

一株海藻多糖降解菌的分离与鉴定

林清菁^{1,2} 潘崇良² 蒋霞敏^{1*} 张泽凌^{1,2} 苏明聰² 王英荣²

(1. 宁波大学 海洋学院 浙江 宁波 315211)

(2. 台湾海洋大学 食品科学系 台湾 基隆 20224)

摘要:【目的】从腐烂的褐藻中筛选一株海藻多糖降解菌, 编号L206, 分析其对不同多糖的降解能力。【方法】通过形态观察、生化单因子试验及16S rRNA基因鉴定细菌, DNS法测定海藻多糖降解酶活性等。【结果】海洋细菌L206, 革兰氏阴性短杆菌, 生长对数期为3–21 h, 适宜生长的NaCl质量浓度为0–3% (质量体积比); 通过16S rRNA基因鉴定为白色噬琼胶菌(*Agarivorans albus*); L206被海带粉诱导至72 h时, 综合复合酶活力达到最大, 其中淀粉酶活力最高(28.17 U/mL), 木聚糖酶次之(23.83 U/mL)。【结论】白色噬琼胶菌L206是一株多能型多糖降解菌, 对褐藻多糖有特殊的降解能力, 具有潜在开发价值。

关键词: 海洋细菌, 16S rRNA基因, 多糖降解酶, 酶活力

Isolation and identification of a seaweed polysaccharide degrading bacteria strain

LIN Qing-Jing^{1,2} PAN Chong-Liang² JIANG Xia-Min^{1*} ZHANG Ze-Ling^{1,2}
SU Ming-Tsung² WANG Ying-Rong²

(1. College of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

(2. Department of Food Science, Taiwan Ocean University, Jilong, Taiwan 20224, China)

Abstract: [Objective] A bacterial strain, L206, which could degrade seaweed polysaccharides was isolated from the rotten brown algae. This research aims to analyze its ability to degrade different polysaccharides of seaweed. [Methods] The morphologic, biochemical and physiological characteristics and 16S rRNA gene were analyzed to identify the taxonomic position of strain L206. Then the activity of seaweed polysaccharide degrading enzyme was measured by DNS. [Results] The bacterial strain was a Gram-negative short bacillus. Its logarithmic growth phase was 3–21 h, with NaCl concentration range from 0 to 3% (W/V) for suitable growth. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons indicated that the strain L206 was *Agarivorans albus*. The comprehensive enzyme activity reached maximum level after strain L206 was induced for 72 h by the powder of *Laminaria japonica*, amylase present the highest enzymatic activity (28.17 U/mL), and followed by xylanase (23.83 U/mL). [Conclusion] As a

基金项目: 国家海洋公益性项目(No. 201305022); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放基金项目(No. J2012010)

*通讯作者: ✉: jiangxiamin@nbu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-23; 接受日期: 2014-04-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-30

multi-functional polysaccharide-degrading bacterium, *Agarivorans albus* L206 shows a special ability to degrading brown algae polysaccharide and has a great development potential.

Keywords: Marine bacteria, 16S rRNA gene, Polysaccharide-degrading enzyme, Enzyme activity

近年来,在海洋药物及保健品的蓬勃发展和能源危机日趋严重的大环境下,海藻多糖的研究引起了人们的广泛重视。海藻寡糖具有多种新型的生理活性,在医药、食品、化工能源等领域具有重要的应用价值,而用海藻生产生物质酒精因具有不与陆地上的农作物抢耕地、淡水、肥料等^[1-2]优势成为近年来研究热点。但海藻多糖结构复杂,不易降解成单糖甚至寡糖,难以被酵母菌利用发酵酒精,海藻多糖降解酶的开发和利用为生产海藻寡糖或单糖提供了新方法。海藻多糖降解酶包括褐藻胶酶、岩藻糖胶酶、琼脂酶、淀粉酶、纤维素酶等。从各类环境中筛选产高效降解酶菌株的研究较多,如工业腐败物中魏氏柠檬酸杆菌的分离等研究^[3]。海藻多糖降解酶主要来源于海洋食藻动物(如鲍鱼、海兔、海螺)和海洋微生物,动物来源的海藻多糖降解酶受其生存环境、采食量等因素的局限,从海洋中筛选具有海藻多糖降解酶的海洋微生物更具有实用价值^[4]。目前关于海藻多糖降解酶的筛选研究主要集中在单一降解酶,如褐藻胶酶、琼脂酶及岩藻糖胶酶等^[5-6],而从海洋中筛选具有多种海藻多糖降解酶的海洋微生物却鲜有报道^[7]。

噬琼胶菌属(*Agarivorans*)是2004年新发现的一个菌属,目前已报道两种细菌,均为革兰氏阴性好氧菌,具有琼脂降解能力^[8]。其中,白色噬琼胶菌(*Agarivorans albus*)主要从海洋环境样本中分离得到,如海水、腐烂海藻及海洋动物等,目前关于该菌的研究已有数篇报道,但仅限于褐藻胶酶和琼脂酶的活力测定及其分离纯化^[9-10],有关该菌株的多种多糖降解酶活力未见报道。本文从大量海水及腐烂的海藻样品中筛选分离出一株具有多种海藻多糖降解酶活力且倾向于分解褐藻多糖(海带多糖为主)的菌株,通过形态特征、生理生化特性和16S rRNA基因鉴定菌株,并通过DNS法测定海藻多

糖降解酶的种类和酶活力,为未来开发生产海藻寡糖和海藻生产生物质酒精提供实验依据和科学指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源:分离筛选菌种的环境样本采自台湾基隆国立台湾海洋大学的小艇码头藻类养殖场。菌株 L206 分离于腐烂的海藻混合物中。海带(*Laminaria japonica*)购买自浙江宁波农贸市场,石花菜(*Gelidium amansii* Lamx)、石莼(*Ulva lactuca*)等海藻购买自台湾基隆市和平岛渔市场。

1.1.2 主要试剂及仪器:海洋细菌培养基(Marine Broth 2216),购自 HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. India; 琼脂(Agar),购自美国 Difco 公司; 淀粉培养基(SSM),购自 HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. India; 褐藻胶(Alginate)、纤维素(Cellulose)、木聚糖(Xylan)等购自 Sigma 公司(St. Louis, MO, U.S.A.); 甘油(Glycerol)、可溶性淀粉(Soluble starch)等购自 Panreac 公司。岩藻聚糖(Fucoidan)提取自荚托马尾藻(*Sargassum siliquosum*)^[11-12], DNS 试剂见文献[13],其他试剂均为分析纯。

光学显微镜,奥林巴斯公司,日本; 折射率侦测器, RI-930, 杰斯科公司, 日本; 免疫吸附分析测度仪, 百特威努斯基, 美国。

1.1.3 培养基:海洋细菌培养基: 40.3 g/L (表示 1 L 蒸馏水中加入 40.3 g 海洋细菌培养基,下同), 固体培养基加入 1.5% 琼脂; 多糖培养基(PSMB): 海洋细菌培养基加入 0.3% 海藻多糖热萃液[15.0 g 藻粉加入 500 mL 蒸馏水中(石花菜减半), 1.0×10⁵ Pa 热萃 20 min]或市售多糖; 淀粉培养基(SSM): 25.0 g/L; 经海带诱导的培养基(MMB-Lami): 海洋细菌培养基 2216 (MB, g/L) 40.3; 海带粉 3.0; Tris-HCl 1.0; NaCl 6.0; NaNO₃ 1.0; KH₂PO₄ 0.1。以上培养基均

调整 pH 至 8.0 后, 于 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株筛选: 海水、腐烂的海藻、麒麟菜等样品匀质后, 上清液用无菌人工海水稀释后涂布平板(MA 固体培养基), 26 °C 恒温培养 48 h 后, 取出观察, 含海藻多糖降解酶菌株的菌落周期会出现明显凹陷。选取菌落周围有凹陷的菌株进一步分离纯化后, 转接摇瓶培养, 最后用甘油保存。

选取凹陷明显的菌株做进一步筛选。一环纯化后的菌落接入装有 10 mL 多糖培养基的试管中, 26 °C、200 r/min 培养, 每隔 24 h 测定细菌生长吸光值(OD_{600})。

1.2.2 菌株鉴定: 形态特征: 经筛选所确定的菌株, 平板划线 26 °C 培养 48 h 后进行革兰氏染色, 观察菌落形态, 用光学显微镜观察菌体形态并拍照。

生理生化及生长特性: 生理生化指标糖类发酵试验指标(果糖、木糖、蔗糖等, 此时培养基的其他成分为二次水及显色剂 BBL™ Phenol Red Broth Base)、IMViC (吡啶、甲基红等)、盐类(硝酸盐等)及氨基酸(赖氨酸、鸟氨酸等)的利用性等, 其测定方法参照文献[14-15]。菌株生长曲线和耐盐性测定方法参照文献[16], MB 液体培养基中接种菌液 1%, 用恒温振荡培养箱 26 °C、160 r/min 振荡培养, 折射率侦测器定时测定细菌生长吸光值(OD_{600}), 同时测定 pH 值及细菌生长量。耐盐性实验: MB 液体培养基中 NaCl 浓度梯度为: 0、3%、6%、8%、10% (质量体积比), 其他成分不变, 26 °C、160 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 测定细菌生长吸光值(OD_{600})。

分子鉴定: 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 (27f: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGG-3'; 1492r: 5'-ACGGCAACCTTGTTACGAGTT-3')进行 PCR 扩增, 菌株 L206 的 16S rRNA 基因委托台湾明欣生物科技有限公司进行序列测定。测定结果使用 EzGenom 软件、NCBI 的 BLASTn 软件对 GenBank 中的序列进行比对, 进行同源性分析, 并通过 MEGA 5.05 软件, 用 Neighbour-Joining 法构建系统发育树。

1.2.3 酶活测定: 取纯化的菌种接入 MMB-Lami 培养基于 26 °C、160 r/min 振荡培养 48 h, 所得培养液经 4 °C、9 600 r/min 离心 30 min, 收集上清液用于酶活测定。参照 Preiss、Weissbach 和 Hurwitz 等方法^[17-18], 用 DNS 法测定粗酶液的酶活力(酶连结免疫吸附分析测度仪)。一个酶活力单位(U)定义为: 1 mL 酶液每分钟水解产生 1 mol 还原糖, 以海藻多糖水解产生的单糖建立标准曲线。

1.2.4 数据分析与统计: 实验数据以 Excel 2007 和 SigmaPlot 11.0 软件作图, SPSS for Windows 15.0 软件进行方差分析处理。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

自海水及腐烂的海藻混合物中分离到 25 株具有琼胶降解能力的海洋细菌。其中编号为 L206 的菌株在含有 0.3% 纤维素、马尾藻热萃液、铜藻热萃液、石花菜热萃液的培养基中生长优于控制组(MB) [$OD_{600}(PS) - OD_{600}(MB) > 0$], 而在含有 0.3% 海带热萃液的培养基中具有特殊的生长趋势(图 1)。

菌株 L206 在多糖培养基和 MB 液体培养基中的菌体浓度差量变化如图 1 所示。菌株 L206 在含有 0.3% 石花菜热萃液的培养基中生长优于控制组(MB), 而在含有 0.3% 石莼热萃液的培养基中生长最差 [$OD_{600}(PS) - OD_{600}(MB) < 0$], 说明菌株 L206 能分解石花菜多糖用于生长所需或石花菜热萃液中含有其他促进菌株 L206 生长的氮源等化合物, 而石莼热萃液中除了石莼多糖外, 还可能存在阻碍该菌株生长的物质。菌株 L206 在含有 0.3% 海带热萃液的培养基中具有如下生长趋势: 第 1-3 天优于控制组, 第 4 天 $OD_{600}(PS) - OD_{600}(MB)$ 降至 -0.141, 但在第 5 天达到最高(0.527), 之后两天均优于控制组; 观察其在含有 0.3% 马尾藻和 0.3% 铜藻热萃液的培养基中具有类似生长趋势, 但该趋势在含有 0.3% 海带热萃液的培养基中更为明显, 故采用 0.3% 海带热萃液进行后续试验。以上结果表明, 菌株 L206 是一株多能型多糖降解菌, 且比较倾向于分解褐藻多糖。

表1 菌株 L206 的理化特性
Table 1 Physicochemical characteristics of strain L206

理化指标 Physico-chemical indexes	结果 Results	理化指标 Physico-chemical indexes	结果 Results
对碳源的利用 Utilization of carbon sources		过氧化氢酶 Catalase	-
D-果糖 D-Fructose	+	氧化酶 Oxidase	+
D-半乳糖 D-Galactose	+	β -半乳糖苷酶 ONPG	+
D-葡萄糖 D-Glucose	+	脲酶 Urease	-
D-麦芽糖 D-Maltose	+	生化特性 Physicochemical characteristics	
D-甘露糖 D-Mannose	-	精氨酸 Arginine	-
D-棉子糖 D-Raffinose	-	赖氨酸 Lysine	-
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	鸟氨酸 Ornithine	-
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	吲哚 Indole	-
乳糖 Lactose	+	硝酸盐 Nitrate	+
蔗糖 Sucrose	-	丙二酸盐 Malonate	-
木糖 Xylose	-	三糖铁琼脂 TSI	+
福寿昔醇 Adonitol	-	甲基红 M.R.	+
D-甘露醇 D-Mannitol	+	伏-普 V-P	-
肌醇 Inositol	-	柠檬酸 Citrate	-
山梨醇 Sorbitol	-	硫化氢 H ₂ S	-
能产生的酶活 Enzyme activity generated		明胶 Gelatinase	-
琼脂酶 Agarase	+	杨素 Salicin	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇作为唯一碳源,不可利用木糖、蔗糖、棉子糖等碳源;生长过程中具有氧化酶活性、 β -半乳糖苷酶活性及琼脂酶活性;硫化氢、V-P 及明胶液化试验呈阴性。卢戈氏碘液的检验结果为阳性,表明菌株生长过程中能产生淀粉酶。

在耐盐性试验中,菌株能在含有 0-3% NaCl (质量体积比)的 MB 液体培养基生长,但在含有 6%、8%、10% NaCl (质量体积比)的 MB 液体培养基中基本不能生长(图 5),故菌株 L206 的最适 NaCl 生长浓度为 0-3% (质量体积比)。

2.3.2 菌株的生长特性: 菌株 L206 生长具有明显的 4 个时期,即延缓期(0-3 h)、对数期(6-21 h)、平稳期(21-60 h)和衰亡期(60-132 h)(图 6)。

MB 液体培养基中加入 0.3% 海带热萃液,研究海带多糖对菌株 L206 生长曲线的影响(图 6)。此

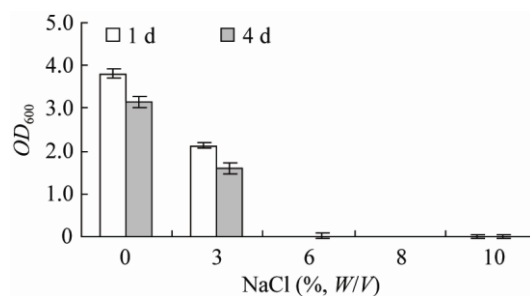


图5 氯化钠浓度对菌株 L206 生长的影响(26 °C、160 r/min)
Figure 5 Effects of concentration of sodium chloride on growth of strain L206 (26 °C, 160 r/min)

时菌株 L206 的生长周期为: 延缓期(0-6 h)、对数期(6-15 h), 而平稳期延长至 84 h (15-84 h), 衰亡期为 84-132 h。菌株 L206 在以糖类为主的海带萃取物培养液中具有较好的生长趋势,说明其生长过程中能产生海带多糖降解酶,分解利用海带多糖用于生长。

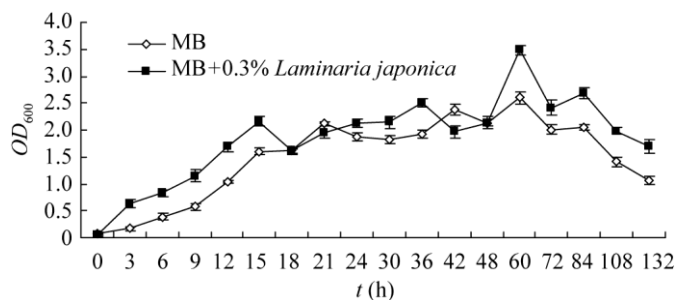


图 6 海带多糖对菌株 L206 生长曲线的影响

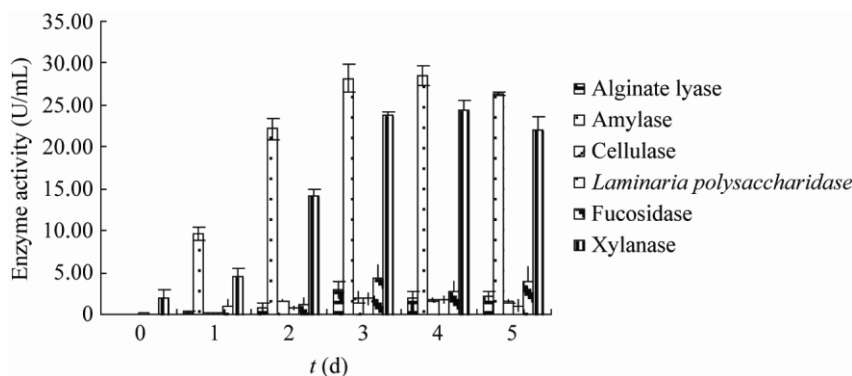
Figure 6 The effects of *Laminaria japonica* polysaccharides on growth curve of strain L206

图 7 菌株 L206 经诱导后所产酶的酶活力

Figure 7 The activity of induced enzyme from strain L206

由图 1 和表 1 可知, 菌株 L206 是一株较倾向于分解褐藻多糖的海洋细菌, 且在含有海带多糖的培养基中具有比较特殊的生长趋势, 故以褐藻胶、纤维素、岩藻聚糖、海带多糖、淀粉、木聚糖为基质测定其相对应的酶活力, 结果如图 7 所示。菌株 L206 经海带水解液诱导后所产酶的酶活力, 当被诱导至 3 d 时, 综合酶活力达到最大, 其中淀粉酶活力最高(28.17 U/mL), 木聚糖酶其次(23.83 U/mL), 同时酶活力最低的海带多糖降解酶和纤维素酶也分别达到 1.92 U/mL 和 2.05 U/mL (图 7)。

3 讨论

3.1 菌株 L206 的理化特性

菌株 L206 筛选自腐烂的海藻混合物中, 隶属于噬琼胶菌属, 是一株多能型多糖降解菌, 且对海带多糖具有特殊的降解利用能力。噬琼胶菌属 (*Agarivorans*) 的模式菌株 *Agarivorans albus*

MKT106^T 由 Kurahashi 和 Yokta 于 2004 年筛选于海洋动物中, 能以甘露醇、麦芽糖、葡萄糖和木糖为唯一碳源^[19]。除甘露醇、麦芽糖、葡萄糖外, 菌株 L206 还能以果糖、半乳糖、乳糖为唯一碳源, 而不能以木糖为唯一碳源, 但当用海带诱导后, 能产生木糖酶, 表明该酶为典型的诱导酶。与付晓婷^[20]从蛸螺肠道中筛选到的海藻多糖降解菌相比, 菌株 L206 不但能在以多糖为碳源的培养基中产生多糖降解酶, 且能在 MB 中产生多种海藻多糖降解酶; 而与韩文君等^[7]筛选到的海藻多糖降解菌相比, 菌株 L206 除能在琼脂糖类的培养基中生长较好外, 还较倾向于利用褐藻多糖为碳源生长, 是一株多能型多糖降解菌。

NaCl 通常在培养基中起着维持菌体内外渗透压、维持细胞内外电势差、参与物质运输的作用。NaCl 浓度与海洋细菌的生长密切相关, 也是区分

海洋细菌与淡水细菌的重要指标。本研究中当 NaCl 浓度为 0–3% NaCl (质量体积比) 时, 菌体能正常生长, 符合海洋细菌的嗜盐特点, 属于典型的海洋细菌^[21]。

3.2 菌株 L206 对海带多糖的利用能力

菌株 L206 能水解利用海带多糖用于生长所需, 推测原因可能是与海带多糖中含有甘露醇和葡萄糖有关, 菌株 L206 能以甘露醇、葡萄糖作为唯一碳源, 海带中含有 51.9% 的碳水化合物, 其主要成分为甘露醇(30.54%, 占全部糖类的 81%) 和葡萄糖(6.98%)^[22], 所以菌株 L206 能利用海带多糖用于生长所需, 海带多糖能延长该菌株的生长平稳期进一步证明了这一观点。与其他多糖培养基相比(7 d 中循序渐进地生长或 7 d 均停止生长), 菌株 L206 在含有海带多糖的培养基中具有比较特殊的生长趋势(第 1–3 天正常生长, 第 4 天基本停止生长, 到第 5–7 天又开始生长), 推测原因可能与菌株 L206 对于不同海带多糖的利用变化相关。海带多糖是一类具有生物活性的大分子有机物, 主要由褐藻胶、岩藻聚糖、木聚糖等组成, 其结构复杂, 不同多糖具有不同的糖残基或寡糖残基连接方式^[23–25]。海带的细胞壁中褐藻胶和岩藻聚糖被纤维素包裹在里面^[26], 由此推测海带多糖可能是多层包裹结构。菌株 L206 首先能分解第一种海带多糖用于生长所需(第 1–3 天), 当用尽时, 第二种海带多糖降解酶需要经过诱导后(第 4 天)才能利用并分解相对应的海带多糖以供生长(第 5 天开始), 具体分解机制有待进一步研究。

3.3 菌株 L206 的应用前景

与其他已报道的白色噬琼胶菌相比, 菌株 L206 生长周期短(21 h 就达到对数期), 产酶种类多, 主要包括褐藻胶酶、纤维素酶、岩藻聚糖酶、海带多糖降解酶、淀粉酶、木聚糖酶等, 其酶活力普遍较高, 其中淀粉酶最高活力可达 28.17 U/mL, 在水解海藻多糖(尤其是海带多糖)方面具有较高的生产潜力, 为未来开发生产海藻寡糖和海藻生产

生物质酒精提供实验依据和科学指导。

4 结论

(1) 自海藻养殖场腐烂的海藻混合物样品中分离得到能液化琼脂且较倾向于分解褐藻多糖的海洋细菌 L206, 属革兰氏阴性细菌, 分子鉴定为白色噬琼胶菌(*Agarivorans albus*)。

(2) 白色噬琼胶菌 L206 生长周期较短, 21 h 既达到对数期, 海带粉能延长该菌的平稳期, 属于典型的海洋细菌。

(3) 能以果糖、半乳糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇作为唯一碳源, 在海带粉的诱导下能产生木糖酶和淀粉酶等。

(4) 菌株 L206 是一株能降解多种多糖, 且对海带多糖具有特殊分解能力的海洋细菌, 蕴含包括褐藻多糖降解酶、琼脂酶等在内的丰富的多糖降解酶资源, 具有潜在开发价值, 为海藻资源的开发利用提供实验依据和科学指导。

参考文献

- [1] 潘崇良. 利用藻类生产生物质能源[J]. 科学发展, 2010, 448: 26-32.
- [2] Lau CL, Lee KT, Mohamed AR. Global warming mitigation and renewable energy policy development from the Kyoto Protocol to the Copenhagen Accord-A comment[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012, 16(7): 5280-5284.
- [3] 李尤杰, 周刚, 施庆珊, 等. 一株工业腐败物种魏氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及产生物膜特性分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 2-7.
- [4] Mohammad MR, Akira I, Hiroyuki T, et al. Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 157(4): 317-325.
- [5] Kim EJ, Fathoni A, Jeong GT, et al. Micro bacterium oxidants, a novel alginate and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste[J]. Journal of Environmental Management, 2013, 130(2013): 153-159.
- [6] 汤海清, 欧昌荣, 郑晓冬. 1株产褐藻胶裂解酶海洋细菌的分离鉴定及酶学性质[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(4): 387-395.
- [7] 韩文君, 赵帅, 刘会会, 等. 一株多糖降解菌的分离、

- 鉴定与琼脂糖降解能力[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 776-783.
- [8] Yasuike M, Nakamura Y, Kai W, et al. Draft genome sequence of *Agarivorans albus* strain MKT 106T, an agarolytic marine bacterium[J]. Genome Announc, 2013, 1(4): 1-2.
- [9] Du ZJ, Wang J, Yang LJ, et al. Identification of a marine agarolytic bacterium *Agarivorans albus* QM38 and cloning and sequencing its beta-agarase genes[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 30(1): 118-124.
- [10] 解卉, 韩宝芹, 董文, 等. 一种海洋琼胶酶的分离纯化、酶学性质研究及降解产物分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 896-901.
- [11] Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, et al. Fructose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 *in vitro*[J]. Marine Drug, 2011, 9: 2605-2621.
- [12] Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, et al. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(3): 331-336.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for reagent for determination of reducing sugars[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] Sakatoku A, Wakabayashi M, Tanaka Y, et al. Isolation of a novel Saccharophagus species (Myt-1) capable of degrading a variety of seaweeds and polysaccharides[J]. Microbiology Open, 2012, 1(1): 2-12.
- [15] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 1-276.
- [16] 吴绍祺. 海洋菌所产 Agarase 生产条件与海藻多醣经 Agarase 分解所得寡醣类组成之探讨[D]. 基隆: 国立台湾海洋大学硕士学位论文, 1999.
- [17] Preiss J. Bacterial alginate lyase[J]. Methods in Enzymology, 1966(8): 641-644.
- [18] Weissbach A, Hurwitz J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B[J]. Biological Chemistry, 1958, 234: 705-709.
- [19] Kurahashi M, Yokota A. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a-proteobacterium isolated from marine animals[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 693-697.
- [20] 付晓婷. 海洋细菌(*Agarivorans albus* YKW-34)产生的褐藻胶裂解酶及琼胶酶的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2008.
- [21] 周培瑾. 嗜盐细菌[J]. 微生物学通报, 1989, 16(1): 31-34.
- [22] Kim NJ, Li H, Jung K, et al. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(16): 7466-7469.
- [23] 曹刚. 海带多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 吉林: 东北师范大学硕士学位论文, 2010.
- [24] 张慧玲. 海带多糖的分离纯化及化学结构的初步研究[D]. 黑龙江: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2007.
- [25] Zha XQ, Xiao JJ, Zhang HN, et al. Polysaccharides in *Laminaria japonica* (LP): Extraction, physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis[J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 244-252.
- [26] Xiong Y, Xu J, Shan WJ, et al. A new approach for rhenium (VII) recovery by using modified brown algae *Laminaria japonica* adsorbent[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 464-472.