

一株产琼胶酶海洋细菌的分离与鉴定

梅建凤, 李 莎, 茅鹤婷, 王 鸿, 应国清

(浙江工业大学 药学院, 浙江 杭州 310032)

摘要: 为获得琼胶酶活性高产菌株, 对采集的海水样品进行了产酶微生物的分离、筛选和鉴定。经过平板培养预筛和两次摇瓶培养筛选, 从浙江省舟山市普陀区近海海水样品中分离到一株琼胶酶产生菌 G-5, 该菌株液体培养产酶活力可达到 413.8 U/mL。G-5 菌株的菌落呈乳白色、半透明、表面湿润; 菌体革兰氏染色阴性, 大小 0.58~0.69 μm ×1.50~2.26 μm ; 光学显微镜下呈短杆状, 略有弧形。G-5 菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中 15 个弧菌属(*Vibrio*)菌株的 16S rDNA 有 98% 的同源性, 可以确定 G-5 菌株是一株弧菌(*Vibrio* sp.)。

关键词: 琼胶酶; 弧菌(*Vibrio* sp.); 分离与鉴定; 16S rDNA

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)02-0071-05
doi: 10.11759/hyxx20130502003

琼胶(agar)是一种从紫菜、石花菜和江蓠等海洋红藻中提取的多糖。琼胶由琼脂糖和硫酸琼胶组成, 其中琼脂糖是由(1→3)-O- β -D-半乳糖和(1→4)-O-3, 6 内醚- α -L-半乳糖交替组成的琼二糖重复单位连接而成的线形链状分子。琼胶因其具有优良的胶凝性、稳定性、黏滞性和渗透性, 因此在食品、医药和化工等领域有广泛的应用^[1]。琼胶寡糖(agaro-oligosaccharide)就是琼胶经降解后聚合度为 2~10 的低聚糖。近年来的研究表明琼胶寡糖有多种生理活性, 如抗氧化、降血脂, 免疫增强, 抗过敏和抑制糖苷酶等活性, 是一种极具开发潜力的功能低聚糖^[2]。

由琼胶制备琼胶寡糖可以采用化学降解和酶降解 2 种方法, 相比于化学降解法, 酶降解法具有寡糖得率高、生物活性高和工艺环保等优点。琼胶酶就是能够将琼胶水解为寡糖或单糖的酶类, 它不仅可用于琼胶寡糖的制备, 还可以应用于分子生物学研究中回收琼脂糖凝胶中的 DNA 和 RNA; 或作为工具酶用于海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等^[3-4]。目前, Sigma-Aldrich 有限公司已有琼胶酶销售, 其来自大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*), 价格昂贵, 如纯度大于 5 000 U/mg 的产品, 1 kU 包装的价格为 1854.45 元人民币^[5]。因此, 寻找一种产酶活性高、性状稳定、易于培养的琼胶酶产生菌仍是琼胶酶研究与应用的关键。本文从东海浙江海域采集了海水样品, 进行琼胶酶产生菌的分离和筛选, 并对得到的菌株进行形态学和 16S rDNA 序列分子鉴定, 确定该菌株的分类地位, 旨

在获得产酶活性高的菌株, 为琼胶酶的研究和应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 海水样品

2 份海水样品分别采自东海浙江省舟山市普陀区附近海域(采集点北纬 29.872811°N, 122.404974°E)和东海浙江省临海市附近海域(采集点北纬 28.779320°N, 121.670580°E)。

1.2 培养基

平板和斜面培养基 A(g/L): NaCl 25, NH₄Cl 1, MgSO₄·7H₂O 5, KCl 1, FeSO₄·7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.2, NaH₂PO₄·2H₂O 0.6, 琼脂 20, pH 7.0^[6]。

斜面培养基 B(g/L): 葡萄糖 1, NaCl 20, 酵母浸出粉 5, MgSO₄·7H₂O 5, KCl 1, FeSO₄·7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.2, NaH₂PO₄·2H₂O 0.8, 琼脂 20, pH 7.5^[6]。

产酶培养基(g/L): NaNO₃ 4, NaCl 10, MgSO₄·7H₂O 5, KCl 1, FeSO₄·7H₂O 0.02, CaCl₂ 0.2, NaH₂PO₄·2H₂O 0.6, MnCl₂·4H₂O 0.15, 琼脂 2.5, pH 7.0^[6]。

以上培养基均采用 121 °C、20 min 高压蒸汽灭菌; 产酶培养基装 250 mL 玻璃三角烧瓶, 每瓶装 40 mL, 8 层纱布扎口。

收稿日期: 2013-09-23; 修回日期: 2013-12-10

基金项目: 浙江自然科学基金项目(LY13B020011)

作者简介: 梅建凤(1973-), 男, 安徽天长人, 副教授, 博士, 主要从事生物制药方向的研究。电话: 0571-88871029, E-mail: mrion@zjut.edu.cn

所有实验试剂均为市售分析纯或生物试剂。

1.3 方法

1.3.1 富集培养

海水样品 50 mL 于 250 mL 三角瓶中, 加入 0.15 g 琼脂粉, 30℃ 摇床培养 7 d 以上。

1.3.2 平板菌落筛选

将经过富集后的海水样品用无菌人工海水适当倍数稀释, 取 0.1 mL 涂布平板, 28℃ 培养至平板上长出菌落。观察菌落形态, 挑取能形成明显凹陷的菌落划线接种于另一平板, 28℃ 培养, 将形成较深凹陷的单菌落挑至斜面培养基 A 上培养。

1.3.3 摇瓶培养筛选

挑取斜面菌株的菌苔 2~3 环, 接入产酶培养基中, 28℃、200 r/min 振荡培养 48 h。取发酵液 10 mL, 4℃、8000 r/min 离心 15 min, 取上清液测酶活力。初筛不做重复, 淘汰酶活相对较低的菌株, 同法对剩余菌株进行复筛, 每个菌株做 3 个重复的摇瓶培养, 筛选出酶活最高的菌株。

1.3.4 酶活测定

酶活测定采用 DNS 法^[7]: 取磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH7.0) 配制的 2.5 g/L 琼胶底物溶液 9 mL, 加入 1 mL 待测酶液, 45℃、100 r/min 水浴摇床中酶解 20 min, 立即取 1 mL 酶解液于刻度试管中, 加入 1 mL DNS 溶液、1 mL 水, 沸水浴 5 min 后立即冷却至室温, 定容至 10 mL。于紫外可见分光光度计测定 A_{540} , 再由 D-半乳糖浓度的标准曲线计算酶解液中的还原糖质量浓度。琼胶酶的活力定义: 在上述反应条件下, 1 mL 酶液 1 min 产生 1 μ g 还原糖作为一个酶活力单位(U/mL)。

1.3.5 16S rDNA 序列分析

用 EzupTM 柱式细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组总DNA, 作为PCR模板DNA。扩增引物选用细菌鉴定通用引物: 正向引物 27F: 5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3' (对应于 *E.coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置), 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E.coli* 16S rRNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)^[8]。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 $\times$ PCR Master 溶液 25 μ L (2 $\times$ PCR Master 包括 3 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、0.1 U/ μ L Tag DNA polymerase 和 2 $\times$ PCR buffer)。DNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。扩增程序: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸

1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。取 5 μ L 扩增样品, 1% 琼脂糖凝胶, 80 V 电压电泳检测^[9]。

引物合成及 PCR 扩增产物测序均由上海生工生物技术服务公司完成。

将测得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上通过 BLAST 比对, 分析其与其他菌株的同源性。并选择相似度 $\geq 98\%$ 的菌株的 16S rDNA 基因序列, 采用 Mega5.1 软件建立系统发育树。

2 结果和讨论

2.1 平板筛选

在本文采集海水的海域, 并非海藻生长区域, 但海水样品经过富集后, 采用平板法分离, 培养基上有大量琼胶酶产生菌生长。虽然菌落较小, 多数菌落周围会出现较深的釜底形凹陷, 在菌落密集的地方, 平板培养基液化深至皿底 (图 1), 反映了这些菌株产酶活性较高。选取凹陷较深的菌落, 转接斜面培养基 A 上培养, 获得出了 26 株具有降解琼胶能力的菌株。

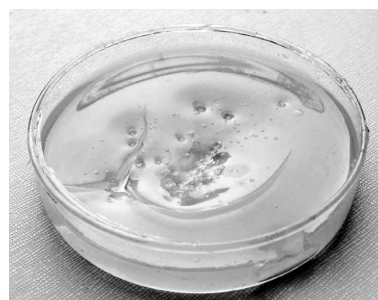


图 1 平板分离琼胶酶产生菌的菌落照片

Fig.1 Colonies of bacterial strains producing agarase in plate cultivation

2.2 初筛和复筛

平板筛选出的 26 株菌株转接斜面培养基, 新鲜斜面菌体接种产酶培养基, 摇瓶振荡培养 48 h 后, 测定发酵液酶活, 筛选出 8 株酶活相对较高的菌株。然后将这 8 个菌株再经斜面活化培养后, 新鲜斜面菌种接种产酶培养基, 每个菌株做 3 个重复, 摇瓶振荡培养 48 h 后, 测定各菌株的琼胶酶活力, 计算平均值, 结果见表 1。

从摇瓶复筛的结果可以看出: 这些菌株的产琼胶酶活力均较高, 其中菌株 G-5 的琼胶酶活力最高, 达到 413.8 U/mL。

表1 产琼胶酶菌株的摇瓶培养复筛产酶活力

Tab.1 The agarase activity of some strains in the second screening by shaking cultivation

菌株编号	琼胶酶活力(U/mL)
W-2	342.1±15.6
W-6	337.6±9.5
W-10	378.8±13.1
G-5	413.8±6.6
G-6	386.8±13.8
G-7	370.8±6.2
G-8	313.5±11.9
G-10	371.9±9.3

2.3 G-5 菌株的菌落和菌体形态特征

对产酶活力相对较高的W-10、G-5和G-6进行了分类鉴定, 结果发现这3个菌株的菌落特征、菌体形态以及16S rDNA序列均相同, 说明它们是同一个种, 所以本文以下仅报道G-5菌株的鉴定结果。

G-5菌株在平板培养基上培养7 d, 菌落半透明, 直径约为3~5 mm, 在平板培养基上生长可以形成很深凹陷, 甚至可使培养基开裂。在斜面培养基A上培养7 d, 沿划线呈沟壑状, 但菌体量较少(图2)。在斜面培养基B上培养, 因含有葡萄糖和酵母浸出粉, 一般24 h即可长满斜面, 菌落周围无凹陷。对该菌种的保藏和分子生物学鉴定时, 便采用斜面培养基B, 可以缩短培养时间, 获得更多的菌体。



图2 菌株 G-5 斜面培养菌落形态

Fig. 2 Colonies of G-5 on the slant culture

G-5菌株的菌体革兰氏染色呈阴性, 菌体简单染色后在光学显微镜下观察, 菌体呈短杆状, 略有弧形, 菌体大小 $0.58\sim 0.69\ \mu\text{m}\times 1.50\sim 2.26\ \mu\text{m}$, 菌体的光学显微镜照片见图3。

2.4 16S rDNA 序列分析

提取G-5菌株的总DNA, 利用细菌16S rRNA通用引物进行PCR扩增, 扩增产物电泳图表明, 分子

量在1500 bp左右, 测序后得可用序列1458 bp。将测序所得基因序列在NCBI上通过BLAST比对, 相似度在98%及以上的菌株见表2, 菌株G-5与这些弧菌的同源性关系见系统发育树(图4)。

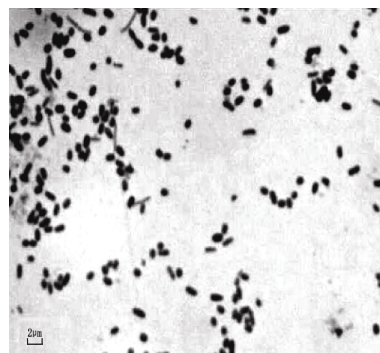


图3 菌株 G-5 在光学显微镜下菌体照片

Fig. 3 Cell shape of G-5 observed under optical microscope

菌株G-5的16S rDNA序列与NCBI数据库中15株弧菌(*Vibrio* sp.)的16S rDNA序列相似度达到98%及以上, 因此可以判断其是一株弧菌, 但与这些菌株的亲缘关系均较远, 尚不能依据16S rDNA序列比对将G-5鉴定到种。目前, 已经分离到多株能够产琼胶酶的弧菌, 如Aoki 等^[10]分离到的*Vibrio* sp. AP-2; Sugano等^[11]分离到的*Vibrio* sp. strain JT0107; Araki 等^[12]分离到的*Vibrio* sp. PO-303菌株; 杜宗军等^[13]分离到*Vibrio tubiashii*, 因未能获得这些菌株的16S rDNA序列, 无法将G-5与它们进行亲缘关系比较。NCBI数据库中有一株*Vibrio tubiashii*(登记号NR 026129.1), 但从系统发育树来看, G-5与其亲缘关系较远。

3 结论

琼胶酶具有广阔的应用前景, 自1957年Yaphe^[14]第一次从海水中分离到能分解琼胶的细菌——大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*), 此后人们已经从海水系统中分离到了多株琼胶酶产生菌, 虽然近年来从陆生环境分离到了一些降解琼胶的微生物, 但海洋是琼胶酶产生菌生存的大环境, 从海水中容易分离到琼胶酶产酶活性较高的菌株。本文通过平板菌落预筛和摇瓶初筛与复筛, 从浙江省舟山市普陀区近海海水中筛选到一株琼胶酶高产菌株G-5, 在平板和斜面培养时即可看出其产酶能力不同凡响, 原始菌株液体培养的产酶活力可以达到413.8U/mL,

表 2 NCBI 数据库中与 G-5 菌株 BLAST 相似度 $\geq 98\%$ 的菌株

Tab. 2 The *Vibrio* strains with similarity of $\geq 98\%$ by BLAST in the database of NCBI

NCBI 登记号	菌株	相似度(%)
NR 026124.1	<i>Vibrio natriegens</i> strain ATCC 14048	99
NR 041683.1	<i>Vibrio azureus</i> strain LC2-005	99
NR 041838.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> strain ATCC 17802	98
NR 042081.1	<i>Vibrio rotiferianus</i> strain LMG 21460	98
NR 044911.1	<i>Vibrio mytili</i>	98
NR 025491.1	<i>Vibrio hepatarius</i> strain LMG 20362	98
NR 043165.1	<i>Vibrio harveyi</i> strain NCIMB1280	98
NR 026128.1	<i>Vibrio proteolyticus</i> strain ATCC 15338	98
NR 044825.1	<i>Vibrio alginolyticus</i> strain ATCC 17749	98
NR 036844.1	<i>Vibrio diabolicus</i> strain HE800	98
NR 025478.1	<i>Vibrio xuii</i> strain R-15052	98
NR 026129.1	<i>Vibrio tubiashii</i> strain Milford 74	98
NR 036888.1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain 324	98
NR036790.1	<i>Vibrio fluvialis</i> strain VL 5125	98
NR 029254.1	<i>Vibrio aestuarianus</i> strain OY 0-002	98

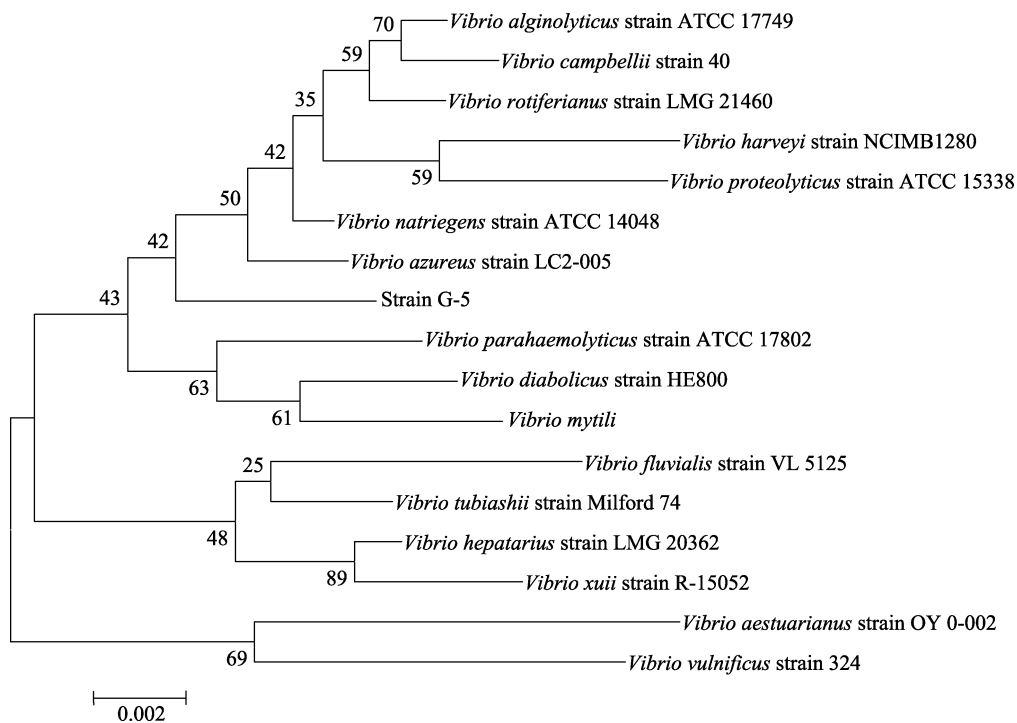


图 4 依据 16S rDNA 序列同源性比较构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the *Vibrio* sp. strains based on 16S rRNA gene sequence

如进一步对其进行诱变育种, 优化其产酶培养基和培养条件, 其产酶活力定能进一步提高, 具有较高的工业化应用潜力。

参考文献:

[1] 李琴梅, 戚勃. 琼脂的物化特性及其在食品工业中的

应用[J]. 中国食品添加剂, 2009, 6(1): 170-175.

[2] 刘美英, 梅建凤, 易喻, 等. 琼胶寡糖生物活性的研究进展[J]. 药物生物技术, 2008, 15(6): 493-496.

[3] 马翠萍, 石超. 琼胶酶研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 107-111.

[4] 刘江涛, 蔡俊鹏, 吴冰. 琼胶酶及其综合应用的研究

- 概况[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 177-179.
- [5] Sigma-Aldrich Co. LLC[EB/OL]. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6306?lang=zh®ion=CN>, 2013-04-26.
- [6] 刘美英. 产琼胶酶海洋微生物的筛选及其发酵工艺研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [7] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997:7.
- [8] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* [J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [9] Baker G C, Smith J J, Cowan D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primer [J]. J Microbiol Methods, 2003, 55 (3): 541-555.
- [10] Aoki T, Araki T, Kitamikado M. Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2 [J]. Eur J Biochem, 1990, 187(2): 461-465.
- [11] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107 [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(5): 1549-1554.
- [12] Araki T, Hayakawa M, Lu Z, et al. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303 [J]. J Mar Biotechnol, 1998, 6(4): 260-265.
- [13] 杜宗军, 王鹏, 李筠, 等. 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 1-4.
- [14] Yaphe W. The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae) [J]. Can J Microbiol, 1957, 3(7): 987-993.

Isolation and identification of a bacterial strain producing agarase from sea water

MEI Jian-feng, LI Sha, MAO He-ting, WANG Hong, YING Guo-qing

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Received: Sep., 23, 2013

Key words: Agarase; *Vibrio* sp.; Isolation and Identification; 16S rDNA

Abstract: To obtain microbes for producing high activity agarase, a series of bacterial strains in sea water were isolated, screened and identified. By prescreening in plate cultivation and twice screening in liquid cultivation, a strain designated as G-5 was isolated from sea water that was taken from Zhoushan coastal areas in Zhejiang Province. The activity of agarase produced by G-5 could reach 413.8 U/mL. The colony of G-5 was milky white and semitransparent with a wet surface. The cell of G-5 was Gram negative and rod-shaped with a size of 0.58~0.69 $\mu\text{m} \times 1.50 \sim 2.26 \mu\text{m}$. The 16S rDNA sequence of G-5 was 98% homologous to 15 strains of *Vibrio* species in the database of NCBI. It could be concluded that the strain G-5 was a *Vibrio* species.

(本文编辑: 梁德海)