

# 褐藻酸降解菌的产酶条件研究\*

王艳玲 唐学玺 杨 震

(青岛海洋大学生命学院 青岛 266003)

**提要** 以海带病烂处分离到的单胞菌属 (*Alteomonas*) 的褐藻酸降解菌菌株 AI 为研究对象, 对该菌的产酶条件进行了研究。结果表明, 产酶的最适温度 20℃, 褐藻酸钠浓度 (质量分数) 0.5% ~ 0.6%, pH 7.5, 盐度 15, 氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 培养时间 72 h。

**关键词** 褐藻酸降解菌, 褐藻酸酶, 产酶条件

**中图分类号** Q945.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0052-04

海带 (*Laminaria japonica*) 是我国海洋水产资源的重要组成部分, 总产量居世界第一。但是海带病烂, 尤其在苗期, 绿烂病、白烂病以及脱苗掉苗现象等时有发生, 造成了重大经济损失<sup>[1,2]</sup>。海带属于褐藻类, 它富含褐藻胶。褐藻胶是由  $\alpha$ -1, 4-L 古罗糖醛酸 (G) 和  $\beta$ -1, 4-D 甘露糖醛酸 (M) 为单体构成的嵌段共聚物<sup>[3]</sup>。褐藻酸酶能够酶解褐藻胶, 破坏藻体细胞壁,

导致原生质体的产生, 一方面这是大型经济海藻 (如海带) 病烂的原因, 另一方面也是开展海带细胞育苗

---

\* 国家重点基础研究专项经费 G1999012004 号。

第一作者: 王艳玲, 出生于 1971 年, 硕士研究生。研究方向: 海藻学。

收稿日期: 2002-01-22; 修回日期: 2002-07-18

的科学依据,因此找出导致这类细菌异常增殖的环境因子,并对其产酶条件进行研究,对了解海带病烂的发生与防治以及推动海带体细胞育苗技术的发展都很有意义<sup>[4]</sup>。本研究主要从病烂藻体上分离到该病致病菌,并对其产酶的培养温度、培养时间、pH、底物浓度等进行了初步研究,旨在为海带病害的防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

2000年10月,从烟台海带养殖场采集自然发病的海带幼苗,长约5 cm,利用褐藻酸钠选择性培养基,从藻体病烂处分离纯化得到单胞菌属(*Alteomonas*)的褐藻酸降解菌菌株 Al, 该菌具有很强的降解褐藻酸钠能力,菌落大而圆,乳色,菌落周围有明显的透明区和晕圈。

### 1.2 培养基组分

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, NaCl 25 g, 褐藻酸钠 5 g, 海带浸出液(质量分数为1%) 2 mL, 自来水 1 000 mL, pH 7.4。

### 1.3 液体菌种培养

接一环菌种于装有 20 mL 液体培养基(已灭菌)的 100 mL 三角瓶中,20℃下培养 24 h。

### 1.4 产酶的液体培养试验

1.4.1 产酶的液体培养条件 每一试验组(重复3次以上)均在100 mL三角瓶中装入30 mL已灭菌的液体培养基,按2%(体积分数)的接种量接入液体菌种,20℃下培养,定期摇晃,72 h后,收集培养液,于4 000 r/min离心30 min,得上清液(即粗酶液),测定上清液的酶活力。

1.4.2 褐藻酸酶活力测定方法 参照纤维素酶的测定方法<sup>[5]</sup>,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,常温下保温10 min,加入粗酶提液1 mL,40℃下保温,30 min后取出,立即于沸水浴中煮沸15 min使酶失活,冷却后取糖化液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煮沸灭活的酶液代替粗酶提液,其它同试验管。酶活力定义为在试验条件下,每分钟催化底物产生1 μg还原物所需的酶量。

## 2 实验结果

### 2.1 培养条件对菌体产酶的影响

2.1.1 培养温度 试验研究了不同温度对褐藻酸降解菌产酶的影响(图1)。结果表明,该菌的最适产酶温度为20℃左右,在该温下菌体具有最强的产酶能力,产酶量达到最大值6.54 U/mL。20℃之后产酶量开始下降,25℃时产酶能力已下降一半。菌株在15℃的产酶量高于25℃,说明低温时该菌同样具有很强的致病力。

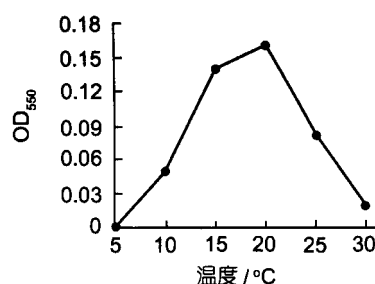


图1 温度对菌体产酶的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzyme formation

2.1.2 培养基初始 pH 实验研究了不同的培养基起始 pH 值对菌体产酶的影响(图2)。结果表明,在 pH 7.0~8.0 的范围内菌种均可以良好地产酶,菌体具有较高的产酶力,产酶的最适 pH 值为 7.5。

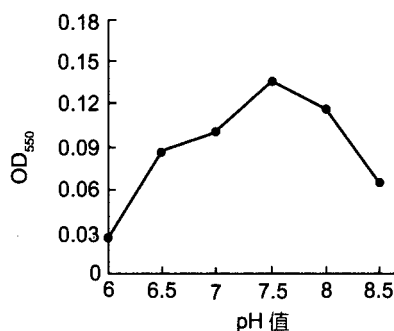


图2 培养基初始 pH 对菌体产酶的影响

Fig.2 Effect of initial pH on enzyme formation

2.1.3 初始培养基褐藻酸钠浓度 实验研究了不同培养基初始褐藻酸钠浓度对菌体产酶的影响(图3)。结果表明,随着培养基中褐藻酸钠浓度的升高,菌体产酶能力增强,褐藻酸钠浓度(质量分数)在0.5%~0.6%的范围内酶活力趋于稳定,并接近最大。

2.1.4 时间 实验研究了菌体产酶量随时间的

变化过程(图4),结果表明在细菌生长的稳定期,即培养72 h时,细菌的产酶量达最大,然后随着时间的延长而逐渐降低。

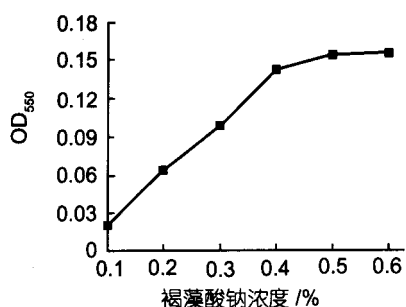


图3 培养基褐藻酸钠浓度对菌体产酶的影响

Fig.3 Effect of sodium alginate concentration on enzyme formation

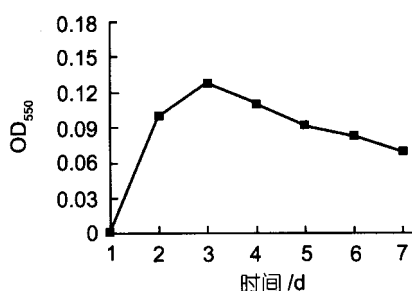


图4 时间对菌体产酶的影响

Fig.4 Time course of enzyme formation

2.1.5 初始培养基 NaCl 浓度 实验研究了初始培养基 NaCl 浓度对菌体生长的影响,结果表明(图5),在没有添加 NaCl 的培养基中菌体没有生长,检测不到褐藻酸酶活力,该菌产酶的最适 NaCl 浓度(质量分数)为 1.5%左右。

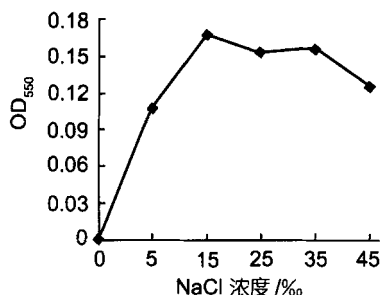


图5 初始培养基 NaCl 浓度对菌体产酶的影响

Fig.5 Effect of initial concentration of NaCl on enzyme formation

2.1.6 不同氮源 实验研究了不同氮源对菌体产酶的影响。在质量分数为 0.5%褐藻酸钠的生长基础培养基中,添加质量分数均为 0.5%的不同含氮化合物。结果为菌体生长的最适氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,此时产酶量最高,尿素对菌体生长有抑制作用,不利于产酶。不同氮源的产酶量分别为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.21 U/mL,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  4.56 U/mL, 蛋白胨 3.21 U/mL, 牛肉膏 2.54 U/mL,  $\text{NaNO}_2$  2.46 U/mL, 尿素 1.63 U/mL。

2.1.7 不同碳源 实验研究了不同碳源对菌体产酶的影响。在含 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的生长基础培养基中,添加浓度均为 0.5%的不同含碳化合物。结果表明菌体只有在培养基中含有褐藻酸钠时才能正常生长,并具有产酶力。在葡萄糖和甘露醇中有较慢的生长,但不产生褐藻酸酶。在山梨醇、蔗糖和纤维素中没有生长。不同碳源的产酶量分别为褐藻酸钠 4.80 U/mL,葡萄糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖、纤维素均为零。

### 3 讨论

目前,褐藻酸降解菌和褐藻酸酶的研究颇受重视。陈明等 1981 年报道<sup>[6]</sup>,褐藻酸降解菌广泛地分布在近岸海域,尤其是海带养殖区内,它们是海带藻体上的主要定居者,能够产生褐藻酸酶,褐藻酸酶的酶解作用是导致海带病烂的重要因素。因此通过对褐藻酸降解菌产酶条件的研究,了解该菌大量产酶的环境因子,从根本上、有的放矢地对海带病害加以防治是非常必要的。另外褐藻酸酶还可用作海藻解壁酶<sup>[7]</sup>,分解海藻细胞及原生质体,以获得 DNA 和单细胞,推动海藻育苗技术的发展,因此优化细菌的培养条件,获得高产量的褐藻酸酶也有一定的意义。

本试验分离得到的别单胞菌属菌株,在适宜的条件下培养,其胞外产物具有很强的褐藻酸酶活力。通过对菌株产酶条件的研究发现,培养温度是重要的限制因子,直接影响着育苗系统中海带幼苗和褐藻酸降解菌的生长与繁殖。在 15~20℃范围内菌种具有较高的产酶活性,而超过和低于这个范围,产酶活性急剧降低。而海带是冷水性藻类,高温会影响其生长和抗病能力。曾呈奎等 1962<sup>[8]</sup> 年报道,一直培养在水温 20℃或以上条件下的海带配子体,始终不能发育、形成孢子体。丁美丽<sup>[9]</sup> 1990 年研究认为,培养于 6℃, 15℃, 20℃条件下的接菌海带,经 6 d,只有 20℃下的藻体部分变白腐烂。在没有添加  $\text{Na}^+$  的培养基中褐藻酸降解菌不能生长,检测不到酶活性,可以看出 NaCl 是该菌生长和产酶的必需因子。安藤芳明等<sup>[10]</sup> 1961 年的研究表明当培养基中 NaCl 浓度为 1%时最有利于褐藻酸降解菌产酶,之后随着 NaCl 浓度的升

高,菌体产酶量下降。但 Sawabe 等<sup>[11]</sup> 1992 年的研究认为高浓度的 NaCl 是褐藻酸酶具有活性的重要因素,随着培养基中盐度的升高,菌体产酶能力逐渐增强。本实验在实验的 NaCl 浓度范围内,最适浓度为 1.5%,由此可见,不同的菌株对盐度的要求有所差异,这也许与菌体来源有关。菌株 A1 只有在含有褐藻酸钠的培养基上才能生长,合成大量的褐藻酸酶,表明该菌株褐藻酸酶的形成是诱导型的。而 Kitamikado 等<sup>[12]</sup> 1989 年通过厌氧培养的方法,从海水中分离到在无褐藻酸钠的培养基中可以生长并产生胞外酶的菌株 A1-9,说明褐藻酸酶的取得可以有多种途径。不同的菌株大量产酶的时间各不相同<sup>[13]</sup>,本次分离到的菌株 A1 在生长 72 h 后,菌量最大,胞外产物最多,产酶能力最强。其次该菌产酶的最适氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,尿素对其产酶有抑制作用,同时 pH 对菌体产酶影响不大。

#### 参考文献

- 1 周丽,宫庆礼,俞开康,等.海带的病害.海洋湖沼通报,1996(4):38-43
- 2 曾呈奎,王素娟,刘思俭.海藻栽培学.上海:上海科学技术出版社,1985.82-96
- 3 Sawabe T, Ohtsuka M, Ezura Y. Application of an alginate lyase from *Alteromonas* sp. for isolation of protoplasts from a brown algae *Laminaria japonica*. Carbohydrate Research, 1997 (304):69-76
- 4 马凌波,王素娟.细菌酶解条斑紫菜体细胞及室内人工育苗法的研究.水产学报,1998(22):24-30
- 5 中山大学生物系生化微生物教研室编.生化技术导论.北京:人民教育出版社,1978.61-62
- 6 陈明,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.海洋与湖沼,1981,12(2):133-137
- 7 韩宝芹,戴继勋,刘万顺,等.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.海洋学报,1998,20(3):90-95
- 8 曾呈奎,吴超元,任国忠.温度对海带配子体生长发育的影响.海洋与湖沼,1962,4(1-2):22-28
- 9 丁美丽.环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响研究.海洋学报,1990,12(2):224-229
- 10 Ando Y, Inoue K. Decomposing of alginic acid by microorganisms. IV. On the Vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. Nippon Suisan Gakkaishi, 1961, 27(4):9-34
- 11 Sawabe T, Ezura Y, Kimura T. Characterization of an alginate lytic marine bacterium from decaying nishiri-kombu *Laminaria japonica* varochotensis. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1992, 58(1):141-145
- 12 Kitamikado M, Tseng C, Aoki T. Isolation of bacteria capable of producing alginate-degrading enzyme from natural environment. Nippon Suisan Gakkaishi, 1989, 55(4):709-713
- 13 韩宝芹,戴继勋,王海.海藻工具酶研究 I.褐藻酸降解菌的分离鉴定及其褐藻酸酶形成条件研究.海洋学报,1997,19(5):97-102

## STUDY ON CULTURE CONDITIONS FOR ALGINASE FORMATION BY ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA

WANG Yan-Ling TANG Xue-Xi YANG Zhen  
(College of Marine Life Science, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Received: Jan., 22, 2002

Key Words: Alginic acid decomposing bacteria, Alginase, Conditions of enzyme formation

### Abstract

An alginic acid decomposing bacterium A1 which could produce alginase was isolated from decaying thalli of *Laminaria japonica*. The productivity of extracellular alginase of the bacterium was examined under different conditions. The bacterium produced a maximum amount of alginase in liquid culture medium containing 0.5% ~ 0.6% sodium alginate, 1.5% NaCl and 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at pH 7.5 when it was incubated at 20 °C for 72 h. (本文编辑:刘珊珊)