

褐藻胶多糖分子修饰酶的研究进展

李丽¹, 宁利敏², 姚忠¹, 朱本伟^{*1}, 徐虹¹

(1. 南京工业大学 食品与轻工学院, 江苏 南京 210009; 2. 南京中医药大学 医学院·整合医学学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 褐藻胶作为一种线性多糖根据其结构和组成差异具有不同的生理生化特性, 在食品、医药和化妆品等领域有着巨大的应用价值和潜力。褐藻胶的这些特性主要通过褐藻胶修饰酶如褐藻胶裂解酶、甘露聚糖 C5 差向异构酶、褐藻胶乙酰化酶和褐藻胶脱乙酰化酶的作用控制。作者主要概述了褐藻胶修饰酶合成和修饰褐藻胶的作用机理, 总结了几种褐藻胶修饰酶的来源、分类、结构、作用方式和研究进程, 重点阐述了褐藻胶裂解酶和甘露聚糖 C5 差向异构酶的相关研究进展, 并对相关研究的未来发展提出展望, 可为进一步开发和应用褐藻胶及其相关修饰酶提供借鉴和参考。

关键词: 褐藻胶多糖; 褐藻胶修饰; 褐藻胶裂解酶; 甘露聚糖 C5 差向异构酶

中图分类号: Q 55 文章编号: 1673-1689(2023)01-0018-22 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.01.002

Research Progress of Alginate Polysaccharide Molecular Modifying Enzymes

LI Li¹, NING Limin², YAO Zhong¹, ZHU Benwei^{*1}, XU Hong¹

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China; 2. School of Medicine and Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: As a linear polysaccharide, alginate has different physiological and biochemical characteristics according to its structure and composition. It holds great application value and potential in food, medicine and cosmetics. These characteristics of alginate are mainly controlled by the action of alginate-modifying enzymes such as alginate lyase, mannan C5-epimerase, alginate acetylase and alginate deacetylase. This review mainly introduced the synthesis of alginate-modifying enzymes and the mechanism of alginate modification, and summarized the source, classification, structure, mode of action and research progress of several alginate modifying enzymes. The emphasis was laid on the research progress of alginate lyase and mannan C5-epimerase. And we also prospected the future development of related research, providing reference for the further development and application of alginate and its related modifying enzymes.

Keywords: alginate polysaccharide, alginate modification, alginate lyase, mannan C5-epimerase

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

褐藻胶是一种由 β -D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronate, M)和 α -L-古洛糖醛酸(α -L-guluronate, G)通过1 \rightarrow 4糖苷键连接的线性多聚体^[1],根据其分子的长度、M/G残基比率和分布以及乙酰化程度等,使其具有凝胶强度、水合能力、黏度和生物活性等特性,在食品、医药和化妆品等领域有着巨大的应用价值。褐藻胶的这些特性主要通过褐藻胶修饰酶对褐藻胶的合成和修饰过程进行控制,为了能够利用不同的褐藻胶修饰酶进行高效、安全和绿色地制备具有不同性质的褐藻胶分子,作者旨在介绍褐藻胶修饰酶合成和修饰褐藻胶的作用机理,总结目前几种褐藻胶修饰酶的来源、分类、结构、作用方式和研究进展,为将来更好地应用褐藻胶修饰酶和开发褐藻胶的商业价值提供参考。

1 简介

褐藻胶根据残基的排列组合不同分成3种片段:聚甘露糖醛酸(poly-mannuronate, poly-M)片段、聚古洛糖醛酸(poly-guluronate, poly-G)片段和甘露糖醛酸-古洛糖醛酸(poly-MG)杂合段。poly-M和poly-G的链式结构非常相似,单糖组分的区别仅仅是C5上羟基位置的不同(见图1)^[1]。

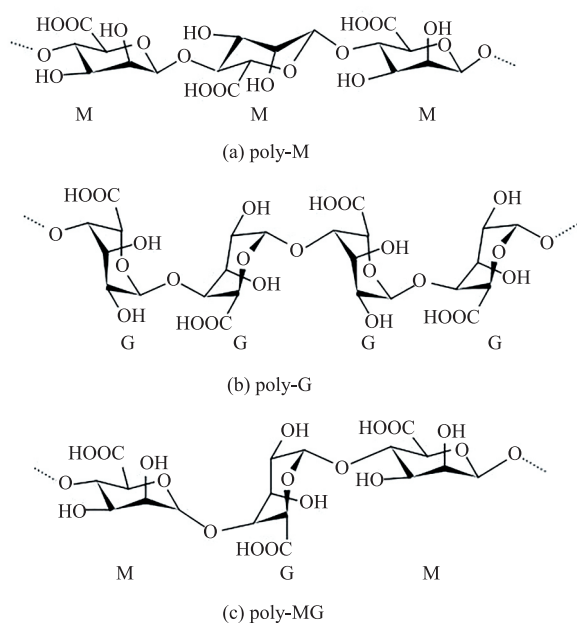


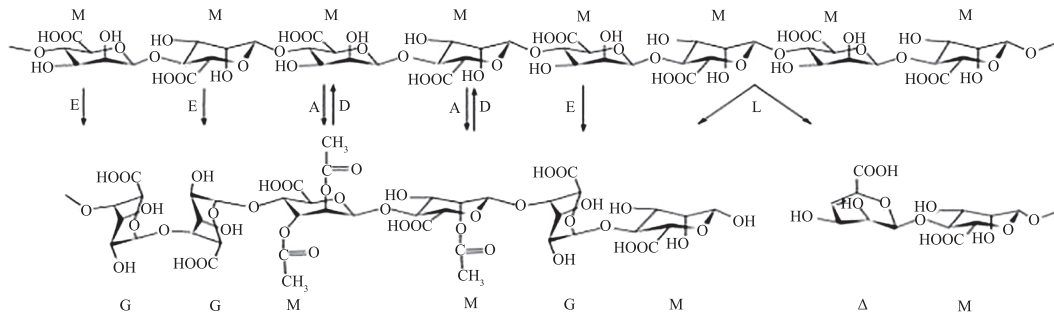
图1 不同结构褐藻胶的结构示意图

Fig. 1 Structural diagram of alginate with different structures

自然界中的褐藻胶主要是由褐藻、一些钙质红藻、假单胞菌属和固氮菌属的一些细菌产生的。目前的商业褐藻胶主要是从一些褐藻植物中提取,如泡叶藻(*Ascophyllum*)、公牛藻(*Durvillaea*)、昆布(*Ecklonia*)、螺旋雷松藻(*Lessonia trabeculata*)、巨藻(*Macrocystis*)和马尾藻(*Sargassum*)等^[2]。不同来源褐藻胶的组成和结构不同,例如螺旋雷松藻和极北海带(*Laminaria hyperborea*)中的褐藻胶古洛糖醛酸含量较高(M/G残基比率 <1),海洋巨藻(*Durvillaea potatorum*)中的褐藻胶古洛糖醛酸含量较低,而细菌中的褐藻胶还会发生乙酰化反应^[3]。此外一些褐藻中的褐藻胶结构还受到季节、生长环境、年龄及不同部位的影响^[4]。

褐藻胶开始由GDP-甘露糖醛酸合成,然后被甘露聚糖C5差向异构酶、褐藻胶裂解酶、褐藻胶乙酰化酶和褐藻胶脱乙酰化酶在聚合物水平上进行修饰改性(如图2)。褐藻胶是以聚甘露糖的形式合成的(见图2第一行分子);甘露糖醛酸残基(M)可以在O2或O3位置通过甘露糖乙酰化酶(A)乙酰化、甘露聚糖C5差向异构酶(E)而异构化为古洛糖醛酸残基(G)或被褐藻胶裂解酶(L)降解产生不饱和的4-脱氧-L-赤式-6-4-烯吡喃糖醛酸酯残基(Δ);乙酰基可以通过褐藻胶脱乙酰酶(D)去除。

铜绿假单胞菌中合成褐藻胶所需的12种蛋白质由AlgD操纵子编码(AlgD、Alg8、Alg44、AlgK、AlgE、AlgG、AlgX、AlgL、AlgI、AlgJ、AlgF、AlgA),而另一种蛋白质AlgC则在其他地方进行编码^[5]。褐藻胶合成复合体的模型如图3所示。首先,细胞质蛋白质AlgA、AlgC和AlgD通过一系列反应将D-果糖-6-磷酸转化为GDP-甘露糖醛酸,这是合成褐藻胶的活化前体^[6]。其次,GDP-甘露糖醛酸通过聚合成聚甘露糖醛酸链,部分Alg44^[7]也参与了这个过程。Alg8具有多个跨膜结构域和一个细胞质糖基转移酶结构域,而Alg44具有单个跨膜结构域,能将细胞质c-di-GMP结合的PilZ结构域与一个C端周质结构域分开^[8-9]。然后,在聚合时新生的聚甘露糖醛酸链被由AlgG、AlgL、AlgK、AlgX和AlgE组成的周质支架在周围进行置换^[9]。并且在周质中新生褐藻胶链的甘露糖醛酸残基可以通过AlgI、AlgJ和AlgF的作用选择性地在O2/O3位置进行O-乙酰化^[5]。周质支架中的AlgG是一个差向异构酶,能够将 β -D-甘露糖醛酸转化为 α -L-古洛糖醛酸^[10]。AlgL



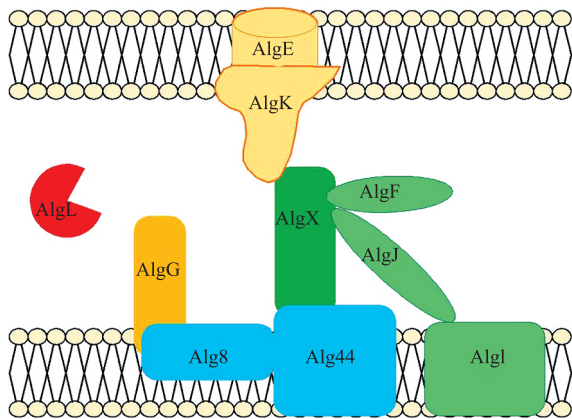
M:甘露糖醛酸残基;A:甘露糖乙酰化酶;E:甘露聚糖 C5 差向异构酶;G:古洛糖醛酸残基;L:褐藻胶裂解酶; Δ :4-脱氧-L-赤式-6-烯吡喃糖醛酸酯残基;D:褐藻胶脱乙酰酶。

图 2 褐藻胶修饰酶的作用示意图

Fig. 2 Schematic diagram of function of alginate-modifying enzymes

是一种双功能周质蛋白质,不仅具有裂解褐藻胶的功能^[11],同时作为修复系统存在于周质中,以清除这些合成异常的褐藻胶分子^[12],保证周质支架的功能完整性。AlgK 位于周质中,通过脂质部分附着在外膜上,是一个广泛参与蛋白质相互作用的结构域^[13]。蛋白质 AlgX 也在周质中与 AlgK 和 MucD 相互作用参与褐藻胶生物合成的翻译后调节。AlgE 在外膜中形成一个 β 桶孔,合成的褐藻胶最后通过 AlgE 从细胞中分泌出来^[6]。

此外如果产生褐藻胶的复合体不能正常工作的话,周质中的聚阴离子褐藻胶会吸引阳离子,从而产生渗透胁迫导致细胞溶解。



参与聚合的蛋白质为蓝色,褐藻胶裂解酶为红色,下同聚体为橙色,而参与乙酰化的蛋白质为绿色。

图 3 铜绿假单胞菌褐藻胶合成复合体模型^[14]

Fig. 3 Alginate synthesis complex model of *Pseudomonas aeruginosa*^[14]

一般来讲,经过修饰后的褐藻胶存在结构上的差异主要涉及以下几点:

1)褐藻胶分子中 M 残基和 G 残基之间的比例

和分布模式发生变化 如图 2 所示,先合成的部分甘露糖醛酸残基(M 残基)通过甘露聚糖 C5 差向异构酶被异构化为古洛糖醛酸残基(G 残基),从而产生 3 种褐藻胶多糖分子片段(poly-G、poly-M、poly-MG)。而 poly-G 和 poly-MG 的长度和数量影响着聚合物的几个重要的物理特性,比如溶液的黏度及凝胶的稳定性、渗透性和水解性^[14]。通常 G 残基含量比较少的聚合物不能形成阳离子凝胶,但是可以形成酸性凝胶。富含 M 残基的褐藻胶表现出免疫刺激性,而 poly-G 则不具有免疫刺激性,即褐藻胶中 M 和 G 的相对含量直接关系到免疫活性强弱,且分子结构中各个聚合体的连接方式和连接顺序对免疫活性也有直接的影响^[15]。

2)不同生物体产生的褐藻胶多糖分子有不同程度的乙酰化修饰 细菌中产生的褐藻胶通常会在 β -D-甘露糖醛酸的 O2/O3 位置上选择性地发生乙酰化修饰^[16],而在海藻中产生的褐藻胶没有这种变化。乙酰基能抑制聚合物与阳离子相互作用,因此褐藻胶的乙酰化可能会提高褐藻胶的黏度,降低其水溶性,从而增强褐藻胶形成凝胶的能力。去除 O-乙酰残基则会导致多糖与二价阳离子结合能力增强,多糖溶解度提高。另外,乙酰化的褐藻胶还可能与透明质酸类似,具有保留水和营养物质的能力^[17]。

3)即使来源相同的褐藻胶其聚合度也有不同^[12]在生物体合成褐藻胶的过程中,可能由于物理或者褐藻胶裂解酶的作用使褐藻胶多糖降解为褐藻胶寡糖,从而改变聚合物的聚合度。聚合度也会影响褐藻胶的黏度和凝胶强度,可以通过 SEC-Malls 等方法测定^[18]。

褐藻胶结构的多样性影响了褐藻胶多糖的物

理化学性质并使其在不同行业中有广泛的应用前景。

在食品行业中,褐藻胶可以作为食品添加剂起到稳定、增稠和乳化等作用^[19]。同时褐藻胶作为一种可食用纤维对预防结肠癌、心血管疾病、肥胖症、体内重金属的积累具有辅助治疗的功效^[20]。

在生物医学材料的应用方面,褐藻胶作为支架材料其柔韧性可以完全弥补组织缺陷,并且光滑的表面可以避免对损伤部位的二次伤害^[21]。Li 等使用褐藻胶和阿拉伯树胶与钙离子介导,通过交联设计获得了最佳黏性水凝胶支架,用于介导和加速一种细胞膜修复中的重要蛋白质 MG53 的释放,以改善伤口的再上皮化过程和持续释放用于治疗慢性伤口^[22]。褐藻胶还是制药工业中常见的赋形剂。有研究者在西咪替丁固定组合片剂中添加褐藻胶用于改善食管反流^[23]。

在医药领域中,褐藻胶具有抗过敏、调节免疫、抗氧化和抗炎等生物活性,能够激活人单核细胞产生在抗肿瘤、抗菌、抗病毒中发挥重要作用的免疫因子^[24],故可用于治疗外伤、修复皮肤损伤,具有良好的止血作用、可靠的治疗效果和较低感染率等特性。Jiang 等证明褐藻胶寡糖显示出有效地抗氧化活性和抗凋亡活性^[25]。

2 褐藻胶裂解酶

褐藻胶裂解酶能够将褐藻胶多糖降解为具有更高生物活性的褐藻胶寡糖^[26]。此外褐藻胶裂解酶还可以用于褐藻资源的生物炼制^[27]及褐藻胶多糖精细结构的表征^[28]等方面。因此挖掘表征具有不同特性的褐藻胶裂解酶,对褐藻资源的利用具有重要的意义。

2.1 褐藻胶裂解酶的来源

在自然界中,褐藻胶裂解酶由许多利用褐藻胶作为碳源的细菌、动植物和病毒产生,目前细菌来源的褐藻胶裂解酶研究最为广泛,已报道的产褐藻胶裂解酶的微生物主要包括弧菌、假单胞菌、黄杆菌、固氮菌、交替假单胞杆菌、鞘氨醇单胞菌以及克雷伯氏菌等^[29]。其次,来源于病毒、真菌以及动植物的褐藻胶裂解酶也有一定的报道,Suda 等于 1999 年在小球藻病毒中也发现了褐藻胶裂解酶的基因^[30]。Inoue 等首次在褐藻植物中提取出了一种褐藻胶裂解酶,进一步拓宽了褐藻胶裂解酶的来源^[31],近年来

不断有人从盐藻、红藻和海带等海洋藻类中分离出褐藻胶裂解酶^[32-33]。在海洋软体动物和棘皮动物体内也可以分离出褐藻胶裂解酶,如黑斑海兔(*Aplysia kurodai*)^[34]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus-hannai*)和短滨螺(*Littorina brevicula*)等^[35-36]。

2.2 褐藻胶裂解酶的分类

目前,褐藻胶裂解酶的分类方式主要有 3 种:

1) 根据氨基酸序列相似性多糖裂解酶被分成不同的家族,在 CAZy 数据库中,褐藻胶裂解酶可归属到 14 个多糖裂解酶家族(PL):PL5、PL6、PL7、PL8、PL14、PL15、PL17、PL18、PL31、PL32、PL34、PL36、PL39 和 PL41 家族^[31],还有一些并不属于以上家族的新型褐藻胶裂解酶,如 *Paenibacillus* sp. LJ-23 中的 Algpt^[37]。其中来自细菌的褐藻胶裂解酶大多数属于 PL5、PL6、PL7、PL15 和 PL17 家族,而来自真核细胞和病毒中的褐藻胶裂解酶主要属于 PL14 家族,不同的家族其在结构上有明显的差异。

2) 如图 1 所示,褐藻胶分子中存在 4 种不同的化学键:M—M、G—G、M—G、G—M,大多数裂解酶对不同的化学键表现出不同的反应速率,根据对不同糖苷键的底物特异性,褐藻胶裂解酶可以分为:专一裂解聚甘露糖醛酸的裂解酶(EC4.2.2.3)、专一裂解聚古洛糖醛酸的裂解酶(EC4.2.2.11)以及对 poly-M 和 poly-G 均表现出高活性,可以更有效地降解褐藻胶的双功能裂解酶(EC4.2.2.-)^[38],并且不是所有的褐藻胶裂解酶都能裂解乙酰化的褐藻胶^[39]。来自软体动物的褐藻胶裂解酶和来自几种海洋细菌的褐藻胶裂解酶多具有 poly-M 底物特异性,那些发现于细菌培养液的胞外酶则大部分具有 poly-G 底物特异性。值得注意的是,某些 poly-M 裂解酶/poly-G 裂解酶并不是只对 poly-M/poly-G 有活性,也可以裂解 poly-G/poly-M 和 poly-MG,只是活性较低。双功能裂解酶多集中在 PL7、PL15 和 PL17 家族中,许多双功能裂解酶对不同的糖苷键活性不同,例如来自 *Persicobacter* sp. CCB-QB2 的双功能裂解酶 AlyQ 对 poly-G 和 poly-M 的活性仅是对褐藻胶活性的 60.7%和 29.0%,表明 AlyQ 更偏好裂解 GM 或 MG 之间的糖苷键^[40]。而来自 *Wenyingshuangia fucanilytica* 的双功能裂解酶 Aly7B_Wf 对 poly-M 和 poly-G 的活性分别为 (27.03±1.69) U/mg 和 (21.48±1.10) U/mg,表明该酶的首选底物为 poly-M^[41]。另外来自 *Sphingomonas* sp. ZH0 的 ZH0-I 对 poly-G

的活性则是对褐藻胶和 poly-M 活性的 120%^[42]。

3)从作用模式来看,褐藻胶裂解酶可以分为3类:(1)内切型褐藻胶裂解酶,目前报道的大多数的裂解酶均具有内切酶活性,这些酶在褐藻胶内部随机切割糖链上的 1→4 糖苷键,并产生不同聚合度(Dps)的不饱和褐藻胶寡糖^[43];(2)外切型褐藻胶裂解酶,一些外切酶可以从多糖的末端切除单体或二聚体寡糖产生不饱和单糖,然后通过非酶反应转化成 DEH(4-deoxy-1-erythro-5-hexoseulose uronate),

如来自 *Zobellia galactanivorans* DsijT 的 AlyA3^[44],目前报道的大多数外切酶属于 PL7、PL15 和 PL17 家族;(3)内切和外切型褐藻胶裂解酶,有一些裂解酶同时具有内切和外切两种活性,例如 Huang 等分离纯化出的 Alg17B 裂解酶对褐藻胶表现出内切和外切两种活性,产生单糖和低相对分子质量寡聚糖^[45]。目前只有 PL6、PL7 和 PL17 家族有过这种类型裂解酶的报道^[38,46-49]。表 1 中列举了已经表征的各个家族的典型褐藻胶裂解酶。

表 1 典型的褐藻胶裂解酶
Table 1 Typical alginate lyase

褐藻胶裂解酶	来源	首选底物	作用模式	主要产物(Dp)	家族	备注	参考文献
AlgL	<i>Azotobacter vinelandii</i>	poly-M	内切	主要是 Dp3,4	5	EC4.2.2.3	[50]
Alga	<i>Pseudomonas</i> sp. E03	poly-M	内切	1~20(主要是 Dp2)	5	EC4.2.2.3	[51]
Alga-II	<i>Sphingomonas</i> sp. A1	poly-G	内切	Dp3,4	5	EC4.2.2.11	[52]
Mase-04135	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	poly-MG(内切)、 poly-G(外切)	内切+外切	Dp2,4	6-1	EC4.2.2.-	[46]
AlyGC	<i>Glaciecola chathamensis</i> S18K6 ^T	poly-G	外切	Dp1	6	EC4.2.2.11	[53]
AlyF	<i>Vibrio splendidus</i>	poly-G	内切	Dp3	6-1	EC4.2.2.11	[54]
TsAly6A	<i>Thalassomonas</i> sp. LD5	poly-G	内切	Dp3	6	EC4.2.2.11	[55]
AlyA3	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ ATCC BAA-1303	poly-MG	内切	Dp2~4	7-1	EC4.2.2.-	[56]
Alyw201	<i>Vibrio</i> sp. W2	poly-G	内切	Dp2~6	7-2	EC4.2.2.11	[57]
Alyw202	<i>Vibrio</i> sp. W2	褐藻胶	内切	Dp2~4	7-2	EC4.2.2.-	[58]
Alg2A	<i>Flavobacterium</i> sp. S20	poly-G	内切	Dp5~7	7	EC4.2.2.11	[59]
FlAlyA	<i>Flavobacterium</i> sp. UMI-01	poly-M	内切	Dp2~4	7	EC4.2.2.3	[60]
Aly7B_Wf	<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127	poly-M	内切	Dp2	7-6	EC4.2.2.3	[41]
PsMan8A	<i>Paradendryphiella salina</i>	poly-M	外切	Dp1	8-4	EC4.2.2.3	[61]
AkAly30	<i>Aplysia kurodai</i>	poly-M	内切	Dp2,3	14-3	EC4.2.2.3	[34]
A1-IV	<i>Sphingomonas</i> sp. A1	poly-M	内切	Dp2,3	15	EC4.2.2.3	[62]
ZHO-IV	<i>Sphingomonas</i> sp. ZHO	褐藻胶、 poly-G、 poly-M	外切	Dp1	15	EC4.2.2.-	[42]
AlyFRB	<i>Falsirhodobacter</i> sp. Alg1	褐藻胶	外切	Dp1	15	EC4.2.2.-	[63]
OalA	<i>Vibrio splendidus</i>	poly-M	外切	Dp1	15	EC4.2.2.-	[64]
AlgL17	<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1	poly-M	外切	Dp1	17-2	EC4.2.2.3	[65]
AlgSH17	<i>Microbulbifer</i> sp. SH-1	poly-M	内切+外切	Dp2,3 Dp1	17-2	EC4.2.2.3	[49]
Alg17C	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	低聚褐藻胶	外切	Dp1	17-2	EC4.2.2.-	[66]

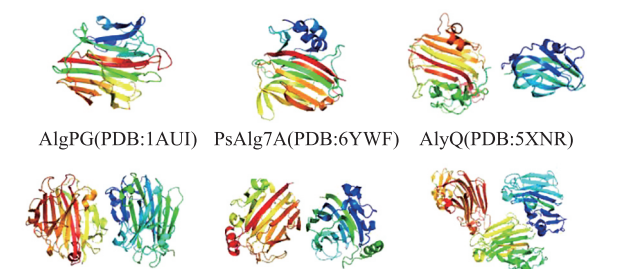
续表 1

褐藻胶裂解酶	来源	首选底物	作用模式	主要产物(D _p)	家族	备注	参考文献
Aly-SJ02	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524	poly-G	内切	D _p 3,4	18	EC4.2.2.-	[67]
PsAly	<i>Paenibacillus</i> sp. str. FPU-7	poly-M	内切	D _p 3~5	31	EC4.2.2.3	[68]
HM-PREF1071_02769	<i>Bacteroides salyersiae</i> CL02T12C01	poly-M	内切	/	32	EC4.2.2.3	[69]
OPIT5_18480	<i>Opitutaceae bacterium</i> TAV5	褐藻胶	内切	/	34	EC4.2.2.-	[69]
Aly36B	<i>Chitinophaga</i> sp. MD30	poly-M	内切	D _p 2	36-2	EC4.2.2.3	[70]
Dp0100	<i>Defluviitalea phaphyphila</i> Alg1	poly-G、poly-M、poly-MG	内切	D _p 2~4	39	EC4.2.2.-	[71]
SjAly	<i>Saccharina japonica</i>	poly-M	内切	D _p 1~4	41	EC4.2.2.3	[72]

2.3 褐藻胶裂解酶的结构

作者所在课题组在褐藻胶裂解酶研究方面发表了多篇综述,详述了褐藻胶裂解酶的结构并阐释了其与底物特异性之间的关系^[29,73-74]。褐藻胶裂解酶的结构可以分成4种类型^[39]:

1)β-胶冻卷结构 这是褐藻胶裂解酶中最常见也是研究得最透彻的一种结构,PL7、PL14、PL18、PL36家族的褐藻胶裂解酶多采用这种结构(见图4)^[75]。该结构可分为两个相互连接的弧形反平行β片:内凹片(SA)和外凹片(SB)。它们在中间进一步弯曲,形成近90°的球状。内凹的薄片形成一个含有催化部位的裂隙并结合底物,在催化反应中起着不可或缺的作用。



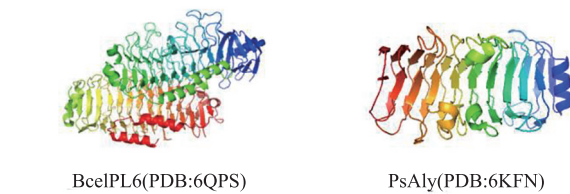
AlgPG、PsAlg7A 和 AlyQ 属于 PL7, AkAly30 属于 PL14, Aly-SJ02 属于 PL18, CK934_20815 属于 PL36。

图 4 β-胶冻卷结构示意图

Fig. 4 Schematic representation of β-jelly roll structure

2)β-螺旋结构 PL6 和 PL31 家族的褐藻胶裂解酶多采用这种结构(见图5),它由3个β-折叠和3个转角(T)组成^[76]。转角(T)分别位于两个β-折叠之间,一起形成了一个完整的β-螺旋(PB1-T1-

PB2-T2-PB3-T3)。利用X射线衍射仪等结构生物学技术对几种具有β-螺旋结构的褐藻胶裂解酶进行了研究。褐藻胶裂解酶 BcelPL6 在溶液中是一种单体,它由两个结构域组成,N 末端结构域(NTD)和 C 末端结构域(CTD)都采用右手平行的β-螺旋折叠。多肽的 C 端(残基 432~468)为两个平行于β-折叠 PB3 平面的3圈α-螺旋。β-螺旋的 N 端部分在 PB1 平面上有一个α-螺旋,C 端部分有一个α-螺旋和一个几乎垂直于 PB3 的β链。生化分析表明,底物结合亲和力主要由 NTD 贡献,而 BcelPL6 的 CTD 参与将底物固定到合适的构象。然而,CTD 具有较弱的褐藻胶裂解酶活性,可与 PL6 结构域协同起到更有效的催化作用。此外,CTD 参与形成一个封闭的催化口袋,它的缺失使 BcelPL6 对高度聚合底物的活性增加^[77-78]。



BcelPL6 属于 PL6, PsAly 属于 PL31。

图 5 β-螺旋结构示意图

Fig. 5 Schematic representation of β-helix structure

3)(α/α)_n桶状结构 PL5 家族褐藻胶裂解酶多采用这种结构(见图6)。这种三维结构是由几个反平行的α-螺旋构成的桶状结构,从其顶部看螺旋环是逆时针方向的。例如,来自 PL5 的 A1-III 的活性中心由12个α-螺旋形成,这些螺旋形成一个具有深隧道状裂隙的α₄/α₅桶折叠。在这种模式下,底物

穿透到隧道状裂隙中,并进一步与催化位置相互作用^[52]。



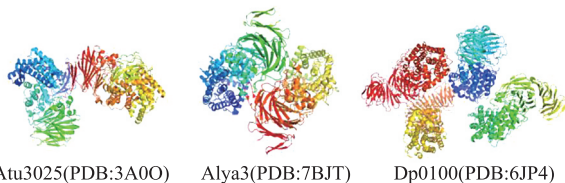
AI-III(PDB:1HV6)

AI-III 属于 PL5。

图 6 $(\alpha/\alpha)_n$ 桶状结构示意图

Fig. 6 Schematic representation of $(\alpha/\alpha)_n$ barrel structure

4) $(\alpha/\alpha)_n$ 桶+反平行 β -折叠结构的组合结构 PL15、PL17 以及 PL39 家族褐藻胶裂解酶多采用这种结构(见图 7)。PL15 家族中的 Atu3025 被鉴定为该结构,其次还有一个口袋状结构,口袋由两个结构域决定因素构成,即中心结构域和 C 端结构域之间界面的构象变化和短 α -螺旋 H3 的存在,合理推测口袋状结构是 PL15 家族褐藻胶外切裂解酶的特征,对于释放不饱和单糖作为唯一产物并识别底物非还原末端的外切模式至关重要^[79]。PL39 中的 Dp0100 褐藻胶裂解酶整体由 3 个结构域组成,N 端结构域主要是螺旋结构,由不完整的 $(\alpha/\alpha)_6$ 环形成。中心结构域由 16 条反平行的 β 链排列在两个 β -折叠中,并带有扭曲的 α -螺旋。C 端结构域由两个反平行 β -折叠组成,形成一个典型的由 16 条 β 链组成的 β -三明治。中心结构域的一面紧贴 C 端结构域,形成一个 4 层 β -折叠层,另一面紧贴 N 端结构域^[80]。



Atu3025 属于 PL15, Alya3 属于 PL17, Dp0100 属于 PL39。

图 7 $(\alpha/\alpha)_n$ 桶+反平行 β -折叠结构结构示意图

Fig. 7 Schematic representation of $(\alpha/\alpha)_n$ barrel + antiparallel β -fold structure

而 PL8、PL32、PL34 以及 PL41 家族褐藻胶裂解酶的结构尚未得到解析。

2.4 褐藻胶裂解酶的作用机制

褐藻胶裂解酶通过 β -消除反应裂解褐藻胶,在

C4~C5 位形成不饱和双键,并在新的非还原末端存在一个 4-脱氧-L-赤式-6-4-烯吡喃糖醛酸酯残基,这个双键在 235 nm 处有吸光度,可以用来定量测定褐藻胶裂解酶的活性^[81]。

Gacesa 提出整个 β -消除反应通过三步反应去完成^[82]:首先,带正电的氨基酸残基或者金属离子中和 C5 位羧基上的负电荷从而降低 H-5 质子的 pKa;其次,催化碱从 C5 位提取一个质子从而形成烯醇中间体,羧基上的电子转移裂解 4-O-糖苷键,导致在 C4~C5 位形成双键并最终使得糖苷键的断裂;最后,在糖苷键断裂的同时产生了含有 4-脱氧-L-赤式-6-4-烯吡喃糖醛酸酯残基作为不饱和非还原末端的寡糖。该反应过程中需要催化碱去提取质子,并且需要催化酸去提供质子。当 C5 位提取质子的方向与 C4 位桥接氧在糖醛酸环的方向在同侧时为顺式消除(从 M 残基处进行消除),当两者方向相反时为反式消除(从 G 残基处进行消除)。

根据催化位点以及中和底物负电荷的方式不同可将绝大多数褐藻裂解酶的消除反应分为六大类:

1)金属离子辅助催化 PL6 家族使用钙离子去中和 C5 位羧基上的负电荷,然后 Lys 充当催化碱从 C5 位提取一个质子,Tyr 充当催化酸提供一个质子^[83]。

2)His/Tyr 型 β -消除 PL7 和 PL15 家族中的褐藻胶裂解酶采用 Tyr 以及 His 分别充当催化酸和催化碱^[84-85]。

3)Tyr/Tyr 型 β -消除 在催化过程中,两个 Tyr 分别充当催化酸和催化碱,例如 PL17 家族中的 Alg17c,该酶分别采用 Tyr450 残基充当催化碱和 Tyr258 作为催化酸^[86]。

4)Tyr/Tyr 型 β -消除 PL5、PL14 和 PL18 家族中的褐藻胶裂解酶在催化过程中,同一个 Tyr 既充当催化酸又充当催化碱^[87-89]。

5)水催化型 β -消除 在催化过程中水分子用于中和羧基上的负电荷,Arg 以及 Lys 分别充当催化酸和催化碱。

6)Lys/Lys 型 β -消除 在催化过程中同一个 Lys 既充当催化酸又充当催化碱,例如 PL36 家族中的 Aly36B 在催化过程中 Arg169、Tyr185 和 Tyr187 负责中和底物的负电荷,Lys143 既充当催化酸又充当催化碱^[70]。

2.5 褐藻胶裂解酶的酶学特性

目前针对褐藻胶裂解酶酶学特性的研究报道较少,而某些酶学性质如嗜热、嗜冷、温度稳定性、pH稳定性和盐活化等的研究有利于酶适应生存环境和应用于工业化生产。因此,作者对已报道的典型褐藻胶裂解酶的酶学性质进行了整理。

热稳定性是褐藻胶裂解酶应用中最重要性质之一,在褐藻胶裂解酶催化过程中,由于热稳定性的存在,催化反应可以在更高的温度下进行,反

应混合物黏度的降低和酶活性的提高从而促进底物的转化^[90]。当催化海带粉等粗基质发生转化时,高工艺温度(高于45℃)还可以防止微生物污染。因此具有良好热稳定性的褐藻胶裂解酶对于褐藻胶低聚糖的酶促生产有重要价值。目前已知的大多数褐藻胶裂解酶不具有热稳定性,只在30~40℃表现出最佳催化活性^[91],而关于具有热稳定性的褐藻胶裂解酶报道较少,表2中列举了目前报道的一些热稳定性良好的褐藻胶裂解酶。

表2 典型的热稳定性褐藻胶裂解酶

Table 2 Typical thermostable alginate lyase

酶	来源	最适温度/℃	热稳定性	参考文献
rSAGL	<i>P. pastoris</i>	45	在50℃的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中孵育72 h后,可保留49.0%的初始活性	[92]
AMOR_PL17A	北极中洋海脊(AMOR)宏基因组学数据集	>50	在90℃时的产物产量比40℃时高18倍,在没有底物的条件下AMOR_PL17A能够在60℃下稳定24 h	[93]
rNitAly	深海热液喷口	70	在67℃条件下孵育30 min后活性仍保留50%,即使在100℃条件下处理30 min后仍旧残留10%的活性	[94]

到目前为止有关褐藻胶裂解酶耐热机制的相关研究还较少,根据已有报道,rNitAly的热稳定性与Cys80和Cys232之间形成的二硫键有关^[94]。来自*Cobetia* sp. NAP1的AlgC-PL7的热稳定性可能与 α -螺旋有关^[95]。Yang等对AlyM进行保守结构域重建,去除F5_F8_type_C结构域后,在45℃下孵育1 h的热稳定性由保留30%~40%的酶活力提升到了保留大约70%的酶活力^[96],经截断后的突变体具有比全酶更紧凑的结构,能更好地抵抗热变性的影

响,证明酶的热稳定性也可能与酶的结构紧凑程度有关。

在低温条件下进行酶促反应可以减少能耗、降低微生物污染的风险和终止催化反应的难度,一般的耐冷性褐藻胶裂解酶在低于35℃时具有最高的催化活性,并通常在20℃时保留最高活性的50%^[57]。表3中列举了3种具有良好低温稳定性的褐藻胶裂解酶。

表3 典型的耐冷褐藻胶裂解酶

Table 3 Typical cold-adapted alginate lyase

酶	来源	最适温度/℃	低温稳定性	参考文献
Alg2951	<i>Alteromonas portus</i> HB161718	25	在低于30℃的温度下有很好的稳定性	[47]
Alyw201	<i>Vibrio</i> sp. W2	30	在低温10℃和20℃下,催化活性分别为最高活性的72.9%和38.4%	[57]
AlyC3	<i>Psychromonas</i> sp.	20	在1℃下保持其最高活性的48.2%	[97]

对于大多数褐藻胶裂解酶来说,催化的最适pH接近中性,并且只在狭窄的pH范围内表现出较高活性,也有一些酶在狭窄的pH碱性条件下表现出最高活性。只有少数酶在较宽的pH范围内表现出较高活性。例如来自*Vibrio* sp. NJ-04的AlgNJ-04裂解酶在pH 4.0~10.0的宽pH范围内保留了超过80%的活性,表现出优异的pH稳定性^[98]。而Alyw201在pH 5.0~10.0孵育12 h后仍保留超过

70%的活性。特别是在检测到的整个pH范围(pH 3.0~11.0)中,孵育12 h后仍保留超过40%的活性^[57]。另外,来自*Pseudalteromonas carrageenovora* ASY5的Alg823^[99]、*Vibrio* sp. SY01的Aly08^[100]、*Serratia marcescens* NJ-07的AlgNJ-07^[101]、*Paenibacillus* sp. LJ-23的Algpt^[37]等均具有良好的pH稳定性。

从海洋环境中分离出的褐藻胶裂解酶通常还

具有盐活化这一特性,即在一定浓度的氯化钠溶液中,褐藻胶裂解酶的活性增加数倍,反映了它们对海水环境的适应能力。如在 1 mol/L NaCl 条件下,AlgM4 的活性增加了约 7 倍^[102];AlyPM 其活性在 0.5~1.2 mol/L NaCl 条件下可以增加 6 倍^[103];而对于来自 *Vibrio* sp.的 A9mT 在 0.4 mol/L NaCl 条件下其活性增加了 24 倍^[104]。尽管到目前为止已经发现了很多褐藻胶裂解酶可以被盐激活,但是其中的激活机制并没有被彻底揭示出来。根据已有报道,AlgNJ-04 的盐活化特性是由于褐藻胶分子中结合水的去除或褐藻胶-酶复合物形成过程中的电荷效应^[98]。AlgM4 的二级结构中 α -螺旋和 β -折叠的含量被 NaCl 改变从而增强了其对底物的亲和力和抵抗热变性的能力^[102]。AlyPM 的盐活化特性也是由于在 NaCl 存在时其对底物亲和力增强,但是结构并不发生变化^[103]。AlyC3 的盐活化机制则是因为保留了二聚体四元结构^[97]。

总之,目前对褐藻胶裂解酶的基础研究依然主要集中在新型褐藻胶裂解酶的表面、酶学性质分析以及对酶的三级结构分析,而为了更好地利用褐藻胶裂解酶进行工业化生产,需要进行更多的研究来揭示褐藻胶裂解酶催化机制。

2.6 褐藻胶裂解酶的应用

褐藻胶裂解酶的应用包括褐藻胶寡糖的制备、原生质体分离、肺囊性纤维化病的治疗以及褐藻胶测序等方面。

1)褐藻胶寡糖的制备 褐藻胶寡糖相对分子质量小,具有多种生物活性。褐藻胶寡糖的制备方式包括酸解、热解和酶解等。Iwamoto 等比较了酸解和酶解制得的褐藻胶寡糖对肿瘤坏死因子 TNF- α 的诱导活性,结果证明酶解得到的褐藻胶寡糖具有更加广泛的生物活性^[105]。根据 Belik 等报道通过褐藻胶裂解酶降解天然的聚甘露糖醛酸,产生的甘露糖醛酸寡糖可用于协同治疗肿瘤^[106]。

2)原生质体分离 褐藻胶是褐藻细胞壁中含量最丰富的成分,除此还有岩藻糖胶、纤维素、多酚和蛋白质等物质。研究表明多酚与褐藻胶网络相连从而进一步加强细胞壁^[107]。采用纤维素酶和褐藻胶酶混合的方法可以降解褐藻细胞壁,释放原生质体^[108]。

3)肺囊性纤维化病的治疗 褐藻胶裂解酶能够配合一些抗生素降解肺囊性纤维化病人肺中病

原菌产生的褐藻胶,使病原菌的细胞壁通透性增强,利于抗生素发挥抗生作用^[109]。Patel 等开发了环丙沙星-褐藻胶裂解酶功能化壳聚糖纳米颗粒(AgLase-CIPR-CH-NPs)用于有效治疗肺囊性纤维化患者铜绿假单胞菌感染^[110]。

4)褐藻胶测序 核磁共振是表征褐藻胶分子最常见的一种方法,然而其只能得出 G 残基和 M 残基的统计分布,利用具有特殊底物特异性以及作用模式的酶来降解褐藻胶,再结合一些现代分析方法如质谱等对褐藻胶片段进行表征能够进一步测量片段长度分布^[28]。

5)生物燃料的制备 褐藻因其高生长速率和高糖分含量而被认为是生物燃料乙醇生产中的可再生生物质。由于缺乏木质素,褐藻生物质的糖化相对容易。但是传统的工业微生物无法代谢褐藻胶,经代谢工程改造的微生物生产的外切型褐藻胶裂解酶可以有效利用褐藻胶,以此克服了该问题^[111]。Wang 等优化了两种重组褐藻胶裂解酶(内切型 Alg7D 和外切型 Alg17C)的酶促糖化过程,以便从褐藻胶中高效生产 DEH,而 DEH 是利用褐藻生物质生产生物燃料的关键底物^[112]。

2.7 提高褐藻胶裂解酶的应用能力

目前针对褐藻胶裂解酶的应用能力,主要是通过酶的固定化和酶的分子改造提高酶活性或者改善某种特性,大大提高了酶的工业化应用效率。

为了发挥酶的最大应用价值,近年来研究人员证明了固定化酶在稳定性、可重复利用性和易于分离方面显示出比游离酶更好的优势,酶可以通过吸附、包埋和交联进行固定化。目前对固体载体上固定褐藻胶裂解酶已经进行了一些研究,例如生物聚合物微球、超滤膜、壳聚糖纳米颗粒、介孔氧化钛颗粒等,为褐藻胶寡糖的生产、工业废水的处理以及抗生物膜治疗等方面提供了褐藻胶裂解酶应用的途径^[25,83]。作者所在课题组将褐藻胶裂解酶 AlyPL6 固定在介孔氧化钛颗粒(MTOPs)上后,在重复使用 10 次后,在 45 °C 下保留 >55.4% 的活性^[113]。Li 等将褐藻胶裂解酶 Aly08 固定在低相对分子质量壳聚糖纳米颗粒上,与游离的 Aly08 相比,固定化的 AL-LMW-CS-NPs 在抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成和阻断成熟的生物膜方面表现出更高的效率,使得铜绿假单胞菌的生物量大大减少。该研究促进了褐藻胶裂解酶作为抗生物膜剂的进一步发展^[114]。而

Meshram 等将 AlgL 固定在醋酸纤维素超滤膜上,成功地解决了多糖结垢问题对水净化的影响^[115]。

酶的分子改造主要包括合理设计、半理性设计、定向进化、保守结构域重组和非催化结构域截断^[116],经过分子改造后的突变体具有与初始酶不同的酶学特性。作者所在课题组系统总结了褐藻胶裂解酶分子改造的研究进展^[117],目前常以引入二硫键、重建保守结构域以及定向进化来提高酶的活性和稳定性。例如, Yang 等在对 cAlyM 的催化位点、二级结构以及空间构型进行综合分析后,在分子中引入了二硫键,设计出了突变体 D102C-A300C 和 G103C-T113C, $t_{1/2}$ (45 °C) 分别增加了 2.25、1.16 h^[118]。作者所在课题组研究发现褐藻胶裂解酶 Aly7B 在 35 °C 下表现出较差的热稳定性。然而,当截断 Aly7B-CDI (非催化结构域;R2~Y181) 时, Aly7B-CDII (催化结构域;W190~H477) 在 35 °C 下活性可以保持不变^[119],热稳定性大大提高。Xu 等通过在 AlgL-CD 的活性中心引入碱性氨基酸来合理设计酶分子以增加酶活性,其中突变体 E226K 的整体构象变得更加灵活,与底物的亲和力增加,表现出比野生型 AlgL-CD 更高的酶活力,但同样由于钙结合环的灵活性变高,与 Ca²⁺ 的结合能力变弱, E226K 的热稳定性变差^[120]。而 Su 等基于 E226K 的作用模式,选择 loop 环 1 上的 I211 位点和底物入口处的 E276、Y292 和 R294 位点作为工程靶点,设计出的突变体 E226K/I211T/R294V 催化裂隙周围的环更灵活、底物入口更大,酶的催化效率提高了 4.78 倍,半衰期 $t_{1/2}$ (45 °C) 从 89 min 增加到 557 min^[121]。此外,分子改造还可以用于改造酶的最终产物, Zhang 等报道了借助 AlyF 中间产物的裂解模式变化,对与糖结合的残基 Arg266 进行位点突变,改变亚位点对糖的亲和力,结果证明 F128T/W172R/R226H 突变体的主要产物由三糖(三糖占比为 87.0%)变为二糖和三糖(二糖占比提高到 40.5%)^[122]。

3 甘露聚糖 C5 差向异构酶

甘露聚糖 C5 差向异构酶 (mannuronan C5-epimerase, MC5E) 是一种褐藻胶修饰酶,催化褐藻胶中的 β -D-甘露糖醛酸(M) 转化为 C5 同分异构体 α -L-古洛糖醛酸(G)。研究表明纯化后的一些 MC5Es 能在体外引入 G 片段,并进一步增加褐藻胶中的 G 残基含量,经验证 AlgE2 在特定的褐藻胶中

将 G 残基相对含量从初始值 (0~45%) 提高到约 70%^[123]。而 AlgE6 和 AcAlgE1 甚至可以将 G 残基相对含量分别提高到 78% 和 87%^[124]。考虑到褐藻胶的理化性质和生物活性与 G/M 的含量有关, MC5E 作为一种褐藻胶修饰酶是生产具有特殊性质的褐藻胶的重要工具酶。

3.1 甘露聚糖 C5 差向异构酶的来源及分类

MC5Es 有两个主要的来源:真核生物来源,包括褐藻、海带和昆布等;细菌来源,主要包括假单胞菌属(如荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、丁香假单胞菌和门多萨假单胞菌)和固氮菌属(如圆褐固氮菌和棕色固氮菌)^[124]。不同物种中的 MC5Es 具有不同的数量、类型和特征。

MC5Es 可分为 Ca²⁺ 依赖亚型和 Ca²⁺ 非依赖性亚型。例如丁香假单胞菌中的 PsmE、圆褐固氮菌中的 AcAlgE1 以及棕色固氮菌中 AlgE1~7 的酶活性取决于 Ca²⁺ 的存在,而丁香假单胞菌、棕色固氮菌、铜绿假单胞菌中的周质 AlgG 可以在无 Ca²⁺ 条件下高效地将甘露糖醛酸转化为古洛糖醛酸^[125]。对于依赖 Ca²⁺ 的 MC5Es 来说, Ca²⁺ 参与中和异构化反应中甘露糖醛酸的电荷,而在丁香假单胞菌中的 Ca²⁺ 非依赖型周质 AlgG 中一些特殊的氨基酸,如 Arg345,也可以执行同样的功能^[126]。

MC5Es 也可以分为单功能和双功能 MC5Es。例如棕色固氮菌中的 AlgE2 和 AlgE7 都具有差向异构酶活性和裂解酶活性,在存在 Ca²⁺ (3.3 mmol/L) 的情况下, AlgE2 可以修饰褐藻胶并使其链中的糖苷键发生断裂,具体表现为催化后的褐藻胶平均相对分子质量下降和整个褐藻胶溶液的黏度下降^[123]。同样, AlgE7 也具有与 AlgE2 相同的双功能且其裂解酶活性高于 AlgE2^[127]。Gawin 等也在 2020 年从棕色固氮菌中鉴定出 3 种褐藻胶修饰酶,其中 AcAlgE2 和 AcAlgE3 具有裂解酶和异构酶活性,且在体外条件下只显示出裂解酶活性^[128]。来自铜绿假单胞菌的 AlgG 不仅具有异构酶活性,而且还能保护褐藻胶不被降解^[129]。来自丁香假单胞菌中 Ca²⁺ 依赖的 PsmE 会催化褐藻胶中的 M 残基的异构化和 O-乙酰水解^[125]。

3.2 甘露聚糖 C5 差向异构酶的结构及催化机制

棕色固氮菌产生的 7 种分泌性差向异构酶 (AlgE1~7, AlgEs) 结构特征已经研究清楚, AlgEs 由两个不同的蛋白质模块组成,包括一个或两个 A 模

块(约 385 个氨基酸)和 1~7 个 R 模块(约 150 个氨基酸)^[123]。每个 AlgE 都有一个独特的 A 和 R 模块的序列、数量和分布(见图 8),每个胞外 AlgE 的最后一个 R 模块通常都有一个参与酶分泌的非结构化多肽^[130]。含有与褐藻胶和 Ca²⁺结合位点的 A 模块可以进行异构化反应和确定最终的异构化反应模式^[131]。而 R 模块不具有异构化活性,主要通过降低催化反应对 Ca²⁺浓度的要求,使 A 模块的催化活性提高了约 10 倍^[132]。除此之外,具有 9 个氨基酸序列的 4~7 个重复的 R 模块参与了酶的分泌和 Ca²⁺的结合^[130]。丁香假单胞菌的 PsmE 具有与 AlgEs 相似的 A 和 R 模块,同时还具有额外的 M 区、N 区和 RTX 区。M 区和 RTX 区都是参与 Ca²⁺的结合,而 N 区是一种乙酰化酶^[125]。此外,圆褐固氮菌中的 AcAlgE1、AcAlgE2 和 AcAlgE3 具有与 AlgEs 相同的模块结构^[35]。

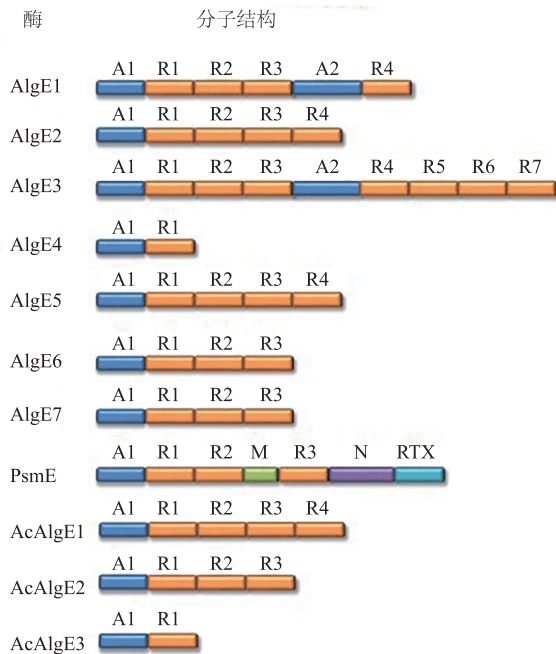


图 8 MC5Es 的模块结构

Fig. 8 Module structure of MC5Es

研究人员通过核磁共振方法确定了 AlgE4 的结构,AlgE4 的 A 模块折叠成一个右手平行 β -螺旋,由 4 个平行的 β -折叠组成,包括 12 个完整的匝数^[133]。突变体实验证明,Tyr149、Asp152、His154 和 Asp178 是 AlgE4 活性的关键残基,甘露糖醛酸的质子化羧基可以与 Asp152 (或 Asp178) 形成氢键,Tyr149 作为催化碱提取与 C5 结合的质子,质子化的 His154 作为催化酸贡献一个质子对 C5 进行亲

核攻击,最后形成古洛糖醛酸^[133]。R 模块形成了一个右手平行的 β -胶冻卷。根据计算,A 模块可以结合 11 个糖醛酸残基,R 模块可以结合 5 个残基^[134]。AlgE4 的结构模型可以用于更好地理解其他 AlgE1~7 结构。

Wolfram 等解释了来自丁香假单胞菌的 AlgG 的分子结构,它折叠成右手平行 β -螺旋,有 11 个完整的线圈和一个不完整的线圈,其中线圈 4~10 形成一个碳水化合物结合域或糖类水解结构域^[126]。

研究表明,褐藻胶裂解酶和甘露聚糖 C5 差向异构酶的催化机制是相似的^[133],裂解反应和异构化反应都涉及 3 个步骤,两者均需要中和羧基上的负电荷,并催化提取 C5 位上的质子,两者的反应机理差异发生在最后一步,对于裂解酶来说,最后一步是糖苷键的断裂,同时在 C4 和 C5 之间形成双键,离开的基团发生质子化形成一个新的还原端。而甘露聚糖 C5 差向异构酶需要一个氨基酸残基,该残基能够从吡喃糖环的另一侧向 C5 提供一个质子,形成 C5 差向异构体。

AlgG 和 AlgE4 的 A 模块的整体结构与一些 β -螺旋结构的褐藻胶裂解酶(PL6、PL31 家族)在结构上有相似之处,然而使用 Dail 进行蛋白质结构比较结果表明,它们之间没有任何可能表明共同进化起源的序列同源性,并且这些褐藻胶裂解酶的催化残基在 AlgE4 中的 A 模块中并不保守^[133]。异构酶 AlgE4 中的 A 模块的催化位点更类似于褐藻胶裂解酶 A1-III(PL5 家族)和 ALY-1(PL7 家族),ALY-1 和 A1-III 的底物结合裂缝中心的 4 个催化残基(Gln/Asn、His、Arg 和 Tyr)在反应机理中起着关键作用。AlgE4 中的 A 模块的活性位点 Asp152、His154、Lys117 和 Tyr149 也显示出相同的空间排列,并且甘露糖醛酸三糖以与 A1-III 中结合的三糖非常相似的方向和位置结合。尽管 4 个活性位点氨基酸残基的位置相似,但是其他重要残基(尤其是 Asp178)和亚位点-2 和-3 的环境非常不同。

AlgG 与 AlgE4 的活性位点结构非常相似,活性位点的主要区别在于 AlgE4 不包含与 AlgG 中发现的 Arg345 相当的残基,而是包含参与形成 AlgE4 中 Ca²⁺结合位点的几个酸性残基。正如在大多数 β -螺旋褐藻胶裂解酶中所发现的那样,这种 Ca²⁺在反应过程中能够中和糖醛酸的羧酸基团,从而发挥与 Arg345 相当的作用^[126]。依赖 Ca²⁺的褐藻胶裂解酶和

AlgE4 通过 Ca^{2+} 中和糖醛酸上的负电荷, 而不依赖 Ca^{2+} 的褐藻胶裂解酶和 AlgG 则使用一个精氨酸残基来完成这个反应^[135]。在第二步催化中, 精氨酸或赖氨酸通常作为裂解酶的催化碱基, 而去质子化的 His319 能够从甘露糖醛酸的 C5 中提取质子, His319 很可能在 AlgG 的催化反应中起催化碱基的作用。那么, 水分子在 AlgG 的催化过程中充当催化酸, 这也与前文中提到的一些具有 β -螺旋结构的褐藻胶裂解酶也有水分子作为催化酸的结论一致^[126]。

对于双功能酶 AlgE7, Gaardlos 等解释了两种活性如何相互调节的结构基础, 首先异构酶和裂解酶活性具有相同的催化位点, 这两种活性通过不断改变褐藻胶链而相互影响, 并且产物的形成高度依赖于酶作用于哪种底物。当使用明确的底物 poly-M 和 poly-MG 时, 裂解酶优先的裂解位点为 $\text{M} \downarrow \text{XM}$ 和 $\text{G} \downarrow \text{XM}$ (X 为 G 或 M)。其中 H154 在反应中充当催化碱, Y149 充当催化酸, 而突变体 R148G 几乎失去了所有裂解酶活性, 但保留了异构酶活性, 因此推测 R148 会影响 Y149 将质子提供给糖苷键或糖环的另一侧^[136]。

3.3 甘露聚糖 C5 差向异构酶的作用方式

关于 MC5E 作用方式的报道较少, 相关报道主要集中在棕色固氮菌中的 AlgE 家族, 目前已经提出两种反应模式, 即优先攻击模式和渐进作用模式^[137]。在优先攻击模式中, 酶优先攻击邻近 G 残基中的 M 残基, 并在每次差向异构化反应后脱离底物^[138]。而在渐进作用模式中, 由于甘露糖醛酸之间通过 β -1,4 糖苷键连接, 每个残基相对于其相邻残基旋转近 180° , 因此酶和多糖链相对移动, 使得下一次异构化反应可以在酶与底物不解离的情况下完成^[138]。有研究报道了 AlgE4 的渐进作用模式, 酶沿着底物链进行滑动, 每隔一个残基进行一次异构化, 不需要发生旋转。即底物封闭在一个相对较大的凹槽中, 并且在活性位点的每一侧都有一个夹子, 该夹子封闭了聚合物并帮助其滑动^[137]。而丁香假单胞菌中的 AlgG 也遵循渐进作用模式, 这也是为什么假单胞菌中的褐藻胶出现 M 和 G 交替的原因^[126]。此外, AlgE2 和 AcAlgE1 遵循优先攻击模式进行反应, 并且与底物的组成和钙离子的浓度有关^[126,128]。而其余的 AlgEs 都是根据优先攻击模式或者两种机制的组合进行反应^[132]。

由于反应模式的不同, 不同的 AlgEs 异构酶所

产生的产物也不同。据报道, AlgE1 具有两种不同的催化结构域, 一种产生 poly-G, 一种产生 poly-MG^[139], AlgE2 和 AlgE5 主要产生短的 poly-G^[140], PsmE、AlgE6 和 AcAlgE1 主要产生长的 poly-G^[140], AlgE4 主要产生 poly-MG^[141]。人们可以利用该产物特点获得不同类型的褐藻胶低聚糖。

3.4 甘露聚糖 C5 差向异构酶的酶学特性

目前已经表征的大多数异构酶的最适 pH 在 6.5~8.0, 最适温度范围为 30~40 $^\circ\text{C}$ ^[124]。据报道, 来自 *Pseudomonas mendocina* sp.DICP-70 的 PmC5A 作为裂解酶和异构酶时的最适 pH 分别为 8.0 和 9.0, 是目前最适 pH 最高的酶^[142]。金属离子影响酶活力, 当 Na^+ 浓度为 100~200 mmol/L 时, AlgE1 活性最高^[124]。对于 AlgE2, Ca^{2+} 浓度为 0.58 mmol/L 时, 初始反应速率随 Na^+ 浓度的增加而增加, 当 Ca^{2+} 浓度达到 3.3 mmol/L 时, Na^+ 对异构化反应没有促进作用, 而当 Na^+ 浓度达到约 20 mmol/L 时, 对异构化反应有抑制作用^[143]。对于双功能酶 AlgE7, 较高的 Na^+ 浓度可降低裂解酶活性并增加 poly-G 的形成, 而高 Ca^{2+} 浓度则提高裂解酶活性并减少 poly-G 的形成^[136], 因此, 可以通过调节 Na^+ 与 Ca^{2+} 浓度来调节 AlgE7 的裂解酶活性与异构酶活性, 获得目标产物。研究人员还证明在某些情况下 Sr^{2+} 可以代替 Ca^{2+} , 但酶的活性明显降低^[144]。

3.5 甘露聚糖 C5 差向异构酶的应用

MC5E 作为一种褐藻胶修饰酶, 能够增加底物的 G 残基含量, 将褐藻胶或褐藻胶寡糖升级为具有长 poly-G 或 poly-MG 的产品, 该类型的产品表现出优良的机械性能和独特的生物活性, 可以应用于制备药物释放材料、用作抗菌剂、促进角质细胞增殖等方面。

1) 制备具有优异机械性能的材料 富含 G 的褐藻胶分子可以通过与一些二价离子结合而形成热稳定的三维凝胶网络, 形成的凝胶^[145]具备一定的刚性和机械强度, 具有低收缩、高孔隙率^[146]、高稳定性和高交联密度等特点。用 MC5E 调节褐藻胶分子中的 G 残基含量从而制备具有优异机械性能的材料是一种较为简单、可控和节能的方法。

2) 制备应用于药物释放的褐藻胶 褐藻胶是输送药物的理想材料。药物扩散过程的速度主要与褐藻胶分子的孔隙大小有关, 研究表明, poly-G 含量较高的褐藻胶分子具有更开放的孔隙结构, 表现出

较高的扩散能力。而富含 M 的褐藻胶分子是软的,多孔性较差,并且随着时间的推移容易脱胶^[147]。因此,富含 G 的褐藻胶能够更好地保护药物不被破坏,使其达到特定的位置并最大限度地发挥药效。

3) 增强褐藻胶寡糖的抗菌活性 富含 G 的褐藻胶寡糖可以通过与细胞表面的结合来分解生物膜,影响表面电荷,导致微生物的聚集,并通过阻止微生物移动来影响致病微生物的活性并增强抗生素的效果,因此 M/G 残基比率低的褐藻胶寡糖表现出突出的抗菌活性并可以用来制备抗菌剂^[148]。

4) 制备促进角质细胞增殖的褐藻胶寡糖 褐藻胶和褐藻胶寡糖也可以应用于治疗脱发症,因为它们不仅可以作为凝胶基质嵌入和装载活性成分,还可以促进角质细胞增殖。其中,具有由末端还原的 poly-MG 组成的褐藻胶寡糖组分是角质形成细胞生长最有效的激活剂^[149]。

4 褐藻胶乙酰化

细菌中的褐藻胶在 O2/O3 位上发生乙酰化,增加了自身的水合能力和黏度,有助于聚合物作为保护膜靠近细菌并阻碍免疫细胞的运动,同时乙酰化还使褐藻胶裂解酶无法作用于 M 残基,从而保护褐藻胶不被裂解成褐藻胶寡糖。然而到目前为止还没有发表过详细的褐藻胶乙酰化机制。

4.1 褐藻胶乙酰化机制初步分析

目前对铜绿假单胞菌中乙酰化褐藻胶的生物合成途径及相关基因已经基本了解,研究表明 AlgI、AlgJ 和 AlgF 形成一个多蛋白质复合体,并借助 Alg8 和 AlgX 形成的分泌多蛋白质复合体与包膜上的褐藻胶发生聚合作用,进行褐藻胶的 O-乙酰化反应过程。虽然 AlgI、AlgJ 和 AlgF 不是褐藻胶合成蛋白质复合体的一部分,但它们是褐藻胶乙酰化所必需的,Chanasit 等也通过实验证明了这一点^[150]。AlgI 是一种膜结合型 O-乙酰基转移酶,其从未知的细胞质乙酰基供体通过细胞质膜转移乙酰基,而 AlgJ 附着在内膜上,将乙酰基转移到 AlgX,AlgX 是甘露聚糖 O-乙酰化酶,包含一个碳水化合物结合模块,能够将 M 残基乙酰化^[151]。

研究表明乙酰化程度高的褐藻胶的异构化程度较低^[152],原因可能是乙酰化酶 AlgX 和周质异构酶 AlgG 均是修饰酶复合体的一部分,可以看做是多糖底物的固定化酶,两者均能够结合 M 残基并进

行修饰反应,但目前尚不清楚两种酶在与褐藻胶的结合上是否存在竞争关系^[126]。

4.2 研究乙酰化机制的意义

高乙酰化褐藻胶具有的黏度高、水合能力强、G 残基含量低等特点使其在组织工程开发和再生医学中的水凝胶和支架以及含有生物活性胶囊化合物的伤口敷料等众多材料方面具有巨大潜力^[153]。

铜绿假单胞菌形成以乙酰化褐藻胶为主要成分的生物被膜,可以提高生物被膜的稳定性,从而有助于细菌抵抗恶劣的生存环境。同时相比于浮游细菌,生物被膜内的铜绿假单胞菌对抗生素的耐药性提高了 10~1 000 倍,乙酰化褐藻胶是导致细菌耐药性和细菌免疫逃逸的主要原因^[154]。因此研究褐藻胶的乙酰化机制对于治疗铜绿假单胞菌感染也具有重要意义。

5 褐藻胶脱乙酰化酶

乙酰化的褐藻胶可以自发产生脱乙酰化,但在正常条件下反应缓慢,前文中提到,胞外甘露聚糖 C5 差向异构酶可以催化产生 G,而这些酶不能催化已经乙酰化的残基,根据对 AlgE4 的晶体结构的分析表明这是由于空间位阻的限制,因此,为了获得高 G 含量的褐藻胶,需要对已经乙酰化的残基进行去乙酰化。

目前还没有发现假单胞菌能够产生连续 G 残基的褐藻胶,但是人们在丁香假单胞菌中发现了一种分泌性甘露聚糖 C5 差向异构酶 PsmE,该酶能够在体外催化生成连续的 G 残基聚合物,PsmE 能够催化乙酰化底物进行差向异构化反应,是一种具有脱乙酰基和 C5 差向异构功能的双功能酶,使得菌株产生的褐藻胶具有较低乙酰基数量和较高 G 残基含量的特性^[125]。

6 展望

尽管目前已经表征了大量的褐藻胶裂解酶,特别是对于来自海洋细菌中的酶,但对极端环境中的裂解酶知之甚少,一些新发现的褐藻胶裂解酶表现出的新颖的酶学性质和作用机制也没有得到清晰地解释。纵观近年来发表的关于褐藻胶裂解酶分子改造的相关文章,对酶的改造仍旧需要建立在对酶结构和作用机制分析的基础上。因此现下仍旧迫切需要筛选、克隆和表征新型褐藻胶裂解酶并解析其

酶学性质,了解褐藻胶裂解酶的调控机制。同时随着褐藻胶裂解酶在生物工业上应用的深入,迫切需要利用固定化和分子改造等手段以改善酶的催化效率、特殊性能和产量,以满足其日益增加的商业需求。

MC5E作为一种生物工具酶在生产褐藻胶及具有特殊M/G残基比率和序列分布的褐藻胶寡糖方面具有重要意义,至今人们已经分离和表征了几种具有不同性质的MC5Es并根据其晶体结构初步阐明了其催化机制,但对于MC5Es的结构和反应机制还需要进一步探索与研究。由于已知天然MC5Es的热稳定性和催化效率并不理想,因此,需要通过计

算机辅助设计、定点突变以及DNA修饰等方式提高酶的催化活性和酶学性质,推动MC5Es的工业化应用。

褐藻胶修饰酶作为一种生物技术工具表现出了重要的生物活性和应用价值。目前人们在褐藻胶裂解酶和甘露聚糖C5差向异构酶上的研究较深,而对于褐藻胶乙酰化和脱乙酰化的了解尚未深入。随着结构分析技术不断发展,对褐藻胶修饰酶作用机制和条件的不断深入了解,可以利用各种酶的产物特性进行配合生产目标褐藻胶分子,满足不同的商业功能需求。

参考文献:

- [1] VASUDEVAN U M, LEE O K, LEE E Y. Alginate derived functional oligosaccharides: recent developments, barriers, and future outlooks[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 267: 1-18.
- [2] BIXLER H J, PORSE H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(3): 321-335.
- [3] SCHIENER P, BLACK K D, STANLEY M S, et al. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 363-373.
- [4] WESTERMEIER R, MURUA P, PATINO D J, et al. Variations of chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars of *Macrocystis* from Chile[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(5): 1191-1201.
- [5] FRANKLIN M J, NIVENS D E, WEADGE J T, et al. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 1-16.
- [6] MAY T B, SHINABARGER D, BOYD A, et al. Identification of amino-acid-residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase-a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic-pathway of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(7): 4872-4877.
- [7] OGLESBY L L, JAIN S, OHMAN D E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization[J]. *Microbiology*, 2008, 154: 1605-1615.
- [8] MERIGHI M, LEE V T, HYODO M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 876-895.
- [9] HAY I D, REHMAN Z U, REHM B H A. Membrane topology of outer membrane protein AlgE, which is required for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(6): 1806-1812.
- [10] JAIN S, FRANKLIN M J, ERTESVAG H, et al. The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(4): 1123-1133.
- [11] ALBRECHT M T, SCHILLER N L. Alginate lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(11): 3869-3872.
- [12] REHMAN Z U, WANG Y J, MORADALI M F, et al. Insights into the assembly of the alginate biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(10): 3264-3272.
- [13] KEISKI C L, HARWICH M, JAIN S, et al. AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel

- exopolysaccharide secretin[J]. **Structure**, 2010, 18(2):265-273.
- [14] ERTESVAG H. Alginate-modifying enzymes; biological roles and biotechnological uses[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2015, 6: 1-10.
- [15] FLO T H, RYAN L, KILAAS L, et al. Involvement of CD14 and beta2-integrins in activating cells with soluble and particulate lipopolysaccharides and mannuronic acid polymers[J]. **Infection and Immunity**, 2000, 68(12):6770-6776.
- [16] SUTHERLAND I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework[J]. **Microbiology**, 2001, 147(1):3-9.
- [17] SUTHERLAND I W. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment[J]. **Trends in Microbiology**, 2001, 9(5):222-227.
- [18] URTUVIA V, MATURANA N, ACEVEDO F, et al. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2017, 33(11):1-10.
- [19] GUO X, WANG Y, QIN Y M, et al. Structures, properties and application of alginic acid: a review[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 162:618-628.
- [20] MAROUNEK M, VOLEK Z, TAUBNEW T, et al. Metabolic effects of a hydrophobic alginate derivative and tetrahydrolipstatin in rats fed a diet supplemented with palm fat and cholesterol[J]. **Folia Biologica**, 2021, 67(4):143-149.
- [21] TIWARI S, PATIL R, BAHADUR P. Polysaccharide based scaffolds for soft tissue engineering applications[J]. **Polymers**, 2019, 11(1):1-23.
- [22] LI M, LI H C, LI X G, et al. A bioinspired alginate-gum arabic hydrogel with micro-/nanoscale structures for controlled drug release in chronic wound healing[J]. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 2017, 9(27):22160-22175.
- [23] SALVATORE S, RIPEPI A, HUYSENTRUYT K, et al. The effect of alginate in gastroesophageal reflux in infants[J]. **Paediatr Drugs**, 2018, 20(6):575-583.
- [24] KAWADA A, HIURA N, TAJIMA S, et al. Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells[J]. **Archives of Dermatological Research**, 1999, 291(10):542-547.
- [25] JIANG Z D, ZHANG X W, WU L Y, et al. Exolytic products of alginate by the immobilized alginate lyase confer antioxidant and antiapoptotic bioactivities in human umbilical vein endothelial cells[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2021, 251:1-8.
- [26] LIU J, YANG S, LI X, et al. Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2019, 18(6):1859-1881.
- [27] LIM H G, KWAK D H, PARK S, et al. *Vibrio* sp. dhg as a platform for the biorefinery of brown macroalgae[J]. **Nature Communications**, 2019, 10:1-9.
- [28] AARSTAD O A, TONDERVIK A, SLETTA H, et al. Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes[J]. **Biomacromolecules**, 2012, 13(1):106-116.
- [29] ZHU B W, YIN H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications[J]. **Bioengineered**, 2015, 6(3):125-131.
- [30] SUDA K, TANJI Y, HORI K, et al. Evidence for a novel *Chlorella* virus-encoded alginate lyase[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1999, 180(1):45-53.
- [31] INOUE A, OJIMA T. Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9(1):1-11.
- [32] PILGAARD B, VUILLEMIN M, HOICK J, et al. Specificities and synergistic actions of novel PL8 and PL7 alginate lyases from the marine fungus *Paradendryphiella salina*[J]. **Journal of Fungi**, 2021, 7(2):1-16.
- [33] INOUE A, MASHINO C, UJI T, et al. Characterization of an eukaryotic PL-7 alginate lyase in the marine red alga *Pyropia yezoensis*[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2015, 4(3):240-248.
- [34] RAHMAN M M, INOUE A, TANAKA H, et al. cDNA cloning of an alginate lyase from a marine gastropod *Aplysia kurodai* and assessment of catalytically important residues of this enzyme[J]. **Biochimie**, 2011, 93(10):1720-1730.

- [35] HATA M, KUMAGAI Y, RAHMAN M M, et al. Comparative study on general properties of alginate lyases from some marine gastropod mollusks[J]. **Fisheries Science**, 2009, 75(3): 755-763.
- [36] YAMAMOTO S, SAHARA T, SATO D, et al. Catalytically important amino-acid residues of abalone alginate lyase HdAly assessed by site-directed mutagenesis[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, 43(6): 396-402.
- [37] WANG M P, CHEN L, LOU Z Y, et al. Cloning and characterization of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. LJ-23[J]. **Marine Drugs**, 2022, 20(1): 1-16.
- [38] DHARANI S R, SRINIVASAN R, SARATH R, et al. Recent progress on engineering microbial alginate lyases towards their versatile role in biotechnological applications[J]. **Folia Microbiologica**, 2020, 65(6): 937-954.
- [39] WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. **Annual Review of Microbiology**, 2000, 54: 289-340.
- [40] SIM P F, FURUSAWA G, THE A H. Functional and structural studies of a multidomain alginate lyase from *Persicobacter* sp. CCB-QB2[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7: 1-9.
- [41] PEI X J, CHANG Y G, SHEN J J. Cloning, expression and characterization of an endo-acting bifunctional alginate lyase of marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2019, 154: 44-51.
- [42] HE M, GUO M, ZHANG X, et al. Purification and characterization of alginate lyase from *Sphingomonas* sp. ZH0[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2018, 126(3): 310-316.
- [43] SUN H, GAO L, XUE C, et al. Marine-polysaccharide degrading enzymes: status and prospects[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2020, 19(6): 2767-2796.
- [44] JOUANNEAU D, KLAU L J, LAROCQUE R, et al. Structure-function analysis of a new PL17 oligoalginate lyase from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* DsijT[J]. **Glycobiology**, 2021, 31(10): 1364-1377.
- [45] HUANG G Y, WEN S H, LIAO S M, et al. Characterization of a bifunctional alginate lyase as a new member of the polysaccharide lyase family 17 from a marine strain BP-2[J]. **Biotechnology Letters**, 2019, 41(10): 1187-1200.
- [46] MATHIEU S, HENRISSAT B, LABRE F, et al. Functional exploration of the polysaccharide lyase family PL6[J]. **Plos One**, 2016, 11(7): 1-15.
- [47] HUANG H Q, LI S, BAO S X, et al. Expression and characterization of a cold-adapted alginate lyase with exo/endo-type activity from a novel marine bacterium *Alteromonas portus* HB161718[J]. **Marine Drugs**, 2021, 19(3): 1-14.
- [48] TANG X, JIAO C, WEI Y, et al. 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): 1-17.
- [49] YANG J, CUI D, MA S, et al. Characterization of a novel PL 17 family alginate lyase with exolytic and endolytic cleavage activity from marine bacterium *Microbulbifer* sp. SH-1[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 169: 551-563.
- [50] ERTESVAG H, ERLIEN F, SKJAK-BRAEK G, et al. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase[J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, 180(15): 3779-3784.
- [51] ZHU B W, HUANG L S, TAN H D, et al. Characterization of a new endo-type polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp.[J]. **Biotechnology Letters**, 2015, 37(2): 409-415.
- [52] YOON H J, HASHIMOTO W, MIYAKE O, et al. Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases[J]. **Protein Expression and Purification**, 2000, 19(1): 84-90.
- [53] XU F, DONG F, WANG P, et al. Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase family 6[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2017, 292(11): 4457-4468.
- [54] LYU Q Q, ZHANG K K, SHI Y H, et al. 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-General Subjects**, 2019,

- 1863(7):1167-1176.
- [55] GAO S, ZHANG Z L, LI S Y, et al. 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.
- [56] GIMMESTAD M, ERTESVAG H, HEGGESET T M B, et al. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination[J]. **Journal of Bacteriology**, 2009, 191(15):4845-4853.
- [57] WANG Z P, CAO M, LI B, et al. Cloning, secretory expression and characterization of a unique pH-stable and cold-adapted alginate lyase[J]. **Marine Drugs**, 2020, 18(4):1-12.
- [58] MA Y, LI J, ZHANG X Y, et al. Characterization of a new intracellular alginate lyase with metal ions-tolerant and pH-stable properties[J]. **Marine Drugs**, 2020, 18(8):1-12.
- [59] HUANG L. Characterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium* sp. S20[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2013, 40(1):113-122.
- [60] INOUE A, TAKADONO K, NISHIYAMA R, et al. Characterization of an alginate lyase, FIAlyA, from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 and its expression in *Escherichia coli*[J]. **Marine Drugs**, 2014, 12(8):4693-4712.
- [61] PILGAARD B, VUILLEMIN M, HOLCK J, et al. Specificities and synergistic actions of novel PL8 and PL7 alginate lyases from the marine fungus *Paradendryphiella salina*[J]. **Journal of Fungi**, 2021, 7(2):1-16.
- [62] HASHIMOTO W, MIYAKE O, OCHIAI A, et al. Molecular identification of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyase (A1-IV') as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate lyase evolution[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005, 99(1):48-54.
- [63] MORI T, TAKAHASHI M, TANAKA R, et al. *Falsirhodobacter* sp. Alg1 harbors single homologs of endo and exo-type alginate lyases efficient for alginate depolymerization[J]. **Plos One**, 2016, 11(5):1-16.
- [64] JAGTAP S S, HEHEMANN J H, POLZ M F, et al. 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.
- [65] JIANG Z D, GUO Y X, WANG X X, et al. Molecular cloning and characterization of AlgL17, a new exo-oligoalginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1[J]. **Protein Expression and Purification**, 2019, 161:17-27.
- [66] KIM H T, CHUNG J H, WANG D, et al. Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 93(5):2233-2239.
- [67] LI J W, DONG S, SONG J, et al. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524[J]. **Marine Drugs**, 2011, 9(1):109-123.
- [68] ITOH T, NAKAGAWA E, YODA M, et al. Structural and biochemical characterisation of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9:1-14.
- [69] HELBERT W, POULET L, DROUILLARD S, et al. Discovery of novel carbohydrate-active enzymes through the rational exploration of the protein sequences space[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2019, 116(20):10184-10185.
- [70] DONG F, XU F, CHEN X L, et al. Alginate lyase Aly36B is a new bacterial member of the polysaccharide lyase family 36 and catalyzes by a novel mechanism with lysine as both the catalytic base and catalytic acid[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2019, 431(24):4897-4909.
- [71] JI S Q, DIX S R, AZIZ A A, et al. The molecular basis of endolytic activity of a multidomain alginate lyase from *Defluviitalea phaphyphila*, a representative of a new lyase family, PL39[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2019, 294(48):18077-18091.
- [72] INOUE A, OJIMA T. Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9:1-11.

- [73] LI Q, ZHENG L, GUO Z L, et al. Alginate degrading enzymes: an updated comprehensive review of the structure, catalytic mechanism, modification method and applications of alginate lyases[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2021, 41(6): 953-968.
- [74] 李谦, 胡富, 宁利敏, 等. 褐藻胶裂解酶的结构及催化机制研究进展[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(5): 592-598.
- [75] XU F, WANG P, ZHANG Y Z, et al. Diversity of three-dimensional structures and catalytic mechanisms of alginate lyases[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2018, 84(3): 1-12.
- [76] GAO S K, YIN R, WANG X C, et al. Structure characteristics, biochemical properties, and pharmaceutical applications of alginate lyases[J]. **Marine Drugs**, 2021, 19(11): 1-14.
- [77] STENDER E G P, DYBDAHL C, FREDSLUND F, et al. Structural and functional aspects of mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2019, 294(47): 17915-17930.
- [78] INOUE A. Characterization of PL-7 family alginate lyases from marine organisms and their applications[J]. **Methods in Enzymology**, 2018, 605: 499-524.
- [79] OCHIAI A, YAMASAKI M, MIKAMI B, et al. Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(32): 24519-24528.
- [80] JI S, DIX S R, AZIZ A A, et al. The molecular basis of endolytic activity of a multidomain alginate lyase from *Deffluviitalea phaphyphila*, a representative of a new lyase family, PL39[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2019, 294(48): 18077-18091.
- [81] PREISS J, ASHWELL G. Alginic acid metabolism in bacteria: the enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1962, 237: 317-321.
- [82] GACESA P. Enzymic degradation of alginates[J]. **International Journal of Biochemistry**, 1992, 24(4): 545-552.
- [83] GARRON M L, CYGLER M. Uronic polysaccharide degrading enzymes[J]. **Current Opinion in Structural Biology**, 2014, 28: 87-95.
- [84] OGURA K, YAMASAKI M, MIKAMI B, et al. Substrate recognition by family 7 alginate lyase from *Sphingomonas* sp. A1[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2008, 380(2): 373-385.
- [85] OCHIAI A, YAMASAKI M, MIKAMI B, et al. Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2010, 285(32): 24519-24528.
- [86] PARK D, JAGTAP S, NAIR S K. Structure of a PL17 family alginate lyase demonstrates functional similarities among exotype depolymerases[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(12): 8645-8655.
- [87] MIKAMI B, BAN M, SUZUKI S, et al. Induced-fit motion of a lid loop involved in catalysis in alginate lyase A1-III[J]. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, 2012, 68: 1207-1216.
- [88] YOON H J, HASHIMOTO W, MIYAKE O, et al. Crystal structure of alginate lyase A1-III complexed with trisaccharide product at 2.0 angstrom resolution[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2001, 307(1): 9-16.
- [89] DONG S, WEI T D, CHEN X L, et al. Molecular insight into the role of the N-terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(43): 29558-29569.
- [90] DONATO D P, BUONO A, POLI A, et al. Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses[J]. **Sustainability**, 2019, 11(1): 1-20.
- [91] HAN W J, GU J Y, CHENG Y Y, et al. Novel alginate lyase (Aly5) from a polysaccharide-degrading marine bacterium, *Flammeovirga* sp. strain MY04: effects of module truncation on biochemical characteristics, alginate degradation patterns, and oligosaccharide-yielding properties[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016, 82(1): 364-374.
- [92] LI H F, WANG S L, ZHANG Y Y, et al. High-level expression of a thermally stable alginate lyase using *Pichia pastoris*, characterization and application in producing brown alginate oligosaccharide[J]. **Marine Drugs**, 2018, 16(5): 1-16.

- [93] AMTZEN M O, PEDERSEN B, KLAU L J, et al. Alginate degradation: insights obtained through characterization of a thermophilic exolytic alginate lyase[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2021, 87(6):1-16.
- [94] INOUE A, ANRAKU M, NAKAGAWA S, et al. Discovery of a novel alginate lyase from *Nitratiruptor* sp. SB155-2 thriving at deep-sea hydrothermal vents and identification of the residues responsible for its heat stability[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2016, 291(30):15551-15563.
- [95] YAGI H, FUJISE A, ITABASHI N, et al. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Cobetia* sp. NAP1 isolated from brown algae[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2016, 80(12):2338-2346.
- [96] YANG M, LI N N, YANG S X, et al. Study on expression and action mode of recombinant alginate lyases based on conserved domains reconstruction[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019, 103(2):807-817.
- [97] XU F, CHEN X L, SUN X H, et al. Structural and molecular basis for the substrate positioning mechanism of a new PL7 subfamily alginate lyase from the arctic[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2020, 295(48):16380-16392.
- [98] ZHU B W, NI F, NING L M, et al. Cloning and characterization of a new pH-stable alginate lyase with high salt tolerance from marine *Vibrio* sp. NJ-04[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 115:1063-1070.
- [99] ZENG J, AN D, JIAO C, et al. Cloning, expression, and characterization of a new pH- and heat-stable alginate lyase from *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2019, 43(7):1-13.
- [100] WANG Y, CHEN X, BI X, et al. Characterization of an alkaline alginate lyase with pH-stable and thermo-tolerance property[J]. **Marine Drugs**, 2019, 17(5):1-14.
- [101] ZHU B W, HU F, YUAN H, et al. Biochemical characterization and degradation pattern of a unique pH-stable polyM-specific alginate lyase from newly isolated *Serratia marcescens* NJ-07[J]. **Marine Drugs**, 2018, 16(4):1-12.
- [102] HUANG G, WANG Q, LU M, et al. AlgM4: a new salt-activated alginate lyase of the PL7 family with endolytic activity[J]. **Marine Drugs**, 2018, 16(4):1-13.
- [103] CHEN X L, DONG S, XU F, et al. Characterization of a new cold-adapted and salt-activated polysaccharide lyase family 7 alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2016, 7:1-9.
- [104] UCHIMURA K, MIYAZAKI M, NOGI Y, et al. Cloning and sequencing of alginate lyase genes from deep-sea strains of *Vibrio* and *Agarivorans* and characterization of a new *Vibrio* enzyme[J]. **Marine Biotechnology**, 2010, 12(5):526-533.
- [105] IWAMOTO M, KURACHI M, NAKASHIMA T, et al. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells[J]. **FEBS Letters**, 2005, 579(20):4423-4429.
- [106] BELIK A, SILCHENKO A, MALYARENKO O, et al. Two new alginate lyases of PL7 and PL6 families from polysaccharide-degrading bacterium *Formosa algae* KMM 3553 (T): structure, properties, and products analysis[J]. **Marine Drugs**, 2020, 18(2):1-12.
- [107] DENIAUD-BOUET E, KERVAREC N, MICHEL G, et al. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae[J]. **Annals of Botany**, 2014, 114(6):1203-1216.
- [108] INOUE A, KAGAYA M, OJIMA T. Preparation of protoplasts from *Laminaria japonica* using native and recombinant abalone alginate lyases[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2008, 20(5):633-640.
- [109] WAN B, ZHU Y, TAO J, et al. Alginate lyase guided silver nanocomposites for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* from lungs[J]. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2020, 12(8):9050-9061.
- [110] PATEL K K, TRIPATHI M, PANDEY N, et al. Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2019, 563:30-42.
- [111] LEE O K, LEE E Y. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass[J]. **Biomass & Bioenergy**, 2016, 92:70-75.
- [112] WANG D M, KIM H T, YUN E J, et al. Optimal production of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid from alginate for

- brown macro algae saccharification by combining endo- and exo-type alginate lyases[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2014, 37(10): 2105-2111.
- [113] LI Q, HU F, WANG M Y, et al. Elucidation of degradation pattern and immobilization of a novel alginate lyase for preparation of alginate oligosaccharides[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 146: 579-587.
- [114] LI S, WANG Y, LI X, et al. Enhancing the thermo-stability and anti-biofilm activity of alginate lyase by immobilization on low molecular weight chitosan nanoparticles[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, 20(18): 1-14.
- [115] MESHARAM P, DAVE R, JOSHI H, et al. A fence that eats the weed; alginate lyase immobilization on ultrafiltration membrane for fouling mitigation and flux recovery[J]. **Chemosphere**, 2016, 165: 144-151.
- [116] CHENG D Y, JIANG C C, XU J C, et al. Characteristics and applications of alginate lyases: a review[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 164: 1304-1320.
- [117] CAO S S, LI Q, XU Y X, et al. Evolving strategies for marine enzyme engineering: recent advances on the molecular modification of alginate lyase[J]. **Marine Life Science & Technology**, 2022, 4(1): 106-116.
- [118] YANG M, YANG S X, LIU Z M, et al. Rational design of alginate lyase from *Microbulbifer* sp. Q7 to improve thermal stability [J]. **Marine Drugs**, 2019, 17(6): 1-13.
- [119] HU F, LI Q, ZHU B W, et al. Effects of module truncation on biochemical characteristics and products distribution of a new alginate lyase with two catalytic modules[J]. **Glycobiology**, 2019, 29(12): 876-884.
- [120] XU X Q, ZENG D Y, WU D Y, et al. Single-point mutation near active center increases substrate affinity of alginate lyase AlgL-CD[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021, 193(5): 1513-1531.
- [121] SU B M, WU D Y, XU X Q, et al. Design of a PL18 alginate lyase with flexible loops and broader entrance to enhance the activity and thermostability[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2021, 151: 1-9.
- [122] ZHANG K K, YANG Y, WANG W D, et al. Substrate-binding mode and intermediate-product distribution coguided protein design of alginate lyase AlyF for altered end-product distribution[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69(25): 7190-7198.
- [123] RAMSTAD M V, ELLINGSEN T E, JOSEFSEN K D, et al. Properties and action pattern of the recombinant mannuronan C-5-epimerase AlgE2[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1999, 24(10): 636-646.
- [124] CI F F, JIANG H, ZHANG Z H, et al. Properties and potential applications of mannuronan C5-epimerase: a biotechnological tool for modifying alginate[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 168: 663-675.
- [125] BJERKAN T M, BENDER C L, ERTESVAG H, et al. The pseudomonas syringae genome encodes a combined mannuronan C-5-epimerase and O-acetylhydrolase, which strongly enhances the predicted gel-forming properties of alginates[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(28): 28920-28929.
- [126] WOLFRAM F, KITOVA E N, ROBINSON H, et al. Catalytic mechanism and mode of action of the periplasmic alginate epimerase AlgG[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(9): 6006-6019.
- [127] SVANEM B I G, STRAND W I, ERTESVAG H, et al. The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(34): 31542-31550.
- [128] GAWIN A, TIETZE L, AARSTAD O A, et al. Functional characterization of three *Azotobacter chroococcum* alginate-modifying enzymes related to the *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family[J]. **Scientific Reports**, 2020, 10(1): 1-14.
- [129] JAIN S, FRANKLIN M J, ERTESVAG H, et al. The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Molecular Microbiology**, 2003, 47(4): 1123-1133.
- [130] BUCHINGER E, KNUDSEN D H, BEHRENS M A, et al. Structural and functional characterization of the R-modules in alginate C-5 epimerases AlgE4 and AlgE6 from *Azotobacter vinelandii*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2014, 289(45):

- 31382-31396.
- [131] BJERKAN T M, LILLEHOV B E, STRAND W I, et al. Construction and analyses of hybrid *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerases with new epimerization pattern characteristics[J]. **Biochemical Journal**, 2004, 381(3):813-821.
- [132] ERTESVAG H, VALLA S. The A-modules of the *Azotobacter vinelandii* mannuronan-C-5-epimerase AlgE1 are sufficient for both epimerization and binding of Ca²⁺[J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181(10):3033-3038.
- [133] ROZEBOOM H J, BJERKAN T M, KALK K H, et al. Structural and mutational characterization of the catalytic A-module of the mannuronan C-5-epimerase AlgE4 from *Azotobacter vinelandii* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283(35):23819-23828.
- [134] AACHMANN F L, SVANEM B I, GUNTERT P, et al. NMR structure of the R-module; a parallel beta-roll subunit from an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2006, 281(11):7350-7356.
- [135] JERGA A, RAYCHAUDHURI A, TIPTON P A. *Pseudomonas aeruginosa* C5-mannuronan epimerase; steady-state kinetics and characterization of the product[J]. **Biochemistry**, 2006, 45(2):552-560.
- [136] GAARDLOS M, HEGGESET T M B, TONDERVIK A, et al. Mechanistic basis for understanding the dual activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-Epimerase and alginate lyase AlgE7 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2022, 88(3):1-18.
- [137] CAMPA C, HOLTAN S, NILSEN N, et al. Biochemical analysis of the processive mechanism for epimerization of alginate by mannuronan C-5 epimerase AlgE4[J]. **Biochemical Journal**, 2004, 381(1):155-164.
- [138] HOLTAN S, BRUHEIM P, SKJAK-BRAEK G. Mode of action and subsite studies of the guluronan block-forming mannuronan C-5 epimerases AlgE1 and AlgE6[J]. **Biochemical Journal**, 2006, 395(2):319-329.
- [139] ERTESVAG H, HOIDAL H K, SKJAK-BRAEK G, et al. The *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase AlgE1 consists of two separate catalytic domains[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1998, 273(47):30927-30932.
- [140] ERTESVAG H, HOIDAL H K, HALS I K, et al. A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*[J]. **Molecular Microbiology**, 1995, 16(4):719-731.
- [141] HOIDAL H K, ERTESVAG H, SKJAK-BRAEK G, et al. The recombinant *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase AlgE4 epimerizes alginate by a nonrandom attack mechanism[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, 274(18):12316-12322.
- [142] SUN M, SUN C, LI T, et al. Characterization of a novel bifunctional mannuronan C-5 epimerase and alginate lyase from *Pseudomonas mendocina* sp. DICP-70[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 150:662-670.
- [143] RAMSTADAB M V, MARKUSSEN S, ELLINGSEN T E, et al. Influence of environmental conditions on the activity of the recombinant mannuronan C-5-epimerase AlgE2[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2001, 28(1):57-69.
- [144] ERTESVAG H, HOIDAL H K, SCHJERVEN H, et al. Mannuronan C-5-epimerases and their application for *in vitro* and *in vivo* design of new alginates useful in biotechnology[J]. **Metabolic Engineering**, 1999, 1(3):262-269.
- [145] FERNANDO I P S, LEE W, HAN E J, et al. Alginate-based nanomaterials; fabrication techniques, properties, and applications [J]. **Chemical Engineering Journal**, 2020, 391:1-13.
- [146] AARSTAD O A, STANISCI A, SAETROM G I, et al. Biosynthesis and function of long guluronic acid-blocks in alginate produced by *Azotobacter vinelandii*[J]. **Biomacromolecules**, 2019, 20(4):1613-1622.
- [147] GOH C H, HENG P W S, CHAN L W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2012, 88(1):1-12.
- [148] LIU J, YANG S Q, LI X T, et al. Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications [J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2019, 18(6):1859-1881.
- [149] KAWADA A, HIURA N, SHIRAIWA M, et al. Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture[J]. **FASEB Journal**, 1997, 11(9):43-46.

- [150] CHANASIT W, GONZAGA Z J C, REHM B H A. Analysis of the alginate O-acetylation machinery in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020, 104(5):2179-2191.
- [151] BAKER P, RICER T, MOYNIHAN P J, et al. *P. aeruginosa* SGNH hydrolase-like proteins AlgJ and AlgX have similar topology but separate and distinct roles in alginate acetylation[J]. **Plos Pathogens**, 2014, 10(8):1-16.
- [152] WHITNEY J C, HOWELL P L. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in gram-negative bacteria [J]. **Trends in Microbiology**, 2013, 21(2):63-72.
- [153] DUDUN A A, AKOULINA E A, ZHUIKOV V A, et al. Competitive biosynthesis of bacterial alginate using *Azotobacter vinelandii* 12 for tissue engineering applications[J]. **Polymers**, 2022, 14(1):1-21.
- [154] DONLAN R M, COSTERTON J W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. **Clinical Microbiology Reviews**, 2002, 15(2):167-193.

科技信息

欧盟拟修订禁止出口欧盟的动物源性食品中抗菌剂使用规定

2022年12月6日,欧盟委员会网站发布Ares(2022)8453372号咨询文件,拟修订(EU)2019/6号条例,即禁止出口欧盟的动物和动物源食品中使用某些抗菌剂规定,意见反馈期截至2023年1月3日。主要修订内容如下:1)适用范围:从第三国出口到欧盟的动物或动物产品,不适用于明胶及其生产原料、高度精炼产品、野生动物及其制品、昆虫、青蛙、蜗牛和爬行动物及制品、复合食品、不投放欧盟市场的过境食品等;2)禁止使用某些抗菌药物包括:促进动物生长或增加产量目的、抗菌剂等;3)产品进入欧盟的条件:来自列入清单的第三国或地区、具有证明产品符合规定的官方证书等。

[信息来源] 中华人民共和国海关总署. 欧盟拟修订禁止出口欧盟的动物源性食品中抗菌剂使用规定[EB/OL]. (2022-12-23).<http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=aYkOQzdsU4zJCqtUaLvI6DiZ8BCU3pNSzxRJry4>