

研究报告

Research Report

产褐藻胶裂解酶海洋细菌的筛选和鉴定

宋鑫^{1,2} 秦送玉² 朱军² 黄惠琴² 孙前光² 鲍时翔^{2*}

1 海南大学环境与植物保护学院, 海口, 570228; 2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口, 571101

* 通讯作者, baoshixiang@itbb.org.cn

摘要 褐藻胶是广泛存在于各种褐藻中的一类多糖物质,其降解产物褐藻寡糖具有抗肿瘤、抗凝血、抗氧化和促进植物根部生长等作用,应用前景广阔。本研究以褐藻胶为单一碳源,从腐烂的马尾藻及其生境底泥中共筛选获得褐藻胶降解细菌18株。采用95%酒精处理褐藻胶裂解酶检测平板,水解圈与菌落的直径比值(D/d)≥5的有13株,D/d≥8的有3株。采用DNS法测定细菌的褐藻胶裂解酶活力,菌株DB15913的活力最高,达到15.42 U/mL。依据菌体形态、生理生化特征和16S rDNA序列分析,鉴定菌株DB15913为*Cobetia amphilecti*。

关键词 马尾藻属,褐藻胶裂解酶,鉴定,*Cobetia amphilecti*,酶活力

Screening and Identification of Marine Bacteria Producing Alginate Lyase

Song Xin^{1,2} Qin Songyu² Zhu Jun² Huang Huiqin² Sun Qianguang² Bao Shixiang^{2*}

1 College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, 570228; 2 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, 571101

* Corresponding author, baoshixiang@itbb.org.cn

DOI: 10.13417/j.gab.035.000907

Abstract Alginate is a kind of polysaccharide which widely exists in various kinds of brown algae. Alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase have lots of activities such as anti-tumor, anti-coagulation, anti-oxygenation and promotion for growth of plant roots. In this study, 18 bacteria were screened from rotten sargasso and its biotope using sodium alginate as the sole carbon source. By the method of 95% alcohol processing test, the result showed that the diameter ratios of hydrolyzation circle and colony (D/d) of 13 strains were larger than 5 and that of 3 strains (D/d) were larger than 8. By the method of DNS colorimetry, the fermentation broth showed that the enzyme activity of strain DB15913 reached 15.42 U/mL. According to morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, strain DB15913 was identified as *Cobetia amphilecti*.

Keywords *Scagassum*, Alginate lyase, Identification, *Cobetia amphilecti*, Enzyme activity

褐藻胶是由1,4-β-D-甘露糖醛酸(1,4-β-D-mannuronic acid, M)和1,4-α-L-古罗糖醛酸(1,4-α-L-guluronic acid, G)两种糖醛酸单体通过α/β-1,4糖苷键链接,随机排列成的线性高分子,无分支和侧链(Gacesa, 1992),是一种极具应用价值的多糖类物质。大分子的褐藻胶可以被降解成由2~20单糖聚合而成的寡糖片段,从而表现出多种生物活性,在食品、医疗及工业生产等行业应用广泛。常用的褐藻胶降

解方法有物理降解法(Holme et al., 2003; 蒋林斌和谢天俊, 2000)、化学降解法(杨钊等, 2004)和生物降解法(Nakada and Sweeny, 1967),工业生产现主要以物理降解法和化学降解法为主,但物理降解法操作复杂,对设备要求较高,难以将褐藻胶完全降解(Toshio et al., 1983);化学降解法中酸降解法较为常用,但降解反应条件剧烈,降解后产生的废弃物较多,对环境有较大的危害(Rehm, 1998)。生物降解法尤其是微生

物降解褐藻胶 因其专一性高、反应条件温和以及褐藻寡糖得率高等优点,受到越来越多的关注。

褐藻胶裂解酶来源广泛,如海洋和土壤微生物(Dong et al., 2012; 黄李淑馨等, 2013; 王熙涛等, 2014, 中国饲料, (4): 27-31)、海洋动物(朱仁华, 1983, 海洋学报(中文版), 5(Sup): 899-906)等。微生物是褐藻胶裂解酶的重要来源之一,包括海洋弧菌(李京宝等, 2003)、交替假单胞菌(Li et al., 2011)、盐单胞菌(李恒等, 2014)等。但现有微生物源的褐藻胶裂解酶依然存在着酶活力较低、作用位点单一等缺陷,因此寻找新的产褐藻胶裂解酶菌株以及不同类型的褐藻胶裂解酶是当下研究的热点和趋势。本研究从海洋大型褐藻——马尾藻及其生境底泥混合样品中分离能降解褐藻胶的细菌,并对酶活较高的菌株 DB15913 通过形态学和 16S rDNA 系统发育分析进行了鉴定,对其产酶能力进行初步测定,为褐藻胶裂解酶的生产 and 工业应用提供了一个新的菌种资源。

1 结果与分析

1.1 产酶菌株的初筛

通过以 0.5%褐藻酸钠为唯一碳源的培养基定向分离,从腐烂的马尾藻及其生境底泥混合样品中共分离得到 18 株细菌。将 18 株细菌点接在初筛平板上,用 95%酒精处理后均显现出明显的水解圈,其中水解圈与菌落的直径比值 $D/d \geq 5$ 的有 13 株, $D/d \geq 8$ 的有 3 株(图 1)。水解圈显现出两种明显不同的类型,一般认为古罗糖醛酸特异性的褐藻胶裂解酶产生白色圈状水解圈,而甘露糖醛酸特异性的褐藻胶裂解酶产生白色环状水解圈(Hisano et al., 1994) (图 2)。初筛得到的 18 株细菌中,菌株 DB15899、DB15901、DB15902 表现为甘露糖醛酸特异性(EC4.2.2.3),其余菌株表现为古罗糖醛酸特异性(EC4.2.2.11)。

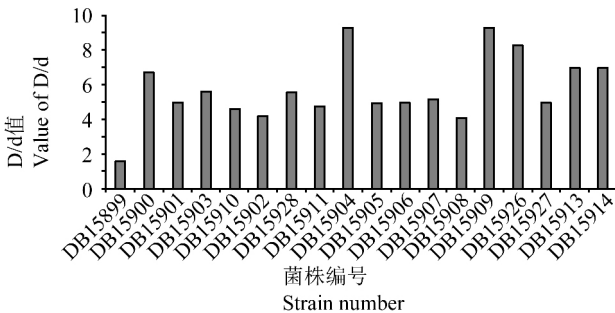


图 1 产酶细菌水解圈与菌落直径比值(D/d)

Figure 1 Diameter ratios of hydrolyzation circle and colony (D/d) of enzyme-producing bacteria

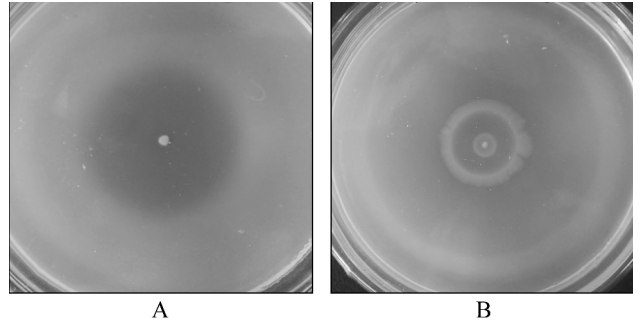


图 2 两种不同褐藻胶裂解酶活性水解圈

注: A: 古罗糖醛酸特异性; B: 甘露糖醛酸特异性

Figure 2 Two kinds of hydrolyzation circles of different alginate lyases

Note: A: Guluronate-specific alginate lyase; B: Mannuronate-specific alginate lyase

1.2 产酶菌株的复筛

选取 $D/d \geq 5$ 并且生长良好的 6 株细菌,采用 DNS 法测定其褐藻胶裂解酶酶活,其中菌株 DB15913 酶活最高,达到 15.42 U/mL (图 3)。

1.3 菌株 DB15913 的形态学特征及部分生理生化特征

菌株 DB15913 在以褐藻胶为单一碳源的分离培养基上生长良好,菌落圆形,直径 2~3 mm,乳白色或乳黄色,半透明,表面光滑、湿润、无褶皱。菌苔粘稠,不易挑起。菌体短小呈椭圆形,革兰氏阴性菌(图 4)。菌株 DB15913 可在 20~42℃ 的温度范围及 0%~20% 的 NaCl 浓度范围内生长,最适温度为 25℃,最适 pH 为 8.5。其余生理生化特征列于表中(表 1)。

1.4 16S rDNA 与系统发育分析

菌株 DB15913 测序后序列已提交到 GenBank 数据库中,登录号为 KU529687。将序列在 Eztaxon 数据库中比对后结果显示菌株 DB15913 与 *Cobetia amphilecti* 同源性最高,达到 99.72%。与 *Cobetia litoralis*、*Cobetia marina*、*Cobetia pacifica* 同源性均为 99.58%。

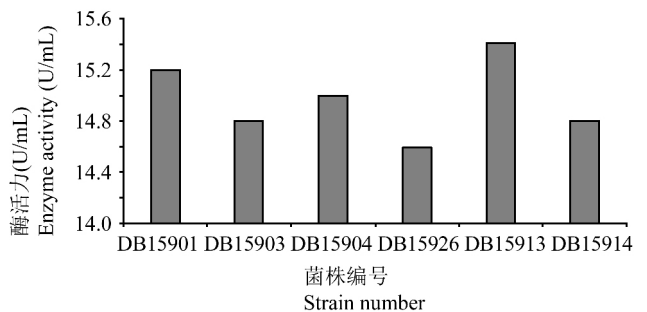


图 3 产酶细菌的褐藻胶裂解酶活力

Figure 3 Alginate lyase activity of enzyme-producing bacteria

表 1 菌株 DB15913 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain DB15913

鉴定项目	鉴定结果	鉴定项目	鉴定结果
Identification items	Identification results	Identification items	Identification results
V.P	-	蔗糖	+
M.R	+	Sucrose	
产吲哚实验	-	山梨醇	-
Indole production		Sorbitol	
明胶液化	-	阿拉伯糖	+
Gelatin liquefaction		Arabinose	
硝酸盐还原	+	葡萄糖	+
Nitrate reduction		Glucose	
接触酶	+	乳糖	+
Catalase		Lactose	
氧化酶	-	甘露醇	+
Oxidase		Mannitol	
柠檬酸盐利用	-	果糖	+
Citrate utilization		Fructose	
淀粉水解	-		
Hydrolysis of starch			

注：“+”表示阳性或能够利用；“-”表示阴性或不能利用

Note: +: Positive; -: Negative

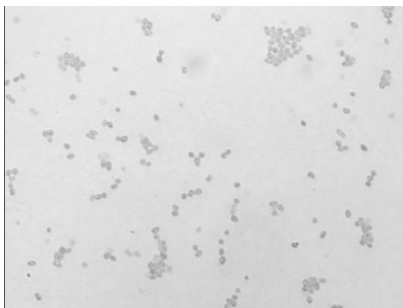


图 4 菌株 DB15913 的显微形态(x1 000)

Figure 4 The microscopic morphology of strain DB15913 (x1 000)

从系统发育树可以看出，菌株 DB15913 与 *Cobetia amphilecti* 聚为同一分支，亲缘关系最近(图 5)。结合菌株形态特征和生理生化特征，鉴定菌株 DB15913 属于 *Cobetia* 属，为 *Cobetia amphilecti*。

2 讨论

本研究以褐藻酸钠为单一碳源，从海南岛腐烂的马尾藻和马尾藻生境底泥混合样品中共分离出 18 株可降解褐藻酸钠的细菌。通过平板水解圈初筛和液体发酵复筛，获得一株褐藻胶裂解酶活性较高的菌株 DB15913。测定菌株酶活时发现，当褐藻胶裂解酶将培养基中的褐藻胶降解成小分子的寡糖时，经过 95%酒精的处理，会在培养基上形成水解圈，理论上

如果酶活性越高，水解圈越大，水解圈与菌落直径的比值(D/d)较能准确的表示酶活力的大小。但是将图 2 和图 3 的数据对比后发现，6 株细菌的 D/d 值与酶活力值并没有呈现出线性关系。菌株 DB15904 的 D/d 值最大达到了 9.33，但其褐藻胶裂解酶活力为 15.01 U/mL，低于菌株 DB15913 的 15.42 U/mL。分析其原因可能为菌株在培养基上形成的水解圈会受到多方面的影响，比如菌株分泌褐藻胶裂解酶有快有慢、培养基的均匀程度不同、培养基的薄厚不均一等都会使水解圈产生不同的变化，导致 D/d 值与酶活力值不成线性相关，甚至同一菌株不同平行间的 D/d 值也会有一定幅度的变化。因此，D/d 值只可以作为大批量初筛时的参考指标，必须结合酶活值才能确定菌株的酶活力高低。最终测定菌株 DB15913 褐藻胶裂解酶活力为 15.42 U/mL，后期可经过优化发酵培养基和发酵条件进一步提高酶活力。

经过菌株形态学观察、生理生化特征鉴定和 16S rDNA 系统发育分析，鉴定菌株 DB15913 为 *Cobetia amphilecti*。现已报道的褐藻胶裂解酶多是从海带、以褐藻为食的海洋动物和土壤中获得，产褐藻胶裂解酶的菌株多为弧菌属和假单胞菌属。*Cobetia* 属的报道较少，*Cobetia amphilecti* 未见有报道，也未见从热带马尾藻生境中分离得到产褐藻胶裂解酶细菌的报

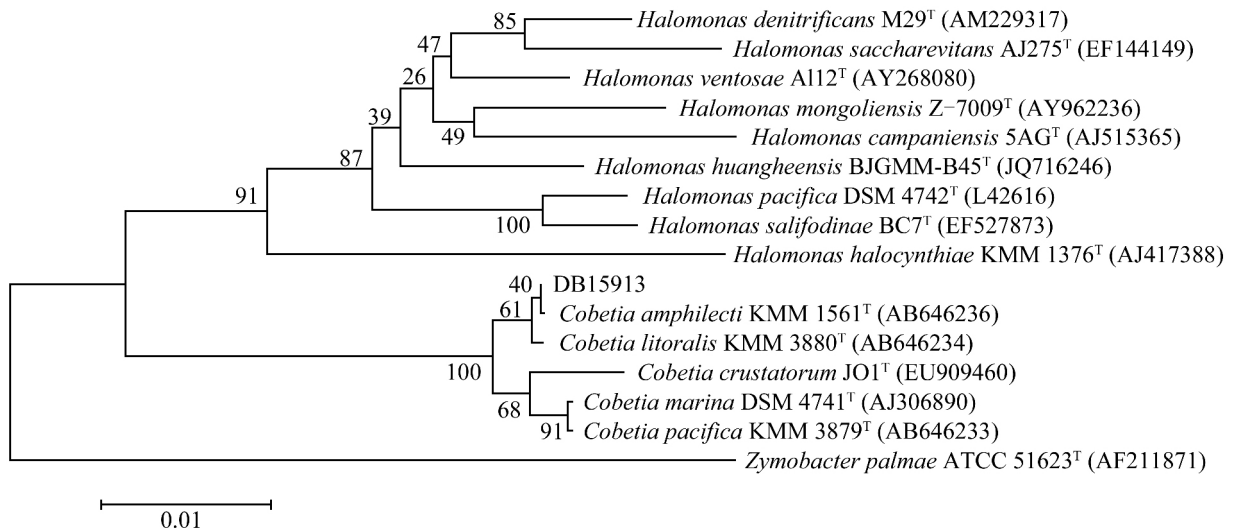


图5 菌株 DB15913 系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of strain DB15913

道,本研究为褐藻胶裂解酶的生产 and 应用提供了新的材料来源和菌种资源。

3 材料与amp;方法

3.1 样品来源

本实验所用的马尾藻及其所在生境底泥样品,均采自海南省儋州市海头镇沿海区域。此区域人为干扰较少,较能避免外界因素对样品的影响。

3.2 主要试剂与培养基

海藻酸钠购自上海源叶生物科技有限公司;β,5-二硝基水杨酸购自国药集团化学试剂有限公司;2×Es Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司;DM2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;16S rDNA 基因扩增引物由生工生物工程股份有限公司合成,其余试剂均为国产分析纯。

分离培养基:褐藻酸钠 5 g、(NH₄)₂SO₄ 5 g、K₂HPO₄ 2 g、NaCl 5 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL pH 7.5。初筛培养基与分离培养基相同。种子培养基和发酵培养基为不添加琼脂的分离培养基。所有培养基 121℃湿热灭菌 20 min。

3.3 产酶菌株的分离

将采回的马尾藻样品与其生境底泥样品充分混合,置于塑料箱中,静置 3 d,使藻体自然腐烂。称取 10 g 混合样品,置于装有 90 mL 无菌水及玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中,200 r/min 振荡 30 min,使样品分散均匀。静置震荡后的悬液 5 min,使较大颗粒物质

沉降,取上清液做 10 倍梯度稀释。取原液、10⁻¹、10⁻² 三个稀释度涂布于分离平板,每个稀释度设 3 个平行。将平板置于 28℃培养箱中培养 3~5 d,挑选生长状态良好、形态不同的菌落进行划线培养,经多次纯化后得到纯的菌株。

3.4 产酶菌株的初筛

用灭菌牙签挑取待检测菌落点接到初筛平板上,28℃培养 3 d。使用 95%酒精处理平板显现水解圈,分别测量菌落直径(d)和水解圈直径(D),以水解圈直径和菌落直径比值(D/d)作为初筛指标。

3.5 产酶菌株的复筛

选取生长良好、水解圈明显的菌株,转接至种子培养基中,28℃、200 r/min 振荡培养 24 h。按照 3% 接种量将种子液接种于液体发酵培养基中,28℃、200 r/min 振荡培养 3 d。取发酵液,4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液测定褐藻胶裂解酶酶活,以酶活力大小作为复筛指标。

绘制葡萄糖标准曲线,采用 DNS 法测定粗酶液中褐藻胶裂解酶酶活。每组添加 2 mL 0.3%褐藻酸钠,0.5 mL 粗酶液。实验组 40℃水浴 30 min 后添加 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 3 min。对照组不水浴直接添加 1.5 mL DNS 试剂后沸水浴 3 min。冷却后定容到 25 mL,在 520 nm 波长下比色,对照标准曲线求出褐藻胶酶活力。定义 1 个酶活单位(U)为酶在最适反应温度下,单位时间内将底物水解产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。DNS 试剂采用 Ghose 法配置(王俊丽等,2010),静置 7~10 d 后使用。

3.6 菌株 DB15913 的形态学观察及生理生化特征鉴定

对复筛选取出的菌株,观察其固体培养基上菌落形态。用光学显微镜对菌株的菌体形态进行显微观察。部分生理生化特征鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英,2001,科学出版社,pp.364-398)。

3.7 菌株 DB15913 16S rDNA 序列测定与系统发育树构建

挑取待测序菌株至装有 500 μ L 发酵培养基的 2 mL 离心管中,28 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 24 h,以菌液作为 DNA 模板进行 16S rDNA 的菌液 PCR 扩增。所用引物为 P1/P6, P1 :AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT ;P6 :TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min ; 94 $^{\circ}$ C 1 min ,58 $^{\circ}$ C 1 min ,72 $^{\circ}$ C 2 min ,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 GenBank 中进行序列比对,比对结果使用 Clustal X 进行多序列比对,并使用 MEGA5.0 软件进行聚类分析和同源性分析,以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,确定菌株的种属分类(宋敏等,2015)。

作者贡献

宋鑫负责本研究的实验方案设计、实验操作、文献查阅和论文撰写工作;朱军和黄惠琴负责实验指导和论文的修改,秦送玉参与了部分实验研究,孙前光负责实验材料的采集和前期处理;鲍时翔为通讯作者并负责实验方案的确定和论文修改与审核。

致谢

本研究由海洋公益性行业科研专项(2014418-0402)、海洋经济创新发展区域示范项目(12PYY001-SF08)、海南省科技兴海专项(XH201408)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ITBB2015RC07;1630052015038)共同资助。

参考文献

Dong S., Yang J., Zhang X.Y., Shi M., Song X.Y., Chen X.L., and Zhang Y.Z., 2012, Cultivable alginate lyase-excreting bacteria associated with the Arctic brown alga *Laminaria*, *Mar. Drugs*, 10(11): 2481-2491

Gacesa P., 1992, Enzyme degradation of alginates, *International Journal of Biochemistry*, 24(4): 545-552

Hisano T., Nishimura M., Yamashita T., Imanaka T., Muramatsu T., Kmiura A., and Murata K., 1994, A simple method for determination of substrate specificity of alginate lyases, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(2): 182-184

Holme H.K., Lindmo K., Kristiansen A., and Smidsrød O., 2003, Thermal depolymerization of alginate in the solid state, *Carbohydrate Polymers*, 54(4): 431-438

Huang L.S.X., Liu G., Yue M., Cao H.L., Tan H.D., Zhao X.M., Yin H., and Du Y.G., 2013, Isolation and identification of alginate lyases-producing bacteria, *Shipin Gongye Keji (Science and Technology of Food Industry)*, 34(23): 147-151 (黄李淑馨, 刘钢, 岳敏, 曹海龙, 谭海东, 赵小明, 尹恒, 杜昱光, 2013, 产褐藻胶裂解酶菌株的分离与鉴定, *食品工业科技*, 34(23): 147-151)

Jing L.B., and Xie T.J., 2000, The study on bleaching technological condition of extracting sodium alginate from sargassum, *Guangxi Nongye Shengwu Kexue (Journal of Guangxi Agriculture and Biological Science)*, 19(1): 51-55 (蒋林斌, 谢天俊, 2000, 从马尾藻中提取褐藻酸钠的漂白工艺条件研究, *广西农业生物科学*, 19(1): 51-55)

Li H., Zhu S.T., Liu X.M., Gong J.S., Jiang M., Xu Z.H., and Shi J.S., 2014, Identification of an alginate lyase producing strain *Halomonas* sp. WF6 and fermentation optimization, *Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi (China Biotechnology)*, 34(9): 94-101 (李恒, 朱思婷, 刘旭梅, 龚劲松, 蒋敏, 许正宏, 史劲松, 2014, 褐藻胶裂解酶产生菌的分离鉴定及产酶发酵优化, *中国生物工程杂志*, 34(9): 94-101)

Li J.W., Dong S., Song J., Li C.B., Chen X.L., Xie B.B., and Zhang Y.Z., 2011, Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524, *Mar. Drugs*, 9(1): 109-123

Li J.B., Yu W.G., Han F., Han W.J., Song K., 2003, Purification and characterization of a novel alginate lyase from marine *Vibrio* sp. QY102, *Weishengwu Xuebao (Acta Microbiologica Sinica)*, 43(6): 753-757 (李京宝, 于文功, 韩峰, 韩文君, 宋凯, 2003, 从海洋中分离的弧菌 QY102 褐藻胶裂解酶的纯化和性质研究, *微生物学报*, 43(6): 753-757)

Nakada H.I., and Sweeny P.C., 1967, Alginate acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas, *J. Bio. Chem.*, 242(5): 845-851

Rehm B.H., 1998, Alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* CF1/M1 prefers the hexameric oligomannuronate as substrate, *FEMS Microbiol. Lett.*, 165(1): 175-180

Song M., Huang H.Q., Liu M., Zou X.X., Sun Q.G., and Bao S.X., 2015, Diversity and nematicidal activity analysis of bacillus-like species in Yongxing island soil, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(3): 535-540 (宋敏, 黄惠琴, 刘敏, 邹潇潇, 孙前光, 鲍时翔, 2015, 永兴岛土壤芽胞杆菌多样性与抗线虫活性分析, 基

基因组学与应用生物学, 34(3): 535-540)

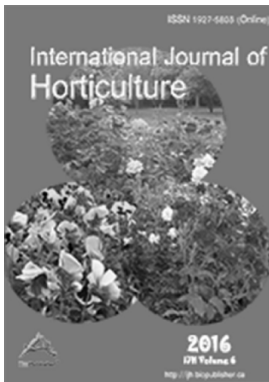
Toshio Y., Keiko N., Kengo T., and Takemasa K., 1983, Ultrasonic degradation of schizophyllum commune polysaccharide in dilute aqueous solution, *J. Appl. Polym. Sci.*, 28(2): 873-878

Wang J.L., Nie G.X., Cao X.L., Zhang J.X., and Zhang P.F., 2010, Effects of different DNS reagents in determination of xylose content, *Shipin Yanjiu Yu Kaifa (Food Research and*

Development), 31(7): 1-4 (王俊丽, 聂国兴, 曹香林, 张建新, 张朋飞, 2010, 不同 DNS 试剂测定木糖含量的研究, *食品研究与开发*, 31(7): 1-4)

Yang Z., Li J.P., Zhang Z.Q., and Guan H.S., 2004, Oxidation depolymerization-a new method for preparation of alginate oligosaccharides, *Haiyang Kexue (Marine sciences)*, 28(7): 19-22 (杨钊, Li Jinping, 张真庆, 管华诗, 2004, 一种新的褐藻胶寡糖制备方法 - 氧化讲解法, *海洋科学*, 28(7): 19-22)

International Journal of Horticulture (IJH)



International Journal of Horticulture (ISSN 1927-5803) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal publishes all the latest and outstanding research articles, letters and reviews in all aspects of horticultural and its relative science, containing horticultural products, protection; agronomic, entomology, plant pathology, plant nutrition, breeding, post harvest physiology, and biotechnology, are also welcomed; as well as including the tropical fruits, vegetables, ornamentals and industrial crops grown in the open and under protection.

Email: edit@ijh.biopublisher.ca

Web: <http://ijh.biopublisher.ca>