

复合酶对卡德藻溶壁效果的研究*

STUDY ON EFFECTS OF COMPLEX ENZYMES ON THE CELL WALL DEGRADATION OF *Tetraselmis* sp.

林学政 沈继红 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

关键词 卡德藻,原生质体,溶壁

早在1892年,Kiercker就用机械法从藻类中分离到原生质体。该法靠手工操作,难度非常大,原生质体的得率非常少,费时费力。1960年,英国Cooking首先采用酶解法从番茄幼苗根尖中的细胞用纤维素酶把原生质体分离出来,从而开创了酶法大量获得原生质体的新时期。由于此法的创立,才使原生质体培养、融合、转化等的一系列研究得到很大的发展。尽管该技术被应用于陆生植物已有很长时间,但由于海藻多样化的细胞壁组成和结构,其应用仍处于发展阶段。

海洋微藻类因其结构简单和易于培养等特点,成为原生质体制备、细胞融合,以及细胞工程和基因工程研究的极好材料。目前已有许多海藻原生质体制备的报道。最初海藻原生质体的制备是利用机械法获得的;近来则大多采用外源多糖水解酶获得原生质体。以兼养藻为研究对象进行溶壁研究,并利用正交实验设计优化其酶解条件,迄今未见有关报道。本文采用复合酶解法对兼养藻——卡德藻进行溶壁研究,以期微藻细胞遗传操作提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

卡德藻(*Tetraselmis* sp.),由青岛海洋大学海洋生命学院微藻研究室提供,属绿藻门,绿藻纲,团藻目,塔形藻亚目,扁藻科;系单胞藻,卵形侧扁,顶部四裂,具鞭毛,两长两短,游动迅速,细胞内有一大的杯状色素体,具眼点,约12~14 μm长,5~7 μm宽,可以自养或兼养。

卡德藻的培养采用TM4培养基^[1],在23±2℃,光照强度2000 lx的条件下培养,每天摇动3~4次。

1.2 酶与试剂

酶:纤维素酶类包括纤维素酶(Cellulase, Onozuka R10,日本Yakult honsha)(A),崩溃酶(Drilase, Sigma)(D),果胶酶类包括离析酶(Macerzyme R10,日本Yakult honsha)(B),果胶酶(Pectinase, BIB)(E),半纤维素酶类为半纤维素酶(Hemicellulase, Sigma)(C)。

酶溶剂:0.05 mol/L的不同pH值的缓冲液,内含0.6 mol/L的渗透压调节剂(甘露醇:山梨醇=1:1)。

复合酶溶液的配制:4种复合酶溶液的组分及浓度见表1;正交实验设计见表2。按所需的种类及浓度称取一定量的酶溶于已灭菌的酶溶剂中。

1.3 卡德藻的溶壁试验

(1)取指数生长期的藻细胞(浓度约为 10^7 cell/ml),在室温下以4000 r/min的转速离心5 min。(2)用无菌海水洗涤沉淀的藻细胞一次,在室温下以4000 r/min的转速离心5 min,弃上清液,将洗好沉淀的细胞在5 ml酶溶液中悬浮。(3)在恒温(30℃)水浴中保存细胞悬浮液,不时轻轻晃动。(4)定时取出0.1 ml细胞悬浮液,加入到1.9 ml蒸馏水中,振荡。显微镜下观察,细胞破壁完全,膨胀变大、破裂,并可见有内容物漏出,此即为原生质体。

1.4 原生质体得率的测定

利用渗透压冲击破碎法^[1],取1.3(2)细胞悬浮液0.1 ml,加入到1.9 ml蒸馏水中,用血球计数板计未

* 国家863青年基金资助项目863-819-Q17号。

收稿日期:2000-04-28;修回日期:2000-05-09

破碎细胞数 N ; 同样计数 1.3(4) 未破碎细胞数 N_0 , 则原生质体得率为 $(N - N_0) / N \times 100\%$ 。

1.5 藻株生长动态的确定

按 10% 的接种量接种种子培养液, 光培养, 定时取样, 用 752 型分光光度计测量其光吸收值。

1.6 卡德藻酶解条件的确定

1.6.1 不同复合酶液对卡德藻破壁效果的评价 在 1.3 试验中, 添加不同酶液进行试验, 测定酶解 1 h 时的原生质体得率。

1.6.2 不同生长期对卡德藻溶壁效果的影响 在卡德藻不同生长期, 取样进行酶解试验, 测定其原生质体得率, 步骤按 1.3 进行。

1.6.3 不同温度对卡德藻溶壁效果的影响 在卡德藻溶壁试验中, 分别在 20, 23, 26, 29, 32 °C 下进行酶解试验, 分别测定原生质体得率。

1.6.4 不同 pH 值对卡德藻溶壁效果的影响 将酶溶解在 pH 值分别为 4.6, 5.0, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.6, 7.0, 7.5 的 0.05 mol/L 的缓冲溶液中, 在相同温度 (30 °C) 下进行卡德藻的溶壁试验, 分别测定其原生质体得率。

2 结果

2.1 出发藻株生长动态的确定

卡德藻培养液的光吸收曲线示于图 1。可见, 卡德藻的吸收峰在 440 nm。在 440 nm 处测得卡德藻的生长动态曲线见图 2。由图 2 可见, 0~1 d 是卡德藻的静止生长期, 然后卡德藻进入指数生长期, 6 d 以后是平衡和死亡期。

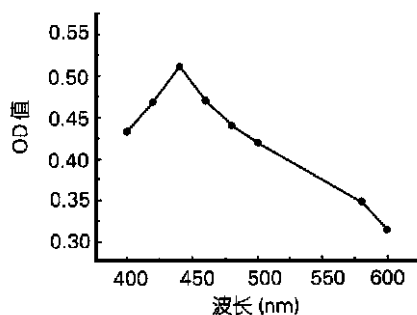


图 1 卡德藻培养液吸收峰的确定

2.2 不同水解酶对卡德藻的溶壁效果

复合酶溶液的组成及溶壁结果均见表 1。由表 1

可见, 酶溶液 1 的溶壁效果优于酶溶液 2, 酶溶液 3 的效果优于酶溶液 4, 由此可以看出, 纤维素酶 R10 与

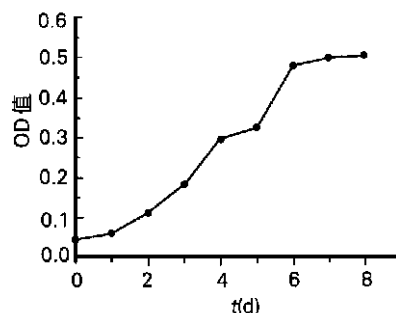


图 2 卡德藻的生长曲线

表 1 不同水解酶对卡德藻溶壁效果的影响

酶溶液	酶			原生质体得率 (%)
	(2%)	(1%)	(1%)	
1	A	B	C	31.58
2	D	B	C	13.24
3	A	E	C	29.96
4	D	E	C	10.90

表 2 复合酶对卡德藻溶壁正交实验结果

试验号	A (%)	B (%)	C (%)	空白	原生质体 得率(%)
1	1.0	0.5	0.5	1	23.83
2	1.0	1.0	1.0	2	34.85
3	1.0	1.5	1.5	3	23.26
4	2.0	0.5	1.0	3	25.75
5	2.0	1.0	1.5	1	34.92
6	2.0	1.5	0.5	2	46.81
7	3.0	0.5	1.5	2	32.40
8	3.0	1.0	0.5	3	33.27
9	3.0	1.5	1.0	1	34.34
Σ1	81.94	81.98	103.91	93.09	
Σ2	107.48	103.04	94.94	114.06	
Σ3	100.01	104.41	90.58	28.28	
优水平	2.0	1.5	0.5		
极差	25.54	22.43	13.33		
主次顺序	A > B > C				

崩溃酶相比, 溶壁效果较佳, 因为酶溶液 1 和酶溶液 2, 酶溶液 3 和酶溶液 4 的唯一差别在于纤维素酶种类的不同。同样, 离析酶 R10 与果胶酶相比, 离析酶

R10 的溶壁效果较佳, 但二者溶壁效果相差并不明显。

因此, 选取酶溶液的组成为纤维素酶 R10, 离析酶 R10 和半纤维素酶, 复合酶溶液的组成与含量以及正交实验的结果示于表 2。可以看出, 纤维素酶和离析酶对卡德藻酶解效果的影响较大, 而半纤维素酶的影响较小, 主次顺序为 $A > B > C$ 。从优水平确定酶溶液的组成为: 2.0 % 纤维素酶, 1.5 % 离析酶, 0.5 % 半纤维素酶。

2.3 卡德藻不同生长期对溶壁效果的影响

不同生长期对卡德藻溶壁效果的影响示于图 3。可见在藻株的指数生长期时溶壁效果比较理想, 而在静止期和平衡期死亡期时溶壁效果差一些。因此, 溶壁试验应选在卡德藻指数生长期时进行。

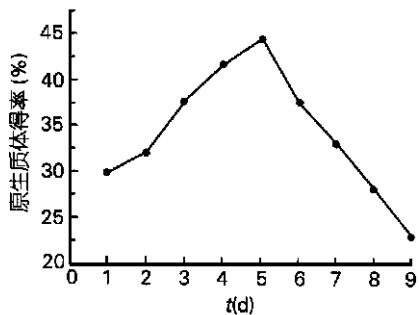


图 3 生长周期对卡德藻溶壁效果的影响

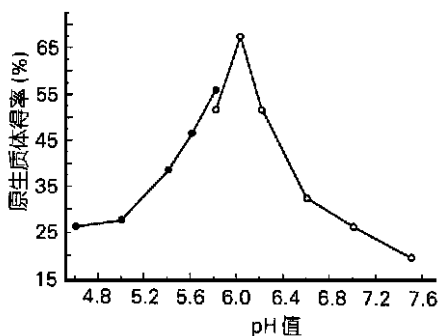


图 4 pH 值对卡德藻溶壁效果的影响

● 柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液;
○ 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液

2.4 pH 值对卡德藻溶壁效果的影响

不同 pH 值对卡德藻溶壁效果试验结果示于图 4。可见, 在 pH 值为 6.0 时溶壁效果最佳, 而在 pH 较大或较小时效果差一些。在相同的 pH 值下 ($pH =$

5.8), 不同的缓冲液对卡德藻的溶壁效果也不一样。

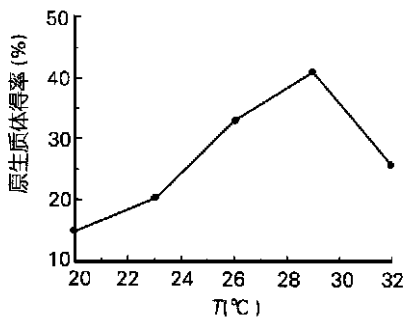


图 5 温度对卡德藻溶壁效果的影响

2.5 温度对卡德藻溶壁效果的影响

温度对卡德藻溶壁试验结果示于图 5。可以看出, 温度对卡德藻酶解效果的影响很大。从低温时随着温度的升高, 酶活力逐渐增加, 到 29 °C 达到最大; 以后随着温度的升高, 酶活力逐渐下降, 酶解效果也越来越差。

3 讨论与结语

3.1 本研究中对测定卡德藻的生长曲线时, 存在着不同程度的藻细胞沉淀问题, 这可以参照金传荫等 1995 年报道的方法解决, 即将培养液用玻璃匀浆器匀浆, 并加入适量丙三醇, 混匀使细胞悬浮良好。在卡德藻的生长曲线中, 有一明显的转折, 这可能是二次生长所致, 因为卡德藻为兼养藻, 可利用分泌到细胞外的有机质重新生长。

3.2 研究表明, 崩溃酶的酶解效果不如纤维素酶 R10, 这可能是因为崩溃酶在酶溶剂中的溶解性不佳所致。因为在配制酶溶液时, 崩溃酶 (浓度为 2 %) 在酶溶剂中的溶解性较差, 明显没有溶解完全, 试管底部仍有较多酶粉末存在; 而纤维素酶在酶溶剂中的溶解性较好。

果胶酶的溶壁效果不如离析酶 R10, 这同王素娟等^[2]的实验结果相一致。在比较酶溶液的组成对羊栖菜 (*Sargassum fusciprune*) 原生质体得率的影响时发现, 在其他实验条件和酶组分相同的条件下, 将酶溶液中的 2.0 % 果胶酶换成 1.0 % 果胶酶和 1.0 % 离析酶 R10, 就能明显提高原生质体的得率。

本研究最后确定的酶溶液的组成和浓度同卡德藻的细胞壁组成是密切相关的。因为其细胞壁组分主要为纤维素和果胶质, 所以酶溶液的主要成分为纤维

素酶和离析酶。同时据王素娟 1992 年报道,商品纤维素酶往往含有半纤维素酶,这就决定了半纤维素酶对卡德藻的酶解效果影响较小,含量较低。据 Yamada 等 1981 年报道,纤维素酶 Onozuka R10 和离析酶 R10 是含有多种多糖水解酶的粗酶,因而仍不清楚酶解细胞壁的必需组分。

3.3 卡德藻在不同的生长时期对溶壁效果差异很大,这和细胞的生长分裂有很大关系。在细胞的指数生长期,细胞处于活跃的生长和分裂状态,细胞壁较薄、胞外分泌物较少,有利于酶对细胞壁的水解;而在静止期和死亡期,细胞生长分裂较少,细胞壁较厚、胞外分泌物多,不利于酶发挥作用。

在不同 pH 以及相同 pH 不同的酶缓冲液下,酶对卡德藻的溶壁效果不同,主要是不同 pH 和离子影响了酶的活力。

本文只研究了各种因子对卡德藻溶壁效果的影响,需进一步研究其对原生质体再生的影响。

参考文献

- 1 张士瑾、马军英、范 晓。海洋生物技术原理和应用。北京:海洋出版社,1997。101 ~ 102
 - 2 王素娟、孙云龙、马凌波等。水产学报,1996,20(3):241 ~ 249
 - 3 Day, J. G., Tsavalos, A. J. . *J. Appl. Phycol.*, 1996, 8(1): 73 ~ 77
- (本文编辑:刘珊珊)