



# 一株糖降解噬糖菌 FZY0027 的多糖水解活性及基因组分析

傅子玥<sup>1</sup>, 张道锋<sup>1\*</sup>, 黄梦涵<sup>1</sup>, 李敬霖<sup>1</sup>, 苏浩辰<sup>1</sup>, 李文均<sup>1,2,3\*</sup>

1 河海大学海洋学院 海洋生物研究所, 江苏 南京 210098

2 中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275

3 中国科学院新疆生态与地理研究所 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

傅子玥, 张道锋, 黄梦涵, 李敬霖, 苏浩辰, 李文均. 一株糖降解噬糖菌 FZY0027 的多糖水解活性及基因组分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1593-1606.

FU Ziyue, ZHANG Daofeng, HUANG Menghan, LI Jinglin, SU Haochen, LI Wenjun. Polysaccharide hydrolysis activity and genomic information of *Saccharophagus degradans* FZY0027[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1593-1606.

**摘要:**【目的】潮间带海水中分离获得一株具有水解多糖能力的菌株 FZY0027, 分析其对不同多糖的水解能力和基因组特征。【方法】通过形态观察、16S rRNA 基因测序和基于 Illumina NovaSeq 和 Oxford Nanopore PromethION 测序技术全基因组测序对菌株 FZY0027 进行鉴定。使用 dbCAN、EasyCGTree、BRIG 和 Easyfig 等生物信息学软件将菌株 FZY0027 和降解糖噬糖菌(*Saccharophagus degradans*) 2-40<sup>T</sup> 进行比较。使用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定多糖水解活性。【结果】菌株 FZY0027 与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因序列相似度达到 99.9%, 初步鉴定为降解糖噬糖菌(*S. degradans*) FZY0027。该菌株在水解淀粉、木聚糖和甘露聚糖时产生的还原糖浓度最高, 分别为 2.28、1.75 和 1.10 mg/mL。菌株 FZY0027 基因组全长 5 178 381 bp, 共编码 4 156 个基因, G+C 含量为 45.8%。菌株 FZY0027 与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)、平均氨基酸一致性(average amino acid identity, AAI)和 DNA-DNA 分子杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)值分别为 96.5%、96.7%和 70.0%。经碳水化合物活性酶数据库注释获得 303 个基因, 其中, 菌株 FZY0027 和 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 分别有糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)结构域的基因 137 个和 130 个。菌株 FZY0027 具有多个参与淀粉、木聚糖等多糖水解的基因, 这与菌株 FZY0027 对淀粉和木聚糖的水解能力强的结果一

资助项目: 国家自然科学基金(31900001); 江苏省海洋科技创新项目(JSZRHYKJ202209)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31900001), and the Innovation Project for Marine Science and Technology of Jiangsu Province (JSZRHYKJ202209).

\*Corresponding authors. E-mail: LI Wenjun, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; ZHANG Daofeng, zdf@hhu.edu.cn

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-02-07; Published online: 2024-02-21

致。然而，与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 相比，菌株 FZY0027 在实验条件下只能水解少数多糖，这可能需要特定的诱导条件才能充分发挥其多糖水解能力。【结论】菌株 FZY0027 是一株多能型多糖水解菌，具有潜在开发价值。

关键词：降解糖噬糖菌；多糖水解活性；基因组；生物信息学分析

## Polysaccharide hydrolysis activity and genomic information of *Saccharophagus degradans* FZY0027

FU Ziyue<sup>1</sup>, ZHANG Daofeng<sup>1\*</sup>, HUANG Menghan<sup>1</sup>, LI Jinglin<sup>1</sup>, SU Haochen<sup>1</sup>, LI Wenjun<sup>1,2,3\*</sup>

1 Institute of Marine Biotechnology and Bio-resource Utilization, College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210098, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Pest Biocontrol and Resource Utilization, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

3 State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang, China

**Abstract:** [Objective] To analyze the polysaccharide hydrolysis activity and genomic characteristics of a Gram-negative bacterial strain FZY0027 isolated from intertidal seawater. [Methods] The strain FZY0027 was identified based on the morphological characteristics, 16S rRNA gene sequence, and the whole genome sequence determined by Illumina NovaSeq and Oxford Nanopore PromethION. Bioinformatics tools such as dbCAN, EasyCGTree, BRIG, and Easyfig were used to compare the strain FZY0027 with *Saccharophagus degradans* 2-40<sup>T</sup>. The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method was employed to measure the polysaccharide hydrolysis activity of strain FZY0027. [Results] The 16S rRNA gene sequence showed the similarity of 99.9% between strain FZY0027 and *S. degradans* 2-40<sup>T</sup>, and thus strain FZY0027 was preliminarily identified as *S. degradans* FZY0027. The highest levels of reducing sugars (2.28, 1.75, and 1.10 mg/mL, respectively) were produced by FZY0027 through the hydrolysis of starch, xylan, and mannose. The genome of strain FZY0027 was 5 178 381 bp, encoding a total of 4 156 genes, with the G+C content of 45.8%. The average nucleotide identity (ANI), average amino acid identity (AAI), and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) values between strain FZY0027 and *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> were 96.5%, 96.7%, and 70.0%, respectively. A total of 303 genes were annotated in the Carbohydrate-Active Enzyme database, and there was a significant difference in the number (137 and 130, respectively) of genes encoding glycoside hydrolases (GHs) between strain FZY0027 and *S. degradans* 2-40<sup>T</sup>. Strain FZY0027 carried multiple genes involved in the hydrolysis of starch and xylan, which was corresponding to its strong ability to hydrolyse starch and xylan. However, compared with *S. degradans* 2-40<sup>T</sup>, strain FZY0027 could only hydrolyse a few polysaccharides under the experimental conditions in this study, which suggested that this strain may require specific culture conditions to fully exert its polysaccharide hydrolysis ability.

**[Conclusion]** Strain FZY0027 is a versatile polysaccharide-hydrolyzing bacterium with the potential for bioresource utilization.

**Keywords:** *Saccharophagus degradans*; polysaccharide hydrolysis activity; genome; bioinformatics analysis

多糖水解后形成的寡糖不仅溶解性好, 而且具有更好的生物活性, 易于被机体吸收利用, 一直是糖化学、糖生物学及糖药物学的研究热点<sup>[1]</sup>。筛选能高效水解多糖的微生物及酶类, 是提高生物质多糖利用效率及实现资源转化的重要途径之一。降解糖噬糖菌(*Saccharophagus degradans*)是一种革兰染色阴性好氧细菌, 属于 $\gamma$ -变形菌门, 能够分解利用藻类和高等植物材料, 也是目前所报道的水解多糖种类最多的海洋微生物之一, 被誉为“超级降解者”<sup>[2-3]</sup>。噬糖菌的标准菌株 2-40<sup>T</sup>具有高产极端酶的能力, 例如其分泌的 $\beta$ -琼脂酶( $\beta$ -agarase, EC 3.2.1.81) Aga50D具有一定的冷适性和耐碱性, 酶的最适温度为 30 °C<sup>[4]</sup>。*S. degradans* 2-40<sup>T</sup>分解琼脂的机制是采用 5 种 $\beta$ -琼脂酶(Aga50A、Aga16B、Aga86C、Aga50D 和 Aga86E<sup>[4-5]</sup>)以及新琼脂二糖水解酶 Aga117F<sup>[6]</sup>。有关 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup>的琼脂酶、几丁质酶和藻蛋白酶系统已被广泛研究, 如能够破坏植物细胞壁上聚合物的纤维素水解酶和水解琼脂获得单糖的 $\alpha$ -新琼脂二糖水解酶等<sup>[7]</sup>。虽然在 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup>全基因组中发现了多达 130 种含有糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)结构域的编码基因, 但目前仅有少数基因的功能得到实验验证<sup>[3]</sup>。另外, *S. degradans* 作为聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)的可持续生产者, 可以利用海藻酸盐作为碳源, 在海藻酸盐固定化微藻(alginate immobilized microalgae, AIM)废水处理过程中制备 PHB<sup>[8]</sup>。此外, *S. degradans* 也可以利用褐藻生产 PHB 和还原糖, 为生产更加廉价且丰富的

PHB 提供了可能<sup>[9]</sup>。

除了菌株 2-40<sup>T</sup>之外, 从韩国济州岛南海岸采集的海藻(*Gelidium amansii*)中分离的噬糖菌 AG21 含有新型 $\beta$ -琼脂酶基因 *agy1*, 与菌株 2-40<sup>T</sup>的 Aga16B 一致性为 93.7%, 其蛋白产物 Agy1 属于 GH16 (glycosyl hydrolase family 16)家族, 水解琼脂糖的产物主要为新琼脂六糖和新琼脂四糖<sup>[10]</sup>。从日本富山湾的沉积物中分离的噬糖菌 Myt-1, 含有新型的嗜碱性藻酸盐裂解酶 AlgMytC, 属于 PL7 (polysaccharide lyase family 7)家族成员, AlgMytC 与菌株 2-40<sup>T</sup>的 Alg7A 氨基酸序列一致性为 95.9%, 但在碱性环境(pH 8.5–10.0)中表现出较强的酶活力<sup>[11]</sup>。由此可见, *S. degradans* 在多糖水解领域具有重要的研究价值。在进行江苏滩涂可培养细菌资源调查过程中, 从盐城大丰区潮间带的表层海水中获得一株降解糖噬糖菌, 编号为 *S. degradans* FZY0027。基于降解糖噬糖菌的广谱降解活性和优良的应用潜能, 本研究对菌株 FZY0027 进行多糖水解活性测定和基因组分析, 以评估其应用潜力。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品和培养基

分离筛选菌种的环境样品采自中国黄海的盐城大丰区(33°6′59″N, 120°51′9″E), 为潮间带表层海水。使用灭菌的 2.5%海盐水溶液(质量体积分数)将样品稀释至 10<sup>-3</sup>, 取 50  $\mu$ L 涂布于添加 2.5%海盐的 R2A [碧迪医疗器械(上海)有限公司, 下文简称 R2A]琼脂培养基上。置于 28 °C 培养 7 d 后, 发现培养基表面形成一些琼脂降解坑

洞, 肉眼可见坑洞内非单一培养物。

将坑洞内的培养物梯度稀释至  $10^{-5}$  后均匀涂布于 R2A 固体培养基上, 置于 28 °C 恒温培养 5 d。随后, 挑取菌落形态不同的菌株, 在 R2A 平板上进行划线纯化培养。获得菌株 FZY0027 后, 放置 4 °C 保存备用, 并刮取适量菌落于 1 mL 的 0.5% 二甲基亚砷中搅拌均匀, 置于 -80 °C 保藏。

## 1.2 菌株的鉴定

### 1.2.1 菌株的形态学观察

菌株在 R2A 琼脂培养基、R2A 琼脂糖培养基、2216E 琼脂培养基(北京索莱宝科技有限公司)和 2216E 琼脂糖培养基上 3 d 后观察培养特征, 其中琼脂和琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司]的添加量分别为 10% 和 15%。使用革兰氏染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行革兰氏染色测试。通过透射电镜观察细胞形态(镇江专博检测科技有限公司)。

### 1.2.2 菌株的 16S rRNA 基因鉴定

按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]操作说明提取细菌基因组 DNA。以所提出的基因组 DNA 为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增<sup>[12]</sup>, 引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGCTACCTGT TACGACTT-3') 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR Master (B532081) 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, DNA 模板 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 100 s, 共 34 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物, 在含有 SuperRed/GelRed 核酸染料的 0.8% 琼脂糖凝胶上, 160 V 电泳 20 min, 并在凝胶成像仪下观察拍照。16S rRNA 基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 将所得序列与 NCBI BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中的参比序列进行比对, 使用 MEGA X 软件进行多重序列比对和系统发育分析<sup>[13]</sup>。采用 Kimura 双参数模型计算遗传距离<sup>[14]</sup>, 以邻接(neighbour-joining, NJ)法构建系统进化树<sup>[15]</sup>, bootstrap 置信值估算重复 1 000 次<sup>[16]</sup>。

### 1.3 菌株 FZY0027 基因组测序

将菌株接种到 2216E 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 72 h 后收集菌体。基因组 DNA 的提取和测序由武汉贝纳科技有限公司完成, 使用 Illumina NovaSeq 6000 测序仪进行二代测序和 Oxford Nanopore PromethION 测序仪进行实时单分子测序(三代测序), 基因组测序结果利用 Unicycler (v1.0) 进行组装<sup>[17-18]</sup>。

将基因组数据提交到 GenBank 并使用 NCBI 的 PGAP<sup>[19]</sup> ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)) 和 eggNOG (<https://eggnog-mapper.embl.de/>) 在线工具对基因组进行注释<sup>[20]</sup>。选择 120 个高度保守管家基因<sup>[21]</sup>, 使用 EasyCGTree 软件包(<https://github.com/zdf1987/EasyCGTree4>) 构建菌株 FZY0027 的 bac120 系统发育树<sup>[22]</sup>, 通过 iTOL 在线工具(<https://itol.embl.de/>) 对系统发育树的结果进行可视化展示。使用 Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 在线工具 (<https://ggdc.dsmz.de>) 计算菌株 FZY0027 与近缘菌株间的数字化 DNA-DNA 分子杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH) 值<sup>[23]</sup>。使用 Kostas Lab 的在线工具(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g>) 计算菌株间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI) 和平均氨基酸一致性(average amino acid identity, AAI)<sup>[24]</sup>。

### 1.4 多糖水解活性的测定

为检测胞外多糖水解酶的活性, 将分离的细菌接种到添加 0.5% (质量体积分数) 复合多糖淀

粉和羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)的改良基础盐培养基(minimal basal medium, MBM) (g/L)中: 蛋白胨 10.0, 琼脂 15.0, 海盐 25.0, pH 7.2。对于琼胶酶活性检测, 以 R2A (每升添加 25 g 海盐)或 2216E 为基础培养基添加终浓度为 1.0% (质量体积分数)的琼胶糖或 1.5% (质量体积分数)琼脂为碳源物质。将接种后的平板在 28 °C 下孵育 4 d, 染色后细菌培养物周围形成晕圈, 表明了相应酶的产生<sup>[25]</sup>。为了进一步测试菌株 FZY0027 对不同物质来源多糖的利用情况, 将 100  $\mu$ L 麦氏浊度为 0.5 的菌悬液, 接种到 10 mL 多糖培养基中: 以 R2A (每升添加 25 g 海盐)为基础培养基加上终浓度为 0.2% (质量体积分数)的多糖物质, 测试菌株的碳源利用谱<sup>[26]</sup>。测试的碳源有: 淀粉、海藻酸钠、木聚糖、甘露聚糖、壳聚糖、几丁质、微晶纤维素、琼胶、琼胶糖、卡拉胶、黄原胶、果胶和硫酸软骨素。28 °C 振荡培养一周, 8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定上清液中还原糖的含量以反映对多糖的水解能力<sup>[27]</sup>。反应体系: 上清液 1 mL, DNS 显色剂 2 mL, 经过 5 min 沸水浴终止反应, 冰水冷却后定容至 15 mL, 测定 540 nm 处吸光度值。每组实验设置 3 个重复, 不接种菌悬液的多糖培养基为空白对照。

### 1.5 碳水化合物活性酶注释

菌株 FZY0027 中的碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes) 通过 CAZy 数据库和 NCBI 数据库对比获得。CAZy (<http://www.cazy.org/>)属于专用功能数据库<sup>[28]</sup>, 是关于能够合成或分解复杂碳水化合物和糖复合物的酶类的一个数据库资源。该数据库将碳水化合物活性酶分成了六大类: 糖苷水解酶类(glycoside hydrolases, GHs)、糖苷转移酶类

(glycosyl transferases, GTs)、多糖裂解酶类(polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶类(carbohydrate esterases, CEs)、辅助模块酶类(auxiliary activities, AAs)与碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs)。利用 dbCAN<sup>[29-30]</sup> (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>)在线工具将 FZY0027 的编码基因氨基酸序列与 CAZy 数据库进行比对注释; 选取 HMMER<sup>[31]</sup>软件为比对工具, 取  $E$ -value $<1E-15$  的注释结果。

### 1.6 基因组的生物信息学分析

根据 CAZy 数据库注释结果, 分析菌株 FZY0027 与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 参与水解琼胶多糖相关酶的结构域, 以分析两者的多糖水解潜能差异。使用软件 BRIG (v0.95) (<https://sourceforge.net/projects/brig/>)<sup>[32]</sup>进行基因组特征分析, 选用 BLAST-2.9.0+<sup>[33]</sup>作为基因组序列比对的工具( $E$ -value 设为  $1E-10$ , 一致性阈值为 50%)。以菌株 FZY0027 的基因组作为参考序列, 并以标准菌株 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 作为对比序列, 将 GenBank 格式的基因组文件输入 BRIG 软件, 构建基因组圈图。使用软件 Easyfig (<http://easyfig.sourceforge.net/>)<sup>[34]</sup>对菌株 FZY0027 和 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 进行基因组共线性可视化分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离和鉴定

菌株 FZY0027 为革兰氏阴性菌, 划线接种至 R2A 平板并置于 28 °C 培养 72 h 后, 菌落呈圆形, 红色(图 1A); 划线接种至 2216E 平板并置于 28 °C 培养 72 h 后, 菌落呈圆形, 黑色, 且出现明显琼脂分解现象(图 1B)。在透射电镜下, 菌株 FZY0027 的细胞呈杆状, 其大小为(2.5–3.5)  $\mu$ m $\times$ (0.8–1.2)  $\mu$ m, 有端生鞭毛, 表面有大量囊泡(图 1C)。经 PCR 扩增、序列测定和拼接后获得菌株

FZY0027 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 355 bp, 该序列的 GenBank 登录号为 OR502370。根据 NCBI 比对的结果, 与菌株 FZY0027 的 16S rRNA 基因序列相似度最高的菌株有: 噬糖菌属 (*Saccharophagus* sp.) AG21 (99.9%)、*S. degradans* 2-40<sup>T</sup> (99.9%)、*Saccharophagus* sp. Myt-1 (99.9%)、Gamma proteobacterium R001 (99.9%)、*S. degradans* HME8281 (99.9%)、*Saccharophagus* sp. HK-S109 (99.9%) 和 *Saccharophagus* sp. MM1-2b (98.8%)。使用洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) ATCC 25416<sup>T</sup> (GenBank 登录号为 AF097530) 作为外支, 基于 16S rRNA 基因采用 NJ 法构建的系统发育树, 菌株

FZY0027 与 *Saccharophagus* sp. Myt-1、*S. degradans* 2-40<sup>T</sup>、*Saccharophagus* sp. AG21、Gamma proteobacterium R001、*S. degradans* HME8281 和 *Saccharophagus* sp. HK-S109 聚集在一起, 形成了确定的单系进化支, 且该支自举值为 100% (图 1D)。因此, 菌株 FZY0027 初步鉴定为降解糖噬糖菌, 命名为 *S. degradans* FZY0027, 属于纤维弧菌科 (*Cellvibrionaceae*)、 $\gamma$ -变形菌门的一员。

## 2.2 菌株水解多糖活性

经卢戈氏碘液染色后, 菌株 FZY0027 在菌落周围形成较大的透明圈 (图 2A、2B)。透明圈产生的原因是卢戈氏碘液能使琼胶多糖染成

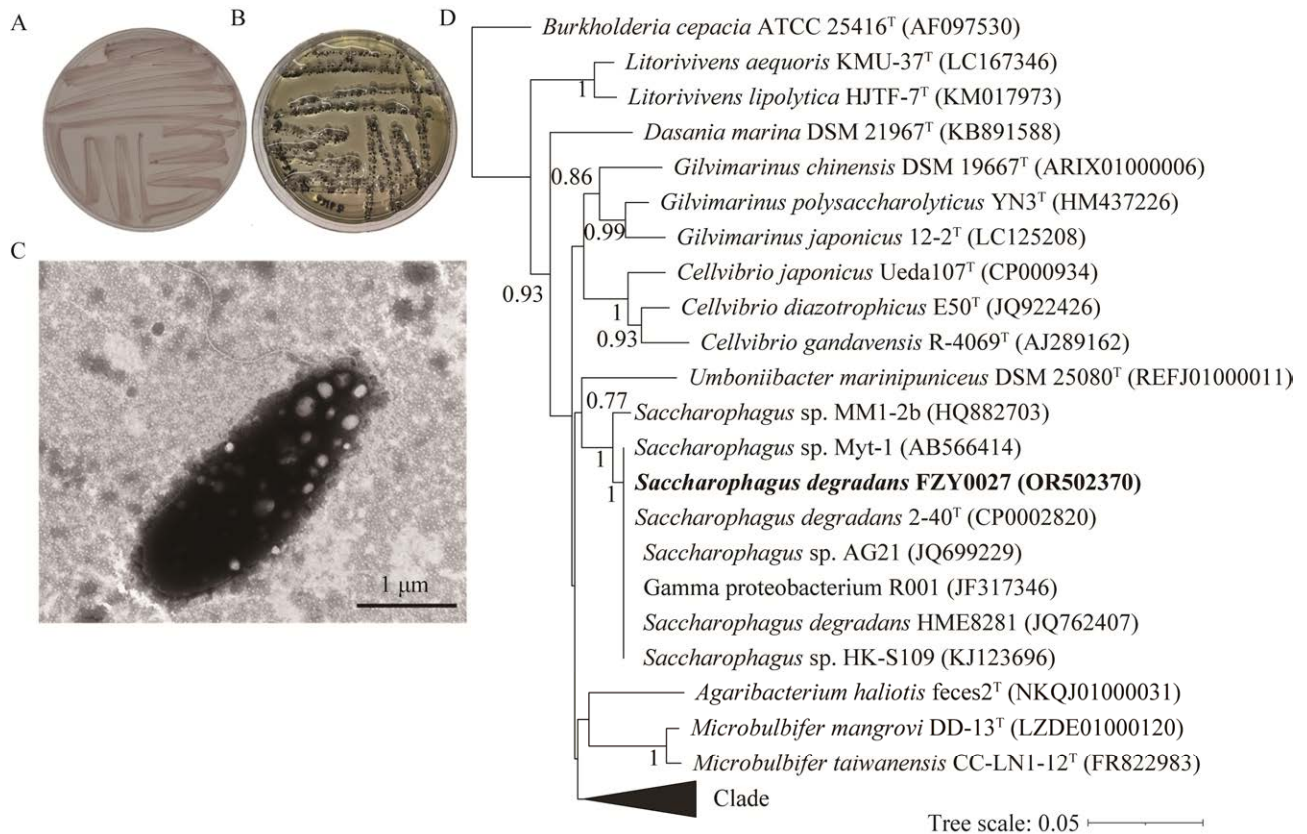


图 1 菌株 FZY0027 的生物学表征和系统发育地位

Figure 1 Biological phenotypes and phylogenetic position of strain FZY0027. A: Colony morphology of strain FZY0027 cultured on R2A medium 28 °C for 3 days. B: Colony morphology of strain FZY0027 cultured on 2216E medium 28 °C for 3 days. C: Transmission electron micrograph showing the cell morphology of strain FZY0027 cultured on 2216E medium 28 °C for 3 days; Bar: 1 μm. D: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain FZY0027.



深棕色而不能使琼胶水解后产生的琼胶寡糖着色<sup>[35]</sup>。含有底物 CMC 的细菌培养物(图 2C)用刚果红溶液淹没 1 h 后, 通过加入 1.5 mol/L NaCl 冲洗平板以检测区域<sup>[36]</sup>, 在菌落周围形成清晰晕圈被认为是水解多糖阳性; 当在含有底物如淀粉(图 2D)和琼胶(图 2E、2F)的平板中用碘溶液淹没时<sup>[37]</sup>, 在培养物周围形成透明区。细菌培养物周围的晕圈的形成暗示了相应酶的产生, 表明菌株 FZY0027 对琼胶糖、淀粉、琼胶和 CMC 具有一定的水解活性。通过 DNS 比色定糖法测定  $OD_{540}$ , 根据半乳糖标准曲线确定反应产生的还原糖含量, 验证菌株 FZY0027 对多糖的水解活性(图 3)。在胞外多糖水解体系中, 菌株 FZY0027 对淀粉的水解能力最强, 产生的还原糖浓度为 2.28 mg/mL, 与对照相比具有极显著性差异, 其次是木聚糖(1.75 mg/mL)、甘露聚糖(1.10 mg/mL)、海藻酸钠(0.41 mg/mL)、果胶(0.22 mg/mL)、硫酸软骨素(0.15 mg/mL)、微晶纤维素(0.12 mg/mL)、几丁质(0.12 mg/mL)、卡拉胶(0.12 mg/mL)、黄原胶(0.11 mg/mL)、壳聚糖(0.11 mg/mL)、琼胶糖(0.08 mg/mL)和琼胶

(0.03 mg/mL)。如图 2 所示, 菌株 FZY0027 对淀粉、木聚糖、甘露聚糖和海藻酸钠表现出较强的多糖水解能力, 且均具有显著差异性, 但无法水解果胶、微晶纤维素、几丁质、卡拉胶、黄原胶、壳聚糖、琼胶糖及琼胶。与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 相比, 菌株 FZY0027 在胞外多糖水解体系中水解多糖产生的还原糖浓度中对淀粉、木聚糖和甘露聚糖的水解能力更强<sup>[26]</sup>, 但 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 对 10 种多糖均表现出水解活性, 而本研究中的菌株 FZY0027 只能水解少数多糖。值得注意的是, 菌株 FZY0027 在固体培养基上表现出较强的琼胶分解能力(图 2B), 但在以琼胶糖为碳源的液体培养基中未表现出水解活性(图 3), 可能是菌体将水解后的琼胶低聚物吸收利用而导致还原糖浓度较低。在  $\beta$ -琼脂糖解途径中, 各种  $\beta$ -琼脂酶首先将琼脂糖聚合物降解为琼胶寡糖, 如新琼脂四糖(neoagarotetraose, NA4)、新加罗己糖(neoagarohexaose, NA6), 随后,  $\beta$ -琼脂酶(GH50 家族)将其降解生成新琼脂二糖(neoagarobiose, NA2), 并最终降解为单糖, 这些单糖被微生物自身利用<sup>[38]</sup>。

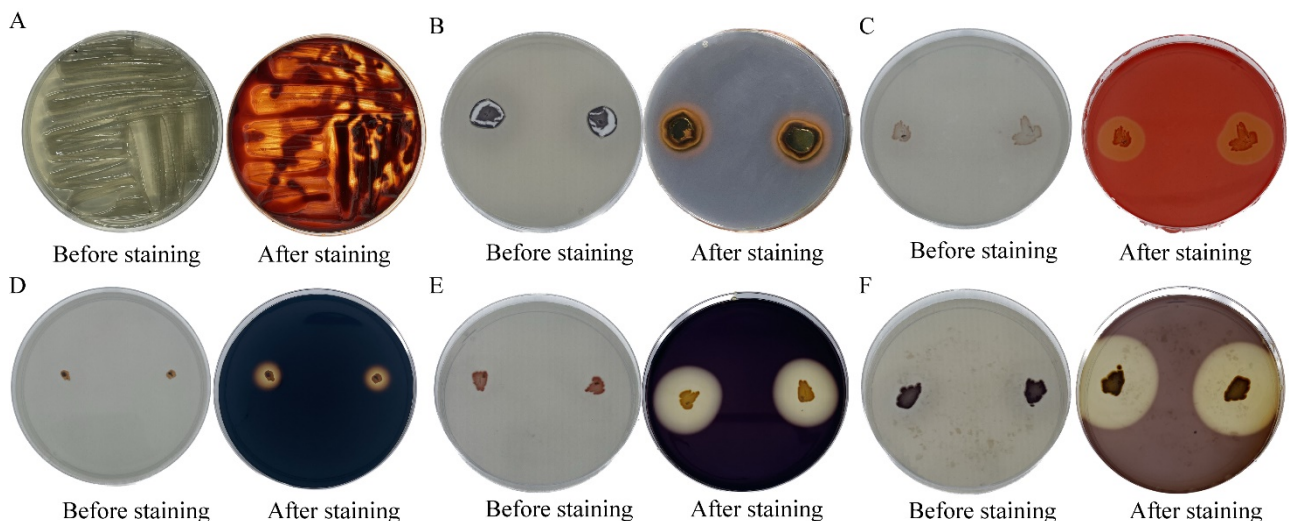


图 2 菌株 FZY0027 的多糖水解染色结果

Figure 2 Results of polysaccharide hydrolysis staining of strain FZY0027. A: 2216E agarose plate (normal streak culture). B: 2216E agarose plate. C: Cellulase agar plate. D: Starch agar plate. E: R2A agar plate. F: 2216E agar plate.

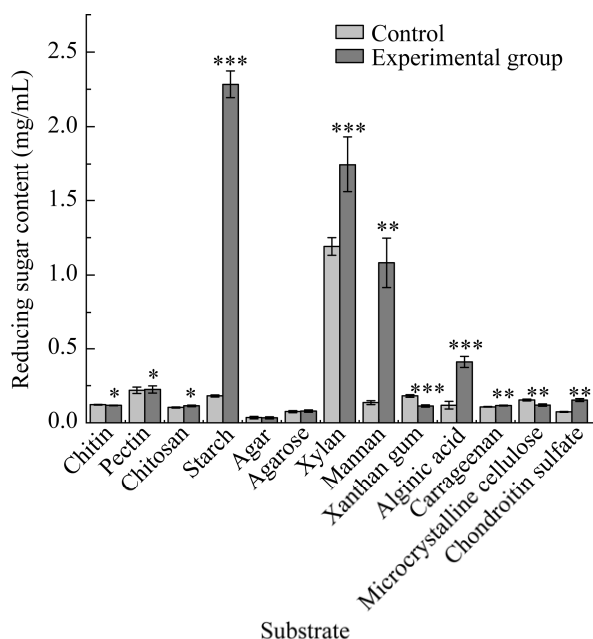


图3 菌株 FZY0027 多糖水解能力验证

Figure 3 The ability of hydrolyzing polysaccharide of strain FZY0027. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.3 菌株 FZY0027 基因组测序结果

菌株 FZY0027 的基因组大小约为 5.2 Mb, 基因组 G+C 含量为 45.8% (图 4)。基因组序列上传至 NCBI, GenBank 登录号为 CP123764、BioProject 登录号为 PRJNA958120、BioSample 登录号为 SAMN34277932。选择 *Cellvibrionaceae* 科中的 12 个菌株和外群 *Burkholderia cepacia* ATCC 25416<sup>T</sup> (AF097530) 基因组构建 bac120 进化树, 结果如图 5 所示。菌株 FZY0027 与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 和 *S. degradans* E3M17 聚集在一起, 自举值为 100%, 这一结果与 16S rRNA 基因系统发育树相近。菌株 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 与 *S. degradans* E3M17 的 ANI、AAI 和 dDDH 值分别为 96.1%、100.0% 和 67.8%, 具有极高的相似度。另外, 菌株 FZY0027 与 *S. degradans* 2-40<sup>T</sup> 和 *S. degradans* E3M17 的 ANI 值分别为 96.5% 和 97.8% (高于物种划分的阈值: 95.0%–96.0%), AAI 值分别为 96.7% 和 97.5% (高于物种划分的

阈值: 95.0%–96.0%), dDDH 值分别为 70.0% 和 79.2% (高于物种划分的阈值: 70.0%), 进一步证明菌株 FZY0027 为降解糖噬糖菌。利用 Easyfig 软件生成基因组圈图, 对 FZY0027 和 2-40<sup>T</sup> 之间的全基因组比较。结果如图 6 所示, 两株菌的基因组具有很强的共线性关系, 未发现明显的基因重排现象, 但是插入、缺失片段现象较为明显。

## 2.4 基因功能注释

### 2.4.1 KEGG 数据库注释

菌株 FZY0027 在 KEGG 数据库中注释获得 2 110 个基因, 占基因总数的 50.8%, 结果如图 7A 所示, 菌株 FZY0027 基因组在 KEGG 注释的基因主要参与六大类型代谢途径: 代谢 (55.9%)、细胞过程 (9.0%)、环境信息处理 (7.9%)、遗传信息处理 (7.2%)、人类疾病 (5.6%) 和生物体系统 (3.8%)。在代谢途径中, 参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因最多, 分别有 228 个和 143 个。参与碳水化合物代谢通路中, 发现 39 个与淀粉多糖和蔗糖代谢相关的基因, 其中 10 个基因被注释到基因家族 K01179 (内聚葡聚糖酶, 可将纤维素分解为纤维糊精后再分解为纤维二糖), 6 个基因被注释到 K05349 ( $\beta$ -葡萄糖苷酶, 可将纤维糊精分解为纤维二糖后再分解为 D-葡萄糖, 或参与将  $\beta$ -D-葡萄糖苷水解为 D-葡萄糖), 4 个基因被注释到 K01176 ( $\alpha$ -淀粉酶, 可将淀粉或糖原水解为葡聚糖); 24 个与果糖和甘露糖代谢相关的基因, 18 个和半乳糖代谢相关的基因。KEGG 数据库注释的结果表明, 菌株 FZY0027 在碳水化合物多糖水解方面显示出巨大的潜力。

### 2.4.2 CAZy 数据库注释

研究表明, CBMs 可以与碳水化合物活性酶的底物结合, 进而提高碳水化合物活性酶的催化活性<sup>[39]</sup>。如图 7B 所示, 菌株 FZY0027 基因组



在 CAZy 数据库中共注释获得 303 个基因, 其中 GHs 基因 137 个, CBMs 基因 67 个, PLs 基因 39 个, GTs 基因 31 个, CEs 基因 22 个, AAs 基因 7 个。尽管在 CAZy 数据库中共注释获得的基因数量差异不大, 甚至 FZY0027 含有更多 GHs 结构域的基因, 但在菌株 FZY0027 中可能存在一些基因未表达出来, 或者需要外界环境因

子的刺激才能发挥更强的水解能力。菌株 FZY0027 在实验室共培养物 L6-3 中能表现出更强的水解活性, 推测菌株 FZY0027 与菌群中某个或某些菌株共同作用时, 可以发挥更强的水解功能。这表明菌株 FZY0027 可能对特定环境条件更为敏感, 需要特定的诱导条件才能充分发挥其多糖水解能力。

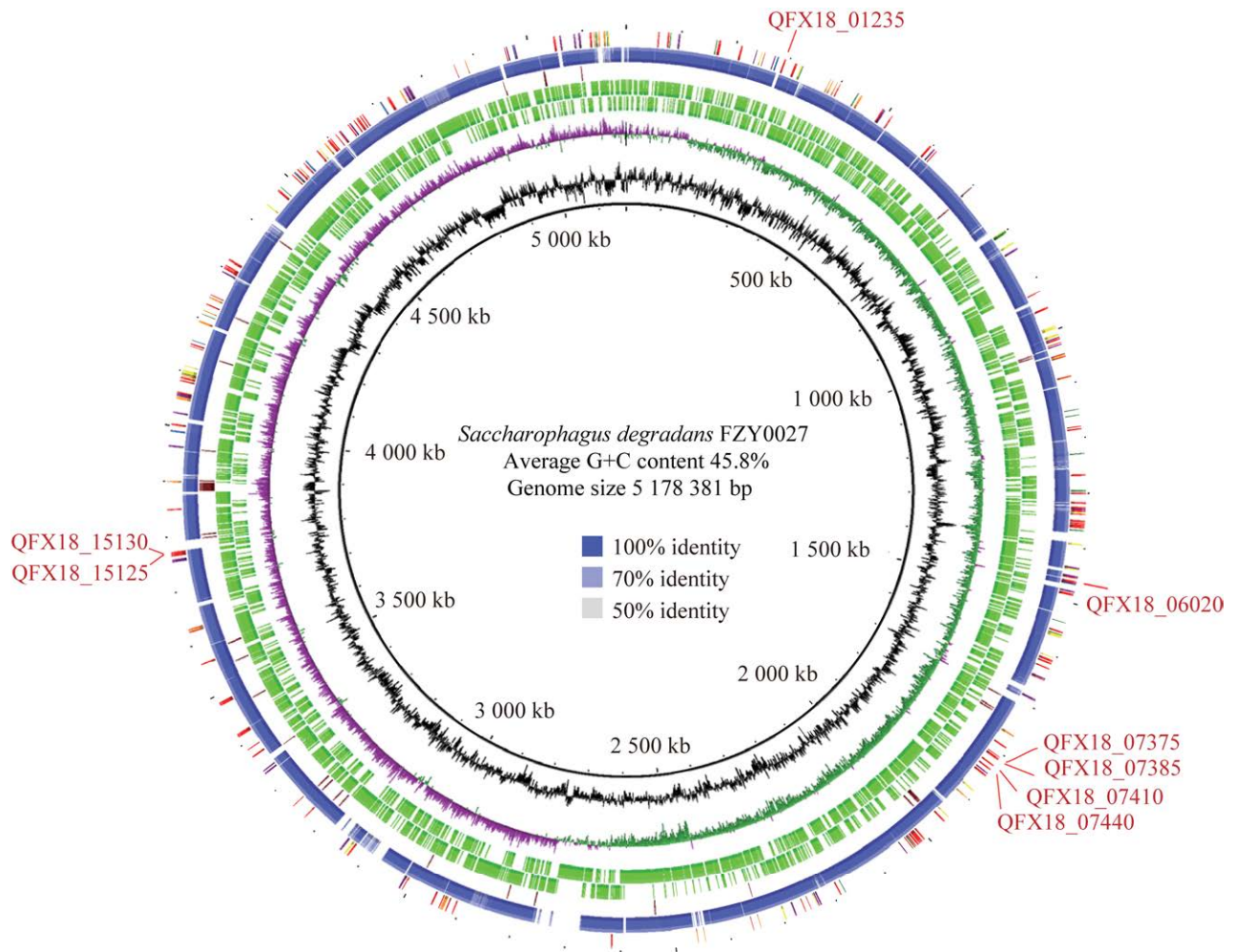


图 4 菌株 FZY0027 与菌株 2-40<sup>T</sup> 的基因组比较圈图

Figure 4 Circular map of the strain FZY0027 genome compared with strain 2-40<sup>T</sup>. From the center to outside: (i) The G+C content; (ii) The G+C skew; (iii) The forward coding genes; (iv) The reverse coding genes; (v) The RNA coding genes; (vi) The homologous region of strain FZY0027 and strain 2-40<sup>T</sup>, and the color indicates the identities; (vii) The annotation results from the CAZymes database, with red indicating GHs, orange indicating GTs, yellow indicating PLs, green indicating CEs, blue indicating AAs, and purple indicating CBMs. The outer labels suggest the locations of genes associated with agarose genes.

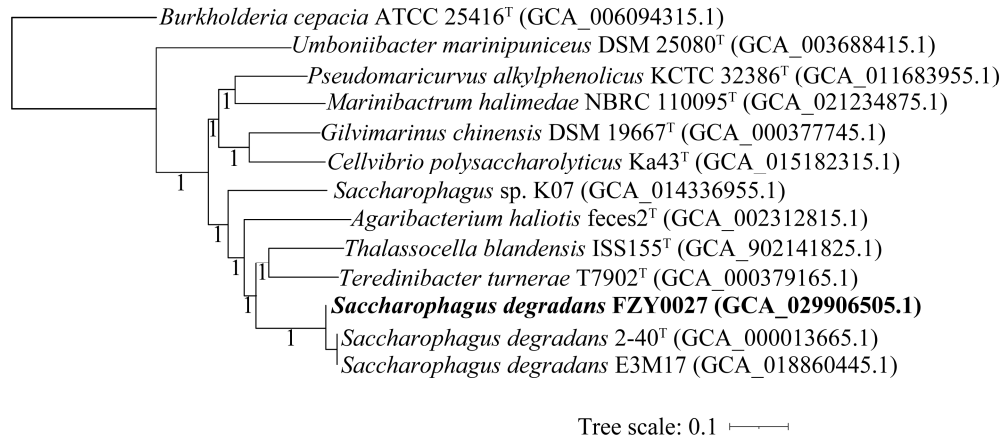


图 5 基于 120 个单拷贝蛋白质序列构建的菌株 FZY0027 最大似然法系统发育树

Figure 5 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on bac 120 gene set of strain FZY0027. Bootstrap values based on 1 000 replicates are shown at the branch points nodes. GenBank assembly accession number is indicated in the bracket. *Burkholderia cepacia* ATCC 25416<sup>T</sup> is used as out group. Bar: 0.1 substitutions per nucleotide position.

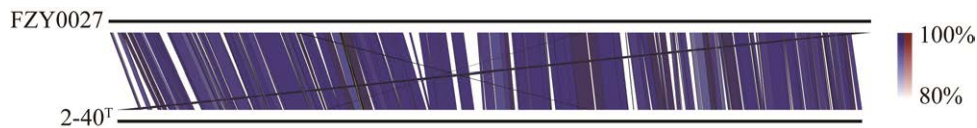


图 6 使用 Easyfig 对菌株 FZY0027 和 2-40<sup>T</sup> 的基因组比较

Figure 6 Genome comparison of strain FZY0027 and 2-40<sup>T</sup> using Easyfig. Vertical blocks between sequences indicate regions of shared similarity shaded according to BLASTn (blue for matches in the same direction or red for inverted matches).

## 2.5 多糖水解酶生物信息学分析

琼胶酶、淀粉酶、纤维素酶等常见的多糖水解酶，主要分布在 GH 家族和 CBM 家族。其中与琼胶糖水解有关的基因主要分布在 GH 家族：2 个属于 GH117 家族的  $\alpha$ -新低聚糖水解酶(EC 3.2.1.159)基因；6 个  $\beta$ -琼胶酶(EC 3.2.1.81)基因，分别属于 GH86 家族(3 个基因)、GH50 家族(2 个基因)和 GH16 家族(1 个)。为了探究菌株 FZY0027 的琼胶糖水解能力，分析参与水解琼胶糖的琼胶酶结构域，并且找出菌株 FZY0027 中与 2-40<sup>T</sup> 起到相似功能的酶和对应的蛋白质序列，从菌株 FZY0027 与 2-40<sup>T</sup> 的注释结果中提取出能够产生以琼胶(寡)糖为底物的酶的蛋白质

序列进行进一步分析。结果如表 1 所示，菌株 FZY0027 含有与菌株 2-40<sup>T</sup> 的 CAZymes 注释结果几乎一致的 6 条蛋白质序列。另外，locus\_tag 为 QFX18\_01235 和 QFX18\_06020 的基因，其预测产物  $\beta$ -半乳糖苷酶对于琼脂糖的水解是必不可少的，主要参与水解  $\beta$ -半乳糖苷键(图 4)。

与淀粉水解有关的基因包括：5 个  $\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)基因，分别属于 GH13 家族(3 个基因)和 CBM20 家族(2 个基因)；2 个属于 GH13 家族的  $\beta$ -淀粉酶(EC 3.2.1.20)基因；1 个属于 GH15 家族的葡聚糖 1,4- $\alpha$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.3)基因；1 个属于 GH13 家族的纤维素酶(EC 3.2.1.41)基因；1 个属于 GH77 家族的 4- $\alpha$ -葡聚糖转移酶

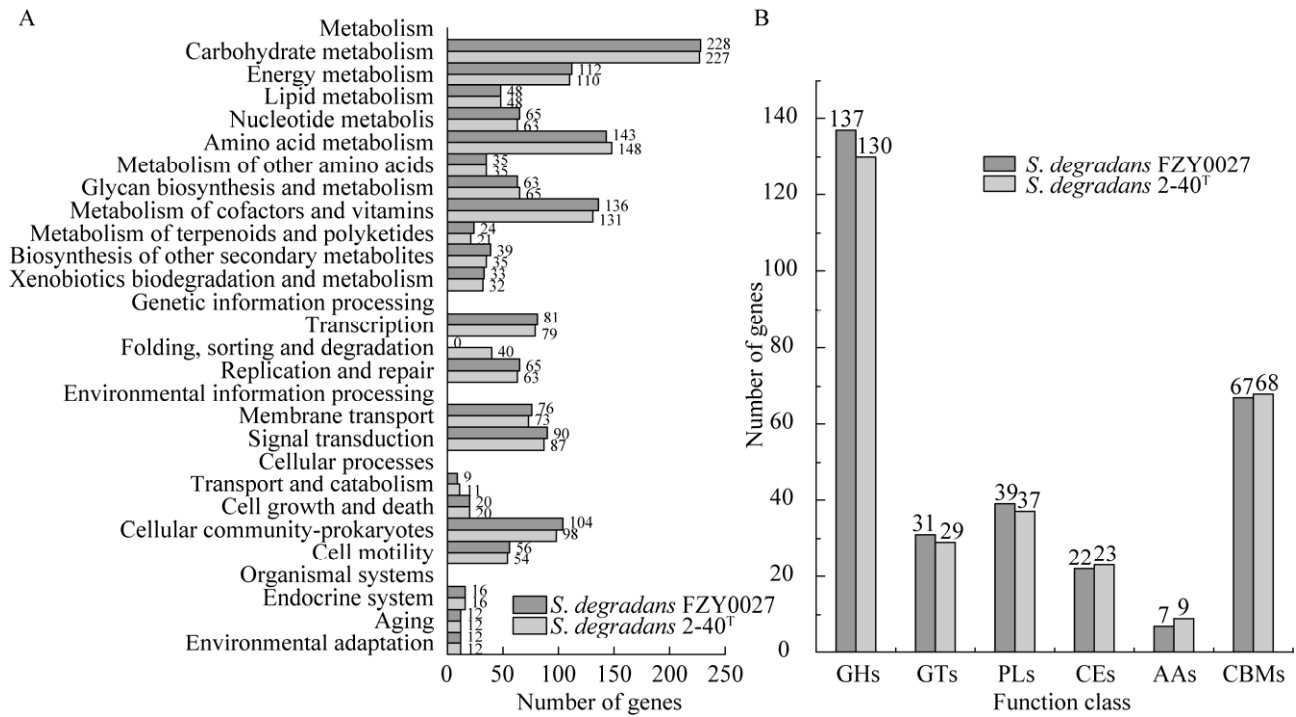


图 7 菌株 FZY0027 与菌株 2-40<sup>T</sup> 相应基因数量统计

Figure 7 Function gene enrichments of strain FZY0027 and strain 2-40<sup>T</sup>. A: Gene function annotation KEGG metabolic pathway classification map. B: Functional classification of carbohydrate-active enzymes.

表 1 菌株 FZY0027 与 *Saccharophagus degradans* 2-40<sup>T</sup> 中的琼胶酶基因生物信息学分析

Table 1 Bioinformatics analysis of agarose genes in strains FZY0027 and *Saccharophagus degradans* 2-40<sup>T</sup>

Strain	Locus_tag/ Protein ID	EC	HMMER	Substrate	Signal peptide
FZY00027	QFX18_15130	3.2.1.81 3.2.1.178	GH16_16 (44–290)+CBM6 (348–458)+CBM6 (494–605)	Agarose	Y (1–20)
	QFX18_15125	3.2.1.81	GH50 (93–771)	Agarose	Y (1–24)
	QFX18_07410	3.2.1.81	GH86 (141–776)	Agarose	Y (1–24)
	QFX18_07385	3.2.1.81	GH86 (662–895)+GH86 (928–1343)	Agarose	Y (1–44)
	QFX18_07440	3.2.1.81	GH50 (91–780)	Agarose	N
	QFX18_07375	3.2.1.159	GH117 (57–186)+GH117 (180–265)	Neoagaro-oligosaccharide	N
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40 <sup>T</sup>	WP_216062919.1	3.2.1.81 3.2.1.178	GH16_16 (44–290)+CBM6 (317–458)+CBM6 (494–605)	Agarose	Y (1–20)
	WP_216062918.1	3.2.1.81	GH50 (93–771)	Agarose	Y (1–24)
	WP_216065830.1	3.2.1.81	GH86 (141–776)	Agarose	Y (1–24)
	WP_216065835.1	3.2.1.81	GH86 (644–877)+GH86 (910–1325)	Agarose	Y (1–30)
	WP_216065825.1	3.2.1.81	GH50 (98–787)	Agarose	N
	WP_216065837.1	3.2.1.159	GH117 (57–188)+GH117 (180–265)	Neoagaro-oligosaccharide	N

(EC 2.4.1.25)。与木聚糖水解有关的基因包括 5 个属于 GH43 家族的木聚糖结合结构域的基因；属于 CBM2 家族的 1 个木聚糖特异性内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EC 3.2.1.151)基因和 1 个溶解纤维素单加氧酶(EC 1.14.99.54)基因；1 个属于 CBM6 家族的果胶裂解酶(EC 4.2.2.2)基因；2 个属于 CBM11 家族的葡萄糖醛酸特异性藻酸酶(EC 4.2.2.3)和顺丁烯二酸水合酶(EC 4.2.2.11)基因；2 个木聚糖 1,4- $\beta$ -木糖苷酶(EC 3.2.1.37)基因，分别属于 GH3 家族和 GH43 家族；2 个属于 CE2 家族的乙酰基丙烷酯酶(EC 3.2.1.72)基因；2 个属于 GH67 家族的木聚糖  $\alpha$ -1,2-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.131)基因；4 个属于 CBM6 家族的葡聚糖内切 1,3- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.39)和葡聚糖内切 1,6- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.75)基因；10 个纤维素酶(EC 3.2.1.4)基因，分别属于 CBM2 家族(4 个基因)、CBM6 家族(5 个基因)和 GH5 家族(1 个基因)；17 个内切 1,4- $\beta$ -木聚糖酶(EC 3.2.1.131)基因，分别属于 CBM2 家族(2 个基因)、CBM6 家族(7 个基因)、CBM35 家族(2 个基因)、CBM60 家族(2 个基因)、GH10 家族(3 个基因)和 GH11 家族(1 个基因)。CAZY 数据库注释结果表明，菌株 FZY0027 具有多个参与淀粉、木聚糖等多糖水解的基因，这与前面在胞外多糖水解体系中，菌株 FZY0027 对淀粉和木聚糖的水解能力较强的结果一致。

### 3 结论

本研究结果表明，菌株 FZY0027 是一株多能型多糖水解菌，对淀粉、木聚糖和甘露聚糖具有较强的水解活性，并含有多种参与多糖水解的基因，包括琼胶酶、淀粉酶、纤维素酶等，这些基因主要分布在 GH 家族和 CBM 家族中。菌株 *S. degradans* FZY0027 能够为多糖水解菌的开发利用提供一种新颖的研究材料。

### 参考文献

- [1] 孙冲, 姚昱锟, 方婷, 李长城. 海洋寡糖制备工艺及生物活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 446-453.  
SUN C, YAO YK, FANG T, LI CC. Research progress on preparation process and biological activity of marine oligosaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(18): 446-453 (in Chinese).
- [2] WEINER RM, TAYLOR LE, HENRISSAT B, HAUSER L, LAND M, COUTINHO PM, RANCUREL C, SAUNDERS EH, LONGMIRE AG, ZHANG HT, BAYER EA, GILBERT HJ, LARIMER F, ZHULIN IB, EKBORG NA, LAMED R, RICHARDSON PM, BOROVOK I, HUTCHESON S. Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40<sup>T</sup>[J]. *PLOS Genetics*, 2008, 4(5): e1000087.
- [3] HUTCHESON SW, ZHANG H, SUVOROV M. Carbohydrase systems of *Saccharophagus degradans* degrading marine complex polysaccharides[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(4): 645-665.
- [4] KIM HT, LEE S, LEE D, KIM HS, BANG WG, KIM KH, CHOI IG. Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type  $\beta$ -agarase producing neoagarobiose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1): 227-234.
- [5] EKBORG NA, TAYLOR LE, LONGMIRE AG, HENRISSAT B, WEINER RM, HUTCHESON SW. Genomic and proteomic analyses of the agarolytic system expressed by *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3396-3405.
- [6] LEE S, LEE JY, HA SC, JUNG J, SHIN DH, KIM KH, CHOI IG. Crystallization and preliminary X-ray analysis of neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2009, 65(Pt12): 1299-1301.
- [7] JANG WY, KWON MJ, KIM KY, KIM YH. Enzymatic characterization of a novel recombinant 1,3- $\alpha$ -3,6-anhydro-L-galactosidase specific for neoagarobiose hydrolysis into monosaccharides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(11): 4621-4634.
- [8] HU XJ, MENESES YE, STRATTON J, HUO SH. Direct processing of alginate-immobilized microalgae

- into polyhydroxybutyrate using marine bacterium of *Saccharophagus degradans*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 126898.
- [9] KARGUPTA W, KAFLE SR, LEE Y, KIM BS. One-pot treatment of *Saccharophagus degradans* for polyhydroxyalkanoate production from brown seaweed[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 385: 129392.
- [10] LEE Y, OH C, de ZOYSA M, KIM H, WICKRAMAARACHCHI WDN, WHANG I, KANG DH, LEE J. Molecular cloning, overexpression, and enzymatic characterization of glycosyl hydrolase family 16  $\beta$ -agarase from marine bacterium *Saccharophagus* sp. AG21 in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(7): 913-922.
- [11] SAKATOKU A, TANAKA D, NAKAMURA S. Purification and characterization of an alkaliphilic alginate lyase AlgMytC from *Saccharophagus* sp. Myt-1[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 23(6): 872-877.
- [12] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [13] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [14] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [15] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [17] NURK S, BANKEVICH A, ANTIPOV D, GUREVICH AA, KOROBAYNIKOV A, LAPIDUS A, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN A, SIROTKIN A, SIROTKIN Y, STEPANAUSKAS R, CLINGENPEEL SR, WOYKE T, MCLEAN JS, LASKEN R, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products[J]. *Journal of Computational Biology*, 2013, 20(10): 714-737.
- [18] OKONECHNIKOV K, GOLOSOVA O, FURSOV M, TEAM TU. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(8): 1166-1167.
- [19] TATUSOVA T, DiCUCCIO M, BADRETDIN A, CHETVERNIN V, NAWROCKI EP, ZASLAVSKY L, LOMSADZE A, PRUITT KD, BORODOVSKY M, OSTELL J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(14): 6614-6624.
- [20] HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, HELLER D, HERNÁNDEZ-PLAZA A, FORSLUND SK, COOK H, MENDE DR, LETUNIC I, RATTEI T, JENSEN LJ, MERING CV, BORK P. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5 090 organisms and 2 502 viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D309-D314.
- [21] PARKS DH, RINKE C, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL PA, WOODCROFT BJ, EVANS PN, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. Recovery of nearly 8 000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 1533-1542.
- [22] ZHANG DF, HE W, SHAO ZZ, AHMED I, ZHANG YQ, LI WJ, ZHAO Z. EasyCGTree: a pipeline for prokaryotic phylogenomic analysis based on core gene sets[J]. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24(1): 390.
- [23] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1): 1-14.
- [24] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [25] VISHNUPRIYA S, JABIR T, ADARSH BM, KATTATHEYIL H, SHAHANA KABEER S, KRISHNAN KP, RADHAKRISHNAN CK, MOHAMED HATHA AA. Diversity of complex polysaccharide degrading bacteria from the sediments of interlinked high Arctic fjords, Svalbard[J]. *Regional Studies in Marine Science*, 2023, 63: 102989.
- [26] ENSOR LA, STOSZ SK, WEINER RM. Expression of multiple complex polysaccharide-degrading enzyme systems by marine bacterium strain 2-40[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, 23(2): 123-126.

- [27] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [28] CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl\_1): D233-D238.
- [29] YIN YB, MAO XZ, YANG JC, CHEN X, MAO FL, XU Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(W1): W445-W451.
- [30] SCHUSTER-BÖCKLER B, BATEMAN A. An introduction to hidden Markov models[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2007, 18: A.3A.1-A.3A.9.
- [31] EDDY SR. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference[J]. *Genome Informatics International Conference on Genome Informatics*, 2009, 23(1): 205-211.
- [32] ALIKHAN NF, PETTY NK, BEN ZAKOUR NL, BEATSON SA. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 1-10.
- [33] ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG JH, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [34] SULLIVAN MJ, PETTY NK, BEATSON SA. Easyfig: a genome comparison visualizer[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(7): 1009-1010.
- [35] 杜宗军, 王祥红, 李筠, 陈吉祥. 琼胶酶研究进展[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(1): 64-67.
- DU ZJ, WANG XH, LI J, CHEN JX. Advance in research of agarase[J]. *Microbiology China*, 2003, 30(1): 64-67 (in Chinese).
- [36] KHANDEPARKER R, VERMA P, MEENA RM, DEOBAGKAR DD. Phylogenetic diversity of carbohydrate degrading culturable bacteria from Mandovi and Zuari estuaries, Goa, west coast of India[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2011, 95(4): 359-366.
- [37] FATURRAHMAN F, MERYANDINI A, JUNIOR MZ, RUSMANA I. Isolation and identification of an agar-liquefying marine bacterium and some properties of its extracellular agarases[J]. *Biodiversitas*, 2011, 12(4): 192-197.
- [38] GAO BL, LI L, WU H, ZHU D, JIN M, QU W, ZENG RY. 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.
- [39] 魏晓凤, 范翰, 马俊, 汪俊卿, 李丕武. 碳水化合物结合结构域的研究进展[J]. *齐鲁工业大学学报*, 2022, 36(2): 13-19.
- WEI XF, FAN H, MA J, WANG JQ, LI PW. Research progress of carbohydrate-binding modules[J]. *Journal of Qilu University of Technology*, 2022, 36(2): 13-19 (in Chinese).