

# 海洋红细菌 *Lentibacter algarum* 胞外多糖的分离纯化及结构解析

李佩佩, 陈雪昌, 张玉荣, 张小军, 梅光明, 郭远明

浙江省海洋水产研究所 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江 舟山 316021

李佩佩, 陈雪昌, 张玉荣, 等. 海洋红细菌 *Lentibacter algarum* 胞外多糖的分离纯化及结构解析. 生物工程学报, 2014, 30(3): 455-463.

Li PP, Chen XC, Zhang YR, et al. Purification and structural elucidation of exopolysaccharide from a new marine bacterium *Lentibacter algarum* ZXM100T. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 455-463.

**摘要:** 从青岛潮间带的海水中分离得到的红细菌科细菌 *Lentibacter algarum* 的发酵液中提取胞外多糖, 对其进行离子交换色谱分离纯化, 得到水洗和 0.1、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液 4 个洗脱组分。对含量最高的 0.1 mol/L NaCl 洗脱组分 La0.1 进行进一步的凝胶排阻柱层析纯化, 得到组分 La0.1-1。通过化学测定和高效液相色谱 (HPLC)、高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 等分析方法对其理化性质、分子量、单糖组成、连接方式及初步结构进行研究。结果表明, La0.1-1 总糖含量为 66%, 平均分子量为 12.0 kDa。其单糖组成主要为半乳糖、甘露糖和氨基葡萄糖, 比例为 Gal : Man : GlcN=1.35 : 1.1 : 1.0。对 La0.1-1 进行气相色谱质谱联用 (GC-MS) 和一维核磁 (1-D NMR) 分析结果显示, La0.1-1 的连接方式是以  $\beta$  构型为主, 主要存在  $\rightarrow 2$ -Manp(1 $\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3$ )-Galp(1 $\rightarrow$ 连接, 还存在少量的  $\rightarrow 4$ -Galp(1 $\rightarrow$ 和  $\rightarrow 4$ -Manp(1 $\rightarrow$ 等连接方式, 表明该多糖以直链为主, 还存在一定的分支, 分支发生在  $\rightarrow 2$ -Manp(1 $\rightarrow$ 的 O-6 位和  $\rightarrow 3$ -Galp(1 $\rightarrow$ 的 O-4 或 O-6 位。氨基葡萄糖主要为  $\rightarrow 4$ GlcN(1 $\rightarrow$ 和末端连接方式。核磁分析还显示 La0.1-1 存在一定的乙酰基取代, 初步判断主要取代在氨基葡萄糖的 N-2 位上, 也可能存在于甘露糖和半乳糖上。本研究是首次对 *Lentibacter* 属细菌的胞外多糖进行测定, 获得了结构较为新颖的胞外多糖资源, 为开发海洋多糖资源提供物质基础。

**关键词:** 海洋细菌, 胞外多糖, 分离纯化, 理化性质, 结构分析

Received: June 2, 2013; Accepted: September 30, 2013

Corresponding author: Yuanming Guo. Tel: +86-580-2299898; E-mail: guoyuanming@msn.com

# Purification and structural elucidation of exopolysaccharide from a new marine bacterium *Lentibacter algarum* ZXM100T

Peipei Li, Xuechang Chen, Yurong Zhang, Xiaojun Zhang, Guangming Mei, and Yuanming Guo

Zhejiang Province Key Laboratory of Mariculture & Enhancement, Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, Zhejiang, China

**Abstract:** Exopolysaccharide La0.1-1 was extracted from the broth of a marine bacterium *Lentibacter algarum* ZXM100T isolated from the seawater in the coastal region of Qingdao and purified by Q Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography and Superdex 75 gel-permeation chromatography. Its physicochemical properties and primary structural characters were investigated by chemical analysis together with high performance liquid chromatography (HPLC), high performance gel permeation chromatography (HPGPC) and gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). The results show that the total sugar content of the exopolysaccharide La0.1-1 was about 66% with an average molecular weight at 12.0 kDa. La0.1-1 is mainly composed of Gal, Man, GlcN at the ratio of 1.35:1.1:1.0. Results of GC-MS and NMR demonstrate that the exopolysaccharide La0.1-1 mainly exists with the  $\beta$  configuration. The primary linkage styles are  $\rightarrow$ 2)-Manp(1 $\rightarrow$  and  $\rightarrow$ 3)-Galp(1 $\rightarrow$  with a small amount of  $\rightarrow$ 4)-Galp(1 $\rightarrow$  and  $\rightarrow$ 4)-Manp(1 $\rightarrow$  linkages. The linkage mode of GlcN is  $\rightarrow$ 4)GlcN(1 $\rightarrow$  and terminal linkage. The exopolysaccharide has mainly a linear structure with a few branches linked to *O*-6 of  $\rightarrow$ 2)-Manp(1 $\rightarrow$  and *O*-4 or *O*-6 of  $\rightarrow$ 3)-Galp(1 $\rightarrow$ . 1D-NMR data also revealed that La0.1-1 is substituted by certain acetyl; the acetyl is mainly linked to *N*-2 of GlcN. The exopolysaccharides of the bacterium of *Lentibacter* genus is reported for the first time, and an exopolysaccharide with novel structure was obtained, which enriched marine polysaccharide resources.

**Keywords:** marine bacterium, exopolysaccharides, purification, physical and chemical properties, structure analysis

多糖作为除核酸、蛋白以外的另一类大分子物质,以其丰富的结构和独特的理化性质日益受到关注并得到广泛的应用。多糖按照来源分为植物多糖、动物多糖和微生物多糖。不同来源的多糖在结构上有很大的差异。微生物多糖相比其余两种而言,组成更加复杂多样,结构更加丰富,并且微生物由于其发酵条件可控,不受地域、天气季节、病虫害等因素的影响,可大规模发酵,应用前景更加广阔。凝乳糖、菌核葡聚糖、吉兰多糖、黄原胶多糖等微生物多糖在食品和工业方面已经得到广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。

随着对海洋微生物活性物质研究的深入,研究者发现海洋微生物是获得多糖的有效资源<sup>[3-5]</sup>。研究表明,绝大部分细菌都处于活的非

可培养状态,常规条件下在培养基上不生长繁殖,所以能获得和利用的微生物资源相比而言还非常有限。但是在一些理化因素及生物因素发生改变时,一些细菌可以复苏并可在实验室中培养出来,这一些微生物将成为重要的微生物及微生物资源<sup>[6-7]</sup>。我们从潮间带海水中分离培养得到的一株海洋红细菌发酵液中,分离纯化其胞外多糖,并对其理化性质和初步结构信息进行了测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-岩藻糖、D-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP, 99%) 均为Sigma公司

产品；不同分子量葡聚糖标准品Dextran (Ultra Pure, 美国Fluka公司)；标准牛血清蛋白 (Ultra Pure, 美国Sigma公司), Folin酚试剂乙以及重蒸酚 (北京鼎国生物工程公司)；95%乙醇、丙酮、浓硫酸、无水乙醇、吡啶、硼砂、乙酰丙酮、对二苯氨基苯甲醛、二甲亚砷、吡啶、醋酸酐、氯化钠、硼氢化钠、二氯甲烷、肌醇六乙酸酯、酒石酸钾钠、碳酸钠、硫酸铜、三氟乙酸等均为国产分析纯。

## 1.2 仪器

紫外可见分光光度计 (Cary 50, 美国瓦里安公司)；高效液相色谱仪 (Waters 2695, 美国Waters公司)；快速蛋白质液相色谱仪 (AKTA FPLC Pharmacia Biotech, Sweden)；在线紫外检测器 (Uvicord SII Pharmacia Biotech, Sweden)；旋转蒸发仪 (R-215 BÜCHI, Switzerland)；便携式pH计 (Five FG2, METTLER TOLEDO, Switzerland)；高速离心机 (Centrifuge 5810, Eppendorf)；电热恒温真空干燥箱 (DHG-9123A型, 上海精宏实验设备有限公司)；超级恒温槽 (SC-15, 宁波新芝生物科技)；真空冷冻干燥机 (美国LABCONCO, 美国)；G1362A型示差折光检测器；气相色谱仪 (450GC, 美国瓦里安公司)；Shodex OHpak SB-804 HQ (8.0 mm×300 mm) (Shodex, Japan)；Eclipse XDB-C18 (4.6 μm×250 mm), (Agilent Technologies, USA)；Jeol JNM-ECP超导核磁共振波谱仪 (600 MHz) (日本电子)。

## 1.3 菌株鉴定及胞外多糖提取

菌株经实验室培养发酵后鉴定为好氧型革兰氏阴性菌，菌体为不规则卵圆形，无鞭毛。基于16S rRNA进化分析表明细菌属于变形菌纲 (Alphaproteobacteria), 玫瑰杆菌支系 (Roseobacter clade)。表型及系统发生分析最终确定属红色细

菌科 (Rhodobacteraceae), 命名为 *Lentibacter algarum*<sup>[8]</sup>。

细菌发酵液经布氏漏斗双层滤纸抽滤分离除去菌体及其中的粗杂质，并用乙酸乙酯萃取分离小分子脂溶性物。将水相旋转蒸发浓缩至约为原体积的1/10。再将预冷2 h的95%的乙醇缓慢加入到浓缩液中 (体积比4 : 1)，边加边搅拌，有沉淀析出，把醇沉后的溶液放入冰箱中静置过夜。倾出上层清液，沉淀部分用布氏漏斗三层滤纸抽滤，并依次用无水乙醇、丙酮数次脱水后于40 °C烘干，将其溶于适量蒸馏水后的上清液置于截留分子量为3 500的透析袋中对蒸馏水透析2 d，电导率仪测试透析外液至恒定值时停止透析，将透析液浓缩冷冻干燥即得到胞外多糖粗品。

## 1.4 胞外多糖的分离纯化

参考文献[9]进行：将胞外多糖粗品采用离子交换色谱 (IEC) 纯化，在 AKTA FPLC 快速蛋白纯化系统上用 Q S.epharose FF 柱进行纯化，用0–2 mol/L NaCl 溶液线性洗脱，根据线性洗脱结果，确定 NaCl 梯度洗脱浓度并分别以0、0.1、0.5和1.0 mol/L NaCl 洗脱，部分收集器收集各组分，硫酸-苯酚法测定多糖含量，490 nm 检测。

## 1.5 多糖的凝胶纯化

参考文献[10]进行 选取样品 La0.1以 Superdex 75凝胶柱进一步纯化，以0.2 mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>为流动相，自动部分收集，同时作样品的凝胶纯化曲线，为保证多糖纯度，我们只取峰尖部分，得到纯度较高的多糖样品命名为 La0.1-1。

## 1.6 分子量分析

参考文献[11]进行：采用Shodex SB804柱，流动相为0.2 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液，柱温35 °C，流速0.5 mL/min。进样量为20 μL，RI在线检测。

### 1.7 多糖完全酸水解及PMP柱前衍生高效液相色谱分析 (HPLC)

参考文献[12]进行：将多糖样品1 mg加2 mol/L TFA, 在安瓿瓶中105 °C密封降解6 h后, 氮吹除去TFA。干燥后采用PMP衍生法对多糖水解得到的单糖样品衍生后进行高效液相色谱分析。液相以HPLC Column ZORBAX Eclipse XDB-C18柱进行测定, 流动相为磷酸盐缓冲液 乙腈=83 17, 柱温25 °C, 流速1.0 mL/min, 紫外检测器检测。根据出峰时间和峰面积比可知样品的单糖组成和摩尔比。

### 1.8 含量测定

参考文献[13-17]进行：采用硫酸-苯酚法, 以甘露糖为标准品测定样品的总糖含量。采用硫酸-吡啶法, 以葡萄糖醛酸为标准测定糖醛酸的含量。Elson-Morgan 法测氨基糖含量。采用 Follin 酚法, 以牛血清白蛋白为标准测定蛋白质含量。

### 1.9 甲基化分析

参考文献[18]进行：采用改良的 Hakomori 法对得到的多糖 La0.1-1进行甲基化分析。称取1.0 mg 减压干燥后的多糖纯品, 加入1.0 mL 二甲基亚砜, 磁力搅拌至样品完全溶解, 快速加入100.0 mg 干燥的 NaH, 充入 N<sub>2</sub>密封后于室温下反应1 h, 缓慢加入碘甲烷1.0 mL, 继续反应1 h, 最后加入1.0 mL 水终止反应。反应液以氯仿萃取多次, 合并萃取液, 并以水洗涤氯仿层3次。甲基化后多糖经减压干燥, 进行红外光谱分析以确定甲基化是否完全。

将甲基化后样品完全酸水解, 硼氢化钠还原, 醋酸酐乙酰化得到乙酰化衍生物, 进行气质分析 (GC-MS)。

### 1.10 核磁分析 (NMR)

参考文献[19]进行：取40.0 mg La0.1-1以0.5 mL D<sub>2</sub>O 溶解, 反复交换2次。最后以0.7 mL

D<sub>2</sub>O 将样品溶于核磁管, 加入一滴氘代丙酮作为内标, 在23 °C下, 利用<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 等核磁技术对 La0.1-1进行结构分析。

## 2 结果

### 2.1 胞外粗多糖的提取及分离纯化

胞外粗多糖的产量约为 0.15 g/L, 为纯白色粉末, 经 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子色谱柱分离纯化后主要得到水洗和 0.1、0.5、1.0 mol/L NaCl 洗脱 4 个组分, 分别命名为 La0、La0.1、La0.5 和 La1.0 (图 1 和图 2)。

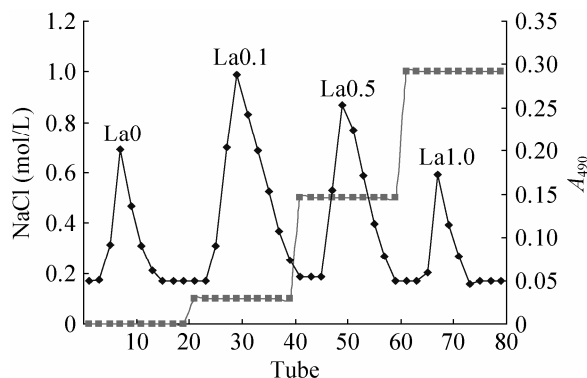


图 1 胞外粗多糖 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换梯度洗脱图

Fig. 1 Segment elution graph of crude polycaccharide in Q-Sepharose fast-flow column.

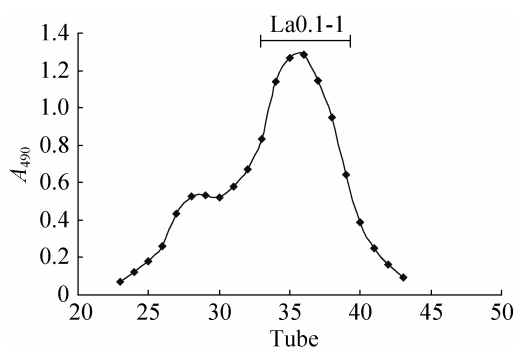


图 2 La0.1 Superdex 75 凝胶渗透洗脱图

Fig. 2 Permeation elution graph of the La0.1 in Superdex 75 column.

由于含量及纯度等原因,选取含量最高的组分La0.1进行下一步凝胶渗透色谱纯化,收集主峰,命名为La0.1-1。纯化后经shodex SB804凝胶渗透色谱显示峰形较为对称,纯度较高,根据标准曲线回归方程计算,其分子量为12.0 kDa。

## 2.2 单糖组成分析

由单糖组成液相色谱图(图3)所示,La0.1-1的单糖组成较为简单,主要含有甘露糖,氨基葡萄糖和半乳糖。三者的摩尔比约为Man GlcN Gal=1.1 1.0 1.35。该组分单糖组成不含有酸性糖,而和很多细菌来源多糖相似,富含GlcN这类碱性糖,但在单糖组成上主要由甘露糖、氨基葡萄糖和半乳糖组成,且三者比例相似,在细菌来源多糖中较为少见。

## 2.3 含量分析

对多糖La0.1-1进行理化性质分析结果表明,La0.1-1总糖含量为66.3%,氨基糖含量为25%,未检测出糖醛酸。和中性多糖相比,La0.1-1总糖含量偏低,可能是由于样品中氨基糖的含量过高,导致苯酚硫酸法比色时颜色偏浅,造成误差

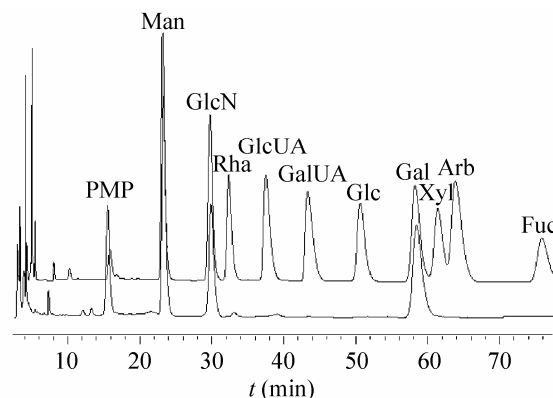


图3 La0.1-1单糖组成的液相色谱图

Fig. 3 Monosaccharides of La0.1-1 in HPLC chromatography.

较大。样品中还含有8.1%的蛋白,对含量测定和结构分析也造成一定的影响,蛋白是否为多糖结合蛋白仍需进一步分析确定。

## 2.4 甲基化分析

为研究多糖中单糖之间的连接方式,采用改良的 Hakmoori 法对 La0.1-1多糖进行甲基化分析。甲基化后的样品经完全酸水解并经过还原后制备成乙酰化衍生物,采用气质联用仪(GC-MS)进行检测(图4)。

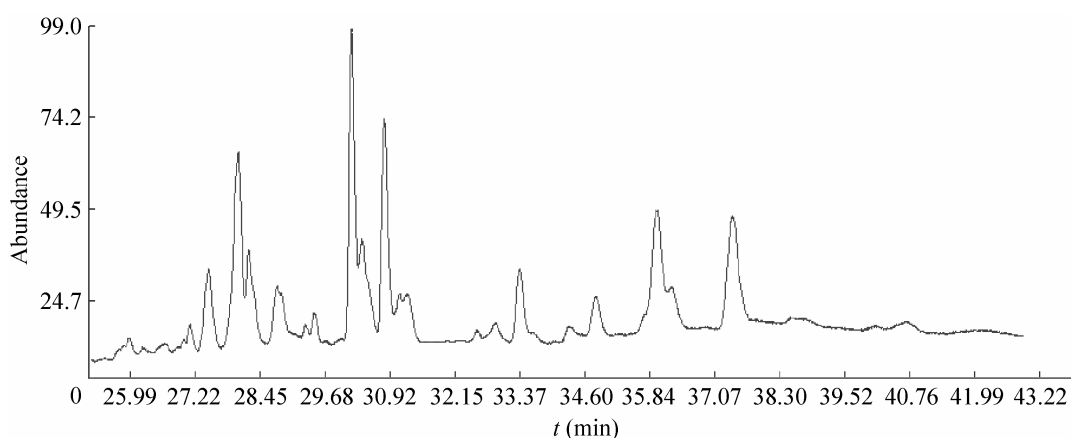


图4 La0.1-1 的气质联用总离子流色谱图

Fig. 4 Total ion chromatogram of La0.1-1 on GC-MS.

结果表明,La0.1-1的连接方式较为复杂,存在Manp(1→,Galp(1→,→2)Manp(1→,→3)Galp(1→,→4)Manp(1→,→4)Galp(1→,→3,4)Galp(1→,→2,6)Manp(1→,→3,6)Galp(1→)连接方式。各单糖具体连接方式和比例如表1所示。La0.1-1的连接方式主要以→2)Manp(1→,→3)Galp(1→)为主,占总连接方式的40%以上,还含有少量的→4)Manp(1→,→4)Galp(1→)连接方式。根据比例判断,大约每五个糖存在一个分支,分支在→2)Manp(1→)的O-6位和→3)Galp(1→)的O-4或O-6位。该分析条件无法得到氨基糖相关的连接方式的信息。

## 2.5 核磁分析

为进一步确定多糖的结构,对La0.1-1进行了<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C NMR波谱分析。通过对氢谱分析(图5A所示发现,异头质子信号主要集中在4.4–4.7 ppm处。因此推测该多糖的构型主要以β构型为主<sup>[20-21,12]</sup>。氢谱在2.0 ppm处,出现了甲基的信号,碳谱(图5B所示)在175 ppm处出现了大量的羰基信号,推测多糖中存在乙酰基取代。通过和文献

比对,我们推测乙酰基取代主要发生在氨基葡萄糖上,为乙酰氨基葡萄糖<sup>[22]</sup>,甘露糖和半乳糖上也有一定的乙酰基取代,取代位置可能为甲基化分析中的分支位点处,因为乙酰化位点不能甲基化,最终结果和多糖分支处的甲基化结果一致。

通过和已知多糖核磁数据相互比对<sup>[23-24]</sup>,我们推断104.3 ppm处的信号为→3)-β-D-Galp(1→)的异头碳信号。103.8 ppm处为→4)-β-D-Galp(1→)的异头碳信号。102.9 ppm处推测为→4)-β-D-GlcNAcp(1→)的信号,101.5 ppm处为→4)-β-D-Manp(1→)的信号,100.6 ppm处为→2)-D-Manp(1→)的信号。99.0 ppm处可能为非还原末端GlcNAc或Gal的异头碳信号。82.9 ppm处为→3)-β-D-Galp(1→)的C3位信号。80.6 ppm处的两个信号分别为→4)-β-D-Galp(1→)和→4)-β-D-GlcNAcp(1→)的C4信号。78.0 ppm处可能为2位被取代的C2信号。62.0 ppm为未被取代C6位信号,而在67.0处的信号表明有部分C6被取代<sup>[25]</sup>,与甲基化结果相符合。56.0 ppm左右为氨基葡萄糖的C2位信号。

表1 细菌胞外多糖组分La0.1-1甲基化水解产物GC-MS分析结果

Table 1 GC-MS results of the fraction La0.1-1 after methylation

Time (min)	Permethylated alditol acetate	Linkage pattern	Major mass fragments ( <i>m/z</i> )	Mol ratio (%)
27.43	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	Manp(1→	101 117 129 145 161 205	6.2
28.20	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	Galp(1→	101 117 129 145 161 205	9.2
30.20	3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	→2)Manp(1→	129 161 198	23.1
30.8	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→3)Galp(1→	101 117 129 161 201 233 277	19.2
31.0	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	→4)Manp(1→	99 101 113 117 129 161 233	11.5
31.3	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→4)Galp(1→	99 101 113 117 129 161 233	10.0
33.4	2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	→3,4)Galp(1→	117 129 185 305	7.7
36.0	3,4-Me <sub>2</sub> -Man	→2,6)Manp(1→	129 189	5.4
37.4	2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	→3,6)Galp(1→	117 129 189 233 305	7.2

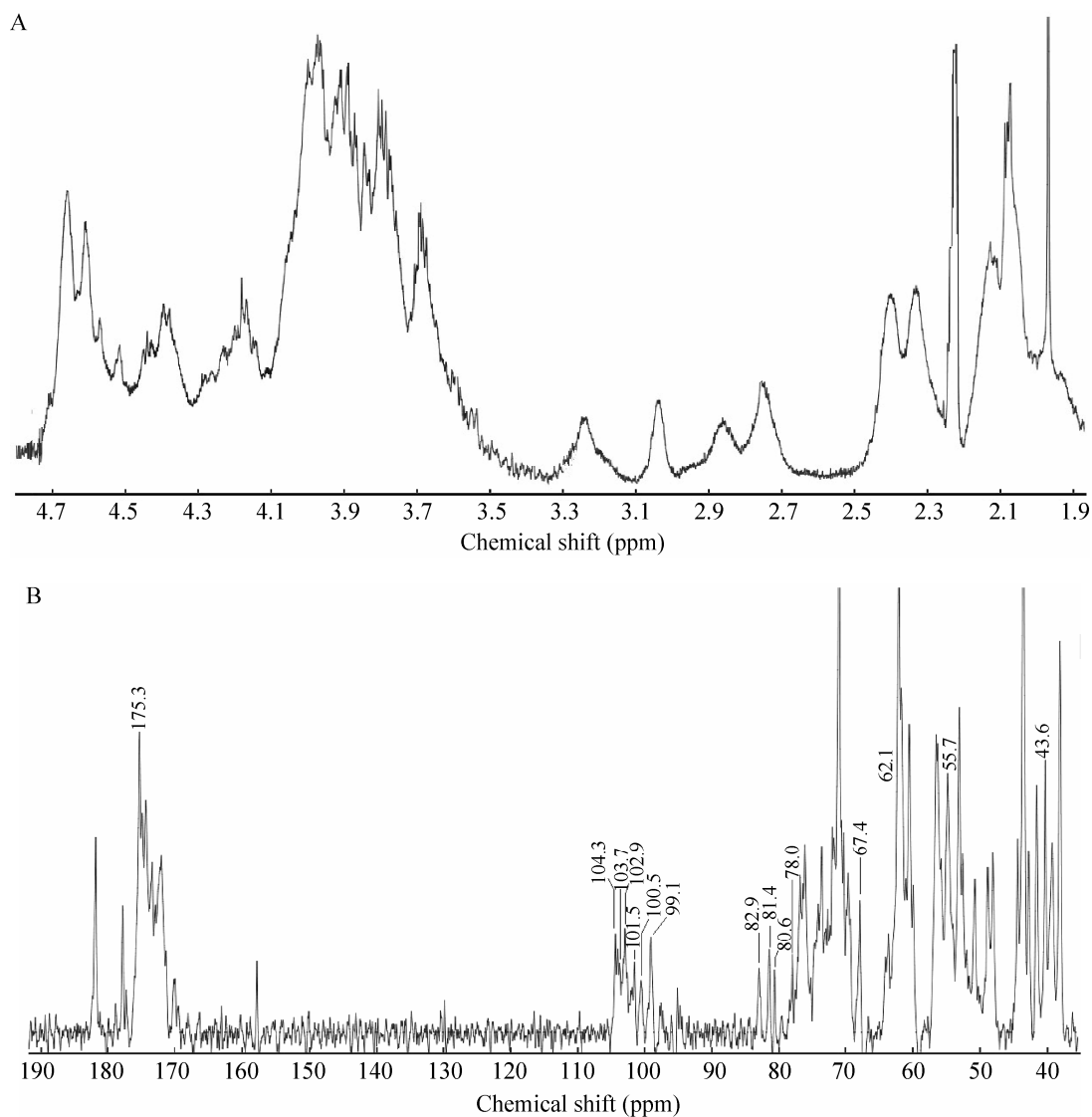


图5 La0.1-1的  $^1\text{H}$  谱(A)和  $^{13}\text{C}$  谱(B)

Fig. 5  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) of La0.1-1.

虽然通过一维核磁的分析和比对能归属出大部分信号,但该多糖的结构比较复杂,具体连接顺序的信息还需要进步通过二维核磁来进一步确定。

### 3 讨论

对青岛潮间带海水中分离得到的一株海洋

红细菌 *Lentibacter algarum* ZXM100T 所产胞外多糖进行了分离纯化,对含量较高的组分 La0.1 进一步纯化得到组分 La0.1-1,并对其化学组成和结构进行研究。结果表明,La0.1-1 主要由半乳糖、甘露糖和氨基葡萄糖组成,其摩尔比约为 1.35 1.1 1.0,分子量约为 12.0 kDa。通过甲基化分析和核磁分析表明,该多糖为存在少量分支

的直链结构。多糖连接方式主要为 $\beta$ 构型,其中半乳糖主要为 $\rightarrow 3)\text{Galp}(1\rightarrow$ 和少量的 $\rightarrow 4)\text{Galp}(1\rightarrow$ 连接,甘露糖主要为 $\rightarrow 2)\text{Manp}(1\rightarrow$ 和少量 $\rightarrow 4)\text{Manp}(1\rightarrow$ 连接,氨基葡萄糖主要为 $\rightarrow 4)\text{GlcNAc}(1\rightarrow$ 和末端连接方式。分支发生在 $\rightarrow 2)\text{Manp}(1\rightarrow$ 的C6位或 $\rightarrow 3)\text{Galp}(1\rightarrow$ C6和C4位。核磁分析还发现该多糖存在一定的乙酰基取代,主要取代在氨基葡萄糖的C2位,可能还有一定取代发生在 $\rightarrow 3)\text{Galp}(1\rightarrow$ 的C4或C6位。虽然未确定La0.1-1的最终结构,但初步分析表明该多糖的结构具有一定的新颖性,因为以半乳糖为主,并同时含有大量甘露糖和氨基葡萄糖的多糖鲜有报道。该研究为海洋微生物胞外多糖的开发利用提供了重要资料,也确定了海洋微生物是获取结构丰富多糖的重要资源。该多糖具体的结构信息还有待进一步研究,纯度还需提高,减少蛋白对结构和活性测定的影响,并进行可能的生物活性筛选。

## REFERENCES

- [1] Wei PL. A summary of microbial extra polysaccharides. *Zhejiang Univ Sci Technol*, 2002, 14(2): 8–12 (in Chinese).  
魏培莲. 微生物胞外多糖研究进展. *浙江科技学院学报*, 2002, 14(2): 8–12.
- [2] Lü J, Yang Y. Three types of microbial polysaccharide. *China Food Addit*, 2007(1): 117–121 (in Chinese).  
吕俊, 杨阳. 三种微生物多糖的研究进展. *中国食品添加剂*, 2007(1): 117–121.
- [3] Zhang SS, Wang CY, Wei XL, et al. Progress of the research on the structure and bioactivities of marine microbial exopolysaccharide. *Microbiol China*, 2007, 34(1): 153–156 (in Chinese).  
张姗姗, 王长云, 魏晓蕾, 等. 海洋微生物胞外多糖结构与生物活性研究进展. *微生物学通报*, 2007, 34(1): 153–156.
- [4] Su WJ, Huang YL, Huang YJ, et al. Screening of marine actinomycetes producing polysaccharides with immunomodulating activity. *Acta Oceanol Sin*, 2001, 23(6): 114–119 (in Chinese).  
苏文金, 黄益丽, 黄耀坚, 等. 产免疫调节活性多糖海洋放线菌的筛选. *海洋科学*, 2001, 23(6): 114–119.
- [5] Chen Y, Guo SD, Xu J, et al. Studies on exopolysaccharides from a marine endogenetic fungus of the *Sponge (Alternaria sp.)*. *Period Ocean Univ China*, 2010, 40(5): 1–4 (in Chinese).  
陈荫, 郭守东, 徐健, 等. 海绵内生真菌胞外多糖理化性质及自由基清除活性研究. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(5): 1–4.
- [6] Sun XY, Li Y. Exploration of the development of cultured microorganisms by the VBNC state of bacteria. *Chin J Prev Vet Med*, 2008, 30(12): 992–994 (in Chinese).  
孙晓媛, 李影. 细菌的“VBNC”状态在开发未可培养微生物中的探索. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(12): 992–994.
- [7] Zhang XF, Hao LJ. Orthogonal optimization of fermentation conditions for EPS-1 and researching on fermentation process of exopolysaccharides. *Food Ind*, 2012, 33(11): 41–43 (in Chinese).  
张晓飞, 郝鲁江. 海洋细菌多糖 EPS-1 发酵培养基的正交优化及多糖发酵过程的研究. *食品工业*, 2012, 33(11): 41–43.
- [8] Li Z, Qu Z, Zhang XM, et al. *Lentibacter algarum* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from coastal water in Qingdao, China during a massive green algae bloom. *Int J Systematic Evol Microbiol*, 2012, 62: 1042–1047.
- [9] Li CL, Yu GL, Zhao X, et al. Extraction and characterization of several polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifolafrondosa*. *Chin J Biochem Pharmac*, 2004, 25(1): 20–22 (in Chinese).  
李春林, 于广利, 赵峡, 等. 灰树花菌丝体中几种多糖的分离及结构表征. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(1): 20–22.



- [10] Shi H, Liu B, Su MX, et al. Isolation, purification and structure analysis of polysaccharides from *Peecilomyces lilacinus*. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1080–1087 (in Chinese).  
史怀, 刘波, 苏明星, 等. 淡紫拟青霉胞外多糖的分离、纯化及结构分析. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1080–1087.
- [11] Zhao X, Miao H, Fan HH, et al. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of *Sulfated polysaccharide* 911 by GPC. *J Ocean Univ Qingdao*, 2000, 30(4): 623–626 (in Chinese).  
赵峡, 苗辉, 范慧红, 等. 用 GPC 法测定硫酸多糖 911 的分子量和分子量分布. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 623–626.
- [12] Stevenson TT, Furneaux RH. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydr Res*, 1991, 210: 277–298.
- [13] Zhang WJ. *Techniques of Glycoconjugates Biochemical Research*. 2nd ed. Hangzhou: Zhangjiang University Press, 1999: 18 (in Chinese).  
张惟杰. *糖复合物生化研究技术*. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 18.
- [14] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350–366.
- [15] Lowy OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reaction. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265–275.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 7: 248–254.
- [17] Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330–334.
- [18] Hakomori S. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem*, 1964, 55: 205–208.
- [19] Xu J, Tao HW, Chen Y, et al. Chemical composition and structure of an exopolysaccharide produced by marine fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. *Period Ocean Univ China*, 2011, 41(10): 87–92 (in Chinese).  
徐健, 陶洪文, 陈荫, 等. 厚藤共生真菌 (*Fusariumoxysporum* Y24-2) 胞外多糖的化学组成和结构研究. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(10): 87–92.
- [20] Lu QY, Ji SL. Application of NMR technique in the structure elucidation of carbohydrates. *Chin J Biochem Pharmac*, 2008, 29(3): 207–209 (in Chinese).  
卢穹宇, 姬胜利. 核磁共振技术在糖类结构解析中的应用. *中国生化药物杂志*, 2008, 29(3): 207–209.
- [21] Ana KMC, Giulianna PVA, Suely FC, et al. Structural elucidation of an acidic galactan from the eggs of mollusc *Pomacea lineata*. *Carbohydr Polym*, 2010, 79: 975–980.
- [22] Liu HM, Ji XM, Sun HP, et al. NMR spectra assignments of amino sugar derivatives. *J Zhengzhou Univ: Nat Sci Ed*, 2007, 39(1): 88–91 (in Chinese).  
刘宏民, 姬小明, 孙贺平, 等. 氨基糖衍生物的 NMR 碳氢化学位移完全解析. *郑州大学学报: 理学版*, 2007, 39(1): 88–91.
- [23] Chen Y, Mao WJ, Tao HW, et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Biores Technol*, 2011, 102: 8179–8184.
- [24] Hinz SWA, Verhoef R, Schols HA, et al. Type I arabinogalactan contains  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp structural elements. *Carbohydr Res*, 2005, 340: 2135–2143.
- [25] Chen Y, Mao WJ, Gao Y, et al. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by the marine fungus *Aspergillus versicolor*. *Carbohydr Polym*, 2013, 93(2): 478–483.

(本文责编 郝丽芳)