

微泡菌 ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的表达及信息学分析

吴利洋¹, 梁梅芳¹, 倪辉^{1,2,3,4}, 肖安风^{1,2,3,4}, 姜泽东^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}

(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. 厦门市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] 以微泡菌(*Microbulbifer* sp.) ALW1 的基因组为模板, 使用褐藻胶裂解酶 AlgL14 特异性引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物克隆至 pMD18-T 载体后进行测序, 并对该基因编码的蛋白质序列进行生物信息学分析。将目的基因插入 pET-28 α (+) 表达载体, 转入 *Escherichia. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 并利用亲和层析进行重组蛋白纯化。结果显示, 克隆基因的大小为 1 350 bp, 预测编码含有 449 个氨基酸残基的蛋白质。该蛋白质序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶序列具有一定的相似性, 预测克隆的目的基因编码褐藻胶裂解酶, 归属于 PL-14 家族。褐藻胶裂解酶 AlgL14 的理论分子量大小为 48.772 ku, 理论等电点为 6.27。采用同源建模法建立菌株 ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的三维结构, 富含 β -折叠。将目的基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 并纯化获得重组褐藻胶裂解酶。SDS-PAGE 分析显示, 表达的目的蛋白分子量约为 48.8 ku。

[关键词] 微泡菌; 褐藻胶裂解酶; 克隆; 基因表达; 信息学分析

[中图分类号] Q 939.97

Expression and Bioinformatics Analysis of Alginate Lyase AlgL14 from *Microbulbifer* sp. ALW1

WU Liyang¹, LIANG Meifang¹, NI Hui^{1,2,3,4}, XIAO Anfeng^{1,2,3,4}, JIANG Zedong^{1,2,3,4}, ZHU Yanbing^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;

3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China; 4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

Abstract: The genomic DNA of *Microbulbifer* sp. ALW1 was used as the template for amplification of alginate lyase AlgL14 gene by using PCR with a pair of specific primers. The amplified products were cloned into pMD18-T vector and then sequenced. The deduced protein sequence of this gene was further analyzed by bioinformatics. The target gene was inserted into pET-28 α (+) expression vector. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and the target gene was induced to express. The recombinant alginate lyase AlgL14 was purified through affinity chromatography. The results showed that the cloned gene was 1 350 bp, encoding 449 amino acid residues. The target protein sequence shared certain identities with the alg-

[收稿日期] 2018-06-09

[修回日期] 2018-07-19

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2016J01162)

[作者简介] 吴利洋(1994—), 男, 硕士生, 从事食品工程方向研究。通信作者: 朱艳冰(1976—), 女, 教授, 博士, 从事食品酶学方向研究, E-mail: yanbingzhu@163.com。

inate lyase sequences from other bacterial strains. So the cloned target gene was predicted to encode an alginate lyase belonging to PL-14 family. The theoretical molecular weight and pI of the alginate lyase AlgL14 were 48.772 ku and 6.27, respectively. The three-dimensional structure of alginate lyase AlgL14 from ALW1 was constructed by homology modeling and presented β -strands rich structure. The target gene was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and induced to express. Then the recombinant alginate lyase AlgL14 was purified. The molecular weight of the target protein was approximately 48.8 ku through SDS-PAGE analysis.

Keywords: *Microbulbifer* sp; alginate lyase; cloning; gene expression; bioinformatics analysis

0 引言

褐藻胶是一种阴离子酸性直链多糖,它主要来源于褐藻类植物的细胞壁,是由 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)通过 β -1,4 糖苷键连接构成的线性高分子聚合物^[1]。褐藻胶来源广泛,因为其具有增稠性、稳定性、凝胶性和螯合金属离子等特点,所以被广泛应用在食品、医疗、印染和化工等领域^[2-4]。褐藻寡糖作为褐藻胶的降解产物,具有多种生物活性,如抗菌、抗氧化、抗凝血、降血糖、降血脂、抗肿瘤等^[5]。

褐藻胶裂解酶具有 β -消除催化裂解褐藻胶糖苷键的能力,产生多种不饱和糖醛酸寡糖及不饱和糖醛酸单体^[6]。褐藻胶裂解酶具有底物专一性,据此可以将该酶分为多聚 β -D-1,4-甘露糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.3)和多聚 α -L-1,4-古罗糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.11)两大类。褐藻胶裂解酶生物来源十分广泛,如陆生真菌、土壤细菌、病毒、海洋细菌、棘皮动物、海洋软体动物和海藻类等^[7],其中细菌类是该酶最为广泛的提取来源,如假交替单胞菌^[8-10]、弧菌^[11]、黄杆菌^[12]、芽胞杆菌^[13-14]、链霉菌^[15]等。褐藻胶裂解酶被普遍认为是定向制备褐藻寡糖的有力工具,因而,不断寻找开发新的褐藻胶裂解酶的菌种资源,进而研究褐藻胶裂解酶,对实现褐藻寡糖的高效应用具有深远的意义。

在先前的研究中,本课题组从腐烂海带中筛选出一株褐藻胶裂解酶高产菌株 ALW1,鉴定为微泡菌属(*Microbulbifer* sp.)^[16]。本研究进行 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因的克隆、表达及信息学分析,为该菌株褐藻胶裂解酶 AlgL14 的酶学性质、酶的结构与功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株 ALW1 由本实验室筛选获得; *Escherichia coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 菌株由本实验室保存; pET-28 α (+) 载体为 Novagen 公司产品; pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 DNA 标准均为 TaKaRa 公司产品; T₄ DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司; Ni-NTA 琼脂糖树脂为 GE Healthcare 公司产品; 柱式质粒 DNA 提取试剂盒和柱式 DNA 胶回收试剂盒均为天根生化科技(北京)有限公司产品; 寡核苷酸序列的合成及核酸序列的测定均委托厦门铂瑞生物科技有限公司完成; 褐藻酸钠为国药集团产品; 其余试剂均为分析纯产品。

1.2 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因的克隆

根据 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的基因序列,合成以下引物, P1: 5'-CGCG-GATCCACCGAGGTTCCAGGAGCGATTG-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), P2: 5'-CCGCTCGAGCAAAGAGCAAGGAGATTTTCGTGTCC-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。将菌株 ALW1 的基因组 DNA 作为模板,用 PCR 技术扩增特异的基因片段,反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 55 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,凝胶回收目的基因片段。将回收产物与 pMD18-T 载体进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。细胞涂布在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养平板上(平板上预先涂布 10 μ L 0.5 mol/L

IPTG 和 50 μL 20 g/L X-gal)。从平板挑选白色单菌落进行菌落 PCR 鉴定重组子, 并经测序鉴定重组质粒中的插入序列。

1.3 基因及其编码产物的生物学信息分析

利用 NCBI 的 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行蛋白质序列的同源性搜索。利用 MEGA 6.0^[17] 的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树。利用 ExPASy 的 ProtParam 工具进行蛋白质的理化性质预测。蛋白质二级结构预测采用 NPS 服务器 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 上的 GOR4 法^[18] 进行, 利用 NCBI 的 CD Search 程序^[19] 在 GenBank 数据库中进行蛋白质的结构域分析。利用 Modeller 9.15^[20] 进行蛋白质结构的三维建模, 采用 VMD 软件显示蛋白质的空间结构。

1.4 褐藻胶裂解酶 AlgL14 重组表达质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对连接有褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因的 T 载体和表达载体 pET-28 α (+) 进行双酶切, 电泳后回收目的片段, 然后用 T₄ DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒进行测序验证, 所构建的重组表达质粒命名为 pET-28 α -algL14。

1.5 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的诱导表达和纯化

1.5.1 诱导表达

将重组表达质粒转化至表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3), 经菌落 PCR 筛选阳性克隆后, 挑取阳性转化子的单菌落, 接种于 10 mL LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 将培养菌液按 1% (V/V) 比例接种到 100 mL LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 A_{600} 值达到 0.6 ~ 0.8, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为 0.05 mmol/L, 在 12 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下诱导表达 20 h。离心收集菌体, 利用 SDS-PAGE 分析蛋白质的表达情况。

1.5.2 蛋白质纯化

采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱进行纯化。将节 1.5.1 收集的菌体悬浮于 10 mL 预冷的缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 15 mmol/L 咪唑, pH = 8.0), 冰浴条件下进行超声破菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 的滤膜过滤, 将滤液参照 Zhu 等^[21] 的方法进行目的蛋白的纯化。取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳分析洗脱样品的纯度, 利用 Bradford 法^[22] 测定蛋白质的浓度。

1.6 褐藻胶裂解酶的活力测定

采用 DNS (3, 5 - 二硝基水杨酸) 法^[23] 测定还原糖含量。0.9 mL 的质量分数 0.3% 褐藻酸钠底物 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液中) 加入 0.1 mL 酶液, 混合物于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 15 min 后, 加入 1 mL DNS 试剂, 并煮沸 5 min 显色, 然后立即冷水冷却至室温。反应液定容至 5 mL, 在 540 nm 下测定吸光度值。以灭活酶液作为空白对照。在上述条件下, 每分钟水解底物产生 1 μg 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

2 结果

2.1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因的克隆

以 *Microbulbifer* sp. ALW1 的基因组 DNA 为模板, 利用褐藻胶裂解酶 AlgL14 的特异性引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳显示, 扩增产物为大约 1 300 bp 的 DNA 片段 (见图 1)。将该基因克隆入 T 载体后进行测序分析, 结果显示, 目的基因的大小为 1 350 bp。

2.2 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因及其编码产物的序列分析

Microbulbifer sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因 (1 350 bp) 预测编码 449 个氨基酸。该蛋白质的前 33 个氨基酸残基预测为信号肽, 预测的切割位点位于 A33 和 A34 之间。将该蛋白质序列在 GenBank 的 Reference proteins 数据库中进行同源性搜索, 结果显示, 目的基因编码的蛋白质序列与来自

Shewanella waksmanii (WP_028774034.1)、*Haliangium ochraceum* (WP_045118766.1)、*Haliangium ochraceum* DSM 14365 (ACY14264.1)、*Psychromonas* sp. *psych*-6C06 (WP_101106907.1)、*Opitutaes bacterium* TMED158 (OUW17800.1)、*Alteromonadaceae bacteriu*(PCK07151.1)、*Gammaproteobacteria bacterium* TMED134 (OUV79830.1) 和 *Zooshikella ganghwensis*(WP_094785829.1) 的多聚 β -D-甘露糖醛酸裂解酶或褐藻胶裂解酶的序列分别具有 57%、47%、47%、44%、41%、40%、40% 和 40% 的相似性，所以预测目的基因编码产物为褐藻胶裂解酶。将本研究的菌株 ALW1 褐藻胶裂解酶序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶序列进行比对，结果如图 2 所示。将本研究的菌株 ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 序列与其他多糖裂解酶家族来源的褐藻胶裂解酶序列进行系统发育分析，结果（见图 3）显示，该褐藻胶裂解酶与 PL-14 家族褐藻胶裂解酶具有较近的亲缘关系，属于 PL-14 家族褐藻胶裂解酶。

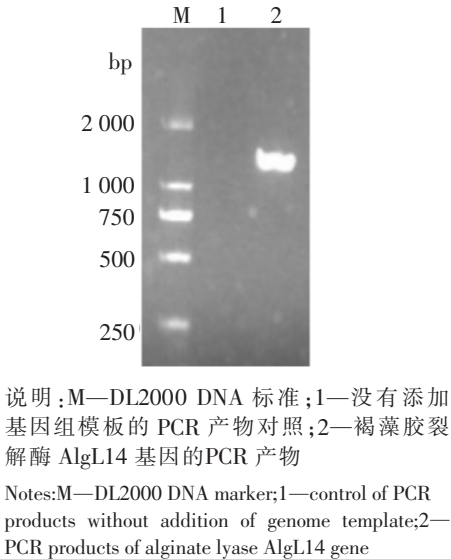


图 1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因的 PCR 产物

Fig.1 PCR products of the alginate lyase AlgL14 gene from *Microbulbifer* sp.ALW1

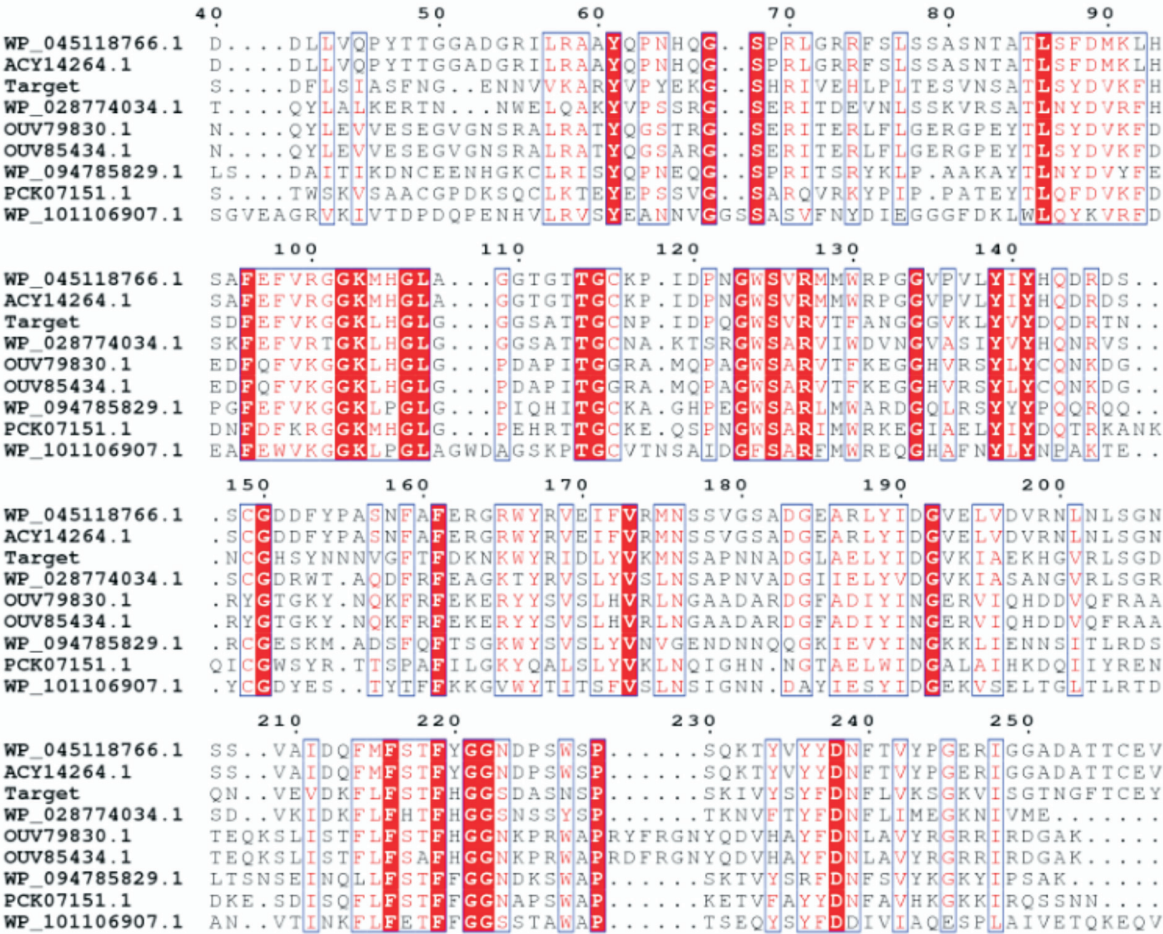


图 2 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的氨基酸序列与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶序列的部分比对

Fig.2 Partial alignment of alginate lyase AlgL14 protein sequences from *Microbulbifer* sp. ALW1 with alginate lyase sequences from other bacterial strains

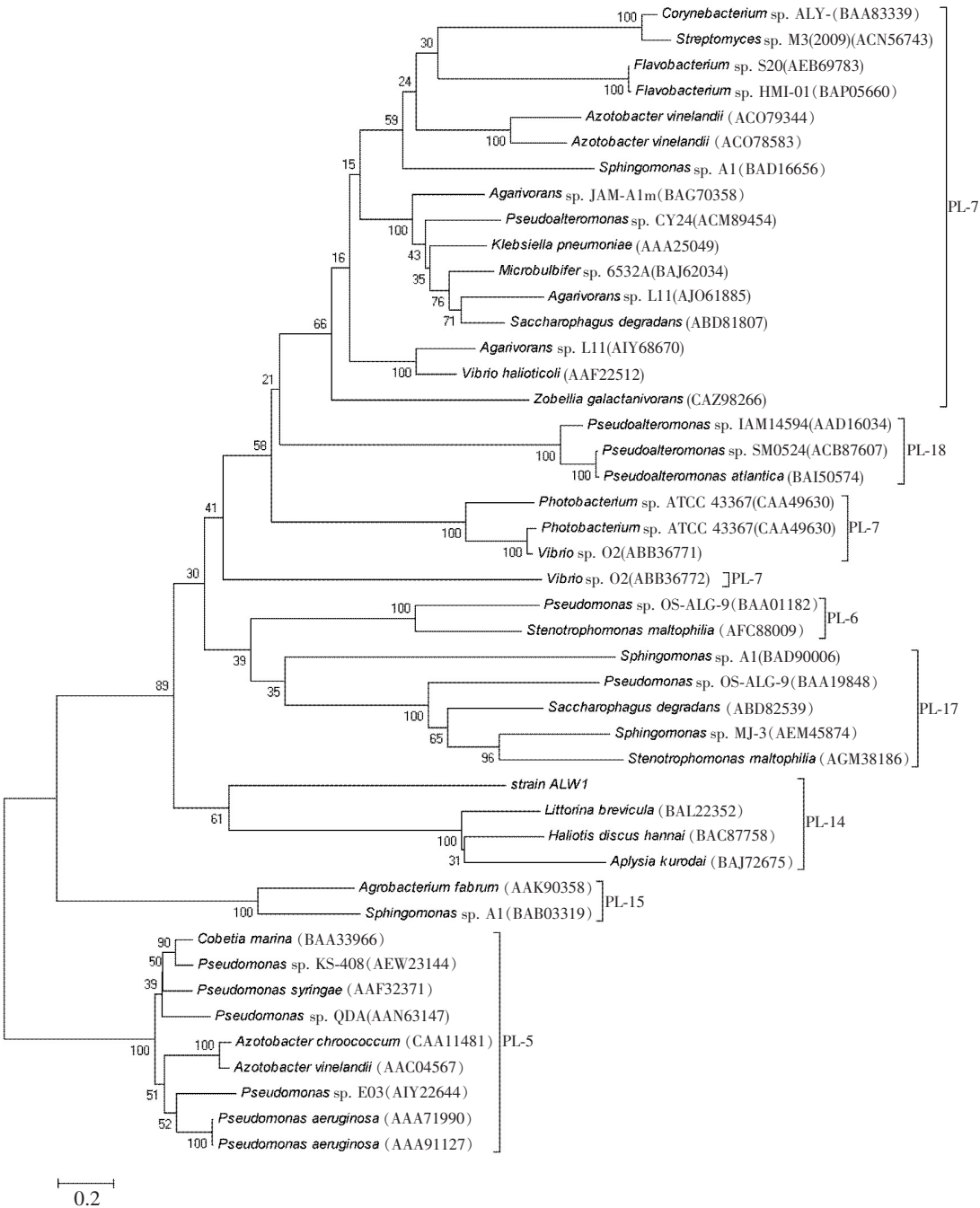


图 3 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的系统发育进化树

Fig.3 Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree of alginate lyase AlgL14 from *Microbulbifer* sp. ALW1

2. 3 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因编码蛋白质的理化性质

利用 ExPASy 的 ProtParam 工具分析目的基因所编码蛋白质的序列, 结果如下: 氨基酸个数为 449, 理论分子质量大小为 48.8 ku; 理论等电点为 6.27, 负电荷残基总数为 43(D + E), 正电荷残基总数为 39(R + K); 分子式为 C₂₁₆₉H₃₂₉₀N₅₈₄O₆₇₀S₁₈, 原子总数为 6 731; 预测在大肠杆菌细胞内半衰期大于 10 h, 不稳定指数为 25.21, 该蛋白质分类为稳定蛋白; 脂溶指数为 70.36, 亲水性平均指数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.258。

2. 4 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的二级结构和结构域

预测 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的二级结构, 结果如图 4 所示。α - 螺旋、β -

折叠和不规则卷曲所占比例分别为 17.37%、59.91% 和 22.72%。该蛋白质包含褐藻胶裂解酶结构域，位于 245 ~ 334 位氨基酸残基，结果如图 5 所示。



图 4 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 二级结构的预测

Fig.4 Prediction of secondary structure of alginate lyase AlgL14 from *Microbulbifer* sp. ALW1

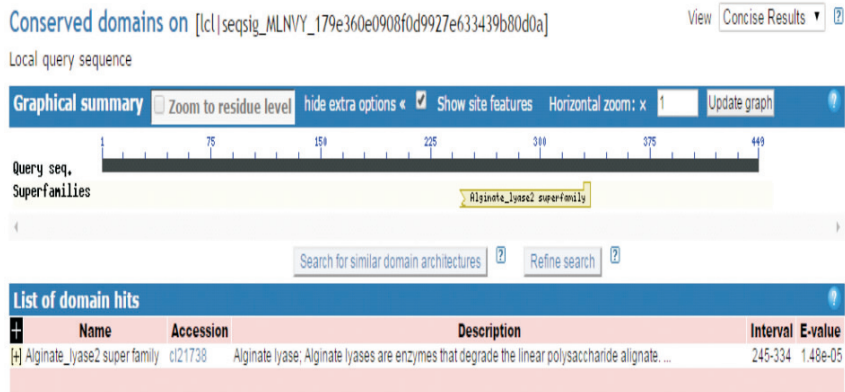


图 5 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 结构域的预测

Fig.5 Prediction of domain of alginate lyase AlgL14 from *Microbulbifer* sp. ALW1

2.5 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的三级结构

将 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 进行三维建模，利用 Modeller 9.15 多模板建模的功能，选择多个模板预测菌株 ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的三级结构。模板在 PDB 数据库中的登录号分别为 5GMT_B、3GNE_B 和 2ZZJ_A。由图 6 可以看出，*Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 富含 β -折叠，整体结构由多个反向平行的 β -折叠组成，呈 β -果冻卷状。AlgL14 结构中存在一个宽度较大的裂隙（图 6 箭头所示）。

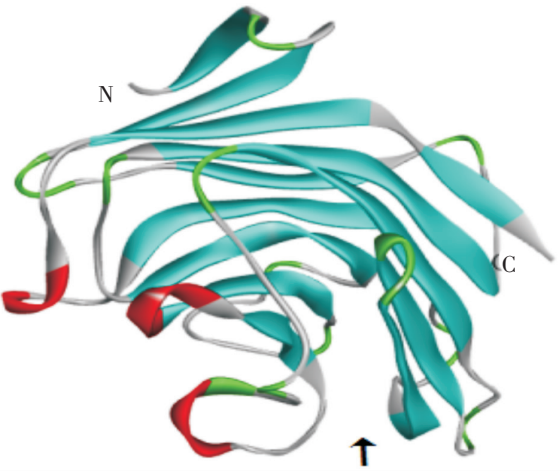
2.6 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的表达与纯化

将重组褐藻胶裂解酶表达质粒转化至表达宿主 *E. coli* BL21（DE3），进行 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示，pET-28 α (+) 表达质粒插入目的基因，经 IPTG 诱导后，与 pET-28 α (+) 的空载（图 7 的道 1）和未诱导的 pET-28 α -algL14 阳性菌（图 7 的道 2）相比较，被诱导表达的含有 pET-28 α -algL14 的阳性菌在 45 ku 左右有明显的融合蛋白表达条带（图 7 的道 3）。破碎菌体后，上清液用 Ni-NTA agarose 亲和柱纯化，得到重组蛋白（图 7 的道 4），分子质量为 48.8 ku。

2.7 重组褐藻胶裂解酶的活力测定结果

DNS 法检测还原糖含量，进而对纯化的褐藻胶裂解酶 AlgL14 的酶活力进行测定，结果显示，重

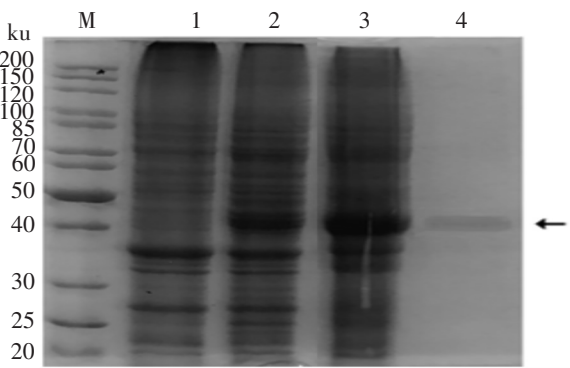
组褐藻胶裂解酶 AlgL14 的酶活力为 1.14 U/mg。



说明： α -螺旋显示为红色； β -折叠显示为蓝色；N 和 C 分别表示蛋白质的氨基末端和羧基末端
Notes： α -helix, red; β -sheet, blue;the letters N and C represent the respective termini of the enzyme

图 6 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的三维建模

Fig.6 3-D structure modeling of alginate lyase AlgL14 from *Microbulbifer* sp. ALW1



说明：M—蛋白质标准；1—含 pET-28 α (+)菌株,IPTG 诱导；2—含 pET-28 α -algL14 阳性菌,未诱导；3—含 pET-28 α -algL14 阳性菌,37 ℃ IPTG 诱导；4—经 Ni-NTA agarose 纯化后的重组蛋白

Notes:M—protein marker;1—bacterium containing pET-28 α (+), IPTG induced;2—positive bacterium containing pET-28 α -algL14, not induced;3—positive bacterium containing pET-28 α -algL14, IPTG induced;4—purified recombinant protein

图 7 褐藻胶裂解酶 AlgL14 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE of the expressed protein encoded by the alginate lyase AlgL14 gene

3 讨论

使用褐藻胶裂解酶可以制备具有多种生物活性的寡糖。此外，褐藻胶裂解酶在医药、海藻工程、褐藻胶的代谢研究等方面具有极其重要的作用。本研究中，从 *Microbulbifer* sp. ALW1 的基因组中成功扩增了 1 350 bp 的褐藻胶裂解酶基因片段，该基因编码的蛋白质与其他菌株来源的褐藻胶裂解酶具有中等程度的相似性。将含有褐藻胶裂解酶基因的重组表达质粒转化至表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)，在 37 ℃ 条件下利用 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导表达时，目的蛋白在细胞内主要以包涵体形式存在，利用亲和层析纯化不到可溶性重组蛋白（结果未示）。本研究中，在 12 ℃ 条件下利用 0.05 mmol/L IPTG 进行诱导表达时，获得了低浓度的重组蛋白，酶的活力分析显示，目的蛋白具有褐藻胶裂解酶的活力。

褐藻胶裂解酶是多糖裂解酶家族 (PLs, EC 4.2.2. -) 的成员，根据酶的初级结构可将 PLs 分为 22 个家族，褐藻胶裂解酶属于 7 个家族，分别为 PL-5, PL-6, PL-7, PL-14, PL-15, PL-17 和 PL-18，大多数细菌来源的内切褐藻胶裂解酶属于 PL-5 和 PL-7，而前者多具有降解多聚 β -D-甘露糖醛酸底物的特异性，后者多具有降解多聚 α -L-古罗糖醛酸底物的特异性^[23]。系统发育进化分析显示，*Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 归属于 PL-14 家族多糖裂解酶。本研究中，*Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的空间结构主要为 β -折叠，类似的结构常见于葡萄糖淀粉酶和纤维素酶。AlgL14 结构中存在一个较大的裂隙，预测该结构能使得褐藻胶底物分子容易渗透进入，并与酶催化位点相互作用。

Microbulbifer sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的克隆与表达为该酶的进一步研究以及工业化生产和应用打下良好的基础。在未来的研究中，可以进行 *Microbulbifer* sp. ALW1 褐藻胶裂解酶 AlgL14 的酶学性质以及酶的结构与功能研究。

[参 考 文 献]

[1] VERA J, CASTRO J, GONZALEZ A, et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants [J]. Mar Drugs, 2011, 9(12): 2514-2525. DOI:10.3390/md9122514.
[2] RAVANAL M C, SHARMA S, GIMPEL J, et al. The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown

- macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima* [J]. *Algal Res*, 2017, 26: 287-293. DOI:10.1016/j.algal.2017.08.012.
- [3] BOUHADIR K H, LEE K Y, ALSBERG E, et al. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering [J]. *Biotechnol Prog*, 2001, 17(5): 945-950. DOI:10.1021/bp010070p.
- [4] GEORG J M, PEDERSEN C, KRISTENSEN M, et al. Review: efficacy of alginate supplementation in relation to appetite regulation and metabolic risk factors: evidence from animal and human studies [J]. *Obes Rev*, 2013, 14(2): 129-144. DOI:10.1111/j.1467-789X.2012.01056.x.
- [5] 刘航, 尹恒, 张运红, 等. 褐藻胶寡糖生物活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012(增刊 1): 201-204.
- [6] GERMONI L A P, BREMER P J, LAMONT I L. The effect of alginate lyase on the gentamicin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in mucoid biofilms [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(1): 126-135. DOI:10.1111/jam.13153.
- [7] 罗丹丹, 薛永常. 褐藻胶裂解酶的研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2016, 33(6): 95-98.
- [8] YOKOSE T, NISHIKAWA T, YAMAMOTO Y, et al. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(2): 450-453. DOI:10.1271/bbb.80692.
- [9] WANG L, RAHMAN M M, INOUE A, et al. Heat-stability and primary structure of the major alginate lyase isozyme LbAly35 from *Littorina brevicula* [J]. *Fish Sci*, 2012, 78(4): 889-896. DOI:10.1007/s12562-012-0517-1.
- [10] FARRELL E K, TIPTON P A. Functional characterization of AlgL, an alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochemistry*, 2015, 51(51): 10259-10266. DOI:10.1021/bi301425r.
- [11] 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. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.01.053.
- [12] ZHU B W, HUANG L S, TAN H D, et al. Characterization of a new endo-type polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(2): 409-415. DOI:10.1007/s10529-014-1685-0.
- [13] MOHAPATRA B R. Kinetic and thermodynamic properties of alginate lyase and cellulase co-produced by *Exiguobacterium* species Alg-S5 [J]. *Int J of Biol Macromol*, 2017, 98:103-110. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.091.
- [14] SAWABE T, TAKAHASHI H, EZURA Y, et al. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene(alyPEEC) encoding the extracellular alginate lyase [J]. *Carbohydr Res*, 2001, 335(1): 11-21. DOI:10.1016/S0008-6215(01)00198-7.
- [15] KIM D E, LEE E Y, KIM H S. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5 [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2009, 11(1): 10-16. DOI:10.1007/s10126-008-9114-9.
- [16] ZHU Y B, WU L Y, CHEN Y H, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. *Microbiol Res*, 2016, 182: 49-58. DOI: 10.1016/j.micres.2015.09.004.
- [17] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729. DOI:10.1093/molbev/mst197.
- [18] GARNIER J, GIBRAT J F, ROBSPIN B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence [J]. *Methods Enzymol*, 1996, 266: 540-553.
- [19] WILLIAMS L E, WU A M, YAZAKI P J, et al. Numerical selection of optimal tumor imaging agents with application to engineered antibodies [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2001, 16(1): 25-35.
- [20] WALLNER B, ELOFSSON A. All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs [J]. *Protein Sci*, 2010, 14(5): 1315-1327. DOI:10.1110/ps.041253405.
- [21] ZHU Y, ZHENG W, NI H, et al. Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6 [J]. *J Basic Microbiol*, 2015, 55(10): 1219-1231. DOI:10.1002/jobm.201500081.
- [22] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [23] MIYAKE O, OCHIAI A, HASHIMOTO W, et al. Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and -7 in *Sphingomonas* sp. strain A1 [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(9): 2891-2896. DOI:10.1128/JB.186.9.2891-2896.2004.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)