

## Wenyngzhuangia 属海洋细菌产 $\beta$ -紫菜多糖酶的克隆表达及性质研究

冯瑞方<sup>1</sup>, 张玉莹<sup>1</sup>, 申晶晶<sup>1</sup>, 常耀光<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266003

<sup>2</sup> 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** 从海洋细菌 *Wenyngzhuangia aestuarii* OF219 中挖掘到一种新颖的  $\beta$ -紫菜多糖酶编码基因 *por16Z*, 对其进行生物信息学分析。利用分子生物学技术进行异源表达, 研究其生化性质, 采用高效液相色谱-质谱联用技术对降解产物进行解析。生化性质研究表明:  $\beta$ -紫菜多糖酶 Por16Z\_Wa 的最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 6.5, 在 pH 4.0~9.0 范围具有较好的稳定性, 且该酶具有适冷性。作用方式结果表明: Por16Z\_Wa 为内切酶, 其降解终产物主要由紫菜二糖构成, 含有少量的四糖及六糖, 且它们均为被修饰或取代后的紫菜寡糖。Por16Z\_Wa 作为紫菜多糖的新型工具酶, 能够高效、定向制备紫菜二糖, 对紫菜多糖的应用研究具有推动作用。

**关键词** 紫菜多糖; GH16 家族;  $\beta$ -紫菜多糖酶; 紫菜寡糖; 克隆表达

**文章编号** 1009-7848(2022)02-0098-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.011

紫菜是一种大型经济海藻, 目前中国紫菜栽培产业年产量达 11.4 万 t<sup>[1]</sup>, 居世界首位。紫菜多糖是紫菜的主要组成部分, 约占紫菜干重的 40%<sup>[2]</sup>。其存在于紫菜细胞壁及细胞间隙中<sup>[3]</sup>, 由(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖残基(G 残基)及(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -L-吡喃半乳糖-6-硫酸基残基(L6S 残基)交替组成<sup>[4]</sup>。研究表明, 紫菜多糖、低分子质量紫菜多糖及紫菜寡糖具有多种生物活性, 如清除活性氧自由基<sup>[5]</sup>, 抗神经炎症<sup>[6]</sup>, 抑制癌细胞生长<sup>[7]</sup>等, 是潜在的功能食品的功能因子。

酶法降解相比物理法和化学法, 具有反应条件温和、特异性强等特点, 是制备低分子质量降解产物及寡糖的重要手段。紫菜多糖酶是一类糖苷水解酶, 可特异性识别和降解紫菜多糖中的糖苷键。目前报道的序列仅有 5 条, 均为  $\beta$ -紫菜多糖酶, 催化紫菜多糖结构中  $\beta$ -1,4 糖苷键的断裂<sup>[4]</sup>。由法国团队发表的来源于海洋细菌 *Zobellia galactanivorans* 中的 PorA 和 PorB<sup>[4]</sup>是最早被报道的紫菜多糖酶, 且该团队于人类肠道细菌 *Bacteroides plebeius* 中挖掘到紫菜多糖酶 BpGH16B 和 BpGH86A<sup>[8]</sup>, 提出了由饮食习惯引起的紫菜多

糖酶基因转移至人类肠道细菌的新见解。此外, 本实验室研究人员以前期自主筛选的海洋细菌 *Wenyngzhuangia fucanilytica* 为基础, 挖掘到紫菜多糖酶 Por16A\_Wf<sup>[9]</sup>, 并阐明该酶的生化性质及作用方式。基于氨基酸序列分析, 目前发现的  $\beta$ -紫菜多糖酶分别归属于 2 个糖苷水解酶(Glycoside hydrolyase, GH)家族, 即 PorA、PorB、BpGH16B 及 Por16A\_Wf 归属于 GH16 家族<sup>[10]</sup>, BpGH86A 归属于 GH86 家族。

本文从海洋细菌基因组出发, 通过生物信息学和分子生物学相结合的技术, 挖掘并克隆表达新型紫菜多糖酶, 采用超高效液相色谱-质谱联用技术对作用方式进行解析。课题组前期分离纯化得到 1 株海洋细菌 *Wenyngzhuangia aestuarii* OF219, 并完成其全基因组测序。前期的生物信息学分析表明, 该细菌基因组中存在一条潜在的  $\beta$ -紫菜多糖酶基因 *por16Z*(MN639876)。本文对该序列进行生物信息学分析、大肠杆菌异源表达, 阐明重组蛋白 Por16Z\_Wa 的生化性质、动力学常数及作用方式, 为紫菜多糖这一重要藻类多糖的酶解及分子剪裁提供新型工具酶。

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671883)

作者简介: 冯瑞方(1998—), 女, 本科

通信作者: 常耀光 E-mail: changyig@ouc.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

干坛紫菜, 购自青岛水产市场; 海洋细菌

*Wenyngzhuangia aestuarii* OF219, 实验室自主筛选及保藏;基因组 DNA 抽提试剂盒,上海 Sangon Biotech 公司;高纯质粒小量快速提取试剂盒、BL21(DE3)感受态细胞,北京 Biomed 公司;pET-28a(+)质粒,北京 Annoron 公司;切胶回收试剂盒, Omega 公司;限制性内切酶 *Bam*HI/*Xho*I、预染蛋白分子质量标准, Thermo Fisher Scientific 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒, Beyotime Biotech 公司;OHpak LB-806M(8.0 mm×300 mm)色谱柱,日本 Shodex 公司;HiPrep™ 26/10 Desalting、HisTrap™ HP、Superdex 30 increase 3.2/300 GL 色谱柱,美国 GE Healthcare Life Sciences 公司。

## 1.2 仪器与设备

JY92-IIIN 超声波细胞粉碎机,宁波 Scientz 公司;Agilent 1260 Infinity、Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪、Agilent G6125B 质谱仪,美国 Agilent 公司;ÄKTA Prime Plus 蛋白纯化系统,美国 GE Healthcare Life Sciences 公司;NANODROP 2000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Dawn Heleos II MALLS 检测器,美国 Wyatt Technology 公司;iMark 酶标仪、T100TM PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 紫菜多糖的提取及纯化** 紫菜多糖的提取及纯化参考文献[11]的方法。利用粉碎机将干坛紫菜磨粉备用。紫菜粉末通过水提及乙醇沉淀法处理获得粗紫菜多糖。利用 ÄKTA Prime Plus 蛋白纯化系统,以凝胶排阻色谱法(色谱柱:HiPrep™ 26/60 Sephacryl S-400)纯化多糖,以次甲基蓝法<sup>[12]</sup>对各收集管进行检测,收集显色的各管进行透析、冻干,所得多糖用于后续试验。多糖的分子量由高效凝胶排阻色谱(High performance size exclusion chromatography, HPSEC)法测定,检测器采用多角度激光光散射仪(Multi-angle laser light scattering detector, MALLS)及示差检测器(Refractive index detector, RID)联用方法。本研究中使用的紫菜多糖分子量测定为(194.0±2.1) ku。

**1.3.2 生物信息学分析** 使用 SignalP 4.1<sup>[13]</sup>、db-CAN<sup>[14]</sup>、ExPASy<sup>[15]</sup>软件分别预测 Por16Z\_Wa 的信

号肽、结构域组成、分子量及等电点。利用 ClustalX<sup>[16]</sup>进行多序列比对并使用 MEGA6<sup>[17]</sup>基于邻接法建立进化树。利用 BLASTP<sup>[18]</sup>程序对 Por16Z\_Wa 与已报道的 GH16 家族  $\beta$ -紫菜多糖酶序列的相似度进行预测。

## 1.3.3 克隆表达及蛋白纯化

**1.3.3.1 克隆表达** 利用磁珠法提取 *W. aestuarii* OF219 基因组 DNA。通过无缝克隆技术扩增目的基因并构建质粒。上下游引物分别为 5'-GACACGGATCCATGATTGTATCATGTAGTAAAA AGAACACT-3'、5'-GACACCTCGAGTTATTGTT TGTCTTCTAATTTCCAAGTTCT-3'。酶切位点使用 *Bam*HI 及 *Xho*I。将目标序列进行 PCR 扩增,纯化后得扩增产物片段与含有 N 端 His 标签的载体连接,将构建的质粒进行检测,回收构建成功的质粒,并将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。将转化成功的菌株使用 Luria-Bertani 琼脂培养基于 37 °C、180 r/min 培养过夜,添加异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(培养基中终浓度为 0.5 mmol/L)并于 17 °C 低温诱导过夜。离心收集细胞沉淀并重悬于 20 mmol/L 柠檬酸-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.5)缓冲液中,通过超声破碎(400 W,共 99 次循环)获取粗酶液。

**1.3.3.2 蛋白纯化** 使用亲和色谱对粗酶液进行纯化(色谱柱为 HisTrap™ HP),以 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含 0.3 mol/L 氯化钠,pH 8.0)为流动相进行平衡,使用咪唑在 0~0.5 mol/L 范围进行线性梯度洗脱,观察紫外信号并收集有酶活的组分。进一步以凝胶排阻色谱柱(HiPrep™ 26/10 Desalting)进行脱盐,以 20 mmol/L 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 6.5)为流动相进行平衡。收集有酶活组分并利用 SDS-PAGE 测定蛋白分子量及纯度,纯化后的蛋白用于酶学性质的研究。

**1.3.4  $\beta$ -紫菜多糖酶酶活测定** 将紫菜多糖底物溶液(溶于 20 mmol/L pH 6.5 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液,质量浓度为 2 mg/mL)与适量稀释的酶液混合,45 °C 孵育 10 min,取出后立即置于 100 °C 金属浴灭活 5 min。反应体系中的还原糖增量以 pHBH 法<sup>[19]</sup>测定。酶活单位(U)定义为 1 mL 酶液 1 min 内水解底物产生 1  $\mu$ mol 还原糖(即 D-半乳糖)的

活力<sup>[20]</sup>。以 BCA 法测定蛋白浓度。

### 1.3.5 生化性质研究

1.3.5.1 温度对 Por16Z\_Wa 的影响 酶与底物在 4~50 °C 范围内反应,测定酶活力以研究重组蛋白的最适反应温度。将酶液在不同温度下(4, 25, 35, 45 °C)放置 24 h,探究温度对酶活稳定性的影响。

1.3.5.2 pH 值对 Por16Z\_Wa 的影响 酶与底物在不同 pH 值缓冲体系 (pH 3.0~6.5: 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液;pH 6.5~9.0:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液;pH 9.0~11.0:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液)中反应,测定酶活力以研究重组蛋白的最适反应 pH 值。将酶液置于上述不同的 pH 值条件下,在 4 °C 下存放 1 h 后调整至最适 pH 值,探究 pH 值对酶活稳定性的影响。

1.3.5.3 金属离子及化学试剂对 Por16Z\_Wa 的影响 向酶与底物的反应体系中添加终浓度为 0~0.6 mol/L 的 NaCl 和 KCl,研究 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>浓度对重组蛋白活力的影响。向反应体系中添加终浓度 1 mmol/L 的金属离子及化学试剂,测定 MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、HgCl<sub>2</sub>、β-巯基乙醇、SDS、EDTA 存在时酶活力的变化情况。

1.3.5.4 动力学常数的测定 根据米氏方程,在底物质量浓度为 0.1~1 mg/mL 时测定 Por16Z\_Wa 的动力学常数  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $K_{cat}$  及  $K_{cat}/K_m$ 。

1.3.6 作用方式及降解产物研究 以 0.1 U Por16Z\_Wa 酶解 100 mg 紫菜多糖底物(以 20 mmol/L 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液溶解至 2 mg/mL, pH 6.5),添加缓冲液补足至体系中紫菜多糖底物终质量浓度为 1 mg/mL,45 °C 下反应,并于不同时间间隔取样并灭活。酶解产物利用高效凝胶排阻色谱,以多角度激光光散射仪与示差检测器联用(HPSEC-MALLS-RID)测定分子质量。色谱柱为 Shodex OHpak LB-806M;流动相为 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4)。

为探究 Por16Z\_Wa 的降解终产物,以 7.5 U Por16Z\_Wa 与 100 mg 紫菜多糖底物(2 mg/mL,超纯水溶解)混合,于最适条件下充分反应,以获取终产物。利用超高效凝胶排阻色谱与质谱联用(UPSEC-MS)技术检测降解产物中的全部寡糖组分。凝胶排阻色谱柱:Superdex 30 increase 3.2/300<sup>[21]</sup>;流动相:10%乙腈,含 50 mmol/L 甲酸铵;流

速:0.075 mL/min;柱温:30 °C;进样体积:10 μL;质谱条件:气体流速 12 L/min;雾化压力 241.32 kPa;干燥气温度 300 °C;碎裂电压 110 V;扫描分子质量 100~2 000 u;离子源负离子模式。

### 1.4 数据统计

试验设计 3 个平行,利用统计分析软件 SPSS 16.0 进行显著性分析,以  $P < 0.05$  作为差异显著性检验的标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物信息学分析

Por16Z\_Wa 由 313 个氨基酸组成,其序列中含有一段 GH16 家族结构域(62~307)(如图 1 所示)。

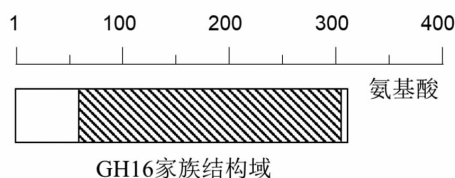


图 1 Por16Z\_Wa 结构域

Fig.1 Domain architecture of Por16Z\_Wa

GH16 家族是目前研究最为广泛的半乳聚糖降解酶家族之一,该家族酶具有广泛的底物多样性<sup>[22-23]</sup>,包括琼胶、紫菜多糖、地衣多糖、κ-卡拉胶以及海带淀粉。将 GH16 家族中已报道的糖苷水解酶与本研究的 Por16Z\_Wa 进行系统发育分析,发现不同底物的降解酶进化关系较近,其中 Por16Z\_Wa 与 GH16 家族中 β-紫菜多糖酶的进化地位相近,预示该序列具有 β-紫菜多糖酶活力。

GH16 家族 β-紫菜多糖酶的关键位点已被报道。其中,PorB<sup>[4]</sup>的关键催化位点为 E156 和 E161,关键识别位点为 W67 和 R70。目前,已报道的 4 条 GH16 家族 β-紫菜多糖酶在上述位点均保守。多序列比对结果表明,Por16Z\_Wa 在上述 4 个位点与 GH16 家族 β-紫菜多糖酶具有一致性(图 3),进一步提示该酶具有潜在的 β-紫菜多糖酶活力。同时,对 Por16Z\_Wa 以及已报道的 GH16 家族的蛋白序列进行 Blast 局部比对,发现序列相似度最高为 67.4%,相似度最高的酶为 *W. fucanilytica* 产紫菜多糖酶 Por16A\_WF<sup>[10]</sup>(覆盖率为 88%)。



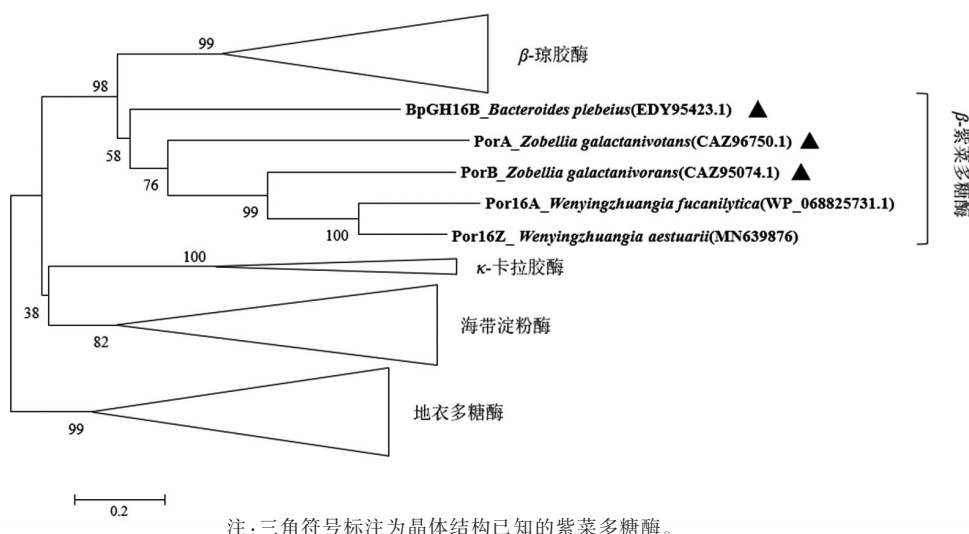


图 2 Por16Z\_Wa 与 GH16 家族糖苷水解酶构建的进化树

Fig.2 Evolutionary tree constructed by Por16Z\_Wa and GH16 family glycoside hydrolases

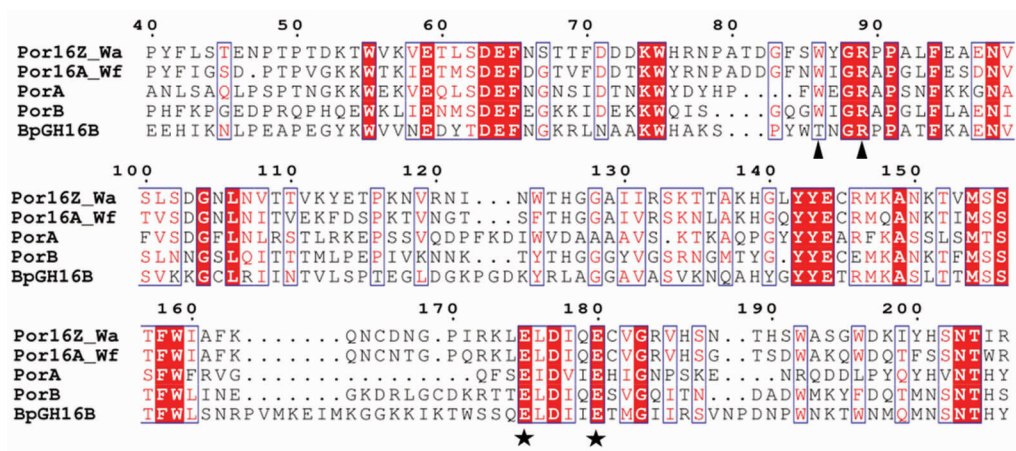
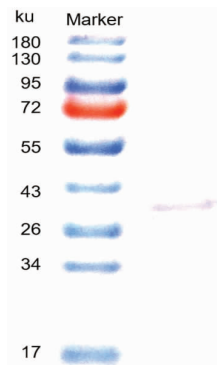


图 3 Por16Z\_Wa 的多序列比对结果

Fig.3 Multiple sequence alignment results of Por16Z\_Wa

2.2 功能验证

Por16Z\_Wa 实现了在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达,超声破碎后的上清液经镍柱亲和纯化后,在咪唑浓度为 0.2 mol/L 时,洗脱组分显示出 β-紫菜多糖酶活力,酶活为 (11.02±0.12)U/mg。纯化后的蛋白在电泳谱图中呈现单一条带,证明其纯度较高(图 4)。利用蛋白分子质量 Marker 计算得出重组蛋白的分子质量为 37.4 ku,与预测分子质量 (39.6 ku)吻合。上述结果证实 Por16Z\_Wa 为 β-紫菜多糖酶。



注:Marker 为预染蛋白分子质量标准。

图 4 纯化后 Por16Z\_Wa 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE of purified Por16Z\_Wa

## 2.3 酶学性质

2.3.1 温度对酶活的影响 反应温度对 Por16Z\_Wa 酶活的影响如图 5a 所示,该酶的最适反应温度为 45 °C。15 °C 和 20 °C 时的活力分别为最适温度的 63.0% 和 86.7%, 说明此酶具有适冷性; 相比于已阐明生化性质的 Por16A\_Wf, Por16Z\_Wa 可以在低温下反应同时保持较高的酶解速率, 有利于降低实际应用时的热能消耗。Por16Z\_Wa 的热稳定性如图 5b 所示, Por16Z\_Wa 在 4 °C 放置 24 h 时酶活基本保持不变。此外, 25

°C 放置 6 h 酶活残余率为 95.2%, 然而该酶在 35 °C 及 45 °C 下的酶活稳定性较差, 这一现象与多数海洋来源的糖苷水解酶性质相似<sup>[24-26]</sup>。

2.3.2 pH 值对酶活的影响 反应体系 pH 值对 Por16Z\_Wa 酶活的影响如图 5c 所示, 该酶的最适反应 pH 值为 6.5, 并在 pH 5~9 范围展现出较高活力, 说明该酶具有较广泛的 pH 适用范围。Por16Z\_Wa 的 pH 值稳定性如图 5d 所示, Por16Z\_Wa 在 pH 4.0~9.0 条件下酶活保持稳定 (酶活残余率大于 75%)。

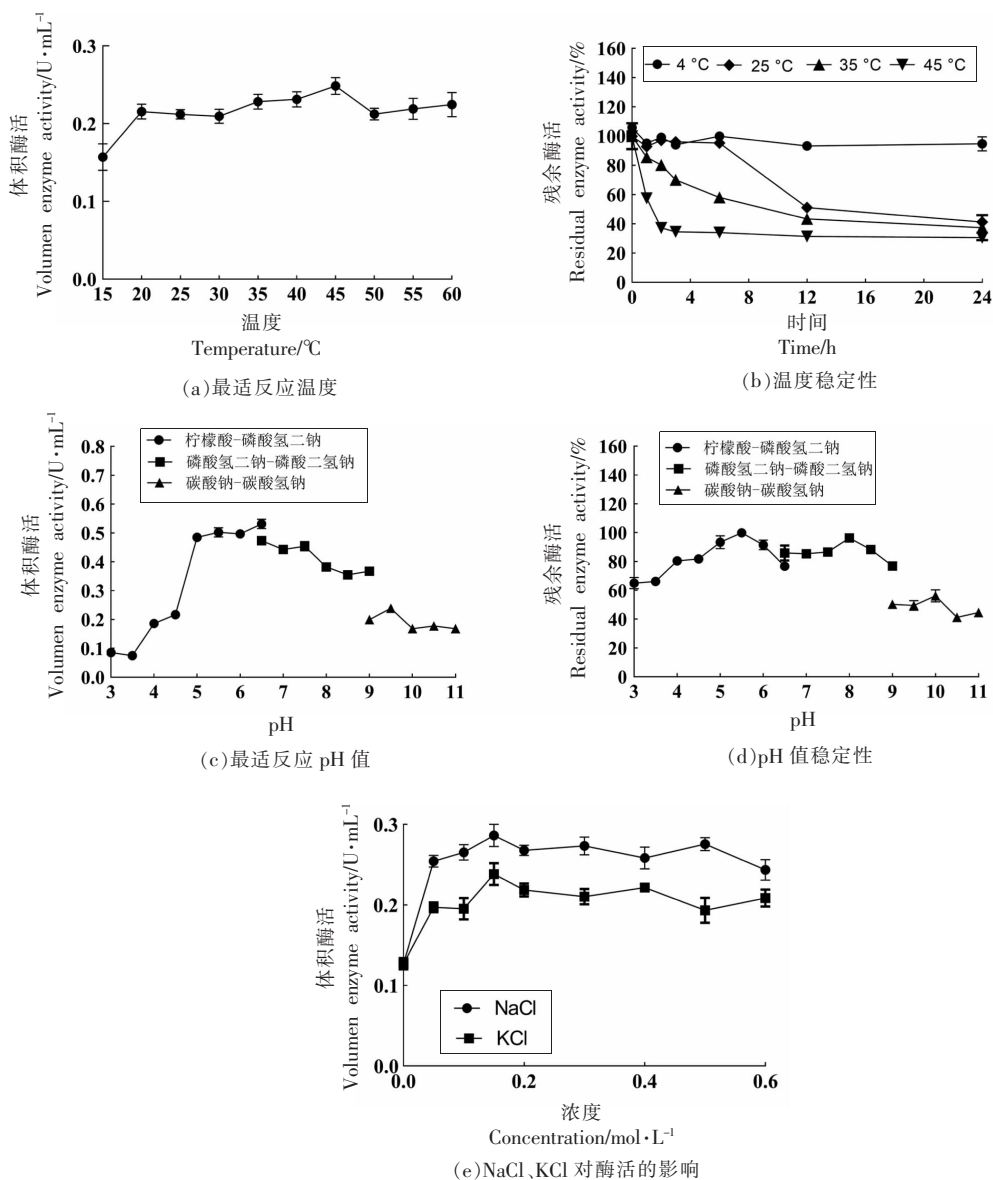


图 5 Por16Z\_Wa 酶学性质

Fig.5 Enzymatic properties of Por16Z\_Wa

2.3.3 NaCl、KCl、金属离子及化学试剂对 Por16Z\_Wa 酶活的影响 NaCl 和 KCl 对 Por16Z\_Wa 酶活的影响如图 5e 所示。与未经处理的反应体系相比,0.15 mol/L NaCl 和 0.15 mol/L KCl 可分别使 Por16Z\_Wa 的酶活提高 1.2 倍和 0.9 倍,Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 显著提高酶活的现象与 Por16A\_Wf 以及多种海洋来源的酶相一致<sup>[27]</sup>,此时底物的物理状态可能发生了改变,导致相对酶活的提高<sup>[28]</sup>。然而在不添加 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 的条件下, Por16Z\_Wa 仍然具有酶活,证明该酶活力的启动不依赖盐离子。在工业生产中,酶解产物中不含有盐离子可以避免后续繁琐的脱盐步骤,降低生产成本。

Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTA  $\beta$ -巯基乙醇及 SDS 均对酶活无显著影响,而 Mn<sup>2+</sup> 与 Hg<sup>2+</sup> 对酶活具有显著性抑制作用(图 6)。

2.3.4 动力学常数 控制反应体系中底物质量浓度为 0.1~1 mg/mL,于最适反应条件下测定 Por16Z\_Wa 的动力学常数,  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $K_{cat}$  和  $K_{cat}/K_m$  分别为 1.09 mg/mL、105.26 U/mg、69.44 s<sup>-1</sup>、12.36×10<sup>3</sup> L/(mol·s)。已报道的 Por16A\_Wf,其  $K_m$ 、 $K_{max}$ 、 $K_{cat}$  和  $K_{cat}/K_m$  分别为 0.54 mg/mL、17.54 U/mg、13.41 s<sup>-1</sup>、4.25×10<sup>3</sup> L/(mol·s),Por16Z\_Wa 的  $V_{max}$  及  $K_{cat}$  高于 Por16A\_Wf,证明该酶的催化效率较高。

## 2.4 作用方式和反应产物研究

将 0.1 U Por16Z\_Wa 与 100 mg 底物反应,反应产物经凝胶色谱柱分离后检测, MALLS 检测器检测得到在反应 10 min 及 30 min 后样品分子质量分别由初始的(194.0±2.1)ku 降至(89.9±1.3)ku 和(47.6±1.5)ku,这种短时间内分子质量急剧下降的现象证明 Por16Z\_Wa 为内切酶。

为探究降解终产物,利用 UPSEC-MS 对 7.5 U Por16Z\_Wa 酶解 100 mg 底物所得的终产物进行在线分离及检测,终产物组成如图 8 所示。Por16Z\_Wa 的降解终产物由 1 种二糖、3 种四糖及 3 种六糖组成。碳水化合物是一类非模板合成的生物大分子,其结构存在异质性,紫菜多糖也表现出相同性质<sup>[29]</sup>。据文献报道,紫菜多糖是琼脂糖的生物前体物,因此在紫菜多糖的糖链中含有琼脂糖的二糖单元的取代,约占 30%。其中,琼脂糖

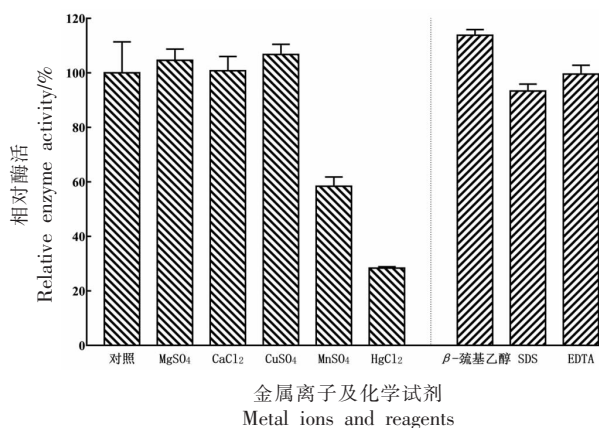
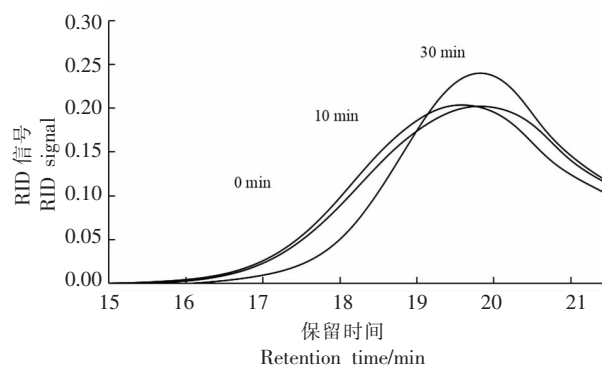


图 6 金属离子和化学试剂对 Por16Z\_Wa 酶活的影响

Fig.6 Effects of metal ions and chemicals on the activity of Por16Z\_Wa



注:样品反应时间分别为 0, 10, 30 min。

图 7 HPSEC-MALLS-RID 分析 Por16Z\_Wa 的酶解产物

Fig.7 HPSEC-MALLS-RID analysis of the hydrolysis products of Por16Z\_Wa

结构由 G 残基及 LA 残基 ((1-4)-O-3,6-内醚- $\alpha$ -L-吡喃半乳糖残基)交替连接构成<sup>[4]</sup>。此外,多糖链的 G 残基的 C6 位氧原子容易被甲基化修饰,修饰程度可高达 50%<sup>[30]</sup>。Por16Z\_Wa 的二糖产物仅有一种,即紫菜二糖(L6S-G),且高聚合度的紫菜四糖(L6S-G)<sub>2</sub> 及紫菜六糖(L6S-G)<sub>3</sub> 均未被检测到,证明 Por16Z\_Wa 能够识别并切割 G 与 L6S 之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,并将所有的紫菜二糖重复单元完全水解,具有高效制备紫菜二糖的潜力。此外,所有的四糖及六糖产物均为 LA-G 取代或者甲基化修饰的结构,而二糖产物中未发现相应的结构单元 LA-G 及 L6S-GMe 的生成,证明 Por16Z\_Wa 严格识别 G-L6S 之间的糖苷键。因

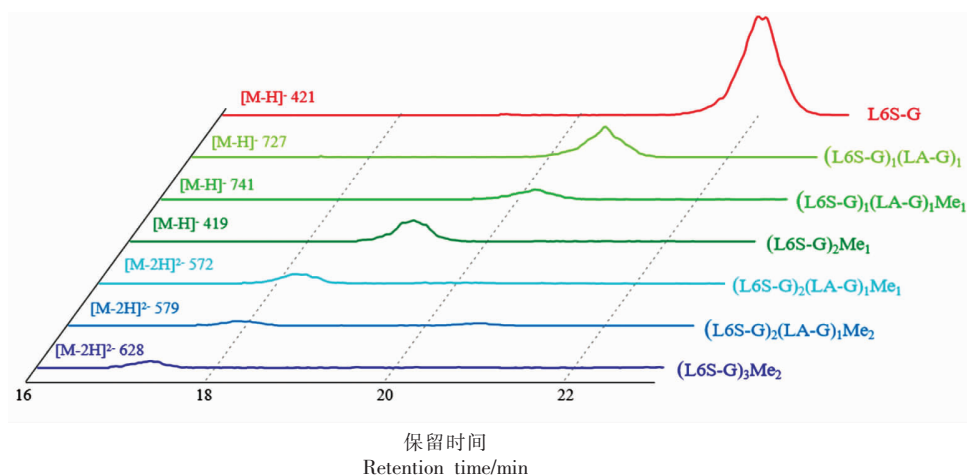


图8 Por16Z\_Wa 降解产物的提取离子流色谱图

Fig.8 EIC chromatogram of the end products of Por16Z\_Wa

此, Por16Z\_Wa 是一种紫菜多糖酶解的新工具, 可以用于紫菜寡糖及紫菜二糖的高效、定向制备。

### 3 结论

本研究从海洋细菌 *Wenyngzhuangia aestuarii* OF219 的基因组克隆并异源表达了一条新型的 GH16 家族  $\beta$ -紫菜多糖酶, 对其进行了生物信息学分析并研究了其生化性质及作用方式。45 °C、pH 6.5 是 Por16Z\_Wa 的最适反应条件, 其在 pH 4.0~9.0 及 4 °C 的环境中具有较好的稳定性, 20 °C 下仍能保持 80% 以上的酶活性。作用方式结果表明 Por16Z\_Wa 为内切酶。Por16Z\_Wa 的降解终产物主要由紫菜二糖构成, 并含有少量的四糖及六糖, 且四糖、六糖均为被取代或修饰的紫菜寡糖。Por16Z\_Wa 作为紫菜多糖的新型工具酶, 可以用于低分子质量紫菜多糖的制备及紫菜二糖的高效、定向制备, 该酶的研究有利于紫菜及紫菜多糖的高值化开发及利用。

### 参 考 文 献

[1] 丁洪昌, 严兴洪. 紫菜遗传育种研究进展[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 592-603.  
DING H C, YAN X H. Advances in *Porphyra* (formerly *Porphyra*) genetics and breeding[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 592-603.

[2] 韩莎莎, 黄臻颖, 沈照鹏, 等. 酶法降解坛紫菜多

糖及其产物分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 145-149.

HAN S S, HUANG Z Y, SHEN Z P, et al. Enzymatic degradation of polysaccharide from *Porphyra haitanensis* and analysis of its products[J]. Food Science, 2015, 36(21): 145-149.

- [3] ZHANG Q B, QI H M, ZHAO T T, et al. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta) [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(15): 2447-2450.
- [4] HEHEMANN J, 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] ZHANG Q B, YU P Z, LI Z E, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15(4): 305-310.
- [6] 刘英娟. 两类海藻寡糖对帕金森病模型的神经保护作用机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2018.  
LIU Y J. Neuroprotective effects of two kinds of algal oligosaccharides on Parkinsonian model[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2018.
- [7] 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.
- [8] HEHEMANN J, KELLY A G, PUDLO N A, et al. Bacteria of the human gut microbiome catabolize red



- seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(48): 19786-19791.
- [9] 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.
- [10] 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(SI): D233-D238.
- [11] CHANG Y G, HU Y F, MCCLEMENTS D J. Competitive adsorption and displacement of anionic polysaccharides (fucoidan and gum arabic) on the surface of protein-coated lipid droplets[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 820-826.
- [12] 续晓琪, 薛长湖, 张翠玉, 等. 次甲基蓝显色法定量海参硫酸软骨素[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 246-249.
- XU X Q, XUE C H, ZHANG C Y, et al. Determination of chondroitin sulfate from sea cucumber by methylene blue colorimetry[J]. Food Science, 2013, 34(22): 246-249.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[M]. Totowa: Humana Press, 1999: 531-552.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC 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.
- [17] 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.
- [18] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER 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.
- [19] 张翠玉, 薛长湖, 于龙, 等. 基于pHBH法的岩藻聚糖硫酸酯酶活测定方法[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 200-206.
- ZHANG C Y, XUE C H, YU L, et al. Fucoidanase activity determination method on basis of pHBH method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(7): 200-206.
- [20] 田雪健, 申晶晶, 常耀光. 来源于*Wenyngzhuangia*属海洋细菌的一种 $\beta$ -琼胶酶的克隆表达及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(8): 22-28.
- TIAN X J, SHEN J J, CHANG Y G. Cloning, expression, and characterization of a  $\beta$ -agarase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(8): 22-28.
- [21] HITCHCOCK A M, COSTELLO C E, ZAIA J. Glycoform quantification of chondroitin/dermatan sulfate using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform[J]. Biochemistry, 2006, 45(7): 2350-2361.
- [22] GERARD A, HENRISSAT B, KLOAREG B, et al. The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases[J]. Molecular Biology and Evolution, 1998, 15(5): 528-537.
- [23] CORREC G, HEHEMANN J, CZJZEK M, et al. Structural analysis of the degradation products of porphyran digested by *Zobellia galactanivorans*  $\beta$ -porphyranase A[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(1): 277-283.
- [24] CUI X, JIANG Y C, CHANG L Y, et al. Heterologous expression of an agarase gene in *Bacillus subtilis*, and characterization of the agarase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120(Pt A): 657-664.
- [25] CUI F Y, DONG S J, SHI X C, et al. Overexpression and characterization of a novel thermostable beta-agarase YM01-3, from marine bacterium *catenovulum agarivorans* YM01(T)[J]. Marine Drugs, 2013, 30(12): 2725-2729.



- 2014, 12(5): 2731–2747.
- [26] AN K, SHI X C, CUI F Y, et al. Characterization and overexpression of a glycosyl hydrolase family 16 beta-agarase YMO1-1 from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YMO1 (T)[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 143: 1–8.
- [27] SHEN J J, CHANG Y G, CHEN F, et al. Expression and characterization of a  $\kappa$ -carrageenase from marine bacterium *Wenyingzhuangia aestuarii* OF219: A biotechnological tool for the depolymerization of  $\kappa$ -carrageenan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 93–100.
- [28] CHAUHAN P S, SAXENA A. Bacterial carrageenases: An overview of production and biotechnological applications[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 146.
- [29] 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 Adv, 2015, 5(98): 80793–80803.
- [30] LAHAYE M, YAPHE W, VIET M T P, et al. <sup>13</sup>C-n.m.r. spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides[J]. Carbohydrate Research, 1989, 190(2): 249–265.

### Studies on Cloning Expression and Characterization of $\beta$ -Porphyranase from Marine Bacterium *Wenyingzhuangia aestuarii*

Feng Ruifang<sup>1</sup>, Zhang Yuying<sup>1</sup>, Shen Jingjing<sup>1</sup>, Chang Yaoguang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong

<sup>2</sup>Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong)

**Abstract** A novel GH16  $\beta$ -porphyranase gene *por16Z* was cloned from marine bacterium *Wenyingzhuangia aestuarii* OF219 and expressed in *E. coli*, and the biochemical properties and hydrolytic patterns of the recombinant protein Por16Z\_Wa were characterized. Por16Z\_Wa showed the maximum activity at 45 °C and pH 6.5 and keep stable at a wide pH range from 4.0 to 9.0. Por16Z\_Wa exhibited a cold-adapted property. Por16Z\_Wa was an endo-acting enzyme. The final products of Por16Z\_Wa were majorly composed of porphyran disaccharides L6S-G, with a minor portion of tetrasaccharides and hexasaccharides which were substituted by agarose moieties and (or) modified by methyl groups. Por16Z\_Wa could be utilized as a promising tool for degradation of porphyran and directional preparation of porphyran disaccharides, which would facilitate the investigation of porphyran polysaccharides.

**Keywords** porphyran; GH16 family;  $\beta$ -porphyranase; porphyran oligosaccharides; cloning and expression