

Screening of Alginate Lyase Synthase Producing Strain and Optimization of Its Fermentation Conditions

Panke Yang, Guofu Yan, Jie Tang*

Beijing Leili Marine Bioindustry Inc., Beijing

Email: *39129557@qq.com

Received: Aug. 24th, 2018; accepted: Sep. 7th, 2018; published: Sep. 14th, 2018

Abstract

Through systematic method of strain selection, from sample collection to sample treatment, by target bacteria acclimatization and enrichment, then high-yield strain screening, re-screening, optimization of fermentation conditions for enzyme production of the optimal strain and other steps, finally, a strain with high alginic acid degradation enzyme activity was selected from marine algae. It was initially identified as Gram-positive bacteria. The strain was formulated in the medium as: Sodium alginate 0.8%, corn pulp 0.9%, ammonium sulfate 0.3%, sodium chloride 3%, potassium bisphosphate 0.2%, magnesium sulfate 0.05%. The rest is tap water. The initial pH 7.2 was adjusted with sodium hydroxide. The culture process is: 150 ml triangular bottle liquid 50 ml for constant temperature oscillation culture, the culture temperature is controlled at 30°C, and the rocker speed is set at 180 r/min. The enzyme activity of aerobic fermentation after 18 - 24 h is up to 580 U/ml or so. In addition, the enzyme produced by the strain was experimentally identified as an extracellular enzyme. It has a very good research and application value.

Keywords

Alginate Lyase, Domestication and Enrichment, Initial Screening, Further Screening, Optimization of Fermentation Conditions, Marine Bacteria

褐藻胶裂合酶高产菌株的筛选及其发酵产酶条件优化

杨攀科, 严国富, 汤洁*

北京雷力海洋生物新产业股份有限公司, 北京

*通讯作者。

文章引用: 杨攀科, 严国富, 汤洁. 褐藻胶裂合酶高产菌株的筛选及其发酵产酶条件优化[J]. 微生物前沿, 2018, 7(3): 87-97. DOI: 10.12677/amb.2018.73011

摘要

通过系统的菌种选育方法,从样品的采集开始,到样品处理,目标菌驯化富集,再到高产菌株的初筛,复筛,最优菌株发酵产酶条件优化等步骤,最终从海洋藻类马尾藻中选育出1株酶活力很高的产褐藻胶裂合酶菌株,初步鉴定为一种革兰氏阳性细菌。该菌株在培养基配方为:褐藻酸钠0.8%,玉米浆干粉0.9%,硫酸铵0.3%,氯化钠3%,磷酸氢二钾0.2%,硫酸镁0.05%,余量为自来水,用氢氧化钠调节初始pH7.2,培养工艺为:150 ml三角瓶装液50 ml进行恒温振荡培养,培养温度全程控制在30℃,摇床转速设定在180 r/min的条件下,好氧发酵18~24 h酶活高达580 U/ml左右。另外通过实验鉴定该菌株所产的酶为胞外酶,具有非常好的研究应用价值。

关键词

褐藻胶裂合酶, 驯化富集, 初筛, 复筛, 发酵产酶条件优化, 海洋细菌

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

褐藻胶是一种来源丰富、用途广泛的酸性海洋多糖,由 α -L-1,4 古罗糖醛酸(G)及 β -D-1,4 甘露糖醛酸(M)随机组合形成的线性高分子量聚合物[1]。随着海藻寡糖多种生理活性的发现[2],海藻寡糖巨大的应用潜力越来越受到关注。近年来,褐藻胶寡糖生物活性的研究取得了重大进展,如调节植物生长、诱导植物抗病能力、抗肿瘤及抗老年痴呆,以及防治海洋无脊椎动物常见病的功能等[2]因而通过各种降解方法制备的褐藻胶寡糖在糖化学、糖生物学、糖工程及糖类药物研究领域具重要的研究价值。目前海藻寡糖的获取方法主要有物理降解法、酸降解法、氧化降解法和酶解法等[3]-[9]。其中酶解法是一种条件温和、可控性强和特异性高的生物降解方法,也是主要的研究方向[10]。海藻胶裂解酶是通过 β 消去机制降解海藻胶,海藻胶的酶解法反应条件易控制,底物特异性高,在寡糖制备各方面明显优于化学和物理降解。因此,高活性褐藻胶裂解酶的研究与开发具有重要的理论意义和应用价值。

褐藻胶裂解酶来源广泛,微生物来源的褐藻胶裂解酶主要来源于海洋细菌、真菌等[11]。本实验从海生植物马尾藻中筛选出一株高产褐藻胶裂合酶菌株,通过研究影响其产酶活力的培养基组成和培养条件,优化其发酵产酶的流程,为酶的高效产出、性质研究、应用探索等奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 样品采集

采集鲜嫩的马尾藻及其生长处海水各 5~10 千克,采集地位于印度洋北部弗洛勒司(Flores)海域,采集的样品于 4℃冷藏密封保存备用。

2.1.2. 培养基配方[12] [13] [14] [15]

驯化富集培养基：褐藻酸钠 0.2%~2%；硫酸铵 0.5%；氯化钠 3%；磷酸氢二钾 0.2%；硫酸镁 0.05%；余量为自来水，氢氧化钠调 pH 7.2~7.4。

初筛平板培养基：海藻酸钠 0.2%；硫酸铵 0.5%；氯化钠 0.9%；磷酸氢二钾 0.2%；硫酸镁 0.03%；琼脂 1.8%，余量为自来水，氢氧化钠调 pH 7.2~7.4。

复筛液体发酵培养基：褐藻酸钠 0.5%；蛋白胨 0.5%；氯化钠 1.5%；磷酸氢二钾 0.2%；硫酸镁 0.05%；余量为自来水，氢氧化钠调 pH 7.2~7.4。

试管斜面培养基：褐藻酸钠 0.5%；营养琼脂 3.5%；余量为自来水，氢氧化钠调 pH 7.2~7.4。

2.2. 实验方法

2.2.1. 样品处理

从冷藏保存的样品中，取 100 克马尾藻鲜藻，剪成不超过 1 cm 左右长的小段放于灭过菌的 1 L 玻璃烧杯中，加入 200~300 ml 海水将其浸没。置于 30℃ 恒温培养箱中温育 5~7 天左右至马尾藻体严重腐烂海水浸液浑浊为止。

2.2.2. 野生菌驯化富集

通过对样品 5~7 天的温育处理，马尾藻体上的原生野生菌得到一定程度的选择性增殖富集，适合 30℃ 发酵条件下的野生菌株得到增殖。进一步需要对这些野生目标菌株进行进一步的驯化富集使其更加适应人为设定的培养条件并充分激发产酶潜能。采用驯化富集培养基连续培养来达到目的。即取 5 ml 温育 5~7 天的马尾藻海水浸液，加入到 100 毫升无菌生理盐水中。无菌生理盐水事先加好玻璃珠(直径 2~3 mm 的玻璃珠约 50 粒)一起灭菌使用。将加入样品菌液的无菌生理盐水置于恒温震荡培养箱中，设定温度为 30℃，设定转速为 180 转/分钟，振荡处理 30 分钟。然后取 5 ml 菌悬液移入到 200 ml 含海藻酸钠 2 g/L 的一代驯化富集培养液中，培养 24 小时以上至培养液浑浊为止，移取 5 ml 培养好的第一代驯化富集培养液至 200 ml 新鲜的第二代驯化富集培养液中，第二代驯化富集培养液中海藻酸钠含量提高到 4 g/L，培养至浑浊移取 5 ml 至 200 ml 新鲜的第三代驯化富集培养液中，三代驯化富集培养液中海藻酸钠添加量提高到 6 g/L，以此类推，连续培养驯化富集八代，驯化富集培养液海藻酸钠添加量在第四代提高到 8 g/L，第五代为 10 g/L，第六代 12 g/L，第七代 15 g/L，第八代 20 g/L 依次逐步提高海藻酸钠添加量，其它配方参数均不变。经过八代连续驯化富集，野生菌习性得到很大改变能够很好适应人工设定的培养条件，不适应环境的野生菌株被淘汰，目标菌的含量得到提高，数量得到放大，从而为后续筛选纯化带来便利。

2.2.3. 初筛鉴定

取上一步中驯化富集了八代的菌液，用灭过菌的浓度为 3% 的盐水按照 10^{-3} 到 10^{-8} 不等梯度进行稀释，取各稀释液 50 μ L 涂布于初筛平板上，30℃ 恒温培养 48 h 进行初筛鉴定。初筛鉴定前先通过平板影印法将待鉴定的母平板上所有菌落完全复制转接到一个新的子平板上(平板均使用初筛平板)。然后再对母平板做初筛鉴定，子平板培养留种。应用氯化钙染色的处理方法使母平板上有褐藻胶降解酶活性的菌落周围显现出“透明圈”，因为氯化钙会与平板培养基中添加的海藻酸钠起反应生成白色的海藻酸钙沉淀使平板变得浑浊，如果菌落有褐藻胶降解酶活性，菌落周围的海藻酸钠就会被降解而不与氯化钙形成沉淀反应，菌落周围就形成“透明圈”。实验采用 1% 的氯化钙溶液对母平板进行浸染处理。每个平板加入 10 毫升 1% 的氯化钙溶液浸染 5~10 分钟后倒掉氯化钙溶液，观察“透明圈”并对透明圈的直径进行精确测定。选取具有较大透明圈的菌落，找到其子平板上对应的菌落接种试管斜面保存以待复筛鉴定，并做好菌种编号特征记录。

2.2.4. 复筛鉴定

将初筛获得的试管菌种用 5 毫升无菌水洗下, 全部转移到 50 mL 灭过菌的发酵培养基中(用 150 毫升瓶盛装), 在 30℃, 180 r·min⁻¹ 转速下培养 18~24 h, 取发酵上清液用 DNS 法测定酶活。

2.2.5. 发酵液酶活测定

采用通用的还原糖显色法测定发酵液的酶活[12]。取 0.1 ml 酶液加入到 1 ml 0.5%的褐藻酸钠底物溶液中, 底物溶液添加 1%的磷酸氢二钾调节 pH 另起稳定反应过程中 pH 的作用, 另需补加 0.05%的硫酸镁激活酶的作用。在 35℃条件下, 振荡反应 60 min 后, 加入 3 ml DNS 显色剂, 沸水浴 5 min 进行显色处理, 然后迅速冷却定容至 15 ml, 用 721 可见分光光度计于 540 nm 波长下测定吸光值。

以无水葡萄糖做标准曲线, 根据反应组和对照组的差值来计算还原糖的产生量。1 个酶活力单位定义为: 1 ml 发酵液在上述条件下, 每分钟产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。

2.2.6. 发酵产酶条件优化

以复筛液体培养基为出发培养基, 150 毫升摇瓶装液 50 毫升, 30℃, 180 r/min 摇床发酵 18~24 h, DNS 法测酶活。依次对培养基碳源、氮源组成及添加量进行优化考察, 进一步对培养基盐度做优化, 再考察培养基初始 pH、培养温度、摇瓶装液量对菌株发酵产酶的影响, 最后进一步探索其它提高酶产量的措施, 实验添加表面活性剂吐温 80 来促进菌株产酶, 每一次实验结果用于下一次实验。

3. 结果与分析

3.1. 菌种筛选

对第五代至第八代完成驯化富集的培养液进行涂布分离单菌株。长好后对要初筛鉴定的母平板做好平板影印留种。氯化钙染色后精确测定菌落“透明圈”直径 TD 值, 筛选 TD 值 ≥ 0.5 cm 的菌株进行子平板对应菌株的试管菌种制备及保藏。菌落“透明圈”如下图 1 所示:



Figure 1. The form of “transparent circle” formed by the staining of tablet colonies with calcium chloride

图 1. 平板菌落在经氯化钙染色后形成的“透明圈”形态

试管菌株制备好以后放在冰箱内 4℃ 冷藏不超过 1 个月，并做好试管菌种的编号，TD 值记录及其它特征的记录。

通过初筛，实验累计获得了 28 株 TD 值 ≥ 0.5 cm 的菌株，分别记为 SE001, SE002, SE003, SE004.....SE028，然后对各菌株进行摇瓶发酵复筛 DNS 法测酶活，初筛、复筛多次测量综合判定后筛选出最优良目标菌株，见下表 1 即为各菌株初筛“透明圈”TD 值，复筛 DNS 酶活值的大体情况。

Table 1. Screening enzyme activity summary

表 1. 菌株初筛复筛主要酶活值数据

菌株编号	初筛透明圈 TD 值(cm)	复筛 DNS 酶活值(U/ml)	备注
SE001	0.52	29.3	
SE002	0.53	35.1	
SE003	0.61	32.4	
SE004	0.58	39.5	
SE005	0.82	35.7	
SE006	0.79	42.6	
SE007	0.77	29.8	
SE008	0.6	35.0	
SE009	0.63	42.9	
SE010	0.55	19.7	
SE011	1.78	5.1	霉菌
SE012	2.39	0.9	霉菌
SE013	0.82	49.7	
SE014	0.73	57.2	
SE015	0.78	23.2	
SE016	0.86	79.1	
SE017	0.88	65.6	
SE018	0.77	71.0	
SE019	0.92	29.3	
SE020	0.91	85.1	
SE021	0.56	42.4	
SE021	0.74	29.9	
SE022	0.68	35.7	
SE023	0.79	48.6	
SE024	0.56	59.3	
SE025	0.83	75.2	
SE026	0.77	43.3	
SE027	0.52	29.8	
SE028	0.81	72.5	

由表 1, 菌株平板初筛“透明圈”直径大小值与复筛发酵酶活值具有一定对应关系但并不绝对, 依据“透明圈”大小来筛选高产菌株有一定参考作用, 但最终需要复筛发酵来综合判定。综合来看菌株 SE020 是最优秀的菌株。不仅酶活是最高的, 是唯一一株液体发酵酶活突破 80 的菌株, 而且其透明圈直径也相对较大, 初筛复筛结果对应关系较好这有利于菌株后期进一步筛选提高。SE020 采用未经优化的培养基发酵酶活即达到了 85.1 U/ml, 这已经高于一般文献报道[15] [16] [17] [18], 如果进一步对其进行发酵产酶条件优化, 相信能获得更高酶活。实验也筛选到少量霉菌如 SE011 和 SE012, 虽然它们“透明圈”TD 值很大但是酶活却不高, 可能由于霉菌液体发酵产酶效率要远低于其固态发酵, 本实验优先考虑细菌, 故选择细菌 SE020 做为目标菌株进行下一步的发酵产酶条件优化的研究。

3.2. 发酵产酶条件优化

3.2.1. 碳源组成及添加量优化

采用不同碳源进行发酵测试, 试验了以褐藻酸钠、醋酸钠、葡萄糖、蔗糖、淀粉、甘油、甘露醇、羧甲基纤维素钠分别作为唯一碳源时菌株生长产酶情况。结果表明褐藻酸钠最有利于菌株产酶。其它碳源不利于菌株产酶, 尤其小分子碳源完全抑制产酶。因此可以推测菌株所产的褐藻胶裂解酶为诱导酶。据文献报道, 大多数褐藻胶裂解酶均属于诱导酶[19] [20] [21] [22]。如下表 2 所示为不同碳源做发酵试验的产酶情况:

很明显海藻酸钠是最有利于产酶, 其它均严重影响菌株产酶。进一步即对褐藻酸钠添加量进行优化, 如图 2 所示, 当褐藻酸钠浓度为 0.8% 时, 可以获得最高发酵酶活, 浓度超过 0.8% 时可能出现碳源过量, 造成碳氮比失衡而不利于菌株产酶性能的最大发挥甚至影响菌株代谢。

经过优化, 在最适褐藻酸钠添加 0.8% 的情况下获得了高达 169.2 U/ml 的发酵酶活, 碳源优化后酶活提高到优化前的 1.9 倍。所以碳源对菌株产酶非常关键。

3.2.2. 氮源组成及添加量优化

进一步做氮源优化, 先采用不同氮源进行发酵测试, 试验了以无机氮源: 硝酸铵、硫酸铵, 有机氮源: 尿素, 有机复合氮源: 蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、玉米浆干粉分别为唯一氮源时发酵产酶情况, 氮源添加量均为 0.5%。实验发现以无机氮、有机氮尿素为氮源时生长缓慢且酶活不高普遍只有添加有机复合氮源时的 1/3~1/2。有机复合氮源玉米浆干粉最优, 酵母膏相对较差。有机复合氮源营养丰富直接为菌株生长产酶提供材料从而提高酶的合成速率提高产量[23]但是酵母膏可能营养过于丰富而不利于产酶。实验情况如图 3。

Table 2. The strain SE020 ferments enzymes under different carbon sources
表 2. 菌株 SE020 采用不同碳源发酵产酶情况

碳源种类	酶活(U/ml)
褐藻酸钠	88.9
醋酸钠	10.4
葡萄糖	3.9
蔗糖	17.6
淀粉	23.0
甘油	12.2
甘露醇	9.7
羧甲基纤维素钠	14.3

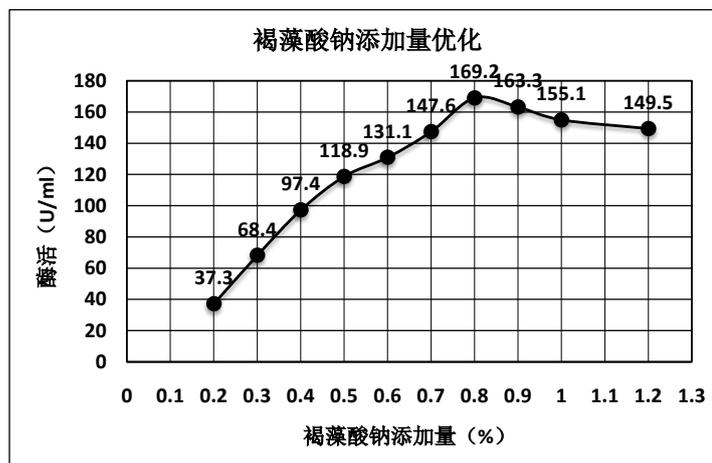


Figure 2. Optimization of addition of sodium alginate

图 2. 褐藻酸钠添加量的优化

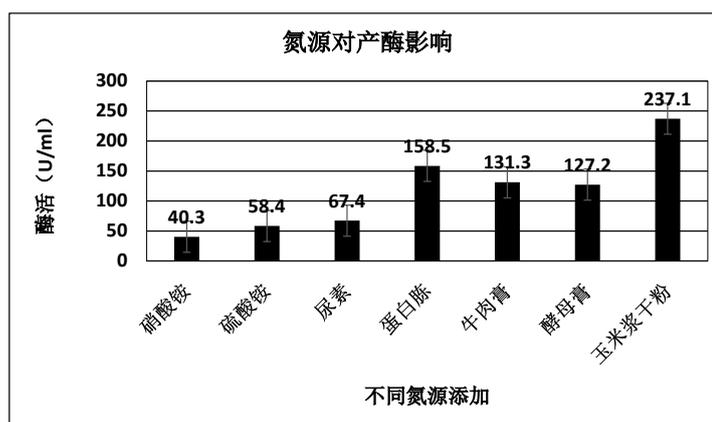


Figure 3. Enzyme production from different nitrogen sources

图 3. 不同氮源的发酵产酶情况

实验表明玉米浆干粉明显有利于产酶所以进一步对玉米浆干粉添加量进行优化, 玉米浆干粉添加 0.9%时达到最高酶活 288.6 U/ml, 再辅加 0.3%的无机氮硫酸铵最终使酶活提高到 312 U/ml 达到优化前的 1.8 倍。所以氮源同样对菌株产酶影响较大。

3.2.3. 培养基盐度优化

进一步优化培养基中 NaCl 的添加量(如图 4)。NaCl 对菌株的生长和产酶也有较大影响, 在 NaCl 添加量低于 0.5%时菌株几乎不能生长, 氯化钠添加量为 3%时酶活最大。可能是菌株来源于海洋, 海洋平均盐分在 3.5%左右, 生存环境决定了菌株的嗜盐性, 3%的氯化钠添加使培养基盐度接近海水而最利于菌株生长。

在最适盐度 3%的条件下, 获得了 385.2 U/ml 的发酵酶活, 酶活较优化前再提高 20%左右。从实验反映出的菌株有一定的嗜盐性特征来看, 菌株极可能为一株海洋细菌。

3.2.4. 培养基初始 pH 优化

据资料培养基初始 pH 对微生物生长产酶影响很大, 细胞产酶最适 pH 常与酶作用最适 pH 接近。一般报道海洋细菌来源的褐藻胶裂解酶的最适作用 pH 在 7.5 左右[18] [19] [20]。通过实验进一步印证了这

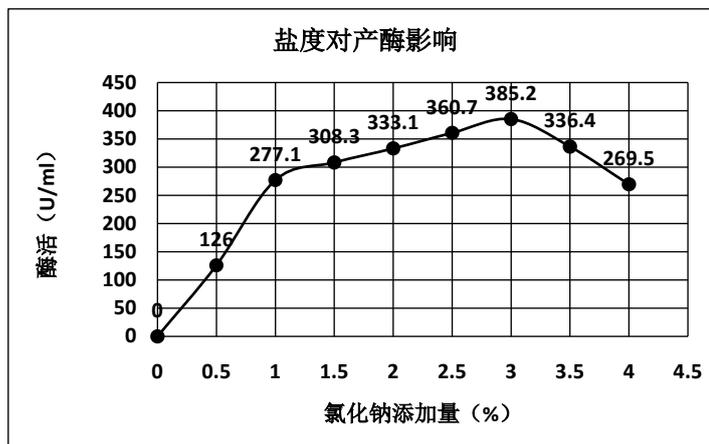


Figure 4. Effect of NaCl addition at different concentrations on enzyme production of strain

图 4. 不同浓度的 NaCl 添加对菌株产酶影响

一点, 实验表明菌株最适生长产酶 pH 在 7.2 左右。实验菌株在 pH6.0、6.5、6.8、7.0、7.2、7.5、8.0、8.5 八个不同 pH 梯度下进行发酵。如图 5 所示。

菌株发酵最适 pH7.2, 过低不利于生长产酶, 过高, 在 pH 高于 8.5 后菌株就完全停止生长产酶, 所以 pH 对菌株的生长产酶影响更大, 需要防止 pH 过高而抑制菌株生长产酶。

3.2.5. 培养温度优化

温度直接影响微生物生长代谢生化反应酶的活性也将对产酶带来较大影响。实验在 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、35℃、40℃ 几种不同温度下发酵产酶, 试验反映菌株在 25℃~35℃ 温度条件下培养, 生长产酶几乎不受温度影响, 但在 20℃ 温度条件下生长、产酶明显受到抑制, 40℃ 以上的温度条件下则几乎停止生长产酶。如图 6 所示为温度对菌株发酵产酶的影响:

试验中从温度控制的便利性方面选取发酵温度为 30℃。

3.2.6. 装液量优化

装液量多少关乎培养基中溶氧, 培养基中碳源需要经有氧降解才能产生大量 ATP, 从而为细胞生长、酶的合成提供足够的能量。所以装液量也将对产酶带来较大影响。采用 150 毫升瓶进行试验, 装液量设定 30 毫升、50 毫升、70 毫升、90 毫升、120 毫升五个梯度, 结果显示 50 毫升装液量酶活最高。如图 7 所示:

装液量确实对产酶影响较大, 150 毫升瓶装液量高于 70 毫升后可能就会由于供氧不足而不利于菌株生长产酶。装液量到 120 毫升时酶活不及最佳产酶水平的一半。而实验中装液量为 30 毫升时虽然供氧充足, 但是由于体积太小, 水分蒸发造成培养基成分变化较大从而对生长产酶造成不利影响。所以通过该实验, 菌株为好氧菌, 150 毫升摇瓶发酵装液量最佳为 50 毫升。

3.2.7. 表面活性剂的优化

表面活性剂可以与细胞膜相互作用, 增加细胞膜的通透性, 有利于胞外酶的分泌, 从而提高胞外酶的产量。选用吐温 80 进行试验, 培养基中添加 0.1% 吐温 80 即可获得最大产酶。如图 8, 分别在培养基中添加 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.5% 的吐温 80 进行发酵试验观察吐温 80 对菌株产酶影响。

吐温 80 对菌株产酶影响明显, 最适添加量为 0.1%, 过低效果不足, 过高可能对细胞有一定毒害作

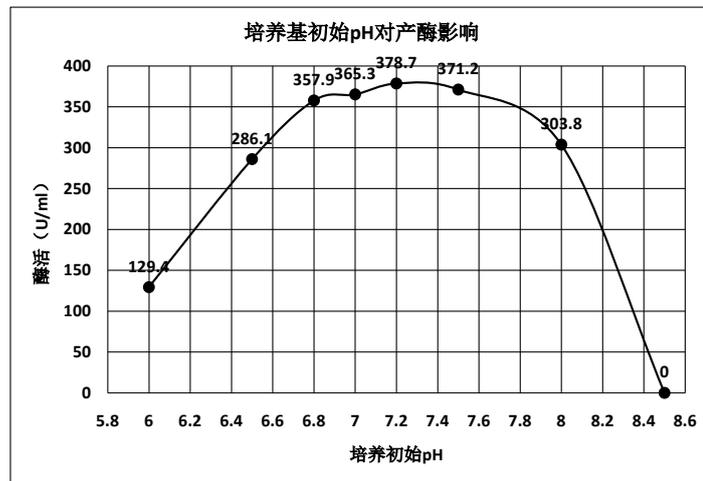


Figure 5. Fermentation of strains at initial pH of different media
图 5. 菌株在不同培养基初始 pH 下发酵情况

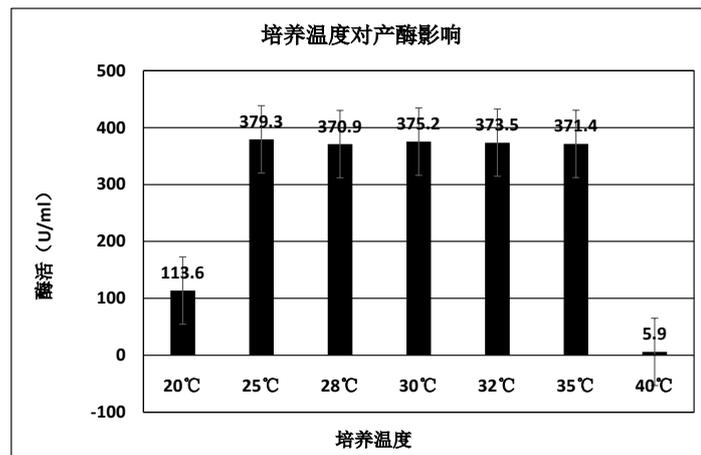


Figure 6. Effect of culture temperature on enzyme production of strain
图 6. 培养温度对菌株产酶的影响

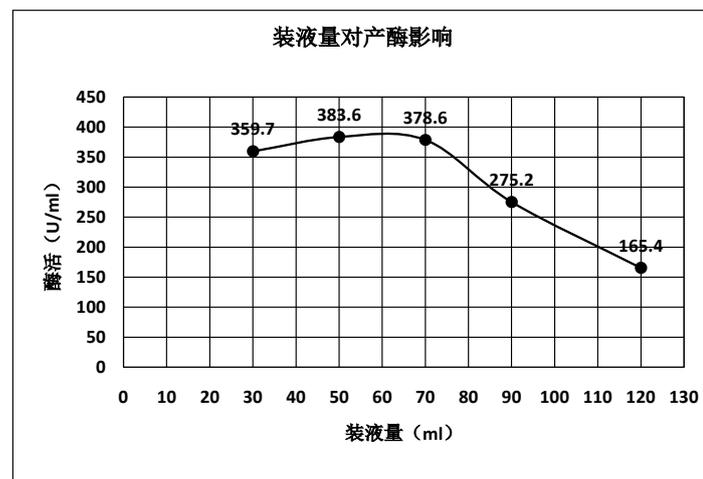


Figure 7. Effect of liquid quantity on enzyme production
图 7. 装液量对产酶影响

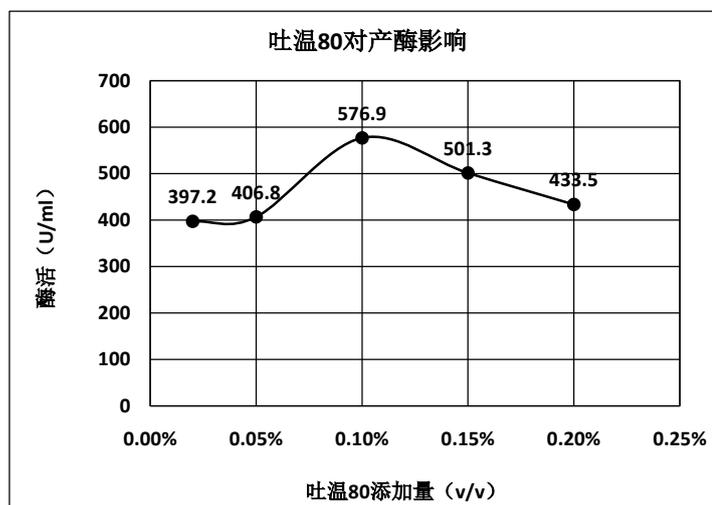


Figure 8. Effect of Twain 80 addition on enzyme production of strain
图 8. 吐温 80 添加量对菌株产酶的影响

用。从酶活提高情况来看菌株所产酶为胞外酶，如果是胞内酶应该不会有这么大的提高，表面活性剂优化后酶活提高了将近 50%，最终通过以上 7 个方面的优化，菌株酶活提高到优化前的 6.78 倍。

4. 结果与讨论

1) 本研究通过系统的菌种选育方法，从样品的采集开始，到样品处理，目标菌驯化富集，再到高产菌株的初筛，复筛，最优菌株产酶条件优化等步骤最终从海洋藻类马尾藻中选育出 1 株酶活力很高的产褐藻胶裂合酶菌株，优化后菌株摇瓶发酵酶活提高了 6.78 倍达到了 576.9 U/ml，远高于一般文献报道 [15]-[28]；

2) 通过对菌株产酶条件优化的研究，一是找到了 1 种较适合的产酶条件：培养基组成及配方为：褐藻酸钠 0.8%，玉米浆干粉 0.9%，硫酸铵 0.3%，氯化钠 3%，磷酸氢二钾 0.2%，硫酸镁 0.05%，余量为自来水，用氢氧化钠调节初始 pH7.2，培养工艺为：采用 150 ml 三角瓶装液 50 ml 进行恒温振荡培养，培养温度全程控制在 30℃，摇床转速 180 r/min，培养 18~24 h 达到最大酶活 580 U/ml 左右。另外，通过实验发现菌株为好氧菌，具有一定程度的嗜盐性，菌株很可能为一种海洋细菌，菌株所产的褐藻胶裂合酶为胞外酶。

3) 本研究获得的菌株生长快，酶活高，营养要求简单，极具工业生产应用潜质，而且胞外酶利于提取适合酶制剂生产研究。

参考文献

- [1] 宋凯, 于文功, 韩峰, 等. 海洋弧菌褐藻胶裂解酶的分离纯化及性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(5): 473-477.
- [2] 刘斌, 王长云, 张洪荣, 等. 海藻多糖褐藻胶生物活性及其应用研究新进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(6): 36-41.
- [3] 杨钊, 范莹. 不同降解方法制备褐藻胶甘露糖醛酸寡糖的结构特点[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 69-71.
- [4] 袁兆慧, 韩丽君, 林伟, 等. 褐藻酸降解酶的制备及其性质研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 78-80.
- [5] 韩宝芹, 戴继勋, 王海. 海藻工具酶研究 I. 褐藻酸降解菌的分离鉴定及其褐藻酸酶形成条件研究[J]. 海洋学报, 1997, 19(5): 97.
- [6] 纪明候. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 54.

- [7] 秦国奎, 张玉忠, 陈秀兰, 等. 海藻酸盐酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 26.
- [8] 侯保兵, 刘书来, 张建友, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌的发酵优化研究[J]. 水产科学, 2009, 28(11): 667-670.
- [9] 刘玉佩, 汪立平, 赵勇, 等. 解淀粉芽孢杆菌产褐藻胶裂解酶的发酵条件优化[J]. 湖南农业科学, 2010, 5(23): 17-20.
- [10] Baron, A.J., Wong, T.Y., Hicks, S.J., *et al.* (1994) Alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae*, Subsp *Aerogenes*, Gene cloning, Sequence Analysis and High Level Production in *Escherichia coli*. *Gene*, **143**, 61. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90605-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90605-X)
- [11] Boyd, A., Ghosh, M., May, T.B., *et al.* (1993) Sequence of the algL Gene of *Pseudomonas aeruginosa* and Purification of Its Alginate Lyase Product. *Gene*, **131**, 1. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90662-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90662-M)
- [12] 项翔. 产褐藻酸酶菌株的筛选、发酵条件优化和酶学性质研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [13] 刘涛, 郭继强, 王运吉. 海藻酸裂解酶的发酵条件优化[J]. 大连轻工业学院学报, 2003(2): 139-141.
- [14] Caswell, R.C., Gacesa, P., Luttrell, K.E., *et al.* (1989) Molecular Cloning and Heterologous Expression of a *Klebsiella pneumoniae* Gene Encoding Alginate Lyase. *Gene*, **75**, 127. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90389-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90389-2)
- [15] 张绪, 赵琳, 钱龙, 等. 海藻酸分解菌研究进展[J]. 生命科学, 2011, 24(5): 475-482.
- [16] 张宁宁. 褐藻酸降解菌株 S3 的筛选分离及培养条件和产酶能力[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(10): 106-108.
- [17] 马悦欣, 纪涛, 李慧琼, 等. 假交替单胞菌 LJ1 菌株产褐藻胶裂解酶的培养条件优化及酶学性质[J]. 微生物学报, 2009, 49(8): 1086-1094.
- [18] 李丽妍, 管华诗, 江晓路, 等. 海藻工具酶——褐藻胶裂解酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 838-845.
- [19] 蔡俊鹏, 程璐. 褐藻酸裂解酶及其裂解产物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 219-222.
- [20] 刘妍, 李志勇. 具有多重酶活性的澳大利亚厚皮海绵共附生放线菌的研究[J]. 生物技术通报, 2006(5): 121-125.
- [21] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., *et al.* (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, **173**, 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- [22] Cello, F.D., Bevivino, A., Chiarini, L., *et al.* (1997) Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* Population Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Plant Growth Stages. *Applied and Environment Microbiology*, **63**, 4485-4493.
- [23] Sawabe, T., Ohtsuka, M. and Ezura, Y. (1997) Novel Alginate Lyases from Marine Bacterium *Alteromonas* sp. Strain H-4. *Carbohydrate Research*, **304**, 69-76. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00194-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00194-8)
- [24] Sim, S.J., Baik, K.S., Park, S.C., *et al.* (2011) Characterization of Alginate Lyase Gene Using a Metagenomic Library Constructed from the Gut Microflora of Abalone. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **39**, 585-593. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1054-0>
- [25] Li, L.Y., Jiang, X.L., Guan, H.S., *et al.* (2011) Three Alginate Lyases from Marine Bacterium *Pseudomonas fluorescens* HZJ216: Purification and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164**, 305-317. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9136-4>
- [26] Hu, X., Jiang, X. and Hwang, H.M. (2006) Purification and Characterization of an Alginate Lyase from Marine Bacterium *Vibrio* sp. Mutant Strain 510-64. *Current Microbiology*, **53**, 135-140. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0347-9>
- [27] Kim, D.E., Lee, E.Y. and Kim, H.S. (2009) Cloning and Characterization of Alginate Lyase from a Marine Bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Marine Biotechnology*, **11**, 10-16.
- [28] Zhang, Y.Q., Schumann, P., Li, W.J., *et al.* (2005) *Isoptericola halotolerans* sp. nov., a Novel Actinobacterium Isolated from Saline Soil from Qinghai Province, North-West China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1867-1870.
- [29] Stackebrandt, E., Schumann, P. and Cui, X.L. (2004) Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou *et al.* 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 685-688. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02878-0>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org