

琼胶降解菌 F-6 筛选、培养条件及对条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 细胞解离作用的研究*

付万冬 韩宝芹 王常红 刘万顺

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 利用琼胶作为唯一的碳源从青岛太平角海域的海水和红藻样品中筛选分离得到一株高产琼胶酶的海洋菌 F-6, 对其最适的产酶条件, 利用琼胶酶分离条斑紫菜的原生质体和原生质体的培养进行研究。结果表明, 通过单次单因子和正交实验确定琼胶降解菌株 F-6 最适产酶培养基配方为(W/V): 琼胶 0.7%; 酵母粉 0.3%; 蛋白胨 0.5%; NaCl 2.0%; K₂HPO₄ 0.1%; CaCl₂ 0.02%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; FeSO₄·7H₂O 0.002%; 起始 pH = 7.5, 最适的发酵产酶条件为: 26 °C 培养 36h。经条件优化后, 粗酶液的酶活高达 631.6U/ml。发酵液经过 6000g 离心 30min 得到粗酶液, 粗酶液经过 8k 分离膜超滤, 加入 1mol/L 渗透剂, 0.22μm 滤膜过滤除菌后降解条斑紫菜组织块, 成功地分离得到大量的紫菜原生质体, 其产率为 3 × 10⁶ 个原生质体/g 新鲜紫菜组织。原生质体经初步培养发育成愈伤组织, 其成活率为 60%。

关键词 琼胶降解菌, 琼胶酶, 培养条件优化, 条斑紫菜, 原生质体

中图分类号 Q556.3

琼胶(琼脂)由琼脂糖和琼胶酯组成, 琼脂糖是由(1-3)-O-β-D-半乳糖和(1-4)-O-3, 6-内醚-L-半乳糖交替组成的线形链状分子(Sugano *et al.*, 1993); 琼胶酯由复杂的长短不一的半乳糖残基的多糖链组成, 其中包含有多种取代基如硫酸基、甲基等。随着对海洋资源的开发和利用, 越来越多的海洋低聚糖被证明具有良好的生物活性和药理作用, 琼胶低聚糖具有抗氧化等重要的生理功能(徐强等, 2002), 一定聚合度的琼胶类硫酸多糖对 B 型流感病毒、腮腺炎、脑膜炎病毒等有抑制作用(王静雪等, 2001)。琼胶酶降解琼胶制备低聚糖由于其具有专一性、高效性和清洁无污染, 在研究和生产中越来越受到重视(毛文君等, 2001)。琼胶酶根据降解琼胶的作用方式不同, 把它们分为两类: α-琼胶酶(EC3.2.1.-), 作用于琼脂糖的 (1-3)糖苷键, 产物为琼胶寡糖, 以 3, 6-内醚-β-L-半乳糖作为还原性末端; β-琼胶酶

(EC3.2.1.81)水解 D-半乳糖残基和 3, 6-内醚-α-L-半乳糖残基之间的 (1-4)糖苷键, 产生的琼胶寡糖以 D-半乳糖残基作为还原性末端。天然琼胶主要存在于某些海藻的细胞壁中, 琼胶酶在这些海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等过程中具有重要的使用价值, 是一种海藻遗传工程的工具酶(Sugano, 1993; Araki *et al.*, 1994, 1998a), 同时, 琼胶酶在分子生物学方面也多有应用。因此, 对琼胶酶的研究具有重要的理论意义和应用价值。

作者从海洋中分离得到一株高产琼胶酶的海洋菌, 对其发酵产酶条件进行优化, 确定最佳产酶条件。发酵液经过 6000g 离心 30min 得到粗酶液, 粗酶液经过 8k 分离膜超滤、加入 1mol/L 葡萄糖、0.22μm 滤膜过滤除菌后降解条斑紫菜组织块。分离得到大量的紫菜原生质体, 原生质体经培养发育成愈伤组织。

* 国家“十五”科技攻关项目, 2001BA708B04-07 号。付万冬, 硕士, E-mail: fwd2002fwd@sohu.com

通讯作者: 韩宝芹, 教授, E-mail: baoqinh@ouc.edu.cn

收稿日期: 2006-09-20, 收修改稿日期: 2006-12-28

1 材料与amp;方法

1.1 培养基组成

1.1.1 分离培养基成分(W/V) 琼胶 2.0%, NaCl 2.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, $CaCl_2$ 0.02%, pH 7.5。

1.1.2 发酵培养基成分(W/V) 琼胶 0.7%, 蛋白胨 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 酵母粉 0.3%, NaCl 2.0%, $CaCl_2$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, pH 7.5。

1.2 菌株的筛选

1.2.1 取样 分别用无菌的三角瓶取海水、泥沙、红藻。

1.2.2 样品的处理 海水直接用无菌生理盐水稀释 10^{-4} — 10^{-6} 涂布平板, 底泥和红藻加入到装有无菌生理盐水的三角瓶中, 充分摇匀, 然后系列稀释取合适浓度涂布, 25℃ 恒温培养 72h。

1.3 初筛和复筛

1.3.1 初筛 以琼胶作为唯一碳源, 分离和筛选琼胶降解菌, 25℃ 恒温培养 72h 后, 根据菌落周围透明圈大小初步判断菌株降解能力大小。

1.3.2 复筛 初筛分离纯化得到的菌株, 分别接种斜面和平板培养。平板培养 72h 后, 用卢卡氏碘液染色观察。斜面试种至发酵培养基中, 于 25℃ 恒温条件下, 150r/min 摇荡培养 36h, 检测发酵液的酶活力。

1.4 酶活力测定

将发酵液在 4℃ 下, 经 6000g 离心 20min, 取上清液作为粗酶液。每 100 μ l 酶液加入到 900 μ l 含 50mmol/L (pH 7.0)磷酸盐作为缓冲液 0.5%琼胶底物中, 50℃ 保温 15min, 用沸水浴灭活 5min 的酶液作为对照, DNS 法测定还原糖含量(北京大学生物教研室, 1992)。酶活力单位定义为在 50℃、pH 7.0 条件下 1ml 酶液每分钟催化产生 1 μ g 还原糖(以半乳糖计)所需要的酶量(U)。

1.5 发酵条件优化

除非特定说明外, 培养温度为 26℃, 时间为 36h, 摇床转速为 150r/min, 接种量为 2%, 菌体浓度为 $(1.0\text{—}3.0) \times 10^8$ cfu/ml, 500ml 三角瓶装液量为 100ml, 每组试验重复 3 次, 每次试验 3 组平行样, 优化结果都用于以后试验。

1.5.1 培养时间对产酶的影响 菌体在液体培养基培养 12h 后, 每隔 4h 取样, 测定酶活力和菌体的生长密度, 以及培养时间对菌株生长和产酶的影响。

1.5.2 培养基起始 pH 值对产酶的影响 培养基的起始 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及培养基起始 pH 值对菌株产酶的影响。

1.5.3 培养温度对产酶的影响 培养温度分别为 20、22、24、26、28、30、32、34℃, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及温度对菌株产酶的影响。

1.5.4 NaCl 浓度对产酶的影响 发酵培养基中 NaCl 浓度(W/V)分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及 NaCl 浓度对菌株产酶的影响。

1.5.5 琼胶浓度对产酶的影响 发酵培养基中琼胶浓度(W/V)分别 0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%、0.60%、0.70%、0.80%、0.90%、1.0%, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及琼胶浓度对菌株产酶的影响。

1.5.6 不同浓度的酵母粉对产酶的影响 发酵培养基中的酵母粉浓度(W/V)分别为 0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%、0.60%, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及酵母粉浓度对菌株产酶的影响。

1.5.7 不同浓度的氮源对产酶的影响 发酵培养基中氮源分别为碳酸氢铵、草酸铵、尿素、硝酸铵、牛肉浸膏、蛋白胨、硫酸氢二钾、硝酸钠和硝酸钾浓度(W/V)为 0.30%和 0.50%, 培养 36h 后, 测定发酵液的酶活力, 以及氮源对菌株产酶的影响。

1.5.8 培养基成分的正交实验 实验按四因素三水平安排正交 $L_9(3^4)$, 培养中 NaCl 浓度(W/V), $A_1=1.5\%$, $A_2=2.0\%$, $A_3=2.5\%$; 酵母粉浓度(W/V), $B_1=0.10\%$, $B_2=0.30\%$, $B_3=0.50\%$; 氮源(蛋白胨)浓度(W/V), $C_1=0.30\%$, $C_2=0.50\%$, $C_3=0.70\%$; 琼胶浓度(W/V), $D_1=0.30\%$, $D_2=0.50\%$, $D_3=0.70\%$ 。按正交实验进一步优化发酵产酶条件。

1.6 琼胶酶对条斑紫菜细胞的解离作用

1.6.1 酶液的配制 发酵液经过 6000g 离心 30min, 上清液通过 8K 分离膜超滤后加入 1.0mol/L 渗透稳定剂, 然后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 放在 4℃ 下保存备用。

1.6.2 条斑紫菜的处理和原生质体的分离

(1) 材料处理 取新鲜的条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*), 刷去附着的杂藻和原生动物, 在含 0.7% KI 的消毒海水中浸泡 20min, 进一步杀死藻体上的原生动物, 用消毒海水反复冲洗, 滤纸吸干。称取藻体约 1g, 用刀片切成细碎小块, 过 300 目绢以滤洗去机械损伤的细胞内容物, 加入装有 10ml 酶液的三角瓶中, 25℃ 下低速摇动黑暗酶解。

(2) 原生质体鉴定方法 用蒸馏水渗涨法处理样品, 迅速在显微镜下观察细胞是否涨破, 涨破后有无细胞壁存在。若不涨破或涨破后有细胞壁的残余存在, 则不是原生质体。

(3) 原生质体的分离 藻体经 3—4h 酶解后有大量的原生质体, 单细胞从组织块游离出来, 停止酶解, 然后用 300 目绢过滤, 将滤出液以 800g 离心 3—4min, 用吸管小心吸去上清液, 沉淀反复用高渗海水(4.5% W/V, NaCl) 轻轻冲洗、离心, 即得大量原生质体。

1.6.3 单细胞和原生质体产率和成活率的统计 用血球计数板统计酶解总细胞数和游离细胞和原生质体数, 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。原生质体的成活率为发育成愈伤组织的原生质体占酶解中单细胞和原生质体总数的百分比。

1.6.4 酶解时间对条斑紫菜细胞解离的影响 1.0mol/L 葡萄糖作为渗透稳定剂条件下, 酶解时间分别为 2.5h、3.0h、3.5h、4.0h 后, 统计了原生质体产率和成活率的影响。

1.6.5 渗透剂对条斑紫菜细胞解离的影响 以 1.0mol/L NaCl、1.0mol/L 葡萄糖、1.0mol/L 甘

露醇、1.0mol/L 山梨醇作为渗透剂在酶解 3.5h 后, 统计原生质体的产率和成活率。

1.6.6 原生质体的培养 过滤海水于 121℃ 高温灭菌 20min, 冷却后加入 1% PESI 备用。将收集到的原生质体, 用高渗消毒海水悬浮后, 加入到盛有高渗海水的灭菌平板中, 移入到 20℃ 培养室培养, 并逐步降低盐度至普通海水, 光照时间为 12h/d, 光照强度为 1500—2000 lx。在培养过程中, 每两天观察一次, 定期检查细胞健康状况及典型发育情况, 对细胞存活率进行统计。

2 结果与分析

2.1 初筛和复筛

作者在本实验中从青岛太平角海域海水和红藻样品中筛选出多株琼胶降解菌, 经过液体发酵培养复筛, 比较了不同菌株产酶能力的大小, 得到一株具有高效产琼胶酶能力的菌株 F-6(表 1), 用于本实验发酵条件优化和酶对条斑紫菜的解离作用的实验。该菌株能在以琼胶作为唯一碳源的平板上生长, 分泌胞外酶降解琼胶, 使得菌落周围形成凹陷的透明圈。平板培养 72h 后用卢卡氏碘液染色观察降解效果。琼胶平板未被降解的地方可以被染色, 而琼胶降解菌产生琼胶酶降解了菌落周围的琼胶形成透明圈, 降解形成的琼胶寡糖因具有还原性, 不能被卢卡氏碘液染色。从图 1 可以观察到菌株 F-6 具有两个明显的降解圈, 而其他菌株只有一个降解圈。据作者初步判断可能是菌株 F-6 产两种琼胶酶, 它们的降解方式、降解活性和渗透性能不一样。透明圈 1 可能被某一种酶降解或两种酶共同作用, 降解成为低分子量、具有高还原性的寡糖, 因不能被卢卡氏碘液染色而透明圈较亮; 而透明圈 2 可能被另一种酶因其具有高渗透性能和降解方式不一样, 琼胶被降解为相对高的分子量、低还原性的寡糖, 透明圈较暗。这与文献报道的琼胶降解菌产多种琼胶酶相一致(Araki *et al*, 1998a)。具体的机制有待进一步研究。

表 1 摇瓶复筛结果

Tab.1 Results of shaking cultivation screening of agarolytic strains

菌株	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
酶活(U/ml)	218	235	260.2	245	267	330

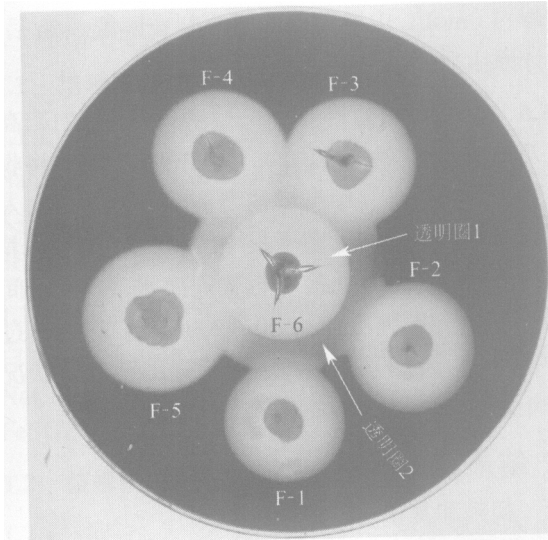


图1 不同琼胶降解菌株卢卡氏碘液染色效果(平板培养 72h)
Fig.1 Results of Lugol dyeing of different agarolytic strains (growing on plate for 72h)

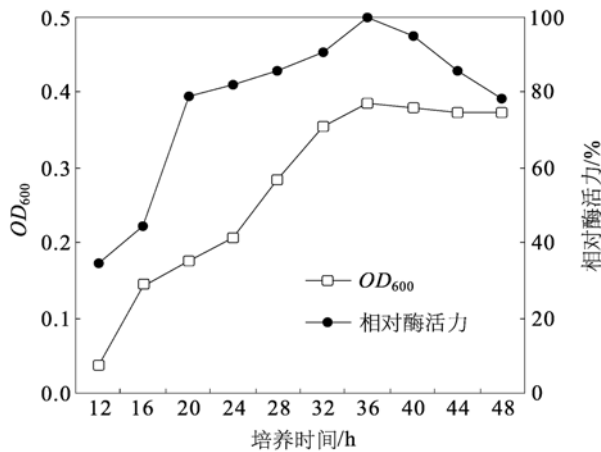


图2 菌株 F-6 生长曲线和产酶曲线
Fig.2 Duration of growth and enzyme formation of strain F-6

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 培养时间对产酶的影响 随着培养时间的延长, 菌体的密度和发酵液的酶活力都持续增长,

培养 36h 后, 菌体的密度和酶活力几乎同时达到最大值, 之后两者都逐渐降低(图 2)。

2.2.2 培养基起始 pH 值对产酶的影响 培养基的起始 pH 值对产酶影响较大, pH 值在 7.0—8.0 时, 发酵液酶活力较高, 当起始 pH 值小于 6.5 或大于 8.5 时发酵液酶活力都很低(表 2)。

2.2.3 培养温度对产酶的影响 试验结果表明, 在 20—34 范围内琼胶降解菌株 F-6 都能生长, 但在 24—28 范围内, 菌体产酶活性高, 在 26 时, 酶活性最高(表 3)。

2.2.4 NaCl 对产酶的影响 试验结果表明在低浓度 NaCl 下, 不利于琼胶降解菌的产酶。在 NaCl 浓度为 2.0%—3.0% 条件下, 菌株产酶能力较强(表 4), 这说明了该菌株具有海洋菌的特性。

2.2.5 琼胶浓度对产酶的影响 实验结果表明, 在一定的范围内, 琼胶浓度的增加有利于诱导菌株产琼胶酶, 最适琼胶浓度为 0.6%—0.7%。琼胶浓度过高又会抑制菌株产酶。琼胶浓度过低时, 培养基粘度小、通气量大, 使菌体利用琼胶的速度快。但由于培养基中的琼胶浓度低, 菌体在较短时间内开始利用已降解产生的小分子糖作碳源。降解琼胶的产物——小分子还原糖抑制酶的产生, 同时缺乏琼胶底物的诱导, 菌体产琼胶酶的能力下降。但随着培养基中的琼胶浓度的增加, 培养基的粘度增加, 通气量小, 菌体难以被诱导产生琼胶酶, 降解琼胶产生小分子还原糖以维持菌株正常的生命代谢活动, 因此过量的琼胶底物会抑制琼胶酶的产生(表 5)。

2.2.6 酵母粉含量对产酶的影响 试验结果表明在满足了菌体生长所必需的生长因子后酵母粉的浓度对产酶影响不大(表 6)。

表 2 培养基起始 pH 值对产酶的影响

Tab.2 Effects of initial pH of medium on agarase production

pH 值	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
相对酶活力(%)	0	29.7	33.9	41.1	69.1	85.2	100	76.9	69.6	47.8

表 3 培养温度对产酶的影响

Tab.3 Effects of cultivation temperature on agarase production

温度()	20	22	24	26	28	30	32	34
相对酶活力(%)	47.6	60.4	77.7	100	91.1	87.7	82.7	74.9

表 4 NaCl 浓度对产酶的影响

Tab.4 Effects of concentration of NaCl on agarase production

NaCl 浓度(W/V, %)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
相对酶活力(%)	31.6	42.7	48.5	75.8	88.8	100	89.5	82.7

表 5 琼胶浓度对产酶的影响

Tab.5 Effects of concentration of agar on agarase production

琼胶浓度(W/V,%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
相对酶活力(%)	44.2	46.5	51.4	54.2	57.0	93.4	100	39.8	38.2	33.2

表 6 酵母粉浓度对产酶的影响

Tab.6 Effects of concentration of yeast powder on agarase production

酵母粉浓度(W/V,%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
相对酶活力(%)	87.1	100	96.6	94.4	92.2	85.4

2.2.7 氮源对产酶的影响 试验结果表明菌株 F-6 能在多种不同氮源中生长,但在两个不同浓度(0.30%和 0.50%)的不同种氮源产酶能力差别较大。蛋白胨和 NaNO₃ 为氮源浓度为 0.30%的培养基中有利于菌株 F-6 产酶(图 3)。

2.2.8 正交试验的结果与分析 试验的结果见表 7 和表 8,从表 8 可以看出琼胶浓度和蛋白胨浓度对菌株产酶影响显著,所以控制好氮源和琼胶浓度,能确保高效产酶。而 NaCl 浓度和酵母粉浓度对菌株的产酶影响不显著。这说明了 NaCl 和酵母粉浓度在一定范围内,菌株产酶具有稳定性。从表 7 可以得出最佳的培养基成分组合为 A₃B₃C₂D₃。通过单次单因子和正交实验,确定最佳的培养基成分(W/V):琼胶 0.7%,酵母粉 0.3%,蛋白胨 0.5%,NaCl 2.0%,K₂HPO₄ 0.1%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.002%,CaCl₂ 0.02%,pH = 7.5。最佳的培养条件为 26℃,摇床转速为 150r/min,接种量为 2%,500ml 三角瓶装

液量为 100ml,培养 36h。

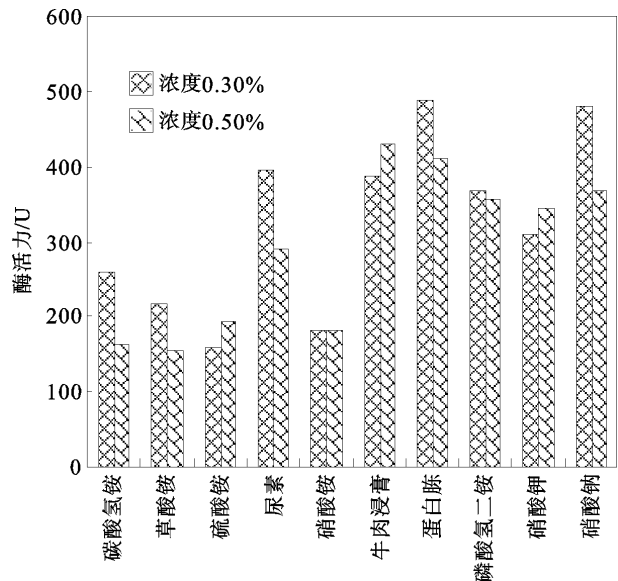


图 3 不同浓度的氮源对产酶的影响

Fig.3 Effects of different concentration of nitrogenous sources on agarase production

表 7 正交实验结果

Tab.7 Results of orthogonal experiment

序号	因素				酶活力(U/ml)			
	A	B	C	D	X ₁	X ₂	X ₃	X _i
1	1	1	1	1	427.7	420.4	451.0	1299.1
2	1	2	2	2	512.7	554.0	536.0	1602.7
3	1	3	3	3	580.7	563.9	631.6	1776.2
4	2	1	2	3	602.5	563.9	607.4	1773.8
5	2	2	3	1	419.8	493.3	498.1	1411.2
6	2	3	1	2	469.0	459.3	483.6	1411.9
7	3	1	3	2	512.7	488.4	541.8	1542.9
8	3	2	1	3	571.0	537.0	556.4	1664.4
9	3	3	2	1	566.1	512.7	498.1	1576.9
T ₁		4678.0	4615.8		4375.4	4287.2		=14059.1
T ₂		4596.9	4678.3		4953.4	4557.5		
T ₃		4784.2	4765.0		4730.3	5214.4		

表 8 正交实验结果方差分析

Tab.8 Analysis of variance of results of orthogonal experiment

因素	平方和	自由度	均方	F 值
A	1960.6	2	980.3	1.29
B	1247.6	2	623.8	0.82
C	18881.9	2	9441.0	12.39**
D	50528.9	2	25264	33.16**
误差	13714.9	18	761.9	
总的	86333.9	26		

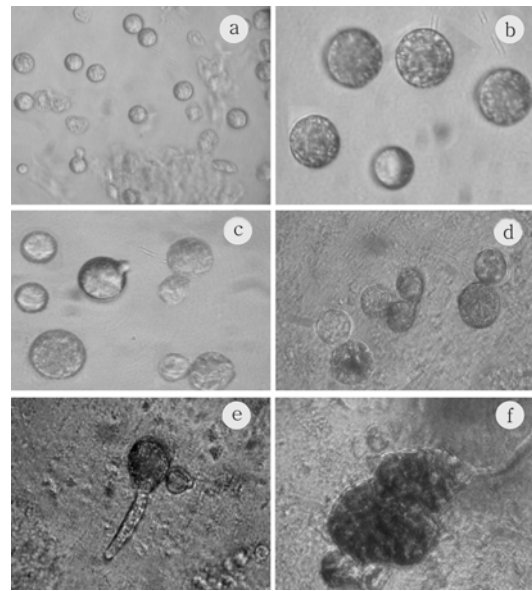
**表示 $F_{0.01}(2, 20) = 5.85$

2.3 琼胶酶的对条斑紫菜细胞的解离作用

2.3.1 原生质体的制备和培养 以超滤浓缩滤菌后的琼胶酶为工具酶, 酶解条斑紫菜藻块, 2.0h 以后组织块开始有些软化, 显微镜下观察, 藻块边缘细胞的细胞壁疏松, 2.5h 后, 大约 25% 细胞从组织块中游离出来; 3.5—4h 后大约 80% 细胞已经从组织块中解离下来。收集于离心管底部的条斑紫菜原生质体呈现淡红色。用蒸馏水渗涨法处理样品后, 观察到 85% 的细胞已经去除了细胞壁。经血球计数板观察计数, 换算, 每克新鲜紫菜原生质体产率为 3×10^6 个。在显微镜下观察这些原生质体, 多数呈淡红色和红色, 均有浓厚的原生质。细胞大小不一, 原生质体的直径为 5—12 μm 。这可能与酶解材料的部位有关, 髓部细胞和表皮细胞较大, 皮层细胞则较小。原生质体的发育过程见图 4。

2.3.2 酶解时间对原生质体产率和成活率的影响 随着酶解时间的增加, 原生质体产率也增加, 但是原生质体的成活率却下降了(表 9)。琼胶酶是复合酶, 其组分复杂, 也含有有害成分。一般说来, 酶浓度越高, 对细胞的毒害就越大。所以在能满足分离一定量的原生质体的基础上, 应尽可能地降低酶浓度, 这有助于提高原生质体的成活(Araki *et al.*, 1990)。

2.3.3 渗透剂对原生质体产率和成活率的影响 不同的渗透剂对原生质体的产率和成活率影响不同, 以葡萄糖作为渗透剂为好(表 10)。

图 4 原生质体发育过程(10 \times 40)Fig.4 The processes of development of *P. yezoensis* protoplast (10 \times 40)

a: 降解分离得到条斑紫菜原生质体; b: 培养 3—4 天后, 原生质体再生了细胞壁; c: 培养 5—6 天后, 部分细胞有出芽现象; d: 培养 7—10 天后, 大部分细胞有出芽现象; e: 细胞初始部位发育成固着器; f: 培养 16 天后, 细胞发育成愈伤组织

表 9 不同时间的酶解效果

Tab.9 Effects of different times on enzymatic hydrolysis to *P. yezoensis*

项目	2.5h	3.0h	3.5h	4.0h
原生质体产率(%)	25	55	75	80
成活率(%)	70	65	60	50

表 10 不同渗透剂的酶解效果

Tab.10 Effects of different permeabilization agents on enzymatic hydrolysis to *P. yezoensis*

渗透剂(1mol/L)	NaCl	葡萄糖	甘露醇	山梨醇
产率(%)	70	80	55	60
成活率(%)	45	60	50	50

注: 表 9 和表 10 试验结果是重复 3 次试验的结果的平均值

3 讨论

3.1 产酶菌株的筛选和条件优化

本实验中利用琼胶作为唯一碳源的选择性培养基,从青岛近海海水中筛选到一株具有高琼胶降解能力的海洋菌 F-6,通过培养条件优化,该菌在发酵培养基中 36h 达到产酶高峰,产酶能力较高而且稳定,发酵液酶活力达到 631.6U/ml,高于一些报道的产琼胶酶菌株(Vera *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 1992),为酶的分离纯化、产业化生产及活性琼胶低聚糖的开发奠定了基础,同时对该菌株的菌种鉴定和其酶蛋白结构的分析、酶基因的克隆及序列分析等尚待进一步研究。

3.2 酶的生物学效应

本实验利用发酵液离心,上清液通过超滤浓缩,过 0.22 μ m 滤膜除菌来降解紫菜组织块,能够较好的分离得到大约 3×10^6 个/g 鲜藻的原生质体,与以往报道的利用琼胶酶和纤维素酶等混合酶液(Sugano, 1993)才能很好除去细胞壁相比有一定的优势。

参 考 文 献

王静雪,江晓路,胡晓珂,2001. 细菌降解琼胶的研究进展. 中国水产科学, 8(3): 94
 毛文君,林洪,管华诗,2001. 琼胶寡糖的制备及¹³C-NMR 研究. 水产学报, 25(6): 582—584

北京大学生物教研室,1992. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 4
 徐强,薛长湖,赵雪等,2002. 酸解法制备琼胶低聚糖及其抗氧化性评价. 中国海洋药物, 85: 19—22
 Araki T, Hayakawa M, Lu Z *et al.*, 1998a. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303. Marine Biotechnology, 6(4): 260—265
 Araki T, Hayakawa M, Tamaru Y *et al.*, 1994. Isolation and regeneration of haploid protoplasts from *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) with marine bacterial enzymes. Phycology, 30: 1040—1046
 Araki T, Lu Z, Morishita T, 1998b. Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). Journal of Marine Biotechnology, 6(3): 193—197
 Araki T, Morishita T, 1990. Fusion of Protoplasts from wild type *Porphyra yezoensis* and green type *P. tenera* Thalli (Rhodophyta). Nippon Suisan Gakkaishi, 56(7): 1161
 Leon O, Quintana L, Peruzzo G *et al.*, 1992. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1. Applied and Environmental Microbiology, 58(12): 4060
 Sugano Y, 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* Strain JT107. Applied and Environmental Microbiology, 1549—1554
 Sugano Y, Matsumoto T, Kodama H *et al.*, 1993. Cloning and sequencing of agaA, a unique Agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107. Applied and Environmental Microbiology, 59(11): 3570
 Vera J, Alvarex R, Murano E *et al.*, 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extra cellular agarase. Applied and Environmental Microbiology, 64(11): 4378

SCREENING AND CULTIVATION OF AGAROLYTIC BACTERIUM F-6 AND THE DECOMPOSING EFFECT OF AGARASE ON CELLS OF *PORPHYRA YEZOENSIS*

FU Wan-Dong, HAN Bao-Qin, WANG Chang-Hong, LIU Wan-Shun
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract The authors isolated F-6, a marine agarolytic bacterium able to produce agarase effectively from red algae in coastal seawater in Qingdao, Shandong of China, using agarose medium as the only-carbon source. The experiment was carried out from Sep. 2004 to Mar. 2005 for studying the decomposition effect by agarase on *Porphyra yezoensis* cells.

With one-factor-at-a-time method and orthogonal experiment, the optimal fermentation condition of strain F-6 was determined. Besides, the decomposition effect by agarase on *P. yezoensis* cells was studied. Main procedures of experiment of decomposition effect were 1) centrifuged the fermentation broth at 6000g for 30min to obtain supernatant for culture; 2) ultrafiltrated the supernatant and then mixed with 1mol/L permeabilization agents; 3) filtrated the mixture for removing bacteria by 0.22 μ m separate film; 4) decomposed *P. yezoensis* tissue for producing protoplasts; 5) poured the collected protoplasts into hyperosmotic and sterilized in sea water with 1% PESI; 6) cultivated the protoplasts in 20 in light scheme of 12h/day at 1500—2000 lx until the salt concentration was gradually declined to normal sea water level. We also examined the healthy condition of the protoplasts, typical development of cells and their survival rate.

The optimal fermentation condition of strain F-6 was agar 0.7%; yeast powder 0.3%; peptone 0.5%; NaCl 2.0%; K₂HPO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; FeSO₄·7H₂O 0.002%; CaCl₂ 0.02%; and initial pH 7.5. The optimal temperature and duration were 26 and 36h, respectively, at which the highest agarase activity reached 631.6U/ml. The experiments of decomposition effect of agarase on *P. yezoensis* cells and protoplast cultivation showed that the agarase could easily decompose *P. yezoensis* tissue into protoplasts at production rate of about 3 × 10⁶ protoplasts per gram of the tissue. The optimal duration of enzymatic hydrolysis to *P. yezoensis* was 3.5h. The permeabilization agent of glucose (1mol/L) could obviously improve the production rate and survival rate of the protoplasts. The protoplasts could develop into callus at survival rate of approximately 60%.

Key words Agarolytic bacterium, Agarase, Optimization of cultivation condition, *Porphyra yezoensis*, Protoplast