

# 响应面法优化海洋细菌 NTa 产琼胶酶的发酵条件

陈艳红<sup>1,2,3,4</sup>, 王海琪<sup>1</sup>, 马芮萍<sup>1,2,3,4</sup>, 姜泽东<sup>1,2,3,4</sup>, 倪辉<sup>1,2,3,4</sup>, 朱艳冰<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 利用 Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和响应面法, 对培养基组成、培养条件对 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶的影响进行分析并优化, 研究该菌株发酵产酶的动态规律, 并利用薄层色谱和 MALDI-TOF MS 进行酶解产物的鉴定。结果显示, 在琼脂、酵母浸膏、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、培养基的初始 pH 值、装液量、接种量几个因素中, 酵母浸膏和培养液初始 pH 值对菌株 NTa 产琼胶酶具有显著影响, 在含有 1.03% 酵母浸膏、初始 pH = 8.0 的基础发酵培养基 (NaCl、KNO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CaCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、琼脂的质量浓度分别为 50, 5.0, 5.0, 0.2, 0.1, 0.02, 2.0 g/L) 中可获得最高的琼脂酶活力。菌株在 28 ℃、180 r/min 条件下发酵时, 对数生长中后期快速合成琼胶酶。发酵 48 h, 琼胶酶活力高达 2.688 U/mL。酶解 72 h 的产物分析结果显示, 菌株 NTa 琼胶酶水解琼脂主要产生四糖。

**[关键词]** *Stenotrophomonas* sp.; 响应面法; 琼胶酶; 优化; 四糖

**[中图分类号]** TS 201.2

## Response Surface Optimization of Fermentation Conditions for Agarase Production by Marine Bacterium NTa

CHEN Yanhong<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Haiqi<sup>1</sup>, MA Ruiping<sup>1,2,3,4</sup>, JIANG Zedong<sup>1,2,3,4</sup>, NI Hui<sup>1,2,3,4</sup>, ZHU Yanbing<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;  
2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;  
3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China;  
4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Effects of medium composition and culture conditions on agarase production by *Stenotrophomonas* sp. NTa in liquid culture were investigated by Plackett-Burman design, steepest ascent method and response surface methodology. The dynamic law of enzyme production by this strain was studied, and the enzyme hydrolytic products were analyzed by thin-layer chromatography and MALDI-TOF MS. Among the tested seven factors, including agar, yeast extract, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, initial culture pH, liquid medium volume, and inoculum size, yeast extract and initial culture pH had significant effects on agarase production. The highest agarase production was obtained in the basic fermentation medium (NaCl 50.0 g/L, KNO<sub>3</sub> 5.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, agar 2.0 g/L) containing 1.03% yeast

**[收稿日期]** 2019-11-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (41976124)

**[作者简介]** 陈艳红 (1981—), 女, 实验师, 硕士, 从事食品安全方向研究。通信作者: 朱艳冰 (1976—), 女, 教授, 博士, 从事食品生物化学方向研究。E-mail: yanbingzhu@jmu.edu.cn

extract and with initial pH of 8.0. At the conditions of 25 °C and 180 r/min, agarase was rapidly synthesized in the middle and late log phase during the fermentation. After incubation for 48 h, the agarase activity reached 2.688 U/mL. Analysis of the enzyme hydrolytic products after 72 h reaction showed that the hydrolysis of agar by strain NTa agarase mainly produced tetraose.

**Keywords:** *Stenotrophomonas* sp.; response surface methodology; agarase; optimization; tetraose

## 0 引言

琼脂是红藻细胞壁的主要成分,主要由琼脂糖和硫酸琼脂组成<sup>[1]</sup>。琼脂糖是不含有硫酸酯盐的非离子型多糖,由 D-半乳糖(G)和 3,6-内醚- $\alpha$ -L-半乳糖(LA)以  $\alpha$ -1,3-糖苷键和  $\beta$ -1,4-糖苷键反复交替连接形成的线性大分子,是形成凝胶的组分<sup>[1-2]</sup>。硫酸琼脂和琼脂糖的二糖单位类似,其中一些羟基被硫酸基、甲氧基和丙酮酸残基等替代<sup>[1-2]</sup>,是非凝胶组分。

琼胶酶属于糖苷水解酶家族,它将琼脂降解为具有重复二糖单位的寡糖。根据酶解类型,琼胶酶分为  $\alpha$ -琼胶酶(EC 3.2.1.158)和  $\beta$ -琼胶酶(EC 3.2.1.81)。 $\alpha$ -琼胶酶作用于琼脂糖的  $\alpha$ -1,3-糖苷键,产物是以 3,6-内醚- $\alpha$ -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖(agar-oligosaccharide, AOs); $\beta$ -琼胶酶作用于琼脂糖的  $\beta$ -1,4-糖苷键,产物是以 D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖(neoagar-oligosaccharides, NAOs)<sup>[3]</sup>。琼胶水解产生的寡糖表现出多种生物学活性<sup>[4]</sup>,如益生元效应、增白效应、保湿效应和抗氧化作用等,在食品、医药和化妆品行业有广泛的潜在应用。琼胶酶除了用于制备寡糖外,也可以用于琼脂糖凝胶 DNA 的回收、海藻原生质体的制备、海藻中生物物质的提取等<sup>[3]</sup>。

琼胶酶主要从海洋微生物和海洋软体动物的消化道中获得,其中许多琼胶酶已经从细菌物种中被鉴定出来<sup>[5-10]</sup>。由于琼胶酶的生产率低,琼胶酶的商业用途受到限制,已经有一些研究进行产琼胶酶微生物的培养条件或培养基组成的优化<sup>[11-15]</sup>。

在先前的研究中,本课题组从厦门的海洋泥土样品中分离出琼胶酶的高产菌株 *Stenotrophomonas* sp. NTa<sup>[16]</sup>,并进行了该菌株发酵产琼胶酶条件的初步优化,利用单因素优化的方法确定了菌株 NTa 产琼胶酶的最佳碳源是琼脂、氮源是酵母浸膏,培养基中 NaCl 的最佳质量分数为 5%,产酶的最佳温度为 28 °C<sup>[17]</sup>。在此基础上,本研究拟应用一些统计设计包括 Plackett-Burman 试验(Plackett-Burman design, PBD)、最陡爬坡试验(steepest ascent method, SAM)和响应面分析法(response surface methodology, RSM),进一步建立 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产酶的优化方法,并鉴定菌株 NTa 琼脂酶的酶解产物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

种子培养基(g/L): NaCl 50.0, KNO<sub>3</sub> 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, 蛋白胨 5.0, 酵母浸膏 1.0, 琼脂 2.0。

基础发酵培养基(g/L): NaCl 50.0, KNO<sub>3</sub> 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0, CaCl<sub>2</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, 琼脂 2.0。通过 1 mol/L NaOH 将培养基的初始 pH 值调至 7.5。

新琼二糖(NA2)、新琼四糖(NA4)、新琼六糖(NA6)和新琼八糖(NA8)等新琼寡糖标准品,上海 ZZBIO 有限公司,其他试剂均为分析纯产品。

### 1.2 仪器与设备

WFJ 型可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;3 ku 超滤离心管,Millipore, USA; Labconco Free-Zone 6 plus 冷冻干燥机, ThermoFisher, USA; Waters Maldi Synspt Q-TOF 质谱仪, Waters Corp, USA。

### 1.3 方法

1.3.1 琼胶酶粗酶样品的制备 将产琼胶酶细菌 NTa 单菌落接种于 5 mL 种子培养基中, 28 °C、

180 r/min 培养 24 h。将 1 mL 上述培养物接种到 50 mL 种子培养基 (在 250 mL 锥形瓶) 中, 28 ℃、180 r/min 培养 12 h。将制备的接种物以质量比为 1:50 的比例转移到 50 mL 基础发酵培养基中 (在 250 mL 锥形瓶), 28 ℃、180 r/min 条件下培养 36 h。

1.3.2 琼胶酶粗酶样品的制备 发酵液于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为发酵粗酶液。

1.3.3 琼胶酶活力的测定 琼胶酶的活力测定参照文献 [16] 进行。在 40 ℃、pH = 7.0 条件下, 以每分钟释放 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

1.3.4 生物量的测定 取 1 mL 发酵液, 在 12 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 保留菌体沉淀, 加入去离子水至 3 mL, 充分混匀后, 测定其在 600 nm 处的吸光度值, 以去离子水为空白对照, 检测微生物的生物量。

1.3.5 总糖的测定 取稀释 10 倍的发酵液 1 mL 于试管中, 加入 2 mL 蒽酮试剂, 混匀, 沸水浴反应 10 min, 冷却至室温后, 放置 10 min, 在 620 nm 处测定吸光度值。

1.3.6 PBD 采用 PBD 试验选择影响琼胶酶活力的因素, 对琼脂质量分数 (A)、酵母浸膏质量分数 (B)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 质量分数 (C)、CaCl<sub>2</sub> 质量分数 (D)、培养基初始 pH 值 (E)、装液量 (F) 及接种量 (G) 7 个因素进行考察, 分别选择高水平和低水平, 因素水平设计如表 1 所示。测定样品的琼胶酶活力和生物量, 选择置信度高 (大于 95%) 的因素进行进一步考察。

表 1 琼胶酶发酵 PBD 设计因素及水平  
Tab. 1 Design factors and levels of PBD for agarase fermentation

水平 Levels	因素 Factors						
	$w(\text{琼脂})$ Agar / % (A)	$w(\text{酵母浸膏})$ Yeast extract / % (B)	$w(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ / % (C)	$w(\text{CaCl}_2)$ / % (D)	培养基初始 pH 值 Initial pH value of medium (E)	装液量 Liquid volume / mL (F)	接种量 Inoculation quantity / mL (G)
-1	0.05	0.1	0.5	0.02	5.0	30	1
1	0.20	0.5	1.0	0.06	8.0	60	5

1.3.7 SAM 为了接近琼脂酶产量的最高区域, 在 PBD 试验结果的基础上确定最陡上升的方向和合理的步长。

1.3.8 RSM 基于 PBD 和 SAM 的结果, 使用中心组合试验设计, 进一步评估对菌株产琼胶酶有显著影响的变量。变量分别在 5 个不同的层次进行研究。测定了试验设计中琼胶酶活力的实际值和预测值的响应。对获得的数据应用多元回归分析。系统的行为由式 (1) 来解释:

$$Y = b_0 + \sum (b_i x_i) + \sum (b_{ij} x_i x_j) + \sum (b_{ii} x_i^2), i = 1, 2, 3, \dots, J. \quad (1)$$

其中:  $Y$  是预测的响应值 (琼胶酶活力, U/mL);  $b_0$ ,  $b_i$  和  $b_{ij}$  是常系数;  $x_i$  和  $x_j$  是编码的自变量。使用 Design Expert 8.0.5.0 对模型进行统计分析以评估方差分析。

1.3.9 酶解产物的制备 将发酵粗酶液通过冷冻干燥机浓缩成粉末, 将酶粉末溶于 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.0) 中, 然后用 150 倍体积的相同缓冲液透析过夜 4 次。透析样品用作部分纯化的琼胶酶。将 5 mL 酶溶液 (1.2 U/mL) 加入 15 mL 含有 1.0% ( $m/V$ ) 琼脂的 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.0) 中, 40 ℃下 120 r/min 进行振荡反应。每隔一段时间取样, 利用 DNS 法<sup>[18]</sup>测定释放的还原糖的量。温育 72 h 后, 释放的还原糖量没有变化。在沸水中加热 10 min 停止反应。反应物在 4 ℃下 18 000g 离心 20 min, 上清液利用 3 ku 超滤离心管处理, 滤液即为酶解产物。

1.3.10 酶解产物的鉴定 将酶解产物加到硅胶 60 薄层色谱板上, 用  $V(\text{正丁醇}): V(\text{乙酸}): V(\text{水溶液}) = 2:2:1$  作为溶剂体系展开。利用含体积分数 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的乙醇溶液显影产物, 并在 110 ℃加热 10 min。利用质谱仪测定酶解产物的分子质量分布。

1.3.11 数据分析 所有实验是 3 次平行试验的平均值, 数值表示为平均值 ± 标准偏差。使用

Microsoft Excel 程序和 Design-Expert 8.0.5.0 统计软件分析结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 7 种因素对菌株产琼胶酶的影响

采用 PBD 考察 7 种因素对菌株产琼胶酶的影响,结果如表 2 所示。将这些结果拟合到式 (2):

$$Y = 0.35 - 0.067 A + 0.26 B - 0.12 C + 0.12 D + 0.28 E + 0.074 F + 0.037 G. \quad (2)$$

其中:  $Y$  是琼脂酶活力;  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $E$ 、 $F$ 、 $G$  分别代表琼脂含量、酵母浸膏含量、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  含量、 $\text{CaCl}_2$  含量、培养基初始 pH、装液量和接种量。各因素的方差分析如表 3 所示,可见,因素 B (酵母浸膏含量) 和因素 E (培养基初始 pH 值) 的  $P$  值分别为 0.019 9 和 0.014 6,均小于 0.05,说明这两个因素对 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶的活力影响显著。其他 5 个因素的  $P$  值均大于 0.05,说明对该菌株产琼胶酶的活力影响不显著。因此,酵母浸膏含量和培养基初始 pH 值的置信度均大于 95%。对这两个因素进行进一步考察,其他 5 个因素则维持在初始水平。

表 2 琼胶酶发酵 PBD 试验结果

Tab. 2 The results of PBD agarase fermentation

指标 Index	试验组 Experimental groups											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
琼胶酶活力 Agarase activity /(U · mL <sup>-1</sup> )	1.269 ± 0.022	0.073 ± 0.006	0.122 ± 0.012	0	0.837 ± 0.027	0	0.077 ± 0.007	0.109 ± 0.011	0.120 ± 0.013	0.244 ± 0.018	1.233 ± 0.031	0.126 ± 0.025
$A_{600}$	1.606 ± 0.020	0.378 ± 0.008	1.156 ± 0.019	0.391 ± 0.039	1.598 ± 0.041	0.774 ± 0.047	1.355 ± 0.051	1.095 ± 0.012	0.692 ± 0.078	0.383 ± 0.008	1.097 ± 0.059	0.836 ± 0.011

表 3 PBD 试验方差分析结果

Tab. 3 The results of variance analysis of PBD test

因素 Factors	平方和 Sum of squares	自由度 Free degree	均方 Mean square	$F$	$P$
A	0.054	1	0.054	0.940	0.387 4
B*	0.810	1	0.810	14.090	0.019 9*
C	0.170	1	0.170	2.890	0.164 4
D	0.170	1	0.170	2.950	0.161 2
E*	0.970	1	0.970	16.970	0.014 6*
F	0.066	1	0.066	1.150	0.344 8
G	0.017	1	0.017	0.290	0.617 9
残差 Residual error	0.230	4	0.057		
总和 Sum	2.480	11			

说明: \* 表示显著影响因素。

Note: \* indicated significant influencing factors.

### 2.2 适当区域的 SAM 确定

通过氮源酵母浸膏和培养基初始 pH 值两个因素同时变化的 SAM 进行最优条件搜索,试验设计组合及结果如表 4 所示。可见,第 2 组琼胶酶酶活力达到高峰,而第 4 组生物量达到峰值。*Stenotrophomonas* sp. NTa 的生长需要丰富的营养物质,而酵母浸膏中含有大量氨基酸及多肽,可保证菌株的生长需求,但过高浓度的氨基酸和多肽则会抑制微生物对酶的合成。由于本研究的目的主要是想提高菌株 NTa 所产琼胶酶的活力,所以选择第 2 组的条件作进一步的研究。

表 4 SAM 设计及结果  
Tab.4 Design and results of SAM

试验号 Experiment numbers	梯度 Gradient	$w$ (酵母浸膏 Yeast extract) /%	培养基初始 pH 值 Initial pH of medium	琼胶酶活力 Agarase activity /(U · mL <sup>-1</sup> )	生物量 Biomass (A <sub>600</sub> )
	△	0.46	0.5		
1	Origin	0.30	6.5	0.756 ± 0.067	1.361 ± 0.143
2	Origin + 1 △	0.76	7.0	1.790 ± 0.040	2.816 ± 0.202
3	Origin + 2 △	1.22	7.5	1.438 ± 0.045	2.925 ± 0.212
4	Origin + 3 △	1.68	8.0	1.309 ± 0.030	4.777 ± 0.221
5	Origin + 4 △	2.14	8.5	1.261 ± 0.014	4.379 ± 0.349
6	Origin + 5 △	2.60	9.0	0.817 ± 0.013	1.911 ± 0.113

### 2.3 重要因素的 RSM 优化

基于 PBD 和 SAM 结果,采用 RSM 对氮源酵母浸膏和培养基初始 pH 值重要因素的水平及其互作效应进行优化和分析,结果如表 5 所示。可见,在所有 13 次实验中,琼胶酶活力在 0.241 ~ 2.038 U/mL 之间变化。数据的统计分析结果见表 6。式 3 被用来解释变量与琼胶酶活力之间的关系:

$$Y = 1.79 + 0.58 X_1 + 0.28 X_2 + 0.069 X_1 X_2 - 0.56 X_1^2 - 0.15 X_2^2. \quad (3)$$

其中:  $Y$  表示琼胶酶活力;  $X_1$  和  $X_2$  分别是氮源酵母浸膏和培养基初始 pH 值。

表 5 中心组合试验设计及结果  
Tab.5 Design and results of central composite experiment

试验号 Experiment numbers	水平 Levels		琼胶酶活力 Agarase activity/(U · mL <sup>-1</sup> )		生物量 Biomass (A <sub>600</sub> )
	酵母浸膏 Yeast extract $X_1$	培养基初始 pH 值 Initial pH value of medium $X_2$	真实值 Real value	预测值 Predicated value	
1	0	0	0.241 ± 0.010	0.29	2.378 ± 0.032
2	1.414	0	1.502 ± 0.058	1.31	1.821 ± 0.055
3	-1.414	0	0.499 ± 0.047	0.72	0.908 ± 0.017
4	0	0	2.038 ± 0.037	2.01	2.331 ± 0.051
5	0	1.414	0.049 ± 0.010	-0.14	1.857 ± 0.055
6	-1	1	1.323 ± 0.008	1.49	1.475 ± 0.011
7	1	1	0.986 ± 0.057	1.09	2.310 ± 0.127
8	0	-1.414	2.033 ± 0.038	1.90	1.731 ± 0.017
9	0	0	1.877 ± 0.011	1.79	2.270 ± 0.042
10	0	0	1.666 ± 0.041	1.79	2.184 ± 0.131
11	1	-1	1.617 ± 0.035	1.79	1.957 ± 0.110
12	-1	-1	1.820 ± 0.040	1.79	1.297 ± 0.013
13	0	0	1.965 ± 0.060	1.79	2.369 ± 0.158

说明:  $X_1$  和  $X_2$  在 5 个不同的水平进行测定 (-1.414 (最低水平); -1 (低水平); 0 (中等水平); 1 (高水平); 1.414 (最高水平))。

Note:  $X_1$  and  $X_2$  were measured at five different levels (-1.414 (the lowest level); -1 (low level); 0 (medium level); 1 (high level); 1.414 (the highest level)).

方差分析结果如表 6 所示,可见,模型  $P = 0.000\ 2 < 0.001$ ,说明模型极显著。失拟项  $P = 0.1634 > 0.05$ ,失拟项不显著,该模型具有统计学意义。根据决定系数  $R^2$  的值可知,95.35% 的酶活力变化可由此方程来解释,模型拟合程度良好,可以通过回归方程准确描述各因素与响应值之间的关系。根据校正决定系数  $R_{adj}$  的值可知,仅有总变异的 8% 不能由该模型来解释。

表6 中心组合试验方差分析结果  
Tab.6 Variance analysis results of central composite test

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Free degree	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
模型 Model	5.520	5	1.100	28.69	0.000 2
<i>X</i> <sub>1</sub>	2.650	1	2.650	68.77	0.000 1
<i>X</i> <sub>2</sub>	0.650	1	0.650	16.80	0.004 6
<i>X</i> <sub>1</sub> <i>X</i> <sub>2</sub>	0.019	1	0.019	0.50	0.501 6
<i>X</i> <sub>12</sub>	2.170	1	2.170	56.36	0.000 1
<i>X</i> <sub>22</sub>	0.150	1	0.150	3.89	0.089 2
残差 Residual error	0.270	7	0.038		
失拟项 Mismatch term	0.190	3	0.062	2.92	0.163 4
纯误差 Pure error	0.084	4	0.021		
总和 Sum	5.790	12			

由图1可以看出,软件拟合响应面各试验点的预测值和真实值的线性关系基本在同一条直线上,表明该模型对试验结果进行拟合的程度良好。因此,该模型可用于 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶,通过此模型可以代替真实的试验点对琼胶酶发酵条件优化进行分析和预测。

各个变量及对响应值的影响可以通过回归方程软件绘制三维响应面及其对应的等高线图来解释。各因素之间的交互强弱可以通过等高线的形状反映,两因素交互作用显著显示椭圆形,反之则显示圆形。由图2可见,氮源酵母浸膏含量与培养基初始pH值二者的交互作用对琼胶酶活力的影响并不明显,在二者选取一个适中值时,琼胶酶活力将会到最高值,而超出或低于适中值时,酶活力降低。利用软件对回归方程进行规范形分析并结合图2可知,回归模型存在稳定点,响应面预测最大点为稳定点。分析得出,对 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶具有重要影响的因子的最佳水平为:酵母浸膏质量分数为1.03%,培养基初始pH=8.0。在模型分析得到的最适产酶条件下,模型预测到的发酵产琼胶酶的活

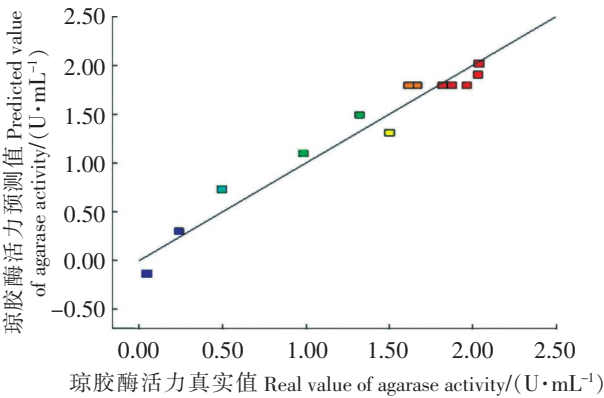


图1 响应面各试验点预测值与真实值之间的线性关系图

Fig.1 Linear relationship between predicted value and real value of each test point on response surface

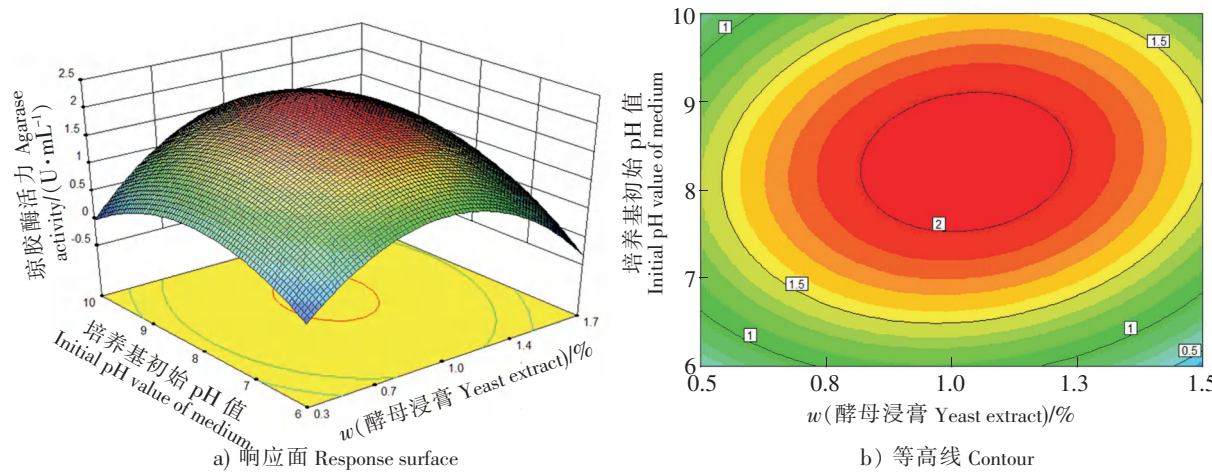


图2 酵母浸膏含量与培养基初始pH值对琼胶酶活力影响的响应面及等高线图

Fig.2 Response surface and contour of the effects of yeast extract content and initial pH value on agarase activity

力为  $2.113 \text{ U/mL}$ 。

## 2.4 验证试验

为了确定结果的准确性,在上述条件的基础上做了 5 次重复实验进行验证,在实际发酵中,得到琼胶酶活力为  $(2.628 \pm 0.047) \text{ U/mL}$ ,接近模型预测值,说明该回归方程可以准确地反映菌株 NTa 发酵产琼胶酶中受到各个因素的影响程度。

## 2.5 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶的动态规律

对液态发酵琼胶酶的动态规律进行分析,结果如图 3 所示。 $0 \sim 8 \text{ h}$ ,菌株的生长和生物量的增长都比较缓慢,产酶能力微弱,这段时期为细胞生长延滞期; $8 \text{ h}$ 后,琼脂为菌体提供充足的养分,菌株快速生长,菌株细胞进入对数生长期; $8 \sim 16 \text{ h}$ ,菌体生长速度迅速,但产酶能力依然微弱; $16 \sim 32 \text{ h}$ ,菌体的生长速度减慢,但菌株的生物量继续增大,琼胶酶活力迅速升高,酶活力  $32 \text{ h}$  时达到  $2.479 \text{ U/mL}$ ; $32 \sim 48 \text{ h}$ ,菌株的生长和产酶能力逐渐趋于稳定,琼胶酶活力在  $48 \text{ h}$  时达到最高为  $2.688 \text{ U/mL}$ ; $56 \text{ h}$ 后,菌株的生物量开始下降。培养基总糖含量在不同时间段有所变化,在  $0 \sim 8 \text{ h}$  内基本无变化, $8 \sim 16 \text{ h}$  内缓慢减少, $16 \sim 32 \text{ h}$  内迅速减少, $32 \text{ h}$  后趋于稳定。可以通过发酵曲线得出,菌株 NTa 发酵产琼胶酶的酶活力增加主要在菌体的对数生长中后期 ( $16 \sim 32 \text{ h}$ )。

## 2.6 酶解产物的鉴定

采用 TLC 对酶解产物进行分析,结果如图 4a 所示,在反应  $10 \text{ min}$  时可以检测到少量的八糖、六糖和四糖,随着反应时间的增加,八糖逐渐减少,六糖和四糖逐渐增加。 $30 \text{ min}$  时,八糖消失,六糖和四糖明显增多。 $48 \text{ h}$  后产物主要为四糖, $72 \text{ h}$  后产物不再发生变化。

使用质谱仪对  $72 \text{ h}$  的酶解产物进一步分析,结果见图 4b,每个质谱峰被认为是质子化形式的  $(M-H)^-$  或  $(M+Cl)^-$ 。 $m/z$  为  $161.1$  ( $M-H$ ) $^-$  时对应的产物是 3,6-脱水- $\alpha$ -L-半乳糖, $m/z$  为  $323.1$  ( $M-H$ ) $^-$  对应的是二糖, $m/z$  为  $629.2$  ( $M-H$ ) $^-$  和  $665.2$  ( $M+Cl$ ) $^-$  对应的是四糖。所以,质谱结果显示,菌株 NTa 琼胶酶水解琼脂的产物包括 3,6-脱水- $\alpha$ -L-半乳糖、二糖和四糖。

## 3 结论

本研究使用统计设计的方法确定 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶的最佳条件。优化后琼胶酶的活力在发酵  $48 \text{ h}$  后高达  $2.688 \text{ U/mL}$ 。在发酵过程中,菌株 NTa 的琼胶酶在对数期迅速合成。通过 TLC 和 MALDI-TOF MS 分析显示,菌株 NTa 琼胶酶水解琼脂主要产生四糖。

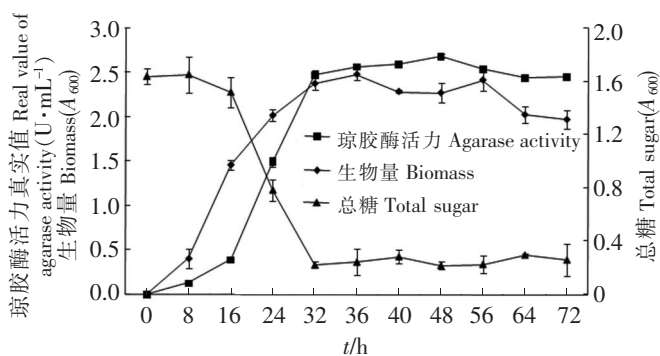
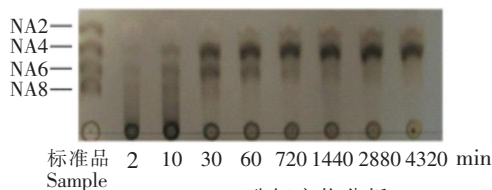
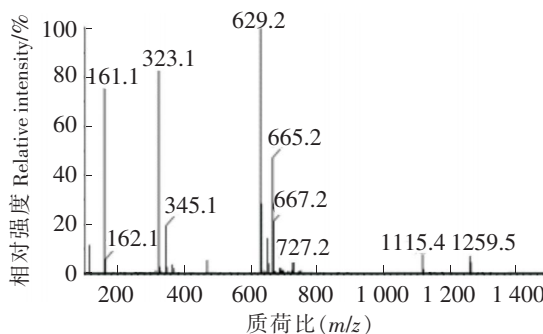


图 3 *Stenotrophomonas* sp. NTa 发酵产琼胶酶的动态规律

Fig.3 Dynamic law of agarase production by *Stenotrophomonas* sp. NTa



a) TLC 酶解产物分析  
Analysis of enzyme hydrolytic products by TLC



b) MALDI-TOF MS 鉴定 72 h 的酶解产物

The hydrolysates identified for 72 h by MALDI-TOF MS

图 4 *Stenotrophomonas* sp. NTa 琼胶酶酶解产物分析

Fig. 4 Analysis of agarase hydrolysates of *Stenotrophomonas* sp. NTa



## [ 参考文献 ]

- [1] DUCKWORTH M, YAPHE W. The structure of agar: part I fractionation of a complex mixture of polysaccharides [J]. Carbohydrate Research, 1971, 16(1): 189-197. DOI:10.1016/S0008-6215(00)86113-3.
- [2] HAMER G K, BHATTACHARJEE S S, YAPHE W. Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by  $^{13}\text{C}$ -n. m. r. spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 1977, 54(1): 7-10. DOI:10.1016/S0008-6215(00)80567-4.
- [3] FU X T, KIM S M. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications [J]. Marine Drugs, 2010, 8(1): 200-218. DOI:10.3390/md8010200.
- [4] YUN E J, YU S, KIM K H. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 101(14): 5581-5589. DOI:10.1007/s00253-017-8383-5.
- [5] LI R K, CHEN Z, YING X J, et al. A novel GH16 beta-agarase isolated from a marine bacterium, *Microbulbifer* sp. BN3 and its characterization and high-level expression in *Pichia pastoris* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 1164-1170. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.053.
- [6] ZHANG W B, XU J N, LIU D, et al. Characterization of an  $\alpha$ -agarase from *Thalassomonas* sp. LD5 and its hydrolysate [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 102(5): 2203-2212. DOI:10.1007/s00253-018-8762-6.
- [7] LEEMA R T, SACHINDRA N M. Purification and characterization of agarase from marine bacteria *Acinetobacter* sp. PS12B and its use for preparing bioactive hydrolysate from agarophyte red seaweed *Gracilaria verrucosa* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 186(1): 66-84. DOI:10.1007/s12010-018-2726-2.
- [8] ZHU Y B, ZHAO R, XIAO A F, et al. Characterization of an alkaline  $\beta$ -agarase from *Stenotrophomonas* sp. NTa and the enzymatic hydrolysates [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86: 525-534. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.106.
- [9] ZHANG W B, XU J N, LIU D, et al. Characterization of an  $\alpha$ -agarase from *Thalassomonas* sp. LD5 and its hydrolysate [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(5): 2203-2212. DOI:10.1007/s00253-018-8762-6.
- [10] CHOI U, JUNG S, HONG S K, et al. Characterization of a novel neoagarobiose-producing GH42  $\beta$ -agarase, AgaJ10, from *Gayadomonas joobiniege* G7 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(1): 1-12. DOI:10.1007/s12010-019-02992-5.
- [11] PARK J, HONG S K, CHANG Y K. Production of DagA, a  $\beta$ -agarase, by *Streptomyces lividans* in glucose medium or mixed-sugar medium simulating microalgae hydrolysate [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(12): 1622-1628. DOI:10.4014/jmb.1405.05019.
- [12] 刘兴凯, 朱丹, 史晓娟, 等. 产琼胶酶细菌 *Acinetobacter* sp. L XK 的发酵条件优化 [J]. 青岛农业大学学报, 2018, 35(1): 57-65.
- [13] 张建美, 韩尧跃, 王国增, 等. 海洋弧菌 Ag-1 产琼胶酶条件研究 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(3): 90-95.
- [14] 刘振华, 周晨妍, 王燕, 等. 一株产琼胶酶细菌的鉴定和发酵条件优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(4): 892-900.
- [15] 许彩云, 姚德恒, 朱艳冰, 等. 产琼胶酶菌株海洋弧菌 NTi 罐上工艺优化及中试放大 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(11): 96-104.
- [16] 马芮萍, 朱艳冰, 倪辉, 等. 一株产琼胶酶细菌的分离、鉴定及其琼胶酶基本性质 [J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 543-551.
- [17] 马芮萍, 朱艳冰, 倪辉, 等. 海洋细菌 NTa 发酵产琼胶酶条件的初步优化 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2014, 19(4): 259-265.
- [18] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426-428. DOI:10.1021/ac60147a030.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)