

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(6):776-783; 4 June 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株多糖降解菌的分离、鉴定与琼脂糖降解能力

韩文君^{1,2}, 赵帅², 刘会会², 吴志红^{2*}, 顾谦群¹, 李越中²

¹ 中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 青岛 266003

² 山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 【目的】筛选海洋来源的多糖降解菌, 分析其多糖降解能力并初探机制。【方法】碘液染色法从海泥中初筛琼脂糖降解菌, 唯一碳源生长法分析菌株的多糖利用能力, 克隆 16S rRNA 基因以分析系统分类地位。用硫酸铵沉淀法制备胞外粗酶制剂, DNS-还原糖法测定琼胶酶活性, 活性染色法分析胞外琼胶酶系的组成特征。分离、纯化琼脂糖的酶解产物, 通过 TLC 测定寡糖 R_f 值、阳离子质谱测定分子量。【结果】分离到 1 株能液化琼脂糖的海洋细菌 JZB09, 鉴定至桃色杆菌属 (*Persicobacter*)。JZB09 能利用 11 种不同的多糖为唯一碳源生长, 在利用琼脂糖、纤维素和木聚糖时生长较好。胞外粗酶制剂的琼胶酶活力约 77.2 U/mg, 含有至少 2 条琼胶酶, 大小约 45 kDa、70 kDa。酶制剂降解琼脂糖后的产物是系列新琼寡糖, 四糖是主产物, 表明 β -琼胶酶在胞外琼胶酶系降解琼脂糖时起关键作用。【结论】海洋细菌 *Persicobacter* sp. JZB09 是 1 株多能型多糖降解菌, 可分泌 β -琼胶酶降解琼脂糖且活性显著, 具有潜在开发价值。

关键词: 桃色杆菌属 (*Persicobacter*), 多糖降解酶, 琼胶酶, 寡糖

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 06-0776-08

天然多糖是由重复的糖单元通过糖苷键链接而成的大分子聚合物, 是组成植物、微生物和动物机体的结构物质, 也是能量贮存的重要方式之一。多糖降解酶能催化多糖分子内糖苷键的断裂, 使聚合度不断降低, 产生寡糖。多能型多糖降解菌^[1-2]能利用多种不同类型的多糖进行生长, 所产多糖降解酶类型多样, 具有重要开发价值。目前, 海洋来源的多能型多糖降解菌仅见降解糖噬糖菌 (*Saccharophagus degradans*) 2-40^[3-6]等少数菌株的报道。

琼胶、褐藻胶和卡拉胶是目前产量最大、应用最为广泛的三大海洋多糖。琼胶主要产自江蓠、石花

菜和紫菜等海洋红藻, 琼脂糖是琼胶的重要组成部分。琼脂糖分子的主链由重复的 O-3, 6-内醚- α -L-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-吡喃半乳糖二糖单元通过 β -1, 4 糖苷键链接而成^[7]。琼胶酶可催化琼脂糖分子内糖苷键的水解, 产生以二糖为基本差异的系列寡糖; 基于所催化糖苷键的类型差异, 琼胶酶分为 α -琼胶酶 (E. C. 3.2.1.158) 和 β -琼胶酶 (E. C. 3.2.1.81) 等两大类型^[8-9]。相应地, 寡糖产物分别称为琼寡糖 (Agaro-oligosaccharide, AOs) 和新琼寡糖 (Neoagaro-oligosaccharides, NAOs)。新琼寡糖具有抗氧化^[10-12]和益生元^[13]等功能。除可用于寡糖的

基金项目: 微生物技术国家重点实验室开放基金 (M2010-12); 国家自然科学基金 (30870001)

* 通信作者: Tel: +86-531-88366175; E-mail: wuzhihong@sdu.edu.cn, lilab@sdu.edu.cn

作者简介: 韩文君 (1979-), 男, 山东滕州人, 讲师, 博士, 主要从事资源微生物学与分子酶学工程研究。E-mail: hanwenjun_79@hotmail.com

收稿日期: 2011-12-28; 修回日期: 2012-02-27

制备外,琼胶酶在DNA胶回收^[14]、海藻原生质体制备^[15-17]等遗传学操作中具有重要应用价值。因此,琼胶酶及其产生菌一直是海洋生物资源开发的研究热点之一。现有报道^[18]表明,海洋细菌,特别是 γ -亚支变形菌,是琼胶酶的主要来源,关于 α -亚支海洋细菌所产琼胶酶的报道相对较少。

桃色杆菌属(*Persicobacter*)细菌归类于变形菌 α -亚支,该属内现命名有2个种,流散桃色杆菌(*P. diffluens*)^[19]与*P. psychrovioidus*^[20]。流散桃色杆菌曾被命名为流动噬纤维菌(*Cytophaga diffluens*),显著性状之一是纤维素降解能力强^[21];也有关于能产琼胶酶的报道^[17],但未见与琼脂糖降解能力及其酶解机制相关的详细报道。关于*P. psychrovioidus*仅见分类研究。本文分离、鉴定了1株桃色杆菌属海洋细菌,分析了菌株的多糖降解能力、胞外琼胶酶系及琼脂糖酶解产物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 海泥与培养基:海泥样品于2009年10月采自青岛胶州湾红岛附近滩涂。菌株初筛培养基: Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, 天然海水 1000 mL, 琼脂粉 15 g, pH 7.2。人工海水: NaCl 30 g, KCl 7.5 g, CaCl₂ 1.1 g, Mg₂SO₄ 7.2 g, NH₄Cl 1.5 g, 纯水 1000 mL, pH 7.2。多糖利用分析培养基: 人工海水 100 mL, 0.1 g 多糖底物。产酶培养基: 人工海水 1000 mL, Tryptone 4 g, Yeast Extract 2.5 g。

1.1.2 主要试剂和仪器:琼脂糖购自美国 Invitrogen 生命技术公司;羧甲基纤维素、木质素、D-半乳糖等购自美国西格玛奥德里奇公司;琼脂粉等其它多糖试剂购自上海生物工程有限公司;Protein Assay 试剂盒购自美国 Bio-RAD 公司。DU800 分光光度计购自美国贝克曼公司;PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司;AXIMA-CFR plus 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪购自日本岛津公司。

1.2 琼脂糖降解菌的筛选

称取 1.0 g 海泥样品,用无菌天然海水进行 10 倍梯度稀释。取梯度稀释后的各海泥样品 100 μ L, 分别涂布于初筛培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d。挑取能够使琼脂粉平板崩解的单一菌落,划线培养,至得到克隆纯培养物。参照文献^[22]方法,将纯克隆的 72 h 培

养皿用改良卢戈氏碘液(KI 2.0 g, I₂ 1.0 g, 纯水 100 mL)染色,根据菌落周围的透明圈大小、菌落凹陷及平板液化程度,选择高活性菌株进行后续研究。

调整人工海水中的 NaCl 浓度为 0% - 5.0% (w/v),分别用于配制含 1.5% 琼脂糖的固体平板,分析适宜菌株生长的 NaCl 范围。在 4 $^{\circ}$ C - 40 $^{\circ}$ C 测试菌株最适生长温度。在 pH 值 6 - 11 的范围内测试最适合菌株生长的酸碱值。按文献^[23]方法进行革兰氏染色与观察。

1.3 菌株 JZB09 的分子鉴定

菌株培养物用冰冷的 TE 缓冲液(Tris 10mmol/L, Na₂EDTA 1mmol/L, pH 8.0)重悬,4 $^{\circ}$ C 放置过夜。加入溶菌酶至终浓度(0.40mg/mL),37 $^{\circ}$ C 温育,至体系粘稠。按照基因组 DNA 制备试剂盒(大连,宝生物)操作手册方法纯化基因组 DNA。用细菌 16S rRNA 基因通用引物(27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAGG-3'; 1492r: 5'-ACGGCAACCTTGTTACGA GTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物通过浓度为 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳进行分离,胶回收后克隆入 pMD19-T 载体,并转化 *E. coli* DH5 α 菌株。蓝白斑法筛选阳性克隆,制备重组质粒后送测序。

用 BioEdit 7.09 软件分析测序结果,截除引物序列。进行 BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) 在线分析,下载相似性大于 90% 的模式菌株的序列,并用 Clustal 1.83X 软件进行多序列比对。通过 MEGA 5.05 软件,用 Kimura-Parameter 模型计算遗传距离、Neighbour-Joining 法构建发育树、计算 Bootstrap 值评估置信度,重复数设为 1000。

1.4 菌株 JZB09 多糖利用能力的分析

为配制多糖利用分析培养基,向人工海水中分别添加粉状多糖底物至终浓度为 0.10% (w/v),包括:琼脂粉,琼脂糖,褐藻酸钠,卡拉胶, *D*-卡拉胶,纤维素,微晶纤维素,羧甲基纤维素,几丁质,壳聚糖,魔芋粗粉,魔芋精细粉(甘露聚糖),果胶,淀粉,木聚糖。在 115 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min 后得 15 种唯一碳源培养基。

用产酶培养基在 28 $^{\circ}$ C 初级培养 JZB09 菌株 100 mL,至 OD₆₀₀ 约 0.6 - 0.8,5000 \times g 离心 15 min 后收集菌体。用无菌人工海水洗涤菌体沉淀 2 次,最终重悬于 100 mL 无菌人工海水中。向每 100 mL 唯一碳源培养基中接入上述菌悬液 1.0 mL,28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养 7d。监测 OD₆₀₀ 及培养物中菌体

颜色的变化,判断菌株对多糖底物的利用能力。分别用不含任何碳源的无菌人工海水,及含 0.10% (w/v) 葡萄糖的唯一碳源培养基进行对照组实验。

1.5 菌株 JZB09 胞外琼胶酶的活性分析

用 1.0 L 产酶培养基在 28℃、200 r/min 培养 JZB09 菌株 72 h,12000 × g 4℃ 离心 10 min 后收集发酵液上清。总胞外酶的制备在 4℃ 环境中进行。向上清中缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 粉末至 80% 饱和度,磁力搅拌助溶,15000 × g 离心 30 min 后收集沉淀组分。用缓冲液 A (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na₂EDTA, 5 mmol/L DTT, 5.0% 甘油, pH 8.0) 重悬蛋白质沉淀,使充分溶解。将蛋白溶液装入最大孔径为 14 kDa 的纤维素透析袋,对缓冲液 A 连续透析 4 次,使 (NH₄)₂SO₄ 浓度降至 1 μg/mL 以下。将所得胞外酶制剂分装,贮于 -20℃。蛋白质浓度测定方法按照文献 [24] 进行,以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品绘制蛋白浓度 - OD₅₉₅ 标准曲线。

用纯水配制浓度为 0.10% (w/v) 的琼脂糖底物,加热溶解后置于 40℃ 备用。参照文献方法 [25],每 450 μL 底物中加入 50 μL 胞外粗酶制剂或制剂的稀释物,混匀后在 40℃ 中进行酶解反应。隔时隔时取样,加入等体积的 DNS-还原糖测试试剂,沸水浴中加热 10 min,使颜色稳定。冷却至室温,离心,取 200 μL 上清加入 96 孔板中,测定 540 nm 吸收值。每样品 3 个平行;以沸水浴灭活后的胞外酶制剂进行对照反应;以 D-半乳糖为标准品,绘制还原糖浓度 - OD₅₄₀ 标准曲线。

1.6 菌株 JZB09 胞外琼胶酶系的酶谱分析

将胞外酶制剂与等体积的 SDS 变性上样缓冲液混匀,进行分离胶浓度为 13.2%、层积胶浓度为 5.0% 的变性凝胶电泳 (SDS-PAGE),所用蛋白分子量标准物为 SM0431。为去除胶中的蛋白变性剂 SDS,使所含琼胶酶复性,在电泳结束后将胶块转入 50 mL 缓冲液 B (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中,室温振荡平衡 3 次共 90 min。将平衡后的胶贴在含 1.0% 琼脂糖的平皿上,37℃ 温育过夜。用考马斯亮蓝 R250 染液对 SDS-PAGE 胶染色;用卢戈氏碘液对琼脂糖平皿染色,观察并测定透明条带的相对位置。透明条带所在位置对应琼胶酶所在区域。

1.7 琼脂糖酶解产物的鉴定

按照 1:9 的体积比混匀胞外粗酶制剂与琼脂糖

底物,40℃ 温育,进行酶解反应。隔时隔时取样,沸水浴中温育 10 min 使酶失活。离心后取 2 μL 上清,作为琼脂糖的酶解产物,用高效硅胶板 (Merck, TLC Silica gel 60 F254) 进行 TLC 分析。展开剂及各成分的体积比为正丁醇:乙醇:水 = 2:1:1。用显色剂 (二苯胺:苯胺:磷酸:丙酮 = 1 g:1 mL:5 mL:50 mL) 染色后,110℃ 加热 10 min 使显色。所用含有新琼二糖 (NA2)、新琼四糖 (NA4)、新琼六糖 (NA6) 和新琼八糖 (NA8) 的分子量标准物是用 β-琼胶酶降解琼脂糖并纯化后的产物 [26],由中国海洋大学于文功教授实验室惠赠。

将按上述方法制备的琼脂糖酶解产物进行 10 倍浓缩,然后用凝胶柱 Superdex peptide 10/300 GL 进行分离,所用流动相为 0.10 mol/L NH₄HCO₃ 溶液。将分部收集所得寡糖组分进行 TLC 检测,并将含量大、纯度较高的 3 个寡糖组分 (F2、F3 与 F4) 反复冷冻干燥脱盐。用色谱级甲醇分别溶解除盐后的 3 个寡糖样品,与基质 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 混匀后,进行基质辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI-TOF MS) 分析,测定各寡糖纯化产物的分子量。

2 结果和讨论

2.1 琼胶降解菌的分离

自胶州湾红岛海泥样品中分离到 10 余株具有琼胶降解能力的海洋细菌。其中编号为 JZB09 的菌株在 28℃ 培养 5 d,能使琼脂粉含量为 0.8% - 1.2% (w/v) 的筛选培养基液化。卢戈氏碘液染色还表明:在琼脂粉含量为 1.5% 的唯一碳源平板上培养 48 h, JZB09 菌落不明显,但周围出现大于自身直径 3 倍以上的透明圈 (图 1)。这提示:菌株 JZB09 能分泌胞外琼胶酶,降解琼脂糖后产生了水溶性还原糖。

2.2 菌株的基本生长特征

革兰氏染色分析表明:菌株 JZB09 是革兰氏阴性细菌,杆状。观察该菌株在初筛培养基上的生长现象发现:菌落的颜色在 48 h 内由无色逐渐加深至桔黄色,然后逐渐变浅,在 96 h 后成为透明菌落。菌株 JZB09 生长的最适 pH 范围是 7.0 - 7.5,最适温度范围是 28℃ - 30℃。该菌株在 NaCl 浓度为 0.5% - 3.5% (w/v) 的范围内生长,在 NaCl 浓度低于 0.5% 或高于 3.5% 时基本不能生

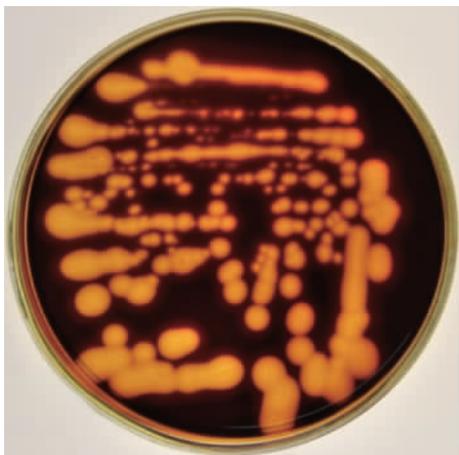


图1 菌株 JZB09 在琼脂糖平板上的碘液染色结果

Fig. 1 The clear zones around the JZB09 colonies stained with the I_2 solution.

长,最适 NaCl 浓度为 3.0%,这表明:JZB09 是 1 株嗜盐海洋细菌。

2.3 菌株 JZB09 的系统分类地位

将菌株 JZB09 的 16S rRNA 基因克隆、测序后提交 GenBank,获得收录号 JN619405。BLASTn 在线分析表明,与该序列一致性大于 97% 的菌株来自变形菌 α -亚支火色杆菌科桃色杆菌属。该序列与模式菌株 *P. diffluens* NBRC 15940、*P. psychrovidius*

NBRC 101262 的 16S rRNA 基因序列一致性分别为 99.4%、98.3%。自 GenBank 得到一致性大于 90% 的模式菌株 16S rRNA 基因序列 5 条,用 MEGA 5.05 软件构建得到邻接树(图 2),结果表明:JZB09 菌株与桃色杆菌属的模式菌株聚类,且位于该分支内部。因此,将 JZB09 菌株鉴定至桃色杆菌属。

2.4 菌株 JZB09 的多糖利用能力

经初级培养、洗涤和转接,JZB09 菌株在各唯一碳源培养基中的理论起始浓度(OD_{600})约 0.006 - 0.008。在无碳源的对照培养基中检测不到 JZB09 的生长,在含 0.10% (w/v) 葡萄糖的唯一碳源培养基中 JZB09 的最高菌体浓度为 0.39。此外,菌体浓度的测定(图 3)和多糖唯一碳源培养基颜色的观察还表明:培养 2-3d 后, OD_{600} 大于 0.10 的培养基普遍显示了不同程度的桔黄色变化过程, OD_{600} 小于 0.10 的培养基没有明显的颜色特征。因此,判定:菌株 JZB09 能利用琼胶、琼脂糖、褐藻胶、卡拉胶和 ι -卡拉胶等海藻来源的多糖,纤维素、微晶纤维素、果胶、淀粉和木聚糖等植物来源的多糖,以及动物来源的壳聚糖等进行生长。其中,在琼脂糖、纤维素和木聚糖为唯一碳源的培养基中 JZB09 的生物量相对较高。这些结果表明:菌株 JZB09 是 1 株多能型多糖降解菌。

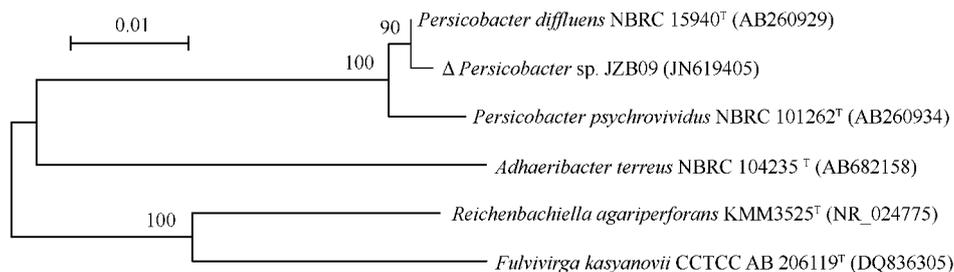


图2 基于 16S rRNA 基因的菌株 JZB09 与模式菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA genes of strain JZB09 and closely related strains using Neighbour-Joining method. Numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank. Numbers at the nodes indicates the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1000 resampled data sets. Bar, 0.01, represent sequence divergence.

2.5 菌株 JZB09 胞外粗酶制剂的琼胶酶活性

从 1.0L 不含琼脂糖的产酶培养基中得到 JZB09 胞外粗酶制剂约 320 mL,蛋白质的浓度为 0.645 ± 0.012 mg/mL。这表明,在本文研究条件下,JZB09 的胞外蛋白产量约 206 mg/L。在 40℃ 检测胞外粗酶制剂的琼胶酶活性,测得胞外粗酶制剂

活力为 77.2 ± 0.6 U/mg。这些结果提示:菌株 JZB09 可在无琼脂糖诱导条件下组成型表达胞外琼胶酶。

2.6 菌株 JZB09 胞外酶系的基本组成

为进一步分析菌株 JZB09 胞外琼胶酶系的组成,将胞外酶制剂进行了 SDS-PAGE 分析(图 4-A)及在

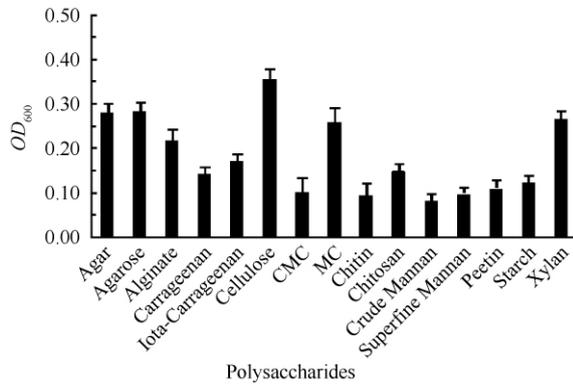


图3 *Persicobacter* sp. JZB09 在唯一碳源培养基中生长的最高菌体浓度

Fig. 3 Growth ability of *Persicobacter* sp. JZB09 on sole carbon source.

此基础上的活性染色分析(图4-B),对比后发现:碘液染色后的平皿中对应 SDS-PAGE 中蛋白标准物 45 kDa 处存在 1 条显著透明带,对应约 70 kDa 处存在 1 条微弱透明带。这些结果表明:在无琼脂糖诱导物的培养条件下,菌株 JZB09 的胞外琼胶酶系含有至少 2 条琼胶酶,分子量大小约 45 kDa、70 kDa。

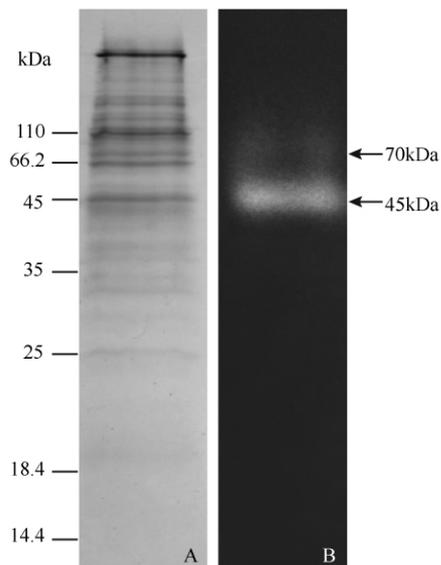


图4 *Persicobacter* sp. JZB09 胞外粗酶制剂的 SDS 变性凝胶电泳分析(A)和酶谱分析(B)

Fig. 4 Zymogram analysis of the crude extracellular enzyme extract from *Persicobacter* sp. JZB09. (A) SDS-PAGE. (B) Agarase activity staining.

2.7 琼脂糖的酶解产物

Ohta 等(2005)的研究^[27]表明,聚合度相同的新琼寡糖与琼寡糖在 TLC 分析中的展开系数(Rf)

显著不同。本文在展开剂为正丁醇:乙醇:水=2:1:1的条件下,用 F254 硅胶板进行 TLC 分析,结果新琼寡糖的带型清晰,测得新琼寡糖标准物中 NA2、NA4、NA6 与 NA8 的平均 Rf 值分别为 0.57、0.42、0.28 和 0.19。将浓度为 0.10% (w/v) 的琼脂糖用 JZB09 胞外粗酶制剂降解 12 h, TLC 分析酶解产物(图5),结果:(1)产物中含有与新琼寡糖 NA2、NA4、NA6 及 NA8 的 Rf 值一致的系列寡糖;(2)与 NA4 对应的寡糖在总产物中含量最显著。这表明:JZB09 胞外粗酶制剂降解琼脂糖后的产物是一系列新琼寡糖,新琼四糖是主产物。

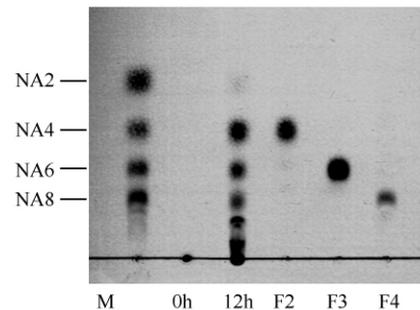


图5 菌株 JZB09 胞外粗酶制剂降解琼脂糖的产物分析

Fig. 5 TLC detection of the hydrolysis products of agarose by the extracellular enzyme extract from *Persicobacter* sp. JZB09.

为深入鉴定寡糖产物,用 Superdex peptide 10/300 GL 预装柱从琼脂糖的酶解产物中纯化得到 F2、F3 和 F4 等 3 个组分。TLC 分析(图5)表明,它们与 NA4、NA6、NA8 的 Rf 值分别一致。质谱分析所得阳离子信号(表1)表明,它们的分子量分别是 630、936 和 1242。这些结果表明:寡糖 F2、F3 和 F4 分别是以 0-3 β -内醚- α -L-吡喃半乳糖-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-吡喃半乳糖(分子量 324)为基本二糖单元构成的新琼四糖、新琼六糖和新琼八糖,彼此之间的分子量差异是由二糖基本单元的聚合度差异及基本单元间的缩水造成的。

表1 寡糖纯化产物的质谱分析结果

Table 1 The MALDI-TOF MS results of oligosaccharides purified from crude enzymatic products of agarose

Purified Oligosaccharides	Signals (m/z)			Molecular Weight
	[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + K] ⁺	
F2	—	652.9	668.9	629.9
F3	—	959.2	975.2	936.2
F4	1243.5	1265.6	—	1242.5

—, undetectable

上述结果提示: β -琼胶酶是 JZB09 胞外琼胶酶系的主要成分,在菌株降解琼脂糖的过程中起关键作用。本研究小组正在进行相关降解酶的蛋白纯化与基因克隆。

3 结论

本文自胶州湾滩涂海泥样品中分离得到能液化琼脂糖的海洋细菌 JZB09,属革兰氏阴性细菌,分子鉴定归类于桃色杆菌属。该菌株能利用 11 种来自海藻、高等植物和动物的多糖为唯一碳源生长,且在琼脂糖类、纤维素和半纤维素类培养基中生长相对较好。该菌株在无琼脂糖诱导条件下,可表达、分泌至少 2 条胞外琼胶酶。胞外酶制剂降解琼脂糖后产生相差二糖单元的系列新琼寡糖,新琼四糖是主产物。这些研究表明,*Persicobacter* sp. JZB09 是 1 株能降解多种多糖的海洋细菌,蕴含包括 β -琼胶酶在内的丰富的多糖降解酶资源,具有潜在开发价值。

致谢 感谢山东大学国家糖工程技术研究中心李福川教授、迟连利教授在寡糖的分离与鉴定中给予的指导和帮助。

参考文献

- [1] Andrykovitch G , Marx I. Isolation of a new polysaccharide-digesting bacterium from a salt marsh. *Applied Environmental Microbiology* , 1988 , 54 (4) : 1061-1062.
- [2] Ekborg NA , Gonzalez JM , Howard MB , Taylor LE , Hutcheson SW , Weiner RM. *Saccharophagus degradans* gen. nov. , sp. nov. , a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2005 , 55 (4) : 1545-1549.
- [3] Taylor LE , Henrissat B , Coutinho PM , Ekborg NA , Hutcheson SW , Weiner RM. Complete cellulase system in the marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2 - 40. *Journal of Bacteriology* , 2006 , 188 (11) : 3849-3861.
- [4] Ekborg NA , Taylor LE , Longmire AG , Henrissat B , Weiner RM , Hutcheson SW. Genomic and proteomic analyses of the agarolytic system expressed by *Saccharophagus degradans* 2 - 40. *Applied Environmental Microbiology* , 2006 , 72 (5) : 3396-3405.
- [5] Howard MB , Ekborg NA , Taylor LE , Weiner RM , Hutcheson SW. Genomic analysis and initial characterization of the chitinolytic system of *Microbulbifer degradans* strain 2 - 40. *Journal of Bacteriology* , 2003 , 185 (11) : 3352-3360.
- [6] Weiner RM , Taylor LE , Henrissat B , Hauser L , Land M , Coutinho PM , Rancurel C , Saunders EH , Longmire AG , Zhang HT , Bayer EA , Gilbert HJ , Larimer F , Zhulin IB , Ekborg NA , Lamed R , Richardson PM , Borovok I , Hutcheson S. Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium , *Saccharophagus degradans* strain 2 - 40^T. *PLoS Genetics* , 4 (5) : e1000087. doi: 10.1371/journal.pgen.1000087.
- [7] Rees D. Structure , conformation , and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* , 1969 , 24 : 267-332.
- [8] Rochas C , Potin P , Kloareg B. NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers produced by an α -agarase. *Carbohydrate Research* , 1994 , 253 : 69-77.
- [9] Rochas C , Lahaye M , Yaphe W , Phan Viet MT. ¹³C-NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers. *Carbohydrate Research* , 1986 , 148 (2) : 199-207.
- [10] Hatada Y , Ohta Y , Horikoshi K. Hyperproduction and application of α -agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyrin. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* , 2006 , 54 (26) : 9895-9900.
- [11] Wang JX , Jiang XL , Mou HJ , Guan HS. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *Journal of Applied Phycology* , 2004 , 16 (5) : 333-340.
- [12] Wu SC , Wen TN , Pan CL. Algal-oligosaccharide-lysates prepared by two bacterial agarases stepwise hydrolyzed and their anti-oxidative properties. *Fisheries Science* , 2005 , 71 (5) : 1149-1159.
- [13] Hu B , Gong QH , Wang Y , Ma YM , Li JB , Yu WG. Prebiotic effects of neoagar-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe* , 2006 , 12 (5 - 6) : 260-266.

- [14] Cole KD , Åkerman B. Enhanced capacity for electrophoretic capture of plasmid DNA by agarase treatment of agarose gels. *Biomacromolecules* , 2000 , 1 (4) : 771-781.
- [15] Gupta V , Kumar M , Kumari P , Reddy CRK , Jha B. Optimization of protoplast yields from the red algae *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh and *G. verrucosa* (Huds.) Papenfuss. *Journal of Applied Phycology* , 2010 , 23 (2) : 209-218.
- [16] Yeong HY , Khalid N , Phang SM. Protoplast isolation and regeneration from *Gracilaria changii* (Gracilariales , Rhodophyta) . *Journal of Applied Phycology* , 2008 , 20 (5) : 641-651.
- [17] Nikolaeva EV , Sinityn AP , Tambiev AH. Degradation of agarolytic red algal cell wall components by new crude enzyme preparations. *Journal of Applied Phycology* , 1999 , 11 (4) : 385-389.
- [18] Fu XT , Kim SM. Agarase: review of major sources , categories , purification method , enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs* , 2010 , 8 (1) : 200-218.
- [19] Nakagawa Y , Hamana K , Sakane T , Yamasato K. Reclassification of *Cytophaga aprica* (Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Flammeovirga* gen. nov. as *Flammeovirga aprica* comb. nov. and of *Cytophaga diffluens* (ex Stanier 1940; emend. Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Persicobacter* gen. nov. as *Persicobacter diffluens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1997 , 47 (1) : 220-223.
- [20] Muramatsu Y , Takahashi M , Kaneyasu M , Iino T , Suzuki K , Nakagawa Y. *Persicobacter psychrovidus* sp. Nov. , isolated from shellfish , and emended descriptions of the genus *Persicobacter* and *Persicobacter diffluens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2010 , 60 (8) : 1735-1739.
- [21] Vaidya SY , Vala AK , Dube HC. Production of cellulases by marine bacteria. *Indian Journal of Marine Science* , 2000 , 29 (4) : 336-339.
- [22] Hodgson DA , Chater KF. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) , and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP 1. *Journal of General Microbiology* , 1981 , 124 (2) : 339-348.
- [23] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 1976 , 72 (1-2) : 248-254.
- [25] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* , 1959 , 31 (3) : 426-428.
- [26] Ma CP , Lu XZ , Shi C , Li JB , Gu YC , Ma YN , Chu Y , Han F , Gong QH , Yu WG. Molecular cloning and characterization of a novel beta-agarase , AgaB , from marine *Pseudoalteromonas* sp. CY24. *Journal of Biological Chemistry* , 2007 , 282 (6) : 3747-3754.
- [27] Ohta Y , Hatada Y , Miyazaki M , Nogi Y , Ito S , Horikoshi K. Purification and characterization of a novel α -agarase from a *Thalassomonas* sp. *Current Microbiology* , 2005 , 50 (4) : 212-216.

Isolation , identification and agarose degradation of a polysaccharide-degrading marine bacterium *Persicobacter* sp. JZB09

Wenjun Han^{1,2} , Shuai Zhao² , Huihui Liu² , Zhihong Wu^{2*} , Qianqun Gu¹ ,
Yuezhong Li²

¹ Key Laboratory of Marine Drugs , Chinese Ministry of Education ; School of Medicine and Pharmacy , Ocean University of China , Qingdao 266003 , China

² State Key Laboratory of Microbial Technology , School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China

Abstract: [Objective] To isolate and identify a versatile carbohydrate-degrading bacterium from marine environments , and characterize the extracellular agarase activity. [Methods] The I₂ staining method was applied in the isolation of agarose-degrading bacteria from coastal sediments of the Jiaozhou bay nearby Qingdao city , China. The JZB09 strain was cultured in multiple media using various complex polysaccharides as the sole carbon source to test the carbohydrate utilizing abilities. The 16S rRNA gene was cloned , sequenced and analyzed to identify the taxonomic position of the strain. Crude extracellular proteins were prepared using (NH₄)₂SO₄ preprecipitation method. The dialyzed enzyme extract was applied in further studies including activity testing , activity staining , and agarose degrading for oligosaccharides purification. Three purified oligosaccharides were individually analyzed using thin layer chromatograph (TLC) and MALDI-TOF MS method. [Results] The agarolytic marine bacterium , *Persicobacter* sp. JZB09 , could use multiple complex polysaccharides as the sole carbon source and grew well on agarose , cellulose and xylan. The extracellular enzyme extract exhibits efficient and extensive degradation activity on agarose with an activity of 77.2 U/mg proteins. The extracellular agarase system (EAS) in the crude extracellular enzymes contains at least two agarose depolymerases with molecular masses of approximately 45 kDa and 70 kDa , respectively. A series of degradation products from agarose by the EAS was purified and identified as neoagaro-oligosaccharides , among which neoagarotetraose was the major product of the crude enzymatic products , which suggests that β -agarase is the major constituent of the JZB09 EAS. [Conclusion] The polysaccharide-degrading bacterium *Persicobacter* sp. JZB09 and its polysaccharide-degrading system is promising for the exploration of polysaccharide depolymerase resources including β -agarases.

Keywords: *Persicobacter* , polysaccharide depolymerase , agarase , oligosaccharide

(本文责编:王晋芳)

Supported by the State Key Laboratory of Microbial Technology (M2010-12) and by the National Science Foundation of China (30870001)

* Corresponding author. Tel: +86-531-88366175; E-mail: wuzhihong@sdu.edu.cn , lilab@sdu.edu.cn

Received: 28 December 2011 / Revised: 27 February 2012