

黄原胶降解菌的筛选及其降解酶性质的研究*

黄成栋¹ 王洪荣² 白雪芳¹ 杜昱光^{1**} 李宪臻²

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)¹ (大连轻工业学院生物与食品工程系 大连 116034)²

摘要: 从野外采集并筛选到一株能降解黄原胶的菌株, 并对菌种进行了对照鉴定。此外, 对菌株的发酵参数、黄原胶降解酶的性质(最适反应温度、pH 值, 金属离子的影响、底物专一性、动力学研究等)作了初步的研究。结果显示, 该酶的最适催化反应温度和 pH 分别为 30℃~40℃ 和 5.0~7.0; 能够专一性降解黄原胶; 测试大多数金属离子对酶活力没有明显影响, 但 Ca^{2+} 能很大程度地缓解 EDTA 对酶活的抑制作用。

关键词: 黄原胶, 黄原胶降解菌, 黄原胶降解酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0032-06

Screening of a Xanthan-Degrading Bacterium and Characterization of the Xanthanase

HUANG Cheng-Dong¹ WANG Hong-Rong² BAI Xue-Fang¹ DU Yu-Guang^{1**} LI Xian-Zhen²

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023)¹

(Department of Bio & Food Engineering, Dalian College of Light Industry, Dalian 116034)²

Abstract: One strain capable of degrading xanthan was isolated from soil and identified as *Cellulomonas* sp. The xanthan-degrading enzyme activity was detected and found that it is not thermostable. The optimal temperature is at 30℃~40℃ and pH optimum is 5.0~7.0. The enzyme is high specificity on xanthan. There is no effect of the tested meta ions on enzyme activity but the inhibition of EDTA on enzyme could be complemented by addition of Ca^{2+} partially.

Key words: Xanthan, Xanthan-degrading bacterium, Xanthan-degrading enzyme

黄原胶由五糖单位重复构成, 其主链是由 β -1, 4-糖苷键相连的葡萄糖链组成, 在主链结构上每隔一分子葡萄糖连着一个由三糖组成的侧链: 甘露糖→葡萄糖→甘露糖。其中, 与主链相连的甘露糖大多被乙酰基和侧链末端的甘露糖与丙酮酸发生缩醛反应从而被修饰, 而中间的葡萄糖则被氧化为葡萄糖醛酸, 分子量一般在 2000~20000 kD 之间。黄原胶除了有规则的一级结构外, 还具有稳定的二级结构——规则的螺旋结构^[1]。

黄原胶(xanthan gum)是人类研究最深、商业化应用程度最高的微生物胞外多糖。由于其独特的剪切稀释性质, 良好的增稠性, 理想的乳化稳定性, 对酸、碱、热、反复冻融的高度稳定性以及对人体的完全无毒害等许多优良的特性, 而在食品、石油、医药、日用化工等十几个领域有着极其广泛的应用。超乎寻常的稳定性极大地扩展了黄原胶的应用范围, 但同时也引起了一些应用问题。采油过程中黄原胶的使用可提高采油率, 但也增加了原油的粘度, 使后续工艺如油料运输及产品纯化的成本增高^[2], 为此需要能方便降解黄原胶的方法。

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2001AA625010、2002AA245131);

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA620501、2002AA245131)

** 联系人 Tel: 0411-4379061, Fax: 0411-4379061, E-mail: duyg@dicp.ac.cn;

收稿日期: 2004-03-12, 修回日期: 2004-06-22

尽管黄原胶的主链结构与纤维素相同,但由于规则的螺旋结构的保护,以及侧链所产生的位阻,使得一般的糖水解酶如淀粉酶、纤维素酶和半纤维素酶等都很难将其降解^[3]。Rinaudo 等在 1980 年第一次报道了用纤维素酶可以降解不规则构象的黄原胶主链,但却几乎完全不降解具有规则的螺旋构象的黄原胶^[4]。为了能有效降解黄原胶,Cripps 等人于 1981 年从土壤中分离到一种能以黄原胶为唯一碳源进行生长的棒状杆菌^[2],随后陆续又有研究者又发现了黄原胶的降解菌株^[5,6]。

最近我们从土壤中首次分离到了一株能够使黄原胶粘度迅速下降的 *Cellulomonas* 菌,该菌能够以黄原胶为唯一碳源进行生长,并发现该菌具有胞外黄原胶降解酶活性。本文主要研究了该黄原胶降解菌株的分类及降解酶的性质,这也是国内首次有关生物降解法生产黄原胶寡糖的报道。

1 材料与方法

1.1 黄原胶降解菌株的筛选及鉴定

将土样悬浮于灭菌后的生理盐水中,并进行梯度系列稀释后,按常规方法涂黄原胶平板,于 30℃ 培养箱中培养 24 h。分别挑出单个菌落的一部分接种于黄原胶平板,于 30℃ 培养箱培养 24 h,作为保留菌种;另一部分接种于选择性液体培养基,并于 30℃ 振荡培养 (200 r/min),观察培养基的粘度变化。

选择性液体培养基组成为:黄原胶:2.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 3.0 g, K_2HPO_4 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16.7 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.66 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, H_3BO_3 0.1 mg, NaNO_3 2.0 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, 定容至 1 L。黄原胶平板培养基的组成为:琼脂粉:20 g,蛋白胨:1 g,酵母浸出粉:1 g,黄原胶:3 g,葡萄糖:2 g,水:1 L。黄原胶液体培养基的组成为:黄原胶:4.5 g,葡萄糖:0.8 g,蛋白胨:1 g,酵母浸出粉:1 g,调 pH 至 7.0 左右,定容至 1 L。

黄原胶降解菌株的分类鉴定按《伯杰细菌鉴定手册》^[7]和《国际细菌分类学杂志》进行。

1.2 培养

将活化后的黄原胶降解菌按 1% 接种量接种至装有 100 mL 黄原胶液体培养基的 250 mL 三角瓶中培养。培养温度为 30℃,旋转式摇床转速为 200 r/min,培养过程中每隔一定时间取样,分别测定发酵液的 OD_{600} 和上清液中的还原糖含量 (P-Hydroxybenzoic acid hydrazide, PAHBAH 法^[9]) 及粘度。

1.3 降解酶的初步纯化

将培养 4~5 d 的发酵液 (以培养液的粘度大幅度降低为根据) 在 9,000 r/min, 4℃ 条件下离心 15 min 除去菌体,于上清液中分别加入 35%~80% 不同饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,静置 40 min,然后在 9000 r/min, 4℃ 下离心 20 min,用磷酸盐缓冲液溶解沉淀,分别测定酶活力。

将盐析后所得粗酶透析 12 h (换 3 次透析液),冷冻干燥后,再溶解于小体积的相同缓冲液中。上事先平衡过的 DEAE-Sepharose 柱 (pH=5.9),用含有 0.7 mol/L NaCl 的相同缓冲液线性梯度洗脱 (流速 1 mL/min),并收集活性组分。合并活性组分并透析后,用冷冻干燥机浓缩,再次上 DEAE-Sepharose 柱 (pH=4.9),收集活性组分,透

析 12 h (中间换 3 次透析液), 浓缩成固体后 -20℃ 冷藏保存留作活性分析。

1.4 酶活力分析

将一定量的酶与底物 (0.25% 黄原胶水溶液) 混合后 (酶与底物的质量比为 1:15), pH5.9, 在 30℃ 水浴中反应 45 min, 立即取 200 μL 反应液加入到 750 μL 5% PAHBAH (Sigma) 和 NaOH (5%) 的混合液中, 在 120℃ 下加热 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。

1.5 黄原胶降解酶的酶学性质研究

1.5.1 温度对黄原胶降解酶的影响: 分别在 25℃、30℃、35℃、40℃、50℃ 下测定酶活 (pH5.9), 以 30℃ 为基准 (100%)。并在 40℃、45℃、50℃ 下分别保温 1 h, 在 30℃ 水浴中测定酶活, 以没有保温 0 h 的酶活为基准 (100%)。

1.5.2 pH 对降解酶的影响: 分别在 pH 4.4、4.9、5.9、7.0、8.0、9.2 下于 30℃ 水浴中保温 0、1、3 h, 测定酶活, 以在 pH5.9 下保温 0 h 的酶活作为基准 (100%)。

1.5.3 金属离子对酶活的影响以及 Ca^{2+} 对 EDTA 抑制作用的补偿: 在不同金属离子存在时测定酶活 (30℃, pH5.9), 以没添加金属离子的酶活作为空白对照 (100%), 除 Na^+ 和 K^+ 为 150 mol/L 外, 其余的金属离子浓度皆为 1×10^{-3} mol/L。

在 EDTA 存在下 (6×10^{-4} mol/L), 加入不同量的 Ca^{2+} , 测定酶活, 以不含 EDTA 和 Ca^{2+} 的酶活为空白对照 (CK, 100%)。

1.5.4 底物专一性的研究: 分别以纤维素、淀粉、葡聚糖、木聚糖、昆布多糖、卡拉胶 (τ), 卡拉胶 (λ), 卡拉胶 (κ) [以上药品皆为 Sigma 公司产] 作为酶解底物, 以黄原胶作为底物的酶活为基准 (100%), 测定酶活 (30℃, pH5.9), 以上黄原胶作为底物的酶活为基准 (100%)。

1.5.5 酶的动力学研究: (a) V-S 曲线: 将一定量的酶与不同浓度的底物 (S) 混和, 酶解时间准确控制为 15 min (30℃, pH5.9), 测定还原糖的生成量, 除以酶解时间作为酶解速度 (V)。以 V-S 作图。(b) EDTA 对酶活的抑制曲线: 将一定量的酶与不同浓度的底物 (S) 混和, 加入 EDTA, 使其在反应体系的浓度为 1×10^{-3} mol/L, 酶解时间准确控制为 15 min (30℃, pH5.9), 测定还原糖的生成量, 除以酶解时间作为酶解速度 (V), 以 V-S 作图。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

从黄原胶平板上挑取能使选择性液体培养基粘度明显变稀所对映的菌落, 在新鲜黄原胶平板上划线培养, 选择单菌落, 用选择性液体培养基进行复筛, 经对培养过程中培养液粘度下降程度和速度的比较, 选出一株对黄原胶降解能力最强的菌落作为研究用菌, 并命名为 XT11。

黄原胶降解菌 XT11 在细胞生长过程中呈杆状, 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, 抗酸性阴性, 且不运动。由《伯杰细菌鉴定手册》可知, 应属于纤维单胞菌属 *Cellulomonas*。但由于其不水解纤维素, 又与已知纤维单胞菌属的各个种有区别, 可能是 *Cellulomonas* 属中的一个新种。有关该菌株是否是一新种, 尚需对其 16S rRNA 系统发育树和 DNA 杂交数据分析后才能确定。

2.2 发酵

将黄原胶降解菌 XT11 接种于黄原胶液体培养基中培养,并测定培养过程中的细胞浓度、还原糖含量和粘度的变化,结果如图 1。当有还原糖(在发酵液中加入少量的葡萄糖来加快菌株的最初生长速度),存在时发酵液的粘度没有变化,说明没有降解酶的出现。发酵 2 d 后,发酵液中的葡萄糖耗尽,该菌株开始分泌降解酶降解黄原胶(现象反映为还原糖的生成以及发酵液表观粘度的下降),因此有明显的二次生长现象,并断定该酶为诱导酶。此外,发酵液中还原糖的大量生成滞后于发酵液粘度的大幅降低,说明最先被降解的应是主链结构(xanthase),伴随的还原糖量持续升高则说明了发酵液中侧链降解酶(xanthan lyase)的存在。

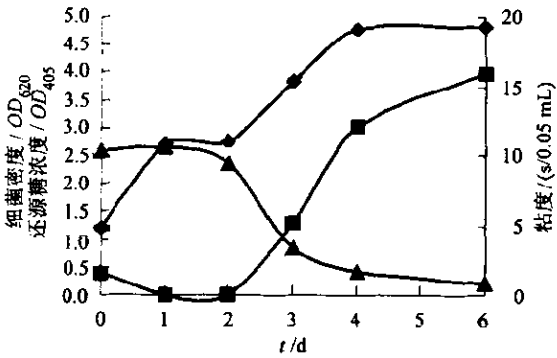


图 1 发酵液性质变化研究

◆ 细菌密度 (OD₆₀₀), ■ 还原糖含量, ▲ 粘度

2.3 黄原胶降解酶的部分分离纯化

黄原胶降解酶分离纯化的结果如表 1。经测定,45%~65% 饱和度的硫酸铵可以最大限度地将黄原胶降解酶沉淀并除去尽可能多的杂蛋白。

表 1 黄原胶降解酶的纯化结果

提纯步骤	总酶活/(u)	总蛋白量/(mg)	比活/(u/mg)	回收率/(%)	提纯倍数
Crude enzyme	3481	1123	1.7	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	2054	105.3	19.5	59.0	11.5
DEAE-Sepharose (pH5.9) Chromatography	1626	3.33	48.4	46.7	28.5
DEAE-Sepharose (pH4.9) Chromatography (peak1#)	214.3	0.73	293.5	6.2	172.6
DEAE-Sepharose (pH4.9) Chromatography (peak 2#)	333.7	0.86	388.1	9.6	228.3

在硫酸铵沉淀蛋白中仍含有相当量的糖,由于这些糖并不挂柱,因此在第一次 DEAE-Sepharose 层析时 (pH5.9) 可将其除去。在第二次 DEAE-Sepharose 柱层析时 (pH4.9),从柱上洗脱出两个具有酶活的蛋白峰(分别命名为峰 1#和峰 2#,图略)。由黄原胶的结构推测,微生物要利用黄原胶作为碳源生长,至少应由两种酶共同起作用——主链水解酶和侧链水解酶,因此推测这两个蛋白峰可能为两种不同的降解酶,有待进一步的实验证实。至投稿日止,我们尚未得到电泳纯的黄原胶降解酶,因此本文使用部分纯化的黄原胶降解酶进行酶学研究。

2.4 酶学性质的研究

2.4.1 最适酶解温度以及温度稳定性:结果表明(图 2),黄原胶降解酶的最适温度为 30℃~40℃,并且,其温度敏感性较高,在 45℃下保温 1 h 酶活力是 28.6%,50℃下保温 1 h 酶活力只剩 14.6%。

2.4.2 最适酶解 pH 以及 pH 稳定性: 见图 3。该酶的最适 pH 的范围为 5.0~7.0, 但对 pH 的敏感性不高, 在 pH9.2 时能保持 57% 的活性, 即便在此 pH 下保温 3 h 能保持 43% 的活性。

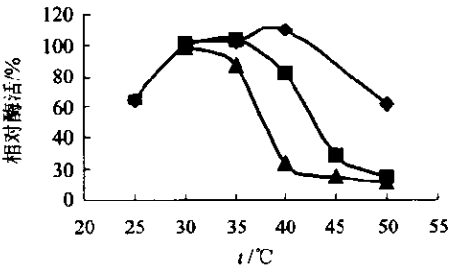


图 2 酶的最适温度及温度稳定性

◆ 0h, ■ 1h, ▲ 3h

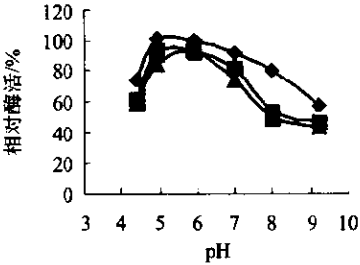


图 3 酶的最适 pH 及 pH 稳定性

◆ 0h, ■ 1h, ▲ 3h

2.4.3 金属离子对酶活的影响: 由结果 (图 4) 可知, 主族的二价离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活没有影响, 高浓度的主族一价离子 Na^+ 、 K^+ 对酶活有一定程度的影响, 过渡金属离子 Co^{2+} 对酶活有一定的影响, 而过渡金属离子 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、金属离子螯合剂 EDTA 的存在则几乎可使其完全失活。而由 Ca^{2+} 对 EDTA 抑制作用的补偿实验结果 (图 7) 可知, Ca^{2+} 能很大程度地缓解 EDTA 对酶活的抑制作用。

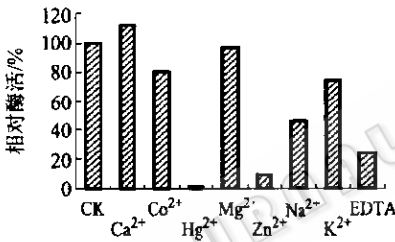


图 4 金属离子对酶活的影响

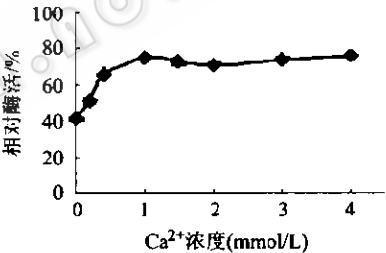


图 5 Ca^{2+} 对酶活的补偿作用

可由此推测出主族的二价金属离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等) 对于维持此酶活性的必要性: 一是直接的活性中心, 二是作为辅基而起辅助性作用。正常情况下此酶中并不缺少此类金属离子, 因此 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的加入并不能影响酶活, 而加入 EDTA 后, 由于其螯合了酶中的此类金属离子而使酶活大幅降低, 通过向溶液中添加 Ca^{2+} 可使酶活得以恢复。而就主族的一价金属离子、过渡金属离子而言, 由于对酶中的金属离子存在着竞争而将其置换下来, 从而导致酶活力不同程度的损失。

2.4.4 底物专一性的研究: 黄原胶降解酶具有高度底物专一性, 除黄原胶外, 对其它多糖仅有较低的降解活性, 如表 2 所示。

表 2 酶的专一性研究

底物	相对酶活/%	底物	相对酶活/%	底物	相对酶活/%
黄原胶	100	昆布多糖	0	果胶	0
纤维素	9	卡拉胶 (τ)	0	岩藻聚糖	4
淀粉	0	卡拉胶 (λ)	23	海藻酸钠	10
葡聚糖	0	卡拉胶 (κ)	5	菊粉	0
木聚糖	0	瓜胶	18	多聚半乳糖醛酸	12

2.4.5 酶的动力学研究：米氏方程以及 EDTA 对酶活的抑制作用：如图 6，通过绘出 V-S 曲线，可得到关于此酶的如下信息：(1) 米氏常数 (Michaelis constant) $K_m = 0.26 \mu\text{g/mL}$ ；(2) 最大反应速度 $V_{\max} = 72 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ ；因此，如果该酶的动力学方程符合 Michaelis - Menten equation，则：

(a) 当 $S \ll K_m$ 时， $V = V_{\max} \times S/K_m = 277 \cdot S$

(b) 当 $S \gg K_m$ 时， $V = V_{\max} = 72 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$

(c) 当 S 与 K_m 接近时， $V = V_{\max}/(K_m + S) = 72/(0.26 + S)$

通过有 EDTA 抑制时的 V-S 曲线可以看出，EDTA 使酶对底物的 K_m 明显增大 ($K_m > K_m$)，而 V_{\max} 并无太大变化，说明 EDTA 可能螯合并从而占据了酶和底物的结合作用密切相关的金属离子的位点，使得酶与底物结合的能力大大减弱，只有当底物浓度过量时，才能恢复其原有的反应速度。此外，如很多构酶那样，抑制剂 (EDTA) 的存在增大了底物 (黄原胶) 与酶结合过程中的协同性，使 V-S 曲线变为明显的 S 型，因此推测此酶为别构酶。

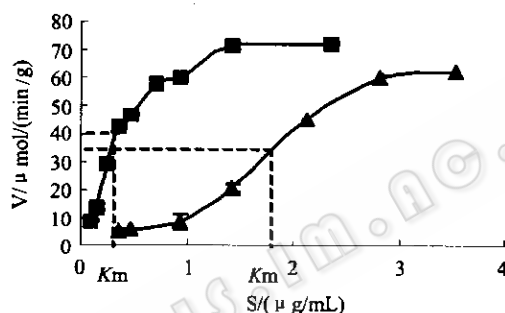


图 6 无抑制的 V-S 曲线以及加入 EDTA 后的 V-S 曲线

3 结论及展望

本文发现了一种新型的可分泌黄原胶降解酶的细菌，并对该酶进行了初步的分离纯化；研究了黄原胶降解酶的酶学性质，发现黄原胶降解酶对温度敏感性较高，而对 pH 环境的要求则相对宽松；通过研究金属离子对酶活性影响，以及 Ca^{2+} 对 EDTA 抑制作用的补偿作用，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；通过研究酶反应初速度 (V) 与底物浓度 (S) 之间的关系，以及加入抑制剂后的 V-S 关系发现，此酶为别构酶。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，有待进一步的实验研究。

参考文献

- [1] Morris E R. Extracellular microbial polysaccharides, ACS Symp. Ser, 45 (Washington, DC) 1977. pp. 81 ~ 89.
- [2] Cripps, Eur Pat Appl 30393 Abstr, 1981 ; 95 (258): 14157q.
- [3] Ganguly A K, Ziracin J. Antibiot, 2000. 53 (10): 1038 ~ 10144.
- [4] Kunz C, Rudloff S. Annu Rev Nutr, 2000, 20: 699 ~ 722.
- [5] Barnara K. Polymer Degrad and Stap, 1998, 59: 81 ~ 84.
- [6] Rinaldo N J, Milas, Int J Biol Macromol, 1980, 2: 45 ~ 48.
- [7] Cadmus, Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 5 ~ 11.
- [8] Williams S T, Gharpe M E, Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (1989), 30: 20 ~ 32.
- [9] Lever M. Anal Biochem, 1972, 47: 273 ~ 279.