



5株溶藻抑藻细菌的筛选及果胶酶活性的初步研究

王海玉¹, 孙珮石¹, 毕晓伊¹, 彭 谦², 陈欣辉³

(¹云南大学工程技术研究院, 昆明 650091; ²云南大学微生物研究所, 昆明 650091;

³云南大学图书馆, 昆明 650091)

摘要:为了解决溶藻细菌分离筛选难的问题, 试验以果胶为唯一碳源来分离溶藻菌, 然后将分离到的菌株和实验室纯培养的铜绿微囊藻进行溶藻试验, 并将溶藻效果与果胶酶活性进行比较分析, 探讨细菌溶藻与细菌的果胶酶活性之间的关系。结果发现, 分离到的5株细菌均具有较好的溶藻特性, 试验第1天就出现菌胶膜包裹微囊藻下沉黄化的现象, 5株菌具最佳溶藻效果时的菌液藻液体积比 $w_{01} > w_{03} = w_{05} > w_{04} > w_{02}$; 达最佳降解效果的时间 $w_{05} > w_{04} > w_{01} = w_{02} > w_{03}$; 持续抑藻时间 $w_{04} > w_{05} > w_{01} > w_{02} > w_{03}$; 果胶酶活性 $w_{04} > w_{01} > w_{03} > w_{02} = w_{05}$ 。以果胶为唯一碳源的培养基可以有效分离到溶藻细菌, 但细菌的溶藻效果与果胶酶活性之间无线性关系。

关键词:溶藻菌; 果胶酶; 酶活

中图分类号: Q8993

文献标志码: A

论文编号: 2012-0268

The Selection of Five Algae Lysing-bacterium Strains and the Study on Their Pectinase Activity

Wang Haiyu¹, Sun Peishi¹, Bi Xiaoyi¹, Peng Qian², Chen Xinhui³

(¹Research Institute of Engineering and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China;

²Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China;

³Yunnan University Library, Kunming 650091, Yunnan, China)

Abstract: In order to solve the difficult of isolation the algicidal bacteria, isolated algicidal bacteria with pectin as the sole carbon source in this experiment. To explore the relationship between the pectinase activity of the bacteria lysing bacteria, the lytic effect of lysing-bacteria on *Microcystis aeruginosa* and the pectinase activity were compared and analyzed. The results showed that five strains had lytic characteristics, the first day of the experiment, the cells of the *Microcystis* appeared yellow and bacteria film wrapped *Microcystis* cells sunk. Compare the five strains on the best lysing-condition, bacterial liquid and the algae liquid in volume ratio: $w_{01} > w_{03} = w_{05} > w_{04} > w_{02}$; the speed: $w_{05} > w_{04} > w_{01} = w_{02} > w_{03}$; continuous lysing-algae time: $w_{04} > w_{05} > w_{01} > w_{02} > w_{03}$. pectinase activity: $w_{04} > w_{01} > w_{03} > w_{02} = w_{05}$. The medium with pectin as sole carbon source can be used to isolate algicidal bacteria effectively, however there no linear relationship between the lytic effects of bacterial pectinase activity.

Key words: Algae Lysing-bacterium; Pectinase; Enzyme Activity

0 引言

果胶酶(pectinases)是指能够催化果胶质分解的多种酶的总称, 由D-半乳糖醛酸以 α -1,4糖苷键连接形成的直链状的聚合物, 最初是由Mac Donnell从桔子里提

取得到的。作为一种非常重要的工业酶制剂, 果胶酶具有不可估量的潜在应用价值。它通常包括原果胶酶(PPase)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)、裂解酶(PL)和果胶酯酶(PE)4类。果胶酶初见于1930年, 用来制备酒水和

基金项目: 云南大学校基金资助项目“生物活性炭降解藻毒素的工艺研究”(2011YB45); 云南省教育厅资助项目“综合法处理藻毒素的工艺研究”(2010Y244); 国家自然科学基金资助项目“嗜热嗜酸同步脱氮脱硫复合菌群优化应用基础研究”(50908199)。

第一作者简介: 王海玉, 女, 1977年出生, 山东郓城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事环境微生物方向的相关研究。通信地址: 650091 云南省昆明市翠湖北湖2号 云南大学工程技术研究院, E-mail: why77_0@163.com。

通讯作者: 孙珮石, 男, 1957年出生, 吉林人, 教授, 研究员, 博士, 主要从事大气及说污染治理研究。通信地址: 650091 云南省昆明市翠湖北湖2号 云南大学工程技术研究院, E-mail: sunps2003@tom.com。

收稿日期: 2012-06-07, **修回日期:** 2012-09-06。

果汁。据报道,自然界中已发现有几十种微生物能产果胶酶^[1],有曲霉属^[2]、青霉属^[3]、镰孢属^[4]及某些细菌^[5]等,其中细菌杆菌属的碱性果胶酶日益受到重视^[5-6]。目前果胶酶主要用于果汁制造^[7]、果酒酿造^[8]、罐头加工、木材防腐、纸浆漂白、麻类脱胶以及防治植物病害等方面^[7]。对于果胶酶在有毒藻类治理方面还没见报道。笔者通过对从滇池分离到的5株溶藻细菌的果胶酶活性的测定,揭示果胶酶与细菌溶藻之间存在着一定的联系,为溶藻细菌的筛选方法提供参考,以期为果胶酶在藻类治理方面的应用提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

研究室内试验于2011年在云南大学微生物实验室进行。

1.2 试验材料与设备

本研究室内使用仪器为上海第三分析仪器厂生产的721型分光光度计,日本OLYMPUS公司上产的OLYMPUS光学显微镜,上海精密实验设备有限公司上产的BH-9050型隔水式恒温培养箱,上海志泽生物科技发展有限公司上产的HH-1型恒温水浴锅等。果胶和果胶酶为美国Sigma公司上产,其他培养基所用药品为化学纯规格,果胶酶活测定所用药品均为分析纯规格。

1.3 试验方法

1.3.1 DNS法测定果胶酶活性 将培养到稳定期的菌液离心处理后作为粗酶液,用分光光度法测定粗酶液的果胶酶活性。果胶酶分解果胶,产生带有还原性醛基的还原糖(以半乳糖醛酸基计),3,5-二硝基水杨酸可与其发生显色反应,根据颜色深浅的不同,通过分光光度计测定果胶酶的活性大小^[10-15]。

在上述条件下,每小时每毫升果胶酶酶促转化果胶生成1 mg当量还原糖(以半乳糖醛酸计)所需的酶量定义为一个活力单位^[10-15]。

1.3.2 试剂的配制方法

(1)标准葡萄糖溶液的配制方法。精确称量1 g葡萄糖溶于少量蒸馏水中定容至1000 mL。

(2)果胶酶标准溶液配制方法。精确称量0.2 g果

胶酶定容至200 mL蒸馏水中。

(3)0.5%果胶酶溶液配制。准确称取0.5 g果胶于烧杯中,用巴比妥缓冲液(pH 8.6)溶解,定容至100 mL。

(4)DNS试剂的配制方法。将6.3 g 3,5-二硝基水杨酸、262 mol/L NaOH加到500 mL含182 g酒石酸钾钠的热水溶液中(不超过50℃),再加入5 g苯酚及5 g亚硫酸钠,待溶解、冷却后,加蒸馏水定容至1000 mL,贮藏于棕色瓶中,放置1周后使用。

(5)巴比妥缓冲液(pH 8.6)的配制方法。称取1.84 g巴比妥酸,置于56~60℃的水中溶解,然后加入10.3 g巴比妥钠,加蒸馏水定容至1 L。

(6)酶活测定方法。取0.5%的果胶溶液1.5 mL加入到1.5 mL酶液中,摇匀。在50℃水浴中准确反应0.5 h,取出后,迅速在沸水浴中加热30 min,冷却。取1.5 mL反应液移入加有1.5 mL DNS试剂的试管,加入7 mL蒸馏水,摇匀,在沸水浴中加热5 min,迅速冷却。用分光光度计在540 nm处测其吸光度值。

(7)参比液配制。加热灭活30 min的1.5 mL的稀酶液与1.5 mL的0.5%果胶溶液充分混合。

1.3.3 果胶酶活性的计算方法 由葡萄糖标准曲线可得公式: $A(\text{吸光度值})=\text{斜率} \times C(\text{mg 葡萄糖/mL})$ 。未知试液测定吸光度值 A 后,可以通过上式求的葡萄糖浓度 C 。

在上述条件下,每小时内每毫升果胶酶酶促转化果胶生成1 mg当量还原糖(以半乳糖醛酸计)所需的酶量定义为一个酶活力单位。

即:果胶酶活 $(\text{mg 半乳糖醛酸}/(\text{mL} \cdot \text{h}))=\text{酶液稀释倍数} \times C(\text{mg 葡萄糖/mL}) \times 2 \times 194/180$

式中:194/180——葡萄糖转换成半乳糖醛酸的量;2——测定中稀释酶液被0.5%果胶溶液稀释的倍数。

1.3.4 细菌溶藻效果研究方法 首先将分离纯化到的细菌进行扩大培养,待细菌的生长到达对数期时,按照不同的比例(菌液:藻液)进行试验,寻找到菌液的抑藻溶藻阈值的下线。通过观察试验现象以及光学显微镜观察,分析细菌抑藻或溶藻的效果^[16-21]。根据前期初步试验结果,对于不同菌株的溶藻试验,设置了不同的菌液藻液比例,各菌株的发酵液与藻液的添加比例如表1。

表1 菌株发酵液与藻液体积比($V_{\text{菌液}}:V_{\text{藻液}}$)

菌株	1	2	3	4	5	6
w01	0:100	10:100	15:100	20:100	25:100	30:100
w02	0:100	5:100	10:100	15:100		
w03	0:100	5:100	10:100	15:100		
w04	0:100	2:100	5:100	10:100		
w05	0:100	5:100	10:100	15:100		



2 结果与分析

2.1 绘制葡萄糖标准曲线

测定不同浓度葡萄糖溶液的吸光值,具体见表2所示。根据表2数据绘制葡萄糖标准曲线如图1所示,从图1可以计算出斜率 $K=0.4/0.6=2/3$ 。

2.2 果胶酶浓度与吸光度之间关系

从图2可以看出,当果胶酶浓度在0.0250~0.1250 mg/mL之间、吸光度在0.071~0.473之间

时,果胶酶浓度与吸光度之间存在一定的线性关系。

2.3 各菌液的酶活

从表3的数据可以看出,经稀释后的粗制果胶酶溶液的吸光度位于0.115~0.295之间,参考图2曲线,稀释后的稀酶液吸光度在0.071~0.473之间时,果胶酶浓度与吸光度之间是存在一定的线性关系的,所以该数据是可以利用的,是有效数据。

表2 葡萄糖浓度与吸光度关系

葡萄糖浓度/(mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
吸光度	0	0.149	0.205	0.400	0.510	0.700

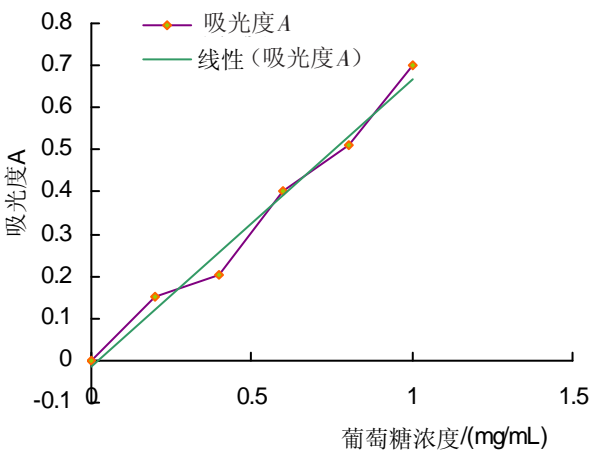


图1 葡萄糖标准曲线

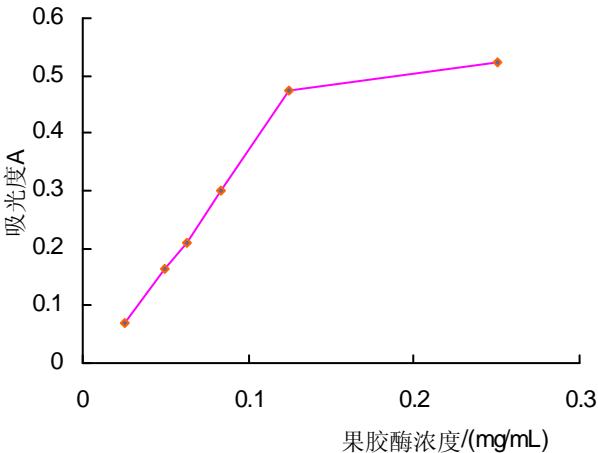


图2 果胶酶浓度与吸光度之间关系曲线

表3 各菌株制得的粗酶液的吸光度

各菌株制得的粗酶液	540 nm吸光度
w01	0.145
w02	0.115
w03	0.185
w04	0.295
w05	0.115

2.4 各菌株制得的粗酶液的果胶酶活性计算

由标准曲线得斜率 $K=2/3$,由1.3.3章节下的公式分别计算各菌株粗酶液的果胶酶活性,具体数值见表4所示。从图3可以看出5株菌均具有果胶酶活性,果胶酶活性关系为 $w04>w03>w01>w02=w05$ 。

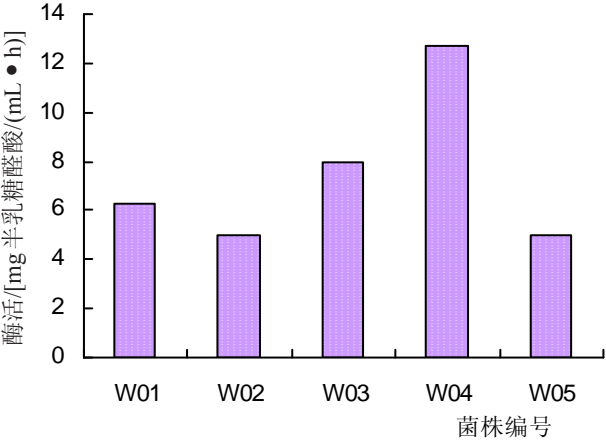


图3 各菌株果胶酶活性

表4 各菌株培养液的果胶酶活性

菌株	W01	W02	W03	W04	W05
酶活/[mg半乳糖醛酸/(mL·h)]	6.251	4.958	7.976	12.718	4.958

2.5 溶藻效果

对5株果胶酶产生菌进行溶藻抑藻试验,结果发现,5株菌均具有较好的溶藻及抑藻特性,经过多天观察,5株菌均可以迅速溶藻,24 h均可见到明显的效果,但它们达到最佳溶藻抑藻效果的时间不同,细菌发酵液起作用的下线值也不同。w01和w03加入菌液比例在大于15%时有效,但添加比例在15%时效果不是很

好,藻细胞不能完全消失,肉眼可以观察到藻细胞存在;然而,w02和w05在菌液添加比例在大于5%时具有较好效果,添加比例在5%时,肉眼见不到细胞的存在。比较图5和图8可以发现w02的溶藻下线较w05低,溶藻效果也较w05好,虽然2株菌具有相同的抑藻下线;w04在菌液添加比例大于5%时,具有抑藻特性,但是菌液添加比例达到10%时溶藻才彻底,持续



0:100 10:100 15:100 20:100 25:100 30:100

图4 w01溶藻情况



15:100 10:100 5:100 0:100

图5 w02溶藻情况



0:100 5:100 10:100 15:100

图6 w03溶藻情况



10:100 5:100 2:100 0:100

图7 w04溶藻情况



0:100 5:100 10:100 15:100

图8 w05溶藻情况

试验30天,通过光学显微镜观察反应液,没有发现藻细胞存在,该菌溶藻最彻底。具体溶藻抑藻效果见图4~8。

从表5可以看出,5株细菌能够溶藻的菌藻液体积比下限为w02=w03=w04<w05<w01。达到最佳溶藻

效果的菌藻液体积比w02<w04<w03=w05<w01。

从表6可以看出,5株菌在其溶藻阈值内第1天就可见效,达到最佳溶藻效果的时间w03<w01=w02<w04<w05,持续抑藻时间w04>w05>w01>w02>w03。



表5 各菌株的溶藻阈值

菌株	1	2	3	4	5	6
w01	0:100	10:100	15:100	20:100	25:100	30:100
w02	0:100	5:100	10:100	15:100		
w03	0:100	5:100	10:100	15:100		
w04	0:100	2:100	5:100	10:100		
w05	0:100	5:100	10:100	15:100		

注:紫红色数据为细菌溶藻能够起效的菌藻液体积比下限,有下划线的数据为细菌溶藻能够达到最好效果的菌藻液体积比下限。

表6 各菌株溶藻情况

d

菌株标号	抑藻或溶藻 见效时间	抑藻溶藻达最佳 效果时间	持续抑藻 时间
w01	1	5	20
w02	1	5	16~20
w03	1	4	16
w04	1	8	∞
w05	1	10	30

结合表5和表6可以看出,5株菌均具有溶藻性质,各自具有各自的溶藻特性,其中w04菌虽然其达到最佳溶藻效果的作用下限并不是最低,但溶藻效果最彻底,并且可以持续抑藻,所以该菌株在5株菌中溶藻效果是最好的。

3 结论

(1)利用果胶为唯一碳源的培养基可以有效分离筛选到溶藻细菌。

(2)细菌w01、w02、w03、w04、w05均具有较好的溶藻效果,其中w04的溶藻效果最好,当菌液中细菌浓度达 10^7 以上,藻细胞浓度为 10^7 时可以彻底溶解微囊藻,并具有持续抑藻效果。

(3)细菌w01、w02、w03、w04、w05均具有果胶酶活性。

(4)果胶酶活性与溶藻效果之间无严格的线性关系。

4 讨论

试验利用果胶为唯一碳源的培养基筛选溶藻菌,结果筛选到的5株菌均具有溶藻抑藻特性,然后对5株菌进行果胶酶活性测定,发现5株菌均具有果胶酶活性。在本试验中以果胶为唯一碳源的培养基筛选溶藻菌的概率为100%。通过5株菌的果胶酶活性大小与溶藻抑藻效果对比分析,推断出细菌溶藻与细菌分泌果胶酶之间存在着一定的相关性,但溶藻效果与细菌

分泌的果胶酶活性大小并不成正比例,w04的果胶酶活性最大,其溶藻抑藻效果也最好;w02与w05的果胶酶活性大小相同,但是它们的溶藻抑藻效果特征并不一样。由此推断,细菌产果胶酶是细菌溶藻抑藻的一个重要的因素。对于溶藻或抑藻细菌在国内外均有报道^[17-21],但是对于溶藻细菌的有效分离筛选方法以及细菌溶藻与果胶酶之间的相关性还无报道,笔者的报道尚数首例。为了进一步确定果胶酶在细菌溶藻中的贡献,可以对利用该方法分离到的溶藻菌所产生的酶系以及代谢产物进行系统分析比较。

参考文献

- [1] 张健红,李寅,刘和,等.一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化[J].应用与环境生物学报,2005,11(3):354-358.
- [2] 田林茂,张红燕,刘成,等.黑曲霉HG-1发酵苹果渣生产果胶酶的工艺优化及部分酶学性质[J].生物技术,2008,18(2):74-77.
- [3] Cardoso P G, Ribeiro J B, Teixeira J A, et al. Over expression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*[J]. J Ind Microbiol Biot, 2008,35(3):159-166.
- [4] 疏秀林,施庆珊,欧阳友生,等.微生物发酵生产果胶酶的研究概述[J].发酵科技通讯,2010,39(1):25-27.
- [5] Kluskens L D, Vanalebeekgij W M, Voragen G J, et al. Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*[J]. Biochemistry,2003,370(2):651-659.
- [6] 薛长湖,张永勤,李兆杰.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99.
- [7] 陈立阁,王路玲.果胶酶和壳聚糖对菠萝汁澄清作用的比较研究[J].广州食品工业科技,2004,20(1):48-49.
- [8] 林勤,唐春燕.壳聚糖和果胶酶对桑椹酒的澄清效果[J].贵州农业科学,2010,38(11):228-230.
- [9] 黄俊丽,李常军,王贵学.微生物果胶酶的分子生物学及其应用研究进展[J].生物技术通讯,2006,17(6):992-994.
- [10] 张红霞,江晓路,牟海津,等.微生物果胶酶的研究进展[J].生物技术,2005,15(5):92-95.
- [11] 贾月,弓爱君,邱丽娜,等.果胶酶分离纯化及分析方法的研究进展[J].工业微生物,2005,35(1):55-58.



- [12] 王伟,茆军,傅力,等.一株产低温果胶酶菌株的发酵培养基优化研究[J].农产品加工·学刊,2006(11):18-20.
- [13] 顾燕松.纺织生物助剂果胶酶酶活的测定方法[J].纺织科学研究,2002,13(3):29-35.
- [14] 江洁,李彩芹.果胶酶活性分光光度测定方法的研究[J].齐齐哈尔大学学报,1998,14(1):62-66.
- [15] 蒋世琼.果胶酶活力的简便测定方法[J].化学世界,1995,36(10):553-555.
- [16] 李现尧,刘晓文,史全良.一株微囊藻毒素降解辅助菌的分离和鉴定[J].微生物学通报,2010,37(3):473-478.
- [17] 李小彩,胡文容,裴海燕,等.一株溶藻细菌(P15)的溶藻效应研究[J].中国给水排水,2006,22(19):8-11.
- [18] 裴海燕,胡文容,曲音波,等.一株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性[J].环境科学学报,2005,25(6):796-802.
- [19] 陈凤兰,母瑞敏,杨小钰.利用栗褐芽孢杆菌除藻的试验研究[J].中国环境管理干部学院学报,2006(3):52-53.
- [20] 赵传鹏,浦跃朴,尹立红,吕锡武,李先宁.溶微囊藻菌的分离与溶藻作用[J].东南大学学报:自然科学版,2005(4):602-606.
- [21] 吴为中,安成才,刘新尧,等.溶藻细菌(B₃)的溶藻效果与溶藻特性的初步研究[J].北京大学学报:自然科学版,2003(4):489-493.

(上接第57页)

- [4] 曹孜义,刘国明.实用植物组织培养教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996:12.
- [5] 张志祥.葡萄组织培养的意义[M].北京:中国葡萄志,2005.
- [6] 马英,林艳,赵志新,等.八仙花杂交种胚培养[J].林业实用技术,2011(2):46-48.
- [7] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的建成及调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [8] 任玉芬.银×新杨试管植株的诱导[J].植物生理学通讯,1984(2):33-34.
- [9] 高志坚,刘炜,张亚平.保护地葡萄优质高产栽培技术[J].新疆农业科学,2003(2):22-23.
- [10] 孙可群,张应麟,龙雅宜,等.花卉及观赏树木栽培手册[M].北京:中国林业出版社,1985:25-26.
- [11] 蒙敏,蒋衡,何江成,等.俄罗斯杨组织快繁技术研究[J].新疆农业科学,2003,40(2):101-102.
- [12] 刘雪莲,顾地周.不同培养基对宿根福禄考不定芽诱导的影响[J].林业实用技术,2011(1):6-7.
- [13] 安运华.兰花种子培养研究进展[J].湖北农业科学,2006,45(1):122.
- [14] 王丰妍,王丰志,李莉,等.杂交兰组培苗的生根及移栽试验[J].林业实用技术,2011(2):49-50.
- [15] 李云,冯慧,田砚亭.‘红地球’葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立[J].园艺学报,2002,29(1):60-62.