

海洋细菌 *Bacillus* sp. H-TP2 岩藻多糖酶的生产和酶学性质*

王 鹏^{1,2} 蔡敬民¹ 秦 松³ 吴茜茜¹ 吴 克¹ 王 锐² 徐 涤³

(合肥学院生物化学系,合肥 230022) (兰州大学生命科学学院,兰州 730000)

(中国科学院海洋研究所,青岛 266071)

摘 要 研究了海洋细菌 *Bacillus* sp. H-TP2 液态发酵生产岩藻多糖酶的条件,并对酶学性质进行了初步探讨。主要包括氮源、碳源、起始 pH、温度、盐浓度和添加物等对产酶的影响。培养基组成为:岩藻多糖 3g/L、尿素 5g/L、 NH_4NO_3 2g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g/L、 Na_2HPO_4 0.5g/L、葡萄糖 0.4g/L、蛋白胨 4g/L。菌种在 20℃,起始 pH 7.0,1.25 倍海水盐度下培养 24 h,酶活力可以达到 1.29 IU/mL。另外,该酶的最适反应温度为 50℃,最适反应 pH 为 6.5。

关键词 海洋细菌,岩藻多糖酶,发酵条件,*Bacillus* sp.

从褐藻如海带中可以提取岩藻多糖,它的主要成分是 L-岩藻糖,线性主链是岩藻吡喃环以 α -1,3-糖苷键连接而成的含硫岩藻的多糖,其中可能还夹杂着半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸等。低分子质量的岩藻多糖具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒的功效^[1~5],同时,它在抑制补体激活、吸收重金属、抑制精卵接合等方面有很好的功效^[6]。

岩藻多糖酶(E.C.3.2.1.44)可通过生物降解岩藻多糖得到低分子质量的岩藻糖聚合物。已有报道,可通过鲍鱼肝胰腺^[8]、细菌^[9]和真菌^[10]得到此酶。目前,尚未见国内有关海洋细菌发酵生产岩藻多糖酶的研究报道。课题组从德国北海、波罗的海和我国渤海海域的海水、海藻及污泥中分离纯化了 100 余株海洋细菌,对其产酶情况进行了分析研究。文中报道了 1 株自青岛海域分离的海洋细菌 *Bacillus* sp. H-TP2 发酵生产岩藻多糖酶的条件及酶学性质。

1 材料与方法

1.1 菌 种

自山东青岛太平角采集后分离获得,通过 16S rRNA 序列分析鉴定为 *Bacillus* sp.

1.2 培养基

菌种培养基(g/L):牛肉膏 3、蛋白胨 10、琼脂 20。

基础培养基(FS 培养基),g/L^[9]:岩藻多糖 3、 NH_4NO_3 2、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2、 Na_2HPO_4 0.5。

1.3 培养条件

菌株在固态培养基上分离、纯化,经活化后接入液体培养基中,在 20℃,150 r/min 的摇床中培养,实验采用 25mm × 200mm 规格的试管摇瓶培养,产酶曲线实验采用 100 mL 发酵液/250 mL 三角瓶。

1.4 主要试剂与材料

海带岩藻多糖^[11]:鲜海带洗净干燥后粉碎,用 90℃ 水浸提 10 h 后离心得上清液,再用水/醇法分级沉淀,乙醇终体积分数为 75% 时静置过夜,离心得沉淀用无水乙醇洗涤数次,冷冻干燥得到岩藻多糖,并用淀粉酶去除淀粉。

Fucus vesiculosus 岩藻多糖、L-岩藻糖、木聚糖均为 Sigma 公司产品;D(+)木糖为德国 Merck 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

16C14 型 721 分光光度计,上海精密科学

第一作者:硕士研究生(蔡敬民教授为本文通讯作者)。

* 教育部留学回国人员科研启动基金、安徽省优秀青年科技基金(No.04043051),安徽省自然科学基金项目(No.03043104)

收稿时间 2003-11-17,改回时间 2003-12-18

仪器有限公司 ; LGJ-10 冷冻干燥机 ,北京四环科学仪器厂 ; SHY-2A 水浴恒温振荡器 ,江苏金坛市金城国胜科学仪器厂 ; LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌器 ,上海化线医用核子仪器有限公司 ; HZQ-F160 全温振荡培养箱 ,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.5 测定方法

岩藻多糖酶活力的测定 :采用 DNS 法 ,在 1 mL 1.0%(pH 6.5 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液) *Fucus vesiculosus* 岩藻多糖液中加入 0.1 mL 酶液 ,在 50℃ 下振荡反应 10min ,加入 3mL DNS 试剂 ,在 100℃ 下水浴 10 min ,加入 16.4 mL 蒸馏水 ,用灭活酶液作对照测定光吸收值。酶活力定义为 :在本试验条件下 ,每分钟释放 1 μmol 还原糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(IU/ mL)。

总糖含量的测定 :取发酵液加入 3 倍体积的 3% 的 H_2SO_4 ,120℃ 下酸解 30 min ,再按 DNS 法测定还原糖的量。

生物量的测定 :以培养基做对照 ,在 440nm 处测定菌液的相对 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 碳源对海洋细菌 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

在 FS 培养基的基础上 ,改变不同的碳源 ,检测 H-TP2 菌株的产酶情况。由表 1 可以看出 ,此菌对于木聚糖和昆布多糖具有弱的分解能力 ,在以其他多糖和单糖为唯一碳源时不产酶。试验结果显示 ,岩藻多糖酶系诱导酶 ,只有在岩藻多糖底物存在的条件下才能大量产生。

表 1 碳源对 H-TP2 菌的岩藻多糖酶产量的影响

碳 源	岩藻多糖酶 相对活力 / %	起始 pH	终止 pH
岩藻多糖	100.00	6.7	7.0
葡萄糖	0.01	6.3	5.8
木 糖	0.02	5.5	5.1
木聚糖	22.22	6.3	7.0
昆布多糖	29.63	5.8	5.1
羧甲基纤维素钠	0.05	5.8	4.1
甘 油	0.11	6.3	7.0

2.2 碳源浓度对 H-TP2 产酶的影响

将岩藻多糖作为唯一碳源 ,分别按

0.05%、0.1%、0.3%、0.5% 和 0.8% 的浓度配置培养基。如图 1 所示 ,0.3% 时酶活力最高。

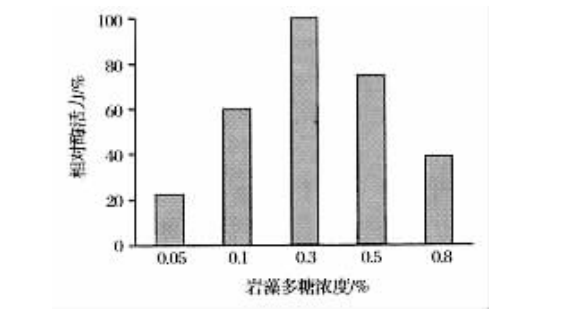


图 1 碳源浓度对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

2.3 氮源对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

通过改变 FS 培养基的氮源 ,分别以 0.2% 的 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、蛋白胨为唯一氮源。尿素和蛋白胨对酶活的提高影响最大 ,相对 FS 培养基中使用的 NH_4NO_3 氮源 ,可提高酶活力 50% 以上。此外 ,这 2 种培养基的发酵终止 pH 值均 > 7.0 ,呈弱碱性。

表 2 氮源对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

氮 源	岩藻多糖酶相对活力 / %	起始 pH	终止 pH
NH_4NO_3	100.00	6.5	6.7
NaNO_3	96.15	6.5	6.7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	69.23	7.0	6.5
尿 素	153.85	6.5	8.0
蛋白胨	150.00	7.3	7.2

2.4 氮源浓度对 H-TP2 产酶的影响

根据 2.3 节的研究结果 ,选用尿素作为氮源 ,并进一步研究尿素浓度对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响。如图 2 所示 ,0.5% 尿素的培养基最适合于 H-TP2 产岩藻多糖酶 ,产酶活力可达 0.92 IU/mL。

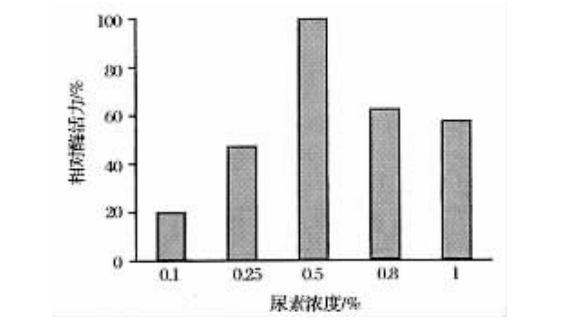


图 2 氮源浓度对 H-TP2 产酶的影响

进一步向培养基中添加不同浓度的蛋白胨,发现当添加量达到 0.4% 时,酶活力可以达到 1.15 IU/mL。

2.5 添加葡萄糖对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

葡萄糖对于微生物的初期生长,以及迅速提高生物量具有重要的作用。但是,易利用的碳源对许多酶的生物合成具有阻遏作用。本试验在原培养基基础上添加少量的葡萄糖,可以看到它有利于 H-TP2 菌产酶。

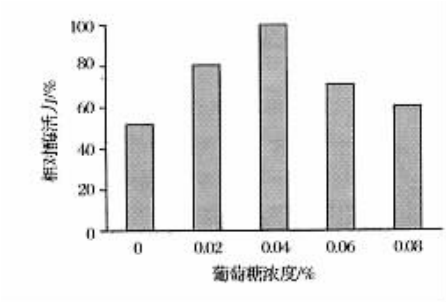


图 3 葡萄糖对 H-TP2 产酶的影响

2.6 培养温度对 H-TP2 产酶的影响

图 4 显示了在不同的培养温度下 H-TP2 产酶的情况。20℃ 时,产酶效果最好,这可能与 H-TP2 生长的海洋环境有关。

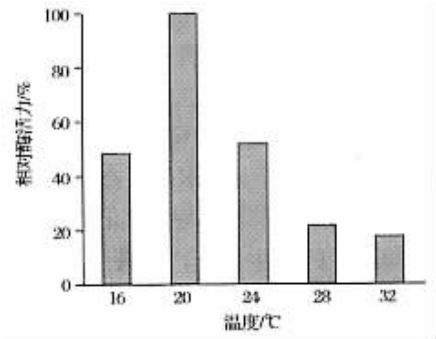


图 4 培养温度对 H-TP2 产酶的影响

2.7 发酵起始 pH 值对产酶活力的影响

海水的 pH 范围大致在 7.2 ~ 8.3 左右,海洋细菌最适宜生活的 pH 值与此关系密切。试验中将培养基的初始 pH 值分别调整到 5、6、7、8、9,如图 5 所示。初始 pH 值为 7 的培养基最有利于菌体产酶。此外,通过测定酶活时的终止 pH 值发现, pH 值都比初始值高出 0.5 左右,

这是由于菌体利用培养基中的尿素,使培养基 pH 值升高。

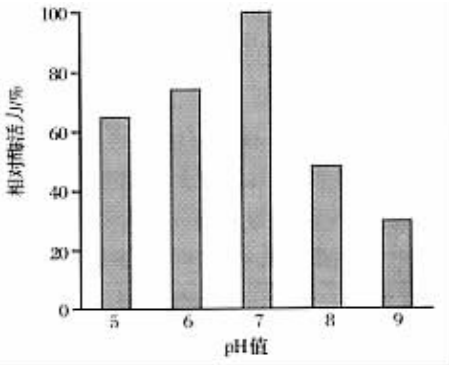


图 5 起始 pH 对 H-TP2 产酶的影响

2.8 不同海水浓度对 H-TP2 菌产酶的影响

海水浓度与海洋细菌的生长密切相关,这也是区分海洋菌与淡水菌的重要标志。试验改变了培养基的海水浓度,如图 6 所示。H-TP2 菌株在 1.25 倍海水浓度的环境下酶活最高,同时也表明了此菌株是典型的海洋细菌,具有耐高渗透压的特性。

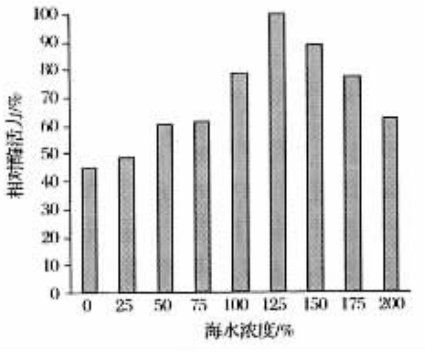


图 6 海水浓度对 H-TP2 产酶的影响

2.9 通气量对 H-TP2 菌产酶的影响

试验采用 25mm × 200mm 规格的试管摇菌培养,选择不同体积的装液量将改变菌株的溶氧量,溶氧量对好氧细菌的生长具有十分重要的作用。在本试验条件下,装液量为 10 mL 时酶活力最高。

2.10 岩藻多糖酶的产酶曲线

在优化培养基条件下,对 H-TP2 进行培养,代谢与产酶情况如图 7 所示。在 0 ~ 24 h,菌株迅速生长,总糖含量从 0.398 g/L 开始下降,残

还原糖量上升至 0.292 g/L,这可能与菌株分解岩藻多糖产生大量还原糖有关,此时,发酵液中的总糖也大量转变为还原糖,这也为菌株生长提供了大量的能源物质。pH 值从 7.2 降至 6.8。到 24 h 时,细菌生长进入平衡期,产酶也达到最高值 1.29 IU/mL,随后酶活呈明显下降趋势,pH 值上升,残还原糖量减少,生物量在 36 h 后进入衰退期。

表 3 通气量对 H-TP2 产岩藻多糖酶的影响

装液量/mL	相对酶活力/%
6	64.20
8	96.30
10	100.00
12	72.84
14	57.41

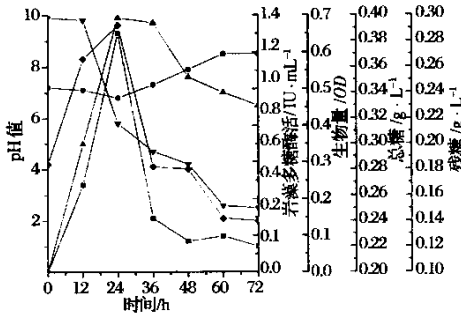


图 7 优化培养条件下的产酶曲线

可以看到,H-TP2 的岩藻多糖酶的生物合成与生长是同步的,属于同步合成型酶。

2.11 岩藻多糖酶初步酶学性质

2.11.1 反应温度对酶活力的影响

将发酵培养液于 5000 r/min 离心 10 min,去除菌体,以上清液做粗酶液,分别在不同温度条件下测定岩藻多糖粗酶的活力,结果如图 8 所示。在 50℃ 下,岩藻多糖粗酶的酶活力最高。

2.11.2 反应 pH 值对酶活力的影响

实验中分别配置了不同 pH 值的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液组成的 1% 的岩藻多糖液,在 50℃ 下测定不同 pH 值对岩藻多糖粗酶活力的影响,如图 9。可以看到,岩藻多糖粗酶在弱酸 (pH6.5) 时酶活力最高。

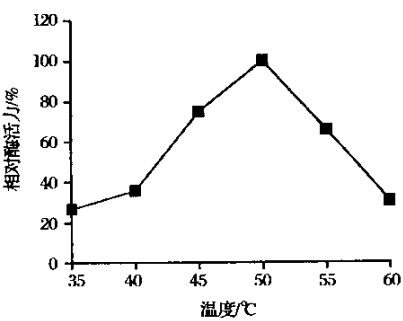


图 8 温度对岩藻多糖粗酶活性的影响

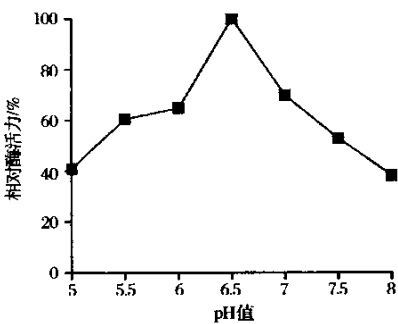


图 9 pH 对岩藻多糖粗酶活性的影响

3 结 语

岩藻多糖存在于褐藻之中,主要含 2 种岩藻多糖分子,一种是 F-岩藻多糖,成分主要是含硫酸岩藻糖;另一种是 U-岩藻多糖,其中 21% 的成分是葡萄糖醛酸。本课题组研究采用微生物酶法生产低分子质量岩藻多糖已经获得成功^[1]。

已有部分有关海洋细菌和真菌产岩藻多糖酶的报道,但产酶活力均不是很高。目前,首先要建立高产菌株的筛选方法,优化其发酵条件,研究不同来源的微生物所产岩藻多糖酶的水解性质和底物特异性,同时,要研究硫酸酯酶和岩藻糖苷酶的生物合成条件,尽量降低二者的活力,提高岩藻多糖酶的活力。

褐藻中的大多数在我国都是传统的食品,如羊栖菜、海带、裙带菜、鹿角菜等,在食品工业生产中,岩藻多糖是生产褐藻酸盐的副产品,来源是很充足的,这些也都为工业化制备低分子质量的岩藻多糖创造了良好的条件。目前,岩藻多糖作为治疗心血管和肾衰方面的药物已经

进入临床试验阶段,低分子质量的岩藻多糖的工业化生产将有助于加速这一多糖药物的开发和应用^[1~3,12~14]。

参 考 文 献

- 1 Chevolot L, Foucault A, Chaubet F et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity [J]. Carbohydr Res, 1999, 319: 154 ~ 165
- 2 Mauray S, de Raucourt E, Talbot J et al. Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1378: 184 ~ 194
- 3 Nishino T, Yamauchi T, Horie M et al. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA [J]. Thromb Res, 2000, 99: 623 ~ 34
- 4 Baba M, Snoeck R, Pauwels R et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1988: 1742 ~ 1745
- 5 Lynch G, Low L, Li S et al. Sulfated polyanions prevent HIV infection of lymphocytes by disruption of the CD4-gp 120 interaction, but do not inhibit monocyte infection [J]. J Leukoc Biol, 1994, 56(3): 266 ~ 272
- 6 陈秋, 钱凯先. 褐藻中岩藻聚糖和岩藻多糖的结构与功能的研究 [J]. 东海海洋, 2001, 19(2): 10 ~ 14
- 7 蔡敬民, 秦松, 吴克等. 微生物酶法制备低分子量岩藻多糖工艺 [P]. 中国发明专利, 2003, 申请号 03112609.X
- 8 Kitamura K, Matsuo M, Yasui T. Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(11): 1829 ~ 1934
- 9 Shin-ichi Furukawa, Tatsuo Fujikawa, Daizo Koga et al. Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5 [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(8): 1499 ~ 1503
- 10 吴克, 刘斌, 吴茜茜等. 海洋真菌 *Dendryphiella arenaria* TM94 产岩藻多糖酶发酵及酶学性质 [J]. 生物学杂志, 2003, 20(2): 14 ~ 16
- 11 吴茜茜, 吴克, 蔡敬民等. 海带岩藻多糖的分离与部分性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(10): 39 ~ 42
- 12 张尔贤, 范益华. 鼠尾藻醇提取物的生理活性和若干生化性质研究 [J]. 药物生物技术, 1994, 1(1): 30 ~ 34
- 13 杨晓林, 孙菊云, 许汉年等. 褐藻糖胶的免疫调节作用 [J]. 中国海洋药物, 1995, 14(3): 9 ~ 13
- 14 李德远, 徐现波, 熊亮等. 海带的保健功效及海带生理活性多糖研究现状 [J]. 食品科学, 2002, 23(7): 151 ~ 154

Fermentation of Marine Bacterium *Bacillus* sp. H-TP2 and the Fucoidanase Properties

Wang Peng^{1,2} Cai Jingmin¹ Qin Song³ Wu Qianqian¹
Wu Ke¹ Wang Rui² Xu Di³

(Department of Biochemistry, Hefei University, Hefei, 230022)

(School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, 730000)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

ABSTRACT Liquid state fermentation conditions for marine bacteria *Bacillus* sp. H-TP2 that produces fucoidanase were studied. The optimum condition of fermentation components were as follow (g/L): fucoidan 3, urea 5, NH_4NO_3 2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, Na_2HPO_4 0.5, glucose 0.4, peptone 4. The activity of fucoidanase could reach 1.29 IU/mL when cultured at 20°C for 24 hours. The optimum pH and temperature of fucoidanase were 6.5 and 50°C respectively.

Key words marine bacterium, fucoidanase, fermentation conditions, *Bacillus* sp.