

褐藻酸降解酶特性的初步研究

冯 蕾, 唐学玺, 王艳玲, 杨 震

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 对从海带 (*Laminaria japonica*) 病烂处分离出的 2 株别单胞菌属的褐藻酸降解菌(简称菌株 A1, A2) 进行了褐藻酸钠降解能力及胞外产物中褐藻酸酶特性的初步分析。结果表明, 2 株褐藻酸降解菌中, 菌株 A2 表现出较强的对褐藻酸钠的降解能力; 同时菌株 A2 所分泌的褐藻酸酶在 pH 6.0~8.0 相对稳定, 30℃ 以下酶不易失活。在较低离子浓度时, Mn^{2+} , Ba^{2+} 对反应有较强的促进作用, Ag^{+} 和 Pb^{2+} 则有明显的抑制作用。

关键词: 褐藻酸降解菌; 褐藻酸酶特性; 海带 (*Laminaria japonica*)

中图分类号: Q945.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)02-0030-04

褐藻酸是褐藻细胞壁的主要组成成分, 它是由 α 1, 4-L-古罗糖醛酸(G) 和 β 1, 4-D-甘露糖醛酸(M) 为单体构成的嵌段共聚物。一些研究表明, 褐藻酸酶具有降解褐藻酸的能力, 引起细胞壁的破坏和藻体中单细胞及原生质体的分离, 这是大型经济海藻(如海带) 病烂发生的原因之一^[1,2]。本实验从病烂海带上分离到褐藻酸降解菌, 并对其胞外产物中褐藻酸酶的特性进行了研究, 以期阐明褐藻酸降解菌引起海带病烂发生的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株的选择

选用本实验室 2000 年 10 月从病烂海带 (*Laminaria japonica*) 幼苗上分离到的 2 株具高褐藻酸酶活性的菌株, 二者均为革兰氏阴性, 杆状, 细胞大小为 $0.6 \sim 0.7 \mu m \times 1.5 \sim 2.4 \mu m$ 。按《一般细菌常用鉴定方法》^[3] 将其定为别单胞菌属 (*A. lteromonas*), 分别简称为 A1 和 A2。

1.2 生长基础培养基

$(NH_4)_2SO_4$ 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, K_2HPO_4 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, NaCl 25 g, 褐藻酸钠 5 g, 1% 海带浸出液(1 g 干海带于 100 mL 自来水中煮沸 10 min, 上清液即海带浸出液) 2 mL, 自来水 1 000 mL, pH 7.4。

1.3 降解能力测定

取保存的菌株分别接种到褐藻酸钠液体培养基中, 接种的初始密度均为 3×10^6 个/mL, 通过培养, 根据变成澄清时间的长短来判断它们的降解能力。

1.4 褐藻酸酶制备

接一环菌种 A2 于装有 20 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 20℃ 恒温培养 24 h。然后按体积分数 2% 的接种量接入装有 300 mL 培养基的 1 000 mL 三角瓶中, 于 20℃ 培养, 并定期振摇, 72 h 后, 将培养物于 4℃, 4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 加入饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 溶液, 调至 75% 饱和度, 低温下盐析过夜。再于 4℃, 4 000 r/min 离心, 收集沉淀, 溶于磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2) 中, 用同一缓冲液透析。透析液即为褐藻酸酶粗提液。

1.5 褐藻酸酶活力测定方法

参照杨蕙萍等^[4] 的方法, 具体操作: 向试管中先后加入褐藻酸钠溶液 1 mL 和磷酸缓冲液 4 mL, 保温一段时间, 加入经一定稀释的粗酶提取液 1 mL, 再在 40℃ 下保温 30 min 后取出, 立即于沸水浴中煮沸 15 min 使酶失活, 冷却后取酶解液 1 mL, 加入 3, 5-二硝基水杨酸显色液 3 mL, 沸水浴中显色 15 min, 再稀释至 25 mL, 摇匀, 在 550 nm 波长下比色, 以蒸馏水校零点。空白管由 1 mL 煮沸的酶液代替粗酶提液, 其它同测试管。酶活力定义为在实验条件下, 每分钟催化底物产生 1 μg 还原物所需的酶量。

1.6 温度敏感性实验

将等量的菌株 A2 的酶液(1 mL) 分别放置于不

收稿日期: 2004-07-13; 修回日期: 2005-01-18

基金项目: 国家重点基础研究专项经费资助(G1999012004)

作者简介: 冯蕾(1965), 女, 副教授, 博士研究生, 从事海藻学研究, 电话: 0532-2031640; E-mail: leifeng0601@163.com

同的温度下保温 10 min, 然后进行酶活力的测定。

1.7 pH 敏感性实验

参照 Sawabe^[5] 等的方法, 将 0.1 mL 菌株 A2 酶液加入到 0.9 mL 不同 pH 值的缓冲液中, 混合液置于 4℃ 冰箱中, 6 h 后进行酶活力分析。维持 pH 值所使用的缓冲液系统为: 醋酸缓冲液(pH 4.0~ 5.5)、磷酸缓冲液(pH 6.0~ 7.0) 和 Tris HCl 缓冲液(pH 7.5~ 9.0)。

1.8 金属离子的抑制和促进作用

选用 Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{+} , Pb^{2+} , Co^{2+} 和 Fe^{3+} , 分别配成 0.1, 1.0 和 5.0 mmol/L 溶液, 取 0.5 mL 的金属离子溶液混合于 0.5 mL 菌株 A2 的酶液中进行酶活力的测定。

表 1 2 株细菌胞外产物的酶活性、比活性和蛋白质含量

Tab. 1 Enzyme activities, specific activities and protein contents of two isolated strains

菌株	蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	酶活性(U/mL)	比活性($\text{U}/\mu\text{g}$)
A1	39.80	11.10	0.27
A2	36.00	13.00	0.36

2.3 褐藻酸降解菌降解能力分析

表 2 显示, 在褐藻酸降解菌接种密度等量的情况下, 菌株 A2 组液体培养基最早出现透明的时间为

表 2 2 株褐藻酸降解菌的降解能力

Tab. 2 The decomposing abilities of two strains of alginic acid degrading bacteria

菌株	A1	A2
观察结果	液体表面无菌膜, 液体明显分层, 上层似雾, 浑浊, 下层浅浊, 培养 6 d 后, 液体转为黄色	液体表面无菌膜, 上部呈雾状, 液体澄清, 培养 4 d 后, 液体转为黄色
最早透明时间(d)	3	1
降解能力	弱	强

2.4 温度对酶稳定性的影响

从图 1 可以看出, 在 30℃ 以下, 褐藻酸酶能够保持较高的酶活力, 酶活力的下降幅度不明显, 表现出较高的温度稳定性。30℃ 以上, 随着温度的升高, 酶活力急剧降低。40℃ 时残余酶活力仅为 40.79%。

2.5 pH 值对酶稳定性的影响

从图 2 可以看出, 在 pH 6.5~ 8.0 的范围内褐藻酸酶相对稳定, 在此范围内, 4℃ 下放置 6 h 后的剩余酶活力可保持原来的 70% 以上。

1.9 蛋白质含量测定

采用考马斯亮兰法^[6] 测定。

2 结果

2.1 2 株菌株分泌物中蛋白质含量的差异

2 株细菌胞外产物的蛋白质含量有所不同, 在等体积的条件下, 菌株 A1 的胞外产物中蛋白质的含量 ($39.80\mu\text{g}/\text{mL}$) 高于 A2 ($36\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.2 2 株菌的褐藻酸降解酶活性差异

2 株菌株的褐藻酸降解酶的活性也存有差异性, 如表 1 所示, 褐藻酸降解酶的活性为 A2 ($14.00\text{U}/\text{mL}$) > A1 ($11.10\text{U}/\text{mL}$)。

1 d, 而 A1 组最早出现透明的时间是 3 d, 因此, 菌株 A2 降解褐藻酸钠的能力明显高于菌株 A1。

2.6 金属离子对酶活力的影响

实验对 10 种不同金属离子对褐藻酸酶活力的影响进行了研究, 将处理组与空白对照组进行差异显著性分析, 结果表明(图 3), 当 $\alpha=0.05$ 时, 在 1 mmol/L 浓度范围内, Ca^{2+} , Mg^{2+} 对酶活力有促进作用, Mn^{2+} , Ba^{2+} 对酶活力有较强的促进作用, 在高浓度 5 mmol/L 时, 促进作用不明显, 甚至有抑制作用。 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} 对酶活力有抑制作用, 但不明显。 Ag^{+} 和 Pb^{2+} 在较低浓度时对酶活力却有较强的抑制作用。

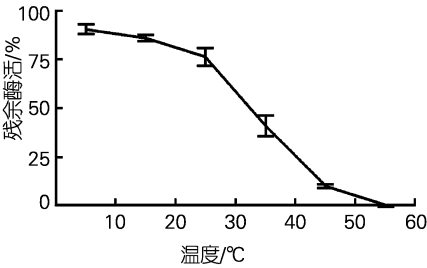


图 1 温度对酶稳定性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the stability of alginate

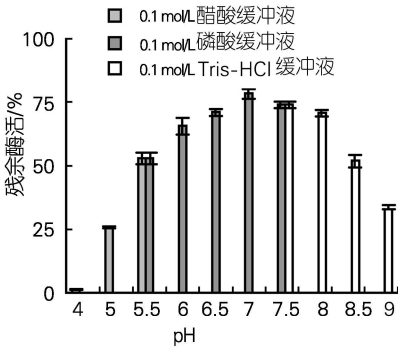


图 2 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the stability of alginate

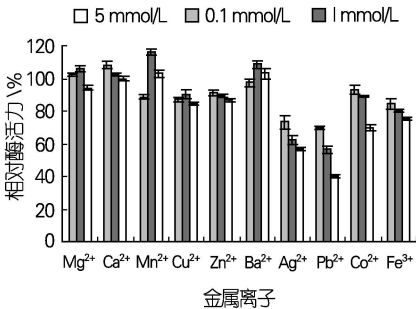


图 3 金属离子对酶活力的影响

Fig.3 Effect of metal ions on alginate activity

3 讨论

海带是人们喜欢食用的海藻,富含褐藻胶,褐藻酸降解菌胞外产物中的褐藻酸酶能够通过 β -消去反应裂解褐藻酸的糖苷键,产生含有不饱和和双键的寡聚糖醛酸,导致藻体细胞原生质体的分离。陈马马等^[7]在对海带病烂的研究中,利用酶粉点种已被灭菌处理过的海带片,发现被点种部位明显软腐、溃烂,

表明褐藻酸酶的酶解作用是海带病烂的根本原因。作者的研究结果表明,2株菌所产胞外酶具有不同程度的降解褐藻酸钠的能力,降解能力与胞外产物中各酶的酶活性和比活性密切相关。而且菌株A2所产酶的活性和比活性均高于菌株A1,这与2株菌降解褐藻酸钠的能力和引起液体培养基澄清的先后顺序一致。因此褐藻酸降解菌所产褐藻酸酶不仅是海带病烂的原因,而且不同的菌株致病性也有差异。另一方面,筛选出降解能力较强的菌株,制备高活性的褐藻酸酶用作解壁酶,在海藻体细胞育种方面也具有一定的意义。

褐藻酸酶的取得可以有多种途径,不同来源的褐藻酸酶对褐藻酸的酶解方式和性质也不相同^[8,9]。本试验从褐藻酸降解菌的胞外产物中获得了酶的粗提物,并对其性质进行了初步的研究,结果表明,在30℃以下酶不易失活,pH稳定范围6.0~8.0,在磷酸缓冲液中稳定。且随着磷酸缓冲液浓度的升高,酶的稳定性加强,这与Muramatsu等^[10]的研究结果一致。离子浓度对酶活性的影响试验结果表明,在较低离子浓度时, Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 对反应有显著的促进作用,离子浓度较高时作用不明显, Ag^{+} 和 Pb^{2+} 浓度为0.1 mmol/L时对酶活力就有较强的抑制作用。这与Sawabe等^[5]的研究结果相同。吴永沛等^[11]和韩宝芹等^[12]的研究结果表明,金属离子对褐藻酸酶活力具有抑制作用,而且随着金属离子浓度的提高,其抑制作用更加明显,但低浓度的金属离子会对褐藻酸酶具有微弱的激活作用。而杨惠萍等^[4]的研究结果表明,在0.1 mol/L的浓度条件下, Zn^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} , Li^{2+} 和 Ba^{2+} 对皱纹盘鲍的褐藻酸酶的活性有显著的抑制作用,但是 Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 却没有作用,这可能与所选用离子浓度高低和褐藻酸酶的来源等条件不同有关,其机理还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈马,林光恒,沈世泽.褐藻酸降解菌的研究II.海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J].海洋与湖沼,1981,12(2):133-137.

[2] Ando Y, Inoue K. Decomposing of alginic acid by microorganisms V. on the alginase of *Vibrio* sp. SO-20 strain [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1961, 27: 342-347.

[3] Holt J G, Krieg N R, Sneath P A, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 9th(Edn.). 1994. 39.

- [4] 杨蕙萍, 董圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报, 1998, **22**(4) : 345-351.
- [5] Sawabe T, Yoshio E, Takahisa K. Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, **58**(3) : 521-527.
- [6] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1991.
- [7] 陈马, 林光恒, 沈世泽. 褐藻酸降解菌的研究 I . 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用[J]. 海洋与湖沼, 1979, **10**(4) : 329-333.
- [8] Chao Huang Tseng, Kuniko Y, Manabu K. Isolation and properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AI-128 [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, **58**(3) : 533-538.
- [9] Madgwick J, Haug A, Larsen B. Alginate lyase in brown alga *Laminaria digitata* (Huds) Lamour [J]. *Acta Chem Scand*, 1973, **27**: 711-712.
- [10] Tsuyoshi M, Shigenori H, Makiko K. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus* [J]. *Agric Biol Chem*, 1977, **41**(10) : 1939-1946.
- [11] 吴永沛, 蔡慧农. 金属离子和 pH 值对九孔鲍几种消化酶活力的影响 [J]. 海洋科学, 2003, **27**(5) : 66-69.
- [12] 韩宝芹, 戴继勋. 海藻工具酶研究: II. 褐藻酸酶的制备、性质及对裙带菜细胞的解离研究[J]. 海洋学报. 1998, **20**(2) : 90-95.

Preliminary studies on the properties of alginic acid decomposing enzymes

FENG Lei, TANG Xuexi, WANG Yarrling, YANG Zhen

(Marine Life College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jul., 13, 2004

Key words: alginic acid degrading bacteria; properties of alginate; *Laminaria japonica*

Abstract: The degrading abilities of strain A1 and strain A2, two strains of alginic acid decomposing bacteria which were isolated from decaying pieces of kelp (*Laminaria japonica*) and were identified as *Alteromonas*, were investigated. In addition, the properties of alginase produced by the strain A2 were examined. The results showed that the strain A2 expressed higher alginate degrading ability than the strain A1 and the enzymes from A2 were relatively stable at pH 6.0~8.0 below the temperature of 30℃. Moreover, the activity of alginate was improved by Mn^{2+} and Ba^{2+} but inhibited significantly by Ag^{+} and Pb^{2+} when the concentrations of ions were below 1 mmol/L.

(本文编辑: 张培新)