

Flammeovirga sp. SJP92 琼脂酶的分离纯化及其酶学性质

黄能平, 阮灵伟, 施 泓

(国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:琼胶酶是一类能够降解琼脂糖生成琼胶寡糖的酶类, 具有广泛的应用范围. 从海洋性高产琼胶酶菌株 *Flammeovirga* sp. SJP92 的发酵液经硫酸铵沉淀, DEAE-琼脂糖离子层析, 分离纯化获得了一个分子量约为 70KDa 的琼胶酶 AgaB. 经过酶学性质分析, 它的最适 pH 值为 7.0, 最适温度为 40°C, 在最适温度下能够保持较好的稳定性. 进一步的分析表明, MgSO₄ 和 β-Me 对该酶有明显的促进作用, 而 CaCl₂、MnCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、FeCl₃、CuSO₄ 等则会强烈抑制它的活性. 此外, 通过产物分析表明, 该酶能够通过内切作用将琼脂糖最终降解成 6 糖和 4 糖. AgaB 的分离纯化及其酶学性质分析为其工业应用奠定了基础.

关键词:海洋生物学; *Flammeovirga* sp.; 琼胶酶; 分离纯化; 酶学性质

DOI:10.3969/J.ISSN.2095-4972.2016.01.014

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972 (2016)01-0116-06

琼胶是一种为人所熟知的海洋性多糖, 在食品添加剂和微生物培养基中经常可以见到. 它是红藻门江蓠属和石花菜属等藻类植物细胞壁的重要组成成分^[1]. 琼胶主要是由 β-D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半乳糖通过 β-1,4 糖苷键和 α-1,3 糖苷键相互交联而成. 琼胶酶是一类能够水解琼脂糖的酶类. 根据水解方式的不同, 可以分为 α-琼胶酶和 β-琼胶酶. α-琼胶酶可以破坏琼脂糖的 α-1,3 糖苷键生成琼胶寡糖, 而 β-琼胶酶可以降解琼脂糖的 β-1,4 糖苷键, 生成新琼胶寡糖. 据报道, 琼胶寡糖具有抗炎、抗氧化的作用, 而新琼胶寡糖具有美白保湿以及益生元的功效^[2-5]. 此外, 琼胶酶还被广泛应用于回收 DNA 和制备藻类原生质体等方面^[6-7].

许多微生物都能够分泌琼胶酶, 如 *Vibrio* sp.、*Thalassomonas* sp.、*Agarivorans* sp.、*Cytophaga* sp.、*Alteromonas* sp.、*Bacillus* sp.、*Flammeovirga* sp.、*Halococcus* sp.、*Thermococcus* sp. 等属的微生物均有报道可以产琼胶酶^[8-11]. 这些微生物的生境十分多样, 如:淡水里、大洋底部淤泥、海藻表面、一些海洋软体动物胃肠道内等^[8]. 本实验室从厦门市大嶝岛

鲍鱼养殖场的鲍鱼胃肠道内筛选获得一株琼胶酶高产菌株 *Flammeovirga* sp. SJP92. 本研究进一步对该菌的琼胶酶进行了分离纯化, 并对其相应的酶学性质进行了初步的研究.

1 材料与方法

1.1 菌株

Flammeovirga sp. SJP92 由本实验室从厦门大嶝岛鲍鱼养殖场的鲍鱼胃肠道内分离得到, 15% 甘油 -75°C 保存.

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 培养基 2216E 培养基: 2.0% 氯化钠 (质量占比, 下同), 0.3% 六水氯化镁, 0.6% 七水硫酸镁, 0.1% 硫酸铵, 0.02% 碳酸氢钠, 0.03% 二水氯化钙, 0.05% 氯化钾, 0.042% 磷酸二氢钾, 0.005% 溴化钠, 0.002% 六水氯化硒, 0.001% 柠檬酸铵铁, 0.1% 酵母粉和 0.5% 蛋白胨, pH 值为 7.6. 固体培养基另外添加 0.6% 琼胶粉.

改良 2216E 培养基: 2.2% 氯化钠, 0.36% 六水氯化镁, 0.76% 七水硫酸镁, 0.03% 二水氯化钙,

收稿日期: 2015-04-01

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费资助项目 (201105027)

作者简介: 黄能平 (1986 ~), 男, 硕士研究生; E-mail: huangnengping@aliyun.com

通讯作者: 阮灵伟 (1981 ~), 男, 博士, 副研究员; E-mail: ruanlingwei@aliyun.com

0.05% 氯化钾, 0.042% 磷酸二氢钾, 0.005% 溴化钠, 0.002% 六水氯化硒, 0.001% 柠檬酸铵铁, 1.33% 蛋白胨, pH 值为 8.27.

1.2.2 培养方法 挑取冻存的 *Flammeovirga* sp. SJP92 于 2216E 培养基中, 32℃ 下 200 r/min 培养 12 h. 取部分菌液用含 0.6% 琼胶粉的 2216E 固体培养基包埋, 32℃ 静置培养 24 h, 制备单菌落. 挑取单菌落于 2216E 培养基中, 32℃ 下 200 r/min 培养 12 h, 即为种子液. 以 1% 的量将种子液加到改良的 2216E 培养基中 (含 0.2% 琼胶), 在 32℃ 下 200 r/min 发酵培养 36h, 即为发酵液.

1.3 琼胶酶酶活的测定

琼胶酶酶活测定方法参考 DNS 法^[12]. 取 10 nm³ 酶液与 390 nm³ 含 0.2% 琼脂糖的 PBS (pH 值为 7.0) 混合, 作为标准反应体系. 将混合液在 40℃ 水浴 30 min, 添加 400 nm³ DNS 试剂, 沸水浴处理 10 min, 在 540 nm 波长下测定反应产物的吸光值.

1.4 琼胶酶分离纯化

琼胶酶的分离纯化均在 0~4℃ 条件下进行. 将 *Flammeovirga* sp. SJP92 的发酵液 13 000 r/min 离心收集上清. 往发酵上清中加入固体硫酸铵粉末至饱和度为 40%, 静置 2 h. 13 000 r/min 离心 30 min, 收集上清. 在上清中继续添加固体硫酸铵粉末至饱和度为 80%, 静置过夜, 13 000 r/min 离心 30 min. 将沉淀用 20 mmol/dm³, pH 值为 7.8 的 Tris · HCl 缓冲液透析, 即为粗酶液. 将用 20 mmol/dm³, pH 值为 7.8 的 Tris · HCl 缓冲液平衡好的 DEAE Sepharose Fast Flow 填料加入粗酶液中, 颠倒混匀 1 h, 3 000 r/min 离心, 沉淀用少量的 20 mmol/dm³, pH 值为 7.8 的 Tris · HCl 缓冲液混匀成胶浆装柱. 用 20 mmol/dm³, pH 值为 7.8 的 Tris · HCl 缓冲液配置浓度为 0.0~0.3 mol/dm³ 的 NaCl 洗脱缓冲液线性梯度洗脱, 洗脱速度为 1.47 cm³/min, 每管收集 5 cm³. 按琼胶酶酶活的测定方法测定各管收集液的琼胶酶酶活, 并绘制酶活曲线.

根据酶活曲线, 将具有琼胶酶酶活的各管收集液合并, 置于滤膜孔径为 3 KDa 的超滤管中 6 000 r/min 离心浓缩, 即为纯化的琼胶酶.

1.5 蛋白质电泳与酶活染色

将蛋白质样品与蛋白上样缓冲液 [组份为 250 mmol/dm³ Tris · HCl (pH 值为 6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油] 混匀后, 在 4% 的浓缩胶和 8% 的分离胶上恒压电泳 (浓缩胶 100 V, 分离胶 160 V), 同样的蛋白质样品分别上两个不同的上样孔. 待溴酚蓝跑至凝胶末端结束电泳, 取出凝胶, 一条泳

道放于考马斯亮蓝溶液 (考马斯亮蓝 R250, 甲醇 45%, 冰醋酸 10%, 双蒸水 45%) 中染色 30 min, 然后在脱色液 (12.5% 异丙醇和 10% 醋酸的水溶液) 中脱色; 另一条泳道的凝胶放在 PBS (pH 值为 7.0) 中漂洗 3 次, 每次 10 min. 将凝胶贴于 1.5% 的琼脂糖凝胶上, 40℃ 反应 2 h. 揭去凝胶, 滴加卢戈氏碘液 (5% 碘与 10% 碘化钾的水溶液) 至条带显色.

1.6 蛋白质质谱分析

根据酶活染色的结果, 切取目标蛋白质条带, 由广州辉俊生物科技有限公司完成质谱分析.

1.7 酶学性质分析

1.7.1 pH 值 分别用 20 mmol/dm³ 的 NaAc · HAc 缓冲液 (pH 值为 4.5~5.5), Na₂HPO₄ · NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 值为 6.0~7.5), Tris · HCl 缓冲液 (pH 值为 8.0~9.0) 代替标准反应体系中的 PBS, 按琼胶酶酶活的测定方法测定纯化的琼胶酶酶活, 以各点中酶活力最高的值为对照, 绘制 pH 值-酶活曲线.

1.7.2 温度 根据标准反应体系制备琼胶酶反应混合液, 分别置于 30~75℃ 温度下, 反应 30 min, 按琼胶酶酶活的测定方法测定纯化的琼胶酶酶活, 以各点中酶活力最高的值为对照, 从而绘制了温度-酶活曲线.

1.7.3 热稳定性 将琼胶酶酶液分别置于 40、45、50℃ 温浴 2.5 h, 其间每隔 30 min 分别取样, 随后用标准反应体系检测所取样品的琼胶酶酶活, 以各点中酶活力最高的值为对照, 绘制温度稳定性曲线.

1.7.4 化学试剂对琼脂酶酶活的影响 分别在标准反应体系中加入相应浓度的化学试剂 (表 1), 按琼胶酶酶活的测定方法测定琼胶酶酶活. 以不添加任何额外试剂的反应体系为对照, 计算酶活变化的百分比.

表 1 各种化学试剂对琼胶酶 AgaB 活性的影响
Tab. 1 Effect of various reagents on the activity of AgaB

化学试剂	浓度/mm ³ · dm ⁻³	相对酶活 ± SD/%
-	-	100 ± 3.45
NaCl	10	109.29 ± 1.27
KCl	10	106.57 ± 2.97
MgSO ₄	3	127.38 ± 2.98
	10	135.39 ± 0.65
CaCl ₂	3	70.35 ± 1.21
MnCl ₂	3	23.29 ± 3.79
ZnCl ₂	3	1.00 ± 0.88
	10	1.16 ± 0.86
CuSO ₄	3	2.97 ± 0.35

续表 1

化学试剂	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	相对酶活 \pm SD/%
FeCl_3	3	6.93 \pm 0.23
CoCl_2	3	39.32 \pm 3.65
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	91.59 \pm 2.59
β -Me	3	119.03 \pm 0.79
	10	156.71 \pm 2.24
EDTA	3	114.91 \pm 1.30
SDS	3	97.77 \pm 1.54
Urea	3	101.09 \pm 3.16
	10	96.39 \pm 4.13

1.7.5 产物分析 配制含 0.3% 琼脂糖的 PBS (pH 值为 7.0), 按 39:1 ($v:v$) 与琼胶酶酶液混匀, 40°C 温浴. 在 0 ~ 12 h 内分别取样, 反应完毕后, 4°C 保存. 分别取 5 nm³ 反应物点在硅胶板上 (Merck, Darmstadt, Germany), 吹干后, 展层 1 h [展层剂为氯仿: 甲醇: 冰乙酸 (2:2:1, $v:v:v$)], 均匀喷雾乙醇硫酸混合液 (9:1, $v:v$), 95°C 烘箱显色.

2 结果与讨论

2.1 琼胶酶的分离纯化

Flammeovirga sp. SJP92 发酵液在经过 45% ~ 85% 的硫酸铵沉淀, DEAE-琼脂糖离子层析后, 得到了数十管收集液, 通过酶活测定, 绘制了它们的酶活曲线 (图 1). 从中挑取活性较高的数管 (34 ~ 44 管), 浓缩后, 我们获得了琼胶酶 AgaB (图 2). 从图 2 中的泳道 1 可看出 AgaB 的纯度在 90% 以上, 其分子量大小为约为 70 KDa, 由于它将琼脂糖降解, 在泳道 2 对应位置上形成一个清晰的条带.

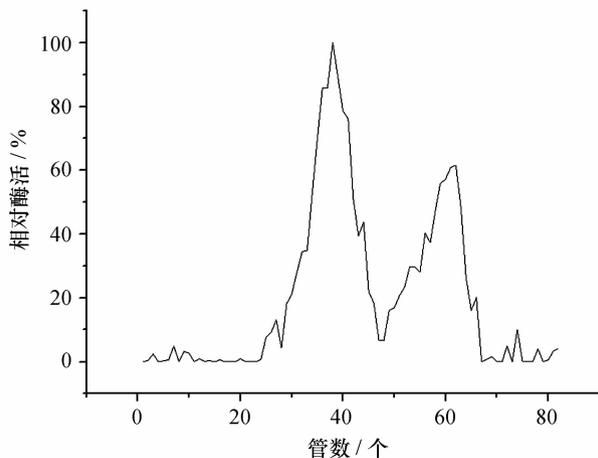


图 1 琼胶酶 AgaB 经 DEAE 琼脂糖离子层析的的酶活曲线
Fig. 1 Purification of AgaB from *Flammeovirga* sp. SJP92 by DEAE sepharose fast flow

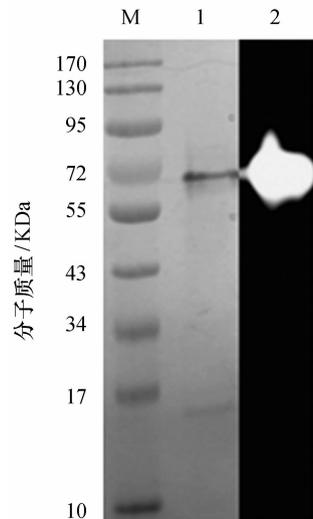


图 2 琼胶酶 AgaB SDS-PAGE 与酶活染色
Fig. 2 SDS-PAGE and gel activity assay of AgaB
1: 纯化的 AgaB; 2: AgaB 酶活染色

2.2 质谱鉴定

根据纯化获得的 AgaB 酶活染色的结果, 我们切取了目的蛋白, 并进行了质谱鉴定. 经 MALDI-TOF-TOF 质谱及 MASCOT 检索数据库搜索鉴定, 其与 *Flammeovirga pacifica* 菌株 WPAGA1 的 β -琼胶酶 AgaP2049 的同源性最高, 蛋白分数达到 308 (阈值为 59).

2.3 酶学性质分析

2.3.1 pH 值 分别用 20 mmol/dm³ 的 NaAc · HAc 缓冲液 (pH 值为 4.5 ~ 5.5), Na₂HPO₄ · NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH 值为 6.0 ~ 7.5), Tris · HCl 缓冲液 (pH 值为 8.0 ~ 9.0) 代替标准反应体系中的磷酸缓冲液来分析 pH 值对琼胶酶 AgaB 酶活力的影响. 由图 3 可见, AgaB 在 pH 值为 4.5 ~ 9.0 区间均有活性, pH 值中性区间是它酶活力较大的区间, 且在 pH 值为 7.0 时, 酶活力最高.

2.3.2 温度 根据标准反应体系制备的琼脂酶反应混合液, 分别置于 30 ~ 75°C 温度下反应来分析温度对 AgaB 琼胶酶活性的影响. 从图 4 可知, 琼胶酶 AgaB 在 35 ~ 65°C 区间均有活性, 40 ~ 50°C 是它活性较大的区间, 其最适温度为 40°C.

2.3.3 热稳定性 为了分析 AgaB 的热稳定性, 先分别将其置于 40、45、50°C 温浴 2.5 h, 其间每隔 30 min 分别取样, 测定酶活. 由图 5 可知 AgaB 在最适温度 40°C 下最为稳定, 温浴 150 min 后仍可以保持 95% 以上的酶活. 但在 45°C 和 50°C 下, 酶活则损失 36% 和 62%.

2.3.4 化学试剂对琼胶酶活力的影响 为了了解

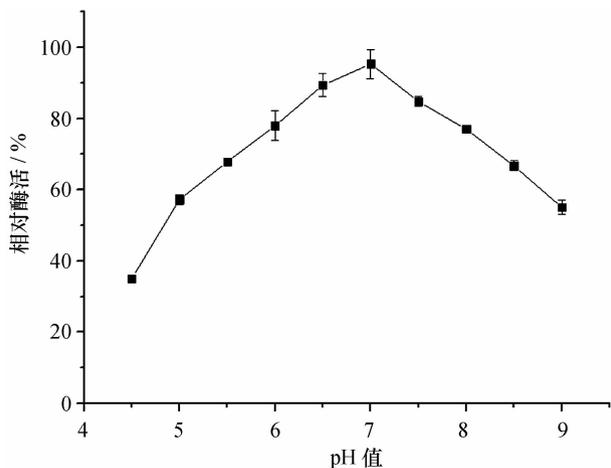


图3 pH 值对琼胶酶 AgaB 活性的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the activity of AgaB

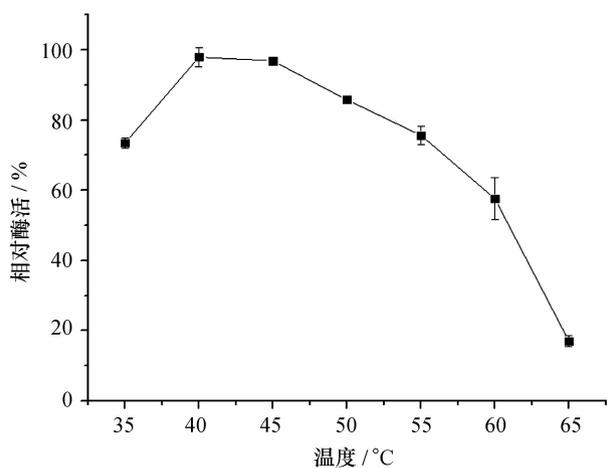


图4 温度对琼胶酶 AgaB 活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of AgaB

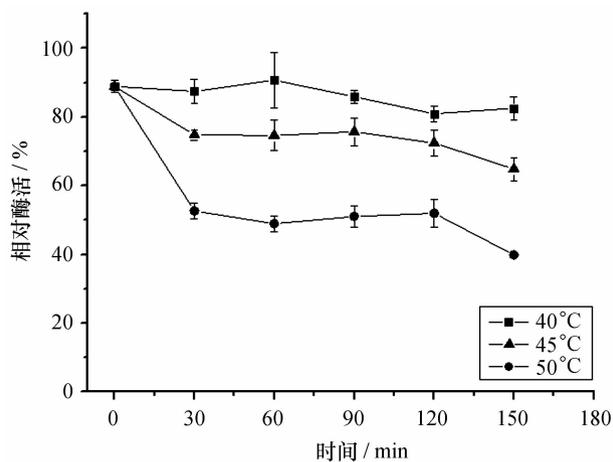


图5 琼胶酶 AgaB 的温度稳定性

Fig. 5 Effect of temperature on the stability of AgaB

化学试剂对 AgaB 琼胶酶活力的影响,分别在标准反应体系中加入相应浓度的化学试剂.由表 1 可知,

MgSO₄ 与 β-Me 对琼胶酶 AgaB 的酶活均有较大的促进作用. CaCl₂、MnCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、FeCl₃、CuSO₄ 和 (NH₄)₂SO₄ 对琼胶酶 AgaB 的酶活均有抑制作用,其中 ZnCl₂、FeCl₃ 和 CuSO₄ 几乎使得 AgaB 失去了活性.其余的化学试剂对琼胶酶 AgaB 没有明显影响.

2.3.5 产物分析 由图 6 可知,在最初的阶段,琼胶酶 AgaB 将琼脂糖降解成 10 糖、8 糖、6 糖和 4 糖等一系列分子量大小不等的寡糖,随着时间延长,10 糖和 8 糖逐渐被降解,当反应时间达 30 min 时, AgaB 已将琼脂糖完全降解为 6 糖和 4 糖.这样的降解模式说明 AgaB 是一种内切酶,它降解的最终产物是 6 糖和 4 糖.

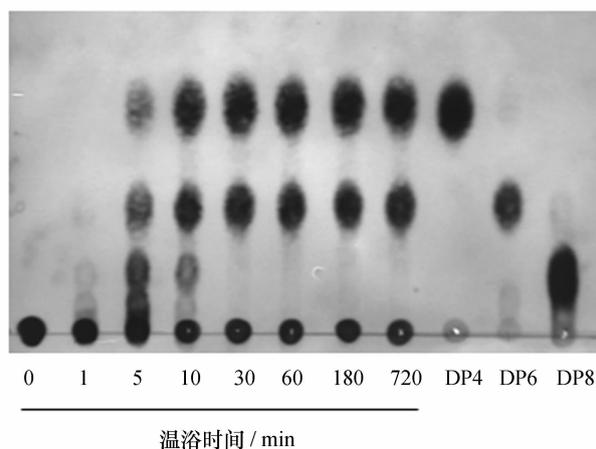


图6 TLC 法分析琼胶酶 AgaB 水解琼脂糖的产物

Fig. 6 TLC analysis of the products of agarose hydrolysis by AgaB

DP4: 琼脂 4 糖; DP6: 琼脂 6 糖; DP8: 琼脂 8 糖

2.4 讨论

琼胶酶由于能够降解琼脂糖,因而被用于回收 DNA,制备藻类原生质体以及琼胶寡糖.到目前为止,有许多种琼胶酶在多种生境中被发现并被分离出来.

本研究从一株高产琼胶酶菌株 (*Flammeovirga* sp. SJP92) 的发酵液中纯化到一种琼胶酶 (AgaB),生化性质分析显示该酶最适 pH 值为 7.0,最适温度 40°C,其在最适温度下稳定性也最好.根据目前已有的报道,琼胶酶的最适温度一般在 30 ~ 45°C,个别的能达到 55°C;而它们的最适 pH 值一般在 6 ~ 8 这样的中性区间,但也有个别的达到 5.5 或者 9.0 这样的偏酸或偏碱的值^[8,13].本研究中的琼胶酶在这些性质方面与已报道的一些琼胶酶很相似^[14-16].

除了外界温度与 pH 值外,琼胶酶也受到环境中金属离子与化学试剂的影响.海水中富含 Na⁺、

K^+ 和 Mg^{2+} , 本研究中 AgaB 和一些琼胶酶类似, 它的活性在这 3 种离子存在的情况下有所提高, 尤其以 Mg^{2+} 的促进作用最为明显^[13,17]. 许多化学试剂如 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $CuSO_4$ 等会强烈抑制该酶的活性, 这可能与重金属离子会和酶的一些蛋白质残基相互作用有关^[18]. 与许多琼胶酶相似, β -Me 也能够显著地增高 AgaB 的活性, 很有可能是该酶碳水化合物结构域中的半胱氨酸在催化作用时起了很大作用^[19]. 此外, 通过对 AgaB 降解产物的分析表明, AgaB 在最初阶段将琼脂糖降解成 10 糖、8 糖、6 糖和 4 糖等分子量大小不等的寡糖, 随着时间延长, 最终降解产物只剩下 6 糖和 4 糖. 这样的

降解模式说明 AgaB 是一种内切酶.

3 结论

综上所述, 我们以一株从鲍鱼胃肠道内筛到的 *Flammeovirga* 属高产琼胶酶菌株 (*Flammeovirga* sp. SJP92) 为发酵菌株, 通过发酵培养, 硫酸铵沉淀, DEAE-琼脂糖离子层析从该菌株的发酵液中纯化到了一种琼胶酶 AgaB. 进一步通过质谱分析鉴定, 确定该酶是一种琼胶酶, 并初步分析了该酶在 pH、温度、热稳定性、化学试剂的影响以及酶解产物等相关方面的酶学性质. 该酶的分离纯化工艺及其相关酶学性质分析将为其进一步的工业应用奠定基础.

参考文献:

- [1] Araki C. Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii* [J]. *Journal of the Chemical Society*, 1937, 58: 1 338-1 350.
- [2] Enoki T, Okuda S, Kudo Y, et al. Oligosaccharides from agar inhibit pro-inflammatory mediator release by inducing heme oxygenase 1 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010, 74: 766-770.
- [3] Chen H, Yan X, Zhu P, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nutrition Journal*, 2006, 5: 31.
- [4] Lee D G, Jang M K, Lee O H, et al. Over-production of a glycoside hydrolase family 50 beta-agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30: 911-918.
- [5] Hu B, Gong Q, Wang Y, et al. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose [J]. *Anaerobe*, 2006, 12: 260-266.
- [6] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 1 549-1 554.
- [7] Araki T, Lu Z, Morishita T. Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Marine Biotechnology*, 1998, 6: 193-197.
- [8] Fu X T, Kim S M. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8: 200-218.
- [9] Yang J I, Chen L C, Shih Y Y, et al. Cloning and characterization of beta-agarase AgaYT from *Flammeovirga yaeyamensis* strain YT [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112: 225-232.
- [10] Minegishi H, Shimane Y, Echigo A, et al. Thermophilic and halophilic beta-agarase from a halophilic archaeon *Halococcus* sp. 197A [J]. *Extremophiles*, 2013, 17: 931-939.
- [11] Mardanov A V, Ravin N V, Svetlitchnyi V A, et al. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 4 580-4 588.
- [12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- [13] Oh C, Nikapitiya C, Lee Y, et al. Molecular cloning, characterization and enzymatic properties of a novel beta-agarase from a marine isolate *Pseudoalteromonas* sp. AG52 [J]. *Braz Journal Microbiol*, 2010, 41: 876-889.
- [14] Zhang W W, Sun L. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 2 825-2 831.
- [15] Lin B, Lu G, Zheng Y, et al. Gene cloning, expression and characterization of a neoagartetraose-producing beta-agarase from the marine bacterium *Agarivorans* sp. HZ105 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 1 691-1 697.
- [16] Chi W J, Park da Y, Seo Y B, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel GH16 beta-agarase AgaG1 from *Alteromonas* sp. GNUM-1 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 4 545-4 555.
- [17] Kim H T, Lee S, Lee D, et al. Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type beta-agarase producing neoagarobiose [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86: 227-234.

- [18] Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, et al. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 505-514.
- [19] Fu X T, Lin H, Kim S M. Purification and characterization of a novel beta-agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78: 265-273.

Purification and characterization of an agarase from *Flammeovirga* sp. SJP92

HUANG Neng-ping, RUAN Ling-wei, SHI Hong
(Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: Agarases are the enzymes that can catalyze the hydrolysis of agar, and are widely used in some fields. In the present study, an agarase was purified from a high agarase production marine bacterium, *Flammeovirga* sp. SJP92 by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sephrose Fast Flow. The molecular mass of the agarase AgaB was about 70 kDa. The optimal pH and temperature for the best activity were 7.0 and 40°C, respectively. It showed the best stability under the optimal temperature. Furthermore, AgaB was obviously activated by MgSO₄ and β-Me, while strongly inhibited by CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, FeCl₃ and CuSO₄. Besides, it degraded agarose by endo-type hydrolysis with end products of neoagarotetraose and neoagarohexaose. Our study lays a better foundation for its industry application.

Key words: marine biology; *Flammeovirga* sp.; agarase; purification; enzymatic properties

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2016.01.014

(责任编辑:杜俊民)