

热稳定 κ -卡拉胶酶产生菌 *Bacillus* sp.Car19 的发酵条件优化

谢买胜, 李江, 林学政, 何培青

(国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要: 对一株分泌热稳定 κ -卡拉胶酶印尼热泉菌进行了种属鉴定, 并采用响应面法对该菌发酵产酶条件进行了优化。鉴定结果表明, 该菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 命名为 *Bacillus* sp.Car19(GeneBank: KT865196)。发酵条件优化结果显示, 9 个环境因子影响 *Bacillus* sp.Car19 产酶量。其中影响 *Bacillus* sp.Car19 产酶量的三个主要因素分别为培养温度、培养基中 Cu^{2+} 浓度和培养基中 NaCl 浓度。综合次要因素对 *Bacillus* sp.Car19 产酶影响, *Bacillus* sp.Car19 最佳产酶发酵条件为: 培养温度 52.31 $^{\circ}\text{C}$ 、 Cu^{2+} 浓度 6.93 mmol/L、NaCl 浓度 37.03 g/L, 培养基 pH 为 6, 接种量 1%, 培养时间 36 h, 半乳糖浓度 0.3 g/L, 硝酸铵浓度 7 g/L, 卡拉胶浓度 0.5 g/L。优化后发酵上清液酶活力达到 15.21 U/mL, 与优化前相比提高了 1.5 倍。

关键词: 热泉菌; 卡拉胶酶; 优化; 响应面

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2016)11-0007-10

doi: 10.11759/hyxx20160125001

嗜热微生物由于能合成多种具有应用价值的耐热酶, 已成为近年来科学研究的热点^[1]。微生物学家普遍认为, 能在 55 $^{\circ}\text{C}$ 以上高温环境生长的微生物为嗜热微生物, 包括最低等的古细菌和部分细菌, 能在 80 $^{\circ}\text{C}$ 以上环境中生长的为极端嗜热菌, 其中大部分是古细菌^[2]。耐热酶是嗜热微生物产生的一类热稳定性酶, 这种酶特点就是高温下达到最高催化效率。高温能提高底物和产物的溶解度, 减少物质与反应器的贴壁效应, 同时降低染菌风险, 减少产物收集难度, 所以耐热酶有望取代传统常温催化, 广泛用于食品、生物制药、废水处理等生产领域^[3-4]。

卡拉胶(carrageenan)是海洋红藻中一种结构性多糖, 由 α -1, 3 和 β -1, 4 糖苷键交替连接的 D-半乳糖或其衍生物组成。它是一种亲水性胶体, 主要存在于海藻细胞壁中^[5]。常见的卡拉胶有 κ -、 λ -、 ι -型, 另外也有 α -、 β -、 θ -、 μ -、 ν -、 γ -、 δ -、 ξ -、 π -、 ω -等类型的卡拉胶。卡拉胶的分子质量大、溶解性差、机体不易吸收、利用率低等缺点, 制约了卡拉胶在医药领域的应用^[6], 目前卡拉胶主要用于食品相关工业。已有的研究表明: 利用卡拉胶制备的卡拉胶寡糖具有多种生物活性, 如抗病毒、抗氧化、抗凝血、免疫调节等^[7-9], 因此在医药领域有很高应用价值。如何利用卡拉胶制备卡拉胶寡糖, 提升卡拉胶的应用价值已成为当前卡拉胶研究亟需攻克的技术。制备卡拉胶寡糖的方法主要有三种: 生物酶法、化学法及物理

法。传统的化学法和物理法的主要缺陷是反应条件不易控制、产物聚合度很高且分布不均一。利用卡拉胶酶制备卡拉胶寡糖的生物酶法, 具有反应条件温和易控制、底物专一性好等优点, 能克服物理法和化学法的缺陷。因此利用生物酶法, 开发高活性的卡拉胶酶是提升卡拉胶应用价值的关键技术。

卡拉胶酶是能断裂卡拉胶 β -1, 4 糖苷键的半乳糖苷水解酶。根据底物类型, 可以分为 κ -、 ι -、 λ -卡拉胶酶^[10]。迄今发现的卡拉胶酶大部分为热不稳定酶, 当温度高于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时就会迅速失活, 严重限制了卡拉胶酶的应用。牟海津^[11]研究表明, 卡拉胶降解菌 M-2 分泌的 κ -卡拉胶酶在 55 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 即丧失全部酶活; Potin 等^[12]研究显示, *Cytophaga* 菌株分泌的 κ -卡拉胶酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 酶活亦完全丧失。而来源于嗜热微生物的高温酶因其作用温度高、耐热性好等优点, 是生物工程领域具有发展前景的酶资源。本

收稿日期: 2016-01-25; 修回日期: 2016-04-26

基金项目: 海洋公益性行业科研专项项目(201505026); 青岛市应用基础研究计划项目(14-2-4-14-jch); 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放基金(MBSMAT-2015-06)

[Foundation: Public Science and Technology Research Funds Project of Ocean (201505026); Qingdao Fundamental and Applied Research Project (14-2-4-14-jch); Key Lab of Marine Bioactive Substance and Modern Analytical Technique, SOA (MBSMAT-2015-06)]

作者简介: 谢买胜(1992-), 男, 江西九江人, 硕士研究生, 研究方向: 极地微生物学, E-mail: 903741992@qq.com 电话: 13127057267; 李江, 通信作者, 副研究员, 博士, 研究方向: 极端微生物环境适应性及其活性物质研究, Email: lijiaang@fio.org.cn

研究以一株分泌热稳定卡拉胶酶的印尼热泉菌为对象,通过 16S rDNA 测序的方法鉴定了该菌的种属,用响应面法确定了该菌的最适产酶发酵条件,以期为生物酶法制备卡拉胶寡糖及卡拉胶寡糖的应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

产卡拉胶酶的菌株分离自印度尼西亚卡利安达岛东海岸的热泉样品(5°44'46"N, 105°35'12"E),现保存于国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室菌种库中(-80℃)。

1.1.2 试剂

蛋白胨、酵母粉(Oxoid 公司);分析纯 κ-、λ-、ι-卡拉胶(SIGMA 公司);混合卡拉胶(天津巴斯夫化工有限公司);3-5 二硝基水杨酸(DNS)、氢氧化钠、结晶酚、碘单质、碘化钾、亚硫酸钠、四水合酒石酸钾钠和甘氨酸均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

2216E 液体培养:蛋白胨 5g,酵母粉 1g,1000 mL 过滤海水配制;

2216E 固体培养基:蛋白胨 5g,酵母粉 1g,卡拉胶 15g,1000 mL 过滤海水配制;

2216E 斜面培养基:蛋白胨 5g,酵母粉 1g,琼脂粉 15g,1000 mL 过滤海水配制。

1.2 实验方法

1.2.1 *Bacillus* sp.Car19 菌株 16S rDNA 的鉴定

以 *Bacillus* sp.Car19 菌株基因组为 DNA 模板,利用通用引物 27F、1492R^[13]对 *Bacillus* sp.Car19 菌株 16S rDNA 基因进行 PCR 扩增,使用 3730 测序仪对 PCR 产物进行序列测序并双向测通(南京金斯瑞生物公司)。将所测序列在 GenBank 数据库(NCBI)用 BLAST 分析比对并上传序列获得 GenBank 登录号。

1.2.2 *Bacillus* sp.Car19 产卡拉胶酶的类型确定

以 2216E 固体培养基作为基础培养基,分别加入 κ-、λ-、ι-卡拉胶制成筛选平板,取 2 μL 含 *Bacillus* sp.Car19 的菌液于平板上,在 55℃ 恒温培养箱中倒置培养 36 h,然后用 Lugol 氏碘液染色,观察菌落周围是否有透明圈,以确定该菌产生的卡拉胶酶的类型。

1.2.3 卡拉胶酶活力的测定方法-DNS 法^[14]

前期实验表明, *Bacillus* sp.Car19 发酵上清液中

粗酶的最适作用条件为 60℃、pH=9,因此,本次实验取 1mL 培养 36h 后的发酵上清液作为粗酶液,与 1mL 0.5%的卡拉胶在 60℃、pH=9 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中反应 15min 后,测量反应体系中还原糖的含量来表示粗酶的酶活。1 个酶活力单位(U)定义为 1mL 发酵上清液在 60℃和 pH 为 9 的条件下,1min 内催化产生 1μg 还原糖所需的酶量。酶活力计算公式^[15]:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{\text{还原糖的含量}(\mu\text{g}) \times \text{酶液的稀释倍数}}{\text{酶液的加入量(mL)} \times \text{反应时间(min)}}$$

1.3 *Bacillus* sp.Car19 的发酵条件优化

1.3.1 单因素实验

分别以培养温度、培养基 pH、培养时间、接种量、不同碳源、不同氮源、最适碳源浓度、最适氮源浓度、不同金属离子、最适金属离子浓度、卡拉胶浓度及 NaCl 浓度作为唯一变量,进行发酵实验,确定各种环境因素对 *Bacillus* sp.Car19 产酶的影响。各因素及水平见表 1。以发酵液在波长 600 nm 下的吸光度代表其生物量,离心发酵上清液酶活力最高时条件为单因素实验下最适产酶条件,并将该条件下酶活力定义为 100%。分别确定影响 *Bacillus* sp.Car19 产酶的最适培养温度、最适培养基 pH、最适培养时间、最适接种量、最适碳源、最适氮源、最适碳源浓度、最适氮源浓度、最适金属离子、最适金属离子浓度、最适 NaCl 浓度以及卡拉胶浓度。其中,确定最适碳源、氮源、金属离子后,进一步设置不同浓度梯度找出最适碳源、氮源、金属离子的最适浓度。

1.3.2 响应面法优化 *Bacillus* sp. Car19 发酵条件

1.3.2.1 Plackett-Burman 实验^[16]

根据单因素的实验结果,对上述 9 个因素进一步考察,采用 Factors=9,Runs=12 的 Plackett-Burman 设计,选取各因素最高和最低 2 个水平,进行 50 mL 发酵实验,用每毫升发酵上清液中卡拉胶酶活力表示响应值 R_1 ,确定影响 *Bacillus* sp. Car19 发酵产酶的主要因素,实验因素代码(实验因素对应代码全文不变)及水平见表 2。

1.3.2.2 最陡爬坡实验^[17]

据 Plackett-Burman 实验结果,利用 Design-expert.v8.05 软件进行各因素的方差分析,得到各因素重要性排名顺序,对排名前三的实验因素,选择适合的坡度进行梯度实验,得到发酵上清酶活力逼近最大响应面区域时的条件。

表 1 单因素实验设计各因素及水平

Tab. 1 Factors and levels in single factor experiment

因素	因素变量
温度(°C)	20、30、40、50、60、70
培养基 pH	4、5、6、7、8、9
培养时间(h)	12、18、24、30、36、42、48
接种量(%)	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5
碳源 0.1g/L	乳糖、葡萄糖、淀粉、麦芽糖、甘露糖、半乳糖、山梨醇、蔗糖、酵母粉
氮源 5g/L	碳酸氢铵、硝酸铵、蛋白胨、牛肉膏、硝酸钾、氯化铵、柠檬酸铵
半乳糖浓度(g/L)	0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0
硝酸铵浓度(g/L)	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10
不同金属离子 5mmol/L	Cu ²⁺ 、Ca ²⁺ 、Ni ²⁺ 、Mg ²⁺ 、Co ²⁺ 、K ⁺ 、Fe ³⁺ 、Zn ²⁺
Cu ²⁺ 浓度(mmol/L)	1、3、5、7、9、11
卡拉胶浓度(g/L)	0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5
NaCl 浓度(g/L)	10、20、30、40、50、60

表 2 Plackett-Burman 实验中影响 *Bacillus sp.*Car19 产酶的因素及水平

Tab. 2 Factors and levels affecting *Bacillus sp.* Car19 production of carrageenase in Plackett-Burman experiment

因素	代码	水平	
		-1	1
培养温度(°C)	X ₁	20	70
初始 pH	X ₂	4	9
培养时间(h)	X ₃	12	48
接种量(%)	X ₄	0.5	2.5
半乳糖浓度(g/L)	X ₅	0.1	1
硝酸铵浓度(g/L)	X ₆	1	10
Cu ²⁺ (mmol/L)	X ₇	1	11
NaCl 浓度(g/L)	X ₈	10	60
卡拉胶浓度(g/L)	X ₉	0	2

1.3.2.3 响应面 Box-Behnken 实验设计^[18]

利用 Design-expert.v8.05 软件中 Box-Behnken 设计响应面实验, 考察三个显著因素之间的交互作用及获得发酵上清液酶活力最高时的三因素组合。各因素代码及水平见表 3, 其中以最陡爬坡实验中酶活力最高时的实验条件, 作为 Box-Behnken 实验设

计的中心点, 围绕中心点附近取一个最高和最低水平, 进行 15 个不同条件组合的发酵实验。

表 3 Box-Behnken 实验因素及水平

Tab. 3 Box-Behnken factors and level values

代码	因素	水平			平均值	标准差
		-1	0	1		
X ₁	培养温度(°C)	36	48	60	48	9.79
X ₇	培养基 Cu ²⁺ 浓度(mmol/L)	2	5	9	5.33	2.86
X ₈	培养基 NaCl 浓度(g/L)	28	34	40	34	4.90

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

*Bacillus sp.*Car19 菌株 16S rDNA 经测序拼接后长度为 1461 bp, 与 NCBI 数据库中 *Bacillus licheniformis* DHXJ13 菌株 16S rDNA 基因的相似度为 99%, 因此确定该热泉菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 命名为 *Bacillus sp.*Car19。将该序列上传至 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号为(KT865196), 根据 *Bacillus sp.*Car19 菌株 16S rDNA 构建的系统发育树如图 1 所示。

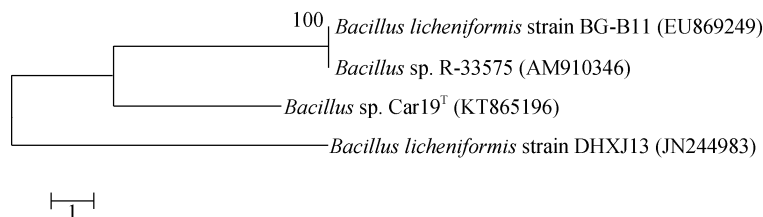


图 1 根据 *Bacillus sp.*Car19 菌株 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree of *Bacillus sp.*Car19 based on 16S rDNA gene sequence

2.2 *Bacillus sp.*Car19 所产卡拉胶酶的类型

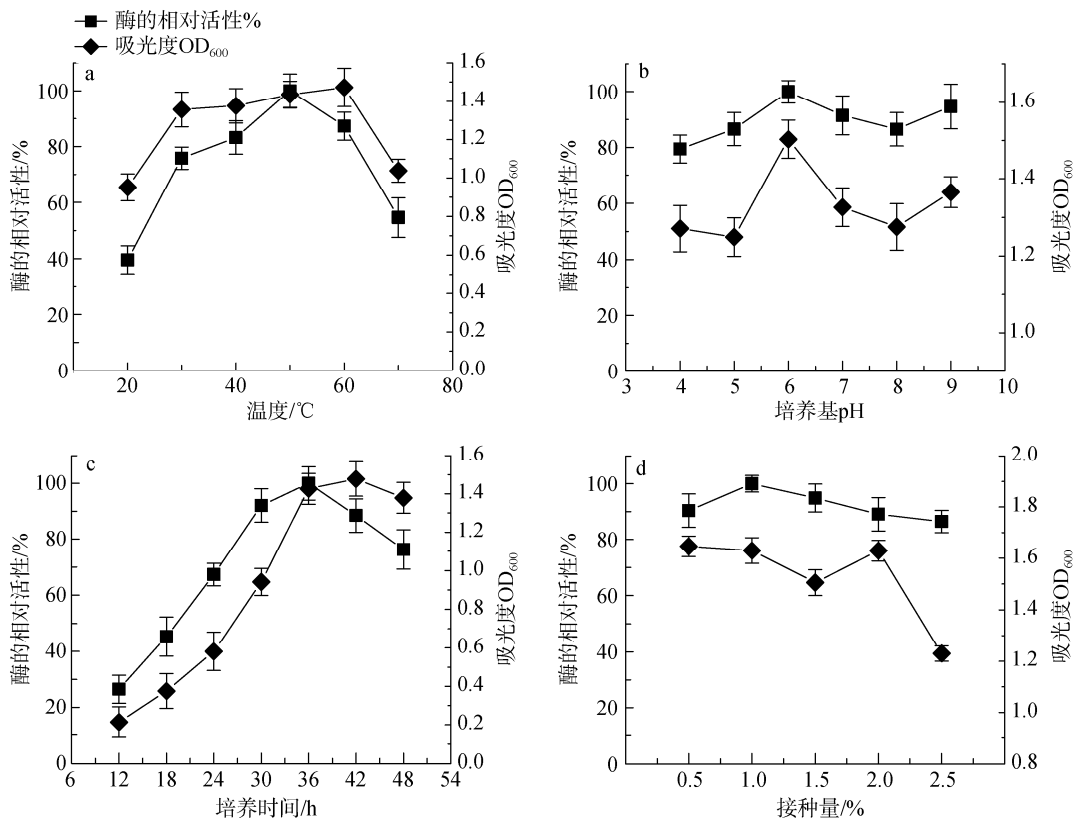
*Bacillus sp.*Car19 在含有不同类型卡拉胶的筛选平板生长 36 h 后, 只在含有 κ -卡拉胶的筛选平板上产生明显的透明圈(图 2), 而在其他类型卡拉胶的平板上没有透明圈(图略), 因此确定该酶为 κ -卡拉胶酶。



图 2 *Bacillus sp.*Car19 在 κ -卡拉胶平板上产生的透明圈
Fig. 2 *Bacillus sp.* Car19 produced transparent circle on Kappa-carragenan solid medium

2.3 单因素实验结果

各种环境因素对 *Bacillus sp.*Car19 生长及产酶的影响情况见图 3。由(图 3-a)可以看出该菌在 60℃



时生物量达到最大值, 但相对酶活力在培养温度为 50℃时最高; pH 对菌体生长及产酶影响较小, 菌体在培养基 pH=6 时相对酶活力最高(图 3-b); (图 3-c)的结果表明最高酶活力出现在培养 36 h 时, 但菌的生物量还在继续增加, 直到 48 h 后才开始降低; 接种量在 0.5%~1%(图 3-d)之间时, 发酵上清液粗酶的酶活力保持增加趋势, 但接种量超过 1%后, 发酵上清液粗酶活力开始降低, 但接种量过小, 菌体培养时间就会相对延长^[19]。同时研究结果也表明, 最佳碳源为 0.3 g/L 的半乳糖(图 3-e 和图 3-g), 最佳氮源为 7 g/L 的硝酸铵(图 3-f 和图 3-h), 培养基中卡拉胶最佳浓度则为 0.5 g/L(图 3-k); 金属离子对菌体生长及产酶有较明显的影响, 特别是培养基中 Cu^{2+} 浓度为 5 mmol/L(图 3-j)以及 NaCl 浓度为 30 g/L 时(图 3-l)。

2.4 响应面实验结果

2.4.1 Plackett-Burman 实验结果

Plackett-Burman 实验结果见表 4。从表 4 中可以看出: 进行 12 个不同因素最高最低水平组合的实验时, 发酵上清液最高酶活力为 15.08 U/mL, 最低为 9.35 U/mL。且不同条件组合下, 发酵液上清酶活力在 9~12 U/mL 之间比较集中。同时对实验结果进行 F 检验, 结果见表 5, 从表 5 中可以看出影响

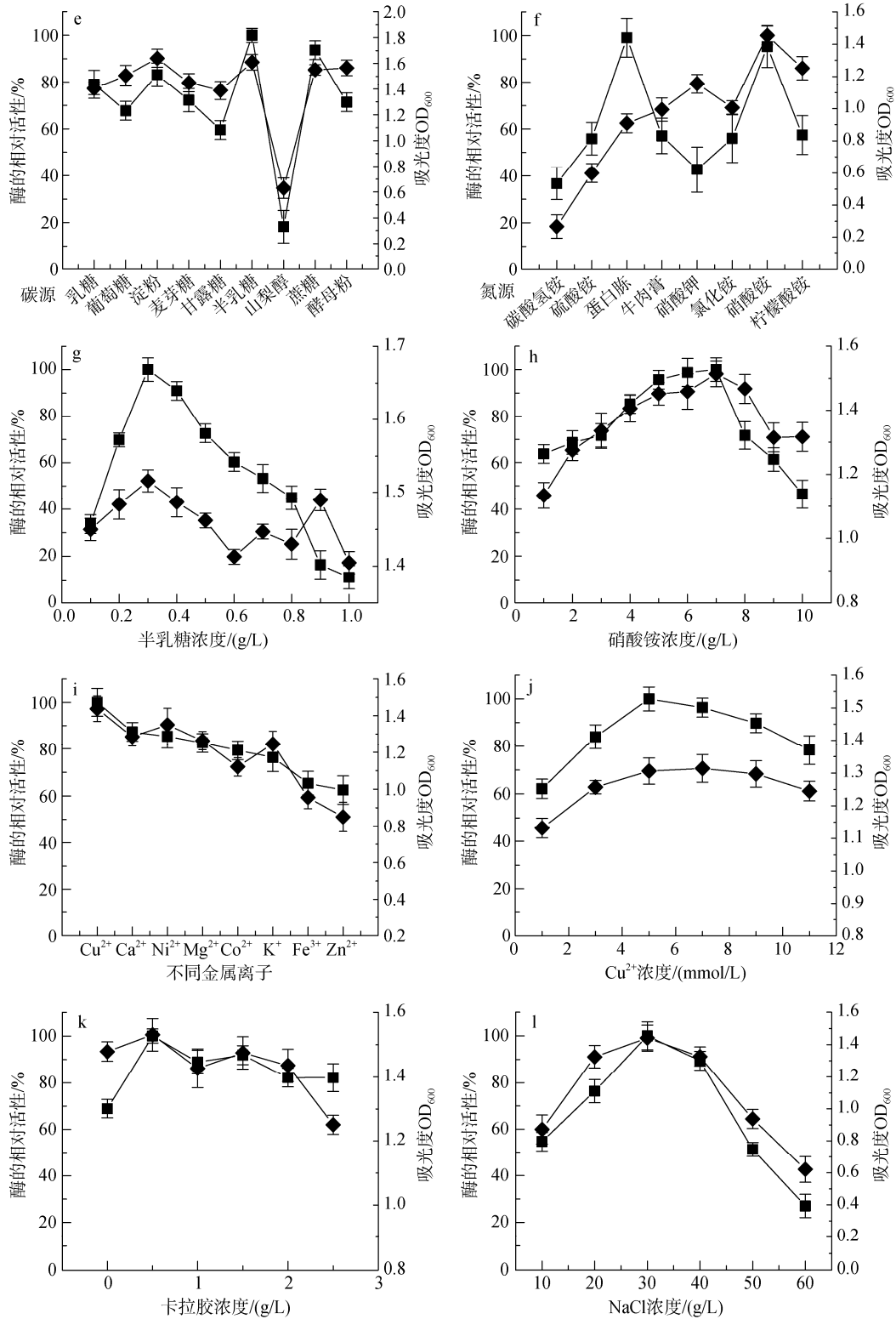


图3 不同培养条件对 *Bacillus sp. Car19* 生长及产卡拉胶酶的影响

Fig. 3 Influence of different culture conditions on *Bacillus sp. Car19* growth and carrageenase production

a—l 分别表示培养温度、培养基 pH、培养时间、接种量、碳源、氮源、半乳糖浓度、硝酸铵浓度、不同金属离子、Cu²⁺浓度、卡拉胶浓度、NaCl 浓度对 *Bacillus sp. Car19* 生长及产卡拉胶酶的影响。

a—l represent the influence of culture temperature, pH, time, inoculation quantity, carbon source, nitrogen source, galactose concentration, NH₄NO₃ concentration, different metal ion, Cu²⁺ concentration, carrageenan concentration, and NaCl concentration on *Bacillus sp. Car19* growth and carrageenase production, respectively

表 4 Plackett-Burman 实验设计及响应值结果

Tab. 4 Plackett-Burman design and response results

实验序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	酶活力(U/mL)
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	15.06
2	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	10.07
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.35
4	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	10.25
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	11.14
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	10.48
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	10.39
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	15.08
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	14.35
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	10.92
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	9.45
12	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	14.66

表 5 Plackett-Burman 实验主效应分析

Tab. 5 Analysis of main effects of Plackett-Burman design

影响因素代码	F 检验	$Pr> f $	重要性排列
X_1	102.96	0.0096	1
X_2	1.13	0.3985	9
X_3	1.25	0.3802	8
X_4	18.59	0.0498	4
X_5	16.66	0.0551	5
X_6	3.15	0.2180	6
X_7	35.90	0.0267	2
X_8	19.50	0.0476	3
X_9	1.70	0.3219	7

Bacillus sp.Car19 产酶的三个重要的因素依次是培养温度, 培养基中 Cu^{2+} 含量, NaCl 浓度, P 值均小于 0.05, 说明这 3 个因素对 *Bacillus* sp.Car19 产酶活力影响显著, 因此选择这 3 个因子作为最陡爬坡实验进一步考察影响 *Bacillus* sp.Car19 产酶量的对象。

2.4.2 最陡爬坡实验结果

根据 Plackett-Burman 实验各因素重要性的排列顺序, 选出影响 *Bacillus* sp.Car19 产酶前三的因素进行梯度爬坡实验, 实验结果见表 6。从表中可以看出在培养温度为 54℃、 Cu^{2+} 7 mmol/L、NaCl 浓度 36 g/L 时发酵上清液的酶活力达到最大值 15.07 U/mL, 因此将该条件作为下一步 Box-Behnken 响应面设计实验的中心点。

2.4.3 响应面 Box-Behnken 法获得最优发酵条件结果

以最陡爬坡实验得到的发酵上清酶活力最高实验条件为中心值, 分别取离中心值附近的各对称条件为最高最低水平, 采用 factors=3, run=15 进行

表 6 最陡爬坡实验设计及结果

Tab. 6 Experimental design and response of steepest ascent

实验序号	X_1 (°C)	X_7 (mmol/L)	X_8 (g/L)	酶活力(U/mL)
1	30	1	28	9.84
2	36	2	30	10.46
3	42	3	32	12.59
4	48	5	34	15.07
5	54	7	36	14.73
6	60	9	40	12.31

Box-Behnken 响应面实验设计, 实验设计及结果见表 7。对实验结果进行二次多元回归方差分析, 得到发酵上清液酶活力 R_1 与自变量培养温度 X_1 、 Cu^{2+} 浓度 X_7 、NaCl 浓度 X_8 的多元回归方程为:

$$R_1=12.47+2.61X_1+2.67X_7+2.86X_8-0.24X_1X_7+2.48X_1X_8+1.42X_7X_8-2.03X_1^2-2.14X_7^2-2.90X_8^2$$

回归模型方差分析见表 8。从表中可以看出模型 $P=0.0401$ 小于 0.05, 说明线性模型回归显著, 模拟得到的方程可信。 X_1 、 X_7 、 X_8 的 P 值均小于 0.05, 对 *Bacillus* sp.Car19 产酶影响显著, 交互项和二次项的中 X_1X_8 、 X_8^2 的 P 值小于 0.05, 说明 *Bacillus* sp.Car19 卡拉胶酶产量受三因素之间交互作用的影响。决定系数 $R^2=0.9056$, 失拟项 $CV=27.04\%$, 表明模型与实验拟合较好, 得到的方程可用。因此通过多元回归得到的方程可以很好的说明 *Bacillus* sp.Car19 产酶量与培养温度 X_1 、 Cu^{2+} 浓度 X_7 、NaCl 浓度 X_8 之间的关系。

根据多元回归方程(1)绘制的培养温度、 Cu^{2+} 浓度、NaCl 浓度两两交互作用的响应曲面及等高线图 4~图 6。从响应曲面图可以看出发酵上清液酶活 R_1 的值在所选因素范围内有最大值, 最大值即为等

表 7 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab. 7 Box-Behnken design and results

实验序号	X_1	X_7	X_8	酶活力(U/mL)
1	0	1	-1	7.69
2	1	-1	0	10.49
3	-1	1	0	6.59
4	-1	0	1	6.37
5	1	0	-1	3.75
6	0	1	1	15.02
7	0	-1	-1	2.37
8	0	-1	1	4.32
9	0	0	0	10.57
10	0	0	0	12.47
11	1	1	0	12.53
12	-1	0	-1	4.68
13	-1	-1	0	3.58
14	0	0	0	14.36
15	1	0	1	15.06

高面图的中心点。为求出多元回归方程(1)所构建模型的最大值及最大值条件下对应各因素的组合, 对所得的回归拟合方程分别求各自变量的一阶偏导数, 并令其为 0, 得到三元一次方程组, 求解此方程组得到模型 R_1 在最大值条件下各因素对应的值^[20]: $X_1=52.31$ 、 $X_7=6.93$ 、 $X_8=37.03$, 即当培养温度为 52.31℃、 Cu^{2+} 浓度为 6.93 mmol/L、NaCl 浓度为 37.03 g/L 时, 理论发酵上清液酶活力 R_1 的最大值为 15.82 U/mL。为进一步验证模型是否正确, 进行三组发酵实验验证, 每组培养基均为优化后得到的最优条件, 用三组数据平均值来表示优化后发酵上清液的酶活力。测得优化后发酵上清液酶活力 $R_1=15.21$ U/mL, 接近预测值, 表明优化得到的发酵条件可信。发酵后的酶活力是未优化前的 1.5 倍, 优化后的培养基提高了 *Bacillus* sp. Car19 的产酶量。

表 8 回归方程方差分析

Tab. 8 Analysis of variance by regression equation

方差来源	总偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	Prob>F
模型	265.17	9	29.46	5.33	0.0401 ^a
X_1	54.65	1	54.65	9.88	0.0256 ^a
X_7	57.08	1	57.08	10.32	0.0237 ^a
X_8	65.44	1	65.44	11.83	0.0184 ^a
X_1X_7	0.24	1	0.24	0.043	0.8448
X_1X_8	24.60	1	24.60	4.45	0.0487 ^a
X_7X_8	8.07	1	8.07	1.46	0.2812
X_1^2	15.17	1	15.17	2.74	0.1586
X_7^2	16.94	1	16.94	3.06	0.1405
X_8^2	31.04	1	31.04	5.61	0.0440 ^a
误差项	27.66	5	5.53		
失拟项	20.47	3	6.82	1.90	0.3630
纯误差	7.18	2	3.59		
所有项	292.83	14			

注: ^a代表 $0.01 < P < 0.05$, 具有显著性

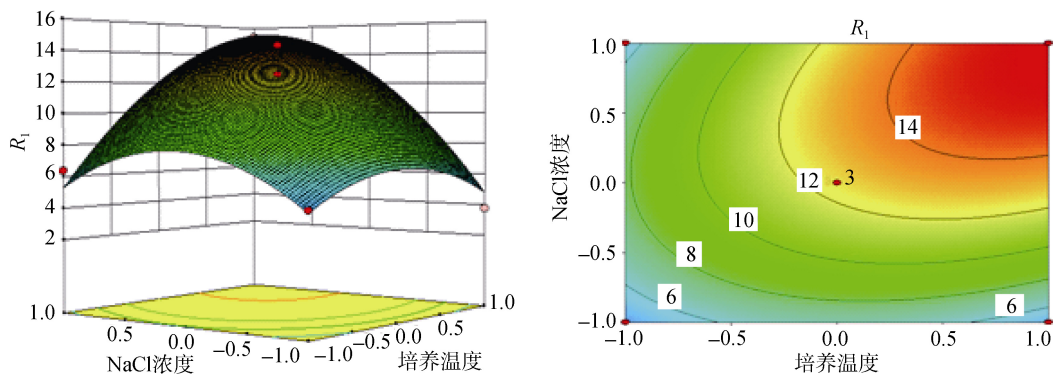


图 4 NaCl 浓度和培养温度影响 *Bacillus* sp. Car19 产卡拉胶酶绘制的响应曲面及等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plot of NaCl concentration and temperature influence on *Bacillus* sp. Car19 carrageenase production

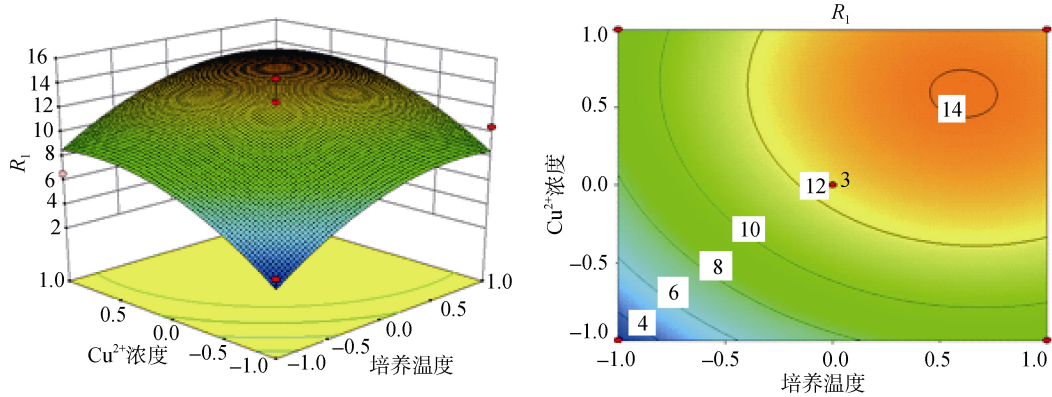


图 5 Cu^{2+} 浓度和培养温度影响 *Bacillus* sp. Car19 产卡拉胶酶绘制的响应曲面及等高线图

Fig. 5 Response surface and contour plot of Cu^{2+} concentration and temperature influence *Bacillus* sp. Car19 carrageenase production

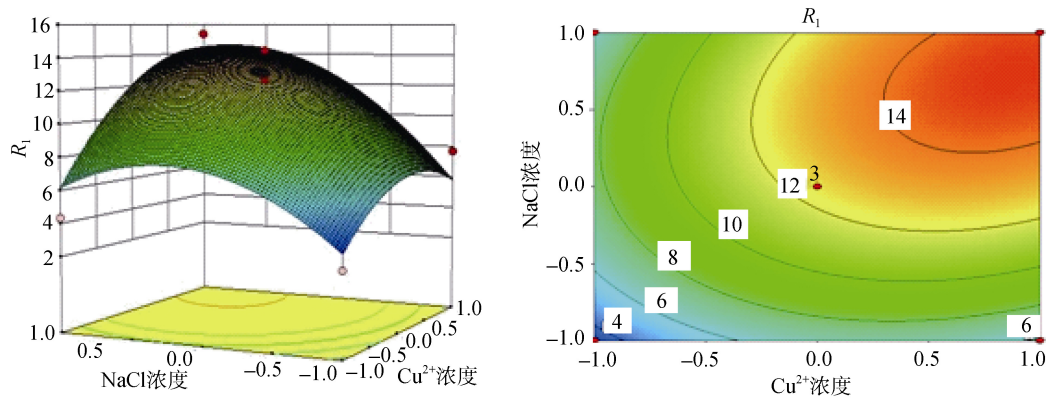


图 6 NaCl 浓度和 Cu^{2+} 浓度影响 *Bacillus* sp. Car19 产卡拉胶酶绘制的响应曲面及等高线图

Fig. 6 Response surface and contour plot of NaCl concentration and Cu^{2+} concentration influence on *Bacillus* sp. Car19 carrageenase production

3 讨论

自从 1966 年首次在海洋微生物中发现能分泌卡拉胶酶的假单胞菌 *Pseudomonas carrageenovora*^[21] 以来, 已发现多种属的海洋微生物能产生卡拉胶酶, 如噬纤维菌属、假单胞菌属、别单胞菌属、弧菌属等^[22], 这些细菌多分离自海藻表面或以海藻为食的软体动物, 且多为热不稳定酶。本文研究的产酶菌株分离自印度尼西亚卡利安达岛东海岸的热泉群 (5°44'46"N, 105°35'12"E), 热泉水温可达 50~97℃^[1], 周边毗邻大型海藻床, 经鉴定该菌属于 *Bacillus* 属, 与胡秋实等^[23]发现的产卡拉胶酶菌株一致, 但前者为 λ -卡拉胶降解菌, 而本研究中的菌株为 κ -卡拉胶降解菌, 目前有关热泉菌产卡拉胶酶的报道尚不多见。

培养条件的优化在微生物代谢产物的研究中起着重要的作用, 与传统的单次单因子法和正交实验相比, 响应面法实验次数少、周期短, 不仅能够评价

各因素对生物过程的影响, 并且还能体现各因素之间的交互作用得到最佳条件, 是优化培养条件的有效方法^[24]。为了提高 *Bacillus* sp. Car19 产卡拉胶酶的能力, 本文采用响应面法对其培养条件进行了优化, 发现影响 *Bacillus* sp. Car19 产卡拉胶酶的三个主要因素分别为培养温度、NaCl 浓度和 Cu^{2+} 浓度。培养温度是微生物生长和代谢的关键因素, 由于 *Bacillus* sp. Car19 来源于热泉, 因此较高的培养温度也与其生长环境相一致, 较高的培养温度不仅能够缩短培养周期, 而且也可有效的避免杂菌的生长; 李俊等^[19]对 HC4 菌株产卡拉胶酶条件优化时发现, NaCl 浓度对其产卡拉胶酶能力有较大影响, 且 NaCl 的最适浓度在 20 g/L 左右, 而本研究中 NaCl 浓度达到 37.03g/L, 比普通海水的浓度略高; 至于 Cu^{2+} 浓度对产酶能力的影响机制目前尚不清楚, 有待今后结合热泉样品的组成成分进行综合分析。

经过优化后, 发酵上清液的酶活力达到 15.21 U/mL,

比优化前提高了 1.5 倍, 加之 *Bacillus* sp. Car19 所产的卡拉胶酶作用温度高, 在后续制备产物的过程中杂菌很难生存, 能减少杂菌代谢物对产物的污染, 同时减少物质的贴壁效应, 使得收集卡拉胶寡糖相对容易, 因而具有一定的应用潜力。

参考文献:

- [1] 王帅, 林学政, 黄晓航, 等. 印尼热泉中嗜热碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(2): 244-251.
Wang Shuai, Lin Xuezheng, Huang Xiaohang, et al. Screening and Characterization of a Crude Thermophilic Alkaline Protease From an Isolated Strain of *Brevibacillus* PBI in Indonesia's Hot Spring[J]. *Advance In Marine Science*. 2012, 30(2): 244-251.
- [2] 刘艳, 黄晓航, 何培青, 等. 印度洋深海热液区可培养细菌的分子鉴定与系统发育分析[J]. 海洋科学进展, 2009, 27(2): 193-200.
Liu Yan, Huang Xiaohang, He Peiqing, et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of cultivable bacteria from Indian ocean hydrothermal Ventsr[J]. *Advances in Marine Science*, 2009, 27(2): 193-200.
- [3] Wu J, Bian Y, Tang B, et al. Cloning and analysis of WF146 protease, a novel thermophilic subtilisin-like protease with four inserted surface loops[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2004, 230(2): 251-258.
- [4] Huang G G, Ying T J, Huo P, et al. Purification and characterization of a protease from Thermophilic bacillus strain HS08[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(24): 347-356.
- [5] Guibet M, Kervarec N, Génicot S, et al. Complete assignment of 1 H and 13 C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii*, λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(11): 1859-1869.
- [6] Kataoka T, Teraoka J, Sakoda A, et al. Erratum to: Protective Effects of Radon Inhalation on Carrageenan-Induced Inflammatory Paw Edema in Mice[J]. *Inflammation*, 2012, 35(35): 713-722.
- [7] Zhou G, Sun Y P, Xin H, et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*[J]. *Pharmacological Research*, 2004, 50(1): 47-53.
- [8] Cáceres P J, Carlucci M J, Damonte E B, et al. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta*, (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity[J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(1): 81-86.
- [9] 刘哲民. κ -卡拉胶酶基因克隆表达及酶法制备卡拉胶低聚糖工艺研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Liu Zhemin *Kappa - carrageenan predominate enzyme gene cloning and enzymatic preparation of carrageenan oligosaccharides research process*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [10] 上官巧灵. λ -卡拉胶寡糖的降解特征及其生物活性研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2013.
Shang Guan Qiaoling. Research on the degradation pattern of λ -carrageenan and the biological activities of λ -carrageenan oligosaccharides[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013.
- [11] 牟海津, 江晓路, 蒋萱, 等. 卡拉胶降解菌 M-2 的筛选与产酶性质[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 251-254.
Mou Haijin, Jiang Xiaolu, Jiang Xuan, et al Selection and enzymatic study of carrageenan-decomposing strain[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 251-254.
- [12] Potin P, Sanseau A, Gall Y L, et al. Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine Cytophaga-like bacterium.[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 201(1): 241-247.
- [13] Wolfgang L. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification.[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120(3): 225-236.
- [14] Shoemaker S P, Brown R D Jr. Characterization of endo-1, 4-beta-D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1978, 523(1): 147-161.
- [15] 沙玉杰, 杨平平, 何培青, 等. 印尼热泉菌 *Bacillus* sp. BI-3 产琼胶酶的发酵条件优化[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1358-1364.
Sha Yujie, Yang Pingping, He Peiqing, et al. Optimization of fermentation condition for agarase production of strain *Bacillus* sp. BI-3 from Indonesian hot spring[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1358- 1364.
- [16] 唐志红, 刘苹, 吕家森, 等. 利用响应面法优化海洋细菌 YDX-1 产纤维素酶的发酵条件[J]. 食品科技, 2011, 36(3): 6-9.
Tang Zhihong, Liu Ping, Lü Jiasen, et al, Optimization of cellulase production condition by marine bacteria YDX-1 using response surface methodology[J]. *Food Science And Technology*, 2011, 36(3): 6-9.
- [17] 张大皓, 谭天伟, 王炳武. 响应面实验设计优化脂肪酶发酵培养基[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2006, 33(2): 41-45.
Zhang Dahao, Tan Tianwei, Wang Bingwu. Response surface analysis of lipase production by *Penicillium camembertii* Thom[J]. *Journal of Beijing university chemical technology*, 2006, 33(2): 41-45.
- [18] 胡娜, 许杨. Box-Behnken 法模拟黄曲霉 AS3.4408 最适产毒条件的研究[J]. 食品科技, 2006, 31(7): 43-47.
Hu Na, Xu Yang. Study on cultivation conditions for aflatoxin producing by *aspergillus flavus* AS3.4408

- using Box- Behnken design[J]. Food Science And Technology, 2006, 31(7): 43-47.
- [19] 李俊, 马悦欣, 冯兵, 等. 产 κ -卡拉胶酶菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 大连海洋大学学报, 2009, 24(1): 24-29.
Li Jun, Mai Yuexin, Feng Bing, et al. Screening and optimization of fermentation conditions by a κ -carrageenase producing bacterium[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(1): 24-29.
- [20] 刘玉佩, 汪立平, 赵勇, 等. 解淀粉芽孢杆菌产褐藻胶裂解酶的发酵条件优化[J]. 湖南农业科学, 2010(5): 17-20.
Liu Yupei, Wang Liping, Zhao Yong, et al. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* producing alginate lyase[J]. Hunan Agricultural Science, 2010(5): 17-20.
- [21] Weigl, W, Yaphe. Glycosulfatase of pseudomonas carrageenovora desulfation of disaccharide κ -carrageenan[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1966, 12(12): 874-876.
- [22] Greer C W, Yaphe W. Purification and properties of ι -carrageenase from a marine bacterium[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1984, 30: 1500-1506.
- [23] 胡秋实, 苏忠亮, 何培青, 等. 响应面法优化热泉菌 *Bacillus* sp.Lc50-1 的发酵产卡拉胶酶条件[J]. 海洋科学进展, 2014, 32(2): 259-267.
Hu Qiushi, Su Zhongliang, He Peiqing, et al. Optimization of carrageenase fermentation conditions of hot spring bacterium *Bacillus* sp. Lc-501 by response surface methodology[J]. Advances in Marine Science, 2014, 32(2): 259-267.
- [24] 杜沛, 朱丽娟, 陈双喜, 响应面法优化 *Bacillus subtilis* HD-F9 产 γ -聚谷氨酸发酵培养基. 河南大学学报, 2010, 40(5): 498-502.
Du Pei, Zhu Lijuan, Chen Shuangxi. Fermentation medium optimization for γ -PGA production of *Bacillus subtilis* HD-F9 by response surface methodology[J]. Journal of Henan university, 2010, 40(5): 498-502.

Optimization of fermentation conditions for thermostable κ -carrageenase production of strain *Bacillus* sp. Car19

XIE Mai-sheng, LI Jiang, LIN Xue-zheng, HE Pei-qing

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China)

Received: Jan. 25, 2016

Key words: Hot spring bacterium; Carrageenase; Optimization; Response surface

Abstract: In this study, we identified a high-yield κ -carrageenase bacteria strain by its 16S rDNA sequence and optimized the fermentation conditions using a response surface methodology. The results show that the hot-spring bacterium was 99% identical to *Bacillus* sp. and therefore we assigned it to the *Bacillus* genus and named it *Bacillus* sp. Car19 (GenBank accession number: KT865196). The optimized fermentation conditions of *Bacillus* sp. Car19 involve nine factors that affect *Bacillus* sp. Car19 carrageenase production, and the three main factors are culture temperature, Cu^{2+} concentration, and NaCl concentration. Combined with subordinate factors, the final optimized fermentation conditions for maximal activity, as determined by regression analysis are as follows: a culture temperature of 52.31 °C, a Cu^{2+} concentration of 6.93 mmol/L, an NaCl concentration of 37.03 g/L, medium pH = 6, 1% inoculation quantity, 36 h incubation time, a galactose concentration of 0.3 g/L, an ammonium nitrate concentration of 7 g/L, and a carrageenan concentration of 0.5 g/L. The supernatant carrageenase activity after optimized fermentation can reach 15.82 U/mL, which is 1.5 times that without optimization.

(本文编辑: 康亦兼)