

郑明亮, 郑浑龙, 孟春, 等. 海藻酸钠裂解酶酶活测定方法研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 246–251. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050180

ZHENG Mingliang, ZHENG Hunlong, MENG Chun, et al. Study on the Test of Sodium Alginate Lyase Activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 246–251. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050180

· 分析检测 ·

海藻酸钠裂解酶酶活测定方法研究

郑明亮¹, 郑浑龙², 孟 春¹, 王 航^{1,*}

(1. 光催化研究所, 生物科学与工程学院, 福州大学, 福建福州 350116;

2. 福建省博凯科技有限公司, 福建福州 350108)

摘要: 应用酶反应动力学原理对海藻酸钠裂解酶酶活测定反应体系和反应条件进行系统研究, 以改进海藻酸钠裂解酶的测定方法。本实验采用紫外吸收法测定酶活, 改良后的酶活测定方法为: 300 μL 底物溶液 (海藻酸钠 2.2%, KCl 5 mmol/L, 0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, pH7.0) 加入 50 μL 稀释至 2.4~30 U/mL 的酶液, 于 37 °C 水浴静置反应 20 min 后用冰浴终止反应, 反应液稀释 20 倍后在 235 nm 处测定吸光度。每份底物溶液均需用新枪头移取以提高精密度, 使移液误差小于 2%。本酶活测定方法的相对标准偏差小于 5%。

关键词: 海藻酸钠裂解酶, 酶反应动力学, 改进, 酶活测定

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)07-0246-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050180

Study on the Test of Sodium Alginate Lyase Activity

ZHENG Mingliang¹, ZHENG Hunlong², MENG Chun¹, WANG Hang^{1,*}

(1. Research Institute of Photocatalysis, College of Biological Science and Engineering,

Fuzhou University, Fuzhou 350116, China;

2. Fujian Bokai Technology Co., LTD, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Based on the principle of enzyme reaction kinetics, the reaction system and conditions for the test of enzyme activity of sodium alginate lyase were studied in order to improve the test method of sodium alginate lyase. In this experiment, the enzyme activity was measured by ultraviolet absorption method, and the improved method was as follows: 300 μL of substrate solution (sodium alginate 2.2%, KCl 5 mmol/L, 0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer, pH7.0) and 50 μL of enzyme solution diluted to 2.4~30 U/mL was mixed and reacted in a 37 °C water bath for 20 minutes, and then the reaction was terminated with an ice bath. After the reaction solution was diluted 20 times, the absorbance was measured at 235 nm. Each substrate solution need to be removed with a new pipette tip to improve the precision, and the pipette error was less than 2%. The relative standard deviation of this enzyme activity determination method was less than 5%.

Key words: sodium alginate lyase; enzyme reaction kinetics; improvement; enzyme activity measurement

海藻酸钠又名褐藻胶, 是一种天然的高分子多糖, 是海带、马尾藻、巨藻等海藻细胞壁和细胞质的重要组成部分^[1-2]。海藻酸钠裂解酶可通过底物的非还原末端的 β 消去机制降解褐藻胶, 将褐藻胶降解为褐藻寡糖^[3]。褐藻寡糖是一种功能性低聚寡糖, 褐藻胶寡糖由于其降解模式、G/M 比、分子量和降解产物的空间构象不同使得褐藻胶寡糖具有多种生物活性^[4-8]。褐藻寡糖可作为高效、环保的生物肥料代替

传统化学肥料^[9]。褐藻胶寡糖在保健食品、医学领域也有很广泛的应用, 其具有多种生理活性, 如抗肿瘤、刺激细胞因子的产生、减轻炎症、抗菌、抗氧化、调节血脂和糖类等^[10-15]。某些特定的褐藻寡糖还可以提高巨噬细胞的活性, 诱导单核白细胞生产细胞因子, 促进肠道益生菌生长, 加速表皮细胞的增长繁殖^[16-17]。

目前, 海藻酸钠裂解酶的酶活力测定方法主要

收稿日期: 2020-05-18

基金项目: 福州大学国家环境光催化工程技术研究中心开放课题 (NERCEP-201906)。

作者简介: 郑明亮 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酶学, 发酵工程, E-mail: zml1209@126.com。

* 通信作者: 王航 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: whbio@foxmail.com。

有硫代巴比妥酸法(TBA)^[18]、紫外吸收法^[19, 20]、粘度法^[21]和还原糖法^[22]。上述方法中, 硫代巴比妥酸法操作较为繁琐, 粘度法要求待测液体积较大, 还原糖法需沸水浴加热, 而紫外吸收法是基于酶解产生的不饱和糖醛酸在 230~240 nm 处有吸收峰, 这种方法灵敏且便捷, 是目前褐藻胶裂解酶酶活力测定的主要方法^[23]。常见的紫外吸收法测定海藻酸钠裂解酶酶活力的测量体系各不相同, 主要的问题在于海藻酸钠底物浓度太低(质量浓度为 0.2%~0.75%^[4, 24~25]), 导致酶促反应并不能接近最大反应速率, 且测量范围窄。目前未见有对该酶测定精密度、灵敏度、检测范围等系统研究的报道。

酶活的本质是以最大反应速率来表征酶量, 因而理想的酶活测定方法的核心就是使反应速度达到最大的反应体系和反应条件。本文以酶促反应动力学理论为指导, 系统研究酶活测定的反应体系和反应条件, 为建立准确、高效的海藻酸钠裂解酶酶活测定方法标准提供数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

基因重组的毕赤酵母工程菌 本实验室保存; 海藻酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钾、氯化锌 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 氢氧化钠、硫酸镁、硫酸钙、五水合硫酸铜、七水合硫酸亚铁 西陇科学股份有限公司, 分析纯。

HH-4 型恒温水浴锅 国华电器有限公司; EU2600 型紫外分光光度计 上海昂拉仪器有限公司; XZ21K 型高速冷冻离心机 长沙湘智离心机仪器有限公司; ZWY-2101C 型恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海藻酸钠裂解酶酶液的制备 将基因重组的毕赤酵母在摇瓶中活化, 30 ℃ 培养 24 h; 以 10% 体积比转接至发酵罐中, 参考金虎等^[26]的培养条件, 诱导重组蛋白表达。发酵 120 h 后, 4 ℃、1000 × g 离心 5 min, 收集上清液即为海藻酸钠裂解酶粗酶液。

1.2.2 海藻酸钠裂解酶酶活测定方法 参考文献方法^[25, 27]并加以调整。底物海藻酸钠用 0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(pH7.0)配制。300 μL 底物加入 50 μL 稀释 20 倍的酶液于一定温度水浴保温 20 min 后终止反应, 样品稀释 20 倍后在 235 nm 下测定其吸光值。

酶活力单位的定义为: 在上述反应体系和反应条件下, 每分钟水解使吸光度值增加 1 所用的酶量定义为一个酶活力单位 U。

$$\text{酶浓度}(\text{U/mL}) = \frac{\overline{OD}_{600} \text{实验组} - \overline{OD}_{600} \text{对照组}}{20 \text{ min} \times 0.05 \text{ mL}} \times \text{稀释倍数}$$

1.2.3 动力学因素的确定

1.2.3.1 底物浓度的确定 37 ℃、pH 7 条件下测量 0.7~22 g/L 底物终浓度时酶的最大反应速率。并采用 Lineweaver-Burk 法^[28~29]以 1/V 对 1/[S₀] 作图, 计算动力学参数 K_m、V_m, 确定最适海藻酸钠底物配制浓度。

1.2.3.2 加酶量的确定 在 300 μL、22 g/L 的底物中加入 50 μL 0~5 U 的酶液。测定 37 ℃、pH 7 条件下的加酶量与 OD 值变化的关系, 确定反应体系中合适的加酶量范围。

1.2.3.3 酶促反应时长的确定 以 22 g/L 海藻酸钠为底物, 加酶量 9 U/mL, pH 7, 温度 37 ℃ 条件下, 不同反应时间(5~45 min)取样测量酶最大反应速率, 确定最适的酶促反应时长。

1.2.3.4 酶促反应的终止方法 在酶促反应 20 min 后, 将反应液放置 0 ℃ 冰浴中 60 min, 以放置室温(25 ℃)0、10、60 min 作为对照, 在最适反应条件下测定酶的反应速率。

1.2.4 环境条件的优化

1.2.4.1 海藻酸钠裂解酶最适反应 pH 以 22 g/L 海藻酸钠为底物, 加酶量 9 U/mL, 温度 37 ℃ 条件下测量酶在不同 pH(5~10)缓冲体系下的反应速率, 确定酶最适反应 pH。

1.2.4.2 海藻酸钠裂解酶最适反应温度 以 22 g/L 海藻酸钠为底物, 加酶量 9 U/mL, pH 7 条件下测量酶在不同温度(20~50 ℃)下的反应速率, 确定酶最适反应温度。

1.2.4.3 金属离子对海藻酸钠裂解酶反应速率的影响 在 22 g/L 海藻酸钠为底物的酶促反应体系中分别添加终浓度为 1 和 5 mmol/L 的 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺ 7 种金属离子, 以未添加金属离子的酶促反应组作为对照组, 测量 pH 7、37 ℃ 条件下的酶相对反应速率。

1.2.4.4 传质对酶活测定的影响 采用同一批酶液进行酶活测量, 分别测量在最适条件下静置反应和 200 r/min 摆床反应的酶浓度。

1.2.5 方法的准确性和精密性

1.2.5.1 底物移取的精密性试验 本实验提出两种方法解决底物移取精密性较差的问题, 方法 1 采用 100 ℃ 水浴加热海藻酸钠底物 5 min 以降低粘度; 方法 2 每个样都使用新枪头; 对照组不加热底物也不换枪头。两种方法及对照组分别称重移液 300 μL 的 22 g/L 海藻酸钠底物 5 次, 计算两种方法及对照组底物移取重量的平均值、标准偏差和相对标准偏差。

1.2.5.2 方法的精密性试验 重复 8 次测试同一批酶液的酶浓度, 计算平均值、标准偏差、相对标准偏差。

1.3 数据分析

每个实验3次重复,数据以平均值±标准差表示。采用Graphpad Prism 8.0软件进行数据差异显著性分析和作图。

2 结果与分析

2.1 动力学因素

2.1.1 底物浓度的确定 根据米氏方程,底物浓度S足够大时,反应速度 $V_0 \approx V_m = k_2 e_0$,不受底物浓度影响,而与酶浓度成正比,可用于表征酶量。在酶活测定反应体系中,底物浓度通常定为5~10 K_m,因而需先测出酶的K_m值。如图1所示,采用Lineweaver-Burk法测得K_m值为3.17 g/L。

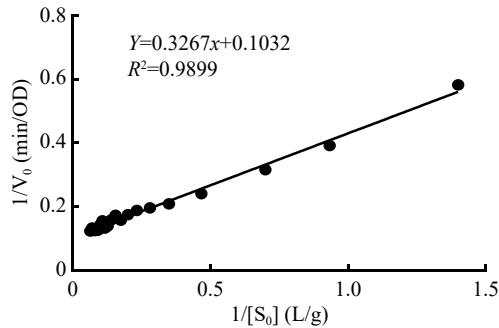


图1 Lineweaver-Burk法计算K_m、V_m
Fig.1 Lineweaver-Burk method to calculate K_m, V_m

从动力学角度考虑,底物浓度越大,越有利于消除底物浓度对酶活测定的影响,但在实际操作中还要考虑底物的溶解度和黏度。海藻酸钠是高分子量聚合物,溶解度小,黏度大,过高的浓度不容易配制,而且也不容易移取。综合考量,底物浓度设为6 K_m左右,通过计算,海藻酸钠溶液浓度定为2.2% (W/V)。

2.1.2 加酶量的确定 米氏方程的前提假设之一是酶浓度远小于底物浓度,同时过大的酶浓度会使底物浓度迅速下降,从而使反应速度降低。对于海藻酸钠裂解酶而言,反应速度不仅受底物浓度影响,而且还受到海藻酸钠分子量影响,分子量越小,反应速度越慢^[30]。因此在酶活测定体系中,加入的酶量不宜太大,以保证反应速度与酶量成正比。

由图2可见,在加酶量小于1.5 U时,产物随加酶量线性增加,加酶量超过1.5 U后,曲线斜率开始

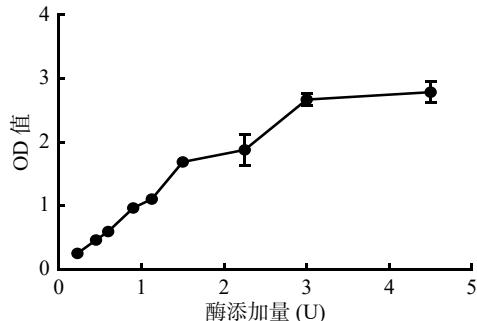


图2 酶添加量对产物生成的影响
Fig.2 Effect of enzyme addition on product

逐渐下降。因此酶活测定体系加酶量应小于1.5 U。

另一方面,加酶量也不能太小,否则由于分光光度计灵敏度的限制,在测定时间内无法测到OD₂₃₅。为保证测量的有效数位,OD₂₃₅读数应在0.1以上,由此倒算,最小加酶量为0.12 U。因此反应体系发酵酶液上样的浓度应稀释至2.4~30 U/mL。

2.1.3 酶促反应时长的确定 不同反应时间下取样测量酶的最大反应速率,结果如图3所示。

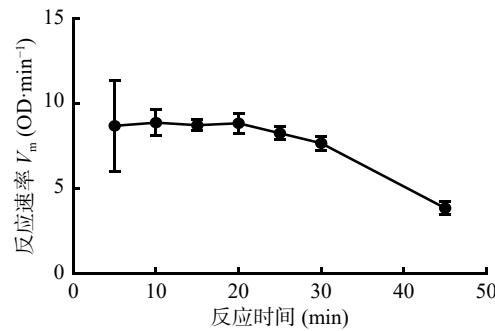


图3 酶促反应速率与反应时间的关系
Fig.3 Relationship between enzymatic reaction rate and reaction time

随着反应的进行,底物浓度不断降低,酶不断失活,因而反应速率越来越低,因此酶活测定的反应时间不能太长。另一方面,反应时间过短,则会导致检测的灵敏度下降,同时还会导致测定误差变大。为确定反应时间,本实验测定了不同反应时间下的平均反应速度,结果如图3所示,反应时间在20 min以内,平均反应速度几乎不变,反应时间超过20 min后,反应速率开始明显下降,表明反应时间不能超过20 min。同时也注意到,在反应时间2 min时测得的反应速度的误差很大。因此,以2.2%海藻酸钠底物测量海藻酸钠裂解酶活性时,反应时间设为20 min较为合适。

2.1.4 酶促反应的终止方法 酶活的测定需要及时终止反应,现有的终止反应方法有高温、加酸、加碱、冰浴等。其中,高温终止反应方法操作繁琐,加热过程容易使EP管开盖,造成样品损失或污染。加酸、加碱的方法改变了反应液的体积,加液的误差会影响最终测定的结果,而且当有较多样品需要同时进行酶活测定时,难以保证同时终止。此外海藻酸钠在高温、酸、碱环境中也会水解,会造成测定结果偏大。冰浴的方法没有上述缺点,但冰浴不能使酶失活,而只能使反应速率降低。如果冰浴能把反应速率降到足够低,在较短时间内检测不到产物变化,也可将冰浴做为终止反应的有效方法。

如图4所示,37 °C反应结束后,反应液在25 °C下放置10 min就对测定结果有显著影响($P<0.05$),而在冰浴中放置1 h,对酶活测定没有影响。相比高温、加酸、加碱的终止反应方法,冰浴终止酶解反应的方法有安全、易操作、效果好等优点。

2.2 环境条件的影响

2.2.1 海藻酸钠裂解酶最适反应pH 磷酸钠缓冲液

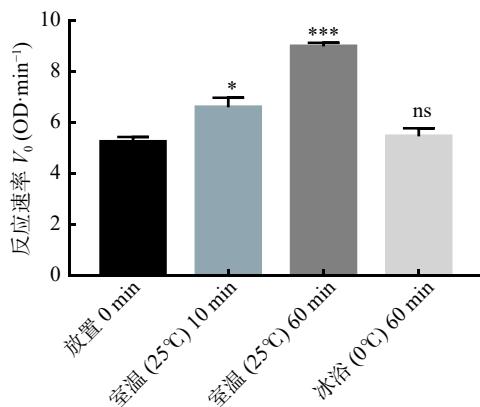


图 4 冰浴终止酶解反应的效果

Fig.4 The effect of ice bath to terminate the enzymatic hydrolysis reaction

注: “***”表示极显著($P<0.001$); “*”表示显著($P<0.05$); “ns”表示没有显著性差异。

pH 对海藻酸钠裂解酶反应速率的影响如图 5 所示。

结果表明, pH 6.5~7.5 时, 海藻酸钠裂解酶的酶促反应速率最大, 有较宽的最适反应 pH 范围。pH 小于 6 或大于 8 时, 酶反应速率明显下降。这表明此时的水解 pH 已经影响了海藻酸钠裂解酶的活性, 偏离海藻酸钠裂解酶最适 pH 范围的过酸或过碱的水解环境会导致其酶活逐渐丧失。酶活测定一般选择在最适 pH 下测定, 根据图 5 结果, 选择测定 pH 7.0。

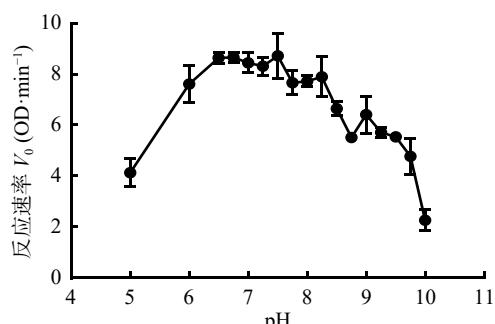


Fig.5 Reaction rate of sodium alginate lyase under different pH conditions

2.2.2 海藻酸钠裂解酶最适反应温度 温度对海藻酸钠裂解酶反应速率的影响如图 6 所示。

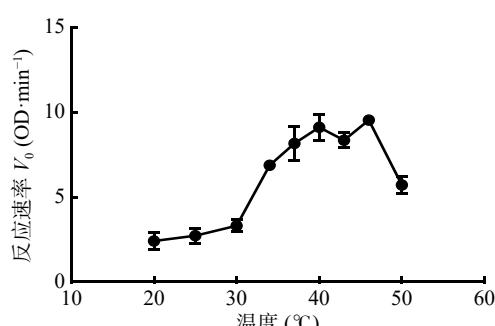


Fig.6 Reaction rate of sodium alginate lyase under different temperature conditions

温度对于酶反应而言是把双刃剑, 提高温度一方面可以增加分子碰撞几率, 从而提高反应速度, 另一方面会加快酶失活, 从而降低反应速度。图 6 结果表明, 在我们的测定条件下, 最适反应温度范围为 37~46 °C, 我们选定常用的 37 °C 为测定温度。

2.2.3 金属离子对海藻酸钠裂解酶反应速率的影响

金属离子会显著影响海藻酸钠裂解酶活性^[27]。添加适量的激活剂可提高酶活测定的灵敏度。为此考察了 7 种金属离子对酶活性的影响。结果如图 7 所示。

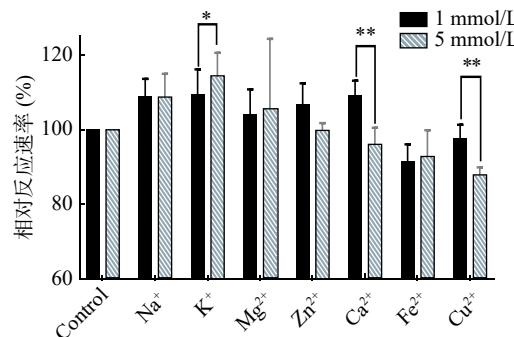


图 7 金属离子对海藻酸钠裂解酶反应速率的影响
Fig.7 Effect of metal ions on the reaction rate of sodium alginate lyase

注: “**”表示较显著($P<0.01$); “*”表示显著($P<0.05$)。

终浓度为 1 mmol/L 时, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶具有一定程度的促进作用; Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对该酶具有不同程度的抑制作用, Fe^{2+} 抑制效果较为明显。终浓度为 5 mmol/L 时, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 对该酶具有不同程度的促进作用, K^+ 效果最好, 相对反应速率达到 114%; Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 对该酶具有不同程度的抑制作用, Cu^{2+} 抑制效果较为明显。据韩伟等^[31]报道, Cu^{2+} 对海藻酸钠裂解酶有抑制作用, 1 mmol/L Ca^{2+} 有一定促进作用, 而 5 mmol/L Ca^{2+} 反而对酶产生抑制作用, 与本实验结果一致。在酶活测定时, 可在反应体系中添加 5 mmol/L 的 K^+ 以提高酶的最大反应速率。

2.2.4 传质对酶活测定的影响 通常酶活测定体系较小, 不受传质影响, 可在静置条件下测定。然而本实验所使用的海藻酸钠浓度较高, 黏度大, 传质可能会成为反应的限制性因素。为此分别考察了静置和 200 r/min 振荡条件对酶活测定的影响, 结果如图 8 所示。

结果表明, 在 2.2% 海藻酸钠底物反应条件下, 静置反应与 200 r/min 振荡反应下的酶活力测量数值无显著差异。这是由于反应体系体积很小, 传质影响小, 因此静置反应即可。

2.3 方法准确性与精密性

2.3.1 底物移取的精密性试验 海藻酸钠是一种常见的增稠剂, 改进后的酶活测定方法将 0.5% 海藻酸钠的底物改为 2.2%, 海藻酸钠底物的黏度明显提高, 这会导致移液枪进样量精密度变差。为了解决这个问题,

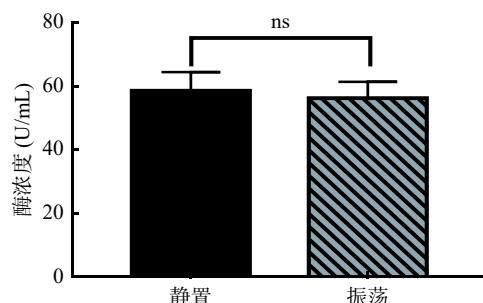


图 8 传质速度对酶活测定的影响

Fig.8 Effect of mass transfer speed on enzyme activity determination

注：“ns”表示没有显著性差异。

题,本实验提出两个方案,一是将底物加热到100℃以降低黏度,二是每个样都使用新枪头,测试结果如图9所示。

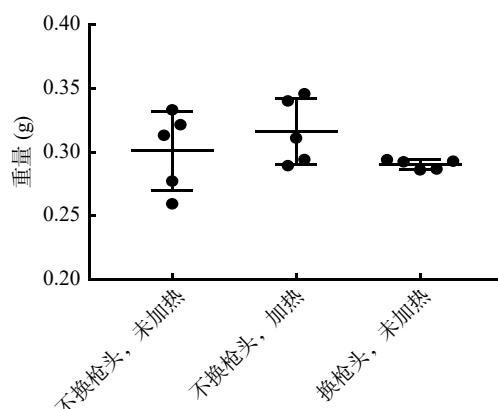


图 9 不同条件对底物移取的精密性影响

Fig.9 The influence of different conditions on the precision of substrate removal

结果表明,沸水浴加热降低底物粘度的方法有一定效果,底物移取的相对标准偏差由10.4%降为8.2%。而每加一个样换一个枪头的方法,底物移液误差最小,效果最好,相对标准偏差小于2%。另外要注意的是,每个枪头需要剪去前端一小节,增大横截面积,以免底物堵塞枪头。

2.3.2 精密性试验 取同一批发酵液,采用改进后的方法重复测量海藻酸钠裂解酶的酶活性8次,精密性试验结果如表1所示。

表 1 海藻酸钠裂解酶酶活测定的精密度试验(n=8)

Table 1 Precision test for determination of enzyme activity of sodium alginate lyase (n=8)

酶活测定值 (U/mL)	平均值 (U/mL)	SD标准偏差 (U/mL)	RSD相对标准偏差 (%)
161~181	170	7.72	4.54

由表1可知,用改进后的方法测量的8组平行海藻酸钠裂解酶活力数值波动范围较小,标准偏差为7.72 U/mL,相对标准偏差为4.54%,检测结果精密度高,可见此方法可信,检测结果有效。

3 结论

通过对影响酶活测定因素的系统研究,本文建立了海藻酸钠裂解酶活力测定方法:300 μL底物溶液(海藻酸钠2.2%,KCl 5 mmol/L,0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液,pH7.0)加入50 μL稀释至2.4~30 U/mL的酶液,于37℃水浴静置反应20 min后用冰浴终止反应,反应液稀释20倍后在235 nm处测定吸光度。每份底物溶液均需用新枪头移取以提高精密度。本方法相对标准偏差小于5%。该研究主要解决了传统紫外吸收法测量酶活的海藻酸钠底物浓度太低问题,并研究了提高底物浓度后带来的一系列问题,为制订海藻酸钠裂解酶活性测定方法标准提供数据支撑。

参考文献

- [1] 孙小越.海洋来源褐藻胶裂解酶的异源表达和规模化制备研究[D].上海:华东理工大学,2018.
- [2] 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.
- [3] 江晓路,刘岩,胡晓珂,等.Vibrio sp. 510产褐藻胶裂合酶的底物专一性分析[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2004(1):55~59.
- [4] 罗丹丹.产褐藻胶裂解酶菌种筛选与酶学性质研究[D].大连:大连工业大学,2016.
- [5] Li H, Wang S, Zhang Y, et al. High-level expression of a thermally stable alginate lyase using pichia pastoris, characterization and application in producing brown alginate oligosaccharide[J]. Marine Drugs, 2018, 16(5): 158.
- [6] Chen Y, Dou W, Li H, et al. The alginate lyase from *Isoptericola halotolerans* CGMCC 5336 as a new tool for the production of alginate oligosaccharides with guluronic acid as reducing end[J]. Carbohydr Res, 2018, 470: 36~41.
- [7] Takeshita S, Oda T. Usefulness of alginate lyases derived from marine organisms for the preparation of alginate oligomers with various bioactivities[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2016, 79: 137.
- [8] Xing M, Cao Q, Wang Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 144.
- [9] Chen Y, Li J, Huang Z, et al. Impact of short-term application of seaweed fertilizer on bacterial diversity and community structure, soil nitrogen contents, and plant growth in maize rhizosphere soil[J]. Folia Microbiologica, 2020.
- [10] Li S, Wang Z, Wang L, et al. Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*[J]. Bioresource Technology, 2019, 281: 84~89.
- [11] Han Y, Zhang L, Yu X, et al. Alginate oligosaccharide attenuates alpha2, 6-sialylation modification to inhibit prostate cancer cell growth via the Hippo/YAP pathway[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(5): 374.
- [12] Zhou R, Shi X Y, Bi D C, et al. Alginate-derived oligosaccharide inhibits neuroinflammation and promotes microglial

- phagocytosis of beta-amyloid[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(9): 5828–5846.
- [13] Tondervik A, Sletta H, Klinkenberg G, et al. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against *Candida* and *Aspergillus* spp[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112518.
- [14] Chi F C, Kulkarni S S, Zulueta M M, et al. Synthesis of alginate oligosaccharides containing L-guluronic acids[J]. *Chem Asian J*, 2009, 4(3): 386–390.
- [15] Shang Q, Jiang H, Cai C, et al. Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: An overview[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 179: 173–185.
- [16] Xu X, Wu X, Wang Q, et al. Immunomodulatory effects of alginate oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells and their structure-activity relationships[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(14): 3168–3176.
- [17] Xu X, Bi D, Wu X, et al. Unsaturated guluronate oligosaccharide enhances the antibacterial activities of macrophages[J]. *FASEB J*, 2014, 28(6): 2645–2654.
- [18] Hurwitz J, Weissbach A. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification[J]. *J Biol Chem*, 1959, 234(4): 705–709.
- [19] Zhu B, Tan H, Qin Y, et al. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. W13[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75: 330–337.
- [20] Li S, Wang L, Hao J, et al. Purification and characterization of a new alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. SY08[J]. *Mar Drugs*, 2016, 15(1): 1.
- [21] Sawabe T, Ohtsuka M, Ezura Y. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4[J]. *Carbohydr Res*, 1997, 304(1): 69–76.
- [22] Stevens R A, Levin R E. Purification and characteristics of an alginase from *Alginovibrio aquatilis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33(5): 1156–1161.
- [23] Miyake O, Hashimoto W, Murata K. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV)[J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 29(1): 33–41.
- [24] 李云涛, 张齐, 汪立平, 等. 海洋弧菌中褐藻胶裂解酶Alg的克隆表达及酶学性质[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2018, 49(4): 659–666.
- [25] 高洁, 李益民, 杜聪, 等. 褐藻胶裂解酶基因的克隆表达与酶学性质[J]. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1178–1188.
- [26] 金虎. 毕赤酵母高效发酵生产猪α干扰素过程的优化与代谢调控[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [27] 邵宏博. 海藻酸裂解酶在巴斯德毕赤酵母中的表达及酶性质研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2014.
- [28] 李建伟. 海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 分泌的褐藻酸裂解酶的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [29] Swift S M, Hudgens J W, Hesel坡 R D, et al. Characterization of AlgMsp, an alginate lyase from *Microbulbifer* sp. 6532A[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112939.
- [30] 肖琼, 肖安风, 姚德恒, 等. 琼胶酶水解工艺条件的优化及产物分析[J]. 中国食品学报, 2015, 15(12): 99–106.
- [31] 韩伟, 许鑫琦, 叶秀云, 等. 海洋来源褐藻胶裂解酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 136–142.