DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251229005
引用格式: 王文璇, 吴宁, 张德超, 等. 食鹿角菜假交替单胞菌 A1 降解海带的产物分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 43–52.
WANG WX, WU N, ZHANG DC, *et al*. Analysis of the degradation products of *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1 on *Saccharina japonica* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 43–52. (in Chinese with English abstract).

食鹿角菜假交替单胞菌 A1 降解海带的产物分析

王文璇[1,2], 吴　宁[1], 张德超[3], 张全斌[1,2], 耿丽华[1*]

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学实验室, 青岛　266000; 2. 中国科学院大学海洋学院, 青岛　266400; 3. 中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室, 青岛　266000)

摘　要: 目的　评价食鹿角菜假交替单胞菌 A1 对海带的降解效果, 并系统分析降解产物的多糖特性。**方法**　通过筛选获得一株可降解海带的食鹿角菜假交替单胞菌 A1, 对海带发酵后获得的发酵液进行分析。将发酵液及分步醇沉组分进行了含量分析、单糖组成分析和分子量分析, 并对海带残渣进行了扫描电子显微镜观察。**结果**　该菌株可显著破坏海带细胞壁; 降解产物包含不同分子量多糖与寡糖, 沉淀中包含大分子量多糖, 而上清液中主要富集 1.4~1.7 kDa 的寡糖。对沉淀组分进一步分析可知岩藻糖含量较高, 其中 70%醇沉沉淀达 4.08%; 单糖组成分析表明, 沉淀富含岩藻糖、半乳糖和甘露糖, 并检出褐藻胶特征单元, 证实产物中含褐藻多糖硫酸酯与褐藻胶。**结论**　食鹿角菜假交替单胞菌 A1 具有分解海带, 破坏海带细胞壁, 释放其中糖类化合物的功能。通过分级醇沉, 能够有效获得不同分子量的海带多糖及寡糖, 为采用发酵技术开发海带多糖与寡糖, 获取生物活性原料以用于食品工业生产提供了思路。

关键词: 海带; 微生物发酵降解法; 食鹿角菜假交替单胞菌 A1; 多糖与寡糖

Analysis of the degradation products of *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1 on *Saccharina japonica*

WANG Wen-Xuan[1,2], WU Ning[1], ZHANG De-Chao[3], ZHANG Quan-Bin[1,2], GENG Li-Hua[1*]

(1. *Laboratory of Experimental Marine Biology*, *Institute of Oceanology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Qingdao* 266000, *China*; 2. *College of Marine Sciences*, *University of Chinese Academy of Sciences*, *Qingdao* 266400, *China*; 3. *Laboratory of Marine Organism Taxonomy & Phylogeny*, *Institute of Oceanology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Qingdao* 266000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To evaluate the degradation effects of *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1 on *Saccharina japonica* and systematically analyze the polysaccharide characteristics of the degradation products. **Methods**　A strain of *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1 capable of degrading *Saccharina japonica* was obtained through screening. The fermentation broth acquired after *Saccharina japonica* fermentation was analyzed. The content determination, monosaccharide composition analysis and molecular weight analysis were performed on

收稿日期: 2025-12-29
基金项目: 福建省 STS 计划配套项目(2025T3020)
第一作者: 王文璇(2002—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋生物学。E-mail: wangwenxuan7687@outlook.com
***通信作者:** 耿丽华(1990—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为海藻化学与海洋药物。E-mail: lhgeng@qdio.ac.cn

the fermentation broth and its fractional ethanol precipitation components, and the *Saccharina japonica* residues were observed by scanning electron microscopy. **Results** This strain could significantly damage the cell wall of *Saccharina japonica*. The degradation products contained polysaccharides and oligosaccharides with a wide molecular weight range, while the supernatant mainly enriched oligosaccharides of 1.4–1.7 kDa. Further analysis of the precipitated components revealed that the content of fucose was relatively high, with 70% alcohol precipitation reaching 4.08%; the monosaccharide composition analysis indicated that the precipitation was rich in fucose, galactose and mannose, and the characteristic units of alginate were detected, confirming that the products contained sulfated fucopolysaccharides and alginate. **Conclusion** *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1 has the function of decomposing *Saccharina japonica*, destroying the cell wall and releasing the carbohydrate compounds. Polysaccharides and oligosaccharides with different molecular weights from *Saccharina japonica* can be effectively obtained by alcohol precipitation, providing a method to develop kelp polysaccharides and oligosaccharides through fermentation technology and obtain bioactive materials for the food industry.

KEY WORDS: *Saccharina japonica*; microbial fermentation degradation method; *Pseudoalteromonas carrageenovora* A1; polysaccharides and oligosaccharides

0 引 言

海带(*Saccharina japonica*), 属褐藻门海带科, 是一种多年生药食同源大型藻类[1]。海带主要分布在北半球的冷水海域, 在我国集中分布于辽东半岛、山东半岛沿岸海域, 以及福建和广东省的沿海地区[2]。我国是全球海带主产国, 海带不仅作为食品原料, 还在碘、胶、醇工业生产中发挥着重要作用, 为我国带来了巨大的生态价值和产业价值[3], 海带多糖种类丰富, 主要包含褐藻多糖硫酸酯、褐藻胶(包括古罗糖醛酸与甘露糖醛酸), 以及纤维素、半纤维素等结构性多糖[4]。海带多糖与寡糖作为重要的食品添加剂与天然生物活性物质, 已有大量研究证明其具有清除自由基、抗肿瘤、降血糖等功效[5], 在功能性食品开发中展示出广阔发展空间与强大发展潜力, 受到广泛关注与研究。

通过多样方式对海带进行降解, 以获取活性物质用于食品工业生产是一条基本范式。现有降解方法主要为物理法、化学法、生物酶解法以及微生物发酵降解法。化学法通常涉及化学试剂提取海带相关成分, 利用稀碱或高浓度酸碱进行化学处理[6], 但存在反应时间长、提取效率低和环境污染重的问题。物理法主要通过机械破碎、热处理手段辅助提升海带多糖的提取率, 不作为主要提取手段。蔡婉静等[7]采用超声法-醋酸酐法联合处理海带多糖, 并成功将乙酰化基团引入海带多糖, 能够有效提升海带多糖的溶解能力、抗氧化能力和吸湿/保湿能力。生物酶解法应用系列特异性酶制剂, 如: 褐藻胶裂解酶[8]、纤维素酶、木瓜蛋白酶[9]等, 实现海带的有效降解, 但其成本高、无法应用于大规模生产。相较于上述方法, 微生物发酵降解法通过筛选具有降解海带能力的菌种以实现高效降解。姚艳艳等[10]从鲍鱼肠道中筛选出的弧菌属 YY7 菌株, 这些菌株能够产生褐藻胶裂解酶, 从而实现海带的降解; 杨春妹等[11]的研究表明, 利用微泡菌(*Microbulbifer* sp.) SH-1 对海带进行菌解, 其产率比酶解工艺高 9.3%。此外, 微生物发酵降解法还能够与物理法、酶解法联合使用, 有效提升产物得率, 不同降解方法及特点如表 1 所示。现有研究表明, 海藻多糖与寡糖的生物提取工艺需多种酶和微生物进行细胞壁破坏[12], 工序烦琐、成本投入大, 亟需探索一条方便快捷、绿色环保的海带降解通路。微生物发酵降解法主要利用菌种产生的多种酶类进行分解, 进而提取相应生物活性物质[13], 该方法能够揭示不同微生物及其酶系在海带降解中的作用, 具有绿色高效[14]、增加活性成分[15]、节能环保[16]与可持续发展[17]的特点, 可以提高海带的利用率和原料价值[18], 具有更加广阔的发展空间。

表 1 现有降解方法及特点

Table 1 Existing degradation methods and characteristics

降解方法	特点
物理法	机械破碎、热处理手段辅助提取
化学法	试剂易得, 条件简单, 但反应时间长、提取效率低、环境污染重
生物酶解法	专一高效、条件温和, 但生产成本高
微生物发酵降解法	生物安全性高, 不破坏多糖活性, 但生产周期长, 商业化菌种少

食鹿角菜假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas carrageenovora*)不仅是微生物发酵降解的有效菌株, 还为红藻卡拉胶生产的重要作用酶。目前利用食鹿角菜假交替单胞菌对海带进行降解的研究不足, 关于该菌株的应用值得进一步拓宽研究。同时, 现有研究多聚焦菌株筛选与粗放型降解效率评估, 缺乏对发酵过程中糖类组分动态变化及结构特征的深度解析。因此, 本研究以海带为研究对象, 筛选出一株新型可降解海带的菌株食鹿角菜假交替单胞菌 A1 (*Pseudoalteromonas carrageenovora* A1); 对海带发酵

液进行分级醇沉以获得 3 组不同组分, 分别进行分子量分析, 岩藻糖含量和单糖组成分析; 将海带残渣进行扫描电子显微镜观察, 展示该菌株的降解效果。本研究旨在突破单一组分分析的局限, 通过分级醇沉策略对发酵产物进行系统分离, 同步解析不同分子量区段多糖及寡糖的组成与结构特性, 动态揭示降解过程中多糖的释放与转化规律。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

新鲜海带采自山东荣成。

乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 正丁醇、甲酸、浓硫酸、三氟乙酸、氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、三氯甲烷、氯化钙($CaCl_2$)、半胱氨酸盐酸盐、无水硫酸钠(Na_2SO_4)、褐藻酸钠、蛋白胨、酵母粉、琼脂粉、生理盐水、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 人工海水(上海源叶生物科技有限公司); Takara 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(宝日医生物技术有限公司); 单糖标准品甘露糖(mannose, Man)、氨基葡萄糖(glucosamine, GlcN)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA)、氨基半乳糖(galactosamine, GalN)、葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)、木糖(xylose, Xyl)、阿拉伯糖(arabinose, Ara)、岩藻糖(fucose, Fuc)(美国 Sigma 公司)。

1.2　仪器与设备

DHC9123A 恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); TU-1810PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); HH-ZK4 四孔水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); Centrifuge 5804R 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司); FD-1A-80 冷冻干燥机(北京博医康仪器有限公司); ZORBAX SB-AQ C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Alilent 公司); TSK G3000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)、TSK G2000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)(日本 Tosoh 公司); S-3400N 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　菌株筛选

新鲜海带采后低温保存运输至实验室后, 取 20 g 新鲜海带, 用无菌剪刀剪成小块, 加入到含有 30 mL 灭菌生理盐水(0.9% NaCl)的三角瓶中。在 25 ℃、150 r/min 的条件下振荡 3 h 后从三角瓶中吸取 1 mL 溶液, 加入到 9 mL 无菌生理盐水中进行 10 倍系列稀释。稀释后的溶液涂布在 2216E 固体培养基(蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 1 g/L, 琼脂粉 20 g/L, 过滤海水配制, pH 7.6~7.8)上, 在 25 ℃下培养 7 d, 期间根据菌落形态和颜色挑选不同单菌落, 并在 2216E 固体培养基上进行划线纯化培养, 直至获得单一纯菌落。将所获分离的菌株点接种到褐藻胶裂解酶筛选培养基(褐藻酸钠 20 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 酵母粉 1 g/L, 琼脂粉 20 g/L)上, 在 25 ℃下培养 3 d 后, 加入 10% $CaCl_2$ 溶液, 静置 20~30 min, 观察透明圈的出现, 以此判断菌株是否产生褐藻胶裂解酶。

在筛选出具有褐藻胶裂解酶活性的菌株后, 采用 Takara 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 A1 菌株的 DNA。使用 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')引物, 通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系为 40 μL, 包括 1 μL 27F, 1 μL 1541R, 20 μL 2×Mix, 以及 16 μL ddH_2O。PCR 产物送至北京擎科生物有限公司进行 16S rRNA 基因测序, 并与美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)序列比对。最后, 利用 MEGA 7.0 软件, 以邻接法构建系统发育树, 分析菌株 A1 与假交替单胞菌的系统发育关系。

1.3.2　海带发酵

海带经高压灭菌后接种食鹿角菜假交替单胞菌 A1 以获得发酵液[19], 该菌株于 2021 年 3 月 30 日保藏于中国微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 CGMCC 22090。具体为: 用过滤后海水配制 2216E 培养基, 将 A1 菌株接种到培养基中, 在 25 ℃、150 r/min 条件下培养 2 d 后, 制备获得种子液。之后将 24 g 干海带剪成 2~3 cm 直径的小块, 加入到 2216E 液体培养基中, 灭菌。按照 1:5 接入种子液, 设置 3 个重复, 发酵培养 10 d, 所得发酵液为 DC-1。取 3 份 100 mL 发酵液, 分别离心(9000 r/min, 5 min)后, 将上清液冷冻干燥称重, 得 5.34 g±0.08 g。

1.3.3　分级醇沉

取 3 份 100 mL 的发酵液, 分别离心(9000 r/min, 5 min)后, 上清液用乙醇沉淀, 终浓度分别为 90%、70%、50%, 醇沉结束后, 将发酵液分别离心(4000 r/min, 10 min)以获得沉淀。将沉淀标记为 DCD-2、DCD-3、DCD-4; 将上清液旋蒸浓缩后标记为 DCU-2、DCU-3、DCU-4, 沉淀与上清液均冷冻干燥保存。

1.3.4　分子量分析

采用高效液相-凝胶色谱法测定相对分子量的分布。色谱柱采用 TSK G3000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)、TSK G2000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)。色谱条件: 流动相为 0.05 mol/L Na_2SO_4 水溶液, 流速为 0.5 mL/min, 柱温箱温度为 40 °C, 检测器为示差检测器。标准曲线的绘制以不同分子量的右旋糖酐系列标准品为参照, 标准曲线采用 3 次函数拟合。样品分别用 0.05 mol/L Na_2SO_4 溶液配制成 10 mg/mL 的糖溶液, 过滤后取 20 μL

进行上样分析。

1.3.5 岩藻糖含量测定

采用半胱氨酸盐酸盐法测定 Fuc 含量。首先, 配制 3%半胱氨酸盐酸盐溶液并将 20 mg 待测样品溶于 10 mL 的溶液中。在测量过程中, 取 100 μL 糖溶液并稀释至 1 mL, 随后在冰水浴中加入 4.5 mL 的浓硫酸溶液(6:1, *V*:*V*), 将混合物在沸水浴中加热 10 min 后冷却至室温。加入 0.1 mL 新鲜配制的 3%半胱氨酸盐酸盐溶液, 混匀后静置 90 min。使用分光光度计在 396 nm 和 427 nm 波长下测量吸光度值。

为构建标准曲线, 配制 0.103 mg/mL 的 Fuc 标准溶液, 并分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 并稀释至 1 mL。按照与样品所述相同步骤进行处理, 得到吸光度值, 对所得数据进行处理, 即可得到 Fuc 含量。

1.3.6 单糖组成分析

样品前处理: 采用三氟乙酸水解法将待测样品水解为单糖。精确称取 2 mg 样品, 加入 1 mL 水溶解, 随后加入 1 mL 4 mol/L 三氟乙酸。封口后, 将样品置于 105 °C 下水解 4 h。水解完成后, 冷却至室温, 用 2 mol/L NaOH 溶液中和至中性, 然后将溶液转移至 10 mL 容量瓶中定容。

单糖组成分析采用 PMP 柱前衍生-高效液相色谱法。取 100 μL 水解后的样品或单糖混合标准品, 加入 120 μL PMP溶液和100 μL 0.3 mol/L NaOH溶液, 涡旋振荡以充分混匀。封口后, 将反应混合物置于 70°C 水浴中反应 30 min, 反应结束后, 取出冷却至室温, 加入 100 μL 0.3 mol/L HCl 溶液终止反应。通过加入 0.5 mL 三氯甲烷并离心萃取 3 次, 取上清液进行色谱分析。

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX SB-AQ C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温箱温度 25 °C, 检测器为二极管阵列检测器(diode array detector, PDA)检测器。采用二元梯度洗脱, 流动相为 0.1 mol/L PBS (pH=6.8)与乙腈(83:17, *V*:*V*), 流速 0.8 mL/min, 上样量 20 μL, 采集时间 50 min。

1.3.7 扫描电子显微镜

取发酵过后的海带块用生理盐水清洗表面, 经 4%戊二醛溶液 4 ℃固定 2 h 后, 用逐级浓度的乙醇脱水, 每次 10 min, 最后于 100%乙醇中取出脱水的样品, 纯丙酮置换 15~20 min, CO_2 临界点干燥后, 取材固定, 喷金镀膜, 上机扫描。

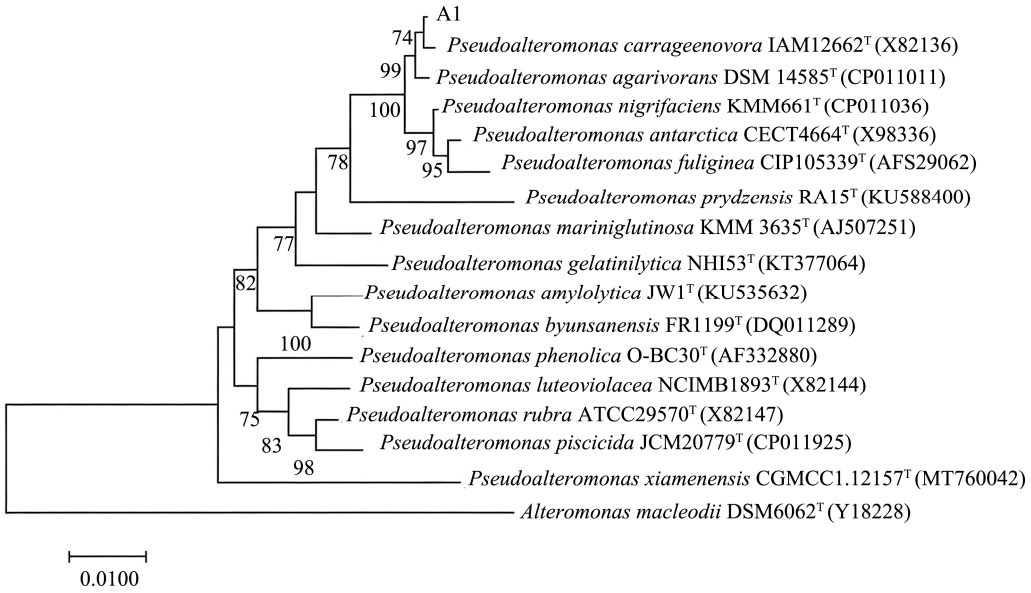
1.4 数据处理

实验结果均以平均值±标准偏差表示。所有实验数据分析使用 SPSS 26.0 软件进行, 显著性水平 *P* 取 0.05。系统发育树使用 MEGA 7.0 软件构建, 实验图片均使用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株 A1 分析

通过 2216E 固体培养基培养筛选到 6 株具有褐藻酸钠裂解酶的菌株, 其中菌株 A1 的酶活最高。将菌株 A1 的 PCR 产物进行 16S rRNA 基因测序与 NCBI 数据库序列比对, 证明该菌株 A1 为假交替单胞菌属, 同该属已发表种 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 相似性最高(99.9%), 因此该菌株为 *Pseudoalteromonas carrageenovora*, 命名为食鹿角菜假交替单胞菌 A1。MEGA 7.0 软件所构建的系统发育树如图 1 所示, 菌株 A1 与 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 聚类在一个分支上, 表明它们之间具有最近的系统发育关系。



注: T 代表模式菌株(type strain)。

图 1 基于 16S rDNA 的菌株 A1 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain A1 based on 16S rDNA gene sequences

2.2　分级醇沉产物质量

乙醇可以通过降低多糖水溶液的介电常数，减少多糖与水的作用，从而使多糖逐级沉淀[20]。因此，向含糖的水溶液加入乙醇，当乙醇达到一定浓度时多糖最先被沉淀出来，逐步提高乙醇浓度，将逐级沉淀出分子量由大到小的多糖。根据该特点向发酵液中逐步加入乙醇，通过离心收集不同乙醇浓度下得到的不同组分，降解液经分级醇沉冻干后的质量如图 2 所示。将不同醇沉条件下所得沉淀与上清液质量之和与发酵液质量进行对比，发现其均值并无较大差别；对数据计算分析可知，相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.35<5，表明不同醇沉条件下所得产物质量与发酵液质量没有显著差异。通过数据分析可以证明分级醇沉方法可行性高，具有较强的重复性。进一步分析可知，随着醇沉浓度的增加，沉淀的质量在逐步增大，同时上清液的质量在逐步变小，表明多糖和寡糖的析出量随乙醇浓度的增加而增加，这与林丽芹等[21]对微拟球藻分级醇沉多糖所得结果一致，杜涓等[22]在分级醇沉发酵麸皮多糖中同样证实这一结果，并阐明单糖在高浓度乙醇中具有一定的溶解性。通过此法能够初步将发酵液中的糖类成分按照分子量大小进行分离，便于后续分析。

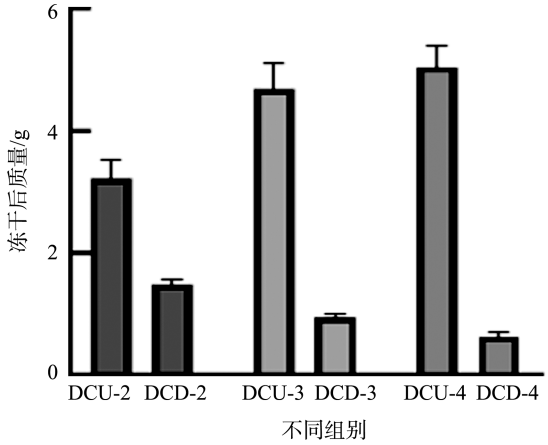


图 2　降解液分级醇沉冻干后的质量

Fig.2　Quality of liquor after grading-alcoholic precipitation lyophilization

2.3　分子量分布分析

采用 TSK G3000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)、TSK G2000 PWxl 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 5 μm)分别对降解液及分离组分进行凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)分子量分析。首先选取分子量为 2700~135350 Da 的系列右旋葡萄糖酐标准品进行测定以绘制标准曲线，进行 3 次方程拟合。TSK G3000 PWxl 色谱柱所得拟合方程为 $Y=0.003361870X^3-0.1647723X^2+2.362994X-5.343511$, $r^2=0.9999$; TSK G2000 PWxl 色谱柱所得拟合方程为 $Y=-0.008590899X^3+0.4169091X^2-7.035701X+45.03317$, $r^2=0.9992$，二者均具有较高的拟合度，证明具有较好的预测效果。

使用 G3000 色谱柱进行分子量分析，经 GPC 计算所得分子量结果如表 2 所示，分析谱图如图 3 所示。结合二者结果进行分析，可知 DC-1 主要有两个有效信号峰，分别为 746.0 kD 和 1.6 kD。降解液 DC-1 中由于小分子杂质的信号(保留时间 20.600 min)太强导致其他信号被掩藏，不利于分析(图 3A)。进一步对 DCU-2 至 DCU-4 进行分析，发现经分级醇沉后，上清液的分子量集中在 1.4~1.7 kD 之间。横向比较 DCU-4 和 DCD-4，发现在 DCD-4 中占比较大的多糖分子量分别为：650.0、40.0 和 2.7 kD，从而印证了分级醇沉法能够按照分子量不同将糖进行初步分离且具有一定效果，该结果与蔡冰洁等[23]的研究结果一致。使用 TSK G2000 PWxl 色谱柱对降解液进行分离分析(图 4)，发现分子量分布情况与 TSK G3000 PWxl 色谱柱结果一致，并未展现出更加详尽的分子量信息。分析其原因，可能是由于降解液中杂质过多，进而影响了实验效果，后续应对降解液进行除杂，以期展现更多糖分子信号，通过多维度对比，明确分级醇沉与微生物降解的协同作用。

表 2　微生物降解液及分级组分的分子量分布情况(TSK G3000 PWxl 色谱柱)

Table 2　Molecular weight distribution of microbial degradation solution and fractional components (TSK G3000 PWxl column)

指标	DC-1	DCU-2	DCU-3	DCU-4	DCD-2	DCD-3	DCD-4
分子量/kD	746.0, 1.6	536.0, 1.7	1.5	1.4	483.0, 1.6	488.0, 2.6, 1.2	650.0, 40.0, 2.7

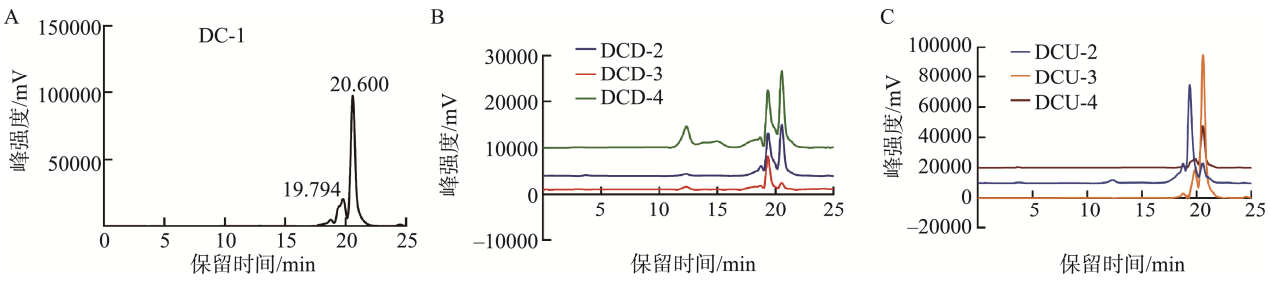


图 3　微生物降解液及分级组分的分子量分布谱图(TSK G3000 PWxl 色谱柱)

Fig.3　Molecular weight distribution spectra of microbial degradation solution and fractional components (TSK G3000 PWxl column)

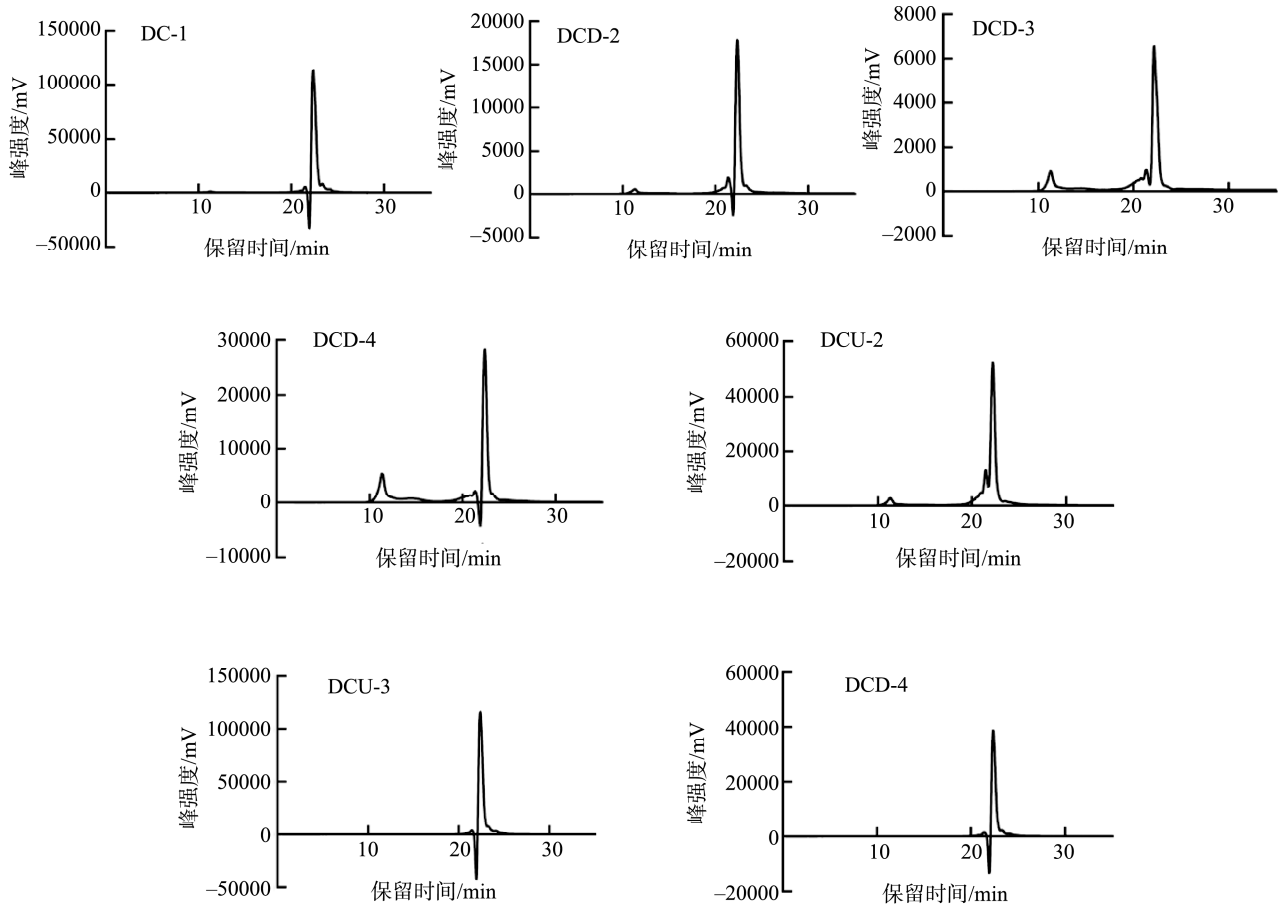


图 4 微生物降解液及分级组分的分子量分布谱图(TSK G2000 PWxl 色谱柱)

Fig.4 Molecular weight distribution spectra of microbial degradation solution and fractional components (TSK G2000 PWxl column)

2.4 岩藻糖含量测定结果

研究测定得到Fuc标准曲线方程为 Y=14.466X+0.0317, r^2=0.9963, 拟合结果表明其具有较高的标准性与可信度, 可以依据其进行糖含量分析。分别从冻干的发酵液和醇沉样品中称取 20 mg, 配制成 2 mg/mL 的糖溶液进行 Fuc 含量测定, 测定结果如表 3 所示。结果表明, DCU 系列样品中 Fuc 含量低于 DCD 系列样品, 证明沉淀中含有一定量的 Fuc, 因其主要存在于沉淀而非降解液, 故推测其随多糖分子共同沉出, 后续的单糖组成成分分析也与该测定结果相互印证。DC-1 中 Fuc 含量较低, 该结果与分级组分的结果不一致, 说明培养基中的小分子杂质对半胱氨酸盐酸盐法测定结果产生严重干扰, 进一步证明不利用分级醇沉的方法无法实现精准测定。

2.5 单糖组成分析结果

降解液及分级组分分别水解后采用 PMP 柱前衍生法对中性单糖的组成进行分析, 单糖标准品由 11 种单糖组成。此外, 为了分析其中是否含有褐藻胶成分, 采用褐藻酸钠进行降解作为古洛糖醛酸(G)和甘露糖醛酸(M)的标准品。

微生物降解液及分级组分的单糖组成分析结果列于表 4 中, 单糖组成分析谱图如图 5 所示。将二者相结进行分析可以发现, 各组分的单糖组成与比例具有相似性, 但也存在一定差异。各组分中均含有 Man、GlcN、Glc 和 Gal, 其中 Glc 均占比大, 说明海带细胞壁造成了显著的破坏。同时, 海带细胞壁刚性结构中含有一定量的聚甘露糖, 也被一定程度降解下来, 因此在沉淀的单糖组成中含有较高的 Man[24]; 相较于其他组分, DCU-3 中还含有少量的 GalN 和 Ara。海带中的褐藻多糖硫酸酯主要由 Fuc 组成, 还存在相当量的 Gal 和其他单糖[25], 研究表明其很难被微生物降解利用[26]。此外, 培养基中存在蛋白胨和酵母粉, 其中也含有一定量的糖类物质, 导致 Glc 和 Man 的含量提高。沉淀的单糖组成中, Fuc 含量明显提升, 还伴有 Gal 含量的升高, 结合分子量分析结果, 表明微生物可以

表 3 微生物降解液及分级组分的化学组成分析

Table 3 Chemical composition analysis of microbial degradation solution and fractional components

指标	DC-1	DCU-2	DCU-3	DCU-4	DCD-2	DCD-3	DCD-4
岩藻糖质量比/%	0.560±0.091	0.290±0.018	0.369±0.026	0.406±0.014	2.097±0.198	4.079±0.158	3.980±0.236

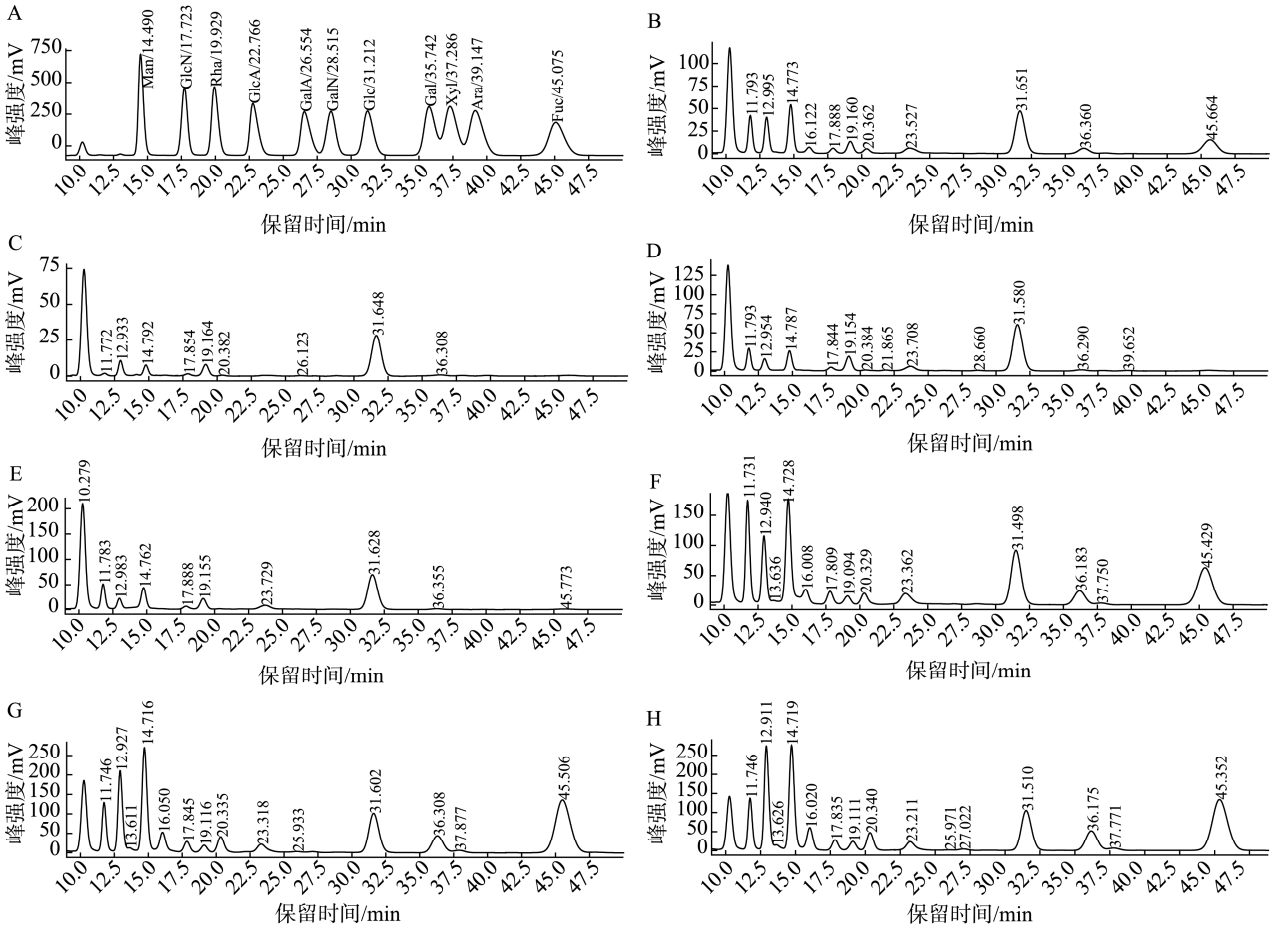
一定程度上将海带中的褐藻多糖硫酸酯提取出来。此外, 单糖组成显示, 降解液与沉淀中均含有一定量的 G 和 M, 且沉淀中的含量远高于上清液, 提示发酵液中产生了一定量的褐藻胶与少量的褐藻胶寡糖。研究发现, 海带褐藻多糖硫酸酯具有抗肿瘤[27]、降血脂[28]、高自由基清除活性[29]等作用, 褐藻胶寡糖具有抗炎症[30]、抗氧化[31]和抗微生物[32]等功能及作用。食鹿角菜假交替单胞菌 A1 能够在一定程度上使海带中的褐藻多糖硫酸酯和褐藻胶寡糖释放出来, 为微生物发酵降解海带进一步提取和利用活性物质提供了思路与可能。

表 4　微生物降解液及分级组分单糖组成分析

Table 4　Analysis of monosaccharide composition of microbial degradation solution and fractional component

样本	单糖组成(摩尔比)											G/M
	Man	GlcN	Rha	GlcA	GalA	GalN	Glc	Gal	Xyl	Ara	Fuc	
DC-1	0.49	0.06	0.07	0.12	-	-	1.00	0.11	-	-	0.45	4/1
DCU-2	0.11	0.02	0.01	-	0.01	-	1.00	0.01	-	-	-	1/1
DCU-3	0.18	0.04	0.01	0.01	-	0.01	1.00	0.02	-	0.01	-	7/1
DCU-4	0.31	0.05	-	-	-	-	1.00	0.02	-	-	0.02	10/1
DCD-2	0.96	0.14	0.14	0.21	-	-	1.00	0.25	0.03	-	0.96	6/1
DCD-3	0.64	0.08	0.14	-	-	-	0.53	0.22	0.03	-	1.00	2/1
DCD-4	0.66	0.08	0.15	0.10	0.02	-	0.55	0.26	0.02	-	1.00	2/1

注: -表示未检测到。



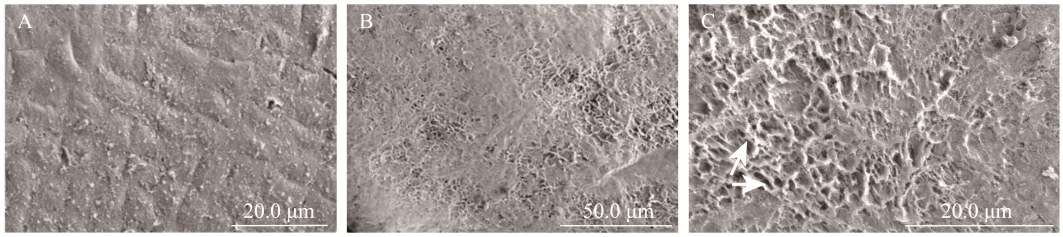
注: A. 标准品; B. DC-1; C. DCU-2; D. DCU-3; E. DCU-4; F. DCD-2; G. DCD-3; H. DCD-4。

图 5　单糖组成分析谱图

Fig.5　Analysis spectrum of monosaccharide composition

2.6 微生物降解对海带形貌的影响

取微生物降解后的海带残渣及经高压灭菌后的海带分别固定脱水后, 扫描电子显微镜观察其形貌变化。如图 6 所示, 未经处理的海带表面(图 6A)和经微生物降解后的海带表面(图 6B)相比, 二者形态出现明显差异。进一步观察海带表面(图 6C), 可以发现经食鹿角菜假交替单胞菌 A1 处理后的海带, 细胞壁有明显破坏痕迹, 具有较为明显得间隙, 结构更加破碎疏松且藻胶质层产生均匀的孔隙。电子显微镜扫描图证明了食鹿角菜假交替单胞菌 A1 能够破坏海带细胞壁, 在一定程度上可以释放和利用海带细胞内的多糖成分, 具有实际效果。



注: C 图箭头表示降解后海带表面产生的孔隙。

图 6 未经处理的海带表面(A)及微生物降解后的海带表面(B、C)电子显微镜照片

Fig.6 Electron microscopic images of untreated *Saccharina japonica* surface (A) and microbiodegradable *Saccharina japonica* surface (B, C)

3 讨论与结论

利用微生物降解海带是一种广泛应用的绿色、高效、环保的方法, 其主要依赖于微生物产生的褐藻胶裂解酶。这种酶能够催化褐藻胶中的 1,4 糖苷键断裂, 通过 β-消除反应产生褐藻寡糖。这些微生物菌株通常来源于海洋环境或海洋动物消化道, 显示出海洋微生物在褐藻胶降解中的潜力和重要性; 同时, 它们在降解过程中不仅能够减少环境污染, 还能产生具有高附加值的褐藻寡糖, 在功能性食品开发应用、活性物质挖掘中具有广阔前景。因此, 微生物降解海带法正成为开发海藻源食品多糖与寡糖、探索海藻源功能性食品与食品添加剂的重要发展方向。

利用微生物产褐藻胶裂解酶以降解褐藻, 获得相应功能性糖类物质在近些年得到广泛应用。翟婧等[33]从腐烂的海带中筛选得到褐藻胶裂解酶高产假单胞菌属菌株 YSH5, 褐藻胶裂解酶降解海藻酸钠得到的主要产物为聚合度 3~5 的褐藻寡糖。程志钱等[34]利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达食琼脂火色杆菌(*Flammeovirga agarivorans*)褐藻胶裂解酶, 但产物仅包含聚合度 2~4 的褐藻寡糖, 较为单一; 且仅通过高效液相色谱进行产物分析, 降解评价体系不甚全面。王小涵[35]从马尾藻样品中筛选出来自弧菌菌株(*Vibro* sp.) C42, 具有双功能性的 AlyC7 褐藻胶裂解酶, 其主要产物仅为褐藻三糖。可以发现, 无论是假单胞菌属菌株 YSH5、食琼脂火色杆菌还是仿刺参肠道中分离的弧菌, 它们都能产生褐藻胶裂解酶, 释放褐藻寡糖。值得注意的是, 以上研究均存在褐藻寡糖聚合度单一化的问题, 这导致产品多样性较低, 相关生物活性不强, 限制了微生物产褐藻胶裂解酶法在食品领域及相关多领域应用的可能性。相比之下, 食鹿角菜假交替单胞菌 A1 的发酵产物谱系更广, 说明食鹿角菜假交替单胞菌 A1 通过多酶协同, 实现了对海带细胞壁中不同结构多糖的协同降解与溶出, 丰富了主要活性多糖的种类。这为开发基于单一菌株发酵、同步获取多种海带活性多糖组分的绿色工艺提供了新的菌种资源与理论依据, 突破了传统方法产物单一的瓶颈。本研究主要聚焦于对降解产物的组成与特性进行系统性解析, 未对海带生物质的绝对降解率进行精确量化, 未来将结合底物消耗动力学模型, 设立阴性对照组以排除海带在培养基中自然降解的影响, 进一步对食鹿角菜假交替单胞菌 A1 的降解效率进行更精确的评估。

同时, 针对于降解海带的微生物法亦有探索与研究。夏海峰[36]发现褐藻胶降解菌 S12, 其具有快速溶藻能力, 可以有效降解海带, 但菌株 S12 具有两次生长特征, 历经两次生长后多糖物质含量较少, 还原糖浓度较低。微生物如暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) D3 能够实现海带降解并释放其中活性成分[37], 如海藻多糖、Fuc、海藻酸等。本研究证实食鹿角菜假交替单胞菌 A1 对海带具有明确的降解效果。该效果不仅体现于形态结构的破坏, 更关键地体现在活性组分的释放与转化上。通过分级醇沉结合系统分析证实, 其发酵产物是一个包含不同分子量区段的糖类混合物: 既能获得低分子量褐藻胶寡糖, 也可富集高分子量组分。单糖组成及岩藻糖含量分析进一步揭示, 这些产物中包含源自海带细胞壁的褐藻多糖硫酸酯(特征单糖 Fuc 在沉淀中含量最高达 4.08%)和褐藻胶(检出 G/M 结构单元)。需要指出的是, 本研究的单糖组成分析受到培养基中酵母粉、蛋白胨所含糖类的背景干扰, 导致 Glc 和 Man 的含量偏高。这虽不影响对特征性单糖(如岩藻糖)及 G/M 比值的趋势判断, 但可能影响对绝对含量的计算精度。未来将采用无糖或限定碳源的基础培养基进行发酵, 以更加真实反映源自海带的单糖组成。

综上, 使用食鹿角菜假交替单胞菌 A1 能够有效降解海带, 并同步将海带中的结构性多糖转化为一系列从大分子多糖到小分子寡糖的活性物质。纵观微生物发酵降解海

带过程绿色安全, 发酵产物富含多糖、寡糖等系列成分赋予海带更高营养保健功能, 本研究为绿色安全有效菌株筛选、海藻源功能性食品开发与利用、拓宽天然活性物质应用奠定坚实基础, 为未来绿色高效食品工业生产的关键一环提供了参考与借鉴。

参考文献

[1] 杨嘉欣, 李瑶, 黄显健, 等. 海带多糖羧甲基化修饰工艺优化及其生物活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(18): 115–122.
YANG JX, LI Y, HUANG XJ, *et al*. Optimization of carboxymethylation modification process and study on bio logical activity of *Laminaria japonica* polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(18): 115–122.

[2] 杜佳垠. 海带常见种类分布与增养殖前景[J]. 渔业经济研究, 2006(1): 19–24.
DU JY. Distribution of common kelp species and prospects for enhancement and aquaculture [J]. Fisheries Economy Research, 2006(1): 19–24.

[3] NIMBS MJ, WERNBERG T, DAVIS TR, *et al*. Climate change threatens unique evolutionary diversity in australian kelp refugia [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 1248.

[4] 程晓芳, 袁丹丹, 张余慧, 等. 海带多糖的生理活性及其在食品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 361–367.
CHENG XF, YUAN DD, ZHANG YH, *et al.* Research progress of physiological activity of *Laminaria japonica* polysaccharides and its application in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(8): 361–367.

[5] 许波杰, 闫培生. 褐藻多糖的提取及生物活性研究进展[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 369–378.
XU BJ, YAN PS. Research progress on extraction and biological activity of polysaccharides from brown algae [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 369–378.

[6] 苗钧魁, 张雅婷, 张圣国, 等. 不同工艺海带提取物中植物激素和海藻酸寡糖的比较研究[J]. 南方水产科学, 2022, 18(2): 142–149.
MIAO JK, ZHANG YT, ZHANG SG, *et al*. Comparative research of plant hormones and alginate oligosaccharides in seaweed extracts by different processing methods [J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(2): 142–149.

[7] 蔡婉静, 刘少伟, 李苒, 等. 乙酰化降解海带多糖的抗氧化、吸湿/保湿性能探究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 109–114, 121.
CAI WJ, LIU SW, LI R, *et al*. Antioxidant and absorption/retention activities of the acetylated degraded *Laminaria japonica* polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(10): 109–114, 121.

[8] 于娜, 张丽敏, 徐彤. 海带多糖的提取方法及生物活性研究[J]. 食品安全导刊, 2023(28):138–140.
YU N, ZHANG LM, XU T. Study on extraction method and biological activity of polysaccharide from *Laminaria japonica* [J]. Journal of Food Safety Guide, 2023(28):138–140.

[9] 谢瑾, 林宗毅, 王智荣, 等. 海带多糖酶法降解及其产物生物活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20): 23–27.
XIE J, LIN ZY, WANG ZR, *et al.* Enzymatic hydrolysis of polysaccharides from *Laminaria japonica* and studies on its product activity [J]. Food Research and Development, 2016, 37(20): 23–27.

[10] 姚艳艳, 刘心田, 常丽荣, 等. 鲍鱼肠道海带降解菌株的筛选、鉴定及粗酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 61–66.
YAO YY, LIU XT, CHANG LR, *et al*. Isolation, identification, and enzymatic properties of kelp degradation strain in abalone intestine [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(9): 61–66.

[11] 杨春妹, 杨锦, 崔丹丹, 等. 海带酶解和菌解工艺优化及其降解产物对菜心抗逆性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(8): 1432–1444.
YANG CM, YANG J, CUI DD, *et al*. Optimization of parameters for enzymatic and bacterial hydrolysis of seaweeds and the effects of two products on the stress resistance of Chinese flowering cabbage [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2021, 27(8): 1432–1444.

[12] 刘文杰, 刘兆志, 杨照悦, 等. 海藻肥的制备及功效研究进展[J]. 智慧农业导刊, 2024, 4(9): 66–69.
LIU WJ, LIU ZZ, YANG ZY, *et al*. Research progress on preparation and efficacy of seaweed fertilizer [J]. Journal of Smart Agriculture, 2024, 4(9): 66–69.

[13] TAN IS, LEE KT. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study [J]. Energy, 2014, 78: 53–62.

[14] WAKABAYASHI M, SAKATOKU A, NODA F, *et al*. Isolation and characterization of *Microbulbifer* species 6532A degrading seaweed thalli to single cell detritus particles [J]. Biodegradation, 2012, 23(1): 93–105.

[15] SUN CX, ZHOU J, DUAN GL, *et al*. Hydrolyzing *Laminaria japonica* with a combination of microbial alginate lyase and cellulose [J]. Bioresource Technology, 2020, 311: 123548.

[16] KIM EJ, FATHONI A, JEONG GT, *et al*. *Microbacterium oxydans*, a novel alginate and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste [J]. Journal of Environmental Management, 2013, 130: 153–159.

[17] 王明鹏. 基于褐藻酸降解的铜藻发酵提取技术及其产物农用功效研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
WANG MP. Research on fermentation technology of *Sargassum horneri* based on alginate-degrading and agricultural effects of fermentation produc [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017.

[18] 聂小伟, 何粉霞, 毕可海, 等. 生物技术降解海带岩藻聚糖硫酸酯分子研究现状[J]. 农产品加工, 2023(14): 67–70, 74.
NIE XW, HE FX, BI KH, *et al*. Research study on biodegradation of seaweed fucoglycan sulfate [J]. Farm Products Processing, 2023(14): 67–70, 74.

[19] 张德超, 耿丽华, 张全斌, 等. 一种可分解海带的菌株: 中国, CN202111155330.4[P]. 2023-05-30.
ZHANG DC, GENG LH, ZHANG QB, *et al*. A strain capable of decomposing kelp: China, CN202111155330.4 [P]. 2023-05-30.

[20] 李灿, 吕金博, 刘会平, 等. 分级醇沉裙带菜褐藻糖胶及其体外降血糖活性研究[J]. 食品工业科技. 2024, 45(8): 309−317..
LI C, LV JB, LIU HP, *et al*. Study on gradient alcohol precipitation of fucoidan from *Undaria pinnatifida* and its hypoglycemic activity *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 309−317.

[21] 林丽芹, 王宝贝, 肖金艳, 等. 微拟球藻分级醇沉多糖的理化特性与抗

氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(4): 255–263.
LIN LQ, WANG BB, XIAO JY, *et al*. Physicochemical characterization and antioxidant activities of polysac-charides from *Nannochloropsis* by gradient ethanol precipitation [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(4): 255–263.

[22] 杜涓, 安晓萍, 刘娜, 等. 分级醇沉发酵麸皮多糖的成分分析与抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 58–62.
DU J, AN XP, LIU N, *et al*. Studies on composition analysis and antioxidant activities of bran polysaccharides by fractional alcohol submerged fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(5): 58–62.

[23] 蔡冰洁, 汪苗苗, 刘咏. 枳椇多糖的分级醇沉及其免疫调节活性的研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2018, 41(6): 852–858.
CAI BJ, WANG MM, LIU Y. Graded alcohol precipitation and immunoregulatory activity of polysaccharide from *Hovenia dulcis* peduncles [J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science), 2018, 41(6): 852–858.

[24] LIU P, HU J, WANG Q, *et al*. Physicochemical characterization and cosmetic application of kelp blanching water polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 248: 125981.

[25] WANG J, ZHANG Q, ZHANG Z, *et al*. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 46(1): 6–12.

[26] ZHANG Y, ZHANG Y, ZHAO X, *et al*. Metagenomic insights into the dynamic degradation of brown algal polysaccharides by kelp-associated microbiota [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(2): e02025–23.

[27] ZHAO D, XU J, XU X. Bioactivity of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* using a novel procedure with high yield [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 911–918.

[28] SANJEEWA KKA, JEON YJ. Fucoidans as scientifically and commercially important algal polysaccharides [J]. Marine Drugs, 2021, 19(6): 284.

[29] KISELEVSKIY MV, ANISIMOVA NY, USTYUZHANINA NE, *et al*. Perspectives for the use of fucoidans in clinical oncology [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11821.

[30] ŞEN M. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation [J]. Applied Radiation and Isotopes, 2011, 69(1): 126–129.

[31] AN QD, ZHANG GL, WU HT, *et al*. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 161–170.

[32] YANG MX, LU ZJ, LI FL, *et al*. Alginate oligosaccharide improves fat metabolism and antioxidant capacity in the liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Aquaculture, 2021, 540: 736664.

[33] 翟婧, 杜永铎, 胡睿洁, 等. 褐藻胶裂解酶高产菌株 YSH5 的筛选及酶学性质研究[J]. 化学与生物工程, 2024, 41(9): 38–43.
ZHAI J, DU YD, HU RJ, *et al*. Screening and enzymatic properties of high-yield alginate lyase-producing strain YSH5 [J]. Chemistry & Bioengineering, 2024, 41(9): 38–43.

[34] 程志钱, 程晓峰, 涂红艳, 等. 毕赤酵母表达食琼脂火色杆菌褐藻胶裂解酶[J]. 食品科技, 2024, 49(6): 19–25.
CHENG ZQ, CHENG XF, TU HY, *et al*. Expression of *Flammeovirga agarivorans* alginate lyase in *Pichia pastori* [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(6): 19–25.

[35] 王小涵. 弧菌褐藻胶裂解酶的表征及应用潜力分析[D]. 济南: 山东大学, 2023.
WANG XH. Characterization and application potential analysis of the alginate lyase from *Vibrio* [D]. Ji'nan: Shandong University, 2023.

[36] 夏海峰. 褐藻胶降解菌 *Tamlana* sp.S12 藻类多糖利用酶类及其对海带降解特征的分析[D]. 济南: 山东大学, 2023.
XIA HF. Analysis of algal polysaccharide utilizationenzymes and the characteristics of *Laminaria japonica* degradation by *Tamlana* sp. S12, an alginate degrading bacterium [D]. Ji'nan: Shandong University, 2023.

[37] 张晶晶, 解学仕, 周丽, 等. 高效降解海带芽孢杆菌菌株的筛选及活性成分检测[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(20): 14–21.
ZHANG JJ, XIE XS, ZHOU L, *et al*. Screening of *Bacillus* strains degrading *Laminaria japonica* with high efficiency and detection of active components [J]. Food Research and Development, 2019, 40(20): 14–21.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)