

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20

C12N 9/00

//(C12N1/20, C12R1 : 63)



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03138866.3

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1206344C

[22] 申请日 2003.7.28 [21] 申请号 03138866.3

[71] 专利权人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 江晓路 胡晓珂

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有限
公司

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法

[57] 摘要

一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法，包括把菌株接入含海藻粉发酵液培养基中，在一定温度下培养一定时间，然后投入提酶剂，使产生的沉淀物下沉，再进行分离，最后冷冻干燥，其特征是所用的菌种为河弧菌 *Vibrio fluvialis*。本发明用的菌种具有营养要求范围广，容易培养和代时短的特点，特别是具有高的产酶活性，其发酵液酶活力为 226U/ml。用本发明的方法生产的岩藻聚糖硫酸酯酶为内切和外切两类，降解岩藻聚糖硫酸酯可得到岩藻聚糖硫酸酯低聚糖、双糖、单糖。该酶产品的活性高，稳定性好，成本低，能够实现工业化生产。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

-
- 1、 一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法，包括把细菌接入海藻粉发酵液中，在 18-28℃的培养温度下培养 18-24 小时，然后投入提酶剂 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，使产生的沉淀物下沉，再进行分离，最后冷冻干燥，其特征是所用的菌种为河弧菌 *Vibrio fluvialis*。

一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法

技术领域

本发明涉及一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法。

背景技术

据本发明人所知，岩藻聚糖硫酸酯酶在制备具有不同分子量的岩藻聚糖硫酸酯低聚糖、双糖、单糖等方面显示出极其重要的作用，它对一些海洋药物的研制和工业化生产有决定性的意义。目前，已经有人用 *Vibrio sp.*N-5 得到外切型岩藻糖酶。另有人用 *Bacillus* 等其它微生物生产岩藻糖酶。但用这些菌种产酶时间长，产出的酶活性低，培养成分复杂，难适于工业化生产。

发明内容

本发明的目的是提供一种用河弧菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法，它能克服现有技术的上述缺点。

一种用细菌生产岩藻聚糖硫酸酯酶的方法，包括把细菌接入海藻粉发酵液中，在 18-28℃ 的培养温度下培养 18-24 小时，然后投入提酶剂 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，使产生的沉淀物下沉，再进行分离，最后冷冻干燥，其特征是所用的菌种为河弧菌 *Vibrio fluvialis*。

本发明用的菌种具有营养要求范围广，容易培养和代时短的特点，特别是具有高的产酶活性，其发酵液酶活力为 226U/ml。用本发明的方法生产的岩藻聚糖硫酸酯酶为内切和外切两类，降解岩藻聚糖硫酸酯可得到岩藻聚糖硫酸酯低聚糖、双糖、单糖。该酶产品的活性高，稳定性好，成本低，能够实现工业化生产。

具体实施方式

本发明用的河弧菌 *Vibrio fluvialis* 菌株为弧形，端生单鞭毛， G^- ，菌落

圆形，乳白色。培养该菌采用的培养基为海水细菌培养基 2216E，培养基的组分为酵母膏 1 克，蛋白胨 5 克，磷酸高铁 0.01 克，琼脂 15 克，陈海水 1000ml，其 pH 为 7.6-7.8。本发明所用的产酶培养基为上述培养基，另外又加入 0.8-1.5%(按重量，以下同)的海藻粉，培养 20 小时即可得到酶液。上述河弧菌的保藏单位为中国典型培养物保藏中心，简称 CCTCC，地址：中国武汉、武汉大学，保藏日期为 2000 年 6 月 5 日。保藏号为 M200015。

将河弧菌用上述 2216E 培养基活化后，以 5%的接种量接入装有 100ml 含有 1%藻粉培养基的 500ml 三角瓶中，26℃摇瓶培养 18-24h 后，将该培养液用冷冻离心机以 4000rpm 离心 10 分钟去除菌体，获得发酵酶液。将该酶液于 4° C 冰箱中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 80%的饱和度，4° C 下沉淀 24h，冷冻离心收集沉淀，该沉淀经冷冻干燥后制成粗酶制剂。所述的培养温度为 18-28℃。