黄立群, 张联平, 范舒怡, 等. 四株产琼胶酶弧菌的筛选鉴定、全基因组分析及其产酶酶学性质研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(11): 213−225. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060176

HUANG Liqun, ZHANG Lianping, FAN Shuyi, et al. Screening, Identification, Whole Genome Analysis of Four Agarase-producing *Vibrio* Strains and Their Enzymatic Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(11): 213−225. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060176

· 生物工程 ·

四株产琼胶酶弧菌的筛选鉴定、全基因组分析及其产酶酶学性质研究

黄立群[1,2,3], 张联平[1,2,3], 范舒怡[1,2,3], 姚丽玲[1,2,3], 燕辰涛[1,2,3], 郑旭蕾[1,2,3], 刘　斌[1,2,3,4,*], 黄　莹[1,2,3,4,*]

（1.福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002;
2.闽台特色海洋食品加工及营养健康教育部工程研究中心, 福建福州 350002;
3.福建省农副产品保鲜技术开发基地, 福建福州 350002;
4.福州海洋研究院, 福建福州 350108）

摘　要: 为了丰富产高活性琼胶酶的菌株资源并挖掘与琼胶酶相关的基因资源，本文以鲍鱼内脏为菌株分离源，通过单一碳源培养基结合卢戈氏碘液法进行初筛，3,5-二硝基水杨酸（DNS）法测定酶活进行复筛，利用 16S rDNA 测序鉴定产酶菌株，并比较产酶菌株的基因组序列信息和酶学性质。筛选得到四株产高活性琼胶酶的地中海弧菌（2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51），它们所产琼胶酶粗酶液活性分别为 315.17、340.99、293.88 和 324.37 U/mL。根据全基因组测序结果，2DB15、2DBB20、2DBB51 编码较丰富的琼胶酶及其相关酶基因，包括 GH16 和 GH50 家族的 *β*-琼胶酶、*β*-半乳糖苷酶和 *α*-新琼脂二糖水解酶等。四株菌（2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51）所产琼胶酶分别在温度为 45、40、45、45 ℃ 以及 pH 分别为 8.0、7.0、8.0 和 7.0 条件下，相对酶活最高，且均在 40 ℃ 以下和 pH5.0~9.0 条件下有较好的稳定性。研究结果丰富了弧菌产琼胶酶的理论基础，可为琼胶寡糖的绿色生产提供优质酶资源。

关键词: 琼胶酶, 地中海弧菌, 全基因组测序, 酶学性质

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)11−0213−13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060176　　本文网刊:

Screening, Identification, Whole Genome Analysis of Four Agarase-producing *Vibrio* Strains and Their Enzymatic Properties

HUANG Liqun[1,2,3], ZHANG Lianping[1,2,3], FAN Shuyi[1,2,3], YAO Liling[1,2,3], YAN Chentao[1,2,3], ZHENG Xulei[1,2,3], LIU Bin[1,2,3,4,*], HUANG Ying[1,2,3,4,*]

（1.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2.Engineering Research Centre of Fujian-Taiwan Special Marine Food Processing and Nutrition, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China;
3.Fujian Agricultural Products Preservation Technology Development Base, Fuzhou 350002, China;
4.Fuzhou Institute of Oceanography, Fuzhou 350108, China）

Abstract: In order to expand the reservoir of highly active agarase-producing strains and to mine agarase-related gene pools, this study isolated strains from abalone viscera. Primary screening was conducted using a single carbon source medium combined with Lugo's iodine staining, followed by rescreening via the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method to deter-

收稿日期: 2025−06−16

基金项目: 国家自然科学基金（31701710）; 福建省科技计划项目（2023J01466, 2017J05047）; 福州海洋研究院“揭榜挂帅”科技项目（2025F10）; 福建农林大学科技创新专项基金（KFB22083XA）。

作者简介: 黄立群（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 15880408201@163.com。

*** 通信作者:** 刘斌（1969−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: liubin618@hotmail.com。
黄莹（1984−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: yinghuangyh@126.com。

mine enzyme activity. Agarase-producing strains were identified by 16S rDNA sequencing, and their genomic sequences and enzymatic properties were compared. Four strains of *Vibrio mediterranei* (2DB7, 2DB15, 2DBB20 and 2DBB51) producing highly active agarases were screened. The activities of the crude enzyme solutions from these strains were 315.17, 340.99, 293.88, and 324.37 U/mL, respectively. Whole genome sequencing revealed that 2DB15, 2DBB20, and 2DBB51 encode relatively abundant agarase genes and related enzyme genes, including *β*-agarases (GH16 and GH50 families), *β*-galactosidase, and *α*-neoagarobiose hydrolase. The agarases produced by these four strains (2DB7, 2DB15, 2DBB20 and 2DBB51) reached their peak relative activity at 45, 40, 45, and 45 ℃, and at pH 8.0, 7.0, 8.0, and 7.0, respectively. Furthermore, all enzymes maintained good stability below 40 ℃ and within a pH range of 5.0 to 9.0. The research results could enrich the theoretical foundation for agarase production by *Vibrio* sp. and provide high-quality enzyme resources for the eco-friendly production of agar oligosaccharides.

Key words: agarase; *Vibrio mediterranei*; whole genome sequencing; enzymatic properties

近年来，全球藻类资源的开发与利用已成为蓝色经济的重要增长点。根据联合国粮农组织（FAO）统计，2020 年全球大型藻类养殖产量超 3500 万吨（湿重），其中红藻类占比超过 40%[1]。我国作为藻类养殖大国，藻类养殖产量占全球的一半以上。我国目前江蓠和石花菜等经济红藻类的年产量已突破 75 万吨，高值化加工利用率亟待提高[2]。

琼胶，也称为琼脂，主要由琼脂糖和琼脂胶两部分组成。作为一种从江蓠属和石花菜属等红藻的细胞壁中提取的水溶性胶体，琼胶凭借其独特的凝胶特性、优异的流变性能、良好的相容性及较低的成本，被广泛应用于食品加工、微生物培养基制备及药物载体开发等[3]。然而，其高分子量导致的高粘度、低溶解度和低生物利用度限制了其在功能食品和药物递送系统中的高附加值应用[4]。

与琼胶相比，琼胶的酶解产物琼胶寡糖分子量更小，溶解度更高，易于人体吸收[5]。且琼胶寡糖具有多种生物活性，如调节肠道菌群、增强免疫力、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等[6−11]。因此，将廉价且丰富的生物质藻类用于生产具有更高生理活性和市场价格的藻类寡糖，是藻类资源高值化利用的重要方向[12]。目前工业级琼胶寡糖的生产主要依赖化学酸解法，虽然成本低廉，但存在产物异质性、副产物毒性及环境污染等缺点[13]。相比之下，基于琼胶酶的酶解法具有产物可控、反应条件温和、碳排放量低等优势，符合绿色制造需求[14]。

琼胶酶主要分为 *α*-琼胶酶和 *β*-琼胶酶，前者水解琼脂糖的 *α*-1,3 糖苷键，产生偶数的琼寡糖（agarooligo saccharides, AOS）；后者水解琼脂糖的 *β*-1,4 糖苷键，产生偶数的新琼寡糖（neoagarooligo saccharides, NAOS）。相比于 *β*-琼胶酶，*α*-琼胶酶的研究起步较晚，相关研究较少[15]。碳水化合物活性酶（CAZymes）是参与碳水化合物组装、修饰或解构的酶[16]。根据氨基酸序列的相似性，CAZymes 可分为糖苷水解酶（GH）、糖基转移酶（GT）、多糖裂解酶（PL）、碳水化合物酯酶（CE）、辅助氧化还原酶（AA）和碳水化合物结合模块（CBM）等[17]，琼胶酶属于糖苷水解酶（GH）家族。

琼胶酶通常存在于依赖琼胶作为主要碳源的微生物体系中，这类微生物通常分布于富含琼胶的藻类表面或以海藻为食的海洋软体动物的消化系统内。目前研究的绝大多数琼胶酶都来自于海洋微生物，主要包括弧菌属（*Vibrio* sp.）[18]、假交替单胞菌属（*Pseudoalteromonas* sp.）[19]、噬琼胶菌属（*Agarivorans* sp.）[20]、交替单胞菌属（*Alteromonas* sp.）[21]、芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.）[22] 等。利用全基因组测序技术，可以较全面解析产酶菌株的遗传背景，也有助于发现新酶基因[23]。

总体来看，现有琼胶酶资源尚不丰富，其产业化应用仍面临瓶颈，如酶活普遍偏低、催化稳定性差、产酶菌株遗传背景不明确、现有商业化酶制剂种类稀少等[24−25]。因此，为了丰富产高活性琼胶酶的菌株资源并挖掘与琼胶酶相关的基因资源，本研究从鲍鱼消化系统中筛选鉴定具有高琼胶酶活性的菌株，结合全基因组测序分析产酶菌株的与琼胶酶相关的遗传信息，并考察比较它们所产琼胶酶的酶学性质。研究结果可为新型的、具有良好应用潜力的琼胶酶的开发挖掘提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

5 批次不同市场商户购买的鲍鱼　福州海鲜市场；筛选培养基、种子培养基、发酵培养基：2216E 液体培养基　青岛海博生物技术有限公司；乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA）、4-（2-氨乙基）苯磺酰氟盐酸盐（4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, AEBSF）、碘乙酰胺（iodoacetamide, IAM）　生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA marker、Taq 酶　宝生物工程（大连）有限公司；琼脂粉　北京索莱宝科技有限公司；氯化钾、氯化钙、氯化锰、氯化钴、硫酸镁、氯化锌、五水硫酸铜、氯化亚铁、六水三氯化铁、氯化钠　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；细菌 DNA 提取试剂盒（磁珠法）　上海美吉逾华生物医药科技有限公司。

CY04-IS-RDV1 型立式恒温振荡器　美国精骐有限公司；KUBOTA 6000 型高速冷冻离心机　日本

久保田公司；LRH-150 型生化培养箱　上海一恒科学仪器有限公司；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪　美谷分子仪器（上海）有限公司；A24812 型 PCR 扩增仪　美国生命技术公司；DYCP-31E 型 DNA 凝胶电泳仪　北京六一生物科技有限公司；JXFSTPRP-32L 型全自动样品快速研磨仪　上海净信实业发展有限公司；Covaris M220 型基因组 DNA 片段化仪　基因有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　产琼胶酶菌株的筛选和鉴定

1.2.1.1　产琼胶酶菌株的平板分离与初筛　将鲍鱼内脏样品剪碎后，每 3 只鲍鱼的内脏样品混合作为一个样品，按固液比 1∶9 加入生理盐水，均质 30 min，涂布于筛选培养基（以琼脂为唯一碳源），置于 30 ℃ 培养 48 h。选取菌落周围产生明显凹陷圈的菌株，三区划线纯化后进一步采用卢戈氏碘液染色法进行筛查，染色后筛选透明圈直径大的菌株作为候选菌。

1.2.1.2　产琼胶酶菌株的酶活力测定复筛　将候选菌株接入含有 0.2% 琼脂（w/v）的种子培养基中，于 30 ℃、150 r/min 摇床培养 24 h 后，转接到含有 0.2% 琼脂（w/v）发酵培养基中，于 30 ℃、150 r/min 摇床培养 36 h，取菌液于 8000 r/min 离心 10 min 后，取上清液作为粗酶液，以 DNS 法测定琼胶酶活力，取酶活力最高的菌株进行后续实验。

1.2.1.3　琼胶酶活力测定　采用 DNS 法（3,5-二硝基水杨酸法）测定琼胶酶活力[26]：取 1 mL 酶液和 1 mL 底物溶液（用 0.02 mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液配制的 0.5%（w/v）琼脂溶液）混合于试管内，在 40 ℃ 反应 30 min，加入 1.5 mL DNS 试剂，混合液在沸水中水浴 5 min 后用去离子水定容至 25 mL，充分混匀后在 540 nm 处测定吸光度值，以灭活的酶液作为空白对照。绘制以 D-半乳糖含量和 $OD_{540\ nm}$ 值分别为横纵坐标的 D-半乳糖标准曲线，获得线性回归方程 $Y=0.3081X-0.008$（$R^2=0.9984$），根据标准曲线计算酶活力。酶活力单位（U）的定义：以 1 mL 酶液 1 min 产 1 μg 还原糖定义为 1 个活力单位。

1.2.1.4　产琼胶酶菌株的形态学观察　将菌株在 2216E 固体培养基上划线，于 28 ℃ 培养 24 h 后，观察菌落形态特征。利用革兰氏染色法观察细菌细胞形态和染色结果。

1.2.1.5　产琼胶酶菌株的 16S rDNA 鉴定　采用破碎煮沸法提取 DNA，利用通用引物扩增 16S rDNA（上游 F：5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’；下游 R：5’-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3’）[27]，PCR 扩增体系（50 μL）包含 10×PCR Buffer 5 μL，dNTP Mixture 4 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，Taq 酶（5 units/μL）0.25 μL，DNA 模板 2 μL 和无菌水 36.75 μL。扩增程序步骤包括 94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 90 s，共 30 个循环；72 ℃ 终延伸 10 min。PCR 产物委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。使用 DNAMAN 9.0 软件拼接测序结果，利用 BLAST 工具与 GenBank 数据库进行序列比对，获取同源性高的菌株的 16S rRNA 基因序列。采用 MEGA 11 软件基于邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树，比对建树时选择三类序列，即可能同种、同属不同种以及外群近缘属。

1.2.2　产酶菌株全基因组测序及分析

1.2.2.1　全基因组测序　使用试剂盒提取菌株基因组 DNA。利用基因组 DNA 片段化仪将 DNA 样本断裂成约 400 bp 的片段。文库成功制备后，采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行双端测序（2×150 bp）。

1.2.2.2　基因组组装和功能注释　对 Illumina 平台测序所得序列经过剪切得到高质量 reads（clean data）。利用组装软件 SOAPdenovo2[28] 对 clean data 进行拼接组装。利用 Glimmer[29] 对基因组中的编码序列（CDS）进行预测，利用 tRNAscan-SE[30] 进行 tRNA 预测，利用 Barrnap 进行 rRNA 预测。利用 BLASTP、Diamond、HMMER 等序列比对工具对预测到的 CDS 进行 NR、Swiss-Prot、Pfam、GO、COG、KEGG、CAZy 等数据库的注释，获得基因的功能信息。

1.2.3　酶学性质

1.2.3.1　琼胶酶的最适温度及温度稳定性　粗酶液与琼脂底物溶液分别在 25、30、35、40、45、50、55 和 60 ℃ 不同温度下反应 30 min，测定琼胶酶活力，以最高酶活力为 100%，研究琼胶酶反应的最适温度。将粗酶液预先置于 30、40、50、60、70、80、90 和 100 ℃ 的水浴锅中分别孵育 30、60 min，以未经处理的酶活力为 100%，测定残余酶活力，研究琼胶酶的热稳定性。

1.2.3.2　琼胶酶的最适 pH 及酸碱稳定性　分别配制 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的缓冲溶液：柠檬酸-磷酸氢二钠（pH4.0~6.0），磷酸二氢钠-磷酸氢二钠（pH7.0~8.0），甘氨酸-氢氧化钠（pH9.0~11.0）。用不同 pH 的缓冲溶液配制 0.5% 琼脂（w/v）底物溶液，测定不同 pH 下的琼胶酶活力，以最高酶活力为 100%，研究琼胶酶反应的最适 pH。将粗酶液与 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的缓冲溶液等体积混合后，置于 4 ℃ 保温 1 h，以未经处理的琼胶酶活力为 100%，测定残余酶活力，研究琼胶酶的酸碱稳定性。

1.2.3.3　不同 NaCl 浓度对酶活力的影响　配制不同 NaCl 浓度（0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 mol/L）的磷酸缓冲溶液，用上述缓冲溶液配制 0.5% 琼脂（w/v）底物溶液，测定不同 NaCl 浓度下的琼胶酶活力。将未加入 NaCl 的对照组的酶活力计为 100%。

1.2.3.4 不同金属离子对酶活力的影响 参考梁小凤[4]报道的方法，配制终浓度为 1 和 10 mmol/L 的不同金属离子磷酸缓冲溶液（KCl、$CaCl_2$、$MnCl_2$、$MgSO_4$、$ZnCl_2$、$CuSO_4$、$FeCl_2$、$FeCl_3$、$CoCl_2$），用上述缓冲溶液配制 0.5% 琼脂（w/v）底物溶液，测定琼胶酶活力，以未加入金属离子的对照组的酶活力计为 100%。

1.2.3.5 EDTA 和蛋白酶抑制剂对酶活力的影响 参考 ZHANG 等[31]报道的方法，将粗酶液与含不同抑制剂（IAM、AEBSF、EDTA）的磷酸缓冲溶液混合，各抑制剂的终浓度分别达到 1 和 10 mmol/L。混合均匀后置于 4 ℃ 保温 30 min，以未经处理的琼胶酶活力为 100%，测定残余酶活力。

1.3 数据处理

实验测定均采用三次独立重复实验，并计算“均值±标准差”。实验数据分析使用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行单因素 ANOVA 检验分析，$P<0.05$ 表示差异显著。图表绘制使用 Origin 2024 软件。

2 结果与分析

2.1 产琼胶酶菌株的筛选和鉴定

2.1.1 产琼胶酶菌株的平板分离与初筛 从不同批次的鲜活鲍鱼内脏样品中涂板分菌，根据筛选培养基上琼脂凹陷圈大小，分离得到 487 株有琼脂降解活性的菌株。将菌株重新点板到 2216E 平板上培养后，经卢戈氏碘液染色后产生透明圈（图 1），根据透明圈大小与菌体大小的比值（H/C）（图 2）选出 H/C 最大（大于 7.5）的菌株 7 株。

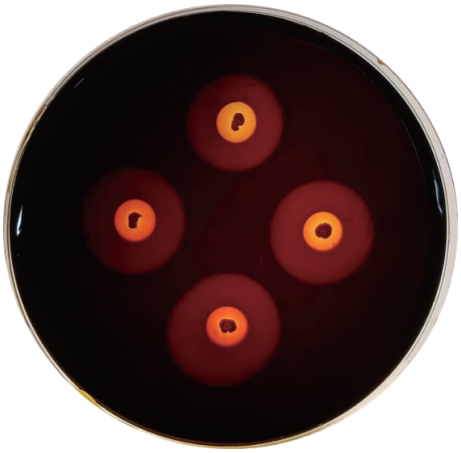


图 1 产琼胶酶菌株卢戈氏碘液染色后的透明圈

Fig.1 Transparent circle of agarase-producing isolates after Lugo's iodine solution staining

2.1.2 产琼胶酶菌株的酶活力测定复筛 以初筛得到的 7 株菌株为测试菌株，测得其琼胶酶活力（表 1）。其中，菌株 2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51 的酶活力达 290 U/mL 以上，显著高于其他 3 株菌（$P<0.05$），用于后续实验。

2.1.3 产琼胶酶菌株的形态学观察结果 4 株产琼胶酶菌株的形态学观察结果见附图 1（详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版）和附图 2（详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版）。由附图 1 可知，4 株菌菌落形态相似，培养 24 h 后，菌落形状不规则，呈现半透明浅黄色，表面光滑湿润，有轻微凸起。由附图 2 可知，4 株菌革兰氏染色呈红色，为革兰氏阴性菌，呈略微弧形弯曲的短杆状。

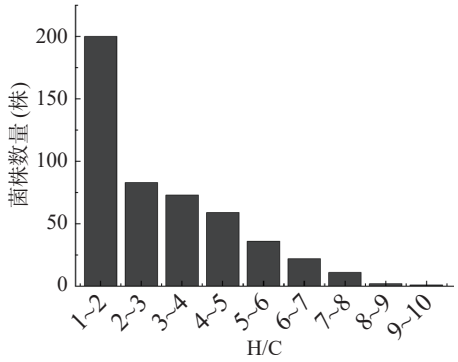


图 2 产琼胶酶菌株卢戈氏碘液染色后的 H/C 值

Fig.2 H/C of agarase-producing isolates after Lugo's iodine solution staining

注：1~2 指 1<H/C≤2；2~3 指 2<H/C≤3；3~4 指 3<H/C≤4；4~5 指 4<H/C≤5；5~6 指 5<H/C≤6；6~7 指 6<H/C≤7；7~8 指 7<H/C≤8；8~9 指 8<H/C≤9；9~10 指 9<H/C≤10。

表 1 7 株测试菌株的产琼胶酶活力

Table 1 Activity of agarases produced by seven testing strains

菌株	酶活力（U/mL）
2DB7	315.17±5.597^{b}
2DB15	340.99±9.795^{a}
2DBB20	293.88±6.455^{c}
2DBB51	324.37±4.037^{b}
3D183	282.65±4.643^{d}
2DBB34	250.03±7.277^{e}
2DBB36	255.47±4.126^{e}

注：不同字母表示差异显著，$P<0.05$。

2.1.4 产琼胶酶菌株的 16S rDNA 鉴定 将扩增得到的 4 株菌 16S rDNA 序列经 BLAST 比对，结果表明 4 株菌均与地中海弧菌（*V. mediterranei*）同源性最高，均达到 99.86% 以上。从 GenBank 中选取和 4 株菌同源性较高的 14 株地中海弧菌（同源性达 99% 以上）、5 株弧菌属菌株（同属不同种，同源性在 90%~95%）和 5 株假交替单胞菌属菌株（外群校准，同源性在 80%~90%）的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树，结果显示，4 株菌均与地中海弧菌（*V. mediterranei*）在同一大分支下（图 3），表明 4 株菌均为地中海弧菌（*V. mediterranei*）。并且，4 株菌分属于不同的小分支，也确证这 4 株菌为不同的菌株。

2.2 产酶菌株全基因组测序及分析

2.2.1 基因组特征 对 *V. mediterranei* 2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 进行了基因组测序，结果表明这 4 株菌都不编码质粒，只有环形染色体 DNA（附图 3，详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版）。它们的基因组特征如表 2 所示，

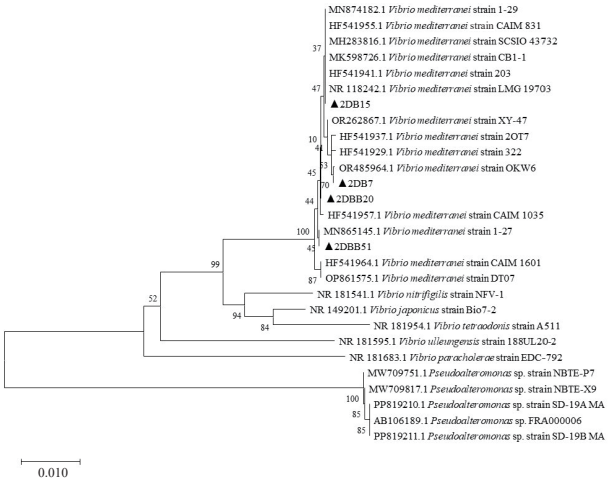


图 3　根据 4 株产琼胶酶菌株及其相关菌株的 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Fig.3　Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA genes of four agarase-producing strains and related strains

4 株菌的基因组大小分别为 5688854、5922738、6120380 和 6129961 bp，GC 含量分别为 44.12%、44.03%、44.15% 和 43.95%，分别编码 5204、5448、5730 和 5604 个基因，编码基因总长度分别为 5045709、5256072、5418285 和 5408262 bp，编码基因平均 GC 含量分别为 44.94%、44.84%、44.95% 和 44.79%。

表 2　基因组特征

Table 2　Genomic features

菌株名称	2DB7	2DB15	2DBB20	2DBB51
基因组大小(bp)	5688854	5922738	6120380	6129961
Contig	107	70	234	77
Contig N50(bp)	180322	470380	226780	221570
基因组GC含量(%)	44.12	44.03	44.15	43.95
编码基因个数	5204	5448	5730	5604
编码基因总长度(bp)	5045709	5256072	5418285	5408262
编码基因平均GC含量(%)	44.94	44.84	44.95	44.79
串联重复序列个数	70	35	114	59
rRNA个数	5	5	6	5
tRNA个数	68	89	78	83

2.2.2　基因功能注释　在 KEGG 数据库中，基因根据代谢途径分为 6 大类，根据特定功能分为 42 个较小的类。2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 在 KEGG 数据库中分别注释到 3996、4034、4213 和 4196 个基因，分别占基因组中所有编码基因的 76.79%、74.05%、73.53% 和 74.88%。4 株菌与代谢相关的基因最丰富，分别为 1219、1237、1256 和 1288 个，其中碳水化合物代谢和氨基酸代谢占了大多数(附图 4，详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)。

COG 数据库用于蛋白质功能分类，主要基于细菌、古菌和真核生物的基因组序列，通过将同源蛋白质分组，推断蛋白质的功能和进化关系。2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 分别有 4266、4371、4478 和 4530 个基因被注释到 COG 数据库中的 24 个分类中，各占总基因数的 81.98%、80.23%、78.15% 和 80.84%。这些基因主要在 [G](碳水化合物转运和代谢，4 株菌注释基因数量分别为 445、459、476 和 531 个)、[E](氨基酸转运和代谢，426、416、425 和 426 个)和 [K](转录，410、440、457 和 447 个)中富集(附图 5，详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)。

CAZy 数据库是一个专注于碳水化合物活性酶的权威数据库，系统整理和分类能够降解、修饰或合成碳水化合物的酶类及其相关模块。为了更好地解析基因组中碳水化合物利用的相关酶，使用 CAZy 数据库对 2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51 编码基因进行注释。分别鉴定出 136、148、158 和 171 个 CAZymes，占总编码基因的 2.61%、2.72%、2.76% 和 3.05%，包括辅助氧化还原酶(AA，12、12、12、11)、碳水化合物结合模块(CBM，1、2、1、1)、碳水化合物酯酶(CE，12、12、13、14)、糖苷水解酶(GH，64、68、81、85)、糖基转移酶(GT，47、49、47、54)和多糖裂解酶(PL，0、5、4、6)(附图 6，详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)。GH 是四株菌基因组中参与多糖降解的主要 CAZyme 家族，占各菌 CAZyme 家族基因的 50% 左右。

关于琼胶酶基因，在 Swiss-Prot 数据库中 2DB7

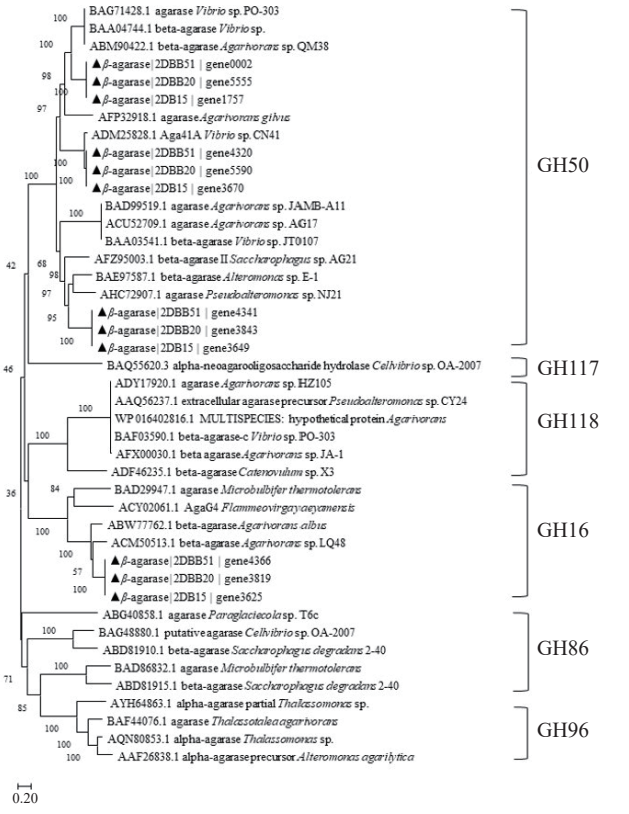


图 4　基于 2DB15、2DBB20、2DBB51 所产 β-琼胶酶氨基酸序列在琼胶酶 GH 家族中构建系统发育树

Fig.4　Phylogenetic tree constructed based on the β-agarase amino acid sequences from 2DB15, 2DBB20, and 2DBB51 within the agarase GH family

注释到 1 个潜在 α-琼胶酶编码基因，而 2DB15、2DBB20 和 2DBB51 则分别注释到了 1 个潜在 α-琼胶酶编码基因和 4 个 β-琼胶酶编码基因。构建蛋白的氨基酸序列系统发育树，发现 2DB15、2DBB20 和 2DBB51 注释的 4 个 β-琼胶酶编码基因中，都有 1 个 β-琼胶酶属于 GH16 家族，其他 3 个属于 GH50 家族（图 4）。2DB15、2DBB20 和 2DBB51 的 β-琼胶酶基因经 CAZy 数据库注释也得到相同结果。与琼胶降解相关的 β-半乳糖苷酶（ABG）和 α-新琼脂二糖水解酶（NABH）也在 CAZy 数据库中被注释到，2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51 分别有 12、14、14 和 15 个 *ABG* 基因，且 2DB15、2DBB20 和 2DBB51 还各含有 1 个 *NABH* 基因。

2.3 酶学性质

2.3.1 酶的最适温度及温度稳定性 本文测定了在温度 25~60 ℃ 范围内的酶活变化情况，结果发现 2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 所产琼胶酶在温度分别为 45 ℃（图 5A）、40 ℃（图 5B）、45 ℃（图 5C）、45 ℃（图 5D）条件下，发挥降解琼脂的能力最强（即最适温度）。其中 2DB7 所产琼胶酶在 25 ℃ 的相对酶活为 47.79%，60 ℃ 条件下完全失活（图 5A）；2DB15 所产琼胶酶在 25 ℃ 的相对酶活为 56.70%，60 ℃ 条件下其相对酶活下降至 25.08%（图 5B）；2DBB20 所产琼胶酶在 25 ℃ 的相对酶活为 50.06%，60 ℃ 条件下其相对酶活下降至 15.23%（图 5C）；2DBB51 所产琼胶酶在 25 ℃ 的相对酶活为 50.38%，60 ℃ 条件下完全失活（图 5D）。在 25 ℃ 条件下，四株菌均能保持 50% 左右的相对酶活，在接近室温的条件下具有一定的酶活力。在 60 ℃ 条件下 2DB7 和 2DBB51 完全失活，热适应性较差，但是 2DB15 和 2DBB20 在 60 ℃ 条件下，仍然具有酶活力，且 2DB15 酶活力可达到 25.08%，因此，2DB15 和 2DBB20 具有一定的热适应性。

本文考察了酶的温度稳定性，结果表明，2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶在 40 ℃ 以下均可以保持良好的稳定性，孵育 1 h 后的相对酶活分别为 95.62%（图 6A）、95.99%（图 6B）、90.56%（图 6C）、85.85%（图 6D）。超过 50 ℃ 后四株菌所产酶的稳定性呈下降趋势。50 ℃ 孵育 30 min 后的相对酶活分别下降至 46.28%、53.21%、57.24%、62.67%；孵育 1 h 后的相对酶活分别下降为 36.35%、37.97%、46.97%、52.13%。温度升至 90 ℃，2DBB51 所产琼胶酶孵育 30 min 后活性完全丧失。温度升至 100 ℃，2DB15 和 2DBB20 所产琼胶酶孵育 30 min 后的相对酶活力仍然分别保持在 22.73% 和 13.65%，直至孵育 1 h 后，二者的酶活力才完全丧失。而 2DB7 在 100 ℃ 孵育 1 h 依旧保留了 10.66% 的相对酶活。结果表明，4 株菌均具有良好的热稳定性，且 2DB7 所产琼胶酶热稳定性最佳。

2.3.2 酶的最适 pH 及酸碱稳定性 本文测定了在

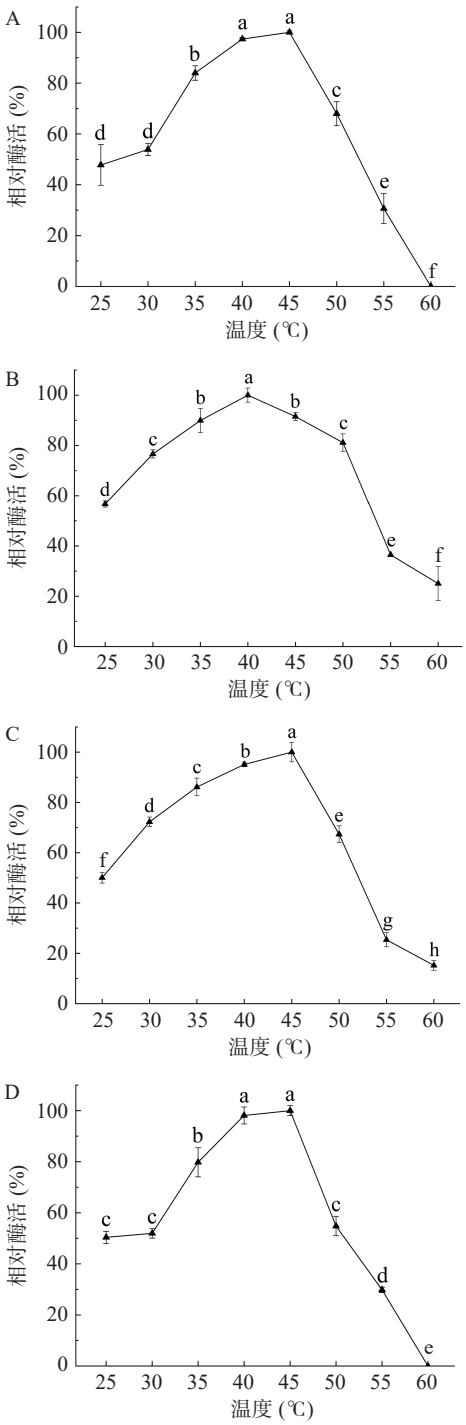


图 5 反应温度对琼胶酶活力的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on the activity of agarases

注：A 为 2DB7；B 为 2DB15；C 为 2DBB20；D 为 2DBB51；不同字母表示差异显著，$P<0.05$，图 6~图 11 同。

pH4.0~11.0 范围内的酶活变化情况，结果发现 2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶在 pH 分别为 8.0（图 7A）、7.0（图 7B）、8.0（图 7C）、7.0（图 7D）条件下，酶活最高。4 株菌所产琼胶酶在 pH5.0~9.0 之间均保持 60% 以上的相对酶活，表明它们 pH 作用范围较为广泛（图 7）。2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶在 pH 为 4.0 时，相对酶活分别只有 12.54%（图 7A）、9.44%（图 7B）、15.03%（图 7C）、14.13%（图 7D）。除

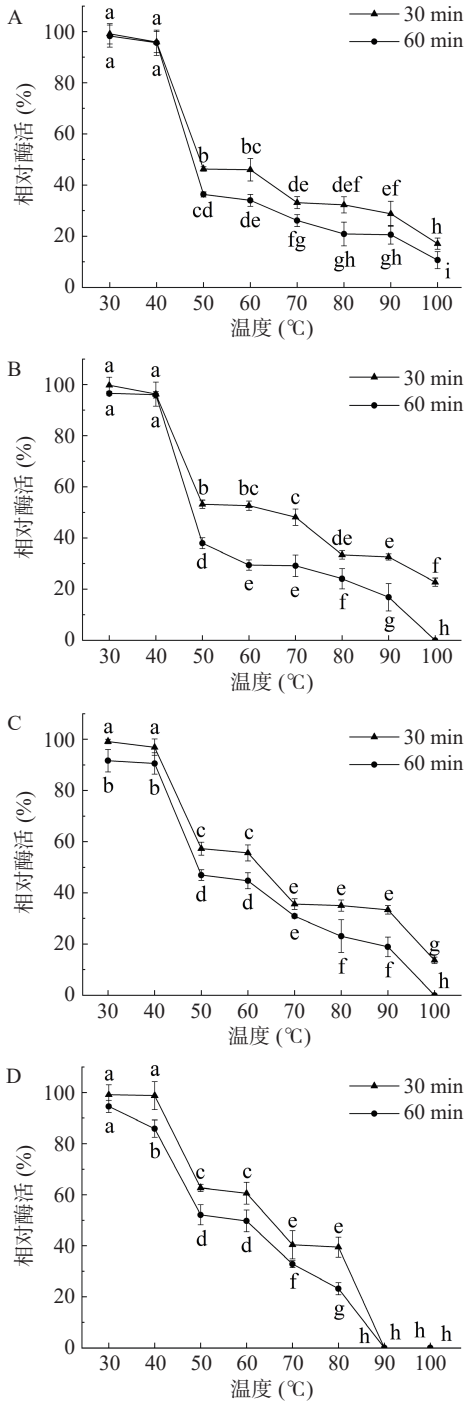


图 6　温度对琼胶酶稳定性的影响

Fig.6　Effect of temperature on the stability of agarases

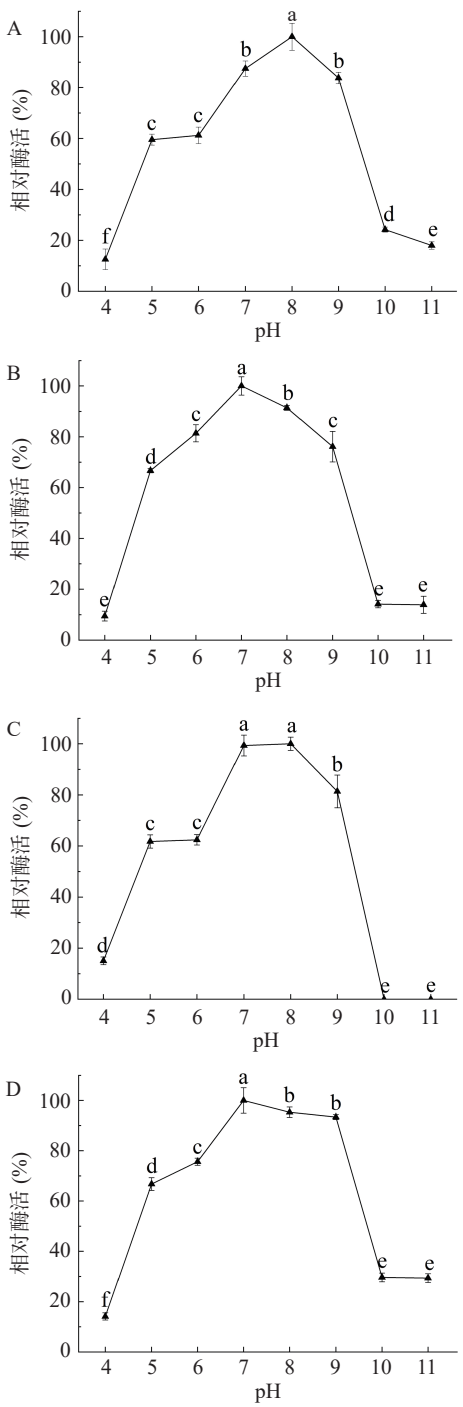


图 7　反应 pH 对琼胶酶活力的影响

Fig.7　Effect of reaction pH on the activity of agarases

2DBB20 外，其他 3 株菌所产琼胶酶在 pH 为 10.0 和 11.0 时，仍然保留酶活力，且 2DBB51 所产琼胶酶在 pH 为 11 时，依旧保持 29.36% 的相对酶活。

本文考察了酶经过 pH4.0~11.0 的 1 h 处理后的酶活性，结果发现 2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶在 pH 分别为 7.0（图 8A）、7.0（图 8B）、7.0（图 8C）、8.0（图 8D）条件下，稳定性最好。2DB7 所产琼胶酶在 pH5.0~9.0 放置 1 h 后，其相对酶活保持在 76.36% 以上，且在 pH4.0 和 11.0 时均有酶活力保留。2DB15 所产琼胶酶在 pH5.0~9.0 放置 1 h 后，其相对酶活保持在 74.62% 以上，在 pH4.0 时酶活力完全丧失，但在 pH11.0 时，依旧保留 28.10% 的相对酶活。2DBB20 所产琼胶酶在 pH5.0~9.0 放置 1 h 后，其相对酶活保持在 61.52% 以上。2DBB51 所产琼胶酶在 pH5.0~9.0 放置 1 h 后，其相对酶活保持在 50.12% 以上，在 pH11.0 时，酶活力完全丧失，但在 pH4.0 时仍然有酶活力保留。

2.3.3　不同 NaCl 浓度对酶活力的影响　由于 4 株菌均是来源于鲍鱼（海洋软体动物）的肠道，故考察酶在不同盐浓度下的酶活力。2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶在 NaCl 浓度

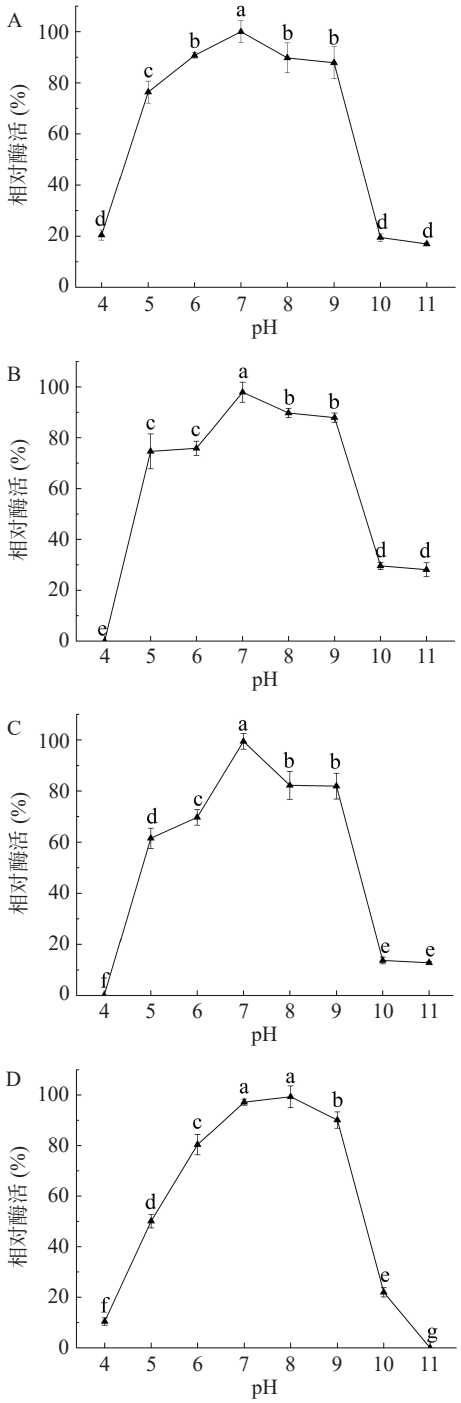


图 8 pH 对琼胶酶稳定性的影响

Fig.8 Effect of pH on the stability of agarases

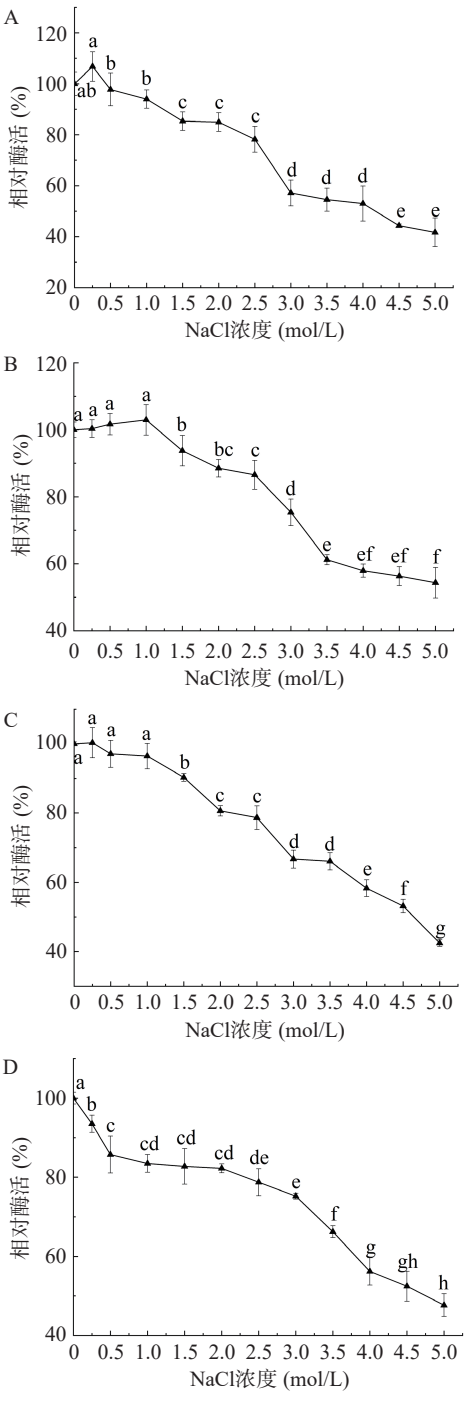


图 9 NaCl 浓度对琼胶酶活力的影响

Fig.9 Effect of NaCl concentration on the activity of agarases

分别为 0.25 mol/L(图 9A)、1 mol/L(图 9B)、0.25 mol/L(图 9C)、0 mol/L(图 9D)条件下,酶活最高。2DB7、2DB15、2DBB20 所产琼胶酶,与不加 NaCl 的对照组相比,酶活力最高可达 106.77%、102.96%、100.32%。当 NaCl 浓度增加至 5 mol/L 时,4 株菌所产琼胶酶均保留了 40% 以上的相对酶活;其中 2DB15 的 NaCl 耐受能力最强,在 NaCl 浓度为 5 mol/L 时,仍然保留了 54.34% 的相对酶活。

2.3.4 不同金属离子对酶活力的影响 浓度为 1 mmol/L 的 Co^{2+}和 Fe^{3+}略微促进 2DB7 所产琼胶酶的酶活性,其中 Fe^{3+}处理时相对酶活可达 101.94%;浓度为 1 mmol/L 的 K^{+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+}和 Cu^{2+}对 2DB7 所产琼胶酶的酶活具有显著抑制作用($P<0.05$),其中 Mn^{2+}的抑制作用最强,将相对酶活降低至 40.38%。测试的所有 10 mmol/L 的金属离子均对 2DB7 所产琼胶酶具有抑制作用,其中 Cu^{2+}的抑制作用最强,将相对酶活降低至 13.48%(图 10A)。

浓度为 1 mmol/L 的 K^{+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}和 Cu^{2+}对 2DB15 所产琼胶酶的酶活具有显著促进作用($P<0.05$),其中 Zn^{2+}、Fe^{3+}和 Cu^{2+}的促进最强,将相对酶活提高至 128.98% 以上;浓度为 1 mmol/L 的 Mn^{2+}和 Mg^{2+}对 2DB15 所产琼胶酶的酶活具有显著

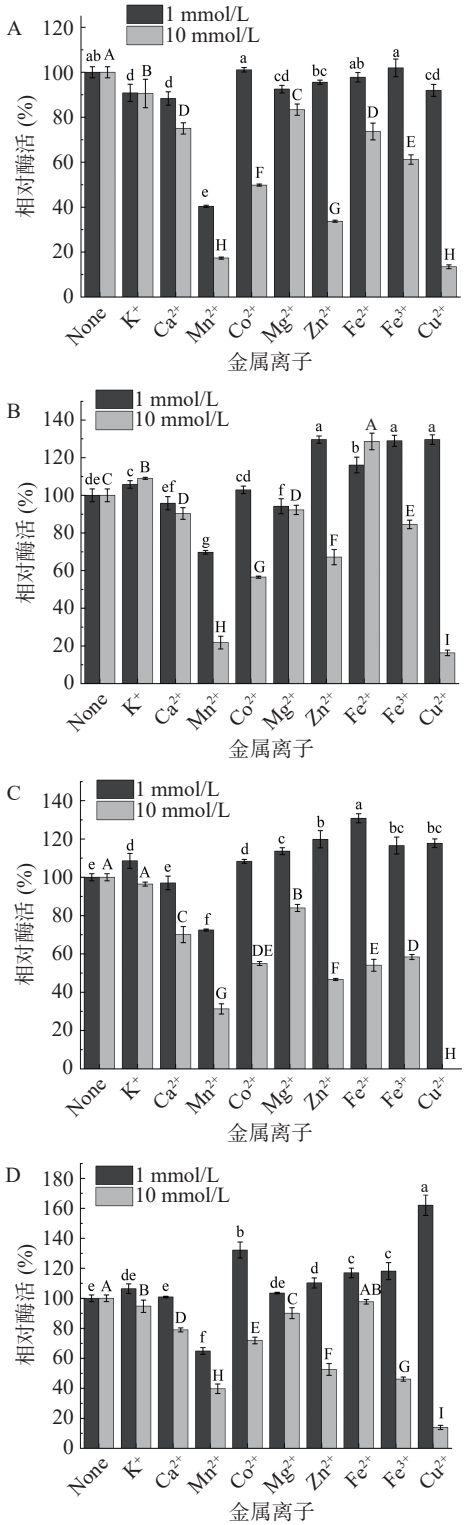


图 10　金属离子对琼胶酶活力的影响

Fig.10　Effect of metal ions on the activity of agarases

抑制作用(P<0.05)，其中 Mn^{2+}的抑制作用最强，将相对酶活降低至 69.74%。浓度为 10 mmol/L 的 K^+和 Fe^{2+}对 2DB15 所产琼胶酶的酶活具有显著促进作用(P<0.05)，其中 Fe^{2+}的促进最强，将相对酶活提高至 128.65%；浓度为 10 mmol/L 的 Ca^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{3+}和 Cu^{2+}对 2DB15 所产琼胶酶的酶活具有显著抑制作用(P<0.05)，其中 Cu^{2+}的抑制作用最强，将相对酶活降低至 16.29%(图 10B)。

浓度为 1 mmol/L 的 K^+、Co^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}和 Cu^{2+}对 2DBB20 所产琼胶酶的酶活具有显著促进作用(P<0.05)，其中 Fe^{2+}的促进最强，将相对酶活提高至 130.81%；浓度为 1 mmol/L 的 Mn^{2+}对 2DBB20 所产琼胶酶的酶活具有显著抑制作用(P<0.05)，将相对酶活降低至 72.45%。除了 K^+，测试的浓度为 10 mmol/L 的金属离子均对 2DBB20 所产琼胶酶具有显著抑制作用(P<0.05)，其中 Cu^{2+}的抑制作用最强，作用后使该酶完全失去活性(图 10C)。

浓度为 1 mmol/L 的 Co^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}和

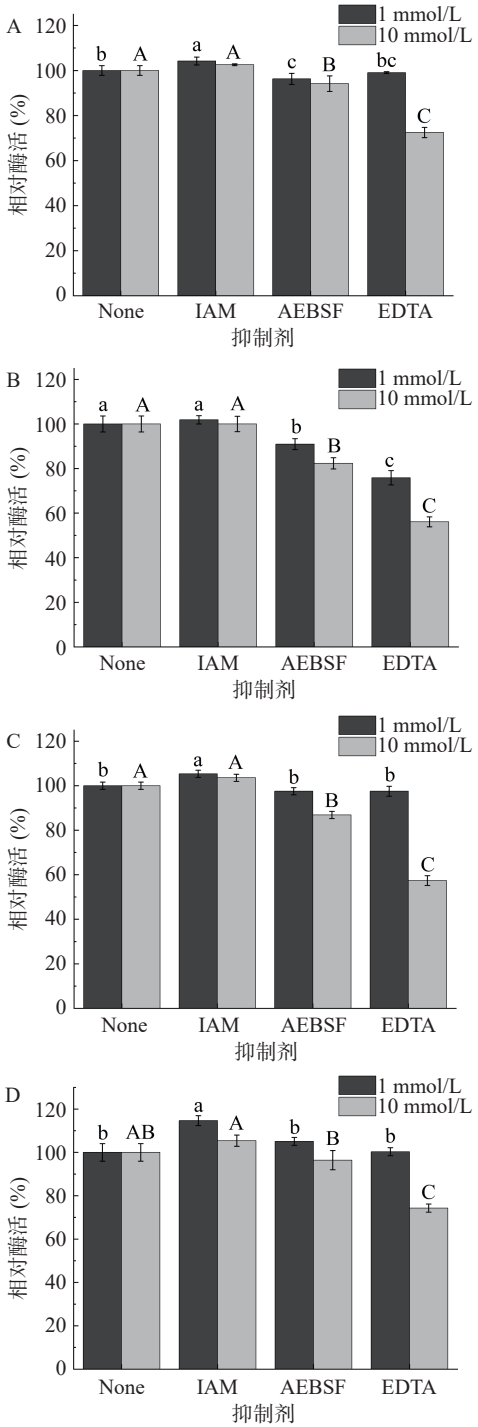


图 11　抑制剂对琼胶酶活力的影响

Fig.11　Effect of inhibitors on the activity of agarases

Cu^{2+}对 2DBB51 所产琼胶酶的酶活具有显著促进作用(P<0.05),其中 Cu^{2+}的促进最强,将相对酶活提高至 162.06%;浓度为 1 mmol/L 的 Mn^{2+}对 2DBB51 所产琼胶酶的酶活具有显著抑制作用(P<0.05),将相对酶活降低至 64.87%。除了 Fe^{2+},测试的浓度为 10 mmol/L 的金属离子均对 2DBB51 所产琼胶酶具有显著抑制作用(P<0.05),其中 Cu^{2+}的抑制作用最强,将相对酶活降低至 13.93%(图 10D)。

2.3.5 EDTA 和蛋白酶抑制剂对酶活力的影响 研究 IAM、AEBSF、EDTA 对 4 株菌所产琼胶酶的酶活力的影响,1 mmol/L 的 IAM 对 2DB7、2DBB20 和 2DBB51 所产琼胶酶起到显著促进作用(P<0.05),将相对酶活性分别提升至 104.20%(图 11A)、105.33%(图 11C)和 114.64%(图 11D);10 mmol/L 的 IAM 处理下,4 株菌所产琼胶酶活性与对照组无显著差异(P>0.05)。10 mmol/L 的 AEBSF 对 2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51 所产琼胶酶起到抑制作用,将相对酶活性分别降至 94.17%(图 11A)、82.35%(图 11B)、86.86%(图 11C)和 96.41%(图 11D)。10 mmol/L 的 EDTA 对 2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 四株菌所产琼胶酶活性的抑制作用最显著(P<0.05),将相对酶活性分别降至 72.47%(图 11A)、56.11%(图 11B)、57.39%(图 11C)和 74.30%(图 11D)。

3 讨论与结论

本研究系统考察和比较了从鲍鱼内脏中分离获得的 4 株产琼胶酶的地中海弧菌的基因组遗传信息及其所产琼胶酶的酶学性质。尽管已有大量研究报道了弧菌属(*Vibrio* sp.)中多种细菌的琼胶酶生产能力,但据搜索文献库所知,目前尚未有关于地中海弧菌产琼胶酶及其产酶相关酶学性质与遗传基础的系统研究报道。关于地中海弧菌的代谢产物的利用,CARRATURO 等[32] 报道分离到一株地中海弧菌,该菌产抑制副溶血弧菌的类细菌素。因此,本文首次详细揭示了地中海弧菌作为琼胶酶生产菌株的潜力及其所产酶的酶学性质。

酶的最适温度测定结果表明,4 株地中海弧菌中 2DB7、2DBB20 和 2DBB51 所产琼胶酶最适反应温度均为 45 ℃,与麦氏交替假单胞菌(*Alteromonas macleodii*)BC7.1[26]、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)Q30F[33] 等来源的琼胶酶最适反应温度相似,而 2DB15 所产琼胶酶最适反应温度为 40℃,与火色杆菌(*Flammeovirga* sp.)OC4[12]、鞘脂单胞菌(*Sphingomonas* sp.)Q2[25] 等来源的琼胶酶最适反应温度一致。2DB7、2DB15、2DBB20、2DBB51 所产琼胶酶在 pH 分别为 8.0、7.0、8.0、7.0 的条件下,酶活最高,且在 pH5.0~9.0 之间都保持 60% 以上的相对酶活,与麦氏交替假单胞菌 BC7.1[26]、交替假单胞菌 Q30F[33] 和不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)AG LSL-1[34] 来源的琼胶酶相比,具有较好的 pH 耐受性。

多糖降解是海洋碳循环的重要组成部分[35]。海洋微生物通过分泌特异性胞外酶,如琼胶酶、纤维素酶、褐藻胶酶等,对海洋中的大分子多糖进行高效分解,从而参与深海环境的碳循环。琼胶酶作为一类重要的海洋多糖降解酶,近年来已成为研究热点,而弧菌属则是琼胶酶的主要微生物来源之一[36−37]。许多弧菌属(*Vibrio* sp.)来源的琼胶酶都表现出冷适应性,在较高的温度下稳定性差。例如,来源于 *V. natriegens* WPAGA4 的琼胶酶 Aga3420[38],其最佳反应温度在 40 ℃,但仅在 10~30 ℃ 下孵育 50 min 内具有良好的稳定性。来源于 *V. fluvialis* A8 的琼胶酶[39],在 50 ℃ 下孵育 30 min 失活。为了得到较好热稳定性的弧菌来源琼胶酶,SU 等[36] 将来自 *Vibrio* sp. ZC-1 的 β-琼胶酶进行诱变,但诱变后的琼胶酶在 46 ℃ 孵育 10 min 后也基本失活。具有一定热稳定性的 *Vibrio* sp. S1 来源的琼胶酶 AgaA33 和 AgaA29[40],在 50 ℃ 下孵育 1 h,其相对活性也下降至 20% 以下。而本文考察的这 4 株弧菌所产琼胶酶在 50 ℃ 孵育 1 h 后仍然具有一定的活性,其中以 2DBB51 热稳定性最佳,相对酶活能达到 52.13%。当温度在 40 ℃ 及以下时,4 株菌所产琼胶酶均具有良好的稳定性,在 40 ℃ 孵育 1 h 后,能维持 85.85% 以上的相对酶活。琼脂的凝胶温度通常在 30~40 ℃ 左右,所以最适反应温度高于 40 ℃ 以及热稳定性较高的琼胶酶在工业化应用中具有较好的应用前景[41]。

在本研究中,10 mmol/L 的 EDTA 和 10 mmol/L 的 AEBSF 对 4 株菌所产琼胶酶活性均起到抑制作用,且 EDTA 的抑制效果更强。EDTA 作为金属螯合剂,可抑制依赖金属离子的酶的活性,AEBSF 是一种广谱的丝氨酸蛋白酶抑制剂,因此,结果表明 4 株菌所产琼胶酶的活性中心依赖于金属离子,且与丝氨酸残基有关。进一步分析金属离子对酶活性的影响时发现,多种低浓度金属离子对测试菌所产琼胶酶活性起到促进作用,如浓度 1 mmol/L 的 Co^{2+}和 Fe^{3+},而浓度 1 mmol/L 的 Mn^{2+}对 4 株菌所产琼胶酶均起到明显抑制作用。浓度为 10 mmol/L 的 Cu^{2+}对 4 株菌所产琼胶酶活性的抑制效果最强,并能使 2DBB20 所产琼胶酶完全失活。从结果可以看出,虽然一些低浓度的金属离子可以促进酶的活性,但过高浓度的金属离子大多可能会导致酶活力的降低,推测可能因为高浓度金属离子影响了酶分子和(或)底物分子的解离情况,或者影响了酶活性中心的电子分布与转移,或者影响了酶分子的空间构象[42]。本研究结果与前人报道的弧菌属其他琼胶酶存在一定差异,例如,来源于 *Vibrio* sp. S1 的 AgaA29 和 AgaA33[40] 在低浓度 Co^{2+}条件下同样显示出酶活促进的结果,但低浓度 Mn^{2+}对其酶活表现为促进作用而非抑制;*V. natriegens* WPAGA4 的 Aga3420[38] 则表现出低浓度 Fe^{3+}和 Mn^{2+}促进其酶活,而低浓度 Co^{2+}抑制其酶活的现象。因此,本研究中的 4 株地中海弧菌所产琼胶酶酶活受金属离子的影响,与其他弧菌菌株来源的

琼胶酶有所不同，这种差异性拓宽了弧菌来源琼胶酶的使用场景。

本研究中测定的 4 株地中海弧菌（2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51）所产的琼胶酶均展现出较强的降解活性，酶活分别为 315.17、340.99、293.88 和 324.37 U/mL。并且，本研究中使用的降解底物为琼脂，而大多数文献报道中测定琼胶酶活性时通常使用琼脂糖作为底物[43−45]。琼脂是由琼脂糖（agarose）和琼脂胶（agaropectin）组成的复合物，因此，这些琼胶酶在降解与琼脂同浓度的琼脂糖时，可能会表现出更高的活性。大多数天然琼脂是硫酸化多糖，需要对其进一步加工才能生产琼脂低聚糖[46]。因此，开发一种无需脱硫步骤即可将硫酸化琼脂糖（粗琼脂）转化为琼脂低聚糖的生物转化工艺，在工业生产中具有良好的应用潜力。

根据氨基酸序列特征，琼胶酶可分为不同的糖苷水解酶（GH）家族。已报道的 β-琼胶酶主要属于 GH16、GH50、GH86 和 GH118 家族，而已报道的 α-琼胶酶均属于 GH96 家族。GH16 家族是最大的 GH 家族，涵盖多种内切型 β-琼胶酶；且根据 CAZy 数据库的统计数据，迄今为止，弧菌属的 GH16 家族琼胶酶较常见[47−49]，弧菌属中其他家族的 β-琼胶酶特征则较少被研究。根据 CAZy 数据库的注释结果，2DB15、2DBB20 和 2DBB51 分别含有 3 个 GH50 家族的琼胶酶基因，且与同为源于弧菌属 GH50 家族的 *V. fluvialis* A8[39] 的琼胶酶和源于 *V. natriegens* WPAGA4 的琼胶酶 Aga3420[38] 相比，本文这 3 株菌所产酶在热稳定性上更有优势。此外，多数琼胶酶属于内切型酶，而 GH50 家族的 β-琼胶酶则大部分为外切型酶，能够以新琼二糖（NA2）作为唯一的降解终产物。从基因组测序结果看，本文这 3 株弧菌各编码有 3 个 GH50 家族琼胶酶的基因，推测它们在后续的应用上可能有更好的前景。

琼脂糖是由 β-D-半乳糖（D-Gal）和 3,6-脱水-α-L-半乳糖（L-AHG）通过 β-1,4 糖苷键和 α-1,3 糖苷键交替连接形成的线性中性多糖[50]。α-琼胶酶水解琼脂糖的 α-1,3 糖苷键得 AOS，β-琼胶酶水解琼脂糖的 β-1,4 糖苷键得 NAOS[51]。联合使用 α-琼胶酶和 β-琼胶酶，有助于实现高效降解琼脂糖。比如，联用这两种酶可降解红藻细胞壁高质量制备原生质体。串联使用 β-琼胶酶 Aga50D 和 α-琼胶酶 BpGH117 实现了琼脂糖组分 L-AHG 的一步制备[43]。在降解的产物方面，AOS 和 NAOS 这两类琼胶寡糖都具有良好的生物活性，但活性存在一定差异，且在开发利用时各有优缺点[52]。此外，当前已有偶数 NAOS 标品，但缺乏偶数 AOS 标品[15]。因此，开发和利用 α-琼胶酶受到越来越多的关注。与 β-琼胶酶相比，关于 α-琼胶酶的研究较少。目前已报道的 β-琼胶酶已超过千种，但已报道有表征的 α-琼胶酶仅近 10 种，如来自解琼脂交替单胞菌 G J1B 的 AgaA、来自深海单胞菌 JAMB-A33 的 A33、来自深海单胞菌 LD5 的 AgaD 和 AgaE、来自噬琼胶卵链菌的 CaLJ96、来自沉积物卵链菌 WS1-A 的 AgaWS5 和来自溶藻性吉尔维菌的 OUC-GAJJ96 等[15,53−54]。

已报道的 α-琼胶酶的同源性相似度差别较大，从 44% 到 90.5%；它们一般都含有碳水化合物结合模块（Carbohydrate-Binding Module, CBM）6[55]。根据 Swiss-Prot 数据库的注释结果，本研究中的 4 株弧菌均注释到潜在的 α-琼胶酶基因，注释同源性达 55% 左右但覆盖度较低，与已报道的 GH96 家族 α-琼胶酶同源性较低。Swiss-Prot 数据库中的蛋白质序列大都经过实验验证，其注释结果可靠性较高。进一步分析序列发现，注释到的潜在 α-琼胶酶基因含有 CBM6 和新推定碳水化合物结合模块（novel putative carbohydrate binding module, NPCBM）。在全基因组数据中，菌株 2DB7 未注释到其他琼胶酶基因，仅在 Swiss-Prot 数据库中注释到这个潜在 α-琼胶酶基因。因此，推测菌株 2DB7 编码新的琼胶酶基因，后续尚需通过酶蛋白纯化、分泌蛋白组质谱鉴定、基因敲除或异源表达等探究该菌株编码且表达新琼胶酶基因的可能性。

根据 CAZy 数据库和 Swiss-Prot 数据库注释结果，2DB7、2DB15、2DBB20 和 2DBB51 四株菌均携带 *ABG* 基因，而 2DB15、2DBB20 和 2DBB51 还各含有 1 个 *NABH* 基因。NABH 可以切割 β-琼胶酶水解琼脂糖产生的偶数 NAOS 非还原端的第一个 α-1,3 糖苷键，生成相应的奇数 AOS；而 ABG 则可以作用于 α-琼胶酶水解琼脂糖产生的偶数 AOS 非还原端的第一个 β-1,4 糖苷键，生成奇数的 NAOS[56]。推测 ABG 与 NABH 的存在可能进一步提升了菌株对琼脂糖的降解效率，这可能是导致这些菌株产生的酶液拥有高琼胶酶活性的原因之一。本研究目前只在基因组层面确证了菌株编码上述的琼胶降解相关基因，后续还需结合利用 RT-qPCR、转录组或蛋白质谱等进一步做蛋白表达层面的验证。

综上所述，本研究从鲍鱼内脏中分离出 4 株具有较高琼胶降解活性的地中海弧菌，菌株的全基因组测序注释到 GH50 和 GH16 家族琼胶酶等多种琼胶降解相关基因，菌株所产琼胶酶具有较高的酶活、较好的热稳定性和 pH 稳定性。研究结果丰富了琼胶酶资源库，为深入理解和利用所获得的琼胶酶提供了理论参考。下一步可考虑纯化制备琼胶酶蛋白、在蛋白表达层面验证各菌株的琼胶酶基因表达情况；优化发酵产酶条件提高酶的产量，降低产酶成本；利用深度学习模型预测定点突变或定向进化对酶分子稳定性能的影响来指导酶分子改造。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture[DB]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.

[2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024. [Fishery Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquaculture Technology Promotion Station, Chinese Fisheries Society. China fisheries statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2024.]

[3] WANG Chen, LONG Jie, LI Xingfei, et al. Preparation of agar polysaccharides and biological activities and relationships of agar-derived oligosaccharides and monosaccharides: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 295: 139552.

[4] 梁小凤. 一株琼胶降解菌 *Microbulbifer* sp. 的产酶条件及琼胶酶性质研究[D]. 南宁: 广西大学, 2022. [LIANG Xiaofeng. Optimization of enzyme production conditions and characteristics of agarase from *Microbulbifer* sp.[D]. Nanning: Guangxi University, 2022.]

[5] 周凤, 谭黄虹, 孙慧敏, 等. 基于红藻多糖的生物转化研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 326−334. [ZHOU Feng, TAN Huanghong, SUN Huimin, et al. Progress in biotransformation of red algal polysaccharides for industrial utilization[J]. Food Science, 2021, 42(13): 326−334.]

[6] LI Tao, YANG Shaoqing, LIU Xiaoyan, et al. Dietary neoagarotetraose extends lifespan and impedes brain aging in mice via regulation of microbiota-gut-brain axis[J]. Journal of Advanced Research, 2023, 52: 119−134.

[7] ZHANG Xiao, AWEYA J J, HUANG Zongxun, et al. *In vitro* fermentation of *Gracilaria lemaneiformis* sulfated polysaccharides and its agaro-oligosaccharides by human fecal inocula and its impact on microbiota[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 234: 115894.

[8] WANG L, FU X, HYUN J, et al. *In vitro* and *in vivo* protective effects of agaro-oligosaccharides against hydrogen peroxide-stimulated oxidative stress[J]. Polymers, 2023, 15(7): 1612.

[9] ZOU Yaxue, FU Xiaoting, LIU Nannan, et al. The synergistic anti-inflammatory activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(4): 2547−2558.

[10] HIGASHIMURA Y, NAITO Y, TAKAGI T, et al. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice[J]. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, 2016, 310(6): G367−G375.

[11] ZHANG Yonghui, SONG Xiangning, LIN Yan, et al. Antioxidant capacity and prebiotic effects of *Gracilaria* neoagaro oligosaccharides prepared by agarase hydrolysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 137: 177−186.

[12] CHEN Xinglin, LIN Hetong, JIN Min, et al. Characterization of a novel alkaline *β*-agarase and its hydrolysates of agar[J]. Food Chemistry, 2019, 295: 311−319.

[13] CHEN Xiaodan, FU Xiaoting, HUANG Luqiang, et al. Agar oligosaccharides: A review of preparation, structures, bioactivities and application[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 265: 118076.

[14] 李倩, 杨锐, 孙辉, 等. 大型海藻功能物质在农业生产中的应用[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 99−103. [LI Qian, YANG Rui, SUN Hui, et al. Application of algal functional material in agricultural production[J]. Journal of Biology, 2018, 35(5): 99−103.]

[15] 金佳, 江承程, 毛相朝. *α*-琼胶酶 OUC-GaJJ96 的异源表达及酶学性质[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(6): 47−54. [JIN Jia, JIANG Chengcheng, MAO Xiangzhao. Heterologous expression and enzymatic properties of *α*-agarase OUC-GaJJ96[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(6): 47−54.]

[16] ZHENG Jinfang, HU Boyang, ZHANG Xinpeng, et al. dbCAN-seq update: CAZyme gene clusters and substrates in microbiomes[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D557−D563.

[17] WANG B T, HU S, OH D N, et al. Insights into the lignocellulose-degrading enzyme system based on the genome sequence of *Flavodon* sp. x-10[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(3): 866.

[18] 童秀芳, 王宁, 张孟源, 等. 需钠弧菌 WPAGA4 菌株 3 条琼胶酶基因克隆、表达与酶学性质分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3667−3678. [TONG Xiufang, WANG Ning, ZHANG Mengyuan, et al. Cloning, expression, and characterization of three agarases in *Vibrio natriegens* WPAGA4[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3667−3678.]

[19] 王珊, 张子岩, 沈镜莹, 等. 一株高产琼胶酶菌株的筛选及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(1): 178−185. [WANG Shan, ZHANG Ziyan, SHEN Jingying, et al. Screening and identification of a high-yield agarase-producing strain[J]. Food Research and Development, 2025, 46(1): 178−185.]

[20] KIM J S, LEE D G, YEO G W, et al. Isolation of *Agarivorans* sp. JS-1 and characterization of its *β*-agarase[J]. Journal of Life Science, 2023, 33(4): 357−362.

[21] 张黔. 海藻降解菌 *Alteromonas* sp. Aga1552 产琼胶酶的分子特征和酶学性质[D]. 青岛: 自然资源部第一海洋研究所, 2023. [ZHANG Q. Molecular characteristics and enzymatic properties of agarase produced by seaweed degrading bacterium *Alteromonas* sp. Aga1552[D]. Qingdao: First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, 2023.]

[22] LIANG T W, CHEN W T, LIN Z H, et al. An amphiprotic novel chitosanase from *Bacillus mycoides* and its application in the production of chitooligomers with their antioxidant and anti-inflammatory evaluation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1302−1315.

[23] 刘芳, 舒志强, 王共明, 等. 产褐藻胶裂解酶菌株 S10 的鉴定、全基因组测序及分析[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 73−84. [LIU Fang, SHU Zhiqiang, WANG Gongming, et al. Identification, whole-genome sequencing and analysis of *Vibrio alginolyticus* S10, a strain producing alginate lyase[J]. Food Science, 2024, 45(22): 73−84.]

[24] 李驰, 李春生, 杨贤庆, 等. 海洋细菌 *Vibrio fluvialis* 的分离鉴定、产琼胶酶条件优化及酶的分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 35−42. [LI Chi, LI Chunsheng, YANG Xianqing, et al. Isolation and identification of agarase-producing *Vibrio fluvialis* for agarase preparation and purification[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(7): 35−42.]

[25] 钱洗谦, 乔乐克, 张洪锋, 等. 海洋细菌 *Sphingomonas* sp. Q2 产琼胶酶发酵条件优化、酶学性质及降解产物研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 139−146. [QIAN Xiqian, QIAO Leke, ZHANG Hongfeng, et al. Optimization of fermentation conditions, enzymatic properties and degradation products of agarase produced by marine bacterium *Sphingomonas* sp. Q2[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 139−146.]

[26] ZILDA D S, PATANTIS G, DEWI A S, et al. Characterization of *β*-agarase produced by *Alteromonas macleodii* BC7.1 and its oligosaccharide products[J]. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 2024, 10: 100865.

[27] 翁盼. 对鱼源希瓦氏菌群体感应具有抑制活性乳酸菌的筛选及其作用机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2023. [WENG P. Screening and its inhibition mechanism of lactic acid bacteria against quorum sensing of *Shewanella* of fish origin[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2023.]

[28] LUO Ruibang, LIU Binghang, XIE Yinlong, et al. SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read *de no-*

vo assembler[J]. GigaScience, 2012, 1(1): 18.
[29] DELCHER A L, BRATKE K A, POWERS E C, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673−679.
[30] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955−964.
[31] ZHANG Yuying, ZHENG Long, LIU Guanchen, et al. The *α*-linkage in funoran and agarose could be hydrolyzed by a GH96 family enzyme: Discovery of the *α*-funoranase[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 338: 122201.
[32] CARRATURO A, RAIETA K, OTTAVIANI D, et al. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(1): 234−241.
[33] CUI Xin, JIANG Yuechen, CHANG Liuyi, et al. Heterologous expression of an agarase gene in *Bacillus subtilis*, and characterization of the agarase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 657−664.
[34] LAKSHMIKANTH M, MANOHAR S, LALITHA J. Purification and characterization of *β*-agarase from agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(9): 999−1003.
[35] ARNOSTI C, WIETZ M, BRINKHOFF T, et al. The biogeochemistry of marine polysaccharides: Sources, inventories, and bacterial drivers of the carbohydrate cycle[J]. Annual Review of Marine Science, 2021, 13: 81−108.
[36] SU Bingmei, XU Xinqi, YAN Renxiang, et al. Mutagenesis on the surface of a *β*-agarase from *Vibrio* sp. ZC-1 increased its thermo-stability[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 127: 22−31.
[37] MEENA B, ANBURAJAN L, AYANA P, et al. Biochemical and molecular characterization of temperature-adapted agarase from sea urchin associated *Vibrio sonorensis* NIOT_SU2 from Andaman Island[J]. Ecological Genetics and Genomics, 2022, 25: 100150.
[38] ZHANG M, WANG J, ZENG R, et al. Agarose-degrading characteristics of a deep-sea bacterium *Vibrio natriegens* WPAGA4 and its cold-adapted GH50 agarase Aga3420[J]. Marine Drugs, 2022, 20(11): 692.
[39] LI Chunsheng, LI Chi, LI Laihao, et al. Comparative genomic and secretomic analysis provide insights into unique agar degradation function of marine bacterium *Vibrio fluvialis* A8 through horizontal gene transfer[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1934.
[40] CHI W J, SEO J W, HONG S K. Characterization of two thermostable *β*-agarases from a newly isolated marine agarolytic bacterium, *Vibrio* sp. S1[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(5): 799−809.
[41] PARK S H, LEE C R, HONG S K. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(7): 2815−2832.
[42] HUANG Meiying, CUI Peixin, ZHOU Jing, et al. Theoretical study on the inhibition mechanisms of heavy metal ions on urease activity[J]. Chemosphere, 2023, 345: 140416.
[43] LIU Xuewu, LI Xingfei, XIE Zhengjun, et al. Co-immobilization of *β*-agarase and *α*-agarase for degradation of agarose to prepare bioactive 3,6-anhydro-L-galactose[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 133960.
[44] THANH H D T, KIM T L T, PHUONG T T T, et al. Production of extracellular agarase from *Priestia megaterium* AT7 and evaluation on marine algae hydrolysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 172: 110339.
[45] XIE Wenyan, YOU Yuxian, BAN Xiaofeng, et al. Structural basis for the cold activation and adaptation of an *α*-agarase from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* STB13[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102630.
[46] GAO Boliang, LI Li, WU Hui, et al. A novel strategy for efficient agaro-oligosaccharide production based on the enzymatic degradation of crude agarose in *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1231.
[47] LIU Yupeng, JIN Xingkun, WU Chao, et al. Genome-wide identification and functional characterization of *β*-agarases in *Vibrio astriarenae* strain HN897[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1404.
[48] SHI Yanling, LU Xinzhi, YU Wengong. A new *β*-agarase from marine bacterium *Janthinobacterium* sp. SY12[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(11): 2659−2664.
[49] ZHANG Weiwei, SUN Li. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 2825−2831.
[50] ZENG Xiaofeng, TIAN Yixiong, KONG Haocun, et al. Catalytic mode and product specificity of an *α*-agarase reveal its direct catalysis for the production of agarooligosaccharides[J]. Foods, 2024, 13(15): 2351.
[51] YOU Yuxian, XIE Wenyan, LI Caiming, et al. Characterization and efficient production of an *α*-agarase from marine bacterium *Catenovulum maritimum* STB14[J]. Food Bioengineering, 2023, 2(1): 3−14.
[52] LONG Jie, YE Ziying, LI Xingfei, et al. Enzymatic preparation and potential applications of agar oligosaccharides: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(17): 5818−5834.
[53] 解文嫣, 尤钰娴, 班宵逢, 等. 海洋来源琼胶酶研究进展[J]. 未来食品科学, 2022(1): 23−36. [XIE Wenyan, YOU Yuxian, BAN Xiaofeng, et al. Research progress of agarase from marine sources[J]. Future Food Science, 2022(1): 23−36.]
[54] XU Jingnan, CUI Zibo, ZHANG Weibin, et al. Characterizing of a new *α*-agarase AgaE from *Thalassomonas* sp. LD5 and probing its catalytically essential residues[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 50−57.
[55] YUAN Dezhi, LÜ Hua, WANG Tiantian, et al. Biochemical characterization and key catalytic residue identification of a novel alpha-agarase with CBM2 domain[J]. Food Chemistry, 2023, 20: 100915.
[56] JIANG Chengcheng, CHENG Danyang, LIU Zhen, et al. Advances in agaro-oligosaccharides preparation and bioactivities for revealing the structure-function relationship[J]. Food Research International, 2021, 145: 110408.