

研究报告

潮滩发光杆菌中关键海藻酸裂解酶 AlgPg1 的挖掘及其对裙带菜的降解

阙乃猛，张海龙，李洁，黄金枝，王楠，彭惠*

安徽大学 生命科学学院 生物催化与现代生物制造安徽省重点实验室，安徽 合肥 230039

阙乃猛，张海龙，李洁，黄金枝，王楠，彭惠. 潮滩发光杆菌中关键海藻酸裂解酶 AlgPg1 的挖掘及其对裙带菜的降解[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2046-2058.

KAN Naimeng, ZHANG Hailong, LI Jie, HUANG Jinzhi, WANG Nan, PENG Hui. Alginase lyases from *Photobacterium gaetbulicola*: screening and application in degrading *Undaria pinnatifida*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2046-2058.

摘要：【背景】裙带菜是大型食用褐藻，含有丰富的海藻酸盐，是制备海藻酸寡糖(alginate oligosaccharide, AOS)的优良原料之一。酶法制备 AOS 的用酶是海藻酸裂解酶(alginate lyase, EC 4.2.2.-)，但是现有酶的降解效率偏低，难以对褐藻直接降解。【目的】挖掘和筛选海洋细菌潮滩发光杆菌(*Photobacterium gaetbulicola*)中的海藻酸裂解酶，并将其应用于裙带菜直接降解生产 AOS。【方法】结合序列分析、差异表达量测定、蛋白重组表达和催化性质鉴定，从潮滩发光杆菌 Gung47 中筛选活性较高的海藻酸裂解酶，优化其直接降解裙带菜的反应条件，并鉴定降解产物 AOS 的成分。【结果】潮滩发光杆菌 Gung47 中有 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 这 3 个海藻酸裂解酶。AlgPg1 差异表达水平和比酶活都最高，是菌株利用海藻酸钠或裙带菜的关键酶。在 NaCl 条件下 AlgPg1 的比酶活达到 466 U/mg。AlgPg1 能直接降解裙带菜粉末和叶片，还原糖产量达到(26.2±1.6) mg/mL，即转化率为 32.5%。裙带菜的降解产物是聚合度(degree of polymerization, DP) 1–6 的混合寡糖，DP3 含量最高。【结论】海藻酸裂解酶 AlgPg1 能有效地直接降解裙带菜产生 AOS，为裙带菜的资源开发提供了新的工具。

关键词：裙带菜；海藻酸裂解酶；盐离子激活；海藻酸寡糖

资助项目：国家自然科学基金(32170137)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170137).

*Corresponding author. E-mail: penghui@ahu.edu.cn

Received: 2024-09-06; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-12-16

Alginate lyases from *Photobacterium gaetbulicola*: screening and application in degrading *Undaria pinnatifida*

KAN Naimeng, ZHANG Hailong, LI Jie, HUANG Jinzhi, WANG Nan, PENG Hui*

Anhui Key Laboratory of Biocatalysis and Modern Biomanufacturing, School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

Abstract: [Background] *Undaria pinnatifida*, a species of edible brown algae, is considered as an excellent raw material for the preparation of alginate oligosaccharides (AOSs) due to the high content of intracellular alginate. Alginate lyases (EC 4.2.2.-) can depolymerize alginate into AOSs. However, the low catalytic efficiency makes it difficult to produce AOSs from brown algae by directly enzymatic degradation. [Objective] To mine and screen alginate lyases from the marine bacterium *Photobacterium gaetbulicola* for degrading *U. pinnatifida* in the production of AOSs. [Methods] Alginate lyases with high activities were screened from *P. gaetbulicola* Gung47 by sequence analysis, transcriptional analysis, recombinant expression, and enzymatic characterization. The degrading conditions for *U. pinnatifida* were optimized, and the final products were identified. [Results] Three alginate lyases (AlgPg1, AlgPg2, and AlgPg3) were identified from *P. gaetbulicola* Gung47. Both the transcription level and the specific activity of AlgPg1 were higher than those of AlgPg2 and AlgPg3. The specific activity of AlgPg1 was enhanced by NaCl, reaching up to 466 U/mg. AlgPg1 degraded the powder and blades of *U. pinnatifida*, producing reducing sugar at a yield of (26.2 ± 1.6) mg/mL, i.e., AOSs conversion ratio of 32.5%. The degradation products were a mixture of AOSs with the degree of polymerization (DP) ranging from 1 to 6, in which DP3 had the highest content. [Conclusion] The alginate lyase AlgPg1 showed a remarkable ability of producing AOSs from *U. pinnatifida*, demonstrating the potential of serving as a novel tool for the utilization of *U. pinnatifida*.

Keywords: *Undaria pinnatifida*; alginate lyase; Salt ion activation; alginate oligosaccharide

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)是一种口味极佳的大型食用海藻，属褐藻门。我国裙带菜的产量已经超过 20 万 t，成为仅次于海带(*Laminaria japonica*)的第二大海洋经济褐藻^[1]。目前裙带菜的主要利用方式是直接食用，比较单一。裙带菜中含有丰富的多糖，高效开发利用这些多糖，对提高裙带菜的经济价值具有重要意义。

海藻酸盐(又名褐藻胶，alginate)是一种线性大分子多糖，在裙带菜中的含量可高达干重的 20%–40%^[2]。海藻酸盐的降解产物是不饱和的海藻酸寡糖(alginate oligosaccharide, AOS)，

其聚合度(degree of polymerization, DP)在 2–20。低分子量的 AOS 不仅在水中的溶解度大大增加，而且显示出抗炎症、抗病毒、降血糖和抗氧化等生物活性，在医药领域具有广阔的应用前景^[3-4]。

传统的 AOS 生产工艺分 2 个步骤：第 1 步，用化学法提取褐藻中的海藻酸盐；第 2 步，用盐酸水解海藻酸盐^[5]。此外，还有利用碱、H₂O₂、γ 射线、超声波等降解海藻酸盐生产 AOS 的报道^[3,6]。这些工艺都存在环境污染、提取效率低、产品的组成不稳定等缺点。酶法降解海藻酸盐具有条件温和、特异性强的优点，近年来，酶

法制备 AOS 的研究成为热点。

海藻酸裂解酶(alginate lyase, EC 4.2.2.-)属于多糖裂解酶家族(polysaccharide lyases, PLs)，是一类可以降解海藻酸盐的酶，通过 β 消除机制促使海藻酸盐中的糖键断裂，形成寡糖 AOS。海藻酸裂解酶有 2 种分类方式，根据底物特异性划分为 3 种，即多聚甘露糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.3)、多聚古罗糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.11)和能裂解这 2 种底物的双功能裂解酶；根据催化方式分为内切酶和外切酶。内切酶是从内部随机切断糖链，形成不同 DP 的 AOS；而外切酶是从糖链末端切割，产物仅为单糖或二糖。因此，AOS 的酶法生产用酶主要是外切酶^[7]。海藻酸裂解酶来源广泛，比如海洋藻类、海洋软体动物、细菌、真菌和病毒；研究较多的集中于海洋细菌假单胞菌属(*Pseudomonas*)和弧菌属(*Vibrio*)^[8]。由于已知的海藻酸裂解酶的酶活普遍较低，而且作为胞内多糖的海藻酸盐的黏度很高，所以直接酶解褐藻生产 AOS 的报道较少^[4]。目前仅有少量研究利用海藻酸裂解酶直接降解海带粉末^[9-12]。裙带菜的直接酶解研究则更少。2020 年 Xu 等^[13]报道希瓦氏菌(*Shewanella* sp.) pka 1008 的胞外粗酶液中有海藻酸裂解酶活力，该粗酶能微弱地直接降解裙带菜。2023 年 Jiang 等^[5]首次报道了一个纯化的海藻酸裂解酶 VfAly7 能有效地直接降解裙带菜。

发光杆菌属(*Photobacterium*)细菌是表层海水中含量最高的一类细菌^[14]。潮滩发光杆菌(*P. gaetbulicola*) Gung47 的基因组中含有 136 个 CAZy 酶基因，明显多于 CAZy 数据库中其他的发光杆菌属细菌。菌株 Gung47 能高效利用海藻酸钠或裙带菜生长。因此，本研究对该菌株中的海藻酸裂解酶进行了挖掘和筛选。通过序列分析和差异表达测定，挖掘潜在的海藻酸裂解酶；通过蛋白重组表达和酶学性质鉴定，筛选优质的海藻酸裂解酶，并评估其降解裙带菜的能力，以期为裙带菜的资源利用提供新酶资源。

1 材料与方法

1.1 样品

潮滩发光杆菌 Gung47，韩国菌种保藏中心(Korean Collection for Type Cultures, KCTC，编号 22804)。大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，生工生物工程(上海)股份有限公司。载体 pET-28a(+)由本实验室保存。裙带菜、海带、马尾藻(*Sargassum horneri*)、羊栖菜(*Hizikia fusiforme*)、龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)、石花菜(*Gelidium amansii*)和蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*)购自本地市场，低温烘干后研磨为干粉。

1.2 培养基

大肠杆菌用 LB 培养基培养。潮滩发光杆菌的培养基是以 2216 海洋培养基为基础改造的极简培养基(g/L): 蛋白胨 0.050 0、酵母提取物 0.020 0, NaCl 19.450 0, MgCl₂ 8.800 0, (NH₄)₂SO₄ 5.000 0, Na₂SO₄ 3.240 0, KCl 0.550 0, NaHCO₃ 0.160 0, Ferric citrate 0.100 0, KBr 0.080 0, SrCl₂ 0.057 0, H₃BO₃ 0.022 0, Na₂HPO₄ 0.020 0, Na₂SiO₃ 0.004 0, NaF 0.002 4, pH 7.6。添加的海藻酸钠或裙带菜叶片浓度为 5 g/L。

1.3 主要试剂和仪器

海藻酸钠、细菌基因组抽提试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司；PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶，宝日生物医药技术(北京)有限公司。T100™ Thermal Cycler PCR 仪，伯乐生命医学产品(上海)有限公司；超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；紫外/可见分光光度计，北京北分瑞利分析仪器有限责任公司；超高效液相色谱仪串联质谱仪，Waters 公司。

1.4 潮滩发光杆菌 Gung47 的培养

潮滩发光杆菌按 1% 接种量分别接种于添加了 5 g/L 海藻酸钠和未添加海藻酸钠的极简培养基，以未添加海藻酸钠的极简培养基为对照组。在 30 °C、180 r/min 条件下培养 48 h。

以海藻酸钠为主要碳源的培养期间，在4、8、10、14、18、20、24、28、32、36、40、44、48 h 取样测定菌液的 *OD*₆₀₀，绘制生长曲线。以裙带菜叶片为主要碳源的培养期间，在同样时间点取样观察叶片外观变化。同时，对上述定时取样的发酵液进行4 °C、12 000 r/min 离心15 min，直接测定上清液中的酶活。

1.5 转录组测序和基因相对表达量测定

潮滩发光杆菌分别在极简培养基和添加5 g/L 海藻酸钠培养基中30 °C、180 r/min 培养24 h，收集细胞。细胞送上海派森诺生物科技股份有限公司进行RNA的抽提和转录组测序。采用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 测定基因的相对表达量。细胞送生工生物工程(上海)股份有限公司完成引物设计、RNA 提取和 RT-qPCR 扩增。16S rRNA 为内参基因。利用Primer Premier 5.0软件设计 *AlgPg1* 正向引物(5'-ATTGAAC TGACAGCGGATGG-3') 和反向引物(5'-CTAGGCTATCCAAGGTGATGTCA-3')、*AlgPg2* 正向引物(5'-TTTGCCGCTCCA GTGTTT-3') 和反向引物(5'-GCCTCCTTGTG CCGTAT-3')、*AlgPg3* 正向引物(5'-TGC GATGG A CTTTGTGGC-3') 和反向引物(5'-GCTGCTTAAC CGTTGGGAC-3')。Trizol 抽提 RNA，RNA 经反转录得到 cDNA。上述3组基因的 RT-qPCR 反应体系：正向引物和反向引物(10 μmol/L)各0.4 μL，cDNA 模板(200 ng/μL) 2 μL，2×SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL，ddH₂O 补足20 μL。PCR 反应条件：95 °C 3 min；95 °C 15 s，60 °C 30 s，45个循环。

1.6 *AlgPg1*、*AlgPg2*、*AlgPg3* 和 *AlyPB1* 的克隆、表达和纯化

根据NCBI数据库公布的菌株Gung47基因组中的 *AlgPg1* (GenBank 登录号 AJR06654)、*AlgPg2* (GenBank 登录号 AJR06655)和 *AlgPg3* (GenBank 登录号 AJR05271)设计引物。*AlgPg1* 的正向引物为 5'-CCGGAATTCACTTCGCCGA CGCCG-3' (下划线为 *EcoR I* 酶切位点)；反向引

物为 5'-CCGCTCGAGGCCTCGGTGCCTCTT-3' (下划线为 *Xho I* 酶切位点)。*AlgPg2* 的正向引物为 5'-CGCGAATTCCTAGACGGTACGCCAAGC-3' (下划线为 *BamH I* 酶切位点)；反向引物为 5'-CCGCTCGAGCAGTTTGGATACAGCAG-3' (下划线为 *Xho I* 酶切位点)。*AlgPg3* 的正向引物为 5'-CCGGAATTCATGAGCAACCAAAGTCT CTTG-3' (下划线为 *EcoR I* 酶切位点)；反向引物为 5'-CCGCTCGAGCAGCTCGATAGTGACCGT TTC-3' (下划线为 *Xho I* 酶切位点)。用细菌基因组抽提试剂盒抽提潮滩发光杆菌 Gung47 的基因组为模板。PCR 反应体系：2×PrimeSTAR Max Premix 25 μL，正向引物和反向引物(10 μmol/L)各 1.5 μL，模板(200 ng/μL) 1 μL，ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件：98 °C 3 min；98 °C 10 s，55 °C 15 s，72 °C 90 s，30 个循环；72 °C 10 min。用每组引物对应的限制性内切酶分别对目标基因和 pET-28a(+)载体双酶切，然后连接并转化大肠杆菌 BL21(DE3)，重组子测序验证。重组菌株用 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导12 h 后，收集菌体，经超声破壁(350 W，工作6 s，间歇2 s，工作30 min)后4 °C、12 000 r/min 离心10 min 得粗酶液。粗酶液经过 Ni-NTA 亲和层析纯化得到重组的纯蛋白，用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测蛋白纯度。纯化的蛋白保存在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中。

发光杆菌 FC615 来源的海藻酸裂解酶 *AlyPB1* 的基因编号为 MN116685，蛋白编号为 QGJ83311^[15]，委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因合成并克隆在 pET-22a 载体上。测序验证正确后，按照上述方法进行诱导表达和蛋白纯化。

1.7 酶活力的测定

海藻酸裂解酶的活性测定：一个标准反应体系包括 10 μL 适当稀释的纯酶液，590 μL 含 30 mg/mL 海藻酸钠的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。

30 °C反应 10 min 后加入 300 μL 二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)试剂终止反应，100 °C加热 15 min。室温下 540 nm 处测量吸光值，计算酶活。一个标准酶活(U)定义为在测量条件下每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量，使用不同浓度葡萄糖做标准曲线^[5,12,15-17]。蛋白浓度采用 Bradford 法测定，以不同浓度牛血清白蛋白做标准曲线。

1.8 酶学性质

在 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液下测定温度对酶活性的影响，温度范围为 20–45 °C，间隔区间为 5 °C。在 30 °C 测定不同 pH 值对酶活性的影响，缓冲液为 Tris-HCl 缓冲液(pH 6.5–9.0)，间隔区间为 0.5。盐对酶活性的影响是在反应体系中添加终浓度为 0–800 mmol/L 的 NaCl，间隔区间为 100 mmol/L。最适反应条件测试中，测得的最高值定义为 100%；NaCl 浓度影响测试中，未添加 NaCl 的酶活定义为 100%。

酶动力学是分别在未添加和添加了 200 mmol/L NaCl 条件下测试不同海藻酸钠底物浓度(1–30 mg/mL)时的酶活。使用 Origin 9.0 的非线性回归分析计算 AlgPg1 和 AlgPg2 的米氏常数 K_m 和催化效率 k_{cat}/K_m 。

1.9 酶对各种海洋藻类粉末的降解

在 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中测试了 AlgPg1 和 AlyPB1 对 7 种海洋藻类的降解能力。反应体系中含 80 mg/mL 的裙带菜粉末(或其他海洋藻类粉末)、200 mmol/L (AlgPg1)或 600 mmol/L (AlyPB1) 的 NaCl 和 200 U/mL 的酶液；添加 0.2% 的甲苯防止可能的微生物污染。水浴摇床 35 °C、150 r/min 孵育 12 h 后，将酶解液在 12 000 r/min 离心 15 min 以去除残留的海藻粉末。收集上清液，采用 DNS 法测定藻类粉末降解后释放出的还原糖的量。

1.10 AlgPg1 对裙带菜的降解

AlgPg1 对裙带菜粉末的降解条件优化在 Tris-HCl 缓冲液中进行，添加 0.2% 的甲苯防止可能的微生物污染。分别对温度(20–45 °C)、pH (6.5–9.0)、降解时间(0–15 h)、底物浓度

(0–120 mg/mL)、加酶量(10–200 U/mL)和 NaCl 浓度(0–700 mmol/L)进行优化。酶解液 12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液，采用 DNS 法测定底物降解后释放出的还原糖的量。

裙带菜叶片剪成约 1 cm 的方形小片，按照上述条件进行降解。

1.11 AlgPg1 降解裙带菜的产物分析

采用超高效液相色谱仪串联质谱仪(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)分析 AlgPg1 对裙带菜粉末的降解产物。色谱柱为 Waters ACQUITY BEH C18 柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)。流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液。梯度洗脱：0–1 min 2% A；1–2 min 3% A；2–3 min 4% A；3–5 min 5% A；5–8 min 10% A；8–12 min 20% A；12–15 min 80% A。流速 0.3 mL/min。柱温 40 °C。质谱条件：电喷雾离子源，离子源温度 100 °C，锥孔电压 30 kV，毛细管电压 3.5 kV，锥孔气流量 50 L/h，质量扫描范围 20–2 000 m/z 。

2 结果与分析

2.1 潮滩发光杆菌对海藻酸钠和裙带菜的利用

以海藻酸钠为主要碳源培养潮滩发光杆菌 Gung47，菌株生长良好(图 1A)。相较于极简培养基的对照组，菌株接种后快速进入对数生长期，28 h 时菌体 OD 值达到最高；随后，菌体浓度降低进入衰亡期。菌液中海藻酸钠裂解酶的总酶活与生长曲线基本吻合，24 h 时酶活达到最高，为(266.3±3.7) U/mL。

裙带菜的叶厚区间为 0.15–0.45 mm，将叶片剪成 5 mm 边长的小方片。潮滩发光杆菌也能利用裙带菜叶片为主要碳源生长。培养 10 h 叶片的上下表皮之间的髓部出现明显的分解，表皮全部分散在菌液中，不再有完整的叶片；24 h 叶片被降解成小的颗粒；48 h 颗粒物明显减少(图 1B)。菌液中海藻酸钠裂解酶的最高酶活为(244.5±4.9) U/mL。

2.2 潮滩发光杆菌中不同海藻酸裂解酶的序列分析和转录水平

潮滩发光杆菌 Gung47 的全基因组信息于 2010 年公布于 NCBI 数据库。根据 CAZy 数据库的

注释，有 2 个蛋白 (AlgPg1 和 AlgPg3) 注释为海藻酸裂解酶；4 个蛋白 (AlgPg2、AlgPg4/AJR06662、AlgPg5/AJR06663 和 AlgPg6/AJR06638) 注释为含有海藻酸裂解酶结构域的蛋白 (表 1)。

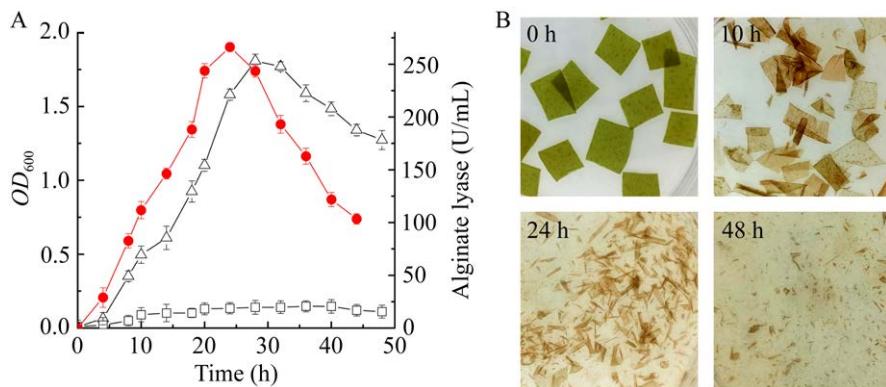


图 1 以海藻酸钠(A)和裙带菜叶片(B)为碳源培养潮滩发光杆菌 Gung47 发酵液中的海藻酸裂解酶活(●)，添加 5 g/L 海藻酸钠的菌株生长曲线(△)，未添加海藻酸钠的菌株生长曲线(□)。

Figure 1 Growth of *Photobacterium gaetbulicola* Gung47 with alginate (A) and *Undaria pinnatifida* blades (B) as the main carbon source. Alginate lyase activity in fermentation broth (●), growth curve of the strain supplemented with 5 g/L sodium alginate (△), growth curve of strains without sodium alginate addition (□).

表 1 转录组测序和 RT-qPCR 验证 6 个海藻酸裂解酶或含有海藻酸裂解酶结构域的蛋白

Table 1 Six alginate lyases and alginate lyase domain-containing proteins determined by RNA-Seq and RT-qPCR

Protein name	NCBI ID, annotated name	Length (aa)	PL family	Signal peptide (aa)	Most similar sequence		log ₂ fold change (by RNA-Seq)	2 ^{-ΔΔCt} (by RT-qPCR)
					Protein, ID, similarity	Organism		
AlgPg1	AJR06654, alginate lyase	542	PL6	21	Alginate lyase, QGJ83311, 91.7%	<i>Photobacterium</i> sp. FC615 ^[15]	22.92	11.75
AlgPg2	AJR06655, alginate lyase domain-containing protein	418	PL38	22	Alginate lyase, GAD04312, 48.4%	<i>Agarivorans</i> sp. B2Z047 ^[18]	17.51	5.17
AlgPg3	AJR05271, alginate lyase	692	PL15	No	Alginate lyase, QGJ83312, 90.3%	<i>Photobacterium</i> sp. FC615 ^[15]	10.44	3.09
AlgPg4	AJR06662, alginate lyase domain-containing protein	716	PL17	No	Oligoalginic lyase, EAP93063.1, 71.6%	<i>Vibrio</i> sp. 12B01 ^[19]	1.38	/
AlgPg5	AJR06663, alginate lyase domain-containing protein	713	PL17	No	Oligoalginic lyase, UQN45019.1, 65.2%	<i>Agarivorans</i> sp. B2Z047 ^[18]	0.94	/
AlgPg6	AJR06638, alginate lyase domain-containing protein	669	PL17	No	PolyM-specific alginic lyase, ATG71374.1, 15.7%	<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1 ^[20]	0.48	/

/: 未进行 RT-qPCR 验证。

/: RT-qPCR validation was not performed.

AlgPg1 为多糖水解酶 6 家族(polysaccharide lyase family 6, PL6)成员，有信号肽。BLAST 分析结果表明，在文献报道的海藻酸裂解酶中，该蛋白与一个来源于发光杆菌属的 FC615 菌株的海藻酸裂解酶 AlyPB1 序列相似性最高，达到 91.7%^[15]；其次，与弧菌(*Vibrio*) OU02 菌株的海藻酸裂解酶 AlyF 的序列相似性为 60.1%^[21]；与近海单胞菌属(*Thalassomonas*)的菌株 LD5 的海藻酸裂解酶 TsAly6A 的序列相似性为 53.7%^[22]。

AlgPg2 为 PL38 家族成员，有信号肽。目前 PL38 家族只有 2 个海藻酸裂解酶被研究过，分别为食琼脂菌属(*Agarivorans*) sp. B2Z047 的 Aly38A^[18] 和 卵 形 拟 杆 菌 (*Bacteroides ovatus*) 的 BoPL38^[23]。AlgPg2 与这 2 个酶的蛋白序列相似性分别为 48.4% 和 30.6%。

AlgPg3 为 PL15 家族成员，无信号肽。该蛋白与来源于发光杆菌属的菌株 FC615 的海藻酸裂解酶 AlyPB2 序列相似性最高，达到 90.3%^[15]。

为了解这些酶在潮滩发光杆菌利用海藻酸钠生长时的贡献，并筛选到关键的海藻酸裂解酶，本文对潮滩发光杆菌进行了转录组测序。分别在添加了海藻酸钠的培养基和极简培养基

中培养 24 h，收集细胞。转录组测序结果表明，相较于极简培养基中菌株微弱生长的情况，这 6 个基因在添加了海藻酸钠的培养基中都出现了不同程度的上调表达($P < 0.05$)。但是属于 PL17 家族的 3 个蛋白的 \log_2 fold change (FC) 值均低于 1.5，差异表达不显著(表 1)。因此，选择 \log_2 FC 值大于 1.5 的 3 个基因进一步用 RT-qPCR 验证其差异表达水平。RT-qPCR 测定差异转录水平与转录组测序得到的差异转录结果一致，差异表达水平从高到低依次为：AlgPg1>AlgPg2>AlgPg3 (表 1)。

2.3 海藻酸裂解酶 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的重组表达和纯化

根据菌株 Gung47 的基因组中 *AlgPg1*、*AlgPg2* 和 *AlgPg3* 的基因信息，去除掉 N 端的信号肽，设计引物。抽提菌株 Gung47 的基因组，通过 PCR 扩增获得基因。基因插入表达载体 pET-28a(+) 中构建重组质粒，转化大肠杆菌 BL21(DE3)。测序验证基因序列无误。重组蛋白经诱导表达、分离和纯化后，用 SDS-PAGE 检测显示为单一一条带。AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的大小依次与理论分子量 59.6 kDa (图 2A)、45.1 kDa (图 2B) 和 78.9 kDa (图 2C) 相符。

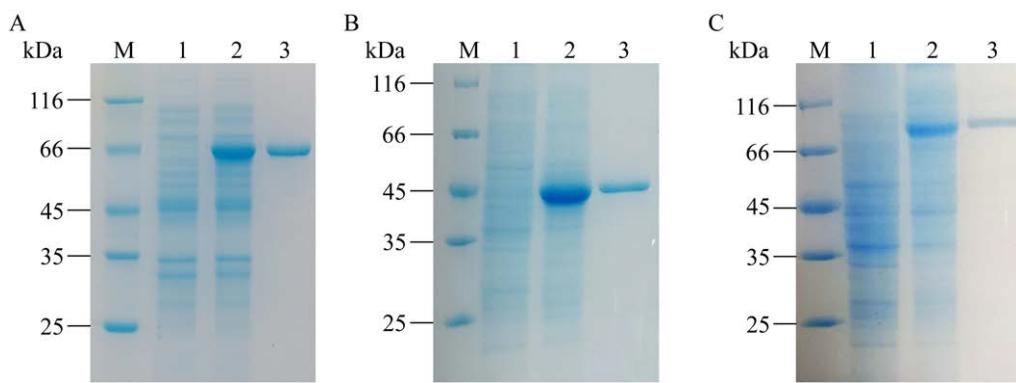


图 2 SDS-PAGE 分析 AlgPg1 (A)、AlgPg2 (B) 和 AlgPg3 (C) 的重组表达和纯化 M: 标准蛋白；1: 含有质粒 pET-28a(+) 的大肠杆菌细胞破碎液；2: 含有质粒 pET-28a-AlgPg1、pET-28a-AlgPg2 或 pET-28a-AlgPg3 的大肠杆菌细胞破碎液；3: 纯化的 AlgPg1、AlgPg2 或 AlgPg3 蛋白。

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant AlgPg1 (A), AlgPg2 (B) and AlgPg3 (C). M: Size marker proteins; 1: The cell lysates of *E. coli* harboring pET-28a(+); 2: The cell lysates of *E. coli* harboring pET-28a-AlgPg1, pET-28a-AlgPg2 or pET-28a-AlgPg3; 3: The purified AlgPg1, AlgPg2 or AlgPg3 protein.

2.4 海藻酸裂解酶 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的酶学性质比较与筛选

以海藻酸钠为底物检测纯化后的海藻酸裂解酶的最适反应条件, 结果表明 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的最适反应温度依次为 30、40 和 20 °C; 最适反应 pH 值依次为 8.0、7.5 和 8.0。这 3 个酶中 AlgPg1 的比酶活最高, 为 (91.2±3.6) U/mg; AlgPg2 的比酶活次之, 为 (21.8±1.4) U/mg。AlgPg3 的比酶活最低, 仅为 (9.5±0.3) U/mg。

由于潮滩发光杆菌为海洋细菌, 并且 AlgPg1 和 AlgPg2 都有信号肽, 为胞外酶, 因此测试了 NaCl 对这 2 个酶的活性影响(图 3)。NaCl 对 AlgPg1 和 AlgPg2 的比酶活都表现出强烈的促进作用。200–400 mmol/L NaCl 浓度范围内, AlgPg1 酶活达到最高(约 466 U/mg), 即酶活增加了 5.1 倍。当 NaCl 浓度继续增加, 酶活出现轻微下降。AlgPg2 的比酶活被提高到最高值(95.1±3.7) U/mg 时需要添加 600 mmol/L NaCl。NaCl 浓度继续增加, 酶活显著下降。

分别在未添加和添加 200 mmol/L NaCl 时测定 AlgPg1 的酶促反应动力学; 在未添加和添加 600 mmol/L NaCl 时, 测定 AlgPg2 的酶促反应动力学(表 2)。对 AlgPg1 而言, NaCl 促使 K_m 值明显下降, 提高酶对底物的亲和力约 2.9 倍; 催化效率(k_{cat}/K_m)则提高了约 11.1 倍。对 AlgPg2 而

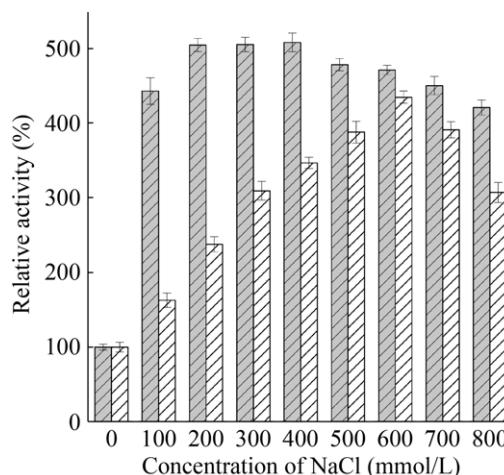


图 3 NaCl 对 AlgPg1 和 AlgPg2 酶活的影响
未添加的酶活定义为 100%。灰色条纹为 AlgPg1; 白色条纹为 AlgPg2。

Figure 3 Effect of NaCl on the AlgPg1 and AlgPg2 activities. The enzymatic activity without NaCl was set as 100%. AlgPg1 and AlgPg2 was marked with gray stripes and white stripes, respectively.

言, NaCl 提高酶对底物的亲和力(K_m 值)约 1.7 倍; 提高催化效率(k_{cat}/K_m)约 6.2 倍。

AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的酶学性质比较如表 2 所示。综合考虑胞外酶 AlgPg1 的酶活最高、反应温度适中, 并且在差异表达中表达水平最高, 所以推测 AlgPg1 是潮滩发光杆菌利用海藻酸钠或裙带菜生长时的关键酶, 进一步考察其应用价值。

表 2 比较和筛选 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 的酶学性质

Table 2 Comparing and Screening the biochemical properties of AlgPg1, AlgPg2 and AlgPg3

Enzyme	AlgPg1	AlgPg2	AlgPg3
最适温度 Optimal temperature (°C)	30.0	40.0	20.0
最适 pH Optimal pH	8.0	7.5	8.0
比酶活 Specific activity (U/mg)			
None	91.2±3.6	21.8±1.4	9.5±0.3
NaCl	466 ^a	95.1 ^b	n.d.
K_m (mg/mL)			
None	2.6	3.2	/
NaCl	0.9 ^a	1.9 ^b	/
k_{cat}/K_m (s/(mg·mL))			
None	48.9	10.3	/
NaCl	544.0 ^a	63.9 ^b	/

^a: NaCl 浓度为 200 mmol/L; ^b: NaCl 浓度为 600 mmol/L; n.d.: 未检测到增加的活性; /: 未测试 NaCl 影响。

^a: NaCl concentration is 200 mmol/L; ^b: NaCl concentration is 600 mmol/L; n.d.: No increased activity detected; /: NaCl effect not tested.

2.5 AlgPg1 和 AlyPB1 对各种海洋藻类粉末的降解

在相同条件下, 检测了 AlgPg1 降解 7 种海洋藻类粉末 12 h 后的还原糖产量, 并与海藻酸裂解酶 AlyPB1 进行了比较, 结果如图 4 所示。AlgPg1 能有效降解 4 种褐藻类的大型藻类(裙带菜、海带、马尾藻和羊栖菜), 而且同潮滩发光杆菌一样, 对裙带菜的降解效果最好, 对马尾藻和羊栖菜的降解效果稍差。对于测试的 3 种红藻(龙须菜、石花菜和蜈蚣藻), AlgPg1 基本不能降解。此外, AlyPB1 对这 7 种海洋藻类的降解偏好性与 AlgPg1 相同, 但是降解能力低于 AlgPg1。

2.6 AlgPg1 降解裙带菜的最适条件和酶活

以酶解裙带菜粉末产生的还原糖产量为标准, 优化了 AlgPg1 对裙带菜的降解条件。相较于海藻酸钠为底物时, 酶的最适反应温度和最

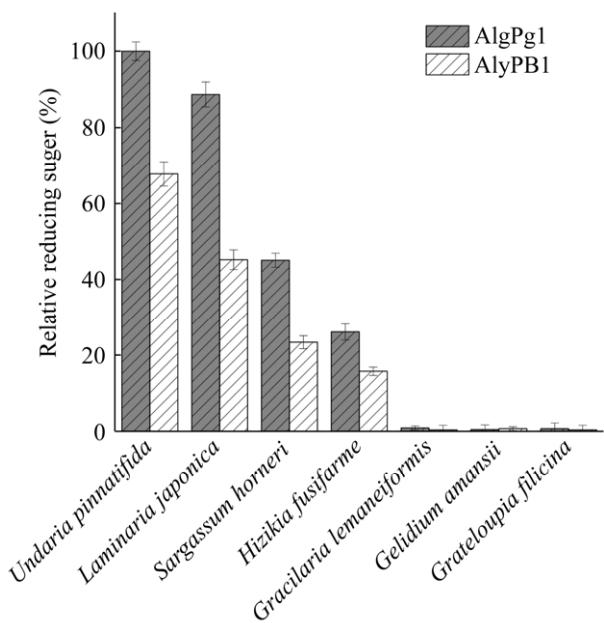


图 4 AlgPg1 和 AlyPB1 对各种海洋藻类的降解
酶 AlgPg1 水解裙带菜的还原糖量定义为 100%。

Figure 4 Degradation of various marine algae by alginate lyases AlgPg1 and AlyPB1. The reducing sugar content of *U. pinnatifida* degradation by AlgPg1 was defined as 100%.

适反应 pH 都发生了偏移, 分别为 35 °C 和 pH 7.5。最适反应时间为 9 h; 裙带菜粉末的最适浓度为 80 mg/mL; 最适加酶量为 140 U/mL; 最适 NaCl 浓度为 200 mmol/L。在最适降解条件下, AlgPg1 降解裙带菜粉末的还原糖产量最高为(26.2±1.6) mg/mL, 即转化率达到 32.5%。

相同条件下, 裙带菜叶片降解前后的形态变化如图 5 所示, 剪成小方片的叶片能在 9 h 内被 AlgPg1 彻底降解为颗粒物。

2.7 AlgPg1 降解裙带菜的产物

对 AlgPg1 降解裙带菜粉末的产物进行了 LC-MS 分析。液相色谱结果显示, 相较于裙带菜底物对照, 酶解产物样品在 2.5 min 之后出现了 2.94、4.97、6.16 和 7.8 min 这 4 个主要的峰(图 6A、6B)。这些峰用质谱进一步分析, 结果显示了 6 个分子离子峰, 其质荷比(m/z)分别为 175、351、527、703、897 和 1 055 m/z , 对应的 AOS 的聚合度分别为 DP1–DP6 (图 6C–6F)。这表明, AlgPg1 降解裙带菜的产物为单糖和 DP2–DP6 的系列寡糖, 其中含量最高的是 DP3, 含量较少的是 DP5 和 DP6。

3 讨论

潮滩发光杆菌 Gung47 能利用海藻酸钠或裙带菜为主要碳源生长, 并且发酵液中有较

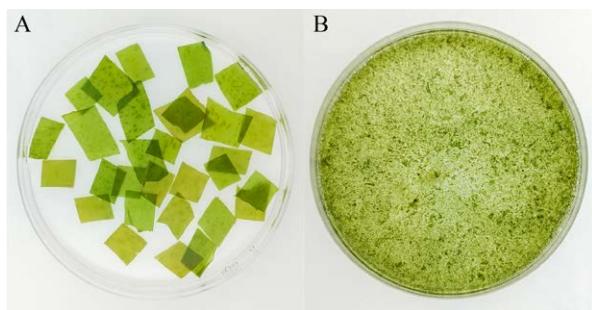


图 5 海藻酸裂解酶 AlgPg1 对裙带菜叶片的降解
A: 裙带菜叶片; B: 最优条件下酶解后的裙带菜。

Figure 5 Degradation of *U. pinnatifida* blade by alginate lyase AlgPg1. A: *U. pinnatifida* blades; B: the blade degradation by AlgPg1 under optimal conditions.

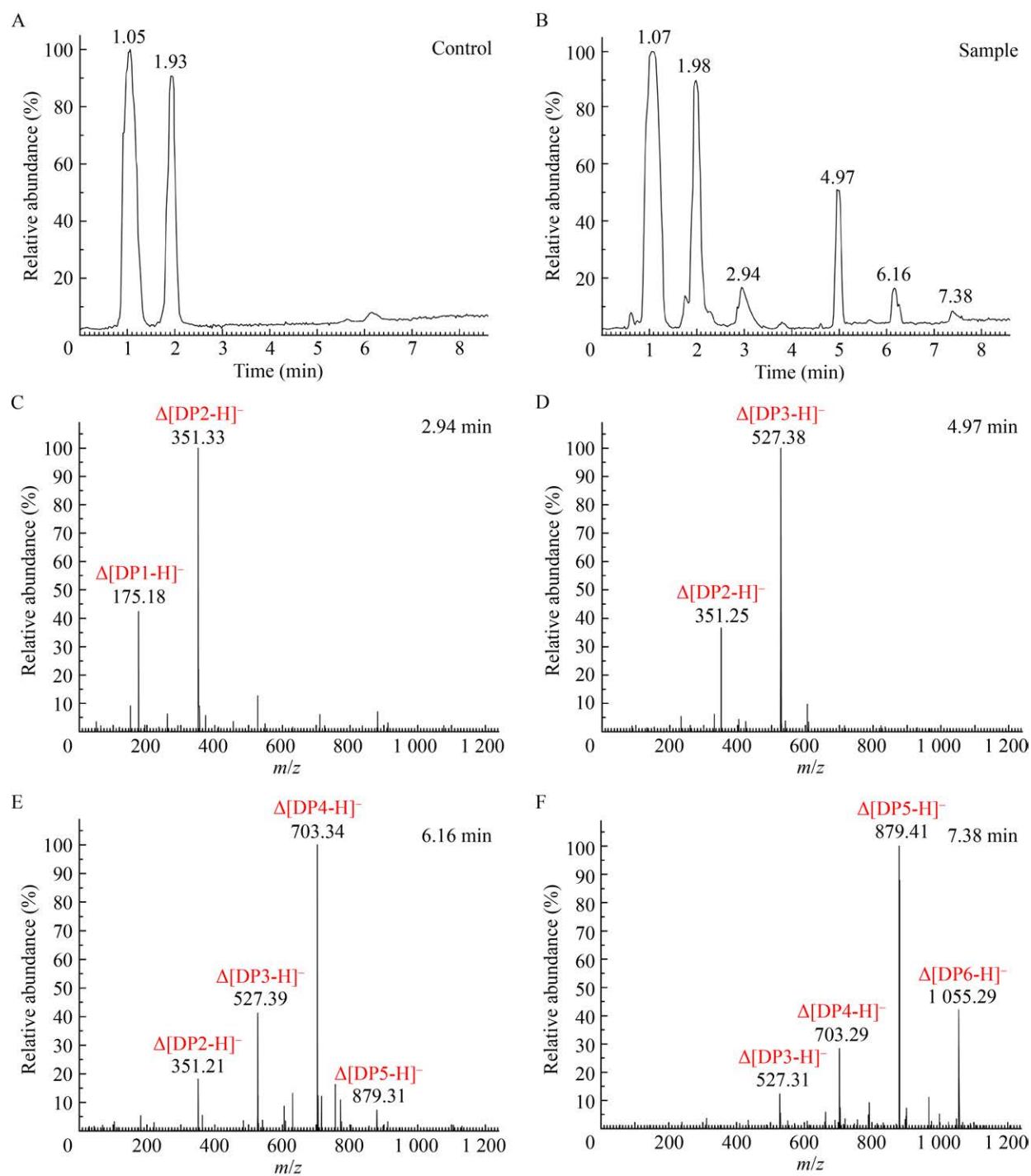


图 6 LC-MS 分析海藻酸裂解酶 AlgPg1 降解裙带菜的产物 A: 裙带菜粉末加酶处理的上清液的液相图谱; B: 裙带菜粉末加 AlgPg1 处理的上清液的液相图谱; C-F: 质谱分析主要的产物峰 2.94 min (C)、4.97 min (D)、6.16 min (E) 和 7.38 min (F)。

Figure 6 LC-MS analysis of the AlgPg1 hydrolysis products with *U. pinnatifida*. A: LC fractions of non-treated *U. pinnatifida*. B: LC fractions of AlgPg1-treated *U. pinnatifida*. C-F: MS analysis of the products at main peaks of 2.94 min (C), 4.97 min (D), 6.16 min (E), 7.38 min (F).

高的海藻酸裂解酶活性，这表明该菌株中极可能有催化性能优良的海藻酸裂解酶。通过基因组数据筛选、转录组测序和 qPCR 验证，发现 3 个在潮滩发光杆菌利用海藻酸钠生长时转录水平显著提高的海藻酸裂解酶 AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3。前二者为胞外酶；后者为胞内酶。发光杆菌属中仅有 FC615 菌株在 2019 年被报道具有 2 个海藻酸裂解酶 AlyPB1 和 AlyPB2^[15]。AlgPg1 和 AlyPB1 有 91.7% 的蛋白序列相似性；AlgPg3 和 AlyPB2 有 90.3% 的序列相似性。

AlgPg1、AlgPg2 和 AlgPg3 基因均在大肠杆菌中进行了重组表达和纯化，测定了酶学性质并进行比较。AlgPg1 的比酶活显著高于其他 2 个酶，是 AlgPg2 的 4.2 倍；是 AlgPg3 的 9.6 倍。同时，这 3 个酶中 AlgPg1 的转录差异表达水平最高。因此，推测 AlgPg1 是潮滩发光杆菌利用海藻酸钠或裙带菜生长时的关键酶。

相较于不同来源的海藻酸裂解酶，AlgPg1 表现出优良的催化特性(表 3)。海藻酸裂解酶的

活性定义有 6 种，所以不同定义下的海藻酸裂解酶的活性高低无法准确比较^[25]。为了便于比较，本研究采用每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量为标准^[15]。我们平行测定了 AlgPg1 和 AlyPB1 对海藻酸钠的比酶活，AlgPg1 比 AlyPB1 [(23.4±0.9) U/mg]高了约 3.9 倍。从表 3 可见，AlgPg1 的比酶活明显高于同样采用该定义已报道的其他海藻酸裂解酶。值得指出的是，来源于强壮弧菌(*Vibrio fortis*)的 VfAly7 是首个报道能直接降解裙带菜的海藻酸裂解酶，AlgPg1 的比酶活也高于 VfAly7 (71.5 U/mg)^[5]。

添加 200 mmol/L NaCl 后 AlgPg1 的比酶活高达 466 U/mg，这是以测还原糖为标准的海藻酸裂解酶的最高活性。为了探索该酶的应用价值，在添加 NaCl 条件下，检测了 AlgPg1 对多种海洋大型藻类的降解。对于测试的 4 种褐藻，AlgPg1 均能降解。其原因应该是海藻酸盐是褐藻细胞壁的主要成分之一^[26]。AlgPg1 降解红藻是因为红藻细胞壁的主要成分是卡拉胶和琼脂类^[27]。选择降解效果最优的裙带菜进一步优化降解条件，AlgPg1 在加酶量 140 U/mL 和 9 h 反应

表 3 比较 AlgPg1 与其他海藻酸裂解酶的生化特征

Table 3 Comparative biochemical parameters of AlgPg1 and other alginate lyases

酶 Enzyme	物种 Organism	最适条件 Optimal condition	比酶活 Specific activity (mg/mL)	NaCl 提高比酶活的倍数 Multiples of specific activity increased by NaCl	水解产物 Degraded product	降解的藻类 Degraded algae	参考文献 Reference
AlgPg1	<i>P. gaetbulicola</i> Guang47	30 °C, pH 8.0	91.2±3.6	5.1	DP 1–6, main DP3	<i>Undaria pinnatifida</i>	This study
AlyPB1	<i>Photobacterium</i> sp. FC615	30 °C, pH 8.0	23.4±0.9	13.0	DP 1–6, main DP3	<i>U. pinnatifida</i>	This study
AlgL7	<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1	40 °C, pH 7.0	36.4	1.2	DP 2–4	<i>Laminaria japonica</i>	[12]
AlgL6	<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1	35 °C, pH 8.0	10.5	1.8	DP 1–4	n.a.	[16]
Aly23	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. ASY5	35 °C, pH 6.0	1.6	1.4	DP 1–3	n.a.	[17]
OalS6	<i>Shewanella</i> sp. Kz7	40 °C, pH 7.2	33.7	4.8	DP1	n.a.	[24]
VfAly7	<i>Vibrio fortis</i>	30 °C, pH 7.5	71.5	n. a.	DP 2–4	<i>U. pinnatifida</i>	[5]

n.a.: 未提供。

n.a.: Not available.

条件下, 还原糖产量达到了(26.2 ± 1.6) mg/mL。这比海藻酸裂解酶 VfAly7 直接降解裙带菜的效率更高^[5]。VfAly7 酶在加酶量更高(300 U/mL) 和降解时间更长(12 h) 的条件下, 最高还原糖产量为 20.9 mg/mL^[5]。此外, 希瓦氏菌 pka 1008 菌株的胞外粗酶液直接降解裙带菜的还原糖产量仅为 0.24 mg/mL^[13]。

AlgPg1 降解裙带菜的产物与海藻酸裂解酶 AlyPB1 降解海藻酸钠的产物类似, 都是产生了 DP 不超过 6 的混合寡糖, 而且含量最高的 AOS 都是 DP3^[15]。

4 结论

本研究结合序列分析、差异表达量测定、蛋白重组表达和催化性质鉴定, 从潮滩发光杆菌 Gung47 中筛选到一个海藻酸裂解酶 AlgPg1。该酶在盐离子条件下, 比酶活提高了 5.1 倍, 可以高效降解裙带菜, 产生以 DP3 糖为主的 AOS。因此, AlgPg1 在裙带菜降解生产 AOS 方面具有潜在的应用价值。

作者贡献声明

阚乃猛: 实验方法设计、具体实验的执行、实际背景的调研、实验数据分析、论文初稿撰写; 张海龙: 实验结果的检查与验证、实验结果可视化; 李洁: 初稿的编辑与校对、实验数据的补齐; 黄金枝: 初稿的编辑与校对、实验数据的补齐; 王楠: 参与论文修订与语言润色, 补充理论分析; 彭惠: 统筹研究规划, 监督实验过程, 指导论文写作与修改, 负责最终版本审定及学术沟通。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 李昱倩, 单体峰, 逢少军. 裙带菜配子体与孢子体的附生微生物群落组成分析[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(5): 219-230.
- [2] SHARMA S, HORN SJ. Enzymatic saccharification of brown seaweed for production of fermentable sugars[J]. Bioresource Technology, 2016, 213: 155-161.
- [3] LIU M, LIU L, ZHANG HF, YI B, EVERAERT N. Alginate oligosaccharides preparation, biological activities and their application in livestock and poultry[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(1): 24-34.
- [4] ABKA-KHAJOUEI R, TOUNSI L, SHAHABI N, PATEL AK, ABDELKAFI S, MICHAUD P. Structures, properties and applications of alginates[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 364.
- [5] JIANG J, JIANG ZQ, YAN QJ, HAN SS, YANG SQ. Releasing bioactive compounds from brown seaweed with novel cold-adapted alginate lyase and alcalase[J]. Marine Drugs, 2023, 21(4): 208.
- [6] ZHU BW, YIN H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications[J]. Bioengineered, 2015, 6(3): 125-131.
- [7] YANG J, CUI DD, CHEN DW, CHEN WK, MA S, SHEN H. Purification and characterization of a novel endolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. SH-1 and its agricultural application[J]. Marine Drugs, 2020, 18(4): 184.
- [8] HUANG GY, WANG QZ, LU MQ, XU C, LI F, ZHANG RC, LIAO W, HUANG SS. AlgM4: a new salt-activated alginate lyase of the PL7 family with endolytic activity[J]. Marine Drugs, 2018, 16(4): 120.
- [9] KIM HT, KO HJ, KIM N, KIM D, LEE D, CHOI IG, WOO HC, KIM MD, KIM KH. Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) from *Saccharophagus degradans*[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(6): 1087-1092.
- [10] LI SY, WANG LN, JUNG S, LEE BS, HE NN, LEE MS. Biochemical characterization of a new oligoalginic lyase and its biotechnological application in *Laminaria japonica* degradation[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 316.
- [11] COSTA M, PIO L, BUDE P, CARDOSO V, ALFAIA CM, COELHO D, BRÁS J, FONTES CMGA, PRATES JAM. An individual alginate lyase is effective in the disruption of *Laminaria digitata* recalcitrant cell wall[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 9706.
- [12] LI HB, HUANG XY, YAO SX, ZHANG CH, HONG X, WU T, JIANG ZD, NI H, ZHU YB. Characterization of a bifunctional and endolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1 and its application in alginate oligosaccharides production from *Laminaria japonica*[J]. Protein Expression and Purification, 2022, 200: 106171.
- [13] XU XT, JEONG SM, LEE JE, KANG WS, RYU SH, KIM K, BYUN EH, CHO YJ, AHN DH. Characterization of *Undaria pinnatifida* root enzymatic extracts using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* pka 1008 and its anti-inflammatory effect[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(1): 79-84.
- [14] MACHADO H, GRAM L. Comparative genomics

- reveals high genomic diversity in the genus *Photobacterium*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1204.
- [15] LU DR, ZHANG QD, WANG SM, GUAN JW, JIAO RM, HAN NH, HAN WJ, LI FC. Biochemical characteristics and synergistic effect of two novel alginate lyases from *Photobacterium* sp. FC615[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 260.
- [16] LONG LF, HU QS, WANG XX, LI HB, LI ZP, JIANG ZD, NI H, LI QB, ZHU YB. A bifunctional exolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1 with salt activation and calcium-dependent catalysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 161: 110109.
- [17] TANG X, JIAO C, WEI Y, ZHUANG XY, XIAO Q, CHEN J, CHEN FQ, YANG QM, WENG HF, FANG BS, ZHANG YH, XIAO AF. Biochemical characterization and cold-adaption mechanism of a PL-17 family alginate lyase Aly23 from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. ASY5 and its application for oligosaccharides production[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(2): 126.
- [18] SUN XK, GONG Y, SHANG DD, LIU BT, DU ZJ, CHEN GJ. Degradation of alginate by a newly isolated marine bacterium *Agarivorans* sp. B2Z047[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(4): 254.
- [19] JAGTAP SS, HEHEMANN JH, POLZ MF, LEE JK, ZHAO HM. Comparative biochemical characterization of three exolytic oligoalginate lyases from *Vibrio splendidus* reveals complementary substrate scope, temperature, and pH adaptations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4207-4214.
- [20] JIANG ZD, GUO YX, WANG XX, LI HB, NI H, LI LJ, XIAO AF, ZHU YB. Molecular cloning and characterization of AlgL17, a new exo-oligoalginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 161: 17-27.
- [21] LYU QQ, ZHANG KK, SHI YH, LI WH, DIAO XT, LIU WZ. Structural insights into a novel Ca²⁺-independent PL-6 alginate lyase from *Vibrio OU02* identify the possible subsites responsible for product distribution[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2019, 1863(7): 1167-1176.
- [22] GAO S, ZHANG ZL, LI SY, SU H, TANG LY, TAN YL, YU WG, HAN F. Characterization of a new endo-type polysaccharide lyase (PL) family 6 alginate lyase with cold-adapted and metal ions-resisted property[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 729-735.
- [23] RØNNE ME, TANDRUP T, MADSEN M, HUNT CJ, MYERS PN, MOLL JM, HOLCK J, BRIX S, STRUBE ML, AACHTMANN FL, WILKENS C, SVENSSON B. Three alginate lyases provide a new gut *Bacteroides ovatus* isolate with the ability to grow on alginate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(10): e0118523.
- [24] LI SY, WANG LN, HAN F, GONG QH, YU WG. Cloning and characterization of the first polysaccharide lyase family 6 oligoalginate lyase from marine *Shewanella* sp. Kz7[J]. *Journal of Biochemistry*, 2016, 159(1): 77-86.
- [25] CHENG DY, JIANG CC, XU JC, LIU Z, MAO XZ. Characteristics and applications of alginate lyases: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 1304-1320.
- [26] BEUDER S, BRAYBROOK SA. Brown algal cell walls and development[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2023, 134: 103-111.
- [27] GOBET A, BARBEYRON T, MATARD-MANN M, MAGDELENAT G, VALLENAT D, DUCHAUD E, MICHEL G. Evolutionary evidence of algal polysaccharide degradation acquisition by *Pseudoalteromonas carrageenovora* 9^T to adapt to macroalgal niches[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2740.