

# 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

韩宝芹 刘万顺 戴继勋 王海

(青岛海洋大学 266003)

**提要** 褐藻酸降解菌埃氏交替单胞菌(*A. lteromonas espejiana*)菌株 A102 发酵培养时褐藻酸酶形成条件研究表明,其产酶的培养基最适褐藻酸钠含量为 0.3~0.6%,氮源为 0.5%的蛋白胨, pH 7.5,装量是在 500m l 三角瓶中装培养基 200m l。培养温度为 25℃,培养时间为 144h。利用该菌株进行发酵培养,制备褐藻酸酶。制备出的褐藻酸酶作用于海带和裙带菜,可使海带和裙带菜细胞游离产生大量的单细胞和原生质体。

**关键词** 褐藻酸降解菌,埃氏交替单胞菌,褐藻酸酶,海带,裙带菜,原生质体

海藻遗传工程研究起步较晚,发展也较缓慢。在海藻中不易获得有活性的单细胞和原生质体是阻碍海藻遗传工程研究的重要原因之一。海藻细胞壁与高等植物细胞壁的化学成分存在明显区别,海藻细胞壁具有多种海藻多糖,同时,红藻、褐藻与绿藻之间细胞壁成分又存在明显差别。因此,用于高等植物的细胞解壁酶对于海藻细胞分离往往难以奏效。因此要进一步发展海藻遗传工程,迫切需要解决海藻解壁酶问题。

目前用于海藻细胞的解壁酶类,主要是从海产动物如鲍鱼<sup>[2,4]</sup>、海螺<sup>[3]</sup>、海兔<sup>[1]</sup>和海胆<sup>[5]</sup>等的消化腺中提取的复合酶。但也有作者利用海藻病烂处的细菌,如弧菌(*Vibrio sp.*)<sup>[6]</sup>、产气单胞菌(*Aeromonas sp.*)<sup>[6]</sup>和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)<sup>[7]</sup>等产生的胞外酶,进行海藻细胞和原生质体分离。本文将报道由海带、裙带菜病烂处分离得到的褐藻酸降解菌埃氏交替单胞菌(*A. lteromonas espejiana*)菌株 A102 的发酵培养以及褐藻酸酶对海带、裙带菜细胞的解离作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

由烂梢的海带、裙带菜中分离得到的埃氏交替单胞菌菌株 A102,该菌株具有褐藻酸酶

活性。

### 1.2 发酵培养基

蛋白胨 0.5%,酵母提取物 0.1%,褐藻酸钠 0.5%, NaCl 3%,蒸馏水, pH 7.5。

### 1.3 液体菌种培养

接一环菌种于 20m l 发酵培养液中, 23℃ 摇瓶培养 12h。

### 1.4 产酶的发酵培养试验

1.4.1 产酶的发酵培养条件 每一试验组均在 100m l 三角瓶中装入 30m l 发酵培养基,并按 2% 接种量接入液体菌种,于 25℃ 下恒温培养 144h,测定发酵液的酶活力及生物量。

1.4.2 褐藻酸酶活力测定方法 3,5-二硝基水杨酸法测酶活力,利用比色法测定酶解后还原物的生成量,以表示酶的活力。酶活力单位定义为在实验条件下,每分钟催化底物产生 1 $\mu$ g 还原物所需的酶量。比活力定义为每毫升发酵液含酶活单位(u/ml)。

1.4.3 细菌生长测定 光电比浊法。

### 1.5 褐藻酸酶的制备

将液体菌种按 2% 的接种量接种到装有 1 000m l 发酵液的 3 000m l 三角瓶中, 25℃ 恒温培养 144h。将培养物于 4℃, 5 000r/min 离心

收稿日期:1996年4月18日

30min, 上清液加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 75% 饱和度, 低温下盐析过夜。再于  $4^\circ\text{C}$ ,  $5000\text{r/min}$  离

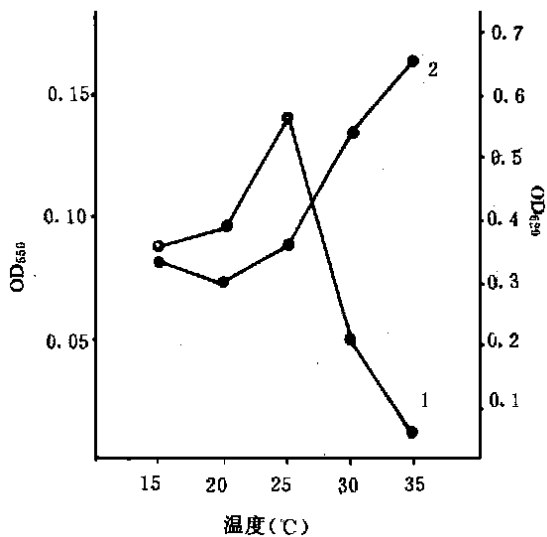


图1 培养温度对产酶的影响  
1. 酶活力 2. 生物量  
(图 2, 3, 4, 5 同)

Fig. 1 Effect of culture temperature on enzyme formation

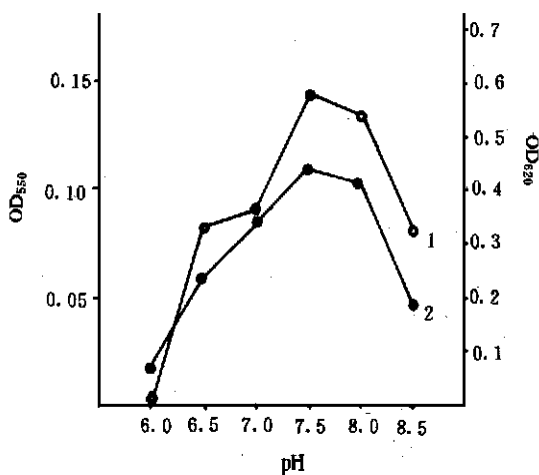


图2 培养基起始 pH 对产酶的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on enzyme formation  
心 30min, 得沉淀, 并进行透析。透析物置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中冷冻后, 进行冷冻干燥, 得酶制剂。

## 1.6 海带、裙带菜细胞的解离

1.6.1 酶解方法 取新鲜幼嫩的海带、裙带菜, 在煮沸消毒的海水中漂洗 2~3 次。继而将干净的海带、裙带菜剪成约  $5\text{mm} \times 5\text{mm}$  的小块, 分别取 0.5g 置于事先准备好的 10ml 酶液中。酶解于  $25^\circ\text{C}$  下进行, 定时取样检查酶解情况。

1.6.2 单细胞和原生质体产率统计 用血球计数板统计酶解总细胞数和游离的单细胞和原生质体数, 单细胞和原生质体产率为酶解物中单细胞和原生质体总数占酶解总细胞数的百分比。

## 2 结果

### 2.1 埃氏交替单胞菌菌株 A102 发酵培养时褐藻酸酶形成条件研究

2.1.1 培养温度对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 实验研究了不同培养温度对褐藻酸酶形成的影响(图 1)。结果表明, 产酶的最适温度为  $25^\circ\text{C}$ , 温度高于  $25^\circ\text{C}$  后, 酶活力急剧下降。

2.1.2 培养基的起始 pH 对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 实验研究了不同的培养基起始 pH 值对菌株产酶的影响(图 2)。结果表明, 产酶的最适 pH 为 7.5~8.0, pH 超过 8.0 时, 酶活力明显下降。

2.1.3 培养基装量对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 在 500ml 的三角瓶中, 分别装入 pH 7.5 的发酵培养基 50ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 试验不同的培养基装量对褐藻酸酶形成的影响(图 3)。结果表明, 培养基的最适装量为 500ml 三角瓶装培养基 200ml, 超过此装量时, 酶活力出现下降趋势。

表 1 氮源对产酶的影响

Tab. 1 Effect of various nitrogen sources on enzyme formation

氮源	蛋白胨	牛肉膏	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NaNO}_3$
酶活力(OD <sub>550</sub> )	0.096	0.071	0.096	0
生物量(OD <sub>620</sub> )	0.315	0.410	0.215	0.218

注: 培养基含氮量均为 0.047%; 本试验发酵培养时间为 120h。

2.1.4 不同氮源对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 实验研究了不同氮源对褐藻酸酶形成的影响(表 1)。结果表明,培养基最适氮源为蛋白胨和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 此时酶活性最高。

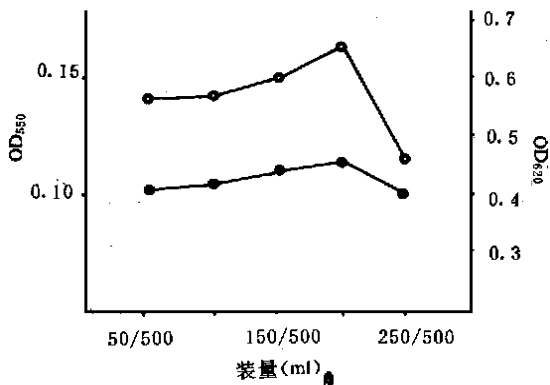


图 3 培养基装量对产酶的影响

Fig. 3 Effect of medium volume on enzyme formation

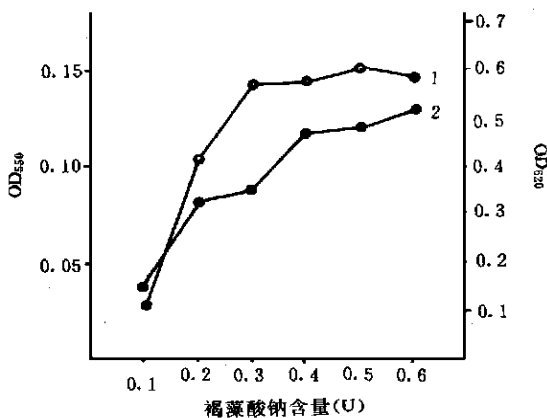


图 4 褐藻酸钠含量对产酶的影响

Fig. 4 Effect of alginate-Na concentration on enzyme formation

表 2 不同碳源对产酶的影响

Tab. 2 Effect of various carbon sources on enzyme formation

碳源	褐藻酸钠	葡萄糖
酶活力( $\text{OH}_{550}$ )	0.145	0
生物量( $\text{OD}_{620}$ )	0.44	0.65

2.1.5 不同碳源对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 实验研究了不同碳源对褐藻酸酶形成的影响(表 2)。结果表明,只有在培养基中加入褐藻酸钠时,才有褐藻酸酶形成。以葡萄糖为碳源时,没有褐藻酸酶形成。说明酶的形成是诱导型的。

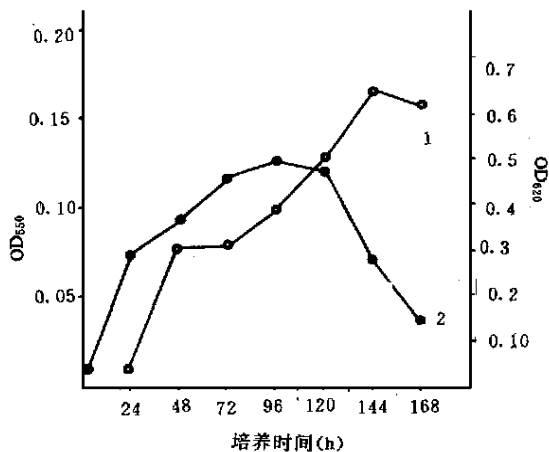


图 5 培养时间对产酶的影响

Fig. 5 The time course of enzyme formation



图 6 裙带菜单细胞和原生质体( $\times 132$ )

Fig. 6 Separated cells and protoplasts of *Undaria pinnatifida*

2.1.6 褐藻酸钠含量对菌株 A102 褐藻酸酶形成的影响 实验研究了不同褐藻酸钠含量对菌株产酶的影响(图 4)。结果表明,产酶的最适褐藻酸钠用量为 0.3% ~ 0.6%。

2.1.7 培养时间对菌株 A102 褐藻酸酶

形成的影响。在 500ml 三角瓶中装入发酵培养基 200ml, 按 2% 接种量接入液体菌种, 进行发酵培养, 不同培养时间取样测发酵液的酶活力及生物量(图 5)。结果表明, 酶活力随培养时间的增加而增加, 在 144h 达到最大值。

## 2.2 褐藻酸酶对海带、裙带菜细胞的解离作用

实验分别研究了不同酶对海带、裙带菜细胞的解离作用。结果表明, 纤维素酶对海带和裙带菜细胞没有解离作用, 褐藻酸酶使海带和裙带菜藻体软化明显, 胞间质松弛, 对酶解产物轻轻摇动, 则形成大量单细胞和原生质体(图 6)。海螺酶对裙带菜的酶解效果不如褐藻酸酶的酶解效果。当 1% 的褐藻酸酶与 1% 的纤维素酶混合使用, 裙带菜的酶解产物中单细胞和原生质体产率达 70%, 海带的酶解产物中单细胞和原生质体产率达 60%。

## 3 讨论

影响埃氏交替单胞菌褐藻酸酶形成的因素很多, 我们只对其中主要的因素进行了试验, 而且是按单因子试验进行的, 没有考虑多因子之间的相互作用, 包括最佳 C/N 在内的影响, 优化试验有待于进一步进行。

褐藻细胞壁的组成成分很复杂, 含有褐藻胶及多种多糖。我们研究了几种酶对海带和裙

带菜细胞的解离作用, 结果只有褐藻酸酶效果最好, 这暗示了海带和裙带菜原生质体游离的最大障碍是褐藻胶的存在。在酶解过程中发现, 取材对原生质体游离效果影响较大, 新鲜幼嫩的材料原生质体游离效果较好, 较老的材料效果不好。这可能与海带和裙带菜生长期间藻胶含量及质量等变化有关。褐藻酸酶的酶解底物为褐藻胶, 褐藻胶又是各种褐藻普遍含有的一种胞间质成分, 因而褐藻酸酶的研究可能为褐藻原生质体游离研究带来较大希望, 具体工作有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Bernard Kloareg and Ralph S. Quatrano, 1987. *Plant Science*. 50: 189-194.
- [2] Kuniko Yamaguchi, Toshiyoshi Arai and Takahiko Aoki *et al.*, 1989. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(1): 105-110.
- [3] Liu Wanshun *et al.*, 1984. *Hydrobiologia* 319-320.
- [4] Polne, M. *et al.*, 1984. *Hydrobiologia* 308-313.
- [5] Saga, N. and Sakai, Y., 1984. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50(6): 1085.
- [6] Toshiyoshi Arai and Tatsuo Morishita, 1990. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(7): 1161.
- [7] Yuji Fujita and Seiji Migita, 1987. *Jap. J. Phycol.* 35: 201-208.

# CULTURE CONDITIONS OF ALGINATE-DEGRADING BACTERIA AND THE SEPARATION OF CELLS OF BROWN ALGAE BY ALGINASE

Han Baoqin, Dai Jixun and Wang Hai  
(Ocean University of Qingdao 266003)

Received: Oct. 24, 1995

Key Words: *Alteromonas espejiana*, Alginate, *Laminaria*, *Undaria*, Protoplast

## Abstract

The strain A102 of *Alteromonas espejiana* is alginate-degrading bacteria. The conditions for

alginate production were examined. The optimal conditions for alginate production are as follows: medium consisting of 0.3-0.6% sodium alginate as carbon source and 0.5% peptone as nitrogen source, pH 7.5, with 200ml fermentation medium in 500ml flask, 25°C, incubation 114h. Alginate was prepared by fermenting strain A102. A large number of separated cells and protoplasts were obtained when alginate acted on *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica*.