

海洋弧菌 QJH-12 发酵产琼胶酶条件的优化

王静雪, 江晓路, 牟海津, 管华诗

(中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要:从中国南海海域分离到了一株具有较高琼胶降解活性的弧菌 *Vibrio* sp. QJH-12, 该菌株为革兰氏阴性菌, 呈弯曲杆状, 极生单根鞭毛, 氧化酶阳性, 过氧化氢酶阳性, O/129 试验阳性。在琼胶平板上生长可软化琼胶, 并在菌落周围产生凹陷。通过单因子实验和正交实验确定了培养基的最佳组成: 琼胶 2.0‰, 柠檬酸三铵 1.0‰, K_2HPO_4 1.0‰, NaCl 1.0‰。确定该菌株的最适发酵产酶条件: 装液量为 250 mL 的三角瓶中装入 125 mL 的液体发酵培养基, 培养基起始 pH6.5, 摇瓶转速 150 r/min, 30 °C 发酵培养 26 h, 发酵液的酶活力达到 332 U/mL。结果表明, 该菌株从产酶活力和发酵特点等各方面具备工业化开发的潜力。

关键词: 海洋弧菌; 琼胶酶; 培养基; 发酵条件

中图分类号: Q93.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2007) 07-0008-07

琼胶是琼胶糖和硫酸琼胶的混合物, 琼胶糖是由 D-半乳糖和 3, 6-内醚-L-半乳糖以交替的 β -1, 3 糖苷键和 α -1, 4 糖苷键连接的直链中性多糖; 硫酸琼胶结构较复杂, 含有 D-半乳糖、3, 6-内醚-半乳糖、半乳糖醛酸、硫酸盐和丙酮酸。琼胶及其降解产物具有很广泛的生物活性, 生物分析表明来源于琼胶的硫酸多糖具有抗病毒的活性, 对 I 型和 II 型单纯疱疹病毒表现出选择性的抗病毒活性^[1]; 硫酸基高度取代的琼胶多糖可抑制腹水瘤在小鼠体内的转移^[2]; 琼胶寡糖具有诱导细胞凋亡和抗敏抗炎等生理活性; 琼胶的酶解产物新琼寡糖还具有清除江篱 (*Gracilaria conferta*) 表面附生细菌等多种生物活性^[3]。因此, 对琼胶的降解及其产物活性的研究越来越受到关注。传统的琼胶降解是以酸法等化学降解法为主, 存在反应条件难以控制、降解产物成分不均一、产物活性基团受破坏等缺点。酶作为一种有催化活性的蛋白质, 具有催化效率高、底物专一性强、反应条件温和、产物不易被破坏等优点, 因此琼胶的酶法降解成为了琼胶结构与活性研究的新方向。

产琼胶酶的菌株大多来源于海洋, 受海洋特殊生长环境的影响, 这些菌种的产酶性状不稳定, 产酶活性不高。因此, 寻找一种性状稳定、易于培养的高效

琼胶酶产生菌株成为研究琼胶酶的关键。作者报道了一株从自然界中筛选出的具有较强降解琼胶能力的菌株, 以提高菌株的产酶活力为目的, 确定了琼胶降解菌的最适培养基组成和最佳产酶条件。

1 材料与方法

1.1 初筛培养基

菌种的初筛采用合成培养基, 其基本组成如下: 琼胶 3.0‰, 酵母膏 0.5%, NH_4Cl 1‰, K_2HPO_4 1.0‰, NaCl 2.0%, pH 7.0。试验中试剂均为分析纯或化学纯。

1.2 菌种的筛选

以琼胶作为唯一碳源, 利用合成培养基和 2216E 培养基同步发酵培养, 比较发酵液的琼胶酶活力, 最终分离到来自中国南海海域的海洋细菌 QJH-12 菌株。

收稿日期: 2005-04-19; 修回日期: 2005-08-20

作者简介: 王静雪 (1976-), 女, 沈阳人, 讲师, 博士, 现从事食品质量与安全研究, 电话: 0532-82032389, E-mail: snow@ouc.edu.cn

1.3 琼胶酶活力的测定

菌株发酵液经离心去除菌体细胞后,取上清液测试琼胶酶活力。用 pH7.0 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液配制 0.5% 的琼胶溶液 20 mL 作为反应底物,加入 1 mL 待测酶液,30 150 r/min 振荡反应 30 min,用 DNS 法^[4]测定反应液中还原糖的生成量。1 个酶活力单位 (U) 定义为在上述反应条件下,每 min 产生 1 μg 还原糖 (以半乳糖计) 所需要的酶量。

1.4 生物量的测定

取 6 mL 发酵液 3 000 r/min 离心 5 min,倾去上清液,补充生理盐水至原体积,混合均匀后以生理盐水作空白,在波长 600 nm 处测光吸收值。

1.5 培养基组成和培养条件的优化

利用单因素实验确定培养基中的碳源、氮源和无机盐,利用正交实验最终确定培养基的最佳组成和配比。确定该菌株的最适产酶时间、温度、起始 pH、摇床转速和装液量。

2 结果

2.1 菌种的筛选

以琼胶作为唯一碳源,从中国南海海域采集的

水样、泥样及腐烂海藻样品中分离琼胶降解菌。样品中高产菌株的数量较少,为防止被漏筛,实验采用选择培养基多次富集培养,使高产菌株在数量上占优势,从而提高筛选的效果。琼胶降解菌菌落周围形成透明圈,培养基呈釜底形凹陷,该特征可作为菌种初筛的依据。

从 200 余株具有琼胶降解能力的原始菌株中,筛选出具有较大透明圈或较深釜底形凹陷的菌株共 15 株进行复筛,将其分别接种至液体培养基中,于 30 150 r/min 振荡培养 24 h,检测发酵液的产酶活力。其中 QJH-12 菌株在两种复筛培养基中都表现出最高的产酶活力 (图 1)。该菌株为革兰氏阴性,菌体呈弯曲杆状,极生单根鞭毛,大小为 $0.5 \mu\text{m} \times (1.2 \sim 1.5) \mu\text{m}$,氧化酶阳性,过氧化氢酶阳性,O/129 试验阳性,在 TCBS 培养基上培养后形成黄色菌落,利用葡萄糖产酸不产气,根据以上特征初步将其鉴定为弧菌属 (*Vibrio*)。图 2 为该菌株的电镜照片。

2.2 培养基组成的优化

2.2.1 碳源对 QJH-12 菌株发酵产酶的影响

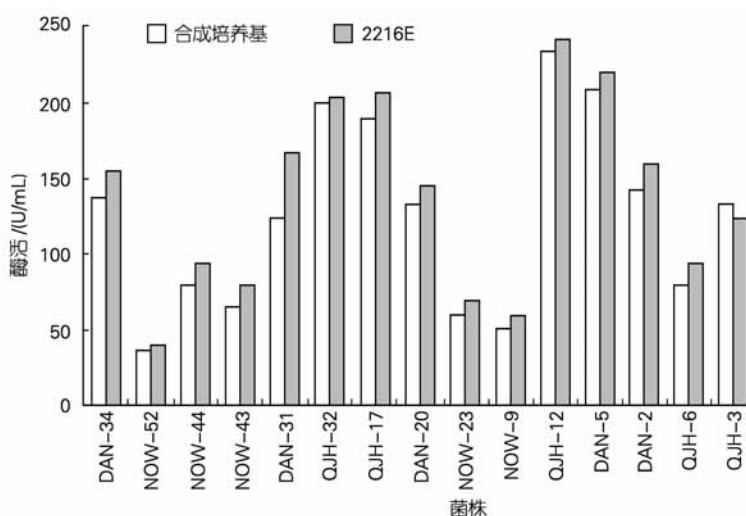


图 1 产生琼胶酶的菌株的酶活测定结果

Fig. 1 Enzyme activity of agarase producing strains

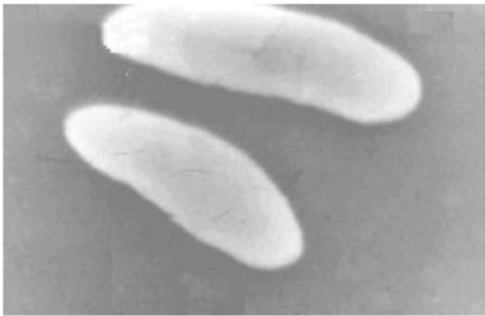


图2 菌株 QJH-12 的扫描电镜照片 (× 35 000)

Fig.2 The photo of scan electron microscope of strain QJH-12 (× 35 000)

在无碳源合成培养基中按 2‰的比例分别加入 8 种碳源,其它组分不变,在相同接种量、相同培养条件下摇瓶发酵 24 h 后,测定酶活,结果如表 1 所示。琼胶是琼胶降解菌 QJH-12 发酵产酶的最佳碳源,可以诱导菌株产生琼胶酶。菌体在其它碳源的培养基中可良好生长,但产酶活力差。

表 1 碳源对菌体产酶的影响

Tab.1 Effect of carbon source on production of agarase

碳源	酶活力 (U/mL)	生物量 <i>A</i> ₆₀₀
乳糖	49.15	0.327
葡萄糖	71.82	0.162
蔗糖	24.63	0.281
淀粉	60.54	0.270
D-半乳糖	56.78	0.223
琼胶	239.15	0.385
麦芽糖	56.67	0.183
果糖	71.84	0.105

2.2.2 氮源对产酶的影响

选择 10 种不同的氮源进行实验,结果如表 2 所示。在所测试的各种氮源中,QJH-12 发酵 24 h 后,在以酵母膏为氮源的液体培养基中发酵产酶活力最高,为 272.71 U/mL;在以柠檬酸三铵为氮源的液体培养基中生物量达到最高,发酵产酶的活力也高达 268.54 U/mL。考虑到利用柠檬酸三铵作为发酵培养

基的氮源,有利于下游工作中琼胶酶的进一步分离提纯以及琼胶酶降解产物的分析,由此作者选择柠檬酸三铵为发酵产酶的氮源。

表 2 不同氮源对菌体产酶的影响

Tab.2 Effect of nitrogen source on production of agarase

氮源	酶活力 (U/mL)	生物量 <i>A</i> ₆₀₀
NaNO ₃	196.51	0.150
KNO ₃	221.16	0.191
(NH ₄) ₂ SO ₄	226.73	0.220
柠檬酸三铵	268.54	0.235
NH ₄ Cl	235.56	0.188
蛋白胨	120.94	0.112
牛肉膏	52.93	0.086
酵母膏	272.71	0.102
草酸铵	26.54	0.080
豆粉	5.12	0.186

2.2.3 无机盐对产酶的影响

通过分析不同无机盐对菌株 QJH-12 产琼胶酶活力的影响可以看出,K₂HPO₄ 对产酶的影响最大,应作为发酵培养基的主要无机盐组分(表 3)。其余无机盐成分在单独添加或混合添加时对菌株产酶活力影响不明显。

表 3 不同无机盐对产酶的影响

Tab.3 Effect of inorganic salt on production of agarase

无机盐	相对酶活力 (%)
K ₂ HPO ₄	100
MgSO ₄	16.2
CaCl ₂	20.3
FePO ₄	21.3
KCl	16.0
MnCl ₂	17.2
FeCl ₂	9.5

2.2.4 不同质量分数的NaCl对产酶的影响

该菌株来源于海洋,受 NaCl 的影响较大。选择不同质量分数的 NaCl (0.5% ~ 3.0%) 进行实验,实验结果见表 4。该菌株具有较广泛的 NaCl 适应范围,在 0.5% ~ 2.0% 的范围内,表现出较高的产酶活性。

NaCl 质量分数为 1.0% 时,发酵液的酶活最高 ;NaCl 质量分数大于 1.0%时,产酶活力逐渐下降,说明过高的 NaCl 质量分数可能会抑制该菌株的产酶能力。

表 4 NaCl 质量分数对产酶的影响

Tab.4 Effect of NaCl concentration on production of agarase

NaCl 质量分数 (%)	酶活力 (U/mL)	生物量 A_{600}
0.5	266.42	0.263
1.0	289.16	0.270
1.5	251.34	0.268
2.0	234.35	0.271
2.5	222.97	0.248
3.0	188.91	0.237

2.2.5 正交法确定发酵产酶培养基

通过对以上实验结果的分析,实验选择琼胶为发酵产酶的最适碳源,柠檬酸三铵为最适氮源, K_2HPO_4 为最适无机盐。选择 3 因素(琼胶、柠檬酸三铵、 K_2HPO_4) 3 水平的正交实验,以确定 3 种因素对菌株发酵产酶的综合影响。正交实验结果和方差分析结果如表 5、表 6 所示,影响产酶活力大小的培养基成分依次为琼胶>柠檬酸三铵> K_2HPO_4 , 方差分析表明

琼胶和柠檬酸三铵质量分数对菌株产酶能力的影响水平显著,最佳培养基组成为琼胶 2.0‰,柠檬酸三铵 1.0‰, K_2HPO_4 1.0‰。

表 5 正交实验结果

Tab.5 Orthogonal test result

组号	琼胶 (‰)	柠檬酸三铵 (‰)	K_2HPO_4 (‰)	酶活力 x_i (U/mL)
1	1.0	1.0	0.5	43.31
2	1.0	2.0	1.0	17.15
3	1.0	3.0	1.5	0
4	1.5	1.0	1.0	108.85
5	1.5	2.0	1.5	55.91
6	1.5	3.0	0.5	32.46
7	2.0	1.0	1.5	179.07
8	2.0	2.0	0.5	85.11
9	2.0	3.0	1.0	118.98
K_1	60.46	331.23	160.88	
K_2	197.22	158.17	244.98	
K_3	383.16	151.44	234.98	
K_1^2	3 655.412	109 713.3	25 882.37	
K_2^2	38 895.73	25 017.75	6015.2	
K_3^2	146 811.6	22 934.07	55 215.6	
R	322.70	179.79	74.10	

注:在方差分析中, x_i 为酶活力。为简化计算,设 $x_i = x_i - 93.21$

表 6 正交实验的方差分析表

Tab.6 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	显著性
琼胶	17 491.25	2	8 745.126	82.72	*
柠檬酸三铵	6 924.389	2	3 462.194	32.75	*
K_2HPO_4	1 407.069	2	703.534	6.66	
误差	211.43	2	105.715		
总和	26 033.14	8			

注:* 表示差异显著

2.3 最适发酵条件的确定

2.3.1 发酵温度对产酶的影响

菌体在不同温度下培养,测定不同发酵温度对产酶的影响,实验结果见图 3。菌株发酵产酶的最适培养温度为 30℃,在 25~30℃ 的范围内培养,发酵液具有较高的酶活力;培养温度为 35℃ 时,发酵液的相对酶活为 65%;当发酵培养温度达到 40℃ 时,

相对产酶活力低于 50%。

2.3.2 培养基中的起始 pH 值对产酶的影响

菌体在不同起始 pH 值的培养基中进行培养,可以发现,菌株 QJH-12 具有较广泛的 pH 适应范围,在起始 pH6.5 的培养基中产酶活力达到最高;pH>6.5 时,产酶活力略有下降;pH8 时,相对产酶活力仅为 75% (图 4)。

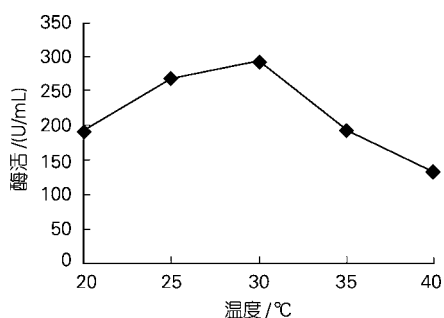


图3 发酵温度对产酶的影响

Fig.3 Effect of temperature on production of agarase

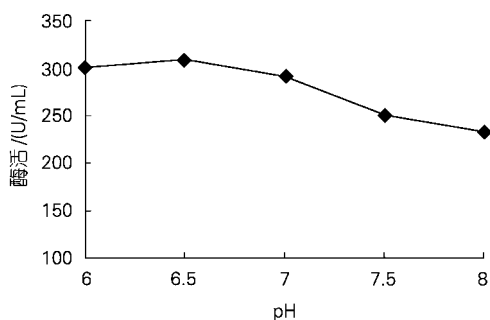


图4 pH对发酵产酶的影响

Fig.4 Effect of the pH on production of agarase

2.3.3 通气量对产酶的影响

通过摇瓶转速和装液量的改变测定通气量对发酵产酶的影响。如表7所示,随着摇瓶转速的增加,菌株发酵产酶能力也随之增加。转速150 r/min时,酶活力达到最高值,为290.6 U/mL;摇瓶转速继续增加时,发酵液酶活力略有下降。

表7 摇瓶转速对产酶的影响

Tab.7 Effect of stirrer speed on production of agarase

摇瓶转速 (r/min)	酶活 (U/mL)
100	200.5
150	290.6
200	287.1

在250 mL的三角瓶中分别装入不同体积的液体

培养基进行发酵,在30 150 r/min,起始pH6.5的条件下摇床培养26 h,测定发酵液的酶活力,实验结果见图5。当装液量为125 mL时,酶活达到最高值,为332 U/mL。

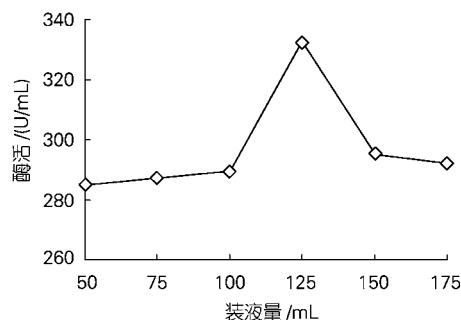


图5 培养基装液量对产酶的影响

Fig.5 Effect of medium volume on production of agarase

2.3.4 最佳产酶时间的确定

在已确定好的上述最适培养条件下,对培养不同时间的发酵液进行酶活测定,以确定最佳产酶时间。实验结果如图6所示,菌体培养26 h时产酶活力最高,超过26 h后产酶活力有下降的趋势。此时菌体仍继续保持增殖趋势,发酵培养32 h以后菌体生物量增加趋于缓慢。

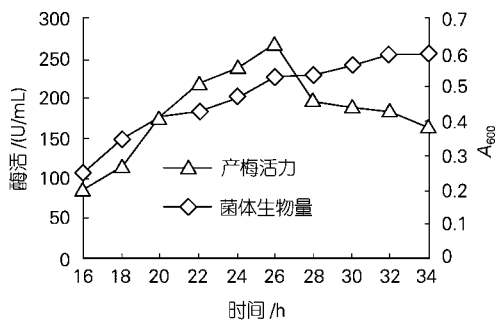


图6 发酵时间对产酶的影响

Fig.6 Effect of ferment time on production of agarase

3 讨论

琼胶酶主要来源于海洋软体动物和海洋微生物,在潮间带,已经证明每克淤泥中含有的琼胶降解菌可

达 10^7 个, 大约占淤泥中所有好氧细菌的 2%~4%。1902 年 Gran 第一次从海水中分离到琼胶分解细菌——琼胶假单胞菌(*Pseudomonas galatica*)以来, 人们已经从海水系统中分离到多种琼胶分解菌。据报道, 噬细胞菌属(*Cytophage*)^[5]、弧菌属(*Vibrio*)^[6]、放线菌属(*Actinomyces*)^[7]、交替单胞菌属(*Alteromonas*)^[8]、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)^[9]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[10]中的某些菌种均能分解琼胶。国内在琼胶降解微生物和琼胶酶解方面的研究报道目前还很少。

不同的琼胶酶产生菌株的培养条件各不相同, 各种因素如培养基的组成、培养温度、起始 pH 值、培养时间都对产酶具有很大的影响。作者以来源于海洋环境, 具有较高琼胶降解能力的野生菌株 QJH-12 为出发菌株, 以提高菌株的产酶活性为目的, 对其产酶培养基及发酵培养条件进行了优化选择。通过单因子实验和正交实验确定了一种合成的培养基: 碳源为琼胶 2.0‰, 氮源为柠檬酸三铵 1.0‰, K_2HPO_4 1.0‰, NaCl 1.0‰。这种全合成培养基的组成简单, 菌种产酶活力高, 有利于对发酵液中的琼胶酶进行分离和纯化, 对于将来利用该菌株进行琼胶酶的工业化生产, 在生产成本和酶产品精制方面创造了极为有利的条件。

该菌株最适的发酵培养条件为: 起始 pH6.5, 培养温度 30℃, 装液量为 250 mL 的三角瓶中装入 125 mL 的液体发酵培养基, 摇瓶转速为 150 r/min, 发酵时间为 26 h。从研究结果可看出该菌株的适合生长范围广。菌体生长在 25~35℃ 范围时, 相对产酶活力>65%; 菌体生长的起始 pH6~8 时, 相对产酶活力>75%。通过确定最适培养条件, 提高了菌株的产酶能力, 在优化的培养基和发酵条件下 QJH-12 的最高产酶活力可以达到 332U/mL, 且培养特征和产酶活力稳定。目前用于工业生产琼胶酶的菌株为 *Pseudomonas atlantic*, 其产品来自 sigma 公司, 价格昂贵。中国尚没有琼胶酶的产品。QJH-12 菌株同国内外已有的报道比较(表 8), 在发酵液初始酶活和产酶稳定性方面具有一定的优势, 通过进一步的诱变和改良, QJH-12 有望成为生产琼胶酶的来源菌株。

表 8 QJH-12 发酵液初始酶活与已报道菌种的比较

Tab. 8 Comparison of the agarase activity of QJH-12 with those reported

菌种	发酵液酶活力 (U/mL)
<i>Vibrio</i> sp. JT0107 ^[6]	13.2
<i>Alteromonas</i> sp. E-1 ^[11]	150
<i>Bacillus cereus</i> ASK202 ^[12]	121
<i>Vibrio</i> sp. PO-303 ^[13]	116
<i>Bacillus</i> sp. MK03 ^[14]	19.8
<i>Alteromonas</i> sp. C-1 ^[15]	414
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CY24 ^[16]	324
QJH-12	332

参考文献:

- [1] Mazumder S, Ghosal P K, Pujol C A, et al. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J]. *Int J Bio Macromo*, 2002, 31: 87-95.
- [2] Fernandez L E, Valiente O G, Mainardi V, et al. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*[J]. *Carbohydr Res*, 1989, 190: 77-83.
- [3] Weinberger F, Richard C, Kloreg B, et al. Structure-activity relationships of oligoagar elicitors towards *Gracilaria conferta*[J]. *J Phycol*, 2001, 37: 418-426.
- [4] Borel E, Hostettler F, Deuel H. Quantitative zuckerbestimmung mit 3,5- dinitrosalicylsäure and phenol[J]. *Helv Chim Acta*, 1952, 35: 115-120.
- [5] Van der Meulen H J, Harder W, Vedkamp H. Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. nov., a new agarolytic flexibacterium[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1974, 40: 329-346.
- [6] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 1549-1554.
- [7] Stanier R Y. Agar-decomposing strains of the *Actinomyces coelicolor* species group[J]. *J Bacteriol*, 1942, 44: 555-570.
- [8] Potin P, Richard C, Rochas C, et al. Purification and characterization of the alpha-agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb.nov., strain GJ1B[J]. *Eur J*

- Biochem**, 1993, 214: 599-607.
- [9] Romanenko L A, Zhukova N V, Rohde M, *et al.* *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2002, 53: 125-131.
- [10] Ha J C, Kim G T, Kim S K, *et al.* beta-Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 1997, 26: 1-6.
- [11] Kirimura K, Masuda N, Iwasaki Y, *et al.* Purification and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1[J]. **J Biosci Bioeng**, 1999, 87: 436-441.
- [12] Bong J O, Kim B J, Kim H J, *et al.* Purification and characterization of β -agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202[J]. **Biotechnol Lett**, 1999, 21: 1 011-1 105.
- [13] Araki T, Hayakawa M, Lu Z, *et al.* Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303[J]. **J Mar Biotechnol**, 1998, 6: 260-265.
- [14] Suzuki H, Sawai Y, Suzuki T, *et al.* Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03[J]. **J Biosci Bioeng**, 2003, 95: 328-334.
- [15] Leon O, Quintana L, Peruzzo G, *et al.* Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1992, 58(12):4 060-4 063.
- [16] 褚艳, 于文功, 韩峰. 琼胶酶高产海洋假单胞菌 CY24 的筛选及培养条件优化[J]. **中国海洋药物**, 2003,5:1-4.

Optimization of cultivation conditions of marine agarase-producing strain *Vibrio* sp. QJH-12

WANG Jing-xue, JIANG Xiao-lu, MU Hai-jin, GUAN Hua-shi

(College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003, China)

Received: Apr., 19, 2005

Key words: Marine *Vibrio*; agarase; culture medium; fermentation conditions

Abstract: A marine bacterium *Vibrio* sp. QJH-12 with high activity of decomposing agar was isolated from the South China Sea coast. The strain was gram negative, polar flagellated and arched. When cultured on agar plate, this isolate produced a diffusible agarase, which softened agar and produced pits around the colonies on the agar plate. By the test of single factor and orthogonal test, the optimum culture medium was determined as follows: agar 2.0%, ammonium citrate tribasic 1.0%, K_2HPO_4 1.0% and NaCl 1.0%. By measuring the agarase activity, the optimum ferment conditions were determined as follows: 125 mL fresh medium in 250 mL flask, the beginning pH 6.5 of the ferment medium, stirrer speed 150 r/min and 30 °C. After cultivation under above conditions for 26 h, the production of agarase reached the peak, with an activity of 332U/mL. The results indicated that QJH-12 might act as a potential candidate for the industrial application.

(本文编辑:张培新)