

[文章编号] 1007-7405(2017)03-0026-07

# 突变芳香基硫酸酯酶 H260L 工程菌的发酵条件优化

乔超超<sup>1</sup>, 郭玉淅<sup>1</sup>, 倪 辉<sup>1,2,3,4</sup>, 肖安风<sup>1,2,3,4</sup>, 朱艳冰<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 通过摇瓶培养对突变芳香基硫酸酯酶 H260L 工程菌的发酵条件进行初步优化, 研究不同发酵条件包括接种量、诱导时期、诱导剂浓度、发酵时间、诱导剂加入方式、发酵温度及培养基初始 pH 值对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响。结果表明, 重组芳香基硫酸酯酶工程菌发酵的乳糖诱导表达优化条件为: 以 5% 接种量培养 3 h 后, 加入乳糖诱导剂至 5 g/L, 诱导表达 7 h; 当发酵温度为 25 ℃、培养基的初始 pH 值为 7.5 时, 重组芳香基硫酸酯酶活性最高。在优化条件下, 工程菌芳香基硫酸酯酶活性达到 2.63 U/mL, 是未优化酶活性的 46.9 倍。突变酶 H260L 对龙须菜粗多糖硫酸基团的脱硫率为 82.1%。

**[关键词]** 突变芳香基硫酸酯酶; 发酵; 乳糖; 诱导表达

**[中图分类号]** Q 814.9

## Optimization of Fermentation for the Mutant Arylsulfatase H260L from Engineering *Escherichia coli*

QIAO Chaochao<sup>1</sup>, GUO Yuxi<sup>1</sup>, NI Hui<sup>1,2,3,4</sup>, XIAO Anfeng<sup>1,2,3,4</sup>, ZHU Yanbing<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;  
2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;  
3. Food and Biological Engineering Technology Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China;  
4. Key Laboratory of Recycling Application and Deep Processing in Economic Marine Alga, Xiamen South Oceanographic Research Center, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The fermentation conditions for the mutant arylsulfatase produced by engineering *Escherichia coli* were studied in the shake flask. It included the effects of inoculation size, induction period, inducer concentration, fermentation time, addition method of inducer, fermentation temperature and original pH value of medium on the expression of the recombinant arylsulfatase. The results revealed that the optimized lactose inducer concentration was 5 g/L added to liquid medium after 3 h initial culture inoculation with 5% (V/V). The highest enzyme specific activity (2.63 U/ml) was achieved after further 7 h fermentation at temperature of 25 ℃ and an original pH 7.5. Compared with the original condition, the enzyme activity was increased by 46.9 times. The desulfation ratio against the crude polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* was 82.1%.

**Keywords:** mutant arylsulfatase; fermentation; lactose; induction expression

[收稿日期] 2016-11-03

[修回日期] 2017-02-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31401632); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(B15139)

[作者简介] 乔超超(1991—), 男, 硕士生, 主要从事微生物学研究。通信作者: 朱艳冰(1976—), 女, 副教授, 博士, 主要从事微生物学研究, E-mail: yanbingzhu@163.com。

0 引言

芳香基硫酸酯酶 (arylsulfatase, EC 3.1.6.1) 属于水解酶类, 它可以催化芳香基硫酸酯键的水解, 生成芳基化合物和无机硫酸盐。该酶分布广泛, 在细菌、真菌、植物和动物中都有分离得到<sup>[1-5]</sup>。其中对一些微生物来源的芳香基硫酸酯酶, 包括从米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)<sup>[6]</sup>、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella aerogenes*)<sup>[7]</sup>、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[8]</sup>、海单胞菌 (*Marinomonas* sp.)<sup>[2]</sup>、交替假单孢菌 (*Pseudoalteromonas carrageenovora*)<sup>[9]</sup>、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[10-11]</sup>、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)<sup>[12]</sup>、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)<sup>[13]</sup>、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.)<sup>[14]</sup>、链霉菌 (*Streptomyces griseorubiginosus*)<sup>[15]</sup> 和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)<sup>[16]</sup> 中得到的芳基硫酸酯酶进行了研究。虽然这些芳香基硫酸酯酶来源于不同的物种, 但是它们的初级结构之间具有较高的相似性<sup>[17]</sup>。相关研究发现, 来自海栖热袍菌<sup>[16]</sup>、鞘氨醇单胞菌<sup>[14]</sup>、交替假单孢菌<sup>[18]</sup> 和海单胞菌 FW1<sup>[2]</sup> 等少数微生物的芳香基硫酸酯酶具有琼脂硫酸酯水解活性。

琼脂是一种天然多糖, 具有优良的胶凝性和增稠性, 被用作胶凝剂、增稠剂、乳化剂、稳定剂和水分保持剂等, 广泛应用于食品、轻工、医药和生物工程等领域中<sup>[19-20]</sup>。目前, 工业生产中普遍使用碱法去除琼脂中的硫酸酯基团, 但存在生产条件不易控制、产品得率低、环境污染大等问题。与碱处理工艺相比, 酶水解技术去除琼脂中的硫酸酯基团具有反应条件温和、特异性高、环境污染小等显著特点, 而且不容易引起琼脂降解流失, 是新型琼脂生产技术的发展方向。因此, 芳香基硫酸酯酶在琼脂提取工业中具有潜在的应用价值<sup>[21]</sup>。

随着基因工程技术的发展, 重组蛋白的高效表达策略已经成为生物工程研究的一个方向。重组蛋白的生产水平不仅取决于基因工程菌的构建, 也取决于发酵过程的工艺控制, 即以经济有效的方式进行基因工程菌发酵, 将影响过程的因素达到最优值, 从而使产率最大<sup>[22]</sup>。在先前的研究中, 本课题组构建了具有琼脂硫酸酯水解活性的交替假单孢菌芳香基硫酸酯酶的原核表达系统, 并利用定向进化的方法筛选到热稳定性较高的突变体 H260L。本研究拟在体外进行突变芳香基硫酸酯酶工程菌的摇瓶发酵条件优化, 研究高效的琼脂硫酸酯水解酶发酵技术, 有利于促进酶法去除琼脂硫酸酯基团的技术发展, 具有重要的研究意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

含有突变芳香基硫酸酯酶 H260L 基因的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株, 本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 细菌学蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值调至 7.5, 灭菌后备用。在 LB 液体培养基中加入质量分数 2% 的琼脂, 灭菌后作为固体培养基。

1.1.3 试剂

胰蛋白胨 (广东环凯微生物科技有限公司); 酵母提取物 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 卡那霉素 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 乳糖 (西陇化工股份有限公司); *p*-nitro-phenyl sulfate (*p*-NPS) (Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 种子培养液的制备

用接种环接种突变酶工程菌种于 LB 固体培养基 (含 50 μg/mL 卡那霉素) 上, 37 ℃ 培养过夜。挑取单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基 (含 50 μg/mL 卡那霉素) 中, 37 ℃、180 r/min 培养 12 h 进行活化, 作为种子培养液。

### 1.3 粗酶样品的制备

将种子液按 1:100 转接于 50 mL LB 液体培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 h, 添加乳糖诱导剂至终质量浓度为 3 g/L, 25  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导表达 6 h。离心收集 3 mL 菌液, 用 500  $\mu\text{L}$  预冷的 50 mmol/L Tris - HCl (pH = 7.5) 缓冲液重悬菌体。冰水浴超声破菌后, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 获得上清液, 作为粗酶样品。

### 1.4 重组芳香基硫酸酯酶的活性测定

20  $\mu\text{L}$  粗酶液中, 加入 80  $\mu\text{L}$  20 mmol/L *p*-NPS (以 50 mmol/L Tris - HCl, pH = 7.5 缓冲液配制), 在 55  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min 后, 加入 25  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaOH 终止反应, 以蒸馏水补足体积至 1 mL, 在 410 nm 下测定吸光度 (*A*)。芳香基硫酸酯酶的活性单位定义为: 在上述条件下, 每分钟酶解底物释放出 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位。

### 1.5 摇床发酵条件优化

#### 1.5.1 接种量对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液分别以不同的接种量 (0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%, 6.0%) 转接入 50 mL LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 添加乳糖于 25  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达, 一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.2 诱导时机对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量转接入 50 mL LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养不同时间 (1, 2, 3, 4, 5 h) 后, 添加乳糖于 25  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达, 一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.3 乳糖诱导剂浓度对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量转接入 50 mL LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 添加乳糖诱导剂至不同质量浓度 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 g/L), 25  $^{\circ}\text{C}$  表达一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.4 诱导后表达时间对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量转接入 50 mL LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 添加乳糖诱导剂诱导表达不同时间 (4, 5, 6, 7, 8 h), 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.5 诱导剂添加方式对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量转接入 50 mL LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 分别以不同次数 (1, 2, 3, 4 次) 添加乳糖诱导剂于 25  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.6 发酵温度对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量转接入 50 mL 发酵培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 添加乳糖诱导剂, 在不同温度 (15, 20, 25, 30, 35, 40  $^{\circ}\text{C}$ ) 下, 诱导表达一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

#### 1.5.7 培养基初始 pH 值对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

将种子液以 5% 的接种量分别转接入 50 mL 不同 pH 值的 LB 培养基 (含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素) 中, 将培养基初始 pH 值分别调至 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养后, 添加乳糖诱导剂于 25  $^{\circ}\text{C}$  诱导表达一定时间后, 测定菌液的  $A_{600}$  值和酶活性。

### 1.6 龙须菜粗多糖硫酸基团的脱除

称取 0.1 g 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 粗多糖, 溶解于 20 mL 50 mmol/L Tris - HCl (pH = 7.5) 缓冲液中。分别加入 30, 60, 90 U 突变酶, 45  $^{\circ}\text{C}$  处理 4 h。将处理后的混合溶液置于尼龙布上, 用超纯水充分洗涤后, 烘干粉碎。称取等质量的经过酶处理后与未处理的龙须菜粗多糖, 高温碳化后, 置于马弗炉中 550  $^{\circ}\text{C}$  灰化 4 h, 将所得灰分全部溶于超纯水中, 定容至 25 mL。取 1 mL 溶液用

0.22 μm 的膜过滤后, 利用离子色谱仪 (ICS-2100, 美国戴安公司) 测定样品的硫酸基团含量。以未经酶处理的粗多糖为对照, 计算脱硫率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 接种量

接种量的大小直接影响菌体的生长和蛋白质的表达。在一定范围内, 接种量提高, 菌体生长迅速, 蛋白质产量高; 超过一定限度后, 菌体生长过快, 导致代谢产物积累速度增加, 将会抑制蛋白质表达。本研究结果表明, 当接种量为 5% 时, 诱导表达后的重组芳香基硫酸酯酶活性最高 (见图 1), 因此, 重组芳香基硫酸酯酶工程菌的接种量选择 5%。

### 2.2 诱导时机

在接种不同时间后, 加入乳糖诱导剂进行诱导酶的表达, 结果 (见表 1) 表明, 接种后培养 3 h、 $A_{600}$  约为 2.48 时进行诱导, 重组芳香基硫酸酯酶活性最高。故接种后 3 h、 $A_{600}$  约为 2.48 时为该工程菌的最佳诱导时机。

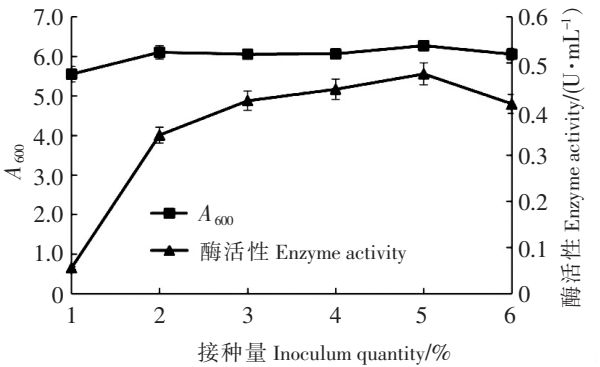


图 1 接种量对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响  
Fig.1 Effect of inoculum quantity on the expression of the recombinant arylsulfatase

表 1 诱导时机对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

Tab. 1 Effect of induction time on the expression of the recombinant arylsulfatase

诱导时机 Induction time/h	$A_{600}$ (诱导前 Before induction)	酶活性 Enzyme activity/(U · mL <sup>-1</sup> )
1	0.77 ± 0.03	0.11 ± 0.01
2	1.74 ± 0.06	0.48 ± 0.04
3	2.48 ± 0.02	0.58 ± 0.10
4	2.75 ± 0.02	0.42 ± 0.08
5	2.85 ± 0.05	0.35 ± 0.02

### 2.3 乳糖诱导剂浓度

影响基因工程产品生产成本的一个重要因素是诱导剂。IPTG 是一种强效的诱导剂, 但是它对人体有潜在的毒性且价格昂贵。乳糖作为诱导剂, 不仅没有毒性, 而且价格低廉, 同时乳糖本身作为一种碳源, 可以被菌体代谢利用。本研究中, 加入不同浓度的乳糖进行诱导, 结果 (见图 2) 显示, 使用 5 g/L 乳糖进行诱导, 重组芳香基硫酸酯酶活性最高, 达 1.41 U/mL, 所以选择 5 g/L 作为乳糖诱导剂的最佳浓度。

### 2.4 诱导后表达时间

重组芳香基硫酸酯酶工程菌经乳糖诱导后表达不同时间, 结果 (见图 3) 显示, 乳糖诱导后表达 7 h, 酶的活性最高。故确定重组芳香基硫酸酯酶工程菌的乳糖诱导后表达时间为 7 h。

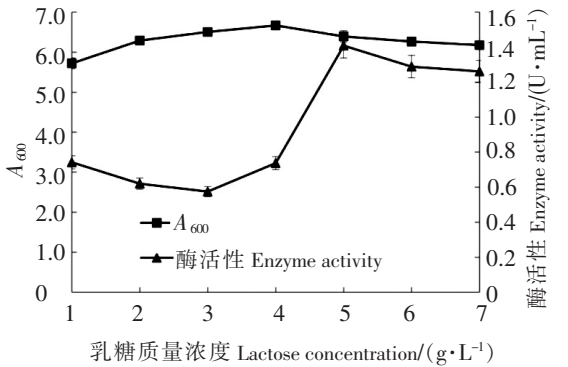


图 2 乳糖浓度对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响  
Fig.2 Effect of lactose concentration on the expression of the recombinant arylsulfatase



2.5 诱导剂的加入方式

乳糖诱导剂按照不同加入次数平均加入，结果（见表 2）显示，乳糖一次加入时，重组芳香基硫酸酯酶的活性最高。

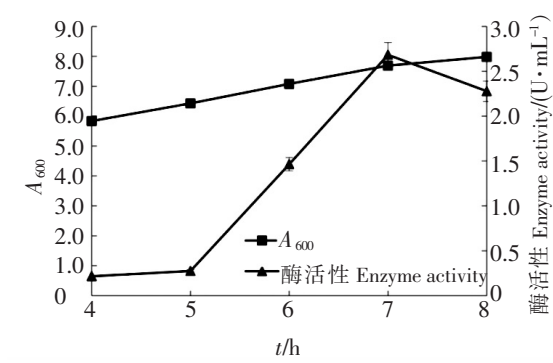


图 3 诱导后表达时间对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响  
Fig.3 Effect of expression time after induction on the expression of the recombinant arylsulfatase

表 2 诱导剂加入方式对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响

Tab.2 Effect of adding inducer times on the expression of the recombinant arylsulfatase

诱导剂加入次数 Inducer times	$A_{600}$	酶活性 Enzyme activity /( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
一次加入 One time to join	$6.24 \pm 0.08$	$2.60 \pm 0.10$
二次加入 Two times to join	$5.98 \pm 0.11$	$1.97 \pm 0.02$
三次加入 Three times to join	$5.96 \pm 0.04$	$2.16 \pm 0.24$
四次加入 Four times to join	$5.93 \pm 0.10$	$2.16 \pm 0.12$

2.6 发酵温度

不同的发酵温度对菌体量与酶活性都有影响。本研究中，重组芳香基硫酸酯酶工程菌加入乳糖诱导剂，分别在不同温度下进行诱导表达，结果（见图 4）显示，当发酵温度为 25 ℃ 时，重组芳香基硫酸酯酶活性最高，故选择 25 ℃ 作为重组芳香基硫酸酯酶工程菌的发酵温度。

2.7 培养基的初始 pH 值

菌体细胞内部许多酶系所进行的催化反应过程都受环境 pH 值的影响，因而培养基的 pH 值对细胞的生长和代谢有显著的作用<sup>[23]</sup>。本研究中，使用不同初始 pH 值的培养基，当培养基初始 pH 值为 6.0~7.5 时，重组芳香基硫酸酯酶的酶活性和菌体量无明显差异，酶活性在 pH = 7.5 时相对较高；pH 值大于 7.5 时，酶活性和菌体量均降低（见图 5）。故发酵培养基的初始 pH 值选择 7.5。在所有优化条件下，重组芳香基硫酸酯酶活性可达 2.63 U/mL，是未条件优化的酶活性 0.056 U/mL（将活化后的菌液以 1% 的接种量，转接到 50 mL LB 培养基中（含 50 μg/mL 卡那霉素），37 ℃，180 r/min 培养 2 h，菌液转接培养 2 h 后，添加乳糖诱导剂至 3 g/L，25 ℃，180 r/min 诱导培养 6 h）的 46.9 倍。

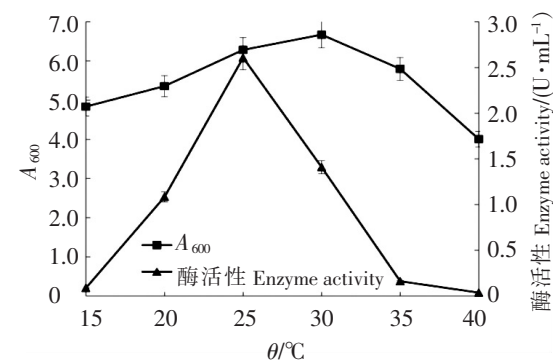


图 4 发酵温度对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响  
Fig.4 Effect of fermentation temperature on the expression of the recombinant arylsulfatase

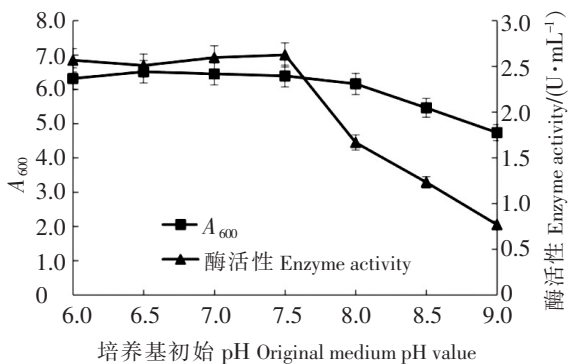


图 5 培养基初始 pH 对重组芳香基硫酸酯酶表达的影响  
Fig.5 Effect of original medium pH value on the expression of the recombinant arylsulfatase

2.8 龙须菜粗多糖硫酸基团的脱除

在 45 ℃ 处理 4 h 的条件下, 随着加酶量的增多, 龙须菜 (*G. lemaneiformis*) 粗多糖被脱除的硫酸基团就越多。当加酶量为 90 U 时, 突变酶 H260L 能脱除 82.1% 的硫酸基团 (见表 3)。

表 3 突变和野生芳香基硫酸酯酶对龙须菜粗多糖硫酸基团的脱除  
Tab. 3 Effects of enzymatic treatment by purified mutant and wild-type arylsulfatases on agar from *G. lemaneiformis*

酶 Enzyme	酶量 Enzyme activity/U	酶处理前后琼脂中硫酸根的质量分数 Sulfate content in agar before and after enzyme treatment/%	脱硫率 Desulfation ratio /%
None	—	2.24 ± 0.10	—
WT	30	1.61 ± 0.08	28.2
	60	1.13 ± 0.06	49.5
	90	0.53 ± 0.03	76.0
H260L	30	1.44 ± 0.04	35.5
	60	0.88 ± 0.31	60.6
	90	0.40 ± 0.13	82.1

3 结论

本实验通过单因素实验对突变芳香基硫酸酯酶工程菌的摇瓶发酵条件进行了优化, 结果表明:

1) 该工程菌的摇瓶发酵最优条件为: 接种量 5%, 培养时间 3 h, 乳糖诱导剂质量浓度 5 g/L, 诱导表达 7 h, 发酵温度 25 ℃, 培养基初始 pH 值 7.5。

2) 在上述最优条件下芳香基硫酸酯酶活性达到 2.63 U/mL, 是未条件优化 0.056 U/mL 的 46.9 倍。

3) 突变酶 H260L 对龙须菜粗多糖的硫酸基团具有较强的脱除能力, 脱硫率为 82.1%。

[ 参 考 文 献 ]

[1] MARZLUF G A. Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in the fungi [J]. Advances in Genetics, 1994, 31: 187-206. DOI:10.1016/S0065-2660(08)60398-3.

[2] WANG X, DUAN D, XU J, et al. Characterization of a novel alkaline arylsulfatase from *Marinomonas* sp. FW-1 and its application in the desulfation of red seaweed agar [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(10): 1353-1362. DOI:10.1007/S10295-015-1625-6.

[3] YAMADA K, AKASAKA K, SHIMADA H. Structure of sea-urchin arylsulfatase gene [J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 186(1/2): 405-410. DOI:10.1111/J.1432-1033.1989.TB15223.X.

[4] WITTSTOCK U, FISCHER M, SVENDSEN I, et al. Cloning and characterization of two cDNAs encoding sulfatases in the Roman snail, *Helix pomatia* [J]. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 2000, 49(1): 71-76. DOI:10.1080/713803591.

[5] WAHEED A, RISLEY J M, VAN ETTEN R L. Structural and immunological relationships among mammalian arylsulfatase a enzymes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1985, 82(4): 855-862. DOI:10.1016/0305-0491(85)90535-8.

[6] BENKOVIC S J, VERGARA E V, HEVEY R C. Purification and properties of an arylsulfatase from *Aspergillus oryzae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1971, 246(16): 4926-4933.

[7] OKAMURA H, YAMADA T, MUROOKA Y, et al. Purification and properties of arylsulfatase of *Klebsiella aerogenes* identity of the enzymes formed by non-repressed and de-repressed synthesis [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1976, 40(10): 2071-2076. DOI:10.1271/BBB1961.40.2071.

[8] MIECH C, DIERKS T, SELMER T, et al. Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated <http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- from a serine [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(9): 4835-4837. DOI:10.1074/JBC.273.9.4835.
- [9] KIM D E, KIM K H, BAE Y J, et al. Purification and characterization of the recombinant arylsulfatase cloned from *Pseudoalteromonas carrageenovora* [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(1): 107-115. DOI: 10.1016/j.pep.2004.09.007.
- [10] BEIL S, KEHRLI H, JAMES P, et al. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*) [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 229(2): 385-394. DOI:10.1111/j.1432-1033.1995.0385k.x.
- [11] MARINO T, RUSSO N, TOSCANO M. Catalytic mechanism of the arylsulfatase promiscuous enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chemistry-A European Journal, 2013, 19(6): 2185-2192. DOI:10.1002/CHEM.201201943.
- [12] HENDERSON M J, MILAZZO F H. Arylsulfatase in *Salmonella typhimurium*: detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis [J]. Journal of Bacteriology, 1979, 139(1): 80-87.
- [13] MUROOKA Y, YIM M H, HARADA T. Formation and purification of *Serratia marcescens* arylsulfatase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(4): 812-817.
- [14] KIM J H, BYUN D S, GODBER J S, et al. Purification and characterization of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(5): 553-559. DOI:10.1007/S00253-003-1463-8.
- [15] UEKI T, SAWADA Y, FUKAGAWA Y, et al. A new type of streptomycete arylsulfatase with high affinity to the sulfur-yl moiety of the substrate [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59(6): 1069-1075. DOI:10.1271/BBB.59.1069.
- [16] LEE D G, SHIN J G, JEON M J, et al. Heterologous expression and characterization of a recombinant thermophilic arylsulfatase from *Thermotoga maritima* [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(5): 897-902. DOI: 10.1007/S12257-013-0094-X.
- [17] HANSON S R, BEST M D, WONG C H. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43(43): 5736-5763. DOI: 10.1002/CHIN.200438268.
- [18] KIM D E, KIM K H, BAE Y J, et al. Purification and characterization of the recombinant arylsulfatase cloned from *Pseudoalteromonas carrageenovora* [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(1): 107-115. DOI:10.1016/J.PEP.2004.09.007.
- [19] SOUZA B W S, CERQUEIRA M A, BOURBON A I, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae* [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(2): 287-292. DOI:10.1016/J.FOODHYD.2011.10.005.
- [20] GARCÍA-GONZÁLEZ C A, ALNAIEF M, SMIRNOVA I. Polysaccharide-based aerogels: promising biodegradable carriers for drug delivery systems [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1425-1438. DOI:10.1016/J.CARBPOL.2011.06.066.
- [21] SHUKLA M K, KUMAR M, PRASAD K, et al. Partial characterization of sulfatase from *Gracilaria dura* and evaluation of its potential application in improvement of the agar quality [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(1): 157-163. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.02.009.
- [22] WEICKERT M J, DOHERTY D H, BEST E A, et al. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1996, 7(5): 494-499. DOI:10.1016/S0958-1669(96)80051-6.
- [23] 陈坚, 李寅. 发酵过程优化原理与实践 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 247.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)