

研究报告

重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产 κ -卡拉胶酶的发酵条件优化

田琳 刘哲民 段芳媛 于源 牟海津*

(中国海洋大学 食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)

摘要:【目的】优化重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产生 κ -卡拉胶酶的发酵条件。【方法】通过单因子筛选和响应面分析方法对在 IPTG 诱导下的 κ -卡拉胶酶的产生菌 BL21-HTa-cgkZ 进行产酶条件优化。【结果】该菌产酶的最佳培养基组成为: 乳糖 7 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, CaCl₂ 0.666 g/L。最佳诱导条件为: 在工程菌接种 1.55 h 后添加 IPTG, IPTG 的浓度为 0.89 mmol/L, 诱导时间为 24 h, 诱导温度为 23.03 °C。并确定了在培养基中添加乳糖、Triton X-100 对 κ -卡拉胶酶分布的影响。【结论】实验结果为产 κ -卡拉胶酶工程菌的规模化生产奠定基础。

关键词: κ -卡拉胶酶, 发酵, 优化, 诱导

Optimization of fermentation conditions of κ -carrageenase by recombinant strain BL21-HTa-cgkZ

TIAN Lin LIU Zhe-Min DUAN Fang-Yuan YU Yuan MOU Hai-Jin*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: [Objective] To obtain the high-yield κ -carrageenase by the recombinant strain BL21-HTa-cgkZ. [Methods] The optimal fermentation conditions of the recombinant strain BL21-HTa-cgkZ were determined by using single factor design and response surface analysis in the flask. [Results] The optimal medium compositions were composed of lactose 7 g/L, tryptone 10 g/L, yeast extract powder 5 g/L, NaCl 10 g/L and CaCl₂ 0.666 g/L. The optimal induction condition was adding IPTG 0.89 mmol/L after inoculation for 1.55 h and maintaining the fermentation at 23.03 °C for 24 h. The distribution of κ -carrageenase expressed by recombinant strain BL21-HTa-cgkZ was also affected by the additive such as lactose and triton X-100 in the medium. [Conclusion] The results provide the clues for the mass production of κ -carrageenase by the recombinant strain BL21-HTa-cgkZ.

Keywords: κ -Carrageenase, Fermentation, Optimization, Induction

卡拉胶(Carrageenan)又名爱尔兰苔菜胶、角叉菜胶、鹿角菜胶,是麒麟菜和角叉菜等海洋红藻的主要成分。卡拉胶的化学本质是半乳聚糖硫酸酯,是由 1,3- β -D-吡喃半乳糖和 1,4- α -D-吡喃半乳糖作

为基本骨架,交替连接成的线性多糖。根据其是否含有 3,6-内醚半乳糖以及硫酸基的含量和分子中在半乳糖上所连接的位置,可以将卡拉胶分为 κ -卡拉胶、 λ -卡拉胶、 γ -卡拉胶、 ι -卡拉胶、 ϕ -卡拉胶等^[1]。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项项目(No. 201362041); 山东省科技发展计划项目(No. 2014GHY115037)

*通讯作者: Tel: 86-532-82032290; 信箱: mousun@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-01-08; 接受日期: 2015-03-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

κ -卡拉胶是由 1,3 连接的 4-O-硫酸- β -D-半乳糖和 1,4 连接的 3,6-内醚- α -D-半乳糖交替连接而成^[2]。能够水解 κ -卡拉胶的 β -1,4 糖苷键的是 κ -卡拉胶酶^[3]。 κ -卡拉胶酶作为工具酶有很大的研究价值和实用价值,可用于藻类原生质体的制备^[4]、藻类细胞壁的结构分析^[5]、研究卡拉胶结构和功能^[6]及卡拉胶寡糖制备等^[7-8]。

产 κ -卡拉胶酶的微生物大部分来自于海洋细菌^[3,9-13],但是受酶的活性和产量的限制,难以大规模生产利用。利用基因重组技术实现 κ -卡拉胶酶的异源高效表达是我们追求的目标。本实验室在获得了野生型产 κ -卡拉胶酶的细菌 *Zobellia* sp. ZM-2 的 κ -卡拉胶酶基因的基础上,通过基因工程技术将该基因导入大肠杆菌 BL21(DE3)中,实现了 κ -卡拉胶酶的异源表达,并将该重组菌命名为 BL21-HTa-*cgkZ*。本文通过对重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 发酵条件的优化,确定了该菌株产 κ -卡拉胶酶的最佳发酵条件,大大提高了酶的产量。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 重组菌 BL21-HTa-*cgkZ*, 内含 κ -卡拉胶酶重组质粒, 由本实验室前期构建并保藏。

1.1.2 培养基组分: 初始发酵培养基(LB, g/L): 酵母粉 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, pH 6.0。培养基使用前 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 加入氨苄青霉素, 终浓度为 0.1 g/L。

1.1.3 主要试剂: 胰蛋白胨、酵母粉、琼脂均为国产分析纯; 氨苄青霉素和 IPTG 购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵条件: 从斜面上挑取适量重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 至种子培养基中, 在 37 °C、160 r/min 条件下培养 12 h。将处于对数生长期的种子液按照 1%的接种量加入到装有 50 mL 液体发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 23 °C、130 r/min 条件下培养一段时间后, 加入诱导剂 IPTG, 继续

培养至 24 h, 测定其酶活力和菌体生物量。同样发酵条件重复 3 次, 以其平均值作为实验数据。除特殊说明外, 实验的对照组均为在初始发酵培养基条件下发酵测得的酶活力和菌体生物量。

1.2.2 菌体生物量测定: 将发酵液用液体 LB 培养基稀释 10 倍, 以未接菌的液体 LB 培养基为参比, 测其在 600 nm 下的吸光度, 检测微生物的生物量。

1.2.3 酶活力的测定: 发酵液在 4 °C、4 800 r/min 离心 10 min 去除菌体后, 取上清液与底物在 39 °C 条件下反应 5 min。 κ -卡拉胶酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)^[14]。一个酶活力单位(U)定义为在最适反应条件下, 每分钟生成 1 μ mol 还原糖所需的 κ -卡拉胶酶量。

酶的相对活力是每次实验中实验组酶活力与对照组酶活力的比值。

2 结果与分析

2.1 碳源对重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 产酶的影响

以初始发酵培养基为基础, 分别按照 0.2% (质量体积比)的比例加入葡萄糖、甘油、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖、蔗糖和 κ -卡拉胶, 研究不同碳源对重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 产酶的影响。如图 1 所示, 不同碳源对重组菌的生长和酶活力影响差别明显。重组菌 BL21-HTa-*cgkZ* 在以乳糖为碳源时菌体长势很好, 并且产 κ -卡拉胶酶的酶活力最大; 以可溶性淀粉为碳源时, 菌体量和酶活力也较好; 葡萄糖和麦芽糖虽然也能显著促进菌体的生长, 但是却对酶的产生有很大的抑制作用。因此, 综合产酶和菌体生长两方面的因素, 选择乳糖作为碳源。

继续考察添加乳糖的量对菌体生长和产酶的影响。分别配制含有 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%乳糖的培养基, 发酵 24 h 后测菌体浓度和酶活力。如图 2 所示, 在 0-0.7%的乳糖浓度范围内, 菌体浓度和酶活力均随着乳糖浓度的增加而增加; 当乳糖浓度>0.7%时, 随着乳糖浓度的增加, 菌体生物量增加缓慢且酶活力逐渐降低。因此乳糖的最适浓度为 7 g/L。

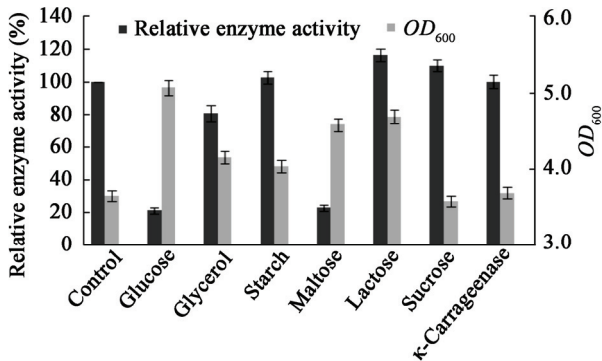


图 1 不同碳源对 BL21-HTa-cgkZ 菌体生长和产酶的影响

Figure 1 Effect of carbon sources on the growth and enzyme activity of BL21-HTa-cgkZ

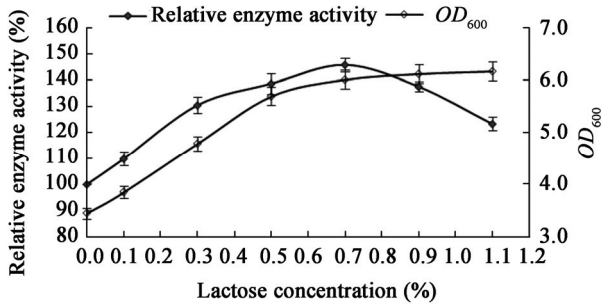


图 2 不同乳糖浓度对 BL21-HTa-cgkZ 菌体生长和产酶的影响

Figure 2 Effect of different lactose concentrations on the growth and enzyme activity of BL21-HTa-cgkZ

2.2 氮源对重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产酶的影响

保留 60% 的蛋白胨和酵母粉, 剩余的按照氮质量分数相等原则分别由硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、氯化铵、尿素、碳酸氢钠代替, 进行摇瓶发酵, 24 h 后测定菌体生物量和酶活力。如图 3 所示, 与有机氮源相比, 当使用无机氮源时, 菌体生长差且产酶能力低。因此无论是从菌体浓度还是酶活力方面考虑, 用无机氮替代 40% 的有机氮的效果都不如全部用有机氮源好。因此, 本实验继续用胰蛋白胨和酵母粉作为氮源, 未使用无机氮源。

2.3 金属离子对重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产酶的影响

在初始发酵培养基的基础上, 分别加入

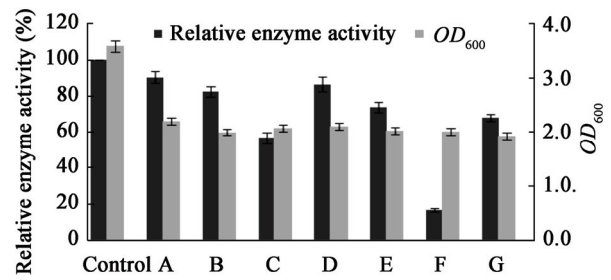


图 3 不同氮源对 BL21-HTa-cgkZ 菌体生长和产酶的影响

Figure 3 Effect of nitrogen sources on the growth and enzyme activity of BL21-HTa-cgkZ

注: A: 硝酸铵; B: 硫酸铵; C: 硝酸钾; D: 硝酸钠; E: 氯化铵; F: 尿素; G: 碳酸氢铵。

Note: A: Ammonium nitrate; B: Ammonium sulfate; C: Potassium nitrate; D: Sodium nitrate; E: Ammonium chloride; F: Urea; G: Ammonium bicarbonate.

2.5 mmol/L 的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 。研究不同金属离子对胞外酶活力和菌体生物量的影响。如图 4 所示, K^+ 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 均对菌体生长有促进作用, 但是对胞外酶的酶活力并没有促进作用; 在培养基中添加 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 不利于菌体的生长而且酶活力很低; Ca^{2+} 不仅能促进菌体的生长, 并且对 κ -卡拉胶酶的酶活力有增大作用。因此, 选择在培养基中添加 Ca^{2+} 以促进菌体的生长和酶活力的增大。继续考察不同 Ca^{2+} 浓度对重组菌生长和产酶的影响, 结果如图 5 所示, 当 Ca^{2+} 浓度范围在 0–6 mmol/L 时, 离子浓度的增加促进菌体的生长, 增大 κ -卡拉胶酶的酶活力; 当 Ca^{2+} 浓度 > 6 mmol/L 时, 随着离子浓度的增加酶活力越来越低。因此, 最适产酶的 Ca^{2+} 浓度为 6 mmol/L, 即 0.666 g/L。

2.4 诱导条件优化

在前期分别对诱导剂浓度(A)、诱导温度(B)、诱导时机(C)进行了单因素试验, 得出适合的 IPTG 浓度为 0.9 mmol/L, 诱导温度为 23 °C, 接种 2.0–2.5 h 后加入诱导剂 IPTG^[15]。在此基础上, 以上述 3 个因素为自变量, 采用 Box-Behnken 实验设计法对产酶诱导条件进行响应面分析实验, 响应面中各个因素的水平如表 1 所示。

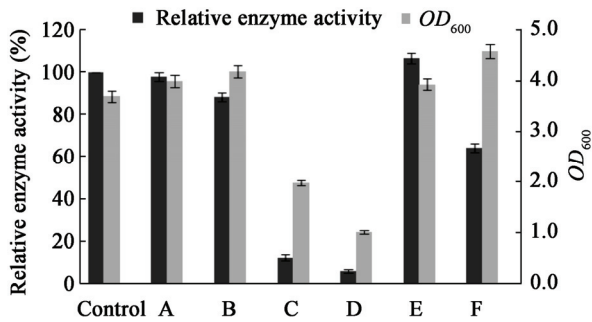


图4 不同金属离子对 BL21-HTa-cgkZ 菌体生长及酶活力的影响

Figure 4 Effect of metal ions on the growth and enzyme activity of BL21-HTa-cgkZ

Note: A: K⁺; B: Mg²⁺; C: Zn²⁺; D: Cu²⁺; E: Ca²⁺; F: Mn²⁺.

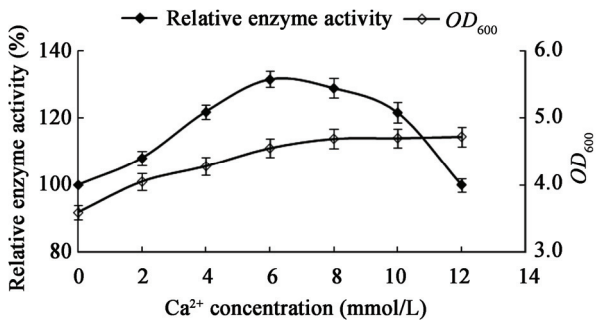


图5 不同浓度的 Ca²⁺对 BL21-HTa-cgkZ 菌体生长和酶活力的影响

Figure 5 Effect of different calcium concentrations on the growth and enzyme activity of BL21-HTa-cgkZ

表1 Box-Behnken 试验因素及水平
Table 1 Levels of variables used in the Box-Behnken design

编码 Encode	因素 Factors	水平 Levels		
		-1	0	1
A	IPTG concentration (mmol/L)	0.6	0.9	1.2
B	Induction temperature (°C)	18	23	28
C	Pre-incubation time (h)	1	2	3

Box-Behnken 实验设计方案及结果见表 2, 其中包括 12 个析因试验和 7 个中心试验。通过 Design-Expert 分析软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合, 得到酶活力(Y)与诱导剂浓度(A)、诱导温

表2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 2 Box-Behnken experiments design and response values

实验号 Serial number	A	B	C	κ-卡拉胶酶产量
				Yield of κ-carrageenase (OD ₅₂₀)
1	0	0	0	0.822
2	1	-1	0	0.507
3	1	0	-1	0.711
4	0	-1	1	0.252
5	-1	1	0	0.566
6	0	0	0	0.852
7	-1	-1	0	0.544
8	0	0	0	0.841
9	0	1	1	0.345
10	0	0	0	0.844
11	-1	0	1	0.392
12	0	0	0	0.862
13	1	0	1	0.244
14	0	0	0	0.857
15	0	1	-1	0.625
16	0	-1	-1	0.637
17	0	0	0	0.837
18	1	1	0	0.518
19	-1	0	-1	0.704

度(B)、诱导时机(C)的关系, 其二次多项回归方程为: $Y=0.85-0.028A+0.014B-0.18C-0.002750AB-0.039AC+0.026BC-0.13A^2-0.18B^2-0.20C^2$ 。

对上述模型进行分析, 表 3 表明该模型达到了极显著水平 ($P<0.0001$), 回归方程的失拟项 ($P=0.0633$) 检验是不显著的。该模型的 $R^2=0.9958$, 说明 99.58% 数据的变异性可以用此回归模型来解释。通过该模型得到的响应面三维图及其等高线见图 6-8。从表 3 及图 6、7、8 可以看出, 诱导剂 IPTG 的浓度和诱导时机以及诱导温度和诱导时机对重组菌 BL21-HTa-cgkZ 胞外产 κ-卡拉胶酶的交互作用显著; 诱导剂 IPTG 的浓度和诱导温度对重组菌 BL21-HTa-cgkZ 胞外产 κ-卡拉胶酶的交互作用不显著。

根据模型方程绘制的响应曲面确定了各因素的最佳水平: IPTG 浓度 0.89 mmol/L, 诱导温度

23.03 °C 和诱导时间 1.55 h, 预测的 OD_{520} 值为 0.886, 与验证值(0.865)拟合良好, 这个结果说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响, 因此用响应面法优化重组菌产 κ -卡拉胶酶的发酵条件是有效可行的, 这为卡拉胶酶的大规模制备提供了依据。

2.5 酶在细胞中的分布

重组菌 BL21-HTa-cgkZ 能够实现分泌表达 κ -

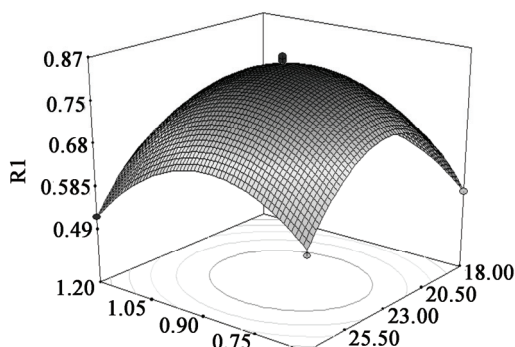
卡拉胶酶, 但还是有一部分 κ -卡拉胶酶留在周质或者胞内, 且在不同培养条件下酶的分布会发生变化。在初始发酵培养基的基础上分别添加 7 g/L 乳糖、0.1% (体积比) Triton X-100, 探究培养基中不同类型添加剂对 κ -卡拉胶酶分布的影响, 如表 4 所示。

结果表明, 在培养基中加入乳糖不仅显著地提高了胞外酶活力, 而且对胞质酶活力也有提升作

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Results of regression equation analysis

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 D_f	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob>F
Model	0.800 0	9	0.089 00	236.21	<0.000 1
A	0.006 385	1	0.006 385	16.92	0.002 6
B	0.001 624	1	0.001 624	4.30	0.067 8
C	0.260 0	1	0.260 0	690.65	<0.000 1
AB	0.003 025	1	0.003 025	0.080	0.783 5
AC	0.006 006	1	0.006 006	15.92	0.003 2
BC	0.002 765	1	0.002 765	7.30	0.024 3
A^2	0.078 00	1	0.078 00	205.67	<0.000 1
B^2	0.140 0	1	0.140 0	383.02	<0.000 1
C^2	0.180 0	1	0.180 0	477.81	<0.000 1
Residue	0.003 396	9	0.000 377 4		
Lack of fit	0.002 304	3	0.000 768 2	4.22	0.063 3
Pure Error	0.001 092	6	0.000 182 0		
Cor Total	0.810 0	18			
	$R^2=0.995 8$			$R^2_{Adj}=0.991 6$	



A: IPTG concentration (mmol/L) 0.60 28.00 B: Induction temperature (°C)

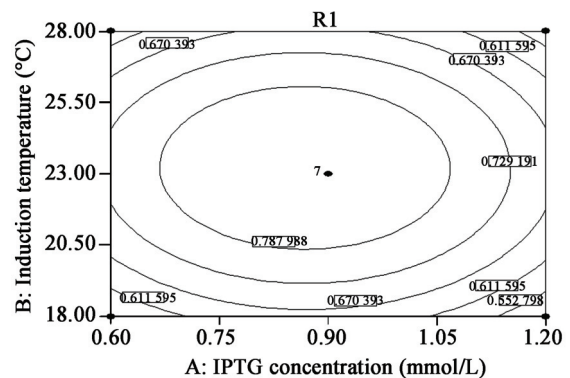


图 6 诱导剂 IPTG 浓度和诱导温度交互作用对 BL21-HTa-cgkZ 酶活力的影响

Figure 6 Effect of interaction between IPTG concentration and induction temperature on the yield of extracellular κ -carrageenase produced by BL21-HTa-cgkZ

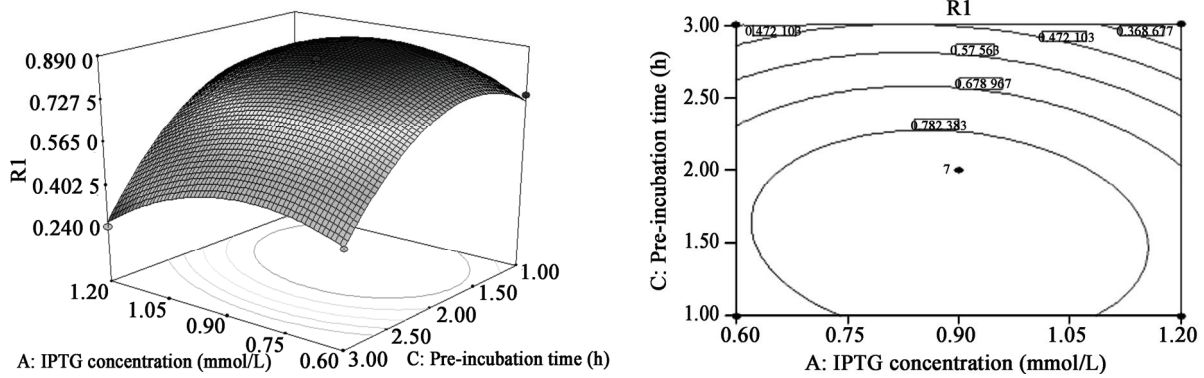


图 7 诱导剂 IPTG 浓度和诱导时机交互作用对 BL21-HTa-cgkZ 酶活力的影响

Figure 7 Effect of interaction between IPTG concentration and pre-incubation time on the yield of extracellular κ -carrageenase produced by BL21-HTa-cgkZ

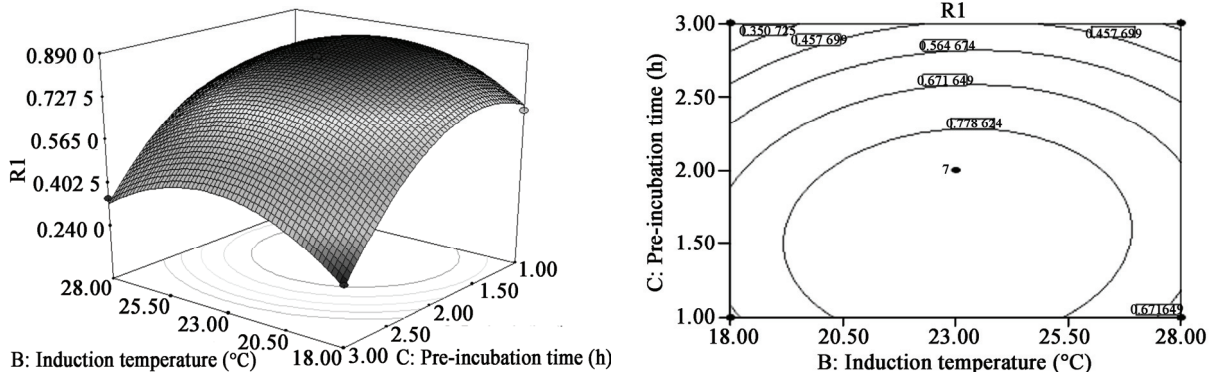


图 8 诱导温度和诱导时机交互作用对 BL21-HTa-cgkZ 酶活力的影响

Figure 8 Effect of interaction between induction temperature and pre-incubation time on the yield of extracellular κ -carrageenase produced by BL21-HTa-cgkZ

表 4 κ -卡拉胶酶的分布

Table 4 The distribution of κ -carrageenase

添加剂 Additive	胞外酶活力 Extracellular enzyme activity (U/mL)	周质空间酶活力 Periplasmic enzyme activity (U/mL)	胞质酶活力 Cytoplasmic enzyme activity (U/mL)	总酶活力 Total enzyme activity (U/mL)	胞外酶占总酶活力的百分比 The percentage of extracellular enzyme (%)
Control	7.89	1.82	2.30	12.01	65.7
Lactose	10.76	1.86	3.28	15.90	67.7
Triton X-100	9.75	0.60	1.89	12.25	79.6

用, 分析一方面是由于乳糖作为适宜的碳源, 为重组菌的生长和代谢提供了良好的物质基础, 利于产酶, 从而提高了胞外酶和胞质酶活力, 因而总酶活力也显著提升了; 另一方面, 乳糖也是该重组菌的一种诱导剂, 可能通过乳糖和 IPTG 的复合作用,

提高了重组菌产酶的能力^[16]。Triton X-100 提高了胞外酶活力, 却降低了周质空间酶活力, 且总酶活力与对照组相比并没有什么变化, 可能是由于 Triton X-100 通过改变细胞膜的通透性来促进周质空间酶向胞外释放^[17], 导致周质空间酶量下降, 从

而降低了周质空间酶活力。

3 结论

近年来研究发现卡拉胶寡糖具有抗病毒^[18]、抗肿瘤^[19]、抗氧化^[20]及免疫调节^[21]等药理活性,有望成为新一代的海洋功能性食品和海洋药物。但是目前尚未有相应的海洋保健品及药物出现,其主要原因就是在自然界分离得到的卡拉胶酶产生菌产酶量低,无法满足卡拉胶寡糖大量生产制备的需要。针对上述问题,本文致力于通过重组菌的发酵优化实现卡拉胶酶的异源高效表达,为卡拉胶酶的规模化生产及卡拉胶寡糖的大量制备提供条件。本文以重组菌 BL21-HTa-cgkZ 为研究对象,优化重组菌 BL21-HTa-cgkZ 产 κ -卡拉胶酶的发酵条件。通过发酵优化,使 79.6%的 κ -卡拉胶酶分泌表达达到细胞外培养基中,胞外酶活力最大可以达到 10.76 U/mL,是优化前的 7.9 倍,是野生菌 *Zobellia* sp. ZM-2 κ -卡拉胶酶产量的 32.6 倍,且远大于国内外许多报道的卡拉胶酶活力。今后,我们将致力于实现酶的工业化规模化生产及应用。

参考文献

- [1] Ji MH. Marine Algae Chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1997: 117-187 (in Chinese)
纪明候. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 117-187
- [2] Mclean MW, Williamson FB. κ -Carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*[J]. European Journal of Biochemistry, 1979, 93(3): 553-558
- [3] Liu GL, Li Y, Chi Z, et al. Purification and characterization of κ -carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of κ -carrageenan[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 265-271
- [4] Zablackis E, Vreeland V, Kloareg B. Isolation of protoplasts from *Kappaphycus alvarezii* var. tambalang (Rhodophyta) and secretion of carrageenan fragments by cultured cells[J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(9): 1515-1522
- [5] Han BQ, Liu WS, Wang H, et al. Study on the enzymes of algal cell wall hydrolysis[J]. Marine Science, 1997(3): 47-49 (in Chinese)
韩宝芹, 刘万顺, 王海, 等. 海藻解壁酶研究[J]. 海洋科学, 1997(3): 47-49
- [6] Guibet M, Boulenger P, Mazoyer J. Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid κ - ι -carrageenans using carrageenases[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(1): 408-415
- [7] Knutsen SH, Marit S, Trond K, et al. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase[J]. Carbohydrate Research, 2001, 331(1): 101-106
- [8] Yao ZA, Wu HG, Zhang SX, et al. Enzymatic preparation of κ -carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101(30): 359-367
- [9] Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B. The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to β -1,3-1,4-glucanases[J]. Gene, 1994, 139(1): 105-109
- [10] Dyrset N, Lystad KQ, Levine DW. Development of a fermentation process for production of a κ -carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20(6): 418-423
- [11] Khambhaty Y, Mody K, Jha B, et al. Statistical optimization of medium components for κ -carrageenase production by *Pseudomonas elongate*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(4): 813-822
- [12] Barbeyron T, Gerard A, Potin P, et al. The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis* structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolyses[J]. Molecular Biology and Evolution, 1998, 15(5): 528-537
- [13] Araki T, Higashimoto Y, Morishita T. Purification and characterization of kappa-carrageenase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. CA-1004[J]. Fisheries Sciences, 1999, 65(6): 937-942
- [14] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [15] Liu ZM, Tian L, Chen YL, et al. Efficient extracellular production of κ -carrageenase in *Escherichia coli*: Effects of wild-type signal sequence and process conditions on extracellular secretion[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 185(20): 8-14
- [16] Weng YP, Hsu FC, Yang WS, et al. Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3): 465-469
- [17] Tang JB, Yang HM, Song SL, et al. Effect of Glycine and Triton X-100 on secretion and expression of ZZ-EGFP fusion protein[J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 657-662
- [18] Wang W, Zhang P, Yu GL, et al. Preparation and anti-influenza A virus activity of κ -carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 880-888
- [19] Yuan HM, Song JM, Li XG, et al. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides[J]. Cancer Letters, 2006, 243(2): 228-234
- [20] Yuan HM, Song JM, Zhang WW, et al. Antioxidant activity and cytoprotective effect of κ -carrageenan oligosaccharides and their different derivatives[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16(5): 1329-1334
- [21] Xu L, Yao ZA, Wu HG, et al. The immune regulation of κ -carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells[J]. Neurochemistry International, 2012, 61(5): 689-696