

一株高效褐藻酸降解菌的筛选、鉴定及其发酵条件的优化

侯士昌¹, 温少红¹, 唐志红¹, 崔玉琳², 秦松²

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 以褐藻酸钠为唯一碳源, 从腐烂海带中筛选得到褐藻酸钠降解能力较强的菌株 H4, 经生理生化和 16S rDNA 序列分析鉴定该菌株属于交替单胞菌属(*Alteromonas*)。对菌株 H4 的发酵条件优化研究表明, H4 的较优培养基组成为(w/v): 褐藻酸钠 0.6%、酵母粉 0.5%、蛋白胨 0.25%、NaCl 3%; 较优培养条件为: 培养温度 28℃, 初始 pH7.5, 接种量 1.5%(v/v), 培养时间 48 h。Fe³⁺对交替单胞菌 H4 的产酶有明显的促进作用, 这在其他褐藻酸裂解酶生产菌株中未见报道, 而 Cu²⁺对褐藻酸裂解酶的抑制作用高达 45.78%。在优化后的培养条件下, 粗酶液酶活达到 146.45 U/mL, 较优化前提高了 39.4%。

关键词: 褐藻酸钠降解菌; 筛选; 鉴定; 酶活优化

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)07-0020-07

doi: 10.11759/hyhx20130722001

褐藻酸主要存在于褐藻的细胞壁和细胞间质, 是一种高聚合度的多糖类物质, 在褐藻中的含量 24%~31%, 由苏格兰化学家 Stanford 在研究大型藻类 *Ascophyllum* 时首次发现。褐藻酸大部分来源于 *Macrocystis*, *Laminaria* 和 *Ascophyllum* 3 个属^[1], 是由 -D-1,4-甘露糖醛酸(简称 M)和 α -L-1,4-古罗糖醛酸(简称 G)两种单体以 C-1,4 糖苷键非均聚形成的线性分子^[2]。近年来随着海洋活性物质的蓬勃发展, 褐藻酸的研究日益受到重视。

褐藻酸具有黏度高和稳定性好的特点, 常作为增稠剂、粘合剂和上浆剂等, 在食品、化工和纺织等领域广泛应用。但是随着分子生物学和医学的发展发现, 褐藻酸降解后得到的寡糖呈现出多种生物活性, 在医药、农业、化工等领域引起了世人的瞩目, 具有诱导角化细胞的增殖^[3]、抗肿瘤^[4]、治疗心血管^[5]等的作用, 还能够促进植物产生抗毒素、提高植物的抗冻能力^[6], 具有较大的开发价值和较为广阔的应用前景。

褐藻酸的降解方法主要包括化学法和生物酶解法, 目前工业普遍采用稀酸水解法, 此方法虽然简单易行, 但是降解速度慢、产量低、产物分子量分布广。相比较, 褐藻酸的酶解法主要是通过消除反应在非还原性末端 C4 和 C5 之间形成不饱和双键^[7], 具有条件温和, 速度快, 底物特异性高的优势。

海洋藻类、海洋软体动物和棘皮动物等体内都可以产生褐藻酸裂解酶, 微生物来源的褐藻酸裂解酶主要包括海洋细菌和真菌等^[8-9]。本实验是以筛选出一株高产褐藻酸裂解酶菌株 H4 为基础, 对其进行

生理生化和种属鉴定, 通过研究影响 H4 酶活的培养基组成和培养条件, 优化其发酵产酶过程, 以期褐藻酸寡糖的规模化生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

(1) 种子培养基: 酵母提取物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。

(2) 初筛培养基: (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, NaCl 30 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L, 褐藻酸钠 5 g/L, pH 7.5。

(3) 发酵培养基: 蛋白胨 5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 褐藻酸钠 5 g/L, NaCl 30 g/L, pH 7.5。

1.2 种子液的制备

以初筛培养基为活化培养基, 1%接种量, 28℃, 150 r/min 摇床 24 h 培养, 作为种子液。

1.3 菌种的分离与筛选

将采自烟台市月亮湾附近的腐烂海带样品在无菌条件下研磨, 并依次稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 的质量分数梯度, 涂布至初筛培养基上。28℃倒置培养 4 d。重复划线培养 4 次, 直到

收稿日期: 2013-12-08; 修回日期: 2014-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41176144); 海洋公益性行业科研经费资助专项(20120527); 山东省自然科学基金项目(JQ200914)

作者简介: 侯士昌(1988-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为微生物的代谢, 电话: 0535-2109077, E-mail: houshichang5@163.com; 秦松, 通信作者, E-mail: sqin@yic.ac.cn

获得纯的单菌落。挑选菌斑直径大、透明圈大的菌落(菌株 H2、H4、H5), 按 1% 的接种量将菌株的种子液接种于 20 mL 的发酵培养基中, 28℃, 150 r/min 摇瓶发酵培养, 每隔 12 h 取样一次, 在 620 nm 下进行发酵液相对生物量的测定和 540 nm 下酶活的测定。筛选出产褐藻酸裂解酶能力最高的菌株。

相对生物量定义为某一变量条件下测得的生物量与这一变量条件下测得的最佳生物量的比值。

1.4 褐藻酸裂解酶酶活的测定

由于褐藻酸钠具有热不稳定性, 对 DNS 法进行优化^[10]。取 1.0 mL 发酵上清液于 10 mL 恒量管中, 加入 1.0 mL 用 pH 7.0 的磷酸缓冲液配置的 0.75 % 褐藻酸钠溶液, 40℃ 水浴反应 20 min 后, 加入 1.5 mL DNS, 沸水浴反应 5 min, 迅速用流动水冷却, 定容, 在 540 nm 下测吸光度。

酶活的单位(U)定义为在实验条件下, 每分钟催化底物产生 1 μg 还原糖所需的酶量。发酵液酶活的单位定义为每毫升发酵液含酶活单位数(U/mL)。

发酵上清液的获取: 发酵液在 4℃ 下, 12000 r/min, 离心 10 min, 取发酵上清液。

1.5 菌株的鉴定

1.5.1 生理生化鉴定

将筛选得到的褐藻酸裂解酶酶活最高的菌株进行常规的生理生化鉴定^[10]。

1.5.2 16S rDNA 鉴定^[11]

利用通用引物^[12]对菌株进行 16S rDNA 基因序列的扩增。将克隆后的样品送至上海生工生物技术有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 序列比对, 确定种属。遵循邻接法和最大相似法原则, 应用 CLUSTAL、MEGA4.0 等软件进行聚类分析与同源性分析, 构建系统发育树。

1.6 菌株发酵条件的优化

在 50 mL 三角瓶中装入 20 mL 发酵培养基, 按 1.5%(v/v) 接种种子液, 于 28℃, 150 r/min 摇瓶培养 48 h 后测定褐藻酸裂解酶酶活。所有实验均设 3 个平行, 前一步优化结果用于后续实验。

2 结果与分析

2.1 最佳褐藻酸裂解酶菌株的确定及酶活的测定

试验开始以褐藻酸钠为唯一碳源, 根据菌斑和透

明圈的情况筛选得到褐藻酸钠降解能力比较大的 3 株菌 H2、H4、H5。通过对这 3 株菌进行相对生物量和酶活(图 1a 和图 1b)的测定可以看出, 3 株菌在 24 h 时处于对数生长期, 36 h 以后进入稳定期, 在 48h 左右相对生物量和酶活同时达到最大值。相比较来说, H2 的相对生物量能够在较短的时间内达到较大值, 但是 H4 具有最高的酶活, 因而以 H4 作为出发菌株优化相关的发酵条件, 并且 48 h 进行取样检测。

2.2 菌株 H4 的鉴定

2.2.1 生理生化鉴定

菌株 H4 生理生化特征鉴定实验的结果见表 1。

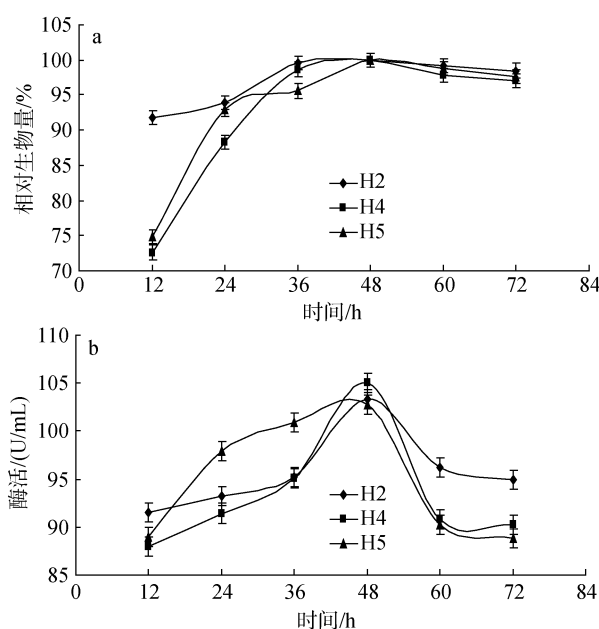


图 1 H2、H4 和 H5 菌株的相对生物量和酶活曲线

Fig.1 The growth and enzyme activity curves of H2、H4、H5 a. 3 株菌的相对生物量曲线; b. 3 株菌的酶活曲线
a. The growth curves of H2, H4 and H5; b. The enzyme activity curves of H2, H4 and H5

表 1 菌株 H4 的生理生化特征

Tab.1 The physiological and biochemical characters of strain H4

菌种生理生化鉴定项目	结果
革兰氏染色	G ⁻
M.R.	+
VP	-
柠檬酸盐利用	+
醋酸铅试验	+
葡萄糖利用	+
D-果糖利用	+
蔗糖利用	+

注: +表示阳性, -表示阴性

2.2.2 16S rDNA 鉴定

测序得到菌株 H4 的 16S rDNA 基因序列含有 1494 bp。经序列比对和相似性分析, 菌株 H4 与交替单胞菌属(*Alteromonas*)亲缘关系最近, 16S rDNA 序列相似性为 99%(图 2)。同时结合菌株的生理生化特性, 将其归类为交替单胞菌属(*Alteromonas*), 命名为交替单胞菌 H4(*Alteromonas* sp. H4)。

2.3 发酵条件的优化

2.3.1 接种量对菌株 H4 生长和产酶的影响

不同的接种量对菌株 H4 的生长和产酶都会有一定的影响, 结果见图 3。接种量对菌株的生长作

用不大, 但对褐藻酸裂解酶酶活影响比较大。从图中可以看出接种量为 0.5%~1.5%, 酶活随着接种量的增加而增大, 接种量超过 1.5% 后, 酶活明显下降。

2.3.2 温度对菌株 H4 生长和产酶的影响

温度对菌株 H4 生长和产酶的影响如图 4 所示, 菌株 H4 在 28℃ 左右产酶和相对生物量最高, 在 24~28℃ 时, 产酶活性和相对生物量随着温度的升高而增加。当温度达到 30℃ 以上时, 酶活和相对生物量下降较大。酶活对温度的耐受力较菌体要强, 在 36℃ 依然能够达到 100 U/mL 以上, 相对生物量几乎减少一半。

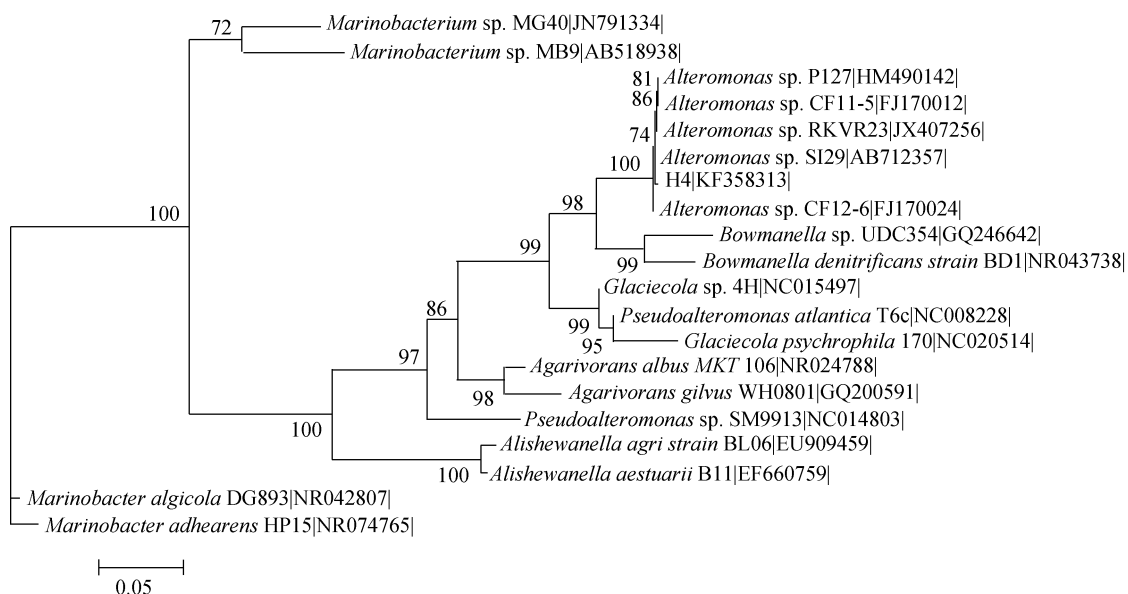


图 2 H4 和其他菌株基于 16S rDNA 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rDNA from H4 and other strains

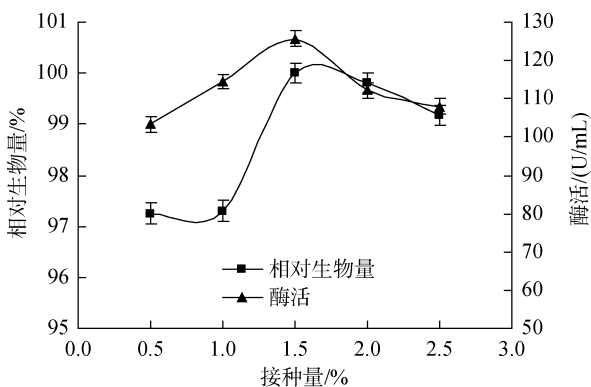


图 3 接种量对菌株 H4 生长和产酶的影响

Fig.3 Effects of inoculum concentration on biomass and enzyme production of strain H4

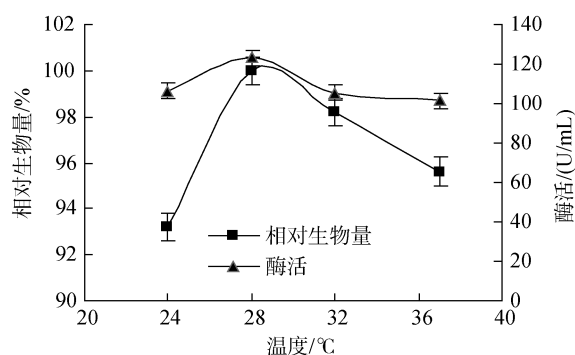


图 4 温度对菌株 H4 生长和产酶的影响

Fig.4 Effects of culture temperature on biomass and enzyme production of strain H4

2.3.3 培养基初始 pH 对菌株 H4 生长和产酶的影响

培养基的初始 pH 能够直接影响菌体的细胞膜的通透性, 稳定性以及代谢产物酶的活力, 并且还间接影响培养基中各成分的离子化程度, 从而影响菌体多营养物质的吸收^[10]。培养基初始 pH 菌株 H4 生长和产酶的影响如图 5 所示菌株 H4 稳定生长的 pH 为 7.0~8.0, 此时酶活较高, pH 在 7.5 时发酵液的酶活达到最大, 表明菌株在微碱环境中生长能力和产酶能力较强。

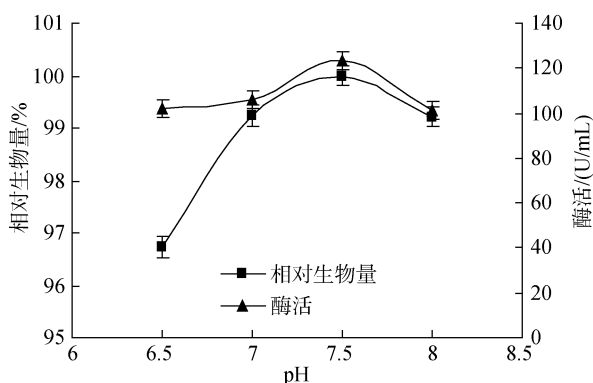


图 5 初始 pH 对 H4 的菌株 H4 生长和产酶的影响
Fig.5 Effects of initial pH on biomass and enzyme production of strain H4

2.3.4 NaCl 质量分数对菌株 H4 生长和产酶的影响

NaCl 浓度对菌株 H4 生长和产酶的影响见图 6, NaCl 对酶活的影响较大。在 NaCl 质量分数为 0 时, 虽然该菌株产褐藻酸裂解酶, 但酶活极低, 当加入 NaCl 之后酶活快速增高, 并在 NaCl 质量分数为 3% 时达到最高。可能的原因是 NaCl 可以去除褐藻酸钠

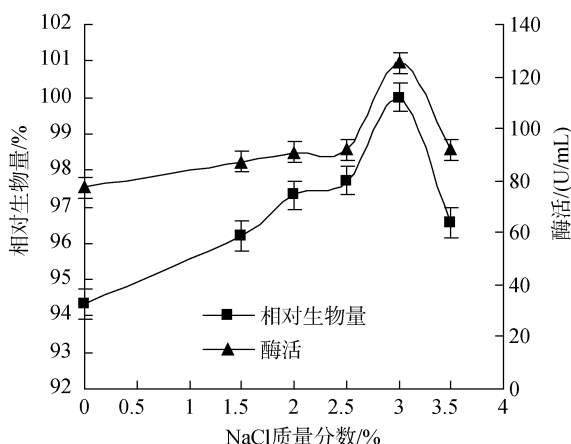


图 6 NaCl 质量分数对 H4 的菌株 H4 生长和产酶的影响
Fig.6 Effects of NaCl on biomass and enzyme production of strain H4

周围的水分子或是能够改变酶与底物结合时的电荷, 从而使酶与底物更好的结合, 形成更稳定的酶与底物复合物^[13]。NaCl 质量分数超过 3% 时, 菌株 H4 生长和产酶能力迅速下降, 可能的原因是 NaCl 的质量分数过高不利于此菌株的生长, 同时不利于产酶。

2.3.5 不同碳源对菌株 H4 生长和产酶的影响

碳源的主要功能包括为细胞内的大分子合成提供碳素骨架以及为细胞的新陈代谢提供能量。本实验主要研究了淀粉, 褐藻酸钠, 葡萄糖, 蔗糖分别作为碳源时, 在含碳量(0.15%)相同的情况下, 对菌株 H4 的生长和产酶的影响。结果如图 7 所示, 菌株 H4 对不同碳源均有不同程度的利用, 但只有在含褐藻酸钠的培养基中才能产生褐藻酸裂解酶, 而在其他碳源培养基中检测不到褐藻酸裂解酶活性。表明 H4 是诱导产酶型菌株, 褐藻酸钠是 H4 菌株产生褐藻酸裂解酶的诱导物, 褐藻酸裂解酶是诱导酶。据文献报道, 大多数褐藻酸裂解酶均属于诱导酶^[14]。

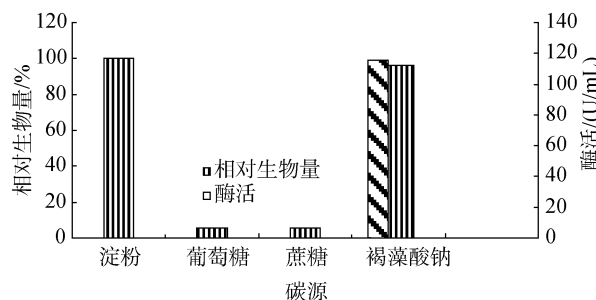


图 7 不同碳源对 H4 的菌株 H4 生长和产酶的影响
Fig.7 Effects of different carbon sources on biomass and enzyme production of strain H4

以褐藻酸钠作为唯一碳源, 使用不同褐藻酸钠浓度的培养基分别对菌株 H4 进行发酵(图 8)。在褐藻酸钠质量分数为 0.3%~0.6% 时, H4 的产酶能力和相对生物量随着褐藻酸钠质量分数的增加而增加, 当质量分数达到 0.6% 时, 酶活达到最大, 当褐藻酸钠质量分数继续升高时, 酶活和相对生物量有所下降。可能原因是褐藻酸钠虽然是诱导其产褐藻酸裂解酶的必要诱导物, 但底物浓度过高反而会影响该菌株的正常代谢, 其降解产物可能会对褐藻酸裂解酶的生物合成有一定阻遏作用。所以, 当褐藻酸钠质量分数为 0.5%~0.7% 时具有较高的酶活, 最适的褐藻酸钠质量分数为 0.6%。

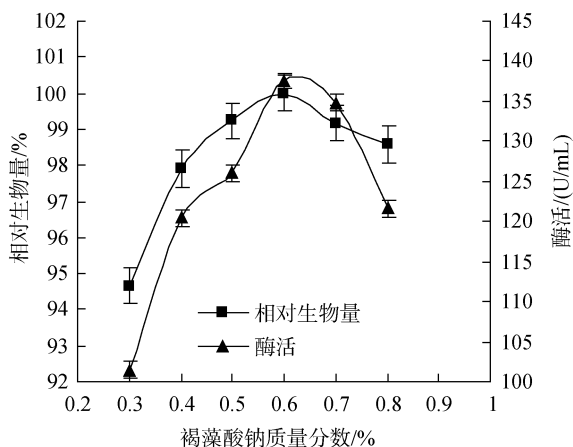


图8 褐藻酸钠质量分数对H4的菌株H4生长和产酶的影响
Fig.8 Effects of sodium alginate content on biomass and enzyme production of strain H4

2.3.6 不同氮源对菌株 H4 生长和产酶的影响

氮源是微生物生长和代谢所需营养物质的重要来源,也是构成酶的重要成分。本实验主要研究了氯化铵、硫酸铵、蛋白胨、酵母提取物和尿素分别作为氮源时,在含氮量相同(0.5%)的情况下,对菌株H4的生长和产酶的影响。结果如图9所示,菌株H4能够利用多种氮源进行生长并产酶,但是在蛋白胨和酵母提取物这两种有机氮源中的状况要明显高于氯化铵、尿素等无机氮源,其中以酵母提取物作为氮源时酶的活性最高。可能原因是蛋白胨、酵母粉等有机氮源经酶、酸、碱水解后获得的多肽和氨基酸等组成的水溶性混合物更容易被菌株分解利用,从而促进菌株生长和产酶^[15]。

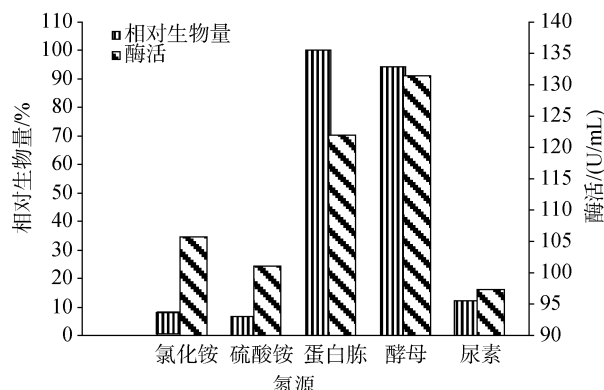


图9 不同氮源对H4菌株H4生长和产酶的影响
Fig.9 Effects of different nitrogen sources on biomass and enzyme production of strain H4

选取酵母提取物和蛋白胨这两种有机氮源作为发酵培养的复合氮源,结果(图10)表明:当酵母提取物和蛋白胨的质量浓度分别为5 g/L和2.5 g/L时,H4的产酶活性达到最大。所以,在发酵培养基中酵母提取物和蛋白胨的最佳配比5 g/L和2.5 g/L。

2.3.7 金属离子对菌株 H4 生长和产酶的影响

在上述优化条件下,使用含有不同种类金属离子的培养基分别对菌株进行发酵培养,研究不同金属离子对菌株H4产酶的影响(表2)。结果显示:不同种类的金属离子对菌株H4的生长影响不明显,但以Cu²⁺的抑制率最大,达到26.65%;Fe³⁺和K⁺对褐藻裂解酶的活力有促进作用,Ca²⁺、Mg²⁺和Cu²⁺对酶活有抑制作用,其中以Cu²⁺的抑制率最高,达到45.78%。

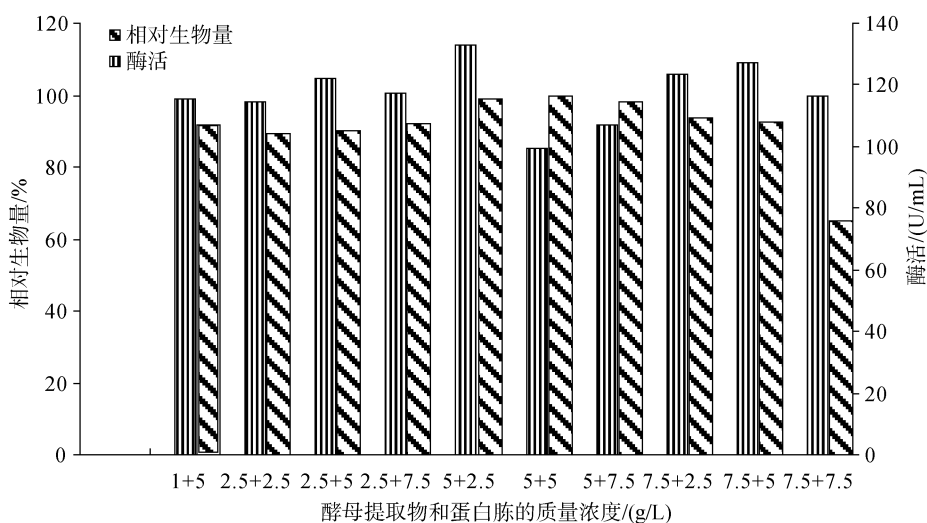


图10 酵母提取物和蛋白胨的质量浓度对H4菌株H4生长和产酶的影响
Fig.10 Effects of Yeast Extraction and Tryptone content on biomass and enzyme production of strain H4

表 2 不同金属离子对 H4 的菌株 H4 生长和产酶的影响
Tab.2 Effects of different ions on biomass and enzyme production of strain H4

金属离子(5 mmol/L)	相对生物量(%)	酶活(U/mL)
对照	100	138.17
Fe ³⁺	99.56	146.45
Ca ²⁺	99.22	90.28
Mg ²⁺	99.83	123.39
Cu ²⁺	73.35	74.91
K ⁺	100.55	139.94

在本研究中 Fe³⁺对交替单胞菌 H4(*Alteromonas* sp.H4)的酶活具有促进作用,可能由于 Fe³⁺是褐藻酸裂解酶活性的组成部分、作为连接底物和酶的桥梁或者对酶起到稳定其构象的作用,这在其他褐藻酸裂解酶生产菌株中未见报道。K⁺、Ca²⁺和 Mg²⁺是常见的激活剂,而在本试验中 Ca²⁺和 Mg²⁺对酶活有抑制作用,这可能是它们能引起酶活性中心结构发生改变或离子浓度较高而造成酶活下降,这与冯蕾等^[16]的研究结果相同。

实验开始通过对筛选得到的 3 株菌进行相对生物量和褐藻酸钠降解能力的比较,确定以 H4 作为研究对象。通过单次单因子实验,优化了 H4 的培养基组成和发酵产酶条件,使得优化后 H4 的酶活达到 146.45 U/mL,较优化之前提高 39.4%。

3 结论

(1) 本文以烟台市月亮湾附近采集的腐烂海带为出发样品,无菌条件下进行研磨、涂布及划线培养得到褐藻酸钠降解能力较大的 3 株菌 H2、H4 和 H5。复筛结果显示, H4 具有最高的褐藻酸钠降解能力,经过生理生化和 16S rDNA 序列分析鉴定将其归为交替单胞菌属,命名为交替单胞菌 H4(*Alteromonas* sp.H4)(基因登录号为 KF358313)。目前,微生物来源的褐藻酸裂解酶主要包括假单胞菌、弧菌、固氮菌等,交替单胞菌分泌褐藻酸裂解酶的报道较少,其中,韩宝芹等^[17]首次从裙带菜和海带中分离得到产褐藻酸裂解酶的埃氏交替单胞菌 (*Alteromonas espejiana*)。

(2) 发酵优化实验表明,交替单胞菌 H4 是诱导型菌株,所产的褐藻酸裂解酶是诱导酶,且褐藻酸裂解酶的产生与菌株生长属于生长偶联型,可以通过提高细胞生长速度来加快酶的生物合成速度。通过单次单因子实验确定褐藻酸钠降解菌株 H4 较优的

产酶培养基主要成分的浓度为(w/v): 褐藻酸钠 0.6%, 酵母提取物 0.5%, 蛋白胨 0.25%, NaCl 3%; 较优的发酵产酶条件为温度 28℃, 初始培养基 pH7.5, 接种量 1.5%(v/v), 培养 48 h 后酶活达到 146.45 U/mL, 较优化之前提高 39.4%。和 K⁺对酶活的促进作用相比, Fe³⁺对酶活的促进作用更明显,这在其他褐藻酸裂解酶生产菌株中未见报道。Ca²⁺、Mg²⁺和 Cu²⁺对酶活有抑制作用, Cu²⁺的抑制率高达 45.78%。

4 前景展望

褐藻酸裂解酶的开发和利用是海洋资源高值化开发的关键技术之一。国内外关于褐藻酸裂解酶特别是基因工程方面的研究进展较为缓慢,相较于其他酶类的开发和应用有一定的滞后性。目前,由于受到如何提高微生物产酶活性和稳定性,以达到酶制剂工业化的需要以及如何制定相应的控制标准,以定向的制备不同的分子量片段等的困扰,国际市场上仍没有商品化的褐藻酸裂解酶制剂及其降解产物出售。相信随着功能酶学、功能基因组及蛋白质组的迅速发展,克隆酶、杂交酶、修饰酶等的完善,褐藻酸裂解酶在新药、新功能食品、新生化产品开发上将发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Skiak B G, Martinsen A. Applications of some algal polysaccharides in biotechnology[M]. *Seaweed Resources in Europe: Uses and potential*,1991: 219-256.
- [2] Gacesa P. Enzymic degradation of alginates[J]. *The International journal of biochemistry*, 1992, 24(4): 545-552.
- [3] Kawada A, Hiura N, Shiraiwa M, et al. Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture[J]. *Federation of European Biochemical Societies*,1997, 408(1): 43-46.
- [4] Schaeffer D J, Krylov V S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(3): 208-227.
- [5] 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.
- [6] Tomoda Y, Nagaki A, Kono T. Method for Improving

- Freeze-resistance of Farm Corp[M]. Tokyo: OMei Seika Kaisha LTD, 1995: 290-295.
- [7] Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. Annual Reviews in Microbiology, 2000, 54(1): 289-340.
- [8] Kim D E, Lee E Y, Kim H S. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(1): 10-16.
- [9] Sim S J, Baik K S, Park S C, et al. Characterization of alginate lyase gene using a metagenomic library constructed from the gut microflora of abalone[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(4): 585-593.
- [10] 魏丹, 奚文芳, 李恒, 等. 高效降解褐藻胶新菌种的筛选, 鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 26-31.
- [11] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [12] Cello D F, Bevivino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4485-4493.
- [13] 马悦欣, 纪涛, 李慧琼, 等. 假交替单胞菌 LJ1 菌株产褐藻胶裂解酶的培养条件优化及酶学性质[J]. 微生物学报, 2009, 49(8): 1086-1094.
- [14] Momma K, Okamoto M, Mishima Y, et al. A novel bacterial ATP-binding cassette transporter system allows uptake of macromolecules[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(14): 3998-4004.
- [15] 张宁宁. 褐藻酸降解菌株 S3 的筛选分离及培养条件和产酶能力[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(10): 106-108.
- [16] 冯蕾, 唐学玺, 王艳玲, 等. 褐藻酸降解酶特性的初步研究[J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 30-33.
- [17] 韩宝芹, 戴继勋. 海藻工具酶研究: 褐藻酸降解菌的分离鉴定及其褐藻酸酶形成条件研究[J]. 海洋学报, 1997, 19(5): 97-102.

The screening, identification of alginate degrading bacteria and optimization of fermentation conditions

HOU Shi-chang¹, WEN Shao-hong¹, TANG Zhi-hong¹, CUI Yu-lin², QIN Song²

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264003, China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Received: Dec., 8, 2013

Key words: alginate degrading bacteria; screening; identification; optimization

Abstract: A screening work was carried out to obtain a bacterium with high alginate lyase activity by using alginate as sole source of carbon. The strain was identified as *Alteromonas* based on physiology and biochemistry analysis, 16S rDNA sequence analysis, and was named *Alteromonas* sp. H4. It was shown that the optimal culture medium composition of producing alginate lyase was as follows (w/v): alginate 0.6%, yeast extracts 0.5%, peptone 0.25% and NaCl 3%. The optimized culture condition was as follows: culture temperature 28°C, initial pH value 7.5, inoculum size 1.5%(v/v) and optimal harvest time 48 h. The activity of alginate lyase was activated by Fe³⁺, which hasn't been reported in other alginate lyase production strains, and the inhibitory effect by Cu²⁺ was up to 45.78%. Under optimized conditions, the alginate lyase activity of the *Alteromonas* sp. H4 was 146.45 U/ml, which was increased by 39.4% than that before optimization.

(本文编辑: 梁德海)