

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :140 - 148; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140309

一株产卡拉胶酶细菌的分离鉴定及其酶学性质

许彩云¹, 朱艳冰^{1,2}, 倪辉^{1,2}, 蔡慧农^{1,2}, 李利君^{1,2}, 肖安风^{1,2*}

¹集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

²福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021

摘要:【目的】从红树林土壤腐叶中分离出能够产生卡拉胶酶的菌株, 对其进行鉴定, 并研究其酶学性质。【方法】利用以卡拉胶为唯一碳源的培养基, 分离出产卡拉胶酶的菌株; 通过形态学观察、16S rDNA 序列分析对其进行种属鉴定; 对该菌株所产卡拉胶酶进行纯化并采用 DNS 测酶活的方法测定酶学性质。【结果】从红树林土壤腐叶中分离出 1 株高产 κ -卡拉胶酶的菌株 ASY5, 经鉴定该菌株为假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp. ASY5)。纯化得到的 κ -卡拉胶酶的分子量约为 30 kDa; 酶学性质试验表明, 其最适反应温度和 pH 分别为 60℃ 和 7.5, 在 50℃ 以下酶的稳定性较好, 在 pH 7.0 - 9.0 范围内酶活力较稳定, 对 κ -卡拉胶具有良好的底物特异性, 以 κ -卡拉胶为底物时 K_m 值和 V_{max} 值分别为 2.28 mg/mL 和 147.06 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等对酶活有显著的促进作用, 而 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 及 SDS 对酶活有强烈的抑制作用。【结论】分离到的细菌假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的 κ -卡拉胶酶在较高的温度和碱性条件下均具有较高的酶活性, 为利用卡拉胶水解酶产生卡拉寡糖的研究和应用奠定了基础。

关键词: κ -卡拉胶酶, 分离, 鉴定, 酶学性质

中图分类号: Q814 文章编号: 0001-6209 (2015) 02-0140-09

卡拉胶是从某些红藻的细胞壁中提取到的一种由 1,3- β -D-吡喃半乳糖和 1,4- α -D-吡喃半乳糖交替连接而成的线性硫酸多糖^[1]。根据其二糖单元上所含的硫酸基团的数量、位置和内醚环的有无, 卡拉胶可分为 κ - λ - ι - α - β - γ - δ - ν - ω - π 等类型, 工业上生产和使用的卡拉胶主要为 κ - λ -和 ι -3 种类型^[2]。卡拉胶是性质最丰富的多糖之一, 具有生物相容性、生物降解性、高保水性、高的凝胶强度, 可以作为凝胶剂、稳定剂和乳化剂, 被广泛应用于食品工业、化妆品工业及制药领域^[3]。研究表明, 卡拉

胶降解形成的寡糖具有多种新型生理活性, 如抗氧化^[4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤^[6]、免疫调节^[7]和促进植物生长^[8]等。

目前降解卡拉胶获得卡拉寡糖的方法主要有化学降解法、超声降解法和酶降解法^[9]。由于化学降解法降解产物复杂, 反应剧烈, 反应条件不易控制, 污染环境等, 影响了其在工业化生产中的应用^[9]。酶法降解则具有反应条件温和, 具有高度专一性和高效性, 易于控制等优点。因此利用卡拉胶酶制备卡拉胶寡糖, 成为卡拉胶工业高值化研究的重要方

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20120005); 厦门南方海洋研究中心项目 (13GZP004NF10)

* 通信作者。E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn

作者简介: 许彩云 (1988 -), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向为农业生物技术。E-mail: xcy841029@163.com

收稿日期: 2014-06-17; 修回日期: 2014-09-28

向^[10]。目前卡拉胶酶的研究主要集中在产酶菌株的分离及酶学性质方面,但是获得的卡拉胶酶活性低,稳定性差,易受各种金属离子及蛋白抑制剂的抑制,对卡拉胶底物的亲和力差,限制了卡拉胶酶的商品化及工业化应用。因此获得能够高效降解卡拉胶的菌株和活性高、稳定性好的卡拉胶酶具有重要的科研价值和应用价值。本文从红树林土壤腐叶中分离出1株能够产生卡拉加酶的细菌,对其进行种属鉴定及卡拉胶酶酶学性质研究,为工业化生产卡拉胶酶及酶法制备卡拉胶寡糖奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:采集自福建厦门集美海边滩涂生长红树林的土壤、腐叶。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒(广州东盛生物科技有限公司);Biometra PCR仪(德国);TaqDNA聚合酶(TaKaRa公司);Centrifuge 5415D小型高速离心机(德国Eppendorf Co., Ltd);CL-40L型AUTOCLAVE(ALP Co., Ltd);HH-6数显恒温水浴锅(厦门精艺兴业科技有限公司);Five Easy实验室pH计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);WFJ-7200型可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);

1.1.3 培养基:(1)富集培养基(g/L):牛肉膏10,胰蛋白胨10,NaCl 21.1,KCl 0.58,CaCl₂ 0.811,MgCl₂·6H₂O 3.6,NaHCO₃ 0.083,MgSO₄·7H₂O 2.625,调pH到7.3。固体培养基在富集培养基中加入2%琼脂粉。(2)筛选培养基(g/L):κ-卡拉胶12,NaCl 15,NaNO₃ 20,CaCl₂ 0.1,MgSO₄·7H₂O 0.5,FeSO₄·7H₂O 0.004,K₂HPO₄·12H₂O 1。(3)发酵培养基:文献[11]中干酪素调整为胰蛋白胨,λ-卡拉胶调整为κ-卡拉胶。

1.2 菌株的分离和筛选

称取0.3g新鲜土壤腐叶,用生理盐水水洗后9800×g离心5min,弃上清,此过程重复4次。将处理后的样品转入装有50mL富集培养基的250mL三角瓶中,于20℃,180r/min摇床振荡培养。待培养基浑浊后取1mL菌液于新鲜的富集培养基中,重复3-4次,对明显浑浊的培养液,用无菌生理盐水适当稀释后,取0.1mL涂布筛选平板,

20℃培养36h,观察菌落形态,挑选周围形成明显水解圈或凹坑的菌落接种至富集培养基,20℃培养60h后划线富集平板,20℃培养36h后,获得卡拉胶降解菌的纯培养。

取卡拉胶降解菌纯培养物接种到发酵培养基中,20℃振荡培养72h。发酵液9800×g离心10min,取上清作为粗酶液,用DNS法测定卡拉胶酶活力。

酶活力定义为:每分钟催化产生1μmol还原糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.3 形态学观察

在菌株生长平板上观察菌落形态。再经过革兰染色,通过光学显微镜观察菌体形态特征。

1.4 基因组的提取与16S rDNA鉴定

菌株培养至OD₆₀₀达到0.6-0.8后用细菌基因组提取试剂盒提取基因组DNA,再进行PCR扩增,引物为一对细菌通用引物27F和1492R。PCR反应采用50μL的体系:10×rTaq DNA聚合酶缓冲液5μL,10mmol/L4种dNTPs混合液4μL,10μmol/L正向和反向引物各4μL,rTaq DNA聚合酶(5U/μL)0.4μL,模板1μL,无菌水31.6μL。PCR程序:95℃5min;94℃45s,55℃45s,72℃1.5min,30个循环;72℃10min。PCR产物测序由上海英骏生物技术公司完成。将得到的16S rDNA序列在GenBank数据库BLAST比对获得相似性高的序列,用MEGA6.06的Neighbor-joining法构建系统发育树。

1.5 κ-卡拉胶酶的分离纯化

1.5.1 硫酸铵沉淀:发酵液4℃,12000×g离心20min,30%硫酸铵冰浴搅拌1h,4℃静置4h;4℃,12000×g离心20min,取上清,80%硫酸铵冰浴搅拌1h,4℃静置过夜;4℃,12000×g离心20min,取沉淀,用pH8.0的Tris-HCl(0.05mol/L)缓冲液复溶,透析。

1.5.2 离子交换层析:透析后的溶液过0.8μm水膜,上样于0.05mol/L pH7.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠(PBS)缓冲液平衡的DEAE sepharose fast flow进行离子交换层析,层析用的缓冲液体系A液为0.05mol/L pH7.0的PBS,B液为含有117g/L NaCl的0.05mol/L pH7.0的PBS,进行梯度洗脱,流速为1mL/min,分部收集洗脱液,测定各组分酶活。

1.5.3 凝胶过滤层析:将上步得到的活性组分超滤

浓缩后进行凝胶过滤层析,其中 Superdex G-75 用含有 0.15 mol/L NaCl 的 pH 7.0 的 PBS(0.05 mol/L) 缓冲液平衡,上样量 0.5 mL,以平衡液洗脱,流速 0.3 mL/min,检测收集物活性。以上层析纯化操作均在 4℃ 进行。

1.5.4 SDS-PAGE:使用不连续的垂直电泳系统对纯化的卡拉胶酶进行 SDS-PAGE,分离胶丙烯酰胺浓度为 12%,电泳后用考马斯亮蓝 R-250 进行染色、脱色,凝胶成像仪进行分析。

1.6 卡拉胶酶学性质

1.6.1 温度对卡拉胶酶活性及稳定性的影响:粗酶液分别在反应温度为 35、40、45、50、55、60、65 和 70℃ 条件下测定酶活,以最高酶活为 100%。同时粗酶液分别在 50、55、60 和 65℃ 下处理不同的时间,取样在最适反应温度下测定残余酶活,以未处理时酶活为 100%。所有测定均重复 3 次取平均值。

1.6.2 pH 对卡拉胶酶活性及稳定性的影响:用不同 pH 的缓冲体系配制 0.5% 卡拉胶底物,在最适反应温度下测定酶活,以最高酶活为 100%。缓冲液体系分别为 50 mmol/L 的乙酸-乙酸钠 (pH 4.0 - 5.8)、Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 5.8 - 8.0)、Tris-HCl (pH 7.5 - 9.0) 和甘氨酸-NaOH (pH 8.6 - 12.0)。pH 稳定性的研究通过将酶液与不同 pH 的缓冲液等比例混合后 4℃ 放置 24 h,测残余酶活力,以未处理时酶活力为 100%。所有测定均重复 3 次取平均值。

1.6.3 金属离子对卡拉胶酶活性的影响:粗酶液透析后,使反应体系中 NaCl 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.2、3、4 和 5 mol/L, KCl 终浓度分别为:1、10、50、100、150、200 和 250 mmol/L, SDS、EDTA 与其他金属离子的终浓度为 1 mmol/L,以未加任何金属离子的酶活为 100%。所有测定均重复 3 次取平均值。

1.6.4 底物特异性实验:纯化酶分别与 0.5% 的 κ-卡拉胶、ι-卡拉胶、琼胶、褐藻胶、岩藻聚糖、羧甲基纤维素、淀粉反应测定其酶活。以最高酶活为 100%。所有测定均重复 3 次取平均值。

1.6.5 酶促反应动力学参数的测定:用 50 mmol/L pH7.5 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液分别配制 κ-卡拉胶含量为 0.1%、0.125%、0.2%、0.25%、0.5%、1% 的底物,与纯化酶在最适温度和 pH 下反应后测定酶活力,采用双倒数法求出米氏常数 K_m。所有测

定均重复 3 次取平均值。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离和筛选

将样品处理后富集培养,以 κ-卡拉胶为唯一碳源的筛选培养基进行分离,根据菌落周围水解圈或凹坑的大小初步判断菌种降解卡拉胶的能力,获得产生水解圈直径较明显的菌株 5 株。经酶活测定后,确定酶活力最高且较稳定的菌株 ASY5,故选该菌株进一步研究。

2.2 形态学观察与 16S rDNA 鉴定

在卡拉胶固体培养基上,菌落湿润,呈乳白色,半透明,有光泽,表面光滑,边缘整齐,菌落直径约 1 cm,在卡拉胶平板上能够形成明显的水解圈和凹坑;革兰氏染色呈阴性,为短杆状。

菌株的 16S rDNA 序列鉴定结果上传至 GenBank(登录号为 KJ747189),序列大小为 1403 bp。将该序列进行 BLAST 比对,再用 MEGA6.06 的 Neighbor-joining 构建系统发育树(图 1)。从进化树中可看出与该菌株最为接近的细菌种属均属于假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* sp.,这与 BLAST 比对结果一致,结合形态学特征,将该细菌鉴定为假交替单胞菌属,并将其命名为 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5。

2.3 κ-卡拉胶酶的分离纯化

经过硫酸铵沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析纯化后的蛋白的 SDS-PAGE 电泳图出现单一条带(图 2),分子量大约为 30 kDa。

2.4 温度对卡拉胶酶活性及稳定性的影响

Liu 等^[12]从腐烂海藻中分离的 *Pseudoalteromonas porphyrae* LL1 产生的 κ-卡拉胶酶的最适温度为 55℃,50℃ 处理 1 h 酶彻底失活;LI 等^[13]研究的 *Pseudoalteromonas* sp. QY203 产生的耐热 κ-卡拉胶酶的最适温度是 45℃,50℃ 处理 1 h 酶活残余 40% 以下;Yao 等^[14]从卡拉胶生产基地沉积物分离出 *Cellulophaga lytica* strain N5-2,其产生的 κ-卡拉胶酶最适温度为 35℃,50℃ 处理 1 h 酶活残余 40% 以下。

由图 3-A 可以看出,*Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶在一定范围内,随着温度的升高,酶的催化能力也随之升高,并在 60℃ 活性达到最高,

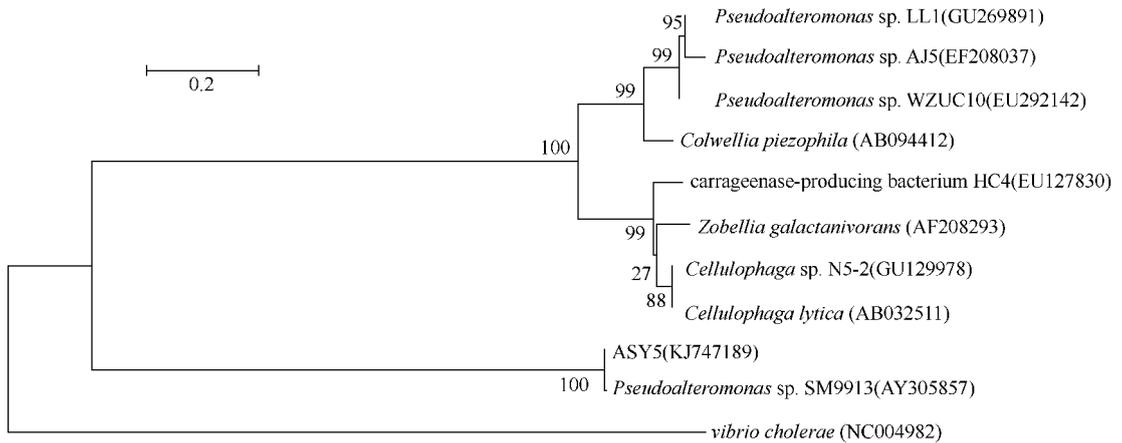


图 1. 基于 16S rDNA 序列和邻接法构建的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences and Neighbor-Joining analysis. ASY5 is experimental strain. Number in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentages supported by bootstrap. Bar, 20% sequence divergence.

超过 60℃ 酶活迅速降低。该酶的热稳定性研究表明, 温度较高时, 该酶的活性较不稳定, 55℃ 10 min 酶活降低到 50% 以下, 温度较低时该酶活性稳定性较好, 50℃ 时、60 min 内酶活依然保持在 45% 以上 (16.4U/mL) (图 3-B)。由此可以看出, *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶相对文献报道的 κ-卡拉胶酶热稳定性更好。

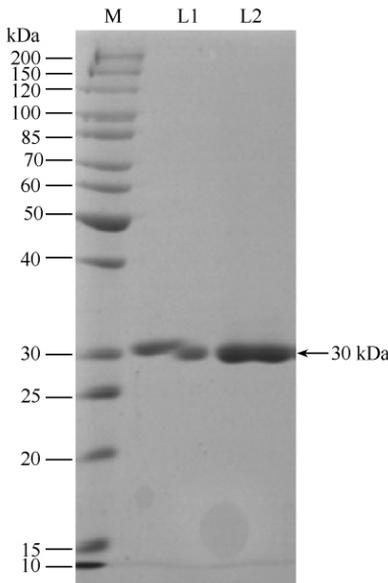


图 2. *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 的 κ-卡拉胶酶 SDS-PAGE

Figure 2. SDS-PAGE of κ-carrageenase purified from *Pseudoalteromonas* sp. ASY5. M, SDS-PAGE low molecular protein standards; lane 1 and 2, purified κ-carrageenase.

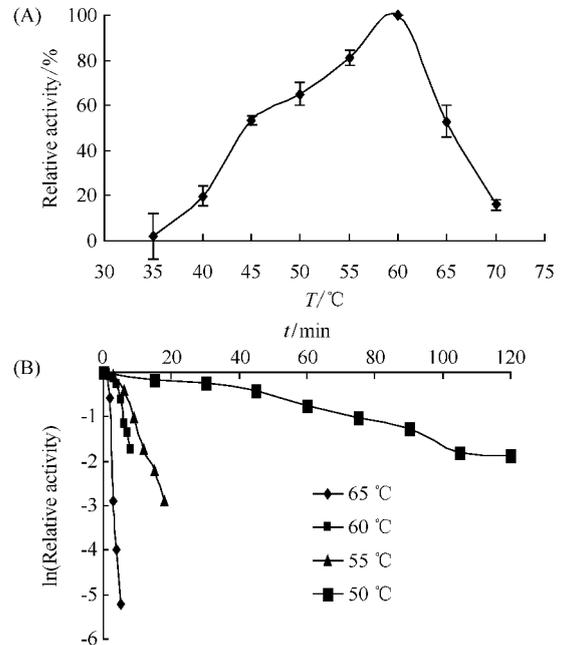


图 3. 温度对卡拉胶酶活性 (A) 及稳定性 (B) 的影响

Figure 3. Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of the carrageenase.

2.5 pH 对卡拉胶酶活性及稳定性的影响

酶的最适 pH 不是一个常数, 受到底物的种类和浓度、缓冲液的种类和浓度、酶的纯度、温度、反应时间等因素的影响。如图 4-A 所示, 60℃, 0.5% 的 κ-卡拉胶做底物时该卡拉胶酶在 pH 7.0 - 8.0 之间酶活力均较高, 并在 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L) 中达到最高, 为其最适反应 pH; 以 Tris-HCl 为缓冲液时, 酶活仅为最高酶活力的 40% - 60%, 这可能是由

于 Na^+ 能够显著促进酶活而 Tris-HCl 缓冲液中不含 Na^+ 所致。图 4-B 则表明,该卡拉胶酶在碱性条件下较稳定,pH 7.0-8.0 时 4℃ 处理 24 h 后酶活力依然保持在 70% 以上,pH 8.0-9.0 时 Tris-HCl 缓冲液中酶活不高可能也是 Na^+ 的影响。

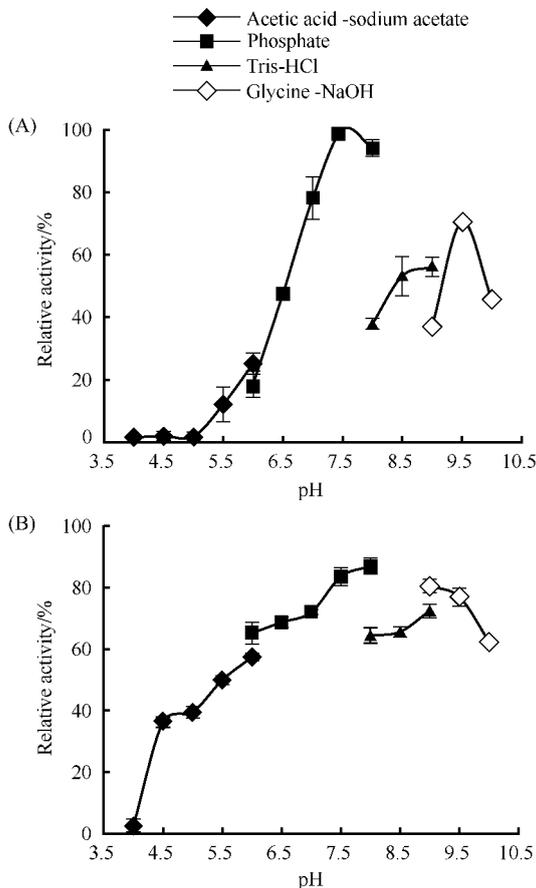


图 4. pH 对卡拉胶酶活性(A)及稳定性(B)的影响

Figure 4. Effect of pH on activity (A) and stability (B) of the carrageenase.

Pseudoalteromonas sp. ASY5 产生的卡拉胶酶其最适 pH 值为 7.5,在中性 pH 值范围比较稳定。比较相关文献,Liu 等^[12]分离的 *Pseudoalteromonas porphyrae* LL1 的 κ -卡拉胶酶的最适反应 pH 为 8.0,pH 6.0-9.0 之间酶活力为最高酶活的 70% 以上;Li 等^[13]研究的 κ -卡拉胶酶的最适反应 pH 为 7.2,pH 6.0-9.0 之间酶活力较高;Sun 等^[15]发现的 κ -卡拉胶酶的最适反应 pH 是 8.0,pH 7.2-8.6 之间酶活力较稳定。这表明 pH 值对 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶的影响与文献报道的 κ -卡拉胶酶性质接近。

2.6 金属离子对卡拉胶酶活性的影响

金属离子对卡拉胶酶的活性影响如表 1 所示, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 对酶活有促进作用,而 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 等对酶活有明显的抑制作用,说明这些金属离子能够改变酶的构象,从而改变酶活性^[16]。Liu 等^[12]的研究 *Pseudoalteromonas porphyrae* LL1 产 κ -卡拉胶酶, Co^{2+} 、 Mn^{2+} 彻底抑制酶活, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 强烈抑制酶活,只有 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 能够促进酶活。马悦欣^[16]的研究中, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 彻底抑制酶活, Mn^{2+} 强烈抑制酶活, Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活影响不大。

表 1. 金属离子对卡拉胶酶活性的影响

Table 1. Metal ions on carrageenase activity

Ion added	Concentration / (mmol/L)	Relative activity / %
None	—	100.00 ± 0.12
Ag^+	1	64.18 ± 4.20
Ca^{2+}	1	126.41 ± 11.07
Mg^{2+}	1	128.48 ± 12.20
Ba^{2+}	1	138.33 ± 8.57
Zn^{2+}	1	4.79 ± 2.56
Cu^{2+}	1	102.44 ± 6.63
Mn^{2+}	1	92.48 ± 5.78
Fe^{2+}	1	93.08 ± 4.49
Fe^{3+}	1	93.73 ± 5.01
Cd^{2+}	1	15.73 ± 4.04
Co^{2+}	1	91.63 ± 7.79
Al^{3+}	1	160.13 ± 7.50

Na^+ 、 K^+ 属于碱金属阳离子,与酶以弱的结合形成配合物而引起酶分子构象的变化,使之变为更有活性的形式,有时也能促进底物的结合。实验表明(图 5), Na^+ 、 K^+ 对该酶酶活有显著的促进作用,且在 Na^+ 浓度为 1 mol/L 时酶活为未加金属离子时的 532.3%, K^+ 浓度为 0.2 mol/L 时对酶活的促进作用达到最高,为未加金属离子时的 160%。海洋交替假单胞菌 QY202 产的 κ -卡拉胶酶^[2] 在 Na^+ 、 K^+ 浓度分别为 0.3 mol/L、0.05 mol/L 时,酶活为未加金属离子时的 179% 和 126%。可见, Na^+ 、 K^+ 对 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产的卡拉胶酶活的促进作用较大。

2.7 蛋白酶抑制剂、变性剂及表面活性剂对卡拉胶酶活性的影响

Liu 等^[12] 研究发现 EDTA、PMSF 对 *Pseudoalteromonas porphyrae* LL1 产的 κ -卡拉胶酶活性具有明显的抑制作用。Li 等^[13] 发现 EDTA、SDS 对 *Pseudoalteromonas* sp. QY203 产的 κ -卡拉胶酶均

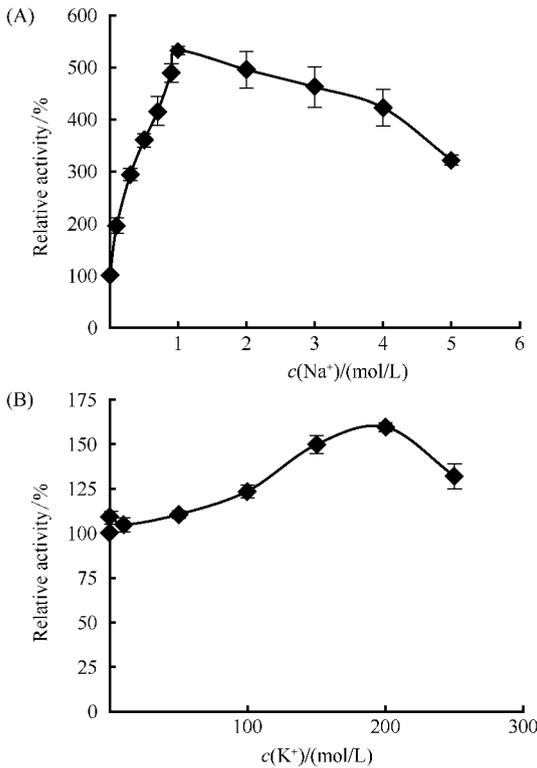


图 5. Na⁺、K⁺对卡拉胶酶活性的影响

Figure 5. Effect of Na⁺, K⁺ on carrageenase activity.

有显著的抑制作用。马悦欣^[17]的研究则表明 EDTA、SDS 对 *Pseudoalteromonas* sp. AJ5-913 产的 κ-卡拉胶酶有显著的抑制作用, Tween-60 对其有略微的促进作用。本文中, EDTA、DTT、β-巯基乙醇、PMSF、SDS、Tween-80 对 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产的卡拉胶酶活性的影响如表 2 所示, SDS 对 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产的卡拉胶酶有强烈的抑制作用, PMSF 对酶活基本没影响, 其余几种蛋白抑制剂对酶活均有不同程度的促进作用。

表 2. 蛋白抑制剂、变性剂及表面活性剂对卡拉胶酶活性的影响

Table 2. Effect of protein inhibitors, denaturing and surface-active agent on carrageenase activity

Ion protein inhibitors, metal chelator	Concentration / (mmol/L)	Relative activity / %
None	—	100.00 ± 0.12
EDTA	1	127.06 ± 1.59
DTT	1	107.70 ± 2.42
β-mercaptoethanol	1	126.44 ± 5.43
PMSF	1	97.79 ± 0.99
SDS	1	8.85 ± 5.06
Tween-80	1	160.48 ± 2.36

EDTA 对 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶酶活有明显的促进作用, 这说明该酶不是离子依赖型, EDTA 可以与溶液中的重金属离子螯合, 去除这些离子对酶的抑制作用从而促进酶活。DTT、β-巯基乙醇作为抗氧化剂捕获并中和反应体系中的自由基从而促进酶活。PMSF 对酶活基本没影响, 说明丝氨酸和组氨酸不参与酶的催化活性中心结构。SDS 作为一种蛋白质变性剂, 可以使卡拉胶酶变性, 使其分子构象发生很大变化, 从而表现出对卡拉胶酶活性的强烈抑制。Tween-80 是一种非离子型表面活性剂, 其与酶分子之间仅存在氢键和疏水作用, 而其乳化性能够增大酶与底物两相接触的界面积, 对酶活有显著的促进作用^[17]。由此可知, *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶与其他菌株产的 κ-卡拉胶酶具有较大的差异, 其对一些蛋白抑制剂有良好的抗性。

2.8 底物特异性实验

Pseudoalteromonas porphyrae LL1 产生的 κ-卡拉胶酶对 κ-卡拉胶有很好的水解作用, 但对 λ-卡拉胶水解作用较差, 对 ι-卡拉胶、琼脂和壳聚糖没有水解作用^[12]; *Pseudoalteromonas* sp. AJ5-913 产生的 κ-卡拉胶酶专门水解 κ-卡拉胶, 对 ι-和 λ-卡拉胶及琼脂没有水解作用^[18]。将 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 产生的卡拉胶酶纯化后与不同底物反应, 通过降解不同底物的活力来表明 ASY5 菌株所产卡拉胶酶的底物特异性, 所得相对酶活如表 3 所示。可以看出, 相对于 κ-卡拉胶, 该酶对可溶性淀粉的水解作用较差, 对 ι-卡拉胶、琼胶、褐藻胶、岩藻聚糖、羧甲基纤维素没有水解作用, 这说明该酶对 κ-卡拉胶具有良好的底物特异性。其结果与文献报道一致。

表 3. 菌株 ASY5 产卡拉胶酶的底物特异性

Table 3. substrate specificity of carrageenase from ASY5

Substrate	Relative activity / %
κ-carrageenan	100 ± 1.70
ι-carrageenan	0 ± 0.29
Agarose	0 ± 2.38
Alginate	0 ± 2.26
Fucidon	0 ± 2.01
Starches	8.04 ± 3.64
Carboxymethylcellulose	0.11 ± 0.61

2.9 酶促反应动力学参数的测定

Pseudoalteromonas sp. ASY5 的 κ -卡拉胶酶水解 κ -卡拉胶符合米氏动力学方程,因此在 60℃, pH 7.5 条件下采用双倒数作图法(图 6),得到酶促反应动力学常数 $K_m = 2.28 \text{ mg/L}$,最大反应速率 $V_{\max} = 147.06 \text{ }\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。结合表 4 中不同菌株所产 κ -卡拉胶酶的酶促反应动力学常数可知,相对于其他的 κ -卡拉胶酶,*Pseudoalteromonas* sp. ASY5 的 κ -卡拉胶酶对 κ -卡拉胶显示出较高的亲和力,最大反应速率远高于已有文献的报道(表 4)。

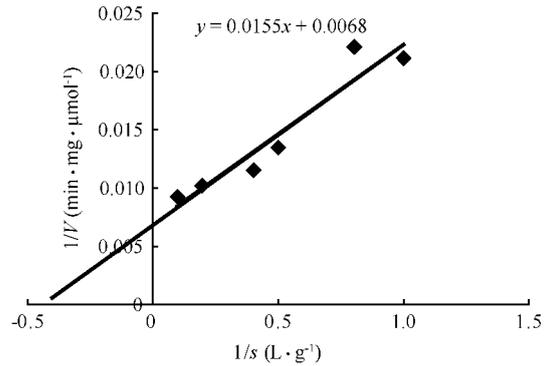


图 6. 米氏常数 K_m 的确定

Figure 6. Determination of michaelis constant.

表 4. 不同菌株所产 κ -卡拉胶酶的米氏常数

Table 4. The michaelis constant of different strains for κ -carrageenase

Enzymes	Strainsproducing enzyme	$K_m / (\text{mg}/\text{mL})$	V_{\max}
κ -carrageenase	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. QY202 [2]	1.600	—
κ -carrageenase	<i>Pseudoalteromonas porphyrae</i> LLI [12]	4.400	0.10 mg / (min·mL)
κ -carrageenase	<i>Cellulophaga lytica</i> strain N5-2 [14]	1.647	8.70 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$
κ -carrageenase	<i>Tamlanasp.</i> HC4 [15]	7.630	—
κ -carrageenase	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AJ5-913 [18]	9.8 ± 0.200	—
κ -carrageenase	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. ASY5	2.280	147.06 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$

3 讨论

海洋假单胞菌(*Pseudomonas carrageenovora*)是最早研究的能够产生卡拉胶酶的微生物[10]。现已经在假单胞菌、噬纤维菌、弧菌、黄杆菌等中发现卡拉胶酶[19]。彭小珍等[20]从红树林底泥中分离出 1 株产 κ -卡拉胶酶的施氏假单胞菌(*Pseudomonasstutzeri*);Yao 等[14]从卡拉胶生产基地沉积物分离出 1 株产 κ -卡拉胶酶的 *Cellulophaga lytica* strain N5-2,本文以卡拉胶为唯一碳源的培养基,从厦门红树林土壤腐叶中分离得到 1 株高产卡拉胶酶的细菌,经鉴定为假交替单胞菌属,命名为 *Pseudoalteromonas* sp. ASY5。

不同的菌株所产卡拉胶酶的性质不同,目前报道的卡拉胶酶的酶学性质中,最适温度多在 30℃ - 50℃,40℃ 以下酶较为稳定,易受各种金属离子及蛋白抑制剂的抑制,对 κ -卡拉胶底物的亲和力差。本文研究的 κ -卡拉胶酶粗酶液酶活为 34.4U/ml,最适反应温度为 60℃,在 50℃ 以下酶的稳定性较好,最适反应 pH 为 7.5,在 pH 7.0 - 9.0 范围内酶活力较稳定,对 κ -卡拉胶具有良好的底物特异性,在 60℃、

pH 7.5 条件下以 κ -卡拉胶为底物时 K_m 值和 V_{\max} 值分别为 2.28 g/L 和 147.06 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等对酶活有显著的促进作用,而 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 及 SDS 对酶活有强烈的抑制作用。这些性质不同于已报道的 κ -卡拉胶酶,具有良好的开发应用前景。

近年来,随着卡拉胶应用技术的成熟,水解卡拉胶生产卡拉胶寡糖成为卡拉胶产业高值化的重要方向。而酶法水解卡拉胶具有反应条件温和,产物易分离等特点受到广泛关注。本文研究的 κ -卡拉胶酶具有酶活力高、热稳定性好、底物亲和力高、粗酶液容易获得等优点,有利于大规模发酵生产及工业应用,为酶法水解卡拉胶生产卡拉寡糖的工业化生产提供了理论依据。

参考文献

- [1] Zhang L, Wang Y, Li Z. Structure, performance, production of carrageenanand its application inthe beverageindustry. *AnhuiAgricultural Sciences*, 2008, 36 (7): 3042-3044. (in Chinese)
- 张乐华,王元兰,李忠海. 卡拉胶的结构·性能·生产及其在饮料工业中的应用. *安徽农业科学*, 2008, 36 (7):

3042-3044.

- [2] Duan G, Su B, Han F, Yu W. Purification and Characterization of a κ -carrageenase from Marine *Pseudoalteromonas* sp. QY202. *Journal of Ocean University of China*, 2010, 40 (3): 95-100. (in Chinese)
- 段高飞, 苏贝, 韩峰, 于文功. 海洋细菌 QY202 产 κ -卡拉胶酶的分离纯化和性质研究. 中国海洋大学学报, 2010, 40 (3): 95-100.
- [3] Vipul D. Prajapati, Pankaj M. Maheriya, Girish K. Jani, Himanshu K. Solanki. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 105: 97-112.
- [4] Yuan HM, Song JM, Zhang WW, Li XG, Li N, Gao XL. Antioxidant activity and cytoprotective effect of κ -carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16 (5): 1329-1334.
- [5] Wang W, Zhang P, Yu GL, Li CX, Hao C, Qi X, Zhang LJ, Guan HS. Preparation and anti-influenza A virus activity of κ -carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives. *Food Chemistry*, 2012, 133 (3): 880-888.
- [6] Yuan HM, Song JM, Li XG, Li N, Dai JC. Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett*, 2006, 243 (2): 228-234.
- [7] Xu L, Yao Z, Wu HG, Wang FF, Zhang SX. The immune regulation of κ -carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells. *Neurochemistry International*, 2012, 61 (5): 689-696.
- [8] Arman M, Qader SAU. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88 (4): 1264-1271.
- [9] 李尚勇. 海洋交替假单胞菌 QY203 产 κ -卡拉胶酶研究. 中国海洋大学的硕士论文, 2012.
- [10] Mou H, Jiang X, Jiang X, Guan H. Screening of carrageenan-degrading bacteria M-2 and the enzyme properties. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9 (3): 251-254, 202. (in Chinese)
- 牟海津, 江晓路, 蒋萱, 管华诗. 卡拉胶降解菌 M-2 的筛选与产酶性质. 中国水产科学, 2002, 9 (3): 251-254, 202.
- [11] 倪敏. 海洋细菌 *Cellulophaga* sp. QY201 λ -卡拉胶酶研究, 中国海洋大学的硕士论文, 2008.
- [12] Liu GL, Li Y, Chi Z, Chi ZM. Purification and characterization of κ -carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of κ -carrageenan. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (1): 265-271.
- [13] Li SY, Jia PP, Wang LN, Yu WG, Han F. Purification and Characterization of a New Thermostable κ -Carrageenase from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. QY203. *Oceanic and Coastal Sea Research*, 2013, 12 (1): 155-159.
- [14] Yao Z, Wang FF, Gao Z, Jin LM, Wu HG. Characterization of a κ -Carrageenase from Marine *Cellulophagalytica* strain N5-2 and Analysis of Its Degradation Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14 (12): 24592-24602.
- [15] Sun FX, Ma YX, Wang Y, Liu Q. Purification and characterization of novel κ -carrageenase from marine *Tamlana* sp. HC4. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28 (6): 1139-1145.
- [16] Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, Ogawa HI, Kato Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 20 (5): 304-307.
- [17] Liu Y, Xu J, Hu Y. Effect of surfactants on lipase activity and enantioselectivity. *Acta Chimica Sinica*, 2000, 58 (2): 149-152. (in Chinese)
- 刘幽燕, 许建和, 胡英. 表面活性剂对脂肪酶活性和选择性的影响. 化学学报, 2000, 58 (2): 149-152.
- [18] 马悦欣. *Pseudoalteromonas* sp. AJ5-913 的 κ -卡拉胶酶酶学性质及酶解产物分析. 中国海洋大学的博士论文, 2008.
- [19] Tang Z, Lv J, Zhang Z, Liu P, Jiang B, Wen S, Qin S. Screening of marine bacterium producing carrageenase and its enzymatic properties. *Food Science and Technology*, 2011, 36 (6): 18-21. (in Chinese)
- 唐志红, 吕家森, 张振, 刘莘, 蒋波, 温少红, 秦松. 产卡拉胶酶海洋菌株的筛选和酶学性质的初步研究. 食品科技, 2011, 36 (6): 18-21.
- [20] Peng X, Ji H, Liu H, Zhang C. Optimization of liquid fermentation conditions on *Pseudomonas stutzeri* producing carrageenase. *Food Research and Development*, 2007, 128 (10): 7-11. (in Chinese)
- 彭小珍, 吉宏武, 刘唤明, 章超桦. 施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 产卡拉胶酶液体发酵条件优化. 食品研究与开发, 2007, 128 (10): 7-11.

Isolation, identification of a κ -carrageenase-producing bacterium and κ -Carrageenase characterization

Caiyun Xu¹, Yanbing Zhu^{1, 2}, Hui Ni^{1, 2}, Huinong Cai^{1, 2}, Lijun Li^{1, 2},
Anfeng Xiao^{1, 2*}

¹ College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

² Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering; Key Laboratory of Recycling Application and Deep Processing in Economic Marine Alga, Xiamen South Oceanographic Research Center; Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen and identify carrageenase-producing strain from mangrove soil leaf and to characterize produced carrageenase. [Methods] The culture medium with κ -carrageenan as sole carbon source was used to isolate the strain exhibiting carrageenase activity. The isolated strain was identified by morphology observation and 16S rDNA sequencing. κ -carrageenase produced by *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 was purified and characterized by DNS method. [Results] A bacterial strain ASY5 with high carrageenase activity was isolated from mangrove soil humus, and was identified as *Pseudoalteromonas* sp. The molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 30 kDa. The optimal temperature and pH of the enzyme were 60°C and 7.5, respectively. The enzyme was stable at 50°C, and more stable between pH 7.0 and 9.0. The enzyme could convert κ -carrageenan. The K_m and V_{max} values of the enzyme for κ -carrageenan was 2.28 mg/mL and 147.06 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. The enzyme was significantly stimulated by Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Al^{3+} . The enzyme was inhibited strongly by Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} and SDS. [Conclusion] κ -carrageenase produced by *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 was stable at high temperature and alkaline pH, with potential application in carrageenan oligosaccharides production.

Keywords: κ -carrageenase, isolation, identification, enzymatic properties

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Projects of Science and Technology Program of Xiamen City (3502Z20120005) and by the Projects of Xiamen Southern Ocean Technology Center of China (13GZP004NF10)

* Corresponding author. E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn

Received: 17 June 2014/Revised: 28 September 2014