

网络出版时间:2014-09-10 18:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.058

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.058.html>

琼胶酶产生菌 *Stenotrophomonas* sp. Z705 的发酵条件优化

缪伏荣,董志岩,刘 景

(福建省农业科学院 畜牧兽医研究所,福建 福州 350013)

【摘 要】 【目的】研究从腐烂紫菜中分离的 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶的最佳发酵条件和培养基组成。【方法】采用单因素试验,分析装液量、摇床转速、发酵时间、初始 pH、发酵温度、盐度等因素对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶活力的影响,从中筛选出该菌株的最佳发酵条件。在此基础上,采用单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验,分析不同氮源和碳源对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶活力的影响,从中筛选出该菌株最佳培养基的组成。【结果】*Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的最佳条件为:装液量 25 mL、摇床转速 200 r/min、发酵时间 23 h、初始 pH 7.2、发酵温度 28℃、盐度 3.4%;最佳培养基组成为:牛肉膏 5.0 g/L、酵母浸膏 1.50 g/L、琼胶 0.30 g/L。【结论】在最佳组成培养基和发酵条件下,该菌株产琼胶酶活力稳定在 87.1 U/mL 左右,比优化前提高了 60.4%。

【关键词】寡养单胞菌属;琼胶酶产生菌;正交试验;酶活力

【中图分类号】Q939.96

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2014)10-0152-07

Fermentation optimization of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705

MIAO Fu-rong, DONG Zhi-yan, LIU Jing

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the optimal culture medium and fermentation conditions for agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 extracted from rotting laver. 【Method】 Using single factor test, effects of liquid volume, shaking speed, fermentation time, initial pH, fermentation temperature and salinity on fermentation enzyme activity of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains were analyzed and the optimal fermentation conditions were obtained. Using single factor test and $L_9(3^3)$ orthogonal test, effects of different nitrogen sources and carbon sources on fermentation enzyme activity of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains were also analyzed to screen the optimal composition of culture medium. 【Result】 The best conditions were: liquid volume of 25 mL, shaking speed of 200 r/min, fermentation time of 23 h, initial pH of 7.2, fermentation temperature of 28℃, and salinity of 3.4%. The optimal culture medium composition was: beef extract 5.0 g/L, yeast extract 1.50 g/L and agar 0.30 g/L. 【Conclusion】 With the optimum culture medium and fermentation conditions, the fermentation enzymatic activity of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains was 87.1 U/mL, 60.4% higher than before optimization.

【收稿日期】 2013-06-19

【基金项目】 福建省重大科技专项“动物营养免疫调控技术集成及功能性饲料开发”(2010NZ0002)

【作者简介】 缪伏荣(1969—),男,福建霞浦人,副研究员,硕士,主要从事饲料资源研究。E-mail: miaofr@sina.com

【通信作者】 刘 景(1967—),男,福建长乐人,副研究员,主要从事饲料资源研究。E-mail: fjliuj@163.com

Key words: *Stenotrophomonas* sp. ; agarase-produced bacterium; orthogonal test; enzyme activity

琼胶(琼脂)是存在于红藻细胞壁中的一类多糖,是自然界中存在的重要碳源之一,是我国产量最大的海洋三大多糖(褐藻胶、琼胶、卡拉胶)之一,广泛应用于食品、医药、生物技术等领域^[1]。琼胶由中性的琼胶糖(agarose)和离子性的硫酸琼胶(agaropectin)组成,其中琼胶糖是由 1,3 连接的 β -D-半乳糖和 1,4 连接的 3,6-内醚- α -L-半乳糖残基反复交替连接的链状中性多糖^[2]。琼胶黏度高、溶解度低,影响了其在各领域中的应用;但琼胶降解后可产生一定分子质量和聚合度的琼胶寡糖,这些寡糖具有良好的抗癌^[3]、抗氧化^[4]、抗病毒^[5]、增强免疫^[6]等药理作用和生物活性。但由于未能找到有效降解琼胶的途径^[7],因此长期以来琼胶未能得到很好的开发利用。利用琼胶酶降解琼胶生产琼胶寡糖,被认为是当今最理想的绿色环保生产技术。但由于琼胶酶来源少、活性低、价格昂贵,难以满足琼胶寡糖生产的需要,因此,筛选高产琼胶酶的菌株及研究其发酵产酶具有重要的实际意义。

目前,已见报道的产琼胶酶菌属有 *Pseudomonas*^[8]、*Pseudoalteromonas*^[9]、*Streptomyces*^[10]、*Alteromonas*^[11]、*Vibrio*^[12] 和 *Cytophaga*^[13] 等。本试验从腐烂的紫菜中分离到 1 株高产琼胶酶的菌株,并将其初步鉴定为寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* sp. Z705^[14],目前国内外尚未见该菌属产琼胶酶的相关报道。本研究通过单因素试验和正交试验,对该菌株的发酵产酶条件和培养基组成进行优化,旨在为琼胶酶的深入研究以及琼胶低聚糖的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* sp. Z705,由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物营养室提供。

1.1.2 培养基及试剂 纯化培养基:牛肉膏 5 g,酵母浸膏 1.5 g,琼脂 15 g,陈海水 1 000 mL,pH 7.2;121 ℃灭菌 30 min。

种子和发酵培养基:牛肉膏 5 g,酵母浸膏 1.5 g,琼脂 3 g,陈海水 1 000 mL,pH 7.2。

主要试剂有 DNS 试剂^[15]、0.2 mol/L 磷酸缓冲液^[16]、琼脂粉、蛋白胨、酵母浸膏和牛肉膏等。

1.1.3 主要仪器 主要仪器有 DY-89 II 电动玻璃

匀浆机、LRH-250A 生化培养箱、SW-CJ-1FD 单人超净工作台、热电 multiscan fc 酶标仪、TDL-5000B 高速冷冻离心机、DY-III S 水质分析仪、FW-80 高速万能粉碎机、LDZS-30KBS 立式高压灭菌器、CRY-200 恒温摇床等。

1.2 菌株的培养

1.2.1 纯化培养 将 *Stenotrophomonas* sp. Z705 划菌斜面置于 28 ℃培养箱内培养 2 d,然后置于 4 ℃冰箱中保存。

1.2.2 种子培养 在 250 mL 三角瓶中装入 25 mL 种子培养基,121 ℃灭菌 30 min 后,取培养好的斜面挑取 1 环于种子培养基中,28 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.3 发酵培养 在 250 mL 三角瓶中装入 25 mL 发酵培养基,121 ℃灭菌 30 min 后,按体积分数 0.1% 的接种量接入种子液,28 ℃、200 r/min 摇床培养 23 h。

1.3 琼胶酶活力的测定

发酵培养 11 h 开始每 2 h 对发酵液取样 1 次。发酵液经 4 000 r/min 离心 5 min,其上清液即为粗酶液。根据 Imoto 等^[17]的方法,通过 DNS-还原糖法测定发酵液的酶活,用 D-半乳糖绘制标准曲线^[18]。取粗酶液 1 mL 加入磷酸缓冲液 1 mL,再加入 0.3 g/L 的琼胶底物溶液 1 mL,50 ℃水浴酶解 30 min 后再于沸水浴中灭活 5 min,立即用冰水冷却至室温,然后加入 1.5 mL 的 DNS 试剂;在沸水浴中保温显色 5 min 后,于室温下定容至 10 mL,20 ℃、2 000 r/min 离心 5 min 得上清液,用酶标仪测其在 520 nm 波长处的吸光度;同时以灭活酶作对照。在上述反应条件下,以 1 mL 酶液 1 min 产生 1 μ g 还原糖作为 1 个酶活(U)。

1.4 菌株产琼胶酶发酵条件的优化

在发酵培养基基础上,按表 1 中的设计方案对发酵条件进行单因素试验,分析不同因素对菌株发酵产琼胶酶活力的影响,其他培养条件和培养基相同,每组设置 3 个重复。

1.5 菌株产琼胶酶发酵培养基的优化

1.5.1 单因素试验 首先,在获得菌株产琼胶酶发酵最佳条件的基础上,分析不同氮源(牛肉膏、酵母浸膏、蛋白胨、 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)和碳源(葡萄糖、D-半乳糖、琼胶、果糖、麦芽糖)对菌株发酵产琼胶酶活力的影响;在筛选到最佳氮源(牛肉膏、酵母

浸膏)以及最佳碳源(琼胶)的基础上进行单因素试验,培养基中氮源和碳源添加水平见表 1。

表 1 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶发酵条件和培养基组成优化的单因素试验

Table 1 Single factor test of fermentation conditions and medium composition of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

因素 Factors	添加水平 Level
装液量/mL Liquid loading quantity	10,15,20,25,30,35,40,45
摇床转速/(r·min ⁻¹) Shaking speed	100,120,140,160,180,200,220,240,260
发酵时间/h Fermentation time	11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35,37
初始 pH 值 The initial pH	6.4,6.6,6.8,7.0,7.2,7.4,7.6,7.8,8.0
培养温度/℃ Incubation temperature	20,22,24,26,28,30,32,34,36
盐度/% Salinity	2.5,2.8,3.1,3.4,3.7,4.0,4.3,4.6
牛肉膏/(g·L ⁻¹) Beef paste	2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0
酵母浸膏/(g·L ⁻¹) Yeast extract	0.75,1.00,1.25,1.50,1.75,2.00,2.25,2.50
琼胶/(g·L ⁻¹) Agar	0.10,0.15,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40,0.45,0.50

注:盐度是指海水中溶解物质质量与海水质量的比值。世界大洋的平均盐度为 3.5%。

Note:Salinity refers to the ratio of dissolved substances in water to water. The averaged ocean salinity is 3.5%.

1.5.2 正交试验 在单因素试验基础上,选择最佳氮源(牛肉膏、酵母浸膏)以及最佳碳源(琼胶)等培养基组分,采用三因素三水平 L₉(3³)的正交试验(表 2)筛选最佳培养基组成。所有试验重复 3 次,分别平行取样。用 SPSS 13.0 进行数据分析。

表 2 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶发酵培养基组成优化的正交试验方案

Table 2 Factors and levels for orthogonal test of medium composition of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

水平 Level	牛肉膏/(g·L ⁻¹) Beef paste A	酵母浸膏/(g·L ⁻¹) Yeast extract B	琼胶/(g·L ⁻¹) Agar C
1	4.0	1.25	0.20
2	5.0	1.50	0.25
3	6.0	1.75	0.30

2 结果与分析

2.1 菌株产琼胶酶发酵条件的优化

2.1.1 装液量和摇床转速对菌株发酵产酶的影响 在微生物发酵过程中,溶氧量对好氧细菌的生长和产酶具有十分重要的作用。减少装液量和增加摇床转速均可以达到增加溶氧量的目的,使菌株快速地利用营养物质,从而有利菌株产酶。但溶氧量必须适度,过量供给会造成酶活力的下降。由图 1 可以看出,在转速为 200 r/min 时,随着装液量的增加,琼胶酶活力随之升高,至装液量为 25 mL 时,琼胶酶活力最高(37.8 U/mL);然后随着装液量的增加,琼胶酶活力逐渐降低。从图 2 可知,在装液量为 25 mL 时,随着摇床转速的提高,琼胶酶活力随之升高,当摇床转速为 200 r/min 时,琼胶酶活力达到最高(35.6 U/mL);之后随着摇床转速的提高,琼胶酶

活力逐渐降低。可知最佳装液量和摇床转速分别为 25 mL 和 200 r/min。

2.1.2 发酵时间对菌株发酵产酶的影响 由图 3 可见,在装液量 25 mL 和摇床转速 200 r/min 的条件下,培养 11 h 时琼胶酶活力为 5.6 U/mL;随着发酵时间的延长,琼胶酶活力逐渐提高,至 23 h 琼胶酶活力达到最高(45.2 U/mL);之后随着发酵时间增加,琼胶酶活力逐渐下降。表明最佳发酵时间为 23 h。

2.1.3 初始 pH 值对菌株发酵产酶的影响 海水的 pH 为 7.2~8.3,海洋细菌最适宜生长的 pH 值与此关系密切。培养物的 pH 不仅直接影响菌体对营养物的吸收及代谢产物的分泌,而且影响营养物的分解。从图 4 可以看出,在培养基的初始 pH 值为 6.4 时,琼胶酶活力为 0.6 U/mL,随着培养基初始 pH 值的升高,*Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力逐渐提高,当初始 pH 值为 7.2 时达到最高(46.3 U/mL);之后随着培养基初始 pH 值的升高,琼胶酶活力逐渐下降。表明最佳初始 pH 值为 7.2。

2.1.4 培养温度对菌株发酵产酶的影响 培养温度是影响微生物生长和代谢的最重要的环境因素之一。适当地提高培养温度有助于促进微生物的生长和酶促反应。从图 5 可以看出,在培养温度为 20 ℃ 时,琼胶酶活力为 17.53 U/mL,随着培养温度的升高,*Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力逐渐提高,当培养温度为 28 ℃ 时,琼胶酶活力最高(43.8 U/mL);之后随着培养温度升高,琼胶酶活力下降。可知最佳培养温度为 28 ℃。

2.1.5 盐度对菌株发酵产酶的影响 盐度与海洋细菌的生长密切相关,是区分海洋菌与淡水菌的重

要指标。本试验改变培养基的盐度,来研究该菌株产酶最适的盐度。从图 6 可以看出,随着发酵培养基盐度的升高,*Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力逐渐提高,至发酵盐度为 3.4%时达最

高(43.2 U/mL);之后随着发酵液盐度的升高,琼胶酶活力逐渐下降。表明此菌株是典型的海洋细菌,具有耐高渗透压的特性,发酵培养的最佳盐度为 3.4%。

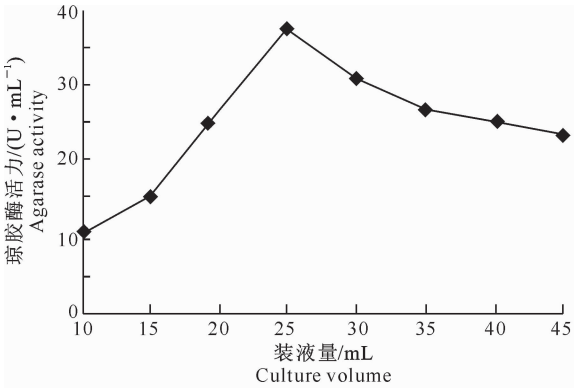


图 1 装液量对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 1 Effects of volume of medium on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

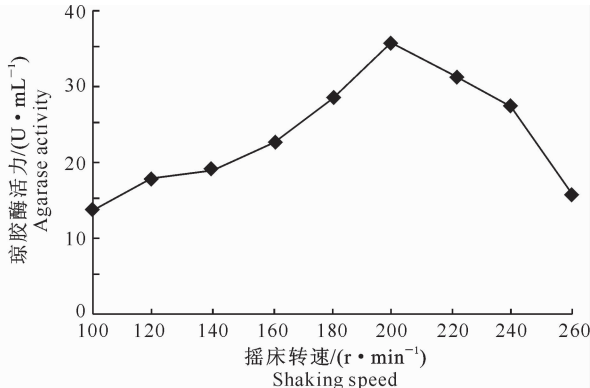


图 2 摇床转速对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 2 Effects of shaking speed on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

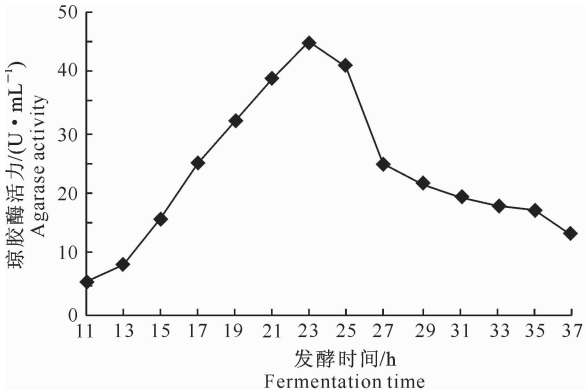


图 3 发酵时间对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶的影响

Fig. 3 Effects of fermentation time on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

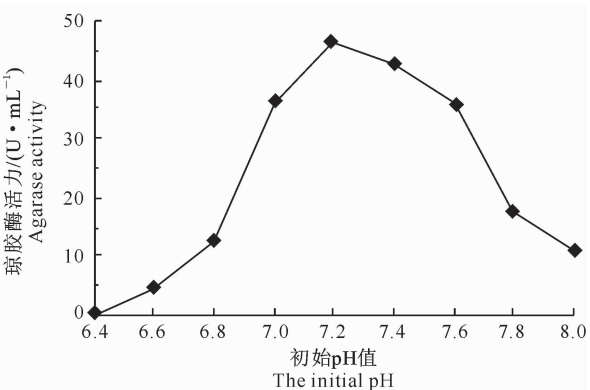


图 4 初始 pH 值对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

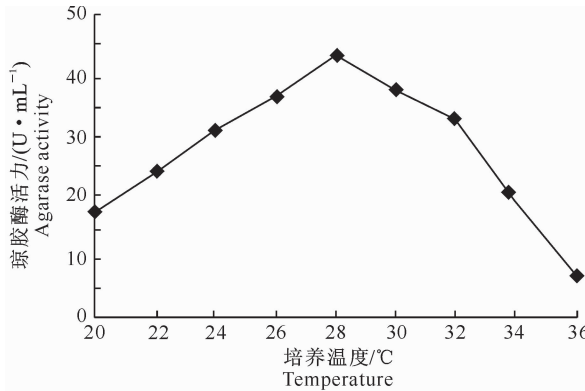


图 5 培养温度对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 5 Effects of culture temperature on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

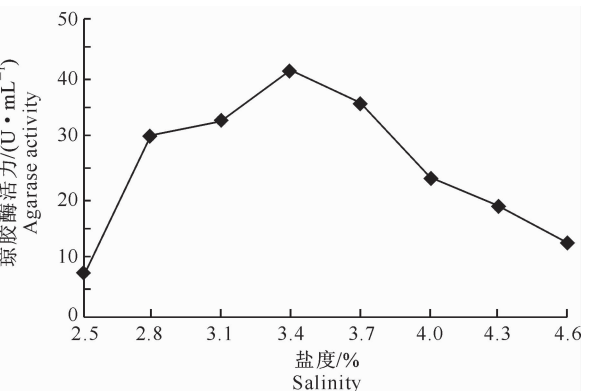


图 6 盐度对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 6 Effects of salinity on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

2.2 菌株产琼胶酶发酵培养基组成优化的单因素试验

2.2.1 氮源对菌株发酵产酶的影响 图 7 显示,以牛肉膏作为氮源时, *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力最大,其次为酵母浸膏。因此,分别选用牛肉膏和酵母浸膏作为氮源,研究其对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力的影响。从图 8 可以看出,随着牛肉膏添加量的增加,琼胶酶活力逐渐提高,至牛肉膏添加量为 5.0 g/L 时,琼胶酶活力最高(45.6 U/mL);之后随着牛肉膏添加量升高,琼胶酶活力下降。由图 9 可见,随着酵母浸膏添加量增加,琼胶酶活力逐渐提高,当酵母浸膏添加量为 1.50 g/L 时,琼胶酶活力最高(41.8 U/mL);之后随着酵母浸膏添加量的增加,琼胶酶

活力下降。

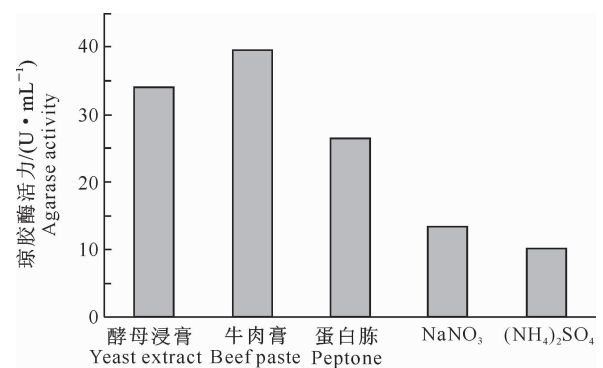


图 7 不同氮源对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 7 Effects of different nitrogen sources on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

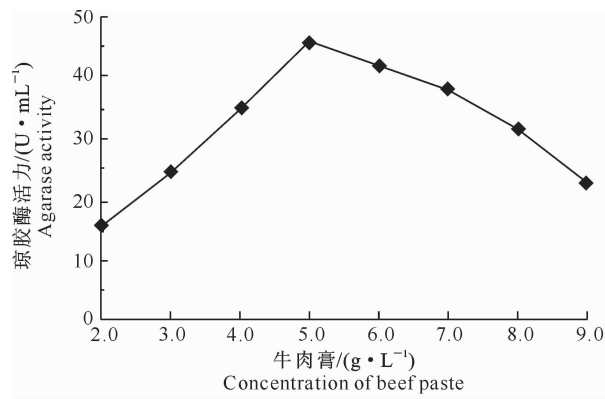


图 8 牛肉膏添加量对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 8 Effects of beef paste amount on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

2.2.2 碳源对菌株发酵产酶的影响 碳源是微生物生长和发酵过程中必需的营养物。它不仅可为微生物生长繁殖提供能量,还可为菌体合成目标产物

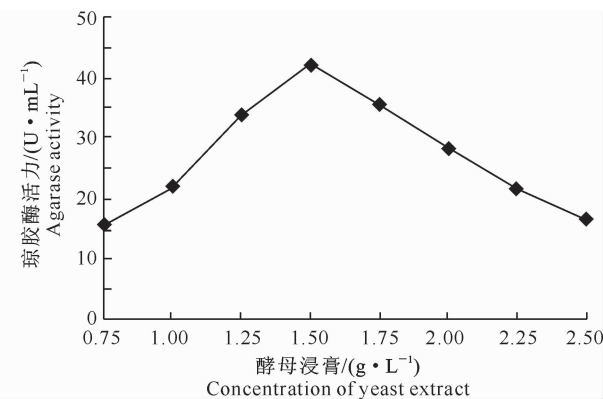


图 9 酵母浸膏添加量对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 9 Effects of yeast extract amount on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

提供所需的碳成分。本研究中,不同碳源对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响见图 10 和图 11。

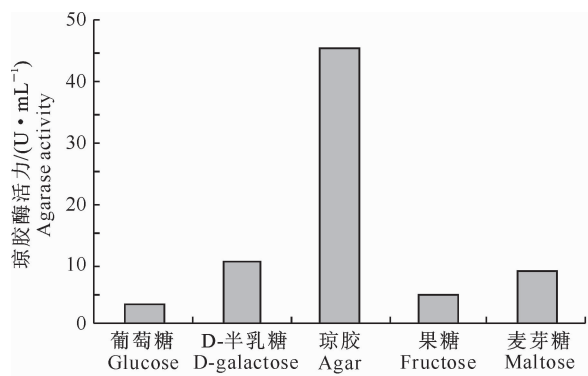


图 10 不同碳源对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 10 Effects of different carbon sources on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

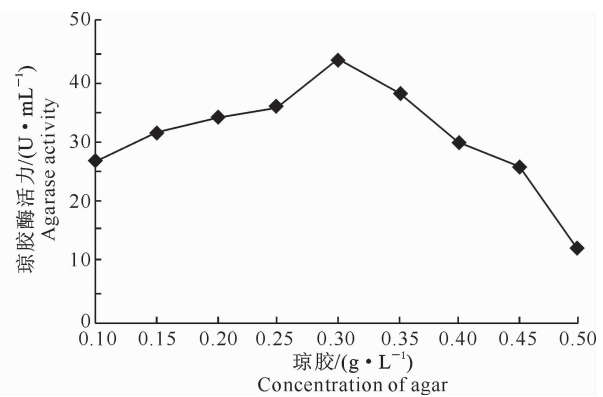


图 11 琼胶添加量对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵产琼胶酶的影响

Fig. 11 Effects of different agar concentrations on enzyme production of *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

图 10 显示,以琼胶作为惟一碳源时,发酵液培养 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶的活力最高。因此,选用琼胶作为碳源,研究其对 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力的影响。从图 11 可以看出,随着琼胶添加量的升高,琼胶酶活力逐渐提高,琼胶添加量为 0.30 g/L 时琼胶酶活力达到最高(43.5 U/mL);之后随着琼胶添加量的升高,琼胶酶活力逐渐降低。这可能是因为随着琼胶添加量的增加,培养基的流动性变差,发酵液通气量降低,从而影响了菌株的发酵产酶性能。

2.3 菌株产琼胶酶发酵培养基组成优化的正交试验

从单因素试验结果可以看出, *Stenotroph-*

omonas sp. Z705 菌株产琼胶酶的最佳发酵条件为:装液量 25 mL、摇床转速 200 r/min、发酵时间 23 h、初始 pH 7.2、发酵温度 28 ℃、盐度 3.4%;发酵培养基中的牛肉膏、酵母浸膏和琼胶对该菌株的产酶影响较大。从表 3 和表 4 可见,影响 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶活力的因素顺序为 A(牛肉膏)>B(酵母浸膏)>C(琼胶);同时各因素对该菌产酶水平均有显著的影响($P<0.05$),确定 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株发酵的最佳培养基组成为 $A_2B_2C_3$,即牛肉膏 5.0 g/L、酵母浸膏 1.50 g/L、琼胶 0.30 g/L。结合最佳发酵条件,经多次发酵试验,该菌株发酵产琼胶酶活力稳定在 87.1 U/mL 左右。

表 3 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶发酵培养基组成优化的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test of medium composition of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

试验序号 No.	牛肉膏/(g·L ⁻¹) Beef paste A	酵母浸膏/(g·L ⁻¹) Yeast extract B	琼胶/(g·L ⁻¹) Agar C	琼胶酶活力/ (U·mL ⁻¹) Agarase activity
1	4.0	1.25	0.20	43.6
2	4.0	1.50	0.25	48.7
3	4.0	1.75	0.30	46.9
4	5.0	1.25	0.25	52.6
5	5.0	1.50	0.30	87.1
6	5.0	1.75	0.20	61.7
7	6.0	1.25	0.30	59.7
8	6.0	1.50	0.20	57.5
9	6.0	1.75	0.25	61.2
K ₁	46.4	52.0	54.3	
K ₂	67.1	64.4	54.2	
K ₃	59.5	56.6	64.6	
R	20.7	12.4	10.4	

表 4 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株产琼胶酶发酵培养基优化的正交试验结果的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment on fermentation conditions of agarase producing bacteria *Stenotrophomonas* sp. Z705 strains

因素 Factors	偏差均和 S	自由度 df	F 值 F value	F 临界值 F critical	显著性 Significance
牛肉膏 Beef paste	659.387	2	1.779	5.14	显著 Significant
酵母浸膏 Yeast extract	238.247	2	0.643	5.14	显著 Significant
琼胶 Agar	214.260	2	0.578	5.14	显著 Significant
误差 Error	1 111.86	6			

3 讨论

微生物发酵产酶是一个复杂的生理生化过程,菌体不同的营养条件会直接影响菌体的代谢,从而影响酶的产量。要提高酶的产量,就必须对发酵产酶的条件进行优化^[19]。不同的琼胶酶产生菌的培养条件不相同,各种因素如培养基的组成、培养温度、初始 pH 值、培养时间等都对产酶有很大的影响。本研究以来源于腐烂紫菜且具有较高琼胶降解能力的野生菌株 *Stenotrophomonas* sp. Z705 为出发

菌株,以提高菌株的产酶活性为目的,对其产酶发酵条件和培养基组成进行了优化,确定 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株的最佳发酵条件为:装液量 25 mL、摇床转速 200 r/min、发酵时间 23 h、初始 pH 7.2、发酵温度 28 ℃、盐度 3.4%;最佳培养基组成为:牛肉膏 5.0 g/L、酵母浸膏 1.50 g/L、琼胶 0.30 g/L,在此条件下该菌株产酶效果最好,琼胶酶活力最高。经多次发酵试验,该菌株发酵产琼胶酶活力稳定在 87.1 U/mL 左右,与优化前(平均酶活力为 34.49 U/mL)相比提高了 60.4%。

与国内外已报道的琼胶酶产生菌相比,首先从酶活力方面而言,菌株 NBRC102603^[20] 为 56.89 U/mL,菌株 HF3-04^[21] 为 80.7 U/mL, *Bacillus* sp. MK03^[22] 为 14.1 U/mL, *Vibrio* sp. JT0107^[23] 为 66 U/mL, *Agarivorans albus* YKW-34^[24] 为 83 U/mL,均低于本研究中的 *Stenotrophomonas* sp. Z705 菌株;其次从琼胶酶活力达到最高时的发酵时间而言,MA-B22^[25] 需要 60 h, *Halomonas* sp. DT-3^[26] 需要 36 h,而本研究供试菌株仅需 23 h。目前我国尚未有工业化产琼胶酶的菌株,所需产品均来自国外,价格昂贵,而本研究供试菌株发酵培养基组分简单低价、培养条件简便,稳定性好,具有一定的生产潜力,可为琼胶酶的深入研究及琼胶低聚糖的开发应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] 王选良. 一株新的具有脱色能力的琼脂分解菌 [J]. 微生物学报, 1985, 25(4): 289-293.
Wang X L. A novel decolorizing ability of agar-decomposing microorganisms [J]. Journal of Microbiology, 1985, 25(4): 289-293. (in Chinese)
- [2] 王静雪, 江晓路, 胡晓珂. 细菌降解琼胶的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(3): 94-96.
Wang J X, Jiang X L, Hu X K. Research advance on agar degradation by bacteria [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(3): 94-96. (in Chinese)
- [3] Wang J X, Mou H J, Jiang X L. Biological activities of a neutral water-soluble agar polysaccharide prepared by agarase degradation [J]. High Tech Lett, 2005, 11(4): 415-420.
- [4] 徐 强, 薛长湖, 赵 雪, 等. 酸法制备琼胶低聚糖及其抗氧化性评价 [J]. 中国海洋药物, 2002, 21(1): 19-22.
Xu Q, Xue C H, Zhao X, et al. Preparation of agar oligosaccharides by acid hydrolysis and determination of their antioxidative effect [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2002, 21(1): 19-22. (in Chinese)
- [5] 毛文君, 林 洪, 管华诗. 琼胶寡糖的制备及其 C-NMR 研究 [J]. 水产学报, 2001, 25(6): 582-584.
Mao W J, Lin H, Guan H S. Preparation and C-NMR investigation of agarose oligosaccharides [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 582-584. (in Chinese)
- [6] 刘江涛, 蔡俊鹏, 吴 冰. 琼胶酶及其综合应用的研究概况 [J]. 现代食品技术, 2005, 21(1): 177-179.
Liu J T, Cai J P, Wu B. Progress of studies on agarase and its applications [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(1): 177-179. (in Chinese)
- [7] 陈海敏, 严小军, 郑 立, 等. 琼胶的降解及其产物的分析 [J]. 郑州工业学院学报, 2003, 24(3): 41-44.
Chen H M, Yan X J, Zheng L, et al. Preparation of agaros oligosaccharides [J]. Journal of Zhengzhou Institute of Technology, 2003, 24(3): 41-44. (in Chinese)
- [8] Groleau D, Yaphe W. Enzymatic hydrolysis of agar purification and characterization of beta neoagar hydrolase from *Pseudomonas atlantica* [J]. Can J Microbiol, 1977, 23(6): 672-679.
- [9] Vera J, Alvarez R, Murano E, et al. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* and characterization of its extracellular agarase [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(11): 4378-4383.
- [10] Buttner M J, Feamley I M, Bibb M. The agarase gene (dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Nucleotide sequence and transcriptional analysis [J]. Mol Gen Genet, 1987, 209(1): 101-109.
- [11] 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(2): 599-607.
- [12] Aoki T, Araki T, Kitam ikado M. Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2 [J]. Eur J Biochem, 1990, 187(2): 461-465.
- [13] Qhta Y, Nogi Y. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(5): 1973-2081.
- [14] 缪伏荣. 一株琼胶酶产生菌的筛选与鉴定 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(21): 88-91.
Miao F R. Screening and molecular identification of a new agarase-producing bacterium [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(21): 88-91. (in Chinese)
- [15] 张信旭, 高海波. 3,5-二硝基水杨酸测定古尼虫中多糖含量方法 [J]. 贵州化工, 2002, 27(3): 23-38.
Zhang X X, Gao H B. Determination of polyose in Chinese gu-ni caterpillar fungus by spectrophotometry [J]. Guizhou Chemical Industry, 2002, 27(3): 23-38. (in Chinese)
- [16] 林加涵, 魏文铃. 现代生物学实验: 上册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 243.
Lin J H, Wei W L. Modern biology experiments: First volume [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 243. (in Chinese)
- [17] Imoto T, Yegishita K. A simple activity measurement of lysozyme [J]. Agr Biol Chem, 1971, 35: 1154-1156.
- [18] Kohtaro K, Noriyoshi M, Yousuke L, et al. Purication and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(4): 436-441.
- [19] 付万冬. 高产琼胶酶菌株的筛选、发酵条件优化及琼胶酶酶学性质的研究 [D]. 山东青岛: 中国海洋大学, 2006.
Fu W D. Study on screening and selecting an effectively agarase-producing strain, its optimal cultivation and characteristics of agarase [D]. Qingdao, Shandong: Ocean University of China, 2006. (in Chinese)

teria Medica,2008,33(15):1802-1805. (in Chinese)

[14] 翟彩霞,温春秀,王凯辉,等. 氮、磷、钾肥对丹参根系生长及养分含量的影响 [J]. 华北农学报,2008,23(S1):220-223.

Zhai C X,Wen C X,Wang K H,et al. Effects of N,P and K fertilizer on roots growth and nutrition content of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23 (S1):220-223. (in Chinese)

[15] Damisch W. Biomass yield a topical issue in modern wheat breeding programmes [J]. Plant Breeding,1996,107:11-17.

[16] Watt M S,Clinton P W,Whitehead E,et al. Above-ground biomass accumulation and nitrogen fixation of broom (*Cytisus scoparius* L.) growing with juvenile *Pinus radiata* on a dryland site [J]. Forest Ecology and Management, 2003, 19 (5):93-103.

[17] 李冬梅,魏 氓,张海森,等. 氮、磷、钾用量和对比对温室黄瓜叶片相关代谢酶活性的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2006,12(3):352-387.

Li D M,Wei M,Zhang H S,et al. Effects of NPK rates and ratios on activities of metabolism enzymes in leaves of cucumber in greenhouse [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2006,12(3):352-387. (in Chinese)

[18] 鲁剑巍,陈 防,张竹青. 磷肥用量对油菜产量、养分吸收及经济效益的影响 [J]. 中国油料作物学报,2005,27(1):73-76.

Lu J W,Chen F,Zhang Z Q. Effect of phosphor application rate on rapeseed yield,nutrient absorption and profit [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2005,27(1):73-76. (in Chinese)

(上接第 158 页)

[20] 朱启加,朱慧文,孙艳娜,等. 海洋细菌 NBRC102603 产琼胶酶发酵条件优化 [J]. 中国酿造,2011,230(5):53-55.

Zhu Q J,Zhu H W,Sun Y N,et al. Optimization of fermentation conditions for agarase production by a marine bacterium NBRC102603 [J]. China Brewing, 2011, 230 (5): 53-55. (in Chinese)

[21] 马悦欣,安 军,刘双连,等. 仿刺参消化道内产琼胶酶菌株的选育及培养条件优化 [J]. 大连水产学院学报,2007,22(2):86-91.

Ma Y X,An J,Liu S L,et al. Breeding and its optimal culture of bacterial and agarase-producing strain from digestive tracts in sea cucumber *Apostichopus japonicu* [J]. Journal of Dalian Fisheries University,2007,22(2):86-91. (in Chinese)

[22] Hisashi S,Yoshinori S,Tohru S,et al. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2003,95 (4):328-334.

[23] Sugano Y,Terada I,Arita M,et al. Purification and characterization of a new agaarse from a marine bacterium,*Vibrio* sp. strain JT0107 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993,59(5):1549-1554.

[24] Fu X T,Lin H,Kin S M. Purification and characterization of a novel β -agarase agaA34 from *Agarivorans albus* YKW-34 [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2008,78:265-273.

[25] 卢 斌,柯才焕,杨 明,等. 一株高产琼胶酶菌株 MA-B22 的分子鉴定与产酶条件优化 [J]. 水产学报,2009,33(6):1037-1043.

Lu B,Ke C H,Yang M,et al. Isolation and identification of a bacterium MA-B22 producing agarase and the optimal cultivation of enzyme production [J]. Journal of Fisheries of China, 2009,33(6):1037-1043. (in Chinese)

[26] 王晓燕,桑卫国. SPSS 正交设计优化琼胶酶产生菌的发酵条件 [J]. 宁波大学学报,2010,23(2):11-16.

Wang X Y,Sang W G. Optimization of fermentation conditions of an agarase-producing bacterium by SPSS orthogonal design [J]. Journal of Ningbo University,2010,23(2):11-16. (in Chinese)