

褐藻酸降解酶的制备及其性质研究

袁兆慧¹ 韩丽君¹ 林伟¹ 韩宝芹²

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:通过培养褐藻酸降解菌交替单胞菌 (*Alteromonas sp.*) 菌株 H-1 使其产酶, 研究了该酶的性质。结果表明, 该菌在 25 ℃ 培养 72 h 时产酶量最高。褐藻酸酶作用的最适底物质量分数为 1% ~ 2%, 最适 pH 值为 7.5, 最适反应温度为 40 ℃, 温度升高酶活力急剧下降。

关键词:褐藻酸降解菌, 褐藻酸降解酶, 制备

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)02-0078-03

褐藻胶是褐藻中的主要成分, 是一种由 α -D-甘露糖醛酸和 β -L-古罗糖醛酸 2 种不同的结构单元组成的线形多糖, 具有独特的水溶性, 因而被广泛地应用于纺织、食品、造纸等工业中^[1]。但是, 由于其具有分子质量大、粘度大、溶解性低等特点, 应用的范围受到了一定的限制。近年来研究发现, 褐藻胶降解产物具有多种生物学活性, 如降血脂、降血压、促进植物生长等^[2-4]。利用褐藻酸降解酶专一的降解褐藻胶, 可以得到低分子量、低粘度并具有一定生物活性的低聚褐藻胶, 以此来扩大其应用范围, 因此褐藻酸降解酶的研究就具有重要的意义。作者通过发酵培养交替单胞菌 (*Alteromonas sp.*) 菌株 H-1 获得褐藻酸酶, 初步研究了该酶的性质, 确定了酶降解褐藻胶的最适反应条件。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源及纯化

实验所用菌株来自中国科学院海洋研究所, 用划线法进一步分离纯化该菌株, 所得菌落大而圆, 乳黄色, 表面光滑, 不透明。

1.2 培养基组成^[5]

褐藻酸钠 2%, 蛋白胨 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, NaCl 2.5%, 酵母浸膏 0.1%, 800 mL 蒸馏水, pH 7.5。

1.3 液体菌种培养

将 20 mL 发酵培养基装入 100 mL 三角烧瓶中, 于 121.5 ℃ 灭菌。冷却后接入一环菌苔, 于 25 ℃ 摇瓶培养 12 h。

1.4 菌种发酵培养实验

1.4.1 培养时间实验

每一实验组均在 100 mL 三角烧瓶中装入发酵培养基 30 mL, 按 2% (体积分数) 的接种量接入液体菌种, 放培养箱中于 25 ℃ 恒温培养, 定期振摇。每 24 h 取一次样品, 测定发酵液的酶活力及其生物量^[6]。

1.4.2 生物量的测定

用 721 型分光光度计于 620 nm 处测定发酵液的光密度值, 以发酵培养基作参比。

1.5 酶的制备

在 100 mL 三角烧瓶中装入 20 mL 发酵培养基, 灭菌后从斜面培养基上接入菌种, 于 25 ℃ 摇瓶培养 12 h, 得液体菌种。在 2 000 mL 三角烧瓶中装入 800 mL 培养基, 灭菌后将培养好的液体菌种按 2% (体积分数) 接入, 于 25 ℃ 恒温培养 72 h。将培养液用 Beckman J2-HS 高速冷冻离心机于 4 ℃ 下, 8 000 r/min 离心 20 min, 取上清液。将上清液于冰浴中搅拌下加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 75% 饱和度 (0 ℃), 盐析过夜。再于 4 ℃ 下, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清

收稿日期: 2004-01-16; 修回日期: 2004-05-20

基金项目: 国家海洋 863 资助项目 (D12022509, D10022508)

作者简介: 袁兆慧 (1979-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 海藻与海洋药物化学, E-mail: ronnie-no2002@yahoo.com.cn; 韩丽君, 通讯联系人, E-mail: ljhan@ms.qdio.an.cn

液,保留沉淀。将沉淀溶于 150 mL 蒸馏水中,得粗酶液,放 4 ℃ 下保存备用。

1.6 酶活力测定

1.6.1 酶活力测定方法^[7]

利用 3, 5-二硝基水杨酸法测定酶解产物中还原糖的量,以此表示酶活力。反应体系溶液包含 1.0 mL 1% 的褐藻酸钠溶液,4.0 mL 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液和 1.0 mL 粗酶液,于 40 ℃ 恒温水浴中保温 30 min,取出后立即于沸水浴中煮沸 15 min 使酶失活,得糖化液。取糖化液 1.0 mL,加入 3, 5-二硝基水杨酸显色剂 3.0 mL,在沸水浴中煮沸显色 15 min。冷却后稀释至 25 mL,摇匀,以 1.0 mL 煮沸灭活的酶液代替粗酶液作空白管,于 550 nm 处比色。

1.6.2 酶活力定义

酶活力单位定义为上述条件下,每分钟催化底物降解生成 1 μg 还原糖所需的酶量。

2 实验结果

2.1 发酵时间对产酶量的影响

实验研究了发酵培养过程中菌体产酶量随时间的变化。结果表明,当发酵液培养 72h 时,菌体产酶量达到最大值,且此时生物量也处于峰值(图 1)。

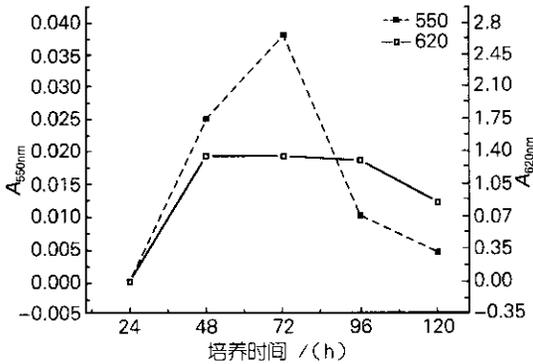


图 1 培养时间对产酶的影响

Fig.1 The time course of enzyme formation

2.2 酶性质研究

2.2.1 底物质量分数对酶活力的影响

实验研究了随底物质量分数的变化,酶活力的变化情况。由图 2 中曲线的变化趋势可以看出:褐藻酸钠质量分数在 0.2% ~ 1.0% 范围内,酶活力随底物质量分数增加而增加;当褐藻酸钠质量分数大于 1.0% 时,酶活力增加的趋势减慢,且逐渐接近最大值,表明在此反应条件下酶已被底物所饱和。所以反

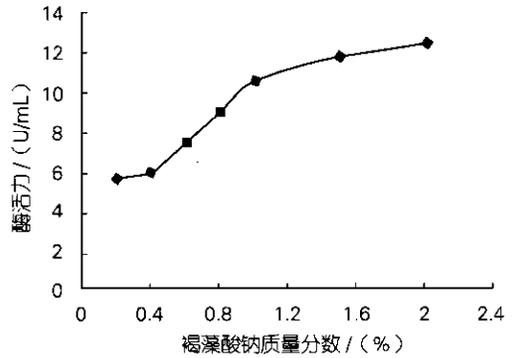


图 2 底物质量分数对酶活力的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on enzyme activity

应体系褐藻酸钠质量分数可选用 1.0% ~ 2.0%。

2.2.2 pH 值对酶活力的影响

实验中分别以 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸盐缓冲液和 pH 为 7.1、7.5、8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作为反应体系的缓冲液,测定了不同 pH 值下酶活力的变化,并对 2 种缓冲液作了对比。结果表明,当使用磷酸盐缓冲液体系,酶活力在 pH = 7.0 时达到最大值 9.45U/mL;当使用 Tris-HCl 缓冲液体系,酶活力在 pH = 7.5 时达到最大值 10.405 U/mL。从图 3 中可以看到,在相同 pH 值下,使用 Tris-HCl 缓冲液的酶活力均大于磷酸盐缓冲液的。所以选择 pH 值为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液作为反应体系的缓冲液。

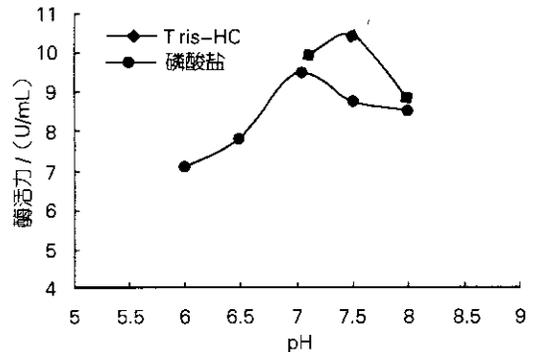


图 3 pH 值对酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on enzyme activity

2.2.3 温度对酶活力的影响

将反应混合物分别于 15、20、25、30、35、40、45、50 ℃ 保温 30 min,测定酶活力。由图 4 中曲线可以看出,

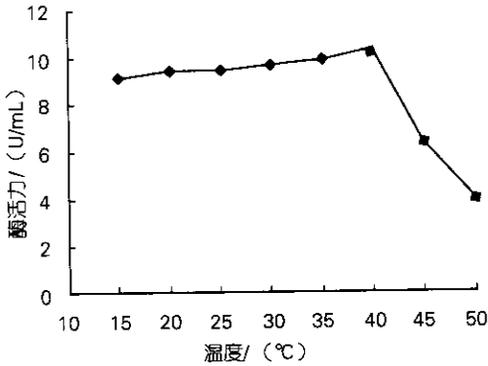


图4 温度对酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzyme activity

温度在 15~40 °C 时,酶活力变化不大,到 40 °C 时达到最大值。说明在较低温度(15~40 °C)该酶对温度变化不敏感,且酶活力较高。前期实验中已验证,在海带侵染实验中,在 15 °C 条件下其他褐藻酸降解菌都无法使海带侵染,而作者所用褐藻酸降解菌交替单胞菌(*Alteromonas* sp.) 菌株 H-1 则很容易使海带侵染,因此认为该菌产生的褐藻酸降解酶活力较其他酶要高。当温度升至 45 °C 时,酶活力急剧下降,即大于 40 °C 酶开始失活。因而酶反应的最佳温度为 40 °C。实际操作中最好将温度控制在 35~40 °C 之间,以免超过 40 °C 影响酶活力。

3 结论

通过酶性质实验的结果可以看出,由该种海洋细菌培养出的褐藻胶降解酶适合降解质量分数为

1%~2% 的褐藻酸钠,在此范围内增加底物质量分数可以提高酶活力。该酶对体系的 pH 值变化敏感,在 pH 值为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中酶活力可达到最大值。体系温度小于 40 °C,酶性质稳定,受温度影响很小,而超过 40 °C 酶活力急剧下降,因而控制酶促反应的温度十分重要。但由于实验中所用酶为粗酶液,没经进一步纯化,体系中其他组分的存在会影响到酶活力,实际应用中若能进一步纯化该酶相信酶活力会有所提高。

参考文献:

- [1] Haug A, Larsen B. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis [J]. *Acta Chem Scand*, 1966, 20: 183-190.
- [2] Murata K, Inose T, Hisano T, *et al.* Bacterial alginate lyase: Enzymology, genetics and application [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76(5): 427-437.
- [3] 张晨. 海藻双酯钠对血清高密度脂蛋白亚组分含量影响的观察 [J]. *中国海洋药物*, 1992, 1: 4-6.
- [4] Natsume M, Kamo Y, Hirayama M, *et al.* Isolation and characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities [J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 258: 187-197.
- [5] 王艳玲,唐学玺,张震. 褐藻酸降解菌的筛选及其生长条件 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(1): 51-54.
- [6] 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: 39-42.
- [7] 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.

Preparation of alginase and its properties

YUAN Zhao - hui¹, HAN Li - jun¹, LIN Wei¹, HAN Bao - qin²

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jan., 16, 2004

Key words: alginic acid decomposing bacterium; alginase; preparation; property

Abstract: Alginase was prepared by culturing an alginic acid decomposing bacterium *Alteromonas* sp. strain H-1. The bacterium produced a maximum amount of alginase when it was incubated at 25 °C for 72h. The optimum alginate sodium concentration was 1%~2%, the optimum pH and temperature was 7.5 (Tris-HCl buffer) and 40 °C respectively. The activity of the enzyme would reduce sharply if the temperature was above 40 °C.

(本文编辑 张培新)