

## 海洋寡糖酶法制备研究进展

杨子祥, 李金梦, 宋琨燕, 葛凤茹, 鄢 烽, 黄冰冰, 张梦岩, 巫小丹, 刘玉环, 郑洪立

### Research Progress on Preparation of Marine Oligosaccharides by Enzymatic Method

YANG Zixiang, LI Jinmeng, SONG Kunyan, GE Fengru, YAN Feng, HUANG Bingbing, ZHANG Mengyan, WU Xiaodan, LIU Yuhuan, and ZHENG Hongli

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100075>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 海洋寡糖制备工艺及生物活性的研究进展

Research Progress on Preparation Process and Biological Activity of Marine Oligosaccharides

食品工业科技. 2021, 42(18): 446-453 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080280>

#### 酶法制备硫酸软骨素寡糖及其抗氧化活性

Chondroitin sulfate oligosaccharides prepared by chondroitinase and its antioxidant activities

食品工业科技. 2017(13): 48-52 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.009>

#### 金樱子多糖提取、纯化及生理活性研究进展

Research Progress on Extraction, Purification and Physiological Activities of Polysaccharides from *Rosa laevigata* Michx.

食品工业科技. 2019, 40(7): 307-312 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.07.053>

#### 海洋细菌来源几丁质酶的研究进展

Research Progress of Microbial Chitinase from Marine Bacteria

食品工业科技. 2021, 42(22): 383-389 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070096>

#### 荞麦蛋白结构、生理活性及其应用的研究进展

Research Progress in the Structure, Physiological Activities and Applications of Buckwheat Protein

食品工业科技. 2021, 42(20): 400-407 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080278>

#### 实用类蛋白反应的作用机制及其对海洋源蛋白修饰的研究进展

Research Progress on Mechanism of Plastein Reactions and Its Modification Function of Marine Proteins

食品工业科技. 2020, 41(9): 362-367 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.058>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

杨子祥, 李金梦, 宋琨燕, 等. 海洋寡糖酶法制备研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 458–467. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100075

YANG Zixiang, LI Jinmeng, SONG Kunyan, et al. Research Progress on Preparation of Marine Oligosaccharides by Enzymatic Method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 458–467. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100075

· 专题综述 ·

## 海洋寡糖酶法制备研究进展

杨子祥, 李金梦, 宋琨燕, 葛风茹, 鄢 烽, 黄冰冰, 张梦岩, 巫小丹, 刘玉环, 郑洪立\*

(南昌大学食品学院, 江西南昌 330047)

**摘 要:** 海洋寡糖是海洋多糖降解得到的含两个至十个单糖残基的糖类化合物。相较于海洋多糖, 海洋寡糖具有水溶性高、生物活性强、易于机体吸收等优点。海洋寡糖有抗肿瘤、抗氧化、降低胆固醇、免疫调节等生理活性, 可以广泛应用于食品、医药等领域。本文综述了海洋多糖、海洋多糖酶法制备海洋寡糖和酶的催化机制, 介绍了褐藻胶、壳聚糖和黄原胶三种主要的海洋多糖, 以及褐藻胶裂解酶的  $\beta$ -消除作用机制、壳聚糖酶的置换机制和黄原胶降解酶的降解作用机制。对海洋多糖酶法制备海洋寡糖的不足开展了讨论和未来的发展趋势进行了展望, 以期海洋寡糖制备及应用提供理论依据。

**关键词:** 海洋多糖, 海洋寡糖, 酶法, 催化机制, 生理活性

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)18-0458-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100075

本文网刊:



## Research Progress on Preparation of Marine Oligosaccharides by Enzymatic Method

YANG Zixiang, LI Jinmeng, SONG Kunyan, GE Fengru, YAN Feng, HUANG Bingbing,  
ZHANG Mengyan, WU Xiaodan, LIU Yuhuan, ZHENG Hongli\*

(College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Marine oligosaccharides, which are prepared by degradation of marine polysaccharides, are carbohydrate compounds composed of two to ten monosaccharide residues. Compared with marine polysaccharides, marine oligosaccharides have several advantages, such as higher water solubility, stronger biological activity, and easier absorption by the body. Marine oligosaccharides have a series of physiological activities, such as anti-tumor, antioxidation, lowering cholesterol, and immunomodulation. They can be widely used in food, medicine, and other fields. This paper summaries marine polysaccharides, preparation of marine oligosaccharides from marine polysaccharides by enzymatic methods, and the catalytic mechanism of the enzymes. Furthermore, three major marine polysaccharides (alginate, chitosan, and xanthan) and the catalytic mechanism of the three enzymes ( $\beta$ -elimination mechanism of alginate lyase, replacement mechanism of chitosanase, and degradation mechanism of xanthan enzyme) are introduced. It is expected to provide a theoretical reference for preparation and application of marine oligosaccharides, deficiencies and potential for future research of preparation of marine oligosaccharides from marine polysaccharides by enzymatic methods are discussed.

**Key words:** marine polysaccharides; marine oligosaccharides; enzymatic method; catalytic mechanism; physiological activities

海洋占地球总面积约 71%, 海洋占地球全部水资源的 97%, 海洋中生物资源丰富, 种类繁多。海洋

多糖是海洋生物资源中最主要的组成成分之一。由于海洋高盐、高渗透压、低温、低光照、寡营养、氧胁

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22066016, 21767017); 江西省技术创新引导类项目 (20212BDH81004); 江西省重点研发计划项目 (20192BBH80023); 赣州市重点研发计划项目 (202101124943)。

作者简介: 杨子祥 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工, E-mail: 1272006986@qq.com。

\* 通信作者: 郑洪立 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 微生物与食品发酵, E-mail: honglizheng@ncu.edu.cn。

迫的特殊环境,形成了结构新颖和功能独特的海洋多糖<sup>[1]</sup>。近年来,随着人们对海洋资源的研究不断深入,发现海洋多糖具有调节免疫、降血糖、抗病毒、抗肿瘤等多种生理活性,这使其越来越广泛地应用于食品、医药、化妆品等领域<sup>[2]</sup>。然而,由于海洋多糖分子量大、结构复杂,导致了海洋多糖溶解性能差,严重限制了其应用<sup>[3]</sup>。

海洋寡糖,也叫海洋低聚糖,是海洋多糖经过各种方法(物理法、化学法、酶法等)降解得到的直链或支链低度聚合糖,通常由 2~10 个单糖单元组成。较海洋多糖,海洋寡糖具有溶解性能好、生理活性高、更具多样性等优势,是二十一世纪糖类研究的热点。由于海洋寡糖原料海洋多糖结构和组成的多样性,外加海洋寡糖有不同的制备方法,故海洋寡糖结构和生理活性更具多样性<sup>[4]</sup>。海洋寡糖具有抑制肿瘤、抗氧化、免疫调节等生理活性,安全无毒,溶解性能好,广泛应用于食品、农业、医药等领域<sup>[5]</sup>。海洋寡糖具有糖醇类似的功能性甜味,且热量较低,可用作食品甜味剂。此外,海洋寡糖难以被人体消化,可满足糖尿病患者的需要。海洋寡糖是一种新型益生元,具有改善肠道微环境的作用<sup>[6]</sup>。海洋寡糖因具有促进植物生长、增强植物抗逆性、防治病害等作用,被应用到农业生产中。海洋寡糖可以通过刺激和激活宿主细胞的免疫功能,增强机体对肿瘤细胞生长的调控,从而实现抗肿瘤的作用<sup>[7]</sup>。

海洋寡糖的生物活性主要与其分子结构相关,分子结构主要受海洋多糖的种类、海洋寡糖制备方法、制备海洋寡糖的酶等因素影响,而制备结构新颖、聚合度明确的海洋寡糖,对于海洋寡糖的应用具有重要意义。本文综述了海洋多糖、海洋多糖酶法制备海洋寡糖和酶的催化机制,介绍了褐藻胶、壳聚糖和黄原胶三种主要的海洋多糖及褐藻胶裂解酶、壳聚糖酶和黄原胶降解酶的作用机制,并指出其存在的问题及今后的研究重点,以期海洋寡糖制备及其应用提供理论依据。

1 海洋多糖

海洋多糖种类繁多(表 1),包括海藻多糖、海洋动物多糖和海洋微生物多糖等<sup>[8]</sup>。海藻多糖是广泛存在于海带、马尾藻、昆布等植物中的天然活性多糖,多具有高粘度或凝固能力。海洋动物多糖是指海洋动物(虾、贝类、螃蟹、鲨鱼、海参等)中的多聚糖及酸性粘多糖,主要包括壳聚糖、糖胺聚糖、硫酸软骨素等。海洋微生物多糖是指海洋中的微生物代谢的多糖,分为胞外多糖、胞壁多糖和胞内多糖。我国海洋多糖资源丰富,已广泛应用于各领域,如褐藻胶作为增稠剂、分散剂、乳化剂等应用于工业生产中<sup>[9]</sup>。随着越来越多海洋多糖资源的发掘以及海洋生物技术的发展,如利用工程细菌发酵生产海洋多糖,将不断丰富海洋多糖资源。众多的海洋多糖为海洋寡糖的制备提供了丰富的原料资源<sup>[10]</sup>。生产寡糖较多的

海洋多糖原料有黄原胶、壳聚糖、琼脂、卡拉胶、褐藻胶、岩藻聚糖等。我国是世界最大的褐藻胶(海藻酸钠)生产国<sup>[11]</sup>,壳聚糖是地球上年产量仅次于纤维素的天然高分子化合物<sup>[12]</sup>,黄原胶是目前世界上生产规模最大的微生物多糖<sup>[13]</sup>,故本文选取褐藻胶、壳聚糖和黄原胶为代表性海藻多糖、海洋动物多糖和海洋微生物多糖进行研究。

表 1 海洋多糖  
Table 1 Marine polysaccharides

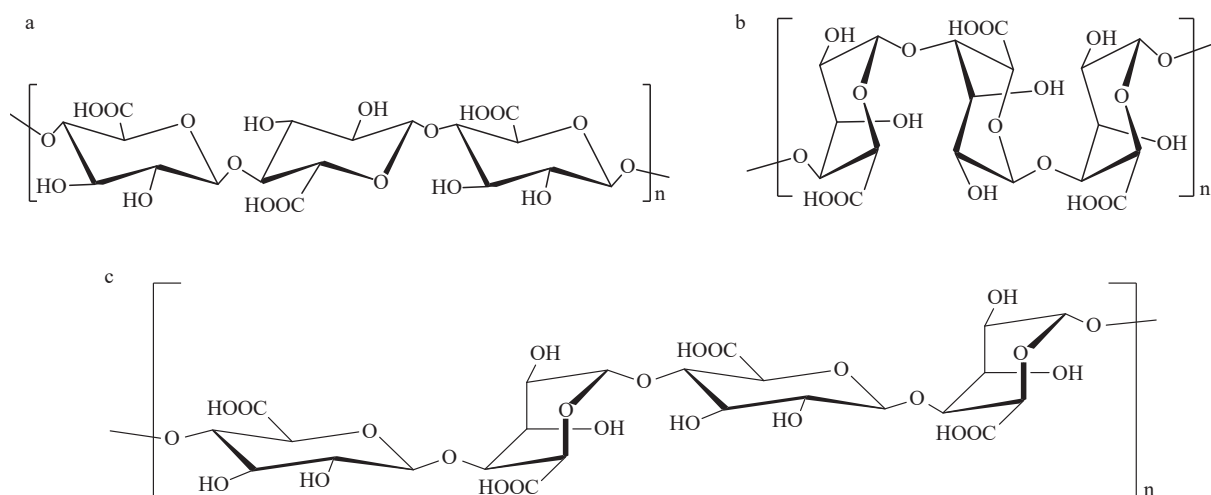
多糖种类	多糖名称	来源	参考文献
海藻多糖	褐藻胶	海带、马尾藻等	[14]
	褐藻糖胶	裙带菜、昆布等	[15]
	琼脂	石花菜、江蓠等	[15]
	卡拉胶	角叉菜、鹿角菜等	[15]
海洋动物多糖	壳聚糖	虾、贝类、螃蟹等	[16]
	硫酸软骨素	鲨鱼、乌贼等	[5,7]
	岩藻聚糖硫酸酯	海参	[5,17]
海洋微生物多糖	胞外多糖	海绵共附细菌	[18]
	甘露聚糖	爱德华氏细菌	[18]
	黄原胶	假黄单胞菌	[19]

1.1 褐藻胶

褐藻胶又叫褐藻酸,分子量介于 20~250 kDa 之间<sup>[20]</sup>。褐藻胶是广泛存在于海带、巨藻、马尾藻等褐藻细胞壁和细胞质间的一种海藻多糖,在天然状态下主要以游离酸、一价盐和二价盐的形式存在。 $\beta$ -D-甘露糖醛酸(M)和 $\alpha$ -L-古洛糖醛酸(G)以 1 $\rightarrow$ 4 糖苷键构成线性多糖即为褐藻胶<sup>[20]</sup>。以上线性多糖有均聚甘露糖醛酸(PM)、均聚古罗糖醛酸(PG)和杂聚物(PMG)三种排列方式<sup>[21]</sup>(图 1)。这两种糖醛酸的比例因褐藻种类的不同而有很大差异,这种结构的多样性可能是由于褐藻对环境或生理条件的功能适应性<sup>[23]</sup>。早在 1881 年,英国的化学家 Stanford 首次在褐藻中发现并成功分离出褐藻胶<sup>[24]</sup>。目前市售的褐藻酸钠(又叫海藻酸钠)是以海带等为原料,采用稀碱溶液提取法制备得到。褐藻酸钠具有抗氧化性、抑菌性、抗肿瘤、降胆固醇等生理活性,用作食品添加剂、医学领域的支架材料、农药化肥增效剂等<sup>[25-27]</sup>。褐藻中褐藻胶的含量最高可达藻体干重的 40%<sup>[28]</sup>。褐藻胶为亲水性分子,褐藻酸与碱金属离子生成褐藻酸盐,易溶于水。褐藻胶的溶解性受 PM、PG 和 PMG 的排列方式、M/G 的比例、溶液离子强度、pH 等的影响<sup>[21,23]</sup>。褐藻胶为酸不溶性,在 pH 低于 3 时,会转变为褐藻酸而析出<sup>[23]</sup>。

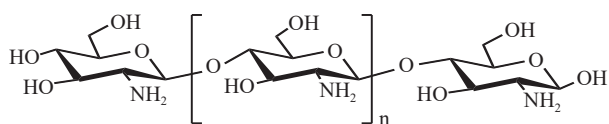
1.2 壳聚糖

壳聚糖是一种广泛存在于虾、螃蟹、贝壳等海洋节肢动物的甲壳以及海洋软体动物的壳和骨骼中的海洋动物多糖,纯天然有机大分子,是甲壳素脱去乙酰基而成。壳聚糖也是目前大自然中发现的独一无二带正电荷的大分子碱性多糖<sup>[29]</sup>。它的基本糖单元为氨基葡萄糖或乙酰氨基葡萄糖(图 2),起连接作用

图1 褐藻胶的结构式<sup>[22]</sup>Fig.1 Structural formula of alginate<sup>[22]</sup>

注: a: 均聚甘露糖醛酸(PM); b: 均聚古罗糖醛酸(PG); c: 杂聚物(PMG)。

的键为 $\beta$ -1,4-糖苷键。壳聚糖的单体为 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-氨基-2-脱氧-b-d-葡聚糖和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-b-d-葡聚糖,分子量介于10~1 000 kDa之间;壳聚糖溶于稀酸,不溶于水和有机溶剂;壳聚糖在稀酸中的溶解性与其脱乙酰度呈正相关<sup>[30]</sup>。它的表面含有大量的氨基、羟基等活性基团,可以发生烷基化、酰基化、羧基化等多种化学反应,能与碳水化合物等阴离子或高分子化合物形成具有不同性能的壳聚糖衍生物。壳聚糖有免疫调节<sup>[31]</sup>、防治高血压<sup>[32]</sup>、抗肿瘤<sup>[33]</sup>等生理活性,可自然降解,已在食品、医疗等领域产业化应用。

图2 壳聚糖的结构式<sup>[30]</sup>Fig.2 Structural formula of chitosan<sup>[30]</sup>

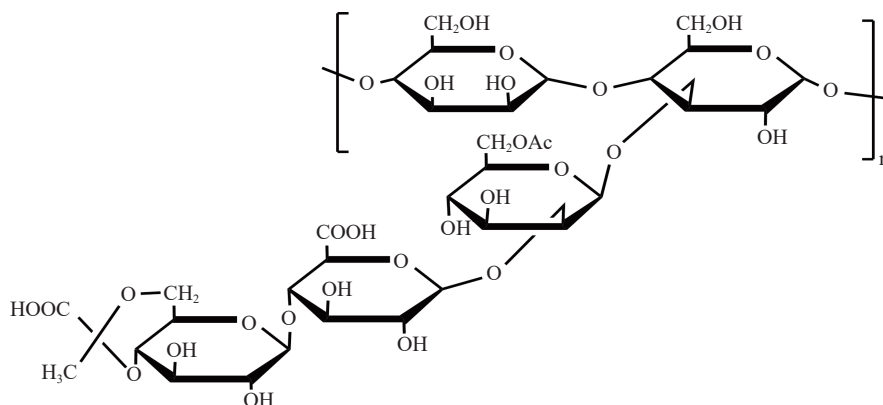
### 1.3 黄原胶

黄原胶,又称为黄胶、汉生胶。它是海洋微生物代谢的一种水溶性胞外多糖。黄原胶分子(图3)是

由D-葡萄糖、D-甘露糖和D-葡萄糖醛酸组成。以上三种成分按2:2:1组成相对分子量在1000 kDa以上的天然有机高分子化合物<sup>[19]</sup>。黄原胶一级结构含葡萄糖基主链和三糖单位的侧链,葡萄糖基主链与纤维素主链结构相同,即 $\beta$ -1,4-糖苷键连接两分子D-葡萄糖;1分子D-葡萄糖醛酸和2分子D-甘露糖在侧链中交替排列,与主链相连的甘露糖在C-6处被乙酰化,丙酮酸部分替代侧链末端的甘露糖,并以缩醛形式连接在4-和6-位置;其二级结构为双螺旋结构,在氢键作用下,侧链反向缠绕主链而形成;其三级结构为螺旋复合体,在共价键的作用下,由二级结构基础上形成,正因这种特殊的化学结构,使黄原胶溶液具有良好的耐盐性、耐酸耐碱性、协同凝胶特性、独特的流变性等<sup>[13]</sup>。因此,黄原胶作为增稠剂、稳定剂等食品工业、医药行业等大范围使用。黄原胶是目前世界上生产规模最大的微生物多糖<sup>[13]</sup>。

### 2 酶法制备海洋寡糖

海洋寡糖的制备方法主要有化学法、物理法和生物酶法(表2)。化学法是通过化学催化剂如草酸、过氧化氢、氢氧化钠等催化海洋多糖生成寡糖的方

图3 黄原胶的结构式<sup>[13]</sup>Fig.3 Structural formula of xanthan gum<sup>[13]</sup>



法, 化学法应用广泛, 操作简便, 是一种成熟的方法。但它存在化学催化剂污染环境、反应条件剧烈、副产物量大等缺点<sup>[34-36]</sup>。物理法(微波辐射、紫外线照射、高温高压等)操作简便、不需要催化剂, 但存在降解效率低下、海洋寡糖得率低等问题<sup>[37-39]</sup>。生物酶法条件温和、酶专一性强、海洋寡糖得率高、不产生副产物、环境友好, 是制备海洋寡糖的有效方法<sup>[40-42]</sup>。早期生物酶法制备海洋寡糖以游离酶法为主, 目前生物酶法制备海洋寡糖主要采用固定化酶法。游离酶法和固定化酶法通常均采用单一酶, 而不是复合酶<sup>[40-46]</sup>。当前酶法制备得到的海洋寡糖主要有: 壳寡糖<sup>[6]</sup>、褐藻胶寡糖<sup>[7,9,35]</sup>、卡拉胶寡糖、黄原胶寡糖、琼胶寡糖等<sup>[42]</sup>。

表 2 海洋寡糖制备方法			
Table 2 The preparation methods of marine oligosaccharides			
制备方法	优点	缺点	参考文献
物理法	操作简单、试剂用量少	降解率低	[34-36]
化学法	技术成熟、成本低	腐蚀设备、污染环境	[37-39]
游离酶法	条件温和、绿色高效	成本高、稳定性差、酶不可重复利用	[40-43]
固定化酶法	稳定性高、产品收率高、酶可重复使用	酶活力低、只适用于小分子底物	[44-46]

2.1 游离酶法制备海洋寡糖

游离酶法制备海洋寡糖是以海洋多糖为原料。海洋多糖种类繁多, 而酶催化具有高度专一性, 故制备海洋寡糖的酶种类众多; 包括一类是降解特定的海洋多糖如褐藻胶裂解酶、壳聚糖酶、黄原胶降解酶、卡拉胶酶、琼胶酶等, 另一类降解非特定的海洋多糖, 如: 淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、甘露糖酶等, 以上酶主要来自微生物。酶法制备海洋寡糖始于上世纪 50 年代中后期, 其目的主要是为了研究海洋寡糖的结构与构效关系以开发药物和功能性制品。经过多年的发展, 利用游离酶制备海洋寡糖已经取得了显著进展; 特别在新酶的发现、酶结构、性质与功能的解析、酶的改造、酶催化条件的优化等方面做了大量的研究<sup>[40-41,47]</sup>。

不同酶作用于不同的海洋多糖, 其反应条件和产物不同。Falkeborg 等<sup>[27]</sup>利用  $\beta$ -褐藻胶裂解酶催化 5% 褐藻酸钠, 反应条件: 酶用量 5%、温度 35 ℃、pH7.0、酶解时间 48 h, 产物为聚合度不大于 4 的寡糖。季珂等<sup>[48]</sup>以壳聚糖酶催化 1% 壳聚糖, 反应条件: 酶用量 120 U/g、温度 50 ℃、pH6.0、酶解时间

4 h, 制备得到的寡糖聚合度不大于 4。谷金芸等<sup>[49]</sup>以黄原胶降解酶催化 2 mg/mL 的黄原胶, 酶解条件: 酶用量 1 mg/mL、温度 45 ℃、pH8.0、酶解时间 2 min, 得到了黄原胶寡糖聚合度为 7~18。同一酶, 但不同类型, 催化产物也不相同。 $\beta$ -褐藻胶裂解酶和双功能褐藻胶裂解酶 AlySY08 制备得到的寡糖聚合度不同。Li 等<sup>[50]</sup>利用双功能褐藻胶裂解酶 AlySY08 催化 0.3% 褐藻胶, 酶解条件: 酶用量 21.5 U/mg、温度 40 ℃、pH7.6、酶解时间 8 h, 所制备的寡糖聚合度不大于 5, 寡糖得率超过 80%。

游离酶法虽然降解效率高、可制得低分子量的海洋寡糖, 但存在酶无法重复利用、易失活以及在均相催化中与底物/产物难以分离等缺点, 导致其生产成本提高, 使游离酶法制备海洋寡糖在工业生产中严重受到限制<sup>[40-43]</sup>。

2.2 固定化酶法制备海洋寡糖

固定化酶技术是指使用物理或化学方法将游离酶限定在一定空间内或完全束缚在某种特定的载体上, 但仍能保持酶活性的一种生物技术<sup>[51]</sup>。与游离酶相比, 固定化酶对不良环境耐受性更强, 同时具有重复利用性、储存稳定性和操作稳定性等优点<sup>[46,52]</sup>。酶的固定化方法多种多样, 主要有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法(表 3)。吸附法是指将酶分子吸附在纤维素、二氧化硅、活性炭、氧化铝等载体表面从而实现固定化的方法; 吸附法成本低、操作简便, 但固定化效率低<sup>[53]</sup>。包埋法是指将酶分子包裹在载体材料中从而实现固定化的方法, 常以海藻酸钠、琼脂等为载体材料<sup>[54]</sup>。酶通过戊二醛、京尼平等试剂交联载体, 从而达到固定化的方法称为交联法, 交联法常与吸附法联用, 提高酶的固定化效率及稳定性, 但在交联过程中反应剧烈, 使得酶的活性降低, 需要不断探索更加温和的固定化工艺来减少酶活损失<sup>[55]</sup>。共价结合法是指酶分子中的非必需侧链基团(氨基、羧基和巯基等)与载体中的功能基团(环氧基、羟基、羧基等)通过共价键结合, 使酶分子固定在载体上的方法<sup>[56]</sup>。

与游离酶相比, 通过与其他载体材料结合, 提高了固定化酶的稳定性, 且易与底物/产物分离, 实现了酶的重复利用, 极大地降低了生产成本, 因此, 固定化酶技术在工业生产中应用前景广阔, 从而引发了国内外学者对多糖降解酶固定化的探讨。Jiang 等<sup>[57]</sup>用四氧化三铁纳米磁性材料为载体, 固定化了褐藻胶裂解酶 AlgL17, 此固定化酶重复使用 5 次后, 仍能保

表 3 固定化酶制备方法				
Table 3 The preparation methods of immobilized enzyme				
固定化方法	优点	缺点	常用载体材料	参考文献
包埋法	条件温和、成本低、固定化速率高	稳定性差、催化效率低	海藻酸钠、明胶、琼脂	[53]
吸附法	操作简便、成本低、酶活回收率高	稳定性差、重复利用低	纤维素、二氧化硅	[60]
交联法	制备简单、稳定性高、载体可回收或无需载体	反应剧烈、固定化程度弱	壳聚糖、磁性Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 纳米颗粒	[55]
共价结合法	稳定性好、重复性好、载体可再生	反应剧烈、酶易失活、载体要求高	沸石、尼龙、环氧树脂	[61]

持最大酶活的 70%; 利用其催化 5 mg/mL 的褐藻胶, 得到了聚合度不大于 4 的褐藻寡糖。研究人员以戊二醛-琼脂糖固定化了壳聚糖酶, 固定化酶重复使用 25 次后, 仍能保持最大酶活的 40%; 利用该固定化酶催化 20 mg/mL 的壳聚糖, 得到的寡糖聚合度不大于 20<sup>[58]</sup>。我国科学家已成功实现了纳米 SiO<sub>2</sub> 材料固定化几丁质酶, 固定化酶的活力是未固定化酶的 70%; 该固定化酶可用于催化真菌多糖几丁质产生几丁寡糖<sup>[59]</sup>。但固定化往往存在降低酶活力, 固定化酶只适用于小分子底物等问题; 这些问题极大地限制了固定化酶的应用。

固定化酶法展现出很好的应用前景。反应器是固定化酶法制备海洋寡糖的重要载体。反应器可以为固定化酶法制备海洋寡糖提供其所需的最佳催化条件。反应器的设计需要考虑温度、pH、搅拌等参数的控制, 还需要考虑物质和能量传递、能耗等因素<sup>[62]</sup>。目前反应器的运行模式主要有批式、分批补料及连续式。反应器主要有搅拌罐式反应器、膜式反应器、固定床式反应器和流动床式反应器<sup>[63]</sup>。反应器已经成为固定化酶法制备海洋寡糖效率的关键设备, 已受到越来越多的关注。

### 3 多糖降解酶及其催化机制

目前, 酶法制备海洋寡糖的关键是高效多糖降解酶的发掘。近年来, 研究者们已经从海洋软体动物、海洋细菌和真菌、土壤细菌和真菌等微生物中分离纯化出多种多糖降解酶, 用于海洋寡糖的制备<sup>[64]</sup>。同时利用色谱法、结晶法、X 射线衍射法、生物信息学方法等, 结合突变技术、共结晶技术、基因工程技术等<sup>[23,27-28]</sup>, 解析了多糖降解酶结构和功能, 初步揭示其催化机制。由于不同海洋多糖其结构和组成存在较大差异, 需要采用不同多糖降解酶; 此外, 由于多糖降解酶来源、酶的组成、酶的分子量、酶的结构等相差很大, 故不同多糖降解酶的催化机制差异显著。在多糖降解酶的活性中心、酶的分子修饰、海洋多糖降解模式与产物生成特点之间规律等方面缺乏深入研究, 多糖降解酶的催化机制目前尚未完全阐明, 需要进一步研究。本文综述了三种多糖降解酶来源、分类及其催化机制。

#### 3.1 褐藻胶裂解酶及其催化机制

褐藻胶裂解酶是特异性降解褐藻胶的一类酶的总称, 其种类繁多、分布广泛。自 1984 年 Hensen 从土壤和海洋中分离出的枯草芽孢杆菌 JBH2 中发现褐藻胶裂解酶以来, 50 多种褐藻胶裂解酶已经被分离出来, 它们主要来源于腐烂的褐藻、海洋软体动物消化液、海洋和土壤微生物中<sup>[65]</sup>。褐藻胶裂解酶分子量一般不大于 1000 kDa<sup>[66]</sup>。Wang 等<sup>[67]</sup>从腐烂海带中分离得到海洋弧菌 *Vibrio* sp. YWA, 通过硫酸铵沉淀、柱层析等组合方法从该菌发酵液中分离纯化得到特异性水解 1,4- $\beta$ -D-聚甘露糖醛酸的褐藻胶裂解酶, 其分子量约为 62.5 kDa; 最适 pH 和温度分别为 7.0 和 25 °C; EDTA 和 Zn<sup>2+</sup>增强该酶的活性, 而 Ba<sup>2+</sup>抑制它的活性。褐藻胶裂解酶可以分成不同类型, 按酶作用底物来划分, 可以分成三类: 1,4- $\beta$ -D-聚甘露糖醛酸(Poly M)裂解酶(EC 42.2.3); 1,4- $\alpha$ -L-聚古罗糖醛酸(Poly G)裂解酶(EC 4.2.2.11)以及 Poly M 和 Poly G 均可降解的双功能酶。按酶作用位点来划分, 可以分成内切酶和外切酶。大部分褐藻胶裂解酶为内切酶<sup>[66]</sup>, 其酶切位点如图 4 所示。

褐藻胶裂解酶的催化机制目前认为主要是在酶  $\beta$ -消除作用下, 使褐藻胶中起连接作用的糖苷键断裂, 生成寡糖。酶使两个残基之间 1,4-O-糖苷键断裂, 同时在 C4 和 C5 之间产生双键, 在产物的非还原性末端形成不饱和糖醛酸, 得到一连串各种长度的寡糖<sup>[68]</sup>。Gacesa<sup>[69]</sup>认为褐藻胶裂解酶降解过程分三步进行: 首先, 底物上的羧基通过形成盐桥被中和; 其次, C5 位的质子被提取, 形成稳定的烯醇阴离子中间体; 最后, C4 和 C5 之间从羧基得到电子, 并形成不饱和双键, 从而使 1,4-O-糖苷键断裂, 完成  $\beta$  消除反应。综上, 尽管对部分褐藻胶裂解酶的结构和催化机制进行了研究, 由于不同来源的褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的机制和制备寡糖的结构不同, 仍然有大部分的酶作用机制需要进一步去研究。

#### 3.2 壳聚糖酶及其催化机制

壳聚糖酶是催化壳聚糖的酶。它主要存在于真菌和细菌细胞中, 此外, 壳聚糖酶也存在一些植物中, 分子量介于 20~60 kDa 之间<sup>[70]</sup>。1973 年, Monaghan

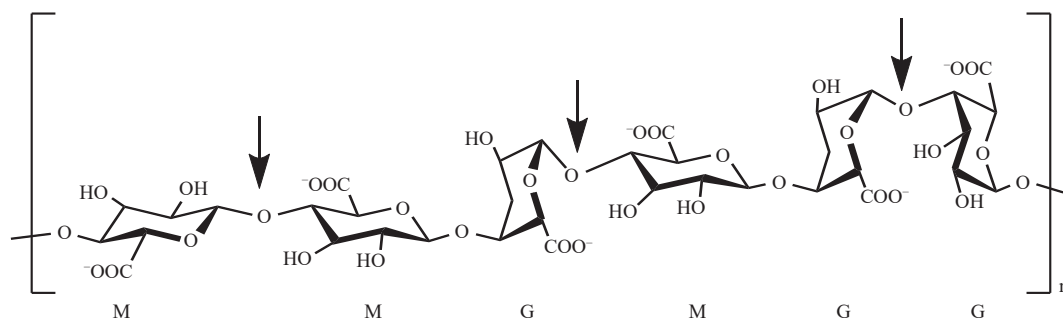


图 4 褐藻胶裂解酶酶切位点<sup>[66]</sup>

Fig.4 Cleavage site of alginate lyase<sup>[66]</sup>

注: M:  $\beta$ -D-甘露糖醛酸; G:  $\alpha$ -L-古洛糖醛酸。

等<sup>[71]</sup>首次从土壤微生物中发现了壳聚糖酶,并提出:壳聚糖酶是一种特异性降解壳聚糖的新型酶,对于胶态几丁质基本不能水解,但可催化几丁质生成壳聚糖。根据壳聚糖酶的作用位点的不同,可以分为内切型壳聚糖酶和外切型壳聚糖酶<sup>[72]</sup>。目前所发现的壳聚糖酶大多为内切型壳聚糖酶,而对于外切型壳聚糖酶的报道相对较少。

基于氨基酸序列的不同,壳聚糖酶可以分为 GH3、GH5、GH7、GH8、GH46、GH75 和 GH80 七种<sup>[73]</sup>。其中,已经破解 GH46、GH75、G8 和 GH80 壳聚糖酶的结构。GH46 壳聚糖酶主要分离自杆菌属和链霉菌属的细菌,其催化机制和蛋白质结构已被广泛研究。GH75 壳聚糖酶主要来源于真菌。壳聚糖酶 GH46、GH75 和 GH80 只能水解壳聚糖,是壳聚糖的专一性水解酶,而其他家族的壳聚糖酶往往具有其他酶活性如纤维素酶和糖基转移酶等<sup>[74]</sup>。根据酶底物特异性的不同,可以将壳聚糖酶分为四个不同的类型: I 类壳聚糖酶(切割 GlcN-GlcN 和 GlcNAC-GlcN 糖苷键)、II 类壳聚糖酶(水解 GlcN-GlcN 糖苷键)、III 类壳聚糖酶(切割 GlcN-GlcN 和 GlcN-GlcNAC 糖苷键)以及 IV 类壳聚糖酶(裂解以上三种糖苷键)<sup>[75]</sup>。

催化机制因不同壳聚糖酶而异,基于酶解产物还原端异头碳结构的差异,通常有保持异头构型的“retaining”机制(图 5a)和形成倒立异头构型“invert-ing”机制(图 5b);“retaining”通过两步置换机制催化水解,有两个关键氨基酸残基参与反应,其中一个氨基酸残基作为亲核基团,另一个作为广义酸/碱;相反,“invert-ing”遵循一步、单一的置换机制,也有两个关键氨基酸参与反应,其中一个作为广义碱使水分子

极化以产生更强的亲核基团来攻击异头碳,而另一个则作为广义酸使糖苷氧质子化以加速反应<sup>[70]</sup>。x 射线结构表明:在壳聚糖酶的催化过程中, Glu22 和 Asp40 有着重要作用。总之,尽管近几年在个别家族的壳聚糖酶催化机制方面取得了一定的研究成果,但壳聚糖酶属于多个糖苷水解酶家族,大部分家族的壳聚糖酶结构和催化机制研究甚少。

### 3.3 黄原胶降解酶及其催化机制

黄原胶降解酶是指能够降解黄原胶的酶的统称。由于黄原胶独特的双螺旋结构和侧链基团产生的位阻,其不易被酶降解,需要在多种酶的协同下才能被彻底水解,因此,黄原胶降解酶是由多种酶组成的混合酶系,分子量介于 10~100 kDa 之间;黄原胶降解酶由黄原胶主链修饰酶和黄原胶侧链修饰酶组成<sup>[76]</sup>。黄原胶主链修饰酶作用于其主链,主要有  $\beta$ -D-葡聚糖酶和  $\beta$ -D-葡聚糖苷酶;黄原胶侧链修饰酶是可以攻击黄原胶分子中所有侧链连接的混合酶系,包括黄原胶裂解酶、 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶和不饱和葡萄糖醛酸水解酶;其中,  $\beta$ -D-葡聚糖酶和黄原胶裂解酶属于胞外酶,  $\beta$ -D-葡聚糖苷酶、 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶和不饱和葡萄糖醛酸水解酶属于胞内酶<sup>[77]</sup>。

黄原胶在上述五种酶的参与下才能彻底水解, Nankai 等<sup>[78]</sup>详细报道了由芽孢杆菌 *Bacillus* sp. strain GL 1 产生的这五种酶降解黄原胶的过程(图 6)。首先,芽孢杆菌细胞外的黄原胶裂解酶攻击黄原胶侧链分子中丙酮酸化的甘露糖基和葡萄糖醛酸残基之间的糖苷键,从而除去丙酮酸化的甘露糖;其次,无末端的黄原胶主链在胞外酶  $\beta$ -D-葡聚糖酶的催化下生成四元糖,后经糖转运途径被转运到细胞内,在细胞内被  $\beta$ -D-葡聚糖苷酶转化为三元糖(不饱和葡萄糖醛

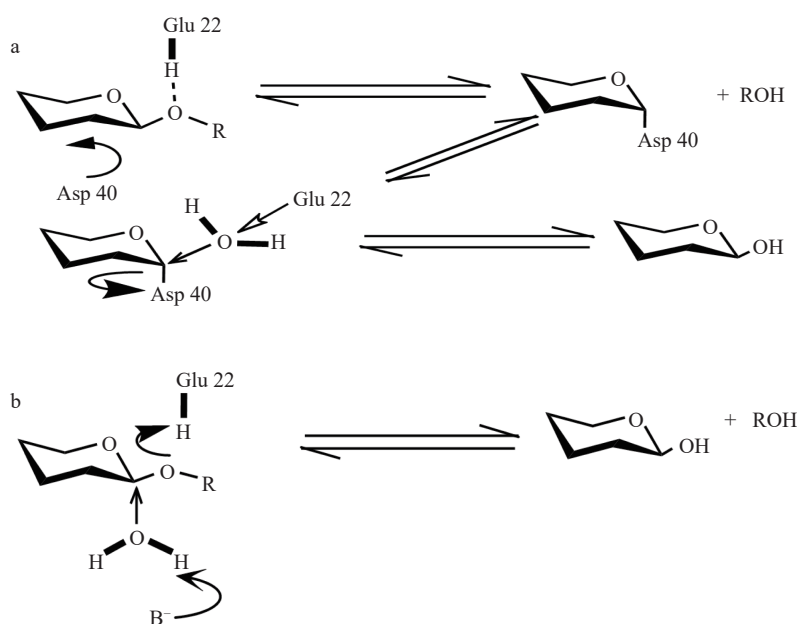
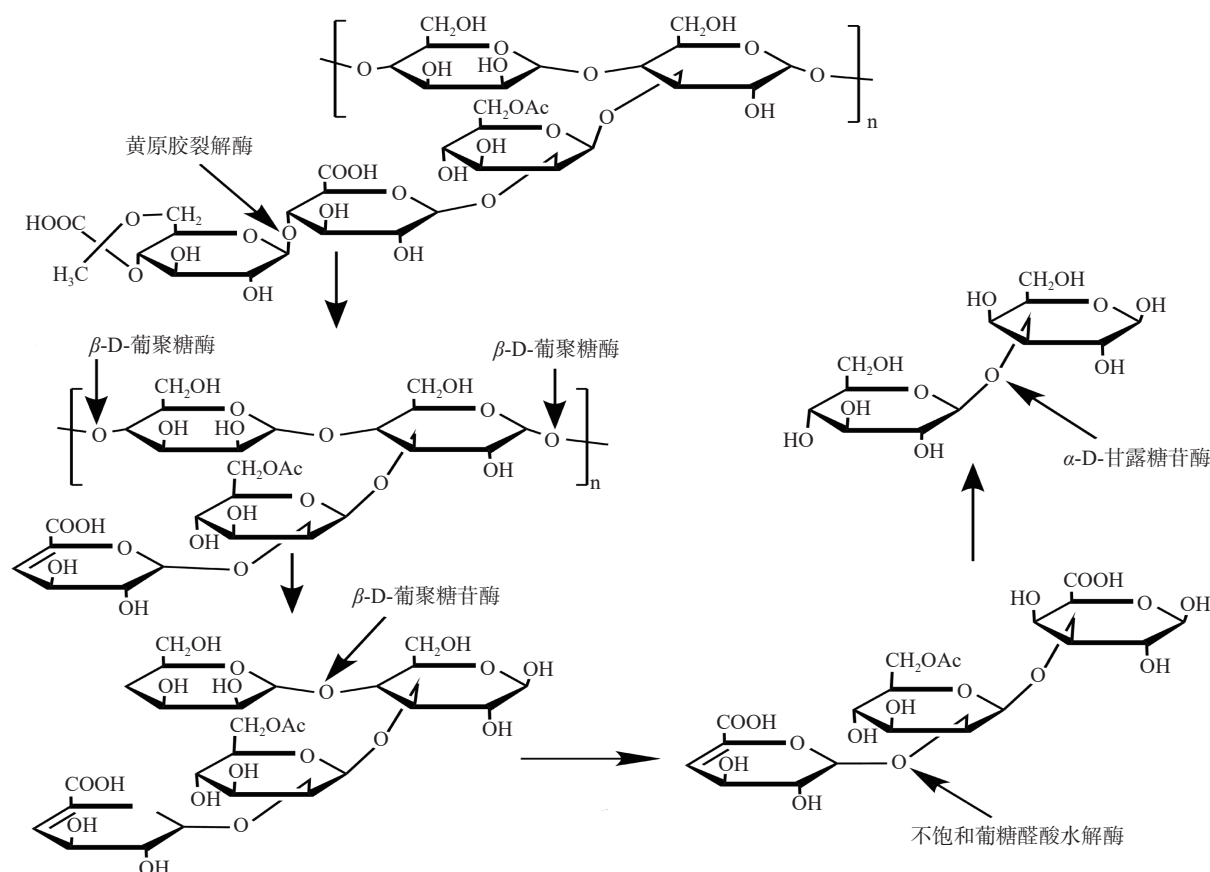


图 5 壳聚糖酶催化机制<sup>[70]</sup>

Fig.5 Catalytic mechanism of chitosanase<sup>[70]</sup>

注: a: “retaining”催化机制; b: “invert-ing”催化机制。



图6 黄原胶降解途径<sup>[78]</sup>Fig.6 Degradation pathway of xanthan gum<sup>[78]</sup>

酸-乙酰甘露糖-葡萄糖);再次,不饱和葡萄糖醛酸水解酶水解三元糖,生成葡萄糖醛酸和双糖甘露糖-葡萄糖;最后,双糖被 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶分解成葡萄糖和甘露糖<sup>[78]</sup>。总之,利用黄原胶降解酶催化黄原胶制备寡糖的作用机制研究仍然十分匮乏,同时无法实现黄原胶相关降解酶的获取,且生成寡糖的含量有限,很难实现黄原胶寡糖的工业化生产。

#### 4 总结与展望

海洋寡糖种类繁多、来源广泛,具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血和抗炎等生理活性,在医药、化妆品、食品、农业等领域发挥着越来越重要的作用,有着广阔的发展前景。目前,海洋寡糖生物酶法制备具有反应条件温和、绿色环保、降解率高等优势,因此,高效优质的海洋寡糖酶法制备工艺开发是当前的主流发展方向。随着科学技术和酶工程的不断发展,很多新型酶进入人们的视野。其中,纳米酶是有催化作用的纳米材料。纳米酶很稳定、价格低廉和易于工业化放大等优点,引起了人们的广泛关注<sup>[79]</sup>。迄今为止,已发现具有氧化还原酶、水解酶、裂合酶和异构酶四种催化类型的纳米酶<sup>[80]</sup>。纳米酶的发现成为未来酶法制备海洋寡糖的发展方向。

随着酶工程和基因工程的不断发展,酶法制备海洋寡糖未来发展方向有如下四个方面:不断发掘催化效率高的酶资源,包括新技术得以应用于酶的分子

修饰和改造,获得高效的酶资源。通过基因工程获得更多优质的酶,并实现优质酶的产业化。从自然界中发现新的酶;完善酶促反应的技术路线,实现高浓度底物的高效降解,提高生产效率、降低生产成本;构建基于固定化酶的高效反应器,包括搅拌罐式反应器、固定床式反应器、流动床式反应器和膜式反应器,实现海洋寡糖的连续化生产。同时加强对新型固定化酶技术及载体的探讨,提高固定化酶活性,降低生产成本;阐明海洋寡糖制备过程中酶的作用和调控机制,提升酶的催化效率,强化酶的调控。随着科学技术的不断发展和研究人员的不断探索,将会促进海洋多糖资源的集约开发和海洋寡糖的商业化生产。

#### 参考文献

- [1] ZHAO J, YANG J F, SONG S, et al. Anticoagulant activity and structure characterization of polysaccharide from abalone (*Haliotis discus hannai* Ito) gonad[J]. *Molecules*, 2016, 21: 697.
- [2] JIAO G, YU G, ZHANG J, et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae[J]. *Marine Drugs*, 2011(9): 196-223.
- [3] 赵小亮,王钰婷,肖宁,等.海洋寡糖及其衍生物活性的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2018, 8(6): 477-488. [ZHANG X L, WANG Y T, XIAO N, et al. Progress on activities of marine oligosaccharides and their derivatives[J]. *Current Biotechnology*, 2018, 8(6): 477-488.]
- [4] SHI D L, QI J H, ZHANG H, et al. Comparison of hydrothermal depolymerization and oligosaccharide profile of fucoidan and



- fucosylated chondroitin sulfate from *Holothuria floridana*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 738–747.
- [5] 李玲翠, 王培培, 吴文惠, 等. 海洋寡糖及在功能食品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 313–320. [LI L C, WANG P P, WU W H, et al. Research progress of marine oligosaccharides and their application in functional foods[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(5): 313–320.]
- [6] 王鲁霞, 吴廷立, 马文平. 壳寡糖的制备方法及其在食品中的应用现状[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11485–11487. [WANG L X, WU Y L, MA W P. The preparation method and application status of chitooligosaccharide in food[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2014, 42(32): 11485–11487.]
- [7] 阿拉腾珠拉, 胡永飞. 褐藻寡糖的制备方法及其生物活性研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 104–118. [ALTZL, HU Y F. Advances in the preparation of alginate oligosaccharides and its biological functions[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(1): 104–118.]
- [8] 张坤, 王令充, 吴皓, 等. 活性海洋多糖的功能及结构研究概况[J]. 中国海洋药物, 2010, 29(3): 55–60. [ZHANG K, WANG L C, WU H, et al. General situation of research on the function and structure of active marine polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2010, 29(3): 55–60.]
- [9] 刘以晴, 马月云, 刘宗浩, 等. 褐藻胶寡糖的制备、分离及表征研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 456–468. [LIU Y Q, MA Y Y, LIU Z H, et al. Review on preparation, separation and characterization of alginate oligosaccharide[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(9): 456–468.]
- [10] 凌娜, 李玮璐, 汲晨锋, 等. 海藻多糖的化学结构及生物活性研究新进展[J]. 中国海洋药物, 2021, 40(1): 69–78. [LI N, LI W L, JI C F, et al. New research progress in the chemical structures and biological activities of seaweed polysaccharides[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2021, 40(1): 69–78.]
- [11] 孙艳宾, 李宁, 梁君玲, 等. 海藻酸钠提取工艺研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(8): 201–206. [WANG Y B, LI N, LIANG J L, et al. Research progress on extraction of sodium alginate[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(8): 201–206.]
- [12] 钱琛. 壳聚糖对苹果幼树根际微生物及氮素吸收的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022. [QIAN Z. Effects of chitosan on rhizosphere microorganisms and nitrogen uptake in young apple trees[D]. Taian: Shangdong Agriculture University, 2022.]
- [13] 张雪梅, 严海源, 张忠亮, 等. 黄原胶的生产及应用进展[J]. 轻工科技, 2022, 38(3): 15–19. [ZHANG X M, YAN H Y, ZHANG Z L, et al. Production and application progress of xanthan gum[J]. *Light Industry Science and Technology*, 2022, 38(3): 15–19.]
- [14] 杨金生, 陈晶晶, 潘玉英, 等. 褐藻胶生物活性应用及最新研究进展[J]. 农村经济与科技, 2017, 28(5): 90–91. [YANG J S, CHEN J J, PAN Y Y, et al. Application and latest research progress of alginate bioactivity[J]. *Rural Economy Science and Technology*, 2017, 28(5): 90–91.]
- [15] 孙慧慧, 杨国淞, 程伊梦, 等. 海洋寡糖的生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(13): 276–284. [SUN H H, YANG G S, CHENG Y M, et al. Research progress on the biological activities of marine oligosaccharides[J]. *Food Science*, 2022, 43(13): 276–284.]
- [16] HU H, XIA H, ZOU X, et al. N-acetyl-chitooligosaccharide attenuates inflammatory responses by suppression of NF-kappa signaling, MAPK and NLRP3 inflammasome in macrophages[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 78: 104364.
- [17] YAN L, WANG D, ZHU M, et al. Highly purified fucosylated chondroitin sulfate oligomers with selective intrinsic factor Xase complex inhibition[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 222: 115025.
- [18] 陈成龙. 三株不同海洋环境来源微生物胞外多糖的结构研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015. [CHEN C L. Structural characterizations of the extracellular polysaccharides produced by three marine microorganisms from different marine environments[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.]
- [19] 邱嘉辉, 何亚文. 微生物胞外多糖黄原胶的应用与研究进展[J]. 激光生物学报, 2019, 28(5): 385–393. [QIU J H, HE Y W. Advances in applications and research of xanthan gum[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2019, 28(5): 385–393.]
- [20] 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*, 2018, 6: 1859–1881.
- [21] 张明杰, 李恒, 蒋敏, 等. 低分子质量褐藻寡糖的高效酶法制备及其抗氧化活性评价[J]. 海洋科学, 2016, 40(12): 62–70. [ZHANG M J, LI H, JIANG M, et al. Efficient enzymatic preparation of low molecular weight fucoidan oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(12): 62–70.]
- [22] 陈彦伶, 张立, 张凌琳, 等. 壳聚糖及其衍生物在口腔疾病防治中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2322–2333. [CHEN Y L, Z L, Z L L, et al. Advances of chitosan and its derivatives in the prevention and treatment of oral diseases[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2322–2333.]
- [23] 孙冲, 姚昱锐, 方婷, 等. 海洋寡糖制备工艺及生物活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 446–453. [SUN Z, YAO L K, FANG T, et al. Research progress on preparation process and biological activity of marine oligosaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(18): 446–453.]
- [24] 范素琴, 逢锦龙, 陈鑫炳, 等. 褐藻胶的功能特性及其在凝胶制品中的应用[J]. 食品与营养科学, 2019, 8(1): 90–94. [FAN S Q, PANG J L, CHEN B X, et al. The gel properties of alginate and its application in modern sweets[J]. *Hans Journal of Food and Nutrition Science*, 2019, 8(1): 90–94.]
- [25] FANG W S, BI D C, ZHENG R J, et al. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages[J]. *Science Reports*, 2017, 7: 1663.
- [26] CHEN J Y, HU Y, ZHANG L R, et al. Alginate oligosaccharide DP5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 623.
- [27] FALKEBORG M, CHEONG L Z, GIANFICO C, et al. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. *Food Chemistry*, 2014, 164: 185–194.
- [28] 李安雪. 褐藻胶裂解酶基因工程菌的高密度培养与褐藻水解产物的应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013. [LI A X. High density cultivation of genetically engineered bacteria in alginate lyase and brown algae hydrolyzate applied research[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.]
- [29] ZHANG P, LIU W Z, PENG Y F, et al. Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 23(1): 254–261.
- [30] ZHU B W, LI F, XIONG Q, et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: source, preparation, structure, physiological activity and applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 61(1): 60–74.

- [31] HE T X, WANG W B, CHEN B S, et al. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres: Microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 236: 116094.
- [32] KUMAR N, SALAR R K, PRASAD M, et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of vincristine loaded folic acid-chitosan conjugated nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cell line[J]. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2019, 5(1): 87-99.
- [33] RAFAEL O H D, FERNANDO Z G L, ABRAHAM P T, et al. Production of chitosan-oligosaccharides by the chitin-hydrolytic system of *Trichoderma harzianum* and their antimicrobial and anticancer effects[J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 486: 107836.
- [34] 刘雪, 王妹姝, 曹素健, 等. 海洋硫酸鼠李寡糖的制备研究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(6): 18-22. [LIU X, WANG M Y, CAO S J, et al. Research on the preparation of marine sulfated rhamno-oligosaccharides[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(6): 18-22.]
- [35] 邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣, 等. 褐藻胶寡糖制备的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 75-79. [TAI H B, TANG L W, CHEN D D, et al. Progresses on preparation of alginate oligosaccharide[J]. *Life Science Research*, 2015, 19(1): 75-79.]
- [36] TOMMERAAS K, VARUM K M, CHRISTENSEN B E. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 333: 137-144.
- [37] LI B, LIU S, XING R, et al. Degradation of sulfated polysaccharides from enteromorpha prolifera and their antioxidant activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1991-1996.
- [38] JO B W, CHOI S K. Degradation of fucoidans from *Sargassum fulvellum* and their biological activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111: 822-829.
- [39] 段科, 单虎, 林英庭, 等. 微波辅助盐酸/过氧化氢降解浒苔多糖及其抗氧化活性[J]. *食品科技*, 2015, 40(12): 142-147. [DUAN K, DAN H, LIN Y T, et al. Degradation of polysaccharide from enteromorpha prolifera with hydrochloric acid and hydrogen peroxide assisted by microwave and its antioxidant activity[J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(12): 142-147.]
- [40] BELIK A A, SILCHENKO A S, KUSAYKIN M I, et al. Alginate lyases: Substrates, structure, properties, and prospects of application[J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2018, 44: 386-396.
- [41] BOUCELKHA A, PETIT E, ELBOUTACHFAITI R, et al. Production of guluronate oligosaccharide of alginate from brown algae *Stypocaulon scoparium* using an alginate lyase[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29: 509-519.
- [42] 邓宇峰, 林娟, 叶秀云, 等. 龙须菜酶解制备琼胶寡糖的工艺优化[J]. *食品工业*, 2019, 40(5): 110-115. [DENG Y F, LING J, YE X Y, et al. Process optimization of preparation of agarose oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(5): 110-115.]
- [43] 陈海欣, 张赛男, 赵力民, 等. 固定化酶: 从策略到材料设计[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(1): 88-95. [CHEN H X, ZHANG S N, ZHAO L M, et al. Enzyme immobilization: From strategies to materials design[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2020, 18(1): 88-95.]
- [44] 柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 等. 酶的固定化技术最新研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 188-203. [KE C X, FAN Y L, SU F, et al. Recent advances in enzyme immobilization[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(2): 188-203.]
- [45] ELNASHAR M M M. Review article: Immobilized molecules using biomaterials and nanobiotechnology[J]. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2010, 1(1): 61-77.
- [46] LIANG S, WU X L, XIONG J, et al. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: An update review[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 406: 213149.
- [47] 文霞, 周少璐, 杨秀芷, 等. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 38-46. [WEN X, ZHOU S L, YANG X J, et al. Research progress on polysaccharide-degrading enzymes from marine microorganism[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 38-46.]
- [48] 季珂, 李恒, 龚劲松, 等. 酶法制备壳寡糖及其抗肿瘤活性评价[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(6): 93-99. [JI K, LI H, GONG J S, et al. Preparation of chitosan oligosaccharides by enzymatic hydrolysis and evaluation of antitumor activities[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(6): 93-99.]
- [49] 谷金芸, 李宪臻, 杨帆, 等. 黄原胶寡糖的酶法制备及其性能[J]. *大连工业大学学报*, 2022, 41(5): 327-331. [GU J Y, LI X Z, YANG F, et al. Enzymatic preparation and properties of xanthan oligosaccharides[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2022, 41(5): 327-331.]
- [50] LI S Y, WANG L N, HAO J H, et al. Purification and characterization of a new alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. SY08[J]. *Marine Drugs*, 2016, 15(1): 1-11.
- [51] ZHANG S S, BILAL M, ZDARTA J, et al. Biopolymers and nanostructured materials to develop pectinases-based immobilized nano-biocatalytic systems for biotechnological applications[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 109979.
- [52] HAO Y, DENG S M, WANG R X, et al. Development of dual-enhancer biocatalyst with photothermal property for the degradation of cephalosporin[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 429: 128294.
- [53] JESIONOWSKI T, ZDARTA J, KRAJEWSKA B. Enzyme immobilization by adsorption: A review[J]. *Adsorption*, 2014, 20: 801-821.
- [54] NEERAJ G, RAVI S, SOMDUTT R, et al. Immobilized inulinase: A new horizon of paramount importance driving the production of sweetener and prebiotics[J]. *Critical Review in Biotechnology*, 2018, 38(3): 409-422.
- [55] LIU Z M, DUBREMETZ J F, RICHARD W, et al. Useful method for the spatial localization determination of enzyme (peroxidase) distribution on microfiltration membrane[J]. *Journal of Membrane Science*, 2005, 267: 2-7.
- [56] WU S, LIU B, LI S. Behaviors of enzyme immobilization onto functional microspheres[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 37(5): 263-267.
- [57] JIANG Z D, ZHANG X W, WU L Y, et al. Exolytic products of alginate by the immobilized alginate lyase confer antioxidant and antiapoptotic[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 116976.
- [58] CHENG Y F, LI Z Y, SUN H H, et al. Immobilization of chitosanase on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and properties[J]. *Oceanic and Coastal Sea Research*, 2022, 21(5): 1381-1388.
- [59] 陈俊鹏. 几丁质酶的活性改良及固定化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. [CHEN J P. Improvement of chitinase activity and its immobilization[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.]
- [60] ELIAS E, WAHAB R A, CHANDREN S, et al. Structure and

properties of lipase activated by cellulose-silica polyethersulfone membrane for production of pentyl valerate[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 245: 116549.

[61] XIANG X R, SUO H B, XU C, et al. Covalent immobilization of lipase onto chitosan-mesoporous silica hybrid nanomaterials by carboxyl functionalized ionic liquids as the coupling agent[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2018, 165: 262–269.

[62] SU Z, LUO J, LI X, et al. Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: a review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation[J]. *Separation and Purification Technology*, 2020, 243: 116840.

[63] 王永红, 夏建业, 唐寅, 等. 生物反应器及其研究技术进展[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(2): 14–23. [WANG Y H, XIA J Y, TANG Y, et al. Recent advances in bioreactor and its engineering[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2013, 11(2): 14–23.]

[64] SUN H H, GAO L, XUE C H, et al. Marine-polysaccharide degrading enzymes: status and prospects[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 2767–2796.

[65] HANSEN J B, DOUBET R S, RAM J. Alginase enzyme production by *Bacillus circulans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(4): 704–709.

[66] 栾明鉴, 何焘, 林荣芳, 等. 褐藻胶裂解酶研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(8): 214–217. [LUAN M J, HE X, LIN R F, et al. Research progress of alginate lyase[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(8): 214–217.]

[67] WANG Y H, YU G L, WANG X M, et al. Purification and characterization of alginate lyase from marine *Vibrio* sp. YWA[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2006, 38(9): 633–638.

[68] PREISS J, ASHWELL G. Alginic acid metabolism in bacteria. I. enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237: 309–316.

[69] GACESA P. Alginate-modifying enzymes: a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases[J]. *Febs Letters*, 1987, 212(2): 199–202.

[70] THADATHIL N, VELAPPAN S P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A re-

view[J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 392–399.

[71] MONAGHAN R L, EVELEIGH D E, TEWARI R P, et al. Chitosanase, a novel enzyme[J]. *Nature New Biology*, 1998, 8(8): 568–574.

[72] 韩玉娟, 王华, 路新枝. 壳聚糖酶的研究进展[J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(2): 88–96. [HAN Y J, WANG H, LU X Z. Research advance in chitosanase[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2018, 37(2): 88–96.]

[73] QIN Z, CHEN Q W, LIN S, et al. Expression and characterization of a novel cold-adapted chitosanase suitable for chitooligosaccharides controllable preparation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 253: 139–147.

[74] IKE M, KO Y, YOKOYAMA K, et al. Cellobiohydrolase I (Ce17A) from *Trichoderma reesei* has chitosanase activity[J]. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 2007, 47: 159–163.

[75] WEIKERT T, NIEHUES A, CORDLANDWEHR S, et al. Reassessment of chitosanase substrate specificities and classification[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1698.

[76] RIAZ T, IQBAL M W, JIANG B, et al. A review of the enzymatic, physical, and chemical modification techniques of xanthan gum[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 186: 472–489.

[77] LI B C, LI H, LIU J L, et al. Enzymatic degradation, antioxidant and rheological properties of a sphingan WL gum from *Sphingomonas* sp. WG[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 210: 622–629.

[78] NANKAI H, HASHIMOTO W, MIKI H. Microbial system for polysaccharide depolymerization: Enzymatic route for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain GL1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 2520–2526.

[79] REN X Y, CHEN D X, WANG Y, et al. Nanozymes-recent development and biomedical applications[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(92): 1–18.

[80] 高利增, 陈雷, 张若飞, 等. 纳米酶: 新一代人工酶[J]. *中国科学: 化学*, 2022, 52(9): 1–15. [GAO L Z, CHEN L, ZHANG R F, et al. Nanozymes: Next-generation artificial enzymes[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2022, 52(9): 1–15.]