

海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02 产 κ -卡拉胶酶的发酵条件优化

陈旭, 姚忠, 袁玮康, 孙芸, 朱本伟

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816)

摘要: 通过筛选分离获得一株产 κ -卡拉胶酶活力较高的菌株 NJ-02, 通过生理生化实验, 16S rRNA 基因序列测定和系统发育树分析, 鉴定其为农杆菌属 *Pedobacter* sp.。通过设计单因素和响应面实验, 确定该菌株的最佳产酶发酵条件。通过单因素实验得其最佳发酵产酶条件为: 碳源为 κ -卡拉胶 (2.00 g/L)、氮源为酵母浸提物 (4.00 g/L)、pH 7.00、接种量 5%、培养温度 30 °C、摇床转速 150 r/min。通过液体培养基单因素研究, 确定了三个影响产 κ -卡拉胶酶的关键因素, 分别是碳源、氮源和初始 pH。根据 Box-Behnken 中心组合方法采用三因素三水平响应值设计实验优化, 得到最佳的培养基配方为: 卡拉胶浓度 2.15 g/L、酵母浸提物 4.32 g/L、pH 7.10。结论: 优化后酶活最高可达 19.01 U/mL, 较优化前提高了 1.20 倍, NJ-02 最佳发酵条件的建立, 为获得大量的 κ -卡拉胶酶进行更深入的研究提供了实验基础和理论依据。

关键词: κ -卡拉胶酶; 发酵条件优化; 海洋细菌

文章编号: 1673-9078(2017)12-155-161

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.024

Optimization of Fermentation Conditions for Producing κ -Carrageenase by a Marine Strain *Pedobacter* sp. NJ-02

CHEN Xu, YAO Zhong, YUAN Wei-kang, SUN Yun, ZHU Ben-wei

(College of Food Sciences and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: A strain NJ-02 with high κ -carrageenan producing activity was acquired through screening and separation, and identified as *Pedobacter* sp. by physiology biochemistry experiment, 16S rRNA sequences determination and phylogenetic tree analysis. The optimal fermentation conditions were studied based on the single-factor and response surface experiment. The optimal conditions were obtained by single-factor experiment as follows: κ -carrageenan as carbon source (2.00 g/L), yeast extraction as nitrogen source (4.00 g/L), pH 7.00, inoculation amount 5%, temperature 30 °C, and table speed 150 r/min. According to the single factor experiments, the carbon resource, nitrogen source, and pH were determined to be three key factors influencing κ -carrageenan enzyme production in fluid fermentation. A regression model for the yield of κ -carrageenan enzyme was established using a Box-Behnken design involving the above three factors with three levels. The best fermentation medium was found as follows: κ -carrageenan 2.15 g/L, yeast extraction 4.32 g/L, and pH 7.10. Under these conditions, the enzyme activity was 19.01 U/mL, which was 1.20 times as that of the original conditions. It provided the experimental foundation and theoretical basis for large quantity of κ -carrageenan and further study.

Key words: κ -carrageenase; fermentation condition optimization; marine bacteria

卡拉胶是海洋红藻如麒麟菜 (*Eucheuma muricatum*), 角叉菜 (*Chondrus ocellatus* Aolmes) 等大型红藻类植物细胞壁的主要成分, 它是由 1,3- α -D-吡喃半乳糖和 1,4- β -D-吡喃半乳糖作为基本骨架, 交替连接而成的硫酸线性多糖。卡拉胶的降解产物-卡拉胶寡糖, 由于其具有抗氧化、抗病毒、抗凝血和免疫调节

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31601410)

作者简介: 陈旭 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程

通讯作者: 朱本伟 (1987-), 男, 讲师, 研究方向: 食品酶工程

等多种生理活性, 逐渐成为海洋功能食品开发领域研究的热点。卡拉胶酶是一种糖苷水解酶, 通过使 β -1,4 糖苷键断裂降解卡拉胶, 生成卡拉胶寡糖。根据作用底物的不同, 卡拉胶酶可分为 λ -卡拉胶酶、 κ -卡拉胶酶和 ι -卡拉胶酶等^[1]。

卡拉胶酶作为工具酶在海藻原生质体制备^[2,3]、卡拉胶寡糖制备^[4]、卡拉胶结构与功能的研究^[5,6]等方面有着广泛的应用。Kang 等^[7]分离出的芽孢杆菌 *Bacillus* sp.SYR4, 能够利用海藻废水作为碳源, 通过降解琼脂、卡拉胶, 过分离产生 7~10 wt% 的生物乙醇。能够

产生卡拉胶酶的生物主要有两种,即动物和微生物。动物中主要为螺类,这些螺类生活在海洋中,以红藻为食,在消化红藻过程中体内产生卡拉胶酶,此种螺类主要有单齿螺、朝鲜花冠小月螺和抚荡枝螺等。此外,人工饲养、以红藻喂食的经济海产品,如鲍鱼,在其肝和胰脏也分离得到了卡拉胶酶^[8,9]。现已经报道的能够产生卡拉胶降解酶的微生物绝大部分都是海洋细菌,包括假交替单胞菌属 *Pseudoaltermonas*^[3,10]、假单胞菌属 *Pseudomonas*^[11]、噬纤维菌属 *Cytophaga*^[12]、弧菌属 *Vibrio*^[13]、交替单胞菌属 *Alteromonas*^[1]和 *Zobella*^[14]。

海洋功能生物酶的开发和利用是海洋资源高值化的必由之路。段高飞^[15]、唐志红^[16]和古钟^[17]等分别从青岛太平角海域、烟台附近海区及福建省漳州市东山岛海域分离出产卡拉胶酶的微生物,并对其进行了研究。本课题组从采集自浙江舟山的东海海域的海藻烂泥样品中,分离获得产 κ -卡拉胶酶活力较高的菌株 NJ-02,初步鉴定为农杆菌属,命名为 *Pedobacter* sp. NJ-02,在实验室条件下,对其发酵条件进行了初步研究,为进一步的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株,从采集自舟山东海海域的海藻样品中分离获得;种子培养基, κ -卡拉胶 3 g/L、蛋白胨 3 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L、 NaCl 20 g/L、无机盐母液 100 mL、水 900 mL、pH 7.00, 121 °C 灭菌 20 min; 发酵培养基, κ -卡拉胶 2.15 g/L、酵母浸提物 4.29 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L、 NaCl 20 g/L、无机盐母液 100 mL、水 900 mL、pH 7.10, 121 °C 灭菌 20 min; 无机盐母液配制, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 CaCl_2 0.02%、 KH_2PO_4 0.1%; κ -卡拉胶,上海梯希爱化成工业发展有限公司;葡萄糖、蛋白胨、酵母浸提物、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸镁、磷酸二氢钾和氯化钙,国产分析纯。

HYG-A 全温摇床柜,苏州培英实验设备有限公司;单人净化工作台,上海苏净实业有限公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株鉴定

通过划线分离筛选方法从采集自浙江舟山的含腐烂海藻的泥土样品中,通过筛选分离获得一株产 κ -卡拉胶酶活力较高的菌株 NJ-02,通过测定其 16S rRNA

基因序列,构建了系统发生树,鉴定为农杆菌属 *Pedobacter* sp.。

1.2.2 菌株生长曲线的测定

将活化后的菌体,接入装有 200 mL 基础培养基的 500 mL 的三角瓶中,30 °C、150 r/min 振荡培养,每隔 4 h 取样,在 600 nm 处测定吸光度,测定其生长状况。确保接入发酵培养基中的菌种处在对数生长期后期,且生长状态最佳。

1.2.3 酶活测定

发酵结束后,取 0.1 mL 酶液与 0.3 mL 的 0.5% κ -卡拉胶混匀后,在 30 °C 水浴温育 30 min,100 °C 水浴煮沸终止反应,取 0.1 mL 上清与 0.3 mL DNA 显色剂混匀,100 °C 水浴煮沸 10 min,冷却后加水稀释到 2.5 mL,测定 540 nm 处的吸收值,平行三次,以煮沸过的酶液作为对照;定义每分钟产生 1 μmol 半乳糖为一个酶活力单位。

1.2.4 菌株产酶曲线测定

将活化后的平板菌体,接入装有 200 mL 基础培养基的 500 mL 的三角瓶中,30 °C、150 r/min 振荡培养,每隔 4 h 取样,以上述方法测定酶活力,以培养时间 (h) 与酶活力 (U/mL) 做产酶曲线,平行三次。

1.2.5 单因素实验

在培养基配方的单因素实验中:碳源分别为卡拉胶、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和乳糖;氮源分别为蛋白胨、酵母浸提物、尿素、牛肉膏和硫酸铵;碳源浓度分别设定为 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 g/L;氮源浓度分别设定为 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 g/L;培养基 pH 分别设定为 5.00、6.00、7.00、8.00 和 9.00;接种量:2.0%、3.0%、4.0%、5.0%和 6.0%。在培养条件的单因素实验中:培养温度分别设定为 20、25、30、35 和 40 °C;摇床转速分别设定为 60、100、140、180、220 r/min。

1.2.6 响应面实验

表 1 响应面实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

编号	因素	水平		
		-1	0	1
x_1	κ -卡拉胶浓度/(g/L)	1.00	2.00	3.00
	酵母浸提物浓度/(g/L)	2.00	4.00	6.00
x_2	酵母浸提物浓度/(g/L)	2.00	4.00	6.00
x_3	pH	5.00	7.00	9.00

以卡拉胶浓度 (x_1)、酵母浸提物浓度 (x_2)、pH (x_3) 为影响因素,酶活力为响应值 (Y),利用 Box-Behnken Design (BBD) 法设计响应面实验,实验因素及水平见表 1。0 水平表示单因素实验得到的最

佳值, -1 水平和 1 水平分别表示各因素在实验中的最低值和最高值。

1.2.7 数据统计分析

试验数据采用 DPS 软件进行差异显著性分析, 采用 Design Expert V8.0.6 软件进行响应面分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

通过筛选分离获得一株产 κ -卡拉胶酶活力较高的菌株 NJ-02, 通过简单的生理生化实验和测定 16S rRNA 基因序列, 构建了系统进化树, 确定了菌株的菌属。

表 2 菌株 NJ-02 生理生化指标

Table 2 The physiological and biochemical indexes of the strain

NJ-02	
生理指标	结果判断
非葡萄糖	+
非麦芽糖	+
非蔗糖	+
鸟氨酸脱羧酶	+
精氨酸脱羧酶	+
硝酸盐还原	-
精氨酸双水解酶	+
亚硝酸盐产气	+
硫化氢	+
硝酸盐产气	+
西蒙氏柠檬酸盐	+
蛋白胨水	-
尿素	-
七叶苷	+

注: +为阳性, -为阴性。

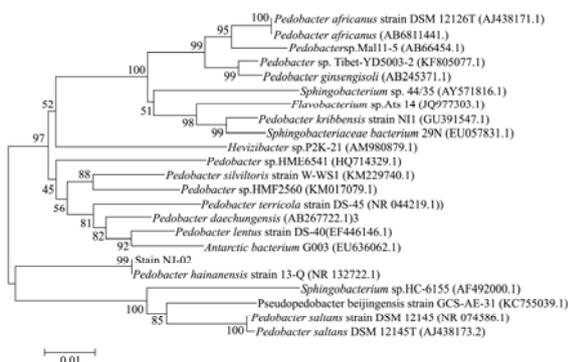


图 1 菌株 NJ-02 的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of a stain of NJ-02

从表 2 可以看出, 菌株 NJ-02 能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖; 具有鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶和精

氨酸双水解酶的产酶活性, 以及硝酸盐产气等性能。

根据系统发育树分析, 菌株 NJ-02 与 *Pedobacter* sp.农杆菌菌属进化关系较近, 序列相似性达 99%, 因此可以初步鉴定该菌株属于 *Pedobacter* 菌属, 并将其命名为 *Pedobacter* sp. NJ-02。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 菌株 *Pedobacter* sp.NJ-02 的生长曲线和产酶曲线

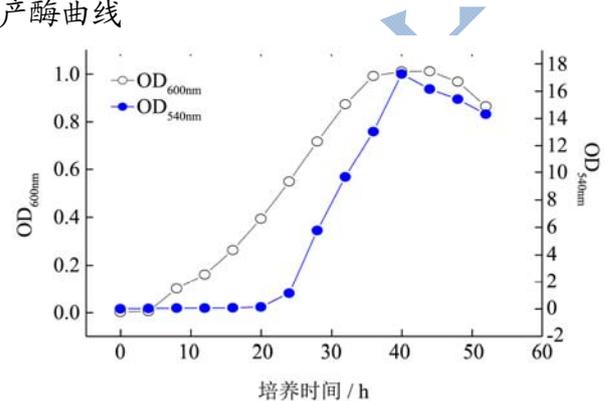


图 2 菌株 *Pedobacter* sp. NJ-02 的生长曲线和产酶曲线

Fig.2 The curve of growth and enzyme production of *Pedobacter* sp. NJ-02

注: 空心圆曲线为生长曲线, 实心圆曲线为产酶曲线。

从图 2 中可以看出, 摇瓶培养中的菌株 *Pedobacter* sp. NJ-02 从 8~36 h 进入对数生长期, 36~44 h 为其稳定期, 44 h 后进入衰亡期; 从图 2 中可以看出该菌株在培养 0~24 h 期间基本不产酶, 培养 24 h 后产酶开始明显上升, 40 h 酶活最高, 之后产酶能力逐渐下降。因此, 种子培养 32 h 后将其接入不同条件的扩大培养基中, 培养 40 h 后测定酶活力, 探讨不同培养基配方和不同培养条件对酶活力的影响。

2.2.2 碳源的影响

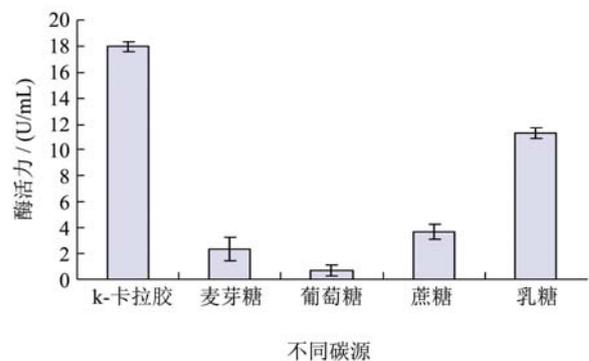


图 3 碳源种类对酶活力的影响

Fig.3 The effects of different carbon sources on the enzyme activity

碳源是组成培养基的主要成分之一。其主要功能有两个: 一是为微生物菌种的生长繁殖提供能源和合

成菌体所必须的碳源；二是为合成目的产物提供所需的碳成分。碳源是微生物细胞结构或代谢产物中碳架来源的营养物质，微生物对碳的需求最大。以 3.00 g/L 卡拉胶碳含量的添加量为标准，分别用葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖作为碳源。采用不同碳源培养基的酶活力结果如图 3 所示。由图 3 可知，不同碳源对菌株 *Pedobacter* sp. NJ-02 产酶的酶活力有一定的影响，在以卡拉胶为碳源的培养基上，酶活力达到最高值为 17.96 U/mL，五种不同碳源对酶活力的影响由大到小排列为：卡拉胶>乳糖>蔗糖>麦芽糖>葡萄糖。

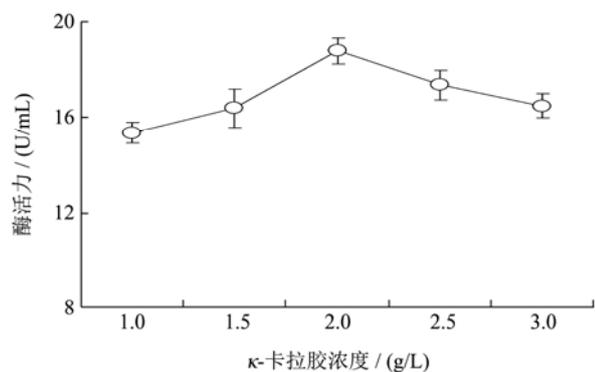


图 4 卡拉胶浓度对酶活力的影响

Fig.4 The effects of carrageenan concentration on the enzyme activity

由图 4 可知，随着卡拉胶浓度的提高，酶活力也随之增加，在卡拉胶浓度为 2.00 g/L 时，酶活力达到最大值 18.78 U/mL，随后开始下降。随着卡拉胶浓度的上升，酶活力先升后降，可能是由于卡拉胶浓度较低，不利于海洋细菌的生长及其产酶，但过高的底物浓度又会对酶活产生抑制作用。

2.2.3 氮源的影响

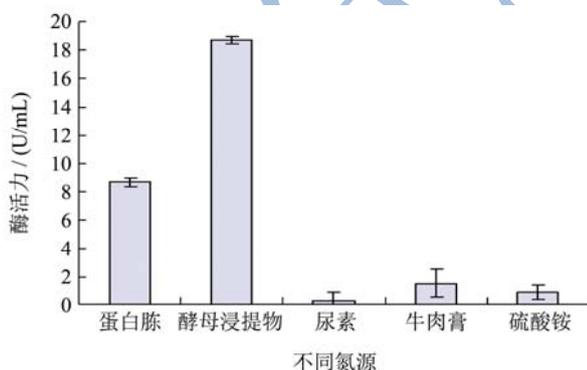


图 5 氮源种类对酶活力的影响

Fig.5 The effects of different nitrogen sources on the enzyme activity

氮源主要用于构成菌体细胞物质如氨基酸、蛋白

质、核酸等和含氮代谢物。氮是构成微生物细胞中核酸和蛋白质的重要元素。分别选择蛋白胨、酵母浸提物、尿素、牛肉膏和硫酸铵为氮源，将以上氮源按 3.00 g/L 蛋白胨氮含量的添加量加入到无氮培养基中。采用不同氮源培养基的酶活力如图 5 所示。由图 5 可知，不同氮源对酶活力有较大的影响，在以酵母浸提物为氮源的培养基上，酶活力最高达到 18.72 U/mL，五种不同氮源对酶活力影响由大到小排列为：酵母浸提物>蛋白胨>牛肉膏>硫酸铵>尿素。

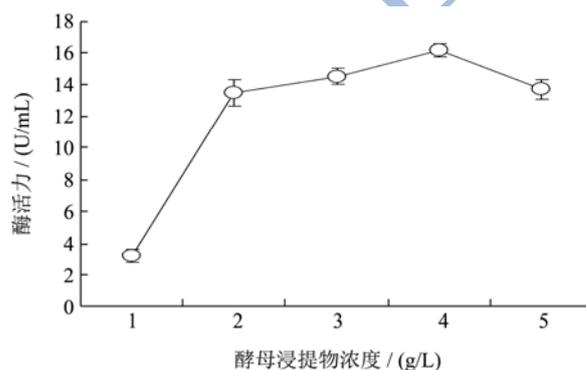


图 6 酵母浸提物浓度对酶活力的影响

Fig.6 The effects of yeast extract concentration on the enzyme activity

由图 6 可知，随着酵母浸提物浓度的提高，酶活力也随之增加，在酵母浸提物浓度为 4.00 g/L 时，酶活力最大为 16.15 U/mL，随后开始下降。

2.2.4 初始 pH 的影响

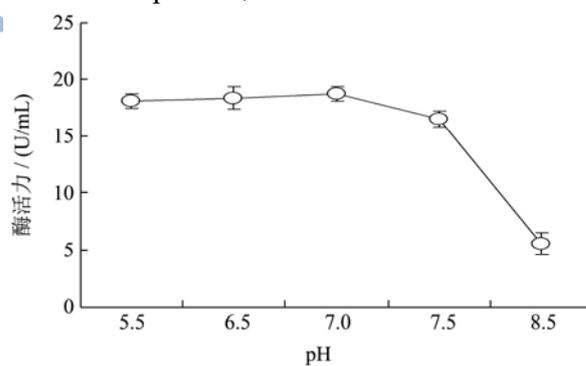


图 7 pH 对酶活力的影响

Fig.7 The effects of pH on the enzyme activity

初始 pH 值对菌株 *Pedobacter* sp. NJ-02 产酶的酶活力影响如图 7 所示，海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02 在初始 pH 值为 7.00 时，酶活力最大为 18.69 U/mL。

2.2.5 接种量的影响

接种量对海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02 产酶的酶活力影响如图 8 所示，海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02

在接种量为 5.0% 时，酶活力最大为 18.72 U/mL。

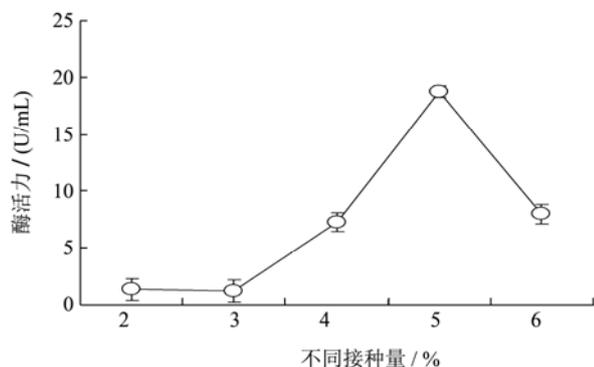


图 8 接种量对酶活力的影响

Fig.8 The effects of inoculum amount on the enzyme activity

2.2.6 通过响应面实验优化的培养基组分

上述单因素实验结果表明，最佳培养基组分为：卡拉胶 2.00 g/L、酵母浸提物 4.00 g/L、pH 7.00。在此基础上，设计响应面实验，30 °C、150 r/min 条件下培养 40 h。响应面实验设计与结果如表 3 所示。

模拟方程为：

$$y = -91.86784 + 16.08985x_1 + 5.79589x_2 + 0.7475x_1x_2 - 0.27235x_1x_3 - 0.018625x_2x_3 - 4.043x_1^2 - 0.08645x_2^2 - 1.56384x_3^2$$

其中 y 为酶活力， x_1 、 x_2 和 x_3 分别为卡拉胶浓度 (g/L)、酵母浸提物浓度 (g/L)、pH。

由表 4 可知，二次回归模型的 $p < 0.0001$ ，表明该模型回归非常显著 ($p < 0.01$)；失拟项 $p = 0.0556 > 0.5$ ，表明实验误差小，相关系数 $R^2 = 98.18\%$ ，校正系数 $R_{Adj}^2 = 95.84\%$ ，说明该模型能很好拟合实验结果。

表 3 响应面实验结果

Table 3 The results of response surface experiment

编号	卡拉胶浓度/(g/L)	酵母浸提物浓度/(g/L)	pH	酶活/(U/mL)
1	1.00	4.00	9.00	9.05
2	1.00	2.00	7.00	10.02
3	2.00	4.00	7.00	18.78
4	3.00	4.00	9.00	8.77
5	2.00	4.00	7.00	17.60
6	3.00	6.00	7.00	15.65
7	3.00	4.00	5.00	8.98
8	2.00	4.00	7.00	18.55
9	1.00	6.00	7.00	9.46
10	2.00	2.00	9.00	9.79
11	3.00	2.00	7.00	10.23
12	2.00	4.00	7.00	18.85
13	2.00	4.00	7.00	18.68
14	1.00	4.00	5.00	7.09
15	2.00	2.00	5.00	7.79
16	2.00	6.00	9.00	10.32
17	2.00	6.00	5.00	8.62

表 4 回归与方差分析

Table 4 Regression and variance analysis

因素	平方和	自由度	均方	F 值	p
x_1	8.02	1	8.02	55.74	< 0.0001
x_2	4.88	1	4.88	10.78	0.0134
x_3	3.71	1	3.71	4.37	0.0750
x_1x_2	8.94	1	8.94	5.02	0.0601
x_1x_3	1.19	1	1.19	12.01	0.0105
x_2x_3	0.022	1	0.022	0.032	0.8637
x_1^2	64.14	1	64.14	75.58	< 0.0001
x_2^2	44.36	1	44.36	52.27	< 0.0001

转下页

接上页

x_3^2	157.46	1	157.46	185.55	< 0.0001
回归	320.78	9	35.64	42.00	< 0.0001
剩余	5.94	7	0.85		
失拟	4.88	3	1.63	6.17	0.0556
总和	326.72	16			

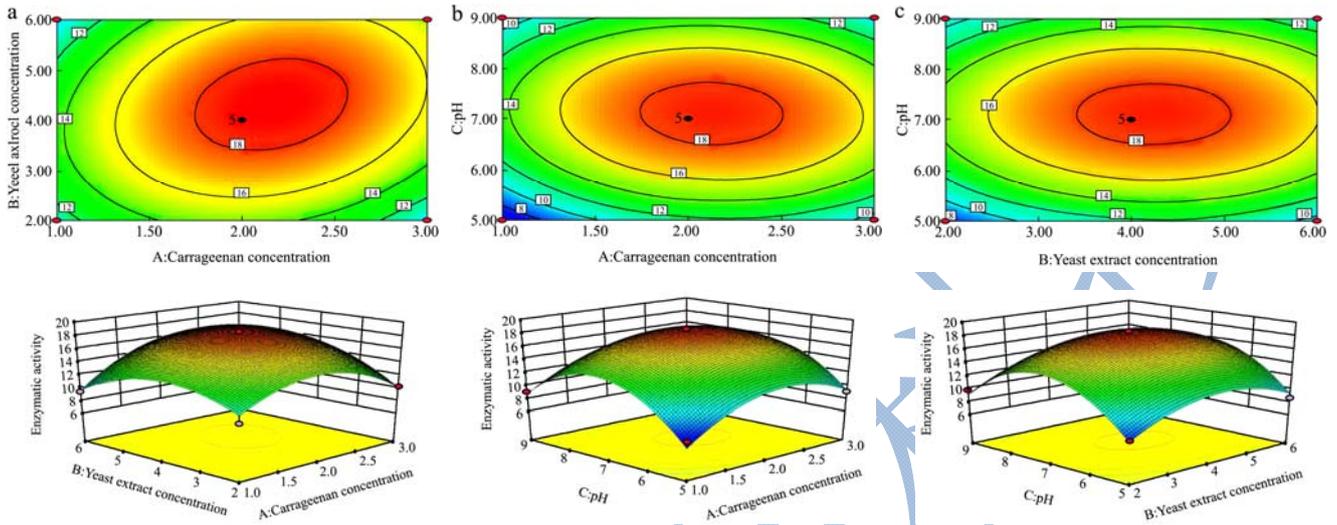


图9 κ -卡拉胶、酵母浸提物浓度及 pH 对酶活力的响应面分析

Fig.9 The response surface analysis of the concentration of κ -carrageenan, yeast extract and pH on the enzymatic activity

图9为各因素交互作用对生物量的影响，从响应面的最高点可以看出在所选范围内存在极值。将二次回归方程分别对 x_1 , x_2 , x_3 进行求导，令导数等于0，得出3个因素的最佳值为：卡拉胶浓度 2.15 g/L、酵母浸提物 4.32 g/L、pH 7.10。预测酶活力为 18.64 U/mL。在响应面法优化的最佳条件下进行三次平行验证试验，得到的生物量平均值为 19.01 U/mL。预测值与实际测量值基本一致，表明回归方程成立。

2.2.7 温度的影响

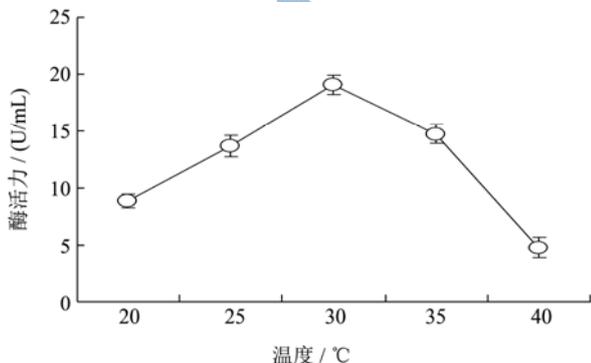


图10 不同温度对酶活力的影响

Fig.10 The effects of different temperatures on the enzymatic activity

温度对海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02 生产 κ -卡拉胶酶的酶活力的影响如图10所示。当温度为 20~30 °C 时，酶活力随着温度的升高而增大，在温度为 30 °C 时，

酶活力最大值为 19.04 U/mL。当温度继续增加时，酶活力降低。

2.2.8 转速的影响

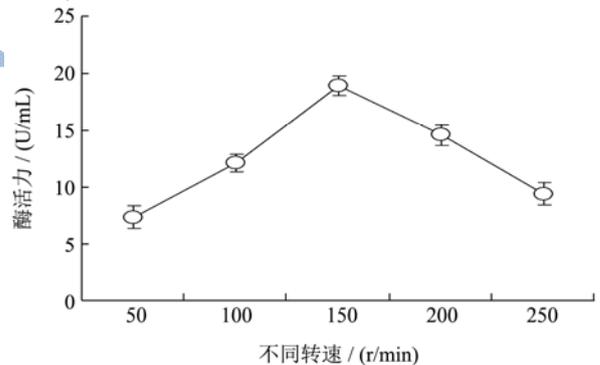


图11 不同转速对酶活力的影响

Fig.11 The effects of different rotation speeds of the enzyme activity

转速对海洋细菌 *Pedobacter* sp. NJ-02 生产 κ -卡拉胶酶的酶活力的影响如图11所示。当转速为 50~150 r/min 时，酶活力随着转速的升高而增大，在转速为 150 r/min 时，酶活力最大值为 18.96 U/mL。当转速继续增加时，酶活力降低。

3 结论

本研究通过初筛、复筛选出一株卡拉胶降解能力强的菌株 NJ-02。通过 16S rRNA 基因测序和系统进化

树的构建,表明菌株 NJ-02 与 *Pedobacter* sp. 农杆菌属属进化关系较近,序列相似性 99%, 鉴定为农杆菌属 *Pedobacter* sp., 并将其命名为 *Pedobacter* sp. NJ-02。单因素实验结果表明,最佳碳源和氮源分别为 κ -卡拉胶浓度和酵母浸提物浓度, κ -卡拉胶浓度、酵母浸提物浓度、温度和 pH 对酶活力有较大影响; 响应面实验结果表明, κ -卡拉胶浓度的最佳浓度为 2.15 g/L、酵母浸提物浓度的最佳浓度为 4.32 g/L、pH 为 7.10; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, NaCl 20.00 g/L, 无机盐母液 100 mL, 水 900 mL, 在 30 °C、150 r/min 条件下摇瓶培养 40 h, 得到最大酶活力为 19.01 U/mL。

参考文献

- [1] Barbeyron T, Michel G, Potin P, et al. κ -carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ -carrageenases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(45): 35499-505
- [2] Zablackis E, Vreeland V, Kloareg B. Isolation of protoplasts from *Kappaphycus alvarezii* var. tambalang (Rhodophyta) and secretion of i-carrageenan fragments by cultured cells [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44(9):1515-1522
- [3] Reddy C R K, Gupta M K, Mantri V A, et al. Seaweed protoplasts: Status, biotechnological perspectives and needs [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(5):619-632
- [4] Lemonnier-Le P C, Chatelet C, Kloareg B, et al. Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica* [J]. *Plant Science*, 2001, 160(6): 1211-1220
- [5] Guibet M, Mazoyer B J. Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(1): 408-415
- [6] Collén P N, Lemoine M, Daniellou R, et al. Enzymatic degradation of κ -carrageenan in aqueous solution [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7): 1757-67
- [7] Kang S, Kim J K. Reuse of red seaweed waste by a novel bacterium, *Bacillus* sp. SYR4 isolated from a sandbar [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(1): 209-217
- [8] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov. and proposal of two [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(4): 755-761
- [9] Khambhaty Y, Mody K, kha B, et al. Statistical optimization of medium components for κ -carrageenase production by *Pseudomonas elongate* [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2007, 40(4): 813-822
- [10] Weigl J, Yaphe W. The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a κ -carrageenase [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 12(5): 939-947
- [11] Khambhaty Y, Mody, Jha B, et al. Statistical optimization of medium components for κ -carrageenase production by *Pseudomonas elongate* [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2007, 40(4): 813-822
- [12] Sarwar G, Sakata T, Kakimoto D. Carrageenase from marine *Cytophaga*. I. The production and characteristics of carrageenase from marine *Cytophaga* [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1983, 49(11): 1689-1694
- [13] Araki T, Hayakawa M, Lu Z, et al. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303 [J]. *Marine Biotechnology*, 1999, 6(4): 260-265
- [14] Barbeyron T, L Haridon S, Corre E, et al. *Zobellia galactanovorans* gen. nov. sp. nov. a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen.nov.comb.nov [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(51): 985-97
- [15] 段高飞,苏贝,韩峰,等.海洋细菌 QY202 产 κ -卡拉胶酶的分 离纯化和性质研究[J].中国海洋大学学报:自然科学版, 2010,40(3):95-100
DUAN Gao-fei, SU Bei, Han Feng, et al. Isolation, purification and characterization of κ -carrageenan enzyme from marine strain QY202 [J]. *Journal of Ocean University of China: Natural Science Edition*, 2010, 40(3): 95-100
- [16] 唐志红,吕家森,张振,等.产卡拉胶酶海洋菌株的筛选和酶 学性质的初步研究[J].食品科技,2011,36(6):18-21
TANG Zhi-hong, LV Jia-sen, ZHANG Zhen, et al. Screening of marine bacterium producing carrageenan and its enzymatic properties [J]. *Food Science*, 2011, 36(6): 18-21
- [17] 古铮.海洋卡拉胶降解菌 *Cellulophaga* sp.KL-A 的筛选优 化及卡拉胶酶研究[D].厦门:厦门大学,2014
GU Zheng. Screening of the carrageenan hydrolyzing marine bacterium *Cellulophaga* sp. KL-A, carrageenase characterization and production optimization [D]. Xiamen: Xiamen University, 2014