

文章编号:1001-5132 (2010) 02-0011-06

# SPSS 正交设计优化琼胶酶产生菌的发酵条件

王晓燕<sup>1</sup>, 桑卫国<sup>1,2\*</sup>

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 实验以从海洋环境中分离获得的一株琼胶酶产生菌 *Halomonas sp.* DT-3 为出发菌株, 研究其发酵产酶的最佳培养基组成和发酵条件. 以琼胶、蛋白胨、酵母膏、NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 为考察因素, 发酵液中琼胶酶活力为指标, 通过 SPSS 软件设计 L27(3<sup>7</sup>) 正交试验. 结果表明: 通过正交实验得出菌株发酵产酶最佳培养基组成为琼胶 0.5%、NaCl 3.5%、蛋白胨 0.3%、酵母膏 0.2%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>、MgSO<sub>4</sub> 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>、CaCl<sub>2</sub> 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 菌株发酵琼胶酶活力稳定在 191 U·mL<sup>-1</sup> 左右.

**关键词:** SPSS; 琼胶酶; 发酵; 优化

中图分类号: TS254

文献标识码: A

琼胶酶是一类能够降解琼胶多糖的酶的总称, 其降解产物为琼胶寡糖<sup>[1]</sup>. 产琼胶酶的细菌主要存在于海洋环境中. 在潮汐带, 已经证明每克淤泥中含有的琼胶降解菌可达  $1 \times 10^7$  个, 大约占有好气细菌的 2%~4%. 琼胶酶的应用广泛, 在医药领域, 制备所得的琼脂寡糖具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫等多种生理活性功能<sup>[2]</sup>; 在海水养殖领域, 可用于海藻单细胞的分离和海藻原生质体的制备, 是海藻遗传工程的工具酶; 琼胶寡糖还可用于饮料、面包及低热量食品的生产, 作为天然防腐剂和淀粉老化抑制剂<sup>[3]</sup>, 利用琼胶酶还可从琼脂糖凝胶中回收 DNA 和 RNA 等. 由于产琼胶酶的菌株大多数来源于海洋, 受海洋特殊生长环境的影响, 这些菌株产酶性状不稳定. 目前, 实现了工业化生产的只有大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*), 其产

品来自于 Sigma 公司, 价格昂贵<sup>[4]</sup>, 应用范围也仅限于科研工作中, 这大大阻碍了琼胶酶及琼胶低聚糖的开发应用. 影响菌株琼胶酶产量和活力的因素, 除菌种外, 培养基组成和发酵条件也十分重要. 因此, 选择适当的碳源、氮源及无机盐并对其组成进行合理的设计和配制, 使其既能满足产酶微生物生长的需要, 也能满足菌株产酶的需要. 同时优化培养条件, 如培养温度、培养基起始 pH、发酵时间等, 可进一步提高菌株产琼胶酶的能力. 实验运用 SPSS 11.5 软件设计 7 因素 3 水平正交试验, 选用琼胶、蛋白胨、酵母膏、NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub> 为考察因素, 以发酵液中琼胶酶活力为指标, 对琼胶酶产生菌株发酵培养基的组成和发酵条件进行优化, 为实现琼胶酶的工业化生产提供实验依据.

收稿日期: 2009-06-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室科研项目(KFT2006-2).

第一作者: 王晓燕(1982-), 女, 山东烟台人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术. E-mail: 99qixiawangxiaoyan@163.com

\*通讯作者: 桑卫国(1955-), 男, 浙江宁波人, 硕士/副教授, 主要研究方向: 食品工程. E-mail: sangweigu@nbu.edu.cn



表2 培养基正交试验各因素和水平

水平	因素(w/v)						
	琼胶 A	NaCl B	蛋白胨 C	酵母膏 D	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> E	MgSO <sub>4</sub> F	CaCl <sub>2</sub> G
1	0.3	1.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5
2	0.4	2.5	0.2	0.2	0.2	0.2	1
3	0.5	3.5	0.3	0.3	0.3	0.3	1.5

他条件不变, 培养 36 h 后测定发酵液酶活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵培养基组成和优化

#### 2.1.1 不同碳源对菌株发酵产酶的影响

分别选取葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉、琼胶为唯一碳源, 浓度均为 0.3%, 发酵 30 h 后测定发酵液酶活力, 选择最佳碳源, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 菌株在以琼胶为唯一碳源的培养基中发酵产酶, 且琼胶酶的活力最高。在其他碳源的培养基中酶活力很低。由此可见琼胶是琼胶酶产生菌株发酵产酶的最佳碳源, 可以诱导菌株产生琼胶酶。

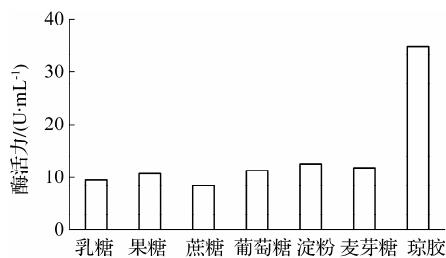


图2 不同碳源对产酶的影响

#### 2.1.2 不同氮源对菌株发酵产酶的影响

分别取硝酸钠、蛋白胨、酵母膏、硝酸铵、氯化铵作为氮源, 浓度均为 0.2%, 发酵 30 h 后测定酶活力, 结果见图 3。由图 3 可知, 此菌株能在多种氮

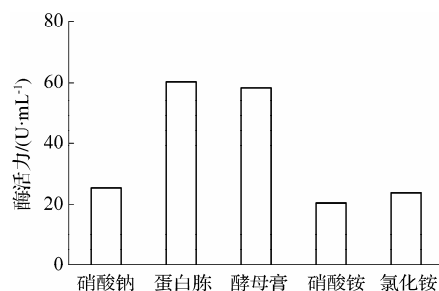


图3 不同氮源对产酶的影响

源中生长, 但在不同氮源中生长时其产酶量显著不同。其在酵母膏和蛋白胨作为氮源时, 产酶效果最佳, 故选取酵母膏和蛋白胨作为菌株发酵的氮源。

#### 2.1.3 不同无机盐对菌株发酵产酶的影响

K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>和 Fe<sup>2+</sup>是海洋细菌培养过程中常用到的金属离子, 因此选择取由 CaCl<sub>2</sub>、FePO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 作为唯一的无机盐加入培养基中, 离子浓度均为 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 测定发酵产酶量, 结果见图 4。由图 4 可知, K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的加入对此菌的生长和产酶均有促进作用, 尤其是 CaCl<sub>2</sub> 的加入, 使酶活显著增加。故选取 CaCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 作为发酵培养基中要添加的无机盐。

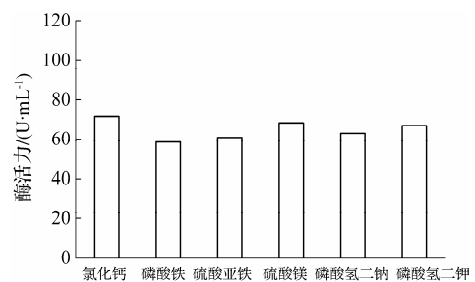


图4 不同无机盐对发酵产酶的影响

## 2.2 发酵条件的优化

### 2.2.1 培养基起始 pH 对产酶的影响

发酵培养基的初始 pH 值对细菌生长和产酶都具有明显的影响。一般认为培养基中的氢离子和氢氧根离子对微生物的影响是间接的, 首先作用于胞外的可解离的弱酸或弱碱, 形成易透过细胞膜的游离态进入胞内再作用于参与代谢的各种酶类, 从而影响菌体的生长和产物的合成。测定发酵液不同初始 pH 对菌株发酵产酶的影响, 结果见图

5. 由图 5 可知, 起始 pH 在 6.5~7.5 范围内, 发酵液酶活力较高, 当起始 pH 值小于 6 或大 8.5 时发酵液酶活力均较低, 因此, 偏酸或偏碱的培养环境均不利于菌株发酵产酶.

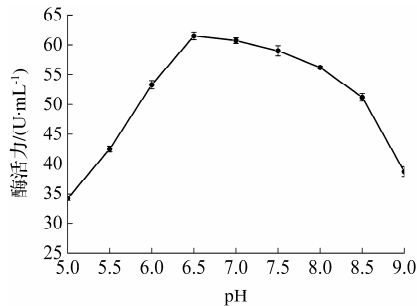


图 5 不同 pH 值对产酶的影响

### 2.2.2 培养温度对产酶的影响

温度是最重要的影响微生物生长和生存的环境因素之一. 温度能以 2 种相反的方式影响活的微生物体. 当温度升高时, 细胞内的化学和酶促反应都以较快的速度进行, 微生物的生长也会变得越来越快. 但是超过特定的温度, 蛋白质、核酸及细胞组分会受到不可逆转的损害. 因此当温度在一定范围内上升时, 微生物生长和代谢机能会逐渐上升达到某一极点, 在该极点会出现钝化反应. 超过此极点, 细胞机能会急剧下降到零, 实验结果见图 6. 由图 6 可知, 菌株在不同的培养温度下发酵产酶的活力不同. 该菌株在 25~30 ℃ 时发酵培养, 发酵液具有较高的酶活力, 发酵产酶的最适培养温度为 28 ℃. 温度较高时, 菌体生长速度快, 代谢产酶的时间短, 对生产效益和节约能源均有好处. 然而, 过高的发酵培养温度却不利于胞外酶的稳定性, 酶在较高温度下容易失活.

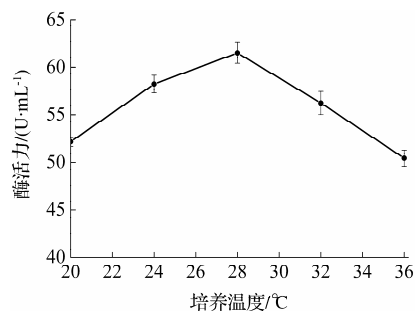


图 6 不同温度对发酵产酶的影响

### 2.2.3 摇床转速对产酶的影响

在微生物发酵中, 增加摇瓶转速可以增加溶氧量, 使菌株可以快速地利用琼胶, 从而有利于诱导菌株产生琼胶酶. 但也不是发酵过程中溶解氧越高越好, 因为溶解氧过大不仅造成浪费而且还可能改变代谢途径. 从图 7 可知, 在 100~150 r·min<sup>-1</sup> 转速下发酵液酶活力较高, 当转速为 120 r·min<sup>-1</sup> 时, 酶活力达到最大值. 当摇瓶转速超过 160 r·min<sup>-1</sup> 时, 菌体产酶活力呈下降趋势. 因此认为发酵产酶的最佳摇床转速为 120 r·min<sup>-1</sup>.

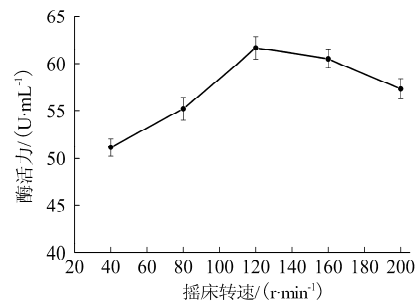


图 7 不同摇床转速对产酶的影响

### 2.2.4 接种量对产酶的影响

由图 8 可知, 接种量在 1%~2% 时发酵液中酶活力较高. 过低的接种量易引起杂菌生长, 不利于酶的产生. 随着接种量的加大, 菌体的生长繁殖变旺盛, 对于酶的产生却没有促进作用. 因此, 选择 1% 为最佳接种量.

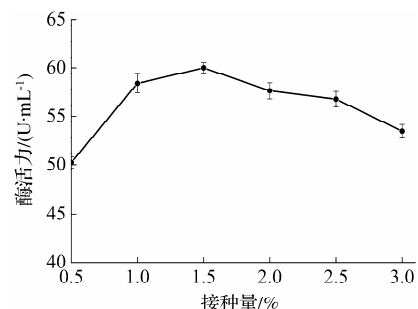


图 8 接种量对产酶的影响

通过单因子实验对发酵条件进行了优化, 确定了最佳发酵温度、初始 pH 值、摇床转速以及接种量. 结果表明菌株发酵产酶的最佳发酵条件为温度 28 ℃, 初始 pH 为 6.5, 摇床转速 120 r·min<sup>-1</sup>, 接种量 1%.

表 3 培养基正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	平均偏差	F 值	显著性
纠偏模型	26 647.156(a)	14	1 903.368	4.769	0.005
截距	248 083.763	1	248 083.763	621.605	0.000
A	9 260.834	2	4 603.417	11.534	0.002
B	5 847.082	2	2 923.541	7.325	0.008
C	6 776.762	2	3 388.381	8.490	0.005
D	495.140	2	247.570	0.620	0.554
E	24.234	2	12.117	0.030	0.970
F	574.091	2	287.045	0.719	0.507
G	3 723.014	2	1 861.507	4.664	0.032
误差	4 789.226	12	399.102		
总误差	279 520.145	27			
纠偏总值	31 436.382	26			

表 4 培养基正交实验结果

实验序号	A	B	C	D	E	F	G	实验结果	实验序号	A	B	C	D	E	F	G	实验结果
1	1	1	1	1	1	1	1	35.15	15	2	2	3	2	2	2	3	107.80
2	1	1	2	2	2	2	2	90.65	16	2	3	1	3	1	2	3	98.15
3	1	1	3	3	3	3	3	72.15	17	2	3	2	1	2	3	1	79.00
4	1	2	1	1	2	3	3	63.85	18	2	3	3	2	3	1	2	136.00
5	1	2	2	2	3	1	1	73.10	19	3	1	1	2	3	1	3	106.15
6	1	2	3	3	1	2	2	88.85	20	3	1	2	3	1	2	1	87.00
7	1	3	1	1	3	2	2	84.20	21	3	1	3	1	2	3	2	176.75
8	1	3	2	2	1	3	3	109.20	22	3	2	1	2	1	3	2	93.50
9	1	3	3	3	2	1	1	92.50	23	3	2	2	3	2	1	3	89.00
10	2	1	1	3	2	1	2	66.60	24	3	2	3	1	3	2	1	92.50
11	2	1	2	1	3	2	3	64.00	25	3	3	1	2	2	2	1	99.00
12	2	1	3	2	1	3	1	96.20	26	3	3	2	3	3	3	2	159.15
13	2	2	1	3	3	3	1	64.00	27	3	3	3	1	1	1	3	190.65
14	2	2	2	1	1	1	2	73.00									

### 2.3 SPSS 正交设计方差分析

利用 SPSS 统计软件对正交设计的实验结果进行方差分析<sup>[7]</sup>, 结果见表 3 和表 4.

由表 3 可知, 琼胶、NaCl、蛋白胨、CaCl<sub>2</sub> 的 *P* 值分别为 0.002、0.008、0.005、0.032, 对菌株发酵产琼胶酶的影响显著(0.05>*P*>0.01), 影响因素主次顺序为: 琼胶>蛋白胨>NaCl>CaCl<sub>2</sub>>MgSO<sub>4</sub>>酵母膏>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 对表 4 作因素配对比较, 确定琼胶酶产生菌发酵的最佳培养基组为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>F<sub>3</sub>G<sub>2</sub>,

即琼胶 0.5%, NaCl 3.5%, 蛋白胨 0.3%, 酵母膏 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol·L<sup>-1</sup>. 综合实验中的最适培养基组成和最佳发酵条件, 经若干次发酵实验后, 菌株发酵琼胶酶活力稳定在 191 U·mL<sup>-1</sup> 左右.

## 3 结论

利用 SPSS 软件设计正交试验优化了琼胶酶

产生菌发酵产酶的培养基组成, 确定其最佳发酵产酶培养基组成为: 琼胶 0.5%, NaCl 3.5%, 蛋白胨 0.3%, 酵母膏 0.2%,  $K_2HPO_4$   $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $MgSO_4$   $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $CaCl_2$   $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . 进一步通过单因子实验确定了菌株发酵产酶的起始 pH 为 6.5, 最适的温度为  $28^\circ\text{C}$ , 摇床转速为  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 培养时间为 36 h. 在最佳的培养基组成和发酵条件下进行实验, 结果菌株产酶的最高酶活力可以达到  $191\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 经发酵培养基和培养条件优化后, 菌株 *Halomonas sp.* DT-7 的产酶性状稳定, 产酶活力较高, 可用于发酵生产琼胶酶, 为下一步琼胶酶的分离纯化和酶性质研究奠定了基础.

#### 参考文献:

[1] 缪伏荣, 李忠荣. 琼胶的降解及其产物的开发应用[J].

现代农业科技, 2007, 25(2):125-128.

[2] 欧昌荣, 汤海青. 琼胶酶生产菌的筛选、鉴定及其酶学性质的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 12(6):86-90.

[3] 张红艳, 林凯. 国外天然防腐剂的研究进展[J]. 粮食加工, 2004, 10(3):57-60.

[4] 李能章, 邱荣蓉, 彭远义. 琼胶酶的研究进展[J]. 生命科学研究, 2006, 8(2):62-66.

[5] Borel E, Hostettler F, Deuel H. Quantitative zuckerbestimmung mit 3,5-dinitrosalicylsäure and phenol[J]. Helv Chim Acta, 1952, 35:115-120.

[6] Kohtaro Kirimura, Noriyoshi Masuda, Yousuke Iwasaki, et al. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from an alkalophilic bacterium, *alteromonas sp.* E-1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(4): 436-441.

[7] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析[M]. 3版. 北京: 电子工业出版社, 2006.

## Optimization of Fermentation Conditions of an Agarase-producing Bacterium by SPSS Orthogonal Design

WANG Xiao-yan<sup>1</sup>, SANG Wei-guo<sup>1,2\*</sup>

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** To study the optimal culture medium and fermentation conditions of an agarase-produced bacterium *Halomonas sp.* DT-3 that is extracted from marine environment. The selection factors of orthogonal design are based on considering the following components: the content of agar, NaCl, peptone, yeast extract,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ . The investigation index is determined by the activity of agarase of fermentation broth. The experimental data are processed using the software SPSS. The results give the optimal culture medium and fermentation conditions of the agarase-producing bacterium, which can be listed as follows: agar 0.5%, NaCl 3.5%, peptone 0.3%, yeast extract 0.2%,  $K_2HPO_4$   $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $MgSO_4$   $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $CaCl_2$   $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperature  $28^\circ\text{C}$ , pH 6.5, rotation speed  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , inoculum size 0.1%.

**Key words:** SPSS; agarase; fermentation; optimization

**CLC number:** TS254

**Document code:** A

(责任编辑 史小丽)