

褐藻酸降解菌 A7 的发酵及产酶条件研究

褚洪蕊, 唐景春

(环境污染过程与基准教育部重点实验室, 南开大学 环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要:以海藻废弃物堆肥中分离到的薄壁杆菌属(*Gracillibacillus*)的褐藻酸降解菌 A7 为研究对象, 对该菌的生长及产酶条件进行了研究。结果表明, 该菌的最适产酶条件为: 温度 30℃, 海藻酸钠的质量分数 0.5%, pH 9.5, NaCl 浓度 0.5 mol/L, 以蛋白胨为主要氮源。在最佳条件下培养 96 h 达到最高酶活力 12.79 U/mL。

关键词:褐藻酸降解菌; 褐藻酸裂解酶; 产酶条件; 薄壁杆菌属(*Gracillibacillus*)

中图分类号: Q93.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)11-0093-04

褐藻酸是由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸通过 β -1,4 糖苷键连接形成的线形阴离子多糖^[1]。其来源广泛, 是海带、马尾藻、巨藻等褐藻的主要组分。褐藻多糖以其价格低廉且降解产物褐藻寡糖生物活性较强, 被广泛应用于食品、化工、医药等行业, 越来越受到研究者的重视^[2]。

褐藻酸裂解酶通过 β 消去机制切割 β -1,4 糖苷键, 并在非还原末端产生 $C_{4,5}$ 不饱和双键, 产生某些具有特定生物活性的寡糖^[3]。其酶解反应条件易于控制、底物特异性高, 在寡糖制备的各个方面明显优于化学和物理降解法, 因此褐藻酸裂解酶成为当前研究的热点。在已报道的文献中, 褐藻酸裂解酶要来源于海洋藻类^[4]、海洋软体动物^[5]体内和多种微生物(包括海洋细菌^[6]、土壤细菌^[7]和真菌^[8]), 为假单胞菌、别单胞菌、弧菌、固氮菌、芽孢杆菌等菌属^[3]。作者以海藻废弃物堆肥中分离出的具有褐藻酸降解功能的薄壁杆菌属菌株 A7 为研究对象, 对其生长及产褐藻酸裂解酶的条件进行初步探索, 为其进一步研究和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 种子液培养基组成

蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 海藻酸钠 5 g, 氯化钠 22.92 g, 溶于 1 000 mL 蒸馏水中, pH 8.5。

1.2 种子液培养

将平板上的菌种挑取数环, 于装有 30 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 30℃ 下 160 r/min 振荡培养 72 h。

1.3 菌株生长曲线的测定

对菌株进行活化, 接入装有 30 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶中, 于 30℃ 下 160 r/min 培养, 每隔 24 h 取样, 于 650 nm 处测定生物量, 以吸光度值对时间做出细菌的生长曲线图。

1.4 发酵产酶培养实验

每组实验均在 100 mL 三角瓶中装入 30 mL 发酵培养基, 按 2%(体积分数)接种量接入活化后的菌液, 于 30℃ 下 160 r/min 培养 72 h 后, 取发酵液测定生物量。将发酵液于 4℃, 8 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液(粗酶提液)测定酶活力。每组设 3 个平行样。

1.5 酶活力的测定方法

参照纤维素酶的测定方法^[9], 取 1 mL 酶液加入到盛有 1 mL 0.5% 褐藻酸钠(用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配置)底物的试管中混匀, 40℃ 水浴中反应 20 min 后, 迅速于沸水浴 15 min 除去酶活, 然后加入 3 mL DNS 溶液, 沸水浴反应 5 min, 迅速冷却, 定容至 25 mL, 于 540 nm 下测定吸光度。空白管由 1 mL 煮沸灭活的酶液代替粗酶提液, 其它同试验管。以葡萄糖作标准曲线, 根据试验管和空白管吸光值的差计算还原糖的产生量。酶活力单位(U)定义为在实验条件下, 每分钟催化底物产生 1 μ g 还原物所需的酶量。比活力定义为每毫升发酵液所含酶活单位(U/mL)。

收稿日期: 2008-05-02; 修回日期: 2008-07-31

基金项目: 国家 863 计划重点资助项目(2007AA061201)

作者简介: 褚洪蕊(1983-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物, 电话: 022-66229394, E-mail: chuhongrui2006@126.com; 唐景春, 通讯作者, E-mail: jc_tang@163.com

2 结果与讨论

2.1 细菌生长曲线图

通过对菌株 A7 生长曲线的实验可以看出(图 1),菌株接种后 24 h 处于延滞期,48 h 到 96 h 处于对数生长期,120 h 时生物量最高,所以在发酵条件优化时,选取处在对数生长期 72 h 的种子液接种。

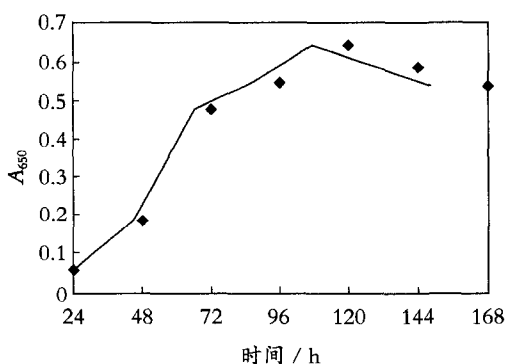


图 1 细菌 A7 生长曲线

Fig. 1 The growth curve of strain A7

2.2 培养基组分对 A7 菌生长及产酶的影响

2.2.1 碳源对细菌生长和产酶的影响

将几种经济易得的单糖和多糖(葡萄糖、蔗糖、淀粉)分别代替海藻酸钠作为碳源培养 72 h,其对菌株生长及产酶的影响见表 1。表 1 表明,该菌在多糖(淀粉、蔗糖)中能较好的生长,并产生一定的褐藻酸酶;在葡萄糖中生长较弱,不能产生褐藻酸酶。以海藻酸钠为碳源时细菌生长最好,且产酶量最大,为 10.75 U/mL。可见该菌对海藻酸钠具有明显的选择趋化性,因该菌分离自裙带菜废弃物堆肥,裙带菜中海藻酸钠含量很高。

表 1 不同碳源对 A7 菌生长及产酶的影响

Tab. 1 Effects of different carbohydrates on biomass and enzyme production of strain A7

碳源	A_{540}	酶活力(U/mL)
葡萄糖	0.071 0	0.00
蔗糖	0.257 7	8.02
淀粉	0.619 0	10.08
海藻酸钠	0.833 3	10.75

2.2.2 氮源对细菌生长和产酶的影响

研究了含量为 0.5% 的几种常见有机和无机氮源(酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、氯化铵和硫酸铵)对菌株 A7 产酶的影响,结果(表 2)表明,菌株 A7 在有机氮源中更有利于其生长和产酶,在酵母膏中细菌虽

生长旺盛,但其产酶量较低,结合生物量和产酶的综合考虑,以蛋白胨为主要氮源,并加入 0.6 倍蛋白胨量的酵母膏作为辅助氮源,实验培养后发现生物量及产酶量均高于以二者为唯一氮源时,说明复合氮源比单一氮源更能促进菌的生长及酶的生成。

表 2 不同氮源对 A7 菌生长及产酶的影响

Tab. 2 Effects of different nitrides on biomass and enzyme production of strain A7

氮源	A_{540}	酶活力(U/mL)
酵母膏	0.934 7	10.01
蛋白胨	0.158 7	12.49
牛肉膏	0.733 7	9.32
氯化铵	0.047 3	7.20
硫酸铵	0.045 7	7.33

2.2.3 NaCl 浓度对细菌生长和产酶的影响

图 2 为不同 NaCl 浓度对 A7 菌的生长及产酶影响。图 2 表明,在没有添加 NaCl 的培养基中,菌体虽有所增长但检测不到酶活力,可以看出 NaCl 是该菌产酶的必需因子。NaCl 添加量以 0.5 mol/L 为宜,此时酶活力最高,达 11.39 U/mL。适宜浓度的 NaCl 能有效提高褐藻酸酶的活性,原因可能是 NaCl 可去除褐藻酸分子表面的水或是能够改变酶与底物结合时的电荷,从而使酶与底物更好的结合,形成更稳定的酶与底物复合物。

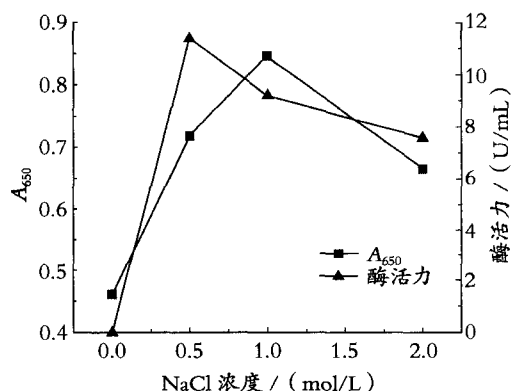


图 2 NaCl 浓度对 A7 菌生长及产酶的影响

Fig. 2 Effects of different NaCl concentrations on biomass and enzyme production of strain A7

2.2.4 海藻酸钠浓度对 A7 菌生长和产酶的影响

由海藻酸钠对 A7 菌的生长及产酶影响实验结果(图 3)可以看出,菌株 A7 产生的褐藻酸酶为诱导酶,作为碳源的海藻酸钠是诱导其产生高活性的褐藻酸酶的必要底物,但底物浓度过高时产酶量并无

明显增加相反有一定程度的减少,这可能是由于过高的底物浓度会影响菌株的正常代谢,其降解产物甚至会对褐藻酸酶的生物合成产生阻碍。由图3可知,褐藻酸钠的最适添加量(质量分数)为0.5%,此时酶活力为10.55 U/mL。

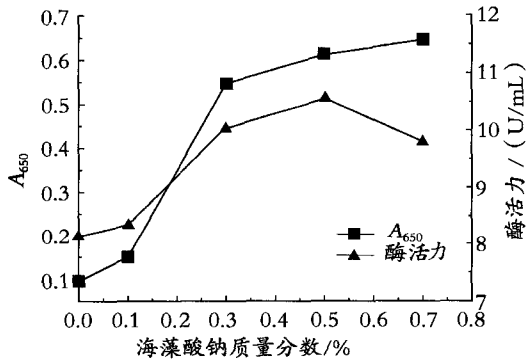


图3 海藻酸钠质量分数对A7菌生长及产酶的影响

Fig. 3 Effects of different sodium alginate concentrations on biomass and enzyme production of strain A7

2.3 培养条件对A7菌产酶的影响

2.3.1 pH值对细菌生长和产酶的影响

图4为培养基的起始pH对A7菌生长和产酶的影响。由图4可知,pH较低时细菌生长缓慢,pH从8.5开始菌体迅速增长,产酶量也随之提高,在9.5~10.0时生物量和产酶均趋于稳定,pH为9.5时二者达到最高。由此可见,该菌适应较广的pH,pH为8.5~10都能良好生长并产酶。

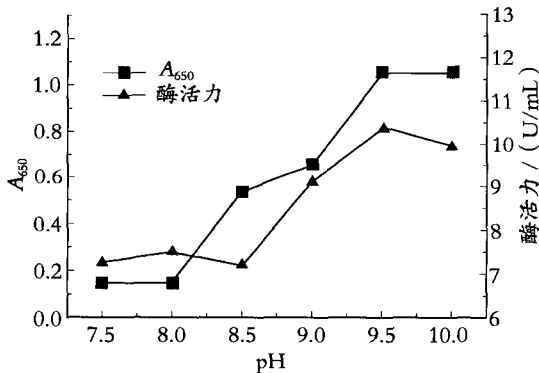


图4 pH对A7菌生长及产酶的影响

Fig. 4 Effects of different pH values on biomass and enzyme production of strain A7

2.3.2 装液量对细菌生长和产酶的影响

在250 mL三角瓶中分别装入50, 100, 150, 200 mL的液体培养基,研究不同装液量对A7菌发酵影响,结果如图5所示。随着装液量的增加,生物量和酶活力都逐渐降低,说明该菌株是好氧菌,提高溶氧量有利于菌体生长和酶的生成。

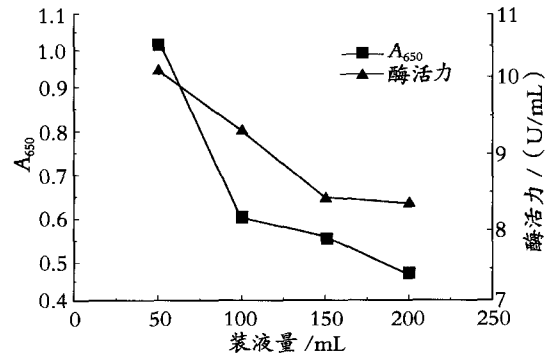


图5 装液量对A7菌生长及产酶的影响

Fig. 5 Effects of different media volumes on biomass and enzyme production of strain A7

2.3.3 温度对细菌生长和产酶的影响

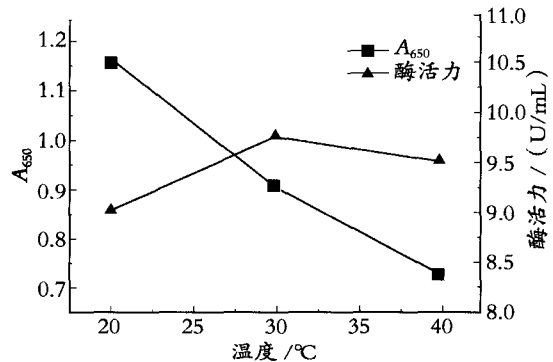


图6 温度对A7菌生长及产酶的影响

Fig. 6 Effects of different temperatures on biomass and enzyme production of strain A7

图6为菌株在不同培养温度下的生长和产酶情况。从图6可以看出,A7菌在20℃时生长旺盛,酶活力在30℃时较高,为9.77 U/mL。该菌在40℃时仍能较好的产酶,这可能与菌的来源有关,因为该菌分离自废弃物堆肥,能耐受较高的温度。

2.3.4 培养时间对细菌生长和产酶的影响

图7为菌体的产酶量随培养时间的变化,由图7可知,在优化后的发酵条件下,菌株培养48 h后生物量达到了最高,随后缓慢降低,产酶量随培养时间变化并不显著,48~96 h基本稳定,之后略有下降。96 h时酶活力最高,为12.79 U/mL。

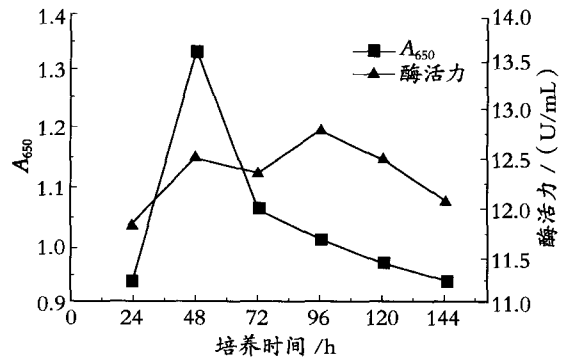


图7 培养时间对A7菌生长及产酶的影响

Fig. 7 Effects of different culture times on biomass and enzyme production by strain A7

3 结论

通过对海藻酸降解菌 A7 发酵上清液的活力测定,得出该菌的最佳产酶条件。该菌在 pH9.5 左右,温度 30℃,海藻酸钠的质量分数 0.5%,NaCl 浓度 0.5 mol/L,蛋白胨为主要氮源时,连续培养 96 h 得到最大酶活力 12.79 U/mL。

在已报道的褐藻胶裂解酶产生菌中,还未见有薄壁杆菌属的报道。1997 年,韩宝芹^[10]等从烂稍的海带、裙带菜中分离出一株具有海藻酸降解功能的埃氏单胞菌株 A102,在最适产酶条件(褐藻酸钠 0.3%~0.6%,蛋白胨 0.5%,pH 7.5,培养温度 25℃)下培养 144 h 酶活最高,达到 7.63 U/mL,此菌株产生的褐藻胶裂解酶不耐高温,温度高于 25℃时酶活力急剧下降。本实验所用薄壁杆菌菌株 A7 分离自海藻废弃物生物堆肥,耐温性较强,40℃时也能较好地产酶;且产酶时间较快,96 h 产酶最高。已报道的海洋细菌所产海藻酸裂解酶最适 pH 在 7.5~8.5 之间^[3],本研究的菌株能耐受较高的 pH,产酶适宜的 pH 在 9.5 左右。在优化培养条件下摇床发酵 96 h 褐藻胶裂解酶活达 12.79 U/mL,显示出良好的研究开发潜力。

目前,海藻酸裂解酶主要应用于工业、食品、医药等行业,在海藻废弃物处理方面的应用鲜见报道。本研究的菌株分离自海藻废弃物堆肥,可考虑将其用于海藻废弃物的快速降解,这对海洋环境的净化及海洋废弃物的有效利用具有重要意义。

参考文献:

[1] Cao Lixiang, Xie Lujing, Xue Xiaoli, *et al.* Purification

- and characterization of alginate lyase from streptomyces species strain A5 isolated from banana rhizosphere [J]. *Agric Food Chem*, 2007,55:5 113-5 117.
- [2] 蔡俊鹏,程璐.褐藻胶裂解酶及其裂解产物的研究进展[J].食品研究与开发,2006,27(11):219-222.
- [3] Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. ALGINATE LYASE: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 289-340.
- [4] Shiraiwa Y, Abe K, Sasaki S F, *et al.* Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae [J]. *Bot Mar*, 1975,18:97-104.
- [5] 康平,汪秋宽,宋琳琳,等.皱纹盘鲍内脏酶的酶学性质及褐藻胶裂解酶的分离纯化[J].水产学报,2007,31(1):15-22.
- [6] Iwamoto Y, Araki R, Iriyama K I, *et al.* Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain No. 272 and its action on saturated oligomeric substrates [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2001,65:133-142.
- [7] 张书利,管斌,邱向锋,等.褐藻胶裂解酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件研究[J].现代食品科技,2006,26(3):24-27.
- [8] Schaumann K, Weide G. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi [J]. *Hydrobiologia*, 1990, 204-205:589-596.
- [9] 中山大学生物系生化微生物教研室编.生化技术导论[M].北京:人民教育出版社,1978. 61-62.
- [10] 韩宝芹,刘万顺,戴继勋,等.褐藻酸降解菌的发酵培养及褐藻酸酶对褐藻细胞的解离作用[J].海洋科学,1997,(2):39-43.

Study on culture conditions for alginase production by alginate degrading bacterium *Gracillibacillus* sp. A7

CHU Hong-rui, TANG Jing-chun

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Nankai University), Ministry of Education/College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Received: May. ,2,2008

Key words: alginate lyase; alginase activity; optimum conditions; *Gracillibacillus*

Abstract: A bacterium A7 with relatively high alginase activity was isolated from wakame compost and belongs to genus *Gracillibacillus*. Based on the activity detection of the fermentation liquid, the optimum conditions of alginase production were determined as follows: pH 9.5; temperature, 30℃; sodium alginate and sodium chloride, 0.5% and 0.5 mol/L, respectively; peptone as the principal source of nitrogen and culturing continuously for 72 h.

(本文编辑:康亦兼)