

文章编号:1000-0615(2009)06-1037-07

一株高产琼胶酶菌株 MA-B22 的分子鉴定与产酶条件优化

卢斌, 柯才焕, 杨明, 康康, 赵晶

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要:琼胶酶在多糖降解应用中的作用日益重要,而从海洋微生物中筛选琼胶酶高产菌株成为一个重要途径。本研究从养殖的杂色鲍体内分离到一株高产琼胶酶的菌株 MA-B22。该菌为革兰氏阴性菌,经 16S rRNA 序列鉴定表明,与 *Tamlana agarivorans* sp. nov. 具有 99% 同源性,因此初步定为 *Tamlana* sp.。在 2216E 培养基中该菌株在培养时间 60 h, 温度 25 ℃, 起始 pH 为 6.0 条件下产酶活性最高。基于上述培养条件,通过单因素和正交实验确定了培养基的最佳基本组成:氮源为牛肉膏(其最适浓度为 6.0 ‰),碳源为琼脂(其最适浓度为 2.5 ‰),配制培养基的人工海水的最适盐度为 25。经培养条件优化后,该菌胞外琼胶酶活力可达 1021.79 U/mL,较优化前提高 8.82 倍。实验首次对 *Tamlana* sp. 属的琼胶酶活性进行确定并优化其产酶条件,为构建琼胶酶高产工程菌株提供了基础,并可能为今后鲍养殖提供潜在的益生菌。

关键词:琼胶酶;酶活力;培养基

中图分类号:S 917

文献标识码:A

琼胶为一种亲水性多糖,主要从石花菜、江篱等红藻中提取分离,它由琼脂糖(agarose)和硫酸琼胶(agarpectin)组成,是海藻工业中生产和应用最广的糖类之一。利用琼胶酶降解琼胶是制备低聚糖的一个重要途径,由于其具有特异性,可选择性地酶切特定链,且反应条件温和,降解过程易于控制,在多糖降解应用中日益增多。目前,从海洋微生物中提取琼胶酶制备琼胶低分子量活性片段,已成为琼胶工业高值化研究的重要方向。因此,针对琼胶酶的研究具有重要的理论意义和经济价值。

获得具有开发前景的菌株是开发微生物琼胶酶的前提,自从 Groleau 等^[1]第一次从海水中分离到降解琼胶的细菌——琼胶假单胞菌(*Pseudomonas galatica*)以来,人们已经从海洋中分离到了多种产琼胶降解酶的细菌,已报道产琼胶酶菌属有 *Pseudomonas*^[1]、*Pseudoalteromonas*^[2]、*Streptomyces*^[3]、*Alteromonas*^[4]、*Microscilla*^[5]、*Vibro*^[6] 和 *Cytophaga*^[7] 等。本文从杂色鲍(*Haliotis*

diversicolor)体内分离到一株高产琼胶酶的菌株,初步鉴定为 *Tamlana* sp.。目前国内外尚无对该菌属的琼胶酶活性进行报道,本文首次确定其产琼胶酶活性,并对该菌发酵产酶条件进行了优化,为后续海藻多糖资源的高值化利用奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

2216 E 海洋细菌培养基 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 琼脂粉 15 g, 磷酸高铁 0.01 g, 人工海水 1 000 mL (经 0.8 μm 孔径滤膜过滤)。

摇瓶发酵琼胶培养基 蛋白胨 1 g, 酵母膏 1 g, 琼脂粉 1 g, 人工海水 1 000 mL (经 0.8 μm 孔径滤膜过滤)。

1.2 菌株的筛选

从汕头某养殖场取得杂色鲍,无菌海水冲洗体表,分别取肌肉,肝胰腺,肠道等部位液氮匀浆。将匀浆液涂布在 2216 E 海洋细菌培养基平板上,28 ℃ 培养 48 h。对平板中出现凹陷的菌株进行

收稿日期:2008-12-10 修回日期:2009-05-19

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A407);国家贝类产业技术体系(NYCYTX-47)

通讯作者:赵晶, Tel:0592-2187420, E-mail: sunnyzhaoj@xmu.edu.cn

纯化分离,选取凹陷最大的一株进行后续实验。

1.3 菌株形态观察

将经过筛选所确定的菌株,平板划线 28 ℃ 培养 48 h,革兰氏染色后,观察菌株形态。

1.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、序列测定以及同源性分析

16S rRNA 基因的 PCR 扩增 取 2 μL 发酵菌液加入 50 μL 灭菌蒸馏水中,99 ℃ 高温裂解 15 min,5 000 × g 离心 10 min 后取上清进行后续 PCR 扩增。采用细菌 16S rRNA 通用引物 27 F/1492 R,PCR 反应体系及条件参考文献[8]的方法。

回收和测序 PCR 产物经纯化回收后,进行克隆,克隆序列送至公司(上海生工)测定完成。所得 16S rRNA 序列,通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 与数据库中已知序列进行同源性比较。将该序列提交 EMBL 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/embl/>),获得登录号 AM946640。

1.5 酶活力测定

在 4 ℃ 将发酵液以 6 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。取 1 mL 粗酶液用 pH 7.4 的 PBS 稀释 50 倍,取 0.5 mL 稀释酶液分装进试管。在试管中加入等量的 0.5 % 琼脂糖底物,于 50 ℃ 的水浴中反应 30 min;水解产生的还原糖采用改进的 DNS 法测定^[9]。将试管置于 100 ℃ 沸水浴中灭活显色 5 min;冷却至室温,取上清液稀释至 25 mL,测波长 520 nm 处的吸光值。以煮沸灭活酶液为对照,以半乳糖制作标准曲线,根据标准曲线确定酶降解底物产生的还原糖的量。在上述反应条件下,1 mL 酶液 1 min 产生 1 μg 还原糖作为一个活力单位。以下所有酶活力测定实验中,每组均采用 3 个平行样。

酶活公式: 酶活力(U/mL) = $\Delta A \times 1000 \times n/k \cdot t$ 。其中,ΔA 为产生的还原糖的吸光值,n 为酶液的稀释倍数,t 为酶反应时间,k 为标准曲线的斜率。

1.6 生长曲线与产酶曲线的测定

在发酵培养 12 h 之后,每隔 4 h 取样一次,3 000 r/min 离心 5 min,无菌生理盐水悬浮沉淀,以生理盐水为对照,于波长 600 nm 处测吸光值,同时测定其粗酶液的酶活。

1.7 发酵条件优化

通过设计不同的培养条件,对培养温度、时

间、pH 进行了一系列实验研究。通过单因素实验确定该菌产酶培养基的海水盐度、碳源及氮源。利用正交实验确定最佳培养基的组成和配比。

2 结果

2.1 菌株的筛选及初步鉴定

从杂色鲍不同部位分离到多株产琼胶酶菌,其中一株菌株 MA-B22,在平板上能够形成规则的黄色圆形菌落,其边缘整齐、湿润,且水解坑明显,可使菌落周围的琼胶培养基形成较深的釜底形凹陷,并形成直径达 20 mm 的水解透明圈(图 1),琼胶降解能力强。革兰氏染色鉴定结果表明该菌为阴性菌,形态呈杆状。

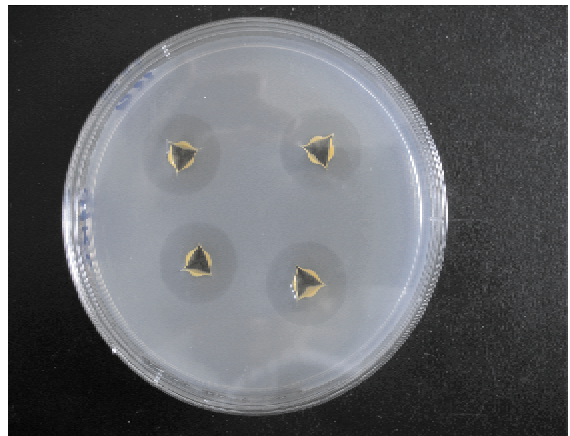


图 1 MA-B22 降解琼脂产生的凹陷
Fig.1 Photograph of strain MA-B22 with agarase activity

2.2 16S rRNA 序列鉴定菌株

该菌株的 PCR 产物经克隆测序后,通过 NCBI Blast 与数据库中已知序列进行同源性比对,结果显示该菌株即 MA-B22 与 Yoon 等^[10]从海水中分离出的新菌属 *Tamlana agarivorans* sp. nov. 的相似性最高,达到 99 %,初步鉴定为 *Tamlana* sp.。

2.3 菌株 MA-B22 生长和产酶曲线

实验结果表明,菌株 MA-B22 的生长与产酶活性并非呈完全的正相关(图 2)。该菌株的生长符合细菌生长曲线的规律,随着培养时间的增长,菌体的生长量逐渐增大,24 h 后增长速度趋缓,当培养 48 h 时,细菌达到最大量,随后进入衰亡期。而从图 1 中可以看出,最大产酶活力的培养时间是 60 h,酶活力达到 343.44 U/mL。

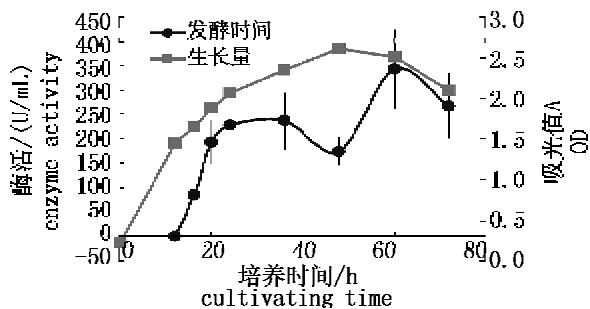


图2 发酵时间对细菌产酶的影响
Fig. 2 Effect of cultivating time on the production of agar enzyme and growth

2.4 发酵温度对菌株 MA-B22 产酶的影响

菌株在 16 ~ 30 °C 下均能生长,当温度达 40 °C 左右时,细菌几乎不生长。如图 3 所示,菌体在 25 °C 下培养具有最高的产酶活力,说明其符合海洋细菌的特性。

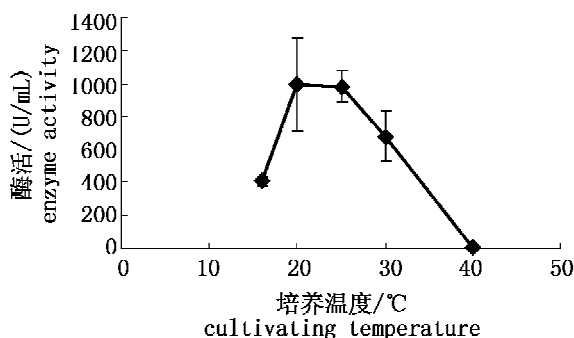


图3 发酵温度对细菌产酶的影响
Fig. 3 Effect of cultivating temperature on the production of agar enzyme

2.5 培养基起始 pH 对菌株 MA-B22 产酶的影响

如图 4 所示,不同起始 pH 值下培养细菌,其产酶活力不同。该菌株在 pH 值为 6 时具有最高的产酶活力,且具有一定的 pH 适应范围,但过酸或者过碱都不利于细菌的发酵产酶。

和硝酸钠作为氮源分别对菌株进行发酵培养,测定酶活力。结果如图 6 所示,该菌株利用蛋白胨和牛肉膏为氮源时,均具有较高的产酶活力。而牛肉膏能使菌株的产酶能力更高。

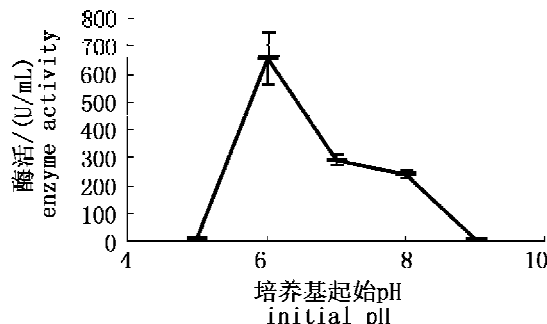


图4 培养基起始 pH 对细菌产酶的影响
Fig. 4 Effect of initial pH on the production of agar enzyme

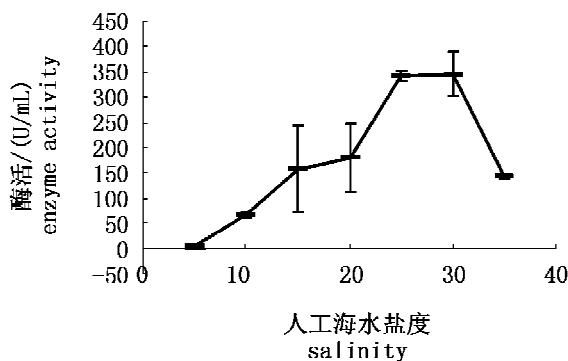


图5 不同盐度人工海水对细菌产酶的影响
Fig. 5 Effect of artificial seawater with various salinity on the production of agar enzyme

2.6 人工海水盐度对菌株 MA-B22 产酶的影响

通过设定人工海水不同盐度梯度来配制发酵培养基,结果表明不同盐度对细菌的发酵产酶有着重要影响(图 5),人工海水盐度为 25 时细菌具有较高的产酶活力。

2.7 氮源对菌株 MA-B22 产酶的影响

氮源是培养基中不可缺少的组成部分。实验中分别以四种常见氮源:牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵

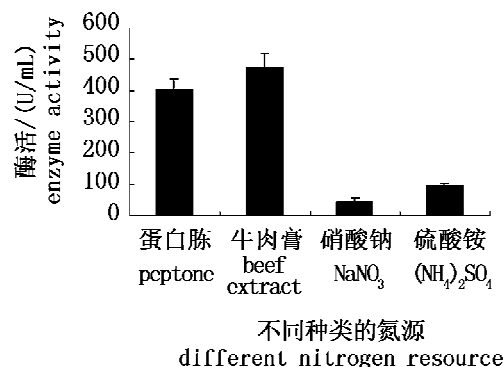


图6 氮源对细菌产酶的影响
Fig. 6 Effect of different nitrogen resources on the production of agar enzyme

不同牛肉膏即氮源浓度培养的菌株产酶活力也不同。在一定范围内(1 % ~ 8 %),提高牛肉

膏的浓度,对细菌产酶具有促进作用;但超过一定的浓度之后,细菌的产酶活力随着牛肉膏浓度的升高而下降(图7),最适的牛肉膏浓度为8‰。

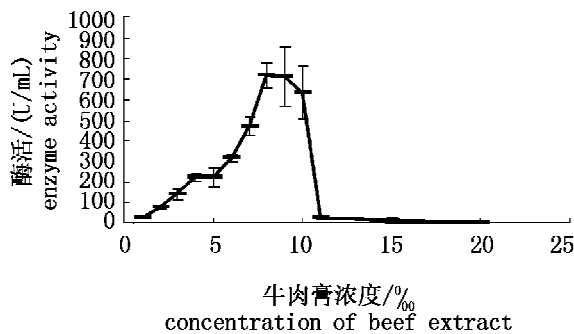


图7 不同浓度牛肉膏对细菌产酶的影响
Fig.7 Effect of different concentration of beef extract on the production of agar enzyme

2.8 碳源对菌株 MA-B22 产酶的影响

选择六种碳源作为唯一碳源来培养菌株,通过比较产酶活力发现,在琼脂作为唯一碳源的培养基中细菌具有最高的产酶活力(图8)。

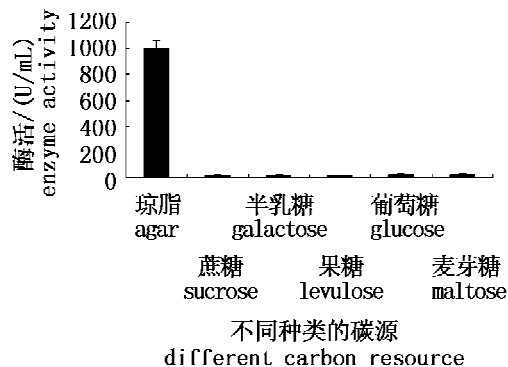


图8 不同碳源对细菌产酶的影响
Fig.8 Effect of different carbon resources on the production of agar enzyme

不同琼脂粉浓度对菌株的产酶活力也有影响(图9)。当琼脂浓度为2.5‰时,菌株的产酶活力最高。

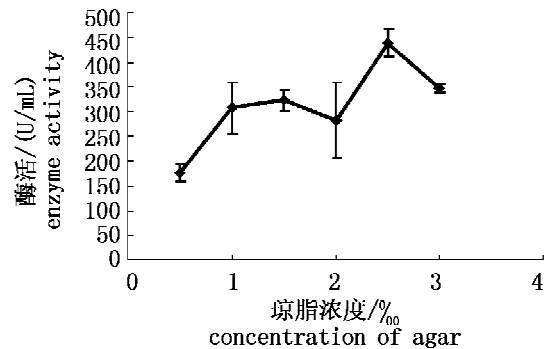


图9 不同浓度琼脂对细菌产酶的影响
Fig.9 Effect of different concentration of agar on the production of agar enzyme

2.9 正交实验确定最佳产酶培养基

通过单因素实验选择琼胶作为最佳碳源、牛肉膏作为最佳氮源及不同氯化钠浓度的变化,进行3因素3水平的正交实验,以确定3种因素对菌株发酵条件的综合影响。正交实验结果和方差分析见表1和表2。从表2中可以看出,琼脂和氯化钠浓度对菌株的产酶条件影响显著,而氮源牛肉膏在一定的饱和范围内影响很小。最佳的培养基组合为琼脂2.5‰,牛肉膏6‰,氯化钠25‰。

2.10 最优条件下菌株 MA-B22 的产酶活力

通过采用上述实验获得的最优培养条件对该菌进行培养,其产酶活力可达1021.79 U/mL,比未进行优化之前的酶活力提高了8.82倍。

表1 正交实验结果
Tab.1 Orthogonal test result

组号 no.	琼脂(‰) agar	牛肉膏(‰) beef extract	氯化钠(‰) NaCl	酶活力(U/mL) enzyme activity
1	1.5	6	25	691.67
2	1.5	8	30	500.28
3	1.5	10	35	537.07
4	2	6	30	616.83
5	2	8	35	756.81
6	2	10	25	808.69
7	2.5	6	35	790.13
8	2.5	8	25	834.36
9	2.5	10	30	746.11
K1	576.340	699.543	778.240	
K2	727.443	697.150	621.073	
K3	790.20	697.290	694.670	
R	213.86	2.393	157.167	

表 2 正交实验方差分析表
Tab.2 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 source of variance	偏差平方和 square deviations	自由度 degree of freedom	方差 variance	F 值 F value
琼脂 agars	72 506. 716	2	12 084. 443	20. 369 *
牛肉膏 beef extract	10. 825	2	1. 804	0. 003
氯化钠 NaCl	37 101. 775	2	6 183. 655	10. 423 *
误差 error ratio	7 119. 26	2		
总和 sum	116 738. 576	8		

注: * 表示差异显著

Notes: * Means significant difference

3 讨论

迄今为止,琼胶酶主要通过海洋微生物获得。杜宗军^[11]等对青岛近海海水中琼胶降解细菌进行系统的分离,从中选出 15 株有代表性的菌株,分别属于 *Cellulophaga*, *Cytophaga*, *Microbulbifer*, *Glaciecola*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas* 和 *Agarivorans* 共 8 个属。而研究最多、最深入的如弧菌属 (*Vibro*)、假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*) 和噬胞菌属 (*Cytophaga*) 等均为常见属。本文从杂色胞体内筛选出多株琼胶降解酶,经过比较不同菌株产生水解透明圈的大小初步判断其降解琼胶能力,对其中一株具有高效产琼胶酶能力的菌株 MA-B22 进行深入研究,经 16 SrRNA 序列鉴定其隶属于黄杆菌科的一个新属 *Tamlanu*,目前国内外尚未见该菌属相关酶活力及产酶条件的报道。而黄杆菌科具有琼胶酶活性的报道仅为 Jam 等^[12]从海水中分离的一株细菌 *Zobellia galactanivorans*。

在菌株 MA-B22 培养过程中,其生长曲线与产酶活力并不呈完全的正相关。在菌体生长 48 h 到最大量时,酶活性出现下降,而在 60 h 重新达到高峰。这与付万冬等^[13]报道的琼胶降解细菌的特性不同。从产酶曲线可以初步分析,12 ~ 48 h 是该细菌的对数生长期,48 h 后进入稳定期,至 60 h 的酶活力达到最大。推测 MA-B22 菌株在利用琼脂为碳源进行生长和降解时可能产生不同的酶,因此,随着培养时间的推移该菌分泌不同琼胶酶,其酶活也不同。由于该菌为产生琼胶酶的新菌属,其产酶种类和酶性质国内外都未见报道,

需要进一步的研究。

在选择碳源实验中,选择六种碳源分别来培养菌株,通过比较产酶活力发现,在琼胶作为唯一碳源的培养基中细菌的产酶活力最高。这与国内学者汤海青等^[14]从青岛近海的红藻 (*Gelidium amansii*) 中筛选到的海洋琼胶降解菌 AT-22 不同,AT-22 在培养过程中,以葡萄糖为唯一碳源时,菌体繁殖旺盛,但琼胶酶活力极差。而 MA-B22 在其他唯一碳源条件下,基本不生长,表明琼脂为该菌株的依赖碳源,这与该菌株具有高效降解琼胶的特性相符。而不同的琼脂浓度对产酶活力也有一定影响。当琼脂浓度较低时,培养基黏度小、通气量大,使菌体利用琼胶的速度加快,所以在一定范围内提高浓度,利于诱导细菌产酶。但随着培养基中琼脂浓度的增加,培养基黏度增大,通气量降低,菌体难以被诱导产生酶,降解琼胶产生的小分子还原糖难以维持细菌正常的代谢活动,所以浓度 0.25 % 的琼胶是最适合 MA-B22 生长的碳源。

琼胶降解菌的产酶活性主要是采用 DNS 法测定被降解的还原糖含量来计算的。国内外学者将在相应反应条件下 1 mL 酶液 1 min 产生 1 μ g 还原糖定义为一个酶活单位。菌株 MA-B22 具有初始高效产生琼胶酶的能力,在初筛过程中,该菌已表现出高效的产酶活力,测定其酶活达 115.84 U/mL,在最优条件下的酶活可达 1021.79 U/mL,产酶活力提高了 8.82 倍。与国内外琼胶降解菌产酶活力比较, *Bacillus* sp. MK03^[15] 为 14.1 U/mL; *Alteromonas* sp. E-1^[16] 为 58.4 U/mL; *Vibrio* sp. Strain JT0107^[17] 为 66 U/mL;

Agarivorans albus YKW-34^[18]为83 U/mL,本菌株的产酶活力具有一定的优势。目前我国尚未有工业用的琼胶酶菌株,所需产品均来自外国公司,价格昂贵,本株琼胶降解细菌 MA-B22 培养条件简单,稳定性好,产酶时间长,具有一定的生产潜力,为进一步开发海洋琼胶酶资源提供潜在的基础材料。

通过单因子实验和正交实验优化了菌株 MA-B22 的发酵培养基组成为:琼脂 2.5%,牛肉膏 6%,氯化钠 25%,且琼胶和氯化钠浓度对菌株的产酶条件影响显著。菌株 MA-B22 最适的发酵条件为:培养基 pH 6,25℃,摇床转速 180 r/min,接种量 1%,150 mL 装液量 30 mL,培养 60 h。从实验结果可以看出,该菌株适合培养范围广。海水盐度 25~30,发酵温度 20~30℃均可产生较强的酶活性。琼胶降解酶作为鲍的消化酶之一,在鲍养殖过程中有一定的应用前景。本实验从鲍体内特别是肠道分离出多株琼胶降解菌,MA-B22 作为其中一株能高效产生琼胶降解酶的菌株,可能是潜在的益生菌,帮助鲍消化饵料或产生拮抗物质制约有害细菌的繁殖,有利于鲍的健康繁殖。该菌株的开发有可能为改善鲍肠道菌群结构、提高饵料利用率起到一定的作用。

参考文献:

- [1] Groleau D, Yaphe W. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of beta neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*[J]. *Can J Microbiol*,1977, 23(6): 672-679.
- [2] Vera J, Alvarez R, Murano E, et al. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* and characterization of its extracellular agarase [J]. *Appl Environ Microbiol*,1998,64(11): 4378-4383.
- [3] Buttner M J, Fearnley I M, Bibb M. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis[J]. *J Mol Gen Genet*,1987, 209(1): 101-109.
- [4] Potin P, Richard C, Rochas C, et al. Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (cataldi), strain GJ1B[J]. *Eur J Biochem*, 1993,214(2): 599-607.
- [5] Naganuma T, Coury D A, Polne-Fuller M, et al. Characterization of agarolytic microscilla isolates and their extracellular agarases[J]. *Systematic and Applied Microbiology*,1993,16(2):183-190.
- [6] Aoki T, Araki T, Kitamikado M. Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2[J]. *Eur J Biochem*, 1990, 187(2): 461-465.
- [7] Qhta Y, Nogi Y. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(5): 1973-2081.
- [8] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1992, 89:5685-5689.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. *Anal Chem*, 1959,31:426-428.
- [10] Yoon J H, Kang S J, Lee M H, et al. *Tamlana agarivorans* sp. nov., isolated from seawater off Jeju Island in Korea[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008,58(8):1892-1895.
- [11] 杜宗军,赵苑,李美菊,等.青岛近海琼胶降解细菌的筛选和多样性分析[J].*中国海洋大学学报*,2007,37(2):277-282.
- [12] Jam M, Flament D, Allouch J, et al. The endo-beta-agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours[J]. *Biochem J*,2005,385(3): 703-713.
- [13] 付万冬,韩宝芹,王常红,等.琼胶降解酶 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[J].*海洋与湖沼*,2007,38(4): 343-350
- [14] 汤海青,管斌,王雪鹏,等.琼胶降解菌 AT-22 的筛选和产酶性质[J].*中国水产科学*,2005,12(2):216-219
- [15] Hisashi S, Yoshinori S, Tohru S, et al. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,2003,95(4):328-334.
- [16] Kirimura K, Masuda N, Iwasaki Y, et al. Purification and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999,87(4):436-441.
- [17] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification

and Characterization of a New Agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59 (5):1549-1554.

[18] Fu X T, Lin H, Kim S M. Purification and characterization of a novel β -agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78:265-273.

Isolation and identification of a bacterium MA-B22 producing agarase and the optimal cultivation of enzyme production

LU Bin, KE Cai-huan, YANG Ming, KANG Kang, ZHAO Jing

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Agarase plays a key role in degrading many complex polysaccharides. The screening of agar-degrading bacteria from marine environment and organisms becomes an important means. A gram-negative bacterial strain, MA-B22 with high agarase activity was isolated from small abalone *Haliotis diversicolor*. By 16S rRNA analysis, this strain has 99% homology to *Tamlana agarivorans* sp. nov., it was named *Tamlana* sp. in this report. Under 2216E medium, the optimal temperature, pH value and culture time are 25 °C, 6.0 and 60h respectively. With one-factor-at-a-time method and orthogonal designed experiment, the optimal compositions of the ferment medium were confirmed. It contained 2.5‰ agar, 6.0‰ beef extract based on the salinity of 25. The highest enzyme activity of agarase was detected by DNS method at 1021.79 U/mL, which is 8.82 times higher than before. MA-B22 demonstrated high-performance characteristics of enzyme production. This is the first report on the agar-degrading *Tamlana* sp. and optimal cultivation to enhance its enzyme activity. The results provide a basis for constructing engineering bacterium for expression agarase genes and potential probiotics of abalone aquaculture in the future.

Key words: agarase; enzyme activity; culture medium