

## 高效褐藻胶降解菌的筛选与产酶条件优化

李婷婷<sup>1,2</sup> 陈倩<sup>2</sup> 石萍<sup>1</sup> 耿旭<sup>3,†</sup>

1. 深圳市重金属污染控制与资源化重点实验室, 北京大学深圳研究生院环境与能源学院, 深圳 518055; 2. 北京市新型污水深度处理工程技术研究中心, 北京大学环境工程系, 北京 100871; 3. 中美食品安全联合研究中心, 西北农林科技大学, 杨凌 712100;

† 通信作者, E-mail: sgeng@ucdavis.edu

**摘要** 以海藻酸钠为唯一碳源, 从天然腐烂海带中筛选得到一株高效褐藻胶降解菌株53#, 经形态学观察和16S rRNA鉴定, 确定为类芽孢杆菌*Paenibacillus agaridevorans*。采用正交试验方法, 以pH、温度、NaCl浓度和海藻酸钠初始浓度为影响因素, 对该菌株的产酶条件进行优化, 得到53#菌的最佳产酶条件: pH=8, 25℃, NaCl浓度15 g/L, 海藻酸钠初始浓度15 g/L。在最佳产酶条件下, 褐藻胶裂解酶最大酶活可达390.53±17.32 U/mL。筛选得到的类芽孢杆菌*Paenibacillus agaridevorans* 53#具有易于培养、产酶速度快和酶活力高等优点, 能够实现褐藻胶的高效糖化, 在褐藻生产生物乙醇领域具有潜在利用价值。

**关键词** 褐藻胶降解; 褐藻胶裂解酶; 类芽孢杆菌; 生物乙醇

**中图分类号** X172

## Screening of Alginate Degrading Bacteria and Optimization of Its Enzyme-Producing Conditions

LI Tingting<sup>1,2</sup>, CHEN Qian<sup>2</sup>, SHI Ping<sup>1</sup>, GENG Shu<sup>3,†</sup>

1. Shenzhen Key Laboratory for Heavy Metal Pollution Control and Reutilization, School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055; 2. Beijing Engineering Research Center for Advanced Wastewater Treatment, Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871; 3. Sino-US Joint Food Safety Research Center, Northwest A&F University, Yangling 712100; † Corresponding author, E-mail: sgeng@ucdavis.edu

**Abstract** 53#, a strain of efficient alginate degrading bacteria, is isolated from rotted kelp using sodium alginate as the only carbon resource. Strain 53# is identified as *Paenibacillus agaridevorans* based on physiological characteristics and 16S rRNA sequencing. The optimal yield condition of strain 53# is identified at pH=8, T=25°C, NaCl 15 g/L, and sodium alginate 15 g/L by orthogonal experiment and analysis, and the highest enzyme activity is 390.53±17.32 U/mL. Strain 53# has the advantages such as being cultivated easily, producing enzyme fast and having high enzyme activity. It can achieve a high efficiency for saccharification of alginate and thus has potential value to be utilized in the production of bioethanol from brown algae.

**Key words** alginate degradation; alginate lyase; *Paenibacillus*; biofuel

近年来, 海洋藻类以生长速度快, 光合作用效率高, 不含难降解木质素, 不与粮食作物争夺土地和淡水资源等优点成为第三代生物能源原料<sup>[1]</sup>。海洋藻类分为微藻和大型海藻。由于油脂含量较高, 微藻仅适用于生产生物柴油; 因碳水化合物含量较高, 大型海藻被认为是开发生物乙醇的优质原料。

以大型海藻中典型的褐藻门海带为例, 干重的30%~40%为碳水化合物<sup>[2]</sup>, 这些碳水化合物以褐藻胶和甘露醇为主, 其中褐藻胶占碳水化合物总量的67%以上<sup>[3]</sup>。

Horn 等<sup>[4]</sup>最早将褐藻门海带用于生物乙醇的发酵, 发现毕赤酵母 *Pichia angophorae* 可以利用北

方海带 *Laminaria hyperborean* 中含有的甘露醇和褐藻淀粉发酵乙醇。此后,越来越多的研究者关注和探索利用褐藻组分进行乙醇发酵。然而,大分子的褐藻胶不能被现有的生物能源转化类微生物直接利用,因而褐藻胶降解糖化是乙醇发酵过程的关键步骤。

目前比较常见的褐藻胶降解糖化方法有稀酸加热法、直接加热法和生物方法<sup>[5]</sup>。生物方法具有高效、预处理简单和无污染等优点,是褐藻胶糖化的必要手段。Wargacki 等<sup>[6]</sup>将灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 中多个褐藻胶代谢与转运相关基因导入大肠杆菌,通过构建基因工程菌,将褐藻胶、甘露醇和葡聚糖等多种碳水化合物成功地转化为乙醇。Enquist-Newman 等<sup>[7]</sup>则通过基因改造酵母菌,实现了对褐藻胶等碳水化合物的转化。与基因工程方法相比,酶解法因具有底物转移性强的特点而备受关注;酶解法的酶解产物褐藻寡糖还能够抗凝血<sup>[8]</sup>,降血糖血脂<sup>[9]</sup>,抗肿瘤<sup>[10-11]</sup>,清除自由基<sup>[12]</sup>,促进肠道双歧杆菌生长<sup>[13]</sup>,具有较高的食用和药用价值。因此,筛选和发现高效的褐藻胶降解菌,进而提取其褐藻胶裂解酶进行褐藻胶的酶解,逐渐成为这一领域的研究热点。

本研究拟以海藻酸钠为唯一碳源,从天然腐烂的海带中筛选高效褐藻胶降解菌株,通过形态学和系统发育树分析,对高效菌株进行鉴定;并采用正交试验法,对 pH、培养温度、盐度及褐藻胶初始浓度等条件进行优化,以得到高效菌种的最佳产酶条件,为高效降解褐藻胶及褐藻生物能源转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

初筛培养基:海藻酸钠 2~10 g/L,硫酸铵 5.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸亚铁 0.01 g/L,氯化钠 15 g/L,磷酸二氢钾/磷酸氢二钾 50 mmol/L,将 pH 值调节为 7,固体培养基添加琼脂 20 g/L。121.5℃灭菌 30 分钟。

复筛培养基:海藻酸钠 10 g/L,硫酸铵 5.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸亚铁 0.01g/L,氯化钠 15 g/L,磷酸二氢钾/磷酸氢二钾 50 mmol/L,将 pH 值调节为 7。121.5℃灭菌 30 分钟。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌种的驯化与筛选

用过滤后的海水浸泡天然腐烂海带约一周,得

到菌悬液。驯化步骤:取 1 mL 菌悬液加入 30 mL 海藻酸钠浓度为 2 g/L 的初筛培养基中,于 25℃,160 r/min 培养 72 小时;取 1 mL 培养液,再次加入新鲜的 4g/L 海藻酸钠初筛培养基中,重复上述操作,依次将培养基中的海藻酸钠浓度提高至 6, 8 和 10 g/L。

最后一代菌液培养 72 小时后,涂布于 10 g/L 海藻酸钠固体初筛培养基上,25℃培养 72 小时后,挑取不同形态的菌落进行平板划线分离,得到单菌落菌株。

从初筛平板上挑取单一菌落转移至 100 mL 复筛培养基中,25℃,160 r/min 摇瓶培养,每 24 小时取样测定生物量和酶活力,选取生长较快、酶活力高的菌株为优势菌株进行优化实验。

#### 1.2.2 菌株的鉴定

取适量菌液稀释后涂片固定,采用革兰氏染液(南京建成生物工程研究所有限公司)染色后在 Olympus BX53 显微镜(Olympus, 日本)下观察细胞个体形态特征(目镜放大 10 倍,物镜放大 100 倍)。

用 16S rRNA 基因测序法进行菌种鉴定。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型,GENEray Biotechnology)提取总 DNA,利用通用引物(27F, 1492R)进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶纯化后,送至华大基因(深圳)进行 TA 克隆及测序。使用 MEGA 6.06 软件,将测序结果与 NCBI 数据库中的序列进行比对分析,设置算法自检程序 Bootstrap 1000 次,使用最大似然法建立系统发育树,确定菌株种类。

#### 1.2.3 酶活测定

褐藻胶裂解酶能以  $\beta$ -消去反应催化降解褐藻胶,一侧得到还原末端,另一侧为带有 C4,5 双键的 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranosyluronic acid 结构的非还原末端,该结构在 230~240 nm 处有强吸收峰。根据此裂解产物的特征,可采用 DNS 法测定还原糖,或用紫外吸收法表征酶活力<sup>[14]</sup>。预实验采用两种方法测定,得到一致的结果,并排除了硫酸铵硝化反应的可能性。本文中主要采用紫外吸收法表征酶活,具体方法如下:将菌悬液在 10000 r/min 离心 10 分钟,取 50  $\mu$ L 上清液,加入 0.95 mL 海藻酸钠溶液(1%)中,测定其 1 分钟内在 235 nm 处吸光度的变化情况<sup>[15]</sup>。将 1 mL 酶液在上述条件下 OD<sub>235</sub> 每分钟增加 0.1 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.4 产酶优化实验设计

综合考虑生长速度及酶活力等因素设计正交试验, 进行产酶条件优化研究。通过单因素实验, 初步判断菌株适宜生长的条件, 选择 pH、温度、NaCl 浓度和海藻酸钠初始浓度, 设计 4 因子 3 水平正交试验表(表 1), 探索最适产酶条件。

1.2.5 测试分析方法

菌悬液生物量用在 600 nm 处的吸光值来表征, 采用紫外分光光度计 UV1800 (岛津, 日本)测定。pH 值采用 pH201 型 pH 计(HANNA, 意大利)测定, 测定之前用标准的 pH 溶液进行两点校准。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选

从天然腐烂海带得到菌悬液, 经过逐级驯化培养, 分离得到 7 株能够以海藻酸钠为单一碳源进行正常生长并具有海藻酸钠降解功能的菌株 (图 1), 其中, 26#, 40#, 41#和 42#均在 48 小时时产酶活力最高, 并在 72 小时进入稳定期。综合考察菌落形态、显微镜图像及细菌生长、酶活情况, 初步判定这 7 株菌主要分属 3 类(分别以 40#, 44#, 53#为代表), 特征具体如下: 40#菌株为短棒状, 生长速度快, 菌落形状不规则, 亮黄色, 边缘半透明, 表面光滑, 湿润, 菌落较大, 接种 48 小时后酶活最高, 可达 253.2 U/mL, 72 小时后进入稳定期, 此后酶活性逐渐降低; 44#菌株呈杆状, 生长非常缓慢, 菌落形状不规则, 白色不透明, 表面粗糙, 干燥, 菌落非常小, 培养 120 小时后 OD<sub>600</sub> 仅为 0.35, 但其酶活持续升高, 120 小时时的酶活可达 370 U/mL; 53#菌株(图 2)为杆菌, 生长速度快, 菌落圆形, 白色不

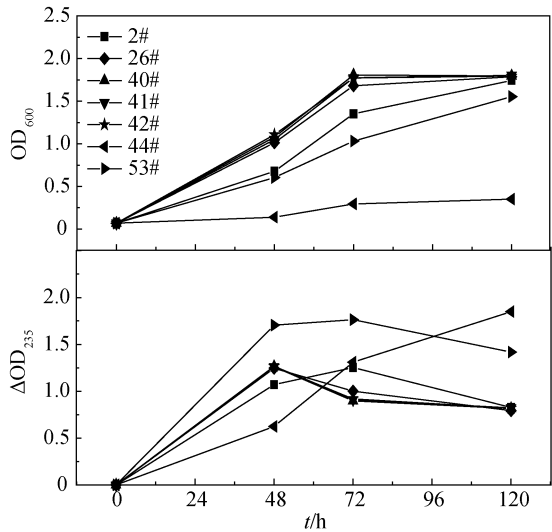


图 1 多株褐藻胶降解菌生长及酶活  
Fig. 1 Bacterial growth and enzyme activity of strains of alginate-degrading bacteria

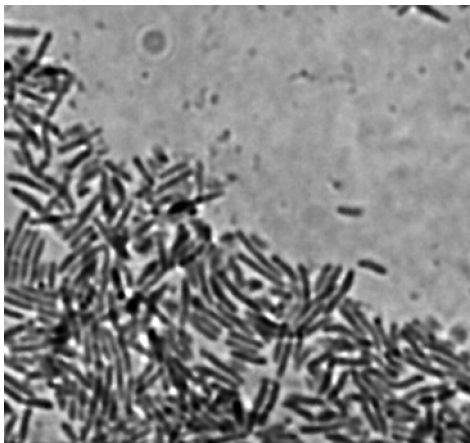


图 2 菌株 53#的显微照片  
Fig. 2 Optical micrograph of strain 53#

表 1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal experiment design

编号	pH	T/°C	NaCl 浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	海藻酸钠初始 浓度/(g·L <sup>-1</sup> )
1	6	22	15	5
2	6	25	30	10
3	6	28	45	15
4	7	22	30	15
5	7	25	45	5
6	7	28	15	10
7	8	22	45	10
8	8	25	15	15
9	8	28	30	5

透明, 表面光滑, 湿润, 菌落较小, 120 小时的培养时间内菌株持续增殖, 酶活在 48 小时时即可达到最高值 352.6 U/mL。综合比较细菌的生长和产酶情况, 53#菌株产酶速率快, 酶活性较高, 因此将其选定为目标菌株。

2.2 菌株的鉴定

通过聚合酶链式反应(PCR), 对 53#菌株的 16S rRNA 的 DNA 进行扩增, TA 克隆杂交测序得到 1532 个碱基对, 将其与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rRNA 基因序列进行比对分析建立系统发育树(图 3), 结果表明 53#菌株与类芽孢杆菌 *Paenibacillus agaridevorans* 同源性最高, 相似度为

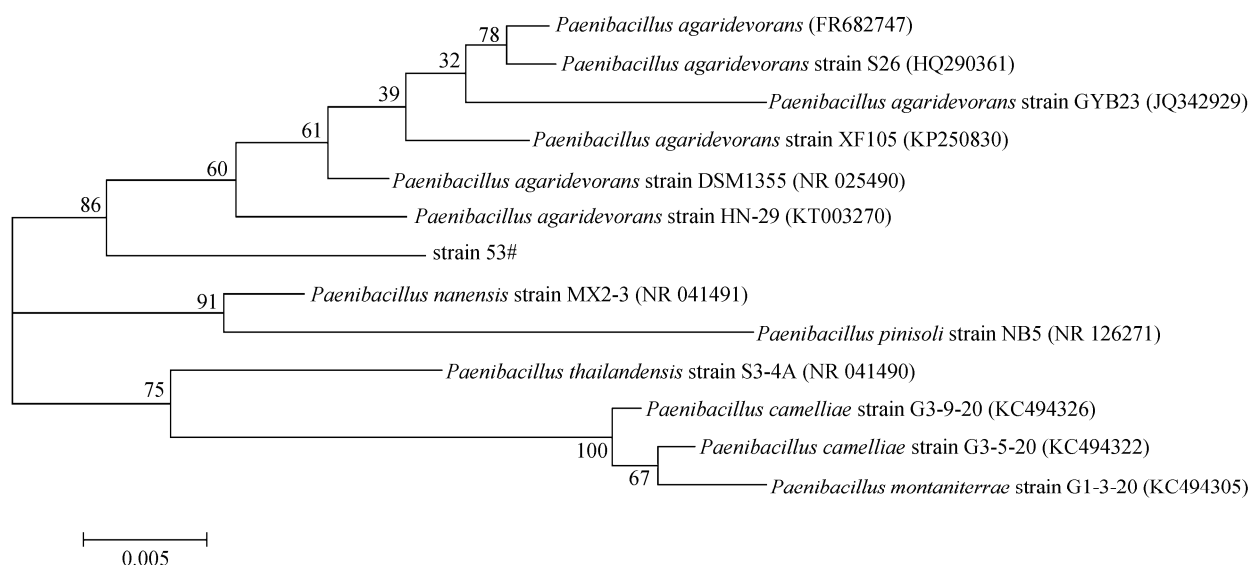


图 3 菌株 53#系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain 53#

97%, 因此确定其为类芽孢杆菌 *Paenibacillus agaridevorans*。迄今为止, 文献中报道的产褐藻胶裂解酶的菌株主要集中在交替单胞菌, 弧菌, 假交替单胞菌等种属<sup>[16]</sup>, 关于类芽孢杆菌褐藻胶裂解酶的报道较少, 本研究得到的这株菌株是对现有褐藻降解菌株的补充。

### 2.3 菌株产酶条件优化

通过正交试验优化 53#菌的产酶条件, 并解析各因素的影响, 以确定最佳产酶条件, 提高酶活。

正交试验中, 极差越大说明相对应的因素对指标的影响越大, 即该因素越关键。从表 2 可知, pH、温度、NaCl 浓度和海藻酸钠初始浓度 4 个因素对褐藻胶裂解酶最大酶活的影响强弱顺序为: 海藻酸钠初始浓度>温度>NaCl 浓度>pH。以最大酶活为主要指标, 正交试验分析得出 53#菌株的最适产酶条件为 pH=8, 温度 25℃, NaCl 浓度 15 g/L, 海藻酸钠初始浓度 15 g/L。

上述 4 个因素中, pH 和 NaCl 浓度对于 53#菌

表 2 正交试验结果  
Table 2 Results of orthogonal experiment design

编号	pH	T/°C	NaCl 浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	海藻酸钠初始浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	最大酶活/(U·mL <sup>-1</sup> )
1	6	22	15	5	203.93
2	6	25	30	10	257.50
3	6	28	45	15	283.80
4	7	22	30	15	359.54
5	7	25	45	5	132.27
6	7	28	15	10	214.40
7	8	22	45	10	268.33
8	8	25	15	15	390.33
9	8	28	30	5	61.60
$k_1$	238.41	266.26	259.55	132.93	
$k_2$	242.40	267.03	229.54	247.74	
$k_3$	244.42	189.93	236.13	344.55	
极差	6.01	77.10	30.01	211.62	

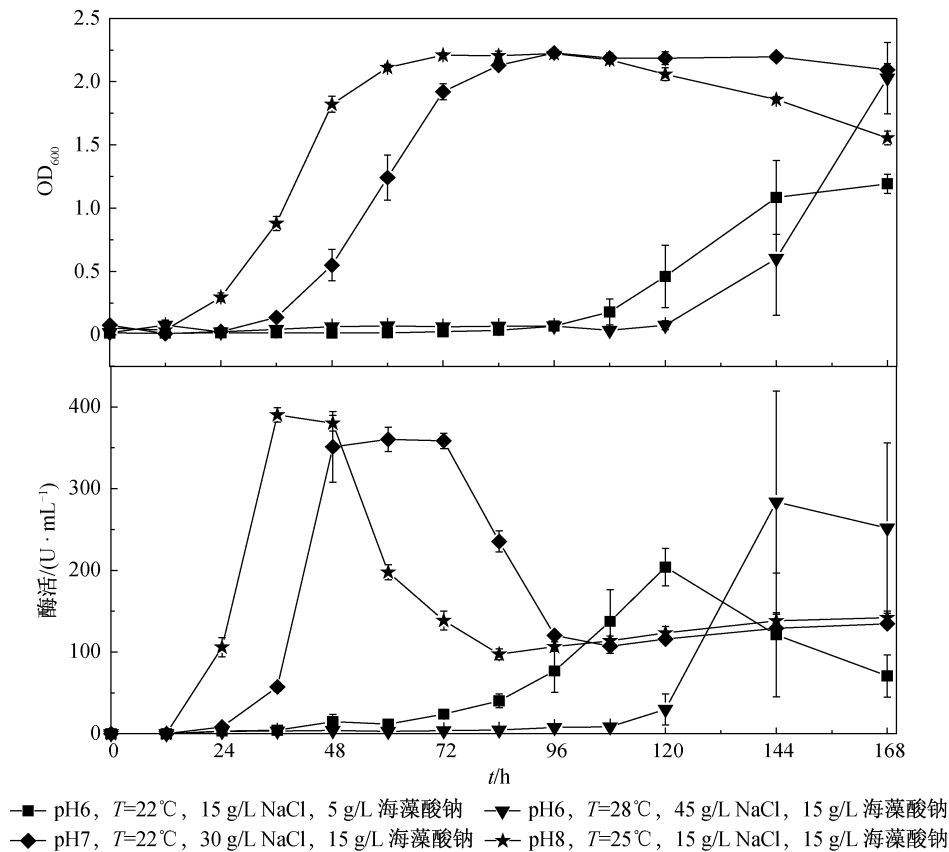


图4 正交试验各组生长及酶活变化

Fig. 4 Bacterial growth and enzyme activity of orthogonal experiment design

株最大酶活的影响最不显著。但从图4可以看出,弱酸性条件会导致细菌迟滞期延长至60~96小时,这可能是低pH条件下产酶速率低的主要原因。在NaCl浓度为30 g/L的条件下,53#菌株生长速率最快,这与海洋细菌较适应3%的海水盐度是一致的。然而,褐藻胶裂解酶酶活在NaCl浓度为15 g/L时最大,且随着NaCl浓度从15 g/L升高到45 g/L,最大酶活呈逐步下降趋势,说明该菌株的生长速率与产酶速率不具有直接的正相关关系。总体来看,53#菌株在22~28℃的温度范围内均可以正常生长,较高的温度(28℃)有益于细菌快速繁殖,但不利于提高酶活,酶活在28℃受到显著抑制。在4个影响因素中,褐藻胶底物浓度对粗酶液酶活的影响最显著,这与褐藻胶裂解酶是底物诱导酶有关,较高的褐藻胶浓度在起到底物诱导作用的同时,又保证了足够的碳源,保障细菌生长繁殖。

以海藻酸钠作为唯一碳源,在正交试验优化出最适培养条件(pH=8, 25℃, NaCl 15 g/L, 海藻酸钠 15 g/L)下进行验证实验。如图5所示,培养基中褐

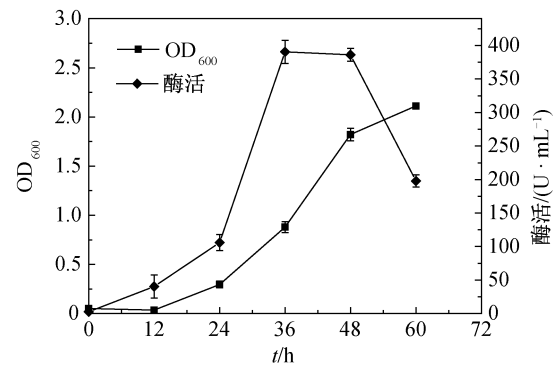


图5 最优条件下菌株53#生长及酶活变化

Fig. 5 Bacteria growth and enzyme activity of strain 53# on optimal conditions

藻胶裂解酶的释放和增长先于细菌的快速增殖,随着细菌生物量的增加,培养基中总酶活迅速提高,培养36小时即可达到最大酶活 $390.53 \pm 17.32$  U/mL,此后海藻酸钠被降解,含量减少,褐藻胶裂解酶作为诱导酶随着底物消耗,合成量减少,培养基酶活也开始下降。

表 3 来自多种微生物的褐藻胶裂解酶  
Table 3 Alginate lyase from various microorganisms

酶来源	处理手段	粗酶活/(U · mL <sup>-1</sup> )	纯化后酶活/(U · mL <sup>-1</sup> )	文献来源
交替单胞菌 <i>Alteromonas</i> H4	无	146.45 <sup>a</sup>		[22]
<i>Vibrio</i> sp. 510-64	复合诱变	289.1 <sup>b</sup>		[17]
蜡样芽胞杆菌 F1-5-10	转基因	12.20 <sup>b</sup>	26.37	[18–19]
<i>Vibrio</i> sp. QY105	硫酸铵盐析, 琼脂糖凝胶色谱纯化	15.86 <sup>b</sup>	76.18	[23]
<i>Alteromonas</i> sp strain No. 272	二乙胺基乙基纤维素层析, 琼脂糖凝胶色谱纯化	8.3 U/mg <sup>b</sup>	1122.8 U/mg	[24]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524	离子交换柱, 凝胶过滤	62.6 <sup>b</sup>	244.94	[25]
<i>Paenibacillus</i> sp strain 8-5	转基因	30.0 <sup>b</sup> (胞外酶) 61 <sup>b</sup> (胞内酶)		[21]
53#	驯化	390.53±17.32 <sup>b</sup>		本研究

注: a 还原糖法表征酶活; b 紫外吸收法表征酶活。

针对已发现的褐藻胶降解菌粗酶活力有限的问题, 研究者多采用驯化、诱变和基因改造等多种手段来提高菌株产酶活力, 并进一步分离纯化, 以获得活性较高的褐藻胶裂解酶。胡晓珂<sup>[17]</sup>从菌株弧菌(*Vibrio* sp. 510)出发, 通过复合诱变和选育, 得到一株酶活力显著提高、生物学性状稳定的突变菌株 *Vibrio* sp. 510-64, 最大酶活可达 289.1 U/mL。汪立平等<sup>[18]</sup>从蜡样芽胞杆菌 F1-5-10 中提取 DNA, 克隆得到褐藻胶裂解酶基因, 并构建到大肠杆菌 BL21 中诱导表达, 粗酶活力为 12.20 U/mL, 后来经过条件优化, 进一步提高到 26.37 U/mL<sup>[19]</sup>。Tavernier 等<sup>[20]</sup>从 *Alteromonas* sp strain No. 272 中得到粗酶 8.3 U/mg, 分离纯化后酶活可提高至 1122.8 U/mg。Qiao 等<sup>[21]</sup>筛选得到一株类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp strain 8-5, 发现其胞外酶活力达 30.0 U/mL, 胞内酶活力达 61 U/mL。通过对比(表 3)可以发现, 本研究中筛选得到的 53#菌株在未经诱变和基因改造的条件下, 产生的褐藻胶裂解酶活性较高, 具有显著的优势, 在生物发酵乙醇过程中具有较高的利用价值。

### 3 结论

从天然腐烂海带中筛选出一株高效褐藻胶降解菌株 53#, 通过菌体形态观察和 16S rRNA 基因序列分析, 确定为类芽孢杆菌 *Paenibacillus agarivorans*。采用正交分析法对 53#菌的产酶条件进行优化, 确定了最佳产酶条件: pH = 8, 温度 25°C, NaCl 浓度 15 g/L, 海藻酸钠初始浓度 15 g/L, 在此条件下可以获得的最大酶活为 390.53±17.32

U/mL。菌株 53#具有易于培养、产酶速度快、酶活力高等优点, 在褐藻寡糖生产和褐藻生物能源转化等领域具有潜在利用价值。

### 参考文献

- [1] Daroch M, Geng S, Wang G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 2013, 102: 1371–1381
- [2] Horn S, Aasen I, Østgaard K. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, 24 (1): 51–57
- [3] 陈姗姗, 潘诗翰, 董蓉, 等. 褐藻燃料乙醇研究进展及其应用前景. *中国酿造*, 2011, 30(4): 11–15
- [4] Horn S, Aasen I, Østgaard K. Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000, 25(5): 249–254
- [5] 张洪荣, 王长云, 刘斌, 等. 一种饱和褐藻胶寡糖的制备方法. *中国海洋药物*, 2006, 25(3): 1–6
- [6] Wargacki A J, Leonard E, Win M N, et al. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 2012, 335: 308–313
- [7] Enquist-Newman M, Faust A M E, Bravo D D, et al. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, 2014, 505: 239–243
- [8] Wall D, Douglas S, Ferro V, et al. Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. *Thrombosis Research*, 2001, 103(4): 325–335

- [9] 王庭欣, 王庭祥, 庞佳宏. 海带多糖降血糖, 血脂作用的研究. 营养学报, 2007, 29(1): 99–100
- [10] Iwamoto Y, Xu X, Tamura T, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(2): 258–263
- [11] Fujihara M, Nagumo T. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydrate Research*, 1993, 243(1): 211–216
- [12] 孙丽萍, 薛长湖, 许家超, 等. 褐藻胶寡糖体外清除自由基活性的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(5): 811–814
- [13] Akiyama H, Endo T, Nakakita R, et al. Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(2): 355–356
- [14] Rahman M M, Inoue A, Tanaka H, et al. Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 157(4): 317–325
- [15] Li L, Jiang X, Guan H, et al. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(6): 794–800
- [16] Wong T Y, Preston L A, Schiller N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Reviews in Microbiology*, 2000, 54(1): 289–340
- [17] 胡晓珂. 褐藻胶裂合酶工程化研究与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004
- [18] 汪立平, 刘玉佩, 孙晓红, 等. 褐藻胶裂解酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶学性质. 食品与生物技术学报, 2012(2): 83–88
- [19] 李安雪, 汪立平, 赵勇. 重组褐藻胶裂解酶基因工程菌的高密度培养. 食品工业科技, 2013, 34(7): 202–205
- [20] Tavernier M L, Petit E, Delattre C, et al. Production of oligoglucuronans using a monolithic enzymatic microreactor. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(15): 2687–2691
- [21] Qiao M, Ouyang L M. Recombinant Production of alginate lyase for improved stress resistance in plants. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2013, 7(3): 1615–1624
- [22] 侯士昌, 温少红, 唐志红, 等. 一株高效褐藻酸降解菌的筛选, 鉴定及其发酵条件的优化. 海洋科学, 2014, 38(7): 20–26
- [23] Wang Y, Guo E W, Yu W G, et al. Purification and characterization of a new alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(5): 703–708
- [24] Iwamoto Y, Araki R, Iriyama K I, et al. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(1): 133–142
- [25] Li J W, Dong S, Song J, et al. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Marine Drugs*, 2011, 9(1): 109–123