

一株产右旋糖苷酶海洋细菌的筛选鉴定

李卫娟^{1,2} 焦豫良² 吕明生² 房耀维² 李华钟^{1*} 李秋潼³ 王淑军^{2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 淮海工学院 海洋学院 江苏 连云港 222005)

(3. 常州大学 石油化工学院 江苏 常州 213164)

摘要:【目的】筛选鉴定产右旋糖苷酶的海洋细菌, 并对其所产右旋糖苷酶的酶学性质及在变异链球菌牙菌斑生物膜中的应用进行初步研究。【方法】利用平板透明圈法从海洋环境中筛选产右旋糖苷酶的细菌, 根据菌株形态特征、生理特征及 16S rDNA 序列确定其分类学地位, 采用体外生物膜模型研究该酶对变异链球菌牙菌斑生物膜形成的抑制作用。

【结果】从海泥中筛选出一株产右旋糖苷酶的细菌 KQ11, 初步鉴定为节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)。该菌株的最适生长温度为 30 °C, 最适生长 pH 7.5, 最适生长 NaCl 浓度为 0.4%。右旋糖苷酶的最适作用温度为 45 °C, 最适作用 pH 为 5.5。该酶能有效地抑制变异链球菌牙菌斑生物膜的形成。【结论】菌株 KQ11 右旋糖苷酶能够抑制变异链球菌牙菌斑生物膜的形成, 可望用于漱口液等口腔护理产品中。

关键词: *Arthrobacter* sp., 右旋糖苷酶, 筛选, 鉴定

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA09070302); 连云港市自然科学基金项目(No. CG1003); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者: 李华钟: Tel: 86-510-85913650; 信箱: hzhli@jiangnan.edu.cn

王淑军: Tel: 86-518-85895421; 信箱: shujunwang86@163.com

收稿日期: 2012-07-14; 接受日期: 2012-11-01

Screening, identification and characterization of a dextranase-producing marine strain

LI Wei-Juan^{1,2} JIAO Yu-Liang² LÜ Ming-Sheng² FANG Yao-Wei²

LI Hua-Zhong^{1*} LI Qiu-Tong³ WANG Shu-Jun^{2*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(3. School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to isolate and identify a strain which can produce dextranase, characterize the enzyme properties and study its application in *Streptococcus mutans* dental biofilm. [Methods] The strains derived from marine environment were screened by observing transparent circle on agar plates. The strains were identified by morphology, physiological characteristics, and phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences. The inhibitory effect of the dextranase on *Streptococcus mutans* dental biofilm was assessed with biofilm models *in vitro*. [Results] A dextranase-producing strain KQ11 was isolated from sea mud and preliminarily identified as *Arthrobacter* sp.. The optimal growth conditions of the strain were 30 °C, pH 7.5, and NaCl concentration of 0.4%. The optimal catalytic conditions of the enzyme were 45 °C, pH 5.5. The dextranase effectively prevented the dental biofilm formation by *Streptococcus mutans*. [Conclusion] The dextranase from the strain KQ11 can effectively degrade *Streptococcus mutans* dental biofilm, and thus it can be added to the oral care products such as mouthwash.

Keywords: *Arthrobacter* sp., Dextranase, Screen, Identification

牙菌斑是发生于牙齿表面及内部的一种慢性口腔细菌疾病,常以发病率高、分布范围广严重威胁着人类的口腔健康。变异链球菌是目前公认的主要致龋细菌,它合成的胞外多糖是牙菌斑形成的重要因素^[1]。目前,控制致龋细菌生物膜形成的策略有多种,其中以酶解为代表的脱粘附方法,以其无毒性、无耐药性等优势,逐渐成为研究的热点^[2]。自1968年Fitzgerald等首次证实了右旋糖苷酶的防龋潜力后,各国科学家纷纷进行了右旋糖苷酶的防龋实验^[3]。目前国内对微生物

产右旋糖苷酶的防龋研究主要为中国科学院微生物研究所的孙晋武等,且研究对象主要为陆源右旋糖苷酶,对于海洋右旋糖苷酶的研究则相对甚少^[4-5]。

右旋糖苷酶(EC3.2.1.11)是一种可以水解右旋糖酐链内及链端 α -1,6糖苷键的糖苷水解酶,因而常被应用于制糖工业、血浆代用品的生产及牙菌斑的预防及治疗等方面^[5]。目前研究发现的产右旋糖苷酶的真菌包括青霉属、拟青霉属、曲霉属、镰孢属、穗霉属、轮枝孢属、长蠕孢属、

毛壳属及斯氏油脂酵母, 细菌包括乳杆菌属、链球菌属、纤维弧菌属、噬胞菌属、短杆菌属、假单胞菌属、棒杆菌属、节杆菌属、黄杆菌属, 这些产生菌主要为陆源微生物^[6]。迄今为止, 已报道的产右旋糖苷酶的节杆菌主要分离于土壤, 例如 1991 年日本大阪大学 Okushima 等分离的 *Arthrobacter* sp. CB-8 及 2010 年 Jin 等分离的产右旋糖苷酶的氧化节杆菌^[7-8]。与陆源酶相比, 海洋酶的耐盐、耐碱、耐低温等特性更利于工业化应用, 因此本研究从海洋环境出发, 旨在筛选得到一株高产右旋糖苷酶的菌株, 对其进行生理生化及分子生物学鉴定, 研究其生长特性及右旋糖苷酶在牙菌斑预防中的作用, 从而为实现其应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

变异链球菌 (*Streptococcus mutans* ATCC 25175): 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 样品采集

从连云港海域采集各类样品, 包括海泥、海水、海鱼、虾、蟹和浒苔。

1.3 培养基

基础培养基: 为 2216E 培养基^[5]。

初筛培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 1.0, 蓝色葡聚糖 2.0, 右旋糖酐 20000 8.0, 琼脂 20.0, 陈海水配制, pH 8.0。

复筛培养基: 在基础培养基的基础上添加 1.0% 右旋糖酐 20000。

产酶培养基(g/L): 麸皮(粉碎过 35 目) 10.0, 硝酸钠 2.5, 氯化钠 4.0, 硫酸镁 0.4, 右旋糖酐 20000 10.0, 自来水配制, pH 6.5。

BHI 培养基(g/L): 脑心浸出液 20.0, NaCl 5.0, Na₂HPO₄ 2.5, 葡萄糖 2.0, pH 7.2-7.4。

1.4 主要试剂

蓝色葡聚糖, GE Healthcare、PCR 试剂及 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒, 上海生工生物工程有 限公司; pMD 19-T 连接试剂盒, 大连宝生物公 司; 基因组提取试剂盒, 杭州爱思进生物技术有 限公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.5 菌株的筛选

1.5.1 样品处理及富集: (1) 海泥: 称取 1 g 海泥 用 10 mL 无菌海水悬浮; (2) 海鱼、虾、蟹、海参: 取出内脏, 剪刀剪碎后于 10 mL 无菌海水中研磨 成浆; (3) 浒苔: 取 0.5 g 新鲜的浒苔, 用剪刀将 其剪碎; (4) 海水: 取 20 mL 海水经 0.22 μm 滤膜 过滤后, 取出滤膜待用。处理后, 用无菌镊子将 剪碎的浒苔组织和过滤海水的滤膜分别接种至 基础培养基中, 泥浆和内脏研磨液则分别按照 2% 的接种量接种至基础培养基中, 接种后置于 摇床中, 25 °C、180 r/min 培养 1-2 d。

1.5.2 初筛及复筛: 经基础培养基富集后, 取富 集培养液梯度稀释后, 涂布于初筛平板上, 25 °C 培养 2-3 d, 观察各菌株产生透明圈的情况^[9]。将 产生透明圈的单菌落接种至复筛培养基中, 25 °C、180 r/min 培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定酶活力大小, 筛选出透明圈 大和酶活力高的菌株。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 细胞形态及生理生化特征: 观察菌株的个 体显微形态和菌落形态, 并按照《伯杰细菌鉴定 手册》^[10], 进行各种生理生化反应鉴定。

1.6.2 16S rRNA 基因序列扩增及分析: 利用细 菌基因组提取试剂盒提取菌株基因组进行 PCR, 引物选用原核微生物 16S rDNA 通用引物, 上游 引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3', 下游 引物: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3', 胶回收 PCR 产物, 与 pMD 19-T 载体连接, 转化至 DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选出阳性克隆, 菌落 PCR

验证,送至上海生工生物公司测序。将所测得的16S rRNA基因序列与GenBank数据库中的已有序列进行BLAST分析,从GenBank中选择近缘菌株的16S rRNA基因序列,采用Bioedit软件程序进行序列分析并用Neighbor-Joining法构建系统发育树,以确定该菌株的分类地位。

1.7 菌株 KQ11 的生长特性

1.7.1 种子液制备:将菌株 KQ11 斜面种子接种到基础培养基中,装液量 20%, 25 °C、180 r/min 培养 16 h。

1.7.2 温度对菌体生长的影响:种子液 2% 接种于基础培养基中, pH 7.5, 转速 180 r/min, 装液量 20%, 在不同温度(0 °C–40 °C)下培养 24 h, 于 OD_{600} 下测定细胞浓度。

1.7.3 pH 对菌株生长的影响:pH 范围 5.0–11.0, 最适温度培养, 其余条件同 1.7.2, 为了防止培养过程中 pH 的变化, 加入终浓度为 10 mmol/L 的缓冲液: pH 5.0–6.0 (MES 缓冲液), pH 6.5–7.0 (PIPES 缓冲液), pH 7.5–8.0 (HEPES 缓冲液), pH 9.0–11.0 直接用 NaOH 调。

1.7.4 NaCl 浓度对菌株生长的影响:培养基用蒸馏水配制, NaCl 范围 0–10%, 最适温度和 pH 下培养, 其余条件同 1.7.2。

1.8 菌株右旋糖苷酶粗酶性质研究

1.8.1 右旋糖苷酶的制备:种子液按 4% 接种量接种至产酶培养基, 30 °C、180 r/min 培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 经分子量为 30 000 的中空纤维膜超滤浓缩, 冻干后备用。

1.8.2 酶的最适作用 pH 和最适作用温度:最适作用 pH: 将酶液与不同 pH 的 3% 的右旋糖酐 70000 在 45 °C 下测定酶活力, 不同 pH 值的缓冲液为: 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.0–6.0)、50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.0–7.5)和 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0)。酶的最适作用温度: 将酶分别在 0 °C、20 °C–60 °C 温度

下, 用 pH 5.5 的乙酸钠缓冲液(50 mmol/L)配制的 3% 右旋糖酐 70000 溶液作为底物进行酶活测定。

1.8.3 酶活力测定:将 10 μ L 酶液与 190 μ L 3% 的右旋糖酐 70000 (50 mmol/L, pH 5.5 乙酸钠缓冲液配制) 45 °C 水浴 15 min 后, DNS 法测定还原糖含量。酶活力单位定义(U/mL): 上述反应条件下, 每分钟催化释放 1 μ mol 麦芽糖所需的酶量为一个活力单位^[11]。

1.9 右旋糖苷酶对变异链球菌牙菌斑生物膜形成的影响

将变异链球菌活化后接种至 BHI 培养基中, 37 °C 厌氧培养 18 h, 将菌浓度 OD_{550} 调整至 1.0。然后与含 1% 蔗糖的 BHI 培养基按照 1:9 (V/V) 的比例加至含无菌盖玻片的无菌平皿内, 再分别加入右旋糖苷酶, 使之终浓度分别为 0、1、3、5 U/mL。37 °C 厌氧培养 24 h 后, 取出盖玻片, 用无菌磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.2)轻柔洗涤, 制备扫描电镜样品^[12]。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

在初筛培养基中加入蓝色葡聚糖, 从而快速、有效地筛选产右旋糖苷酶菌株。对采集的样品富集、稀释涂布后挑选产生透明圈的单菌落接种至产酶培养基中摇瓶复筛, 结果发现编号为 KQ11 的菌株所产右旋糖苷酶活性最高, 在初筛平板上产生的透明圈最大, 如图 1A 所示。该菌株

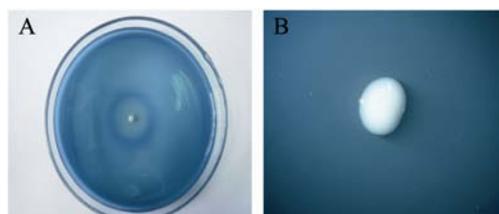


图1 菌株 KQ11 在初筛平板上形成的透明圈(A)和菌落形态(B)

Fig. 1 The clear zone around the colony of strain KQ11 on the plate (A) and colony morphology (B)

在初筛培养基上形成白色不透明菌落,边缘整齐、表面光滑、湿润,其菌落形态如图 1B 所示。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 细胞形态: 菌株 KQ11 为革兰氏阳性菌,无鞭毛,无芽孢,呈规则及不规则杆状,部分以 V 状排列,随着培养时间的延长,杆状断裂成椭球状,生长呈杆球周期变化(图 2),这与伯杰氏手册中对节杆菌的描述是一致的。

2.2.2 菌株的生理生化特征: 该菌株触酶反应呈阳性,氧化酶、甲基红、V-P、吲哚实验呈阴性,在 5% 脱脂牛奶中 65 °C 水浴 30 min 后无存活。通过分析,该菌株的生理生化特征与节杆菌属的生理生化特征基本一致^[10],具体见表 1。

2.2.3 16S rDNA 鉴定: 以菌株 KQ11 的基因组为模板,利用 16S rDNA 通用引物进行聚合酶链式扩增反应,胶回收之后 TA 克隆并测序,得到一条 1 485 bp 的序列。序列比对后,发现菌株 KQ11 与 *Arthrobacter* sp. AD29 的相似性为 99%,系统进化树如图 3 所示。结合菌株的生理生化特征和分子鉴定结果,该菌株为节杆菌 (*Arthrobacter* sp. KQ11)。目前文献报道表明节

杆菌属可以产生多种活性物质,如右旋糖苷水解酶、海藻糖合成酶、半乳糖苷酶、乙内酰胺酶等^[13-17],因而在医药生产及环境治理修复中具有重要的作用。

2.3 菌株 KQ11 的生长特性

2.3.1 温度对菌株生长的影响: 菌株 KQ11 在 0 °C 下能生长,最适生长温度为 30 °C,随着温度的升高,其生长较差(图 4)。目前已报道的节杆菌的最适生长温度多在 20 °C-35 °C 范围内。分离自海洋的节杆菌由于其生长环境使其具有一定的嗜冷性,因而能在低温环境下生长^[18]。

2.3.2 pH 对菌株 KQ11 生长情况的影响: 将基础培养基的初始 pH 分别调至不同 pH,按 2% 接种量接种,30 °C 摇床培养 24 h 后测定菌浓度。如图 5 所示,菌株 KQ11 在 pH 6.5-11.0 内生长相对较好,其最适生长 pH 为 7.5,当 pH 低于 6.5 时不利于菌株的生长。对于节杆菌属来讲,陆源节杆菌与海洋节杆菌对酸性环境都具有敏感性,对碱性环境则具有一定的耐受性,其生长 pH 多在 5.0 以上。例如 Srinivas 等报道的海洋节杆菌 Marine-33 的生长 pH 范围是 7.0-11.0^[19]。李娜等报道的分离自烟样

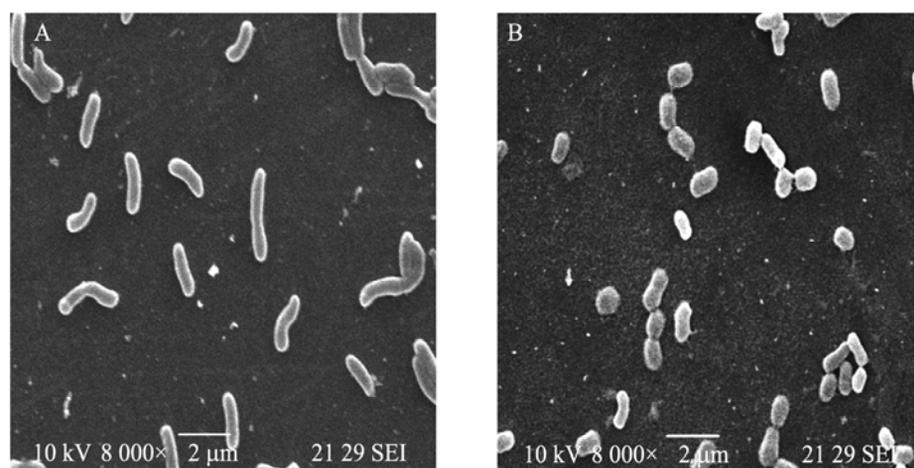


图 2 菌株 KQ11 电镜照片形态(8 000×)

Fig. 2 The SEM photograph of strain KQ11 (8 000×)

注: A: 培养 12 h 的棒杆状菌体; B: 培养 48 h 的椭球状菌体。

Note: A: Club-shaped cells harvested at 12 h; B: Shot rods and coccoids cells harvested at 48 h.

表 1 菌株 KQ11 部分生理生化特征
Table 1 Partly biochemical and physiological characteristics of strain KQ11

实验项目 Item	结果 Result	实验项目 Item	结果 Result
甲基红实验 M.R. test	-	硫化氢 H ₂ S	-
V-P 实验 V-P test	-	尿素酶 Urease	+
吲哚实验 Indole test	-	硝酸盐肉汤 Nitrate broth	+
触酶反应 Catalase test	+	纤维二糖 Cellobiose	-
氧化酶 Oxidase	-	3% NaCl 葡萄糖 Glucose with 3% NaCl	+
淀粉水解实验 Starch hydrolysis test	+	木糖 Xylose	-
油脂水解实验 Oil hydrolysis reaction	+	3% NaCl 蔗糖 Sucrose with 3% NaCl	+
明胶液化实验 Gelation liquefaction test	+	3% NaCl 乳糖 Lactose with 3% NaCl	+
马尿酸盐利用 Hippurate utilization test	-	3% NaCl 阿拉伯糖 Arabinose with 3% NaCl	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
65 °C 5% 脱脂牛奶水浴 30 min 存活实验 Survival test in 5% skim milk at 65 °C for 30 min	-	0 °C 生长实验 Growth test at 0 °C	+

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

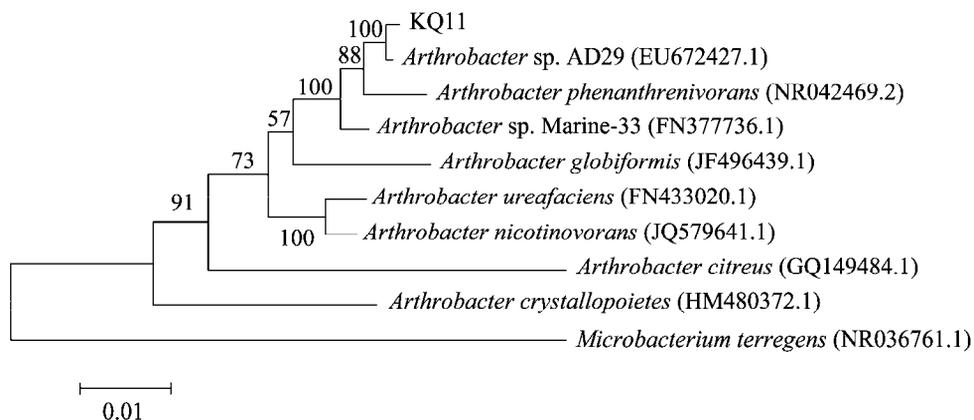


图 3 菌株 KQ11 系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of strain KQ11

注: 种属名后括号内的序号为 GenBank 数据库的登录号; 线段表示 1% 序列差异的分支长度; 分支节点上的数字表示每 100 次分析所支持的次数.

Note: The numbers in the parentheses are the accession numbers of the sequence in GenBank. The bar indicates the 1% nucleotide divergence. The numbers at the branch nodes represent the confidence level among 100 analysis.

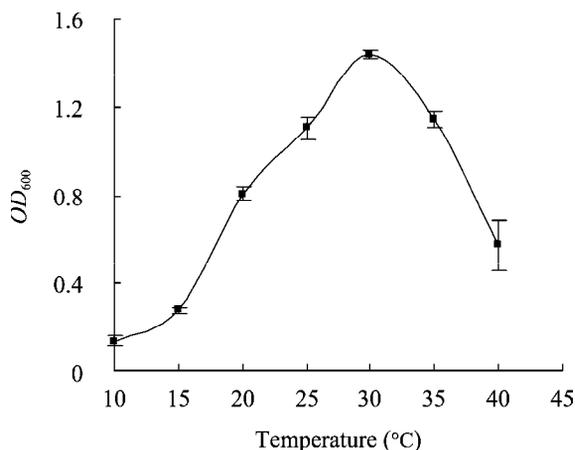


图4 温度对菌株 KQ11 生长的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the growth of strain KQ11

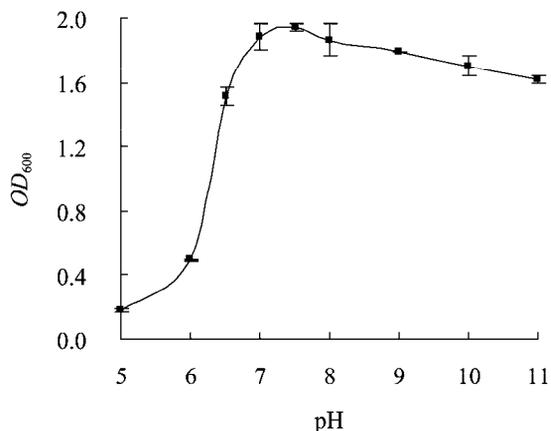


图5 pH对菌株 KQ11 生长的影响

Fig. 5 The effect of pH on the growth of strain KQ11

及土样中的节杆菌最适生长 pH 在 6.5 左右, 在碱性环境下比酸性环境下生长的要好^[20]。

2.3.3 氯化钠浓度对菌株 KQ11 生长的影响: 为了研究氯化钠对菌株生长的影响, 在基础培养基中添加氯化钠至不同终浓度, 并用蒸馏水代替海水, 结果如图 6 所示。菌株的最适生长氯化钠浓度为 0.4%, 当氯化钠的浓度高于 4% 后, 菌株的生长能力明显下降, 但仍有部分生长。与常见的海洋细菌不同, 该菌株在氯化钠浓度为 0 时仍能生长。有研究表明, 在实验室培养条件下, 大多数海洋细菌能够对不良环境产生抗性, 逐渐被驯化, 因

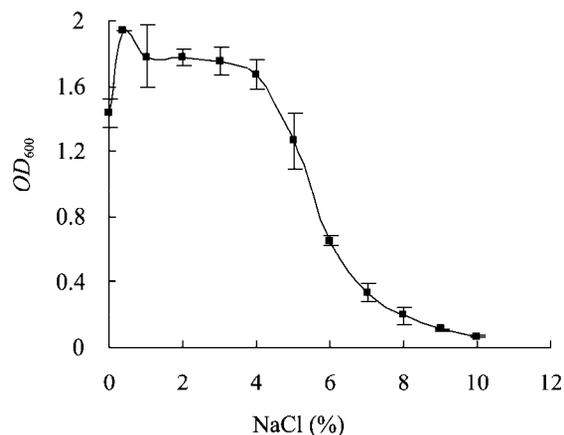


图6 NaCl 浓度对菌株 KQ11 生长的影响

Fig. 6 The effect of NaCl concentration on the growth of strain KQ11

而长久保存的菌株在淡水中生长的与海水中一样好^[21]。Zobell 等曾报道, 他们所分离的 12 株海洋细菌在保存 5 个月后能在淡水培养基中生长^[22]。

2.4 菌株右旋糖苷酶粗酶性质研究

该右旋糖苷酶的最适作用 pH 为 5.5, pH 6.0 时酶活为最高酶活的 80% 以上(图 7)。商品化右旋糖苷酶 Dextranase 50 L 的最适作用 pH 为 4.5, pH 6.0 时酶仅为最高酶活的 50% 左右^[23]。由于人体正常的口腔环境 pH 在 6.0 左右, 因而本研究所用右旋糖苷酶更适合于口腔应用。菌株 KQ11 所产右旋糖苷酶在低温下(0 °C)仍具有一定的酶活力, 最适作用温度为 45 °C, 随着温度的升高, 酶活迅速下降。37 °C 时酶活为最高酶活的 87% 左右(图 8)。目前已报道野生菌的右旋糖苷酶的最适作用温度一般在 50 °C 左右, 例如商品化的 Dextranase 50 L, 其最适作用温度为 55 °C, 37 °C 酶活仅为最大酶活的 40%^[23], 与菌株 KQ11 所产右旋糖苷酶相比比例要低。

2.5 右旋糖苷酶对变异链球菌牙菌斑生物膜形成的影响

牙菌斑生物膜是由微生物自身所产生的胞外基质与菌体本身相互包裹所形成的微生物群落。牙菌斑是一种典型的生物膜, 变异链球菌为牙菌斑

生物膜的优势菌,与龋病的发生有密切关系。由于以右旋糖酐为主的水溶性葡聚糖对于牙菌斑细菌的粘附至关重要,因而右旋糖苷酶的加入可以抑制变异链球菌在牙面的粘附。KQ11产生的右旋糖

苷酶能够有效抑制变异链球菌牙菌斑生物膜的形成,不加右旋糖苷酶的变异链球菌牙菌斑生物膜,其结构较为致密,并有一定的厚度,多糖与菌体相互包裹,内部充斥着大量通道(图9A)。右

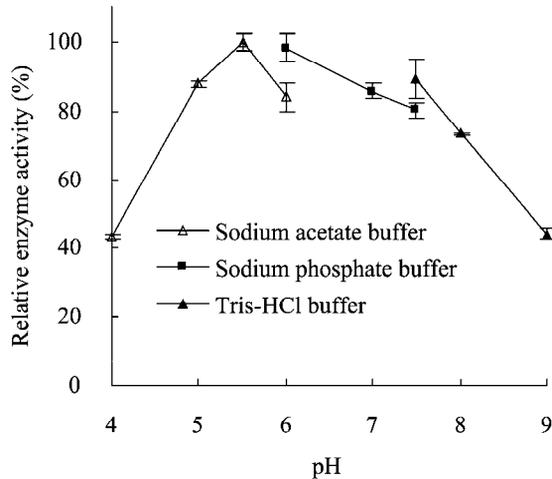


图7 pH对酶活性的影响

Fig. 7 The effect of pH on the activity of dextranase

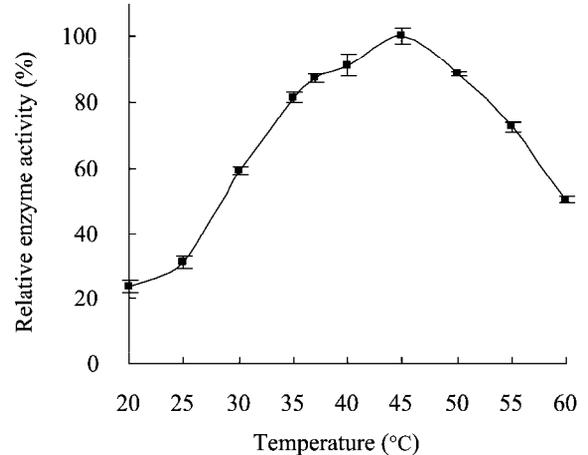


图8 温度对酶活性的影响

Fig. 8 The effect of temperature on the activity of dextranase

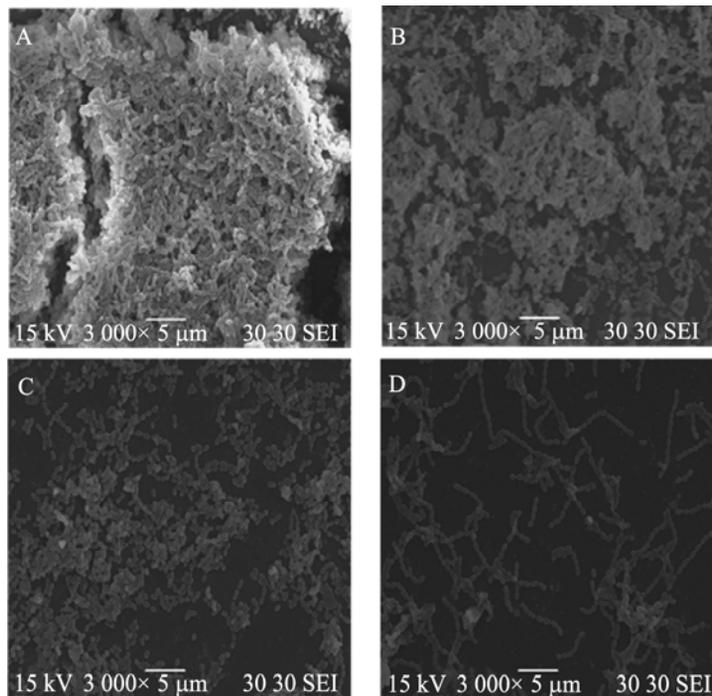


图9 KQ11右旋糖苷酶对*S. mutans*牙菌斑生物膜的作用(3 000×)

Fig. 9 Effect of the dextranase from KQ11 on the dental biofilm formed by *S. mutans* (3 000×)

注: A: 对照组(即添加右旋糖苷酶); B: 添加1 U/mL的右旋糖苷酶; C: 添加3 U/mL的右旋糖苷酶; D: 添加5 U/mL的右旋糖苷酶。
Note: A: Control group (in the absence of dextranase); B: The presence of dextranase at the concentration of 1 U/mL; C: The presence of dextranase at the concentration of 3 U/mL; D: The presence of dextranase at the concentration of 5 U/mL.

旋糖苷酶加入后使变异链球菌牙菌斑生物膜的结构有所改变,随着右旋糖苷酶浓度的增大,生物膜的厚度逐渐变薄,网状结构减少,结构逐渐变得疏松,细菌粘附量也逐渐下降(图 9B、9C、9D)。当右旋糖苷酶的浓度达到 5 U/mL 时细菌粘附量大大下降,原来致密的网状结构被打开,呈短链及长链状存在。

3 结论

海洋微生物是人类获得新型酶的重要源泉,这些新型酶常常具有巨大的生物技术应用价值。目前关于海洋微生物来源的右旋糖苷酶的报道甚少,本研究通过对海洋来源的样品进行筛选得到一株产右旋糖苷酶的海洋细菌,初步鉴定为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。该菌株的最适生长条件为 30 °C, pH 7.5, NaCl 0.4%。该菌株所产右旋糖苷酶粗酶液的最适作用温度为 45 °C, 最适作用 pH 为 5.5。

本研究对菌株 KQ11 所产右旋糖苷酶在牙菌斑生物膜预防中的应用进行了研究,结果发现菌株 KQ11 所产右旋糖苷酶可以有效地预防变异链球菌牙菌斑生物膜的形成,减少细菌在基质表面的粘附。目前国内尚未出现添加右旋糖苷酶的口腔护理产品,因而为其发展提供了一种商业契机。

参考文献

- [1] Pleszczyńska M, Wiater A, Szczodrak J. Mutanase from *Paenibacillus* sp. MP-1 produced inductively by fungal α -1,3-glucan and its potential for the degradation of mutan and *Streptococcus mutans* biofilm[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(11): 1699–1704.
- [2] Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, et al. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix—a modelling study[J]. *Microbiology*, 2005,

151(12): 3817–3832.

- [3] Fitzgerald RJ, Spinell DM, Stoudt TH. Enzymatic removal of artificial plaques[J]. *Archives of Oral Biology*, 1968, 13(1): 125–128.
- [4] 孙晋武. 右旋糖酐酶及其应用[J]. *生物工程进展*, 1986(4): 35–41.
- [5] 吕明生, 王淑军, 房耀维, 等. 一株产低温右旋糖苷酶海洋细菌的筛选和鉴定[J]. *海洋科学*, 2011, 35(5): 32–37.
- [6] Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 306–325.
- [7] Okushima M, Sugino D, Kouno Y, et al. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*[J]. *Japanese Journal of Genetics*, 1991, 66(2): 173–187.
- [8] 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 Science and Biotechnology*, 2012, 19(3): 757–762.
- [9] Wynter CVA, Galea CF, Cox LM, et al. Thermostable dextranases: screening, detection and preliminary characterization[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(2): 203–212.
- [10] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 867–877.
- [11] Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1881–1894.
- [12] 蒋丹. 外源性右旋糖苷酶和氟化钠协同消解变形链球菌单菌种生物膜的研究[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2007.
- [13] Hatada Y, Hidaka Y, Nogi Y, et al. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a protease-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties, and crystallization of the recombinant enzyme[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(5):

- 583-592.
- [14] Oguma T, Kurokawa T, Tobe K, et al. Cloning and sequence analysis of the gene for glucodextranase from *Arthrobacter globiformis* T-3044 and expression in *Escherichia coli* cells[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(12): 2174-2182.
- [15] Chen XM, Jiang Y, Li YT, et al. Regulation of expression of trehalose-6-phosphate synthase during cold shock in *Arthrobacter* strain A3[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(4): 499-508.
- [16] Nakagawa T, Fujimoto Y, Ikehata R, et al. Purification and molecular characterization of cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 720-725.
- [17] Ragnitz K, Syldatk C, Pietzsch M. Optimization of the immobilization parameters and operational stability of immobilized hydantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aureescens* for the production of optically pure L-amino acids[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(7/8): 713-720.
- [18] Norkrans B, Stehn BO. Sediment bacteria in the deep Norwegian Sea[J]. *Marine Biology*, 1978, 47(3): 201-209.
- [19] Srinivas TNR, Nageswara Rao SSS, Vishnu Vardhan Reddy P, et al. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from culturable bacteria of kongsfjorden and Ny-ålesund, Svalbard, Arctic[J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(5): 537-547.
- [20] 李娜, 雷丽萍, 夏振远, 等. 节杆菌 K15 发酵条件的研究[J]. *云南农业大学学报*, 2010, 25(6): 817-821, 826.
- [21] Zobell CE. 海洋细菌学[M]. 薛廷耀, 译. 北京: 科学出版社, 1962: 114-116.
- [22] Zobell CE. Studies on the bacterial flora of marine bottom sediments[J]. *Journal of Sediment Research*, 1938, 8(1): 10-18.
- [23] Marotta M, Martino A, De Rosa A, et al. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(1): 101-108.

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启发性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。