

· 综 述 ·

褐藻胶寡糖制备的研究进展

邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣, 伊日布斯*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院 生物转化研究室, 中国云南 昆明 650500)

摘 要: 褐藻胶寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)是褐藻胶降解而形成的一种功能性寡糖, 具有广泛的生物活性, 如促进植物生长、提高植物抗逆性、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等。褐藻胶寡糖的制备方法主要分为: 化学法、物理法和酶解法。不同的方法制备出的褐藻胶寡糖结构亦有所不同。介绍了化学法、物理法和酶解法等各种褐藻胶寡糖制备方法的研究现状、存在的问题及发展趋势。

关键词: 褐藻胶; 褐藻胶寡糖; 寡糖的制备

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)01-0075-05

Progresses on Preparation of Alginate Oligosaccharide

TAI Hong-bo, TANG Li-wei, CHEN Dai-di, CHAGAN Irbis*

(Laboratory of Bioconversion, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China)

Abstract: Alginate oligosaccharides (AOS), formed by alginate degradation, is a functional oligosaccharides. AOS has a lot of biological activities, such as plant growth promotion, plant abiotic stress resistance, antitumor, bacteriostasis and so on. The methods of alginate oligosaccharides preparation include: chemical degradation, physical degradation and enzyme degradation. The state of the field of preparation of alginate oligosaccharides by chemical degradation, physical degradation and enzyme degradation, and the problems and development trends are introduced.

Key words: alginate; alginate oligosaccharides (AOS); preparation of oligosaccharide

(*Life Science Research*, 2015, 19(1): 075-079)

寡糖(Oligosaccharide)又称低聚糖, 是 2~20 个单糖单位以糖苷键相连形成的糖分子。寡糖经水解后, 每分子产生为数较少的单糖, 寡糖与多糖之间并没有严格的界限。寡糖是生物体内一种重要的信息物质, 在生命过程中具有重要的功能, 如细胞信号识别作用^[1]。

褐藻胶是一种阴离子酸性多糖, 由 α -L-古罗糖醛酸(G)和 β -D-甘露糖醛酸(M)通过 1-4 糖苷键无序连接的线性多糖(图 1), 主要存在于马尾藻、巨藻、海带等褐藻中, 一些细菌也能分泌褐藻胶^[2]。来源于海藻和细菌的褐藻胶结构差异仅在于细菌褐藻胶中 C2 和/或 C3 羟基会被不同程度

乙酰化^[3]。褐藻胶寡糖是褐藻胶的寡聚物, 其相对分子质量低, 具有水溶性好、稳定性高、安全无毒的理化特性, 有很多报道称低相对分子质量的褐藻胶寡糖具有多种生物活性, 如促进植物生长、提高植物抗逆性、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等, 在农业、功能食品开发、医药等领域具有广阔的开发前景。传统制备褐藻胶寡糖的方法主要是化学降解法和酶解法。随着科技的发展, 在化学降解法的基础上, 衍生出过氧化氢法。此外, 物理法作为一种简单快速的制备方法受到了人们的关注。不同方法制备的褐藻胶寡糖结构有所不同。酶解法得到的是不饱和糖醛酸寡糖, 即在非还原端 C4, 5

收稿日期: 2014-04-01; 修回日期: 2014-05-10

作者简介: 邵宏博(1988-), 男, 内蒙古兴安盟人, 硕士研究生, 主要从事褐藻胶裂解酶的克隆、表达、纯化等研究; *通讯作者: 伊日布斯(1967-), 男, 蒙古族, 云南昆明人, 昆明理工大学教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事微生物代谢工程研究, Tel: 0871-65592121, E-mail: irbisc@gmail.com。

之间形成不饱和双键^[4]；而化学降解法得到的是饱和和糖醛酸寡糖。褐藻胶的相对分子质量和 G/M 比率决定了它的理化和生物特性^[5]，因此获得不同结构的褐藻胶寡糖将对其在不同领域的应用具有重要意义。本文主要阐述了近年来褐藻胶寡糖的制备研究进展。

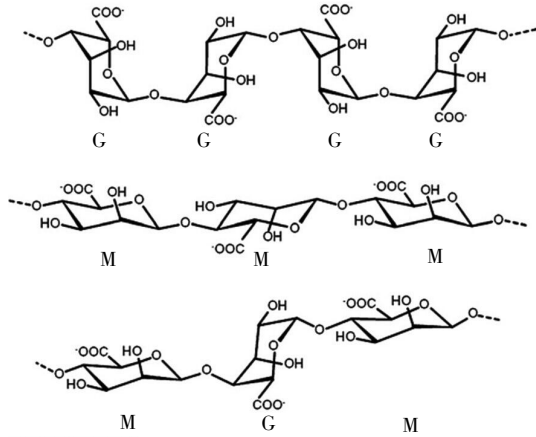


图1 褐藻胶中 G、M 和 GM 段的化学结构^[6]

Fig.1 Chemical structures of G-block, M-block and alternating block in alginate^[6]

1 褐藻胶寡糖的制备

1.1 化学降解法

化学降解法是生产褐藻胶寡糖的传统方法，主要以酸降解为主，使用的酸包括盐酸、草酸、硫酸、甲酸等。酸水解褐藻胶的机制主要包括以下三步：1) 糖苷氧给予共轭酸质子；2) 共轭酸形成的非还原末端与碳-氧鎓离子断裂；3) 水分子迅速加入碳-氧鎓离子中形成还原末端 (图 2)。早在 1966 年, Haug 等^[7]用 1 mol/L 草酸在 100 °C 下水解褐藻胶, 将近 30% 的褐藻胶溶解。在 pH 2.85 处分离得到可溶和不可溶的组分, 可溶组分 80%~90% 为甘露糖醛酸片段; 不可溶组分 80%~90% 为古罗糖醛酸片段。所得到的褐藻胶寡糖聚合度 (degree of polymerization) 从 10~30 不等。褐藻胶对无机酸有较强的耐受性, 很难获得全部水解的糖醛酸, 因此酸降解法只能部分水解褐藻胶。虽然此方法降解褐藻胶效率较低, 但为后人制备褐藻胶寡糖提供了参考。2001 年 Chandia 等^[8]利用硫酸、甲酸和盐酸分别对褐藻 *Lessonia trabeculata* 不同组织进行了处理。结果显示利用 90% 甲酸在 100 °C 反应 6 h, 接着用 1.5 N 甲酸在 100 °C 处理 2 h 即可将褐藻胶全部水解。这种方法比传统的硫酸/盐酸处理法更清洁快速, 而且水解产物的

G/M 比率更低。

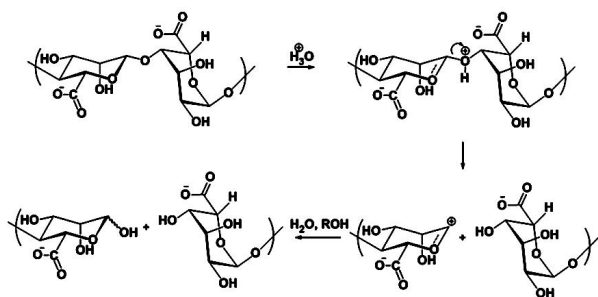
除了酸降解法外, 碱降解法也是化学法中不可缺少的一部分, 其降解机理与酶降解法相似。1985 年, Niemelä 等^[9]利用碱在 95 °C 和 135 °C 处理褐藻胶, 发现有类似于糖精酸的二元酸和一元酸生成。高浓度的碱促进葡异糖精酸、脱水异糖精酸和 2-脱氧-3-C-甲基酒石酸的生成, 而在低浓度的碱存在的条件下 2, 3-二脱氧戊糖酸为主要产物。从反映产物的性质来看, 褐藻胶被直接降解或内部连接断裂后被降解。在此基础上, 科学家们发现经一定浓度的高碘酸处理后的褐藻胶高度敏感于碱催化的 β -消去反应, 甚至在生理条件下 (pH 7.4, 37 °C) 也可发生降解。在褐藻胶中, 氧化发生在 M 和 G 末端 C2 和 C3 之间, 生成的二元醛易在碱中降解。氧化后形成的二元醛自由能为 88 kJ/mol, 而非氧化末端自由能为 113 kJ/mol, 因而经高碘酸处理后的褐藻胶更易在碱性条件下发生 β 消去反应^[10]。这一发现将拓展褐藻胶及其寡糖衍生物在生物材料及组织工程中的应用。

杨钊等^[11]建立了一种新的褐藻胶寡糖制备方法, 即氧化还原法。Poly M 经过 5% 过氧化氢, 在 90 °C 下反应 2 h 后, 可得到聚合度为 3~11 的寡糖。通过圆二色谱和红外光谱结果得出, 氧化降解法制备的寡糖仍保持甘露糖醛酸的结构特点。与传统的酸降解法相比, 氧化降解法制备的寡糖色泽洁白, 产率和纯度较高, 并且降解反应快速, “三废”污染少, 对于工业化生产具有一定参考价值。2010 年, Li 等^[12]利用过氧化氢降解褐藻胶, 获得了低相对分子质量的褐藻胶寡糖。研究结果显示, 降解率取决于反应时间、温度、溶液 pH 值以及过氧化氢的浓度。利用过氧化氢处理褐藻胶导致糖链明显减短, 并在 C-1 还原端形成醛基。然而过激的反应会促进寡聚物羧基的形成。氧化后的褐藻胶形成的钙交联支架要比未加修饰的更易降解, 这表明经过过氧化氢处理后的褐藻胶可用于能进行生物降解的组织工程和药物传输。

化学降解法具有诸多优点, 如生产成本低、技术成熟、反应机理明确等; 但也存在许多问题, 如方法操作步骤繁琐、需要使用刺激性的化学试剂、反应剧烈、易腐蚀设备、造成环境污染, 制备的褐藻胶寡糖产量较低, 难以达到工业化生产的要求等。

1.2 物理降解法

物理降解法主要是通过微波辐射、紫外线照射以及高温高压等物理方法降解褐藻胶。辐射是

图 2 褐藻胶的酸催化降解机理^[13]Fig.2 Acid-catalyzed hydrolytic degradation of alginates^[13]

一种降解多聚物的有效手段^[14]。与化学降解法相比,辐射法对褐藻胶的降解能力更强,更容易获得低相对分子质量的褐藻胶寡糖^[15]。先前就有科学家利用辐射的方法降解纤维素中的糖苷键^[16]。2000年, Nagasawa 等^[17]利用 Co^{60} 伽马射线处理褐藻胶固体和褐藻胶水溶液,并在 20~500 kGy 剂量范围内研究了射线对褐藻胶的影响。结果表明褐藻胶水溶液较固体褐藻胶更易降解,这与溶液中水分子的自由基有密切关系。高度降解的褐藻胶颜色发生变化,这是由于糖链断裂在吡喃糖环形成双键造成的。2014年, Naeem 等^[18]发现经 Co^{60} 放射处理的褐藻胶可以提高薄荷的叶面积,从而获得更多光照机会,增加植物干重。以上研究表明,辐射可以有效降解褐藻胶,得到的褐藻胶寡糖具有促进植物生长活性的作用,这为其在绿色农业领域的应用奠定基础。

紫外照射法是一种新型的降解褐藻胶方法。在光催化剂二氧化钛存在的条件下,紫外照射褐藻酸钠水溶液 3 h 以上可部分水解褐藻酸钠。降解产物的相对分子质量较低, G/M 比率与酸降解法产物相似^[19]。这种方法的优势在于不需要特殊的设备,不需要对温度的严格控制以及二氧化钛易除去,能获得较纯的产物。然而紫外照射法的降解效率过低,反应机理不明确,仍需做进一步研究改进,以适应大规模生产的要求。

超临界水是温度和压力均超过其临界点值(临界温度 374.15 °C, 临界压力 22.05 MPa)的水,其物理化学性质有很大变化,氢键、密度、粘度和介电常数都大幅度减小,扩散系数较大,传质性能好^[20, 21]。因此超临界水可以代替环境不友好的溶剂,是一种新型反应介质。以超临界水为介质,在极短时间内便可完全降解褐藻胶,糖苷键和己糖环被破坏,形成复杂的混合物。以亚临界水为介质,在 25 MPa、523 K 条件下反应 88 ms,便可

获得纯度为 98% 的 Poly G 和富含 M 的 Poly MG 水溶液。通过对反应时间和温度的控制,可调节产物的相对分子质量及 G/M 比率^[22]。这种以超临界水和亚临界水为介质降解褐藻胶的方法与传统方法相比,反应极为迅速,使用的设备精密,对反应过程的可操控性强。在以亚临界水为介质时,褐藻胶内 M-G 和 G-M 连接被选择性降解,适用于大量制备高纯度的 Poly G。

2010年, Aida 等^[23]对褐藻胶进行热处理(180~250 °C)。结果表明,褐藻胶在高温条件下降解,起初释放甘露糖醛酸(M),然后释放古罗糖醛酸(G)。同时发现,单糖是通过具有选择性断裂 M-M、M-G、G-G 之间的糖苷键形成的,而不是在褐藻胶中随机断裂生成的。随着温度的增加,促进褐藻胶降解反应,但是单糖产量会随之降低,最后生成乳酸和乙醇酸等有机酸。此后该课题组又对褐藻胶进行高温水热处理,获得了甲酸、乙酸、乳酸以及乙醇酸等多种有机酸。结果显示在 350 °C、40 MPa 条件下反应 0.7 s 可得 46% 的有机酸。有机酸的生成说明在进行水热处理过程中,褐藻胶结构中的羧基未被破坏,而二羧酸的形成说明发生了氧化反应;同时,降解产物的分布说明水热处理过程中既有酸催化反应又有碱催化反应^[24]。通过对热处理反应机制的深入研究,只要对反应条件适当调整,就可获得同源性多聚糖、褐藻胶寡糖以及单糖(M、G)。热处理法不需要用刺激性的化学试剂,操作简单,反应快速而且具有一定特异性,为褐藻胶寡糖特别是单糖的生产开辟了一条新道路。

2013年 Hu 等^[25]发明了一种制备褐藻胶寡糖的方法,即快速微波放射法。将褐藻胶水解产物 Poly G 置于 130 °C、1 600 W 微波辐射下降解 15 min,便得到古罗糖醛酸寡糖(guluronic acid oligosaccharides)混合物。经过分离,得到聚合度从 1~10 不等的古罗糖醛酸寡糖,产量高达 71%。这种方法不仅简单快速,反应条件易控制,而且得到混合物仅需要一步纯化便可得到不同聚合度的寡糖。ESI-MS 和 NMR 分析得出微波降解法获得的寡糖的化学结构与酸水解法得到的寡糖化学结构相同。

综上所述,物理法降解褐藻胶制备褐藻胶寡糖具有操作简单、反应迅速、无环境污染等优势,弥补了化学法制备褐藻胶寡糖的不足,具有工业化生产的潜力。

1.3 酶解法

褐藻胶裂解酶通过 β -(1, 4) 消去反应降解褐

藻胶,并在非还原端形成一个在 235 nm 处有特征吸收峰的不饱和糖醛酸残基。褐藻胶裂解酶按其底物专一性不同可分为 Poly M 酶、Poly G 酶和 Poly MG 酶;按其作用方式可分为内切酶和外切酶^[26]。褐藻胶裂解酶的催化机制与 C5-差向异构酶的催化机制非常相近,包括三步反应:1)中和羧基阴离子上的负电荷;2)从 C5 上获得质子;3)羧基基团提供电子在 C4 与 C5 之间形成双键,导致了发生在 4-O-糖苷键的 β -消去反应。在差向异构酶的作用机制中,第三步被 C5 上的质子置换反应所替代^[27, 28](图 3)。

近年来,不同来源不同类型的褐藻胶裂解酶的相继发现以及对褐藻胶裂解酶的深入研究,推动了褐藻胶裂解酶制备领域的发展。Zhang 等^[29]分离并纯化了来自 *Vibrio* sp. 510 的褐藻胶裂解酶,水解褐藻胶 24 h,经乙醇沉淀,低压凝胶渗透色谱,半制备强阴离子快速蛋白液相色谱获得了聚合度 2~5 的 7 种不同的褐藻胶寡糖,并用 ESIMS 和 2D NMR 技术阐明了寡糖结构。2010 年, Li 等^[30]利用来自 *Pseudomonas* sp. HJZ216 的褐藻胶裂解酶降解褐藻胶。降解产物经离子交换色谱分离纯化得到 6 种寡糖,其中包括二糖和三糖等低聚寡糖。2012 年, Lee 等^[31]从 *Stenotrophom asmatophilia* KJ-2 中克隆并纯化出一种新的褐藻胶裂解酶。对酶解产物的 NMR 分析显示,降解后获得的褐藻胶寡糖在还原端存在甘露糖醛酸(M),这说明这种酶更偏好降解 M-G 之间的糖苷键,是具有 Poly MG 特异性的褐藻胶裂解酶。将它与 Poly M 酶、Poly G 和外切酶共同使用,可制备出不同结构的褐藻胶寡糖及单糖。

虽然迄今为止报道的褐藻胶裂解酶种类较多,但外切型的褐藻胶裂解酶仅有 3 种^[32-34]。外切酶对于寡糖链的修饰、褐藻胶寡糖和单糖的制备起着重要作用。2012 年, Hee 等从 *Saccharophagus degradans* 2-40 中克隆出外切型褐藻胶裂解酶 Alg17C。Alg17C 属于 PL-17 家族,可将聚合度大于 2 的褐藻胶寡糖降解为褐藻胶单糖 (4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)。经过分析推测, Alg17C 的反应机理为以下三步:1)酶结合到褐藻胶链末端;2)识别末端两个以上的寡糖单位;3)通过酶活性位点在底物上滑动剪切释放单体。对外切型褐藻胶寡糖的深入研究,将为海藻生物质转化为生物燃料和化学制剂提供理论基础。

与化学降解法和物理降解法相比,酶解法具有反应更加温和、底物专一性强、产量较高、副产物少、环境友好等优势。因此,酶解法是目前制备褐藻胶寡糖的主要方法。

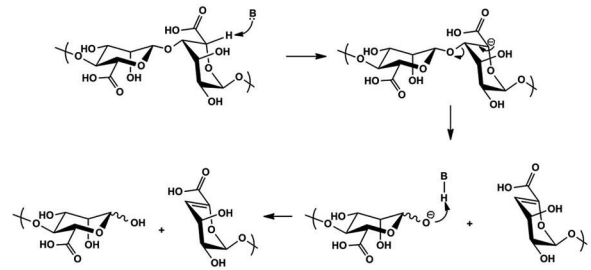


图 3 酶降解褐藻胶的 β -消去反应机理^[13]

Fig.3 Enzyme degradation of alginates by β -elimination^[13]

2 展望

随着对海洋开发的不断深入,人们对褐藻胶寡糖的认识也越来越全面和深入。褐藻胶寡糖结构独特,因其具有特殊的生理活性和物理化学性质而被广泛应用于保健食品、绿色农业、临床医学等领域。尤其是在药物传输和组织工程能方面,褐藻胶寡糖作为一种新型极具潜力的生物材料而备受关注^[35]。然而,目前对褐藻胶寡糖的生物活性机理的研究并不是很系统,因此对不同结构褐藻胶寡糖的制备及其结构与功能之间的关系亟待研究。2012 年, Aarstad 等^[36]对海藻中 G、M 的分布和比例进行了初步研究,并用褐藻胶裂解酶构建了聚合物为 2-15 的寡糖库,为今后研究褐藻胶寡糖结构与功能关系打下良好基础。

另一方面,以大型海藻生物质为原料的第三代生物乙醇时代已经到来。褐藻胶是褐藻中的主要成分,可达干重的 30%以上。综合运用物理化学和生物的方法降解多聚糖将成为海藻生物质转化为生物燃料的关键。已有报道利用辐射-过氧化氢、碱-热处理魔芋中葡甘聚糖,获得低相对分子量、低粘度的功能性寡糖^[37, 38]。此外,褐藻胶裂解酶及 C5-异构酶的剪切修饰作用^[39, 40],将进一步提高褐藻胶的降解效率并拓展褐藻胶寡糖的应用领域。因此,综合运用各种方法制备褐藻胶寡糖及单糖必将成为未来的研究热点,对于寡糖生物活性的探索及其在生物能源领域的应用具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] 郭忠武, 王来曦. 糖化学研究进展[J]. 化学进展(GUO Zhong-wu, WANG Lai-xi. Progress and trends on carbohydrate research[J]. Progress on Chemistry), 1995, 7(1): 10-29.

- [2] 纪明候. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社(JI Ming-hou. Chemistry of Seaweed[M]. Beijing: Science Press), 1997. 10-62.
- [3] REMMINGHORST U, REHM B H. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(21): 1701-1712.
- [4] SCHAUMANN K, WEIDE G. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. Thirteenth International Seaweed Symposium[R]. Netherlands: Springer, 1900.
- [5] SEN M. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation[J]. Applied Radiation and Isotopes, 2011, 69(1): 126-129.
- [6] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: properties and biomedical applications[J]. Progress in Polymer Science, 2012, 37(1): 106-126.
- [7] HAUG A, LARSEN B, SMIDSRØD O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis[J]. Acta Chemica Scandinavica, 1966, 20(1): 183-190.
- [8] CHANDIA N, MATSUHIRO B, VÁSQUEZ A. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46(1): 81-87.
- [9] NIEMELÄ K, SJÖSTRÖM E. Alkaline degradation of alginates to carboxylic acids[J]. Carbohydrate Research, 1985, 144(2): 241-249.
- [10] KRISTIANSEN K A, TOMREN H B, CHRISTENSEN B E. Periodate oxidized alginates: Depolymerization kinetics[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1595-1601.
- [11] 杨钊, 张真庆, 管华诗. 一种新的褐藻胶寡糖制备方法——氧化降解法[J]. 海洋科学(YANG Zhao, ZHANG Zhen-qing, GUANG Hua-Shi. Oxidation depolymerization—a new method for preparation of alginate oligosaccharides[J]. Marine Science), 2004, 28(7): 19-22.
- [12] LI X, XU A, XIE H, *et al.* Preparation of low molecular weight alginate by hydrogen peroxide depolymerization for tissue engineering[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(3): 660-664.
- [13] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications[J]. Biomaterials, 2012, 33(11): 3279-3305.
- [14] WOODS R J, PIKAEV A K. Applied radiation chemistry: radiation processing[M]. New York: Wiley, 1994. 8-23.
- [15] CARDOSO D A, ULSET A S, BENDER J, *et al.* Effects of physical and chemical treatments on the molecular weight and degradation of Alginate-hydroxyapatite composites[EB/OL]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.201300415/full>, 2014-01-17.
- [16] LEONHARDT J, ARNOLD G, BAER M, *et al.* Radiation degradation of cellulose[J]. Radiation Physics and Chemistry, 1985, 25(4): 887-892.
- [17] NAGASAWA N, MITOMO H, YOSHII F, *et al.* Radiation-induced degradation of sodium alginate[J]. Polymer Degradation and Stability, 2000, 69(3): 279-285.
- [18] NAEEM M, IDREES M, AFTAB T, *et al.* Employing depolymerised sodium alginate, triacontanol and 28-homobrassinolide in enhancing physiological activities, production of essential oil and active components in *Mentha arvensis* L. [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 55(4): 272-279.
- [19] BURANA-OSOT J, HOSOYAMA S, NAGAMOTO Y, *et al.* Photolytic depolymerization of alginate[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(15): 2023-2027.
- [20] KALINICHEV A, HEINZINGER K. Molecular dynamics of supercritical water: A computer simulation of vibrational spectra with the flexible BJH potential[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1995, 59(4): 641-650.
- [21] 梁京梅, 李复兴. 超临界水——一种新的化学介质[J]. 化学教育(LIANG Jing-mei, LI Fu-xing. Supercritical water—A new chemical medium[J]. Journal of Chemical Education), 2001, 22(6): 7-9.
- [22] MATSUSHIMA K, MINOSHIMA H, KAWANAMI H, *et al.* Decomposition reaction of alginic acid using subcritical and supercritical water[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2005, 44(25): 9626-9630.
- [23] AIDA T M, YAMAGATA T, WATANABE M, *et al.* Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 296-302.
- [24] AIDA T M, YAMAGATA T, ABE C, *et al.* Production of organic acids from alginate in high temperature water[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 65(5): 39-44.
- [25] HU T, LI C, ZHAO X, *et al.* Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method[J]. Carbohydrate Research, 2013, 373(5): 53-58.
- [26] KIM H, LEE C G, LEE E. Alginate lyase: Structure, property, and application[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(5): 843-851.
- [27] GACESA P. Alginate-modifying enzymes: a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases[J]. Febs Letters, 1987, 212(2): 199-202.
- [28] GACESA P. Enzymic degradation of alginates[J]. International Journal of Biochemistry, 1992, 24(4): 545-552.
- [29] ZHANG Z, YU G, GUAN H, *et al.* Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio* sp. 510[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(8): 1475-1481.
- [30] LI L, JIANG X, GUAN H, *et al.* Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(6): 794-800.
- [31] LEE S I, CHOI S H, LEE E Y, *et al.* Molecular cloning, purification, and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(6): 1643-1653.
- [32] MIYAKE O, HASHIMOTO W, MURATA K. An exotype alginate lyase in *Shingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV)[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 29(1): 33-41.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] SHELKE N B, JAMES R, LAURENCIN C T, *et al.* Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering[J]. Polymers for Advanced Technologies, 2014, 25(5): 448-460.
- [36] AARSTAD O A, TØNDERVIK A, SLETTA H V, *et al.* Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes[J]. Biomacromolecules, 2011, 13(1): 106-116.
- [37] PAN T, PENG S, XU Z, *et al.* Synergetic degradation of konjac glucomannan by γ -ray irradiation and hydrogen peroxide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(2): 761-767.
- [38] JIN W, MEI T, WANG Y, *et al.* Synergistic degradation of konjac glucomannan by alkaline and thermal method[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99(2): 270-277.
- [39] BERG J R. Tailoring of alginate gel properties with mannuronan C-5 epimerases: Correlations between structural and physical properties[M]. Norway: Chemical Engineering and Biotechnology, 2013. 92-122.
- [40] TØNDERVIK A, KLINKENBERG G, AACHMANN F L, *et al.* Mannuronan C-5 epimerases suited for tailoring of specific alginate structures obtained by high-throughput screening of an epimerase mutant library[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(8): 2657-2666.