

黄原胶降解菌菌株 X08a 产酶和降解能力的研究

郭瑞莲, 慕庆峰

(黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163000)

摘要:研究了从土壤中用平板划线法分离出的 1 株黄原胶降解菌, 所产酶的酶活、酶学性质、降黏率和氮源磷源对该菌产酶的影响。结果表明: X08a 降解黄原胶以 NH_4Cl 和 Na_2HPO_4 为氮源和磷源、pH 为 5~6、在 30~40℃ 的条件下降解效果最好。

关键词:黄原胶; 降解菌; 酶活; 降黏率

中图分类号: S188

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)11-0041-04

黄原胶是经发酵工程生产的一种用途广泛的微生物胞外多糖。在食品、石油、医药、日用化工等十几个领域有着极其广泛的应用^[1]。黄原胶超常的稳定性极大地扩展了其应用范围, 但在应用过程中其黏度过高也带来一些问题, 如在提高采收率的同时也增加后继工艺如原料运输及产品的成本^[2]。同时黄原胶的降解产物寡糖还具有抗病毒、抑菌、诱导植物抗性、提高免疫力等功能, 可进一步开发利用。因此, 找到能高效降解黄原胶的微生物菌株有着生产应用的潜在价值^[3]。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从土壤和水中分离筛选出 1 株具较强降解能力的黄原胶降解菌, 该菌能够以黄原胶为唯一碳源进行生长, 并具有黄原胶降解酶活性。

1.2 药品

工业级黄原胶、甘露糖、魔芋粉、葡萄糖、柠檬酸、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、二甲基氨基苯甲酸、溴百里酚蓝、溴甲酚紫、琼脂粉、结晶紫、草酸铵、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NH_4Cl 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 CuSO_4 、 FeSO_4 、 CaCl_2 、 NaCl 、 Na_2SO_4 、 NaOH , 其它化学试剂均为分析纯^[4]。

1.3 培养基

1.3.1 选择性培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 黄原胶 5 g, NH_4Cl 6 g, Na_2HPO_4 5 g, NaH_2PO_4 5 g。

1.3.2 种子液培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 葡萄糖 5 g, NH_4Cl 6 g, Na_2HPO_4 5 g, NaH_2PO_4 5 g, 微量元素液 4 mL。

1.3.3 发酵培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 黄原胶 5 g, NH_4Cl 6 g, K_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 5 g, 微量元素液 4 mL。

1.3.4 微量元素液 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ZnSO_4 0.1 mg, CuSO_4 0.1 mg, MnSO_4 0.1 mg, MgSO_4 0.1 mg^[5]。

1.4 仪器与设备

752 紫外可见分光光度计(南京第四分析仪器有限公司); CF 16RX 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); ZNN-D6A 型六速旋转黏度仪(青岛海通达专用仪器厂)。

1.5 方法

1.5.1 菌种筛选 将所取土样悬浮于灭菌后的生理盐水中, 进行梯度稀释, 常规方法涂布黄原胶平板, 30℃ 培养箱培养 24 h。挑单个菌落于选择性培养基中划线, 经过培养, 再从中挑选单个菌落接种于新的选择性培养基中, 反复操作至菌种完全纯化, 然后接种于斜面培养基中 4℃ 保存^[6]。

1.5.2 粗酶液制备 将菌种接种到含 100 mL 种子液培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃ 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集菌体。用无菌生理盐水洗涤菌体 3 次, 调整细胞浓度 10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 制成种子液^[7]。

在 500 mL 三角瓶中装 200 mL 发酵培养基, 按接种量 1% 接入种子液, 30℃ 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液即粗酶液。

1.5.3 酶活测定 还原糖标准曲线的绘制方法为: 分别在水解管中加入 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Glucose 标准溶液 0、5、10、30 和 40 μL , 用双蒸水补至 200 μL 。向其中各加 150 μL PAHBAH 溶液, 600 μL NaOH (5%) 溶液, 混匀, 120℃ 加热 15 min, 用酶标仪测定 OD_{405} ^[8]。

甘露聚糖酶活力测定方法: 将一定量粗酶液与 0.25% 黄原胶水溶液混合, 30℃ 水浴反应

收稿日期: 2010-08-02

第一作者简介: 郭瑞莲(1988-), 女, 蒙古族, 黑龙江省肇源县人, 在读学士, 从事植物保护及微生物研究。E-mail: guoruilian88@126.com。

45 min,立即取 200 μL 反应液加到 750 μL 5% PAHBAH 和 5% NaOH 的混合液中,120℃加热 15 min,用酶标仪测定 OD_{405} 。

黄原胶降解酶的活力定义为每分钟催化形成相当于 1 μmol 葡萄糖的还原末端所需的酶量为一个酶活力单位^[9]。

1.5.4 不同氮源对菌种产酶的影响 用不同氮源(含氮量终浓度为 0.2%)代替发酵培养基中的 NH_4Cl ,研究各氮源如蛋白胨、胰蛋白胨、甘氨酸、尿素、硝酸铵、磷酸氢二铵和氯化铵对产酶的影响,取对数生长期的菌种接种于上述培养基中^[10]。

1.5.5 不同磷源对菌种产酶的影响 分别以 NaH_2PO_4 、 β -甘油磷酸钠或者 ATP(含磷量的终浓度为 0.22%)作为唯一磷源,其它元素按发酵培养基配方,取对数生长期的菌种接种于上述培养基中^[11]。

1.5.6 酶学性质 JP3 最适 pH 及其稳定性:在 pH 4.0~9.0 的缓冲液(pH 4.0~6.5 为 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH 7.0~8.0 为 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液;pH 9.0 为 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘氨酸-NaOH 缓冲液)中,测定酶活力^[12]。

粗酶液与不同 pH 的缓冲液(pH 9.0~10.5 为 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液)于 30℃保温 6 h 后,测定酶活力。

最适温度和温度稳定性:将反应体系于不同温度测定酶活力,研究酶的最适温度。将酶液在不同温度下保温 30 min 后测定酶活力,分析酶的温度稳定性。

金属离子对酶活的影响:在不同金属离子(Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等)存在时测定酶活(最适温度,最适 pH),以未添加金属离子的酶活作为空白对照(100%),除 Na^+ 为 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外,其余的金属离子浓度皆为 $1\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]。

米氏常数:以不同浓度的黄原胶作底物,测定酶活力,计算酶反应的初速度。每个样品做 3 次平行测定,通过反应初速度和底物浓度的倒数作图,得到双倒数图。根据直线在 X 轴和 Y 轴的截距,利用米氏方程可得米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} ^[14]。

底物浓度对酶活性的影响:底物浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5% 时发酵液菌体生长随时间的变化规律,摇瓶装量为 30 mL,初始 pH 为 7.0,接种量为 1.0%,摇速为 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.5.7 降黏率 采用 PAHBAH 法测定黏度。按比例接种于 300 mL 无菌液体培养基,调节 pH 后,测量初始表观黏度 V_0 ,记录测量温度 T_0 ,放置恒温摇床培养一段时间后取出,水浴加热或自然冷却,使溶液温度恢复为 T_0 ,迅速测量表观黏度 V_1 ,继续放置摇床培养观察。用旋转黏度仪测量黏度,则降黏率为: $W/\% = (V_0 - V_1)/V_0 \times 100$ ^[15]。

2 结果与分析

2.1 菌种的采集和分离及筛选

经对反复筛选和培养过程中培养液粘度下降程度和速度的比较,选出 1 株对黄原胶降解能力最强的菌落,命名为 X08a。菌株 X08a 为细菌,在生长过程中呈杆状,老龄菌为球形,菌体形态不规则;不形成孢子,革兰氏染色阳性^[16]。

2.2 菌株 X08a 黄原胶酶活测定

酶标仪测定 0~40 μg 葡萄糖绘制标准曲线(见图 1),得直线方程 $y=0.0227x+0.0746$ 。

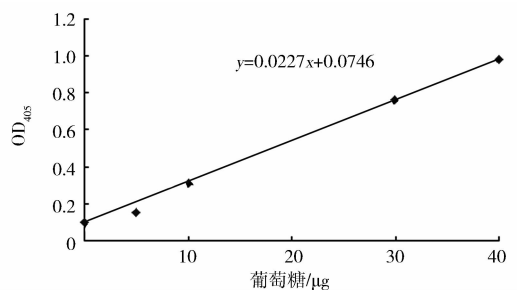


图1 还原糖标准曲线

由图 2 可知,随培养时间的延长,培养基的粘度迅速下降,黄原胶降解酶活力逐渐上升,二者几乎同步变化,说明 X08a 菌生长过程中分泌胞外降解酶将黄原胶降解,提供生长所需能量。

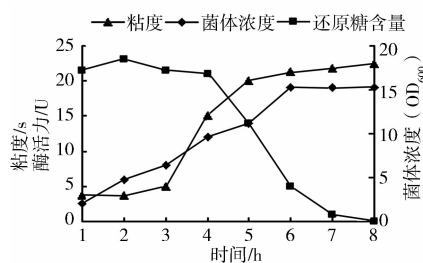


图2 X08a 黄原胶降解酶活性曲线

2.3 不同氮源对菌株 X08a 黄原胶酶产酶的影响

由图 3 结果可知,以 NH_4Cl 作为氮源时,菌体酶活力最高。氯化铵来源广,价格低,是理想氮源。

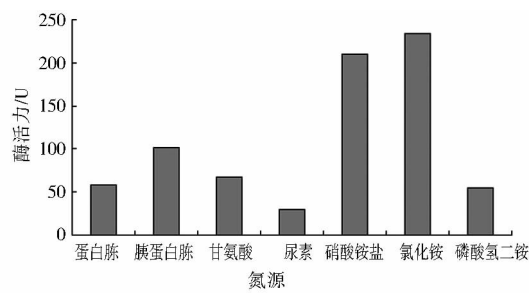


图 3 不同氮源对 X08a 黄原胶酶产酶的影响

2.4 不同磷源对菌株 X08a 黄原胶酶产酶的影响

图 4 表明,以 Na_2HPO_4 、 β -甘油磷酸钠或者 ATP 作唯一磷源时,甘露聚糖酶活性都随磷源浓度的增加而逐渐增高。 Na_2HPO_4 更有利于菌株 X08a 生长和产酶。

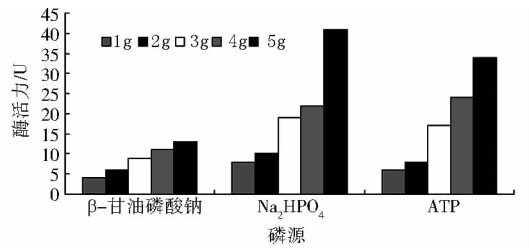


图 4 不同磷源对 X08a 黄原胶酶酶活的影响

2.5 X08a 黄原胶酶酶学性质的测定

图 5 表明,该酶最适 pH 范围为 5~6。菌株 X08a 产酶期间以 1 h 为时间间隔,分别在不同 pH 条件下测其酶活,可看出 3 条曲线间距不大,即不同时间点的黄原胶酶在相同 pH 条件下的酶活差别不大,说明在相同 pH 条件下这种酶产生的时间长短对其酶活影响较小。

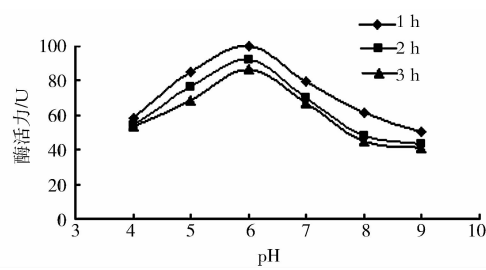


图 5 X08a 黄原胶酶的最适 pH

图 6 表明,这种酶最适温度为 30~40℃。菌株 X08a 产酶期间以 1 h 为时间间隔,分别在不同温度下测其酶活,3 条曲线的数值差别较大,即在不同时间点的黄原胶酶在相同温度下的酶活差别较大,说明在相同温度下这种酶产生的时间长短对其酶活有较大影响。

金属离子 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 EDTA 均显著降低酶活。 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活有抑制作用, Cu^{2+} 、 Mn^{2+}

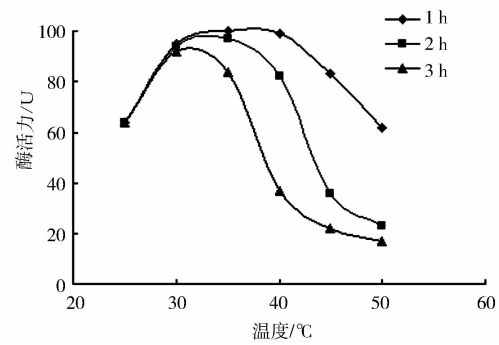


图 6 X08a 黄原胶酶的最适温度

对酶活几乎无影响。说明该酶含有金属离子,该金属离子可能是酶的直接活性中心,也可能是作为辅基起到辅助性作用(见图 7)。

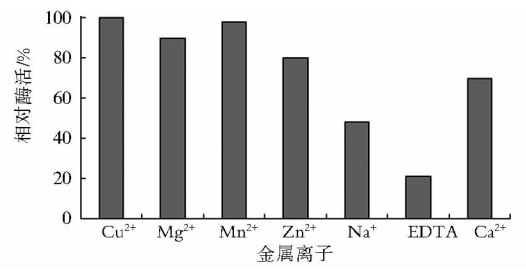


图 7 金属离子对 X08a 黄原胶酶酶活的影响

根据计算,米氏常数 $K_m = 0.24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最大反应速度 $V_{\text{max}} = 68 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ 。表明这种酶的反应速率与酶的浓度成正比(见图 8)。

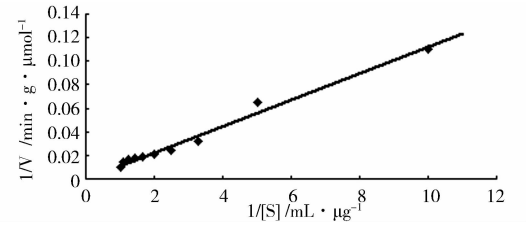


图 8 X08a 黄原胶酶的双倒数图

表 1 表明,底物浓度在 1% 时,黄原胶酶活性最高。

表 1 底物浓度对产酶的影响

培养时间/h	底物浓度		
	1.50%	0.50%	1.00%
0	0	0	0
6	3	5	7
32	13	11	17
48	36	48	58
53	80	90	87
72	93	95	99
78	87	90	91

2.6 降黏率

由图 9 可知,随时间变化,黄原胶溶液的黏度逐渐下降,第 1 天黏度下降 32%,第 2 天变化较

小,第3天有明显下降,之后黏度缓慢下降。黄成栋等研究表明,黄原胶分子的降解有主链降解和侧链降解2个过程。主链降解对黄原胶的黏度变化影响较侧链大,但侧链的存在阻碍了主链的降解。

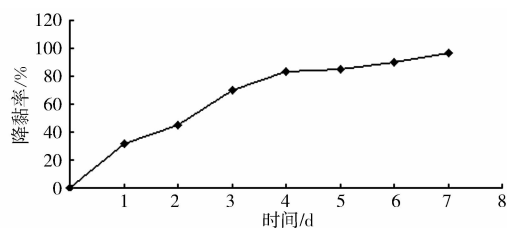


图9 黄原胶溶液降解率的变化情况

3 结论与讨论

该试验分离出了1株产黄原胶降解酶的细菌菌株X08a,单位时间内对黄原胶有较高降解率。研究发现细菌X08a分泌的黄原胶降解酶对温度敏感性较高,对pH要求则相对宽松;通过金属离子对酶活性影响,推测有二价的主族金属离子作为辅助因子对酶的活性起作用;通过酶反应初速度(V)与底物浓度(S)之间的关系可知这种酶的底物专一性较强。而由该酶降解黄原胶所得到的寡糖的结构、组成以及可能拥有的生物活性,则有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄成栋,白雪芳,杜昱光. 黄原胶(Xanthan Gum)的特性、生产及应用[J]. 微生物学通报,2005,32(2):91.
- [2] 石宝忠. 黄原胶调研报告[J]. 化工科技市场,2003,26(11):23.
- [3] Carcia-Ochoa F. Xanthan gum Production, Recovery and

- Properties[J]. Biotechnology Advances,2000(18):549.
- [4] 杨春玉,王霞,苏海军. 黄原胶生物合成的研究进展[J]. 现代化工,2005,25(2):2.
- [5] 易绍金,熊汉辉,王丰. 黄原胶降解菌的生长规律及影响因素[J]. 钻井液与完井液,2007,24(6):69.
- [6] 刘哈. 黄原胶寡糖酶法制备及水解酶分泌菌株的定性[D]. 大连:中国科学院研究生院,2006.
- [7] Cripps. A method of degrade xanthan gum[J]. Europe. Appl,1981,2:30393.
- [8] 黄成栋. 黄原胶的降解、产物寡聚糖结构的初步分析及生物活性探寻[D]. 大连:中国科学院研究生院,2004.
- [9] 熊汉辉,易绍金,王丰. 黄原胶降解菌的降解作用研究[J]. 钻井液与完井液,2007,24(5):62.
- [10] Ruijsenaars H J, de Bont J A M, Hartmans S. A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1[J]. Appl. Environ Microbiol.,1999,65:2446.
- [11] Nankai H, Hashimoto W, Miki H, et al. Microbial system for polysaccharide depolymerisation: enzymatic route for xanthan depolymerisation by *Bacillus* ssp. strain GL-1[J]. Appl. Environ Microbiol,1999,65:2520.
- [12] Nankai H, Hashimoto W, Miki H, et al. Xanthan lyase of *Bacillus* ssp. strain GL1 liberates pyruvylated mannose from Xanthan side chains[J]. Appl. Environ Microbiol,2000,66:3765.
- [13] Cadmus M C, Jackson L K, Burton K A, et al. Biodegradation of Xanthan Gum by *Bacillus* ssp. [J]. Applied and Environmental Microbiology,1982,44:5.
- [14] Bragg J R, Maruca S D, Gale W W, et al. Control of Xanthan-Degrading Organisms in the Loudon Pilot[J]. Approach, Methodology and Results,1983,11:989.
- [15] 黄成栋,王洪荣,白雪芳,等. 黄原胶降解菌的筛选及其降解酶性质的研究[J]. 微生物学通报,2005,32(1):32.
- [16] Davis B. Chitin Chitosan and related Enzymes, Orlando[J]. Academic press,1984,16:24.

Research in Xanthan Gum Degrades Fungus Strain X08a to Produce the Enzyme and Its Degeneration Ability

GUO Rui-lian, MU Qing-feng

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163000)

Abstract: The effect of activity of enzyme, aymology nature, fall maunting rate and nitrogen source phosphorus source which produced by x08a was studied, x08a is a Xanthan gum seperated by the plate streading from soil. The result showed that the most suitable pH was 5~6 and the optimum temperature for 30~40℃. As the nitrogen source and the phosphorus source enzyme was exactly highest taken by NH_4Cl and Na_2HPO_4 .

Key words: xanthan gum; degradation bacterium; enzyme; sticky rates

欢迎投稿 欢迎订阅