卡拉胶多糖的分子修饰：卡拉胶酶和硫酸化酶的研究进展

魏衍尚， 宁利敏， 姚 忠， 朱本伟*
（南京工业大学 食品与轻工学院，江苏 南京 210009）

摘要： 卡拉胶（carrageenan）是一种从海洋红藻细胞壁中提取出来的多糖物质，通过1,3-β-D-吡喃半乳糖和1,4-α-D-吡喃半乳糖交替连接作为基本骨架形成的线性硫酸多糖。研究表明，卡拉胶及其分子修饰后获得的衍生物具有抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、增强人体细胞免疫和体液免疫力等多方面生物活性。卡拉胶酶属于糖苷水解酶，通过使β-1,4糖苷键断裂来降解卡拉胶。卡拉胶硫酸酯酶又被称作卡拉胶硫酸化酶，是一种作用于卡拉胶寡糖的硫酸基使之游离出无机硫酸的酶。经研究证实，这两种酶对于卡拉胶多糖的降解具有协同作用。然而由于卡拉胶多糖结构的复杂性，人们对于卡拉胶的降解及分子修饰大多数尚未探索。现如今，随着技术的进步以及卡拉胶多糖生物活性的多样性，卡拉胶多糖的分子修饰引起了相关研究者的持续关注。作者概括了近年来卡拉胶多糖的分子修饰，重点介绍了卡拉胶酶和硫酸化酶的研究进展，进一步阐述了其修饰后的生理活性变化。

关键词： 卡拉胶；分子修饰；卡拉胶酶；硫酸化酶
中图分类号：Q 946　**文章编号：**1673-1689(2022)10-0017-20　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.002

Molecular Modification of Carrageenan Polysaccharides: Research Progress of Carrageenases and Sulfatase

WEI Yanshang， *NING Limin*， *YAO Zhong*， *ZHU Benwei**
（College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China）

Abstract: Carrageenan is a kind of linear sulphated polysaccharide extracted from the cell wall of marine red algae, which is formed by the alternating connection of 1,3-β-*D*-galactose and 1,4-α-*D*-galactose as the basic skeleton. Studies have shown that carrageenan and its molecular modified derivatives have many biological activities such as anti-tumor, anti-virus, anti-coagulation, enhancing cellular immunity and humoral immunity. Carrageenase is a glycoside hydrolase that degrades carrageenan by breaking the β-1,4-glycosidic bond. Carrageenan sulfase, also known as carrageenan sulfase, is an enzyme that acts on the sulfate group of oligo-carrageenan to free inorganic sulfuric acid. These two enzymes have a synergistic effect on the degradation of carrageenan polysaccharides. However, due to the complex structure of carrageenan polysaccharides, the degradation and

收稿日期： 2022-04-28
基金项目： 国家自然科学基金项目(31601410)；江苏省博士后科研资助计划项目(51208364)；宿迁市科技计划项目(L201906)。
* **通信作者：** 朱本伟(1987—)，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事酶工程研究。E-mail：zhubenwei@njtech.edu.cn

molecular modification of carrageenan have not been explored in the past. Nowadays, with the introduction of technology and the various biological activities of carrageenan polysaccharides, the molecular modification of carrageenan polysaccharides has attracted the continuous attention of relevant researchers. In this paper, the molecular modification of carrageenan polysaccharides in recent years is reviewed, with emphasis on the research progress of carrageenan and sulfatase. The changes of physiological activity after modification were also described.

Keywords: carrageenan, molecular modification, carrageenase, sulfating enzyme

卡拉胶是一种从海洋红藻细胞壁中提取出来的多糖物质,是一种由 *D*-半乳糖通过交替的 α-1,3 和 β-1,4 糖苷键连接而成的线性硫酸多糖[1]。因其具有多样的生物活性而受到广大关注。卡拉胶多糖根据硫酸基团的数量和位置以及 α-1,4 连接的半乳糖残基中 3,6-内醚-α-*D*-吡喃半乳糖(3,6-AG)的存在,可将其分为 κ-、ι-和 λ-型 3 种卡拉胶,其对应的重复二糖结构分别为:G4S-DA、G4S-DA2S 和 G2S-D2S,6S(见图 1)[2]。卡拉胶因其出色的物理功能特性而得到广泛的利用,如增稠、胶凝和稳定能力[1]。然而,由于这种硫酸多糖的高相对分子质量和较差的组织穿透能力,大大限制了它们的进一步应用。

研究表明,经过降解后产生的卡拉胶寡糖或者降解后的卡拉胶经过分子修饰的衍生物往往有着更强的生物活性[3]。卡拉胶的酶降解需要涉及卡拉胶酶和硫酸化酶两种酶的共同作用,前者降解糖苷键,后者脱去卡拉胶分子上的硫酸基团[4-6]。因此作者总结了卡拉胶的多种降解方法以及降解后的卡拉胶所进行的分子修饰,并对其降解后的生物活性做了简单的概述。同时重点概括了近 20 年来卡拉胶酶和硫酸化酶的研究进展,还在最后介绍了两种酶协同降解卡拉胶多糖的机制。

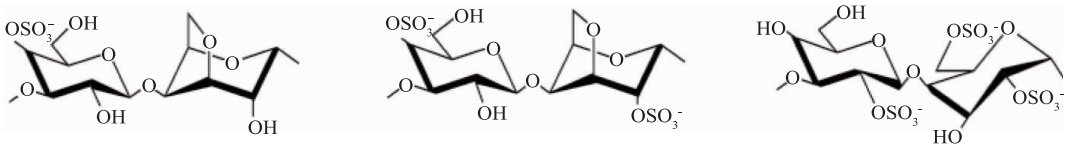


图 1　不同类型卡拉胶的重复二糖结构

Fig. 1　Schematic diagram of repeated disaccharide structure of different types of carrageenan

1　卡拉胶多糖的降解及分子修饰

天然提取的卡拉胶因相对分子质量太大、黏度高、溶解度低等特点,难以通过机体内的屏蔽作用,致使其应用受到很大程度的限制[7]。相比之下,卡拉胶寡糖及其分子修饰后的衍生物具有更为广泛的应用价值[8]。针对这一问题,目前对于卡拉胶多糖的研究主要集中在多糖降解或降解后的卡拉胶的分子修饰。

1.1　卡拉胶多糖的降解方法

1.1.1　化学降解　在化学降解方面可通过用无机酸水解、硫醇水解、甲醇水解、还原水解、过氧化氢氧化水解等方法来将大分子卡拉胶降解为小分子多糖,甚至寡糖[3]。其中研究最多的为无机酸的水解,在酸性溶液中,卡拉胶多糖的糖苷键会发生断裂,从而使多糖降解为小分子片段[3]。通过控制酸的浓度、温度以及时间可获得相对分子质量大小不一的降解产物。

通过酸水解可以获得多种卡拉胶低聚糖及寡糖组分[9-10]。Yang 等通过温和酸水解方法(用 0.1 mol/L H_2SO_4 在 60 ℃降解 1.5 h)得到聚合度 3~17 奇数 κ-卡拉胶寡糖[11]。Hipolito 等对 κ-卡拉胶采用 0.1 mol/L TFA 在 65 ℃降解 30 min 来进行部分水解,其水解产物为低相对分子质量多糖片段[12]。

对比其他降解方法,酸降解不易控制反应条件,降解产物复杂,并且会对多糖结构造成破坏,进

而影响生物活性[13]。

1.1.2 物理降解 物理降解主要有超声降解、辐射降解、微波降解。用 γ 射线在固体、凝胶或溶液中以不同剂量照射,可降解 κ-、ι-和 λ-卡拉胶,且得到的产物相对分子质量分布窄[14]。魏元臣等通过微波降解法得到的不同相对分子质量 λ-卡拉胶,并且证明了降解产物能够使健康小鼠的免疫能力增强[15]。对于超声波降解多糖,其反应过程中易于控制反应条件,便于得到目标产物,且解聚物为具有较窄相对分子质量分布的产物。Tecson 等采用低质量浓度的 κ-卡拉胶底物(5.0 mg/mL)、高振幅的仪器处理(85%)和长处理时间(180 min)的超声波处理,获得了平均相对分子质量(AMW)为 41 864 的 κ-卡拉胶,这比初始 AMW 为 1 139 927 的原始样品减少了 1 098 063(96.3%)[16]。

1.1.3 酶降解 由于化学降解和物理降解的降解条件不易控制,且极易引起多糖结构的破坏,因此生物降解法受到了研究者们极大的关注[17]。卡拉胶酶是一种糖苷水解酶,可以降解卡拉胶的 β-1,4 糖苷键,从而获得卡拉胶低聚糖。由于酶法降解具有底物专一性、高效性、对环境友好、无副反应、工艺易于控制等优点,是一种理想的降解方式,目前已逐渐代替传统的降解方法。

1.2 降解后的卡拉胶多糖的分子修饰

研究者提出了许多化学修饰方法来修饰卡拉胶的理化性质。大多数修饰的目的是通过用新的官能团取代生物聚合物 *D*-半乳糖-4-硫酸盐部分中的原醇基团来诱导新的性质。改性反应包括硫酸化[18]和脱硫酸化[19]、乙酰化[20]、烷基化[12]、磷酸化[21]、自由基接枝共聚等[22]。

卡拉胶的硫酸化方法有很多,通过硫酸盐基团的引入,可以在一定程度上改变卡拉胶多糖的生物活性,其中最常用的 3 种包括氯磺酸-吡啶法[23]、硫酸化法[24]和三氧化硫-吡啶法[25]。对于脱硫酸化,则涉及卡拉胶硫酸化酶,详情见下文。乙酰化则通过酰基转移酶催化,这种化学修饰不仅可以影响不同化合物的功能,而且可以改变溶解度、稳定性或细胞靶的不同性质[26-27]。Yamada 等发现,乙酰化的低相对分子质量硫酸卡拉胶具有潜在的抗 HIV 活性;同时,卡拉胶多糖在水中的溶解度直接受到乙酰化程度的影响;λ-和 κ-卡拉胶的高取代率表明其不溶于水[28]。卡拉胶的烷基化也会对卡拉胶的生物活性产生影响。Uryu 等对硫酸寡糖进行分子修饰,引入烷基,发现其修饰产物抗 HIV 的能力得到了提高,而不含烷基的硫酸寡糖抗 HIV 活性较低[29]。袁华茂通过对降解得到的卡拉胶寡糖混合物进行了磷酸化结构修饰,结果表明硫酸化后的卡拉胶在不同的抗氧化模型中具有较卡拉胶寡糖更高的抗氧化活性,说明卡拉胶寡糖的化学修饰可以增强其抗氧化能力[30]。

除了上述的功能化方法外,接枝和交联还可用于化学改性聚合物。将可聚合的合成部分接枝到天然卡拉胶多糖上,然后进行聚合,这是一种产生大分子的方法,合成的大分子具有每种聚合物的某些特性[31]。例如,在 κ-卡拉胶上接枝丙烯酸,合成了 κ-卡拉胶型高吸水凝胶[32]。

2 卡拉胶酶的研究

卡拉胶酶归属于糖苷水解酶家族,其作用模式均为内切型,可专一性的裂解卡拉胶分子内部的 β-1,4 糖苷键,产物为一系列聚合度为偶数的低聚卡拉胶[33]。由于卡拉胶酶在水解卡拉胶多糖的过程中,反应条件温和,底物具有专一性以及所产生的产物均一,因此该法正受到越来越多的关注[8]。近年来,针对海洋微生物所产生的卡拉胶酶对卡拉胶多糖的降解和利用的研究,主要集中在卡拉胶酶的性质、结构与功能之间的关系等。作者将从卡拉胶酶的来源、种类、酶学性质、结构和催化机制以及应用这几个方面来介绍卡拉胶酶的研究进展。

2.1 卡拉胶酶的来源与种类

卡拉胶酶的来源主要是海洋微生物和海洋动物。比如以海藻为食的软体动物,Mori 等从海洋软体动物中纯化并鉴定了第一种卡拉胶酶[34]。Skea 等在新西兰食草鱼内脏中曾提取到可降解卡拉胶的酶[35]。然而,对于大多数已报道的卡拉胶酶,均是从海洋微生物中分离出来的。产卡拉胶酶的海洋微生物种类主要包括 *Pseudomonas*、*Pseudoalteromonas*、*Vibrio*、*Shewanella*、*Cellulophaga*、*Cytophaga*、*Microbulbifer*、*Tamlana*、*Pedobacter*、*Alteromonas* 和 *Zobellia* 等。在已发现的卡拉胶酶中,根据其降解底物的专一性,主要分为 κ-卡拉胶酶、ι-卡拉胶酶、λ-卡拉胶酶。

2.1.1 κ-卡拉胶酶 κ-卡拉胶酶是所有卡拉胶酶中分布与应用最为广泛的一种酶,属于 16 糖苷水解酶家族。该类型的酶能够特异性水解 β-4-硫酸-

D-半乳糖和 α-3,6 内醚-*D*-半乳糖之间的 β-1,4 糖苷键,生成以硫酸化新 κ-卡拉寡糖为主的产物[33]。具有一定活性的 κ-卡拉胶酶可从海洋细菌或动物体内某些组织获得。根据目前已有报道,能够产生 κ-卡拉胶酶的菌株包括 *Alteromonas macleodii* KS62[36]、*Bacillus* sp. SYR4[37]、*Cytophaga* MCA-2[38]、*Cellulophaga lytica*[39]、*Pedobacter hainanensis* 13-Q[40]、*Pseudoalteromonas* sp. ZDY3[41]、*Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2[42]、*Pseudomonas elongata* MTCC 5261[43]、*Pseudomonas carrageenovora* HLX250[44]、*Pseudoalteromonas porphyrae* LL-1[45]、*Pseudoaltero-monas carrageenovora* NCMB.302[46]、*Shewanella* sp. Kz7[47]、*Vibrio* sp. SY01[48]、*Pseudoalteromonas tetraodonis* JAM-K142[49]、*Tamlana* sp. HC4[50]等。Kalitnik 等从红藻 *Tichocarpus crinitus* 中筛选出 28 株具有降解 κ-卡拉胶能力的菌株,且他们均属于 Phyla-bacteroidetes 和 Proteobacteria 种类[51]。也有研究表明,海洋环境中存在大量的细菌细胞外膜囊泡携带具有活性的 κ-卡拉胶酶[36]。海洋无脊椎动物 *Turbo cornutus* 的肠道中也被证明了可以分离出一种能降解琼脂、藻酸盐和 κ-卡拉胶的 *Microbulbifer agarilyticus* GP101[52]。

研究表明,κ-卡拉胶酶是对其 κ-卡拉胶内部的 β-1,4 键上进行剪切[40]。在降解过程中,κ-卡拉胶酶对卡拉胶的降解是随机的,且当卡拉胶为凝胶状时卡拉胶酶对其的降解速率最快[46]。通过 κ-卡拉胶酶降解卡拉胶得到的低聚糖具有更高的同质性和更低的多分散性[53]。对于高聚合度的 κ-卡拉胶寡糖的制备,Cui 等从 *Cellulophaga lytica* strain N5-2 中克隆并异源表达了一个新的 κ-卡拉胶酶基因,其降解产物为新 κ-卡拉辛糖和新 κ-卡拉己糖[39]。

对于 κ-卡拉胶的降解,酶法水解相较于化学水解有许多优点,但其明显的缺点是酶的活性低,需要较长的反应时间,其他缺点包括酶活性的自发丧失和酶具有更昂贵的价格,这意味着还需要进一步探索酶的再利用[54]。而对于自由酶来说,需面临较多工业挑战,包括在非自然环境中稳定性低、分离和回收困难[55]。为了克服这些问题,酶固定化技术已被广泛用于提高酶的稳定性和可重复使用性。通过分子动力学模拟以及圆二色光谱分析将 κ-卡拉胶酶 CgkPZ 和 Ca^{2+}进行组装,合成一种新型的自组装 κ-卡拉胶酶-无机杂化纳米花 CaNF@CgkPZ,且催化效率增加了 292%[56]。

在现有的实验中,通过重组菌株培育出的 κ-卡拉胶酶对卡拉胶的降解可以获得很多具有活性的低聚卡拉胶。例如,*Pseudoalteromonas porphyrae* LL1 的 κ-卡拉胶酶的催化结构基因在 *Brevibacillus choshinensis* 中有效表达,且 100.0 mmol/L 的 Mg^{2+}能使 PpCgkCD 的活性显著提高 97.5%[57]。张成昊等将 *Pseudoalteromonas* JMUZ2 的 κ-卡拉胶酶基因在大肠杆菌中异源表达,结果表明,该酶属于 GH16 家族,最适反应温度和 pH 分别为 50 ℃和 8.0,重组酶对去垢剂 Tween 20、Tween 80 和 Triton X-100 有良好的耐受性,酶解产物对羟自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基具有一定清除作用,还具有良好的还原能力[58]。对从南极大型海藻表面分离的 *Polaribacter* sp. NJDZ03 的全基因组进行了分析,获得了一个推测的卡拉胶酶基因 *Car3206*,且该基因被克隆并在大肠杆菌中获得高效表达[59]。

由于卡拉胶具有较高的结构异质性,存在着典型的杂交卡拉胶。其中一种其结构由交替 β-卡拉胶和 κ-卡拉胶基序组成。Cao 等克隆、表达和表征了来自海洋细菌 *Wenyingzhuangia funcanilytica* CZ1127 的新型 GH16_13 furcellaran(一种部分硫酸化的 β/κ-卡拉胶)水解酶 Cgbk16A_Wf,该酶被命名为 βκ-卡拉胶酶,可以特异性地将 β-卡拉胶和 κ-卡拉胶之间的 β-1,4 糖苷键从非还原端切割到还原端,其相对分子质量为 43 000,且作用模式不依赖于 NaCl,被 Cu^{2+}、Mg^{2+}、Hg^{2+}、Mn^{2+}、β-巯基乙醇抑制,在 50 ℃和 pH 6.0 下表现出最大活性,并表现出高热稳定性[60]。

2.1.2 ***ι*-卡拉胶酶** 有关 ι-卡拉胶酶的报道较少,该酶属于 82 糖苷水解酶家族。该类型的酶能够特异性水解 β-4-硫酸-*D*-半乳糖和 α-2-硫酸-3,6-内醚-*D*-半乳糖之间的 β-1,4 糖苷键,生成以硫酸化新 ι-卡拉寡糖为主的产物[33]。根据目前已有报道,能够产生 ι-卡拉胶酶的菌株包括 *Alteromonas fortis*[61]、*Brevibacillus choshinensis*[62]、*Cellulophaga* sp.QY3[63]、*Flavobacterium* sp. YS-80-122[64]、*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T[65]等。

Barbeyron 等对来自 *Zobellia galactanovorans* 和 *Alteromonas fortis* 的两种 ι-卡拉胶酶进行分析比对,结果表明,*Z. galactanovorans* 和 *A. fortis* ι-卡拉胶酶基因编码的同源蛋白质相对分子质量分别为53 400 和 54 800,相似性达到 59%,同源性达到

43%,且这两种酶都能专一性降解 ι-卡拉胶,作用方式均为内切[66]。

ι-卡拉胶酶从 *Alteromonas fortis* 中首次被提取并表征其酶学性质[61]。Hatada 等从 *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T 的基因组中获得一个 ι-卡拉胶酶基因,酶解终产物 ι-卡拉四糖占总产物的 75%以上,这种酶可能有助于工业生产单一的 ι-卡拉胶低聚糖,此外还证明了保守的 Glu351 对催化作用至关重要[65]。Ma 等从 *Cellulophaga* sp. 和 *Cellulophaga* sp. QY3 中分离并鉴定了两种新的 ι-卡拉胶酶,不仅丰富了 GH82 家族 ι-卡拉胶酶资源,而且对 GH82 家族酶的结构与功能阐释有重要意义[63,67]。

有研究报道,ι-卡拉胶酶 Cgi82A 在大肠杆菌中表达,并对其生化特性、动力学常数和水解模式进行了表征,该酶在 25 ℃时达到最高活性,低于迄今报道的所有 GH82 ι-卡拉胶酶,它是一种内源性水解酶,可作为一种潜在的生物催化剂,制备不同聚合度的卡拉胶寡糖[68]。最近,来自 *Cellulophaga baltica* 的 ι-卡拉胶酶的酶学性质也被进行报道,并且通过单因素实验优化了最大 ι-卡拉胶酶产量[69]。

2.1.3 λ-卡拉胶酶 对于 λ-卡拉胶酶的报道很少,由于缺少其序列信息,因此该酶构成了与包含 κ-卡拉胶酶的 GH16 家族和包含 ι-卡拉胶酶的 GH82 家族没有关系的一个新的 GHs 家族[70]。该类型的酶能够特异性水解 β-2-硫酸-*D*-半乳糖和 α-2,6-硫酸-*D*-半乳糖之间的 β-1,4 糖苷键,生成以硫酸化新 λ-卡拉寡糖为主的产物[33]。根据目前已有报道,能够产生 λ-卡拉胶酶的菌株包括 *Bacillus* sp. Lc50-1[71]、*Pseudoalteromonas* sp. CL19[72]、*Pseudoalteromonas carrageenovora*[73]等。

1955 年,Gauthier 等发现了一种来自海藻细菌 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的 λ-卡拉胶酶,并对其基因进行了克隆[73]。2006 年,Ohta 等从深海沉积物样品中分离到一株含有 λ-卡拉胶酶的 *Pseudoalteromonas* sp.CL19 菌株并对其进行了纯化及表征,这是首次分离 λ-卡拉胶酶及其基因序列的报道[72]。2014 年,首次证实温泉细菌中存在耐热性 λ-卡拉胶酶,并且纯化并表征其生理活性[71]。2015 年,有相关报道指出通过 λ-卡拉胶酶降解所获得的 λ-卡拉胶寡糖具有抗肿瘤和血管生成的活性,并且这种活性与该卡拉胶的聚合程度有关[74]。

2.2 不同种类卡拉胶酶的酶学性质

2.2.1 κ-卡拉胶酶的酶学性质 已报道的 κ-卡拉胶酶的相对分子质量分别在 20 000~128 000。最小和最大的相对分子质量分别是来自 *Zobellia* sp. ZM-2 和 *Pseudomonas elongata* MTCC 5261 的 κ-卡拉胶酶,其对应相对分子质量为 20 000 和 128 000[43,75]。根据已有报道,大部分 κ-卡拉胶酶的最佳温度在 30~55 ℃。但也有一些酶的最适温度超出此范围,例如,来自 *Cytophaga* sp.Ik-C783、*Pseudoalteromonas* sp.WZUC10 和 *Wenyingzhuangia aestuarii* OF219 的 κ-卡拉胶酶,其最佳温度为 25 ℃[76-78]。而来自 *Bacillus* sp. HT19 的 κ-卡拉胶酶的最佳温度为 60 ℃,是迄今为止最具耐热性能的 κ-卡拉胶酶,具有一定程度的应用潜力[79]。大多数报道的 κ-卡拉胶酶的最佳 pH 范围是 7.2~8.0,这与海水的 pH 接近。然而,一些卡拉胶酶在酸性(pH 6)或中性(pH 7)条件下显示其最佳活性。例如,来自 *Zobellia* sp. ZM-2 和 *Cellulophaga lytica* strain N5-2 的 κ-卡拉胶酶的最适 pH 分别为 6 和 7[75,80]。此外,一个特殊的例子是,从 *Pseudomonas elongata* MTCC 5261 中分离出的 κ-卡拉胶酶其活性在酸性(pH 5.6)和碱性(pH 7.7)中都是最佳的[43]。其他 κ-卡拉胶酶的酶学性质见表1[36-50,53-54,59,75-88]。

表 1 κ-卡拉胶酶的酶学性质

Table 1 Enzymatic properties of κ-carrageenase

来源	相对分子质量	最适温度/℃	最适 pH	产物	激活剂	抑制剂	文献
Alteromonas macleodii KS62	–	–	–	–	–	–	[36]
Antarctic macroalgae	40 000	50	6.0	二糖、四糖	Na^+、K^+、Fe^{2+}	Si^{2+}、Ca^{2+}、Ni^{2+}、Ba^{2+} Mn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Mg^{2+}	[81]
Bacillus sp.SYR4	50 600	30	7.5	二糖	Mg^{2+}、K^+、Ca^{2+}、Na^+	–	[37]
Bacillus sp. HT19	45 000	60	7.0	二糖	Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}	Si^{2+}、Fe^{2+}	[79]

续表 1

来源	相对分子质量	最适温度/℃	最适pH	产物	激活剂	抑制剂	文献
Bacillus sp.HTI9	45 000	40	7.0	二糖	—	—	[54]
Cytophaga MCA-2	30 000	35	7.0	四糖、六糖	K^+、Ca^{2+}、Na^+	Al^{3+}、Hg^{2+}、Pb^{2+}	[38]
Cytophaga sp.Ik-C783	100 000	25	7.6	—	—	—	[76]
Cellulophaga lytica strain N5-2	55 240	35	7.0	六糖、八糖	Na^+	K^+、SDS、EDTA	[39]
Cellulophaga lytica	40 800	35	7.0	二糖、六糖	—	—	[53]
Cellulophaga lytica strain N5-2	40 800	35	7.0	二糖、六糖	—	—	[80]
Polaribacter sp.NJDZ03	45 000	55	7.0	二糖	K^+、Ca^{2+}、Na^+	Cu^{2+}、Cr^{2+}	[59]
Pedobacter hainanensis 13-Q	55 000	40	7.0	二糖、四糖 六糖、八糖	—	—	[40]
Pedobacter hainanensis NJ-02	57 120	40	7.0	四糖、六糖	Na^+	Zn^{2+}、Cu^{2+}	[82]
Pseudomonas aeruginosa ZSL-2	–	28	8.0	二糖、四糖	—	—	[42]
Pseudomonas elongata MTCC 5261	128 000	40	7.7	—	—	—	[43]
Pseudoalteromonas sp.ZDY3	42 000	45	8.0	二糖、四糖	—	—	[41]
Pseudoalteromonas sp.QY202	33 200	40	8.0	二糖、四糖	Na^+、K^+	Hg^{2+}、Cu^{2+}	[83]
Pseudoalteromonas sp.QY203	34 000	40	8.0	二糖、四糖	Na^+	Cu^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Al^{3+}、Ni^{2+}	[84]
Pseudoalteromonas sp.QY203	34 000	55	7.2	二糖、四糖	Na^+、K^+	Cu^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Al^{3+}	[85]
Pseudoalteromonas WZUC10	45 000	25	7.5	四糖、六糖	—	—	[77]
Pseudoalteromonas sp. Aj5-13	35 000	55	8.0	四糖、六糖	—	—	[86]
Pseudoalteromonas porphyrae LL-1	40 000	55	8.0	四糖	Mg^{2+}、Ba^{2+}	Cu^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}	[45]
Pseudomonas carrageenovora HLX250	—	—	7.5	二糖、四糖 六糖、八糖	—	—	[44]
Pseudoalteromonas carrageenovora NCMB.302	—	—	—	二糖、四糖	—	—	[46]
Pseudoalteromonas tetraodonis JAM-K142	43 000	55	8.0	—	Mg^{2+}、K^+、Na^+	EDTA、EGTA	[49]
Shewanella sp.Kz7	45 000	45	8.0	二糖、四糖	—	—	[47]
Tamlana sp.HC4	66 000	30	8.0	二糖、四糖	—	Zn^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、K^+、Ba^{2+}	[50]
Vibrio sp.SY01	43 000	40	7.5	二糖	—	—	[48]
Vibrio sp.NJ-2	33 000	40	8.0	二糖、四糖 六糖、八糖	K^+、Ca^{2+}、Na^+	Cu^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}	[87]
Vibrio sp.CA-1004	35 000	40	8.0	二糖、四糖	—	Cu^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+}	[88]
Wenyingzhuangia aestuarii OF219	58 000	25	8.0	二糖、四糖	Cd^{2+}、Ca^{2+}	Mn^{2+}、Hg^{2+}、SDS、EDTA·Na_2	[78]
Zobellia sp. ZM-2	20 000	39	6.0	十糖	Na^+、DTT	Cu^{2+}、Pb^{2+}、SDS、EDTA	[75]

2.2.2 ι-卡拉胶酶的酶学性质 有关ι-卡拉胶酶的酶学性质报道较少(见表2),其相对分子质量在31 000~58 000。最小的和最大的相对分子质量分别是来自 *Cellulophaga baltica* 和 *Brevibacillus choshinensis* 的ι-卡拉胶酶，其对应相对分子质量为31 000和58 000 [62,69]。来自*Cellulophaga* sp.QY3、*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T 的ι-卡拉胶酶最适温度为50 ℃，是迄今为止所报道的ι-卡拉胶酶的最佳温度[63,65]。而来自 *Wenyingzhuangia fucanilytica* 的ι-卡拉胶酶在25 ℃时可达到最高活性，低于目前报道的所有GH82 ι-卡拉胶酶[68]。对于来自*Flavobacterium* sp.YS-

80–122 的 ι–卡拉胶酶在温度为 10 ℃和 15 ℃下分别显示出最大活性的 36.5%和 57%，而且在热休克后恢复了 58.2%的初始活性，这表明该酶是具有抗寒性、耐热性,同时该酶还表现出 NaCl 独立性和高的新 ι–卡拉四糖产率,这将是海藻多糖生产 ι–卡拉胶寡糖工业应用的优质候选者[64]。目前已报道的 ι–卡拉胶酶的最适 pH 在 6.5~8.0。值得注意的是,来自 *Brevibacillus choshinensis* 与 *Cellulophaga* sp. 的 ι–卡拉胶酶分别在 pH 6.0~11.0 与 pH 6.0~9.6 相对较宽范围内表现出一定的稳定性[62,67]。

表 2 ι–卡拉胶酶的酶学性质

Table 2 Enzymatic properties of ι–carrageenase

来源	相对分子质量	最适温度/℃	最适 pH	产物	激活剂	抑制剂	文献
Alteromonas fortis	—	—	—	四糖、六糖	—	—	[61]
Brevibacillus choshinensis	58 000	45	8.0	四糖	Na^+、Mg^{2+}、K^+	—	[62]
Cellulophaga sp.QY3	48 300	50	7.0	二糖、四糖	Na^+、K^+	Cu^{2+}、Ba^{2+}、Fe^{3+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}、Al^{3+}	[63]
Cellulophaga sp.	54 000	45	6.5	四糖	Na^+、K^+、Ca^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+}	SDS、EDTA、Cu^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{3+}、Zn^{2+}	[67]
Cellulophaga baltica	31 000	40	7.5~8.0	—	Na^+、K^+、NH_4^+	Ca^{2+}、Fe^{3+}、Mg^{2+}	[69]
Flavobacterium sp.YS–80–122	51 000	30	7.6	二糖、四糖	Na^+、Mg^{2+}、K^+、Ca^{2+}	Cu^{2+}、Zn^{2+}、SDS、EDTA	[64]
Microbulbifer thermotolerans JAMB–A94T	55 000	50	7.0	四糖	Na^+、Ca^{2+}	EDTA	[65]
Wenyingzhuangia fucanilytica	55 000	25	8.0	二糖、四糖	Na^+	Zn^{2+}、Hg^{2+}、SDS	[68]

2.2.3 λ–卡拉胶酶的酶学性质 目前仅有 3 种 λ–卡拉胶酶的酶学性质被报道（见表 3）。1995 年，Gauthier 等报道了来自 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的 λ–卡拉胶酶，其相对分子质量为 105 000，是迄今为止相对分子质量最大的 λ–卡拉胶酶[73]。2006 年,Ohta 等报道了来自 *Pseudoalteromonas* sp.CL19 的 λ–卡拉胶酶，该酶的相对分子质量约为 100 000,最佳 pH 和活性温度分别约为 7 和 35 ℃，最终产物主要为 λ–卡拉胶理想结构的四糖[72]。2014 年,Li 等报道了来自 *Bacillus* sp.Lc50–1 的 λ–卡拉胶酶,该酶可以在 75 ℃下降解 λ–卡拉胶,属于一种耐热的 λ–卡拉胶酶,并且该酶在 pH 6~9 下稳定，且在 85 ℃下保持约 50%的活性,并持续 10 min[71]。

表 3 λ–卡拉胶酶的酶学性质

Table 3 Enzymatic properties of λ–carrageenase

来源	相对分子质量	最适温度/℃	最适 pH	产物	激活剂	抑制剂	文献
Bacillus sp.Lc50–1	37 000	75	8.0	二糖	K^+、Ca^{2+}、Co^{2+}、Na^+	Sr^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Cd^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、EDTA	[71]
Pseudoalteromonas sp.CL19	100 000	35	7	四糖	Na^+、K^+、Rb^+、Cs^+	—	[72]
Pseudoalteromonas carrageenovora	105 000	30	7.5	二糖、四糖	—	—	[73]

2.3 不同种类的卡拉胶酶序列分析

序列比较是生物信息学中最基本、最重要的操作。比较序列之间的相似性和差异性对于分析序列的结构特征、亲缘关系、进化地位及生物功能等方面具有重要的意义和价值[89]。

针对 κ–卡拉胶酶,Barbeyron 等分别从*Alteromonas carrageenovora* 与 *Cytophaga drobachiensis* 中克隆出两种新的 κ–卡拉胶酶基因，并表明 κ–卡拉胶酶中的 Glu163 残基对酶的催化作用很重要,且得出 GH16 糖苷水解酶家族之间的一般同源性是通过基因复制产生的结论[90–91]。近年来,相继从 *Pseudoalteromonas tetraodonis*、*Zobellia* sp. ZM –2、*Pseudoalteromonas* sp. QY203 中克隆并表征出几种新的 κ–卡拉胶酶基因[49,75,84]。值得注意的是,来自

Pseudoalteromonas tetraodonis 与 *Pseudoal-teromonas carrageenovora* 的 κ-卡拉胶酶具有高度相似性,同源性为 94%[49]。对于以上几种 κ-卡拉胶酶,做出序列比对,结果如图 2 所示(其中 GenBank 为 ADD92366.1、AHN05534.1 的两种 κ-卡拉胶酶的蛋白质序列已上传,但并未有相关文献进行描述)。结果发现,来自 *Pseudoalteromonas* sp. QY203 与 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的同源性最高,达到了 97%。对于参与底物结合和活性催化所必需的几个残基在这些序列中高度保守,如 Glu171、Asp173、Glu176、Asp194、Leu197、Ser271 和 Leu274,其中 3 个残基(Glu171、Asp173 和 Glu176)参与底物的结合[92]。

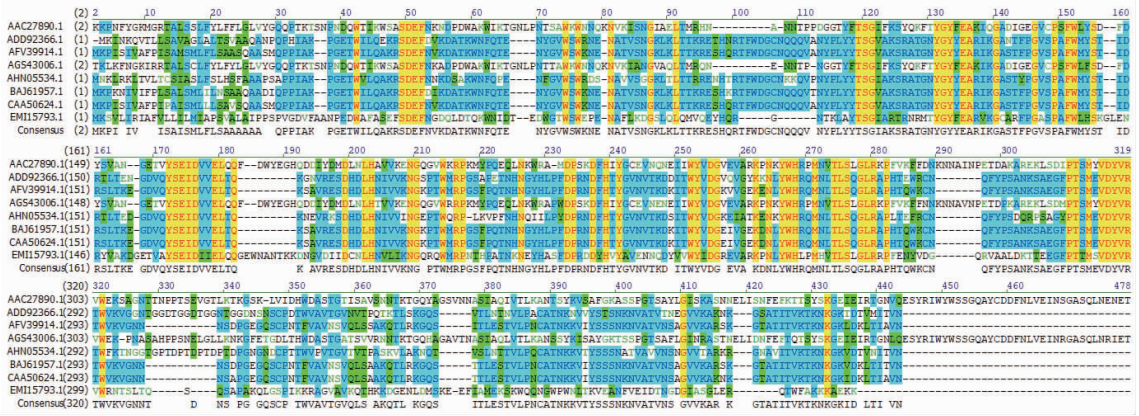


图 2 不同来源的 κ-卡拉胶酶的多序列比对

Fig. 2 Multi-sequence alignment of κ-carrageenases from different sources

对于 ι-卡拉胶酶,目前有 7 种基因已被克隆分析。早期,Barbeyron 等从 *Zobellia galactanovorans* 中克隆出一种新的 ι-卡拉胶酶基因,并表明该卡拉胶酶是一个与 κ-卡拉胶酶家族不相关的新家族[66]。之后,随着对 ι-卡拉胶酶的深入探索,又从 *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T 与 *Wenyingzhuangia fucanilytica*、*Brevibacillus choshinensis* 中鉴定出 3 种新的 ι-卡拉胶酶基因[62,65,68]。值得注意的是,Ma 等从 *Cellulophaga* sp. 和 *Cellulophaga* sp. QY3 克隆出两种新的 ι-卡拉胶酶基因,并表明存在 3 个严格保守的残基(G228、Y229、R254)对底物结合起重要作用[63,67]。近年来,Li 等从 *Flavobacterium* sp. YS-80-122 中克隆并表征了一种具有耐寒性、耐热性的新的 ι-卡拉胶酶基因[64]。从 ι-卡拉胶酶序列比对图得出,来自 *Cellulophaga* sp. QY3 与来自 *Zobellia galactanivorans* 的同源性最高,达到了 79%(见图3)。

关于 λ-卡拉胶酶,目前已发现两种该酶的基因,且同源性达到 98%,故不在此做序列分析。

2.4 卡拉胶酶结构和作用机制

2.4.1 卡拉胶酶的结构 目前,针对卡拉胶酶的研究较少,仅有 4 个卡拉胶酶的晶体结构被完整表征出来。第一个得到结构解析的卡拉胶酶是来自于 *Pseudomonas carrageenovora* 的 κ-卡拉胶酶(PcCgkA)[92]。此外,还有来自 *Zobellia galactanivorans* DsiJT 的 ZgCgkA [93-95]、*Alteromonas fortis* 的 ι-卡拉胶酶(CgiA)[96]和来源于 *Bacteroides ovatus* 的外切卡拉胶酶[95-97]。

PcCgkA 和 ZgCgkA 都属于 κ-卡拉胶酶,它们两者的结构非常相似,都属于 β-夹心结构,其中包括两个反向平行的 β-折叠片和 6 个延伸带构成的活性裂缝[95]。在二级结构层面,该 β 型果冻卷折叠是由 3 个小的反平行的 β-折叠片和一条 α 螺旋组成。β-折叠片两两反向堆积形成催化腔,如隧道状镶嵌在三明治状的结构中,隧道状催化中心的裂缝位置便是酶与底物的结合处,这种隧道活动场所暗示着一种过程性的作用模式(见图 4(a)和(b))。

PcCgkA 和 ZgCgkA 之间也存在微小的差异。第一个明显区别是 κ-卡拉胶酶的模块结构。即使两者都是分泌酶,但只有 ZgCgkA 拥有一个 CBM(碳水化合物结合模块)。附加在催化 GH 模块上的 CBM 的存在,一般与相邻的酶在固体形式下处理顽固的、复杂的底物有关,如在植物细胞壁中所遇到的情况[98-100]。这也从一定方面说明从菌体中分泌的

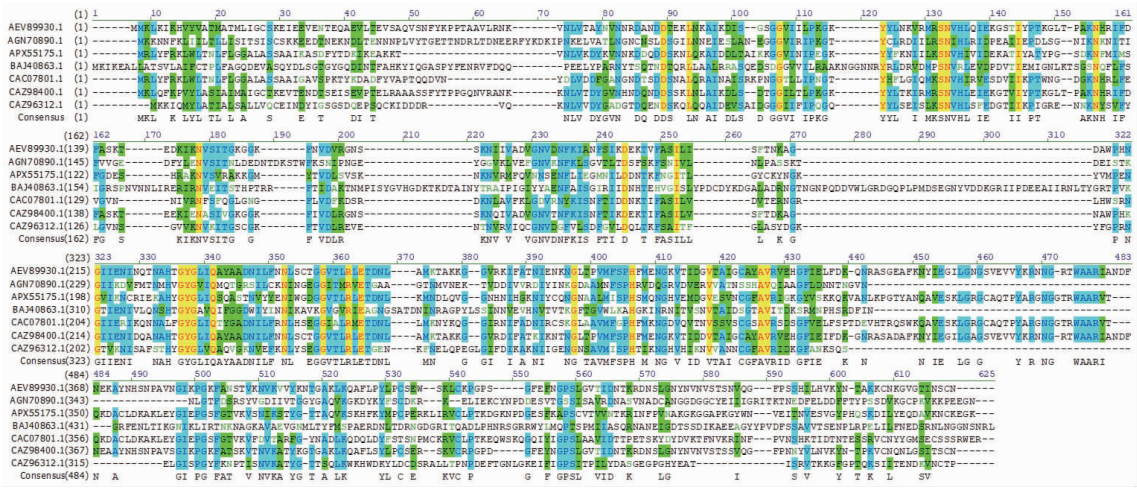
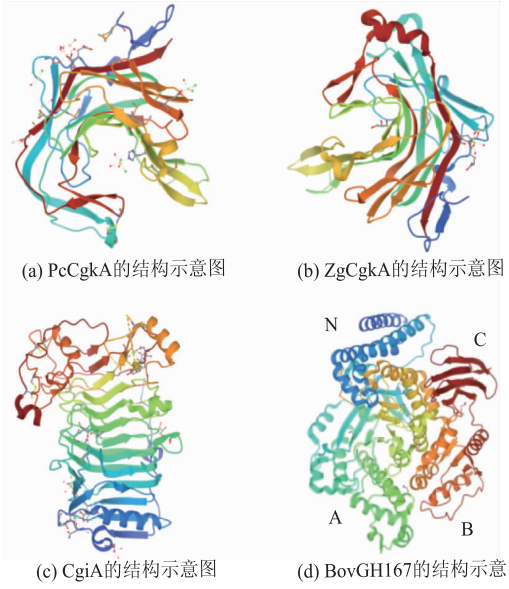


图 3　不同来源的 ι–卡拉胶酶的多序列比对

Fig. 3　Multi–sequence alignment of ι–carrageenases



(a) PcCgkA的结构示意图　(b) ZgCgkA的结构示意图

(c) CgiA的结构示意图　(d) BovGH167的结构示意图

图 4　不同家族的卡拉胶酶结构

Fig. 4　Structure of different families of carrageenan

ZgCgkA 可能会降解海藻细胞壁内的半结晶 κ–卡拉胶。此外,与 PcCgkA 相反,DP6 不被 ZgCgkA 水解,也就是说 DP8 是能被 ZgCgkA 降解的最小寡糖[101]。对于 PcCgkA,DP6 完全由随机加工产生,而 DP4 由随机和过程性作用模式产生[46]。对于同类型酶的结构多样性可能是由各种进化事件造成的,如水平基因转移或序列复制后的分化进化等。

CgiA 晶体结构的分析是 82 家族糖苷水解酶的首次报道。CgiA 的结构为右手平行的 β–螺旋状结构,由 10 个完整的具有右旋性的平行 β–螺旋结构和表面 Loop 组成(见图 4(c))。与 PcCgkA 和 ZgCgkA 相比,CgiA 具有两个额外的 C 端结构域(A 结构域和 B 结构域)。结构域 A 类似于 DNA/RNA 的结合蛋白质,结构域 B 则是由两个二硫键组成的环构成。Glu245、Asp247 或 Glu310 在酶的裂缝中被认为是候选的催化残基。同时,该酶还含有一个钠和一个氯化物结合位点以及 3 个钙结合位点,这表明这些离子会参与稳定酶结构。

来自 *Bacteroides ovatus* 的卡拉胶酶(BovGH167)结构显示了 4 个结构域,其中 3 个在 GH42 家族中经常见到(见图 4(d))。保守域是结构域 A,催化 $(\alpha/\beta)_8$–桶状结构域;结构域 B 是一个由 α–螺旋包围的 5 股平行 β 片;结构域 C 是一个反平行的 β–三明治状,独特的结构域是在 N 端有一个全 α 螺旋的区域。

2.4.2　卡拉胶酶的催化机制　根据糖水解酶在水解过程中其异头碳的构象是否变化,可分为两类:保持型和倒置型。

1995 年,Potin 等从 *Alteromonas carrageenovora* 细菌中纯化出一种 κ–卡拉胶酶,并且对其进化和水解机制进行了表述[102]。该酶的 N 末端的信号肽和 C 末端均被加工。通过免疫印迹法表明,成熟的 κ–卡拉胶酶须由一个前体蛋白质在分泌过程中经过两次水解才能获得。在该酶水解 κ–卡拉胶后,利用凝胶过滤色谱和 ^{13}C–NMR 分析水解产物新 κ–卡拉六糖,发现该寡糖异头碳的构象并没有发生改变,这表明在酶解过程中异头碳的构象未发生变化是属于保持异构构型的分子机制(见图 5)。这一结果同 GH16 糖苷水解酶家族的其他糖苷水解酶在酶解过程中的催化机制相一致。

κ-卡拉胶酶的反应机制如下,酶结构催化腔主要参与催化作用的氨基酸分别是 Glu163、Glu168、Asp165,其中谷氨酸残基 E163 作为亲核催化,谷氨酸残基 E168 作为酸碱催化,而天冬氨酸 D165 可以促进中间转换状态的解体。在催化开始时,底物-1 处的精氨酸残基 R260 将会结合 κ-卡拉胶的硫酸脂基,其目的是用于识别底物,保证酶的专一性。该酶的反应机理为双置换反应,具体反应过程如图 5 所示。

1)Glu 的羧基发生亲核取代反应,与底物的异头碳 C1 生成共价键,在此过程中,Glu163 和 Asp165 因为位阻较大暂时无法形成氢键。

2)Asp165 作为质子供体与异头碳 C1 竞争性结合,由于位阻减小,因此 Asp165 和 Glu163 之间形成氢键,此时 Glu163 发生酸碱催化,导致水分子的电离。

3)Glu163 和 Asp165 之间的低位阻氢键得以恢复,Glu163 的亲核取代基保持负电的状态,并且开始准备参与新一轮的催化反应。

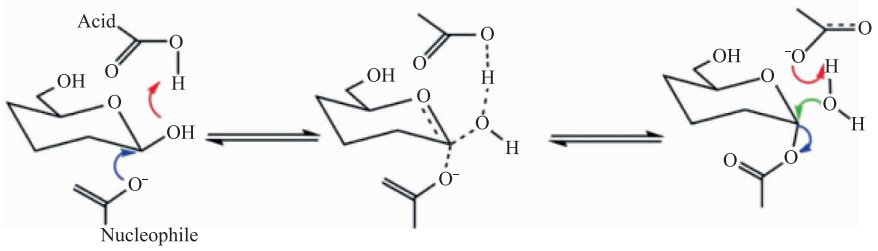


图 5 κ-卡拉胶酶通过双置换反应降解卡拉胶的保留机制

Fig. 5 Retention mechanism of κ-carrageenase degradation of carrageenan by double substitution reaction

ι-卡拉胶酶的反应机制是通过一步亲核取代作用于 β-1,4 糖苷键,同时还发生转糖基和转变异构构型,因此该酶的催化机制为倒置型。这种相互作用机制主要体现在糖链上 β-螺旋在凹槽上进行移动,形成一种酶-底物结合的开放式复合物;随着酶解过程的进行,该结构折叠闭合,其目的是保证糖链降解之后不会脱离酶的作用位点,使得催化反应能够继续进行。

Barbeyron 等研究了 ι-卡拉胶酶的降解机制,发现该酶是通过一步亲核取代作用于 β-1,4 糖苷键,同时还发生了转糖基和转变异构构型,其水解产物主要是硫酸化新 ι-卡拉二糖[66]。Potin 等对水解产物进行了分析,发现该酶降解 ι-卡拉胶的方式是通过异头碳构象倒置,作用于其内部的 β-1,4 糖苷键,有别于 κ-卡拉胶酶的保持型[102]。这种相互作用机制主要体现在糖链上 β-螺旋在凹槽上进行移动,形成一种酶-底物结合的开放式复合物;随着酶解过程的进行,该结构折叠闭合,其目的是保证糖链降解之后不会脱离酶的作用位点,使得催化反应能够继续进行(见图 6)。

2.5 卡拉胶酶的应用

目前,卡拉胶已被广泛应用于食品、医药等多方面的工业生产中。研究表明,降解后的卡拉胶具有抗凝血、抗肿瘤、增强人体体液免疫和细胞免疫,

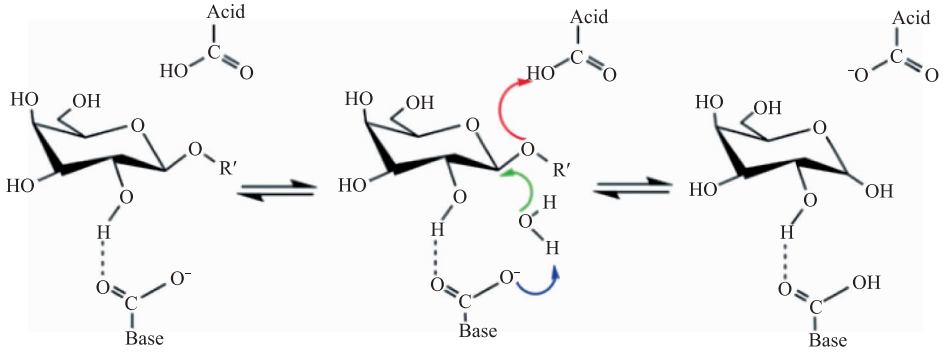


图 6 ι-卡拉胶酶通过单置换反应降解卡拉胶的倒置机制

Fig. 6 Inversion mechanism of ι-carrageenase degradation of carrageenan via a monosubstitution reaction

以及抗病毒等多方面生物活性[7]。通过酶解法降解卡拉胶,反应过程和条件易于控制且不破坏糖链结构,因此酶解法受到了越来越多的关注。卡拉胶酶是酶解过程中所需要的酶,因其具有底物的专一性,研究卡拉胶酶具有深远的应用价值和理论意义。

2.5.1 制备卡拉胶寡糖 据报道的卡拉胶寡糖及其修饰后的衍生物具有很多功能的生物活性。郭丹等通过酶解法制备了低相对分子质量的卡拉胶,随后进行磺化修饰,获得了具有不同硫酸基含量的卡拉胶寡糖衍生物,发现新 κ-卡拉胶寡糖具有显著的抗肿瘤活性,并证明了其空间结构、相对分子质量以及硫酸基团的含量和存在位置都会影响卡拉胶衍生物的生物活性[3]。又比如 2019 年,陈梦等通过酶解法和醇沉法,并与 KCl 溶液混合,以此获得高结合率的低相对分子质量的 κ-卡拉胶钾(LCP),结果表明,LCP 对自发性高血压大鼠有稳定且持续的降压作用,此外,还显著降低血液中脂多糖的水平(P<0.05),并显著改善了肠道上皮结构的完整性,该研究填补了 LCP 在心脑血管疾病领域的空白[103]。另外,卡拉胶寡糖还表现出抗氧化、抗血栓、增强免疫的作用[104-106]。

2.5.2 用于海藻遗传工程 由于卡拉胶主要存在于红藻细胞壁中,其黏度很大,DNA 提取困难。因此,可以通过卡拉胶酶和其他酶共同作用来降解海藻细胞壁,用于提取 DNA、蛋白质和原生质体等物质。

1995 年,Fleurence 等通过使用不同的酶来降解细胞壁从而提取蛋白质,不同的酶与不同的海藻的反应均在最适反应条件下进行,结果表明,用纤维素酶与卡拉胶酶或琼脂酶结合使用,在 2 h 内可获得最高产量的蛋白质。该实验证明了多糖类的酶可以有效帮助降解细胞壁从而获得目的产物[107]。Zablackis 等通过纤维素酶与卡拉胶酶的协同作用,从 *Kappaphycus alvarezii* 中分离出来原生质体[108]。

2.5.3 研究卡拉胶的结构 卡拉胶是具有重复二糖单元的线性硫酸化多糖,因此可以通过卡拉胶酶水解其中糖苷键获得低聚卡拉胶,通过产物的结构分析来推测卡拉胶多糖的内部结构。Guibet 等通过 λ-卡拉胶酶来降解卡拉胶,并通过核磁共振技术研究寡糖产物,结果表明,λ-卡拉二糖单元中并不都含有 3 个硫酸基团,而是在部分单元中存在 4 个硫酸基团,该实验结果改变了人们先前所知的 λ-卡拉胶结构特征[109]。Antonopoulos 等通过重组 ι-卡拉胶酶降解 ι-卡拉胶,然后用高效液相色谱法进行分离,结合蒸发光散射测定 ι-卡拉胶寡糖的结构[110]。

2.5.4 其他应用 针对卡拉胶独特的生物活性,可以通过发酵改造的工程菌株获取重组卡拉胶降解酶,该重组酶的特点是为外切酶,专一识别单位仅为六糖,并且表现出抗阿尔兹海默症的活性[111]。此外,卡拉胶酶对于海藻废物处理的应用也引起越来越多的关注[37]。最后,有研究指出,以 κ-卡拉胶为原料,经脱硫、专一降解酶系的定向水解及菌种发酵,从而实现其乙醇转化,获得可工业生产的生物乙醇,这一途径在未来将会极大程度上缓解不可再生资源的供给压力[112]。

3 硫酸化酶的研究

卡拉胶的生物降解涉及卡拉胶酶和硫酸化酶,前者裂解糖苷键,后者催化去除硫酸盐。尽管大量的卡拉胶酶已被描述,但只确定了少数硫酸化酶的生物化学特征。它们都是在海洋细菌中观察到的,但从红藻基因组的分析中还没有预测到硫酸化酶[113]。

根据序列同源性、晶体结构和机制,硫酸化酶被分为 4 类。I 型硫酸化酶或依赖甲酰甘氨酸的硫酸化酶,包括绝大多数已知的硫酸化酶,以及迄今为止所有生化特性的碳水化合物硫酸化酶[114]。这个家族的成员是依赖 α-甲酰甘氨酸(fgly-dependent)的酶,含有 10 个高度保守的极性残基,参与硫酸盐识别和硫酸酯水解[19]。该家族最明显的特征是其中一个极性残基半胱氨酸(Cys)或丝氨酸(Ser)经过翻译后将转化为具有催化活性位点的醛残基(α-Fgly 残基)[114]。

II 型硫酸化酶包括依赖于 α-酮戊二酸的 Fe(II)烷基硫酸化酶,属于双加氧酶超家族[115]。该酶的催化作用需要分子氧(O_2)和 α-酮戊二酸作为共同底物,导致醛中的初级硫酸酯基团被氧化,同时导致 α-酮戊二酸氧化脱羧成琥珀酸。III 型硫酸化酶的代表是与 Zn^{2+}或 Mn^{2+}依赖性金属-β-内酰胺酶有关的酶[116]。

IV 型硫酸化酶指一个由非特征蛋白质组成的分支家族。其中具有代表性的酶是来自 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的 ι-卡拉胶硫酸化酶(PSC ι-CgsA)。研究表明,位于 *P. carrageenovora* 的 κ-卡拉胶酶产生的低聚 κ-卡拉胶

非还原端上的硫酸酯基团被特异性地消除,这表明硫酸化酶在 κ-卡拉胶的酶解后进行干预[117-118]。Weigl 等首次证明了从海洋细菌 *P. carrageenovora* 中获得了具有活性的卡拉胶硫酸化酶[119]。2014 年,Genicot 等纯化并表征了该酶。PSC ι-CgsA 的相对分子质量为 115 9 00,在 pH 8.3 和温度为(40±5) ℃时表现出最佳的活性和稳定性。序列分析表明,PSC ι-CgsA 与 *P. haloplanktis* TAC 125 的一个假定的非特征蛋白质 Q3IKL4 具有 90%以上的序列同源性,但除此之外,与已鉴定的硫酸化酶没有任何同源性,因此 PSC ι-CgsA 做为代表了一个新的硫酸化酶家族的第一个特征化成员[120]。

近来,学者对能够降解卡拉胶的菌株 *Pseudoalteromonas atlantica* T6c 进行了类似的研究,其基因组已经被测序[121]。一种对 ι-卡拉胶有活性的内切 ι-卡拉胶硫酸化酶被分离出来,并进行了生物化学鉴定。该酶特异性地去除 β-连接的半乳糖第 4 位的硫酸盐,导致 ι-卡拉二糖重复单元转化为 α-卡拉二糖重复单元(见图 7 中 B)[4,122]。编码硫酸化酶的基因已被克隆并在大肠杆菌中重组表达。这些实验证明,内切-4S-ι-卡拉胶硫酸化酶是一种 I 型硫酸化酶,一种依赖甲酰甘氨酸的硫酸化酶。

另一种卡拉胶硫酸化酶是从 *P. atlantica* T6c 中分离出来的,但它催化 κ-卡拉二糖单元的脱硫作用,产生中性的 β-卡拉二糖重复单元(见图 7)。这种内切-κ-卡拉胶硫酸化酶在大肠杆菌中的过度表达也验证了其在 I 型硫酸化酶家族中的分组[123]。结果表明,此类型的酶与第一种卡拉胶硫酸化酶的调查相反,此类型的酶是对聚合物发挥作用,而不是寡糖。这表明卡拉胶的降解可能遵循不同的途径,即一种途径是在寡糖卡拉胶脱硫之前卡拉胶的解聚,另一种途径是假设多糖的脱硫是在尚未发现的 α-和 β-卡拉胶酶降解 α-或 β-卡拉胶之前。

4 卡拉胶酶与硫酸化酶协同作用降解卡拉胶

由于卡拉胶是高度硫酸化的多糖,去除硫酸基团是实现卡拉胶完全分解所必需的。有研究证实,来自海洋异养细菌 *Zobellia galactinovorans* 中卡拉胶的完整分解代谢途径已被表述(如图 8)。结果表明,*Z. galactinovorans* 中的 GHs 和硫酸化酶对卡拉胶的降解具有协同作用。在这里,ι-和 κ-卡拉胶需要由两个专门的硫酸化酶对 *D*-半乳糖的 C4 硫酸基进行脱硫,从而产生 α-或 β-卡拉胶。对于 α-卡拉胶将通过第 3 种硫酸化酶将其转化为 β-卡拉胶,此过程是从脱水半乳糖中去除 C2 硫酸盐基团[124]。如果没有这些脱硫处理,低聚卡拉胶的进一步的降解步骤将会停止。具体步骤如下:

1)卡拉胶多糖的降解　ι-卡拉胶的降解是由 GH82 家族的 ι-卡拉胶酶将多糖链裂解成更小的寡糖。而在 κ-卡拉胶中,则是由 GH16 家族的一个 κ-卡拉胶酶完成的。

2)低聚体卡拉胶上的 G4 脱硫　低聚体 ι-卡拉胶需要由 S1_19 家族的 ι-卡拉胶 G4S-硫酸化酶对 *D*-半乳糖残基进行脱硫,从而产生低聚体 α-卡拉胶。同样的步骤发生在 κ-卡拉胶中,在这里,一个 κ-卡拉胶 G4S-硫酸化酶水解了在 *D*-半乳糖残基上的硫酸酯,结果产生了非硫酸化的 β-卡拉胶。

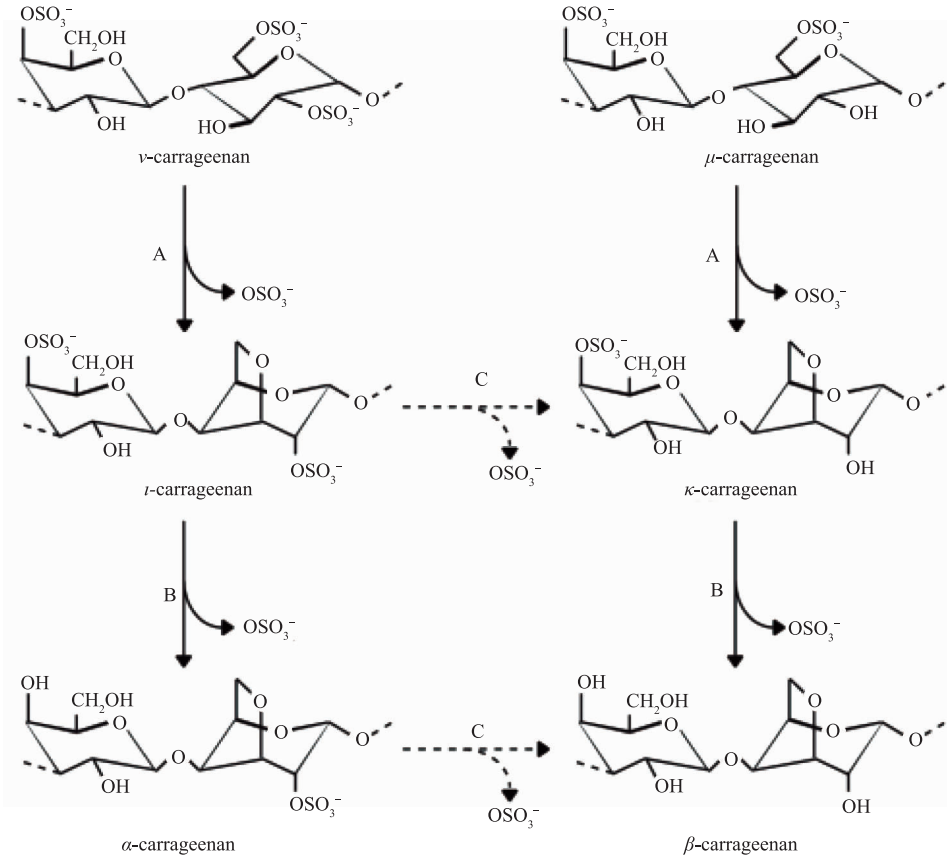
3)α-卡拉胶的脱硫　为了将 α-卡拉胶转化为非硫酸化的 β-卡拉胶,需要用 S1_17 家族的 α-卡拉胶 DA2S-硫酸化酶对剩余的 3,6-脱水-*D*-半乳糖残基进行脱硫。

4)β-卡拉胶的降解　未硫酸化的 β-卡拉胶可以被 GH127 或 GH129 家族的 3,6-脱水-*D*-半乳糖苷酶或 GH2 家族的 β-半乳糖苷酶从非还原端继续连续降解。

5 展　望

卡拉胶作为一种从海洋红藻的细胞壁提取出的多糖物质,具有广阔的应用价值和发展潜力。其已被证明具有多种生物活性,包括抗肿瘤、抗病毒、抗凝血等。降解后的卡拉胶及其分子修饰后的衍生物在某些方面已经展现出更强的生物活性。但由于目前所了解的卡拉胶分子修饰主要集中在构效方面,对于分子修饰的方法研究较少,因而在对卡拉胶进行设计改性从而获得高活性、高稳定性以及具有特定功能的卡拉胶衍生物仍然是今后的研究方向[8]。

卡拉胶多糖的酶降解需要卡拉胶酶和硫酸化酶的共同作用。卡拉胶酶的来源主要依靠于海洋细菌。但由于海洋环境的复杂性和特殊性,目前对海洋细菌的了解还远远不够。迄今为止,已有许多关于卡拉胶酶得到了分离纯化的报道,并且对其中的基因进行了克隆表达,但仍未能满足工业化生产与



A 代表硫酸化酶(名为半乳糖-6-硫酸化酶)催化 ν-和 μ-卡拉二糖单元的转化,分别转化为 ι-和 κ-卡拉二糖单元;B 代表此类硫酸化酶催化去除第4 位的硫酸酯基(实线箭头);C 代表位于第 2 位的基团的脱硫作用是假设的,但对于卡拉胶的完全降解是必要的(虚线箭头)。

图 7　在卡拉胶的生物合成和生物降解过程中观察到的卡拉胶硫酸化酶

Fig. 7　Carrageenan sulphatase observed in the biosynthesis and biodegradation of carrageenan

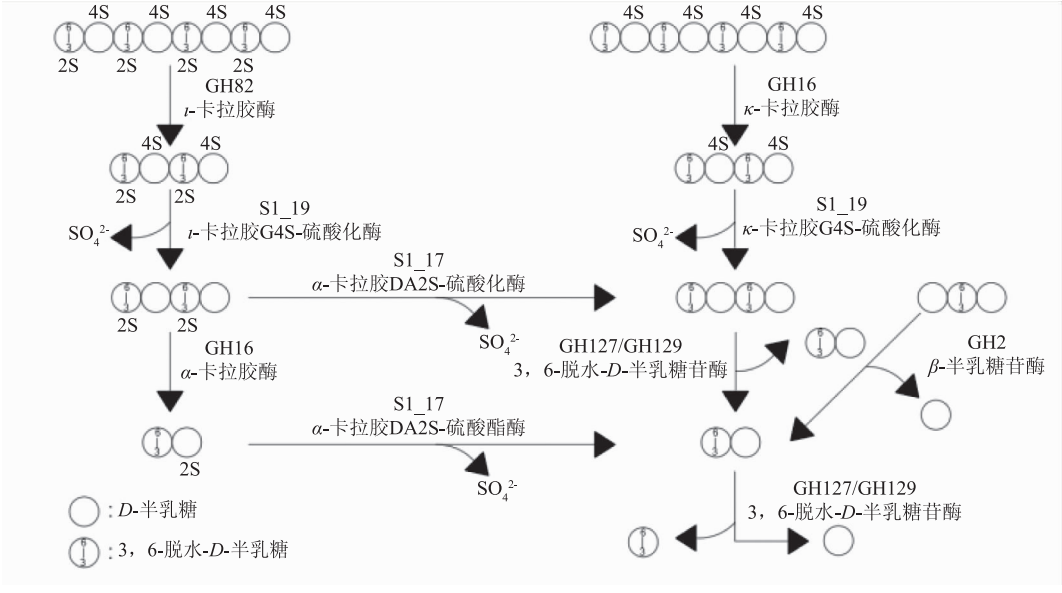


图 8　来自海洋异养细菌 *Zobellia galactinovorans* 中卡拉胶的完整分解代谢途径

Fig. 8　Complete metabolic pathway of carrag eenan from the marine heterotrophic bacterium *Zobellia galactinovorans*

应用的要求。其中一部分原因是缺乏相应的基因信息或者表达出来的酶具有过低的活性以及较差的稳定性。田琳曾通过优化 κ-卡拉胶酶的发酵条件，使其酶活回收率高达 72.4%，为其工业化生产打下基础[125]。因此，在以后的研究中仍然需要重点分析卡拉胶酶的基因序列以及优化表达条件[126-127]。而卡拉胶硫酸化酶的多样性在于卡拉胶多糖的多样性。其中卡拉胶硫酸化酶大部分的组成和结构都是未知的。因此，要全面分析硫酸化酶的功能，需要同时获得关于卡拉胶多糖的新数据。揭示海洋生物来源多糖中硫酸化酶和其他酶的转化过程，这将增强对海洋生物的分子层面理解。相信随着基因组学的不断进步以及科研技术的不断发展，将会实现卡拉胶多糖以及其他海洋类能源物质的可持续发展。

参考文献：

[1] CAMPO V L,KAWANO D F,SILVA D B,et al. Carrageenans, biological properties,chemical modifications and structural analysis: a review[J]. **Carbohydrate Polymers**,2009,77(2):167-180.

[2] USOV A I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups[J]. **Food Hydrocolloids**,1998,12(3):301-308.

[3] 郭丹，栾晖，孙藜玮，等. 低分子量卡拉胶及其衍生物的生物学活性研究进展[J]. 安徽农业科学，2010，38(5)：2581-2598.

[4] PRECHOUX A,GENICOT S,ROGNIAUX H,et al. Controlling carrageenan structure using a novel formylglycine-dependent sulfatase,an endo-4S-iota-carrageenan sulfatase[J]. **Marine Biotechnology**,2013,15(3):265-274.

[5] 倪敏，韩峰，于文功. 卡拉胶酶研究进展[J]. 现代生物医学进展，2008，8(11)：2155-2157.

[6] KNUTSEN S H,MYSLABODSKI D E,LARSEN B,et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans[J]. **Botanica Marina**,1994,37(2):163-169.

[7] 朱楠楠，姚子昂，吴海歌，等. 卡拉胶寡糖的研究进展[J]. 化学与生物工程，2009，26(10)：9-12.

[8] 田秀芳，李平. 卡拉胶的生物活性及分子修饰研究进展[J]. 广东化工，2012，39(11)：134-135.

[9] 王长云，顾谦群，周鹏，等. 红藻多糖卡拉胶分子修饰研究Ⅰ.酸降解[J]. 中国海洋药物，2003(2)：24-27.

[10] 于广利. 系列硫酸寡糖的制备及其结构与序列分析[D]. 青岛：中国海洋大学，2004.

[11] YANG B,YU G L,ZHAO X,et al. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides[J]. **Febs Journal**,2009,276(7):2125-2137.

[12] HIPOLITO E,GONCALVES A G,NOSEDA M D,et al. Semi-synthesis of N-alkyl-kappa-carrageenan derivatives and evaluation of their antibacterial activity[J]. **Carbohydrate Research**,2021,499:3-7.

[13] 魏玉，王元兰，何新建. 低分子量 κ- 卡拉胶的制备、分子修饰及其生物活性研究进展[J]. 食品工业科技，2009，30(4)：344-348.

[14] RELLEVE L,NAGASAWA N,LUAN L Q,et al. Degradation of carrageenan by radiation[J]. **Polymer Degradation and Stability**,2005,87(3):403-410.

[15] 魏元臣，周革非，李树福，等. λ- 卡拉胶降解组分的体外免疫活性[J]. 食品科学，2009，30(11)：232-236.

[16] TECSON M G,ABAD L V,EBAJO V D,et al. Ultrasound-assisted depolymerization of kappa-carrageenan and characterization of degradation product[J]. **Ultrasonics Sonochemistry**,2021,73(8):7-8.

[17] 徐强，管华诗. 卡拉胶研究的发展及现状[J]. 青岛海洋大学学报，1995(Suppl. 1)：117-124.

[18] CHEN L,HUANG G L. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,115:77-82.

[19] HETTLE A G,VICKERS C J,BORASTON A B. Sulfatases:critical enzymes for algal polysaccharide processing[J]. **Frontiers in Plant Science**,2022,13:1-11.

[20] 余成艳. 邻苯二甲酰基化 κ- 卡拉胶的合成及其生物活性[D]. 汕头：汕头大学，2007.

[21] LIEW J W Y,LOH K S,AHMAD A,et al. Effect of modified natural filler o-methylene phosphonic κ-carrageenan on chitosan-based polymer electrolytes[J]. **Energies**,2018,11(7):4-11.

[22] BHATTACHARYA A,MISRA B N. Grafting:a versatile means to modify polymers: techniques,factors and applications[J]. **Progress in Polymer Science**,2004,29(8):767-814.

[23] 陈方. 小分子量硫酸多糖 κ- 卡拉胶衍生物的制备及抗流感病毒活性研究[D]. 福州:福州大学,2006.

[24] 王亚军,郑裕国,吴天星,等. 酵母(1→3)-β-*D*- 葡聚糖制备及其化学衍生研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2005(4):527-532.

[25] 孙青,刘长海,李国栋,等. β- 环糊精硫酸酯的合成及其在舒必利毛细管电泳拆分中的应用[J]. 第二军医大学学报,2004(11):1259-1260.

[26] BONTPART T,CHEYNIER V,AGEORGES A,et al. BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds[J]. **New Phytologist**,2015,208(3):695-707.

[27] ALSEEKH S,DE SOUZA L P,BENINA M,et al. The style and substance of plant flavonoid decoration:towards defining both structure and function[J]. **Phytochemistry**,2020,174:9-10.

[28] YAMADA T,OGAMO A,SAITO T,et al. Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect[J]. **Carbohydrate Polymers**,2000,41(2):115-120.

[29] URYU T,IKUSHIMA N,KATSURAYA K,et al. Sulfated alkyl oligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection[J]. **Biochemical Pharmacology**,1992,43(11):2385-2392.

[30] 袁华茂. 卡拉胶寡糖与衍生物的制备及生物活性研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所,2005.

[31] SHCHIPUNOV Y A. Sol-gel-derived biomaterials of silica and carrageenans[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**,2003,268(1):68-76.

[32] POURJAVADI A,HARZANDI A M,HOSSEINZADEH H. Modified carrageenan 3: synthesis of a novel polysaccharide-based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air[J]. **European Polymer Journal**,2004,40(7):1363-1370.

[33] ZHU B,NI F,SUN Y,et al. Insight into carrageenases:major review of sources,category,property,purification method,structure,and applications[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2018,38(8):1261-1276.

[34] MORI T. On a carbohydrase acting on the mucilage from chondrus ocellatus holmes (II)[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**,1939,15:1070-1074.

[35] SKEA G L,MOUNTFORT D O,CLEMENTS K D. Contrasting digestive strategies in four New Zealand herbivorous fishes as reflected by carbohydrase activity profiles[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**,2007,146(1):63-70.

[36] NAVAL P,CHANDRA T S. Characterization of membrane vesicles secreted by seaweed associated bacterium *Alteromonas macleodii* KS62[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2019,514(2):422-427.

[37] 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.

[38] MOU H J,JIANG X L,LIU Z H,et al. Structural analysis of kappa-carrageenan oligosaccharides released by carrageenase from marine *Cytophaga* MCA-2[J]. **Journal of Food Biochemistry**,2004,28(3):245-260.

[39] CUI H L,PENG Y X,ZHAO B W,et al. Cloning,identification and characterization of a novel kappa-carrageenase from marine bacterium *Cellulophaga lytica* strain N5-2[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2017,105:509-515.

[40] SUN Y J,LIU Y,JIANG K,et al. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of κ-carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with κ-carrageenase from *Pedobacter hainanensis*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2014,62(11):2398-2405.

[41] ZHAO D Y,JIANG B,ZHANG Y,et al. Purification and characterization of a cold-adapted kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas* sp. ZDY3[J]. **Protein Expression and Purification**,2021,178:3-8.

[42] ZIAYODDIN M, LALITHA J, SHINDE M. Increased production of carrageenase by *Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2 using taguchi experimental design[J]. **International Letters of Natural Sciences**, 2014, 12(2): 194-207.

[43] KHAMBHATY Y, MODY K, JHA B. Purification and Characterization of kappa-carrageenase from a novel gamma-proteobacterium, *Pseudomonas elongata* MTCC 5261 syn. *Microbulbifer elon* comb. nov[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2007, 12(6): 668-675.

[44] WEIGL J, YAPHE W. The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a kappa-carrageenase[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 1966, 12(5): 329-332.

[45] LIU G L, LI Y, CHI Z, et al. Purification and characterization of kappa-carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of kappa-carrageenan[J]. **Process Biochemistry**, 2011, 46(1): 265-271.

[46] LEMOINE M, COLLEN P N, HELBERT W. Physical state of kappa-carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*[J]. **Biochemical Journal**, 2009, 419: 545-553.

[47] YUAN H M, ZHANG W W, LI X G, et al. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of kappa-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives[J]. **Carbohydrate Research**, 2005, 340(4): 685-692.

[48] LI S Y, HE N N, HAN Q, et al. Production of a thermo-tolerant kappa-carrageenase via a food-grade host and anti-oxidant activity of its enzymatic hydrolysate[J]. **Food Chemistry**, 2021, 339: 3-8.

[49] KOBAYASHI T, UCHIMURA K, KOIDE O, et al. Genetic and biochemical characterization of the *Pseudoalteromonas tetraodonis* alkaline κ-carrageenase[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2012, 76(3): 506-511.

[50] SUN F X, MA Y X, WANG Y, et al. Purification and characterization of novel kappa-carrageenase from marine *Tamlana* sp. HC4 [J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 2010, 28(6): 1139-1145.

[51] KALITNIK A A, NEDASHKOVSKAYA O I, STENKOVA A M, et al. Carrageenanolytic enzymes from marine bacteria associated with the red alga *Tichocarpus crinitus*[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2018, 30(3): 2071-2081.

[52] JUNG J, BAE S S, CHUNG D, et al. Complete genome sequence of *Microbulbifer agarilyticus* GP101 possessing genes coding for diverse polysaccharide-degrading enzymes[J]. **Korean Journal of Microbiology**, 2018, 54(3): 299-301.

[53] YAO Z, WU H G, ZHANG S X, et al. Enzymatic preparation of kappa-carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2014, 101: 359-367.

[54] CHEONG K L, QIU H M, DU H, et al. Oligosaccharides derived from red seaweed: production, properties, and potential health and cosmetic applications[J]. **Molecules**, 2018, 23(10): 3-12.

[55] SHELDON R A, VAN PELT S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how[J]. **Chemical Society Reviews**, 2013, 42(15): 6223-6235.

[56] DZA B, ZP C, QIAO S A, et al. Self-assembled κ-carrageenase-inorganic hybrid nanoflowers exerting high catalytic efficiency with stable and recyclable properties[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2021, 153(1): 3-7.

[57] ZHAO Y J, CHI Z, XU Y Y, et al. High-level extracellular expression of kappa-carrageenase in *Brevibacillus choshinensis* for the production of a series of kappa-carrageenan oligosaccharides[J]. **Process Biochemistry**, 2018, 64: 83-92.

[58] 张成昊, 朱艳冰, 陈艳红, 等. 假交替单胞菌 JMUZ2 重组 κ-卡拉胶酶的异源表达和酶学性质[J]. 化工学报, 2021, 72(7): 3738-3746.

[59] GUI Y Y, GU X Q, FU L P, et al. Expression and characterization of a thermostable carrageenase from an Antarctic *Polaribacter* sp. NJDZ03 strain[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12: 4-10.

[60] CAO S Q, ZHANG Y Y, CHEN G N, et al. Cloning, heterologous expression, and characterization of a βκ-carrageenase from marine bacterium *Wenyingzhuangia funcanilytica*: a specific enzyme for the hybrid carrageenan-furcellaran[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12: 4-9.

[61] JOUANNEAU D, BOULENGUER P, MAZOYER J, et al. Enzymatic degradation of hybrid ι-/ν-carrageenan by *Alteromonas fortis* ι-carrageenase[J]. **Carbohydrate Research**, 2010, 345(7): 934-940.

[62] XU Y Y,MAO W A,GAO W X,et al. Efficient production of a recombinant iota-carrageenase in *Brevibacillus choshinensis* using a new integrative vector for the preparation of iota-carrageenan oligosaccharides[J]. **Process Biochemistry**,2019,76:68-76.

[63] MA S,DUAN G F,CHAI W G,et al. Purification,cloning,characterization and essential amino acid residues analysis of a new iota-carrageenase from *Cellulophaga* sp. QY3[J]. **Public Library of Science**,2013,8(5):2-10.

[64] LI S Y,HAO J H,SUN M. Cloning and characterization of a new cold-adapted and thermo-tolerant iota-carrageenase from marine bacterium *Flavobacterium* sp. YS-80-122[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2017,102:1059-1065.

[65] HATADA Y,MIZUNO M,LI Z J,et al. Hyper-production and characterization of the ι-carrageenase useful for ι-carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium,*Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T,and insight into the unusual catalytic mechanism[J]. **Marine Biotechnology**,2011,13(3):411-422.

[66] BARBEYRON T,MICHEL G,POTIN P,et al. Iota-carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases,unrelated to that of kappa-carrageenases[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2000,275(45):35499-35505.

[67] MA S,TAN Y L,YU W G,et al. Cloning,expression and characterization of a new iota-carrageenase from marine bacterium,*Cellulophaga* sp.[J]. **Biotechnology Letters**,2013,35(10):1617-1622.

[68] SHEN J J,CHANG Y G,DONG S J,et al. Cloning,expression and characterization of a iota-carrageenase from marine bacterium *Wenyingzhuangia fucanilytica*:a biocatalyst for producing iota-carrageenan oligosaccharides [J]. **Journal of Biotechnology**,2017,259:103-109.

[69] MUZYED S,HOWLADER M M,TUVIKENE R. Fermentation optimization,purification and biochemical characterization of iota-carrageenase from marine bacterium *Cellulophaga baltica*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2021,166:789-797.

[70] GUIBET M,COLIN S,BARBEYRON T,et al. Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase:a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases[J]. **Biochemical Journal**,2007,404:105-114.

[71] LI J,HU Q S,SESWITA-ZILDA D. Purification and characterization of a thermostable lambda-carrageenase from a hot spring bacterium,*Bacillus* sp.[J]. **Biotechnology Letters**,2014,36(8):1669-1674.

[72] OHTA Y,HATADA Y. A novel enzyme,lambda-carrageenase,isolated from a deep-sea bacterium[J]. **Journal of Biochemistry**,2006,140(4):475-481.

[73] 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 twelve new species combinations[J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**,1995,45(4):755-761.

[74] NIU T T,ZHANG D S,CHEN H M,et al. Modulation of the binding of basic fibroblast growth factor and heparanase activity by purified lambda-carrageenan oligosaccharides[J]. **Carbohydrate Polymers**,2015,125:76-84.

[75] LIU Z M,LI G Y,MO Z L,et al. Molecular cloning,characterization,and heterologous expression of a new kappa-carrageenase gene from marine bacterium *Zobellia* sp. ZM-2[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(23):10057-10067.

[76] SARWAR G,MATAYOSHI S,ODA H. Purification of a κ-carrageenase from marine *Cytophaga* species[J]. **Microbiology and Immunology**,1987,31(9):869-877.

[77] ZHOU M H,MA J S,LI J,et al. A κ-carrageenase from a newly isolated *Pseudoalteromonas*-like bacterium,WZUC10 [J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**,2008,13(5):545-551.

[78] SHEN J J,CHANG Y G,CHEN F,et al. Expression and characterization of a kappa-carrageenase from marine bacterium *Wenyingzhuangia aestuarii* OF219:a biotechnological tool for the depolymerization of kappa-carrageenan [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,112:93-100.

[79] LI J,PAN A H,XIE M S,et al. Characterization of a thermostable kappa-carrageenase from a hot spring bacterium and plant

protection activity of the oligosaccharide enzymolysis product[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019, 99(4): 1812-1819.

[80] YAO Z, WANG F F, GAO Z, et al. Characterization of a kappa-carrageenase from marine *Cellulophaga lytica* strain N5-2 and analysis of its degradation products[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2013, 14(12): 24592-24602.

[81] LI J, GU X, ZHANG Q, et al. Biochemical characterization of a carrageenase, car1383, derived from associated bacteria of antarctic macroalgae[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2022, 13: 4-9.

[82] ZHU B W, NI F, NING L M, et al. Cloning and biochemical characterization of a novel kappa-carrageenase from newly isolated marine bacterium *Pedobacter hainanensis* NJ-02[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 108: 1331-1338.

[83] DUAN G F, BEI S U, HAN F, et al. Purification and characterization of a κ-carrageenase from marine *Pseudoalteromonas* sp. QY202[J]. **Periodical of Ocean University of China**, 2010, 40(3): 95-100.

[84] XU X Y, LI S Y, YANG X M, et al. Cloning and characterization of a new kappa-carrageenase gene from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. QY203[J]. **Journal of Ocean University of China**, 2015, 14(6): 1082-1086.

[85] LI S Y, JIA P P, WANG L N, et al. Purification and characterization of a new thermostable kappa-carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. QY203[J]. **Journal of Ocean University of China**, 2013, 12(1): 155-159.

[86] MA Y X, DONG S L, JIANG X L, et al. Purification and characterization of carrageenase from marine bacterium mutant strain *Pseudoalteromonas* sp. Aj5-13 and its degraded products[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2010, 34(3): 661-678.

[87] ZHU B W, NING L M. Purification and characterization of a new κ-carrageenase from the marine bacterium *Vibrio* sp. NJ-2[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2016, 26(2): 255-262.

[88] ARAKI T, HIGASHIMOTO Y, MORISHITA T. Purification and characterization of kappa-carrageenase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. CA-1004[J]. **Fisheries Science**, 1999, 65(6): 937-942.

[89] BARTON G J. Protein sequence alignment techniques[J]. **Acta Crystallographica Section D**, 1998, 54: 1139-1146.

[90] BARBEYRON T, HENRISSAT B, KLOAREG B. The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to β-1, 3-1, 4-glucanases[J]. **Gene**, 1994, 139(1): 105-109.

[91] BARBEYRON T, GERARD A, POTIN P, et al. The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases [J]. **Molecular Biology and Evolution**, 1998, 15(5): 528-537.

[92] MCLEAN M W, WILLIAMSON F B. χ - Carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1979, 93(3): 553-558.

[93] THOMAS F, BARBEYRON T, TONON T, et al. Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine *Flavobacteriia* to their independent transfers to marine *Proteobacteria* and human gut *Bacteroides*[J]. **Environmental Microbiology**, 2012, 14(9): 2379-2394.

[94] MICHEL G, CHANTALAT L, DUEE E, et al. The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases[J]. **Structure**, 2001, 9(6): 513-525.

[95] MATARD-MANN M, BERNARD T, LEROUX C, et al. Structural insights into marine carbohydrate degradation by family GH16 κ-carrageenases[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2017, 292(48): 19919-19934.

[96] MICHEL G, CHANTALAT L, FANCHON E, et al. The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis*: a β-helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(43): 40202- 40209.

[97] HETTLE A G, HOBBS J K, PLUVINAGE B, et al. Insights into the kappa/iota-carrageenan metabolism pathway of some marine *Pseudoalteromonas* species[J]. **Communications Biology**, 2019, 2: 7-11.

[98] TOMME P, VANTILBEURGH H, PETTERSSON G, et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414: analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1988, 170

(3):575-581.

[99] DIN N,GILKES N R,TEKANT B,et al. Non - hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase[J]. **Bio-Technology**,1991,9(11):1096-1099.

[100] BLACK G W,RIXON J E,CLARKE J H,et al. Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates[J]. **Biochemical Journal**,1996,319:515-520.

[101] POTIN P,SANSEAU A,LEGALL Y,et al. Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium[J]. **European Journal of Biochemistry**,1991,201(1):241-247.

[102] POTIN P,RICHARD C,BARBEYRON T,et al. Processing and hydrolytic mechanism of the cgkA-encoded κ-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*[J]. **European Journal of Biochemistry**,1995,228(3):971-975.

[103] 陈梦,韩振莲,付晓丹,等. 低分子质量 κ- 卡拉胶钾的酶法制备及其对原发性高血压大鼠降血压作用的研究[J]. 海洋科学,2019,43(8):36-42.

[104] 季宇彬,武晓丹,邹翔. 海洋藻类多糖生物活性的研究[C]. [出版地不详]:中国海洋学会,2005:157.

[105] 周革非,邢荣莲,孙利芹,等. 不同分子量的角叉菜(*Chondrus ocellatus*)λ- 卡拉胶的抗氧化活性[J]. 海洋与湖沼,2009,40(5):545-550.

[106] 周革非,李树福,王长海. κ- 卡拉胶硫酸多糖的免疫调节活性初步研究[J]. 海洋科学,2010,34(8):56-59.

[107] FLEURENCE J,MASSIANI L,GUYADER O,et al. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*,*Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmale*[J]. **Journal of Applied Phycology**,1995,7(4):393-397.

[108] ZABLACKIS E,VREELAND V,KLOAREG B. Isolation of protoplasts from *Kappaphycus alvarezii* var. *tambalang* (Rhodophyta) and secretion of ι-carrageenan fragments by cultured cells[J]. **Journal of Experimental Botany**,1993,44(266):1515-1522.

[109] GUIBET M,KERVAREC N,GENICOT S,et al. Complete assignment of ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* lambda-carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis[J]. **Carbohydrate Research**,2006,341(11):1859-1869.

[110] ANTONOPOULOS A,FAVETTA P,LAFOSSE M,et al. Characterisation of iota-carrageenans oligosaccharides with high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection[J]. **Journal of Chromatography A**,2004,1059(1/2):83-87.

[111] 吴海歌,姚子昂. 一种海洋硫酸半乳六糖的制备方法和其在抗阿尔兹海默病药物制备中的应用:CN111303310A[P]. 2020.

[112] 李晓琳. 一种利用红藻特征性硫酸多糖进行乙醇转化的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012.

[113] HO C L. Phylogeny of algal sequences encoding carbohydrate sulfotransferases,formylglycine-dependent sulfatases,and putative sulfatase modifying factors[J]. **Frontiers in Plant Science**,2015,26(6):3-13.

[114] HANSON S R,BEST M D,WONG C H. Sulfatases:structure,mechanism,biological activity,inhibition,and synthetic utility[J]. **Angewandte Chemie-International Edition**,2004,43(43):5736-5763.

[115] MULLER I,KAHNERT A,PAPE T,et al. Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK:insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily[J]. **Biochemistry**,2004,43(11):3075-3088.

[116] HAGELUEKEN G,ADAMS T M,WIEHLMANN L,et al. The crystal structure of SdsA1,an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*,defines a third class of sulfatases[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,2006,103(20):7631-7636.

[117] MCLEAN M W,WILLIAMSON F B. Glycosulphatase from *Pseudomonas carrageenovora*: purification and some properties[J]. **European Journal of Biochemistry**,1979,101(2):497-505.

[118] MCLEAN M W,WILLIAMSON F B. Neocarratetraose 4 - O - monosulphate β-hydrolase from *Pseudomonas carrageenovora*[J]. **European Journal of Biochemistry**,1981,113(3):447-456.

[119] WEIGL J,YAPHE W. Glycosulfatase of *Pseudomonas carrageenovora*:desulfation of disaccharide from κ-carrageenan [J]. **Canadian Journal of Microbiology**,2011,12(4):874-876.

[120] GENICOT S M,GROISILLIER A,ROGNIAUX H,et al. Discovery of a novel iota carrageenan sulfatase isolated from the marine bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora*[J]. **Frontiers in Chemistry**,2014,2:5-13.

[121] COPELAND A,LUCAS S,LAPIDUS A,et al. Complete sequence of *Pseudoalteromonas atlantica* T6c [J/OL]. (2006-01-16) [2022-03-02]. http://genome.jqi.doe.gov/portal/pseat/pseat.home.html.

[122] PRECHOUX A,HELBERT W. Preparation and detailed NMR analyses of a series of oligo-α-carrageenans[J]. **Carbohydrate Polymers**,2014,101:864-870.

[123] PRECHOUX A,GENICOT S,ROGNIAUX H,et al. Enzyme-assisted preparation of furcellaran-like κ-/β-carrageenan [J]. **Marine Biotechnology**,2016,18(1):133-143.

[124] FICKO-BLEAN E,PRECHOUX A,THOMAS F,et al. Carrageenan catabolism is encoded by a complex regulon in marine heterotrophic bacteria[J]. **Nature Communications**,2017,8(1):2-12.

[125] 田琳. 重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 产 κ- 卡拉胶酶的发酵优化及分离纯化[D]. 青岛:中国海洋大学,2015.

[126] OSTGAARD K,WANGEN B F,KNUTSEN S H,et al. Large-scale production and purification of κ-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora* for applications in seaweed biotechnology[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1993(4):326-333.

[127] IMRAN M,PODUVAL P B,GHADI S C. Bacterial degradation of algal polysaccharides in marine ecosystem[M]. Berlin:Springer,2017:189-203.

科　技　信　息

国家市场监督管理总局发布《苦丁茶中孔雀石绿的测定》等 8 项食品补充检验方法

根据《中华人民共和国食品安全法实施条例》和《食品补充检验方法工作规定》有关要求,《苦丁茶中孔雀石绿的测定》《葡萄酒中 9 种卤代苯甲醚和卤代苯酚的测定》《食品中硝苯地平及其降解产物的测定》《食品中双醋酚丁等 19 种化合物的测定》《椰子汁饮料中 γ-壬内酯的测定》《植物源性食品中奥克巴胺的测定》《植物源性食品中去甲乌药碱和曲托喹酚的测定》《食品中匹可硫酸钠的测定》8 项食品补充检验方法已经国家市场监督管理总局批准,现予发布。

方法文本可在国家市场监督管理总局食品补充检验方法数据库(http://www.samr.gov.cn/spcjs/bcjyff/)中查询或下载。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.国家市场监督管理总局发布《苦丁茶中孔雀石绿的测定》等 8 项食品补充检验方法[EB/OL]. (2022-9-21).http://www.tbtguide.com/c/mypt/gnxw/512426.jhtml.