

# 褐藻胶降解菌突变株的选育及降解特性研究

王蒋媚, 蒋人凤, 祝 婕, 陈琼珍\*

温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州

收稿日期: 2025年1月13日; 录用日期: 2025年3月11日; 发布日期: 2025年3月20日

## 摘 要

【目的】通过双重诱变获得高效降解褐藻胶的菌株, 并确定该菌株发酵产酶的最优条件, 同时研究其化学试剂抗性能力、降解效率, 进而解析该菌株的降解特性。【方法】采用紫外和亚硝基胍(NTG)溶液对原始菌株*Cobetia* sp. cqz5-12进行双重诱变, 利用平板初筛(氯化钙透明圈法)和摇瓶复筛(二硝基水杨酸法(DNS法))获得目的突变菌株。采用单因素试验优化其发酵条件, 分别利用滤纸片法和氯化钙透明圈法分析化学试剂对菌株生长和降解褐藻胶能力的影响, 利用间苯三酚分光光度计法测定菌株发酵液对不同底物的降解效率。【结果】筛选得到一株降解效率显著提高的诱变菌株, 并将其命名为*Cobetia* sp. cqz5-12-M2。该诱变菌株最优发酵条件为pH 6.5、NaCl浓度为0、发酵温度为31°C、发酵时间为96 h, 此时该突变株总酶活可以达到59.81 U/mL, 比原始菌株的酶活提高50.84%。该突变菌株对褐藻胶的降解效率为42%, 比原始菌株提高8.8%。该突变菌株和原始菌株均对多种待测试剂有敏感性。突变使得菌株对苯酚、氯霉素、阿莫西林或氨苄青霉素的敏感性降低, 对过氧化氢、乙醇、碘伏等多种化学试剂的敏感性增强。当培养基中存在链霉素、氨苄青霉素或卡那霉素存在时, 突变使得菌株对褐藻胶降解能力减弱, 当培养基中存在阿莫西林、5%石炭酸、庆大霉素或头孢菌素时, 突变使得菌株对褐藻胶降解能力增强。【结论】筛选得到的突变菌株对多种消毒剂和抗生素具有良好抗性, 对环境耐受性强, 是目前少见的高适应性褐藻胶降解菌。

## 关键词

褐藻胶降解菌, 诱变选育, 降解特性

## Study on Breeding and Degradation Characteristics of Algin Degrading Mutant Strains

Jiangmei Wang, Renfeng Jiang, Jie Zhu, Qiongzen Chen\*

College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou Zhejiang

Received: Jan. 13<sup>th</sup>, 2025; accepted: Mar. 11<sup>th</sup>, 2025; published: Mar. 20<sup>th</sup>, 2025

\*通讯作者。

文章引用: 王蒋媚, 蒋人凤, 祝婕, 陈琼珍. 褐藻胶降解菌突变株的选育及降解特性研究[J]. 微生物前沿, 2025, 14(1): 34-44. DOI: 10.12677/amb.2025.141005

## Abstract

**[Objective]** The efficient algin degrading strain was obtained by double mutagenesis, and the optimal conditions for the fermentation enzyme production of the strain were determined. Meanwhile, the chemical reagent resistance and degradation efficiency were studied to analyze the degradation characteristics of the strain. **[Methods]** The original strain *Cobetia* sp. cqz5-12 was mutagenic by UV and nitrosoguan (NTG) solution, and the target mutant strain was obtained by plate screening (calcium chloride transparent ring method) and flask rescreening (dinitrosalicylic acid method (DNS method)). Single factor test was used to optimize the fermentation conditions. The effects of chemical reagents on the growth and degradation ability of algin were analyzed by filter paper method and calcium chloride transparent circle method, respectively. The degradation efficiency of different substrates was determined by phloroglucinol spectrophotometer. **[Results]** A mutagenic strain with significantly improved degradation efficiency was selected and named *Cobetia* sp. cqz5-12-M2. The optimal fermentation conditions of the mutagen strain were pH 6.5, NaCl concentration 0, fermentation temperature 31 °C and fermentation time 96 h. In this case, the total enzyme activity of the mutant strain could reach 59.81 U/mL, which was 50.84% higher than that of the original strain. The degradation efficiency of the mutant strain was 42%, which was 8.8% higher than that of the original strain. Both the mutant strain and the original strain were sensitive to a variety of agents to be tested. The mutation made the strain less sensitive to phenol, chloramphenicol, amoxicillin or ampicillin, and more sensitive to hydrogen peroxide, ethanol, iodophor and other chemical agents. When streptomycin, ampicillin or kanamycin were present in the medium, the degradation ability of algin was weakened by mutation; when amoxicillin, 5% carbolic acid, gentamicin or cephalosporin were present in the medium, the degradation ability of algin was enhanced by mutation. **[Conclusion]** The mutant strain was resistant to various disinfectants and antibiotics, and had strong environmental tolerance. It was a rare and highly adaptable algin degrading bacterium.

## Keywords

Alginate Degrading Bacteria, Mutagenesis Selection, Degradation Characteristics

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

褐藻寡糖由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸(M)和  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸(G)通过 1-4 糖苷键连接而成[1], 其分子量较低、黏性小、易于吸收, 而且表现出较强的生物活性[2], 可应用于多个领域, 如可抗肿瘤[3]以及治疗阿尔茨海默病[4]; 可作为饲料添加剂, 有助于肠道有益细菌生长, 改善肠道健康, 增强免疫力[5]。褐藻寡糖是褐藻胶的降解产物, 褐藻寡糖的制备可采用物理法、化学法和生物法, 其中生物法相对环保、节能、选择性强、反应条件温和、效率高[6]。利用褐藻胶降解菌降解褐藻胶是常用的生物法, 该方法制备的褐藻寡糖具备优异的生物活性。

褐藻胶降解菌株来源广泛, 可从海藻、海洋软体动物、海洋腹足类动物等分离得到[6]-[13], 其中, 海洋细菌为主要来源[1]。目前, 已被分离纯化的褐藻胶降解菌株有黄杆菌属、弧菌属、假交替单胞菌属、芽孢杆菌属、农杆菌属、琼胶菌属等[6]-[13]。不同褐藻胶降解菌的最优发酵条件不同, 降解特性也有所差异。例如, 李梦分离得到的菌株 PLT1 来源于海岸土壤, 为芽孢杆菌属, 优化后的裂解酶活可达 214.641

U/mL, 得到的酶解产物为褐藻三糖、四糖和无糖[14]。孟青分离得到的菌株 SK42.001 来源海泥, 为弧菌属, 优化后的酶活可达 5.20 U/mL, 得到的酶解产物主要为褐藻三糖[15]。

在实际的科研和生产中, 通过对菌株进行诱变育种, 可以得到某种优良性状或实现对菌株的改造。用于诱变育种的诱变方法按照诱变源的不同可分为物理诱变、化学诱变、生物诱变等[16]。物理法多为辐射诱变, 如微波辐射、紫外线辐射、X 射线等[17]; 化学方法常用的诱变剂有烷化剂、碱基类似物和吡啶化合物, N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)和甲基磺酸乙酯(EMS)为常用的烷化剂[17]; 生物方法包括转导、转化等, 常用的工具有特定的噬菌体、细菌质粒 DNA、DNA 转座子等[18]。

根据实际情况, 可以选择用单一方法进行诱变(即单一诱变), 也可以多种方法联用以实现诱变育种。紫外诱变、ARTP 等离子诱变常被单独用于诱变育种。如刘思慧通过紫外诱变使酿酒酵母的酒精产率提高 22.0% [16]; 郑志国运用等离子体诱变技术获得了褐藻胶降解菌突变株 HB172198 [19], 该突变株降解能力比原始菌株提高了 32.6%; 张书利运用紫外和甲磺酸乙酯(EMS)进行双重诱变获得了突变菌株 510-64, 其褐藻胶降解能力比原始菌株提高了 385% [20]。复合诱变需要多种诱变手段结合, 如紫外诱变和烷化剂诱变结合、紫外诱变和微波诱变结合等。安宇等通过烷化剂 NTG 和紫外的联用[21], 成功得到了一株高产细菌素的植物乳酸菌突变株 M1-UVs300, 该菌株兼具遗传稳定性、优良发酵特性和抑菌功效, 与出发菌株 M1 相比, 其抑菌相对效价提高了 252.79% 左右。王德森等通过紫外诱变和微波诱变的联用[22], 成功筛选出高产替考拉宁的突变菌株 AT 92-52-37, 该突变株与原始菌株相比替考拉宁的产率提高了 5 倍。

为提高已分离的褐藻胶降解菌的褐藻胶降解能力, 本研究利用 NTG 和紫外对褐藻胶降解菌株 *Cobetia* sp. cqz5-12 进行双重诱变。经过氯化钙透明圈初筛和 DNS 复筛获得了降解性能提高的突变菌株, 并将其命名为 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2。接着, 采用单因素优化试验以提高其产酶能力, 并利用一系列实验分析其对多种试剂的抗性能力、对褐藻胶的降解能力等, 以明确该菌株的降解特性, 为后续工业应用提供基础理论数据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 试剂

培养基 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, pH7.5。种子液培养基(g/L): 海藻酸钠 6 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 2.5 g, 氯化钠 25 g, 磷酸氢二钾 0.25 g, 七水硫酸镁 0.5 g, 硫酸亚铁·七水 0.05 g; 固体培养基在种子液培养基的基础上添加 2% 的琼脂。发酵液培养基(g/L): 海藻酸钠 5 g, 胰蛋白胨 5 g, 氯化钠 25 g, 磷酸氢二钾 0.25 g, 硫酸镁·七水 0.5 g, 硫酸亚铁·七水 0.05 g。发酵优化培养基(g/L): 酵母粉 5 g, 海藻酸钠 5 g, 氯化钠 X g, 磷酸氢二钾 0.25 g, 硫酸镁·七水 0.5 g, 硫酸亚铁·七水 0.05 g, pH X。亚硝基胍母液: 将 10 mg NTG 溶于 1 mL 丙酮, 配制成 10 mg/mL 的亚硝基胍母液。化学试剂: 化学试剂包括消毒剂和抗生素, 消毒剂为 2% 苯酚、75% 乙醇、5% 石炭酸、碘伏和 3% 过氧化氢, 抗生素为 50 ug/mL 卡那霉素、50 ug/mL 庆大霉素、100 ug/mL 氨苄青霉素、50 ug/mL 氯霉素、10 mg/mL 四环素、300 ug/mL 头孢菌素、50 mg/mL 链霉素、20 ug/mL 阿莫西林、10 mg/mL 利福平和 0.05 ug/mL 异烟肼。

#### 2.1.2. 仪器设备

紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司); 超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 低速离心机(德国 Eppendorf 公司); 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); 全自动超声破碎仪(Diagenode 公司)。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. NTG、紫外双重诱变 *Cobetia* sp. cqz 5-12

设置不同诱变时间：将亚硝基胍母液分别加入到 5 支含有 10 mL 菌悬液的试管中，使亚硝基胍终浓度为 0.001 g/L。将 5 支试管置于 37℃ 恒温水浴锅内分别温育 0、10、20、30、40 min，温育过后的每支试管里的菌悬液平铺至数个无菌的空培养皿内，并置于 20 W 紫外灯下分别照射 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 min (照射距离为 45 cm)。紫外照射结束后，迅速在黑暗条件下将各个培养皿中的菌悬液以 5000 r/min 离心 3 min 以收集菌体沉淀。用适量的无菌生理盐水洗涤菌体两次，然后用同样的生理盐水梯度稀释至合适梯度，取 100 uL 菌悬液涂布于含 0.6% 海藻酸钠的种子培养基平板上，30℃ 倒置培养 24~48 h 进行菌落计数，计算致死率。

设置不同诱变浓度：取 10 mL 菌悬液平铺于无菌空培养皿内，于 20 W 紫外灯下照射 2 min (照射距离为 45 cm)。之后于黑暗条件下迅速 5000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀，用适量的无菌生理盐水洗涤菌体两次，然后用相同体积的生理盐水重悬菌体沉淀，制得的菌悬液均分成 5 等份后加入适量 NTG 溶液使 NTG 终浓度分别为 0、0.01、0.001、0.0001、0.00001 g/L。将处理过的菌悬液于 37℃ 恒温水浴锅内温育 20 min，5000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀，用适量的无菌生理盐水洗涤菌体两次，然后用同样的生理盐水梯度稀释至合适梯度，取 100 uL 菌悬液涂布于含 0.6% 海藻酸钠的种子培养基平板上，30℃ 倒置培养 24~48 h 进行菌落计数，计算致死率。

### 2.2.2. 发酵条件优化

以发酵液培养基为出发培养基，对培养基组分及培养条件进行优化，包括 NaCl 浓度、最适 pH 值、最适温度和发酵时间。除考察发酵时间因素外，其余条件的发酵时间均为 72 h 将培养得到的 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2 种子液离心收集、洗涤后按 5% 接种量分别接种至相应发酵液体培养基中，150 r/min，30℃ 进行培养，培养结束后，4℃、8000 r/min、5 min 离心，分别收集发酵上清液和菌体沉淀，利用 DNS 法分别测定发酵上清液和菌体沉淀酶活。

以上述得到的最优发酵条件分别发酵培养原始菌株和突变菌株。培养结束后收集上清液和菌体沉淀测酶活，以比较原始菌株和突变菌株在最优发酵条件下的总酶活差异。

### 2.2.3. 化学试剂对菌株生长的影响

吸取 *Cobetia* sp. cqz5-12 和 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2 的菌悬液各 100 uL，分别涂布于 LB 平板上，用无菌镊子将浸有化学试剂的灭菌小圆滤纸片贴到平板相应区域，30℃ 倒置培养 24 h 左右，取出平板观察并测量抑菌圈大小。

### 2.2.4. 化学试剂对菌株降解褐藻胶能力的影响

将原始菌株和突变株的单菌落分别转接入事先涂布了 100 uL 待测化学试剂的最优发酵培养基平板上，25℃ 培养 48 h。培养结束后，往每个单菌落周围缓慢滴入 5% 氯化钙，浸润 15 min 后测量透明圈直径 D 和菌落直径 d，并计算出每个单菌落的 D/d 值。

### 2.2.5. 菌株及其粗酶液的降解能力初探

按 5% 接种量分别吸取原始菌株和突变菌株菌悬液，4℃、8000 r/min、5 min 离心收集菌体沉淀，并分别接种至 1.2.3 得到的最优发酵液体培养基中，150 r/min，30℃ 培养 72 h 后经 4℃、8000 r/min、5 min 离心得到原始菌株和突变菌株的发酵上清液。

通过检测样品中海藻酸钠的残余量来确定突变株对褐藻胶的降解效率，采用间苯三酚分光光度计法测定海藻酸钠的含量。

突变株对褐藻胶的降解效率可用如下公式计算得到：

$$\omega = \frac{m_0 - m}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

$\omega$ : 突变株对褐藻胶的降解效率, %;  $m_0$ : 不接菌对照组的发酵上清液中的海藻酸钠含量, g;  $m$ : 接菌处理组的发酵上清液中的海藻酸钠含量, g。

### 2.2.6. 活力测定

初筛: 采用氯化钙透明圈法。无菌条件下, 挑取单菌落转入降解性能验证平板(种子液固体培养基)上相应编号的网格内。培养 24 h 后, 将事先配好的 3%氯化钙溶液倒入降解性能验证平板内, 使其铺满皿底, 静置 20 min, 观察是否出现透明圈。

复筛: 采用 DNS 测酶活法。取适量 pH 7.4 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液对粗酶液进行稀释, 然后取 1 mL 适当稀释的发酵上清液与 1 mL 现配的 0.3%海藻酸钠溶液混匀, 40℃、20 min, 再加入 1.5 mL DNS 溶液, 混匀后沸水浴 10 min, 立即冷却至室温后测定 OD<sub>540</sub>。

酶活力单位(E)定义为在实验条件下, 每分钟催化底物产生 1 μg 还原物所需的酶量。发酵液酶活力单位定义为每 mL 发酵液含酶活单位(U/mL)。酶活公式如下

$$E = \frac{\Delta A \times n}{t} \quad (2)$$

式中:  $\Delta A$  ——用 DNS 法测得的 OD<sub>540</sub> 值在葡萄糖标准曲线上所对应的浓度(mg/mL);

$n$  ——发酵上清液稀释倍数;

$t$  ——酶反应时间(实验中均为 20 min)。

**Table 1.** Summary of plate primary screening and DNS re-screening results of each strain

**表 1.** 各菌株平板初筛和 DNS 复筛结果汇总

菌株编号	透明圈直径/菌落直径(D/d)	粗酶活力(U/mL)
N <sub>0.001</sub> -1-11 <sup>①</sup>	1.8 ± 0.16c	12.54 ± 0.90b
T <sub>N0</sub> TUV2-5-8 <sup>②</sup>	2.8 ± 0.64abc	11.24 ± 0.05b
T <sub>N10</sub> TUV1.5-1-19 <sup>③</sup>	3.4 ± 0.38ab	14.87 ± 2.92ab
T <sub>N20</sub> TUV2-2-19 <sup>④</sup>	2.2 ± 0.16bc	18.23 ± 0.72ab
T <sub>N30</sub> TUV2.5-2-14 <sup>⑤</sup>	3.7 ± 0.301a	17.70 ± 4.61ab
T <sub>N40</sub> TUV2-2-51 <sup>⑥</sup>	3.3 ± 0.35ab	19.74 ± 3.8a
<i>Cobetia</i> sp.cqz5-12 <sup>⑦</sup>	2.9 ± 0.07abc	12.47 ± 1.50b

注: 采用 SPASS 软件进行分析, 不同小写字母表示纵向结果的显著性差异(P < 0.05)。① 该突变菌株经 20 W 紫外诱变 2 分钟、0.001 mg/L NTG 温育 20 分钟后经平板初筛得到, 为 1 号板上的 11 号菌株; ② 该突变菌株经 0.001 mg/L NTG 温育 0 分钟、20 W 紫外诱变 2 分钟后经平板初筛得到, 为 5 号板上的 8 号菌株; ③ 该突变菌株经 0.001 mg/L NTG 温育 10 分钟、20 W 紫外诱变 1.5 分钟后经平板初筛得到, 为 1 号板上的 19 号菌株; ④ 该突变菌株经 0.001 mg/L NTG 温育 20 分钟、20 W 紫外诱变 2 分钟后经平板初筛得到, 为 2 号板上的 19 号菌株; ⑤ 该突变菌株经 0.001 mg/L NTG 温育 30 分钟、20 W 紫外诱变 2.5 分钟后经平板初筛得到, 为 2 号板上的 14 号菌株; ⑥ 该突变菌株经 0.001 mg/L NTG 温育 40 分钟、20 W 紫外诱变 2 分钟后经平板初筛得到, 为 2 号板上的 51 号菌株; ⑦ 该菌为未经过诱变的原始菌株。

## 3. 结果

### 3.1. 褐藻胶降解菌突变株的选育结果

利用氯化钙浸润法对经过 NTG 和紫外诱变后的菌株进行初筛, 从中选取六株菌株。对原始菌株和

该 6 株突变菌株再次进行氯化钙浸润法初筛和 DNS 复筛, 数据结果见表 1。与原始菌株相比, 这三株突变菌株降解能力无显著性差异。

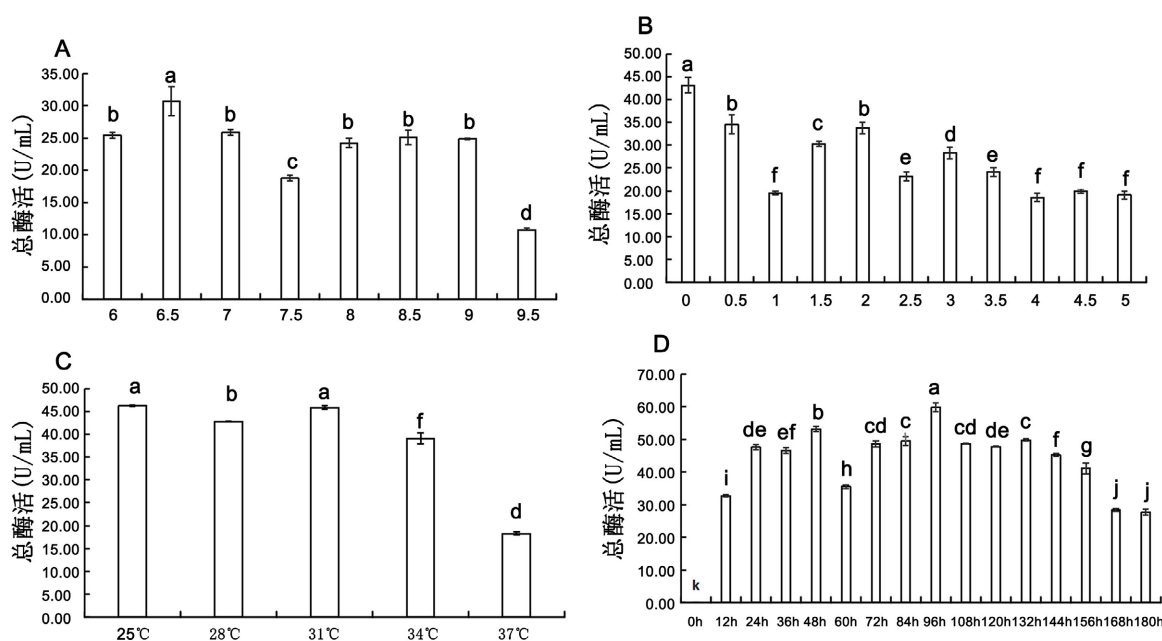
利用 DNS 法进行复筛, 数据结果见表 1。与原始菌株相比, 诱变菌株  $N_{0.001-1-11}$ 、 $T_{N10}T_{UV1.5-1-19}$ 、 $T_{N20}T_{UV2-2-19}$ 、 $T_{N30}T_{UV2.5-2-14}$ 、 $T_{N40}T_{UV2-2-51}$  的酶活均有所提高, 其中  $T_{N40}T_{UV2-2-51}$  有显著差异。

综合考虑 D/d 值和粗酶活力结果, 最终选取突变菌株  $T_{N40}T_{UV2-2-51}$  作为目的突变菌株, 并将其更名为 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2。

### 3.2. 突变菌株 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2 发酵条件优化

当突变菌株分别在 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 的培养基中进行培养 72 h 时, 其总酶活分别为  $25.40 \pm 0.45$ 、 $30.73 \pm 2.24$ 、 $25.86 \pm 0.47$ 、 $18.76 \pm 0.43$ 、 $24.23 \pm 0.69$ 、 $25.06 \pm 1.09$ 、 $24.83 \pm 0.13$ 、 $10.76 \pm 0.31$  U/mL (图 1A)。其中, 以 pH 为 6.5 时菌株总酶活最高, 与其他处理组相比有显著差异性, 因此最终选取 pH 为 6.5 作为最优发酵 pH。该突变菌株在氯化钠浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 g/L 中发酵 72 h 后的总酶活如图 1B 所示, 其中, 当 NaCl 浓度为 0 g/L 时菌株的总酶活最高, 达到  $43.13 \pm 1.61$  U/mL, 与其他处理组具有显著差异, 因此最终选取 NaCl 浓度为 0 g/L 为最优发酵 NaCl 浓度。该突变菌株在温度分别为 25、28、31、34、37°C 培养 72 h 后的总酶活结果如图 1C 所示, 当温度为 25°C~31°C 时, 菌株总酶活稳定, 从经济角度考虑, 最终选取 31°C 为最优发酵温度。该突变菌株在不同发酵时长的总酶活结果如图 1D 所示。其中, 培养时间为 96 h 时菌株的总酶活最高, 达到  $59.81 \pm 1.41$  U/mL, 与其他处理组相比有显著差异性, 因此最终选取培养时间为 96 h。

综上, 最终确定了突变菌株的最优发酵条件 NaCl 浓度为 0%, pH 为 6.5, 在 31°C 下培养为 96 h。



A: pH 优化; B: NaCl 浓度优化; C: 温度优化; D: 培养时间优化。

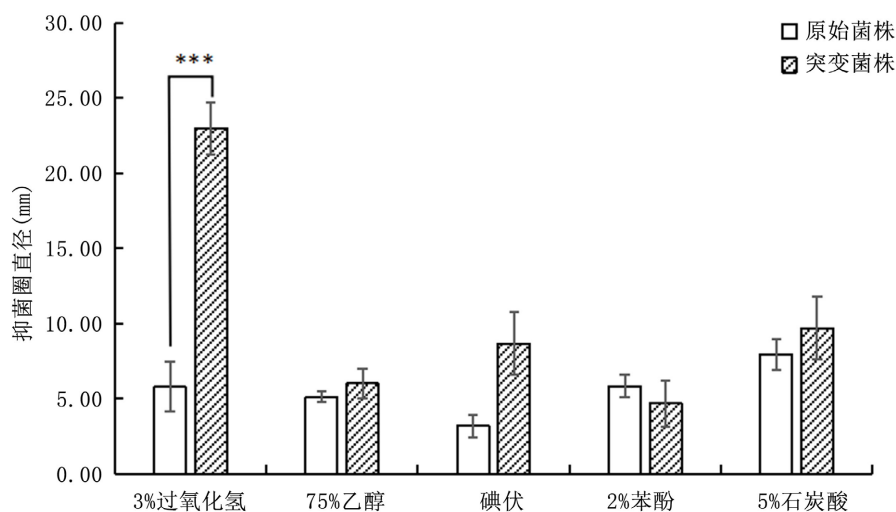
Figure 1. Degradation characteristics of mutant *Cobetia* sp. cqz5-12-M2

图 1. 突变菌株 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2 降解条件优化结果

### 3.3. 突变对菌株性能的影响

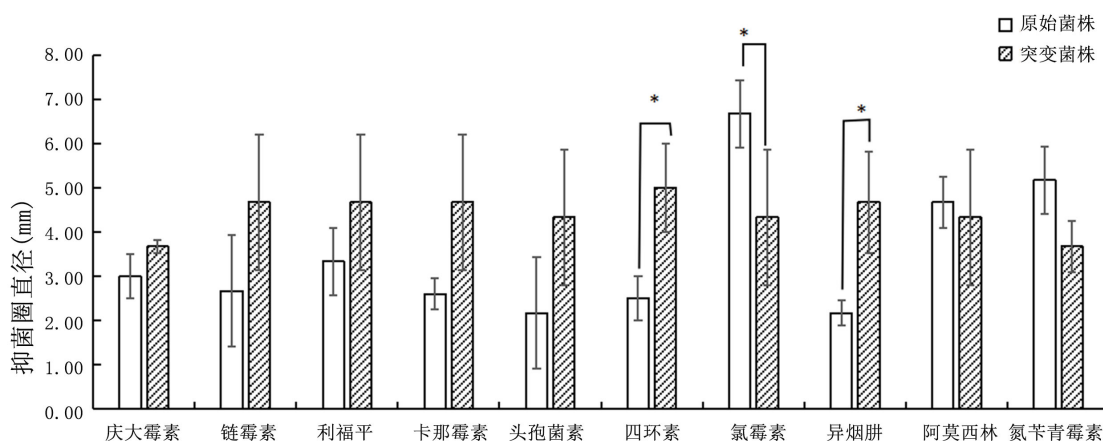
#### 3.3.1. 突变对菌株产酶能力的影响

将原始菌株和突变菌株置于在 2.2 得到的最优发酵条件下进行培养, 并比较二者的产酶能力, 结果显示原始菌株和突变菌株的总酶活分别为  $32.71 \pm 0.18$  U/mL、 $59.81 \pm 1.41$  U/mL。与原始菌株相比, 突变菌株的总酶活提高了 50.84%, 说明双重诱变确实可提高菌株的产酶能力。



注: \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ , ns 表示  $P < 0.05$ 。

**Figure 2.** Results of antibacterial zone determination of original and mutant strains under different disinfectants  
**图 2.** 不同消毒剂下原始菌株和突变菌株的抑菌圈测定结果



注: \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ , ns 表示  $P < 0.05$ 。

**Figure 3.** The results of inhibition zone determination of original and mutant strains under different antibiotics  
**图 3.** 不同抗生素下原始菌株和突变菌株的抑菌圈测定结果

#### 3.3.2. 突变对菌株生长的影响

当培养基中存在 3%过氧化氢、75%乙醇、碘伏、2%苯酚或 5%石炭酸时, 原始菌株的抑菌圈直径分别为  $5.77 \pm 1.66$ 、 $5.10 \pm 0.36$ 、 $3.17 \pm 0.76$ 、 $5.83 \pm 0.76$ 、 $7.93 \pm 1.01$  mm (图 2), 突变菌株的抑菌圈直径分别为  $23.00 \pm 1.73$ 、 $6.00 \pm 1.00$ 、 $8.67 \pm 2.08$ 、 $4.67 \pm 1.53$ 、 $9.67 \pm 2.08$  mm (图 2)。当培养基中存在庆大霉素、链霉

素、利福平、卡那霉素、头孢菌素、四环素、氯霉素、异烟肼、阿莫西林或氨苄青霉素时, 原始菌株的抑菌圈直径分别为  $3.00 \pm 0.50$ 、 $2.67 \pm 1.26$ 、 $3.33 \pm 0.76$ 、 $2.60 \pm 0.36$ 、 $2.17 \pm 1.26$ 、 $2.50 \pm 0.50$ 、 $6.67 \pm 0.76$ 、 $2.17 \pm 0.29$ 、 $4.67 \pm 0.58$ 、 $5.17 \pm 0.76$  mm (图 3), 突变菌株的抑菌圈直径分别为  $3.67 \pm 0.15$ 、 $4.67 \pm 1.53$ 、 $4.67 \pm 1.53$ 、 $4.67 \pm 1.53$ 、 $4.33 \pm 1.53$ 、 $5.00 \pm 1.00$ 、 $4.33 \pm 1.53$ 、 $4.67 \pm 1.15$ 、 $4.33 \pm 1.53$ 、 $3.67 \pm 0.58$  mm (图 3)。

与原始菌株相比, 当培养基含有苯酚、氯霉素、阿莫西林或氨苄青霉素时, 突变菌株的抑菌圈直径小于原始菌株, 当培养基含其余化学试剂时, 突变菌株的抑菌圈直径大于原始菌株。其中, 当培养基含 3% 过氧化氢时, 原始菌株抑菌圈直径和突变菌株的抑菌圈差异极显著。除此之外, 当培养基含碘伏、四环素、氯霉素或异烟肼时, 原始菌株的抑菌圈直径和突变菌株的抑菌圈直径具有显著差异。

### 3.3.3. 突变对菌株降解褐藻胶能力的影响

在 3.3.2. 的试验基础上, 选择 2% 苯酚、75% 乙醇、5% 石炭酸、那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、头孢菌素、链霉素、阿莫西林、利福平作为供试试剂, 以检测菌株降解褐藻胶能力的影响, 具体实验结果见表 2。

**Table 2.** Ability of mutant and original strains to degrade algin under the influence of different chemical reagent  
**表 2.** 不同化学试剂影响下突变菌株和原始菌株降解褐藻胶能力

试剂种类	菌种	d (mm)	D (mm)	D/d
无菌水	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.97 \pm 0.15b$	$9.93 \pm 0.37b$	$3.35 \pm 0.25a$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.28 \pm 0.25c$	$8.02 \pm 0.43a$	$3.55 \pm 0.34a$
链霉素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$4.96 \pm 0.33a$	$10.70 \pm 0.51a$	$2.16 \pm 0.15e$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.11 \pm 0.24c$	$4.13 \pm 0.34e$	$1.98 \pm 0.25d$
氨苄青霉素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.13 \pm 0.33c$	$6.00 \pm 0.36d$	$2.88 \pm 0.48bc$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.61 \pm 0.31b$	$5.02 \pm 0.34d$	$1.94 \pm 0.24d$
利福平	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.13 \pm 0.27c$	$5.1 \pm 0.27e$	$2.44 \pm 0.39d$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$1.94 \pm 0.39cd$	$4.05 \pm 0.21e$	$2.16 \pm 0.43cd$
阿莫西林	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.11 \pm 0.15c$	$4.03 \pm 0.31f$	$1.92 \pm 0.2ef$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.08 \pm 0.24c$	$5.94 \pm 0.38c$	$2.90 \pm 0.47b$
5% 石炭酸	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$3.01 \pm 0.37b$	$5.18 \pm 0.23e$	$1.75 \pm 0.23f$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$1.69 \pm 0.48d$	$3.81 \pm 0.37e$	$2.39 \pm 0.60c$
2% 苯酚	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$3.13 \pm 0.21b$	$5.95 \pm 0.27d$	$1.91 \pm 0.17ef$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$4.2 \pm 0.49a$	$6.11 \pm 0.25c$	$1.47 \pm 0.19 e$
卡那霉素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$3.03 \pm 0.24b$	$9.03 \pm 0.18c$	$3.00 \pm 0.27b$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.02 \pm 0.35c$	$4.08 \pm 0.24e$	$2.06 \pm 0.32cd$
氯霉素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.08 \pm 0.24c$	$6.24 \pm 0.51d$	$3.05 \pm 0.45b$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.18 \pm 0.35c$	$6.09 \pm 0.41b$	$3.22 \pm 0.39ab$
庆大霉素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$2.28 \pm 0.22c$	$6.03 \pm 0.27d$	$2.67 \pm 0.31cd$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$2.13 \pm 0.27c$	$7.01 \pm 0.30b$	$3.33 \pm 0.38a$
头孢菌素	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	$5.05 \pm 0.21a$	$9.04 \pm 0.36c$	$1.79 \pm 0.07f$
	<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	$1.63 \pm 0.34d$	$3.04 \pm 0.63f$	$1.96 \pm 0.67d$

注: 采用 SPASS 软件进行分析, 不同小写字母表示纵向结果的显著性差异( $P < 0.05$ )。



如表 2 所示, 与无菌水相比, 当培养基存在供试试剂时, 原始菌株和突变菌株的 D/d 值均发生下降, 说明所用的供试试剂会使得菌株降解褐藻胶的能力下降。进一步分析显示, 当培养基中存在利福平、2% 苯酚或氯霉素时, 突变菌株和原始菌株的 D/d 值无显著差异, 说明突变不影响菌株在上述试剂中的褐藻胶降解能力。当培养基存在链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素时, 突变菌株和原始菌株的 D/d 值有显著差异, 且突变菌株的 D/d 值低于原始菌株, 说明突变使得菌株在上述试剂中的褐藻胶降解能力减弱。当培养基中存在阿莫西林、5% 石炭酸、庆大霉素或头孢菌素时, 突变菌株和原始菌株的 D/d 值有显著差异, 且突变菌株的 D/d 值高于原始菌株, 说明突变使得菌株在上述试剂中的褐藻胶降解能力增强。

### 3.3.4. 突变对菌株降解褐藻胶效率的影响

通过检测褐藻胶残余量可计算出原始菌株和突变菌株的褐藻胶降解效率。将原始菌株和突变菌株置于 2.2 得到的最优发酵条件下进行培养, 其结果如表 3 所示。原始菌株和突变菌株对褐藻胶的降解效率分别为 33.80%、42%, 与原始菌株相比, 突变菌株对褐藻胶的降解效率提高 8.8%。

**Table 3.** Degradation efficiency of algin by different strains

**表 3.** 不同菌株对褐藻胶的降解效率

菌株种类	OD440	褐藻胶残余量/g	降解效率
<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12-M2	0.524 ± 0.08	0.088 ± 0.012	42% ± 0.81
<i>Cobetia</i> sp. cqz5-12	0.603 ± 0.07	0.110 ± 0.015	33.80% ± 0.91

注: 采用 SPASS 软件进行分析, 不同小写字母表示纵向结果的显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 4. 讨论

已有多篇文献报道可利用诱变育种的方式提高褐藻胶降解菌的降解能力, 如张书利运用紫外和甲磺酸乙酯(EMS)进行双重诱变获得了突变菌株 510-64, 其褐藻胶降解能力比原始菌株提高了 385% [23]。因此, 本研究通过 NTG 和紫外诱变相结合的方式对前期实验室获得的褐藻胶降解菌进行双重诱变, 成功得到突变菌株 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2, 其发酵上清液粗酶活为 19.74 ± 3.83 U/mL。与原始菌株的 12.47 ± 1.50 U/mL 相比提高了 58.3%。该突变菌株的降解能力提高幅度虽低于前述文献, 但高于褐藻胶降解菌突变株 HB172198 [19]的 32.6%。

对突变菌株进行发酵条件优化时, 发现就 pH 而言, pH 值能通过影响微生物细胞膜的通透性, 进而影响微生物对营养物质的吸收以及酶的分泌和酶的活性[15]。由于该突变菌株的原始菌株来源于海洋, 且有多篇文献表明氯化钠对海洋来源的褐藻胶降解菌发酵产酶具有影响, 如海洋来源的菌株 SK42.001 对氯化钠具有很高的耐受性, 在氯化钠浓度为 30.0 g/L 时达到最高酶活[15], 因此本文研究了该突变菌株在不同氯化钠浓度下的总酶活。该突变菌株在氯化钠浓度超过 0 g/L 中发酵产酶时, 总酶活均有所下降, 其中, 当氯化钠浓度为 1 g/L 时, 酶活最低。因还未进行氯化钠浓度对菌株生长影响的试验, 故无法判断氯化钠浓度是否会导致菌株的生长和繁殖减弱。就发酵温度而言, 发酵温度比较低时, 菌株生长较缓慢, 新陈代谢慢, 产物合成速率低下, 所以菌株的胞外酶产量较少, 裂解酶活性低。就发酵时间而言, 当发酵温度比较高时, 高温使微生物体内的蛋白质、核酸等可能发生不可逆的变性, 进而抑制该菌体生长和酶活力, 从而导致裂解酶活性低。发酵前期, 菌株生长缓慢, 褐藻胶裂解酶产量少、活性低, 随着发酵时间的延长, 被诱导产生的褐藻胶裂解酶增多, 酶活性增强, 褐藻胶降解量上升。由于营养物质消耗、菌株达到环境最大容纳量, 菌株逐渐死亡, 导致发酵后期酶活性逐渐降低[23]。通过单因素对突变菌株进行发酵优化, 得到其最佳产酶条件为 NaCl 浓度为 0 g/L, pH 为 6.5, 在 31℃ 下培养为 96 h。优化后的酶活 (59.81 ± 1.41 U/mL), 虽低于菌株 B12 的 91.68 U/mL [24], 菌株 *Cobetia* sp.20 的 142.79 U/mL [25], 但高

于真菌 HB172198 的 15.2 U/mL [19]。与原始菌株相比, 优化后的酶活提高 50.84%, 但降解褐藻胶的效率仅提高 8.8%, 查阅文献发现, 当底物浓度一定时, 酶与反应速率并不成线性关系[26], 酶量过多可导致酶间的竞争。

除上述氯化钠浓度、温度、pH 等环境因素会影响菌株生长和降解褐藻胶性能外, 化学试剂也能影响菌株生长和降解性能。其中, 抗生素通过抑制细菌细胞壁合成、干扰 DNA 复制、阻止肽链合成或抑制蛋白质合成等方式起到杀菌作用[27]。如刘睿的实验结果表明亚硝酸盐降解菌株 GXMZU-B1 对头孢菌素、四环素、青霉素等多种抗生素具有敏感性[28]。在本研究中, 突变确实会影响菌株的生长和褐藻胶降解能力。这种突变可能归因于遗传、转录组学或蛋白质组学的变化, 应通过基因组学、转录组学和蛋白质组学分析来确认。

## 5. 结论

综上所述, 本研究通过紫外和 NTG 双重诱变, 获得一株突变菌株 *Cobetia* sp. cqz5-12-M2, 此菌株比原始菌株的酶活提高 50.84%, 对褐藻胶的降解效率为 42%。与原始菌株相比, 该菌株在阿莫西林、5% 石炭酸、庆大霉素或头孢菌素中的褐藻胶降解能力增强。在当前抗生素滥用且环境中抗生素有残留的情况下该菌株的这种突变特性使其具有一定的应用优势。

## 基金项目

微生物菌群与多花黄精主要有效成分含量相关性及其多糖发酵中的作用研究(横向课题 2021110099HX); 浙江省自然科学基金青年基金项目(LQ18C010004); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31800094)。

## 参考文献

- [1] Falkeborg, M., Cheong, L., Gianfico, C., Sztukiel, K.M., Kristensen, K., Glasius, M., *et al.* (2014) Alginate Oligosaccharides: Enzymatic Preparation and Antioxidant Property Evaluation. *Food Chemistry*, **164**, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.053>
- [2] Gao, S., Yin, R., Wang, X., Jiang, H., Liu, X., Lv, W., *et al.* (2021) Structure Characteristics, Biochemical Properties, and Pharmaceutical Applications of Alginate Lyases. *Marine Drugs*, **19**, Article 628. <https://doi.org/10.3390/md19110628>
- [3] Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., *et al.* (2021) Brown Algae Carbohydrates: Structures, Pharmaceutical Properties, and Research Challenges. *Marine Drugs*, **19**, Article 620. <https://doi.org/10.3390/md19110620>
- [4] Wang, X., Sun, G., Feng, T., Zhang, J., Huang, X., Wang, T., *et al.* (2019) Sodium Oligomannate Therapeutically Remodels Gut Microbiota and Suppresses Gut Bacterial Amino Acids-Shaped Neuroinflammation to Inhibit Alzheimer's Disease Progression. *Cell Research*, **29**, 787-803. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0216-x>
- [5] Barzkar, N., Sheng, R., Sohail, M., Jahromi, S.T., Babich, O., Sukhikh, S., *et al.* (2022) Alginate Lyases from Marine Bacteria: An Enzyme Ocean for Sustainable Future. *Molecules*, **27**, Article 3375. <https://doi.org/10.3390/molecules27113375>
- [6] Huang, L., Zhou, J., Li, X., Peng, Q., Lu, H. and Du, Y. (2013) Characterization of a New Alginate Lyase from Newly Isolated Flavobacterium sp. S20. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **40**, 113-122. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1210-1>
- [7] Dharani, S.R., Srinivasan, R., Sarath, R. and Ramya, M. (2020) Recent Progress on Engineering Microbial Alginate Lyases Towards Their Versatile Role in Biotechnological Applications. *Folia Microbiologica*, **65**, 937-954. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00802-8>
- [8] Zheng, Y., Wang, Y., Dan, M., Li, Y., Zhao, G. and Wang, D. (2023) Characterization of Degradation Patterns and Enzymatic Properties of a Novel Alkali-Resistant Alginate Lyase Alyrm1 from *Rubrivirga Marina*. *Current Research in Food Science*, **6**, Article 100414. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.100414>
- [9] Mohapatra, B.R. (2020) Biocatalytic Characteristics of Chitosan Nanoparticle-Immobilized Alginate Lyase Extracted from a Novel Arthrobacter Species AD-10. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **23**, Article 101458.

- <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101458>
- [10] Wang, B., Dong, S., Li, F. and Ma, X. (2021) Structural Basis for the Exolytic Activity of Polysaccharide Lyase Family 6 Alginate Lyase Bcalyp16 from Human Gut Microbe *Bacteroides Clarus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **547**, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.040>
- [11] Hu, F., Cao, S., Li, Q., Zhu, B. and Yao, Z. (2021) Construction and Biochemical Characterization of a Novel Hybrid Alginate Lyase with High Activity by Module Recombination to Prepare Alginate Oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, **166**, 1272-1279. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.009>
- [12] Chen, C., Cao, S., Zhu, B., Jiang, L. and Yao, Z. (2023) Biochemical Characterization and Elucidation the Degradation Pattern of a New Cold-Adapted and Ca<sup>2+</sup> Activated Alginate Lyase for Efficient Preparation of Alginate Oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, **162**, Article 110146. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110146>
- [13] Xu, F., Cha, Q., Zhang, Y. and Chen, X. (2021) Degradation and Utilization of Alginate by Marine Pseudoalteromonas: A Review. *Applied and Environmental Microbiology*, **87**, e00368-21. <https://doi.org/10.1128/aem.00368-21>
- [14] 李梦. 褐藻胶降解菌产酶条件优化及酶解产物分析[D]: [硕士学位论文]. 烟台: 烟台大学, 2023.
- [15] 孟青, 江波, 周力铖, 等. 一株产褐藻胶裂解酶的需钠弧菌筛选及酶解产物分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 421-436.
- [16] 刘思慧. 酿酒酵母突变株 UV-6 的筛选及甜玉米发酵酒的工艺优化研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [17] 李林玉, 张玉婷, 朱芝宜, 等. 功能菌株选育研究进程与展望[J]. *林业科技情报*, 2021, 53(2): 1-3.
- [18] 薄永恒, 王亮, 杨修镇, 等. 发酵微生物筛选育种技术研究概述[J]. *山东畜牧兽医*, 2020, 41(11): 78-79.
- [19] Huang, H., Zheng, Z., Zou, X., Wang, Z., Gao, R., Zhu, J., *et al.* (2022) Genome Analysis of a Novel Polysaccharide-Degrading Bacterium *Paenibacillus Algicola* and Determination of Alginate Lyases. *Marine Drugs*, **20**, Article 388. <https://doi.org/10.3390/md20060388>
- [20] 张书利. 产褐藻胶裂解酶芽孢杆菌的选育及其产酶性质的研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [21] 安宇, 王颖, 佐兆杭, 等. 复合诱变选育新型高产细菌素植物乳杆菌[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(3): 265-271.
- [22] 王德森, 张祝兰, 任林英, 等. 复合诱变结合抗性突变筛选替考拉宁高产菌株[J]. *工业微生物*, 2017, 47(5): 21-24.
- [23] 许超, 熊亚茹, 卢明倩, 等. 一株具有褐藻胶降解能力的海洋细菌的筛选鉴定及其多糖利用能力研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 198-204.
- [24] 刘海超, 张健, 刘芳, 等. 株褐藻胶降解菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(4): 30-41.
- [25] 唐文竹, 何玉宁, 张璐, 等. 响应面法优化褐藻胶降解菌发酵培养基[J]. *微生物学杂志*, 2024, 44(2): 79-86.
- [26] 张恒. 基于米氏机理的酶催化反应中反应速率常数的计算[J]. *大学化学*, 2024, 39(4): 395-400.
- [27] 张孟格. 环境中细菌对抗生素耐药与响应的组学分析[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2024.
- [28] 刘睿, 梁颖, 殷豆豆, 等. 降解亚硝酸盐菌株的筛选、条件优化及初步应用[J]. *南方水产科学*, 2024, 20(4): 133-143.