

产右旋糖酐酶埃氏交替单胞菌的 筛选、鉴定及酶活分析

焦豫良^{1,2}, 王淑军^{1*}, 吕明生¹, 房耀维¹, 刘 姝¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005;

2. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏连云港 222001)

摘要:从连云港港口海泥样本筛选到一株产右旋糖酐酶的埃氏交替单胞菌 *A. espejiana* YSN412, 对其所产的右旋糖酐酶 AesDEX 酶学性质进行了分析, 对其产酶条件进行了摸索。AesDEX 最适反应温度为 30℃, 最适 pH 值为 8。在 30℃ 下保温 2.5h, 残余相对酶活在 95% 以上, 而在 50℃ 下保温 2.5h 后只有 14% 的残余酶活力。该菌株产酶培养的最佳碳源和氮源, 分别是纤维二糖和酵母粉, 最适产酶培养温度为 30℃, NaCl 浓度为 2%, 初始 pH 为 8 时培养液酶活力最高。该菌株培养 12h 时培养液酶活力达到最高值 9U/mL。本实验筛选到的 *A. espejiana* YSN412 菌株产酶较为迅速, 所产的右旋糖酐酶 AesDEX 酶活最适温度较低, 在工业生产上具有潜在降低成本、提高生产效率的优势。

关键词:埃氏交替单胞菌, 右旋糖酐酶, 酶学性质, 产酶培养

Screening, identification and activity analysis of a Dextranase-producing *Altermonas espejiana* strain

JIAO Yu-liang^{1,2}, WANG Shu-jun^{1*}, LV Ming-sheng¹, FANG Yao-wei¹, LIU Shu¹

(1. College of Marine Sciences, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222001, China)

Abstract: A dextranase producing strain *Altermonas espejiana* YSN412 was isolated from a beach mud sample of Lianyungang port. The enzymatic properties of the dextranase AesDEX were analyzed. The culture condition for production of enzyme from the strain was investigated. The optimum temperature and pH value of the enzyme were 30℃ and 8 respectively. After incubation at 30℃ and 50℃ for 2.5h, the remnant relative enzymatic activities were 95% and 14% respectively. The optimum carbon and nitrogen sources were cellobiose and yeast powder respectively. When the concentration of NaCl was 2% (w/w) and the initial pH value was 8, the enzymatic activity of the liquid culture reached its maximum 9U/mL after culturing the strain for 12h. The *A. espejiana* YSN412 strain isolated and identified in this study produced dextranase quickly and the dextranase AesDEX had a low optimum temperature for enzymatic activity. The enzyme showed the potential to lower the cost and increase the efficiency in industry.

Key words: *Altermonas espejiana*; dextranase; enzymatic property; enzyme producing cultivation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)02-0171-05

右旋糖酐 (dextran) 是一种多由乳酸细菌, 如肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 等合成的多糖。该多糖由 α -D-吡喃葡萄糖基构成, 至少 50% 的糖基通过 α -1, 6 键连接成直链结构, 其余部分由 α -1, 2- α -1, 3 或 α -1, 4 键的分支糖基构成, α -1, 6 键比例越高则溶解性越好^[1]。细菌、丝状真菌、酵母等可产生右旋糖酐酶 (dextranase, Dex; EC 3.2.1.11) 水解细胞外的右旋糖酐生成单糖或低聚糖。右旋糖酐酶及其催化产物在食品工业中有重要而广泛的应用。在

工业制糖中, 右旋糖酐酶可以降解糖液中的右旋糖酐, 降低生产成本, 提高得糖率和生产效率^[1]。在功能食品中, 右旋糖酐酶水解右旋糖酐产生的异麦芽寡糖 (isomaltooligosaccharide, IMO) 作为一种益生元能显著提高肠道内有益微生物 (如双歧杆菌) 群落数量, 还可以治疗持续性血液透析引起的便秘、高血脂等症^[2]。IMO 作为动物饲料添加剂还可以增加养殖动物的免疫器官指数, 提高生产性能^[3]。目前商品化的右旋糖酐酶多为陆源真菌来源, 如 Novozyme 公司生产的右旋糖酐酶来源于毛壳菌属 (*Chaetomium erraticum*) 和青霉属 (*Penicillium sp.*)。海洋细菌来源的右旋糖酐酶产生菌报导较少, 与陆源酶相比, 海洋右旋糖酐酶具有更好的耐盐、耐碱和耐低温等性能, 在食品工业中更具有应用前景。积极开发海洋右旋糖酐酶在

收稿日期: 2012-08-23 * 通讯联系人

作者简介: 焦豫良 (1980-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 海洋微生物酶。

基金项目: 国家 863 计划项目 (2011AA09070302); 连云港市工业攻关项目 (CG1003)。

工业和医学中将有重要应用意义。埃氏交替单胞菌 (*Altermonas espejiana*) 为常见海洋细菌, 是一种能运动、产气、具有一个极鞭毛的革兰氏阴性菌, 该菌具有降解褐藻酸的活性, 在海带储藏、运输和加工中造成海带的腐败变质^[4]。此外, 该菌还可分泌胞外核酸酶和胞外 α -淀粉酶, 其发酵液的脂类提取物能诱导贝螭 (*Hydractinia echinata*) 的变态发育^[5-7]。本实验从海洋环境中筛选得到一株产右旋糖酐酶的埃氏交替单胞菌, 并对产酶条件及右旋糖酐酶的性质进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

样品来源 江苏连云港港口潮间带低潮线海泥; **基本培养基** $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.05g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g, K_2HPO_4 0.05g, 蒸馏水100mL, pH8; **分离培养基** 在基本培养基中加入酵母粉1%, 蛋白胨1%, 右旋糖酐0.5%, 蓝色右旋糖酐2000 0.1%, pH8; **产酶培养基** 基本培养基中加入氯化钠2%, 右旋糖酐0.1%, 纤维二糖0.5%, 酵母粉0.5%, pH8; **培养基、酶活测定、生理生化鉴定中所使用的试剂** 购于国药集团化学试剂有限公司; **右旋糖酐T2000** 美国Sigma公司; **PCR反应和电泳试剂** 上海生工生物工程有限公司; **DNA 标准分子量DL2000**, 大连市波利盾生物工程有限公司。

SPX-250B-Z型生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; **SW-CJ-ICU超净工作台** 苏州安泰空气技术有限公司; **HZQ-F160全温振荡培养箱**

哈尔滨东联电子技术开发有限公司; **DK-8D型电热恒温水浴槽** 上海医用恒温设备厂; **PHS-2C型精密酸度计** 上海精密科学仪器厂; **DYCP-31A型琼脂糖电泳仪** 北京市六一仪器厂; **5332型PCR仪** 德国Eppendorf公司; **MD24型透析袋** 美国光谱医药公司, 截留分子量50000; **ELX808型酶标仪** 美国Biotek公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选和鉴定 将海泥按1%加入液体分离培养基中, 于30℃、150r/min摇床中进行摇瓶富集培养。培养基蓝色褪去后, 将培养液稀释涂布在分离培养基固体平板上。对平板上形成透明圈的菌落再次纯化。不需提取基因组DNA, 直接对纯化的菌落通过菌落PCR法扩增16S rRNA基因序列, 正向引物27F: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3', 反向引物1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'^[8]。PCR扩增条件: 94℃预变性2min, 94℃变性30s、60℃退火45s、72℃延伸45s, 34个循环, 72℃终延伸7min。PCR产物经纯化后由上海生物工程公司测序。所测得的16S rRNA基因序列与GenBank的数据库中已有的序列进行Blast软件分析, 并提交到GenBank。利用Mega 5软件基于16S rRNA基因序列对菌株进行系统进化分析, 选择NJ法构建系统发育树^[9]。对菌种进行革兰氏染色和油镜观察, 然后根据《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化反应实验^[10]。最终根据16S rRNA基因序列比对结果和生理生化反应确定菌株。

1.2.2 酶学性质研究 将菌株接入分离培养基, 于30℃、150r/min摇床中培养24h。发酵液于10000r/min离心5min, 收集上清液, 以PBS缓冲液(pH8)为透析液, 用透析袋MD24透析, 4℃透析3h, 隔1h换透析液一次。透析后的上清液为粗酶液, 吸取100 μ L粗酶液加到1mL含1%右旋糖酐T2000的PBS缓冲液(pH8.0)中, 在37℃水浴反应15min, 用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定还原糖量^[11]。空白对照为相同成分的混合液, 在反应前于沸水浴中加热15min, 后续操作相同。反应产物稀释5倍, 吸取150 μ L加入96孔板, 酶标仪中读取520nm处的吸光值。1个酶活力单位定义为30℃、pH8.0的条件下反应1min催化右旋糖酐产生1 μ mol异麦芽糖的酶量(U/mL)^[12]。在10、20、25、30、35、40、50℃水浴和不同PBS缓冲液pH值6、6.5、7、7.5、8、8.5、9下测定该酶的活性, 分析其最适反应温度和pH值。在30、40、50℃水浴中, 将粗酶液保温2.5h, 然后再测定其残余酶活, 研究其热稳定性。将粗酶液在30℃水浴中, pH值分别为6、6.5、7、7.5、8、8.5、9下保温2、3、4h后测定酶活, 分析其pH稳定性。

1.2.3 产酶条件的确定

1.2.3.1 培养基碳源、氮源、NaCl浓度、初始pH值对产酶的影响 氮源实验中, 在基本培养基中加入0.5%硫酸铵, 然后以0.5%的可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、纤维二糖、乳糖、右旋糖酐为不同碳源, 考察常见的不同碳源对产酶的影响。

氮源实验中, 在基本培养基中加入0.5%纤维二糖, 然后以0.5%的氯化铵、胰蛋白胨、酵母粉、蛋白胨、尿素、硫酸铵、硝酸钠为不同氮源。培养液中接入2%的菌液(10^5 CFU/mL), 30℃下摇床150r/min培养24h, 测定酶活力。

在基本培养基中加入最佳碳源和氮源后, 再加入不同浓度的NaCl(0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%), 按2%的接种量接种菌液(10^5 CFU/mL), 30℃下150r/min摇床中培养24h, 测定酶活力。调节产酶培养基的初始pH值为4、5、6、7、8、9、10、11, 接种2%的菌液(10^5 CFU/mL), 30℃下150r/min摇床中培养24h, 测定酶活力。

1.2.3.2 培养时间和温度对产酶的影响 将浓度为 10^5 CFU/mL的菌液按照2%的接种量接到产酶培养基中, 分别在0、4、15、20、25、28、30、35、40℃下, 150r/min培养24h, 测定酶活力, 确定其最佳产酶温度。在最佳产酶温度(30℃)下150r/min摇床中培养72h, 每隔4h取出1管培养物, 离心取上清液4℃冰箱中保存, 待全部培养时间结束一起测酶活力, 确定其最佳产酶时间。每个样品测三次, 取平均值。由于上清液4℃冰箱中放置72h后, 残余相对酶活约为98.5%, 远小于培养时间对酶活的影响, 因此在4℃冰箱中保存导致的酶活丧失可以忽略不计。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选和鉴定

本实验筛选到一株产透明圈的菌株, 编号为YSN412, 菌落形态照片如图1示。对该菌株进行16S rRNA基因序列扩增后测序, 长度为1425bp, 凝胶电

泳情况如图2所示。通过进行16S rRNA基因序列的系统发育分析,发现YNS412与交替单胞菌(*Alteromonas*)有较近的进化距离,系统发育树如图3示。油镜观察为杆状革兰氏阴性菌。生理生化反应实验结果表明:菌落无色,具有明胶液化能力,可以利用D-葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、D-果糖、纤维二糖、淀粉,不能利用甘油、水杨苷。根据《常见细菌系统鉴定手册》确定该菌株为交替单胞菌属的埃氏交替单胞菌(*A. espejiana*)。 *A. espejiana* YNS412菌株16S rRNA基因序列提交到GenBank,登录号为JN622161。

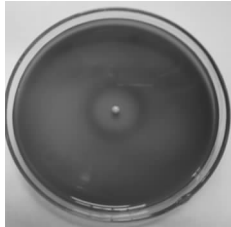


图1 *A. espejiana* YNS412菌株菌落形态

Fig.1 Colony morphology of the *A. espejiana* YNS412 strain

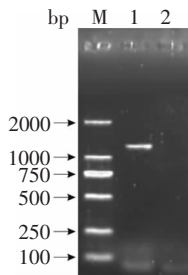


图2 *A. espejiana* YNS412菌株16S rRNA基因序列PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of the 16S rRNA gene of *A. espejiana* YNS412 strain

注:M-DNA分子量;1-16S rRNA基因序列PCR扩增产物;2-阴性对照。

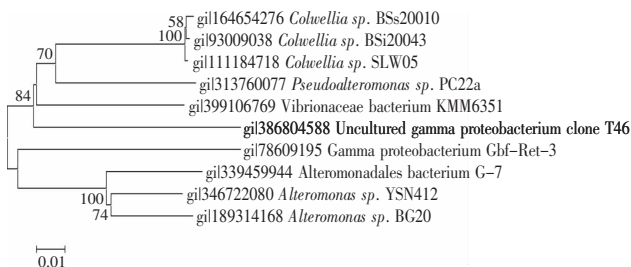


图3 基于16S rRNA基因序列构建的*A. espejiana* YNS412菌株系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *A. espejiana* YNS412 based on 16S rRNA gene sequences

2.2 酶学性质分析

A. espejiana YNS412菌株产的右旋糖酐酶(AesDEX)最适pH值为8(图4-A),30℃下在pH6磷酸缓冲液中保温4h后残余酶活为52%,而在pH8缓冲液中保温4h后,残余酶活仍有96%(图4-B)。AesDEX最适反应温度为30℃(图4-C),在30℃下保温2.5h,相对酶活还在95%以上,但是在50℃保温2.5h后只有14%

的酶活力(图4-D)。

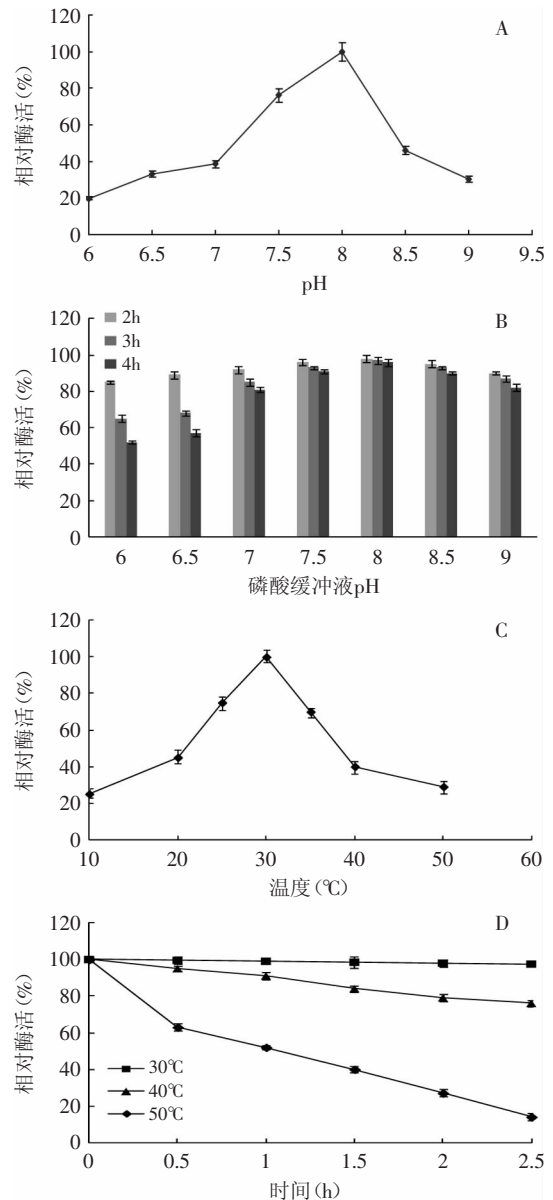


图4 温度和pH对AesDEX酶活的影响

Fig.4 Effect of pH and temperature on the enzymatic activity of AesDEX

注:A-pH对酶活的影响,B-酶的pH稳定性,C-温度对酶活的影响,D-酶的热稳定性。

2.3 产酶条件的分析

2.3.1 培养基碳源、氮源、NaCl浓度、初始pH值对产酶的影响 由图5可知,纤维二糖最能促进*A. espejiana* YNS412菌株产酶,其次是淀粉、果糖、蔗糖,麦芽糖促进效果最差(图5-A)。能促进产酶的最佳氮源是酵母粉,胰蛋白胨次之;无机氮源促进产酶的作用相对较低(图5-B)。培养基初始NaCl浓度为2%时,*A. espejiana* YNS412菌株产AesDEX酶活最高,在8%以后,呈现平稳下降趋势(图5-C)。培养液初始pH为8时,菌株*A. espejiana* YNS412产酶能力最强(图5-D)。碳源、氮源、培养基初始pH和NaCl浓度四个因素的研究中,各个成分的比较均以相对酶活表示,分别以纤维二糖、酵

母粉、初始pH8、NaCl浓度为2%的条件下的酶活为1。

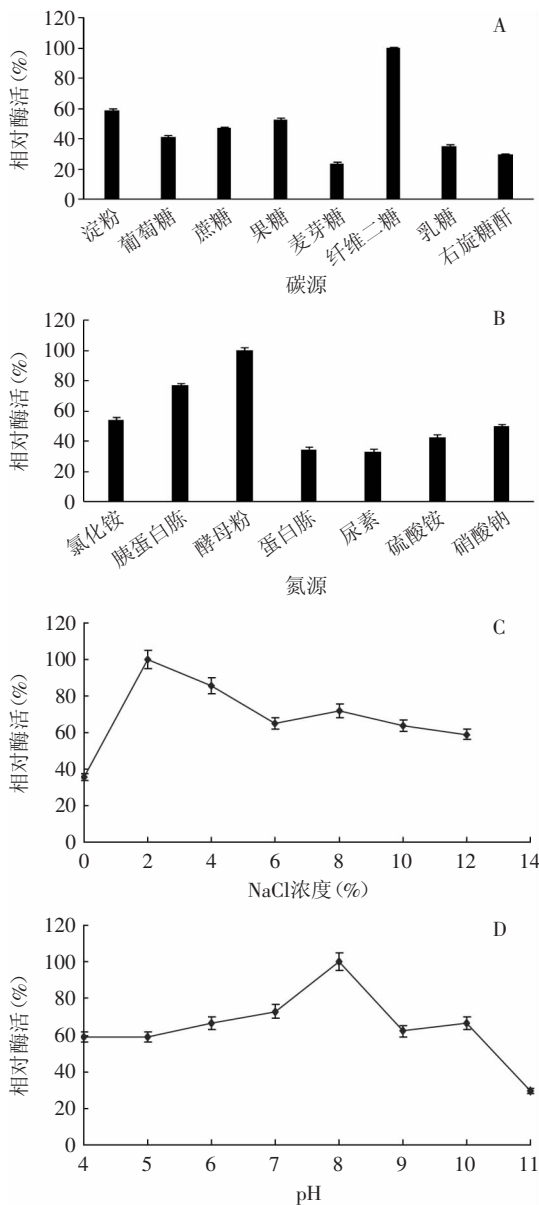


图5 培养基成分对*A. espejiana* YSN412产酶影响

Fig.5 Effect of medium composition on the enzyme production of *A. espejiana* YSN412

2.3.2 培养时间和温度对产酶的影响 由图6可知, *A. espejiana* YSN412菌株在12h的酶活力时最高, 随培养时间延长, 酶活力逐渐降低(图6-A)。在30℃下培养12h, 培养液酶活力最高达到9U/mL, 相对酶活达到100%(图6-B)。图6-B中各温度下培养24h后的酶活为相对酶活, 以30℃条件下的酶活为1。

3 结论与讨论

右旋糖酐酶在食品工业中的应用广泛。真菌来源右旋糖酐酶在甘蔗制糖工业中清除右旋糖酐方面有重要应用, 这是由于其水解效率较高、热稳定性较好, 最适作用温度50℃左右, 最适pH值接近5, 适合在制糖工业中使用^[4]。将淡紫色拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)产生的右旋糖酐酶添加入甘蔗汁中(0.15U/mL), 可以清除73.3%的右旋糖酐^[13]。另外, 在食品安全中, 应

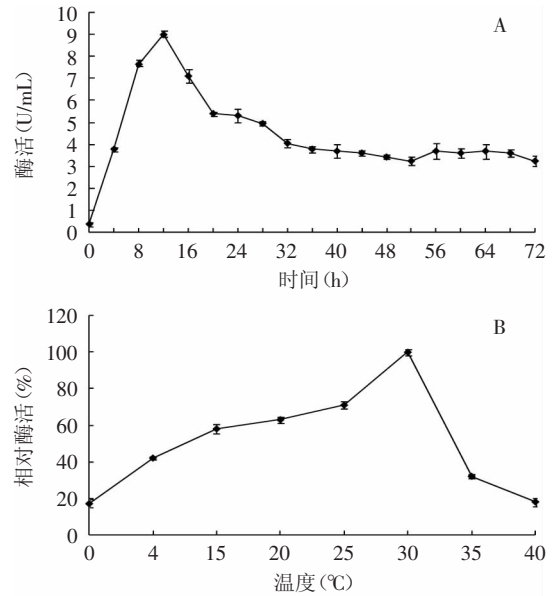


图6 培养时间和温度对*A. espejiana* YSN412产酶的影响

Fig.6 Effect of culturing time and temperature on the enzyme production of *A. espejiana* YSN412

用右旋糖酐酶活性检测便捷的特点, 将其作为毒素的报告基因, 如将微黄青霉来源的右旋糖酐酶转入酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 通过测定重组酵母右旋糖酐酶活性的丢失与否, 用来鉴定待测样品中是否存在真菌毒素^[14]。

产右旋糖酐酶的海洋细菌报道较少, 如交替假单胞菌(*Pseudoaltermonas*)可产生右旋糖酐酶, 而目前尚未见交替单胞菌产右旋糖酐酶的报道^[15]。本实验中*A. espejiana* YSN412培养液酶活力(9U/mL)高于节杆菌属(*Arthrobacter*) (约3U/mL), 与真菌的发酵液酶活相近, 如申氏孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)发酵液中酶活达到10.6U/mL^[12-16]。该菌株的产酶峰值时间为12h, 而通常细菌和真菌产酶峰值时间高于24h, 在生产中具有降低成本、提高生产效率的优势。另外, 该菌株产的右旋糖酐酶最适作用温度为30℃, 低于真菌右旋糖酐酶的最适作用温度, 在异麦芽寡糖的生产中具有降低生产成本的作用^[17-18]。此外, 该右旋糖酐酶最适作用温度接近口腔温度, 还可以作为活性成分添加至漱口液等口腔护理产品中, 通过降解牙菌斑中右旋糖酐, 对菌斑的预防及治疗起到一定的作用。

参考文献

- [1] Jiménez ER. Dextranase in sugar industry: A review[J]. Sugar Tech, 2009, 11(2): 124-134.
- [2] Wang HF, Lim PS, Kao MD, et al. Use of isomaltooligosaccharides in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients[J]. J Ren Nutr, 2001(11): 73-79.
- [3] 杨桂芹, 李玲. 益生菌剂、异麦芽寡糖对肉仔鸡免疫和生产性能的影响[J]. 动物营养学报, 2005, 17(1): 34.
- [4] 肖慧, 唐学玺, 王艳玲, 等. 褐藻酸降解菌的生长条件及其

(下转第178页)

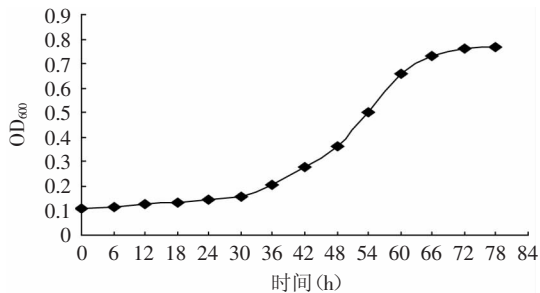


图13 以甲醇为碳源的甲烷氧化细菌M13的生长曲线
Fig.13 The cell growth curve of M13 with methanol as the carbon source

由图12~图13可知,在以甲烷和甲醇为碳源的不同培养条件下,甲醇为碳源培养的甲烷氧化细菌M13进入对数生长期较甲烷早;同时在进入稳定期后,甲醇为碳源66h的OD₆₀₀大于甲烷60h的OD₆₀₀,表明甲烷氧化细菌M13以甲醇作碳源比甲烷作碳源的生长情况更好,因此甲醇更适合M13的生长和细胞合成。

3 结论

本文以甲烷氧化细菌M13作为研究对象,对其细胞形态和菌落形态进行观察,并对不同碳源培养下细胞生长情况进行分析、检测,为今后对这种或者此类的细菌的进一步研究打下了坚实的基础。从菌落形态上看,甲烷氧化细菌M13菌落较大,呈圆形,乳白色,较为均匀,表面光滑明亮。在甲烷和甲醇条

件下培养一段时间均产生粉红色素,且在甲烷培养中的颜色变化比在甲醇中明显;从细胞形态上看,甲烷氧化细菌M13的菌体呈短杆状或略弯,细菌单生,是革兰氏阴性菌;从菌体生长情况上看,甲烷氧化细菌M13在以甲烷和甲醇为碳源的不同培养条件下,甲醇为碳源条件下细菌生长的对数期长,甲烷为碳源进入稳定期比甲醇早,表明甲烷氧化细菌M13以甲醇作碳源比甲烷作碳源的生长情况好。

参考文献

- [1] Murrell J C, McDonald I R, Gilbert B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions[J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(5): 221-225.
- [2] 梁战备, 史奕, 岳进. 甲烷氧化菌研究进展[J]. 生态学杂志, 2004, 5: 198-205.
- [3] 陈劲春, 李珊, 陶慧明, 等. 一株甲烷氧化杆菌的分离及其功能的初步研究[J]. 北京化工大学学报, 1999, 26(1): 9-10.
- [4] Murrell J C, Gilbert B, McDonald I R. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase[J]. Arch Microbiol, 2000, 173(5/6): 325-332.
- [5] Sohngen NL. Ubar bakterien, welche methan ab kohien stoffnahrung and energiequelle gebrauchen[J]. Paramtenkd Infectionskr A bt, 1906, 15: 513-517.
- [6] Whittenbury R, Phillips K C. Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacteria[J]. J Gen Microbial, 1970, 61: 205-218.
- [7] 吕明生, 王淑军, 房耀维, 等. 交替假单胞菌LP621菌株产右旋糖酐酶的培养条件优化[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(6): 11-17.
- [8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: John Wiley and Sons, 1991.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 270-272.
- [11] 王福荣. 生物工程分析与检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 217-218.
- [12] Jin HL, Seong HN, Hyen JP, et al. Biochemical characterization of dextranase from *Arthrobacter oxydans* and its cloning and expression in *Escherichia coli*[J]. Food Sci Biotechnol, 2012, 19(3): 757-762.
- [13] Bhatia S, Bhakri G, Arora M, et al. Dextranase production from *Paecilomyces lilacinus* and its application for dextran removal from sugarcane juice[J]. Sugar Tech, 2010, 12(2): 133-138.
- [14] Li X, Millson SH, Coker RD, et al. Cloning and expression of *Penicillium minioluteum* dextranase in *Saccharomyces cerevisiae* and its exploitation as a reporter in the detection of mycotoxins[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(23): 1955-1964.
- [15] Arnold WN, Nguyen TB, Mann LC. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii* [J]. Arch Microbiol, 1998, 170(2): 91-98.
- [16] Doaa Mahmoud AR, Wafaa Helmy A. Application of Cold-Active Dextranase in Dextran Degradation and Isomaltotriose Synthesis by Micro-Reaction Technology[J]. Aust J Basic & Appl Sci, 2009, 3(4): 3808-3817.
- [17] Purushe S, Prakash D, Nawani NN, et al. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture [J]. Bioresour Technol, 2012, 115: 2-7.

(上接第174页)

对海带的生理效应 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36(2): 261-264.

[5] Leitz T, Wagner T. The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*[J]. Marine Biology, 1993, 115(2): 173-178.

[6] Lee TH, Ho SL, Chou HM, et al. Maltose adaptive mutant of heterotrophic marine bacterium, *Alteromonas espejiana* Bal-31: changes in the growth and the induction of extracellular alpha-amylase[J]. J Gen Appl Microbiol, 2005, 51(3): 165-173.

[7] Hauser CR, Gray HB Jr. Precursor-product relationship of larger to smaller molecular forms of the BAL 31 nuclease from *Alteromonas espejiana*: preferential removal of duplex exonuclease relative to endonuclease activity by proteolysis[J]. Arch Biochem Biophys, 1990, 276(2): 451-459.

[8] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: John Wiley and Sons, 1991.

[9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.

[10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 270-272.

[11] 王福荣. 生物工程分析与检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 217-218.

[12] Jin HL, Seong HN, Hyen JP, et al. Biochemical