



## Wenyngzhuangia 属海洋细菌产紫菜多糖酶的克隆表达与性质及其在紫菜复合酶解中的应用

张玉莹<sup>1</sup>, 常耀光<sup>1,2\*</sup>, 申晶晶<sup>1</sup>, 陈广宁<sup>1</sup>, 李 羚<sup>1</sup>, 薛长湖<sup>1,2</sup>

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237)

**摘要:** 紫菜是一种重要的经济红藻, 我国的紫菜产量高而产值较低。紫菜多糖是紫菜的主要组成部分, 紫菜多糖及其降解产物被证实具有多种生理调节功能, 是实现紫菜高值化开发及利用的重要途径。为挖掘紫菜多糖的工具酶并验证其应用的可行性, 本研究对海洋细菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> 基因组中潜在的紫菜多糖酶编码序列 *por16B* 进行了异源表达、性质研究及应用探究。生化性质研究结果表明, 重组蛋白 Por16B\_Wf 的最适反应温度为 40 °C, 最适反应 pH 值为 7.0, 且具有良好的贮存稳定性及 pH 稳定性。以高效液相色谱-质谱联用技术结合糖生物信息学的糖组学策略, 明确了 Por16B\_Wf 各个亚位点的作用方式。进一步将 Por16B\_Wf 应用至紫菜多糖-蛋白复合酶解, 与单纯蛋白酶酶解工艺相比, 所得酶解液黏度低且紫菜转化率高。本研究为紫菜多糖的降解提供了生化性质及作用方式清晰的工具酶, 并首次实现了紫菜的多糖-蛋白复合酶解, 为紫菜的精深加工及高值化利用提供了新思路。

**关键词:** 紫菜; 紫菜多糖酶; 糖组学; 作用方式; 复合酶解

中图分类号: S 917

文献标志码: A

紫菜是世界范围内广泛种植和食用的海洋藻类, 全球养殖紫菜年产值超过 13 亿美元<sup>[1]</sup>。我国紫菜养殖量居世界第一, 年产量高达 21 万 t<sup>[2]</sup>; 但紫菜的平均价值较低, 世界紫菜的平均价值是我国的 3.7 倍<sup>[3]</sup>。紫菜多糖 (porphyran) 是紫菜的主要多糖组分, 结构由 (1→3)-O-β-D-吡喃半乳糖残基 (G 残基) 及 (1→4)-O-α-L-吡喃半乳糖-6-硫酸酯残基 (L6S 残基) 交替组成<sup>[4]</sup>(图 1), 含量约占紫菜干重的 40%<sup>[5]</sup>。近年来, 紫菜多糖及其降解产物被证实具有丰富的生理调节功能, 如降血脂<sup>[6]</sup>、抗氧化<sup>[7]</sup>、抑制癌细胞生长<sup>[8]</sup>等。因此

紫菜多糖是实现紫菜高值化开发及利用的重要途径。

糖苷水解酶能够特异性降解多糖中的糖苷键, 可在多糖的降解及结构研究等方面发挥巨大作用。紫菜多糖酶 (porphyranase)(EC 3.2.1.178) 是一类可特异性降解紫菜多糖中糖苷键的水解酶。自 2010 年紫菜多糖酶基因被发现后, 近十年内仅有 6 个紫菜多糖酶被研究, 其中海洋细菌 *Zobellia galactanivorans* 产 PorA 及 PorB 是最早被发现并研究的紫菜多糖酶<sup>[4]</sup>, 且同一研究团队在人类肠道细菌 *Bacteroides plebeius* 中发掘到了

收稿日期: 2021-05-12 修回日期: 2021-06-20

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFC0311203); 中央高校基本科研业务费专项 (201941005)

第一作者: 张玉莹 (照片), 从事海洋食品研究, E-mail: 2438022981@qq.com

通信作者: 常耀光, E-mail: changyg@ouc.edu.cn



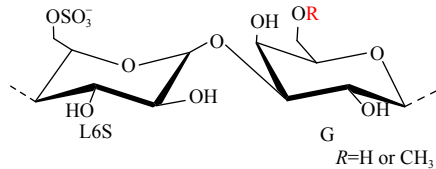


图1 紫菜二糖重复单元

Fig. 1 Structure of porphyran disaccharide moiety

紫菜多糖酶编码基因, 其编码蛋白 BpGH16B 及 BpGH86A<sup>[9]</sup>。此外, 本课题组前期从海洋细菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* 中发现了紫菜多糖酶 Por16A\_Wf<sup>[10]</sup> 及 Por16C\_Wf<sup>[11]</sup>, 并阐明了其生化性质及作用方式。根据蛋白序列的同源性, 在碳水化合物活性酶数据库 (CAZy 数据库)<sup>[12]</sup> 中, PorA、PorB、BpGH16B、Por16A\_Wf、Por16C\_Wf 属于糖苷水解酶 GH16 家族; BpGH86A 属于 GH86 家族, 以上 6 种酶均以内切方式降解紫菜多糖中的  $\beta$ -1,4 糖苷键。目前, 紫菜多糖酶的研究较少, 且相关酶蛋白尚未见于食品加工工艺中的应用。

实验室前期筛选、鉴定了一株海洋细菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup>, 并对其进行了全基因组测序<sup>[13-14]</sup>。初步的生物信息学分析表明, 该细菌基因组中还存在着一条潜在的紫菜多糖酶编码基因 *por16B*(WP\_068828752.1)。本研究拟以分子生物学技术对该序列进行异源表达, 系统阐明重组蛋白的生化性质, 并以糖组学策略<sup>[10]</sup> 实现酶蛋白作用方式的精准解析, 为紫菜多糖的降解提供丰富的工具酶; 此外, 鉴于紫菜多糖酶尚无食品加工中的研究报道及实际应用, 本研究拟尝试将其应用至紫菜多糖-蛋白复合酶解, 验证紫菜多糖酶实际应用的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**实验材料** 干坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 购于青岛南山水产市场, 参考实验室前期方法对紫菜多糖进行制备<sup>[10]</sup>。将坛紫菜粉碎后进行水浴浸提及乙醇沉淀, 所得沉淀即为粗紫菜多糖。利用 ÄKTA Prime Plus 快速低压液相色谱系统, 结合 HiPrep<sup>TM</sup> 26/60 Sphacryl S-400 凝胶色谱柱进行多糖纯化。将纯化后的多糖透析、冻干并用于后续实验。利用高效凝胶排阻色谱 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC), 结合多角度激光光散射仪 (multi-angle laser light

scattering detector, MALLS) 与示差检测器 (refractive index detector, RID) 联用对多糖的分子量进行鉴定。本研究中提取的紫菜多糖分子量为  $(171.1 \pm 2.5)$  ku。

**海洋细菌** *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup>, 实验室筛选并保存; pET-28a(+) 质粒, 武汉淼灵生物科技有限公司; HiPrep<sup>TM</sup> 26/10 Desalting、HisTrap<sup>TM</sup> HP、Superdex peptide 10/300 GL、Superdex 30 increase 10/300 GL、HiPrep<sup>TM</sup> 26/60 Sphacryl S-400 色谱柱, GE 生命科学; TSKgel SuperAW4000, 日本东曹; 其他化学试剂均为分析纯。

**实验仪器** ÄKTA Prime Plus 蛋白纯化系统, GE 生命科学; Dawn Heleos II MALLS 检测器, 怀雅特技术公司; Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪、Agilent 6410 QQQ 质谱仪, 安捷伦科技; Rheometer MCR301 流变仪, 奥地利安东帕公司。

### 1.2 生物信息学分析

利用 dbCAN<sup>[15]</sup> 及 SignalP 4.1<sup>[16]</sup> 软件对蛋白序列结构进行预测, 包括蛋白的催化域及信号肽; 利用 ExPASy<sup>[17]</sup> 对蛋白的理论分子质量进行预测; 使用 ClustalX 2<sup>[18]</sup> 软件进行多序列比对, 并利用 MEGA 6 软件<sup>[19]</sup> 进行系统发育分析, 基于 Neighbor-Joining 法构建系统发育树; 以 BLASTP<sup>[20]</sup> 为工具对目标序列与 CAZy 数据库中已报道的紫菜多糖酶序列进行序列相似度分析。

### 1.3 克隆表达及分离纯化

将冻存于  $-80$  °C 冰箱的 *W. fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> 接种于 2216E 液体培养基进行复苏及传代, 收集生长至对数中期的菌体并提取基因组 DNA。利用无缝克隆技术进行目标序列的扩增及重组质粒的构建。上游引物为 5'-GATGACAC-CATATGAATAATGATGATGTGTTATCGAATG-3', 下游引物为 5'-GACACGGATCCTTAATGTGTAACATTTAACTGATAATATTC-3'。酶切位点采用 *Bam*H I 及 *Xho* I。将扩增后的目的基因连接至 pET-28a(+) 载体 (保留 C 端 His 标签)。将构建好的重组质粒以热击法转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中。筛选转化成功的大肠杆菌进行传代培养, 于 LB 液体培养基 (含 30 ng/ $\mu$ L 卡那霉素) 中 37 °C、170 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.4, 并添加物质的量终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基

$\beta$ -D-硫代半乳糖苷于 17 °C 诱导 12 h。收集培养后的菌体沉淀,以物质的量浓度为 20 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 值 7.0) 重悬。超声破碎(功率 400 W,工作 2 s 间歇 6 s 为 1 次循环,共循环破碎 99 次)并离心获取上清液,得到 Por16B\_Wf 粗酶液。

以 HisTrap™ HP 色谱柱对粗酶液进行亲和层析纯化,以含物质的量浓度为 0.3 mol/L NaCl 的 20 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 (pH 值 8.0) 的流动相进行平衡,使用物质的量浓度为 0~0.5 mol/L 的咪唑进行梯度洗脱,收集紫外信号高的洗脱各管并进行酶活性测定。对有酶活性的各管进行合并,并以 HiPrep™ 26/10 Desalting 色谱柱脱盐,流动相为物质的量浓度为 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 值 7.0)。蛋白的纯度及分子量通过 12% SDS-PAGE 进行分析,以 BCA 法测定蛋白浓度。纯化后的重组蛋白用于生化性质及作用方式的研究。

#### 1.4 紫菜多糖酶的活性测定

将 50  $\mu$ L 紫菜多糖溶液 (2 mg/mL) 与 50  $\mu$ L 适量稀释的酶液 (以 pH 值 7.0、物质的量浓度为 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释) 混匀后于 35 °C 反应 10 min,迅速置于 100 °C 金属浴 5 min 以灭活。在相同的条件下,以灭活的酶液与底物反应作为对照。采用对羟基苯甲酰肼 (para-hydroxybenzoic acid hydrazide, pHBH) 法<sup>[10,21]</sup>表征酶解反应前后还原糖增量。

#### 1.5 生化性质研究

将适量稀释的酶液与紫菜多糖底物溶液混合,测定 Por16B\_Wf 在不同温度 (15~60 °C) 下的酶活性。将酶液分别置于 4、25、30、35 及 45 °C, 间隔时间取样并测定酶活性残余率。将不同 pH 值 (pH 值 4.0~7.0: 物质的量浓度为 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液; pH 值 7.0~9.0: 物质的量浓度为 20 mmol/L PBS 缓冲液; pH 值 9.0~11.0: 物质的量浓度为 20 mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液) 条件下的酶液与对应 pH 值的底物混合,测定 Por16B\_Wf 在不同 pH 时的酶活性。以不同 pH 值的缓冲液置换酶液原来的缓冲环境,于 4 °C 放置 1 h 后调节酶液 pH 值至 7.0,测定酶活性残余率。

分别配置不同 NaCl 及 KCl 浓度的紫菜多糖

底物,使得 NaCl 及 KCl 在底物中的物质的量浓度为 0~2 mol/L,分别测定 Na<sup>+</sup>及 K<sup>+</sup>浓度对 Por16B\_Wf 酶活性的影响。向反应体系中分别添加金属离子及化学试剂,使其物质的量终浓度为 1 及 5 mmol/L,测定不同条件下的酶活性。

将酶液与不同浓度的紫菜多糖溶液混合 (底物浓度 0.1~1 mg/mL),测定不同底物浓度下的酶活性。依据 Michaelis-Menten 方程,计算 Por16B\_Wf 的动力学常数  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $K_{cat}$  及  $K_{cat}/K_m$ 。

#### 1.6 作用方式

将酶液与底物混合反应,其中加酶量为 10 U/g,于 25 °C 反应 24 h,间隔时间取样后将样品置于 100 °C 金属浴 5 min 以灭活。以高效凝胶排阻色谱与示差检测器联用 (HPSEC-RID) 对酶解样品进行监测<sup>[22]</sup>:利用 TSKgel SuperAW 4000 色谱柱 (流动相为物质的量浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl,流速 0.6 mL/min) 检测底物分子量变化;利用 Superdex peptide 10/300 GL 色谱柱 (流动相为物质的量浓度为 50 mmol/L 的甲酸铵,流速 0.5 mL/min) 检测寡糖产物的生成与变化。

向底物中加入过量酶液 (加酶量为 50 U/g),于 25 °C 反应 24 h 以充分降解紫菜多糖。以液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 结合糖生物信息学的糖组学策略对酶解终产物中的寡糖组分进行全覆盖检测及高通量自动分析<sup>[10-11]</sup>。液相色谱仪: Agilent 1260 Infinity; 质谱仪: Agilent 6410 QQQ; 色谱柱: Superdex 30 increase 10/300 GL; 质谱分析流动相: 25% 乙腈 (含 5 mmol/L 甲酸铵); 流速: 0.35 mL/min; 源温: 300 °C; 碎裂电压: 115 V; 毛细管电压: 4000 V; 扫描范围: 100~2 000 u; 扫描模式: 负离子模式<sup>[23]</sup>。

#### 1.7 紫菜的多糖-蛋白复合酶解

将紫菜粉末中加入一定量的蒸馏水使其溶胀复水 40 min。向复水后的紫菜中添加蒸馏水,使得紫菜含量为 4%,参考文献方法添加中性蛋白酶进行<sup>[24]</sup>酶解 (加酶量为 10 500 U/g),于 45 °C 酶解 6 h 后置于 100 °C 水浴中加热 10 min 以灭活,得到单纯蛋白酶酶解液。向蛋白酶酶解液中添加紫菜多糖酶 Por16B\_Wf 进行酶解 (加酶量为 0.5 U/g),于 35 °C 酶解 2 h 后置于 100 °C 水浴中加热 10 min 以灭活,得到紫菜的多糖-蛋白复合酶解液。

将酶解液以 4 000 r/min 离心 15 min,收集未

被酶解的残余物进行冻干称重, 计算紫菜转化率(CR, %):

$$CR = \frac{X - X_1}{X} \times 100\%$$

式中,  $X_1$  为酶解液离心所得沉淀的质量, g;  $X$  为紫菜原料的质量, g。

收集离心后的上清液, 使用流变仪在 25 °C 下对样品进行黏度测定, 剪切速率为 0~100 s<sup>-1</sup>。

## 1.8 数据分析

实验均重复 3 次, 数据以 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析 ( $P < 0.05$ , 差异显著;  $P < 0.01$  差异极显著), 结果以平均值±标准差表示。采用 Origin Pro 9.0 软件对实验数据进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 Por16B\_Wf 的生物信息学分析

*por16B* 编码 296 个氨基酸, 生物信息学预测其编码蛋白 Por16B\_Wf 包含一个 N 端信号肽 (1~24 位氨基酸) 及一个 GH16 家族的结构域 (50~289 位氨基酸)。

对 Por16B\_Wf 及 GH16 家族已研究的酶蛋白进行局部序列比对, 发现其与 *Z. galactanivorans* DsiJ<sup>T</sup> 所产的 PorB<sup>[4]</sup> 相似度最高, 相似度为 79% (覆盖率为 96%), 预示 Por16B\_Wf 为潜在的紫菜多糖酶。

GH16 家族具有多种糖苷水解酶活性, 典型的活性包括紫菜多糖酶、琼胶酶、κ-卡拉胶酶、角叉藻胶酶、地衣多糖酶及海带淀粉酶活性<sup>[25-26]</sup>。将 Por16B\_Wf 与已研究的 GH16 家族糖苷水解酶构建系统发育树(图 2), 进化树结果表明 Por16B\_Wf 位于 GH16 家族紫菜多糖酶的进化分支中, 进一步提示了 Por16B\_Wf 具有潜在的紫菜多糖酶活性。

将 Por16B\_Wf 与 GH16 家族已报道的紫菜多糖酶进行多序列比对, 发现 GH16 家族糖苷水解酶具有典型的特征催化域(图 3), 即 ExDxxE 或 ExDxE, 关键催化位点 E、D 及 E 分别作为催化亲和位点、糖苷酶催化过程中间体的形成助剂及质子供体在糖苷酶发挥功能过程中起着重要的作用<sup>[25]</sup>。紫菜多糖酶的催化域特征符合 ExDxxE, 且 Por16B\_Wf 在上述关键位点严格保守 (E159、D161 和 E164)。

### 2.2 Por16B\_Wf 的克隆表达及功能验证

Por16B\_Wf 异源表达于大肠杆菌 BL21(DE3), 超声破碎所得上清酶液经过镍柱、脱盐柱纯化后, 以 SDS-PAGE 检测到呈现单一条带(图 4)。Por16B\_Wf 的分子量为 35.0 ku, 与预测分子量 34.6 ku 接近。酶活性验证结果表明, Por16B\_Wf 仅特异性降解紫菜多糖 (酶活性为 65.31 U/mg), 而对其他 GH16 家族典型的底物, 如琼脂糖、κ-卡拉胶及角叉藻胶无活力。上述结果证明 Por16B\_Wf

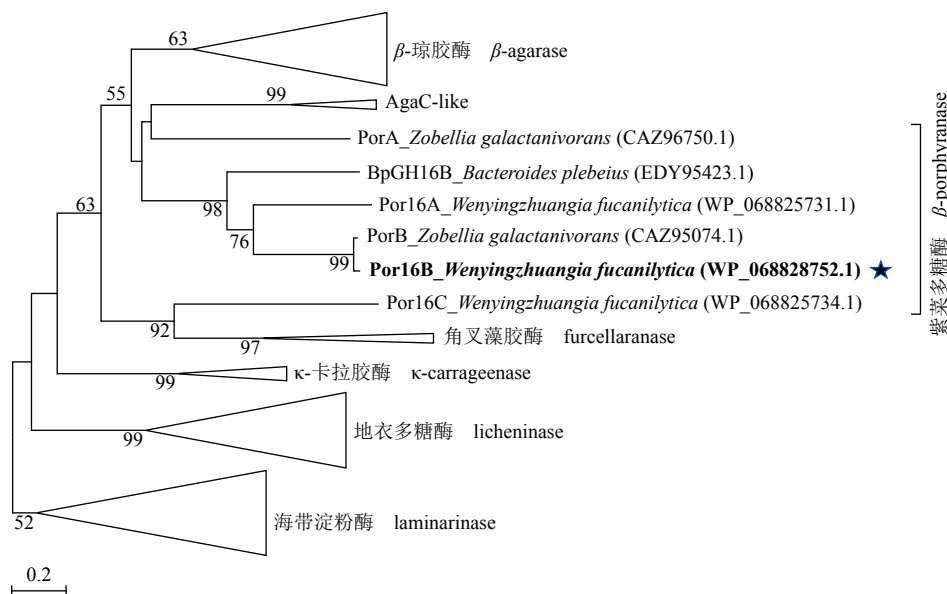


图 2 Por16B\_Wf 与所有已知 GH16 家族糖苷水解酶构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Por16B\_Wf and all characterized GH16 sequences

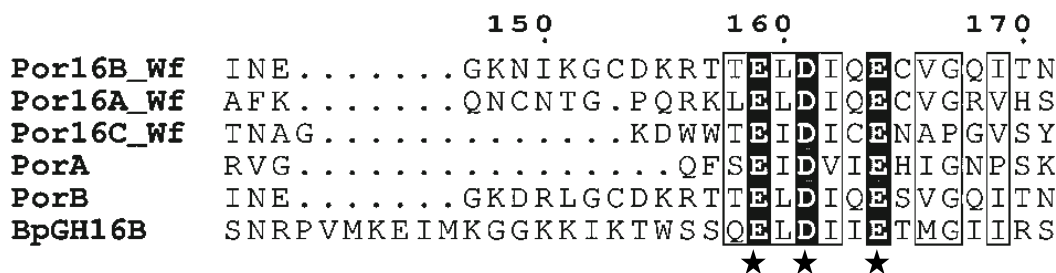


图3 多序列比对结果

星号标识为文献报道的GH16家族糖苷水解酶的重要催化残基,数字代表Por16B\_Wf中氨基酸序列的位数

Fig. 3 Multiple sequence alignment of porphyranases

Critical catalytic residues of GH16 enzymes were marked by black stars, the numbers indicate residue positions in Por16B\_Wf

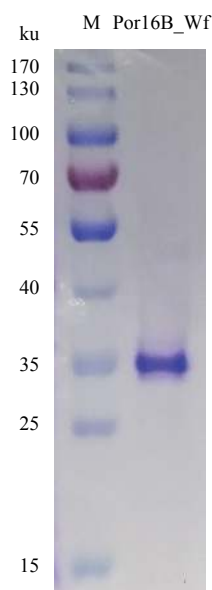


图4 Por16B\_Wf纯化后的SDS-PAGE电泳图

M. 预染蛋白分子质量标准

Fig. 4 SDS-PAGE of purified Por16B\_Wf

M. prestained protein ladder

Wf克隆表达成功并确证为紫菜多糖酶。

### 2.3 Por16B\_Wf的生化性质

Por16B\_Wf的最适反应温度为40℃(图5-a, 5-b)。该酶在4及25℃分别放置24h后,残余活性仍为初始酶活性的93%及84%。此外,在不添加任何保护剂的情况下, Por16B在4℃贮存50d,其残余活力为初始酶活性的50%,证明该酶具有较好的贮存稳定性。但该酶在较高的温度下放置后酶活性丧失较快,在40℃放置1h后残余活性仅为9%。

Por16B\_Wf的最适反应pH为7.0。其在3.0~11.0的较宽的pH范围内具有良好的稳定性(图5-c, 5-d)。

Por16B\_Wf的酶活性随着NaCl及KCl浓度的提高呈先上升后下降的趋势,证明酶蛋白的活性对NaCl及KCl具有依赖性(图5-e)。然而在不添加NaCl及KCl的条件下, Por16B\_Wf仍然具有明显的活性。

金属离子及化学试剂对酶活性的影响如表1所示。Hg<sup>2+</sup>及SDS在1和5mmol/L时均能显著降低酶活性,而Mg<sup>2+</sup>及EDTA·Na<sub>2</sub>在5mmol/L时显著提高酶活性。

Por16B\_Wf的动力学常数K<sub>m</sub>为2.73μmol/L(0.47mg/mL), V<sub>max</sub>为66.23U/mg, k<sub>cat</sub>为38.63s<sup>-1</sup>, k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>为14.16μmol/(L·s)。

### 2.4 Por16B\_Wf的作用方式

**降解方式** 底物分子量变化监测结果表明,1U Por16B\_Wf酶解100mg紫菜多糖底物,在反应10min时样品的出峰时间明显后移(即由3.8min延后至5.3min)(图6-a)。根据凝胶排阻色谱分离的原理,结合Por16B\_Wf在酶解反应初期使得底物分子量急剧下降的现象,推断出该酶为内切酶。寡糖产物轮廓随反应时间的变化如图6-b所示。1U Por16B\_Wf酶解100mg紫菜多糖底物,在反应10min时即可观察到不同聚合度寡糖的生成。这种酶解初期不同聚合度寡糖快速生成的现象证明Por16B\_Wf为随机型内切酶。

**酶解产物鉴定** 与多数天然多糖一样,紫菜多糖结构也被证实具有异质性,其结构中经常伴有琼脂糖结构[琼脂糖结构由(1→3)-O-β-D-吡喃半乳糖残基(G残基)及(1→4)-O-3,6-内醚-α-L-吡喃半乳糖残基(LA残基)交替连接构成]的取代,此外G残基的C-6位会被甲基化修饰(GMe),且修饰程度可达50%<sup>[27]</sup>。

降解终产物经质谱鉴定后的提取离子流色

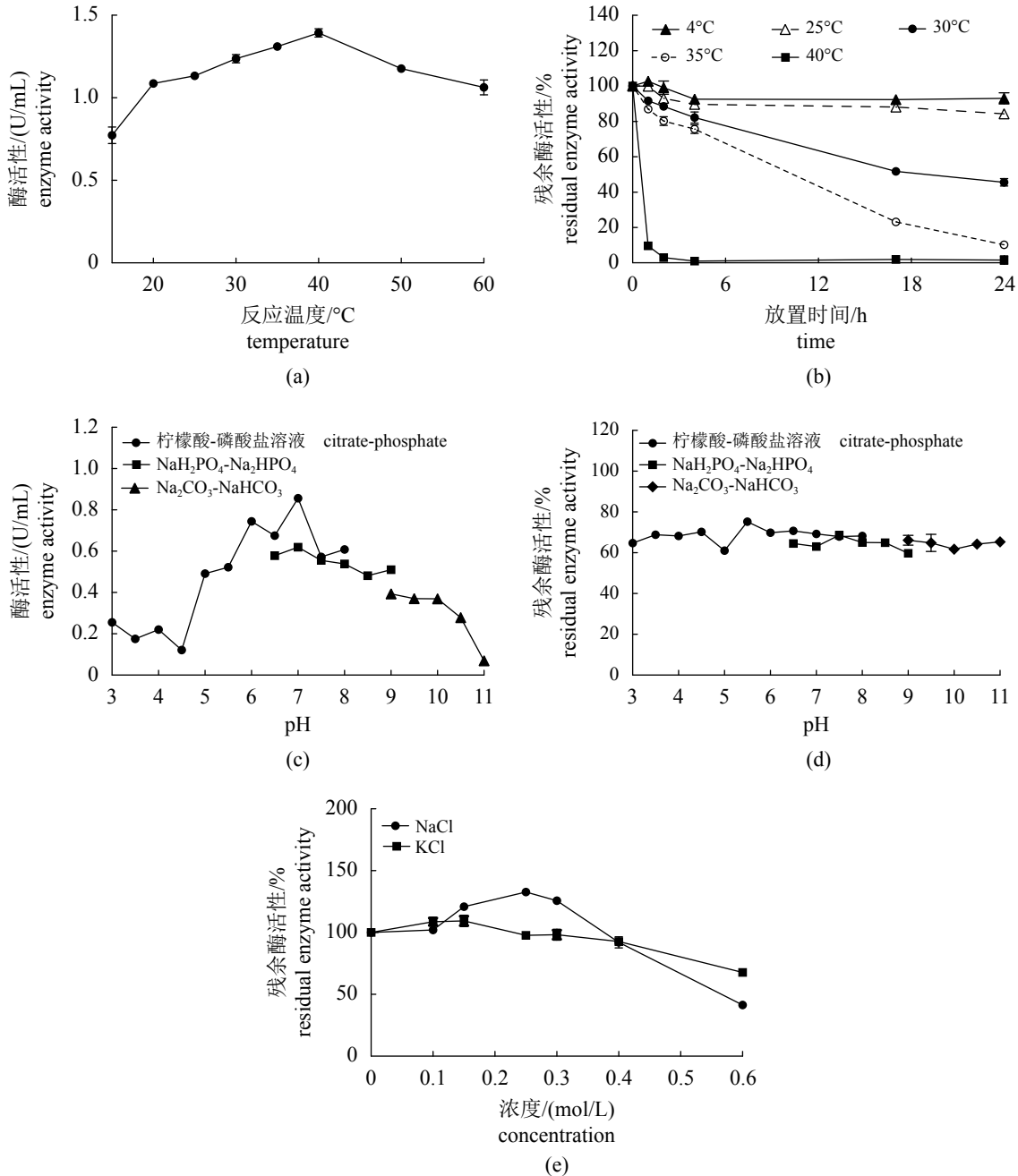


图 5 Por16B\_Wf 的生化性质

(a) 最适反应温度, (b) 温度稳定性, (c) 最适反应 pH, (d) pH 稳定性, (e) NaCl、KCl 对酶活性的影响

Fig. 5 Biochemical characteristics of Por16B\_Wf

(a) optimal temperature; (b) thermal stability; (c) optimal pH; (d) pH stability; (e) the influence of NaCl, KCl on enzyme activity

谱图显示, Por16B\_Wf 的降解终产物主要由紫菜二糖 L6S-G 构成 (图 7)。值得注意的是, 由 L6S-G 重复单元构成的四糖 (L6S-G)<sub>2</sub> 及六糖 (L6S-G)<sub>3</sub> 并未在终产物中检出, 证明 Por16B\_Wf 可将 (L6S-G)<sub>n</sub> 充分转化为二糖。除紫菜二糖 L6S-G 外, 还检测到了 6 种含量较低的产物, 包括 3 种四糖: (L6S-G)<sub>1</sub>(LA-G)<sub>1</sub>、(L6S-G)<sub>1</sub>(LA-G)<sub>1</sub>Me<sub>1</sub>、(L6S-G)<sub>2</sub>Me<sub>1</sub>;

3 种六糖: (L6S-G)<sub>2</sub>(LA-G)<sub>1</sub>Me<sub>1</sub>、(L6S-G)<sub>2</sub>(LA-G)<sub>1</sub>Me<sub>2</sub>、(L6S-G)<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>, 上述 6 种寡糖产物均含有不同程度的 LA-G 取代及甲基修饰。

### 2.5 紫菜的多糖-蛋白复合酶解工艺与单纯蛋白酶酶解工艺的比较

本研究中测得的多糖-蛋白复合酶解组的紫

表 1 金属离子及化学试剂对 Por16B\_Wf 酶活性的影响

Tab. 1 Effect of metal ions and chemicals (1 and 5 mmol/L) on the activity of Por16B\_Wf

离子及化学试剂 compound	残余酶活性/% relative activity		离子及化学试剂 compound	残余酶活性/% relative activity	
	1 mmol/L	5 mmol/L		1 mmol/L	5 mmol/L
Mg <sup>2+</sup>	90.40±1.19	133.28±2.01	Hg <sup>2+</sup>	21.69±0.70	3.88±0.90
Ca <sup>2+</sup>	116.26±3.31	119.19±3.67	SDS	9.87±1.39	5.80±1.02
Cu <sup>2+</sup>	99.08±2.51	108.08±3.14	Mn <sup>2+</sup>	81.22±2.20	125.05±2.68
EDTA·Na <sub>2</sub>	105.85±0.48	130.53±3.93	β-巯基乙醇 β-mercaptoethanol	87.63±1.17	139.05±3.59

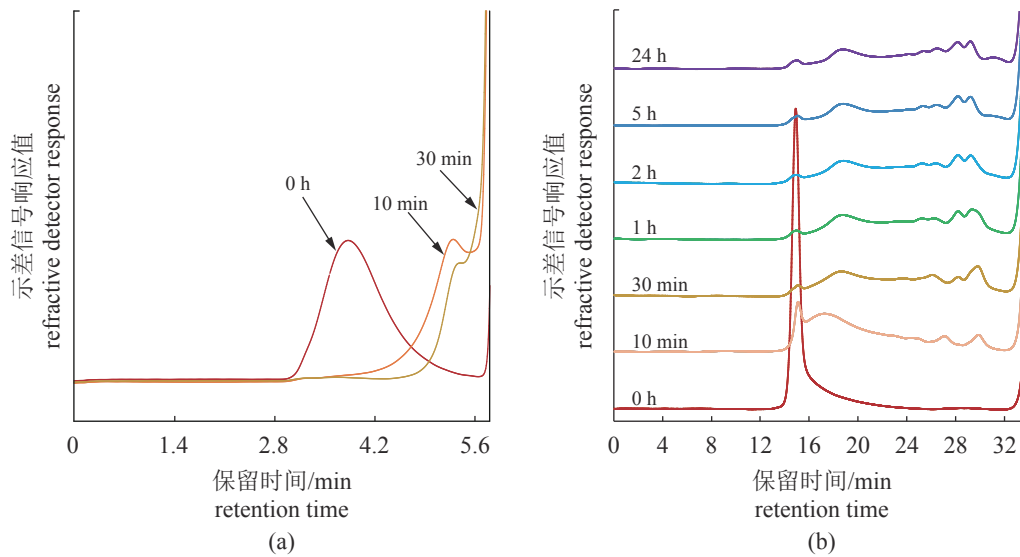


图 6 高效凝胶排阻色谱与示差检测器联用检测 Por16B\_Wf 酶解产物

(a) 分子量变化, (b) 寡糖产物分布

Fig. 6 HPSEC-RID chromatograms of hydrolysis products

(a) global profile, (b) oligosaccharide patterns

菜转化率为 79.4%±0.3%，较单纯蛋白酶酶解组的紫菜转化率 (66.1%±0.6%) 极显著提升 ( $P<0.01$ )。同时，酶解液的黏度变化显示，在剪切速率为 1.1 s<sup>-1</sup> 时，单纯蛋白酶酶解组的样品黏度为 15 Pa·s，而多糖-蛋白复合酶解组的样品黏度为 8.5 Pa·s (与水的黏度 8.0 Pa·s 接近)(图 8)，证明紫菜多糖酶极显著降低了酶解液的黏度 ( $P<0.01$ )，该特性有利于离心、澄清和脱色等后处理工序的进行。此外，收集两种酶解液离心后的沉淀物即未酶解的残余物，观察其冻干后的状态，发现多糖-蛋白复合酶解组得到的残余物呈颗粒状，而单纯蛋白酶酶解组所得残余物呈蓬松状，推测其原因可能是单纯蛋白酶酶解组中含有较多的多糖物质，使得酶解液黏度大，离心不彻底而造成。

### 3 讨论

与同样来源于 *W. fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> 的 Por16A\_Wf (3.16 μM)<sup>[10]</sup> 及 Por16C\_Wf (3.22 μM)<sup>[11]</sup> 相比，Por16B\_Wf 的  $K_m$  值更低，证明该酶与紫菜多糖的亲合力更高。此外，Por16B\_Wf 的酶活性呈现盐依赖性的现象可能与海洋细菌生存的高盐环境相关。但其活性的启动不依赖盐离子，即在利用 Por16B\_Wf 酶解紫菜多糖的反应中可以不添加盐离子，能够避免酶解产物后续繁琐的脱盐步骤，以节约生产成本。

根据糖苷酶的作用特点、寡糖产物类型及紫菜多糖的结构特征，推断出 Por16B\_Wf 的亚位点的特异性 (图 9): ①亚位点-1 和+1 分别严格

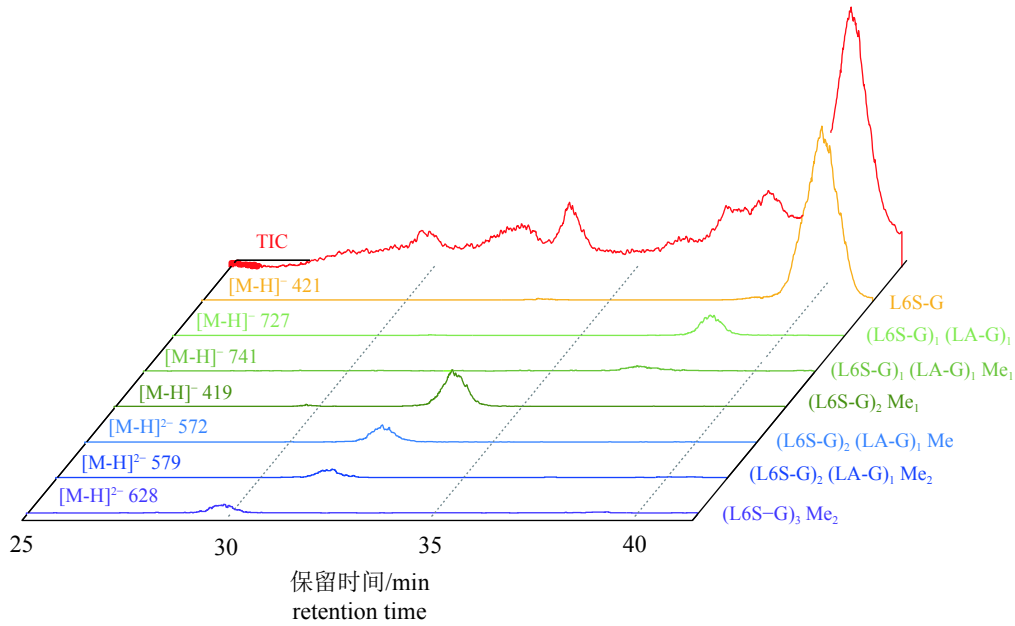


图 7 Por16B\_Wf的降解终产物总离子流图及提取离子流色谱图

Fig. 7 Total ion chromatogram (TIC) and extraction ion chromatograms of identified end products from the Por16B\_Wf hydrolysis, as determined by LC-MS

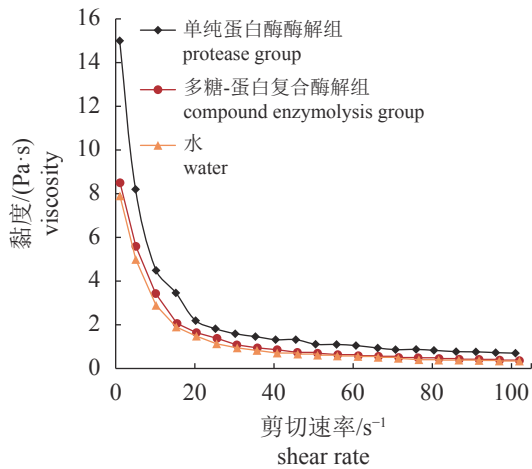


图 8 酶解液黏度变化图

Fig. 8 Viscosity of the enzymatic hydrolysate

识别 G 和 L6S 残基。假设亚位点-1 能够容受 GMe, 那么二糖产物 L6S-GMe 应该被检测到; 同理, 若亚位点+1 能够容受 LA, 则二糖产物 LA-G 应该被检测到, 但在 Por16B\_Wf 的降解终产物中仅检测出一种二糖 L6S-G。②亚位点-2 能够识别 LA 残基。在 Por16B\_Wf 的终产物中, 质荷比 m/z 为 727 的四糖产物, 其序列结构可能为 L6S-G-LA-G 或 LA-G-L6S-G。根据推论①, 得知 Por16B\_Wf 无法酶解产生 LA-G-L6S-G, 因此 m/z 727 的产物为 L6S-G-LA-G, 据此判断出 LA 残基位于亚位点-2。③亚位点+2 容受 GMe 残基。质

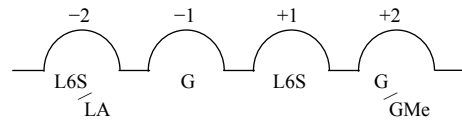


图 9 Por16B\_Wf 的亚位点特异性示意图

Fig. 9 Schematic diagram of the subsite specificity of Por16B\_Wf

荷比 m/z 为 419 的四糖产物, 其序列结构可能为 L6S-GMe-L6S-G 或 L6S-G-L6S-GMe。由②同理可得, m/z 为 419 的四糖结构为 L6S-GMe-L6S-G, 该结构提示 GMe 位于亚位点+2。紫菜多糖结构的异质性意味着其完全降解需要多种不同作用方式的水解酶, Por16B\_Wf 作用方式的阐明为紫菜多糖的降解提供了丰富且性质清晰的工具酶。

目前文献报道的紫菜酶解工艺主要为蛋白酶酶解, 以此为基础进行紫菜饮料等产品的开发。本研究在蛋白酶酶解的基础上进行紫菜多糖酶复合酶解, 结果表明添加紫菜多糖酶的多糖-蛋白复合酶解组与单纯蛋白酶酶解组相比, 所得酶解液具有紫菜转化率高、黏度低的特点, 显著提高了原有工艺的酶解效果, 有利于紫菜的充分利用。

综上所述, 本研究从海洋细菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> 基因组出发, 挖掘得到一条被注释为紫菜多糖酶的基因序列 *por16B*, 以



分子生物学技术实现了其在大肠杆菌中的异源表达。并系统阐明了酶蛋白的生化性质,以液相色谱-质谱联用技术实现了酶作用方式的精准解析,从而阐明了酶蛋白的各个亚位点的特异性。重组蛋白 Por16B\_Wf 在 40 °C 及 pH 7.0 的条件下具有最高的酶活性,且具有良好的贮存稳定性及 pH 稳定性。Por16B\_Wf 以随机型内切方式降解紫菜多糖中的  $\beta$ -1,4 糖苷键。亚位点特异性分析结果表明, Por16B\_Wf 在 -1 及 +1 亚位点分别特异性识别 G 及 L6S 残基, -2 亚位点除识别 L6S 外还能容受 LA 残基, +2 亚位点除识别 G 外还能容受 GMe 残基。以 Por16B\_Wf 与蛋白酶复合酶解紫菜,所得复合酶解液较传统的蛋白酶酶解液相比,黏度低且紫菜转化率高。Por16B\_Wf 可作为特异性工具应用于紫菜多糖的酶解及寡糖产物制备。紫菜多糖酶在紫菜复合酶解中的首次应用,为紫菜的进一步开发及利用提供了理论支撑。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Bito T, Teng F, Watanabe F. Bioactive compounds of edible purple laver *Porphyra* sp. (Nori)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(49): 10685-10692.
- [ 2 ] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fisheries statistical yearbook 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [ 3 ] 张盼盼, 杨锐, 吴小凯. 江苏省条斑紫菜产业现状调研[J]. 宁波大学学报(理工版), 2014, 27(1): 18-22.
- Zhang P P, Yang R, Wu X K. Laver industry in Jiangsu Province: investigation[J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2014, 27(1): 18-22(in Chinese).
- [ 4 ] Hehemann J H, Correc G, Barbeyron T, *et al.* Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota[J]. *Nature*, 2010, 464(7290): 908-912.
- [ 5 ] Geng L H, Wang J, Zhang Z S, *et al.* Structure and Bioactivities of porphyrans and oligoporphyrans[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, 25(11): 1163-1171.
- [ 6 ] Inoue N, Yamano N, Sakata K, *et al.* The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(2): 447-449.
- [ 7 ] Zhang Q B, Li N, Zhou G F, *et al.* *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice[J]. *Pharmacological Research*, 2003, 48(2): 151-155.
- [ 8 ] Kwon M J, Nam T J. Porphyran induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines[J]. *Life Sciences*, 2006, 79(20): 1956-1962.
- [ 9 ] Hehemann J H, Correc G, Thomas F, *et al.* Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(36): 30571-30584.
- [ 10 ] Zhang Y Y, Chang Y G, Shen J J, *et al.* Expression and characterization of a novel  $\beta$ -Porphyranase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: a biotechnological tool for degrading porphyran[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(33): 9307-9313.
- [ 11 ] Zhang Y Y, Chang Y G, Shen J J, *et al.* Characterization of a novel porphyranase accommodating methylgalactoses at its subsites[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(26): 7032-7039.
- [ 12 ] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D233-D238.
- [ 13 ] Chang Y, Xue C, Tang Q, *et al.* Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(3): 301-307.
- [ 14 ] Chen F, Chang Y G, Dong S J, *et al.* *Wenyngzhuangia fucanilytica* sp nov., a sulfated fucan utilizing bacterium isolated from shallow coastal seawater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(9): 3270-3275.
- [ 15 ] Yin Y B, Mao X Z, Yang J C, *et al.* DbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(W1):

- W445-W451.
- [16] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [17] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, *et al.* ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [20] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [21] 张翠玉, 薛长湖, 于龙, 等. 基于pHBH法的岩藻聚糖硫酸酯酶酶活测定方法[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(7): 200-206.
- Zhang C Y, Xue C H, Yu L, *et al.* Fucoindanase activity determination method on basis of pHBH method[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(7): 200-206(in Chinese).
- [22] Shen J J, Chang Y G, Chen F, *et al.* Expression and Characterization of a -carrageenase from marine bacterium *Wenyingshuangia aestuarii* OF219: a biotechnological tool for the depolymerization of -carrageenan[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 93-100.
- [23] Yu L, Xu X Q, Xue C H, *et al.* Enzymatic preparation and structural determination of oligosaccharides derived from sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan[J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 702-709.
- [24] 伍宏. 紫菜复合功能饮料的研制 [D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- Wu H. The development of laver compound functional drink[D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2011 (in Chinese).
- [25] Naretto A, Fanuel M, Ropartz D, *et al.* The agar-specific hydrolase ZgAgaC from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* defines a new GH16 protein subfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(17): 6923-6939.
- [26] Schultz-Johansen M, Bech P K, Hennessy R C, *et al.* A novel enzyme portfolio for red algal polysaccharide degradation in the marine bacterium *Paraglaciecola hydrolytica* S66<sup>T</sup> encoded in a sizeable polysaccharide utilization locus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 839.
- [27] Przybylski C, Correc G, Fer M, *et al.* MALDI-TOF MS and ESI-LTQ-Orbitrap tandem mass spectrometry reveal specific porphyranase activity from a *Pseudoalteromonas atlantica* bacterial extract[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(98): 80793-80803.

## Expression and characterization of a porphyranase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* and its application in compound enzymolysis of *Pyropia*

ZHANG Yuying<sup>1</sup>, CHANG Yaoguang<sup>1,2\*</sup>, SHEN Jingjing<sup>1</sup>, CHEN Guangning<sup>1</sup>,  
LI Ling<sup>1</sup>, XUE Changhu<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

**Abstract:** *Pyropia* is one of the most commercially important marine algae. *Pyropia* cultivation of China ranks first in the world, but the production value remains low. Porphyran is the major polysaccharide from *Pyropia*. It consists of alternating 4-linked  $\alpha$ -L-galactopyranose-6-sulfate (L6S) residues and 3-linked  $\beta$ -D-galactopyranose (G) residues. Porphyran and its degradation products were confirmed to have various bioactivities, which is considered as an important way to realize the high-value application of *Pyropia*. In order to explore the glycoside hydrolase for degrading porphyran and verify the feasibility of its application, here, a porphyranase coding gene *por16B* was cloned from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The biochemical properties and hydrolysis patterns of the recombinant protein Por16B\_Wf were characterized. Por16B\_Wf exhibited maximum activity at 40 °C and pH 7.0, and it possessed stable activity under different pH conditions. Por16B\_Wf hydrolyzed porphyran by an endo-acting manner. The end products of Por16B\_Wf were mainly composed of porphyran disaccharides L6S-G. The subsite specificity of Por16B\_Wf was clarified by glycomics strategy. It specifically hydrolyzed the  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage of G-L6S, whereas it tolerated 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactopyranose and methyl-D-galactose in subsites -2 and +2, respectively. Furthermore, Por16B\_Wf was applied in the compound enzymolysis of *Pyropia*. Compared with the classical enzymolysis technique of *Pyropia* using neutral protease, the compound enzymatic hydrolysate was characterized with low viscosity (8.5 Pa·s) and high conversion rate (79.4%±0.3%) of *Pyropia*. Por16B\_Wf could be utilized as a promising tool for the degradation of porphyran. In this study, the compound enzymolysis of *Pyropia* was realized for the first time, which was beneficial to the full development of *Pyropia*, and provided new insights into the deep-processing and high-value utilization of *Pyropia*.

**Key words:** *Pyropia*; porphyranase; glycomics; hydrolysis pattern; compound enzymolysis

**Corresponding author:** CHANG Yaoguang. E-mail: changyg@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National Key R & D Program of China (2018YFC0311203); Fundamental Research Funds for the Central Universities (201941005)