# α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基合成红藻糖苷的研究

申 熙[1,4], 田 萌[1], 朱悦露[1], 李新月[1], 祁玲曦[1], 张 蕊[1,2,3,4], 周峻沛[1,2,3,4*]

(1. 云南师范大学 生命科学学院,云南 昆明 650500;
2. 云南师范大学 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室,云南 昆明 650500;
3. 云南师范大学 云南省高校高原特色食品酶重点实验室,云南 昆明 650500;4. 西南联合研究生院,云南 昆明 650092)

**摘 要** 红藻糖苷是一种具有抗氧化性、调节免疫系统、保护蛋白等生物活性的糖基醇,在食品和化妆品等领域具有广阔的应用前景。本实验室前期已成功实现了中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)来源的 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07的异源表达,该酶可通过转糖基作用合成红藻糖苷。为提高红藻糖苷的产量,以甘油作为反应受体,对硝基苯基 α-D-吡喃半乳糖苷(pNPG)作为反应供体,对 rAgaAJB07 合成红藻糖苷的条件进行优化。当甘油浓度为 500 mmol/L,pNPG 浓度 40 mmol/L,酶浓度 1.5 U/mL,反应时间 2 h,反应 pH 8.5,反应温度 30 ℃时,rAgaAJB07 合成红藻糖苷的产量达到最大,比优化前提高 66.2%,反应时间缩短 22 h,为红藻糖苷的酶法合成研究提供参考。

**关键词** 糖苷水解酶;α-半乳糖苷酶;转糖基合成;红藻糖苷;产率优化

**中图分类号** Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1005 - 7021(2026)02 - 0036 - 08

doi:10.3969/j.issn.1005 - 7021.2026.02.004

# Study on the Synthesis of Floridoside Through Trans-Glycosylation by α-Galactosidase rAgaAJB07

SHEN Xi[1,4], TIAN Meng[1], ZHU Yue-lu[1], LI Xin-yue[1], QI Ling-xi[1], ZHANG Rui[1,2,3,4], ZHOU Jun-pei[1,2,3,4*]

(1. *School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming* 650500;
2. *Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Yunnan Normal University, Kunming* 650500;
3. *Key Laboratory of Yunnan Provincial Education Department for Plateau Characteristic Food Enzymes, Yunnan Normal University, Kunming* 650500; 4. *Southwest United Graduate School, Kunming* 650092)

**Abstract** Floridoside, a glycosyl alcohol exhibiting diverse biological activities including antioxidant effects, immune regulation, and protein stabilization, demonstrates significant potential for applications in the food and cosmetic industries. In our previous study, we successfully achieved the heterologous expression of the recombinant α-galactosidase rAgaAJB07 from *Mesorhizobium*, which catalyzes floridoside biosynthesis via trans-glycosylation was obtained. In order to improve floridoside production, the reaction conditions were systematically optimized for the recombinant enzyme using glycerol as the acceptor substrate and p-nitrophenyl α-D-galactopyranoside (pNPG) as the donor substrate. The optimal parameters were determined as follows: 500 mmol/L glycerol, 40 mmol/L pNPG, 1.5 U/mL enzyme concentration, 2 h reaction duration, pH 8.5, and 30 ℃. Under these conditions, recombinant rAgaAJB07 achieved a maximum floridoside yield with a 66.2% enhancement compared to baseline parameters, while simultaneously reducing the reaction time by 22 hours. This optimization strategy provides a robust methodological framework for scalable enzymatic synthesis of floridoside.

基金项目:国家自然科学基金项目(31960459);云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2020-124)

作者简介:申熙 男,硕士研究生。研究方向为酶学。E-mail:2323120066@ynnu.edu.cn

* 通讯作者。男,教授,博士生导师。研究方向为酶学。E-mail:zhoujunpei_yn@126.com; junpeizhou@ynnu.edu.cn

收稿日期:2025-07-07

中国知网 https://www.cnki.net

**Keywords** glucoside hydrolase; α-galactosidase; trans-glycosylation synthesis; floridoside; yield optimization

红藻糖苷具有良好的抗冻保护作用,能有效延缓蛋白质的冷冻变性[1],同时还具有抑制癌细胞转移[2]、神经保护[3]、抗炎[4]、抗氧化[5]、调节免疫系统[6]、促成骨分化[7]等多种生物活性,在食品和化妆品等领域具有广阔的应用前景[7-8]。红藻糖苷由吡喃半乳糖基和丙三醇构成,在许多红藻和海洋藻类中被发现,是红藻的主要光合产物[9-10],在红藻中短期存在,多被分解代谢[11]。目前,红藻糖苷的获取途径呈多元化趋势,同时也存在一些不足,主要表现在以下几个方面:化学合成法依赖复杂的步骤和高毒性的试剂对环境不友好[12-14];红藻直接提取法不仅受限于成本高、提取时间长、提取产率低[15-16],而且原料中活性成分会随着季节性而变化[17-18];单细胞藻类合成法面临产物纯化困难与规模化生产瓶颈[19]。而酶法合成凭借其优异的区域选择性和立体选择性,以及步骤简单、反应条件温和、环境友好、产物较单一、产量相对较高等优势[20-21],逐渐成为最具应用前景的替代方案。酶促的糖基化反应是自然界中最重要的反应之一,生物体内通常由糖苷转移酶完成。但与糖苷转移酶相比,糖苷水解酶催化的转糖基反应,不需要其他辅助因子,底物价廉且获取容易,酶易于重组表达和性质多样等优势[22]。α-半乳糖苷酶(α-1,6-D-galactoside galactohydrolase; melibiase; EC 3.2.1.22)是催化水解不同底物末端非还原性半乳糖残基的外切糖苷酶。大多数α-半乳糖苷酶除具有水解活性外,还具有转糖基活性(图 1),可将水解的糖苷转移到多种不同羟基化合物上,如糖、糖醇和醇类等,受体广泛[23-27]。前期有研究证实了酶法合成红藻糖苷的可行性,但关键工艺参数未进行系统优化,导致产物在合成过程中被显著水解,红藻糖苷产率较低[28],严重制约其工业化应用进程。云南省生物质能与环境生物技术重点实验室(本实验室)在前期研究中已成功实现了中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)来源的 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 的异源表达。该酶具有转糖基活性,能够以对硝基苯基 α-D-吡喃半乳糖苷(pNPG)为供体,甘油(丙三醇)为受体合成红藻糖苷[29]。然而,糖苷水解酶因兼具水解活性,转糖基产物会被自身水解,导致转糖基产物的产量低。因此,利用糖苷水解酶的转糖基作用生产糖基化产物,需要优化酶促反应参数,促使反应平衡向转糖基活性方向移动,提高转糖基产物的产量[30]。本研究旨在通过系统优化转糖基反应条件,提高α-半乳糖苷酶rAgaAJB07 的转糖基水平,为红藻糖苷的酶法合成提供有效策略和依据。

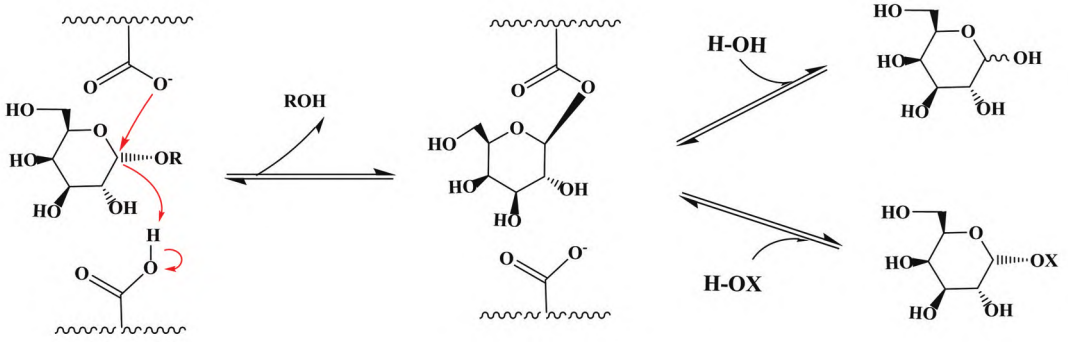



**图 1 α-半乳糖苷酶水解反应和转糖基反应流程图**

Fig. 1 Flowchart of α-galactosidase-catalyzed hydrolysis and trans-glycosylation reaction

X 和 R 表示任意基团

X and R denoted any substituent group

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 包含 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 基因的重组表达质粒 *p*EASY-agaAJB07 以及重组表达大肠埃希菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)均来源于本实验室[29]。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,用适量 $ddH_2O$ 溶解,定容至 1 000 mL。使用前,加入氨苄青霉素(Amp)

中国知网 https://www.cnki.net

至终浓度 100 μg/mL,摇匀备用。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 硅胶板(德国 Merck);冰醋酸、正丁醇(天津市大茂化学试剂厂);高锰酸钾(云南汕滇药业有限公司);对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷(上海源叶生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯。高速冷冻离心机(H2050R,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);高压蒸汽灭菌锅(DXL80A,山东德祥仪器有限公司);超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州安泰空气技术有限公司);纯水仪(Plus-E2-20HT,江苏南京易普易达科技发展有限公司);分析天平(FA2004,上海舜宇恒平科学仪器有限公司);电热板(DB-1A,常州国宇仪器制造有限公司);恒温水浴锅(BWS-10,上海一恒科学仪器有限公司);酶标仪(HBS-1096A,南京德铁生物科技有限公司);蛋白染色仪(eStain L1,金斯瑞生物科技有限公司);层析缸(P-1 型,上海垒固仪器有限公司);超声波细胞破碎仪(Scientz-IID,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

**1.2 方法**

1.2.1 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 的表达与纯化 取活化后的 rAgaAJB07 异源表达菌株接种于含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,37 ℃、180 r/min 条件下培养,待培养液 $OD_{600}$ 值约为 0.7 时,向培养体系中加入 70 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),随后将培养体系转入 20 ℃恒温摇床中,160 r/min 振荡培养 20 h,诱导蛋白表达。待诱导完成后,6 000 r/min 离心 8 min,收集菌体沉淀,将沉淀重悬于预冷的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中(pH 7.0),形成菌悬液。将该菌悬液置于冰浴条件下,使用超声波细胞破碎仪进行裂解处理。裂解液经高速离心(12 000 r/min,10 min,4 ℃,3 次)去除细胞碎片后,所得上清液即为含目的蛋白的粗酶液。粗酶液用 $Ni^{2+}$-NTA 亲和层析柱纯化,以 pNPG 为底物检测酶活力。重组酶的纯度分析通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)完成。

1.2.2 酶活单位测定 rAgaAJB07 可将 pNPG 水解为等量的黄色对硝基酚(pNP)和 α-半乳糖残基,通过测定反应体系当中 pNP 的含量即可测定 rAgaAJB07 的活性[31]。在预设温度条件下,将 450 μL 含有 2 mmol/L pNPG 的缓冲体系恒温处理 5 min。随后加入 50 μL 酶液,孵育 10 min 后,加入 2 mL 1 mol/L 碳酸钠溶液终止反应。终止反应后的混合液经自然冷却至环境温度后,定量移取 200 μL 至 96 孔微孔板中,采用酶标仪在特征吸收波长 405 nm 处测定 pNP 的特征吸光度(*OD* 值)。实验过程中以未加酶液的空白对照组作为参照体系,每组设置 3 个平行实验。酶活单位(U)的定义:一定条件下,每分钟转化底物释放 1 μmol pNPG 所需要的酶量。

1.2.3 转糖基活性测定及产物检测 在 450 μL 含有一定浓度的 pNPG 和甘油的底物缓冲液中,加入 50 μL 适当稀释的酶液,在预设的 pH 和温度下反应相应的时间,离心后于 -20 ℃下终止反应。在其他条件相同的情况下,以加入相同稀释倍数的灭活酶液作为对照。采用薄层层析(Thin layer chromatography, TLC)方法进行产物分析[29],混合 1 mL $ddH_2O$、1 mL 冰醋酸和 4 mL 正丁醇为展开剂,置于层析缸中备用;将硅胶板活化后点样 3 次,每次 0.5 μL;将点样后硅胶板放入层析缸中展层至溶剂前沿距板顶约 1 cm 处;吹干后重复展层一次。显色使用 0.5%(质量分数)高锰酸钾溶液浸没硅胶板 30 s,取出吹干显色。利用 ImageJ 软件进行红藻糖苷产量分析[32-33]。

1.2.4 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基合成红藻糖苷的反应条件优化 采用单因素顺序优化方式检测各反应条件对转糖基合成红藻糖苷产率的影响。首先以 40 mmol/L pNPG 为供体,在 pH 6.5、37 ℃条件下,通过改变受体(甘油)浓度(100、200、300、400、500、600 mmol/L)并固定酶浓度为 0.2 U/mL,反应 24 h 后于 -20 ℃终止,筛选出最优受体浓度;基于此受体浓度,进一步优化供体 pNPG 浓度(20、40、60、80、100、120 mmol/L)。在最优的供体-受体浓度下,探究酶浓度(0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U/mL)对转糖基合成红藻糖苷产率的影响。在最佳供体-受体-酶浓度组合下,依次评估反应时间(2、4、6、8、10、12、24 h)、反应 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)及反应温度(20、30、40、50 ℃)对转糖基效率的影响。所有实验均以等体积灭活酶液为对照,-20 ℃冷冻终止反应,通过薄层层析(TLC)结合 ImageJ 软件分析产物产量差异。

1.2.5 优化前后产物产量对比 分别在优化前(甘油浓度 400 mmol/L,pNPG 浓度 40 mmol/L,酶

中国知网 https://www.cnki.net

浓度 0.2 U/mL,反应时间 24 h,反应 pH 6.5,反应温度 37 ℃)和优化后(甘油浓度 500 mmol/L,pNPG 浓度 40 mmol/L,酶浓度 1.5 U/mL,反应时间 2 h,反应 pH 8.5,反应温度 30 ℃)反应体系中进行转糖基反应,均通过 -20 ℃冷冻终止反应,并设置等体积灭活酶液、无甘油以及无 pNPG 三组对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 的表达与纯化

含 pEASY-agaAJB07 的阳性重组子经诱导表达、超声破碎和 $Ni^{2+}$-NTA 亲和层析,产物为电泳纯单一条带,分子量与 rAgaAJB07 的理论值 80.9 kDa 相符合(图 2)。经酶活力检测显示,纯化酶 rAgaAJB07 具有 α-半乳糖苷酶活性,pNPG 的水解活性为 2.5 U/mL。

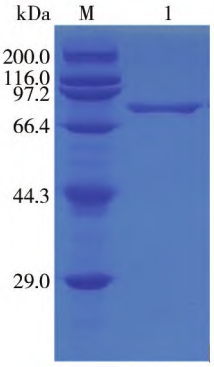



**图 2 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 的 SDS-PAGE 分析**

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of α-galactosidase rAgaAJB07

M:蛋白标准样品(分子量范围:29.0 ~ 200.0 kDa);1:纯化的 rAgaAJB07

M:protein Marker(range:29.0-200.0 kDa); 1: purified rAgaAJB07

### 2.2 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基合成红藻糖苷的条件优化

2.2.1 受体(甘油)浓度的优化 甘油浓度的增加总体上促进了红藻糖苷的积累,当甘油浓度为 500 mmol/L 时,红藻糖苷的相对质量达到最高,表明该浓度为转糖基合成红藻糖苷的最佳甘油浓度(图 3)。

2.2.2 供体(pNPG)浓度的优化 红藻糖苷的相对质量随 pNPG 浓度的变化呈现先上升后下降的趋势。当 pNPG 的浓度由 20 mmol/L 增至 40 mmol/L 时,红藻糖苷相对质量由 89.6% 增加至最大,但当 pNPG 浓度进一步升高(40 ~ 100 mmol/L)时,红藻糖苷相对质量逐步下降。100 ~ 120 mmol/L 时,出现小幅波动,但整体仍呈现下降趋势(图 4)。结果表明,40 mmol/L 的 pNPG 为最优的供体浓度,大于该浓度则显著抑制转糖基合成红藻糖苷的相对质量。

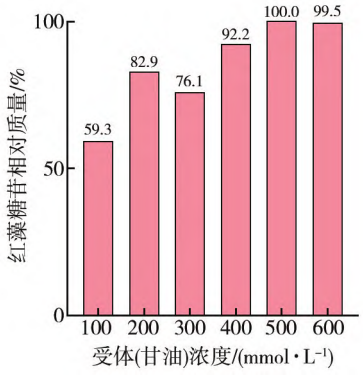



**图 3 受体(甘油)浓度对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 3 Effect of receptor concentration on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

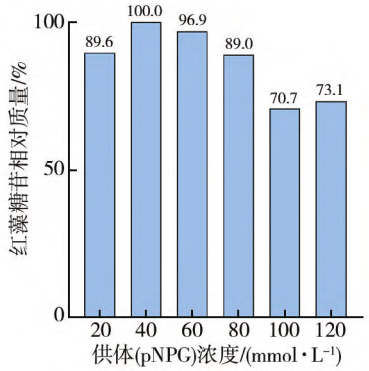



**图 4 供体(pNPG)浓度对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 4 Effect of donor concentration on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

2.2.3 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 浓度的优化 红藻糖苷的相对质量随 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 酶浓度的变化呈现先上升后下降的趋势。当酶浓度由 0.1 U/mL 增加到 1.5 U/mL 时,红藻糖苷的相对质量逐渐提高,并在 1.5 U/mL 时达到最大值。当酶浓度超过 1.5 U/mL 时,红藻糖苷的相对质量开始下降(图 5)。这一结果表明,酶浓度对红藻糖苷的生成具有显著影响。在较低的酶浓度下(0.1 U/mL),红藻糖苷的相对质量仅为

中国知网 https://www.cnki.net

32.2%,这可能是由于酶的催化活性不足,导致反应效率较低。随着酶浓度的增加,反应体系中酶的数量增多,从而提高了红藻糖苷的生成效率。然而,当酶浓度过高时(超过 1.5 U/mL),红藻糖苷的相对质量反而下降,这可能是由于过量的酶导致反应体系中的产物被水解。综上所述,确定 1.5 U/mL为红藻糖苷生成的最佳酶浓度。

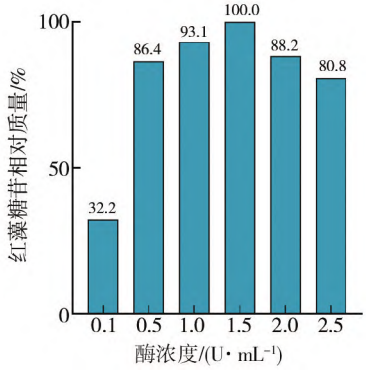



**图 5 酶浓度对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 5 Effect of enzyme concentration on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

2.2.4 *反应时间的优化* 红藻糖苷的相对质量随反应时间的延长呈现逐渐下降的趋势。当反应时间为 2 h,红藻糖苷的相对质量达到最大值。随着反应时间的增加,红藻糖苷相对质量逐渐下降,这可能与反应过程中底物逐渐减少而产物被进一步水解有关(图 6)。因此,2 h 是转糖基合成红藻糖苷的最优反应时间。

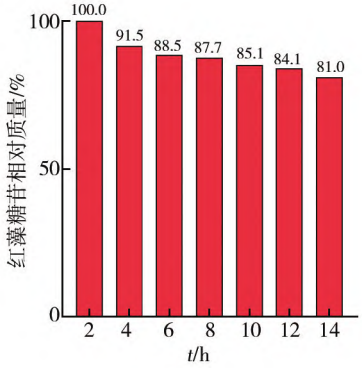



**图 6 反应时间对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 6 Effect of reaction time on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

2.2.5 *反应 pH 的优化* 红藻糖苷的相对质量随 pH 值的变化呈现先上升后下降的趋势。当 pH 值由 6.0 增加到 8.5 时,红藻糖苷的相对质量逐渐提高,并在 pH 8.5 时达到最大值。当 pH 值进一步增加至 9.0 时,相对质量开始下降(图 7)。结果表明,pH 值对红藻糖苷的生成具有显著影响,pH 8.5 是转糖基合成红藻糖苷的最佳反应 pH。

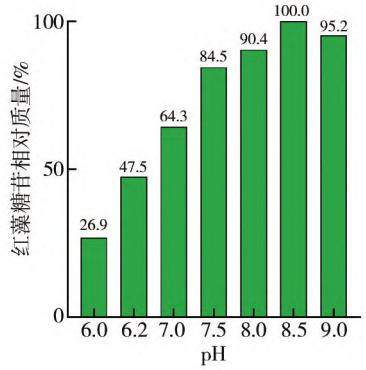



**图 7 反应 pH 对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 7 Effect of pH on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

2.2.6 *反应温度的优化* 红藻糖苷的相对质量随温度的变化呈现先上升后下降的趋势。当温度由 20 ℃上升至 30 ℃时,红藻糖苷的相对质量显著提升,并在 30 ℃达到最大值。当反应温度进一步升高至 40 ℃和 50 ℃时,红藻糖苷的相对质量急剧下降(图 8)。结果表明,反应温度显著影响 rAgaAJB07转糖基合成红藻糖苷的产量,30 ℃是 rAgaAJB07转糖基合成红藻糖苷的最优反应温度。

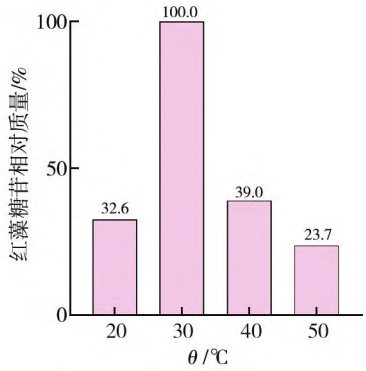



**图 8 反应温度对 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 转糖基活性的影响**

Fig. 8 Effect of reaction temperature on the trans-glycosylation activity of α-galactosidase rAgaAJB07

## 2.3 优化前后产物产量对比分析

优化条件下,rAgaAJB07 合成红藻糖苷的产

中国知网 https://www.cnki.net

物特征斑点较优化前显色强度明显增强、面积显著增加,产量提高了 66.2%,远高于条件优化前的产量(图 9),表明优化后的反应条件可以有效抑制水解反应,使酶更偏向于转糖基作用,进而显著提升红藻糖苷的产率。

当受体甘油浓度为 500 mmol/L,供体 pNPG 浓度 40 mmol/L,酶浓度 1.5 U/mL,反应时间 2 h,反应 pH 8.5,反应温度 30 ℃时,α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 合成红藻糖苷的产量达到最大,比优化前的产量提高了 66.2%,反应时间缩短 22 h。

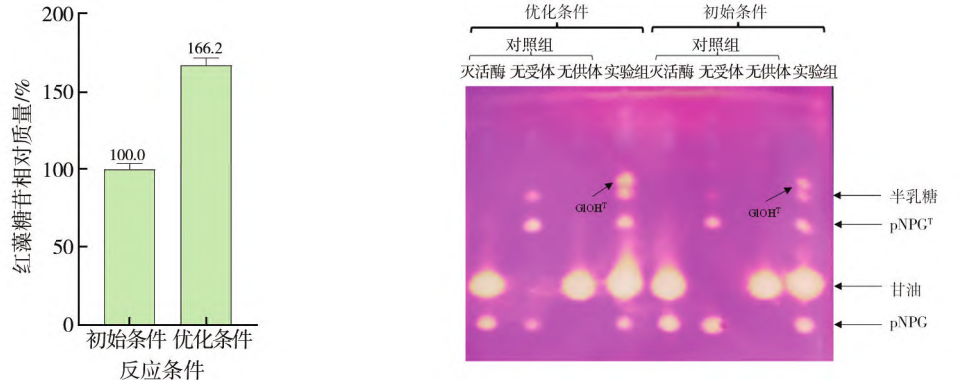



**图 9 优化前后条件下的转糖基产物产量对比分析**

Fig. 9 Comparison of trans-glycosylation product yields under pre-optimized and optimized conditions

GlOH 代表甘油;$X^T$ 代表 X 的转糖基产物

GlOH represents glycerol; $X^T$ represents the trans-glycosylation product from X

## 3 讨 论

本研究使用的 α-半乳糖苷酶 rAgaAJB07 属于糖苷水解酶第 36 家族(GH36),由 722 个氨基酸残基组成,遵循经典保留催化机制(Classical koshland retaining mechanism),该催化机制中,催化反应通常涉及两个酸性氨基酸:一个作为亲核催化氨基酸,另一个作为广义酸/碱催化氨基酸,反应第一步通过去质子化的亲核催化氨基酸侧链攻击底物,另一被质子化的催化氨基酸作为广义的酸为离去基团提供质子,促进糖苷键断裂,亲核催化氨基酸与半乳糖苷形成共价连接的糖基酶中间体[34];反应第二步中去质子化的催化氨基酸侧链作为广义的碱,活化受体分子(当受体分子是水时就发生水解反应,而当受体分子为甘油等就发生转糖基反应),去质子化的受体分子攻击糖基酶复合体,促使其解离,还原亲核催化氨基酸残基,形成水解或转糖基产物[35-36]。从催化机制来看,α-半乳糖苷酶发挥水解活性还是转糖基活性主要取决于催化过程的第二步反应。

rAgaAJB07 转糖基活性受到供体和受体浓度的影响。在受体浓度方面,rAgaAJB07 转糖基活性会随着受体浓度的增加而增大,相似地,草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)来源的 α-半乳糖苷酶能将半乳糖基转至高浓度糖或醇产生转糖基产物[24]。一方面,高浓度受体可以增加活化的机率,提高转糖基活性[37];另一方面,高浓度受体会降低水活度($a_w$),降低水解反应活性[38]。由此可见,高浓度受体有利于提高转糖基产物的产量。在供体浓度方面,超过 40 mmol/L 的 pNPG 会引起红藻糖苷的产量下降,这可能是发生了底物抑制现象[28]。

酶稳定性与催化活性的平衡是长周期反应的关键限制因素。一些 GH36 家族的酶存在最适反应温度与热稳定性不匹配的现象,例如嗜热拟青霉(*Paecilomyces thermophila*)来源的 α-半乳糖苷酶 PtGal36A[23]。本研究发现 rAgaAJB07 也表现出类似的独特催化特性:在低于其最适温度(45 ℃)和高于其最适 pH(6.5)的条件下[29],酶仍能保持稳定并高效催化转糖基反应。推测较低的温度可抑制水解活性,较高的 pH 可能通过改变酶活性中心的静电势,强化其与受体分子甘油的结合[39]。进一步优化酶浓度至 1.5 U/mL 显著提高了底物转化的通量,将反应时间从 24 h 缩短至 2

中国知网 https://www.cnki.net

h 则有效规避了产物水解以及污染的风险[28-29]。

目前红藻糖苷的制备方法主要包括化学合成法、红藻直接提取法、单细胞藻类合成法及酶法合成,前三种方法普遍存在对环境不友好、提取效率低或者纯化成本高等问题,酶法合成以其良好的区域选择性与立体选择性、温和的反应条件和环境友好性等优势逐渐受到关注。目前红藻糖苷的酶法合成研究仍较为有限。迄今仅 Wang 等[28]报道了利用嗜环芽孢杆菌(*Alicyclobacillus hesperidum*)来源的 α-半乳糖苷酶于在 37 ℃、pH 5.0 条件下,催化甘油和半乳糖转糖基反应合成红藻糖苷。但其未对转糖基合成的反应条件进行系统优化以抑制水解反应发生,导致产物在合成过程中被显著水解,最终半乳糖转化率仅为 23%,转糖基效率严重受限。在此基础上,本研究通过系统优化转糖基反应条件显著提升了红藻糖苷的合成效率。所得的最优反应条件下,红藻糖苷的产率较初始条件下提升了 66.2%。与化学合成法相比,酶催化途径避免了有毒试剂的使用,反应流程更为简易[12-14];相较于红藻直接提取法,该工艺解决了原料季节性限制与低得率(低于 5%)问题[15-18];针对单细胞藻类合成法的纯化难题,酶法合成产物的分离难度显著降低[19]。

尽管本研究在提高转化效率方面取得了一定进展,但仍存在一些不足。rAgaAJB07 在热稳定性方面仍需进一步提升,酶在连续反应条件下的活性保持能力也有待验证。此外,本研究所用酶尚未实现固定化,这在一定程度上限制了其在实际工业过程中的推广应用。综上,本研究不仅优化了酶法转糖基合成红藻糖苷的反应体系,还验证了转糖基方法在合成方面的可行性与优势,为红藻糖苷的合成研究提供了有效策略和依据。

## 参考文献:


[1] 高玉丽, 李九零, 严小军, 等. 红藻糖苷的提取及其对草鱼鱼糜抗冻性能的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(2): 311-318.

[2] 杨胜涛, 陈佳丽, 刘怡, 等. 异红藻糖苷对 HT1080 肿瘤细胞侵袭转移作用的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(6): 116-122.

[3] Barbosa M, Valentao P, Andrade PB. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: Implications for neurodegenerative diseases[J]. Marine Drugs, 2014, 12(9): 4934-4972.

[4] Xu MN, Zhang YT, Wu B, et al. A critical review of the edible seaweed *Palmaria palmata* (L.) weber & mohr and its bioactive compounds in the "omics" era[J]. Algal Research, 2024, 82: 103606.

[5] Niu TT, Fu GQ, Zhou JW, et al. Floridoside exhibits antioxidant properties by activating HO-1 expression via p38/ERK MAPK pathway[J]. Marine Drugs, 2020, 18(2): 105.

[6] Courtois A, Simon-Colin C, Boisset C, et al. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway[J]. Marine Drugs, 2008, 6(3): 407-417.

[7] Kim M, Li YX, Dewapriya P, et al. Floridoside suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia[J]. BMB Reports, 2013, 46(8): 398-403.

[8] Maneffa AJ, Whitwood AC, Whitehouse AS, et al. Unforeseen crystal forms of the natural osmolyte floridoside[J]. Communications Chemistry, 2020, 3(1): 128.

[9] Suhr R, Oliver S, Thiem J. Synthesis of glycosyl glycerols and related glycolipids[J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 1998, 17(6): 937-968.

[10] Ishihara K, Oyamada C, Sato Y, et al. Relationships between quality parameters and content of glycerol galactoside and porphyra-334 in dried laver nori *Porphyra yezoensis*[J]. Fisheries Science, 2008, 74(1): 167-173.

[11] 崔晓山, 陈娟娟, 杨锐, 等. 红藻中红藻糖苷的研究进展[J]. 海洋科学, 2018, 42(4): 162-169.

[12] Wang JL, Cao XF, Chen WH, et al. Identification and characterization of a thermostable GH36 α-galactosidase from *Anoxybacillus vitaminiphilus* WMF1 and its application in synthesizing isofloridoside by reverse hydrolysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10778.

[13] Weïwer M, Trevor S, Linhardt RJ. Synthesis of floridoside[J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2008, 27(7): 420-427.

[14] 徐洋,张博,谌苗苗,等.高温胁迫下柞蚕抗氧化酶活性分析[J]. 沈阳农业大学学报,2025,56(2):76-82.

[15] 黄晓航, 张燕霞, 范晓. 海藻糖类的气相色谱分析 Ⅲ. 红藻糖苷的提取与测定[J]. 海洋科学, 1990(1): 14-18.

[16] Bondu S, Kervarec N, Deslandes E, et al. Separation of floridoside and isofloridosides by HPLC and complete $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR spectral assignments for D-isofloridoside[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(16): 2470-2473.

[17] Kerjean V, Morel B, Stiger V, et al. Optimization of floridoside production in the red alga *Mastocarpus stellatus*: Pre-conditioning, extraction and seasonal variations[J]. Botanica Marina, 2007, 50: 59-64.

[18] Gambichler V, Zuccarello GC, Karsten U. Seasonal changes in stress metabolites of native and introduced red algae in New Zealand[J]. Journal of Applied Phycology, 2021, 33(2): 1157-1170.


中国知网 https://www.cnki.net

[19] Martinez-Garcia M, Van Der Maarel MJEC. Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 71.

[20] Lu LL, Guo LC, Wang K, et al. β-galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107465.

[21] 王佳堃,李奎,李慧贤,等. 基于瘤胃微生物资源创制新型饲用酶制剂[J]. 饲料工业,2025,46(12):1-8.

[22] Manas NHA, Illias RM, Mahadi NM. Strategy in manipulating transglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 272-293.

[23] Liu Y, Yan QJ, Guan LY, et al. Biochemical characterization of a novel protease-resistant α-galactosidase from *Paecilomyces thermophila* suitable for raffinose family oligosaccharides degradation[J]. Process Biochemistry, 2020, 94: 370-379.

[24] Kurakake M, Moriyama Y, Sunouchi R, et al. Enzymatic properties and transglycosylation of α-galactosidase from *Penicillium oxalicum* SO[J]. Food Chemistry, 2011, 126(1): 177-182.

[25] Rosengren A, Butler SJ, Arcos-Hernandez M, et al. Enzymatic synthesis and polymerisation of β-mannosyl acrylates produced from renewable hemicellulosic glycans[J]. Green Chemistry, 2019, 21(8): 2104-2118.

[26] Li N, Han XW, Xu SJ, et al. Glycoside hydrolase family 39 β-xylosidase of *Sphingomonas* showing salt/ethanol/trypsin tolerance, low-pH/low-temperature activity, and transxylosylation activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(36): 9465-9472.

[27] Anisha GS. Molecular advances in microbial α-galactosidases: Challenges and prospects[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(9): 148.

[28] Wang L, Song LY, He XX, et al. Production of isofloridoside from galactose and glycerol using α-galactosidase from *Alicyclobacillus hesperidum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 134: 109480.

[29] Zhou JP, Lu Q, Zhang R, et al. Characterization of two glycoside hydrolase family 36 α-galactosidases: Novel transglycosylation activity, lead-zinc tolerance, alkaline and multiple pH optima, and low-temperature activity[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 156-166.

[30] Zeuner B, Jers C, Mikkelsen JD, et al. Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9615-9631.

[31] Chen K, Zhang JY, Liu X, et al. High molecular weight α-galactosidase from the novel strain *Aspergillus* sp. D-23 and its hydrolysis performance[J]. Processes, 2023, 11(1): 255.

[32] Zhang R, Li XY, Cen XL, et al. Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm kernel cake, and investigations into its prebiotic activity[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, 49: 64-71.

[33] 韩明明, 褚宇欣, 关波, 等. 驼乳中产转糖基活性 β-半乳糖苷酶乳酸菌的筛选鉴定及其酶学特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 74-83.

[34] Chuankhayan P, Lee RH, Guan HH, et al. Structural insight into the hydrolase and synthase activities of an alkaline α-galactosidase from *Arabidopsis* from complexes with substrate/product [J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2023, 79: 154-167.

[35] Akintola O, Ren WW, Adabala PJP, et al. Intrinsic nucleophilicity of inverting and retaining glycoside hydrolases revealed using carbasugar glyco-tools[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(15): 9377-9389.

[36] Jian X, Li C, Feng XD. Strategies for modulating transglycosylation activity, substrate specificity, and product polymerization degree of engineered transglycosylases[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(8): 1284-1298.

[37] 李娜, 张蕊, 黄遵锡, 等. β-木糖苷酶的生物活性物质转化功能研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2290-2299.

[38] Alavijeh MK, Meyer AS, Gras SL, et al. Synthesis of N-acetyllactosamine and N-acetyllactosamine-based bioactives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(27): 7501-7525.

[39] Lundemo P, Karlsson EN, Adlercreutz P. Eliminating hydrolytic activity without affecting the transglycosylation of a GH1 β-glucosidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(3): 1121-1131.

中国知网 https://www.cnki.net