

## 研究报告

## 一株产褐藻胶裂解酶的需钠弧菌筛选及酶解产物分析

孟青, 江波\*, 周力钺, 陈静静, 张涛

江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

孟青, 江波, 周力钺, 陈静静, 张涛. 一株产褐藻胶裂解酶的需钠弧菌筛选及酶解产物分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 421-436

Meng Qing, Jiang Bo, Zhou Licheng, Chen Jingjing, Zhang Tao. Screening of a *Vibrio natriegens* SK42.001 strain for producing alginate lyase and enzymatically degraded product analyses[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 421-436

**摘要:**【背景】褐藻胶裂解酶种类丰富、降解机制多样,是高效环保降解褐藻胶、制备褐藻寡糖的工具酶,成为褐藻植物高值化开发利用的研究热点。【目的】从海泥中筛选获得褐藻胶裂解酶高效产酶菌株,确定菌株发酵产酶最优条件,鉴定和分析酶降解产物,进而解析该酶的降解特性。【方法】以褐藻胶为唯一碳源,从海带养殖场附近海泥中筛选菌株,通过形态学观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列比对进行菌种鉴定。优化发酵培养基并利用筛选菌株进行发酵产酶。利用红外和阴离子交换色谱分析不同程度酶解产物以确定该酶的降解偏好,利用薄层色谱和液相色谱-质谱鉴定酶降解的终产物。【结果】筛选鉴定得到一株产褐藻胶裂解酶的需钠弧菌(*Vibrio natriegens*) SK42.001,最优产酶培养基为海藻酸钠 8.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8.0 g/L、NaCl 30.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.0 mmol/L 和  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10.0 mmol/L,发酵酶活为 $(5.20 \pm 0.14)$  U/mL。菌株所产酶偏好于降解褐藻胶中的古罗糖醛酸片段,并且终产物聚合度较为单一,主要为褐藻三糖。【结论】筛选到褐藻胶裂解酶高效产酶菌株 *Vibrio natriegens* SK42.001,该菌株所产酶具有古罗糖醛酸降解偏好性且可特异性生产褐藻三糖,具有进一步开发用于大规模制备褐藻胶裂解酶或褐藻寡糖生物制品的潜力。

**关键词:** 褐藻胶; 褐藻寡糖; 褐藻胶裂解酶; 需钠弧菌; 降解特性

基金项目: 国家自然科学基金(31871745); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-202103); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX18\_1760)

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31871745); Independent Exploration Program for State Key Laboratory of Food Science and Technology of Jiangnan University (SKLF-ZZB-202103); Research and Innovation Program for Postgraduates in Jiangsu Province (KYCX18\_1760)

\*Corresponding author: E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-07-15; Accepted: 2021-08-08; Published online: 2021-09-24

## Screening of a *Vibrio natriegens* SK42.001 strain for producing alginate lyase and enzymatically degraded product analyses

MENG Qing, JIANG Bo\*, ZHOU Licheng, CHEN Jingjing, ZHANG Tao

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Alginate lyase has various types and degradation mechanisms, and has become a tool for the efficient and environmentally friendly production of alginate oligosaccharides, as well as a research hotspot for high-value development and utilization of algae. [Objective] This study aimed to isolate alginate lyase-producing strains, determine the optimal fermentation conditions for enzyme production, and analyze degradation products to reveal the degradation characteristics of the enzyme. [Methods] The strain was screened from the sea mud near kelp farms using alginate as the sole carbon source, and was identified according to morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA sequence alignment. The fermentation medium was optimized and used for enzyme production. Products at different degradation degrees were analyzed by IR and anion exchange chromatography to explore the degradation preference of the enzyme, and the final products were characterized by TLC and LC-MS. [Results] An alginate lyase-producing *Vibrio natriegens* SK42.001 was screened and identified. The optimized fermentation medium contained 8.0 g/L alginate, 8.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30.0 g/L NaCl, 5.0 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 10.0 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, and the fermentation activity was (5.20±0.14) U/mL. The alginate lyase produced by strain SK42.001 had a preference to degrade guluronic acid blocks, and the final products present a relatively simple degree of polymerization, which were predominantly trisaccharides. [Conclusion] A *V. natriegens* SK42.001 with high yield of alginate lyase was screened. The enzyme produced by the strain has a preference to degrade guluronic acid blocks and specifically produces trisaccharides, which has the potential to be further developed for large-scale production of alginate lyase and alginate oligosaccharide biological products.

**Keywords:** alginate; alginate oligosaccharides; alginate lyase; *Vibrio natriegens*; degradation characteristics

褐藻胶(alginate)由英国化学家 Stanford 在 1881 年从海带里发现,是海带、马尾藻、巨藻等褐藻中的主要结构成分,占到褐藻植物干重的 10%–40%,是褐藻中含量最丰富的多糖物质<sup>[1]</sup>。褐藻胶是由 β-D-甘露糖醛酸(β-D-mannuronic acid, M)和 α-L-古罗糖醛酸(α-L-guluronic acid, G)这 2 种糖单元通过 1,4-糖苷键聚合而成的线性多糖,二者为 C5 位上的差向异构体。褐藻胶

平均分子量为 30–200 kDa,分子中主要存在多聚甘露糖醛酸(poly mannuronic acid, poly-M)、多聚古罗糖醛酸(poly guluronic acid, poly-G)、MG 交替或随机构成的 poly-MG 这 3 种不同结构的片段<sup>[2]</sup>。褐藻酸及其衍生物通称为褐藻胶,市场上的褐藻胶一般指海藻酸钠,因其具有亲水性、稳定性、粘性和安全性等优良性质,已作为稳定剂、增稠剂、凝胶剂等食品工业和

医药领域广泛应用。然而褐藻胶聚合度高、分子量大、粘度高的特性导致其难以被机体吸收利用,一定程度上限制了其作为生理活性成分的应用。褐藻寡糖是褐藻胶降解后的低分子量片段,聚合度在 2-20,平均分子量为 3.0 kDa,水溶性相比褐藻胶有很大提高而粘度明显降低,能克服褐藻胶大分子不能穿过机体各种生物屏障的限制,应用范围更广,并显示出更好的生物活性,如具有降血糖、抗病毒、免疫调节、促进双歧杆菌生长等作用<sup>[3-4]</sup>。

相较于物理降解法和化学降解法,生物酶法降解褐藻胶具有反应温和、操作简便、能耗低、产率高、专一性高、绿色环保等优点。褐藻胶裂解酶(alginate lyase)通过  $\beta$  消除机制断裂褐藻胶分子间的 1,4-糖苷键催化褐藻胶降解,在 4-O 糖苷键糖环上的 C4 和 C5 位之间形成双键,构建含有 4-脱氧-L-erythro-hex-4-烯醇式吡喃糖醛酸的非还原末端<sup>[5]</sup>。褐藻胶裂解酶种类较多并有多种分类方式,根据底物专一性的不同可分为 poly-M 裂解酶(EC 4.2.2.3)、poly-G 裂解酶(EC 4.2.2.11)及可裂解 2 种底物的双功能裂解酶;根据作用方式的不同可分为内切酶和外切酶(外切酶又称寡褐藻胶裂解酶,EC 4.2.2.26),内切酶将褐藻胶降解为小分子寡糖,而外切酶的降解产物则为单糖;根据酶的初级结构,褐藻胶裂解酶被划分在多个多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL)族如 PL5、PL6、PL7、PL14、PL15、PL17 和 PL18 等,比其他多糖裂解酶更加多样化<sup>[6]</sup>。褐藻胶裂解酶来源广泛,主要包括海洋植物、海洋软体动物、细菌和真菌等,由于细菌生长快、产酶量高,相关研究较多,如 *Pseudoalteromonas*<sup>[7]</sup>、*Cobetia*<sup>[8]</sup>、*Vibrio*<sup>[9]</sup>等。然而目前褐藻胶裂解酶制剂产品稀少,开发高效价廉的褐藻胶裂解酶制剂已成为当前的研究热点,筛选高效产酶菌株和表征不同种类的褐

藻胶裂解酶对探究褐藻胶裂解酶多样性以及褐藻胶高值化开发利用具有重要价值。

本研究从海带养殖场附近海泥中筛选分离得到一株产褐藻胶裂解酶的菌株,通过菌株形态、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析进行菌种鉴定,并优化其发酵产酶培养基,分析酶降解产物进而解析酶的降解特性,以期褐藻胶裂解酶和褐藻寡糖的制备和应用研究提供新的资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

本实验所用海泥来源于山东省荣成市海带养殖场附近海域。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

富集培养基(g/L): 海藻酸钠 5.00,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.00, NaCl 30.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, pH 7.5; 筛选培养基在富集培养基的基础上添加 20 g/L 琼脂; 初始发酵培养基与富集培养基相同<sup>[8]</sup>。海藻酸钠、二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 冷冻离心机, Eppendorf 有限公司; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 恒温摇床, 太仓强乐实验设备有限公司; 扫描电镜, HITACHI 公司; 多角度激光光散射凝胶色谱系统, Wyatt 公司; 傅里叶红外光谱仪, Thermo Electron 公司; 阴离子交换色谱, 赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 菌株筛选

取 10 g 样品置于装有 90 mL 无菌水和玻璃珠的 250 mL 摇瓶中, 28 °C、200 r/min 振荡 1 h,

使样品分散均匀。静置 5 min 后取上清液加入装有 50 mL 富集培养基的 250 mL 摇瓶中, 28 °C、200 r/min 条件下摇瓶培养 3 d。含有菌体的培养液梯度稀释后涂布于以海藻酸钠为唯一碳源的筛选培养基上, 28 °C 恒温培养 3 d。平板经 95%乙醇处理, 挑取水解圈较大的菌落在筛选培养基上多次划线进行菌株纯化。纯化后的菌株接种于初始发酵培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶发酵 3 d, 发酵液在 4 °C、6 000×g 离心 10 min, 上清液作为粗酶液测定其中褐藻胶裂解酶酶活力。

### 1.3 菌种鉴定

形态学鉴定及生理生化实验: 对分离筛选到的目标菌株根据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[10]</sup>和《伯杰氏系统细菌学手册》<sup>[11]</sup>进行菌落形态观察和生理生化特征检测。电镜观察: 菌株在发酵培养基中培养后于 6 000×g 离心 10 min 获得细菌细胞, 采用 2.5%戊二醛于 4 °C 下浸泡过夜, 细胞用 100 mmol/L 磷酸缓冲液洗涤后, 用 50%、70%、85%、95%、100%乙醇进行脱水, 悬浮于 100%乙醇中, 滴加于盖玻片上冻干之后采用扫描电镜进行检测。

分子生物学鉴定: 待测菌株经培养后, 以菌液作为模板 PCR 扩增菌株的 16S rRNA 基因, 扩增引物为 P1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 P2 (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测序结果在 NCBI 数据库中进行比对, 选取相似性较高的 16S rRNA 基因序列采用邻接法 (neighbor-joining method) 用 MEGA X 软件构建系统发育树。

### 1.4 酶活力测定

发酵液褐藻胶裂解酶的酶活力采用 3,5-二硝基水杨酸法测定。取 80 μL 发酵上清液加入 920 μL 含有 50 mmol/L 磷酸盐和 300 mmol/L

NaCl 的 0.5% (质量体积分数)海藻酸钠溶液 (pH 7.5)中, 35 °C 条件下反应 10 min 后煮沸 10 min 终止反应。取 300 μL 反应产物加入 1 mL DNS 试剂煮沸 10 min, 加入 2 mL H<sub>2</sub>O 稀释, 在 540 nm 波长下测定吸光度; 空白对照为不水浴直接加入 DNS 试剂进行煮沸和稀释<sup>[12]</sup>。根据还原糖(葡萄糖计)产生量计算酶活力, 酶活力单位(U/mL)定义为: 每分钟催化产生 1 μmol 还原糖所需的加酶量为一个酶活力单位。

### 1.5 菌株发酵培养基优化

在含碳量相同(0.2%, 以 5 g/L 海藻酸钠为基准)的情况下, 以海藻酸钠、葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、D-甘露糖、D-半乳糖、甘油作为碳源研究不同碳源对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响, 添加不同浓度的最优碳源确定菌株产酶发酵的最佳碳源浓度。

在含氮量相同(0.1%, 以 5 g/L 硫酸铵为基准)的情况下, 以硫酸铵、尿素、牛肉膏、胰蛋白胍、酵母粉、氯化铵作为氮源研究不同氮源对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响, 添加不同浓度的最优氮源确定菌株产酶发酵的最佳氮源浓度。

添加不同浓度的 NaCl 研究不同 NaCl 浓度对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响, 确定最佳 NaCl 浓度。在含有最佳浓度碳源、氮源和 NaCl 的基础上分别添加 5 mmol/L 的 K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 0.1 mmol/L 的 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>研究不同金属离子对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响, 确定促进该菌发酵产酶的金属离子并对其浓度进行优化。

### 1.6 发酵产酶及菌体生长曲线测定

以优化后的发酵培养基培养菌株 SK42.001, 每 6 h 取样测定发酵液 OD<sub>600</sub> 和上清液酶活力, 测定菌株 SK42.001 的生长曲线和发酵产酶曲线。

## 1.7 不同程度酶解产物的制备和分析

向 1%海藻酸钠中分别添加 2.5、5.0、7.5、10.0 U/g 褐藻胶裂解酶, 在 250 mL 酶反应器中 35 °C、600 r/min 反应 2 h, 100 °C 灭酶 10 min。反应液真空浓缩至 1/3 体积后, 用 75%乙醇进行醇沉, 沉淀复溶于去离子水中, 反复 3 次去除杂质。所得溶液用分子量截留范围为 100 kDa 的透析袋进行透析, 经冷冻干燥获得 4 种产物粉末, 分别命名为 A1、A2、A3 和 A4 (海藻酸钠原料命名为 ALG), 保存于干燥器中备用<sup>[13]</sup>。

### 1.7.1 分子量测定

采用配有多角度散射仪和示差折光检测器的高效体积排阻色谱系统(high performance size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering-refractive index, HPSEC-MALLS-RI)测定分子量。样品浓度为 3 mg/mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 进样量 200 μL, 选用色谱柱 Ultrahydrogel 2000 (7.8 mm×300 mm) 和 Ultrahydrogel 500 (7.8 mm×300 mm)串联, 流动相为 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>+0.02% NaN<sub>3</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 柱温箱温度 35 °C。使用 ASTRA 软件收集和数据处理数据, 计算得出重均分子量( $M_w$ )、数均分子量( $M_n$ )、分散系数( $M_w/M_n$ )等参数。

### 1.7.2 红外分析

称取样品约 2 mg 进行研磨, 按 1:50 加入溴化钾粉末充分研磨混合, 压成薄片, 置于 Nexus 470 型傅里叶红外光谱仪进行全波段扫描。

### 1.7.3 阴离子交换色谱分析

采用脉冲阴离子交换色谱 (high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector, HPAEC-PAD)基于 pH>12.0 时具有电荷差异的不同组分与固定相的离子基团发生可逆交换, 根据组分子与固定相的亲合力差异实现不同组分的分离和定量检测, 该方法可有效分离并定量检测多糖中的不同种类糖醛酸<sup>[14]</sup>。取 6 mg 样品粉末溶解于

5 mL 90%甲酸中, 100 °C 酸解 6 h<sup>[15]</sup>。酸解后的样品冷冻干燥后配制 0.1 mg/mL 的浓度, 0.22 μm 滤膜过滤, 选用色谱柱 CarboPac PA20 (3 mm×150 mm), 柱温 30 °C。流动相为: A 液 200 mmol/L NaOH, B 液 1 mol/L NaAc。洗脱程序: 0–15 min, A 液 5%, B 液逐渐升至 20%; 15–25 min, A 液逐渐升至 100%, 流速 0.5 mL/min。上样量 200 μL, 上样前用 100% B 液洗脱, 100% A 液平衡。

## 1.8 终产物制备和分析

向 500 μL 含有 50 mmol/L 磷酸盐和 300 mmol/L NaCl 的 0.25% (质量体积比)海藻酸钠溶液(pH 7.5)中加入 0.5 U 褐藻胶裂解酶, 35 °C 条件下反应 72 h, 煮沸 10 min 终止反应得到终产物<sup>[16]</sup>。

### 1.8.1 薄层色谱(TLC)分析

取 1 μL 上述终产物在 TLC 硅胶平板上点样, 置于层析缸中展开, 展开剂接近硅胶板上方 1 cm 处时取出晾干, 加入显色剂, 15 s 后取出晾干在 150 °C 条件下显示。展开剂为正丁醇:乙酸:H<sub>2</sub>O (3:2:3, 体积比), 显色剂为硫酸:乙醇 (1:9, 体积比)。

### 1.8.2 液相色谱-质谱(LC-MS)分析

色谱条件: 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm); 检测器为 Waters ACQUITY PDA; 流动相 A 为 100% 乙腈, 流动相 B 为 0.1%甲酸; 梯度洗脱分离条件: 40 min, 100% B; 45 min, 30% A 和 70% B; 50 min, 80% A 和 20% B; 55 min, 100% A; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 45 °C。

质谱条件: 锥孔电压 30 V; 毛细管电压 3.5 V; ESI 阴离子电离喷雾源; 脱溶剂汽温度: 400 °C; 脱溶剂汽流量: 700 L/h; 离子源温度: 100 °C; 锥孔汽流量: 50 L/h; 质量扫描范围: 20–2 000  $m/z$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选

采集的海泥样品经富集培养和分离纯化,共筛选得到 10 株能在以海藻酸钠为唯一碳源的筛选培养基中生长的菌株。将 10 株菌进行多次划线纯化后在初始发酵培养基中进行发酵培养并比较其酶活力。结果表明,菌株 SK42.001 具有较高的发酵酶活,培养 48 h 后酶活为(1.49±0.05) U/mL。经 5 代遗传稳定性培养证明该菌株产酶能力稳定,作为后续实验研究菌株。

### 2.2 菌株 SK42.001 鉴定

#### 2.2.1 形态学观察

菌株 SK42.001 在海藻酸钠平板上迅速生长,经 95%乙醇处理后菌落周围出现不透明水解圈。革兰氏染色阴性,菌落呈乳白色不透明圆形,表面光滑且边缘整齐(图 1A);在电镜下菌体短小,弯曲呈弧形,具备弧菌的典型特征(图 1B)。

#### 2.2.2 生理生化特征

菌株 SK42.001 可在 18–40 °C、pH 4.0–10.5 的条件下生长,最适温度为 37 °C,最适 pH 值

为 7.0。最高能够耐受 35 g/L 的 NaCl 溶液。其余生理生化鉴定结果如表 1 所示。

#### 2.2.3 分子生物学鉴定

菌株 SK42.001 的 16S rRNA 基因包含 1 401 个碱基,与 NCBI 数据库比对后发现该菌株与多种弧菌属(*Vibrio*)菌株有高度相似性,其中与 *V. natriegens* CCUG 16374 和 CCUG 16373 菌株相似性均为 100%,处于系统发育树的同一分支上(图 2),结合其形态学与生理生化特征,将菌株 SK42.001 鉴定为需钠弧菌,并保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC),保藏号为 MF193488.1。

### 2.3 发酵培养基优化

#### 2.3.1 碳源对产酶的影响

如图 3A 所示,除葡萄糖和 D-半乳糖外,SK42.001 在蔗糖、可溶性淀粉、D-甘露糖、甘油作为碳源进行培养时的生长量均比在海藻酸钠中有所增长,其中甘油中的生长情况最佳;该菌株在海藻酸钠作为碳源时显示出最高酶活,D-甘露糖作碳源时酶活约为在海藻酸钠中的 38%,而在葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、D-半乳糖和甘油作为碳源时该菌株发酵酶活几乎为零。

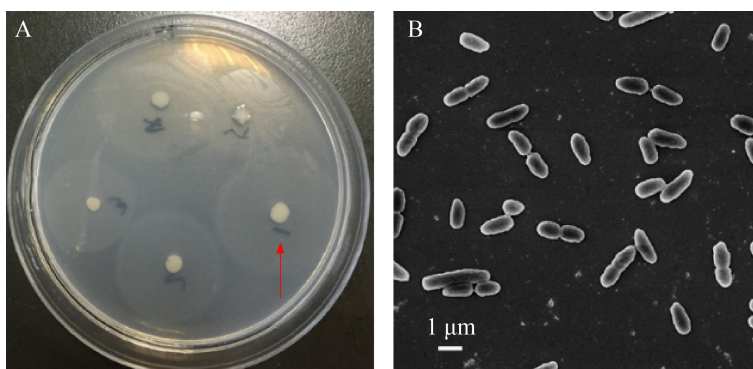


图 1 菌落与菌体形态 A: SK42.001 菌落降解海藻酸钠产生水解圈(红色箭头指示 SK42.001 菌落); B: SK42.001 电镜照片

Figure 1 Morphology of colony and cell. A: Formation of transparent circle after alginate utilization by SK42.001 (red row refers to SK42.001 colony); B: Strain SK42.001 under electron microscope.

表 1 菌株 SK42.001 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain SK42.001

No.	检测项目 Test items	结果 Results	No.	检测项目 Test items	结果 Results	No.	检测项目 Test items	结果 Results
A1	$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -galactosidase	-	C4	L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	C27	纤维二糖 Cellose	-
A2	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	C5	核糖 Ribose	-	C28	麦芽糖 Maltose	-
A3	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	C6	D-木糖 D-xylose	-	C29	乳糖 Lactose	-
A4	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	C7	L-木糖 L-xylose	-	C30	蜜二糖 Melibiose	+
A5	柠檬酸利用 Citrate utilization	+	C8	阿东醇 Adonitol	-	C31	蔗糖 Sucrose	+
A6	H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S generation	-	C9	$\beta$ -甲基-D-木糖苷 $\beta$ -methyl-D-xyloside	-	C32	海藻糖 Trehalose	-
A7	尿酶 Urease	-	C10	半乳糖 Galactose	-	C33	菊糖 Inulin	-
A8	色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	+	C11	葡萄糖 Glucose	+	C34	松叁糖 Melezitose	-
A9	吲哚产生 Indole generation	-	C12	果糖 Fructose	-	C35	棉子糖 Melitose	-
A10	丙酮酸盐 Pyruvate	+	C13	甘露糖 Mannose	+	C36	淀粉 Starch	+
A11	明胶酶 Gelatinase	+	C14	山梨糖 Sorbose	-	C37	糖原 Glycogen	-
B1	葡萄糖 Glucose	+	C15	鼠李糖 Rhamnose	+	C38	木糖醇 Xylitol	-
B2	甘露醇 Mannitol	+	C16	卫茅醇 Dulcitol	-	C39	D-松二糖 D-turanose	-
B3	肌醇 Inositol	-	C17	肌醇 Inositol	-	C40	D-来苏糖 D-lyxose	-
B4	山梨醇 Sorbitol	-	C18	甘露醇 Mannitol	+	C41	D-塔格糖 D-tagatose	-
B5	鼠李糖 Rhamnose	+	C19	山梨醇 Sorbitol	-	C42	D-岩糖 D-fucose	-
B6	蔗糖 Sucrose	+	C20	$\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷 $\alpha$ -methyl-D-mannoside	-	C43	L-岩糖 L-fucose	-
B7	蜜二糖 Melibiose	-	C21	$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷 $\alpha$ -methyl-D-glucoside	-	C44	D-阿拉伯糖醇 D-arabitol	-
B8	苦杏仁苷 Amygdalin	+	C22	N-乙酰-葡糖胺 N-acetyl-glucosamine	-	C45	L-阿拉伯糖醇 L-arabitol	-
B9	阿拉伯糖 Arabinose	+	C23	苦杏仁甙 Amygdalin	+	C46	葡萄糖酸盐 Gluconate	-
C1	甘油 Glycerol	-	C24	熊果甙 Arbutin	-	C47	2-酮基-葡萄糖酸盐 2-keto-gluconate	-
C2	赤藓醇 Erythritol	-	C25	七叶灵 Esculin	W	C48	5-酮基-葡萄糖酸盐 5-keto-gluconate	+
C3	D-阿拉伯糖 D-arabinose	+	C26	柳醇 Salicine	-			

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应; W: 弱阳性反应。A: 酶活检测; B: 碳源氧化检测; C: 利用碳源产酸检测

Note: +: Positive; -: Negative; W: Weakly positive. A: Enzyme activity; B: Carbon source oxidation; C: Produce acid from carbon sources.

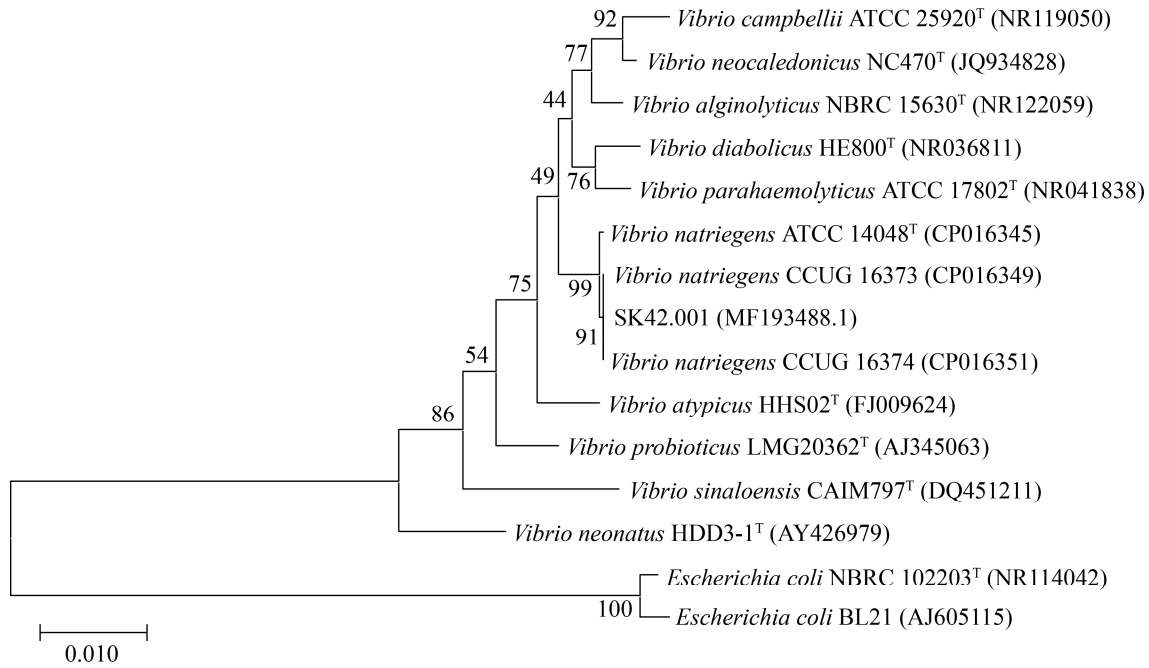


图 2 菌株 SK42.001 系统发育树 括号中数字表示 GenBank 登录号；分支点上的数字表示 1 000 次计算形成该节点的百分比；标尺表示遗传距离

Figure 2 Phylogenetic tree of strain SK42.001. The numbers in brackets are GenBank accession numbers; The numbers at the nodes are the percentages of occurrence in 1 000 boot-strapped trees; The scale represents the genetic distance.

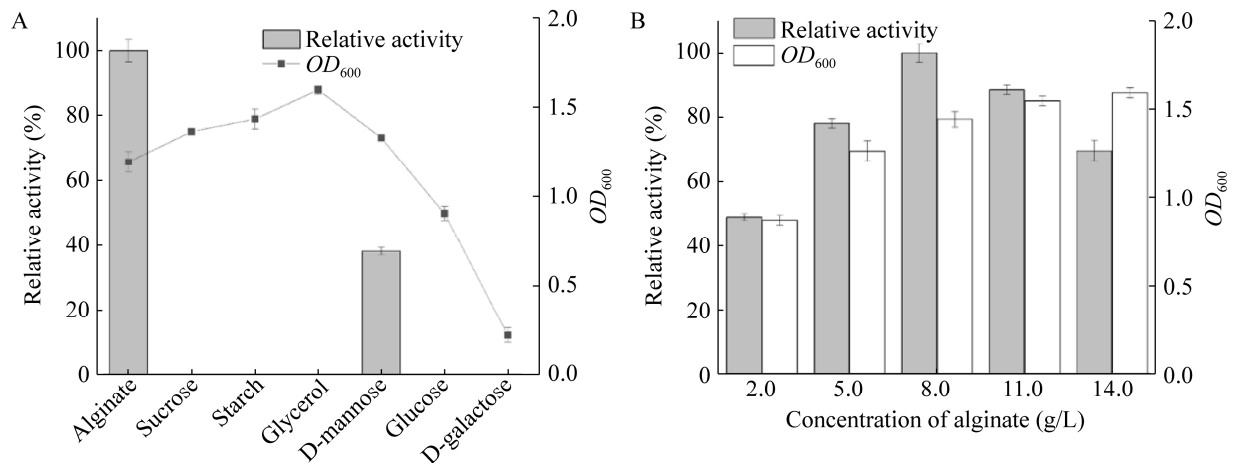


图 3 碳源对菌株 SK42.001 产酶的影响 A: 碳源种类对产酶的影响; B: 海藻酸钠浓度对产酶的影响

Figure 3 Effect of carbon sources on enzyme production of strain SK42.001. A: Effect of carbon sources; B: Effect of alginate concentration.



海藻酸钠浓度对产酶和菌体生长的影响如图 3B 所示,随着海藻酸钠浓度的增加,菌体生长量增加;而菌株的发酵酶活在 8.0 g/L 海藻酸钠的培养基中达到最大,之后随着海藻酸钠浓度的增加酶活呈下降趋势,可能由于海藻酸钠浓度较大时培养基粘度增加不利于氧气摄入进而影响菌株产酶。

### 2.3.2 氮源对产酶的影响

如图 4A 所示,硫酸铵、尿素、牛肉膏、胰蛋白胨、酵母粉和氯化铵分别作为氮源时对菌株 SK42.001 的生长影响不大,而牛肉膏不利于其生长;该菌在以氯化铵为氮源时显示出最大酶活,并且在无机氮源中的酶活是有机氮源的 1.4–3.0 倍。氯化铵浓度对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响如图 4B 所示,随着氯化铵浓度的增大菌体生长量不断增大,酶活在 8.0 g/L 时达到最大。

### 2.3.3 NaCl 及其他金属离子对产酶的影响

*V. natriegens* SK42.001 是海洋细菌,NaCl 对其生长代谢有重要的影响。NaCl 对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响如图 5A 所示,

菌株 SK42.001 对 NaCl 有很高的耐受度,在 20.0–60.0 g/L 的浓度范围内生长较好,在 NaCl 浓度低于 10.0 g/L 时显示极低酶活,随着 NaCl 浓度的增大酶活力增加并在 30.0 g/L 浓度时达到最高酶活。

以只含有海藻酸钠、氯化铵和 NaCl 的培养基作为空白对照,分别添加 5 mmol/L 的  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 0.1 mmol/L 的  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 研究不同金属离子对菌株 SK42.001 产酶和生长的影响。结果如图 5B 所示,  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 促进了菌株 SK42.001 的生长,而其他离子对菌株生长无明显的促进或抑制作用;  $Mg^{2+}$ 和  $K^+$ 添加组酶活比对照组分别提高了约 250%和 220%,  $Ca^{2+}$ 和  $Mn^{2+}$ 略微提高了菌株酶活,而  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和  $Fe^{2+}$ 明显抑制了菌株 SK42.001 褐藻胶裂解酶的合成。  $Mg^{2+}$ 和  $K^+$ 的浓度对菌株 SK42.001 产酶和菌体生长的影响无显著差异(本文数据未显示),分别选择 5.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ 和 10.0 mmol/L  $K^+$ 的离子浓度。

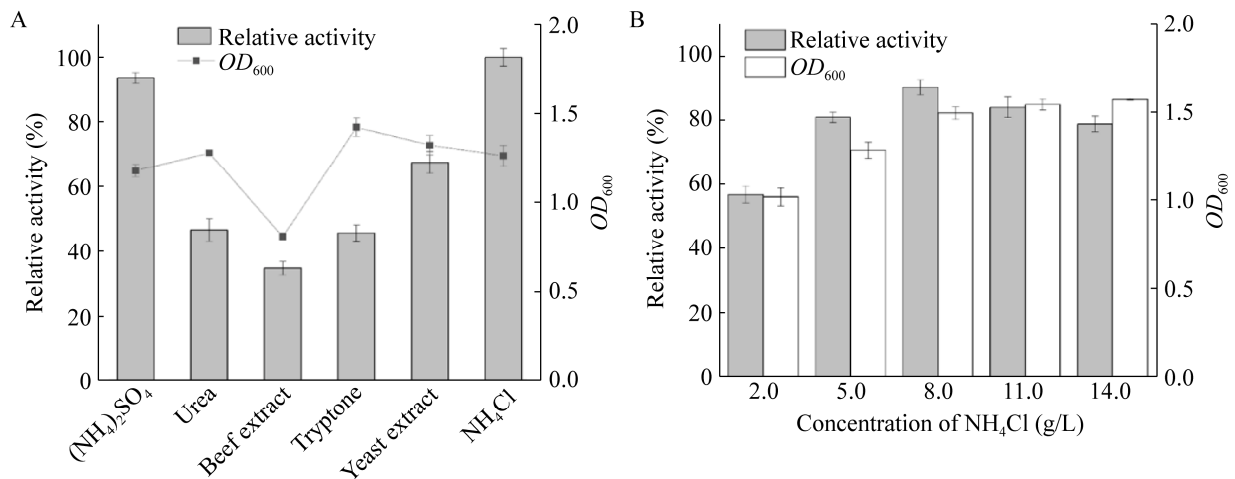


图 4 氮源对菌株 SK42.001 产酶的影响 A: 氮源种类对产酶的影响; B: 氯化铵浓度对产酶的影响  
Figure 4 Effect of nitrogen sources on enzyme production of strain SK42.001. A: Effect of nitrogen sources; B: Effect of NH<sub>4</sub>Cl concentration.

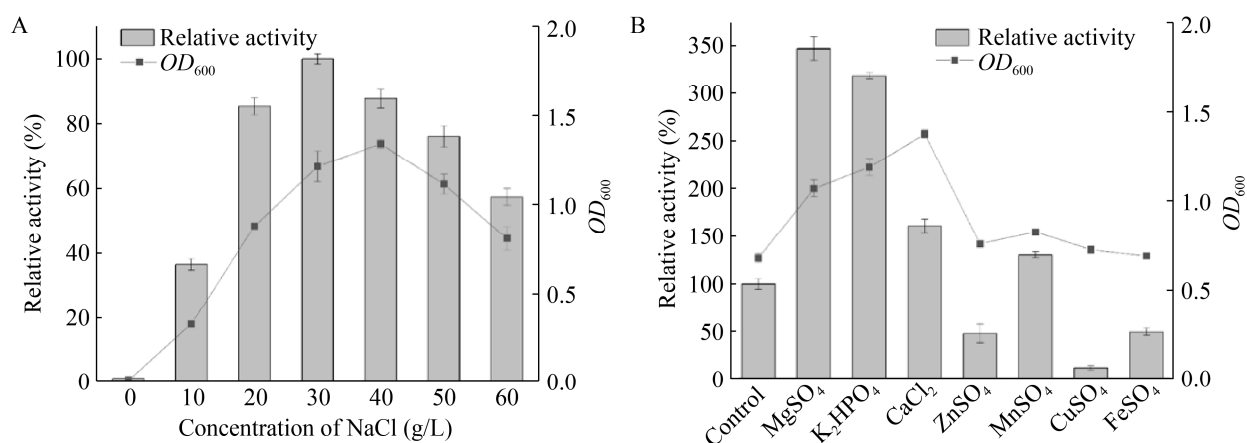


图5 金属离子对菌株 SK42.001 产酶的影响 A: NaCl 浓度对产酶的影响; B: 其他金属离子对产酶的影响

Figure 5 Effect of metal ions on enzyme production of strain SK42.001. A: Effect of NaCl concentration; B: Effect of other metal ions.

## 2.4 菌株 SK42.001 的发酵产酶曲线

上述实验确定菌株 *V. natriegens* SK42.001 发酵生产褐藻胶裂解酶的最佳发酵培养基为海藻酸钠 8.0 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8.0 g/L、NaCl 30.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 mmol/L 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10.0 mmol/L, pH 7.0。在 28 °C、2%接种量和 50 mL/250 mL 装液量的条件下,菌株 SK42.001 发酵产酶及生长曲线如图 6 所示,菌体生长量

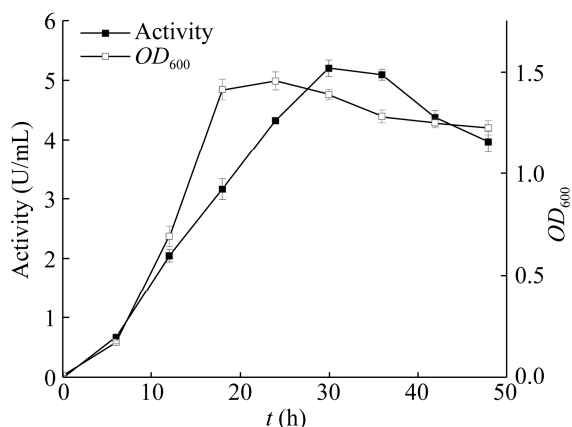


图6 菌株 SK42.001 发酵产酶及菌体生长曲线  
Figure 6 Curves of enzyme production and cell growth of strain SK42.001.

在 24 h 达到最大,30 h 酶活力达到最高,为 (5.20±0.14) U/mL,是优化前的 3.50 倍。

## 2.5 不同程度酶解产物分析

### 2.5.1 分子量测定

由表 2 可知,海藻酸钠原料及 4 种降解产物的重均分子量分别为  $4.66 \times 10^5$ 、 $1.05 \times 10^5$ 、 $0.68 \times 10^5$ 、 $0.48 \times 10^5$  和  $0.40 \times 10^5$  g/mol,酶降解产物 A1–A4 分子量分别下降约 77.5%、85.4%、89.7%和 91.4%。其中原料的分子量范围最大为  $0.81 \times 10^5$ – $49.31 \times 10^5$  g/mol,其次是 A1 分子量范围为  $0.27 \times 10^5$ – $35.46 \times 10^5$  g/mol, A2、A3 和 A4 的分子量范围为  $0.10 \times 10^5$ – $7.00 \times 10^5$  g/mol。A1 的分散度与原料接近约 1.75,而 A2、A3 和 A4 的分散度有所增加,分别为 2.74、2.44 和 2.34,说明从原料到 A4,虽然分子量分布范围变窄,但占主要比例的不同分子量组分的数量增加,导致分散系数增大。

### 2.5.2 红外分析

海藻酸钠原料及 4 种降解产物的红外光谱结果如图 7 所示。图 7A 中波数  $3260 \text{ cm}^{-1}$  处的宽谱带和  $2925 \text{ cm}^{-1}$  处较弱的谱带分别表示

表 2 海藻酸钠及酶降解产物的分子量参数

Table 2 Molecular weights of alginate and its degraded products

样品 Samples	$M_w$ ( $\times 10^5$ g/mol)	$M_n$ ( $\times 10^5$ g/mol)	$M_w$ ( $\times 10^5$ g/mol)		$M_w/M_n$
			Lowest $M_w$	Highest $M_w$	
ALG	4.66±0.18a	2.66±0.08a	0.81±0.05a	49.31±1.57a	1.75±0.08d
A1	1.05±0.05b	0.57±0.03b	0.27±0.02b	35.46±1.72b	1.74±0.06d
A2	0.68±0.01c	0.25±0.01c	0.11±0.03c	7.12±0.41c	2.74±0.03a
A3	0.48±0.02d	0.19±0.00c,d	0.11±0.01c	7.52±0.18c	2.44±0.02b
A4	0.40±0.02d	0.17±0.01d	0.06±0.02c	7.00±0.27c	2.34±0.06c

注: 不同小写字母表示纵向结果的显著性差异( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences column-wise ( $P<0.05$ ).

O-H 和 C-H 的伸缩振动, 波数  $1\ 599\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 409\ \text{cm}^{-1}$  处的 2 个强吸收峰分别表示羧基基团中 O-C-O 的非对称和对称伸缩振动, 波数  $1\ 296\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰由 C-C-H 和 O-C-H 的变形振动引起, 波数  $1\ 027\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 083\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰分别表示甘露糖醛酸和古罗糖醛酸 C-O 的伸缩振动<sup>[17]</sup>。图 7B 表示样品在波数  $950\text{--}750\ \text{cm}^{-1}$  与糖醛酸残基振动相关的指纹区, 波数  $946\ \text{cm}^{-1}$  的谱带表示糖醛酸残基 C-O 的伸缩振动。波数  $889\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰由甘露糖醛酸的 C-H 变形振动引起, 波数  $817\ \text{cm}^{-1}$  处是甘露糖醛酸的特征吸收。随着酶解的进行,

$889\ \text{cm}^{-1}$  和  $817\ \text{cm}^{-1}$  处甘露糖醛酸的特征吸收变强, 说明褐藻胶裂解酶降解产物片段中甘露糖醛酸的比例增加。波数  $904\ \text{cm}^{-1}$  处是古罗糖醛酸 C-H 变形振动的特征吸收, 由图 7B 可知除海藻酸钠原料 ALG 可见较弱的吸收峰外, 其他酶降解产物几乎看不到明显特征峰, 说明酶降解导致古罗糖醛酸片段的减少<sup>[18]</sup>。以上结果初步表明菌株 SK42.001 所产褐藻胶裂解酶具有降解古罗糖醛酸片段的偏好性。

### 2.5.3 阴离子交换色谱分析

如图 8 所示, HPAEC-PAD 分析显示标样古罗糖醛酸和甘露糖醛酸的保留时间分别为

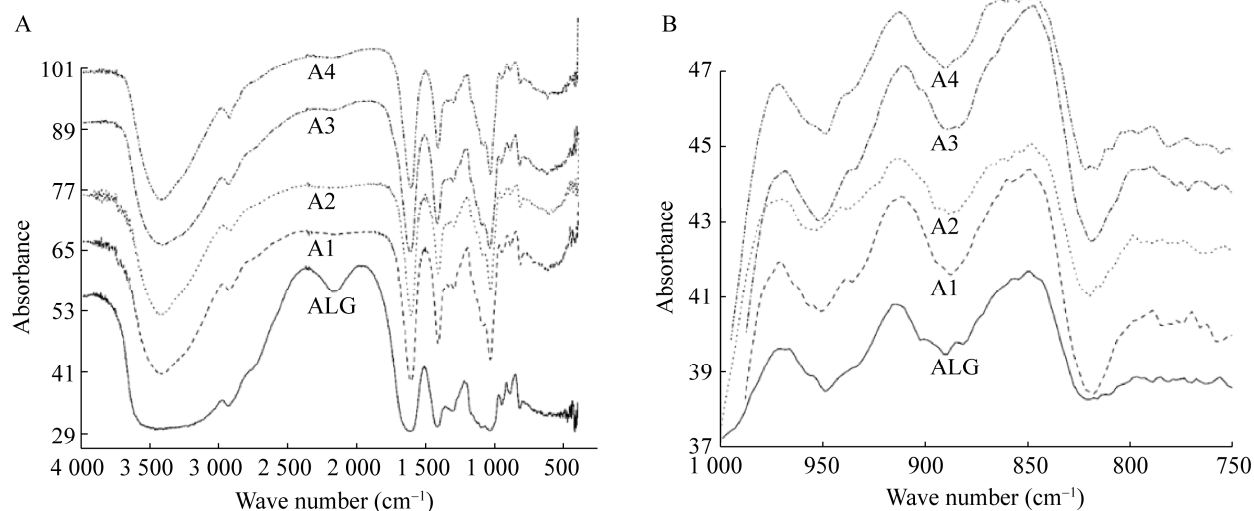


图 7 海藻酸钠及酶降解产物红外光谱图 A: 红外图谱; B: 红外二级图谱

Figure 7 FTIR spectra of alginate and its degraded products. A: FTIR spectrum; B: Second-order FTIR spectrum.

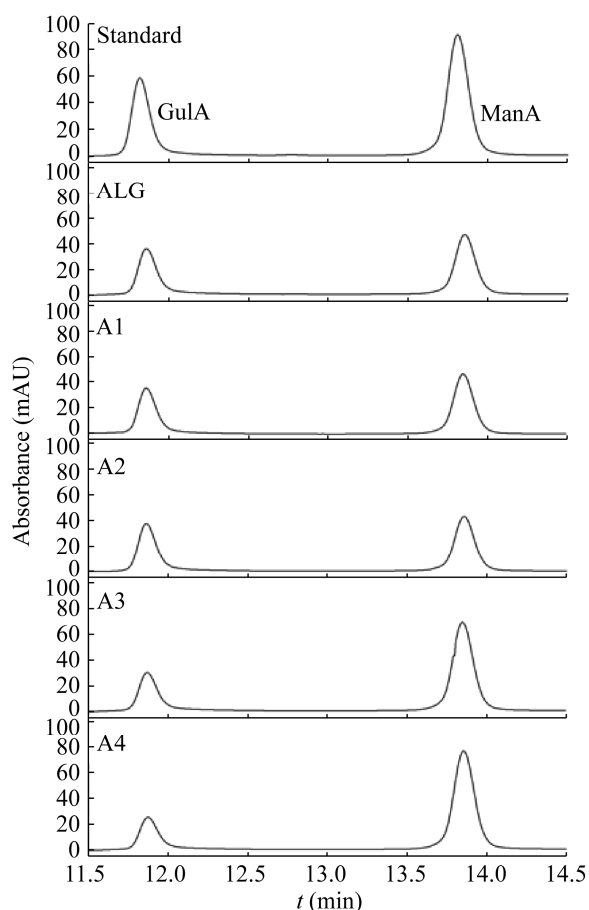


图 8 海藻酸钠原料及酶降解产物 HPAEC-PAD 分析图谱 GulA: 古罗糖醛酸; ManA: 甘露糖醛酸

Figure 8 HPAEC-PAD chromatograms of alginate and its degraded products. GluA: Guluronic acid; ManA: Mannuronic acid.

11.9 min 和 13.9 min, 样品与标样出峰时间一致。随着酶解程度的增大, 甘露糖醛酸峰信号增强, 而古罗糖醛酸峰强度下降。

甘露糖醛酸与古罗糖醛酸的比例( $M/G$ )根据 2 种糖醛酸的峰面积比值计算, 由表 3 可知, A1、A2、A3 和 A4 的  $M/G$  值分别为  $0.72\pm 0.02$ 、 $0.80\pm 0.05$ 、 $1.38\pm 0.05$  和  $1.82\pm 0.07$ , 甘露糖醛酸占比由 41.9% 增加到 64.5%, 而古罗糖醛酸占比由 58.1% 下降至 35.5%, 进一步说明本研究筛选到的 *V. natriegens* SK42.001

表 3 海藻酸钠原料及降解产物 HPAEC-PAD 分析糖醛酸含量结果

Table 3  $M/G$  ratios of alginate and its degraded products by HPAEC-PAD analysis

样品 Samples	$M/G$	甘露糖醛酸占比 Proportion of $M$ (%)	古罗糖醛酸占比 Proportion of $G$ (%)
ALG	$1.53\pm 0.05b$	$60.5\pm 2.0b$	$39.5\pm 0.8d$
A1	$0.72\pm 0.02e$	$41.9\pm 1.2e$	$58.1\pm 1.5a$
A2	$0.80\pm 0.05d$	$44.4\pm 0.9d$	$55.6\pm 0.8b$
A3	$1.38\pm 0.05c$	$58.2\pm 2.1c$	$41.8\pm 1.0c$
A4	$1.82\pm 0.07a$	$64.5\pm 2.5a$	$35.5\pm 0.6e$

注: 不同小写字母表示纵向结果的显著性差异( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences column-wise ( $P<0.05$ ).

菌株所产褐藻胶裂解酶偏好于裂解古罗糖醛酸片段。

## 2.6 酶解终产物分析

TLC 分析表明菌株 SK42.001 所产褐藻胶裂解酶的终产物主要为褐藻三糖(图 9A)。采用 LC-MS 进一步分析, 由图 9B 全离子色谱图可知, 终产物主要为单一聚合度的寡糖, 在 5.08 min 出峰。在负离子模式一级质谱图 9C 中, 相对丰度最高的碎片  $m/z=527$  可知, 出峰产物聚合度为 3 (单糖分子量约为 180), 进一步确定了 *V. natriegens* SK42.001 产酶降解海藻酸钠的终产物主要为褐藻三糖。

## 3 讨论与结论

本研究从海带养殖场附近海泥中分离筛选到一株产褐藻胶裂解酶的需钠弧菌(*V. natriegens*) SK42.001。需钠弧菌是已知的生长速度最快的细菌, 生长速度约是大肠杆菌的 2 倍, 许多研究团队, 如哈佛大学医学院的 George Church 团队<sup>[19]</sup>和加州 Synthetic Genomics 公司的 Daniel Gibson 团队<sup>[20]</sup>等将其视为替代大肠杆菌的下一代模式菌株进行研究。本研究首次报道采用需钠弧菌生产褐藻胶裂解酶, 为褐藻胶裂解酶



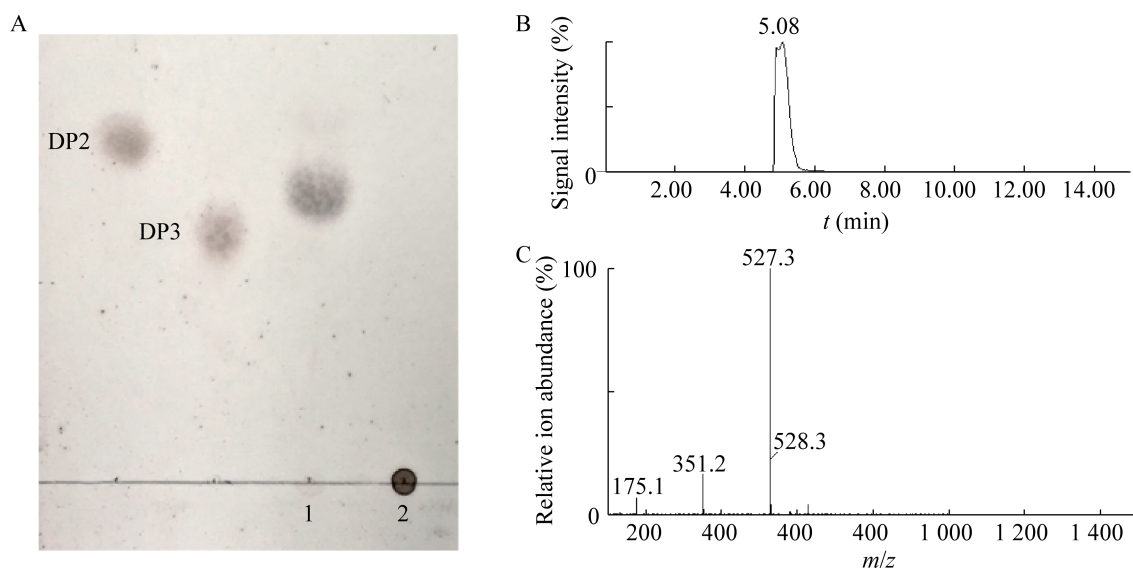


图9 酶降解终产物分析 A: 产物 TLC 分析, DP2: 褐藻二糖; DP3: 褐藻三糖; 1: 酶解产物; 2: 未降解的海藻酸钠。B: 色谱图。C: 质谱图

Figure 9 Analysis of enzymatic final products. A: TLC analyses of products, DP2: Disaccharide; DP3: Trisaccharide; 1: Degraded product; 2: Undegraded alginate. B: Liquid chromatogram. C: Mass spectrum.

的生产和应用提供了新的材料来源。此外, 本研究中菌株 SK42.001 发酵酶活为 $(5.20 \pm 0.14)$  U/mL, 而徐凡等<sup>[12]</sup>报道的 *Pseudoalteromonas* sp. BYS-2 发酵酶活为 5.29 U/mL, 高王宇等<sup>[21]</sup>报道的 *Bacillus amyloliquefaciens* HB12274 发酵酶活约为 4.0 U/mL, 陈鹏等<sup>[22]</sup>报道的 *Bacillus weihaiensis* Alg01 发酵酶活约为 3.1 U/mL, 国晶晶等<sup>[23]</sup>报道的 *Cobetia* AlgX2 发酵酶活为 0.247 U/mL, 周敏等<sup>[24]</sup>报道的 *Vibrio* sp. B4 发酵酶活为 0.1 U/mL (采用 DNS 法检测酶活, 酶活力单位以每分钟生产 1  $\mu$ mol 还原糖所需加酶量计)。因此, *V. natriegens* SK42.001 的产酶能力在所报道的产褐藻胶裂解酶菌株中处于较高水平, 具备应用于褐藻胶裂解酶大规模生产的潜力。

菌株 SK42.001 仅在海藻酸钠作碳源时保留较高酶活, 说明该菌株所产褐藻胶裂解酶可能是诱导酶, 目前报道的野生菌株所产褐藻胶裂

解酶大多都为诱导酶, 如 *Isoptericola halotolerans* WX<sup>[25]</sup>、*Bacillus amyloliquefaciens* HB12274<sup>[21]</sup>、*Cobetia* sp. WG-007<sup>[8]</sup>和 *Halomonas* sp. WF6<sup>[16]</sup>等, 而极少数为非诱导酶, 如 *Photosbacterium phosphoreum* 在葡萄糖、淀粉、甘油作为碳源时酶活反而较褐藻酸钠高<sup>[26]</sup>。甘露糖作为碳源能保留一定酶活可能由于甘露糖与海藻酸钠单体之一甘露糖醛酸类似, 也可作为诱导物诱导褐藻胶裂解酶的合成。就氮源而言, 无机氮源比有机氮源更利于菌株 SK42.001 产酶。不同菌株产酶利用氮源的种类差别较大, 已报道的 *Pseudoalteromonas* sp. B1<sup>[7]</sup>和 *Vibrio* sp. B4<sup>[24]</sup>最适氮源为无机氮源, *P. phosphoreum*<sup>[26]</sup>最适氮源为牛肉膏, 而 *Cobetia* sp. WG-007<sup>[8]</sup>和 *Halomonas* sp. WF6<sup>[16]</sup>在无机氮源培养基中生长缓慢且未检测到酶活。菌株 SK42.001 的生长和产酶对 NaCl 有较高的依赖性, 说明海洋来源的菌株需

要一定的盐度才能维持生长代谢和产酶。其他金属离子中,  $Mg^{2+}$  和  $K^+$  较大地促进了菌株 SK42.001 产酶, 类似地, 单一无机盐  $KH_2PO_4$  对菌株 *Pseudoalteromonas* sp. B1<sup>[7]</sup>和 *Halomonas* sp. WF6<sup>[16]</sup>产酶均有明显的促进作用。

菌株 SK42.001 所产褐藻胶裂解酶特异性生产褐藻三糖, 已有报道中可生产单一聚合度产物的褐藻胶裂解酶较为少见, 大多产物为聚合度不一的混合产物, 如 *Halomonas* sp. WF6 产酶降解海藻酸钠的产物主要为二糖和三糖<sup>[16]</sup>, *Alteromonas* sp. H-4 终产物为 3-8 糖<sup>[27]</sup>, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06 终产物为三糖和四糖<sup>[28]</sup>。褐藻三糖可促进大鼠肠道益生菌增殖并抑制有害菌的生长, 并且低分子量的褐藻寡糖抗氧化活性更强<sup>[29]</sup>, 因此, 本研究提供的褐藻胶裂解酶可用于褐藻三糖产品的大规模制备和开发。本实验室前期克隆了菌株 SK42.001 的褐藻胶裂解酶编码基因, 发现该酶包含碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding module, CBM)及催化活性结构域 2 个结构域, 并且 CBM 结构域的截短改变了终产物分布, 生成主要为褐藻二三糖的混合终产物, 表明 CBM 结构域对该酶特异性生产褐藻三糖起到关键作用<sup>[30]</sup>。

综上所述, 本研究筛选获得一株褐藻胶裂解酶高效产酶菌株 *V. natriegens* SK42.001, 此菌株生长速度快、产酶活力高, 所产酶偏好于降解古罗糖醛酸片段且特异性生产褐藻三糖, 具备开发用于大规模制备褐藻胶裂解酶或褐藻寡糖生物制品的潜力。

## REFERENCES

- [1] Nussinovitch A. Alginates. In: Hydrocolloid Applications[M]. Boston: Springer, 1997: 19-39
- [2] Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications[J]. Biomaterials, 2012, 33(11): 3279-3305
- [3] Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579(20): 4423-4429
- [4] Yamamoto Y, Kurachi M, Yamaguchi K, Oda T. Stimulation of multiple cytokine production in mice by alginate oligosaccharides following intraperitoneal administration[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(8): 1133-1137
- [5] Wong TY, Preston LA, Schiller NL. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 289-340
- [6] Zhu BW, Yin H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications[J]. Bioengineered, 2015, 6(3): 125-131
- [7] 严芬, 连燕萍, 杨光, 王培松, 吴晨烁, 陈宁辛. 高产褐藻胶裂解酶菌株的筛选及发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 287-292  
Yan F, Lian YP, Yang G, Wang PS, Wu CS, Chen NX. Screening of alginate lyase-producing strains and optimization of fermentation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 287-292 (in Chinese)
- [8] 刘旭梅, 李恒, 蒋敏, 龚劲松, 许正宏, 史劲松. 产褐藻胶裂解酶菌株 *Cobetia* sp. WG-007 的筛选及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(9): 903-909  
Liu XM, Li H, Jiang M, Gong JS, Xu ZH, Shi JS. Screening of alginate lyase producing strain *Cobetia* sp. WG-007 and optimization of fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(9): 903-909 (in Chinese)
- [9] 傅晓妍, 李京宝, 韩峰, 路新枝, 于文功. 褐藻胶裂解酶产生菌 *Vibro* sp. QY102 的发酵条件优化[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(3): 432-436  
Fu XY, Li JB, Han F, Lu XZ, Yu WG. Studies on *Vibro* sp. QY102 fermentation processes for alginate lyase production[J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2007, 37(3): 432-436 (in Chinese)
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001

- Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [11] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- [12] 徐凡, 林娟, 叶秀云, 朱凡, 许鑫琦. 交替假单胞菌 BYS-2 产褐藻胶裂解酶条件研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 446-453
- Xu F, Lin J, Ye XY, Zhu F, Xu XQ. Optimization of alginate lyase-producing conditions by *Pseudoalteromonas* sp. BYS-2[J]. Journal of Fuzhou University: Natural Science Edition, 2017, 45(3): 446-453 (in Chinese)
- [13] Khajouei RA, Keramat J, Hamdami N, Ursu AV, Delattre C, Laroche C, Gardarin C, Lecerf D, Desbrières J, Djelveh G, et al. Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed *Nizimuddiniana zanardini*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 1073-1081
- [14] Zhang ZQ, Khan NM, Nunez KM, Chess EK, Szabo CM. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(9): 4104-4110
- [15] Chandía NP, Matsuhiro B, Vásquez AE. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46(1): 81-87
- [16] 李恒, 朱思婷, 刘旭梅, 龚劲松, 蒋敏, 许正宏, 史劲松. 褐藻胶裂解酶产生菌的分离鉴定及产酶发酵优化[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(9): 94-101
- Li H, Zhu ST, Liu XM, Gong JS, Jiang M, Xu ZH, Shi JS. Identification of an alginate lyase producing strain *Halomonas* sp. and fermentation optimization[J]. China Biotechnology, 2014, 34(9): 94-101 (in Chinese)
- [17] Pereira L, Gheda SF, Ribeiro-Claro PJA. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries[J]. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2013, 2013: 1-7
- [18] Leal D, Matsuhiro B, Rossi M, Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(2): 308-316
- [19] Lee HH, Ostrov N, Wong BG, Gold MA, Khalil AS, Church GM. Functional genomics of the rapidly replicating bacterium *Vibrio natriegens* by CRISPRi[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(7): 1105-1113
- [20] Weinstock MT, Heseck ED, Wilson CM, Gibson DG. *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology[J]. Nature Methods, 2016, 13(10): 849-851
- [21] 高王宇, 黄惠琴, 刘敏, 朱军, 鲍时翔. 产褐藻胶裂解酶菌株 HB12274 的鉴定和发酵优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4365-4371
- Gao WY, Huang HQ, Liu M, Zhu J, Bao SX. Identification and fermentation optimization of an alginate lyase-producing strain HB12274[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(10): 4365-4371 (in Chinese)
- [22] 陈朋, 朱玥明, 韩文佳, 门燕, 贾士儒, 孙媛霞. 产褐藻胶裂解酶菌种的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 105-111
- Chen P, Zhu YM, Han WJ, Men Y, Jia SR, Sun YX. Screening and identification of a bacterial strain and optimization of medium composition and culture conditions for the production of alginate lyase[J]. Food Science, 2015, 36(15): 105-111 (in Chinese)
- [23] 国晶晶, 宋悦凡, 何云海, 武龙, 汪秋宽. 高效产褐藻胶裂解酶菌株产酶条件优化及降解寡糖结构分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(2): 252-259
- Guo JJ, Song YF, He YH, Wu L, Wang QK. Optimization of enzyme production conditions and analysis of structure of degraded oligosaccharides in high-yield alginate lyase bacterial strains[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(2): 252-259 (in Chinese)
- [24] 周敏, 冷凯良, 王致鹏, 苗钧魁, 刘小芳, 高华, 王海英. 产褐藻胶裂解酶菌株的筛选及发酵条件优化[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 2019, 32(1): 37-45
- Zhou M, Leng KL, Wang ZP, Miao JK, Liu XF, Gao H, Wang HY. Screening of alginate lyase producing strains and optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Qingdao University: Natural Science Edition, 2019, 32(1): 37-45 (in Chinese)
- [25] 魏丹, 窦文芳, 李恒, 李会, 许正宏, 史劲松. 高效降解褐藻胶新菌种的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 26-31
- Wei D, Dou WF, Li H, Li H, Xu ZH, Shi JS. Isolation, identification, and fermentation optimization of a high efficient novel alginate-degrading strain[J]. Food and

- Fermentation Industries, 2012, 38(7): 26-31 (in Chinese)
- [26] 刘彩琴, 王楠, 陈薇青, 金建昌, 项丽艳. 一株明亮发光杆菌产褐藻胶裂解酶的培养基优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 156-160
- Liu CQ, Wang N, Chen WQ, Jin JC, Xiang LY. Optimization of culture medium for alginate lyase by *Photobacterium phosphoreum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 156-160 (in Chinese)
- [27] Sawabe T, Ohtsuka M, Ezura Y. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4[J]. Carbohydrate Research, 1997, 304(1): 69-76
- [28] Matsushima R, Danno H, Uchida M, Ishihara K, Suzuki T, Kaneniwa M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 567-576
- [29] Wang Y, Han F, Hu B, Li JB, Yu WG. *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate[J]. Nutrition Research, 2006, 26(11): 597-603
- [30] Meng Q, Zhou LC, Hassanin HAM, Jiang B, Liu YC, Chen JJ, Zhang T. A new role of family 32 carbohydrate binding module in alginate lyase from *Vibrio natriegens* SK42.001 in altering its catalytic activity, thermostability and product distribution[J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101112