

· 综 述 ·

## 海藻酸裂解酶异源表达研究进展

赵 琳<sup>1</sup>, 王乔平<sup>2</sup>, 邵宏博<sup>1</sup>, 严金平<sup>1</sup>, 伊日布斯<sup>1\*</sup>

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院 生物转化实验室, 中国云南 昆明 650500;

2. 曲靖市动物疫病预防控制中心, 中国云南 曲靖 655000)

**摘 要:** 海藻酸裂解酶是通过  $\beta$ -消除反应切断海藻酸分子中的糖苷键, 产生非还原性端具有不饱和双键的糖的酶. 通常作为制备海藻酸寡糖的工具酶, 广泛应用于医疗、食品和生物质能源等领域的研究. 介绍了海藻酸裂解酶异源表达的研究现状、存在的问题和发展的趋势.

**关键词:** 海藻酸; 海藻酸裂解酶; 异源表达

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)05-0447-05

### Advances in Heterologous Expression of Alginate Lyase

ZHAO Lin<sup>1</sup>, WANG Qiao-ping<sup>2</sup>, TAI Hong-bo<sup>1</sup>, YAN Jin-ping<sup>1</sup>, CHAGAN Irbsi<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory of Bioconversion, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China, 2. Qujing Center for Animal Disease Control and Prevention, Qujing 655000, Yunnan, China)

**Abstract:** Alginate lyases, also known as alginases or alginate depolymerases, depolymerized by an alginate lyase through a  $\beta$ -elimination reaction to form a double bond at the non-reducing end. Alginate lyases usually as a tool for preparation of alginate oligosaccharides enzymes that widely used in the field of medical care, food and biomass energy. The state of the field of heterologous expression of alginate lyases, and the existing problems and development trends are introduced.

**Key words:** alginate; alginate lyase; heterologous expression

(Life Science Research, 2013, 17(5): 447~451)

海藻酸是来源于褐藻或某些细菌的多糖物质. 由  $\beta$ -D 甘露糖醛酸 (M) 和其 C-5 差相异构体  $\alpha$ -L 古罗糖醛酸(G)通过 1-4 糖苷键连接而成的线性二元共聚物, 也被称为褐藻胶<sup>[1,2]</sup>. 因其具有凝胶性和生物相容性, 在医学、制药和食品领域有广泛的应用. 由于海藻酸特殊的理化性质和结构, 使之不能够直接被生物体利用, 而其降解后释放的寡糖却可以被广泛的利用. 而近年来的研究证明低分子量海藻酸寡糖还具有多种生物活性, 如抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗菌<sup>[4,5]</sup>、增强巨噬细胞吞噬作用<sup>[6]</sup>、促进白细胞因子的产生<sup>[7]</sup>、促植物生长<sup>[8-10]</sup>等, 在药物研制、功能食品开发、农业等领域具有广阔的开发前景.

随着近年来能源危机的加剧, 海藻酸等海藻生物质作为第三代生物能源的原料, 被视为解决能源危机的潜在途径. Takeda 等<sup>[11]</sup>于 2011 年利用强启动子 *sph2987* 把运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中的丙酮酸脱羧酶 *pdc* 和乙醇脱氢酶 *adhB* 成功的在 *Sphingomonas* A1 中实现了过表达. 重组菌株具有生产乙醇的能力. 这是首次利用海藻酸生产生物乙醇的报道, 为海藻酸及海藻酸裂解酶的研究在能源领域提供了有利信息, 同时也加大了对此方面研究的关注.

综上所述, 对海藻酸的降解是利用海藻酸多糖的前提条件, 常用的海藻酸降解的方法有物理

收稿日期: 2013-03-04; 修回日期: 2013-04-17

作者简介: 赵琳(1987-), 女, 辽宁鞍山人, 硕士研究生, 主要从事海藻酸裂解酶的克隆、纯化、表达研究; \* 通讯作者: 伊日布斯(1967-), 男, 云南昆明人, 昆明理工大学大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事微生物代谢工程研究, Tel: 0871-655920211, E-mail: irbisc@gmail.com.

法<sup>[12]</sup>、化学法<sup>[13-15]</sup>和生物降解法<sup>[16]</sup>。其中生物降解法因为具有酶消耗量小、反应条件温和、降解彻底、对环境无污染等优势而成为了当今研究的主要方向。但是,目前的海藻酸裂解酶的生产大多是依靠富集海藻酸分解菌产酶菌株。然而原始菌株产酶量有限,其提取和纯化步骤繁琐,成本高,因此想要获得高效大量的酶对其进行基因工程方面的研究是重要的方法,其中异源表达是解决其在天然生物体中含量低,生产成本昂贵,难纯化,获得高产量、活性酶的有效方法。

## 1 海藻酸裂解酶

海藻酸裂解酶催化海藻酸的 $\beta$ -1,4-糖苷键,通过 $\beta$ 消除反应的解聚作用,在C-4和C-5之间形成双键,在生成寡糖的非还原性末端产生4-deoxy-L-erythro-hex-4-ene pyranosyluronate<sup>[17]</sup>,并且在230~240 nm有强吸收<sup>[18]</sup>。

目前报道的海藻酸裂解酶中多数为内切型酶,裂解生成一系列含有不同糖醛酸单体的寡糖;而具有外切活性的海藻酸裂解酶仅有3例报道,*Sphingomonas* sp. A1中的A1-IV、A1-IV'<sup>[19, 20]</sup>,鲍鱼*Halotis discus hannai*中的HdAlv<sup>[21]</sup>。根据酶作用底物的特异性可分为3大类:1,4- $\beta$ -D-甘露糖醛酸裂解酶(EC4.2.2.3)、1,4- $\alpha$ -L-古罗糖醛酸裂解酶(EC4.2.2.11)和聚古罗甘露糖醛酸裂解酶。这些只对G或M特异性的酶是单功能酶,分别作用于海藻酸的古罗糖醛酸段和甘露糖醛酸段<sup>[22]</sup>。然而同时对G和M有特异性的酶为双功能酶。单功能酶中,现如今所报道的海藻酸裂解酶大部分都是对聚甘露糖醛酸(M)底物具有专一性,而只有少数是降解聚古罗糖醛酸(G)底物<sup>[23]</sup>如来源于棒状杆菌*Corynebacterium* sp.<sup>[24]</sup>、克里伯氏菌*Klebsiella aerogenes*的酶等。此外,按酶的基因序列和主要结构来分,在CAZy数据库中的21个多糖裂解酶家族中海藻酸裂解酶可分为PL-5、6、7、14、15、17、18<sup>[26]</sup>。

## 2 海藻酸裂解酶异源表达的研究现状

20世纪90年代至今,报道了大量来自于细菌、软体动物的海藻酸裂解酶的异源表达研究,其中异源表达的宿主基本为大肠杆菌,近两年才首次成功地在酵母宿主中进行了表达。

### 2.1 海藻酸裂解酶在大肠杆菌中的异源表达

#### 2.1.1 来源于细菌海藻酸裂解酶的表达

迄今为止已有不少来源于细菌的海藻酸裂解

酶被表达,其中大部分为*Pseudomonas* sp.、*Pseudoalteromonas* sp.和*Sphingomonas* sp.的研究,也有少部分是对*Azotobacter* sp.和*Agrobacterium* sp.的研究。

1993年,Maki等<sup>[27]</sup>通过构建基因文库首次筛选出来源于*Pseudomonas* sp. OS-ALG-9的海藻酸裂解酶(E.C 4.2.2.3)基因 $aly$ ,在*E.coli* (*Escherichia coli*)中成功的进行了表达,阐明了此酶基因受 $lacZp$ 启动子的调控。同时验证此酶对聚G具有偏好性。表达后胞内外酶活分别增加了2和20倍,在培养基中加入甘氨酸其胞外酶活明显增高。Chavagnat等<sup>[28]</sup>在1996年从*Pseudomonas alginovorra*中克隆出编码海藻酸裂解酶ALY (E.C 4.2.2.3)的基因 $aly$ ,以 $pET$ -22b为表达载体在*E.coli*中进行过表达。通过His标签对酶进行一步纯化,纯化后蛋白量从野生型的0.4 mg/L增加到5 mg/L,酶活从野生型的1.35 U/mg增加到71 U/mg。

Sawabe等<sup>[29]</sup>于2001年从*Pseudoalteromonas elyakoi* IAM 14594中利用基因文库方法从7 000个转化子中筛选到 $pTPA1$ 、 $pTPB1$ 、 $pTPC1$ 和 $pTPD1$ 4个阳性克隆子,进一步利用限制性酶切图谱法找到编码胞外海藻酸裂解酶基因的序列,通过 $pTrcHisB$ 表达载体在Top10 *E.coli*中对此蛋白进行表达。实验发现表达后的产物在含有50%海水的LB培养基中的酶活高于无海水培养基的酶活,但其原因还尚不清楚。然而,海藻酸裂解酶的活性受海水或者 $MgCl_2$ 、 $NaCl$ 的影响,这些成分都是海水所包含的成分。因此这些海水成分也许对酶的表达的折叠和稳定性有关。重组酶专一性为多聚M。更加难得的是这个胞外酶能够降解来自于海藻酸和一系列的三到八糖的寡糖结构,具有广泛的底物特异性。此外此酶已经成功应用在制备特殊的食品生产上<sup>[30]</sup>,因此可以把它应用在食品工业上来生产海藻寡糖。Matsushima等<sup>[31]</sup>于2010年分析了来自于*P. atlantica* (*Pseudoalteromonas atlantica* AR06)的海藻酸裂解酶的基因,以*P. atlantica*为受体,*E.coli* DH5 $\alpha$ 为供体,*E.coli* HB101 ( $pRK2013$ )为辅助菌通过结合转移方式以三亲本杂交方法进行遗传重组的过表达,构建了 $pARA1$ (无海藻酸裂解酶活性的突变质粒), $pARA3$ (具有 $aly$ 基因)和 $pARA1$  ( $pARA$ )(具有 $aly$ 基因,有海藻酸裂解酶活性)质粒,发现突变质粒没有海藻酸裂解酶活性,但是在补给了 $aly$ 基因后便重新具有海藻酸裂解酶活性,因此验证此酶 $aly$ 为海藻酸

裂解酶,并对此酶的两边序列进行分析及与其他酶进行比较,提出此酶两边序列高度保守,为此酶的克隆提供了有利信息。

Yoon 等<sup>[32]</sup>在 2000 年时从 *Sphingomonas* sp. A1 中克隆了 3 个海藻酸裂解酶基因 A1-I、A1-II、A1-III,构建了 *pET3a-A1-I*、*pET17b-A1-II*、*pET3a-A1-III*,并分别在 BL21(DE3)中成功进行了表达,表达后的酶活分别为 3.50、3.04、2.13 kU/L,是表达前的 10 倍。其后又对这 3 种酶进行了纯化,分别进行了 Butyl-Toyopearl 650M 层析柱和 SP-Sepharose 凝胶柱两步纯化,纯化后比酶活力由原始的 6.55、4.27、9.20 U/mg 分别提高到 73.1、109、45 U/mg。对重组酶水解产物分析发现不同的是 A1-I 作用于海藻酸生产二糖和三糖,而 A1-II 为三糖和四糖。

来源于 *Azotobacter chroococcum* ATCC 4412 的编码海藻酸裂解酶 ALY 的基因被 Ana 等<sup>[33]</sup>在 1999 年以 *pAPET-2* 为表达载体采用基因文库的方法筛选出来并在 *E.coli* BL-21 (DE3)中进行表达,表达后的蛋白量提高了 10.14 倍,比酶活从原始的 9.25 U/mg 增加到 93.88 U/mg。极大地提高了酶活力,为实现工业生产提供了有利信息。Ochiai 等<sup>[34]</sup>在 2006 年,对 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 的部分基因组进行研究,通过同源比对发现其基因组中含有 5 个与 *Sphingomonas* sp. strain A1 同源的开放阅读框,它们分别是 *Atu3021*、*Atu3022*、*Atu3023*、*Atu3024*、*Atu3025*,其中 *Atu3021*、*Atu3022* 被定义归属为家族 15,之后成功地在 *E.coli* HMS174 中进行了过表达。Kim 等<sup>[35]</sup>于 2009 年从来自于海藻中的 *Streptomyces* sp. ALG-5 中克隆出编码海藻酸裂解酶的基因 ALG-5,构建重组质粒 *pColdIIAlg-5*,成功地在 *E.coli* BL21(DE3)中过表达。对其序列进行分析,发现此蛋白在 N 末端具有 YXRSELREM,在 C 末端具有 YFKAGXYXQ 保守序列,因此此酶被归类为家族 7。重组酶具有多聚 G 和多聚 M/G 特异性,酶解产物广泛,包含了 2~5 糖,为应用于寡糖生产提供了可能性。Kim 等<sup>[36]</sup>于 2012 年通过基因文库的方法首次克隆了来自于 *S. degradans* (*Saccharophagus degradans* 2-40) 的胞外海藻酸裂解酶的基因,以 *pET21* 构建表达质粒且在 *E.coil* BL (DE3)中表达,并对此酶进行了 His 标签的纯化,根据其基因序列的分析,最后把此酶归类于家族 17。与以往不同的是本研究用 HPLC(高效液相色谱)和 LC-MS

(液质联用)而不是 TLC(薄层层析)方法,进一步对此酶的降解产物进行分析,发现此酶是降解海藻酸为单糖的关键酶,单糖酸可以用来阐明 *S. degradans* 对海藻酸的代谢途径,也可以更进一步利用重组微生物的代谢工程发酵糖醛酸来生产生物燃料。*S. degradans* 的很多降解酶包括纤维素酶,木糖酶和琼脂水解酶已经被报道了,但是海藻酸降解酶还是首次发现被过表达。

#### 2.1.2 来源于海洋软体动物海藻酸裂解酶的表达

以海藻为食的草食性海洋无脊椎动物,如海胆,鲍鱼,海兔利用在它们消化液中的多糖降解酶消化海藻存储多糖,以此来获得碳水化合物营养物质<sup>[37,38]</sup>。在众多的海藻多糖中海藻酸拥有非常丰富的碳水化合物。相应地,海藻酸降解酶在鲍鱼和海螺的消化液中也非常的丰富,所以对软体动物中的海藻酸裂解酶的研究也比较广泛。

Sugimura 等<sup>[39]</sup>于 2000 年从 *Haliotis discus hannai* 中分离出来的编码海藻酸裂解酶基因的 *Vibrio halioticoli* IAM 14596T 通过 pUC18 载体克隆并在 *E.coli* 中表达,获得了 3 个海藻酸阳性克隆子 *pVHB*、*pVHC*、*pVHE*,且都具有聚古罗糖醛酸裂解酶的特性。3 个聚古罗糖醛酸裂解酶基因 *alyVG1*、*alyVG2*、*alyVG3* 分别被测序,对其序列进行分析,发现 *alyVG1*、*alyVG2* 具有和大多数酶一样的羧基末端区域,包含 9 个氨基酸的保守序列 (YFKAGXYXQ),进一步阐明了这个区域的保守性。

Eri 等<sup>[40]</sup>于 2003 年,对 *Haliotis discus hannai* 的肝胰腺用 TOYOPEARL CM-650M 进行了海藻酸裂解酶的纯化,纯化后的酶活由 2.7 U/mg 提高到 1 324 U/mg,是原始酶活的 489 倍之高。并对此酶进行了 N 末端测序和部分片段氨基酸的测序,分别为 L4、L5、L7、L8, N 末端序列,和 *Turbo cornutus* SP2 比对发现有 85% 的相似性,同时发现 L5 和 SP2 的 C 末端具有相似性,所以通过 cDNA 以 N 末端和 L5 设计引物扩增目的蛋白,再用 RACE 方法扩增全酶。最后以 *pET-3a* 构建表达质粒并成功地在 *E.coli* BL21 (DE3)中表达,表达后酶活性明显。Sim 等<sup>[41]</sup>于 2012 年在鲍鱼肠道微生物中构建了 F-黏粒基因文库,从中筛选出一个 31.7 kb 大小的具有海藻酸裂解酶活性的片段,构建表达质粒 *pMal-c2X* 成功地在 *E.coli* BL21 (DE3) 中表达。对重组酶进行分析发现含有 22 个 ORF,其中第 11、12、13 都和已知的海藻酸裂解酶相似,但是只有 ORF11 有海藻酸裂解酶活性,通

过薄层层析分析此重组酶为内切酶,对其基因分析发现具有3个保守序列分别为RSEL、QIH、YFKAGVYNQ,并推测这3个区域很有可能是起到了稳定三维结构和海藻酸裂解酶功能的作用。

## 2.2 海藻酸裂解酶在酵母中的异源表达和细胞展示

岳明等<sup>[22]</sup>于2009年以*P. aeruginosa*基因组DNA为模板,克隆出1.0 kb的海藻酸裂解酶基因*algL*,以

PIC9K-*aly*为表达载体利用聚乙二醇(PEG)转化法成功地在*Pichia pastoris* GS115中表达。这是首次把海藻酸裂解酶在酵母菌株中进行表达,开创了酵母宿主中异源表达的先河。因为其具有甲醇诱导的强启动子,表达后通过加工、折叠使异源蛋白分泌到胞外,有利于产生活性蛋白,从而简化纯化过程,降低生产成本,为实现海藻酸裂解酶的工业化生产提供了可能性。

Liu等<sup>[42]</sup>于2009年从腐烂海带中的*Vibrio* sp. QY101中通过

ET24-*ALYVI*质粒克隆海藻酸裂解酶基因*ALYVI*,并通过细胞表面展示载体

INA1317-*YICWP110*成功地在*Yarrowia lipolytica*解脂耶罗维亚酵母中进行了表达,表达后在以海藻酸为底物的平板上可以观察到明显的水解圈。并且展示的海藻酸裂解酶还可以水解海藻酸为寡糖,这是首次利用在酵母中展示的海藻酸裂解酶来水解生产寡糖的方法。

## 3 展望

随着对功能性食品和生物能源等海洋生物资源的开发的重视,对海洋生物降解酶的需求也愈加旺盛。现今常以富集海藻酸产酶菌株来生产海藻酸裂解酶,受野生型菌株产酶量少,提取、纯化步骤繁琐等限制,很难达到大量的工业化生产。而异源表达可以解决原始菌株中含量低,生产成本昂贵的问题。具有转换藻类多糖为生物燃料的酶的异源表达研究对可持续发展能源的利用和经济效益有着重大影响和意义。

由于海藻寡糖的应用广泛,目前对内切酶的研究甚广,然而外切酶的研究却较少。而且对内切、外切酶以及不同底物特异性酶的协同作用等降解机理的理解也受到限制。同时海藻酸分解菌代谢机理的研究也仅限于*pseudomonas* sp.和*Sphingomonas* A1。若能够进一步阐明其他菌株的海藻酸降解产物糖醛酸在细胞内的代谢途径,对其代谢产物进行研究,可以加大对海藻酸代谢途

径的了解。本研究室已经筛选到3株海藻酸裂解酶菌株,对其进行了酶的克隆、表达和纯化,接下来进一步在代谢途径方面进行研究,希望有所突破,并对代谢方面提供有价值的参考。虽然克隆海藻酸裂解酶基因并在大肠杆菌或者是酵母等模式菌株中表达的研究很多,但都是非乙醇发酵菌株,若能够使海藻酸裂解酶在酿酒酵母中过表达,进一步以此改造菌株直接发酵利用大型藻类来生产乙醇,这样对于第三代生物燃料的生产是有着重大的突破和经济意义的,也更加扩展了海藻酸裂解酶的应用。

## 参考文献(References):

- [1] COTE G L, KRULL L H. Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*[J]. *Carbohydrate Research*, 1988, 181(1): 143-152.
- [2] GOVAN J R W, FYFE J A M, JARMAN T R. Isolation of alginate-producing mutants of *pseudomonas fluorescens*, *pseudomonas putida* and *pseudomonas mendocina*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1981, 125(1): 217-220.
- [3] FUJIHARA M, NAGUMO T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity[J]. *Carbohydrate Research*, 1992, 7(224): 343-347.
- [4] HU X, JIANG X, GONG J H, et al. Antibacterial activity of lyase-depolymerized products of alginate[J]. *European Journal of Phycology*, 2005, 17(1): 57-60.
- [5] HU X, JIANG X. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives[J]. *European Journal of Phycology*, 2004, 39(1): 67-71.
- [6] FUJIHARA M, NAGUMO T. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity[J]. *Carbohydrate Research*, 1993, 243(1): 211-216.
- [7] OTTERLEI M, OSTGAARD K, SKJAK-BRAEK G, et al. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate[J]. *Immunotherapy*, 1991, 10(4): 286-291.
- [8] NATSUMI M, KAMO Y, HIRAYAMA M, et al. Isolation and characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities[J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 258(20): 187-197.
- [9] TOMODA Y, UMEMURA K, ADACHI T. Promotion of barley root elongation under hypoxic conditions by alginate lyase[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(1): 202-203.
- [10] YONEMOTO Y, TANAKA H, YAMASHITA T, et al. Promotion of germination and shoot elongation of some plants by alginate oligomers prepared with bacterial alginate lyase[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 75(1): 68-70.
- [11] TAKEDA H, YONEYAMA F, KAWAI S, et al. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria[J]. *Energy and Environmental Science*, 2011, 4(7): 2575-81.
- [12] HOLME H K, LINDMO K, KRISTIANSEN A, et al. Thermal depolymerization of alginate in the solid state[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54(4): 431-438.

- [13] HAUG A, LARSEN B, SMIDSRØD O. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis[J]. *Acta Chemica Scandinavica*, 1966, 20: 183-190.
- [14] YANG Z, LI J P, GUAN H S. Preparation and characterization of oligomannuronates from alginate degraded by hydrogen peroxide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 58(2): 115-121.
- [15] NIEMELA K, SJOSTROM E. Alkaline-degradation of alginates to carboxylic acids[J]. *Carbohydrate Research*, 1985, 144(2): 241-249.
- [16] MURATA K, INOSE T, HISANO T, *et al.* Bacterial alginate lyase-Enzymology, genetics and application[J]. *Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76(5): 427-437.
- [17] GACESA P. Enzymic degradation of alginates[J]. *International Journal of Biochemistry*, 1992, 24(4): 545-552.
- [18] HENRY I, NAKAD A. Direct calorimetric studies on the heats of ionization of oxygenated and deoxygenated hemoglobin[J]. *Biological Chemistry*, 1967, 242(5): 845-851.
- [19] HASHIMOTO W, MIYAKE O, MOMMA K, *et al.* Molecular identification of oligoalginate lyase of *Sphingomonas* sp. Strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate[J]. *Bacteriology*, 2000, 182(16): 4572-4577.
- [20] HASHIMOTO W, MIYAKE O, OCHIAI A, *et al.* Molecular Identification of *Sphingomonas* sp. A1 Alginate Lyase (A1-IV) as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate lyase[J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(1): 48-54.
- [21] SUZUKI H, SUZUKI K, INOUE A, *et al.* A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(11): 1809-1819.
- [22] GACESA P. Alginates[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1988, 8(3): 161-182.
- [23] 岳明, 丁宏标, 乔宇. 铜绿假单胞菌 *algL* 基因在毕赤酵母中的表达及其性质研究[J]. *中国农业科学* (YUE Ming, DING Hong-biao, QIAO Yu. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*) in *Pichia pastoris* and characterization of the enzyme[J]. *Scientia Agricultura Sinica*), 2008, 41(4): 1192-1200.
- [24] MATSUBARA Y, KAWADA R, IWASAKI K, *et al.* Extracellular Poly (α-L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. : Purification, Characteristics, and Conformational properties[J]. *Protein Chemistry*, 1998, 17(1): 29-36.
- [25] ØSTGAARD K, KNUtSENA S H, DYRSET N, *et al.* Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweed biotechnology[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15 (9): 756-763.
- [26] GARRON M L, CYGLER M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases[J]. *Glycobiology*, 2010, 20(12): 1547-1573.
- [27] MAKI H, MORI A, FUJIYAMA K, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9[J]. *General Microbiology*, 1993, 139(5): 987-993.
- [28] CHAVAGNAT F, DUEZ C, GUINAND M, *et al.* Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the alginate lyase-encoding *algL* gene of *Pseudomonas alginovorans*: identification of three classes of alginate lyases[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 319(Pt2): 575-583.
- [29] SAWABE T, TAKAHASHI H, EZURA Y. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene (*alyPEEC*) encoding the extracellular alginate lyase[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 335(21): 11-21.
- [30] SATO R, SAWABE T, KISHIMURA H, *et al.* Preparation of neoglycoprotein from carp myofibrillar protein and alginate oligosaccharide: improved solubility in low ionic strength medium[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(1): 17-21.
- [31] MATSUSHIMA R, DANNO H, UCHIDA M, *et al.* Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, 86(2): 567-576.
- [32] YOON H J, MIYAKE O, OKAMOTO M, *et al.* Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases protein expression and purification[J]. *Protein Expression and Purification*, 2000, 19(1): 84-90.
- [33] ANA P, ALBERTO P, ANTONIO P. Cloning and expression of the *algI* gene, encoding the azotobacter chroococcum alginate lyase: purification and characterization of the enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(5): 1409-1414.
- [34] OCHIAI A, HASHIMOTO W, MURATA K. A biosystem for alginate metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58: Molecular identification of Atu3025 as an exotype family PL-15 alginate lyase[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(7): 642-649.
- [35] KIM D E, LEE E Y, KIM H S. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 10-16.
- [36] KIM H T, CHUNG J H, WANG D, *et al.* Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2012, 93(5): 2233-2239.
- [37] KUMAGAI Y, OJIMA T. Enzymatic properties and the primary structure of a β-1, 3-glucanases from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2009, 154(1): 113-120.
- [38] ZAHURA U A, RAHMAN M M, INOUE A, *et al.* An endo-β-1, 4-mannanase, AkMan, from the common sea hare *Aplysia kurodai*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, 157(1): 137-143.
- [39] SUGIMURA I I, SAWABE T, EZURA Y. Cloning and sequence analysis of vibrio halioticoli genes encoding three types of polyguluronate lyase[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(1): 65-73.
- [40] ERI S, OJIMA T, NISHITA K. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(24): 2841-2852.
- [41] SIM S J, BAIK K S, PARK S C, *et al.* Characterization of alginate lyase gene using a metagenomic library constructed from the gut microflora of abalone[J]. *Industrial Microbiology Biotechnology*, 2012, 39(4): 585-593.
- [42] LIU G, YUE L, CHI Z, *et al.* The surface display of the alginate lyase on the cells of *Yarrowia lipolytica* for hydrolysis of alginate[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(5): 619-626.