

琼脂糖酶产生菌的筛选和培养基优化

李静^{1,2}, 杨邵岚^{1,2}, 黄琳^{1,2}, 管政兵^{1,2}, 蔡宇杰^{1,2}, 廖祥儒^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从太岁中筛选得到一株初始产酶较高的琼脂糖酶产生菌,经形态和分子生物学分析方法鉴定之后,认定其属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*),命名为 *Paenibacillus* sp. P1(简称为 P1)。P1 为革兰氏阴性菌,短杆状细胞,对明胶和纤维素都没有水解活性。研究该菌的生长及产酶过程发现,该菌株最适发酵产酶时长是 40 h。利用单因素实验对发酵培养基进行优化,最终确定了最适合菌株 P1 产琼脂糖酶的发酵培养基配方为: Agar 3 g/L、蛋白胨 2 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 1.0 g/L、NaCl 0.3 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L、FeSO₄·3H₂O 0.02 g/L、CaCl₂ 0.04g/L。菌株 P1 在优化后的培养基中发酵 40 h,琼脂糖酶产量达到了 3.47×10⁴ U/L,是优化前产酶水平的 3.4 倍。实验结果为非海洋来源的产琼脂糖酶菌株筛选和琼脂糖酶的放大发酵奠定了基础。

关键词: 琼脂糖酶;类芽孢杆菌;筛选;鉴定;发酵优化

中图分类号: X 754 文章编号: 1673-1689(2021)06-0100-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.06.013

Screening of an Agarase-Producing Strain and Optimization of Culture Medium

LI Jing^{1,2}, YANG Shaolan^{1,2}, HUANG Lin^{1,2}, GUAN Zhengbing^{1,2}, CAI Yujie^{1,2}, LIAO Xiangru^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: An agarase-producing strain with high initial enzyme was isolated from Taisui. The strain was identified as *Paenibacillus* after morphological and molecular biological analysis and named *Paenibacillus* sp. P1 (abbreviated as P1). The strain P1 which had a rod-shaped cell was a Gram-negative bacterium. And it could not hydrolyze gelatin or cellulose. The optimum fermentation time of strain P1 was 40 h based on the study of the growth and enzyme production of strain P1. Single factor experiment was used to optimize the fermentation medium. The optimal medium for agarase production from P1 strain were Agar 3 g/L, peptone 2 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 1.0 g/L, NaCl 0.3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L, FeSO₄·3H₂O 0.02 g/L, and CaCl₂ 0.04 g/L. The strain P1 was fermented in the optimized medium for 40 h and the agarase activity was 3.47×10⁴ U/L after optimization, which was 3.4 times higher than that before optimization. The results lay a foundation for the screening of agarase-producing strains from non-marine sources and the scale-up fermentation of agarase.

Keywords: agarase, *Paenibacillus*, screening, identification, fermentation optimization

收稿日期: 2020-01-02

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(HX2019069, HX2019078); 台州市科技计划项目(1801gy24)。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物质降解酶及其系统生物学研究。

E-mail: liaoxiangru@163.com

琼脂是从红藻加工中获得的多糖,由具有杂合结构的半乳糖家族构成,组分为琼脂糖和琼脂胶^[1]。琼脂糖是接近中性的多糖,是由1,3糖苷键连接的 β -D-半乳糖(G)和由1,4糖苷键连接的3,6-内醚- α -L-半乳糖(LA)残基重复交替连接成的线性多糖分子,因其具有稳定性和凝胶特性而受到广泛应用,例如作为食品添加剂、生物能源的原料、微生物生长培养基、糖果以及琼脂果冻^[2]。琼脂胶的半乳糖主链上常有硫酸酯基团等其他基团,并结合着钙、镁等无机元素^[3]。

琼脂糖酶由琼脂分解细菌产生,帮助琼脂解聚,将其降解成低聚合度的寡糖中间体,再继续通过反应进行能量转化^[4-5]。琼脂糖酶是生物研究领域的基本工具,可以从琼脂糖凝胶中回收脱氧核糖核酸(DNA)条带^[6],更是制备寡糖和降解红藻细胞壁的重要工具酶,用于提取具有抗氧化等活性的生物质^[7-8]。基于裂解模式,琼脂糖酶分为 α -琼脂糖酶和 β -琼脂糖酶。目前研究的琼脂糖酶多来源于海洋微生物,包括弧菌属(*Vibrio*)^[9]、交替单胞菌属(*Alteromonas*)^[10]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[11]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和链霉菌属(*Streptomyces*)等^[12]。而这些菌株所产琼脂糖酶活性低,降解琼脂或琼脂糖的能力普遍不高,如韩尧跃等^[13]2015年分离的产琼脂糖酶弧菌Ag-1,其发酵上清液酶活为7 U/mL;而张静雅等^[14]获得的海洋弧菌HN897,酶活仅为0.41 U/mL;2018年,刘婷威等^[15]对获得的菌株*Agarivorans albus* RZW1-1进行发酵优化,得到最高酶活为23.02 U/mL。由于现有琼脂糖酶存在活性、稳定性和生产率低等缺点,使得这些酶在工业生产中很少使用。迄今只有Sigma-Aldrich有限公司的 β -琼脂糖酶应用于生产,1 kU费用为1 854.4元,价格十分昂贵,所以目前仅用于科研^[16]。

太岁作为一种大型混菌复合体,常以纤维素、几丁素、甲壳质为营养^[17-18]。作者从太岁中筛选得到了多株产琼脂糖酶的菌株,开展了菌种鉴定及初步优化发酵条件的实验,为非海洋来源琼脂糖酶的开发,进一步实施琼脂糖酶基因的克隆表达及放大发酵等做了基础研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 太岁样品由作者所在实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器 酵母粉、蛋白胨、碘化钾、碘、D-半乳糖、3-5二硝基水杨酸、 NH_4SO_4 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、琼脂粉:国药集团化学试剂有限公司产品;琼脂糖(Biowest Agarose):无锡特达生物技术有限公司产品;柱式细菌基因提取试剂盒:天恩泽基因科技有限公司产品;2 \times Taq酶等PCR相关试剂:大连TaKaRa公司产品;pH计:奥豪斯仪器有限公司产品;凝胶成像系统:Biorad公司产品;PCR仪、电泳仪:Biorad公司产品。

1.1.3 培养基与常用储备液

1) 筛选培养基(g/L): Agar 15、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5、NaCl 0.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02;pH为7。

2) 摇瓶发酵培养基(g/L): Agar 2、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5、NaCl 0.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05、 $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.02、 CaCl_2 0.01;pH为7。

3) 种子培养基:同摇瓶发酵培养基。

4) 种子液的制备:用接种环轻蘸单个菌落,接种至种子培养基,30℃、150 r/min过夜培养即为种子液。

5) DNS试剂:3,5-二硝基水杨酸3.15 g,在500 mL蒸馏水中溶解并搅拌,水浴至45℃,在溶液中按次序加入NaOH 20 g、酒石酸钾91 g、无水亚硫酸钠2.5 g、苯酚2.5 mL,搅匀,降至常温后定容到1 000 mL,放入棕色试剂瓶避光密封,室温下放置7 d后使用,6个月内有效^[19]。

6) 底物溶液:琼脂糖溶于pH为7的磷酸盐缓冲液,使其终质量浓度为0.5 g/dL,煮沸溶解后放置在40℃保温。

1.2 方法

1.2.1 菌种的筛选 取1 g太岁样品加入10 mL无菌水后于小型料理机中搅碎处理,将处理后的样品稀释后涂布于筛选培养基平板上,30℃培养箱培养2 d,为防止卢氏碘液对细胞造成损伤,先标记筛选培养基上长出的单菌落并于新的平板上划线,后在原平板上倾倒卢氏碘液,挑选原平板中有较大透明圈的菌落,将其对应的新平板放入培养箱继续培养。转接入有50 mL发酵培养基的250 mL锥形瓶中,30℃、150 r/min培养40 h,离心取上清液测酶活,选取540 nm处吸光度最高的细菌保存并鉴定。

1.2.2 菌株的鉴定

1) 将菌株在平板上划线至出现单个菌落,观察其形态,革兰氏染色后观察菌体细胞特征。

2)16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增和序列比对。利用柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒,提取全基因组作为 PCR 模板 DNA。扩增引物选用细菌鉴定通用引物:正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3',反向引物 1492R:5'-GGTTACCTG TTACGACTT-3'。

PCR 反应体系 (50 μ L):2 \times Taq 酶溶液 25 μ L, DNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,ddH₂O 22 μ L。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L 扩增样品进行电泳检测,结果呈阳性(条带大小正确)的样品送至天霖生物科技(无锡)有限公司测序。测得序列结果利用 NCBI 的 BLAST 程序做同源性比对,选取比对后一些相似的菌株序列,运用 MEGA5.0 的 Neighbor-Joining(NJ) 法构建系统发育树。

1.2.3 酶活的测定 粗酶制备:4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 取发酵上清液。

实验组为 200 μ L 发酵液加入 200 μ L 质量浓度 0.5 g/dL 的琼脂糖底物,对照组在此基础上再加入 400 μ L DNS 试剂,对粗酶液进行钝化处理。两组分别混匀后在 40 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,实验组加入 DNS 试剂停止反应,煮沸 5 min,冰水降温后定容至 5 mL。以对照组作为参照,测定其在 540 nm 处的吸光度,根据标曲确定反应产生的还原糖质量。

琼脂糖酶的酶活定义:依照上述前提,每分钟产生 1 μ g 还原糖所需的酶量作为一个酶活单位 U。酶活力以 U/mL 表示。

1.2.4 菌株的生长曲线和产酶曲线 将体积分数 2%的种子液加入发酵培养基,30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养,间隔 5 h 取发酵液,以其在 600 nm 下的吸光度、发酵上清液的酶活力制作菌株的生长曲线和产酶曲线。

1.2.5 菌株产琼脂糖酶的发酵优化 采用单因素方法依次调整培养基的碳源、氮源及无机盐质量浓度。选取琼脂粉、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖与琼脂糖(均为 0.2 g/dL)作为碳源,探究不同碳源对菌株产酶的影响。确定最合适的碳源后,探究菌株产酶与碳源的添加质量浓度之间的关系。优化碳源后,选择牛肉膏、蛋白胨、NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄ 及酵母粉(均为 0.2 g/dL)作为氮源,进一步探究氮源的不同是否影响菌株产琼脂糖酶。确定最佳氮源后,根据预实验结果,确定 K⁺、Mg²⁺及 Ca²⁺为 3 种实验因素

(金属离子添加形式分别为:K₂HPO₄·3H₂O、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂),以浓度 2 mmol/L 和 5 mmol/L 为变量设计了 8 组实验(见表 1),从而确定产琼脂糖酶的最佳发酵培养基。

表 1 无机盐浓度优化

Table 1 Optimization of the concentration of inorganic salts

组号	K ⁺ 浓度/(mmol/L)	Mg ²⁺ 浓度/(mmol/L)	Ca ²⁺ 浓度/(mmol/L)
1	2	2	2
2	5	2	2
3	2	5	2
4	5	5	2
5	2	2	5
6	5	2	5
7	2	5	5
8	5	5	5

1.2.6 数据分析及绘图 所有实验采用至少 3 个重复,在此基础上采用 SPSS V13.0 软件进行统计分析。使用 Origin 8.5 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

利用琼脂糖酶筛选培养基,从太岁样品得到几株产生明显透明圈的菌株。经过初筛纯化及摇瓶复筛之后,发现编号为 P1 的细菌产酶能力较强,初始酶活达到 10.08 U/mL。将其作为目的菌株进行下一步研究。按照分子生物学的方法得到 16S rRNA 基因一段长 1 425 bp 的 DNA,将得到的 DNA 利用 NCBI 网站的 BLAST 进行比对,结果显示编号为 P1 的菌株序列与气味类芽孢杆菌(*Paenibacillus odorifer*)的一致性超过 99%。构建系统进化树显示 P1 与 *Paenibacillus odorifer* DSM 15391(T)在同一分支的置信度为 77%,所以将其鉴定为类芽孢杆菌属(见图 1)。

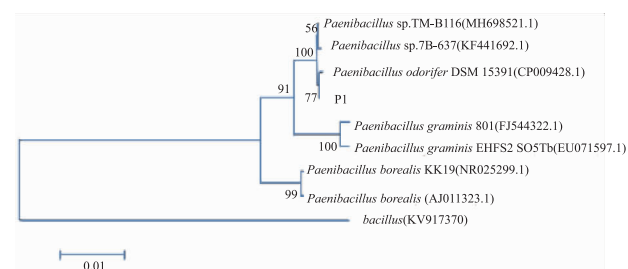


图 1 *Paenibacillus* sp. P1 的 16S rRNA 进化树分析

Fig. 1 16S rRNA phylogenetic tree analysis of *Paenibacillus* sp. P1

单个 P1 菌落在筛选培养基上是白色半透明圆形、表面平整、边缘规则的短杆状细胞,呈革兰氏阴性。经生理生化鉴定,该菌具有固氮能力,既不能利用明胶,也无法水解纤维素(见表 2)。

表 2 *Paenibacillus* sp. P1 生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical identification of *Paenibacillus* sp. P1

指标	生理生化特征		
	<i>Paenibacillus borealis</i>	<i>Paenibacillus graminis</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. P1
固氮	+	+	+
45 °C	-	-	-
VP 反应	-	-	-
明胶	-	-	-
纤维素	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	+	+
木糖	+	+	+
甘露糖	+	+	+
鼠李糖	-	-	+
甘露醇	+	+	-
淀粉	-	+	+

注:“+”为阳性;“-”为阴性。

2.2 菌株的生长和产酶曲线

利用发酵培养基在 30 °C 培养 60 h 后, 绘制菌株的生长及产酶曲线(见图 2), 发现菌株在 1~10 h 时, 生长缓慢, 此时产酶量非常低。而在 10~25 h 期间, 菌株属于快速生长期, 生物量剧增且酶量也逐步上升。之后 P1 进入生长稳定期, 此时生物量增长减缓, 在 35 h 左右生物量有下降趋势, 但相应酶活依然在增加, 在 40 h 时达到最高值。之后菌种的生物量得到短暂回升后继续降低, 酶量也随之减少。因此可判断 P1 的最优发酵时长为 40 h, 此时琼脂糖酶酶活为 10.1 U/mL。

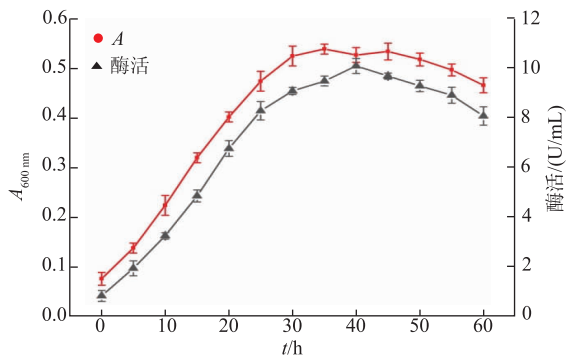


图 2 *Paenibacillus* sp. P1 的生长曲线和产琼脂糖酶曲线

Fig. 2 Growth curve and agarase-producing curve of *Paenibacillus* sp. P1

2.3 碳源对菌株产酶的影响

选取琼脂粉、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖与琼脂糖(均为 0.2 g/dL)作为碳源进行实验, 其他成分与发酵培养基中一致。30 °C 培养 40 h 测酶活(碳源质量浓度的优化与此步操作一致)。如图 3(a)所示, 在以葡萄糖、可溶性淀粉和乳糖作为碳源时, P1 的琼脂糖酶产量较低, 而以琼脂粉和琼脂糖作为碳源时, 琼脂糖酶的酶活虽相差不大, 但琼脂粉更能促进酶活升高。两者的区别在于琼脂粉中琼脂胶占比更高, 结合琼脂胶的结构以及后续实验中金属离子的浓度优化结果, 猜测是琼脂胶上的基团对酶活提高起了促进作用, 所以进一步的碳源优化实验选择琼脂粉作为碳源。图 3(b)中当琼脂粉质量浓度不超过 0.3 g/dL 时, 酶活随着培养基中琼脂粉质量浓度的增加而增加, 最高可达到 16.9 U/mL, 而当琼脂粉质量浓度在 0.3~0.5 g/dL 时, 酶活随琼脂粉质量浓度升高而下降, 因琼脂粉中的琼脂糖具有凝胶功能, 猜测是琼脂粉质量浓度升高, 使反应液黏稠, 导致菌株生长过缓, 酶活下降。

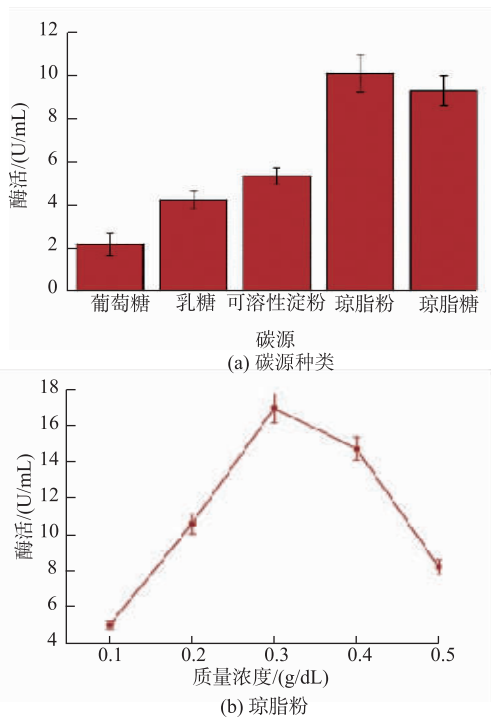


图 3 碳源种类及琼脂粉质量浓度对 *Paenibacillus* sp. P1 产琼脂糖酶的影响

Fig. 3 Effects of carbon source species and agarose concentration on agarase production by *Paenibacillus* sp. P1

2.4 氮源对菌株产酶的影响

选择 0.3 g/dL 的琼脂粉作为最佳碳源后,以质量浓度均为 0.2 g/dL 的牛肉膏、蛋白胨、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及酵母粉作氮源,考察氮源种类与琼脂糖酶活力大小的联系。结果如图 4 所示,在选取的 5 种氮源下,P1 都能产生琼脂糖酶,但考虑到菌株本身的固氮能力,通过实验只能得出的结论是以蛋白胨作为氮源时,菌株产酶最多,此时的酶活达到 22.7 U/mL。

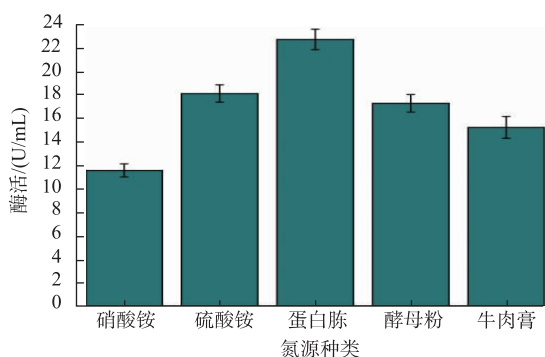


图 4 氮源种类对 *Paenibacillus* sp. P1 产琼脂糖酶的影响
Fig. 4 Effects of nitrogen source species on agarase production by *Paenibacillus* sp. P1

2.5 无机盐浓度对菌株产酶的影响

在优化碳源、氮源及一些基础发酵条件后,酶活提升到原始酶活的 2 倍以上。而产琼脂糖酶的发酵培养基中有不少无机盐成分,所以进一步通过改变组分中的金属离子浓度探究其对菌株产酶的影响。结果见图 5,第 6 组酶活最高,此时 K^+ 、 Mg^{2+} 及 Ca^{2+} 的浓度分别为 5、2、5 mmol/L。当培养基中 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 与 CaCl_2 的浓度升高时,P1 的酶活有所提高,其中 Ca^{2+} 对酶活提升有明显促进效果,而 Mg^{2+} 浓度的增加则导致了酶活的降低。可能随着 SO_4^{2-} 添加浓度的增加,与 Ca^{2+} 发生了结合,导致了 Ca^{2+} 的减少,使得 Ca^{2+} 的促进作用被减弱,造成琼脂糖酶活力减弱, Ca^{2+} 浓度的高低对琼脂糖酶活的影响明显,可能与琼脂糖酶的结构中有 Ca^{2+} 结合位点有关。

3 讨论

我国的藻类资源十分丰富,但目前的开发利用产品多是以生产琼脂作为化工及医药等原料出口,不仅附加值低,对环境也有污染。而通过琼脂糖酶水解琼脂或琼脂糖可以高效获得琼脂寡糖^[20],琼脂

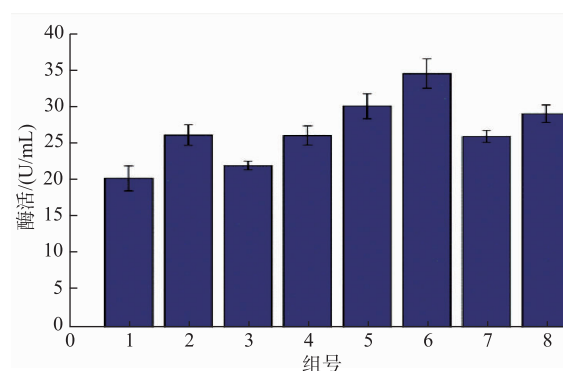


图 5 金属离子浓度对 *Paenibacillus* sp. P1 产琼脂糖酶的影响
Fig. 5 Effect of metal ion concentration on agarase production by *Paenibacillus* sp. P1

寡糖具备抗氧化活性^[21]、保湿美白、抗炎及抑制淀粉降解^[22]的作用。关于琼脂糖酶产生菌的筛选和重组琼脂糖酶的研究虽然很多,但尚没有可以应用于工业的酶产品,且目前国内主要研究海洋来源细菌及其产生的琼脂糖酶。作者从太岁中分离得到 3 株产琼脂糖酶菌株,其中编号为 P1 的菌株产酶能力较强。通过生理生化及分子生物学鉴定,确定该菌株为气味类芽孢杆菌(*P. odorifer*)。国内尚未见有 *P. odorifer* 产琼脂糖酶的报道,关于类芽孢杆菌的琼脂糖酶基因的研究也相对较少。国外报道中,Hosoda 等从菠菜根际土壤中分离得到几株产琼脂糖酶的 *Paenibacillus* sp.,这些菌株优先存在于根部而不是土壤,符合根瘤菌的特性,并且它们都具有多种细胞外琼脂糖^[23];Song 等筛选到一株产琼脂糖酶的菌 *Paenibacillus* sp. SSG-1,并通过菌株的全基因组测序得到琼脂糖酶基因的序列^[24]。

4 结语

作者筛选获得的 *Paenibacillus* sp. P1 可以利用琼脂作为唯一碳源,属于非海洋来源的类芽孢杆菌属,说明其含有将琼脂糖水水解成单糖的琼脂糖水酶体系,并且可能包含多种琼脂糖酶,因此具有极大的开发潜力。实验测定并绘制了该菌的生长及产酶曲线,其最佳产酶时间为培养 40 h。通过对培养基的碳源、氮源及无机盐浓度等因素的初步优化,获得其最适发酵培养基(g/L): Agar 3、蛋白胨 2、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0、NaCl 0.3、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05、 $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.02、 CaCl_2 0.04(pH 为 7)。在最适发酵培养基中发酵 40 h 测定 P1 的琼脂糖酶酶活,该菌株的最高酶活达到 34.7 U/mL,酶活提高为原来的 3.4 倍,

为菌株放大培养和后续的琼脂糖酶应用提供了基础。为了对类芽孢杆菌的琼脂糖酶进行更深入的研究,将考虑对菌株 P1 进行全基因组测序,挖掘出菌株中所有与琼脂糖水解释相关的酶的基因,进行克隆表达或进一步对基因进行改造,以获得酶活力更高、稳定性更好等性质更优良的琼脂糖酶,从而进行更为全面的研究。后续实验也将以此为方向展

开,期望得到关于类芽孢杆菌所产琼脂糖酶的具体生物信息,补充非海洋来源的琼脂糖酶信息,对比类芽孢杆菌所产琼脂糖酶之间的异同。另外可将一种或几种琼脂糖酶联合应用于藻类转化,生产单糖以及琼脂寡糖等,促进藻类资源的有效利用,将资源向高附加值产品转化,为琼脂糖酶的研究及藻类资源转化提供更多方向。

参考文献:

- [1] 田雪健,申晶晶,常耀光. 来源于 *Wenyngzhuangia* 属海洋细菌的一种 β -琼脂糖酶的克隆表达及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(8): 22-28.
- [2] 刘昂,王爽,杜峰,等. 黄海日照海域部分可培养细菌的分离、初步鉴定及产琼脂糖酶细菌的筛选[J]. 微生物学报, 2019, 59(11): 2240-2250.
- [3] SORIANO-MARINHO E. Agar polysaccharides from *Gricilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae)[J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, 89(1): 81-84.
- [4] CHI W J, CHANG Y K, HONG S K, et al. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 94(4): 917-930.
- [5] HA S C, LEE S, LEE J, et al. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway, α -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001, 412(2): 238-244.
- [6] YUN E J, YU S, KIM K H. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017, 101(14): 5581-5589.
- [7] 付万冬. 高产琼脂糖酶菌株的筛选, 发酵条件优化及琼脂糖酶学性质的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [8] HAN W, CHENG Y, WANG D, et al. Biochemical characteristics and substrate degradation pattern of a novel exo-type β -agarase from the polysaccharide-degrading marine bacterium *Flammeovirga* sp. strain MY04 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016, 82(16): 4944-4954.
- [9] ZHANG W W, SUN L. Cloning, characterization and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. V134[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(9): 2825-2831.
- [10] WANG J X, MON H J, JIANG X L, et al. Characterization of a novel beta-agarase marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and its degrading products[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 71(6): 833-839.
- [11] RYU S, CHO S, PARK S, et al. Cloning of the *cel9A* gene and characterization of its gene product from marine bacterium *Pseudomonas* sp. SK38[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 57(1-2): 138-145.
- [12] BIBB M J, JONES G H, JOSEPH R, et al. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterization of the cloned gene product[J]. **Journal of General Microbiology**, 1987, 133(8): 2089-2096.
- [13] 韩尧跃, 林娟, 张建美, 等. 产琼脂糖酶海洋微生物的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 278-284.
- [14] 张静雅, 刘宇鹏, 吴超, 等. 1株高产琼脂糖酶海洋弧菌的分离与酶活性的测定[J]. 热带生物学报, 2018, 9(2): 142-146.
- [15] 刘婷威, 朱新术, 陈梦仟, 等. *Agarivorans albus* RZW1-1 产琼脂糖酶的发酵条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4372-4379.
- [16] 周钦茂, 谢燕纯, 陈彦梅, 等. 一株高产琼脂糖酶海洋细菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2018, 34(12): 140-146.
- [17] 王朝江, 王世清. 基于高通量测序技术对三种太岁样品细菌组成的分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2543-2547.
- [18] 王朝江. 16S rDNA 克隆文库方法分析太岁样品中细菌的多样性[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(3): 95-99.
- [19] 李云, 朱少华, 管政兵, 等. 产耐热 β -半乳糖苷酶蜜源芽孢杆菌的鉴定及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(7): 49-57.
- [20] 杨绍青, 刘学强, 刘瑜, 等. 酶法制备几种功能性低聚糖的研究进展[J]. 生物产业技术, 2019(4): 16-25.
- [21] 肖琼, 肖安风, 姚德恒, 等. 琼脂糖酶水解工艺条件的优化及产物分析[J]. 中国食品学报, 2015, 15(12): 99-106.
- [22] LI J, HAN F, LU X, et al. A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with β -agarase[J]. **Carbohydrate Research**, 2007, 342(8): 1030-1033.
- [23] HOSODA, A, SAKAI M, KANAZAWA S, et al. Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2003, 67(5): 1048-1055.
- [24] SONG T, CAO Y, XU H, et al. Purification and characterization of a novel β -agarase of *Paenibacillus* sp. SSG-1 isolated from soil [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2014, 118(2): 125-129.