

产微球茎菌琼胶酶基因的克隆及生物信息学分析

高 贺¹, 王新侠¹, 倪 辉^{1,2,3,4}, 肖安风^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以琼脂为唯一碳源的培养基分离出一株产琼胶酶的海洋菌株 AG1, 16S rRNA 基因序列分析显示, 该菌株为产微球茎菌 (*Microbulbifer* sp.)。以菌株 AG1 的基因组为模板, 使用琼胶酶特异性引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物克隆至 pMD18-T 载体后进行测序。结果显示, 克隆基因的大小为 1302 bp, 预测编码含有 433 个氨基酸残基的蛋白质。对该蛋白质进行生物信息学分析, 结果表明, 该蛋白质序列与来自耐热微泡菌 (*Microbulbifer thermotolerans*) 的琼胶酶氨基酸序列相似性为 100%, 预测本研究克隆的基因编码琼胶酶。该琼胶酶的理论分子质量大小为 48.2 ku, 理论等电点为 5.42。采用同源建模法建立 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的三维结构, 富含 β -折叠。

[关键词] 产微球茎菌; 琼胶酶; 克隆; 生物信息学

[中图分类号] Q 939.97

Cloning and Bioinformatics Analysis of the Agarase Gene from *Microbulbifer* sp. AG1

GAO He¹, WANG Xin-xia¹, NI Hui^{1,2,3,4}, XIAO An-feng^{1,2,3,4}, CAI Hui-nong^{1,2,3,4}, ZHU Yan-bing^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China; 3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China; 4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

Abstract: By using agar as the sole carbon source in the culture medium, a marine bacterium strain AG1 producing agarases was isolated. It was identified as *Microbulbifer* sp. AG1 based on 16S rRNA gene sequences alignment. The genomic DNA of this strain was used as the template for amplification of agarase gene by using PCR with a pair of specific primers. The amplified products were cloned into pMD18-T vector and then sequenced. It showed that the cloned gene was 1302 bp, encoding 433 amino acid residues. This protein was further analyzed by bioinformatics. The results showed that the target protein sequence shared 100% identity with the agarase sequence from *Microbulbifer thermotolerans*. The theoretical molecular weight and pI of the agarase were 48.2 ku and 5.42, respectively. The three-dimensional structure of *Microbulbifer* sp. AG1 agarase was constructed by homology modeling and presented β -strands rich structure.

[收稿日期] 2015-10-09

[修回日期] 2015-11-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31401632); 厦门南方海洋研究中心项目(13PZP002NF03, 13GZP004NF10); 集美大学科研创新团队基金项目(2010A006)

[作者简介] 高贺(1989-), 男, 硕士生, 从事微生物学方向研究。通信作者: 朱艳冰(1976-), 女, 副教授, 从事食品生物化学方向研究, E-mail: yanbingzhu@163.com。

Keywords: *Microbulbifer* sp. ; agarase; cloning; bioinformatics

0 引言

琼脂是一种存在于江蓠、石花菜等红藻细胞壁中具有高凝胶强度的多糖, 它由琼脂糖和琼脂胶组成。琼脂糖是由 (1→3) -O-β-D-半乳糖和 (1→4) -O-3, 6-内醚-α-L-半乳糖交替组成的链状分子。琼脂胶与琼脂糖有类似的多糖链状结构, 但含有多种取代基, 如硫酸酯、丙酮酸乙缩醛、甲基等^[1]。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, 琼胶酶可分为 α 琼胶酶和 β 琼胶酶两大类。α-琼胶酶 (EC 3.2.1.158) 作用于琼脂糖的 α-1, 3 糖苷键, 产物是以 3, 6-内醚-α-L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖 (Agaro-oligosaccharide, AOs); β-琼胶酶 (EC 3.2.1.81) 作用于琼脂糖的 β-1, 4 糖苷键, 产物是以 β-D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖 (Neoagaro-oligosaccharides, NAOs)^[2]。琼胶经琼胶酶降解产生的琼胶低聚糖、琼胶寡糖表现出多种化学特性和生理学功能, 如抑菌、抗氧化、美白、保湿、缓解淀粉氧化等^[3-7], 可用于功能性食品、医药和化妆品等领域, 具有广阔的应用前景和经济价值。目前已知琼胶酶的来源相当广泛, 包括海水、海底沉积物、海藻、淡水和土壤等^[8-10]。利用基因工程技术将琼胶酶基因在工业化生产的宿主细胞中进行高效表达, 可以获得高产量和高纯度的琼胶酶制剂, 具有较高的产业潜力。本研究对实验室筛选到的产琼胶酶菌株 AG1 的琼胶酶基因进行克隆及生物信息学分析, 为该菌株琼胶酶的酶学性质、酶的结构与功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株 AG1 由本实验室筛选获得; *E. coli* DH5α 菌株由本实验室保存。

pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 DNA 标准均为 TaKaRa 公司产品; T₄ DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 柱式质粒 DNA 提取试剂盒和柱式 DNA 胶回收试剂盒均为生工生物工程 (上海) 股份有限公司产品; 寡核苷酸序列的合成及核酸序列的测定均委托英潍捷基 (广州) 股份有限公司完成, 其余试剂均为分析纯产品。

1.2 产琼胶酶菌株的筛选

称取适量采自厦门集美红树林的泥土样品, 用无菌过滤海水进行梯度稀释, 涂布于选择培养基 (琼脂 20.00 g, NaNO₃ 5.00 g, 豆饼粉 0.50 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.02 g, K₂HPO₄ 0.10 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.02 g, 过滤海水 1000 mL, pH = 7.5), 22 °C 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^[11]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进一步研究。

1.3 产琼胶酶菌株的鉴定

提取菌株的基因组 DNA, 利用引物 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R (5' - GGCTACCTGTACGACTT - 3') 对细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 °C 5 min 预变性; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行电泳分析, 产物纯化后进行测序分析。使用 GenBank 的 BLAST 程序对测得的序列进行同源性搜索, 选取相似性高的序列, 采用 MEGA 6.0 软件的邻接法^[11] (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 确定菌株的分类地位。此外, 菌落形态、革兰氏染色实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]。利用梅里埃 VITEK2 全自动细菌鉴定仪对菌株进行生理生化鉴定。

1.4 琼胶酶基因的克隆

参照 GenBank 中 *Microbulbifer thermotolerans* 的琼胶酶基因序列, 合成以下引物, P1: 5' - AGAAAATAACCTCAATAC - 3', P2: 5' - CAGCTTCACAAAGCGGATT - 3'。以细菌基因组为模板进行

PCR 扩增,反应条件为:95 °C 5 min 预变性;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,凝胶回收目的基因片段。将回收产物与 T 载体进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。细胞涂布在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养平板上(平板上预先涂布 10 μ L 0.5 mol/L IPTG 和 50 μ L 20 g/L X-gal)。从平板挑选白色单菌落进行菌落 PCR,鉴定重组子,并经测序鉴定重组质粒中的插入序列。

1.5 基因及其编码产物的生物学信息分析

利用 NCBI 的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行蛋白质序列的同源性搜索。利用 MEGA 6.0^[13] 的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。利用 ExPASy 的 protparam 工具进行蛋白质的理化性质预测。蛋白质二级结构预测采用 NPS 服务器(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)上的 GOR4 法^[14] 进行,蛋白质的结构域及信号肽分析利用 SMART^[15] 进行。利用 SWISS-MODEL^[16] 进行蛋白质结构的三维建模,采用 PyMOL 软件显示蛋白质的空间结构。使用 Discover Studio 的 LibDock 工具进行酶与底物的分子对接。

2 结果

2.1 产琼胶酶菌株的筛选

从红树林泥土样品中,筛选到 10 余株具有降解琼胶能力的海洋细菌,其中菌株 AG1 菌落周围有明显的凹陷,卢戈氏碘液染色后,形成很大的透明水解圈(见图 1)。

2.2 产琼胶酶菌株的鉴定

菌株 AG1 的 16S rRNA 基因测序后,得到的序列长度为 1393 bp。将该序列与 GenBank 数据库的序列进行相似性比对,然后挑选相似性高的菌株构建系统发育树。结果(见图 2)显示,菌株 AG1 与产微球茎菌属(*Microbulbifer* sp.)的菌株分布在一个大分支上,它的 16S rRNA 基因序列与来自 *Microbulbifer thermotolerans* strain JAMB A94 (NR_040989)、*Microbulbifer marinus* strain Y215 (NR_108573)、*Microbulbifer halophilus* strain YIM 91118 (NR_04435)、

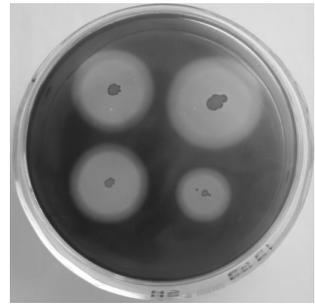


图 1 菌株 AG1 在琼脂平板上的碘液染色结果
Fig.1 Clearance zone of the strain AG1 incubated on agar plate flooding with the I₂ solution

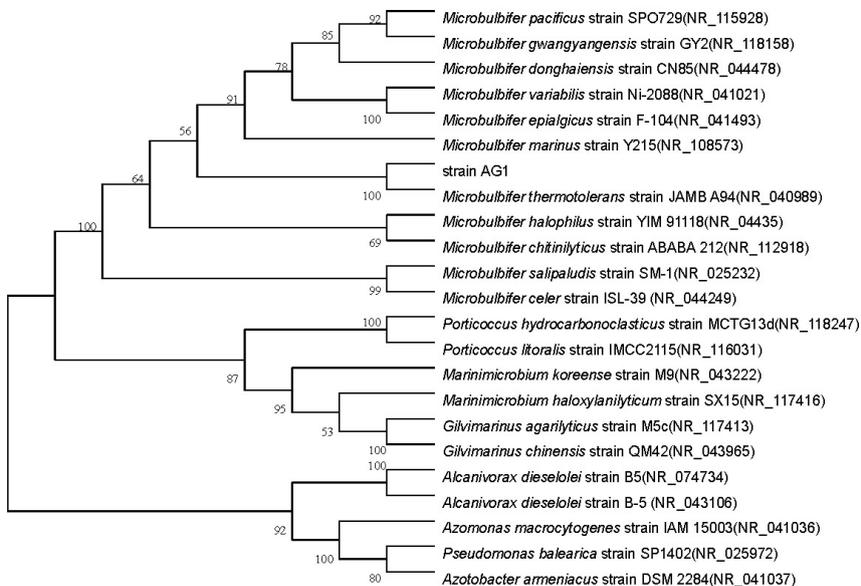


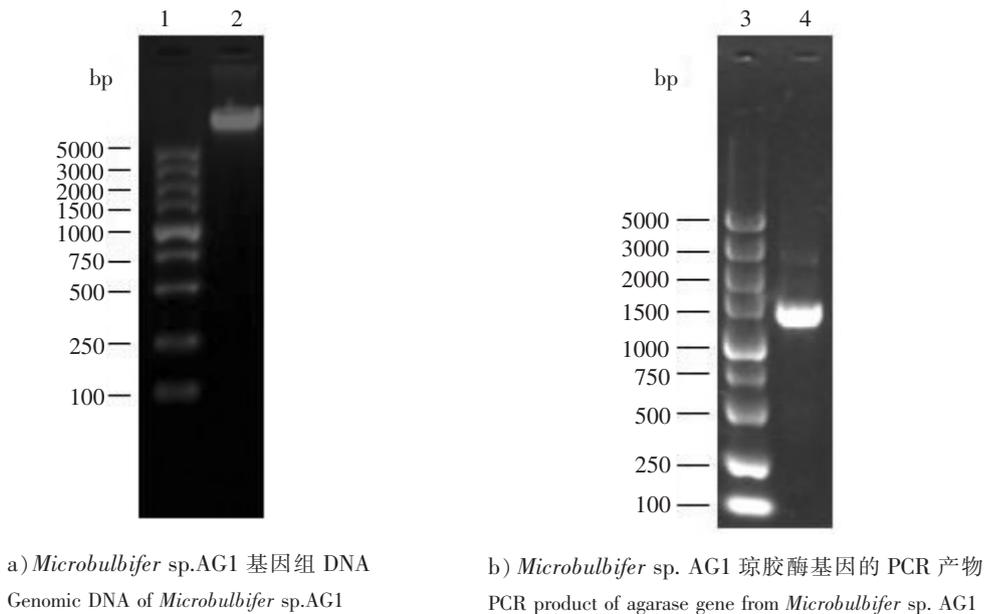
图 2 菌株 AG1 与其他相关菌株的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of strain AG1 with other related bacteria

Microbulbifer chitinilyticus strain ABABA 212(NR_112918)、*Microbulbifer variabilis* strain Ni-2088(NR_041021)、*Microbulbifer donghaiensis* strain CN85(NR_044478)、*Microbulbifer epialgicus* strain F-104(NR_041493)、*Microbulbifer pacificus* strain SPO729(NR_115928)和 *Microbulbifer gwangyangensis* strain GY2(NR_118158)的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 100%、96%、96%、96%、96%、96%、96%、96%和 95%，因此，将菌株 AG1 归属于产微球茎菌属 (*Microbulbifer* sp.)。

该菌株的菌落呈棕色，表面光滑湿润，为革兰氏阴性菌。生理生化鉴定结果表明，该菌株呈现阳性反应包括丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶、L-脯氨酸芳胺酶、酪氨酸芳胺酶和磷酸酶。阴性反应包括侧金盏花醇、吡咯烷基芳胺酶、L-阿拉伯醇、D-纤维二糖、β-半乳糖苷酶、H₂S、β-N-乙酰葡萄糖苷酶、谷氨酰芳胺酶、D-葡萄糖、γ-谷氨酰转移酶、葡萄糖发酵、β-葡萄糖苷酶、D-麦芽糖、D-甘露醇、D-甘露糖、β-木糖苷酶、β-丙氨酸芳胺酶、脂酶、古老糖、尿素酶、D-山梨醇、蔗糖、D-塔格糖、D-海藻糖、柠檬酸盐、丙二酸盐、5-酮-葡萄糖苷、乳酸盐产碱、α-葡萄糖、琥珀酸盐产碱、N-乙酰-β-半乳糖氨酶、α-半乳糖苷酶、氨基乙酸芳胺酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、脱羧酶阴性控制、组氨酸同化、β-葡萄糖苷酸酶、O129 耐受、谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶、L-苹果酸盐同化、二硫代硝基苯甲酸、L-乳酸盐同化。

2.3 琼胶酶基因的克隆

以 *Microbulbifer* sp. AG1 的基因组 DNA (见图 3a) 为模板，利用琼胶酶引物进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳显示，扩增产物为大约 1300 bp 的 DNA 片段 (见图 3b)。将该基因克隆入 T 载体后进行测序分析，目的基因大小为 1302 bp。将该序列提交 GenBank，获得登录号为 KU049031。



说明: 1—DL5000 DNA 标准; 2—基因组 DNA; 3—DL5000 DNA 标准; 4—琼胶酶基因的 PCR 产物。

Notes: 1—DL5000 DNA marker; 2—Genomic DNA of *Microbulbifer* sp. AG1; 3—DL5000 DNA marker; 4—PCR product of agarase gene from *Microbulbifer* sp. AG1.

图 3 *Microbulbifer* sp. AG1 的基因组 DNA 及琼胶酶基因的 PCR 产物

Fig.3 Genomic DNA of *Microbulbifer* sp. AG1 and PCR product of the agarase gene from *Microbulbifer* sp. AG1

2.4 琼胶酶基因及其编码产物的序列分析

Microbulbifer sp. AG1 琼胶酶基因 (1302 bp) 预测编码 433 个氨基酸。该蛋白质的前 20 个氨基酸残基预测为信号肽，预测的切割位点位于 A20 和 A21 之间。将该蛋白质序列在 Genbank Reference proteins 数据库中进行同源性搜索，结果显示，目的基因编码的蛋白质序列与来自 *Microbulbifer*

thermotolerans (BAD29947)、*Simiduia agarivorans* (WP_015048661)、*Simiduia* sp. TM-2 (BAQ95400)、*Gilvimirinus polysaccharolyticus* (WP_049721028)、*Microbulbifer agarilyticus* (BAE06228)、*Saccharophagus degradans* 2-40 (AAT67062) 琼胶酶的序列分别具有 100%、63%、62%、60%、60% 和 58% 的相似性,所以该基因预测编码琼胶酶。将本研究的 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶序列与其他菌株来源的琼胶酶序列进行比对,结果如图 4 所示。

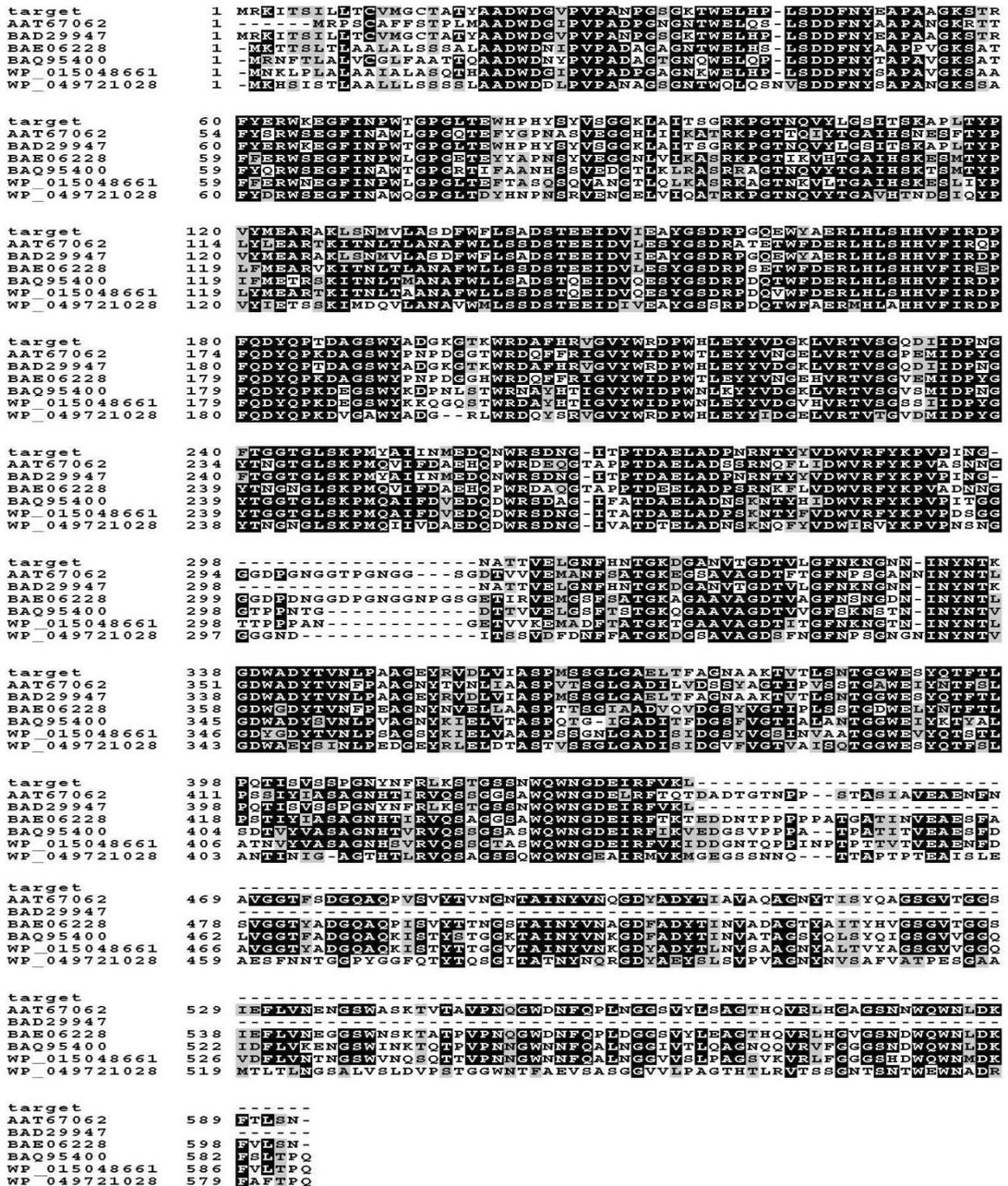


图 4 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的氨基酸序列与其他菌株来源的琼胶酶序列的比对

Fig.4 Alignment of the agarase protein sequences from *Microbulbifer* sp. AG1 with the agarase sequences from other bacterial strains

2.5 琼胶酶基因编码蛋白质的理化性质

利用 ExPASy 的 ProtParam 工具分析目的基因所编码蛋白质的序列,结果如下:氨基酸个数为 433,理论分子质量大小为 48.2 ku;理论等电点为 5.42,负电荷残基总数为 47 (D + E),正电荷残

基总数为 37 (R + K); 预测在大肠杆菌细胞内半衰期大于 10 h, 不稳定指数为 24.45, 该蛋白质分类为稳定蛋白质; 脂溶指数为 65.10, 亲水性平均指数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.514。

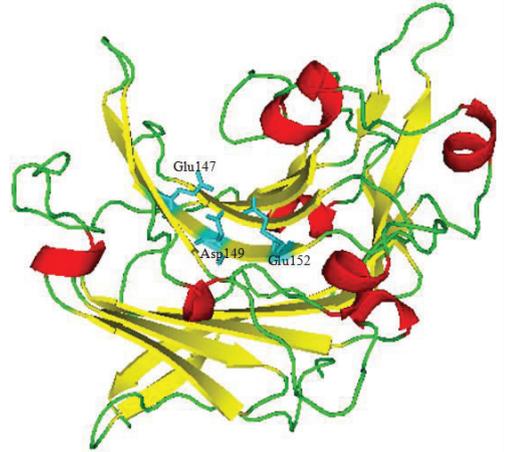
2.6 琼胶酶的二级结构和结构域

使用 NPS 的 GOR4 法在线预测 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的二级结构, α -螺旋、 β -折叠和不规则卷曲分别占 10.39%、30.72% 和 58.89%。该蛋白质包含一个糖苷水解酶 16 家族的结构域和一个碳水化合物结合模块, 分别位于 78 ~ 288 位氨基酸残基和 308 ~ 432 位氨基酸残基。菌株 AG1 的琼胶酶可能属于糖苷水解酶 16 家族。

2.7 琼胶酶的三级结构

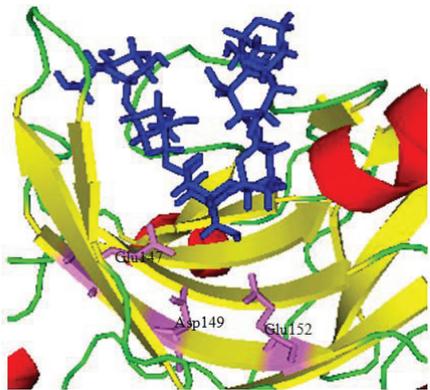
将 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶进行三维模建, 模板为来自 *Microbulbifer thermotolerans* 的琼胶酶 (PDB 登录号为 3wz1)。模建的残基范围为目的序列中的 21 ~ 433 位氨基酸残基, 在此范围内, 目的序列与模板序列的相似性为 100%。与其他的糖苷水解酶 16 家族的琼胶酶^[17-18]相似, *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的三级结构富含 β 折叠, 整体结构由两个反向平行的 β -片层组成, 呈 β -果冻卷状 (见图 5)。通过与模板序列进行比对, Glu147、Asp149 和 Glu152 组成可能的 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶催化活性位点^[18], 整个催化腔为开放的裂隙状 (见图 5)。

采用 Discover Studio 的 LibDock 工具将菌株 AG1 的琼胶酶 3D 结构与琼脂六糖 (PDB 登录号为 1AGA) 进行分子对接, 得到底物分子与该琼胶酶的相互作用 (见图 6)。在 3D 对接模型 (见图 6a) 中, 琼脂六糖分子以折叠的方式进入 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的催化腔中, 并与位于催化腔中且和催化相关的氨基酸 (Glu147、Asp149

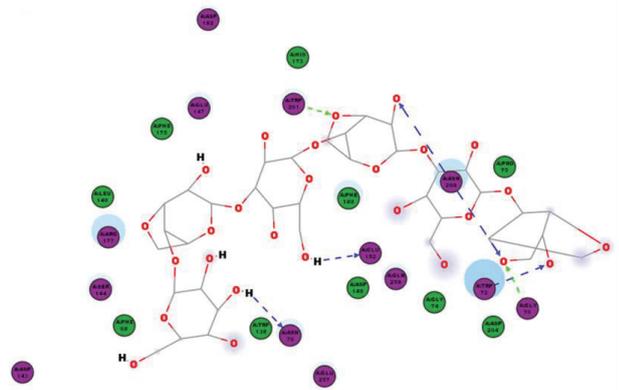


说明: α -螺旋显示为红色, β -折叠显示为黄色。可能的催化活性位点 Glu147、Asp149 和 Glu152 被标记。
Notes: α -helix, red; β -sheet, yellow. Model with the putative catalytic active sites (Glu147, Asp149 and Glu152) labeled.

图 5 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的三维模建
Fig.5 3D structure modeling of *Microbulbifer* sp. AG1 agarase



a) 三维结构模型 3D structure modeling



b) 二维平面图 Planar graph

说明: 琼胶六糖被标记为蓝色; 紫色表示参与氢键、静电或极性相互作用的氨基酸; 绿色表示参与范德华力作用的氨基酸; 蓝色箭头指配体与氨基酸侧链形成的氢键, 箭头指向电子供体。

Notes: Agarase and agarohexaose, agarohexaose was labeled blue; putative catalytic active sites were labeled purple; purple stands for amino acids involved in hydrogen bonding, electrostatic or polar interaction; green represents amino acids involved in van der Waals force acts; blue arrow indicated hydrogen bonds formed by ligand side chains and amino acids. The arrow pointing in the direction of electron donor.

图 6 配体-蛋白质相互作用的三维结构模型和二维平面图

Fig.6 3D structure modeling and planar graph of ligand-protein interaction

和 Glu152) 相互接近,六糖侧链与这几个氨基酸侧链的距离在 0.23 nm 以内。从二维平面图(见图 6b)中可以看出, Glu147 和 Glu152 分别位于琼脂糖链的两侧, Glu152 与糖链形成了氢键,两个残基都与糖链有极性相互作用, Asp149 则与琼脂六糖分子存在着范德华力作用。Phe68、Trp72、Trp138、Ser144、Trp261 与琼脂六糖侧链上的基团相互接近,且具有氢键或极性相互作用,推测这些氨基酸残基可能与底物的结合相关。

3 讨论

琼胶酶在琼胶寡糖制备、海藻工程、细菌来源琼胶的代谢研究等方面有着极其重要的作用。本研究利用 GenBank 数据库中已有的 *Microbulbifer thermotolerans* JAMB - A94 琼胶酶基因序列设计引物,从目的菌株的基因组中成功扩增了 1302 bp 的基因片段。通过蛋白质序列的比对分析,发现该基因编码的蛋白质与 *Microbulbifer thermotolerans* 的琼胶酶具有较高的相似性。所以,本研究克隆的基因预测编码琼胶酶。

由 CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) 数据库可知,琼胶酶归属于糖苷水解酶家族 (GHs, EC 3.2.1 -) 的成员。根据酶的初级结构可将 GHs 分为 100 多个家族,琼胶酶属于 6 个家族^{[3]921},分别为 GH - 16、GH - 50、GH - 86、GH - 96、GH - 117 和 GH - 118,其中 GH - 16 家族中琼胶酶数量最为庞大,且催化机理的研究也较为透彻。GH - 16 家族的琼胶酶通常包含两个与琼胶水解相关的模块,即碳水化合物结合模块和催化糖苷水解模块。本研究中, *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶也包含上述两个模块。研究表明, GH - 16 家族的 β - 琼胶酶的催化模块主要由 β - 片层组成, β - 片层形成的 β - 果冻卷结构内有一个裂隙状的催化腔,裂隙的两边各存在一个 Glu^[17-18]。 *Microbulbifer* sp. AG1 的 3D 结构也主要由 β - 片层组成,形成一种卷状结构, Glu147 和 Glu152 位于这种卷状结构的裂隙两侧。将菌株 AG1 琼胶酶和琼脂六糖分子进行对接, Glu147 和 Glu152 分别位于琼脂六糖分子的两侧,而且与六糖分子有着极性相互作用。与 GH - 16 家族的催化水解机制^[17]相类似, *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶分子中, Glu147 的羧基可能作为亲核试剂, Glu152 的羧基则可能作为广义的酸/碱,在酶的催化过程中起重要作用。但目前关于 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶活性中心起到关键作用的氨基酸,目前还只是基于软件的推测,需要后续的实验进行验证。

4 结论

本研究从以琼脂为唯一碳源的培养基中分离到一株产琼胶酶的海洋菌株 AG1,并通过 16S rRNA 基因序列的测定,确定该菌为产微球茎菌 (*Microbulbifer* sp.)。并使用特异性引物进行 PCR 扩增,从该菌中获得了编码琼胶酶的基因序列。该琼胶酶基因的大小为 1302 bp,预测编码含有 433 个氨基酸残基的蛋白质。采用同源建模法建立 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的三维结构,其中富含 β - 折叠。*Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的克隆及生物信息学分析为该酶的进一步研究打下良好的基础。在未来的研究中,可以进行 *Microbulbifer* sp. AG1 琼胶酶的表达及酶学性质研究,或进一步利用定向进化技术提高该琼胶酶的催化活性或热稳定性,为该琼胶酶的工业化生产和应用打下良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] DUCKWORT M, YAPHE W. The structure of agar: Part I fractionation of a complex mixture of polysaccharides. Carbohydr Res, 1971, 16(1): 189-197. DOI:10.1016/s0008-6215(00)86113-3.
- [2] PARK DA YEON, CHI WON-JAE, PARK JAE-SEON, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a GH16 β -agarase AgaH71 from *Pseudoalteromonas hodoensis* H7. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175(2): 733-747. DOI:10.1007/s12010-014-1294-3.
- [3] CHI W J, CHANG Y K, HONG S K. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. Appl Microbiol <http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- Biotechnol, 2012, 94(4): 917-930. DOI:10.1007/s00253-012-4023-2.
- [4] WANG J, JIANG X, MOU H, et al. Antioxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. J Appl Phycol, 2004, 16(5): 333-340. DOI:10.1023/B:JAPH.0000047944.40463.e6.
- [5] KOBAYASHI R, TAKISADA M, SUZUKI T, et al. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(1): 162-163. DOI:10.1271/bbb.61.162.
- [6] HU B, GONG Q, YE W, et al. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. Anaerobe, 2006, 12(5/6): 260-266. DOI:10.1016/j.anaerobe.2006.07.005.
- [7] 陈建澍, 郑兰娟, 梅建凤, 等. 新琼寡糖对唾液淀粉酶活性的影响. 食品科技, 2013(8): 71-74.
- [8] HOON Y, JUNG C, LEE J. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. J Microbiol Biotechnol, 2011, 21(8): 818-821. DOI:10.4014/jmb.1012.12027.
- [9] CUI F, DONG S, SHI X, et al. Overexpression and characterization of a novel thermostable β -agarase YM01-3 from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01T. Mar Drugs, 2014, 12(5): 2731-2747. DOI:10.3390/md12052731.
- [10] 马芮萍, 朱艳冰, 倪辉, 等. 一株产琼胶酶细菌的分离、鉴定及其琼胶酶基本性质. 微生物学报, 2014, 54(5): 543-551.
- [11] HODGSON D A, CHATER K F. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2), and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP 1. J Gen Microbiol, 1981, 124(2): 339-348. DOI:10.1099/00221287-124-2-339.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 132-148.
- [13] TAMURA K, STECHER G, PRTERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729. DOI:10.1093/molbev/mst197.
- [14] GARNIER J, GIBRAT J F, ROBSON B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol, 1996, 266(1): 540-553. DOI:10.1016/s0076-6879(96)66034-0.
- [15] SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(11): 5857-5864. DOI:10.1186/gb-2000-1-1-reports234.
- [16] AMOLD K, BORDOLI L, KOPP J T, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201. DOI:10.1093/bioinformatics/bti770.
- [17] ALLOUCH J, JAM M, HELBERT W, et al. The three-dimensional structures of two β -agarases. J Biol Chem, 2003, 278(47): 47171-47180. DOI:10.2210/pdb1o4z/pdb.
- [18] TAKAGI E, HATADA Y, AKITA M, et al. Crystal structure of the catalytic domain of a GH16 β -agarase from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94. Biosci Biotechnol Biochem, 2015, 79(4): 625-632. DOI:10.1080/09168451.2014.988680.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)