

## 海藻多糖降解酶的性质和作用机理\*

胡晓珂 江晓路 管华诗

(青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

### PROPERTIES AND MECHANISMS OF MARINE POLYSACCHARIDASES\*

Hu Xiaoke Jiang Xiaolu Guan Huashi

(Fishery College of Qingdao Ocean University, Qingdao 266003, China)

关键词: 海藻多糖, 微生物降解, 海藻多糖降解酶, 海藻寡糖

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0762-05

海藻主要由蓝藻、绿藻、红藻和褐藻四大类组成。世界海洋中估计生长有 8000 多种海藻。海藻的生产与它的利用价值有密切关系,就褐藻、红藻和绿藻这三大门类来说,褐藻和红藻以其种类多、产量丰富和含有用途广泛的褐藻胶、琼胶和卡拉胶等,由自然生产逐步为人工养殖所代替。全世界每年约生产 5 万吨海藻胶(其中,褐藻胶 2.5 万吨,卡拉胶 1.45 万吨,琼胶 0.7 万吨)创值近 4 亿美元。这些海藻胶是海藻细胞壁内的主要填充物质,约占细胞干重的 20% ~ 30%<sup>[1]</sup>。

近年来,各国的科学家大力开展从海洋开发新药物的研究计划。因此,对海藻、海藻多糖及其多糖类代谢产物进行了大规模的化学分离、结构确定及生物活性筛选研究。至今,已经从海藻中分离到了具有抗菌、抗肿瘤等活性的多糖类代谢产物。海洋中资源丰富的三种多糖——褐藻胶、琼胶和卡拉胶广泛应用于医药及食品工业中。据推测,至 90 年代末,全世界海藻胶的产量比 1989 年翻一番<sup>[1]</sup>。近几年来,海藻寡糖的生理作用不断被揭示,引起了人们更大的兴趣。海藻多糖降解酶应用的重要趋向是着力于海藻寡糖的酶法生产,为新药、新功能食品的开发提供了新的手段。本文综述了海藻多糖微生物降解及其酶系的研究。

#### 1 海藻多糖的化学结构及其降解方式

海藻多糖主要包括琼胶(agar)、卡拉胶(carrageenan)、褐藻胶(algin)等。其中卡拉胶和琼胶来自于红藻,其结构非常相似。琼胶包括琼脂糖(agarose)和硫酸琼胶(agaropectin)两种组分。琼脂糖是由交替的 3-O- $\beta$ -D-半乳呋喃糖和 4-O-3,6 内醚- $\alpha$ -L-半乳呋喃糖残基连接而成的直链所组成的。硫酸琼胶的结构则较为复杂,含有 D-半乳糖、3,6-半乳糖酐、半乳糖醛酸及硫酸盐、丙酮酸等。卡拉胶也是红藻中产生的一类半乳聚糖,与琼胶的区别为:琼胶以(1,3)- $\beta$ -D-半乳糖基-(1,4)-3,6-内醚(或不内醚化)- $\alpha$ -L-半乳糖为重复二糖的多糖;卡拉胶则以(1,3)- $\beta$ -D-半乳糖基-(1,4)-3,6-内醚(或不内醚化)- $\alpha$ -D-半乳糖为重复二糖的多糖,而且卡拉胶中的硫酸基明显多于琼胶。褐藻中含有多种多糖,其中褐藻胶是由多聚 D-甘露糖醛酸(M)<sub>n</sub>和多聚 L-古罗糖醛酸(G)<sub>n</sub>以不同规则的排列顺序分布于分子链中,两者中间以交替的 MG 或多聚交替(MG)<sub>n</sub>相连接,因其在藻体中含量高,而且用途广泛,在工业产量最大。褐藻胶,包括水溶性褐藻酸钠、钾等碱金属盐类和水不溶性褐藻酸(alginic acid)及其与 2 价以上金属离子结合的褐藻酸盐类(alginates)。

\* 山东省科委攻关项目资助(003110112)。

作者简介:胡晓珂(1977-),女,山东青岛人,生药学专业硕士研究生,现主要从事海洋应用微生物方面的研究。

收稿日期:2000-12-25,修回日期:2001-04-13

海藻多糖的降解基本上有两种方法:酸法和酶法。酸法降解海藻多糖反应剧烈、工艺条件难以控制而逐渐被酶法降解所代替。降解海藻多糖的酶有两大来源:

海洋中的一些软体动物:1943年 Mori 等曾用海洋软体动物中的水解酶来处理皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)中提取的多糖,发现其确有降解作用<sup>[2]</sup>。1961年, Tsujino 等从鲍的肝脏中得到了褐藻酸裂合酶<sup>[3]</sup>。1978年 Benitez 等在菲律宾海域中发现以异枝麒麟菜为食物的一种软体动物刺冠海胆(*Diadema setosum*)的消化肠道中存在能水解  $\kappa$ -卡拉胶的酶<sup>[4]</sup>。1984年,朱仁华等从三种海螺:朝鲜花冠小月螺(*Lunella cornata coreensis*)、单齿螺(*Monodonta cabio*)和疣荔枝螺(*Purpura clavigera*)中分离到了褐藻酸裂合酶<sup>[5]</sup>。1997年 Erasmus 等从鲍(*Haliotis midae*)中得到降解琼脂的微生物<sup>[6]</sup>。

微生物来源: Sarwar 等<sup>[7,8]</sup>和 Greer 等<sup>[9]</sup>从海洋细菌噬纤维菌属(*Cytophaga*)中得到了卡拉胶酶。Weigle<sup>[10]</sup>从假单胞菌属(*Pseudomonas*)得到卡拉胶酶。Cote、Gorin、Govan 和 Linker 从固氮菌属(*Azotobacter*)和假单胞菌属等海洋细菌以及真菌中得到了褐藻酸裂合酶<sup>[11-14]</sup>。自从1902年 Gran<sup>[15]</sup>第一次从海水中分离到琼脂的分解菌——假单胞菌(*Pseudomonas galatia*)以来,人们已经报道了几个种属的产琼脂降解酶的菌,包括噬纤维菌属(*Cytophaga*)<sup>[16]</sup>,假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[15]</sup>,链霉菌属(*Streptomyces*)<sup>[17]</sup>,弧菌属(*Vibrio*)<sup>[18]</sup>和别单胞菌属(*Alteromonas*)<sup>[19]</sup>。

## 2 海藻多糖降解酶的分类及性质

### 2.1 琼胶酶(agarase)的分类及性质

现在一般将琼胶酶分为两种: $\alpha$ -琼胶酶专一性的裂解  $\alpha$ -(1,3)连接的琼脂糖,生成以  $\beta$ -D-半乳糖为非还原性末端和以 3,6-内醚- $\alpha$ -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖(agarooligosaccharides)系列; $\beta$ -琼胶酶专一性的裂解  $\beta$ -(1,4)连接的琼脂糖,生成以  $\beta$ -D-半乳糖为还原性末端和以 3,6-内醚- $\alpha$ -L-半乳糖为非还原性末端的新琼寡糖(neoagarooligosaccharides)系列。

### 2.2 卡拉胶酶(carrageenase)的分类及性质

根据已确定的各种类型理想的卡拉胶重复二糖结构特征,以及 1,3 连接的 D-半乳糖上的硫酸基的位置,可将各种类型的卡拉胶分类为  $\beta$  族卡拉胶、 $\kappa$  族卡拉胶和  $\lambda$  族卡拉胶。

根据卡拉胶酶的底物专一性不同可将卡拉胶酶分为: $\kappa$ -卡拉胶酶(EC 3.2.1.83)、 $\iota$ -卡拉胶酶(EC 3.2.1.-)和  $\lambda$ -卡拉胶酶(EC 3.2.1.-)。

### 2.3 褐藻酸裂合酶(alginate lyase)的分类及性质

根据对底物专一性的不同将褐藻酸裂合酶分为三类:专一性作用于多聚 D-甘露糖醛酸(M)<sub>n</sub> 的甘露糖醛酸酶;专一性作用于多聚 L-古罗糖醛酸(G)<sub>n</sub> 的古罗糖醛酸酶;某些海洋细菌甚至可以同时产生具有降解多聚 D-甘露糖醛酸(M)<sub>n</sub> 和多聚 L-古罗糖醛酸(G)<sub>n</sub> 的酶系。从某种意义上说,从鲍中得到的褐藻酸裂合酶基本上是内切型甘露糖醛酸酶<sup>[20]</sup>。而海洋细菌中发现的大部分为古罗糖醛酸酶,如在褐藻假单胞菌(*Pseudomonas alginovora*),肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[21,22]</sup>等发现古罗糖醛酸酶。

## 3 海藻多糖降解酶的作用机制

### 3.1 琼胶酶的作用机制

根据裂解酶的底物专一性将琼胶酶的作用机制分为两种:

第一种机制源于对大西洋假别单胞菌(*Pseudoalteromonas atlantic*) ATCC 19292  $\beta$ -琼胶酶的研究<sup>[23]</sup>。在这种细菌中内切型  $\beta$ -琼胶酶 I (EC 3.2.1.81)断裂  $\beta$ -(1,4)连接的琼脂多聚物生成了寡聚糖的混合物,并以新琼脂四糖为主要产物。接着这些寡聚糖被膜绑的外切型  $\beta$ -琼胶酶 II 水解,生成新琼脂二糖。最后,新琼脂二糖被细胞质中新琼脂二糖水解脱水成为 3,6-内醚-L-半乳糖和半乳糖<sup>[24]</sup>。

第二种机制是胞外酶  $\alpha$ -琼胶酶断裂  $\alpha$ -(1,3)连接的琼脂糖<sup>[19]</sup>。产生以新琼脂二糖为单位的寡聚糖,并在非还原性末端产生 D-半乳糖。琼胶降解别单胞菌(*Alteromonas agarolyticus*) GJ1b 含有两种酶: $\alpha$ -琼胶

酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶,此 $\beta$ -半乳糖苷酶专一性作用于还原末端含有3,6-内醚-L-半乳糖单位<sup>[19]</sup>。

### 3.2 卡拉胶酶的作用机制

从现有的资料来看,卡拉胶酶的作用机制是: $\kappa$ -卡拉胶酶专一性作用于 $\kappa$ -卡拉胶的 $\beta$ -(1,4)糖苷键得到 $\kappa$ -新卡拉二糖和 $\kappa$ -新卡拉四糖;用 $\iota$ -卡拉胶酶专一性的作用于 $\iota$ -卡拉胶得到 $\iota$ -新卡拉二糖和 $\iota$ -新卡拉四糖,而 $\lambda$ -卡拉胶酶的作用机制则不清楚。

### 3.3 褐藻胶裂合酶的作用机制

褐藻胶裂合酶催化 $\beta$ -消去反应,断裂褐藻胶分子链,在新的非还原端产生具有不饱和双键的糖醛酸,此单元在230~240nm有强烈的紫外吸收。因此,酶活力的测定可在此范围内的波长内测定。反应的终产物是一系列寡糖的混合物<sup>[21]</sup>。这说明褐藻胶经酶水解得到的双键并非原样品中含有的,而是酶水解在分子链断裂处的非还原末端产生的。

## 4 海藻多糖降解酶的生化性质

海藻多糖的微生物降解大致经历了三个阶段:鉴于新技术的发展情况,早期的海藻多糖降解酶的研究大多停留在对酶解产物的研究,没有对海藻多糖酶进行深入的生化特性方面的研究。琼胶酶存在于大多数的琼脂分解菌中,1955年,Ishimatsu等<sup>[25]</sup>从琼胶液化弧菌(*Vibrio agarliquefaciens*)中分离出能分解琼胶的酶,称为琼胶酶(agarase)。它能使琼胶在分解初期粘度急剧下降,生成还原糖,失去凝固性。1961年Yashikawa等<sup>[26]</sup>用海洋细菌褐藻胶液化假单胞菌(*Pseudomonas alginolyquefaciens*)分泌出的褐藻胶裂合酶分解褐藻胶,用纸色谱法可检测出单糖、二糖和三糖,并证明在非还原末端基上有不饱和键。1966年Weigl<sup>[9]</sup>等从海洋细菌-卡拉假单胞菌(*Pseudomonas carrageenovora*)分离出一种能降解 $\kappa$ -卡拉胶的特有酶。加入硫酸铵分级沉淀,以羟基磷灰石色谱分离。然后于35℃培养,并用DEAE纤维素色谱柱处理,纯化至电泳均一性。此酶对卡拉胶降解的同时能使其粘度急剧下降,还原糖含量增加,降解产物用薄层色谱法确定为同系列的含硫酸寡糖,即以4-硫酸基-新卡拉二糖为主要降解产物。1973年Johnston和McCannless等从同一个菌中纯化了 $\lambda$ -卡拉胶酶<sup>[27]</sup>。其后,Mclean等改进了从卡拉假单胞菌中分离 $\kappa$ -卡拉胶酶的方法,得到分子量为35kD的纯化 $\kappa$ -卡拉胶酶<sup>[28]</sup>。

七、八十年代,随着海藻多糖工业和生物技术的发展,微生物的海藻多糖降解酶的研究受到了广泛的重视,人们对海藻多糖降解酶的生化特性及作用机理方面得到了深入的了解。第一个也是唯一一个商业化的琼胶酶是1983年Moorice等<sup>[23]</sup>对大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*)纯化并鉴定了其中的 $\beta$ -琼胶酶I和II。大西洋假单胞菌中的内切型胞外酶 $\beta$ -琼胶酶I作用于1,4连接的D-半乳糖和3,6-内醚-L-半乳糖,生成新琼脂四糖四聚体末端产物; $\beta$ -琼胶酶I还可以作用于新琼脂四糖和新琼脂六糖。 $\beta$ -琼胶酶II断裂由 $\beta$ -琼胶酶I生成的四聚体中的1,4糖苷键,生成新琼脂二糖的二聚物。存在于大西洋假单胞菌中的第三种酶是 $\alpha$ -琼胶酶断裂新琼脂二糖的 $\alpha$ -糖苷键,生成D-半乳糖和3,6-内醚-L-半乳糖。1987年Min等用假单胞菌生产内切多聚古罗糖醛酸(G)<sub>n</sub>的裂合酶,经凝胶过滤色谱分离得到3组酶,都只降解多聚古罗糖醛酸(G)<sub>n</sub>,而不降解多聚甘露糖醛酸(M)<sub>n</sub><sup>[29]</sup>。198年Sarwar等报道了一种海洋细菌噬纤维菌属(*Cytophage*)1k-c783,分离其胞外酶,并用硫酸铵沉淀、离子交换色谱及凝胶过滤色谱得到了电泳纯的 $\kappa$ -卡拉胶酶,分子量为100kD,最适pH为7.6,最适温度为25℃<sup>[8]</sup>。

进入九十年代,随着分子生物学的发展,又掀起了研究海藻多糖降解酶的高潮,不仅发现了新的海洋微生物来源的海藻多糖降解酶,许多海藻多糖降解酶被纯化,其基因得到了克隆和测序,甚至得到许多海藻多糖降解酶的工程菌。1990年,Potin等报道从红藻中分离到了一株噬纤维菌属(*Cytophage*)Dsjj的卡拉胶降解菌,此菌在 $\kappa$ -卡拉胶、 $\iota$ -卡拉胶或琼胶中产生胞外酶 $\kappa$ -卡拉胶酶、 $\iota$ -卡拉胶酶或琼胶酶的活性,而在粗 $\lambda$ -卡拉胶中则同时产生胞外酶 $\kappa$ -卡拉胶酶和 $\iota$ -卡拉胶酶<sup>[30]</sup>。1991年,Brown等报道了用基因工程的方法从海洋细菌(*Sargassum fluitans*)的甘露糖醛酸裂合酶基因克隆到大肠杆菌中表达,大量生产甘露糖醛酸裂合酶<sup>[31]</sup>。1994年,Barbeyron等克隆了*A. carrageenovora* ATCC 43555编码 $\kappa$ -卡拉胶酶的基因

cgkA。该基因编码一个 397 个氨基酸的蛋白质,并带有一个 25 个氨基酸的肽链,并且此酶是糖苷键水解酶家族(family)16 个新成员。通过蛋白质顺序可推测与天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)产生的  $\beta$ -琼胶酶和  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶有相似的序列<sup>[32]</sup>。1998 年,Barbeyron 等报道了从海洋滑翔细菌(*Cytophaga drobachiensis*)中克隆的一种糖苷键水解酶-卡拉胶酶。核苷酸序列包含一个与各种各样的真核生物、原核生物相似的八聚体  $\omega$  序列。CgkA 基因编码一条 545 个氨基酸的蛋白质,带有一条 35 个氨基酸的信号肽和一条 229 个氨基酸的翻译后加工的 C-末端区域。此酶显示出一个全折叠和糖苷键水解酶 16 家族(family)的催化结构域<sup>[33]</sup>。1998 年,Ertesvag 等报道克隆、测序并在大肠杆菌中成功表达的维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)中的褐藻胶裂合酶的基因 algL。此蛋白质的分子量为 41.4kD。切除一个信号肽以后,剩下一条 39kDa 的成熟蛋白质。其中此成熟蛋白质的 63% 的氨基酸与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中的 AlgL 基因的蛋白质绝对相同<sup>[34]</sup>。1998 年,Kloareg 等报道克隆并测序了一组硫酸半乳糖水解酶基因,其中  $\beta$ -琼胶酶和  $\kappa$ -卡拉胶酶显示出与糖苷键水解酶家族 16 相似的二级结构。与此相反,对疏水氨基酸簇的分析表明  $\iota$ -卡拉胶酶与琼胶酶和  $\kappa$ -卡拉胶酶无结构上的关系, $\iota$ -卡拉胶酶组成了糖苷键水解酶的一个新的家族。其它海藻多糖降解酶的生化特性见表 1。

表 1 几种海藻多糖降解酶的生物化学特性

| 产酶菌株                        | 酶的类型            | 酶作用的底物  | 产物                             | 分子量 /kD | 最适 pH   | 最适温度/°C |
|-----------------------------|-----------------|---------|--------------------------------|---------|---------|---------|
| 弧菌属                         | $\beta$ -琼胶酶    | 琼脂      | 新琼脂二糖                          | 107     | 8.0     | 30      |
| JT0107                      |                 | 新琼脂四糖   | 新琼脂四糖                          |         |         |         |
| 大西洋假单胞菌                     | $\beta$ -琼胶酶    | 琼脂      | 新琼脂四糖                          | 33      | 7.0     | 30      |
| N-1                         |                 |         | 新琼脂六糖                          |         |         |         |
| 琼脂裂解单胞菌                     | $\alpha$ -琼胶酶   | 琼脂      | 新琼脂四糖                          | 360     | 6.0~9.0 | 45      |
| GT1B                        | $\beta$ -半乳糖苷酶  |         | 新琼脂三糖                          |         |         |         |
| 类假单胞菌                       | $\beta$ -琼胶酶 I  | 琼脂      | 新琼脂四糖或新琼脂六糖<br>和新琼脂二糖          | 210     | 6.7     | 38      |
|                             | $\beta$ -琼胶酶 II | 琼脂      | 新琼脂四糖                          | 63      | 6.7     | 43      |
| 维涅兰德固氮菌                     | 甘露糖醛酸酶          | 多聚甘露糖醛酸 | 一系列寡糖醛酸                        | 35      | 7.7     | —       |
| <i>Dendryphiella salina</i> | 甘露糖醛酸酶          | 多聚甘露糖醛酸 | 一系列 4,5 位不饱和的寡糖并进一步水解为不饱和单糖或二糖 | 35      | 5.0     | 45      |
| IFO 32139                   |                 |         |                                |         |         |         |
| Pagrus                      | 古罗糖醛酸糖          | 多聚古罗糖醛酸 | 寡聚糖                            | 42      | 8.5     | 100     |
| 别单胞菌                        | 古罗糖醛酸糖          | 多聚古罗糖醛酸 | 寡聚糖                            | 32      | 7.5     | 30      |
| H-4                         |                 |         |                                |         |         |         |
| 类噬纤维菌属                      | $\kappa$ -卡拉胶酶  | 卡拉胶     | $\kappa$ -新卡拉胶四糖               | 40      | 7.2     | 30      |

综上所述,海藻多糖降解酶的生化特性相差很大,这表现在产酶菌株、酶系的组成、酶的分子量及最优培养条件。

## 5 海藻多糖、海藻寡糖及海藻多糖酶的应用及发展前景

琼胶、卡拉胶、褐藻胶并称为海藻工业的三大多糖,广泛应用于食品、医药、生物技术等领域。其中降解的褐藻胶具有许多类肝素的抗凝和抗病毒的生理活性,可用于心血管疾病和病毒病方面的药用研究,因此在国内受到了广泛的重视,青岛海洋大学药物与食品研究所研制成功的 PSS、甘糖酯已成功的应用于临床,因此以往的酸解法制备低聚褐藻胶已不能适应市场的需要,寻找一种温和、有效的酶解方法迫在眉睫。另外,琼胶酶、卡拉胶酶及褐藻胶酶还应用于分子生物学领域,作为高效、可靠的海藻解壁

酶,用于原生质体、胞内活性物质的制备。海藻多糖酶为我们更为精确的研究海藻多糖的结构,提供了有利的手段。进入九十年代以后,随着分子生物学的发展,海藻多糖的微生物降解及其酶系性质的研究,以及海藻多糖降解菌工程菌酶系的表达,使大量得到海藻多糖降解酶成为可能,这为进一步研究海藻寡糖的生理活性以及海藻解壁的应用提供了基础。近年来,许多新技术得以应用于酶的发现与改造,拓展了酶的来源及特性的概念,克隆酶、杂交酶、修饰酶等将使生物酶发展到一个新阶段。随着功能酶学、功能基因组或蛋白质组的迅速发展,这必将为新酶的研究和酶工程的发展提供更广阔的空间。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 纪明候. 海藻化学. 北京: 科学出版社, 1997.
- [ 2 ] Mori T. *J Agr Chem Soc Jpn*, 1943, **19**: 740 ~ 742.
- [ 3 ] Tsujino I, Saito T. *Nature*, 1961, **192**: 970 ~ 971.
- [ 4 ] Benitez L V, Macaraves N M. *Proc Int Seaweed Symp*, 1978, **9**: 353 ~ 359.
- [ 5 ] 朱仁华. 海洋学报, 1984, **5**(增刊): 899 ~ 906.
- [ 6 ] Erasmus J H, Cook P A, Coyn V E. *Elsevier Science B V Aquaculture Amsterdam*, 1997, **155**: 381 ~ 390.
- [ 7 ] Sarwar G, Sakata T, Kasimoto D. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1983, **49**: 1689 ~ 1694.
- [ 8 ] Sarwar G, Matayoshi S, Oda H. *Microbiol Immunol*, 1987, **31**: 869 ~ 877.
- [ 9 ] Greer C W. *Diss Abstr Int*, 1985, **45**: 2818.
- [ 10 ] Weigl J, Yaphe W. *Can J Microbiol*, 1966, **12**(5): 939 ~ 947.
- [ 11 ] Cote G L, Krull L H. *Carbohydr Res*, 1988, **181**: 143 ~ 152.
- [ 12 ] Gorin P A J, Spencer J F T. *Can J Chem*, 1966, **44**: 993 ~ 998.
- [ 13 ] Govan J R W, Fyfe J A M, Jarman T R. *J Gen Microbiol*, 1981, **125**: 217 ~ 220.
- [ 14 ] Linker A, Jones R S. *Nature*, 1964, **204**: 187 ~ 188.
- [ 15 ] Grobeau D, Yaphe W. *Can J Microbiol*, 1977, **23**: 672 ~ 679.
- [ 16 ] Van der Meulen, H J, Harder W, Vedkamp H. *J Microbiol Serol*, 1974, **40**: 329 ~ 346.
- [ 17 ] Stainer R Y. *J Bacteriol*, 1942, **44**: 555 ~ 570.
- [ 18 ] Sugano Y, Terada M I, Arita M N. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 1549 ~ 1554.
- [ 19 ] Potin P, Richard C, Rocheas C. *Eur J Biochem*, 1993, **214**: 599 ~ 607.
- [ 20 ] Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M, et al. *Phycologia*, 1990, **29**: 173 ~ 181.
- [ 21 ] Haugen F, Kortner F, Larsen B. *Carbohydr Res*, 1990, **198**: 101 ~ 109.
- [ 22 ] Boyd J, Turvey J R. *Carbohydr Res*, 1977, **57**: 163 ~ 171.
- [ 23 ] Morrice L, McLean M, Williamson F, et al. *Eur J Biochem*, 1983, **135**: 553 ~ 558.
- [ 24 ] Day D, Yaphe W. *Can J Microbiol*, 1975, **21**: 1512 ~ 1518.
- [ 25 ] Ishimatsu K, Kibesaki Y. *Sci And Ind ( Jap )*, 1955, **29**: 129 ~ 132.
- [ 26 ] Yoshikawa M, Kyohara T. *Sci Rep Hyogo Univ Agric Ser Agric Chem*, 1961, **6**(2): 51 ~ 56.
- [ 27 ] Johnston K H, McCandless E L. *Can J Microbiol*, 1973, **19**: 779 ~ 788.
- [ 28 ] McLean W, Williamson M W, Williamson F B. *Eur J Biochem*, 1979, **93**: 553 ~ 558.
- [ 29 ] Min K H, Sasaki S F. *J Biochem*, 1987, **81**: 539 ~ 546.
- [ 30 ] Potin P, Sanseau A, LeGall Y, et al. In 3rd International Workshop on Plant Polysaccharides. Le Croisic France, PV11, INTRA Nantes edition, 1990.
- [ 31 ] Brown B J, Preston J F, Ingram L O. *J Appl Envir Microb*, 1991, **57**(6): 1870 ~ 1872.
- [ 32 ] Barbeyron T, Gerard A, Potin P, et al. *Mol Biol Evol*, 1994, **15**(5): 528 ~ 537.
- [ 33 ] Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B. *Gene*, 1998, **139**: 105 ~ 109.
- [ 34 ] Ertesvag H, Erlien F, Skjak-Break G, et al. *J of Bacteriology*, 1998, **180**: 3779 ~ 3784.

\* Project Granted by Key Project of Province (003110112)