

海洋微生物来源的岩藻多糖降解酶

张柯柯^{1,2} 刘伟治^{1,2} 律倩倩^{1,2*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266000)

(2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266000)

摘要: 近年来研究发现,岩藻多糖及其降解产物具有多种重要的生物学活性,对岩藻多糖降解酶的关注日益增多。本文概述了海洋微生物来源的岩藻多糖降解酶的发现、活性检测方法、性质、应用等方面的研究进展。同时展望了现代组学及结构生物学技术快速发展对海洋微生物来源的新型岩藻多糖降解酶研究的推动作用。

关键词: 岩藻多糖, 岩藻多糖降解酶, 海洋微生物, 组学技术

Fucoidan-degrading enzymes from marine microorganisms

ZHANG Ke-Ke^{1,2} LIU Wei-Zhi^{1,2} LYU Qian-Qian^{1,2*}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266000, China)

(2. Qingdao Marine Science and Technology National Laboratory, Marine Biology and Biotechnology Functional Laboratory, Qingdao, Shandong 266000, China)

Abstract: Recent studies have demonstrated that fucoidans and their degradation products possess various biological activities. Thus, the enzymes to hydrolyze fucoidans attract more attention. This review summarizes the recent achievements in the discovery, detection of activity, properties and application of fucoidan-degrading enzymes derived from marine microorganisms. Also, the approaches to understand fucoidan-degrading enzymes from marine microorganisms are introduced. It is expected that the rapid development of modern omics and structural biology will promote the research of novel fucoidan-degrading enzymes derived from marine microorganisms.

Keywords: Fucoidan, Fucoidan-degrading enzyme, Marine microorganism, Omics

岩藻多糖主要来源于褐藻^[1]和一些海洋无脊椎动物^[2-3],由 L-岩藻糖和硫酸基团组成,还含有少量的半乳糖、甘露糖、木糖和糖醛酸等,是一种化学组成和结构都十分复杂的海洋多糖。不同来

源、不同季节收获的岩藻多糖,其结构和组成也存在差异^[4]。例如,水云目(Ectocarpales)和海带目(Laminariales)的褐藻产生的岩藻多糖主要是由 α -L-岩藻糖通过 1→3 糖苷键连接而成;墨角藻目

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41706151); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016DB17)

*Corresponding author: E-mail: lqqdo@163.com

Received: February 28, 2018; **Accepted:** June 13, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 28, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(41706151); 山东省自然科学基金(ZR2016DB17)

*通信作者: E-mail: lqqdo@163.com

收稿日期: 2018-02-28; 接受日期: 2018-06-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-28

(Fucales)的褐藻产生的岩藻多糖主链主要是 1→3 和 1→4 糖苷键交替连接的 α -L-岩藻糖^[5-6]。对 1946 年采集的克氏海带(*Laminaria cloustoni*)、阔叶巨藻(*Laminaria saccharina*)、掌状海带(*Laminaria digitata*)、齿缘墨角藻(*Fucus serratus*)、墨角藻(*Fucus vesiculosus*)分析发现,无论是在柄和叶中,岩藻多糖的组成和含量都有着显著的季节性变化^[7]。研究发现,岩藻多糖具有抗凝血^[8]、抗血栓^[9]、抗癌^[10]、抗炎症和免疫调节^[11]等多种生物学功能,这些生物学活性与岩藻糖的结构有关^[12]。研究发现,与天然岩藻多糖相比,在正常柠檬酸化人血浆的凝血酶原时间加倍时,硫酸化的岩藻多糖显示出高 4 倍的抗凝血活性^[13]。岩藻多糖降解酶是岩藻多糖的结构研究及其寡聚物的制备不可或缺的工具。

岩藻多糖降解酶来源广泛,已报道从海水、海泥、海藻表面以及以海藻为食的海洋生物消化道中均筛选出岩藻多糖降解酶^[1,14-15],但主要还是来源于海洋微生物。目前,关于岩藻多糖降解酶的分离和表征只进行了少量研究,对岩藻多糖降解酶结构、底物特异性、裂解糖苷键的类型、催化活性与底物硫酸化程度之间的关系等研究结果较少。本文主要概述了近年来国内外海洋微生物来源的岩藻多糖降解酶的研究。

1 岩藻多糖降解酶的来源

岩藻多糖降解酶主要来源于海洋生物,大部分发现于海洋细菌,如弧菌(*Vibrio* sp.)^[16-17]、交替单胞菌科细菌(*Alteromonadaceae*)^[18]、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)^[19]和黄杆菌科细菌(*Flavobacteriaceae*)^[1]等。少量无脊椎动物^[20]和真菌^[15]也能降解岩藻多糖。

早在 1959 年, Yape 等^[21]就发现了可以产生岩藻多糖降解酶的海洋细菌 *P. atlantica* 和 *P. carrageenovora*。由于海洋特殊生长环境的影响,在之后的几十年里此类微生物都没有受到研究者关注。直到 90 年代后,研究者才相继开展了产岩

藻多糖降解酶的海洋微生物的筛选工作。Bakunina 等报道了具有高效岩藻多糖降解酶活性的海藻细菌,该研究从枯墨角藻(*Fucus evanescens*)和绳藻(*Chorda filum*)中筛选出 25 株附生海洋细菌,从海参(*Apostichopus japonicus*)中筛选出 53 株细菌^[22]。表 1 概述了部分岩藻多糖降解酶的来源及其天然底物。

2 岩藻多糖降解酶的活性检测

由于岩藻多糖结构较为复杂,单一的检测手段往往不能有效反映酶解情况。因此,在以往的研究中,根据总糖量或还原糖含量的变化、酶解产物分子量和电荷差异等,建立了多种岩藻多糖降解酶活性检测的方法。以下介绍几种常用的酶活性检测方法。

苯酚硫酸比色定糖法。在以岩藻多糖为唯一碳源的液体培养基中培养微生物,若反应体系中总糖含量下降,说明岩藻多糖被降解成低分子量的糖供微生物利用,则微生物具有降解岩藻多糖的能力,进而实现岩藻多糖降解酶的筛选^[18,24,32]。在待测样品中加入苯酚和浓硫酸后与糖反应产生橘黄色化合物,再以比色法检测 490 nm 处的吸光值,进而反映体系中的总糖含量。该方法简便易行、快速有效、适用于各种糖的测定。

还原糖含量测定法。多糖水解酶的活性通常是通过测量水解过程中产生的单糖和寡糖的还原糖量来确定^[33-34]。Kim 等^[35]通过 Somogyi-Nelson 比色法^[36]筛选到产岩藻多糖降解酶的微生物,但该方法在一些研究中是不成功的^[37],即通过电泳法检测到岩藻多糖被有效降解,但 Somogyi-Nelson 比色法测量的溶液还原能力接近于零,这一结果可能与水解后得到的寡糖产物的化学结构有关。

琼脂糖凝胶电泳法。Bilan 等^[25]用 *Littorina kurila* 的岩藻多糖降解酶处理来自 *Fucus distichus* 的岩藻多糖,然后将酶解产物进行琼脂糖凝胶电

表 1 岩藻多糖降解酶的来源及其底物特点
Table 1 The source of fucoidan-degrading enzymes and their substrates

微生物来源 Source	位置 Habitat	岩藻多糖底物来源 Source of fucoidan	岩藻多糖 分子量 Mr (kD)	岩藻糖与硫酸根的 摩尔比 Fuc/SO ₄ ²⁻ molar ratio	参考文献 References
<i>Acinetobacter</i> , <i>Alteromonas</i> / <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Coryneforms</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>	Intra-cellular	<i>Fucus evanescens</i>	300–500	1:0.8	[22]
		<i>Laminaria cichorioides</i>	60–80	1:1.7	
		<i>Laminaria japonica</i>	28–30	1:0.9	
<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	Intra-cellular	<i>Fucus vesiculosus</i>	ND	ND	[23]
		<i>Laminaria digitata</i>	ND	ND	
<i>Flavobacteriaceae</i> SW5	Extra-cellular	<i>Pervetia canaliculata</i>	ND	1:1.8	[1]
		<i>Ascophyllum nodosum</i>	ND	1:1.6	
		<i>Fucus spiralis</i>	ND	1:1.6	
<i>Fucobacter marina</i> SA-0082	Extra-cellular	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	ND	ND	[24]
<i>Littorina kurila</i>	Intra-cellular	<i>Fucus distichus</i>	ND	ND	[25]
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	Extra-cellular	<i>Fucus vesiculosus</i>	ND	ND	[21]
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Intra-cellular	<i>Nemacystus decipiens</i>	>480	ND	[26]
<i>Pecten maximus</i>	Extra-cellular	<i>Ascophyllum nodosum</i>	13	1:1.3	[27]
	Intra-cellular	<i>Ascophyllum nodosum</i>	25	1:1.1	[28]
	Intra-cellular	<i>L-fucopyranoside</i>	13	1:1.4	[29]
<i>Vibrio</i> sp. N5	Extra-cellular	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	ND	1:1.5	[16]
<i>Fucophilus fucidanolyticus</i>	Intra-cellular	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	2 000	ND	[30]
<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Extra-cellular	<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	ND	ND	[18]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> PF-1	Extra-cellular	<i>Undaria pinnatifida</i> sporophyll	1 246	ND	[31]

注：ND：未检测。
Note: ND: Not determinated.

泳。琼脂糖浓度为 0.6%，电极缓冲液为 50 mmol/L 1,3-丙二胺乙酸 pH 9.0，110 V 电泳 1 h。电泳结果检测到不同分子量和不同电荷的寡糖，该方法操作快速、简单，可用于分离多糖复合物^[38]。

白蛋白浊度法。Colin 等^[37]通过比浊法分析菌株的岩藻多糖降解酶活性，将菌株置于液体培养基中生长 1–7 d。加入酸性牛血清白蛋白(BSA)溶液，BSA 和高分子量岩藻多糖形成不溶性复合物，但与寡糖不能形成复合物，通过检测培养混合物的浊度变化来评估菌株的岩藻多糖降解酶活性。白蛋白浊度法对岩藻多糖降解酶的降解效率要求较高，在多数情况下可能并不适用。

菌落透明圈观察法。Silchenko 等^[39]开发了一种用岩藻多糖琼脂糖平板和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)染色来筛选和检测岩藻多糖降解酶活

性的方法。CTAB 是一种阳离子去污剂，可以与岩藻多糖形成白色水不溶性盐，酶促降解的岩藻低聚糖具有低电荷密度而不会被 CTAB 沉淀，因此通过观察菌落出现的透明圈可以分析岩藻多糖降解酶的活性，该方法对岩藻多糖降解酶的降解效率的要求也较高。

聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE)。碳水化合物的电泳通常称为碳水化合物聚丙烯酰胺凝胶电泳(C-PAGE)。在电泳之前通过冷冻或者加热终止酶促反应，上样缓冲液为甘油 10%、酚红 0.02%，浓缩胶为 5% (质量体积比)丙烯酰胺，其缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl pH 6.8，分离胶为 27% (质量体积比)丙烯酰胺，其缓冲液为 150 mmol/L Tris-HCl pH 8.8。染色液为邻甲苯胺蓝 0.01% (质量体积比)，无水乙醇:醋酸:水=2:1:1 (体积比)；或者

阿利新蓝结合银染进行染色^[40], 电泳图上的多条带对应于带负电的寡糖。该方法是鉴定岩藻多糖酶解产物最常用的方法^[1,41], 但缺点是耗时。

荧光辅助糖电泳法(FACE)。该方法是对C-PAGE的调整, 通过还原胺化反应, 引入单一荧光团或发色团来获得还原末端衍生物, 可定量估计反应混合物中的碳水化合物^[42]。各种芳香伯胺已被用于标记酶解产物, 聚磺酸衍生物如 8-氨基-1,3,6-萘三磺酸(ANTS)^[43]和 8-氨基-1,3,6-苊三磺酸(APTS)^[44]的多重负电荷决定了它们的电泳迁移率, 常被用于标记岩藻寡糖进行电泳分析。该方法的优点是极高的灵敏度和良好的分辨率, 允许定量分析低分子量产物(LMWP)的含量, 但缺点是昂贵且耗时。

综上所述, 各种酶活检测方法的联合使用及开发新型的酶活检测方法, 将有利于更多新型岩藻多糖降解酶的筛选和鉴定。

3 酶的作用方式和特异性

岩藻多糖的结构与组成比较复杂, 根据作用方式岩藻多糖降解酶主要分为: 岩藻多糖酶(Fucoidanase, EC 3.2.1.44)、 α -L-岩藻糖苷酶(Fucosidase, EC 3.2.1.51)和硫酸酯酶(Sulfatase, EC 3.1.6), 在它们的协同作用下, 共同完成岩藻多糖的降解。

岩藻多糖酶属于内切酶, 从糖链的内部或边缘水解硫酸化或未硫酸化的岩藻糖苷键, 产生不同聚合度的寡糖, 大多数已知的岩藻多糖降解酶是内切酶^[1,25,35,37,45-48]。为了确定岩藻多糖降解酶的底物特异性, 通常使用具有已知结构的各种底物。Colin 等^[37]使用鹿角藻(*Pelvetia canaliculata*)的岩藻多糖作为底物, 该底物是由重复的二糖单位构建而成的, 即通过交替的 α -1 \rightarrow 3 和 α -1 \rightarrow 4 糖苷键连接的硫酸化岩藻糖残基构成: [3)- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp-(2,3OSO₃⁻)-(1 \rightarrow)]_n。通过核磁共振谱比较天然岩藻多糖和酶解产物, 结果显示来自 *Mariniflexile fucanivorans* SW5^T 的岩藻多

糖降解酶主要作用于[3)- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp-(2,3OSO₃⁻)-(1 \rightarrow)]的 α -1 \rightarrow 4 糖苷键。

岩藻糖苷酶属于外切酶, 从多糖的非还原末端水解 α -L-岩藻糖苷键, 释放岩藻糖。来自海洋弧菌 *Vibrio* sp. N-5 的 3 个酶 E1、E2、E3 可以迅速降解来自厚叶解曼藻(*Kjellmaniella crassifolia*)的岩藻多糖^[16], 通过凝胶过滤和薄层层析分析, 主要产物是硫酸化岩藻糖, 由此说明这 3 种岩藻多糖降解酶均是外切酶。

硫酸酯酶主要负责岩藻多糖中硫酸基团的水解作用。硫酸酯酶的脱硫作用能极大地简化和促进像岩藻多糖这样复杂分子的结构研究。然而, 关于岩藻多糖硫酸酯酶的报道较少。Furukawa 等^[17]报道了来源于海洋细菌 *Vibrio* sp. N-5 的硫酸酯酶, 通过形成 BaSO₄ 的浊度测定法进行酶活检测, 该酶具有广泛的底物选择性, 可以降解 *Gagome* (海带)-、*Mozuku* (海发菜)-和 *Futomozuku* (海藻)-岩藻多糖释放硫酸基团。表 2 概述了部分岩藻多糖降解酶的理化性质和降解底物特异性。

岩藻多糖降解酶的底物特异性不仅表现在可裂解键的类型, 还与硫酸基团、乙酰基的位置有关。来自 *F. algae* KMM 3553^T (FFA)^[47]的岩藻多糖降解酶不能降解来自 *Saccharina cichorioides* (糖海带)的仅由 α -1 \rightarrow 3 糖苷键组成的岩藻多糖, 而可以降解来自 *F. evanescens* 和 *F. vesiculosus* 的由 α -1 \rightarrow 4 和 α -1 \rightarrow 3 糖苷键交替连接的岩藻多糖, 因此, 酶 FFA 具有 α -1 \rightarrow 4 糖苷键特异性。以脱硫酸岩藻多糖作底物时, 寡糖产量更低, 而以脱乙酰化的岩藻多糖作底物时, 寡糖产量增加, 说明硫酸基团和乙酰基对 FFA 的活性至关重要, 很可能是因为它们影响了酶和底物之间的结合。

此外, 部分裂解酶也参与岩藻多糖的降解。Sakai 等^[46]报道了来自海洋细菌 *Fucobacter marina* SA-0082 的胞外酶可以降解来自褐藻 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻多糖链[\rightarrow 4-D-GlcpUA β -1 \rightarrow 2(L-Fucp(3-O-sulfate) α -1 \rightarrow 3)D-Manp α 1-]_n 中 D-Manp 和 D-GlcpUA 之间的糖苷键。

表 2 岩藻多糖降解酶的理化性质和特异性
Table 2 Physico-chemical properties and specificity of the fucoidan-degrading enzymes

来源 Source	作用方式 Mode of action	底物结构 Substrate structure	产物 Product	Temperature- optimum (°C)	pH- optimum	抑制剂 Inhibitors	激活剂 Activators	参考文献 References
<i>Vibrio</i> sp. No. 5	Exo	<i>Kjellmaniella crassifolia</i> : [3]- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→), Branches: α -L-Fucp-1→2	Sulfated fucose	38–45	6.0	Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Co ²⁺	[16]
	Exo		Sulfated fucose	38–45	6.0	Ag ⁺	ND	
	Exo		Sulfated fucose	38–45	7.5	ND	ND	
<i>Fusarium proliferatum</i> LE1	Sulfatase	<i>Gagome</i> -, <i>Mozuku</i> -, <i>Futomozukuri</i> -fucoidan	SO ₄ ²⁻	40	7.5	ND	ND	[17]
	Exo	Synthesized: L-Fuc- α -(1→2)-D-Gal- β -(1→4)- β -D-GlcNAc-OMe, L-Fuc- α -(1→4)-GlcNAc-PAA, 6-O- α -L-Fuc-N,N'-diacetyl chitobiose	Sulfated fucooligosaccharides contained α -1→2, α -1→4, α -1→6 linked fucose residues	45	4.5–6.5	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	ND	[49]
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298	Endo, α -1→3	<i>Fucus evanescens</i> : [3]- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-(1→); <i>Saccharina cichorioides</i> : [3]- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-(1→)	Sulfated fucooligosaccharides contained α -1→3, α -1→4 linked fucose residues	ND	6.5–7.0	ND	ND	[50]
<i>Fucobacter marina</i> SA-0082	Endo, β -1→4	<i>Kjellmaniella crassifolia</i> : [3]- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→), [4]- β -D-GlcUA-1→2- β -D-Manp-(1→), Branches: α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3	Unsaturated sulfated fucoglucuronomanno oligosaccharides	40	7.5	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	NaCl	[32]
<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Endo, α -1→3	<i>Kjellmaniella crassifolia</i> : [3]- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→), Branches: α -L-Fucp-1→2	Sulfated fucooligosaccharides contained α -1→3 linked fucose residues	30–35	6.5–8.0	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	NaCl, Ca ²⁺	[51]
<i>Mariniflexile fucativorans</i> SW5 ^T	Endo, α -1→4	<i>Pelvetia canaliculata</i> : [3]- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→)	Sulfated fucooligosaccharides contained α -1→3, linked fucose residues	20–25	7.5	ND	Ca ²⁺	[1]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> PF-1	Endo	<i>Undaria pinnatifida</i> , Galactofucan	Sulfated fucooligosaccharides	40–45	6.0–7.0	Ca ²⁺ , K ⁺ , Ba ²⁺ , Cu ²⁺	Mn ²⁺ , Na ⁺	[31]
<i>Formosa algae</i> KMM 3553 ^T	Endo, α -1→4	<i>Fucus evanescens</i>	Sulfated fucooligosaccharides	ND	6.5–9.0	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺	[47]
<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	Endo	<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Laminaria digitata</i>	Oligosaccharides	50	6.0	ND	ND	[15]
<i>Fusarium</i> sp. LD8	Endo	<i>Fucus vesiculosus</i>	Oligosaccharides	60	6.0	ND	ND	[52]

注: ND: 未检测。
Note: ND: Not determined.

由表 2 及以上综述可知, 目前研究者只表征了岩藻多糖降解酶的基本理化性质和产物特异性, 对其结构与功能的研究还不够深入, 因此, 后续还需进一步研究其催化机理。

4 酶的应用

4.1 制备岩藻寡糖

岩藻多糖具有多种生物学活性, 正成为新一代天然功能保健食品、药物和化妆品开发的新宠。在医药保健品方面, 国内外以岩藻多糖为原料开发上市的商品中, 日本“Power Fucoidan Gold”产品对抗肿瘤效果较佳; Doctor Best 公司生产的“Best Fucoidan”具有强抗氧化/增强免疫的功能; 中国吉林省辉南长龙生化药业股份有限公司生产的海昆肾喜胶囊, 主要功效是化浊排毒, 用于慢性肾功能衰竭。在化妆品领域, 北京雷力联合海洋生物公司开发的海洋传奇系列保湿面膜、保湿水等化妆品, 主要成分就是岩藻多糖功能活性因子。研究表明, 岩藻多糖的生物学活性与其结构、硫酸根含量及其位置有关^[12], 而岩藻多糖的结构差异、高分子量和粘性等限制了其应用^[47,53], 尤其是作为治疗剂的应用, 具有较低分子量的生物活性低聚糖将有助于克服这些问题^[6,54-55]。而岩藻多糖降解酶可以特异地降解岩藻多糖, 并且酶解反应可控、反应条件温和、获得的产物均一、不会发生副反应等, 因此岩藻多糖降解酶是制备特定岩藻寡糖最理想的工具。

4.2 岩藻多糖结构分析

岩藻多糖的化学组成和糖基连接方式多样, 导致其结构复杂, 而岩藻多糖降解酶可作用于特定的糖苷键, 与红外光谱、气质联用和核磁共振等方法联合使用是推断岩藻多糖结构的有效手段。来自海洋细菌 *Flavobacteriaceae* CZ1127 的岩藻多糖降解酶^[56], 通过酶水解制备海参 (*A. molpadioides*) 岩藻多糖的寡糖产物, 经液质联用 (LC-MS) 纯化到水解产物中的 4 种主要寡糖, 通过核磁共振验证了寡糖的精细结构为: α -L-Fucp-1 \rightarrow

3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp, α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp, α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp 和 α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃(2-))-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp。

因此, 寻找降解岩藻多糖的新型酶已受到学术研究人员和工业界人士的广泛关注。新型岩藻多糖降解酶的发掘及作用机理的阐明, 不仅可以推动岩藻多糖的结构与生物活性之间关系的研究, 还可以改进低聚岩藻多糖的工业生产技术。

5 岩藻多糖降解酶的基因鉴定

到目前为止, 虽然有数个关于岩藻多糖降解酶的报道, 但编码岩藻多糖降解酶的基因知之甚少, 而且均未见相关酶的催化机制及三维结构的报道。

岩藻多糖酶是岩藻多糖降解中的关键酶, 也是当前岩藻多糖酶研究中的热点和难点。已报道的岩藻多糖酶的基因序列包括 *FcnA* (GenBank 登录号 CAI47003.1)、*Fda1* (GenBank 登录号 AAO00508.1)、*Fda2* (GenBank 登录号 AAO00509.1)、*SVI_0379* (GenBank 登录号 BAJ00350.1) 和 *ffa1* (GenBank 登录号 WP_057784217.1), 其中基因 *FcnA* 和 *ffa1* 已经实现了体外重组表达。

2006 年, Colin 等^[37]描述了来自海洋细菌 *M. fucanivorans* SW5^T 的岩藻多糖降解酶 *FcnA* 的基因。通过硫酸铵沉淀、离子交换、凝胶过滤和 SDS-PAGE 获得该蛋白, 并通过 Edman 降解法获得其氨基酸序列, 然后克隆 *FcnA* 的基因并测序, 通过大肠杆菌原核表达获得具有较高活性的重组蛋白, 该酶显示为内切型 α -L-岩藻多糖降解酶, 是新的 GH 家族 GH107 的第一种酶。

对海洋细菌 *F. algae* KMM 3553^T (GeneBank 登录号 PRJNA 299442) 基因组的分析, 已发现岩藻多糖降解酶基因序列的存在^[41]。通过 RAST 服务器使

用 pBLAST 对 *F. algae* 蛋白数据库进行岩藻多糖降解酶基因的预测, 与 *FcnA* (GenBank 登录号 CAI47003.1)、*Fda1* (GenBank 登录号 AAO00508.1)、*Fda2* (GenBank 登录号 AAO00509.1) 和 *SVI_0379* (GenBank 登录号 BAJ00350.1) 的基因序列比对, 在海洋细菌 *F. algae* KMM 3553^T 的基因组中鉴定了岩藻多糖降解酶的基因 *ffa1* (GenBank 登录号 WP_057784217.1), 序列分析显示岩藻多糖降解酶 FFA1 属于 GH107 家族。此外, 该研究团队于 2018 年 1 月分析了具有岩藻多糖降解酶活性的海洋细菌 *F. algae* KMM 8021^T (GeneBank 登录号 PRJNA224116) 的基因组。

近几年, 组学技术得到了快速发展, 并已成功应用于其他海洋多糖降解酶的发掘。如基于组学技术, 建立了海洋菌株 Alg07 的褐藻降解模型^[57]。该研究对分离鉴定的海洋菌株芽孢杆菌 *Bacillus weihaiensis* Alg07 的基因组进行从头测序, 基因注释和碳水化合物活性酶的分析结果表明, 该菌株含有可完全降解褐藻胶和昆布多糖的酶, 还发现了利用甘露醇的蛋白编码基因。为了解 *B. weihaiensis* Alg07 分解褐藻的过程, 进行了 RNA-Seq 转录组分析和 qRT-PCR。参与褐藻胶代谢的基因在褐藻降解的初始阶段都被上调表达, 这表明菌株 Alg07 首先降解褐藻胶以破坏细胞壁, 使得昆布多糖和甘露醇释放并随后分解, 并因此发现了新的褐藻胶裂解酶和昆布多糖酶。

随着高通量 DNA 测序技术的快速发展, 越来越多的物种完成了基因组测序和基因功能注释。与传统的蛋白质提取相比, 组学研究可以更精确地发现新型岩藻多糖降解酶。

6 结论和展望

岩藻多糖是海洋环境中特有的一类多糖, 具有多种生物学活性, 在医药卫生、食品保健等领域具有广阔的应用前景。岩藻多糖降解酶是深入开发岩藻多糖资源必不可少的工具。目前, 岩藻多糖降解酶的研究较少, 在国内外市场上岩藻多糖

降解酶的酶制剂严重缺乏。而且, 研究者只表征了岩藻多糖降解酶的基本生化性质, 对其具体催化机理, 结构与功能的关系研究还不够深入, 阻碍了岩藻多糖活性物质的开发和应用。因此, 继续发掘新型岩藻多糖降解酶, 仍是今后的一个研究方向。

随着基因组测序技术的快速发展, 获得了越来越多的微生物基因组信息, 为新型岩藻多糖酶的发掘提供了基础。此外, 结合结构生物学技术(晶体学与 NMR), 可从分子水平上阐明酶的作用机制。X-射线晶体学技术应用最广泛, 可用于研究酶与底物的复合物结构, 分析酶与底物的结合口袋中参与底物结合及催化的关键氨基酸; 结合定点突变技术, 可以研究关键氨基酸对酶活及底物结合特异性的影响。研究酶结构与功能之间的关系, 揭示酶的作用机理, 有助于进一步挖掘岩藻多糖和岩藻多糖降解酶的应用潜力。

REFERENCES

- [1] Descamps V, Colin S, Lahaye M, et al. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(1): 27-39
- [2] Ribeiro AC, Vieira RP, Mourão PA, et al. A sulfated α -L-fucan from sea cucumber[J]. *Carbohydrate Research*, 1994, 255(10): 225-240
- [3] Vilela-Silva ACES, Alves AP, Valente AP, et al. Structure of the sulfated α -L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition[J]. *Glycobiology*, 1999, 9(9): 927-933
- [4] Mian AJ, Percival E. Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea*, *bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*: Part I. extraction and fractionation[J]. *Carbohydrate Research*, 1973, 26(1): 133-146
- [5] Kusaykin M, Bakunina I, Sova V, et al. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds[J]. *Biotechnology Journal*, 2008, 3(7): 904-915
- [6] Holtkamp AD, Kelly S, Ulber R, et al. Fucoidans and fucoidanases—focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(1): 1-11
- [7] Black WAP. The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British Laminariaceae and fucaceae[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1954, 5(9): 445-448
- [8] Grauffel V, Kloareg B, Mabeau S, et al. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from

- brown algae[J]. *Biomaterials*, 1989, 10(6): 363-368
- [9] Min SK, Han SM, Kim HT, et al. Algal fucoidan, unlike heparin, has thrombolytic activity in a murine arterial thrombosis model[J]. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2012, 23(5): 359-366
- [10] Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity[J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(17): 2769-2776
- [11] Li B, Lu F, Wei XJ, et al. Fucoidan: structure and bioactivity[J]. *Molecules*, 2008, 13(8): 1671-1695
- [12] Boisson-Vidal C, Chaubet F, Chevolot L, et al. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure[J]. *Drug Development Research*, 2000, 51(4): 216-224
- [13] Qiu XD, Amarasekara A, Doctor V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63(2): 224-228
- [14] Bakunina IY, Shevchenko LS, Nedashkovskaya OI, et al. Screening of marine bacteria for fucoidanases[J]. *Microbiology*, 2000, 69(3): 303-308
- [15] Wu QQ, Zhang M, Wu K, et al. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(2): 197-203
- [16] Furukawa S, Fujikawa T, Koga D, et al. Purification and some properties of exo-type fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(11): 1829-1834
- [17] Furukawa SI, Fujikawa T, Koga D, et al. Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(8): 1499-1503
- [18] Sakai T, Kawai T, Kato I. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase[J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(4): 335-346
- [19] Ivanova EP, Bakunina IY, Sawabe T, et al. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 43(2): 242-249
- [20] Burtseva YV, Kusaikin MI, Sova VV, et al. Distribution of fucoidan hydrolases and some glycosidases among marine invertebrates[J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2000, 26(6): 453-456
- [21] Yaphe W, Morgan K. Enzymic hydrolysis of fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora*[J]. *Nature*, 1959, 183(4663): 761-762
- [22] Bakunina I, Shevchenko LS, Nedashkovskaia OI, et al. Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases[J]. *Mikrobiologiya*, 2000, 69(3): 370-376
- [23] Kelly S, Holtkamp A, Poth S, et al. Untersuchungen zur potenziellen fucoidanase-aktivität von *Dendryphiella arenaria*[J]. *Chemie Ingenieur Technik*, 2008, 80(3): 399-403
- [24] Sakai T, Kimura H, Kato I. A marine strain of *flavobacteriaceae* utilizes brown seaweed fucoidan[J]. *Marine Biotechnology*, 2002, 4(4): 399-405
- [25] Bilan MI, Kusaykin MI, Grachev AA, et al. Effect of enzyme preparation from the marine mollusk *Littorina kurila* on fucoidan from the brown alga *Fucus distichus*[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70(12): 1321-1326
- [26] Kitamura K, Matsuo M, Tsunoe Y. Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the Hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(3): 490-494
- [27] Berteau O, Mccort I, Goasdoue N, et al. Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*)[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 273-282
- [28] Daniel R, Berteau O, Jozefonvicz J, et al. Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*[J]. *Carbohydrate Research*, 1999, 322(3/4): 291-297
- [29] Daniel R, Berteau O, Chevolot L, et al. Regioselective desulfation of sulfated L-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollusk *Pecten maximus*: application to the structural study of algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*)[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(21): 5617-5626
- [30] Shimanaka K, Ikai K, Kato I, et al. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* Fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes[J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(6): 536-544
- [31] Kim WJ, Park JW, Park JK, et al. Purification and characterization of a fucoidanase (FNase S) from a marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis* PF-1[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(7): 4398-4417
- [32] Sakai T, Ishizuka K, Kato I. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium[J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(5): 409-416
- [33] Ivanova EP, Bakunina IY, Nedashkovskaya OI, et al. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens*[J]. *Current Microbiology*, 2003, 46(1): 6-10
- [34] Kusaikin MI, Chizhov AO, Alekseeva SA, et al. A comparative study of the specificity of fucoidanases of marine microorganisms and invertebrates[J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2004, 396(1/6): 187-189
- [35] Kim WJ, Kim SM, Lee YH, et al. Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophylls[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(4): 616-623
- [36] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, 153(2): 375-380
- [37] Colin S, Deniaud E, Jam M, et al. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(11): 1021-1032
- [38] Dietrich CP, Farias GGM, de Abreu LRD, et al. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class *Phaeophyceae*[J]. *Plant Science*, 1995, 108(2): 143-153
- [39] Silchenko AS, Khanh HHN, Hang CTT, et al. A simple plate method for the screening and detection of fucoidanases[J]. *Achievements in the Life Sciences*, 2015, 9(2): 104-106
- [40] Min H, Cowman MK. Combined alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: application to

- electrophoretic analysis of molecular weight distribution[J]. Analytical Biochemistry, 1986, 155(2): 275-285
- [41] Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, et al. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 175: 654-660
- [42] Fan JQ, Huynh LH, Lee YC. Purification of 2-aminopyridine derivatives of oligosaccharides and related compounds by cation-exchange chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 232(1): 65-68
- [43] Jackson P. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device[J]. Biochemical Journal, 1990, 270(3): 705-713
- [44] Chen FTA, Evangelista RA. Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 230(2): 273-280
- [45] Thanassi NM, Nakada HI. Enzymic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone, *Haliotis* species[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967, 118(1): 172-177
- [46] Sakai T, Kimura H, Kojima K, et al. Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides[J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(1): 70-78
- [47] Silchenko AS, Kusaykin MI, Kurilenko VV, et al. Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, formosa algae[J]. Marine Drugs, 2013, 11(7): 2413-2430
- [48] Silchenko AS, Kusaykin MI, Zakharenko AM, et al. Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 102: 154-160
- [49] Shvetsova SV, Shabalin KA, Bobrov KS, et al. Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from *Fusarium proliferatum* LE1 that is regioselective to α -(1 \rightarrow 4)-L-fucosidic linkage in the hydrolysis of α -L-fucobiosides[J]. Biochimie, 2017, 132: 54-65
- [50] Bakunina IY, Nedashkovskaya OI, Alekseeva SA, et al. Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*[J]. Microbiology, 2002, 71(1): 41-47
- [51] Takayama M, Koyama N, Sakai T, et al. Enzymes capable of degrading a sulfated-fucose-containing polysaccharide and their encoding genes[P/OL]. US6489155B1, 2002-12-03, <http://www.freepatentsonline.com/6489155.html>
- [52] Wu QQ, Ma S, Xiao HR, et al. Purification and the secondary structure of fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 2011: 196190
- [53] Ji J, Wang LC, Wu H, et al. Bio-function summary of marine oligosaccharides[J]. International Journal of Biology, 2011, 3(1): 74-86
- [54] Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide[J]. Glycobiology, 2003, 13(6): 29R-40R
- [55] Courtois J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(3): 261-273
- [56] 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
- [57] Zhu YM, Chen P, Bao YJ, et al. Complete genome sequence and transcriptomic analysis of a novel marine strain *Bacillus weihaiensis* reveals the mechanism of brown algae degradation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38248