



## 褐藻胶降解菌的筛选、鉴定及产酶条件优化

赵婉琳<sup>1</sup>, 叶静<sup>1,2</sup>, 张娜<sup>1,2</sup>, 肖美添<sup>1,2</sup>, 赵鹏<sup>1,2\*</sup>, 黄雅燕<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021

<sup>2</sup> 厦门市海洋资源综合利用工程技术研究中心, 福建 厦门 361021

**摘要:**【目的】筛选一株能降解褐藻胶的菌株, 并优化产酶条件以提高褐藻胶裂解酶活力。【方法】从漳州海域采集到海水和海泥, 以海藻酸钠为唯一碳源, 通过富集培养、初筛、复筛筛选到一株能够降解褐藻胶的菌株。依据 16S rRNA 序列分析、生理生化特征、菌体形态及菌落特征对该菌进行鉴定。通过单因素和正交试验对该菌的产酶条件进行优化。【结果】该菌属于海科贝特氏菌, 命名为 *Cobetia marina* HQZ08。该菌株最佳的产酶培养基组成为: 海藻酸钠 7.00 g/L、蛋白胨 3.00 g/L、NaCl 30.00 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.25 g/L。最佳发酵条件为: 接种量 2%, 接种龄 12 h, 培养基起始 pH 为 7.0, 培养温度 25 °C, 培养时间 24 h。优化后褐藻胶裂解酶活力达到 68.5 U/mL, TLC 法分析酶解产物为褐藻胶寡糖。【结论】HQZ08 菌株可以用于降解褐藻胶, 产生聚合度为 2–6 的褐藻胶寡糖。

**关键词:** 褐藻胶裂解酶, 海科贝特氏菌, 褐藻胶寡糖

褐藻胶包括水溶性的海藻酸钠和水不溶性的海藻酸及其与 2 价以上金属离子结合的褐藻酸盐类, 主要以海藻酸盐的形式存在于褐藻细胞壁中。它由  $\alpha$ -1,4-L 古罗糖醛酸(G)和它的 C5 差向异构体  $\beta$ -1,4-D 甘露糖醛酸(M)两种糖醛酸单体聚合而成, 组成方式主要有 3 种: MM 片段, GG 片段和杂聚的 MG 片段<sup>[1–3]</sup>。由于褐藻胶水溶性较差, 不易被人体吸收, 限制了褐藻胶的应用。而近年来低分子量的褐藻胶寡糖逐渐受到人们的关注, 其

多种生物活性被逐渐挖掘。

褐藻胶经降解可得到褐藻胶寡糖, 和褐藻胶相比具有分子量低、溶解性强、机体吸收利用率高、稳定性好及安全无毒等理化特性<sup>[4]</sup>。研究表明褐藻胶寡糖能够抑制原代培养的皮肤成纤维细胞的增殖及胶原蛋白的表达<sup>[5]</sup>, 刺激人类角质细胞的增殖<sup>[6]</sup>, 另外在免疫调节、抗肿瘤、抑菌、抗炎及促生长方面的研究也取得一定的进展<sup>[7–11]</sup>。褐藻胶寡糖不但可以保湿, 而且具有清除人体细胞多余

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201505026-5); 福建省高校产学研合作重大项目(2018N5008); 泉州市科技计划重点项目(2015Z140)

\*通信作者。赵鹏, Tel: +86-592-6161589, E-mail: zhaopeng@hqu.edu.cn; 黄雅燕, E-mail: yyhuang@hqu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-10; 修回日期: 2018-07-05; 网络出版日期: 2018-08-20

的自由基、有效抵抗人体衰老的作用<sup>[12-13]</sup>。褐藻胶寡糖的制备方法主要有酶降解法、物理和化学降解法。酶解法是一种条件温和和可控性强和特异性高的生物降解方法,降解产物活性高。褐藻胶裂解酶通过 $\beta$ -消除反应催化褐藻胶 1-4 糖苷键的断裂,在六元碳环的 C4、C5 之间产生双键<sup>[14]</sup>。酶降解法中的褐藻胶裂解酶主要来源于海洋细菌、真菌、海洋软体动物、海洋藻类和土壤微生物<sup>[15]</sup>。目前已发现的产褐藻胶裂解酶的海洋细菌有 50 多种,如假单胞菌(*Pseudomonas* sp. QD03)<sup>[16]</sup>、固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)<sup>[17]</sup>、黄杆菌(*Flavobacterium* sp. LXA)<sup>[18]</sup>、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. CY24)<sup>[19]</sup>、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp. strain A1)<sup>[20]</sup>、弧菌(*Vibrio* sp. QY102)<sup>[21]</sup>等。

本研究从海水和海泥中筛选出 1 株具有褐藻胶裂解酶活力的菌株,利用 16S rRNA 鉴定其为海科贝特氏菌,并对其产酶条件进行优化,为褐藻胶寡糖的酶法制备提供支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**海水及海泥从漳州海域采集。

**1.1.2 培养基<sup>[22-23]</sup>:**(1) 富集培养基(g/L):海藻酸钠 5.00,硫酸铵 5.00,氯化钠 25.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, pH 7.2。(2) 初筛培养基(g/L):海藻酸钠 5.00,硫酸铵 5.00,氯化钠 25.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 琼脂 15 g, pH 7.2。(3) 种子和初始发酵培养基(g/L):海藻酸钠 5,蛋白胨 5,酵母提取粉 1,氯化钠 30, pH 7.5。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**Silica gel 60F<sub>254</sub> 硅胶板(Merck 公司),其他试剂均为国产分析纯试剂。离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, H1650-W),光学显微镜(日本 Olympus Corporation, BX51),紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司 UV-1800),扫描电子显微镜(日本日立, S4800),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)。

### 1.2 菌种的筛选

**富集培养:**在 250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 富集培养基,取少量海泥加入无菌水振荡 30 min,然后将振荡液和采集的海水各 5 mL 分别接种到 50 mL 富集培养基中,30 °C 培养 48 h。

**初筛:**初筛培养基倒平板,将富集培养的菌液进行  $10^{-1}$ – $10^{-7}$  梯度稀释,对  $10^{-3}$ – $10^{-7}$  稀释度的菌液进行涂布,30 °C 培养 48 h。观察菌落周围透明圈大小,选取生长状况良好且透明圈较大的菌株为出发菌株,进行平板划线分离纯化。

**复筛:**在 250 mL 的锥形瓶中装入 50 mL 液体种子培养基,将初筛得到的菌种分别接种到种子培养基中,30 °C 恒温培养 24 h 后,以 2% 的接种量接种到发酵产酶培养基中,30 °C 恒温培养 24 h 后,离心收集上清液,使用 DNS 法测定酶活力。将酶活力最高的菌株摇瓶培养,其菌液和 40% 甘油 1 : 1 混合,于 -80 °C 冰箱存放。

### 1.3 褐藻胶裂解酶活力的测定方法

参照 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法<sup>[24]</sup>并做了适当修改:100  $\mu\text{L}$  粗酶液,加入 900  $\mu\text{L}$  0.3% 的褐藻胶溶液(25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 7.5)中,在 40 °C 恒温水浴锅中反应 5 min,加入 2 mL 的 DNS 试剂停止反应,沸水煮沸 5 min。流水冷却,定容到 10 mL,测定 540 nm 处的吸光度。酶活力

(U/mL)定义为:1 mL 粗酶液每分钟催化产生 1  $\mu$ g 还原糖所需的酶用量定义为 1 个酶活力单位。

## 1.4 菌株的鉴定

**1.4.1 细菌的形态结构观察及生理生化特征试验:**固体平板培养基上观察菌落形态,在光学显微镜和扫描电子显微镜下观察菌体形态。部分生理生化特征鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[25]</sup>。

**1.4.2 16S rRNA 序列鉴定**<sup>[26]</sup>:菌株 *Cobetia marina* HQZ08 基因组采用细菌基因组试剂盒进行提取,之后采用通用 27F/1492R 引物(正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 的 PCR 扩增,PCR 扩增条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s;55 °C 30 s;72 °C 60 s;35 个循环;72 °C 10 min。测序得到的 16S rRNA 序列提交到 NCBI 核酸序列库进行 BLAST 比对,从 GenBank 搜索与该菌株亲缘关系最近的菌株确定其种属,并使用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建进化树。

## 1.5 菌株产酶条件的优化

对培养基组分进行优化,包括碳源种类、最适碳源浓度、氮源种类、最适氮源浓度、NaCl 浓度和金属离子;并进一步对褐藻胶、蛋白胨、NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 四个因素进行正交实验,在优化的产酶培养基基础上改变接种量、接种龄、培养基初始 pH、培养温度、培养时间,探究其对菌株产酶能力的影响。除考察培养时间因素外,其余条件的发酵时间均为 24 h,所有试验均设 3 个平行,前一步优化的条件用于下一步试验中。

## 1.6 酶解产物分析

取 1%褐藻胶溶液 35 °C 酶解 44 h,使用 TLC 法对酶解产物进行分析。展开剂为正丁醇:甲酸:水=4:6:1,显色剂为苯胺/二苯胺/磷酸溶

液(1 mL HCl、2 mL 苯胺、2 g 二苯胺、10 mL 85% 磷酸溶液溶于 100 mL 丙酮中)。将酶解液在硅胶板上点样,室温吹干,放入层析缸中用展开剂将其展开,待展开剂接近硅胶板上侧 1 cm 左右时取出吹干,放入显色剂中,取出,热风吹干显色。

# 2 结果和分析

## 2.1 褐藻胶降解菌株的筛选

通过初筛,从海水和海泥中共筛选出 9 株能在以海藻酸钠为唯一碳源的固体平板培养基上生长且形成透明圈的菌株,对 9 种菌株进行摇瓶复筛,取上清测其酶活力。结果表明菌株 HQZ08 发酵液酶活力最高,经过 5 代传代培养后证明该菌株产酶能力较稳定,可以作为后续实验的研究对象。

## 2.2 菌株 HQZ08 的鉴定

**2.2.1 生理生化及形态学鉴定:**菌株 HQZ08 在平板上培养 24 h 后菌落形态如图 1-A 所示,菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,颜色为乳白色,革兰氏染色鉴定结果为阴性。扫描电子显微镜观察菌体长度约 1  $\mu$ m,呈直杆状,图 1-B 为该菌扫描电子显微镜镜检图片。HQZ08 与 Arahal 等<sup>[27]</sup>描述的海科贝特氏菌模式菌株 *Cobetia marina* DSM 4741<sup>T</sup> 的生理生化特征比较如表 1 所示。二者的生理生化特征绝大多数相似,而利用“lactose”发酵时结果却不同,可能是因为二者的同源相似性虽然达 99%,但仍有些微差异,该差异导致利用“Lactose”的结果不同。刘旭梅等<sup>[28]</sup>筛选的菌株 *Cobetia* sp. 利用 Lactose 的结果与本实验结果相同,另外也有文献<sup>[29]</sup>表明筛出的菌株和伯杰手册中描述的菌株生化特征不同的情况。

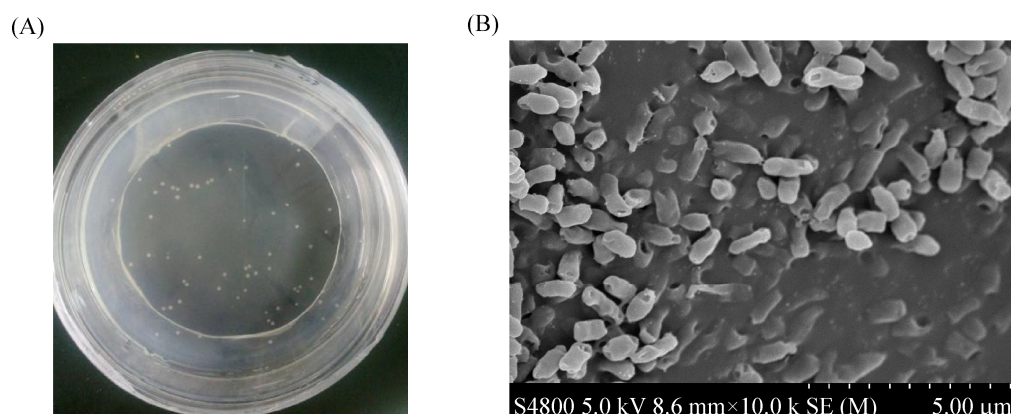


图 1. 菌株 HQZ08 的形态学特征

Figure 1. Morphological characteristics of strain HQZ08. A: Colony morphology; B: SEM of HQZ08.

表 1. 菌株 HQZ08 的生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of strain HQZ08

Test item	HQZ08	<i>Cobetia marina</i>	Test item	HQZ08	<i>Cobetia marina</i>
Growth with Na <sup>+</sup>	+	+	V-P	-	ND
Straight rod shaped	+	+	Lactose	+	-
Nitrate reduction	-	-	Saccharose	-	-
O/F	+	ND	Arabinose	-	-
Catalase	+	ND	D-fructose	+	+
Gelatinase	-	-	Maltose	+	+
Ethanol oxidation	-	ND	D-glucose	+	+
M.R	-	-	D-Mannitol	+	+

+: positive or growth; -: negative or not growth; ND: not determined.

**2.2.2 16S rRNA 序列及系统发育树：**测序得到菌株 HQZ08 的 16S rRNA 基因序列含有 1436 bp，通过 BLAST 比对发现菌株 HQZ08 (MG917730) 与菌株 *Cobetia marina* strain JCM21022 同源性最高，其相似度达到 99%，系统发育树如图 2 所示。结合菌株的形态学特征和生理生化特征，确定其为海科贝特氏菌(*Cobetia marina*)，并命名为 *Cobetia marina* HQZ08。该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC No. M 2017409。

## 2.3 培养基组成的优化

**2.3.1 碳源对菌株产酶的影响：**分别将 5 g/L 的海藻酸钠、岩藻聚糖、葡萄糖和淀粉作为 HQZ08 菌株生长的唯一碳源，研究不同碳源对该菌株产酶的影响。图 3-A 表明以葡萄糖、淀粉和岩藻聚糖为唯一碳源时，菌株的产酶能力较弱，以海藻酸钠为唯一碳源时酶活最高，故选择海藻酸钠作为后期优化碳源。在此基础上进一步研究海藻酸钠浓度(1、3、5、7、9 g/L)对菌株 HQZ08 的产酶影响。由图 3-B 可知，菌株的产酶能力随着海藻酸

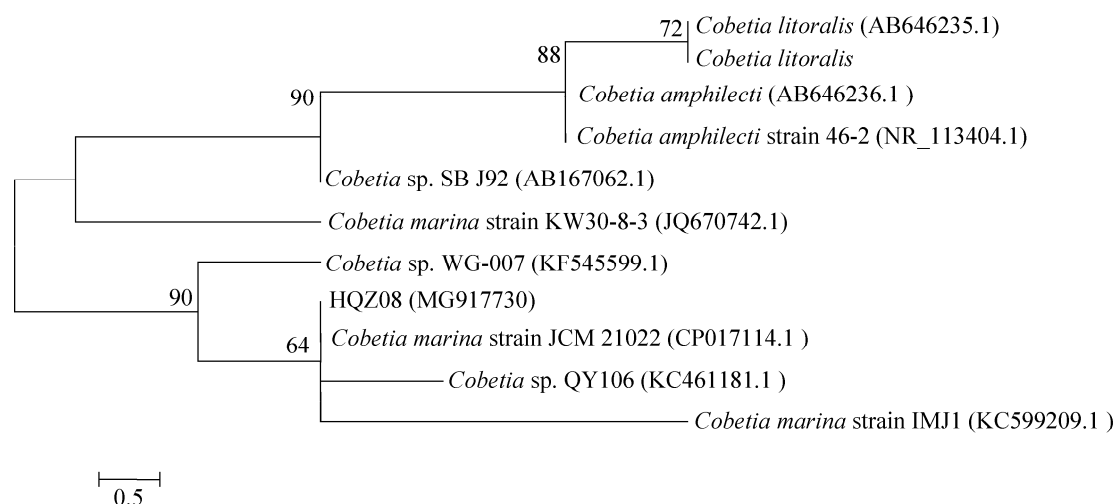


图 2. 菌株 HQZ08 的 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of the 16S rRNA sequence of strain HQZ08. Numbers in parentheses represent accession numbers in GenBank. Numbers at each branch point represent the bootstrap values on Neighbor-joining analysis of 1000 replication data sets. Bar 0.5 is the sequence divergence.

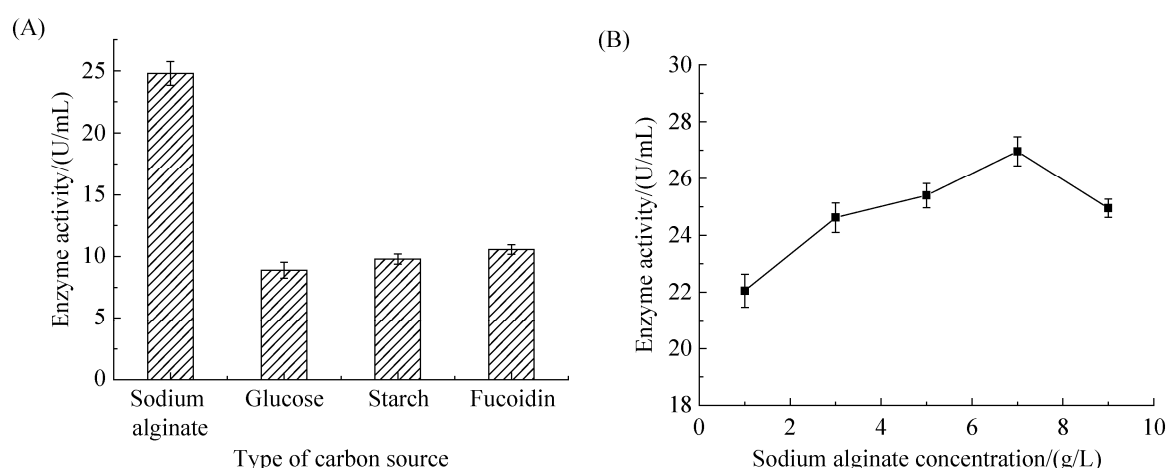


图 3. 碳源对菌株 HQZ08 产酶的影响

Figure 3. Effect of carbon source on enzyme production of strain HQZ08. A: Type of carbon source; B: Sodium alginate concentration.

钠浓度的增加而增加, 当海藻酸钠浓度为 7 g/L 时菌株产酶能力最强。浓度低时可能因为细菌所需要的营养成分不足导致产酶能力较低, 浓度过高时可能因为培养基粘度太高影响细菌的产酶能力<sup>[30]</sup>。

### 2.3.2 氮源对菌株产酶的影响: 以 7.0 g/L 的海藻

酸钠作为碳源, 分别选取 5.0 g/L 的蛋白胨、酵母提取粉、牛肉提取粉、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5.0 g/L 蛋白胨+2.5 g/L 酵母提取粉、5.0 g/L 蛋白胨+2.5 g/L 牛肉提取粉为氮源(编号分别为 A-G), 考察不同氮源对菌株产酶的影响。由图 4-A 可知, 几种氮源都可以被菌株 HQZ08 利用, 以蛋白胨作为氮源

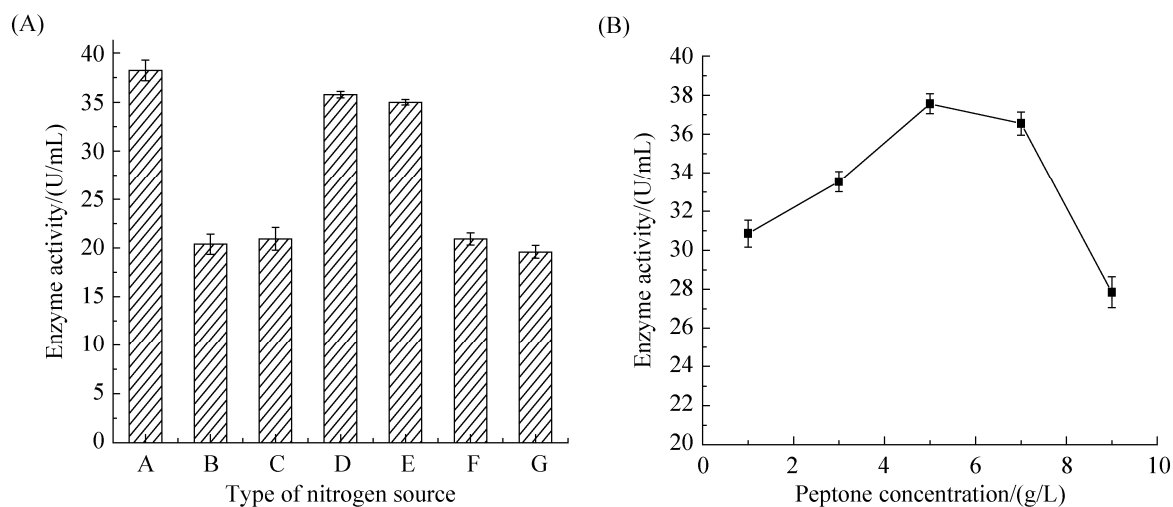


图 4. 氮源对菌株 HQZ08 产酶的影响

Figure 4. Effect of nitrogen source on enzyme production of strain HQZ08. A: Type of nitrogen source; B: Peptone concentration.

时细菌产酶能力最强。随后以蛋白胨作为菌株发酵产酶的最佳氮源,探讨不同蛋白胨浓度(1、3、5、7、9 g/L)对菌株产酶的影响。由图 4-B 可知,当蛋白胨浓度为 5 g/L 时菌株发酵液酶活最高,而浓度过高时可能影响菌体按比例吸收营养物质,从而影响褐藻胶裂解酶的积累<sup>[31]</sup>。

**2.3.3 NaCl 浓度及金属离子对菌株产酶的影响:**进一步考察 NaCl 浓度(10、15、20、25、30、35 g/L)对菌株产酶的影响(图 5)。当 NaCl 浓度达到 30 g/L,菌株的产酶能力最强。可能是因为该菌株的分离源来自于海洋,最适盐浓度也和原来的生存环境较接近。在此基础上考察  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  四种金属离子对菌株产酶的影响(图 6-A),结果发现  $K^+$ 对菌株的产酶有促进作用, $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  均有轻微的抑制作用。随后探讨不同  $K^+$ 浓度(0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 g/L)对菌株产酶的影响,由图 6-B 可知,当  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  浓度为 1.25 g/L 时菌株发酵液酶活最高。

**2.3.4 正交试验:**根据单因素实验结果,选择海

藻酸钠、蛋白胨、NaCl、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  四个因素进行正交实验,结果见表 2。由表中可以看出,各因素对菌株产酶的影响大小为:海藻酸钠>蛋白胨>NaCl> $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,并确定培养基组成为海藻酸钠 7 g/L,蛋白胨 3 g/L,NaCl 30 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.25 g/L。

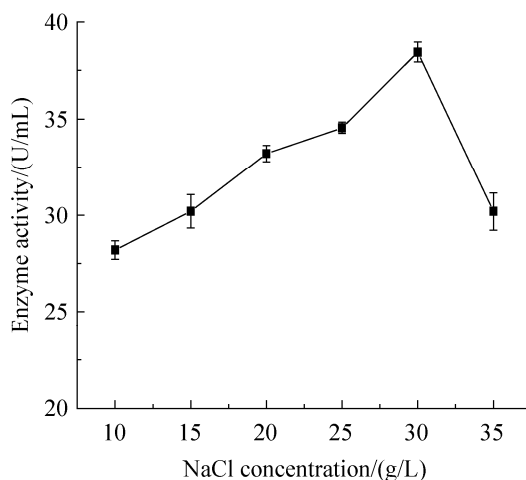


图 5. NaCl 浓度对菌株 HQZ08 产酶的影响

Figure 5. Effect of NaCl concentration on enzyme production of strain HQZ08.

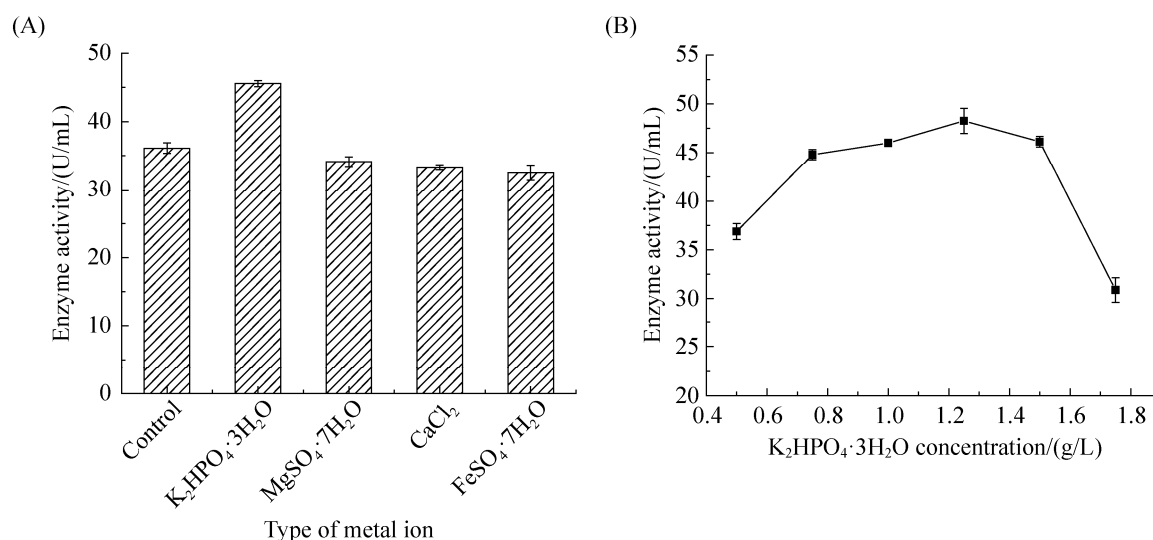


图 6. 金属离子对菌株 HQZ08 产酶的影响

Figure 6. Effects of metal ion on enzyme production of strain HQZ08. A: Type of metal ion; B:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  concentration.

表 2. 正交试验结果

Table 2. Results of orthogonal experiment

Run No.	Alginate/(g/L)	Peptone/(g/L)	NaCl/(g/L)	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ /(g/L)	Alginate lyase activity/(U/mL)
1	5	3	25	1.00	48.23
2	5	5	30	1.25	41.50
3	5	7	35	1.50	36.40
4	7	3	30	1.50	55.52
5	7	5	35	1.00	52.13
6	7	7	25	1.25	52.73
7	9	3	35	1.25	30.60
8	9	5	25	1.50	27.82
9	9	7	30	1.00	29.45
$K_1$	120.73	128.95	123.38	124.41	
$K_2$	160.38	121.45	126.47	124.83	
$K_3$	87.87	118.58	119.13	119.74	
$R$	72.51	10.37	7.34	5.09	

## 2.4 菌株 HQZ08 产酶的条件优化

本实验考察了不同接种量(0.5%–3.0%)对菌株产酶的影响,接种后培养基总体积为 50 mL。由图 7-A 可知,2%的接种量是菌株 HQZ08 发酵产酶的最佳接种量。将种子液分别培养至 6、9、12、

15、21 h 之后接种到发酵培养基中,比较不同接种龄酶活力的变化,结果表明接种龄为 12 h 时酶活力最高(图 7-B 所示)。培养基的初始 pH 不仅对菌体细胞膜的通透性有直接影响,还能影响其稳定性以及代谢产物酶的活力<sup>[32]</sup>。本实验比较了培

培养基不同初始 pH (6.0–8.5) 对菌株产酶的影响。如图 7-C 所示, 当发酵培养基初始 pH 为 7.0 时酶活力达到最大值。温度对细菌的生长和产酶能力影响较显著, 将菌株在 20、25、28、30、32、35 °C 下培养进行产酶能力的考察, 如图 7-D 所示, 当温度为 25 °C 时酶活力达到最大值。随着温度升高, 酶活力明显下降, 说明该菌不适宜在较高温度下培养。产酶培养的过程中, 随着培养时间的增加, 菌群的生长达到稳定期, 产酶量开始增加, 而培养时间过长时可能会导致产生的酶逐渐失活。分别培养 18–42 h, 考察培养时间对菌株产酶的影响, 由图 7-E 可以看出, 当培养时间达到 24 h 时酶活力最高为 68.5 U/mL, 超过 24 h 酶活力明显下降。

目前已有许多有关细菌产褐藻胶裂解酶的报道, 例如芽孢杆菌、弧菌等。李悦明等<sup>[33]</sup>从土

壤中分离出的芽孢杆菌酶活力为 23.4 U/mL, 郭恩文等<sup>[34]</sup>筛选到的弧菌 *Vibrio* sp. QY107 及傅晓妍等<sup>[21]</sup>筛选到的弧菌 *Vibrio* sp. QY102 经发酵 120 h 酶活力分别为 12.32 U/mL 和 10.2 U/mL, 吴海歌等<sup>[35]</sup>从腐烂海带中分离到的假交替单胞菌属优化后的酶活力达到 51.498 U/mL。而关于 *Cobetia marina* 产褐藻胶裂解酶的报道很少, 2016 年, Yagi 等<sup>[36]</sup>从褐藻中分离出 *Cobetia* sp. NAP1 菌株, 其酶活力仅有 4 U/mL, 本实验筛选的菌株和文献报道的相比具有一定的优势。

## 2.5 酶解产物分析

褐藻胶被发酵液上清降解 44 h 后, 产物进行 TLC 分析, 与褐藻胶寡糖标准品二糖、三糖、四糖、六糖对比可知, 酶解产物主要是聚合度为 2–6 的褐藻胶寡糖(图 8)。

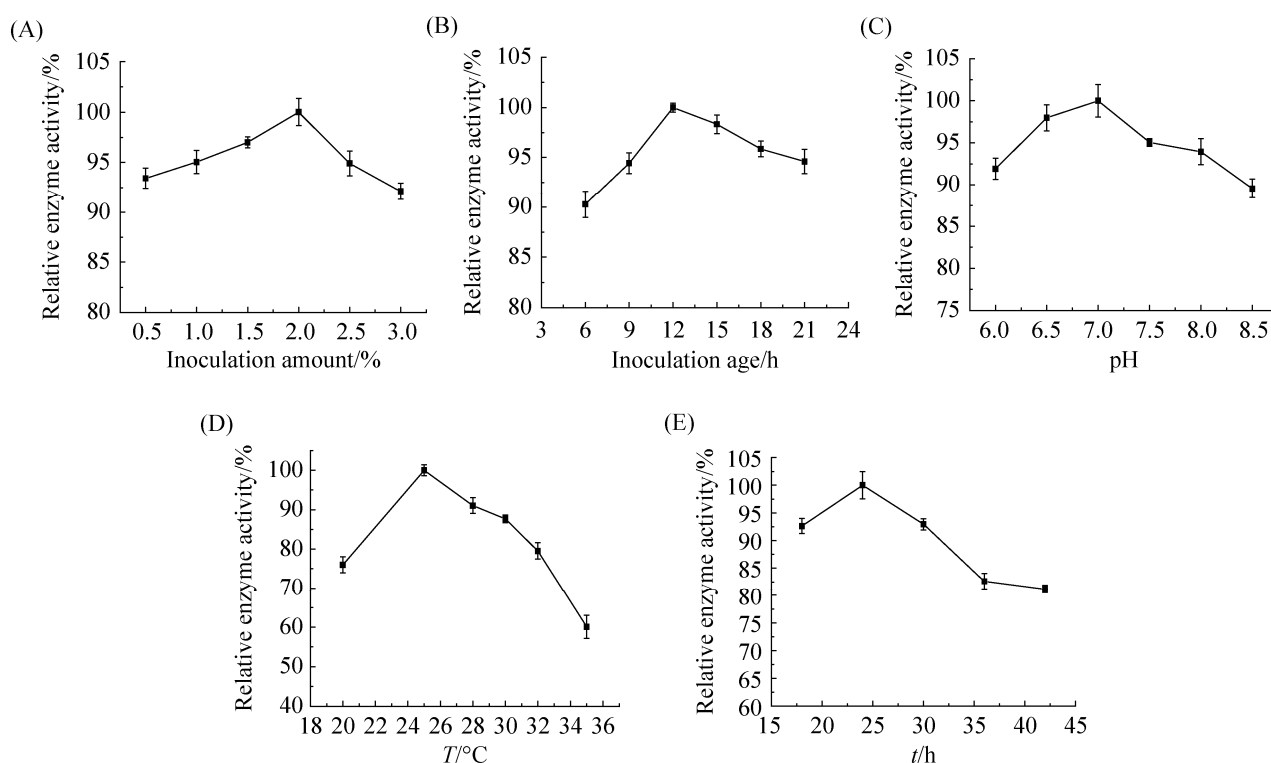


图 7. 发酵条件对菌株 HQZ08 产酶的影响

Figure 7. Effect of fermentation conditions on enzyme production of strain HQZ08. A: Inoculation amount; B: Inoculation age; C: pH; D: Temperature; E: Time.



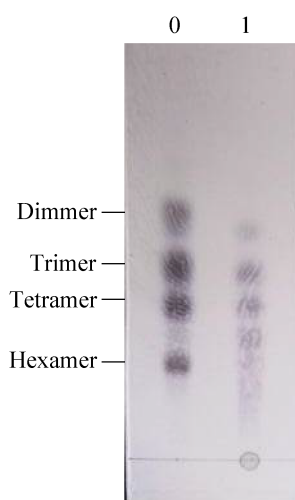


图 8. 褐藻胶降解产物的 TLC 分析

Figure 8. TLC analysis of the degradation products of alginate. 0: alginate oligosaccharide standard (dimer, trimer, tetramer, hexamer); 1: enzymatic product of alginate.

### 3 结论

本文选用以海藻酸钠作为唯一碳源的选择培养基, 从海水和海泥中筛选出多株具有褐藻胶裂解酶活力的菌株, 通过液体发酵培养基复筛测其酶活, 筛选一株酶活最高的菌株 HQZ08, 经生理生化特征实验及 16S rRNA 序列鉴定其为海科贝特氏菌。通过单因素和正交实验对培养基组分及发酵产酶条件进行优化, 优化后的发酵液粗酶活提升到 68.5 U/mL, 本研究的固体粗酶活力为 15800 U/g, 略高于目前市面上仅有 Sigma 公司出售的褐藻胶裂解酶产品(酶活力 10000 U/g), 若要进一步提高 HQZ08 菌株的酶活力还可以进一步对装液量、摇床转速等进行考察, 并对粗酶液进行分离纯化。TLC 法测定该菌的酶解产物为聚合度 2–6 的褐藻胶寡糖, 降解后寡糖的得率为 32.15%, 可为后续开发低聚合度的褐藻胶寡糖奠定基础。

### 参考文献

- [1] Gacesa P. Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 1988, 8(3): 161–182.
- [2] Rahelivao MP, Andriamanantoanina H, Heyraud A, Rinaudo M. Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(1): 143–146.
- [3] Rhein-Knudsen N, Ale MT, Meyer AS. Seaweed hydrocolloid production: An update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine Drugs*, 2015, 13(6): 3340–3359.
- [4] Zhang YJ, Luo FW, Yao ZA, Li Q, Wu HG. Research progress about biological activity of sodium alginate oligosaccharides. *China Brewing*, 2014, 33(1): 5–8. (in Chinese)  
张玉娟, 罗福文, 姚子昂, 李倩, 吴海歌. 海藻酸钠寡糖生物活性的研究进展. *中国酿造*, 2014, 33(1): 5–8.
- [5] Tajima S, Inoue H, Kawada A, Ishibashi A, Takahara H, Hiura N. Alginate oligosaccharides modulate cell morphology, cell proliferation and collagen expression in human skin fibroblasts *in vitro*. *Archives of Dermatological Research*, 1999, 291(7/8): 432–436.
- [6] Kawada A, Hiura N, Shiraiwa M, Tajima S, Hiruma M, Hara K, Ishibashi A, Takahara H. Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture. *FEBS Letters*, 1997, 408(1): 43–46.
- [7] Xu X, Wu XT, Wang QQ, Cai N, Zhang HX, Jiang ZD, Wan M, Oda T. Immunomodulatory effects of alginate oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells and their structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(14): 3168–3176.
- [8] Hu XK, Jiang XL, Hwang H, Liu SL, Guan HS. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives. *European Journal of Phycology*, 2004, 39(1): 67–71.
- [9] Tøndervik A, Sletta H, Klinkenberg G, Emanuel C, Powell LC, Pritchard MF, Khan S, Craine KM, Onsøyen E, Rye PD, Wright C, Thomas DW, Hill KE. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against *Candida* and *Aspergillus* spp. *PLoS One*,

- 2014, 9(11): e112518.
- [10] Zhou R, Shi XY, Gao Y, Cai N, Jiang ZD, Xu X. Anti-inflammatory activity of guluronate oligosaccharides obtained by oxidative degradation from alginate in lipopolysaccharide-activated murine macrophage RAW 264.7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1): 160–168.
- [11] Zhang YH, Yin H, Zhao XM, Wang WX, Du YG, He AL, Sun KG. The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in *Oryza sativa* L. mediated by auxin signaling. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 113: 446–454.
- [12] Xu L, Li Z, Zhou HL, Ding YT, Liu L. Study of hygroscopic and moisturizing performance of oligosaccharides obtained from enzymolysis of algin. *China Surfactant Detergent & Cosmetics*, 2011, 41(1): 42–45. (in Chinese)  
许雷, 李湛, 周火兰, 丁玉庭, 刘琳. 酶解褐藻胶寡糖的吸湿及保湿性能研究. *日用化学工业*, 2011, 41(1): 42–45.
- [13] Wu HG, Wang XW, Li Q, Yao ZA. Study on the anti-oxidant activity of alginate oligosaccharides. *Journal of Dalian University*, 2015, 36(3): 70–75, 83. (in Chinese)  
吴海歌, 王雪伟, 李倩, 姚子昂. 海藻酸钠寡糖抗氧化活性的研究. *大连大学学报*, 2015, 36(3): 70–75, 83.
- [14] Wong TY, Preston LA, Schiller NL. Alginate Lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 289–340.
- [15] Cheng Z. Isolation, purification and optimization the fermentation conditions of the polysaccharide of alginate and inulin degradation bacteria. Master Dissertation of Qingdao University of Science and Technology, 2014. (in Chinese)  
成珍. 多糖降解菌的筛选鉴定及培养条件优化—褐藻胶和菊芋降解菌的分离纯化. 青岛科技大学硕士学位论文, 2014.
- [16] Xiao L, Han F, Yang Z, Lu XZ, Yu WG. A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 from *Pseudomonas* sp. QD03. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(1): 81–88.
- [17] Gimmetstad M, Ertesvåg H, Heggeset TMB, Aarstad O, Svanem BIG, Valla S. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(15): 4845–4853.
- [18] An QD, Zhang GL, Wu HT, Zhang ZC, Zheng GS, Luan L, Murata Y, Li X. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(1): 161–170.
- [19] Duan GF, Han F, Yu WG. Cloning, sequence analysis, and expression of gene *alyPI* encoding an alginate lyase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CY24. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(9): 1113–1118.
- [20] Miyake O, Ochiai A, Hashimoto W, Murata K. Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and -7 in *Sphingomonas* sp. strain A1. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2891–2896.
- [21] Fu XY, Li JB, Han F, Lu XZ, Yu WG. Studies on *Vibro* sp. QY102 fermentation processes for alginate lyase production. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(3): 432–436. (in Chinese)  
傅晓妍, 李京宝, 韩峰, 路新枝, 于文功. 褐藻胶裂解酶产生菌 *Vibro* sp. QY102 的发酵条件优化. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(3): 432–436.
- [22] Wei D, Dou WF, Li H, Li H, Xu ZH, Shi JS. Isolation, identification, and fermentation optimization of a high efficient novel alginate-degrading strain. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(7): 26–31. (in Chinese)  
魏丹, 窦文芳, 李恒, 李会, 许正宏, 史劲松. 高效降解褐藻胶新菌种的筛选、鉴定及产酶条件优化. *食品与发酵工业*, 2012, 38(7): 26–31.
- [23] Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganisms-IV. On the *Vibro*-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1961, 27(4): 339–341.
- [24] Wang LN. Study on oligoalginate lyases from marine bacterium *Shewanella* sp. Kz7. Doctor Dissertation of Ocean University of China, 2014. (in Chinese)  
王林娜. 海洋细菌 *Shewanella* sp. Kz7 的寡褐藻胶裂解酶研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2014.
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] Han JP, Huang YY, Ye J, Xiao MT. Screening and identification of a bacterium capable of converting agar to

- neoagaro oligosaccharides. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(9): 1126–1132. (in Chinese)
- 韩军萍, 黄雅燕, 叶静, 肖美添. 一株转化琼胶为新琼寡糖菌株的筛选及鉴定. *微生物学报*, 2015, 55(9): 1126–1132.
- [27] Arahall DR, Castillo AM, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(2): 207–211.
- [28] Liu XM, Li H, Jiang M, Gong JS, Xu ZH, Shi JS. Screening of alginate lyase producing strain *Cobetia* sp. WG-007 and optimization of fermentation. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(9): 903–909. (in Chinese)
- 刘旭梅, 李恒, 蒋敏, 龚劲松, 许正宏, 史劲松. 产褐藻胶裂解酶菌株 *Cobetia* sp. WG-007 的筛选及发酵优化. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(9): 903–909.
- [29] Wang T, Yang S, Chen YX, Hu LL, Tu Q, Zhang L, Liu XQ, Wang XG. Microbiological properties of two endophytic bacteria isolated from tea (*Camellia sinensis* L.). *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 424–432. (in Chinese)
- 王婷, 杨升, 陈亚雪, 胡玲玲, 屠琴, 张丽, 刘雪芹, 王行国. 两株茶树内生草螺菌的微生物学特性. *微生物学报*, 2014, 54(4): 424–432.
- [30] Ma YX, Ji T, Li HQ, Chen W, Gao S, Liu SF. Culture optimization and characterization of an alginate-lyase from *Pseudoalteromonas* sp. LJ1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(8): 1086–1094. (in Chinese)
- 马悦欣, 纪涛, 李慧琼, 陈炜, 高嵩, 刘声锋. 假交替单胞菌 LJ1 菌株产褐藻胶裂解酶的培养条件优化及酶学性质. *微生物学报*, 2009, 49(8): 1086–1094.
- [31] Hou BB. Isolation of alginate-degrading bacteria, fermentation and some properties of alginate lyase. Master Dissertation of Zhejiang University of Technology, 2009. (in Chinese)
- 侯宝兵. 褐藻胶裂解酶产生菌的筛选、发酵优化及其酶学特性研究. 浙江工业大学硕士学位论文, 2009.
- [32] Hou SC, Wen SH, Tang ZH, Cui YL, Qin S. The screening, identification of alginate degrading bacteria and optimization of fermentation conditions. *Marine Sciences*, 2014, 38(7): 20–26. (in Chinese)
- 侯士昌, 温少红, 唐志红, 崔玉琳, 秦松. 一株高效褐藻胶降解菌的筛选、鉴定及其发酵条件的优化. *海洋科学*, 2014, 38(7): 20–26.
- [33] Li YM, Han JY, Xu JC, Zhang SL, Guan B. Alginate lyase production by *Bacillus* spp. with shaking fermentation. *China Brewing*, 2010, (4): 79–81. (in Chinese)
- 李悦明, 韩建友, 徐建春, 张书利, 管斌. 利用芽孢杆菌发酵生产褐藻胶裂解酶的研究. *中国酿造*, 2010, (4): 79–81.
- [34] Guo EW, Wang Y, Yu WG, Han F. Screening and characterization of a bifunctional alginate lyase-producing bacterium strain. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(29): 5606–5609. (in Chinese)
- 郭恩文, 王亚, 于文功, 韩峰. 产双功能褐藻胶裂解酶菌株的筛选与初步研究. *现代生物医学进展*, 2013, 13(29): 5606–5609.
- [35] Wu HG, Zhang YJ, Luo FW, Yao ZA, Li Q, Gao Z. Isolation of a strain degrading sodium alginate and optimization of its fermentation conditions. *Food Science and Technology*, 2014, 39(8): 31–36. (in Chinese)
- 吴海歌, 张玉娟, 罗福文, 姚子昂, 李倩, 高征. 海藻酸钠降解菌的筛选及其发酵条件的优化. *食品科技*, 2014, 39(8): 31–36.
- [36] Yagi H, Fujise A, Itabashi N, Ohshiro T. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Cobetia* sp. NAP1 isolated from brown algae. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(12): 2338–2346.

## Screening, identification and fermentation optimization of an alginate-degrading strain

Wanlin Zhao<sup>1</sup>, Jing Ye<sup>1,2</sup>, Na Zhang<sup>1,2</sup>, Meitian Xiao<sup>1,2</sup>, Peng Zhao<sup>1,2\*</sup>, Yayan Huang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

<sup>2</sup> Xiamen Engineering and Technological Research Center for Comprehensive Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] To screen an alginate-degrading strain and to improve the activity of its alginate lyase by optimizing the fermentation conditions. [Methods] A strain capable of degrading alginate was screened by the steps of enrichment culture, screening, and re-screening by using seawater and sea mud collected from the sea area of Zhangzhou (Fujian, China). Then, the strain was identified according to its 16S rRNA sequence analysis, physiological and biochemical characteristics, mycelium morphology and colony characteristics. The conditions of enzyme production of the strain were optimized by single factor and orthogonal test. [Results] The strain, belonging to the genus *Cobetia marina*, was named *Cobetia marina* HQZ08. The optimal medium of the strain was composed of 7.00 g/L sodium alginate, 3.00 g/L peptone, 30.00 g/L NaCl, 1.25 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O. The optimal fermentation conditions were as follows: the optimum inoculum was 2%, the inoculation age was 12 h, the initial pH of the culture medium was 7.0, the culture temperature was 25 °C, and the incubation time was 24 h. The enzymatic activity of alginate lyase reached 68.5 U/mL after optimization. Enzymatic hydrolysates were determined to be alginate oligosaccharides. [Conclusion] HQZ08 strain can be used to degrade alginate to produce alginate oligosaccharides with a degree of polymerization of 2–6.

**Keywords:** alginate lyase, *Cobetia marina*, alginate oligosaccharides

(本文责编: 李磊)

Supported by the Special Fund for Marine Research in the Public Interest (201505026-5), by the Major Project of Industry-University Collaboration in Fujian Province (2018N5008) and by the Major Project of Science and Technology Plan of Quanzhou (2015Z140)

\*Corresponding author. Peng Zhao, Tel: +86-592-6161589, E-mail: zhaopeng@hqu.edu.cn; Yayan Huang, E-mail: yyhuang@hqu.edu.cn

Received: 10 March 2018; Revised: 5 July 2018; Published online: 20 August 2018