

Dégradation enzymatique en phase hétérogène des polysaccharides : exemple des agarases et des carraghénases

par Maud Lemoine & William Helbert

Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Unité Mixte de Recherche 7139 « Végétaux Marins et Biomolécules », Station Biologique, F-29682 Roscoff Cedex, France.
Correspondance : lemoine@sb-roscoff.fr, helbert@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

Les agars et les carraghénanes sont des galactanes sulfatés qui s'assemblent dans la paroi des algues rouges sous la forme d'un réseau dense de fibres semi-cristallines. Ces polysaccharides sont dégradés en phase hétérogène par des enzymes bactériennes : les agarases et les carraghénases. Les études cristallographiques et enzymologiques des systèmes galactanes sulfatés/galactanases ont permis de mettre en lumière que ces enzymes possèdent des propriétés adaptées à la dégradation de substrats solides polyanioniques.

En effet, à l'instar des cellulases et amylases, elles sont capables de dépolymériser leur substrat respectif selon un mode d'action processif. Cependant, les galactanases se distinguent au niveau moléculaire par la nature des interactions avec le substrat. Elles sont de type ionique, ce qui ne permet pas de transposer directement les modèles de processivité développés dans les cas de la dégradation des polysaccharides neutres.

SUMMARY Polysaccharides enzymatic degradation in heterogeneous phase: example of agarases and carrageenases

Agars and carrageenans are sulphated galactans which assemble in the red algal cell wall as a dense network of semi-crystalline fibers. These polysaccharides are degraded in heterogeneous phase by bacterial enzymes, namely agarases and carrageenases. Crystallographic as well as enzymologic investigations of the sulphated galactans/galactanases systems highlight that the properties of these catalysts are well adapted to the degradation of solid polyanionic

substrates. Indeed, as for cellulases or amylases, they are able to depolymerize their respective substrates according to a processive mode of action. However, at the molecular level, they are distinguished by the ionic nature of the interactions involved which do not allow the direct transposition of the processivity models developed for the degradation of neutral polysaccharides.

INTRODUCTION

Les polysaccharides sont les molécules biologiques les plus abondantes sur terre et dans les océans. Ces macromolécules sont constituées de l'enchaînement de monosaccharides dont la variété stéréochimique et les possibilités d'enchaînement entre résidus sont telles que le nombre potentiel de structures chimiques de polysaccharides est immense. Par exemple, il a été estimé qu'il y a plus de 10^{12} combinaisons possibles pour former un hexasaccharide réducteur (Laine, 1994). A la diversité chimique des polysaccharides *in vivo*, il faut ajouter la diversité des conformations secondaires de ces macromolécules qui conduisent à des assemblages à l'état solide sous la forme de fibres, de granules ou encore de

gels physiques. Les organismes vivants ont mis à profit cette très grande panoplie de structures d'oligo- et de polysaccharides pour remplir un nombre étendu de fonctions biologiques comme par exemple les fonctions de stockage d'énergie (ex. granule d'amidon), de structure (ex. fibre de cellulose, gels d'alginate) et de signalisation cellulaire (ex. glycoaminoglycans). Les propriétés mécaniques, nutritives, physico-chimiques (*i.e.* texturant, émulsifiant ou stabilisant) et biologiques sont également très largement exploitées sous leur forme naturelle ou après modification, dans les industries papetière, textile, agroalimentaire, cosmétique et parapharmaceutique.

La biosynthèse des polysaccharides ainsi que leur biodégradation impliquent la mise en place d'un nombre très important d'enzymes différentes capables de cataly-

ser la synthèse ou l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Si on considère simplement la coupure des liaisons glycosidiques par un mécanisme d'hydrolyse, près de 160 numéros E.C. (IUB-MB enzyme nomenclature, www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) différents, qui correspondent à autant de substrats, sont nécessaires pour répertorier les activités glycosidases hydrolases (GH) connues à ce jour. La classification de ces glycosidases hydrolases par homologie de séquences peptidiques a conduit à la création de 110 familles d'enzymes (classification CAZY) (Henrissat, 1991). Bien que chaque année, on découvre de nouvelles familles de glycosidases hydrolases, les mécanismes hydrolytiques varient peu, ils impliquent généralement deux acides aminés : un donneur de proton et un nucléophile/base. La coupure s'effectue par rétention ou par inversion de la configuration anomérique.

Les enzymes ont développé des adaptations fonctionnelles au niveau moléculaire au cours de l'évolution. Elles ont ainsi acquis la capacité de reconnaître la diversité chimique des polysaccharides et de catalyser la dépolymérisation de structures insolubles organisées de façon quasi cristalline. En effet, la dégradation d'un substrat solide non diffusible, rigide, offrant peu de sites de coupures accessibles à l'enzyme, induit des contraintes que les organismes impliqués dans la mobilisation de la biomasse ont dû surmonter. L'étude des modalités de dégradation en phase hétérogène des polysaccharides par les glycosidases hydrolases a été abordée essentiellement au travers des études de la dégradation de la cellulose et de l'amidon. Ces études ont mis en lumière notamment que les étapes de diffusion de l'enzyme, de son adsorption sur le substrat, que le mode de dépolymérisation et la capacité à libérer les produits de dégradation sont autant

de paramètres clés pour convertir un substrat récalcitrant en produits métabolisables.

Parmi les glycosidases hydrolases les plus efficaces en phase hétérogène, de nombreuses enzymes possèdent un mode d'action non-aléatoire, et plus précisément, un mode d'action processif (Fig. 1), également appelé mécanisme multi-attaques dans le cas des α -amylases. Selon ce mode d'action, les enzymes se fixent au substrat de façon aléatoire le long de la chaîne et forment un complexe qui est maintenu après catalyse de l'hydrolyse de la liaison glycosidique et libère un premier produit de dégradation. L'enzyme, alors fixée à une extrémité du polysaccharide, glisse le long de la chaîne jusqu'à retrouver une configuration du substrat favorable pour procéder à une nouvelle hydrolyse permettant la libération de produits de faibles poids moléculaires. La processivité est définie comme le nombre de coupures qu'effectue une enzyme avant de se dissocier. Dans le cas de la cellulose, et probablement des autres polysaccharides neutres, la formation du complexe enzyme-substrat ainsi que le déplacement de l'enzyme le long de la chaîne du polysaccharide s'effectuent par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes entre les résidus glucose et des acides aminés hydrophobes (*e.g.* tryptophane).

Les concepts actuels concernant la dégradation en phase hétérogène ont été très largement développés sur la base d'études des systèmes celluloses/cellulases et amidons/amylases. Les modèles de dégradation impliquent des interactions de type hydrophobe entre des polysaccharides neutres et leurs hydrolases respectives. Les polysaccharides d'origine marine, et plus particulièrement ceux présents dans la paroi des macro-algues marines, sont des polyanions (alginate, fucanes, carrag-

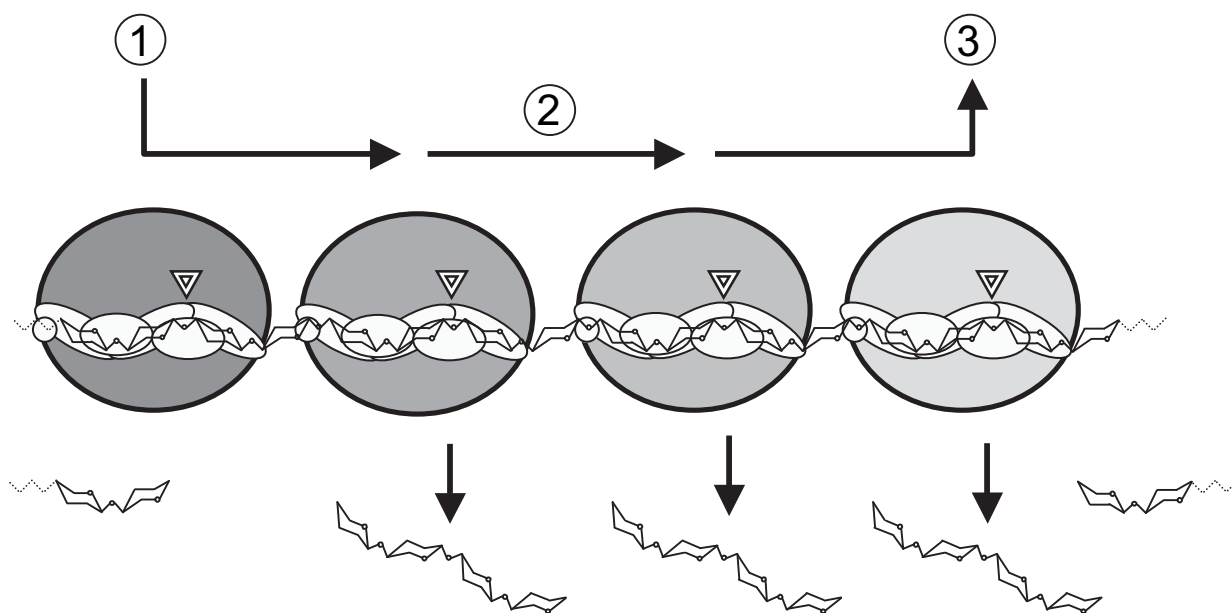


FIG. 1. – Après la formation du complexe enzyme/substrat (1), une enzyme processive va catalyser successivement l'hydrolyse de plusieurs liaisons glycosidiques en glissant le long de la chaîne de polysaccharide (2). La dissociation du complexe enzyme/substrat (3) s'effectuera après un nombre d'événements catalytiques qui dépendra du caractère processif de l'enzyme.

hénanes). Ceci suggère que les modalités de reconnaissance et d'interaction entre les hydrolases et leur substrat chargé négativement doivent s'écarter *a priori* des systèmes de polysaccharides neutres. Les galactanes sulfatés (agars et carraghénanes) sont des molécules possédant la même architecture de galactanes mais qui se distinguent par leur taux de sulfatation. Désormais, plusieurs agarases et carraghénases spécifiques d'une gamme de galactanes sulfatés ont été purifiées et clonées. Leur structure cristallographique et leurs modes d'action en phase hétérogène ont été analysés. Ces résultats montrent que les contraintes de la phase hétérogène sont les mêmes que pour les substrats neutres, et qu'elles ont conduit également à la mise en place du mode d'action processif. Cependant, au niveau moléculaire, la mise en oeuvre de la processivité ferait intervenir des mécanismes rencontrés uniquement chez les galactanases.

LES POLYSACCHARIDES DE LA PAROI DES ALGUES ROUGES

La paroi des algues permet les échanges avec le milieu et les échanges intercellulaires. C'est la paroi qui donne aux cellules leur forme et qui les protège des agressions extérieures. L'organisation générale de la paroi des algues rouges est similaire à celles des autres algues (brunes et vertes) et de façon plus générale à celles des autres végétaux. On distingue une phase squelettique qui est généralement composée d'un réseau tridimensionnel de microfibrilles de cellulose qui représente 1 à 8 % du poids sec de l'algue. La phase matricielle consiste en un assemblage dense de galactanes sulfatés. En fonction de l'origine botanique des algues, on y rencontrera soit des agars soit des carraghénanes (Craigie, 1990).

Les agars et les carraghénanes sont constitués d'un enchaînement de résidus galactose liés alternativement par des liaisons glycosidiques $\alpha(1 \rightarrow 3)$ et $\beta(1 \rightarrow 4)$. Dans le cas de l'agarose, l'unité galactose liée en α se trouve dans une configuration L alors qu'elle se présente en configuration D chez les carraghénanes (Rees, 1969). L'agarose représente le squelette non modifié de l'agar qui est substitué par 20 % de groupements méthyles et d'esters de sulfate répartis le long de la chaîne de polysaccharides. Les carraghénanes sont classés en fonction du nombre et de la position de ces esters de sulfate (S) et en fonction de la présence d'un pont 3,6-anhydro sur le résidu lié en α (unité DA). Ce pont 3,6-anhydro existe sur les carraghénanes qui gélifient (Rees, 1969; Knutsen *et al.*, 1994). Les trois carraghénanes les plus exploités par l'industrie, le κ - (kappa-, DA-G4S), le ι - (iota-, DA2S-G4S), et le λ - (lambda-, DA2S6S-G2S) carraghénane, se distinguent respectivement par la présence de un, deux ou trois esters de sulfate par unité disaccharidique de répétition (Fig. 2).

La structure chimique des agars et des carraghénanes est très hétérogène. Elle est liée à la source d'algues, au stade de vie (gamétophyte ou tétrasporophyte) et au procédé d'extraction des polysaccharides (Craigie, 1990). La complexité de structure des carraghénanes est liée à la présence de mélanges d'extraits d'algues ainsi qu'à la

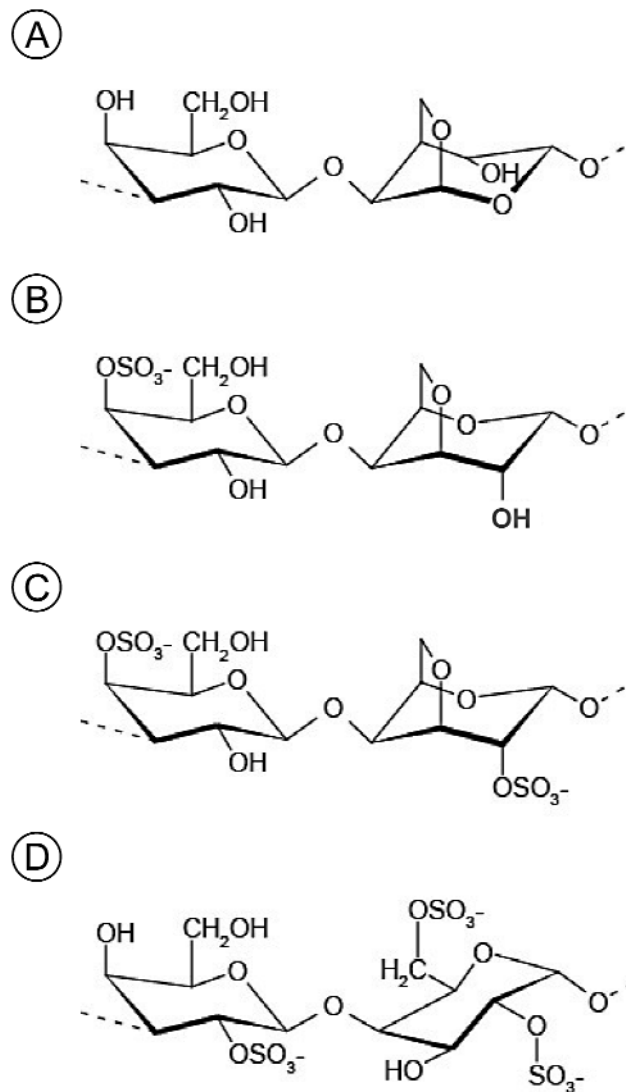


FIG. 2. – Structure chimique des unités de répétition de l'agarose (A), du κ -carraghénane (B), du ι -carraghénane (C) et du λ -carraghénane (D).

combinaison de différents motifs carrabioses idéaux le long des chaînes, formant des carraghénanes hybrides (Greer & Yaphe, 1984; Knutsen *et al.*, 1994; Bixler, 1996; van de Velde *et al.*, 2001). Ainsi par exemple, les dénominations κ - ou ι -carraghénanes indiquent que les galactanes correspondant sont composés essentiellement (et non uniquement) de motifs κ - ou ι -carrabioses.

L'agarose et les carraghénanes forment des gels thermoréversibles dans l'eau, leur rigidité décroît avec le taux de sulfatation du polysaccharide. L'agarose s'auto-assemble pour former des gels rigides et cassants alors que le ι -carraghénane s'agrège sous la forme de gels souples et élastiques. Le λ -carraghénane qui possède trois groupements sulfate par unité disaccharidique ne gélifie pas et donne des solutions visqueuses. Les sels et la force ionique du milieu modulent également les propriétés de gélification

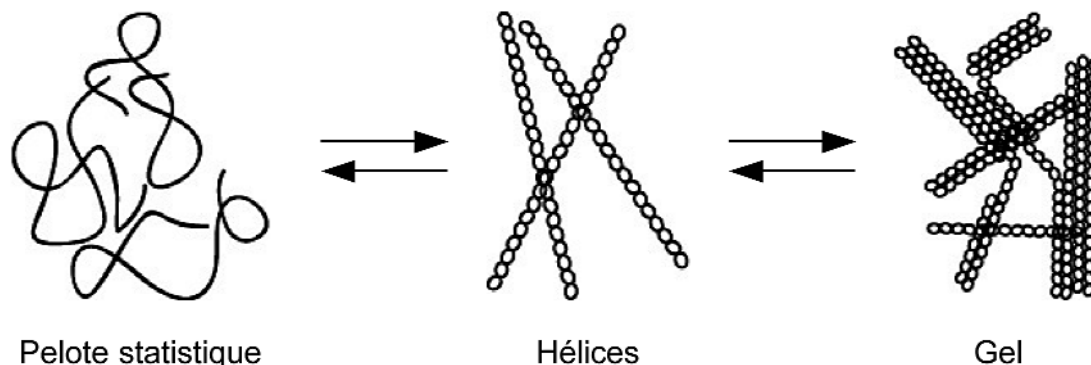


FIG. 3. – En fonction des conditions de température, de force ionique et de la nature des sels du milieu, les carraghénanes peuvent adopter plusieurs états conformationnels : pelote statistique, hélice et gel. Dans le cas du κ -carraghénane, la transition pelote/hélice peut être obtenue au laboratoire en présence de NaI alors que la transition pelote/gel est induite par les ions KCl.

des carraghénanes. Le potassium induit la formation d'un gel de κ -carraghénane, alors que la gélification du ι -carraghénane est favorisée en présence de calcium (Morris *et al.*, 1980; Rees *et al.*, 1982). Bien que l'organisation fine et les modalités d'agrégation des chaînes de galactanes soient toujours l'objet de débats, il est généralement admis que la gélification des carraghénanes est précédée d'une transition d'un état désordonné (pelote) vers un état ordonné (hélices) (Fig. 3). La plupart des données expérimentales indiquent l'existence d'une structure dimérique de l'agarose et du carraghénane à l'état ordonné. Ceci suppose soit une organisation en double hélice (Rees & Conway, 1962; Anderson *et al.*, 1969; Viebke *et al.*, 1994), soit une agrégation en un complexe de simples hélices (Smidsrød & Grasdalen, 1982; Rochas & Rinaudo, 1984; Bongaerts *et al.*, 1999; Cuppo *et al.*, 2002).

La structure du ι -carraghénane est la mieux caractérisée à l'état solide. Les expériences de diffraction des rayons X conduites sur des fibres orientées suggèrent une conformation des macromolécules en double hélice avec probablement un empilement à brins parallèles (Anderson *et al.*, 1969; Janaswamy & Chandrasekaran, 2002). Les clichés de diffraction enregistrés sur des fibres de κ -carraghénane étaient moins bien résolus que ceux du ι -carraghénane. Cependant, sur la base de similarités entre les données cristallographiques, il a été proposé que le κ -carraghénane pourrait également se présenter sous la forme de doubles hélices. Le cas de l'agarose est plus ambigu. En effet, un modèle d'agrégation du polysaccharide impliquant des doubles hélices à l'état solide avait été initialement proposé (Arnott *et al.*, 1974). Cependant, en réexaminant des fibres cristallines d'agarose, un modèle en simple hélice a plutôt été suggéré (Ford & Atkins, 1989), celui-ci semble mieux s'accorder avec les données expérimentales.

LES AGARASES ET LES CARRAGHÉNASES

Les algues rouges représentent une source majeure de nourriture pour une variété d'herbivores, incluant les mollusques, les crustacés, les oursins et les poissons.

Cependant, des enzymes dégradant les agars et les carraghénanes, agarases et carraghénases, n'ont été décrites que chez des bactéries pour lesquelles les galactanes sulfatés constituent une source de carbone importante. Les agarases ont été décrites chez plus d'une vingtaine d'espèces appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de la liaison $\beta(1 \rightarrow 4)$ de l'agarose, à l'exception de l' α -agarase de *Alteromonas agaralytica* qui coupe la liaison $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Les agarases ont été réparties dans quatre familles de glycosides hydrolases : GH 16, 50, 86 et 96 (www.cazy.org). Le nombre d'organismes dont les carraghénases ont été isolées est beaucoup plus restreint (4 espèces). Les carraghénases connues à ce jour coupent les liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ des κ -, ι - ou λ -carraghénane mais elles appartiennent toutes à des familles de glycosides hydrolases différentes. Les κ -carraghénases appartiennent à la famille GH 16 comme les agarases, alors que les ι -carraghénases (GH 82) et les λ -carraghénases (non-classées) composent les familles de fonctions uniques.

La famille GH16 comprend des enzymes possédant des activités très variées. Comme les agarases et les κ -carraghénases, on rencontre des enzymes qui agissent sur les liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ (lichenase, xyloglucane, endo-transférase) mais également des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison $\beta(1 \rightarrow 3)$ (laminarinase, glucane endo-1,3- β -galactosidase). Cependant, toutes ces enzymes catalysent l'hydrolyse par un mécanisme de rétention de configuration et partagent un repliement tridimensionnel en " β -jelly-roll" (Michel *et al.*, 1999; Allouch *et al.*, 2003). L'analyse cristallographique des enzymes de cette famille a révélé une variété de topologies des sites actifs qui sont à rapprocher à des différences de mode d'action. L'endo- β -galactosidase de *C. perfringens* a une topologie en poche, les agarases A et B de *Z. galactinovorans* possèdent des topologies en sillon, alors que la κ -carraghénase se caractérise par une topologie en tunnel.

L'analyse des produits de dégradation enzymatique des polysaccharides permet de déterminer les modes d'action des glycosides hydrolases. De cette manière, les analyses chromatographiques des produits de dégradation de l'agarose en surfusion par les β -agarases A et B ont suggéré un mode d'action endolytique de ces enzymes

(Jam *et al.*, 2005). En effet, au cours des cinétiques, tous les oligosaccharides probables ont été détectés; ce phénomène est caractéristique d'un mode de coupure aléatoire des chaînes de polysaccharides. Ces résultats corroborent l'observation d'une topologie en sillon des deux agarases. Cependant, la structure cristallographique de la β -agarase A (Allouch *et al.*, 2004) (Fig. 4A) obtenue en complexe avec un néo-agar-octaose a mis en évidence deux sites de fixation pour le substrat. L'un correspond au site actif de l'enzyme et l'autre est un site non catalytique comparable à un domaine de fixation (CBD : *carbohydrate binding domain*). Cette propriété tout à fait originale chez les glycosidases s'expliquerait par la capacité de l'agarase A à dissocier, puis à hydrolyser la double-hélice d'agarose. Par conséquent, le mode d'action aléatoire observé sur les substrats d'agarose soluble ne serait pas directement transposable au substrat solide.

L'analyse du mode d'action de la κ -carraghénase (Helbert *et al.*, 2006; Lemoine *et al.*, en préparation) montre que l'enzyme adopterait un mode d'action endolytique quand le polysaccharide est soluble, comme dans le cas des agarases. Par contre, quand le substrat est sous forme de gel, le mode d'action est clairement non aléatoire. L'enzyme procéderait alors selon un mode d'action processif. Les analyses biochimiques s'accordent avec l'observation d'une topologie en tunnel ou sillon fermé (Fig. 4B), que l'on rencontre fréquemment chez les enzymes processives. Cependant, à la différence des β -agarases, la κ -carraghénase prend en charge un substrat polyanionique (un sulfate par unité disaccharidique). Les modalités de reconnaissance impliquent d'une part des interactions hydrophobes entre les galactoses et des acides aminés aromatiques (tryptophane) et d'autre part, des interactions électrostatiques entre les groupements sulfates et des acides aminés chargés (arginine). Dans ce

contexte, le glissement de la κ -carraghénase le long de la chaîne de polysaccharides ne peut s'effectuer comme dans le cas des polysaccharides neutres, et il a été proposé que le déplacement s'effectuerait par des sauts accompagnés par un écartement du tunnel.

L'étude de la dégradation en phase hétérogène de gels de ι -carraghénane par microscopie électronique à transmission a également révélé un mode d'action processif de la ι -carraghénase. En effet, au cours de l'incubation enzymatique, les fibres cristallines de carraghénanes s'affinent sans que la structure en réseau du gel ne soit affectée. Ceci contraste avec une dégradation aléatoire d'un gel par hydrolyse acide ménagée qui conduit à l'isolement des fibres constitutives du gels et, par conséquent, à la perte de la structure en réseau. Les données enzymologiques ont été confortées par l'analyse structurale de la ι -carraghénase cristallisée avec ou sans néo-oligo-carra-tétratosé. La ι -carraghénase adopte un repliement tridimensionnel en hélice β que l'on rencontre souvent chez les enzymes interagissant avec des substrats polyanioniques. En absence de substrat, la topologie du site actif de l'enzyme a une forme de sillon qui se referme par basculement d'un domaine de l'enzyme en présence de substrat (Fig. 4C). Le tunnel obtenu rend compte du mode d'action processif. Il faut également noter que l'enzyme est très basique, ce qui signifie qu'elle aurait la capacité de se fixer sur son substrat acide non seulement par son site actif, mais aussi, à l'image de l'agarase A, par un site localisé à l'extérieur de son site actif.

CONCLUSION

Le mode d'action processif semble correspondre à une adaptation assez générale des enzymes aux contraintes de

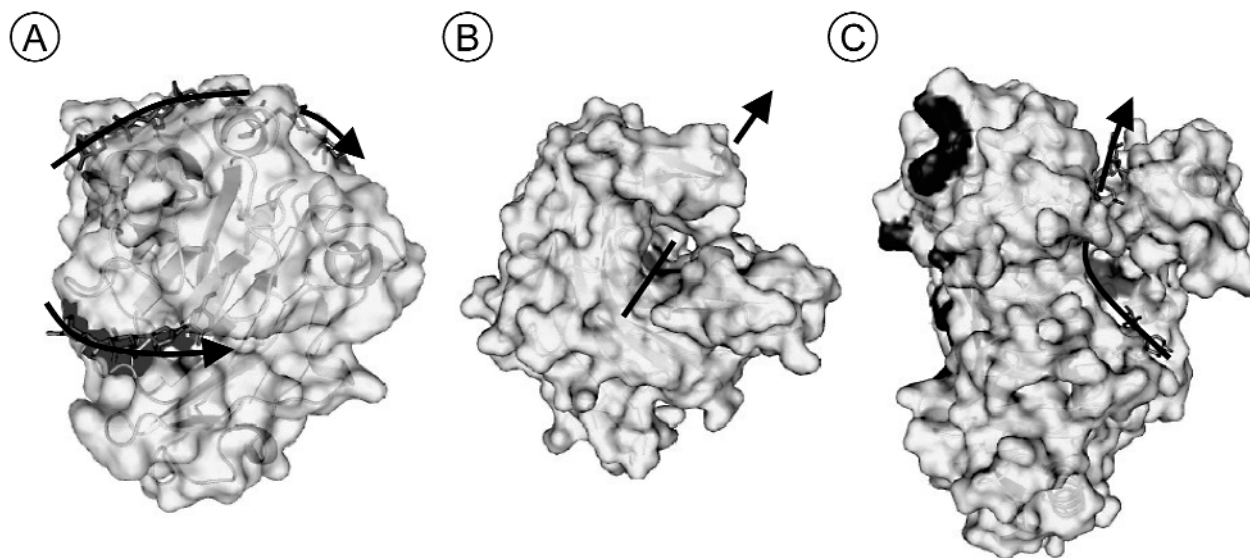


FIG. 4. – Modèles moléculaires de l'agarase A de *Z. galactinovorans* (A) de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (B) et de la ι -carraghénase d'*A. fortis* (C). La position des chaînes de polysaccharides est symbolisée par les flèches qui pointent dans la même direction que les extrémités réductrices.

la dégradation en phase hétérogène. Les travaux menés sur les agarases et les carraghénases ont confirmé cette tendance par l'étude directe des modes d'action et/ou par l'analyse cristallographique des enzymes. Les carraghénanes adoptent probablement une conformation en double hélice et s'agrègent *via* des interactions ioniques pour former des gels. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'au niveau moléculaire, le modèle de processivité proposé pour les cellulases ne soit pas directement transposable aux carraghénases. En effet, la processivité est mise en œuvre selon des modalités qui doivent être corrélées aux propriétés intrinsèques du substrat comme, par exemple, la structure chimique (neutre ou chargée), les propriétés conformationnelles (simple ou double hélice) et les niveaux énergétiques nécessaires à la dissociation des assemblages polysaccharidiques. Ainsi, la surface très basique de la ι -carraghénase reflète l'acidité du substrat. De même, la présence de deux sites de fixation de l'agarose sur l'agarase A est probablement synonyme de la structure en double hélice de l'agarose.

La dégradation enzymatique en phase hétérogène est un phénomène essentiel auquel tous les organismes vivants sont confrontés pour mobiliser l'énergie et la source de carbone contenue dans les polysaccharides. Ce phénomène est indispensable à l'équilibre de la biosphère et s'inscrit dans le cycle du carbone. Actuellement, la valorisation de la biomasse de polysaccharides dans le cadre du développement durable impose de mieux cerner les mécanismes enzymatiques qui permettent de mobiliser les ressources de polysaccharides. Bien que les mécanismes chimiques conduisant à l'hydrolyse de la liaison glycosidique soient maintenant très bien documentés, les connaissances concernant les modes d'action des polysaccharidases proviennent essentiellement des analyses de la dégradation de polysaccharides neutres. L'étude des systèmes galactanes sulfatés/galactanases montre qu'une grande diversité de processus sont possibles et que, par conséquent, les stratégies conduisant à la dépolymérisation des polysaccharides en général sont encore à explorer.

BIBLIOGRAPHIE

- Allouch J., Helbert W., Henrissat B. & Czjzek M., Parallel substrate binding sites in a β -agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose. *Structure*, 2004, 12, 623-632.
- Allouch J., Jam M., Helbert W., Barbeyron T., Kloareg B., Henrissat B. & Czjzek M., The three-dimensional structures of two β -agarases. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 47171-47180.
- Anderson N. S., Campbell J. W., Harding M. M., Rees D. A. & Samuel J. W., X-Ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for κ - and ι -carrageenans. *Journal of Molecular Biology*, 1969, 45, 85-99.
- Arnott S., Fulmer A., Scott W., Dea I., Moorehouse R. & Rees D., The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 90, 269-284.
- Bixler H., Recent development in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*, 1996, 326/327, 35-37.
- Bongaerts K., Reynaers H., Zanetti F. & Paoletti S., Equilibrium and nonequilibrium association processes of κ -carrageenan in aqueous salt solutions. *Macromolecules*, 1999, 32, 683-689.
- Craigie J. S., Biology of the red algae. *Cell Walls*. Cole K. & Sheath R., Cambridge university Press, 1990. Cambridge: 221-257.
- Cuppo F., Reynaers H. & Paoletti S., Association of κ -carrageenan induced by Cs^+ ions in iodide aqueous solution: a light scattering study. *Macromolecules*, 2002, 35, 539-547.
- Ford S. & Atkins E., New X-ray diffraction results from agarose: extended single helix structures and implications for gelation mechanism. *Biopolymers*, 1989, 28, 1345-1365.
- Greer C. & Yaphe W., Hybrid (ι - ν - κ) carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), identified using ι - and κ -carrageenases and ^{13}C -nuclear magnetic resonance. *Botanica Marina*, 1984, 27, 479-484.
- Helbert W., Nyval-Collen P., Michel G. & Czjzek M., Microscopic and molecular insights into heterogeneous phase degradation of agars and carrageenans by marine bacterial galactanases. *Macromolecular symposia*, 2006, 231, 11-15.
- Henrissat B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 1991, 280 (Pt 2).
- Jam M., Flament D., Allouch J., Potin P., Thion L., Kloareg B., Czjzek M., Helbert W., Michel G. & Barbeyron T., The endo- β -agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogous enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochemical Journal*, 2005, 385, 703-713.
- Janaswamy S. & Chandrasekaran R., Effect of calcium ions on the organization of ι -carrageenan helices: an X-ray investigation. *Carbohydrate Research*, 2002, 337, 523-535.
- Knutsen S., Myslabodski D., Larsen B. & Usov A., A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, 1994, 37, 163-169.
- Laine R. A., A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, 1994, 4, 759-767.
- Michel G., Barbeyron T., Flament D., Vernet T., Kloareg B. & Dideberg O., Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the κ -carrageenase from *Pseudalteromonas carragenovora*. *Acta crystallographica*, 1999, D55, 918-920.
- Morris E., Rees D. & Robinson G., Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 1980, 138, 349-362.
- Rees D., Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1969, 24, 267-332.
- Rees D. & Conway E., The structure and biosynthesis of porphyran. *Biochemical Journal*, 1962, 84, 411-416.
- Rees D., Morris E., Thom D. & Madden J., The polysaccharides. Aspinall G. O. New York, USA, 1982. Academic Press: 195-290.
- Rochas C. & Rinaudo M., Mechanism of gel formation in κ -carrageenan. *Biopolymers*, 1984, 23, 735-745.
- Smidsrød O. & Grasdalen H., Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. *Carbohydrate Polymers*, 1982, 2, 270-272.
- van de Velde F., Peppelman H. A., Rollema H. S. & Tromp R. H., On the structure of κ/ι -hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research*, 2001, 331, 271-283.
- Viebbe C., Piculell L. & Nilsson S., On the mechanism of gelation of helix forming biopolymers. *Macromolecules*, 1994, 27, 4160-4166.