

一株海洋细菌所产琼胶酶酶学特性的研究

蔡俊鹏, 许少丹

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要:从海水中分离筛选到一株高活力的海洋琼胶降解菌 2.2-g。通过硫酸铵盐析、透析袋透析、离子交换柱层析和凝胶柱层析, 得到了电泳纯的琼胶酶样品, 通过 SDS-PAGE 电泳, 其分子量约为 55 kDa。该琼胶酶的最适 pH 值和温度分别为 7.0 和 55 °C。Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 对酶促反应有较强的促进作用, 而 Mn²⁺、Zn²⁺、NH₄⁺、EDTA 和 SDS 等则有不同程度的抑制作用。酶解产物的质谱和核磁共振谱结果证明, 该琼胶酶降解琼胶后得到由新琼二糖、新琼四糖、新琼六糖组成的混合物, 证明该琼胶酶为 β -琼胶酶。

关键词: 海洋细菌; β -琼胶酶; 酶学性质; 酶解产物

中图分类号: Q814.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)12-1217-05

Characterization of Extracellular Agarase from an Agarolytic Bacterium

CAI Jun-peng, XU Shao-dan

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: An agar-decomposing strain 2.2-g was isolated and selected from sea water. The enzyme was achieved by ammonium, dialysis and DEAE-cellulose separation, and its molecular mass was determined as 55 kDa. The most suitable pH and temperature of the enzyme were 7.0 and 55°C, respectively. Mg²⁺ and Ca²⁺ can be used as enzyme activators for this extracellular agarase, while Mn²⁺, Zn²⁺, NH₄⁺, EDTA and SDS partially or completely inhibited its activity. MS and NMR analysis showed that the enzyme is a β -agarase, which was further validated by the components of its degraded products (neoagarobiose, neoagarotetose and neoagarohexaose).

Key words: marine bacteria; β -agarase; Enzymeology properties; Enzymatic products;

琼胶通常又被称为琼脂、冻粉或洋菜, 广泛应用于食品、生化、临床、医药等领域。琼胶是一种从江篱、石花菜等红藻中提取出来的水溶性多糖, 主要由琼胶糖和硫酸琼胶两部分组成。琼胶糖是由 1,3 连接的 β -D-半乳糖和 1,4 连接的 3,6-内醚- α -L-半乳糖残基反复交替连接的链状中性糖。硫酸琼胶结构较复杂, 含有 D-半乳糖、3,6-半乳糖酐、半乳糖醛酸和硫酸基, 丙酮酸^[1]。琼胶酶降解产生琼胶低聚糖, 具有高效性和专一性的特点, 而且降解条件温和, 水解产物不易被破坏, 利于产物分析和回收, 因而逐渐代替了传统的酸解法。本实验室从深圳海水中分离筛选到一株高活力的海洋琼胶降解菌 2.2-g^[2], 获得了具有较高活性的琼胶酶, 本文对其基本酶学性质进行分析, 以期为进一步工业化生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基组成

1.1.1 2216E 海洋细菌培养基(g/L)

蛋白胨 5, 酵母膏 1, 磷酸高铁 0.1, 海水晶 33,

蒸馏水 1000 mL, pH 7.2。

1.1.2 2216E 海洋细菌固体培养基(g/L)

在 2216E 海洋细菌液体培养基中加入 0.6% 的琼胶即为固体培养基。

1.1.3 发酵培养基(g/L)

琼脂 2, 其它成分同固体培养基。

1.2 Buffer A

6.06 g Tris 碱, 溶于 700 mL 水中, 用浓盐酸调 pH 值为 7.0, 再加水定容到 1000 mL。

1.3 DNS 试剂: 见文献^[3]。

2 实验方法

2.1 菌体的扩大培养

将菌株接到含有 20 mL 2216E 发酵培养基的 50 mL 三角瓶中, 27 °C 下 180 r/min 摇床培养 20 h 使菌株活化。将 2 mL 活化菌液转移到装有 250 mL 发酵培养基的 1000 mL 的三角瓶中, 20 °C 培养 19 h。一共培养 4 L 发酵液。

2.2 酶的分离纯化

发酵培养液在 4 °C 6000 r/min 离心 30 min 后除菌体, 取上清, 于上清液中缓慢加入硫酸铵至 75% 饱

收稿日期: 2008-07-22,

通讯作者: 蔡俊鹏(1963-), 男, 教授, 主要从事海洋生物技术的研究

和度, 4 ℃静置 3 h, 4 ℃ 6000 r/min 离心 30 min, 弃去上清液, 沉淀用适量的 Buffer A 溶解, 4 ℃透析 (分子量 1.4 kDa) 48 h 后 6000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 即粗酶液。

粗酶液通过 0.22 μm 的微孔滤膜以除去杂质, 上样于 20 mmol/L pH 7.2 tris-HCl 缓冲液平衡的 DEAE-Cellulose 32 柱进行离子交换层析, 用 20 mmol/L pH 7.2 tris-HCl 缓冲液 (内含 0.4 mol/L 的 NaCl) 洗脱, 流速约为 0.5 mL/min, 分步收集洗脱液, 收集的液体于 280 nm 测定吸光度, 将收集的试管号对吸光度作图, 测定峰位的酶活。将有酶活的峰位收集后, 上样于 20 mmol/L pH 7.2 tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephadex G100 凝胶柱进行凝胶柱层析, 用 20 mmol/L pH 7.2 tris-HCl 缓冲液洗脱, 流速约 0.3 mL/min, 分布收集洗脱液, 收集的液体于 280 nm 测定吸光度, 将收集的试管号对吸光度作图, 测定峰位的酶活。

2.3 酶活力的测定

反应体系: 酶液 200 μL, Buffer A 配制成的含 0.3% 琼胶的底物溶液 800 μL, 55 ℃反应 0.5 h, 水解产生的还原糖采用 DNS 法测定^[5]。

酶活力单位定义为 55 ℃, pH 7.0 时 1 mL 酶液每分钟产生 1 μg 还原糖 (以半乳糖计) 所需要的酶量。

2.4 酶蛋白分子量的测定

测定方法为 SDS-PAGE 法^[4]。

2.5 琼胶酶最适反应条件的确定

2.5.1 酶反应的最适温度的确定

按 2.3 所述, 酶与底物混合液分别在 40、45、50、55 和 60 ℃下反应, 测定琼胶酶活力, 并以灭活酶液在上述不同温度下测定酶活作为空白值。以所得最大酶活值为 100 计算其它条件下的相对酶活力, 作相对酶活力-温度曲线。

2.5.2 酶反应的最适 pH 值的确定

按 2.3 所述, 将酶与底物分别在 pH 值为 5、6、7 和 8 条件下反应, 测定琼胶酶活力, 并以灭活酶液在不同 pH 下测定酶活作空白值。以所得最大酶活值为 100, 计算其它条件下的相对酶活, 作相对酶活力-pH 曲线。

2.6 酶反应的底物专一性的确定

用 0.3% 琼胶、0.5% 褐藻胶、0.5% 岩藻多糖、0.5% 卡拉胶、0.5% 纤维素等不同的底物代替琼脂进行 DNS 反应, 并按 2.3 所述以灭活酶进行空白试验。

2.7 温度对酶稳定性的影响

适量酶液分别在 50 ℃、55 ℃和 60 ℃保温 11 h, 并在保温经历 0、0.5 h、1 h、3 h、5 h、7 h、9 h 和 11

h 时取样, 测定酶活力, 并以 0 h 的酶活为 100, 其它酶活力与之相比计算相对酶活力, 作相对酶活-时间图。

2.8 pH 值对酶稳定性的影响

适量酶液分别在 pH 值为 6、7 和 8 下保温 20 h, 并在保温经历 0 h、4 h、6 h、8 h、10 h 和 20 h 取样, 测定酶活力, 并以 0 h 的酶活为 100, 其它酶活力与之相比计算相对酶活力, 作相对酶活-时间图。

2.9 底物浓度对酶促反应的影响

按 2.3 所述, 将酶与不同浓度的底物溶液 (0%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6%) 混合测定酶的活力, 并以灭活酶液与上述不同浓度底物反应作为空白样值, 做相对吸光度-底物浓度图。

2.10 不同金属离子对酶反应的影响

将下述试剂添加到 Buffer A 中代替按 2.3 所述的 Buffer A 进行酶活力的测定。EDTA、MgSO₄、MnSO₄、(NH₄)₂SO₄、CaCl₂、ZnSO₄、SDS, 每种试剂添加的浓度为 1 mmol/L。以未添加以上试剂的酶测定酶活, 并以此值为 100, 其它酶活与之相比计算相对酶活。

2.11 琼胶寡糖的酶法制备

取 3 g 琼脂糖溶于 1000 mL Buffer A 中, 冷却至 55 ℃后加入 5 mL 琼胶酶液, 于 55 ℃保温并搅拌 (100 r/min) 24 h, 然后用旋转蒸发器于 40 ℃下浓缩至原体积的 1/5, 向浓缩液中加入 3 倍体积冰冷的无水乙醇, 4 ℃静置 2 h 使琼胶酶沉淀后, 4 ℃下 8000 r/min 离心 30 min, 取上清液于 40 ℃旋转蒸发至约 50 mL, 将此浓缩液冷冻干燥得到琼胶寡糖粗样品。

2.12 琼胶寡糖的初步纯化

取 2.11 所得冷冻干燥的粗寡糖样品适量溶于 2.0 mL 双蒸水, 过 0.22 μm 膜后上样于 Sephadex G25 色谱柱 (70 cm×1.0 cm), 室温下以蒸馏水进行洗脱 (0.06 mL/min)。部分收集器收集洗脱液 (1 mL/管)。并按用 DNS 法测定洗脱液中还原糖在 540 nm 波长下的吸光值, 绘制吸光值-管数图, 得到寡糖的分离图谱。将具有还原糖的各峰分别收集, 并冷冻干燥得到初步纯化的琼胶寡糖。

2.13 琼胶寡糖的结构鉴定

2.13.1 寡糖分子量的 ESI-MS 检测: 取 2.11 所得冷冻干燥寡糖样品适量溶于光谱醇甲醇, 内含 0.1% 的醋酸。样品过 0.22 μm 膜后经蠕动泵直接向 ESI 电离源进样, 进样速度 3 μL/min。ESI-MS 操作参数如下: Capillary Voltage 3 kV, Cone Voltage 40 kV, Extractor Voltage 5 kV, Source Temperature 110 ℃, Desolvation Temperature 300 ℃。以正电荷模式收集质子峰。

2.13.2 寡糖结构的 ^{13}C -NMR 测定:因为琼胶寡糖中的组成单元为 D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半乳糖,这些结构为已知,现在未知的是琼胶酶以何种方式降解两者之间的糖苷键,降解 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键则得到以 D-半乳糖为还原端的新琼寡糖,降解 $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键则得到以 3,6-内醚-L-半乳糖为还原端的琼寡糖。总之,两者之间的显著差别就在于还原性末端的不同,而正是这种还原性末端的不同造成了 ^{13}C -NMR 图谱上的信号存在显著不同的点^[5-6]。因此,不同琼胶寡糖的区分可以借助 ^{13}C -NMR 实现。将所得冷冻干燥的寡糖样品 30 mg 溶于 0.5 mL 重水,置于 5mm 的核磁管,核磁共振仪在室温条件下,磁场频率为 125.8 MHz 下工作,其它工作参数为: spectral widths 3.14 kHz, pre-scan-delay 6.0 μs , acquisition time 0.26 s, scans 3114。化学位移以 ppm 的形式表现有核磁共振的图谱上,根据化学位移来判断产物的结构。

3 结果与讨论

3.1 酶的纯化

对盐析和透析的酶液按标准方法测定其酶活,将收集的试管号对吸光度作图,如图 1 所示。

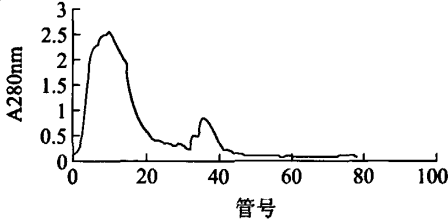


图 1 不同收集试管在 280nm 的吸光度

Fig.1 Absorbency of the crude enzyme measured at 280nm

由图 1 可清晰看到两个洗脱峰,分别将两个峰收集液以琼脂为底物测酶活,结果第 1 个峰的酶活为 20.1 U/mL,另一个峰的酶活接近于 0 U/mL,因此判断其为杂蛋白,酶活为 20.1 U/mL 蛋白溶液判断其为所需的酶液,将该峰收集后浓缩蛋白酶通过 SDS-PAGE 电泳确定其分子量和组分,与标准蛋白进行比较得其分子量约为 55 kDa(如图 2)。

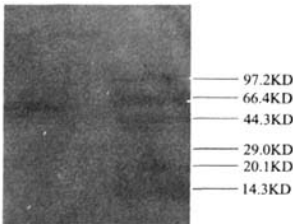


图 2 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.2 SDS-PAGE of the purified agarase protein

3.2 酶的最适反应条件的确定

3.2.1 酶促反应的最适温度

由图 3 可见,酶促反应的最适温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,超过 55 $^{\circ}\text{C}$,酶活开始下降。

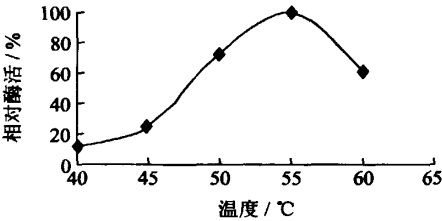


图 3 温度对酶活的影响

Fig.3 Effect of temperature on agarase activity

3.2.2 酶促反应的最适 pH

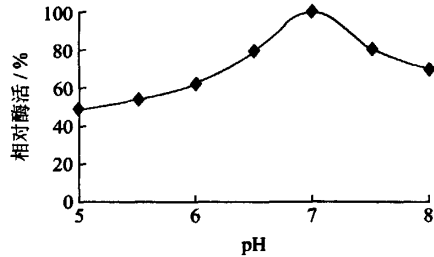


图 4 pH 值对酶活的影响

Fig.4 Effect of pH on agarase activity

如图 4 所示,琼胶酶的最适 pH 均为 7.0,它接近琼胶酶产生菌所生长的海洋环境,这可能是菌种的环境适应性造成的。

3.3 酶反应的底物专一性

该酶对琼胶底物具有相对的专一性,对所选用的其它几种多糖均无作用,见表 1。

表 1 该琼胶酶对不同底物的利用情况

Table 1 Efficiencies of substrate utilization by agarase

底物	琼胶	褐藻胶	岩藻多糖	卡拉胶	纤维素
酶活/(U/mL)	20.1	0	0	0	0

3.4 温度对酶稳定性的影响

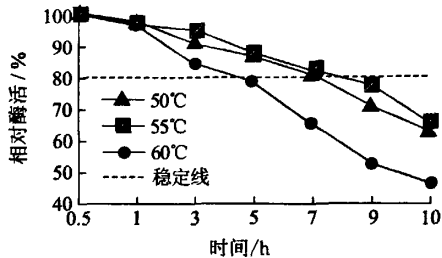


图 5 温度对酶的稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on agarase stability

从图 5 知,酶在 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 的工作温度下的稳定性较

好, 最适温度下保温时间在8 h内时, 相对酶活大于80%, 即使此温度下持续保温11 h, 酶活仍保持在65%以上; 在50~60 ℃内保温9 h, 相对酶活仍大于50%。但是, 相对而言, 工作温度越高, 酶活下降越快, 这也符合酶热失活的基本规律。

3.5 pH值对酶稳定性的影响

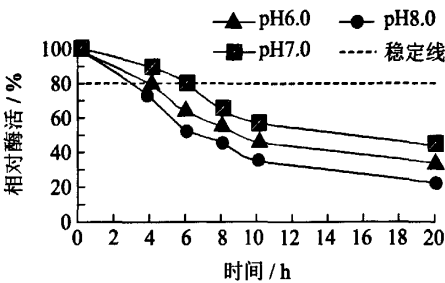


图6 pH值对酶稳定性的影响
Fig.6 Effect of pH on agarase stability

图6为琼胶酶在工作pH值条件下的酸碱稳定性。从图6中可以看出, 琼胶酶酸碱稳定性在最适pH值下较好。在最适pH下, 当反应时间在6 h以内时, 活力维持在80%以上。但是在非最适pH值条件下时, 稳定性不好。如pH 6.0, 保持80%相对活性的稳定时间缩短到3 h。

3.6 底物浓度对酶促反应的影响

当琼脂浓度分别为0%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%和0.6%时, 对酶促反应的影响如图7。

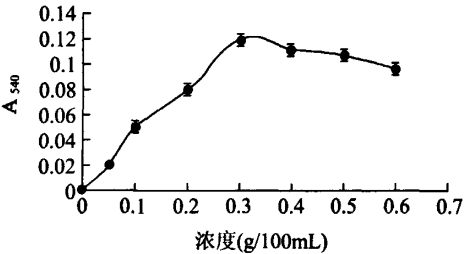


图7 底物浓度对酶促反应的影响
Fig.7 Effect of substrate concentration on agarase activity

从图7知, 当琼脂浓度小于0.3%时, 随着琼脂浓度的增加, 水解产生的还原糖的量也增加; 但当琼脂浓度超过0.3%以后, 随着底物浓度的增加, 水解所得原糖的量不再增加, 甚至还有小幅度的下降。因此, 实验中最适琼脂浓度选择0.3%。

3.7 不同金属离子或试剂对酶反应的影响

结果见表2。Mg²⁺和Ca²⁺对酶促反应有促进作用, 其中Mg²⁺的促进作用最为明显, 相对酶活为175%; EDTA、Mn²⁺、NH₄⁺、Zn²⁺、SDS等对反应有一定的抑制作用, 特别是SDS的添加对该琼胶酶完全抑制。

表2 不同金属离子对琼胶酶活的影响

Table 2 Effects of ions, EDTA and SDS on agarase activity				
金属离子或试剂	Control	EDTA	MgSO ₄	MnSO ₄
相对酶活力/%	100	25	175	65

金属离子或试剂	(NH ₄) ₂ SO ₄	CaCl ₂	ZnSO ₄	SDS
相对酶活力/%	30	150	30	0

注: 表中金属离子或试剂浓度为1mmol/L, pH为7.0

3.8 琼胶寡糖的初步分离纯化

将经琼胶酶解产物通过Sephadex G25凝胶层析柱进行初步分离纯化, 获得一个寡糖的混合组分(图8)。

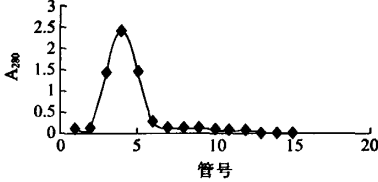


图8 琼胶寡糖在Sephadex 25凝胶柱上的层析结果
Fig. 8 Gel chromatography of the enzymatic products (oligosaccharides) through Sephadex 25

3.9 ESI-MS 分析

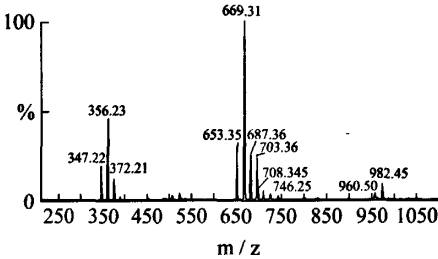


图9 琼胶寡糖的ESI-MS谱图
Fig. 9 ESI-MS analysis of partially purified enzymatic products of agarase

表3 ESI-MS谱图分析

Table 3 ESI-MS analysis of the major components of the enzyme hydrolytic products			
Quasi-ion	m/z		
	Agaro-biose MW=324	Agaro-tetose MW=630	Agaro-hexaose MW=936
[M+Na] ⁺	347.22	653.35	—
[M+Na+H] ⁺	—	—	960.50
[M+NH ₄] ⁺	—	—	—
[M+Na+NH ₄] ⁺	356.23	—	—
[M+Na+NH ₄ +H] ⁺	—	—	982.45
[M+K] ⁺	372.21	669.31	—
[M+2K] ⁺	—	708.34	—

注: —为无信号

琼胶寡糖中具有相同聚合度的糖,无论它是琼寡糖还是新琼寡糖,都是由相同个数半乳糖和 3,6-内醚半乳糖组成,差别只在于次序不同。因此,它们的理论分子量都是一样的。经计算即为:琼二糖或新琼二糖理论分子量为 324,琼四糖或新琼四糖理论分子量为 630,琼六糖或新琼六糖理论分子量为 936,琼八糖或新琼八糖理论分子量为 1242,琼十糖或新琼十糖理论分子量为 1548。初步纯化所得琼胶寡糖的 ESI-MS 的谱图结果如图 9 所示:由各信号峰所对应的寡糖理论分子量来推断,寡糖混合物较纯,基本不存在其它非寡糖物质的杂信峰。而且,信号峰谱图非常清晰,简单,归属容易,能准确判断出化合物的分子量。将图 9 中的质谱峰与不同聚合度的寡糖分子量相对应,其结果见图 9 和表 3。

从图 9 与表 3 可知,初步纯化的琼胶寡糖组成为二糖,四糖和六糖。

3.10 ^{13}C -NMR 结果分析

ESI-MS 的结果只能反映寡糖的分子量,至于这些寡糖是水解 $\alpha(1\rightarrow3)$ 键而得到的琼寡糖还是水解 $\beta(1\rightarrow4)$ 键而得到的新琼寡糖,这只能联合 ^{13}C -NMR 的结果才能得出。所得寡糖样品经 ^{13}C -NMR 分析,结果如图 10。

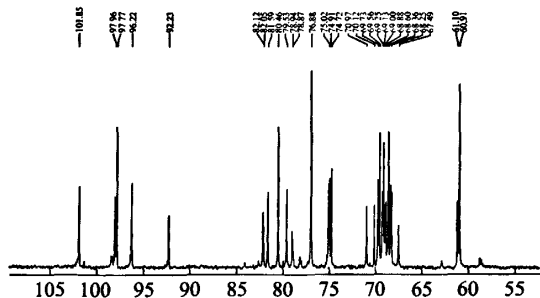


图 10 琼胶寡糖的 ^{13}C -NMR 图谱

Fig. 10 ^{13}C -NMR spectrum of hydrolytic products of the enzyme

真正特异性的 C 原子为寡糖中末端 C 原子,而这些特异性的 C 原子中,能显著区别琼寡糖与新琼寡糖的为还原性末端 C 原子。若为琼寡糖,则 ^{13}C -NMR 图谱中在约 92.7 ppm 处会有 1 代表 3,6-内醚半乳糖还原端 α -C 原子的特征峰,而在 96.0 ppm 处不会有峰信号^[7]。若为新琼寡糖,则在 93 ppm 和 97 ppm 分别出

现代表半乳糖的还原端 C 原子的特征峰。因此,从图 10 可知,初步纯化的琼胶寡糖为新琼寡糖,从而也可以鉴定纯化所得的琼胶酶为 β -琼胶酶。

4 小结

对海洋细菌 *Brevibacterium linens* 菌株产生的琼胶酶的基本性质作了研究。通过硫酸铵盐析、透析袋透析和柱层析,得到了电泳纯的琼胶酶样品,通过 SDS-PAGE 电泳,其分子量约为 55 kDa。

确定了酶的最佳反应条件:酶反应的最适温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶反应的最适 pH 值为 7.0。

Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶促反应有促进作用,其中 Mg^{2+} 的促进作用最为明显,相对酶活为 175%; EDTA、 Mn^{2+} 、 NH_4^+ 、 Zn^{2+} 、SDS 等对反应有一定的抑制作用,特别是 SDS 的添加对该琼胶酶完全抑制。

3 g 琼脂经琼胶酶于 55 $^{\circ}\text{C}$ 下降解 24 h 后,通过浓缩,酒精沉淀和 Sephadex G25 纯化得到琼胶寡糖混合物。寡糖混合物经 ESI-MS 和 ^{13}C -NMR 分析表明,该琼胶酶降解琼胶后得到由新琼二糖,新琼四糖,新琼六糖的混合物,也证明该琼胶酶为 β -琼胶酶。

参考文献

- [1] 王静雪,江晓路.细菌降解琼胶的研究进展[J].中国水产科学,2001,8(3):94-95
- [2] 徐丽,刘江涛,蔡俊鹏.一株琼胶酶高产菌株的筛选鉴定及产酶条件的优化[J].现代食品科技,2006,22(6):19-22
- [3] 张信旭,高海波.3,5-二硝基水杨酸测定古尼虫草中多糖含量方法[J].贵州化工,2002(27):23-38
- [4] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000
- [5] Morrice LM, Cclean MW. An investigation using beta-agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy[J]. Eur J Biochem, 1983, 133(3):673-684
- [6] Rochas C, Potin P, Kloareg B. NMR spectroscopic investigation of agarase oligomers produced by an alpha-agarase[J]. Carbohydrate Res, 1994, 253:69-77
- [7] Potin P, Richard C. Purification and characterization of the alpha-agarase from *Alteromonas agarlyticus*(Cataldi) comb. nov., strain GJ1B[J]. Eur. J. biochem, 1993, 214(2):599-607

一株海洋细菌所产琼胶酶酶学特性的研究

作者: 蔡俊鹏, 许少丹, CAI Jun-peng, XU Shao-dan
作者单位: 华南理工大学轻工与食品学院, 广东, 广州, 510640
刊名: 现代食品科技 
英文刊名: MODERN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY
年, 卷(期): 2008, 24(12)

参考文献(7条)

1. 王静雪;江晓路 细菌降解琼胶的研究进展[期刊论文]-中国水产科学 2001(03)
2. 徐丽;刘江涛;蔡俊鹏 一株琼胶酶高产菌株的筛选鉴定及产酶条件的优化[期刊论文]-现代食品科技 2006(06)
3. 张信旭;高海波 3,5-二硝基水杨酸测定古尼虫草中多糖含量方法[期刊论文]-贵州化工 2002(27)
4. 汪家政;范明 蛋白质技术手册 2000
5. Morrice LM;Cclean MW An investigation using betaagarase Ifrom Pseudomonas atlantica and 13C-NMR spectroscopy 1983(03)
6. Rochas C;Poilu P;Kloarcg B NMR spectroscopic investigation of agarase oligomers produced by an alpha-agarasc 1994
7. Potin P;Richard C Purification and charactedzation of the alpha-agarase from Alteromonas agarlyticus(Cataldi)comb. nov, strain GJ1B 1993(02)

本文读者也读过(10条)

1. 付万冬 高产琼胶酶菌株的筛选、发酵条件优化及琼胶酶酶学性质的研究[学位论文]2006
2. 贾晶, 张小葵, 郑凯, 罗静海 白色噬琼胶菌QM38发酵产琼胶酶条件优化[期刊论文]-江苏农业科学2009(3)
3. 朱启忠, 朱慧文, 孙艳娜, 周晓龙, 郝梅, 郭振博, ZHU Qizhong, ZHU Huiwen, SUN Yanna, ZHOU Xiaolong, HAO Mei, GUO Zhenbo 海洋细菌Agarivorans albus NBRC102603琼胶酶的分离纯化[期刊论文]-生物加工过程2011, 09(3)
4. 付万冬, 韩宝芹, 王常红, 刘万顺, FU Wan-Dong, HAN Bao-Qin, WANG Chang-Hong, LIU Wan-Shun 琼胶降解菌F-6筛选、培养条件及对条斑紫菜(Porphyra yezoensis)细胞解离作用的研究[期刊论文]-海洋与湖沼2007, 38(4)
5. 刘美英, 梅建凤, 应国清, 王鸿 一株海洋琼胶酶产生菌的分离、筛选和初步鉴定[会议论文]-2008
6. 王静雪, 江晓路, 牟海津, 管华诗, WANG Jing-xue, JIANG Xiao-lu, MU Hai-jin, GUAN Hua-shi 海洋弧菌QJH-12发酵产琼胶酶条件的优化[期刊论文]-海洋科学2007, 31(7)
7. 刘江涛, 蔡俊鹏, 吴冰, Liu Jiang-tao, Cai Jun-peng, Wu Bing 琼胶酶及其综合应用的研究概况[期刊论文]-现代食品科技2005, 21(1)
8. 杜宗军 海洋琼胶降解细菌的多样性研究与Agarivorans albus QM38 β -琼胶酶基因的克隆与表达[学位论文]2007
9. 张千, 曾润颖, ZHANG Qian, ZENG Run-ying 厦门沿岸海域杂色鲍中产琼胶酶菌株的筛选及其酶学性质的研究[期刊论文]-台湾海峡2011, 30(2)
10. 刘美英, 梅建凤, 应国清, 王鸿 一株海洋琼胶酶产生菌的分离、筛选和初步鉴定[会议论文]-2008

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gzspgykj200812008.aspx