

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1126 - 1132; 4 September 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150127

一株转化琼胶为新琼寡糖菌株的筛选及鉴定

韩军萍, 黄雅燕, 叶静, 肖美添*

华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021

摘要:【目的】筛选一株可以将琼胶转化为新琼寡糖的菌株, 并对该菌株进行鉴定。【方法】从紫菜生长区域采集紫菜和该区域海水, 用含 1‰ 琼胶的培养基富集培养, 逐级稀释涂布、平板划线进行初筛, 液体培养进行复筛, DNS 法测定琼胶降解产物中还原糖的含量。通过 16S rDNA 序列分析, 结合菌体形态、菌落特征及生理生化特性, 确立该菌的系统发育学地位。【结果】从紫菜振荡液中筛选出一株可以产琼胶酶的菌株 HJPHYXJ-1, 该菌属于革兰氏阴性菌, 16S rDNA 序列同源性与需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*) 的达到了 99%, 结合形态特征和生理生化实验结果鉴定该菌为需钠弧菌。HPLC 法测定酶解产物为新琼寡糖。【结论】HJPHYXJ-1 被筛选用于转化琼胶, 酶解产物的聚合度在 2 - 12 之间, 是以二糖为单位的新琼寡糖, 该菌产生的酶为 β -琼胶酶。

关键词: 琼胶, 新琼寡糖, 酶解, 需钠弧菌

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209(2015)09-1126-07

琼胶(亦称“琼脂”)作为世界三大工业海藻胶之一, 是一类以半乳糖为主要成分的高分子多糖, 它是由中性的琼脂糖和酸性的琼胶酯组成的多糖混合物。琼脂糖是由 $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键连结的 β -D-半乳糖和 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连结的 3,6-内醚- α -L-半乳糖交替连接而成的线性多聚物; 琼胶酯由复杂的长短不一的半乳糖残基的多糖链组成, 包含多种取代基如硫酸基、甲基^[1], 其结构具体细节尚不清楚。

琼胶黏度高, 水溶性低, 不易被吸收, 在应用方面受到较大限制^[2]。研究表明琼胶经琼胶酶降解得到的琼胶寡糖具有较高的利用价值: 琼胶寡糖能够抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 从而抑制血糖升高^[3]; 琼胶寡糖可作为一种新的益生元^[4], 促进双歧杆菌

和乳酸杆菌等肠道有益菌的生长, 抑制病原菌和腐败菌等有害菌的生长, 从而提高人体免疫力; 琼胶寡糖能够将细胞周期阻滞在 S 期, 从而促进静脉内皮细胞凋亡, 进而抑制血管形成, 达到抗肿瘤的目的^[5]; 琼六糖能够抑制肝细胞内活性氧的爆发, 从而减少细胞的氧化损伤^[6]。Enoki 等^[7]研制由琼二糖等组成的防腐剂, 可用于食品和饮料的保鲜, 有效防止其色变、腐败及氧化等。琼胶寡糖可以通过阻止可诱导性 NO 合成酶 (iNOS) 的表达来抑制过量 NO 自由基的产生, 从而消除 NO 过量造成的损伤, 治疗一些炎症类疾病, 如关节炎等^[8]。

琼胶寡糖有重要的应用价值, 但琼胶寡糖的制备方法如酸解法、衍生法、氧化还原降解法都存在产物不均一、重复性差、对环境污染程度大等缺点,

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目 (201305015-2, 201505026-5); 福建省自然科学基金项目 (2015J01598)

* 通信作者。Tel: +86-592-6162285; E-mail: mt Xiao@hqu.edu.cn

作者简介: 韩军萍 (1989 -), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事海洋资源高值化利用研究。E-mail: 1115230082@qq.com

收稿日期: 2015-03-23; **修回日期:** 2015-05-08

而酶解法制备琼脂寡糖具有催化效率高、产物专一性好、反应条件温和、产物易控制、无污染等诸多优势,因此琼胶酶具有重要的研究价值。根据琼胶酶的作用方式不同,把琼胶酶分为两类: α -琼胶酶,作用于琼脂糖的 $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键,酶解产物为琼胶寡糖(Agaro-oligosaccharides),该糖以3,6-内醚- α -L-半乳糖残基为还原性末端^[9](其结构如图1-A); β -琼胶酶,作用于琼脂糖的 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键,酶解产物为新琼寡糖(Neoagaro oligosaccharides),该糖以 β -D-半乳糖残基为还原性末端^[10-11](其结构如图1-B)。

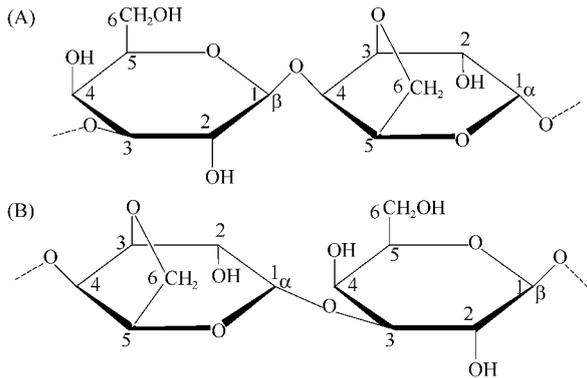


图1. 琼二糖结构(A)和新琼二糖结构(B)

Figure 1. Structure of agarobiose (A) and neoagarobiose (B).

目前已经分离出能够降解琼胶的菌主要来自于海洋,如弧菌属(*Vibrio*)^[12]、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)^[13]、交替单胞菌属(*Alteromonas*)^[14]、噬琼脂菌属(*Agarivorans*)^[15]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[16]等。这些已报道的菌株产酶酶活都较低,不利于产业化应用。

本文拟从紫菜生长区域紫菜或该区域海水中筛选一株可以降解琼胶为琼胶寡糖的高效菌株,并对其进行分类、鉴定,为琼胶寡糖的工业化生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌源:用无菌容器从龙海某紫菜养殖区采集有根和无根两种紫菜以及该水域海水,作为分离源。

1.1.2 培养基:(1)2216E海洋细菌培养基(g/L):酵母提取物1.00,蛋白胨5.00,牛肉膏1.00,磷酸铁0.01,合成海水:NaCl 24.00, MgCl₂·6H₂O 11.00, Na₂SO₄ 4.00, CaCl₂·6H₂O 2.00, KCl 0.70, KBr

0.10, H₃BO₃ 0.03, NaSiO₃·9H₂O 0.005, SrCl₂·6H₂O 0.04, NaF 3.00, NH₄NO₃ 2.00, FePO₄·6H₂O 0.001, 蒸馏水,调pH7.8。(2)富集培养基:加1%琼脂的2216E培养基;(3)固体培养基:加15%琼脂的2216E培养基;(4)液体培养基:不加琼脂的2216E培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器:新琼寡糖标准品:新琼二糖,新琼四糖,新琼六糖,新琼八糖,新琼十二糖(青岛博智慧力生物科技有限公司);三羟甲基氨基甲烷(BR,国药集团化学试剂有限公司);25%戊二醛(AR,西陇化工股份有限公司);乙酸异戊酯(AR,国药集团化学试剂有限公司)。分析型液相色谱仪(美国Agilent 1010),糖柱(日本Shodex Sugar KS-802,6 μm,300 mm×8.0 mm),离心机(上海安亭科学仪器厂,TGL-12B),扫描电子显微镜(日立SU8010),玻璃砂芯过滤装置,光学显微镜(日本Olympus Corporation, BX51),恒温培养箱(广东省医疗器械厂,LRH-250-Z),振荡培养箱(上海欣蕊自动化设备有限公司),紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司UV-1800)。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 富集培养:含琼胶1%的2216E培养基50 mL分装于250 mL锥形瓶中,取少量有根紫菜和无根紫菜剪碎,以无菌水振荡30 min,然后将该振荡液和采集到的海水接种到富集培养基中,富集培养2-3代。

1.2.2 初筛:含15%的琼脂的2216E培养基倒平板,将富集培养的菌液进行10⁻¹-10⁻⁸逐级稀释,将10⁻⁷、10⁻⁸两个稀释度的菌液涂平板,平板培养48 h后用卢戈氏碘液染色观察,能够产生琼胶酶的菌株能够降解琼胶,琼胶被降解后,不能被卢戈氏碘液染色,因此会产生明显的透明圈,将能产生透明圈的菌株平板划线分离纯化,留待后续复筛使用。

1.2.3 复筛:将2216E培养基50 mL分装于250 mL的锥形瓶中,将平板划线分离得到的菌种接到分装好的液体培养基中,30℃恒温培养24 h后,以10%的接种量接种到90 mL 2216E培养基中,30℃恒温培养48 h后,离心(10621×g,10 min),收集上清液,0.22 μm滤膜过滤除菌,DNS法^[17]测定粗酶活。将酶活最高的菌株加30%甘油保存于-80℃冰箱中,备用。

1.3 液相色谱检测条件

流动相:水;流速:0.5 mL/min;柱温:80 °C;检测器:示差检测器;色谱柱:糖柱(日本 Shodex Sugar KS-802 6.0 μm, 300 mm × 8.0 mm)。

将琼胶寡糖标准品配成质量浓度 1.0% 的溶液,各取 300 μL 混合均匀,经 0.22 μm 滤膜过滤,液相色谱检测。将酶解液稀释 10 倍,经 0.22 μm 滤膜过滤,液相色谱检测,与标准品的保留时间比对,确定酶解产物的分子量分布。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 形态生理生化特征:菌落形态采用普通的肉眼观察,菌体形态观察采用光学显微镜(10 × 100)和扫描电子显微镜,并辅助革兰氏染色。生理生化特征的检测方法见《常见细菌系统鉴定手册》^[18]。

1.4.2 菌株的 16S rDNA 序列分析:使用 SK 1201 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒抽提细胞的全基因组,之后采用通用 27F/1492R 引物(正向引物 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; 反向引物 5'-GGTACCTGTACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,PCR 扩增条件:98 °C 5 min;94 °C 35 s, 55 °C 35 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 8 min。扩增产品用 SK 1131 柱式 DNA 胶试剂盒纯化后,委托北京三博远志生物技术有限公司测序。测序得到的 16S rDNA 序列上交 NCBI 核酸序列库,通过 BLAST 比对从 GenBank 搜索与该菌株比较接近的菌株,通过 Clustal X 软件进行序列比对,MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建进化树。结合形态生理生化特征的检测结果以及 16S rDNA 分析确定所得菌株的种属关系。

1.5 菌种粗酶活力的测定

1.5.1 标准曲线:配制浓度为 1.00 g/L 的半乳糖标准溶液,分别取 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL 该半乳糖溶液,用蒸馏水补足至 1.00 mL,分别加入 2.00 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,冷却,用蒸馏水定容至 10 mL,在 540 nm 下测其吸光度,绘制标准曲线,标准曲线如下: $y = 1.59171x - 0.0144$, $R^2 = 0.998$ 。

1.5.2 粗酶活的测定:取 100 μL 粗酶液,向其中加入 900 μL 质量浓度为 0.20% 的琼胶(pH7.5 的 Tris-HCl 溶解),控制酶解温度为 37 °C,酶解 30 min 后,加 2 mL DNS 停止反应,煮沸 5 min,冷却,定容

到 10 mL,以灭活的粗酶液为对照,在 540 nm 下测吸光度,依据半乳糖标准曲线计算粗酶活。定义 1 mL 粗酶液 1 min 产生 1 μg 还原糖为一个活力单位,酶活力公式为:

$$\text{酶活力 (U/mL)} = 1000 \text{ n}\Delta A / (k \cdot t)^{[19]}$$

式中:ΔA 为还原糖的吸光值,n 为酶液的稀释倍数,t 为酶的反应时间(min),k 为标准曲线的斜率。

1.6 产酶条件的优化

1.6.1 生长曲线的测定:测定波长是经全波长扫描确定的最佳吸收波长 410 nm,在此波长下,前 2 h 每小时测 1 次菌液的吸光度,后每 2 h 测 1 次菌液的吸光度,绘制该菌的生长曲线。

1.6.2 最佳接种龄的确定:取一环菌种接种至 50 mL 液体培养基中,在培养至 4、6、8、10 和 12 h 时分别取 10 mL 接种到 90 mL 液体培养基中,培养 48 h,通过粗酶液转化琼胶为琼胶寡糖的含量来确定最佳接种龄。

1.6.3 最适接种量的确定:取一环菌种接种至 50 mL 液体培养基中,培养至 8 h 时,分别以 6%、8%、10%、12% 和 15% 的接种量接种至液体培养基中,使最终的体积为 100 mL,培养 48 h,通过粗酶液转化琼胶为琼胶寡糖的含量来确定最适接种量。

2 结果和分析

2.1 菌种的筛选结果

富集培养液稀释涂平板培养 24 h 后,共得到 10 个不同形态的单菌落,以卢戈氏碘液染色观察,有 1 株菌有明显的透明圈。图 2 为富集培养后菌株的卢戈氏碘液染色图片。将这 10 菌株平板划线分离纯培养 24 h 后,将纯化后的菌株进行液体培养,DNS 法测粗酶活,将酶活最高的菌株加 30% 的甘油保藏于 -80 °C 冰箱中。

2.2 HPLC 检测结果

图 3-A 为 HJPHYXJ-1 酶解产物的高效液相色谱图,图 3-B 为新琼寡糖标准品的高效液相色谱图,分子量大的组分先出峰,新琼寡糖标准品出峰先后顺序是:新琼十二糖、新琼八糖、新琼六糖、新琼四糖、新琼二糖。通过与标准品的对照可知,酶解得到的新琼寡糖分子量范围在 342 - 1962 之间,酶解产物为以二糖为单位的新琼寡糖,即该菌产生的酶为 β-琼胶酶。



图 2. 菌落的卢戈氏碘液染色

Figure 2. The Lugol's iodine staining of the colonies on agarose.

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 菌株的形态特征及生理生化特征：
HJPHYXJ-1 为一株革兰氏阴性菌，弧菌属，兼性厌氧菌。显微镜下菌体长度约 $1 \mu\text{m}$ 。依照《常见细菌系统鉴定手册》，HJPHYXJ-1 与需钠弧菌的生理生化指标对照表如表 1 所示。图 4 为该菌扫描电子显微镜镜检图片。

2.3.2 菌株 HJPHYXJ-1 的 16S rDNA 序列分析：
以菌株 HJPHYXJ-1 基因组 DNA 为模板，采用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增，扩增得到的序列测序之后递交 NCBI 基因库。该序列共 1386 bp，通过 BLAST 比对，对菌株 HJPHYXJ-1 进行系统分类。菌株 HJPHYXJ-1 (KR181948) 与菌株 *Vibrio natriegens* (FR846237) 相似性达到 99% 以上，菌株 HJPHYXJ-1 的系统发育学进化地位见图 5。

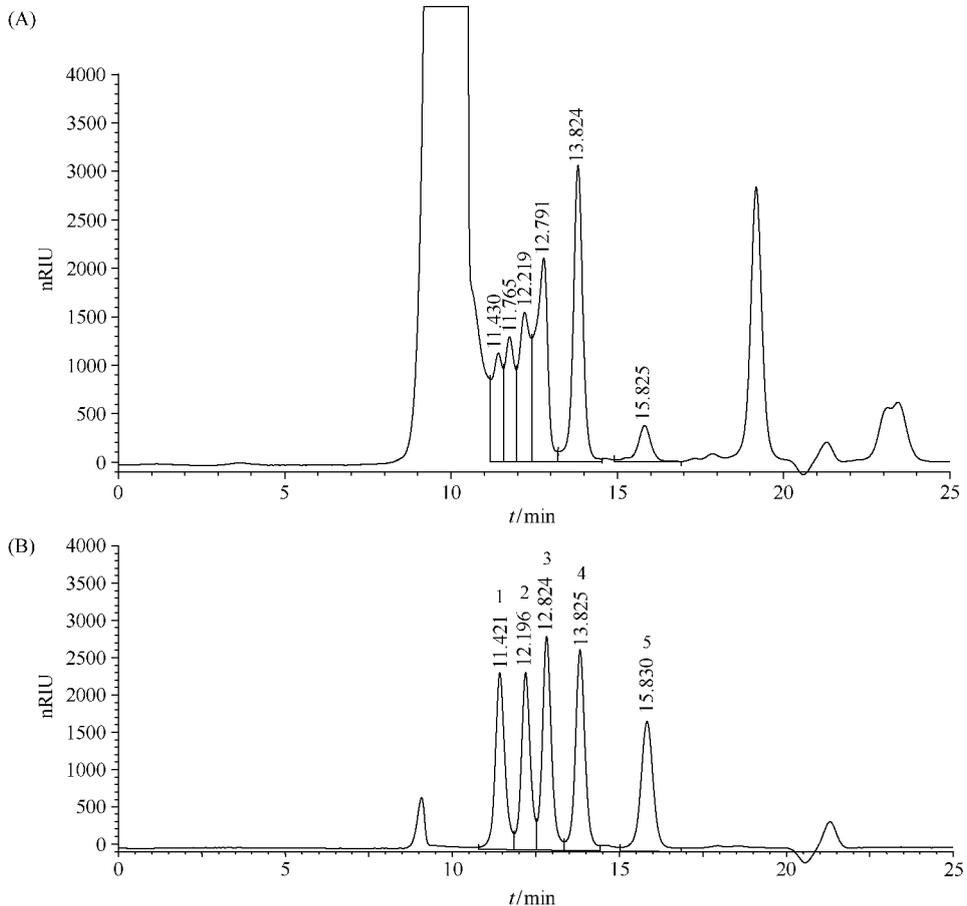


图 3. 酶解制备的新琼寡糖 (A) 和新琼寡糖标准品 (B) 高效液相色谱图

Figure 3. High liquid chromatograms of enzymatic product of neoagaro oligosaccharides (A) and neoagaro oligosaccharides standards (B). 1: neoagaro dodecaose, 2: neoagaro octaose, 3: neoagaro hexaose, 4: neoagaro tetraose, 5: neoagaro biose.

表 1. HJPHYXJ-1 与需钠弧菌的生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of strains HJPHYXJ-1 and *Vibrio natriegens*

Test item	HJPHYXJ-1	<i>Vibrio natriegens</i>	Test item	HJPHYXJ-1	<i>Vibrio natriegens</i>
Growth with Na ⁺	+	+	D-galactose	+	+
Straight rod shaped	+	+	Lactose	+	-
Nitrate reduction	+	+	L-rhamnose	+	+
O/F	+	-	D-sorbitol	-	+
Arginine dihydrolase	-	+	D-xylose	-	-
Gelatinase	d	d	Saccharose	+	+
Lipase	+	+	glycine	+	+
Ethanol	+	+	L-proline	+	+
D-cellobiose	+	d	L-tyrosine	d	d
D-mannitol	+	+			

+ : growth; - : not growth; d: partial growth.

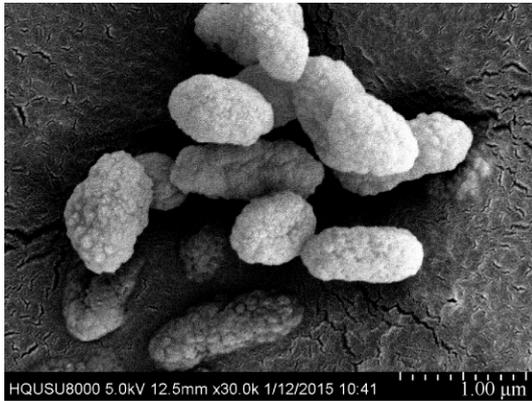


图 4. 菌株 HJPHYXJ-1 的扫描电子显微镜 (30000 ×)

Figure 4. EM image of HJPHYXJ-1 (30000 ×).

结合该菌的 16S rDNA, 生理生化指标, 革兰氏染色以及细菌形态进行分析, 最终将 HJPHYXJ-1 菌株确定为弧菌 (*Vibrio*)。

2.4 菌株 HJPHYXJ-1 的琼胶酶粗酶活力

菌株 HJPHYXJ-1 表现出较高的琼胶酶产酶活力, 经测定该菌的粗酶活力为 103 U/mL, 据目前文献报道, 产琼胶酶的菌株酶活都不高, 限制了琼胶寡糖的大量制备, 在相同的酶活定义下, 该株菌的酶活高于文献报道的其他菌株。因此经进一步优化产酶条件和酶解条件, 本工作菌株有望成为琼胶酶工业生产的出发菌株。

2.5 产酶条件的优化

2.5.1 生长曲线的测定: 通过浊度法测定, 该菌在培养 2 h 时进入对数生长期, 到 10 h 进入稳定期, 对

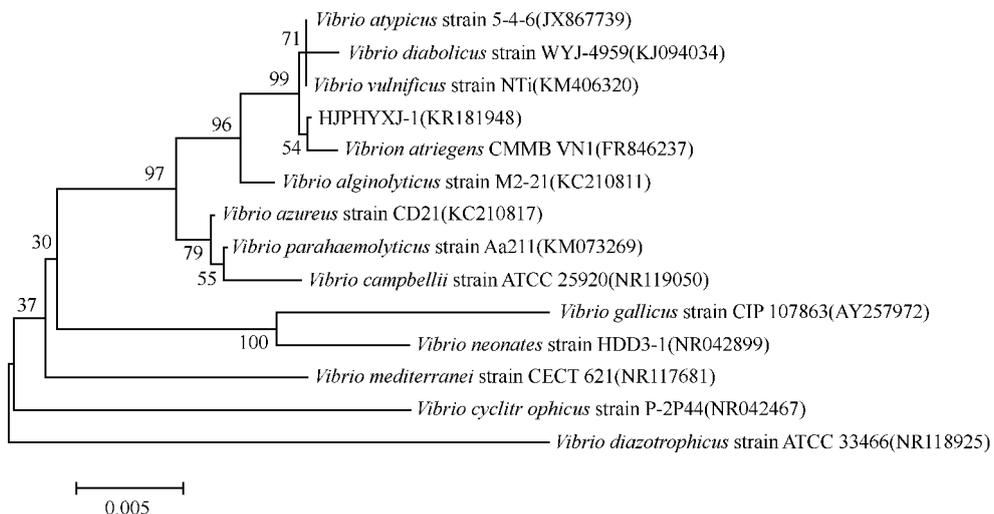


图 5. 菌株 HJPHYXJ-1 与其近缘菌株的 16S rDNA 亲缘关系图

Figure 5. Phylogenetic tree based on 16 S rDNA similarity of strain HJPHYXJ-1 and reference strains. Numbers in parenthesis represents GenBank accession numbers; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1000 replications data sets, Bar 0.0005 at the bottom is the sequence divergence.

数生长期的中期是从 4 h 开始。

2.5.2 最佳接种龄和最适接种量的确定:由表 2 可知,将种子液培养至 8 h 转接,转化得到的还原糖含量最高,所以认为最佳接种龄为 8 h。若要放大生产,接种龄还要根据实际情况重新确定。结果显示(表 2),以 10% 的接种量将种子液接种到液体培养基中,粗酶液转化琼胶为琼胶寡糖的含量最高,所以认为接种量 10% 为最适接种量。

表 2. 菌株的最佳接种龄和最适接种量

Table 2. The optimum inoculation age and the optimum inoculation concentration of HJPHYXJ-1

Optimization of fermentation conditions		The amount of reducing agar/(mg/L)
Inoculation / (age/h)	4	654.25
	6	664.15
	8	714.00
	10	650.11
	12	620.46
Inoculation concentration / %	6	534.53
	8	575.19
	10	647.29
	12	568.28
	15	457.06

3 小结

本文筛选的 *Vibrio natriegens* HJPHYXJ-1 可将琼胶转化为新琼寡糖,这是该菌首次被用于转化琼胶为新琼寡糖。HPLC 法测定该菌的酶解产物为新琼寡糖,分子量范围在 342 - 1962 之间,是以新琼二糖为结构单位的一系列偶数低聚糖。对该菌的产酶条件进行了优化,优化后该菌的粗酶活力达到 103 U/mL。若要提高该菌的产酶量,还可对产酶条件进一步考察,比如培养基的组成和溶氧量等。酶解条件的优化需要考察加酶量、底物浓度、酶解温度、酶解 pH、酶解时间等因素。

参考文献

[1] Marinho S. Agar polysaccharides from *Griacilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *Journal of Biotechnology*, 2001, 89(1): 81-84.

[2] Liu M, Mei J, Yi Y, Chen J, Ying G. Advances in study on biological activities of agaro-oligosaccharide. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2008, 15(6): 493-496. (in Chinese)

刘美英,梅建凤,易喻,陈建澍,应国清. 琼胶寡糖生物活性的研究进展. *药物生物技术*, 2008, 15(6): 493-496.

- [3] Chen H, Yan X. Effects of agar-oligosaccharides on blood glucose level and oxidation-antioxidation status of diabetic mice. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2008, 28(2): 152-155. (in Chinese)
陈海敏,严小军. 琼脂寡糖对糖尿病小鼠血糖和氧化-抗氧化态的效应. *营养学报*, 2008, 28(2): 152-155.
- [4] Yu W, Wang Y, Hu B, Li J, Han F, Lu X. The application of neoagaro-oligosaccharides as prebiotic properties. China: CN1593433. 2005-03-06. (in Chinese)
于文功,王晔,胡斌,李京宝,韩峰,路新枝. 琼胶寡糖作为益生元的应用. 中国: CN1593433. 2005-03-06.
- [5] Chen H, Yan X, Wang F, Lin J, Xu W. Study on the anti-angiogenic role of agar-oligosaccharides. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2007, 29(4): 405-410. (in Chinese)
陈海敏,严小军,王峰,林晶,徐炜峰. 琼胶寡糖抑制血管形成作用的研究. *营养学报*, 2007, 29(4): 405-410.
- [6] Zhao X, Xue C, Xu Q, Xu J, Li Z, Lin H. Antioxidant abilities of agar oligosaccharides. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 280-282. (in Chinese)
赵雪,薛长湖,徐强,许佳超,李兆杰,林洪. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 280-282.
- [7] Enoki T, Sagawa H, Tominaga T, et al. Drugs, foods or drinks with the use of algae-derived physiologically active substances. US: 6911432152. 2005-06-28.
- [8] Takara Co. Red seaweed-derived natural oligosaccharided discovered to possess cancer suppress properties. *Press Release*. 1998-06-03.
- [9] Flament D, Barbeyron T, Jam M, Potin P, Czjzek M, Kloareg B, Michel G. Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarases families. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14): 4691-4694.
- [10] Duckworth M, Turvey JR. An extracellular agarase from a *Cytophase* species. *Biochemical Journal*, 1969a, 113: 139-142.
- [11] Duckworth M, Turvey JR. The specificity of an agarase from a *Cytophase* species. *Biochemical Journal*, 1969b, 113: 693-697.
- [12] Araki T, Lu Z, Morishita T. Optimization of parameters

- for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Journal of Marine Biotechnology*, 1998b, 6: 193-197.
- [13] Vera J, Alvarez R, Murano E, Slebe JC, Leon O. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (11) : 4378-4383.
- [14] Leon O, Quintana L, Peruzzo G, Slebe JC. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (12) : 4060-4063.
- [15] Hu Z, Lin BK, Xu Y, Zhong MQ, Liu GM. Production and purification of agarase from a marine agarolytic bacterium *Agarivorans* sp. HZ105. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 106 (1) : 181-190.
- [16] Morrice LM, McLean MW, Williamson FB, Long WF. Beta-agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*, purifications and some properties. *European Journal of Biochemistry*, 1983, 135 (3) : 553-558.
- [17] Wang J, Nie G, Li S, Xie Y, Cao X. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS m. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2010, 4: 115-118. (in Chinese)
王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 谢艳敏, 曹香林. DNS法测定还原糖含量时最适波长的确定. 河南农业科学, 2010, 4: 115-118.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001: 111-113.
- [19] Lu B, Ke C, Yang M. Isolation and identification of a bacterium MA-B22 producing agarase and the optimal cultivation of enzyme production. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33 (6) : 1037-1043. (in Chinese)
卢斌, 柯才焕, 杨明. 一株高产琼胶酶菌株 MA-B22 的分子鉴定与产酶条件优化. 水产学报, 2009, 33 (6) : 1037-1043.

Screening and identification of a bacterium capable of converting agar to neoagaro oligosaccharides

Junping Han, Yayan Huang, Jing Ye, Meitian Xiao*

College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To screen and identify a bacterium capable of converting agar to neoagaro oligosaccharides. [Methods] We took samples of porphyra haitanensis and nearby seawater, and then used the medium containing 1% agar to enrich the target bacteria. The target isolates were obtained by dilution-plate method, of which crude enzymes were further obtained by liquid culture. We adopted DNS method to determine the target bacteria which can convert agar to neoagaro oligosaccharides. The phylogenetics was identified by analyzing 16S rDNA sequence and combining the strain's morphological and bacterial colonial physiological biochemical characteristics. [Results] We isolated a gram-negative bacterial strain HJPHYXJ-1 capable of transforming agar to neoagaro oligosaccharides. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search of HJPHYXJ-1's 16S rDNA sequence on GenBank suggested that the similarity between this strain and *Vibrio natriegens* reached 99%. In addition, the morphological and physiological biochemical characteristics of HJPHYXJ-1 also showed highly similarity to *Vibrio natriegens*. So we identified HJPHYXJ-1 as *Vibrio natriegens*. The results of HPLC suggested that the metabolite of enzymatic degradation was neoagaro oligosaccharides. [Conclusions] HJPHYXJ-1 or the new isolate of *Vibrio natriegens* was capable of converting agar to neoagaro oligosaccharides.

Keywords: agar, neoagaro oligosaccharides, enzymatic degradation, *Vibrio natriegens*

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the Special Fund for Marine Research in the Public Interest (201305015-2, 201505026-5); Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J01598)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6162285; E-mail: mt Xiao@hqu.edu.cn

Received: 23 March 2015/Revised: 8 May 2015