

研究报告

南极交替单胞菌 R11-5 产卡拉胶酶的发酵条件优化

潘爱红¹ 李江^{2*} 王蕾³ 宋益民¹

(1. 青岛科技大学 山东 青岛 266042)

(2. 国家海洋局第一海洋研究所 山东 青岛 266061)

(3. 青岛大学 山东 青岛 266071)

摘要:【背景】极地寒冷环境中发现了大量具有潜在应用前景的冷适应酶,同时也存在种类繁多的海藻多糖降解菌,因此极端环境微生物是筛选获得新颖、高效多糖降解酶的重要新源泉。由于筛选培养基通常并非野生菌发酵产酶的最优条件,为了使野生菌的产酶效率达到最高,需要对其培养条件进行优化,从而为其深入研究及开发利用提供依据。【目的】对一株产卡拉胶酶的南极菌株进行种属鉴定,并采用响应面法对该菌的发酵产酶条件进行优化。【方法】通过 16S rRNA 基因对产卡拉胶酶的南极菌株进行种属鉴定,采用响应面法优化南极菌株产酶发酵条件。【结果】该南极菌属于交替单胞菌属(*Alteromonas*),命名为交替单胞菌 R11-5。发酵条件优化结果显示,7 个环境因子影响交替单胞菌 R11-5 的产酶量。利用 Design-Expert 软件中的 Plackett-Burman 设计实验,筛选出影响交替单胞菌 R11-5 产酶量的 4 个主要因素分别为培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度和 Ca^{2+} 浓度。通过 Box-Behnken 设计和响应面分析得到交替单胞菌 R11-5 最佳产酶发酵条件为:温度 15.0 °C,牛肉膏浓度 11.0 g/L,卡拉胶浓度 3.0 g/L, Ca^{2+} 浓度 5.0 mmol/L。优化后发酵上清液酶产量达到 87.193 U/mL,与优化前相比提高了 1.8 倍。【结论】响应面法提高了南极交替单胞菌 R11-5 卡拉胶酶的产量,为其开发应用提供了科学依据。

关键词: 南极交替单胞菌, 卡拉胶酶, 优化, 响应面

Optimization of carrageenase fermentation conditions of Antarctic bacterium *Alteromonas* sp. R11-5PAN Ai-Hong¹ LI Jiang^{2*} WANG Lei³ SONG Yi-Min¹

(1. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042, China)

(2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China)

(3. Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: [Background] Cold-adapted enzymes from Antarctic and Arctic microorganisms offer several advantages over their mesophilic and thermophilic counterparts, and their properties make

Foundation items: Public Science and Technology Research Funds Project of Ocean (201505026-4); Key Research and Development Project of Shandong Province (2018GHY115013)

*Corresponding author: Tel: 86-532-88966520; E-mail: lijia@fio.org.cn

Received: May 09, 2018; Accepted: July 13, 2018; Published online (www.cnki.net): July 31, 2018

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费(201505026-4); 山东省重点研发计划(公益类专项)(2018GHY115013)

*通信作者: Tel: 86-532-88966520; E-mail: lijia@fio.org.cn

收稿日期: 2018-05-09; 接受日期: 2018-07-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-07-31

them valuable alternatives with industrial and biotechnological applications. Recent studies have shown that these cold environments represent an important reservoir of cold-adapted, complex polysaccharide-degrading marine bacteria that are a major source of novel polysaccharidases and diverse biological active compounds. In general, screening medium is not the best fermentation condition for producing enzyme bacteria, in order to improve enzyme production for research and application, the culture conditions of enzyme producing bacteria need to be optimized. **[Objective]** To identify a producing carrageenase Antarctic bacterium and optimize the fermentation conditions for carrageenase production. **[Methods]** The producing carrageenase Antarctic bacterium R11-5 was identified by 16S rRNA gene sequence and the fermentation conditions for carrageenase production of R11-5 was optimized using the method of response surface methodology. **[Results]** The 16S rRNA gene sequence analysis results showed that the Antarctic bacterium belonged to *Alteromonas* sp. and was named as *Alteromonas* sp. R11-5. In order to optimize the fermentation conditions of *Alteromonas* sp. R11-5, 7 single factors (inoculation amount, temperature, pH, carbon source, nitrogen source, carrageenan concentration and metal ions) were selected by single test. Four important factors (temperature, beef extract, carrageenan and calcium ion) influencing carrageenase production, which identified by initial experimental design of Plackett-Burman by Design-Expert software. Then Box-Behnken design and response surface analysis were adopted to further study the interaction among the variables and obtain optimal values that bring maximum carrageenase production. The optimal fermentation conditions were as follows: Temperature 15.0 °C, beef extract concentration 11.0 g/L, carrageenan concentration 3.0 g/L, Ca^{2+} concentration 5.0 mmol/L. The supernatant carrageenase activity of optimized fermentation reached 87.193 U/mL, 1.8 times higher than that before optimization. **[Conclusion]** Carrageenase production of Antarctic bacterium *Alteromonas* sp. R11-5 was improved after the fermentation conditions optimized using the method of response surface methodology. R11-5 was a promising candidate for industrial application.

Keywords: Antarctic bacterium *Alteromonas* sp., Carrageenase, Optimization, Response surface

卡拉胶是一种从红藻中提取的酸性多糖, 俗称鹿角菜胶或角叉菜胶, 具有抗氧化^[1]、抗病毒^[2]、抗肿瘤^[3]的生理活性, 在医学领域具有广泛的应用价值, 在制药工艺上常被作为悬浮剂、凝胶剂和增稠剂^[4]使用。卡拉胶的降解产物是卡拉胶寡糖, 相比卡拉胶, 卡拉胶寡糖具有水溶性好、稳定性高、易吸收的特点, 其分子链上的活性基团充分暴露, 在免疫调节功能^[5]、抗氧化活性^[6]、抗病毒活性、抗肿瘤活性^[7-8]方面优于卡拉胶。

目前, 卡拉胶寡糖的制备方法主要有 3 种: 化学法、物理法和生物酶法。化学法即通过化学试剂的作用使卡拉胶大分子中的糖苷键断裂, 形成小分子的寡糖, 但化学降解会使降解底物的硫酸根基团掉落, 降低寡糖的生物活性^[9]。物理法主要通过超声波、微波和辐射^[10]途径降解卡拉胶大分子, 其寡糖的组成和结构虽不会改变, 但反应条件难以控

制。生物酶法即通过生物中提取的活性酶降解卡拉胶, 因其专一性强, 降解卡拉胶产生的产物单一, 反应条件温和, 不会破坏卡拉胶中活性基团, 能够有效保持卡拉胶的活性结构, 在食品工业及医药等领域具有良好的应用前景。

现阶段研究最广泛的是从海洋微生物中制备卡拉胶酶^[11]。最近的研究表明, 寒冷环境存在大量冷适应的、种类繁多的多糖降解海洋细菌^[12]。然而, 对南极细菌多糖降解活性的研究还很少。迄今为止, 只有项目组从南极菌交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp.) NJ21 中筛选、克隆和表达了耐低温的琼胶酶 Aga21^[13], 该酶在 10 °C 时仍能保持 80% 以上的初始酶活。Jung 等^[14]报道了 *Gayadomonas joobiniege* G7 产的冷适应琼胶酶 AgaJ9, 该酶能够从凝固的琼脂糖中直接回收 DNA, 而有关南极微生物产卡拉胶酶的研究尚未见报道。

南极分布着种类繁多的大型海藻^[15],目前已发现的就有 117 种,其中 57 种是南极所特有的种属^[16],因此,大型海藻在南极生态系统及物质能量循环代谢中发挥着重要的作用。海藻多糖降解酶是海藻降解的关键酶,其为南极海洋生物系统提供了大量的有机碳源,发现和研究南极微生物产的海藻多糖降解酶,不仅能获得结构新颖的海藻多糖降解酶,也有助于理解南极海洋生态系统的代谢和调节机制。

微生物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,野生菌受自然环境条件限制,其生长和发酵产酶条件并非最优,特别是对于生长温度较低的南极微生物,为了使野生菌的产酶效率达到最高,需要对野生菌的培养条件进行优化,以满足后续的研究。本文将采用响应面法对产卡拉胶酶南极交替单胞菌 R11-5 的培养条件进行系统研究,以提高其产酶量,从而为该酶的异源表达、酶学性质研究以及后续的应用研究提供科学依据,同时也有助于理解南极海洋微生物的碳代谢机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

南极交替单胞菌 R11-5 来源于中国第 30 次南极科学考察沉积物样品,考察区域位于普里兹湾。采集后筛选分离,保存于 -80°C 。

1.1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司;卡拉胶, HASHENG 生物科技公司;氯化钙、牛肉浸膏,国药集团化学试剂有限公司;3-5 二硝基水杨酸(DNS)溶液:182 g 四水合酒石酸钾钠溶解于 600 mL 蒸馏水中,加入 21 g NaOH, 6.3 g DNS, 5 mL 苯酚, 5 g 亚硫酸钠,定容到 1 L 容量瓶,储存于棕色瓶中;碘单质、碘化钾,上海银典化工有限公司。

PCR 仪、台式冷冻离心机,赛默飞世尔公司;分光光度计,上海尤尼柯公司;数显恒温水浴锅,常州丹瑞实验仪器公司;全温振荡培养箱,北京东联哈尔有限公司。

1.1.3 培养基

2216E 液体培养基(g/L):蛋白胨 5.0, 酵母粉 1.0, 过滤海水配制, 1.21×10^5 Pa 灭菌 20 min。

卡拉胶酶筛选培养基(g/L):蛋白胨 5.0, 酵母粉 1.0, 卡拉胶 20.0, 过滤海水配制, 1.21×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

将从沉积物样品中筛选得到的 85 株可培养的南极细菌接种到 5 mL 2216E 液体培养基中, 15°C 、150 r/min 培养 24 h;取 2 μL 菌液接种于卡拉胶酶筛选培养基上,在 15°C 恒温培养箱中静置培养 48 h,观察菌落形态,用卢戈氏碘液染色法筛选出具有卡拉胶酶活性的菌株,测定卡拉胶酶活。

1.2.2 卡拉胶酶活的测定方法^[17-18]

将筛选得到的具有卡拉胶酶活性的菌株接种到 2216E 液体培养基中, 15°C 、150 r/min 培养 24 h, 4°C 、10 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 发酵上清液作为粗酶液,与 1 mL 0.1%卡拉胶底物(0.1%的卡拉胶溶解于 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, pH 7.0)反应 45 min 后,用 DNS 法测得反应体系中还原糖的含量来表示粗酶的酶活,每组实验设 3 个重复。1 个酶活力单位(U)定义为:在 30°C 条件下,1 min 内催化产生 1 μg 还原糖所需的酶量。发酵上清液酶活力计算公式:

酶活计算公式:酶活力(U/mL)= $\Delta A\times 1\,000\times n/T$ 。

ΔA (mg/mL):半乳糖标准曲线上用 DNS 法测得的吸光值对应的含糖量。 n :实验时酶液被稀释的倍数。 T :酶与底物的反应时间。

1.2.3 菌株的鉴定

以卡拉胶酶活力最高的菌株 R11-5 基因组为 DNA 模板,用通用引物 27F/1492R 对菌株 R11-5 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): $2\times\text{Taq PCR Master Mix}$ 25 μL , 通用引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 基因组 DNA 模板(1 mg/L) 2 μL , 双蒸水补足 50 μL 。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min,

4℃保存。PCR产物送青岛擎科科技有限公司进行测序并拼接。将所测序列在 GenBank 数据库(NCBI)用 BLAST 分析比对。

1.3 R11-5 菌株的发酵条件优化

1.3.1 单因素实验

分别以接种量、培养温度、培养基 pH、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、最适金属离子浓度以及卡拉胶浓度作为唯一变量进行发酵实验，确定各环境因素对菌株 R11-5 酶活的影响，每组实验设 3 个重复。各因素及变量见表 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，并将该条件下酶活定义为 100%。

1.3.2 响应面法优化 R11-5 菌株发酵条件

1) Plackett-Burman 实验^[19]。根据单因素的实

验结果，对南极菌 R11-5 培养条件中的接种量、培养温度、初始 pH、酵母粉浓度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度和 Ca²⁺浓度 7 个因素进行考察，采用 Factors=7 和 Runs=12 的 Plackett-Burman 设计，选取各因素最高和最低 2 个水平，按表 2 进行发酵实验，每组实验设 3 个重复。用每毫升发酵上清液中卡拉胶酶活力表示响应值 R₁，确定影响 R11-5 发酵产酶的 4 个主要因素，实验因素及水平见表 2。

2) 响应面 Box-Behnken 实验^[20]设计。根据 Box-Behnken 实验设计确定的 4 个重要因素，利用 Design-Expert V8.05 软件设计 4 因素 3 水平的响应面实验，按照实验设计进行实验，每组实验设 3 个重复，考察 4 个显著因素之间的交互作用，获得发酵上清液酶活最高时的 4 因素组合。

表 1 单因素实验设计各因素及变量

Table 1 Factors and variables of single factor experiment

因素 Factors	因素变量 Factor variables
接种量 Inoculation amount (%)	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5
培养温度 Temperature (°C)	5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0
pH	5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0
碳源 Carbon source	Lactose, Glucose, Maltose, Yeast powder, Amylum, Sucrose
氮源 Nitrogen source	NH ₄ Cl, Peptone, Beef extract, Urea, (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ NO ₃
酵母粉浓度 Yeast powder concentration (g/L)	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0
牛肉膏浓度 Beef extract concentration (g/L)	5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0, 15.0
金属离子 Metal ion	Mn ²⁺ , Sr ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cr ²⁺ , Cu ²⁺
卡拉胶浓度 Carrageenan concentration (g/L)	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0

表 2 Plackett-Burman 实验影响 R11-5 产酶的实验因素及水平

Table 2 Factors and levels affect R11-5 produce carrageenase in Plackett-Burman experiment

因素 Factors	代码 Encode	水平 Levels	
		-1	1
接种量 Inoculation amount (%)	A	1.5	2.5
培养温度 Temperature (°C)	B	10.0	20.0
pH	C	6.0	7.5
酵母粉浓度 Yeast powder concentration (g/L)	D	4.0	8.0
牛肉膏浓度 Beef extract concentration (g/L)	E	9.0	13.0
卡拉胶浓度 Carrageenan concentration (g/L)	F	1.0	5.0
Ca ²⁺ (mmol/L)	G	1.0	9.0

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

在卡拉胶筛选培养基的作用下,从 85 株可培养的南极细菌中筛选得到 12 株具有卡拉胶酶活性的菌株,通过 DNS 法测定这 12 株菌的酶活,得到酶活性最高的菌株 R11-5,其卡拉胶的筛选培养基上产生明显的透明圈(图 1)。

2.2 菌种的鉴定

菌株 R11-5 16S rRNA 基因经测序拼接后长度为 1 350 bp,通过在 NCBI 进行 BLAST 比对分析,发现菌株 R11-5 与交替单胞菌属(*Alteromonas*)相似度高达 99%,可以初步确定该产卡拉胶酶的南极菌为交替单胞菌属(*Alteromonas*),命名为交替单胞菌 R11-5。

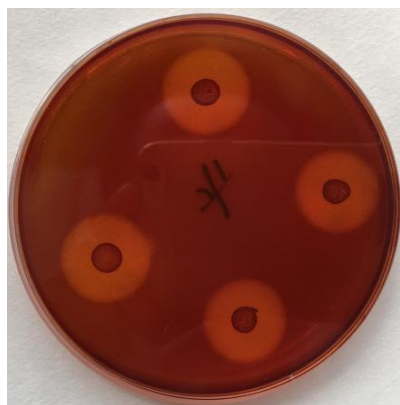


图 1 菌株 R11-5 在卡拉胶培养基上产生的透明圈
Figure 1 R11-5 produce transparent circle on carrageenan solid medium

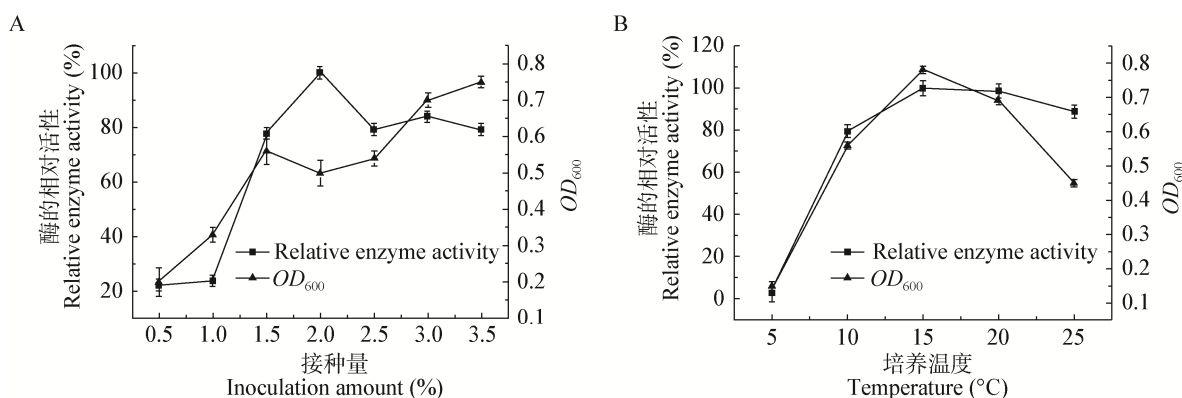
2.3 单因素实验结果

各种环境因素对交替单胞菌 R11-5 生长及产酶的影响情况如下:菌株交替单胞菌 R11-5 的接种量为 2%时,酶产量达到最大值,但随着接种量增加,酶产量并未出现显著升高(图 2A);当培养温度为 15 °C 时,菌株交替单胞菌 R11-5 的酶产量最高,且生物量也最大(图 2B);当培养基 pH 为 7.0 时,菌株 R11-5 酶产量达到最高,生物量也最大(图 2C);最佳碳源为酵母粉时,菌株 R11-5 酶产量最高(图 2D),而且当酵母粉浓度为 6 g/L 时,酶产量最高(图 2F);最佳氮源为牛肉膏时,菌株 R11-5 酶产量最高(图 2E),而且当牛肉膏浓度为 11 g/L 时,酶产量达到最大值(图 2G);金属离子对酶产量也有显著的影响, Ca^{2+} 能增加菌株 R11-5 的酶产量,5 mmol/L Ca^{2+} 时酶的产量最高(图 2H、I); Mn^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 则具有抑制作用,而 Fe^{3+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^{2+} 几乎抑制了酶的产生(图 2H);而当培养基中添加 3 g/L 的卡拉胶时,酶产量最高(图 2J)。

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 3,通过对实验结果进行 F 检验可以看出影响交替单胞菌 R11-5 酶活的 4 个重要因素依次是卡拉胶浓度、培养温度、牛肉膏浓度和培养基中 Ca^{2+} 离子浓度, $P < 0.05$ (表 4),说明这 4 个因素对交替单胞菌 R11-5 产酶量影响显著。



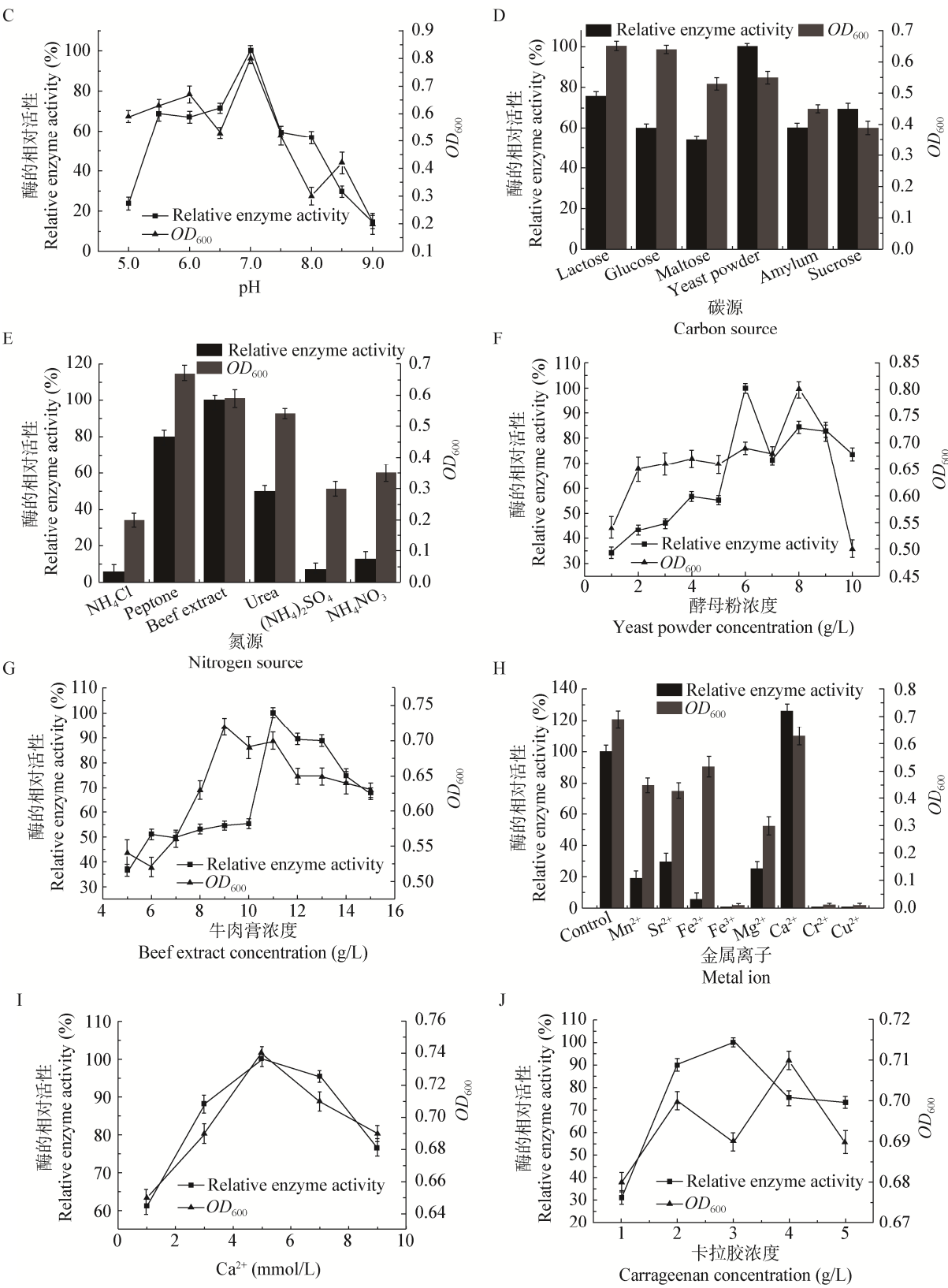


图 2 不同培养条件对交替单胞菌 R11-5 生长及产卡拉胶酶的影响
Figure 2 The influence of different culture conditions on *Alteromonas* sp. R11-5 growth and carrageenase produce

表 3 Plackett-Burman 实验设计及响应值结果
Table 3 Plackett-Burman design and response result

试管序号 Serial No.	A	B	C	D	E	F	G	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	35.101
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	52.754
3	1	1	-1	-1	1	-1	1	61.680
4	1	-1	1	-1	-1	-1	1	57.855
5	1	-1	-1	-1	1	1	1	55.942
6	-1	1	-1	-1	-1	1	1	67.419
7	1	-1	1	1	-1	1	1	32.551
8	-1	1	1	-1	1	-1	-1	50.203
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	29.639
10	-1	1	1	1	-1	1	1	68.057
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	61.680
12	1	1	1	-1	1	1	-1	88.463

2.4.2 响应面 Box-Behnken 法获得最优发酵条件

由 Plackett-Burman 实验筛选出了 4 个显著因素: Ca^{2+} 浓度、培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度, 用这 4 个显著因素设计 Box-Behnken 实验, 根据得到的中心值(0 水平), 对称选取最高水平值(1 水平)和最低水平值(-1 水平)(表 5), 采用 Factors=4 和 run=29 进行 Box-Behnken 响应面实验设计, 分析显著因素之间的交互作用和交互作用最佳值, Box-Behnken 实验设计及实验结果见表 6。

表 4 Plackett-Burman 实验主效应分析
Table 4 Analysis of main effects for Plackett-Burman design

代码 Encode	F 值 F value	P 值 Pr> f	重要性排列 Order of importance
A	1.044	0.345	5
B	3.164	0.026	2
C	0.635	0.555	7
D	-0.653	0.537	6
E	0.926	0.031	3
F	1.001	0.017	1
G	0.833	0.037	4

表 5 Box-Behnken 试验因素及水平
Table 5 Levels of variables used in the Box-Behnken design

代码 Encode	因素 Factors	水平 Levels		
		-1	0	1
B	培养温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	10	15	20
E	牛肉膏浓度 Beef extract concentration (g/L)	10	11	12
F	卡拉胶浓度 Carrageenan concentration (g/L)	2	3	4
G	Ca^{2+} (mmol/L)	1	5	9

表 6 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 6 Design and result of Box-Behnken design

试管序号 Serial No.	B	E	F	G	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	-1	-1	0	0	22.456
2	1	-1	0	0	45.177
3	-1	1	0	0	53.431
4	1	1	0	0	39.223
5	0	0	-1	-1	62.247
6	0	0	1	-1	64.645
7	0	0	-1	1	67.363
8	0	0	1	1	66.627
9	-1	0	0	-1	55.591
10	1	0	0	-1	35.314
11	-1	0	0	1	39.915
12	1	0	0	1	58.313
13	0	-1	-1	0	54.282
14	0	1	-1	0	58.663
15	0	-1	1	0	50.099
16	0	1	1	0	63.318
17	-1	0	-1	0	41.188
18	1	0	-1	0	63.961
19	-1	0	1	0	54.591
20	1	0	1	0	42.526
21	0	-1	0	-1	31.853
22	0	1	0	-1	70.085
23	0	-1	0	1	63.818
24	0	1	0	1	54.173
25	0	0	0	0	89.215
26	0	0	0	0	88.423
27	0	0	0	0	87.182
28	0	0	0	0	87.932
29	0	0	0	0	88.431

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 R_1 与自变量培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度、 Ca^{2+} 浓度的多元回归方程为:

$$R_1=88.24+1.45B+5.93E-0.49F+2.54G-9.23BE-8.71BF+9.67BG+2.21EF-11.97EG-0.78FG-27.61B^2-20.75E^2-10.38F^2-12.83G^2。$$

回归模型方差分析见表 7。从表 7 中可以看出 E、G、BF、BG、EF、EG、 B^2 、 E^2 、 F^2 、 G^2 的 P 值均小于 0.01, 说明其对交替单胞菌 R11-5 产酶影响度极显著; 交互项和二次项中 B、FG 的 $P<0.05$, 说明其对交替单胞菌属 R11-5 产酶影响显著; F、BE 的 P 值大于 0.05, 对交替单胞菌 R11-5 产酶无显著影响, 因此可以说明试验因素对响应面值的影响不是简单的线性关系, 二次项和交互项对响应面有很大的影响。模型 $P=0.002\ 1<0.01$ 说明线性模型回归高度显著, 模拟得到的方程可信。决定

系数 $R^2=0.970\ 8^{[21]}$ 表明方程拟合较好, 失拟项 $CV=3.84\%$, 数值越低说明实验操作越可信, 失拟项 $P=0.137>0.1$, 失拟项不显著, 表明模型的选择正确, 以上可以表明通过多元回归分析得到的方程可以很好地解释交替单胞菌 R11-5 产酶量与培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度、 Ca^{2+} 浓度之间的关系。

根据多元回归方程绘制的培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度、 Ca^{2+} 浓度两两交互作用的响应曲面及等高线见图 3-8。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最大值为等高面图的中心点。通过 SAS 软件分析求解多元回归方程。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, 求解此方程组得此模型 R_1 最大值为 88.683 4 U/mL,

表 7 回归方程方差分析
Table 7 Analysis of variance for regression equation

来源 Source	方差总和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	平均方差 Mean squares	F 值 F value	P 值 Prob>F
Model	8 917.04	14	636.93	125.92	0.002 1
B	25.06	1	25.06	4.95	0.043
E	422.55	1	422.55	83.54	< 0.000 1
F	2.90	1	2.90	0.57	0.461 6
G	77.39	1	77.39	15.30	0.001 6
BE	340.94	1	340.94	67.40	0.270 6
BF	303.42	1	303.42	59.98	< 0.000 1
BG	373.94	1	373.94	73.93	0.002
EF	19.53	1	19.53	3.86	0.004 9
EG	573.05	1	573.05	113.29	0.004 5
FG	2.46	1	2.46	0.49	0.031 2
B_2	4 944.73	1	4 944.73	977.55	< 0.000 1
E_2	2 792.44	1	2 792.44	552.05	< 0.000 1
F_2	699.15	1	699.15	138.22	0.005 9
G_2	1 067.36	1	1 067.36	211.01	< 0.000 1
Residual	70.82	14	5.06		
Lack of Fit	68.58	10	6.86	12.28	0.137
Pure Error	2.23	4	0.56		
Cor Total	8 987.85	28			

注: 显著: Prob>F 值小于 0.05; 高度显著: Prob>F 值小于 0.01.
Note: Significant: Prob>F value less than 0.05; Highly significant: Prob>F value less than 0.01.

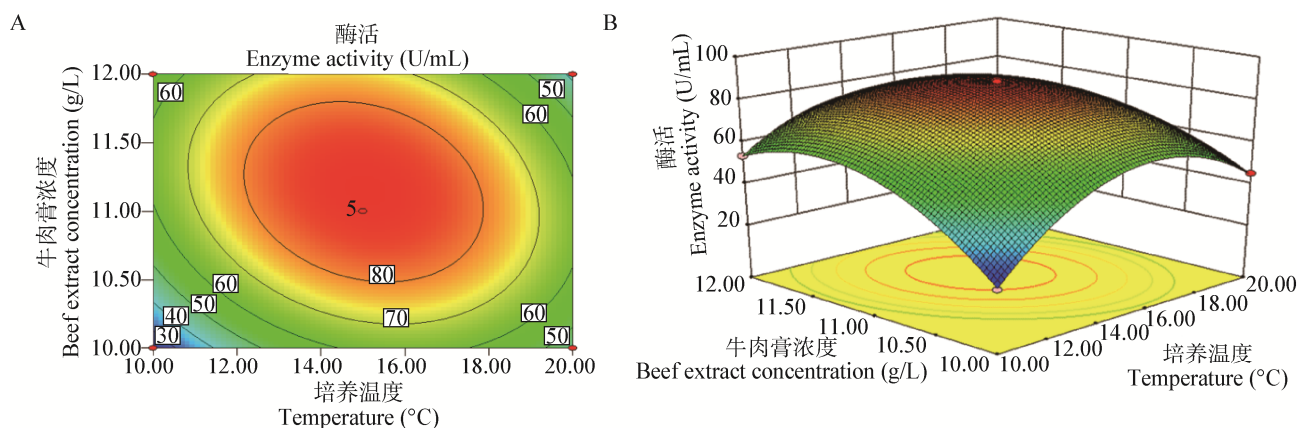


图3 培养温度和牛肉膏浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响

Figure 3 Contour plot (A) and response surface (B) of temperature and beef extract concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

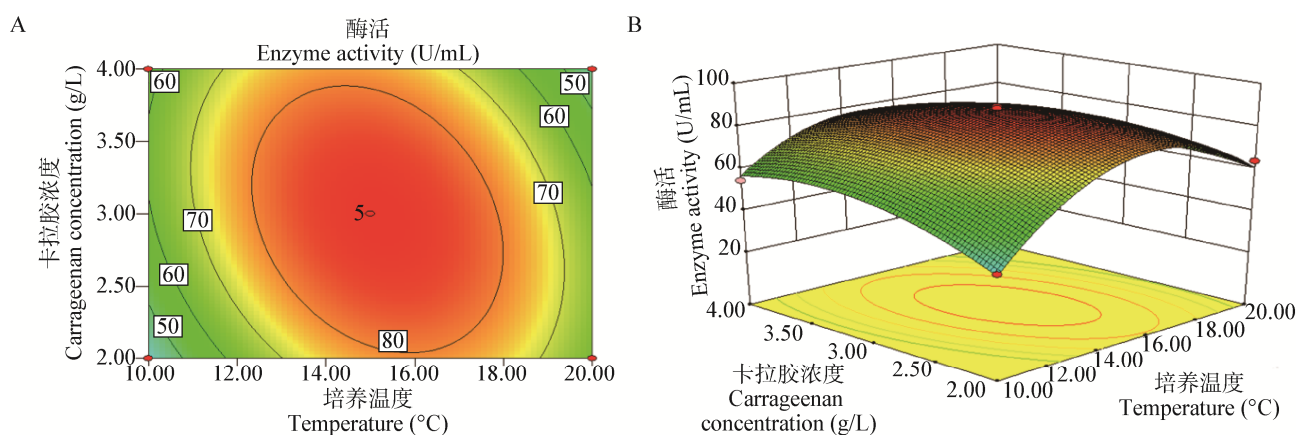


图4 培养温度和卡拉胶浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响

Figure 4 Contour plot (A) and response surface (B) of temperature and carrageenan concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

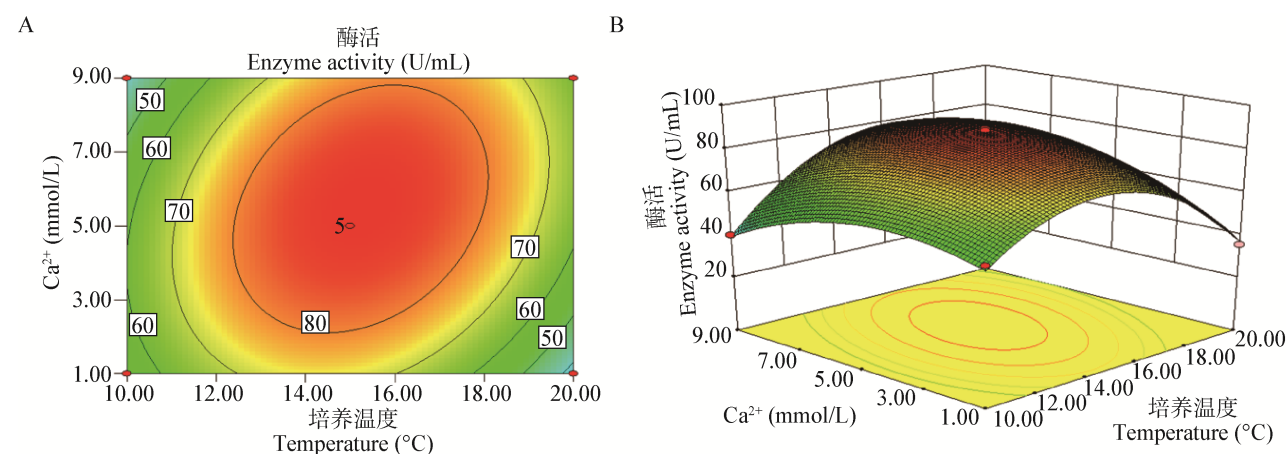


图5 培养温度和 Ca^{2+} 浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响

Figure 5 Contour plot (A) and response surface (B) of temperature and Ca^{2+} concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

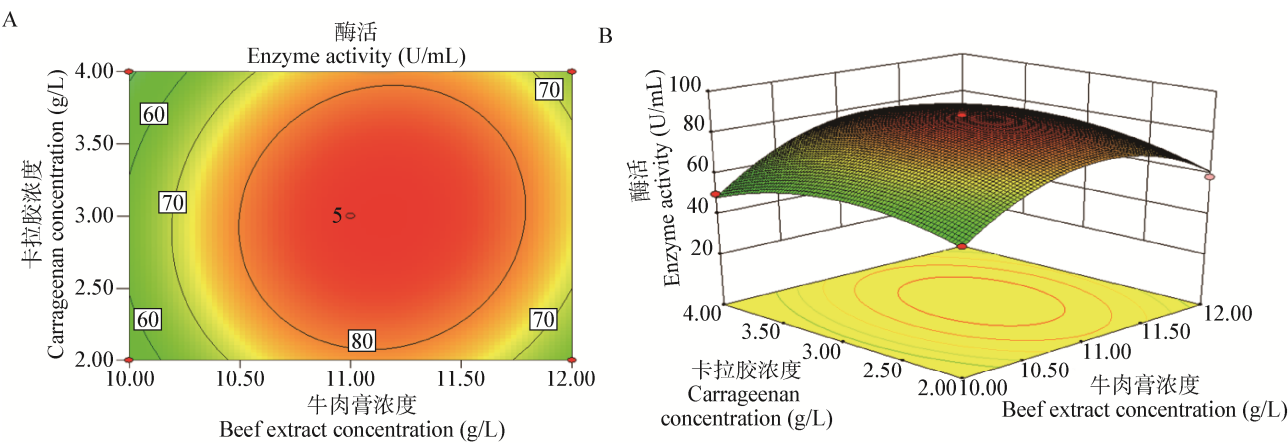


图 6 牛肉膏浓度和卡拉胶浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响
Figure 6 Contour plot (A) and response surface (B) of beef extract concentration and carrageenan concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

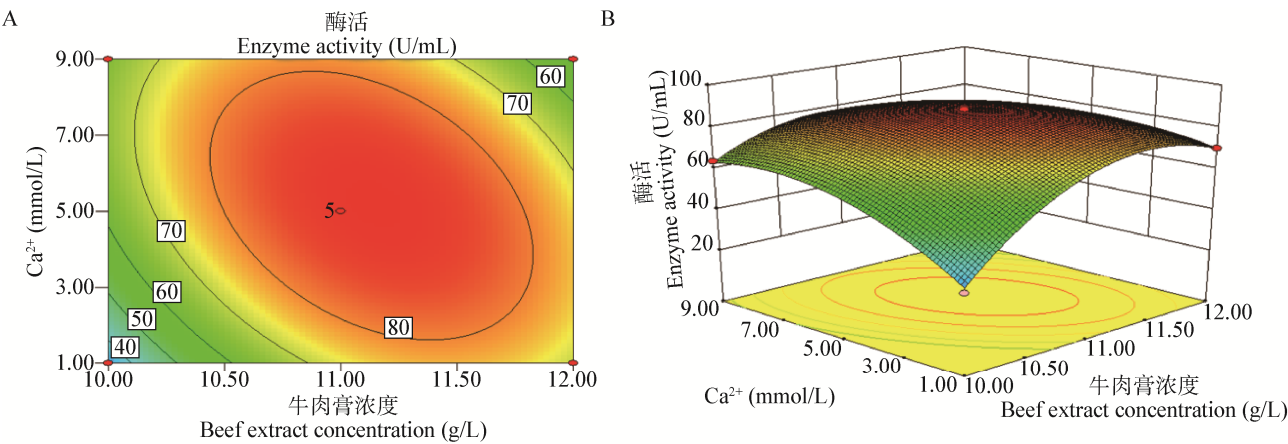


图 7 牛肉膏浓度和 Ca^{2+} 浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响
Figure 7 Contour plot (A) and response surface (B) of beef extract concentration and Ca^{2+} concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

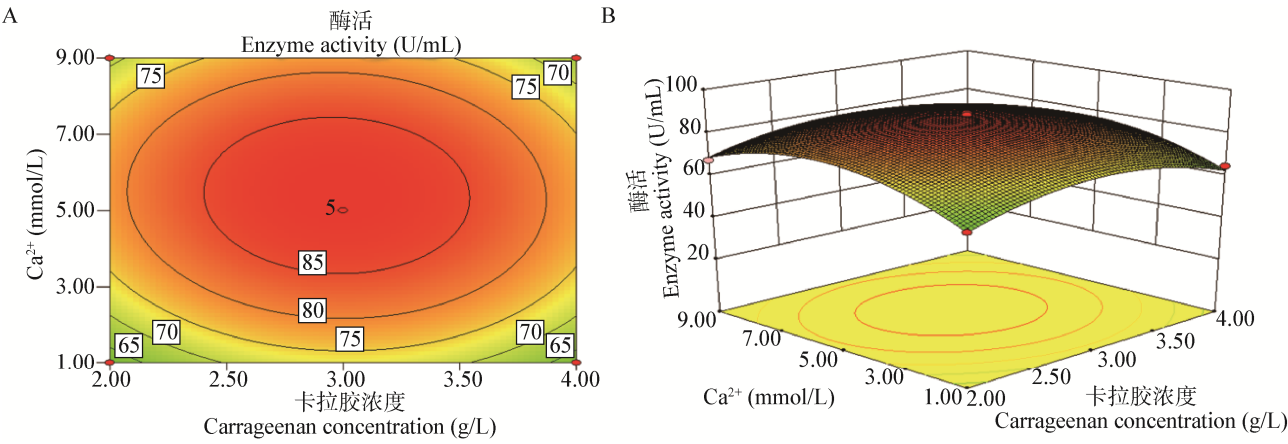


图 8 卡拉胶浓度和 Ca^{2+} 浓度对交替单胞菌 R11-5 产酶的影响
Figure 8 Contour plot (A) and response surface (B) of carrageenan concentration and Ca^{2+} concentration influence *Alteromonas* sp. R11-5 carrageenase production

此条件下各因素对应的值为 $B=15.09$, $E=11.13$, $F=2.98$, $G=5.19$ 。即最佳培养条件为温度 $15.09\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、牛肉膏浓度为 11.13 g/L 、卡拉胶浓度为 2.98 g/L 、 Ca^{2+} 浓度为 5.19 mmol/L 。为验证模型的正确性,我们进行了3组发酵实验,为提高实验的可操作性,我们将培养条件设置为温度 $15.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、牛肉膏浓度 11.0 g/L 、卡拉胶浓度 3.0 g/L 、 Ca^{2+} 浓度 5.0 mmol/L ,用3组数据平均值来表示优化后发酵上清液的酶活。测得优化后发酵上清液酶活 $R_1=86.889\text{ U/mL}$, $R_2=86.822\text{ U/mL}$, $R_3=87.867\text{ U/mL}$,接近预测值,表明优化得到的发酵条件可信,发酵后的产酶量是未优化前的1.8倍。

3 讨论与结论

冷适应酶是由在北极和南极地区、高寒地区、深海和冰川等永久寒冷环境中生长的生物所产生的,由于其在较低的温度下具有高活性和高催化效率,能够有效降低能耗,因而具有巨大的经济效益和应用潜力^[22]。极地寒冷环境中不仅发现了大量具有潜在应用前景的蛋白酶和脂肪酶等冷适应酶,同时也存在种类繁多的多糖降解海洋细菌,因此南极微生物也成为发掘具有生物技术应用前景的海藻多糖降解酶的潜在新来源。

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^[23]。本研究采用响应面法对南极交替单胞菌 R11-5 进行培养优化,从接种量、温度、pH、碳源、氮源和金属离子等因素入手,逐一作为唯一变量进行单因素实验,优化交替单胞菌 R11-5 的发酵条件,然后参考单因素实验的结果应用响应面分析法,借助 Design-Expert 软件,采用 Plackett-Burman 实验设计筛选出影响酶活的4个主要因素:培养温度、牛肉膏浓度、卡拉胶浓度、 Ca^{2+} 浓度,在此基础上利用 Box-Behnken 设计及响应面分析法进行回归分析,得出南极菌交替单胞菌 R11-5 的最佳培养条件为温度 $15.09\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、牛

肉膏浓度 11.13 g/L 、卡拉胶浓度 2.98 g/L 、 Ca^{2+} 浓度 5.19 mmol/L ,考虑到实验的可操作性,我们将培养条件设置为温度 $15.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、牛肉膏浓度 11.0 g/L 、卡拉胶浓度 3.0 g/L 、 Ca^{2+} 浓度 5.0 mmol/L 。在此优化条件下,发酵上清液的酶活达到 87.193 U/mL ,与预测值高度吻合,比优化前提高了1.8倍。彭小珍等^[24]采用单因素和正交试验法优化产卡拉胶酶菌株施氏假单胞菌的发酵条件,优化后最佳发酵条件为卡拉胶浓度 3.0 g/L ,酵母浸粉浓度 1.0 g/L , NaNO_3 浓度 3.0 g/L ,乳糖浓度 0.4 g/L ,吐温-80浓度 0.2 g/L ,起始 pH 值 6.0 ,温度 $32.0\text{ }^{\circ}\text{C}$,装样量 $90\text{ mL}/250\text{ mL}$,接种量 13.0% ,摇床转速 160.0 r/min ,产酶活力为 26.5 U/mL 。刘苹等^[25]采用响应面法优化产卡拉胶酶菌株黄杆菌 YK-5 的发酵条件,优化后最佳发酵条件为温度 $28.17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.77 、卡拉胶浓度 3.71 g/L ,产酶活力为 215.72 U/mL 。通过与上述的研究比较可见,卡拉胶酶作为一种诱导表达的水解酶,培养基中卡拉胶组分对于该酶的产量具有普遍的诱导效果,而且培养基中卡拉胶浓度一般都在 3.0 g/L 左右。其次,影响卡拉胶酶产量的因素是温度,培养温度对于微生物的生长和产酶量均具有重要的作用,由于本研究中的交替单胞菌 R11-5 分离自南极低温环境,所以其培养温度远低于施氏假单胞菌和黄杆菌 YK-5。此外,pH 和金属离子等也是影响菌株产酶量的主要因素。交替单胞菌 R11-5 的产酶虽然不是很高,但鉴于极地微生物产海藻多糖降解酶的潜在应用前景,下一步将采用基因工程手段对该酶进行克隆和异源表达并系统研究其酶学性质,通过构建稳定的工程菌株,为其开发应用提供依据。田琳等^[21]对菌株 *Zobellia* sp. ZM-2 的卡拉胶酶编码基因进行了重组表达,构建了重组菌 BL21-HTa-cgkZ,并采用响应面法对其进行了发酵条件优化,重组卡拉胶酶产量由原来的 0.33 U/mL 提高到 1.362 U/mL ,特别是优化后重组卡拉胶酶产量达到 10.76 U/mL (表8);张兰等^[26]对菌株 *Pseudoalteromonas* sp. QY203 进行

表 8 不同种属菌株产卡拉胶酶及其重组酶的产酶量比较

Table 8 The carrageenanase production of different wild strains and its recombinant bacteria

菌株名称 Strains	野生菌优化前酶活 Enzyme activity before optimization of wild bacteria (U/mL)	野生菌优化后酶活 Enzyme activity after optimization of wild bacteria (U/mL)	重组菌优化前酶活 Enzyme activity before optimization of recombinant bacteria (U/mL)	重组菌优化后酶活 Enzyme activity after optimization of recombinant bacteria (U/mL)	参考文献 References
<i>Alteromonas</i> sp. R11-5	48.441	87.193	—	—	This work
<i>Zobellia</i> sp. ZM-2	0.330	—	1.362	10.76	[21]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. QY203	0.821	—	5.836	42.60	[26]

了重组表达, 构建了重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-CgkX-CM, 并采用响应面法对菌株进行了发酵条件优化, 重组卡拉胶酶产量由原来的 0.821 U/mL 提高到 5.836 U/mL, 特别是优化后重组卡拉胶酶产量高达 42.60 U/mL (表 8)。因此, 通过基因工程手段实现卡拉胶酶的高效异源表达, 是提高卡拉胶酶产量、实现其工业化应用的重要途径。

REFERENCES

[1] Rafiquzzaman SM, Ahmed R, Lee JM, et al. Improved methods for isolation of carrageenan from *Hypnea musciformis* and its antioxidant activity[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(2): 1265-1274

[2] Kalitnik AA, Barabanova AOB, Nagorskaya VP, et al. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(1): 65-72

[3] Guo D, Luan H, Sun LW, et al. Research progress on biological activities of low molecular weight carrageenan and its derivatives[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(5): 2581-2583, 2598 (in Chinese)
郭丹, 栾晖, 孙黎玮, 等. 低分子量卡拉胶及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2581-2583, 2598

[4] He XJ, Lou ZX, Ma CY, et al. Application of the mixture of Carrageenan and enzyme digested Konjac gum in jelly sweets[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 284-287 (in Chinese)
贺雪姣, 娄在祥, 马朝阳, 等. 降解魔芋胶与 κ -卡拉胶复配胶在凝胶软糖中的应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 284-287

[5] Xu L, Yao ZA, Wu HG, et al. The immune regulation of κ -carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells[J]. Neurochemistry International, 2012, 61(5): 689-696

[6] Yuan HM, Song JM, Zhang WW, et al. Antioxidant activity and cytoprotective effect of κ -carrageenan oligosaccharides and their different derivatives[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16(5): 1329-1334

[7] Zhou GF, Li SF, Wang CH. Immunomodulating effects of sulfated κ -carrageenan[J]. Marine Sciences, 2010, 34(8): 56-59 (in Chinese)
周革非, 李树福, 王长海. κ -卡拉胶硫酸多糖的免疫调节活性初步研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 56-59

[8] Ma YX, Dong SL, Mou HJ, et al. Preparation and *in vitro* antiviral activity of kappa-carrageenan oligosaccharides[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2009, 48(6): 105-108 (in Chinese)
马悦欣, 董双林, 牟海津, 等. κ -卡拉胶寡糖的酶解制备及其体外抗病毒活性[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(6): 105-108

[9] Wang CY, Gu QQ, Zhou P, et al. Molecular modification of carrageenan, a polysaccharide from red seaweed *Kappaphycus striatum* I. Acidic degradation[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2003, 22(2): 24-27 (in Chinese)
王长云, 顾谦群, 周鹏, 等. 红藻多糖卡拉胶分子修饰研究 I. 酸降解[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(2): 24-27

[10] Zhu NN, Yao ZA, Wu HG, et al. Research progress on carrageenan oligosaccharides[J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(10): 9-12 (in Chinese)
朱楠楠, 姚子昂, 吴海歌, 等. 卡拉胶寡糖的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(10): 9-12

[11] Ghanbarzadeh M, Golmoradizadeh A, Homaei A. Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes[J]. Phytochemistry Reviews, 2018, 17(3): 535-571

[12] Jain A, Krishnan KP. A glimpse of the diversity of complex polysaccharide-degrading culturable bacteria from Kongsfjorden, Arctic Ocean[J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(2): 203-214

[13] Li J, Sha YJ. Expression and enzymatic characterization of a cold-adapted β -agarase from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ21[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(2): 319-327

[14] Jung S, Jeong BC, Hong SK, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel acidic GH16 β -Agarase, AgaJ11, from *Gayadomonas joobiniege* G7[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 181(3): 961-971

[15] Wulff A, Iken K, Quartino ML, et al. Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and Antarctic[J]. Botanica Marina, 2009, 52(6): 491-507

[16] Ramírez EM. Flora marina bentónica de la región austral de sudamérica y la antártica[J]. Anales del Instituto de la Patagonia,

- 2010, 38(1): 57-71
- [17] Sha YJ, Yang PP, He PQ, 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 (in Chinese)
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
- [18] Xie MS. Research of thermostable κ -carrageenase produced by *Bacillus* sp. car19 from Indonesia hot spring[D]. Qingdao: Master's Thesis of The First Institute of Oceanography, SOA, 2017 (in Chinese)
谢买胜. 印尼热泉菌 *Bacillus* sp. Car19 产热稳定 κ -卡拉胶酶的研究[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所硕士学位论文, 2017
- [19] Cao DM, Hu YH. Fermentation optimization for the production of β -cyclodextrin glucosyltransferase by thermophilic strain HY15 using response surface methodology[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2012, 40(1): 97-100 (in Chinese)
曹冬梅, 胡耀辉. 基于响应面法优化 HY15 发酵生产 β -环糊精葡萄糖基转移酶的发酵条件[J]. *东北林业大学学报*, 2012, 40(1): 97-100
- [20] Zhang D, Min WH, Liu JS, et al. Response surface optimization of fermentation conditions for protease production by *Pichia kudriavzevii* yeast[J]. *Food Science*, 2011, 32(13): 248-253 (in Chinese)
张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件[J]. *食品科学*, 2011, 32(13): 248-253
- [21] Tian L, Liu ZM, Duan FY, et al. Optimization of fermentation conditions of κ -carrageenase by recombinant strain BL21-HTa-cgkZ[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(10): 1945-1951 (in Chinese)
田琳, 刘哲民, 段芳媛, 等. 重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产 κ -卡拉胶酶的发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(10): 1945-1951
- [22] Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, et al. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(4): 449-460
- [23] Du P, Zhu LJ, Chen SX. Fermentation medium optimization for γ -PGA production of *Bacillus subtilis* HD-F9 by response surface methodology[J]. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2010, 40(5): 498-503 (in Chinese)
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[J]. *河南大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(5): 498-503
- [24] Peng XZ, Ji HW, Liu HM, et al. Optimization of liquid fermentation conditions on *Pseudomonas stutzeri* producing carrageenase[J]. *Food Research and Development*, 2007, 28(10): 7-11 (in Chinese)
彭小珍, 吉宏武, 刘唤明, 等. 施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 产卡拉胶酶液体发酵条件优化[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(10): 7-11
- [25] Liu P, Zhang Z, Zhang CZ, et al. Optimization of fermentation conditions for carrageenase production by *Flavobacterium* sp. YK-5 using response surface methodology[J]. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2012, 25(3): 194-198 (in Chinese)
刘苹, 张珠, 张聪芝, 等. 响应面法优化黄杆菌 YK-5 产卡拉胶酶的发酵条件[J]. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2012, 25(3): 194-198
- [26] Zhang L, Su PA, Yang XM, et al. Recombinant expression and fermentation optimization of the catalytic module of κ -carrageenase CgkX[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(6): 1008-1011, 1127 (in Chinese)
张兰, 苏平安, 杨雪梅, 等. κ -卡拉胶酶 CgkX 催化区的重组表达菌株筛选和发酵优化[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(6): 1008-1011, 1127