	Mg^{2+}	62
Cu^{2+}	24	K^+	69
Mn^{2+}	33	对照	62
Fe^{2+}	45	Control	
Pb^{2+}	0		

4°C 条件下,在不同 pH 的缓冲液中分别放置 2 h 和 24 h 后,酶活如图 7 所示,该酶在中性环境中(pH $5 \sim 7$)的稳定性较好,而处理时间对酶活的影响不很明显。

2.5 酶解产物分析

卡拉胶酶解产物采用乙醇沉淀法去除未被充分降解的大分子片段,对小分子组分进行质谱分析,结果如图 8 所示。

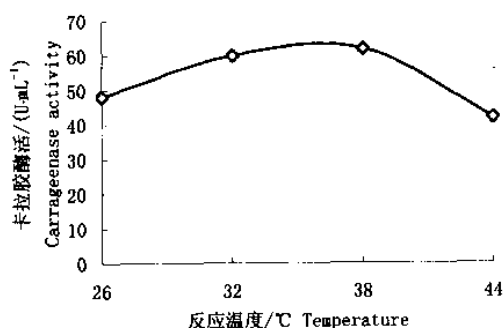


图2 温度对酶活的影响

Fig. 2 Effects of temperature on enzymatic activities

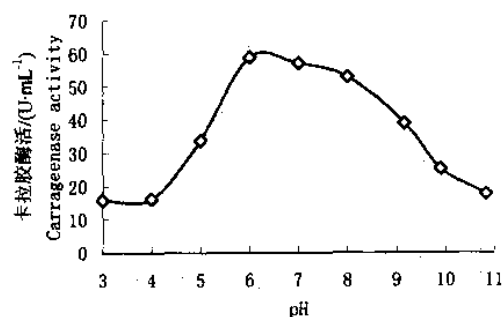


图3 不同 pH 条件下的酶反应活性

Fig. 3 Enzymatic activities at various pH values

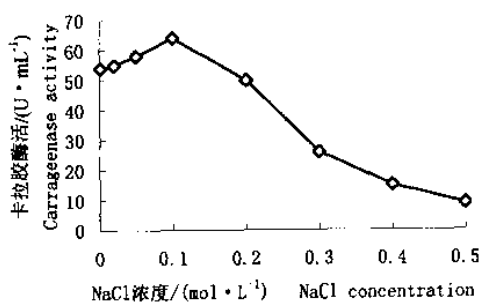


图4 NaCl 含量对酶活的影响

Fig. 4 Effects of NaCl on enzymatic activities

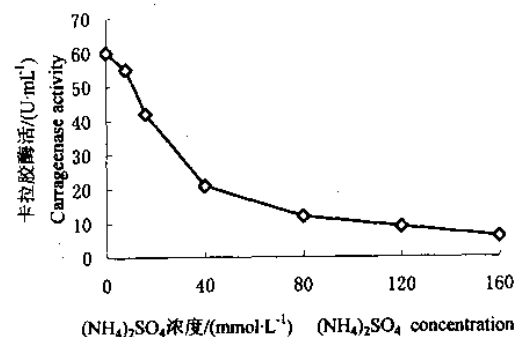


图5 (NH₄)₂SO₄ 含量对酶活的影响

Fig. 5 Effects of (NH₄)₂SO₄ on enzymatic activities

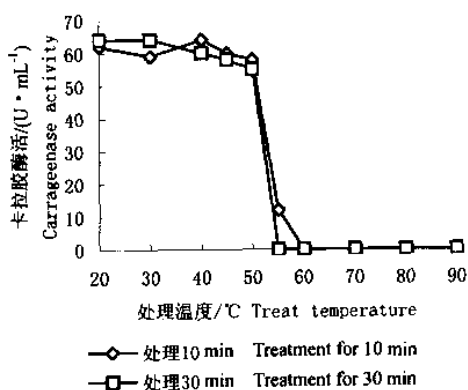


图6 酶的热稳定性试验

Fig. 6 Heat stability test

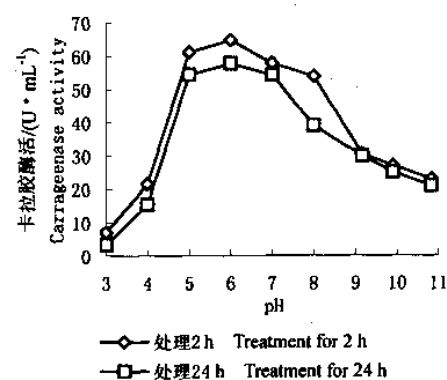


图7 酶对不同 pH 条件的稳定性

Fig. 7 Enzymatic stability at various pH degree

由图中可以看出, 菌株 M-2 降解卡拉胶后形成的终产物以四糖和六糖为主, 根据分子量及其红外吸收特征进行分析, 所得产物为 κ -卡拉胶寡聚

糖。因此, M-2 所产卡拉胶降解酶为 κ -卡拉胶酶。

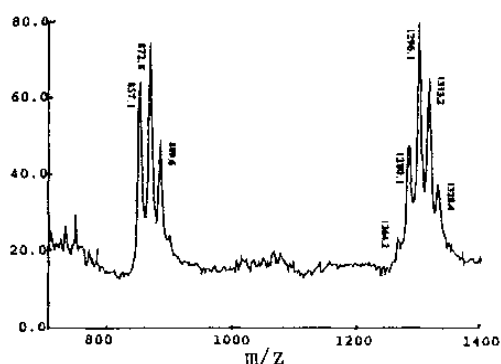


图8 卡拉胶酶解产物的质谱分析

Fig. 8 Analysis of carrageenan decomposing products by MALDI-TOF-MS

3 讨论

卡拉胶的降解方法可归纳为3类:酸水解法、超声波降解法和酶解法。目前普遍采用的是酸水解法,由于酸水解法作用条件剧烈,对底物专一性差,在降解卡拉胶的同时不可避免地破坏了糖链的结构和组成,从而导致生理活性的丧失,同时酶法制备还具有成本低廉、工艺简单、易于控制条件、产率高、无污染等诸多优点。因此,采用酶解法制备卡拉胶寡聚糖活性片段在海洋药物的开发方面具有广阔的发展潜力。

目前有关卡拉胶酶的报道并不多见^[2]。早在1943年, Mori 就从海洋软体动物中提取到能够水解角叉菜卡拉胶的酶。海洋假单胞菌 (*Pseudomonas carrageenovora*) 是最早研究的能够产生卡拉胶酶的微生物。Weigl 等^[3]从 (*P. carrageenovora*) 分离到 κ -卡拉胶降解酶,该酶在对 κ -卡拉胶降解的过程中,使其粘度迅速下降,还原糖含量增加,降解产物以4-硫酸-新卡拉二糖为主。现在已经在假单胞菌、噬细胞菌属 (*Cytophaga*)、别单胞菌属 (*Alteromonas atlantica*、*A. carrageenovora*) 及某些未鉴定菌种中发现到卡拉胶降解酶^[4]。相关的工作主要集中在卡拉胶酶的提取纯化、酶学性质研究及酶解产物的组分分析方面^[5,6]。目前对卡拉胶酶的基因水平的研究工作也开始逐渐展开, Barbeyron 等^[7]对别单胞菌 (*A. carrageenovora*) 的 κ -

卡拉胶酶基因 *cgkA* 进行测序,该基因编码397个氨基酸的多肽和1个含有25个氨基酸的信号肽。Potin 等^[8]从 *Pseudomonas carrageenovora* 和 *Cytophaga drobachiensis* 中分别分离到 κ -卡拉胶酶基因 *CgkK* 和 ϵ -卡拉胶酶基因 *CgkI*,并将其克隆到大肠杆菌中进行表达。

卡拉胶酶对于研究各种卡拉胶的化学组成和结构也具有极为重要的作用。利用卡拉胶酶,结合 C^{13} -NMR 可以有效地根据酶解产物来确定不同类型卡拉胶的细致化学结构。另外,卡拉胶酶还可用作海藻解壁酶,结合纤维素酶共同使用,以获取海藻单细胞、原生质体及其蛋白质和DNA,在海藻细胞学研究、生理代谢研究和遗传育种等方面具有积极的意义。

参考文献:

- [1] 梁勇,李涛.一种潜在的药用多糖——卡拉胶[J].山东医药工业,1998,17(6):18-19.
- [2] 刘岩,江晓路,管华诗.卡拉胶酶的研究进展[J].中国水产科学,2001,8(2):89-93.
- [3] Weigl J, Yaphe W. The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a κ -carrageenase [J]. Can J Microbiol, 1966, 12: 939-947.
- [4] Ostgaard K, Wangen B F, Knutsen S H, et al. Large-scale production and purification of κ -carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora* for applications in seaweed biotechnology[J]. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 326-333.
- [5] Sarwar G, Matayoshi S, Oda H. Purification of a κ -carrageenan from marine *Cytophaga* species[J]. Microbiol Immunol, 1987, 31(9): 869-877.
- [6] Potin P, Sanseau A, Gall Y L, et al. Purification and characterization of a new κ -carrageenase from a marine *Cytophaga* like bacterium[J]. Eur J Biochem, 1991, 201: 241-247.
- [7] Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B. The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to beta-1,3-1,4-glucanases[J]. Gene Amsterdam, 1994, 139(1): 105-109.
- [8] Potin P, Barbeyron T, Bouget F-Y, et al. Biochemical characterization and molecular cloning of phycocolloid-modifying enzymes from marine bacteria and algae[A]. Program and Abstracts Second International Marine Biotechnology Conference [C]. Baltimore MD, 1991. 68.

(For English abstract see P202)