

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(5): 543–551; 4 May 2014

ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicroen

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.009

一株产琼胶酶细菌的分离、鉴定及其琼胶酶基本性质

马芮萍¹, 朱艳冰^{1, 2, 3*}, 倪辉^{1, 2, 3}, 骆河东⁴, 肖安风^{1, 2, 3}, 蔡慧农^{1, 2, 3}

¹集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021

²福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心, 福建 厦门 361021

³福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021

⁴福建省厦门市疾病预防控制中心, 福建 厦门 361021

摘要 【目的】分离海洋来源的琼胶酶产生菌, 对其进行分类鉴定, 并研究其所产琼胶酶的基本酶学性质, 为琼胶酶的应用研究及开发利用奠定基础。【方法】通过以琼脂为唯一碳源的选择培养基分离产琼胶酶的菌株; 利用 16S rRNA 基因序列分析、表型和生理生化特征对菌株进行鉴定; 通过 DNS-还原糖法测定琼胶酶活性; 利用显色底物法测定琼胶酶的类型; 对菌株所产琼胶酶粗酶的酶学性质进行初步研究。【结果】分离到一株产琼胶酶的菌株 NTa, 16S rRNA 基因序列分析显示该菌株属于寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.); 该菌株主要产胞外琼胶酶, 可分泌 α -琼胶酶和 β -琼胶酶; 琼胶酶粗酶的最适反应温度和 pH 分别为 40°C 和 7.0, 并且琼胶酶在温度低于 30°C, pH 为 7.0–9.0 时稳定; Ca^{2+} 对琼胶酶粗酶具有促进作用, Ag^+ 、 Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 均可不同程度地抑制酶的活性; EDTA 对琼胶酶粗酶活性具有抑制作用; 琼胶酶粗酶对检测的抑制剂、去垢剂及变性剂有较好的抗性。【结论】海洋细菌 *Stenotrophomonas* sp. NTa 是一种新型的产琼胶酶菌株, 可同时分泌 α -琼胶酶和 β -琼胶酶, 具有潜在开发利用价值。

关键词: 寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.), 琼胶酶, 鉴定, 酶学性质

中图分类号: Q814 文章编号: 0001-6209(2014)05-0543-09

琼脂是一种从江蓠、石花菜、紫菜等红藻类 (*Rhodophyceae*) 海藻细胞壁中提取出来的具有高凝胶强度的细胞间多糖, 由琼脂糖和琼脂胶组成。琼脂糖是由 D-半乳糖和 3- β -D-内醚- α -L-半乳糖以 α -1, 3 和 β -1, 4 糖苷键交替连接形成的线性大分子^[1–2]。

琼胶酶可催化水解琼脂糖分子内的糖苷键, 基于所催化糖苷键的类型差异, 琼胶酶分为两大类: α -琼胶酶 (E. C. 3. 2. 1. 158) 作用于琼脂糖的 α -1, 3 糖

苷键, 产物是以 3- β -D-内醚- α -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖 (Agaro-oligosaccharide, AOs); β -琼胶酶 (E. C. 3. 2. 1. 81) 作用于琼脂糖的 β -1, 4 糖苷键, 产物是以 D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖 (Neoagaro-oligosaccharides, NAOs)^[2–3]。琼脂低聚糖具有减缓淀粉水解、抗氧化、抑制脂质过氧化及保湿等化学特性和生物学功能, 广泛用于食品、化妆品及制药工业等领域^[2]。除可用于琼脂寡糖的制备, 琼胶酶也是生物研究领域的重要工具酶, 用于分离

基金项目: 国家自然科学基金 (31271914); 厦门市科技计划项目 (201303120001); 厦门南方海洋中心项目 (13GZP004NF10); 集美大学科研创新团队基金 (2010A006)

* 通信作者。Tel: +86-592-6181736; E-mail: yanbingzhu@163.com

作者简介: 马芮萍 (1987–), 女, 甘肃酒泉人, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: mq19870826@126.com

收稿日期: 2013-09-04; 修回日期: 2013-12-13

制备海藻原生质体,从海藻中提取不饱和脂肪酸、维生素、类胡萝卜素及甜菜碱等生物活性物质^[1-2,4]。因此,琼胶酶及其产酶菌株是近年来海洋生物资源开发利用的热点,具有重要的应用价值。

琼胶酶主要来源于一些以琼胶作为碳源的微生物和一些以海藻为食物的海洋软体动物的消化道内^[5]。由于海产食藻动物的来源有限性以及原料保鲜的困难性,此来源的琼胶酶产量少。而微生物来源的琼胶酶具有种类多、便于生产和获得高纯度酶制剂等优点,成为琼胶酶研究领域的主流。微生物来源的琼胶酶产生菌主要是海洋细菌,包括假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[6]、假交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)^[7]、弧菌属(*Vibrio* sp.)^[4]、噬琼胶菌属(*Agarivorans* sp.)^[8]、噬细胞菌属(*Cytophaga* sp.)^[3]、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[9]、产微球茎菌属(*Microbulbifer* sp.)^[10]、桃色杆菌属(*Persicobacter* sp.)^[11]、盐杆菌属(*Salegentibacter* sp.)^[12]和不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)^[13]等,迄今为止未见寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)细菌产琼胶酶的报道。本文分离、鉴定了一株产琼胶酶的寡养单胞菌属海洋细菌,分析其产酶方式及所产琼胶酶的类型,并研究琼胶酶的基本酶学性质,为后续研究及应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 泥土样品于2012年10月采自厦门集美红树林。

1.1.2 培养基: (1) 选择培养基: 琼脂 20 g, NaNO₃ 5 g, 豆饼粉 0.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.02 g, K₂HPO₄ 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.02 g, 过滤海水 1000 mL, pH 7.5。(2) 斜面保藏培养基: 琼脂 20 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.5 g, KNO₃ 5 g, 人工海水^[14] 1000 mL, pH 7.5。(3) 液体种子培养基: 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.5 g, KNO₃ 5 g, 人工海水^[14] 1000 mL, pH 7.5。(4) 摇瓶发酵培养基: 琼脂 2 g, KNO₃ 5 g, 人工海水^[14] 1000 mL, pH 7.5。

1.1.3 主要试剂和仪器: pNPG 购于美国 Sigma 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、*Taq* 酶、dNTPs 均购于广州东盛生物科技有限公司; 其它试剂均为市售分析纯; WJF 型可见分光

光度计(尤尼柯仪器有限公司), YXQ-LS-30SH 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 5417R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司), 7934070 冷冻干燥仪(美国 Thermo Fisher 公司), 7600HC 透射电镜(德国 Zeiss 公司), 梅里埃 VITEK2 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)。

1.2 产琼胶酶细菌的分离

称取适量泥土样品,用无菌过滤海水进行 10 倍梯度稀释。取稀释后的泥土样品 200 μL,分别涂布于选择培养基,22℃ 培养 5 d。选取菌落周围具有明显水解圈或凹陷的菌株进行 3 次以上划线纯化培养。参照 Hodgson 等^[15]的方法,将分离到的菌株平板培养后用卢戈氏碘液染色,根据菌落的凹陷程度和菌落周围的透明圈,选择高活性菌株进行下一步研究。

1.3 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增、序列比对和系统发育分析

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA,并以此为模板采用 16S rRNA 基因的通用引物 27F(5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGCTA CCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。反应条件为:95℃ 5 min;94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物利用琼脂糖凝胶电泳检测后,交由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 程序进行相似性比对,运用 MEGA 4.0 的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统发育树。

1.4 菌株的形态及生理生化特性鉴定

将菌株在斜面保藏培养基上划线接种,收集菌体用梅里埃 VITEK2 全自动细菌鉴定仪对菌株进行生理生化鉴定。菌株的生长温度、菌落形态、革兰氏染色、鞭毛染色、明胶液化实验、硝酸盐还原实验和卵磷脂酶实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[16]。

1.5 琼胶酶粗酶样品制备及酶活力测定

将菌株接种于摇瓶发酵培养基,25℃ 180 r/min 培养 36 h,发酵液于 4℃、17935 × g 冷冻离心 10 min,取上清液,即为发酵粗酶液。

取 50 μL 粗酶液加入 450 μL 含 0.5% 琼脂的 50 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液(pH 7.0)中,40℃ 水浴反应 10 min,加入 500 μL DNS,置于沸水浴中 5 min,冷却后,用蒸馏水定容至 5 mL,充分混匀后,于 540 nm 处测定吸光值。以灭活的酶液作对

照。在上述条件下,每分钟释放 $1 \mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.6 菌株的产酶方式研究

取 1 mL 发酵液 4°C 、 $17935 \times g$ 离心 10 min , 收集上清液,即为胞外酶。菌体用 $500 \mu\text{L}$ 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.0)重悬,冰浴条件下超声破壁 5 min 后 4°C 、 $17935 \times g$ 离心 10 min , 收集上清液,即为胞内酶。将得到的胞内酶和胞外酶按 1.5 方法测定琼胶酶活力。

1.7 琼胶酶类型鉴定

参照 Temuujin 等^[17]的方法,取 $500 \mu\text{L}$ 50 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.0)与 $200 \mu\text{L}$ $\alpha\text{-pNPG}$ 或 $\beta\text{-pNPG}$ (4 mg/mL)混合均匀,置于 40°C 预热 5 min , 迅速加入 $500 \mu\text{L}$ 按 1.6 方法制备的酶液(胞内酶或胞外酶),混匀后置于 40°C 反应 1 h , 然后加入 $500 \mu\text{L}$ 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,在 420 nm 波长下测定吸光度。

1.8 温度对琼胶酶活性的影响

分别在不同温度下测定琼胶酶粗酶液的活力,以最高酶活力为 100% , 研究酶的最适反应温度。将粗酶液分别置于 20 、 30 、 40 、 45 和 50°C 水浴中,分别放置不同时间(5 、 10 、 15 、 20 、 25 和 30 min)后测定酶的剩余活力,以未经处理的酶的活力为 100% , 研究酶的热稳定性。

1.9 pH 对琼胶酶活性的影响

将琼胶酶粗酶液分别置于不同 pH 的底物缓冲液中,测定琼胶酶的活力,以最高酶活力为 100% , 研究酶的最适 pH 。将粗酶液分别置于不同 pH 的缓冲液体系中, 25°C 放置 30 min 后,测定琼胶酶的活力,以未经处理的酶的活力为 100% , 研究酶的 pH 稳定性。研究中所用的缓冲液为 50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 4.0 - 6.0)、 50 mmol/L 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.0 - 9.0)和 50 mmol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0 - 11.0)。

1.10 金属离子对琼胶酶活性的影响

琼胶酶粗酶液用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)溶液透析后,分别添加金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{3+})使其浓度为 1 mmol/L , 25°C 下放置 30 min 后,测定酶的活力,以不添加金属离子的酶活力为 100% , 研究金属离子对琼胶酶活性的影响。

1.11 抑制剂、去垢剂及变性剂对琼胶酶活性的影响

在琼胶酶粗酶液中分别加入 EDTA (1 mmol/L 、 5 mmol/L)、 β -巯基乙醇 (1 mmol/L)、 DTT (1 mmol/L)、 SDS (0.1% , V/V)、 $\text{tween}20$ (0.1% , V/V)、 $\text{tween}80$ (0.1% , V/V)、 tritonX-100 (0.1% , V/V) 和 urea (1 mol/L) 25°C 下放置 30 min 后,测定酶的活力,以不添加抑制剂、去垢剂和变性剂的酶活力为 100% , 研究抑制剂、去垢剂和变性剂对琼胶酶活性的影响。

1.12 统计分析

试验数据为 3 次平行试验的平均值,应用 Excel 软件计算平均值和标准偏差,SPSS17.0 软件(SPSS Inc. H, Chicago, IL)对结果进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果和讨论

2.1 琼胶酶产生菌的分离

自红树林泥土样品中分离到 10 余株具有琼胶降解能力的海洋细菌。其中菌株 NTa 在琼脂平板上可观察到菌落周围有非常明显的凹陷,该菌株在平板上形成规则的圆形菌落,表面光滑湿润,边缘整齐,呈乳白色。卢戈氏碘液染色后,菌落周围形成较大的透明水解圈(图 1),这是由于琼胶未被降解的地方可以被卢戈氏碘液染色,而琼胶降解菌产生的琼胶酶降解了菌落周围的琼胶,形成的琼脂低聚糖因具有还原性,不能被碘液染色,从而形成透明圈。



图 1. 菌株 NTa 在琼脂平板上的碘液染色结果
Figure 1. Clearance zone of free cell-supernatant of the stain NTa incubated on agar plate flooding with the I_2 solution.

2.2 16S rRNA 基因分析及系统发育树构建

以提取的菌株 NTa 的基因组 DNA 为模板,27F 和 1492R 为引物进行 PCR 扩增,在大约 1500 bp 处

得到单一、明亮的条带(结果未示)。目的基因进行测序, 得到 1451 个碱基序列, 将序列提交到 GenBank 获得登录号为 KF516076。利用 BLAST 程序将所得基因序列与 GenBank 数据库的序列进行比对, 菌株 NTa 的 16S rRNA 基因序列与寡养单胞菌属其它种菌株的序列相似性在 96% 以上, 其中与 *S. maltophilia* ATCC 13637T、*S. pavanii* ICB 89、*S. chelatiphaga* LPM-5、*S. chelatiphaga* CCUG 56889、*S. koreensis* TR6-01、*S. acidaminiphila* AMX-19、*S.*

ginsengisoli NBRC 101154、*S. rhizophila* e-p10、*S. terrae* R-32768、*S. humi* R-32729 和 *S. nitritireducens* L2 的相似性分别为 99.65%、99.45%、98.14%、98.40%、97.31%、97.02%、96.75%、96.89%、96.82%、97.23% 和 96.89%。将这些相似性较高的序列, 通过 MEGA 4.0 软件构建系统发育树(图 2) 结果显示菌株 NTa 位于寡养单胞菌属的分枝下, 因此, 将 NTa 菌株鉴定为寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas* sp.)。

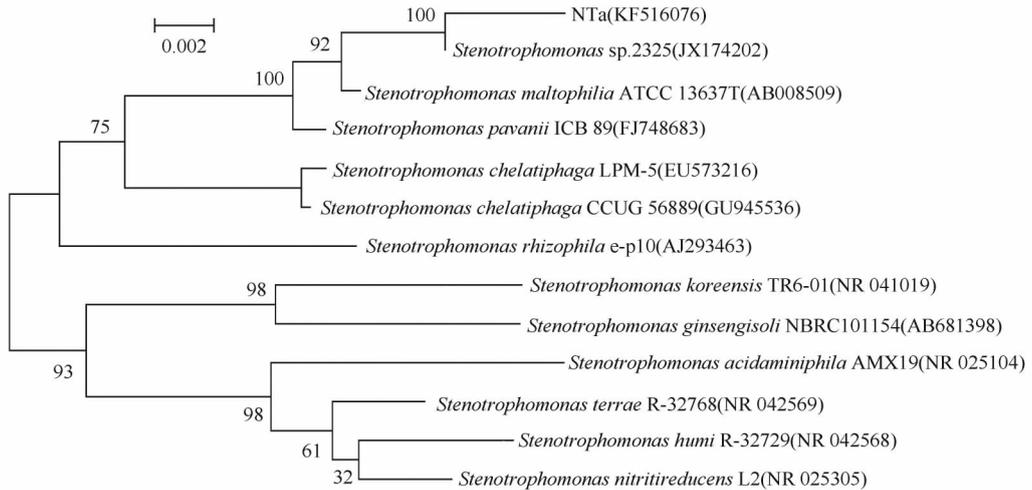


图 2. 菌株 NTa 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequences of strain NTa. Numbers in parentheses represent the sequences accession numbers in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.002% sequence divergence.

2.3 菌株的表型及生理生化鉴定

该菌株为杆菌, 大小为 $0.69 \mu\text{m} \times 2.53 \mu\text{m}$, 有一根极生鞭毛, 长约 $2.53 \mu\text{m}$ (图 3)。由表 1 可知, 该菌株与寡养单胞菌属的其他菌株相同, 均表现为革兰氏阴性, 无芽孢, 5-酮-葡萄糖苷阴性。此外, NTa 与该属种菌株的生理生化特征又有一定的区别: NTa 可在 40°C 生长, 柠檬酸盐、明胶液化、脂酶阴性等。另外, 菌株 NTa 呈现的阳性反应还有: α -半乳糖苷酶, 谷氨酰胺酶 pNA; H_2S 、磷酸酶、 β -糖苷酶、木糖苷酶、Y-谷氨酰转移酶、 β -丙氨酸芳胺酶、L-脯氨酸芳胺酶、 β -丙氨酸芳胺酶、酪氨酸芳胺酶、氨基乙酸芳胺酶、 β -葡萄糖醛酸酶、O129 耐受、丙二酸盐、琥珀酸盐、古老糖、阿拉伯糖、海藻糖及乳酸盐呈现阴性结果。根据细菌系统进化分析及其典型形态和生理生化特征, 菌株 NTa 属于寡养单胞菌属。寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.) 是 1993 年分离

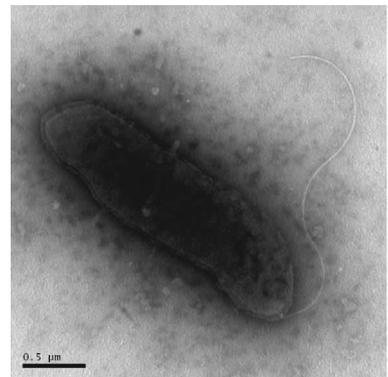


图 3. 菌株 NTa 的电镜观察

Figure 3. Transmission electron microscopy (TEM) of strain NTa. Bar, 0.5 μm .

出来的一个新属, 属于黄单胞菌目 (Xanthomonadales), 黄单胞菌纲 (Xanthomonadaceae), 目前该属有 10 个不同的种^[18]。菌株 NTa 的生理生化特征与目前寡养单胞

菌属中报道的种 (*S. maltophilia*^[19], *S. pavanii*^[19], *S. ginsengisoli*^[22], *S. terrae*^[23], *S. humi*^[23], *S. chelatiphaga*^[20], *S. koreensis*^[21], *S. nitritireducens*^[23]) 有明显的区别, 由此可推断菌株 *acidaminiphila*^[21], *S. rhizophila*^[22], *S. NTa* 可能是寡养单胞菌属的一个新种。

表 1. 菌株 NTa 与相近寡养单胞菌属菌株的表型及生理生化特征

Table 1. Phenotypic and biochemical characteristics of strain NTa and its closely related type strains of genus *Stenotrophomonas* sp.

characteristic	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a
gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
growth at 40°C	+	-	-	nd	-	-	nd	+	-	-	-
3% NaCl	+	+	nd	-	nd	nd	nd	nd	+	+	nd
carbon sources for growth											
adonitol	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
glucose	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
fructose	-	+	-	+	+	-	nd	+	+	+	+
galactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	nd	nd	-	-	+	-	-	-	-
mannose	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
cellobiose	-	+	-	nd	+	-	nd	-	-	-	-
maltose	+	+	-	+	+	-	nd	+	+	+	-
malic acid	-	+	-	+	nd	-	-	-	-	-	-
rhamnose	-	-	nd	nd	-	-	+	-	-	-	-
sorbitol	-	-	-	+	-	-	nd	-	-	-	-
sucrose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tagatose	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
histidine	-	nd	nd	nd	+	-	+	-	nd	nd	nd
5 - ketogluconate	-	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-
citrate	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
femendation / Glucose	-	+	nd	nd	+	-	-	w	+	+	+
femendation / Maltose	-	nd	nd	nd	nd	+	+	-	-	nd	nd
reduction of nitrate	+	+	-	nd	+	-	nd	w	+	+	-
tween 80	-	+	+	-	+	+	-	w	+	-	+
gelatin	-	+	+	+	+	+	-	+	+	w	-
β - galactosidase	+	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd
β - glucosidase	-	w	+	-	+	-	nd	-	-	-	-
urease	-	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd

^astrains 1: NTa; 2: *S. maltophilia* ATCC 13637T; 3: *S. pavanii* ICB 89; 4: *S. chelatiphaga* LPM-5; 5: *S. rhizophila* e-p10; 6: *S. koreensis* TR6-01; 7: *S. ginsengisoli* NBRC 101154; 8: *S. acidaminiphila* AMX-49; 9: *S. terrae* R-32768; 10: *S. humi* R-32729; 11: *S. nitritireducens* L2. symbols: +: positive; -: negative; w: weak positive; nd: not detected/not mentioned.

2.4 菌株的产酶方式和所产琼胶酶类型的鉴定

采用 DNS 法测定菌株 NTa 所产的胞内外琼胶酶的活性, 其中胞外酶活力为 1.225 U/mL, 胞内酶活力仅为 0.146 U/mL, 由此表明菌株 NTa 产生的胞外琼胶酶占优势地位。胞外型的琼胶酶有利于后期的分离纯化, 可避免菌体破壁的步骤。

菌株 NTa 的琼胶粗酶可分别作用于 α-pNPG (含有 α-糖苷键) 和 β-pNPG (含有 β-糖苷键) 这两种底物 (图 4), 由此可推断该菌株可以产 α-琼胶酶和 β-琼胶酶。菌株胞内胞外都有 α-琼胶酶和 β-琼胶酶, 其中 β-琼胶酶在胞外的含量较高。

相关研究表明, 由琼胶酶水解琼脂得到的琼脂低聚糖有抗氧化、抑制肿瘤发生等生物学功能^[1-2, 4], 但已有研究的琼脂低聚糖大部分为由 β-琼胶酶水解得

到的新琼寡糖^[1, 24]。虽然目前有一些 α-琼胶酶的报道^[25-26], 但没有 α-琼胶酶水解琼脂制备琼寡糖的研究结果。菌株 NTa 分泌的 α-琼胶酶可以水解琼脂得

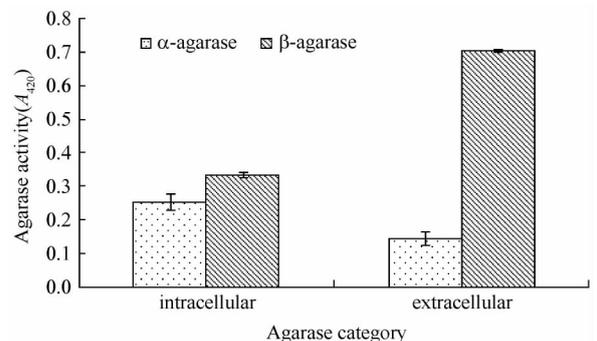


图 4. 琼胶酶类型的确定

Figure 4. The category of agarase to be determined.

到琼寡糖,为其功能研究提供了基础。

2.5 温度对琼胶酶活性的影响

来自菌株 NTa 的琼胶酶粗酶的最适反应温度为 40℃,在 20℃ - 80℃ 范围内均有活性。在 20℃ 时具有最高酶活 50% 的酶活力,在 30℃ - 70℃ 范围内酶活力在 80% 以上,当温度升至 80℃ 时仍具有 30% 的活力(图 5-A)。来自 *Streptomyces coelicolor* A3^[17]、*Acinetobacter* sp. AG LSL-I^[13] 的琼胶酶最适反应温度也为 40℃,这与本实验结果一致。而从江离中分离得到的 *Pseudomonas* sp. 能够产生低温的琼胶酶,其最适反应温度为 35℃^[27],来自 *Pseudoalteromonas* sp. 的琼胶酶的最适反应温度为 55℃^[28]。这表明来源于不同微生物的琼胶酶,其最适反应温度有一定的差别。

菌株 NTa 分泌的琼胶酶粗酶的温度稳定性分析显示(图 5-B),在 20℃ 和 30℃ 下放置 30 min,酶活力不受影响,稳定性好;在 40℃ 下处理 30 min,酶保留了约 50% 的相对活力;当酶在 45℃ 和 50℃ 下放置 30 min 后,酶活力丧失,稳定性差。

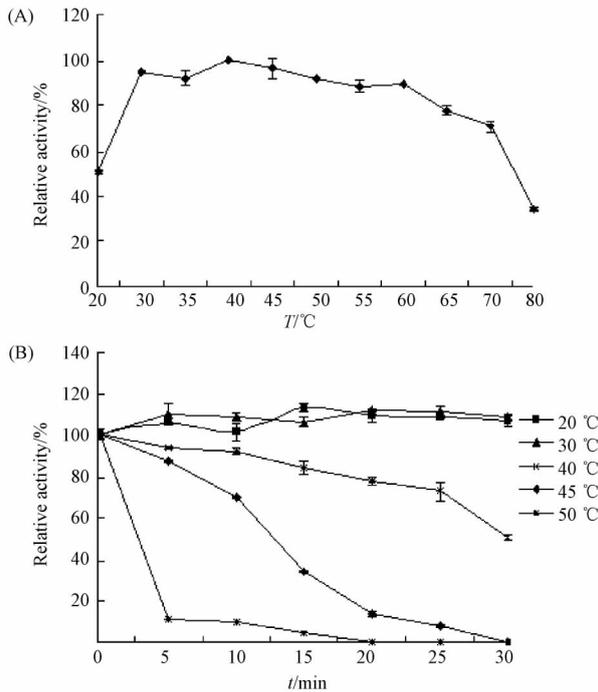


图 5. 温度对琼胶酶活性的影响

Figure 5. Temperature effects on *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase activity. A: Optimum Temperature of *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase; B: Thermostability of *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase.

2.6 pH 对琼胶酶的影响

pH 对酶的影响较大,有学者认为这是由于酶或

者酶的活性位点在形成离子状态时形成了不可逆的钝化或失活^[29]。来自菌株 NTa 的琼胶酶粗酶表现出的最适 pH 为 7.0(图 6-A),这与许多其他来源的琼胶酶的最适 pH 一致,如 *Pseudoalteromonas* sp. JYBCL 1^[5]、*Agarivorans* sp.^[8]、*Microbulbier* sp.^[10] 和 *Janthinobacterium* sp.^[30]。而从 *Pseudoalteromonas* sp. AG52 分离的低分子量琼胶酶的最适 pH 为 5.5^[28],来自噬碱菌 *Pseudomonas* sp. 的酶的最适 pH 为 9.0^[27]。

菌株 NTa 所分泌的琼胶酶粗酶在 pH 7.0 - 9.0 的范围内稳定,相对酶活力均大于 80%(图 6-B)。当存在于偏酸(pH 4.0)或偏碱(pH 11.0)的环境中时,酶活力全部损失。自污水中分离出的 *Rhodococcus* sp. 所产琼胶酶在 pH 5.0 - 8.0 稳定,其稳定范围较宽^[31],而从 *Bacillus* sp. MK03 分离得到的 β-琼胶酶仅在 pH 7.1 - 8.2 稳定^[9],从 *Bacillus* sp. H12 分离到的琼胶酶在 pH 6.5 - 7.5 稳定^[29]。

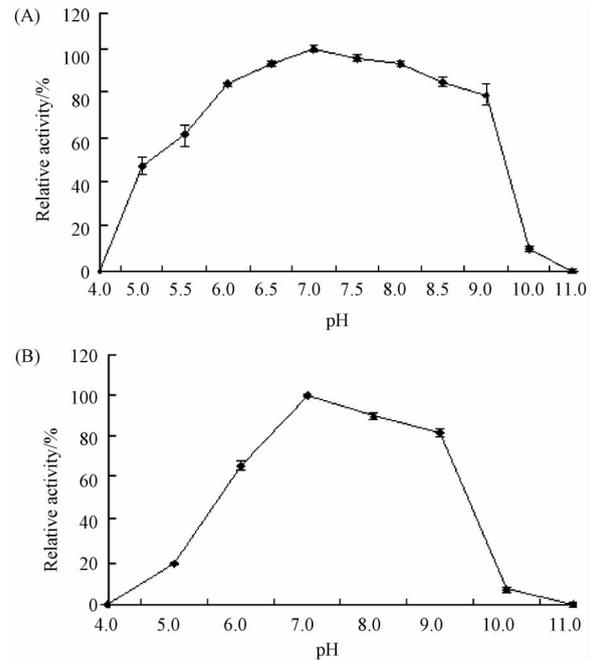


图 6. pH 对琼胶酶活性的影响

Figure 6. pH effects on *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase activity. A: Optimum pH of *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase; B: The pH stability of *Stenotrophomonas* sp. NTa agarase.

2.7 金属离子对琼胶酶活性的影响

菌株 NTa 的琼胶酶粗酶对金属离子比较敏感(表 2)。Ca²⁺对 NTa 所产琼胶酶具有促进作用,这一结论与一些研究者的结果一致^[26, 31]。Na⁺、K⁺和 Mg²⁺对酶活性没有影响。除此之外,Ag⁺、Fe²⁺、

Ba²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺和Fe³⁺都不同程度地抑制了该酶的活性。有研究者认为这是由于反应体系中存在二价金属离子时影响了SH、CO和NH功能基团的亲和力,导致酶催化位点的结构发生变化,从而使得酶活降低^[27-29]。

表 2. 金属离子对琼胶酶活性的影响

Table 2. Effects of metal ions on NTa agarase activity*

metal ion(1 mmol/L)	relative activity / %
control	100.0 ± 1.9 ^b
Ca ²⁺	112.1 ± 3.3 ^a
K ⁺	103.7 ± 0.8 ^b
Mg ²⁺	98.5 ± 2.1 ^b
Na ⁺	97.3 ± 1.6 ^b
Fe ²⁺	83.8 ± 0.1 ^c
Zn ²⁺	29.1 ± 1.6 ^f
Ba ²⁺	81.5 ± 2.9 ^{cd}
Fe ³⁺	74.5 ± 1.6 ^{cd}
Mn ²⁺	71.5 ± 1.0 ^{cd}
Cu ²⁺	69.9 ± 0.8 ^d
Ag ⁺	44.6 ± 2.7 ^e

* Means with different superscript letters within the same column are significantly different (P < 0.05).

2.8 抑制剂、去垢剂及变性剂对琼胶酶活性的影响

不同的抑制剂、去垢剂及变性剂对菌株 NTa 琼胶酶粗酶活性的影响结果显示(表 3),EDTA 对酶具有抑制作用,在一些学者的研究报道中也得到了相同的结论^[8,27,28,31]。β-巯基乙醇、DTT、Tween-20、Tween-80 和 TritonX-100 对琼胶酶没有抑制作用。而去垢剂 Tween-20、Tween-80 和 TritonX-100 对从 *Pseudomonas* sp. 分离到的琼胶酶有抑制作用^[27]。此外,菌株 NTa 的琼胶酶对 SDS 和尿素有一定的抗性。

表 3. 抑制剂、去垢剂及变性剂对琼胶酶的影响

Table 3. Effects of inhibitors, detergents and denaturant on NTa agarase activity*

reagent	concentration	relative activity / %
control	0	100.0 ± 0.1 ^a
EDTA	1 mmol/L	84.2 ± 3.6 ^b
	5 mmol/L	27.2 ± 2.2 ^c
β-mercaptoethanol	1 mmol/L	106.2 ± 1.0 ^a
DTT	1 mmol/L	105.1 ± 2.2 ^a
SDS	0.1% (V/V)	83.4 ± 3.5 ^b
tween 20	0.1% (V/V)	103.7 ± 1.8 ^a
tween 80	0.1% (V/V)	106.2 ± 0.1 ^a
tritonX-100	0.1% (V/V)	106.1 ± 1.2 ^a
urea	1 mol/L	87.9 ± 0.3 ^b

* Means with different superscript letters within the same column are significantly different (P < 0.05).

3 结论

本文自厦门红树林泥土样品中分离得到能降解琼脂的海洋细菌 NTa,属非发酵型的革兰氏阴性杆菌,分子鉴定归类于寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)。结合菌株的表型及生理生化鉴定结果,NTa 可能是寡养单胞菌属的一个新种。胞外酶是菌株 NTa 的主要产酶方式,分泌的琼胶酶包括 α-琼胶酶和 β-琼胶酶两种。来自菌株 NTa 的琼胶酶粗酶的最适反应温度和 pH 分别为 40℃ 和 7.0,在温度低于 30℃ 和 pH 在 7.0-9.0 之间时有好的稳定性。琼胶酶粗酶对金属离子比较敏感,Ca²⁺可激发其活性,Na⁺、K⁺和 Mg²⁺对酶活性没有影响,Ag⁺、Fe²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺和 Fe³⁺均可抑制其活性。EDTA 对琼胶酶粗酶具有抑制作用,此外,琼胶酶粗酶对其它一些抑制剂、去垢剂及变性剂有一定的抗性。本研究首次发现了寡养单胞菌属产琼胶酶的研究结果,菌株 *Stenotrophomonas* sp. NTa 可同时分泌 α-琼胶酶和 β-琼胶酶,是一种产琼胶酶的微生物新资源。

参考文献

- [1] Fu XT, Kim SM. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marines Drugs*, 2010, 8(1): 200-218.
- [2] Chi WJ, Chang YK, Hong SK. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(4): 917-930.
- [3] Vander HJ, Harder W. Purification and characterization of the agarase of *Cytophaga flevensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1975, 41: 431-447.
- [4] Liao L, Xu XW, Cao Y, Yi N, Huo YY, Wu YH, Zhu XF, Zhang XQ, Wu M. Cloning, expression and characterization of a new beta-agarase from *Vibrio* sp. strain CN41. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 7077-7079.
- [5] Oh, Hoon Y, Jung C, Lee J. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* sp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(8): 818-821.
- [6] Kang NY, Choi YS, Cho BK, Kim BS, Jeon JY, Cha CH, Kim CH, Lee YC. Cloning, expression and characterization of a Beta agarase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. SK38. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(14): 1165-1170.

- [7] Kim, Jonghee, Soon-Kwang Hong. Isolation and characterization of an agarase-producing bacterial strain, *Alteromonas* sp. GNUM-1, from the West Sea, Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22 (12): 1621-1628.
- [8] Long M, Yu Z, Xu X. A novel β -agarase with high pH stability from marine *Agarivorans* sp. LQ48. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(1): 62-69.
- [9] Suzuki H, Sawai Y, Suzuki T, Kawai K. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(4): 456-463.
- [10] Jonnadula R, Ghadi SC. Purification and characterization of β -agarase from seaweed decomposing bacterium *Microbulbifer* sp. strain CMC-5. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(3): 513-519.
- [11] Han W, Zhao S, Liu H, Wu Z, Gu Q, Li Y. Isolation, identification and agarose degradation of a polysaccharide-degrading marine bacterium *Persicobacter* sp. JZB09. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 776-783. (in Chinese).
韩文君, 赵帅, 刘会会, 吴志红, 顾谦群, 李越中. 一株多糖降解菌的分离、鉴定与琼脂糖降解能力. *微生物学报*, 2012, 52(6): 776-783.
- [12] Vijayaraghavan R, Rajendran S. Studies on agar degrading *Salegentibacter* sp. and characterization of its agarase. *International Journal of Biosciences*, 2011, 1(5): 56-64.
- [13] Lakshmikanth M, Manohar S, Souche Y, Lalitha J. Extracellular β -agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium *Acinetobacter* sp. AG LSL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(10): 1087-1094.
- [14] Fu X, Lin H, Kim S. Optimization of medium composition and culture conditions for agarase production by *Agarivorans albus* YKW-34. *Process Biochemistry*, 2009, 44(10): 1158-1163.
- [15] 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.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] Temuujin U, Chi WJ, Chang YK, Hong SK. Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type β -agarase-producing Neoagarobiose. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(1): 142-149.
- [18] Chen M, Li H, Chen W, Diao W, Liu C, Yuan M, Li X. Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(7): 702-709. (in Chinese).
陈明霞, 李和阳, 陈维维, 刁伟程, 刘承忠, 袁敏, 李晓虹. 68株北极产蛋白酶菌株的筛选、鉴定及部分酶学性质. *微生物学报*, 2013, 53(7): 702-709.
- [19] Patricia R, Stefanie VT, Fabiano LT, Rafael CSR, Heloiza RB, Paul DV, Carlos AM. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(4): 926-931.
- [20] Elena K, Nina D, Tatyana C, Yuri T. *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(3): 157-162.
- [21] Yang HC, Im WK, Myung SK, Shint DY, Lee ST. *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(1): 81-84.
- [22] Kim HB, Sathiyaraj S, Gayathri S, Quan LH, Kim SH, Thi PNB, Liang ZQ, Kim YJ, Yang DC. *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(7): 1522-1526.
- [23] Kim H, Bram V, Filip P, Liesbeth L, Paul DV. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two airtate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(9): 2056-2061.
- [24] Kobayashi R, Takimasa M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1997, 61(1): 162-163.
- [25] Potin C, Richard P, Rochas C. Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas* sp. agarlyticus (Cataldi) comb. Nov. strain GJ1B. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 214(2): 599-607.
- [26] 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.
- [27] Vishal G, Nitin T, Manoj K, Reddy CR, Bhavanath J. Purification and characterization of exo- β -agarase from an endophytic marine bacterium and its catalytic potential in bioconversion of red algal cell wall polysaccharides into galactans. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 49: 290-298.
- [28] Oh C, Nikapitiya C, Lee Y, Whang I, Kang D, Heo SJ,

- Choi YU, Lee J. Molecular cloning, characterization and enzymatic properties of a novel Beta agarase from a marine isolate *Pseudoalteromonas* sp. AG52. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, 41(4): 876-889.
- [29] Ghazi M, Aziz, Hala M, Ali. Purification and characterization of agarase from *Bacillus* sp. H12. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2013, 5(1): 13-18.
- [30] Shi YL, Lu XZ, Yu WG. A new β -agarase from marine bacterium *Janthinobacterium* sp. SY12. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 2008, 24(11): 2659-2664.
- [31] Feng ZH, Li M. Purification and characterization of agarase from *Rhodococcus* sp. Q5, a novel agarolytic bacterium isolated from printing and dyeing wastewater. *Aquaculture*, 2013, 372-375: 74-79.

Isolation, identification and characterization of an agarase-producing marine bacterial strain *Stenotrophomonas* sp. NTa

Ruiping Ma¹, Yanbing Zhu^{1,2,3*}, Hui Ni^{1,2,3}, Hedong Luo⁴, Anfeng Xiao^{1,2,3}, Huinong Cai^{1,2,3}

¹ College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

² Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology, Fujian Province University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

³ Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian Province, China

⁴ Center for Disease Control and Prevention of Xiamen City, Fujian Province, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To identify and characterize a marine bacterial strain producing agarase. [Methods] The agarase-producing bacterium was isolated from coastal sediments in Xiamen using agar as the sole carbon source. The strain was identified by the analyses of 16S rRNA gene sequence, phenotype and biochemical reactions. Agarase activity was determined by dinitrosalicylic acid method, and the category of agarase was assayed using chromogenic substrate. At last, the characteristics of agarase were determined. [Results] The results of the 16S rRNA phylogenetic, phenotypic and biochemical analyses showed that: the agar-degrading bacterium NTa belonged to the genus *Stenotrophomonas* sp.. The strain could produce extracellular agarases, including α -agarase and β -agarase. The optimum temperature and pH of strain NTa agarase were 40°C and 7.0, respectively. The enzymatic activity was stable below 30°C. It also showed stability over a pH range between 7.0 and 0. Ca^{2+} could activate agarase activity, and Na^+ , K^+ and Mg^{2+} had no significant influence. However, Ag^+ , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} inhibited the enzyme activity. The enzymatic activity of stain NTa agarase was inhibited by EDTA. The agarase had good resistance to some inhibitors, detergents and denaturant. [Conclusion] *Stenotrophomonas* sp. NTa is a new type of agarase-producing strain, which can produce both α -agarase and β -agarase and has potential applications in the production of agaro-oligosaccharide.

Keywords: *Stenotrophomonas* sp., agarase, identification, characterization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271914), by the Science and Technology Program of Xiamen(201303120001), by the Projects of Xiamen Southern Ocean Technology Center of China (13GZP004NF10) and by the Foundation for Innovative Research Team of Jimei University (2010A006)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6181736; Email: yanbingzhu@163.com

Received: 4 September 2013 / Revised: 13 December 2013