DOI:10.12441/spyswjs.20221116005 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0077-08

来源于 *Reinekea thalattae* 的褐藻胶裂解酶酶学性质研究

王鑫绣[1] 徐 炜[1,2] 戴泉玉[3] 刘晓勇[2] 光翠娥[1] 张文立[1,2*] 沐万孟[1]

(1. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 山东海之宝海洋科技有限公司,山东 威海 264333; 3. 中国农村技术开发中心,北京 100045)

摘要:褐藻胶裂解酶可将褐藻胶有效降解为褐藻寡糖(alginate oligosaccharides, AOS),AOS具有良好的物理特性和生理功能,在食品、化妆品和医药等领域有着广泛应用。为高效制备AOS,筛选并鉴定了一种来自 *Reinekea thalattae* 的PL-7家族新型褐藻胶裂解酶Reth-aly,将Reth-aly的编码基因克隆并在大肠杆菌BL21中高效表达。在pH 7.5(Tris-HCl缓冲液)、35 ℃、600 mmol/L NaCl的条件下,Reth-aly表现出最高的催化活性。以海藻酸钠为底物,其催化活性可达765.7 U/mg,降解产物包含聚合度(degree of polymerization, DP)2~4的AOS。与其他PL-7家族褐藻胶裂解酶相比,其在35 ℃下的半衰期为5.4 h,具有良好的稳定性。Reth-aly在高盐环境中表现出良好的催化活性,在AOS生物生产中具有良好的应用前景。

关键词:褐藻寡糖;褐藻胶;褐藻胶裂解酶;酶学性质;生物制备

Enzymatic Characterization of an Alginate Lyase from *Reinekea thalattae*

WANG Xinxiu[1] *XU Wei*[1,2] *DAI Quanyu*[3] *LIU Xiaoyong*[2] *GUANG Cuie*[1] *ZHANG Wenli*[1,2*] *MU Wanmeng*[1]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Shandong Haizhibao Ocean Technology Co. , Ltd. , Weihai 264333, China; 3. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China)

Abstract: Alginate lyases could effectively degrade alginates into alginate oligosaccharides (AOS). AOS have good physical characteristics and excellent physiological functions, and are widely applied in the fields of food, cosmetics, and pharmaceuticals. To efficiently prepare AOS, a novel alginate lyase belonging to the PL-7 family and derived from *Reinekea thalattae* was screened and identified, designated as Reth-aly. The encoding gene of Reth-aly was cloned and overexpressed in *Escherichia coli* BL21. Under conditions of pH 7.5 (Tris-HCl buffer), 35 ℃ and 600 mmol/L NaCl, Reth-aly demonstrated its highest catalytic activity. With sodium alginate as the substrate, its catalytic activity reached 765.7 U/mg. Degradation products included AOS with a degree of polymerization (DP) of 2~4. Compared with other PL-7 family alginate lyases, it showed good stability with a half-life of 5.4 h at 35 ℃ . Reth-aly showed robust catalytic activity in high-salt environments, indicating promising application prospects in AOS bioproduction.

Keywords: alginate oligosaccharides; alginate; alginate lyase; enzymatic characterization; bioproduction

---

基金项目:国家自然科学基金优秀青年基金项目(31922073);中国博士后科学基金面上项目(2020M671979);山东省博士后创新项目(202001018)。

通信作者:张文立(1989—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:wenlizhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-11-16 **改回日期:**2022-12-29

海洋生物资源丰富多样，从海洋生物中提取的活性物质是人类膳食营养和生物医学的巨大资源宝库。大型藻类是海洋生物中重要的一类，一般包括红藻、绿藻和褐藻[1]。褐藻主要生活在海水中，大多属于多细胞生物，具有多样的生态作用。褐藻胶主要来源于两种褐藻（海带目与墨角藻目）的细胞壁[2]，是一种具有多种生理作用的线性酸性多糖。褐藻酸盐是难溶的褐藻胶使用碱溶解而成，包含由1,4-糖苷键连接的*α-L*-古罗糖醛酸（guluronic acid, G）及其C-5差向异构体*β-D*-甘露糖醛酸（mannuronic acid, M），可大致分为聚古罗糖醛酸片段（polyG）、聚甘露糖醛酸片段（polyM）和聚MG/GM片段3种局部结构[3]。由于褐藻酸盐溶解性差、生物利用度低，极大地限制了其生理效应的应用。

褐藻寡糖（alginate oligosaccharides, AOS）是褐藻酸盐的降解产物，通常DP为2~25，具有调节人体代谢[4]、抑菌[5]、调控农作物生长[6]等多种生理功能，因此AOS具有广阔的应用前景。通常，AOS可以通过化学、物理或生物酶分解方法获得。相对于理化方法，生物酶法生产AOS具有条件温和、环保、易于控制[7]、具有独特双键结构等优点。

褐藻胶裂解酶在AOS的生物生产过程中起着重要作用，通过*β*消除将褐藻酸盐降解为AOS。它属于多糖裂解酶家族（polysaccharide lyase, PL），可广泛从海洋软体动物、海洋微生物、藻类和陆生细菌[8]等来源中分离得到。根据CAZy数据库，褐藻胶裂解酶主要出现在PL-5、PL-6、PL-7、PL-14、PL-15、PL-17、PL-18、PL-31、PL-32、PL-34、PL-36和PL-39中[9]。大多数已报道的褐藻胶裂解酶集中在PL-5、PL-6、PL-7和PL-14家族中。此外，根据对底物不同片段的偏好可分为polyM特异性、polyG特异性和双功能酶[10]。很多已报道的褐藻胶裂解酶的催化活性较低，极大限制了AOS的工业生产，例如来源于*Shewanella* sp. Kz7的褐藻胶裂解酶OalS6（属于PL-6家族）[11]，来源于*Microbulbifer* sp. SH-1的褐藻胶裂解酶AlgSH7（属于PL-7家族）[10]。因此，筛选出一种催化效率高、稳定性较好的褐藻胶裂解酶是非常必要的。

在本研究中，鉴定出一种从*Reinekea thalattae*来源的PL-7家族褐藻胶裂解酶，并利用大肠杆菌克隆高效表达，重组蛋白命名为Reth-aly，并对Reth-aly进行了纯化和酶学性质表征，旨在为AOS的应用前景拓展提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与主要试剂 宿主菌株*E. coli* DH5α和*E. coli* BL21（DE3）、抗生素氨苄青霉素（ampicillin，Amp）、诱导剂IPTG（*β-D*-1-thiogalactopyranoside）、海藻酸钠：生工生物工程（上海）股份有限公司；褐藻寡糖等标准品：青岛博智汇力生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备 SCIENTZ-IID型超声波细胞破碎仪：宁波新芝生物科技股份有限公司；蛋白质电泳仪系统：美国Bio-Rad公司；SpectraMax M2型多功能酶标仪：美谷分子仪器（上海）有限公司；三重四极杆液质联用仪、WATERS ACQUITY UPLC型色谱仪：美国沃特世公司。

1.2 试验方法

1.2.1 构建重组质粒 从NCBI数据库中筛选到可能为褐藻胶裂解酶的基因片段，利用SignalP 5.0在线网站（https://services. healthtech. dtu. dk/services/SignalP-5.0）预测可能存在的信号肽位置，并删去信号肽（前34个氨基酸）相关的基因片段。设计时，在目的蛋白质C端添加6个组氨酸标签，以方便使用镍柱进行后续蛋白纯化工作。在表达载体pET-22b（+）选取酶切位点*Nde* I和*Xho* I，在位点中间插入设计好的目的基因，构建重组质粒，命名为pET22b-reth。

1.2.2 诱导表达与重组蛋白纯化 利用热激法将质粒转入表达宿主*E. coli* BL21（DE3），挑取转化子单菌落接种于4 mL的LB培养基（Amp 100 μg/mL），37 ℃培养过夜；向200 mL的LB培养基（Amp 100 μg/mL）接种体积分数为2%的种子液，继续在37 ℃培养2~3 h。培养至OD_{600}约为0.6后，添加终浓度为1 mmol/L的IPTG，在28 ℃下诱导表达6 h，获得的重组酶命名为Reth-aly。

25 ℃、6 000 r/min离心5 min收集菌体，保存于−20 ℃。添加细胞裂解液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；100 mmol/L NaCl），重悬后使用超声裂解，4 ℃、8 000 r/min离心15 min去除细胞碎片，所得上清液即为粗酶液。将粗酶液经孔径0.45 μm的水系膜过滤去除杂质后，泵入经结合洗脱液

（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；500 mmol/L NaCl）平衡的 Ni^{+} 亲和层析柱，使用洗涤缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；500 mmol/L NaCl；50 mmol/L 咪唑）洗去杂质后，再使用洗脱缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；500 mmol/L NaCl；500 mmol/L 咪唑）纯化获得目的蛋白质。随后，将重组酶溶液转移至透析袋（截留相对分子质量为 10 000）中，低温透析去除咪唑与金属离子。将透析后的纯净酶液从透析袋取出，于 4 ℃保存。纯化后的纯酶液经蛋白质凝胶电泳（SDS-PAGE）验证纯度。

1.2.3 *蛋白质质量浓度测定* 以牛血清白蛋白作为标准，使用 BCA 法在 560 nm 下定量测定蛋白质质量浓度。

1.2.4 *酶活测定* 在 35 ℃、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）、600 mmol/L 的 NaCl、质量分数 0.35% 的海藻酸钠的条件下，添加 0.4 μg/mL 的重组酶，恒温水浴 5 min。采用 DNS 法测定酶活，反应结束后沸水浴 5 min 终止反应，然后取适当稀释的反应液加入 2 倍体积 DNS 试剂，沸水浴 5 min 后迅速冷却，再加入 3 倍体积水，在 560 nm 波长下测定吸光度。以葡萄糖为还原糖标准，计算反应生成的还原糖的量。酶活单位（unit，U）定义为：1 min 生成 1 μmol 还原糖所需要的酶量。

1.2.5 *酶学性质鉴定*

（1）最适反应温度测定：在 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）、600 mmol/L 的 NaCl 条件下，测定不同温度（15、20、25、30、35、40、45、50、55 ℃）下褐藻胶裂解酶 Reth-aly 活力。以最高酶活作为 100%，计算各条件下相对酶活。

（2）最适反应 pH 测定：在 35 ℃、600 mmol/L 的 NaCl 条件下，在不同 pH 溶液（醋酸-醋酸钠缓冲液，pH 5.0~6.0；磷酸钠缓冲液，pH 6.0~7.5；Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5~9.0；甘氨酸-NaOH 缓冲液，pH 9.0~10.0）中测定褐藻胶裂解酶 Reth-aly 的酶活。以最高酶活作为 100%，计算各条件下相对酶活。

（3）最适 NaCl 浓度测定：在 35 ℃、50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）条件下，测定不同 NaCl 浓度（0、25、50、100、200、400、600、800、1 000、1 500、2 000 mmol/L）条件下褐藻胶裂解酶 Reth-aly 的酶活。以最高酶活作为 100%，计算各条件下相对酶活。

（4）底物特异性测定：设置底物海藻酸钠、polyM、polyG 质量分数均为 0.35%，分别测定 Reth-aly 对各底物的酶活。在（1）~（3）所测定的最适反应条件下，采用 DNS 法测定针对不同底物的相对酶活（以对海藻酸钠的酶活作为 100%）。

（5）热稳定性测定：对酶液适当稀释后，分别在 30、35、40 ℃下保温，在（1）~（3）所测定的最适反应条件下，测定不同保温时间后残余的酶活。以未处理的酶活作为 100%，分别计算各温度处理后的相对残余酶活。

1.2.6 *反应产物组成分析* 使用薄层层析色谱（thin-layer chromatography, TLC）与液相-质谱联用（liquid chromatograph-mass spectrometer，LC-MS）方法检测酶反应产物组成。

在 1.2.5 部分（1）~（3）所测定的最适反应条件下，以最终质量分数 1% 的海藻酸钠作为底物，加 0.4 μg/mL 重组酶反应 8 h，通过 TLC 检测不同反应时间的产物组成。检测条件：薄层层析板为硅胶 60（GF254 型，购自美国默克公司）；展开剂中 V（正丁醇）∶V（甲酸）∶V（水）=4∶6∶1；显色剂中 V（硫酸）∶V（乙醇）=1∶9，置于 105 ℃下加热显色。

向反应 8 h 后的产物中加入无水乙醇，使 V（产物）∶V（无水乙醇）=2∶3，沉淀、离心、去除长链多糖和酶蛋白，加去离子水稀释 8 倍后，使用 LC-MS 检测反应产物组成。

液相色谱条件：BEH C18 型分析柱规格为 1.7 μm×2.1 mm×150 mm；流动相为体积分数 0.1% 的甲酸水溶液；流量 0.3 mL/min；柱温 45 ℃；进样量 5 μL。

MS 检测条件：离子方式采用电喷雾离子源（electron spray ionization，ESI）负模式，毛细管电压 3.0 kV，锥孔电压 20 V，离子源温度 100 ℃，去溶剂化温度 400 ℃，脱溶剂气流量 700 L/h，锥孔气流量 50 L/h，碰撞能量 6 eV，质荷比范围 50~1 500；离子化电压 1 800 V。

1.3 数据处理

序列比对结果使用 CLUSTAL OMEGA 与 ESPript 3.0 在线网站作图。拍摄的照片使用画图软件与 Adobe Photoshop 软件处理。相关试验数据使用 Microsoft Excel 整合处理，使用 Originlab Origin 2021 作图。

2 结果与分析

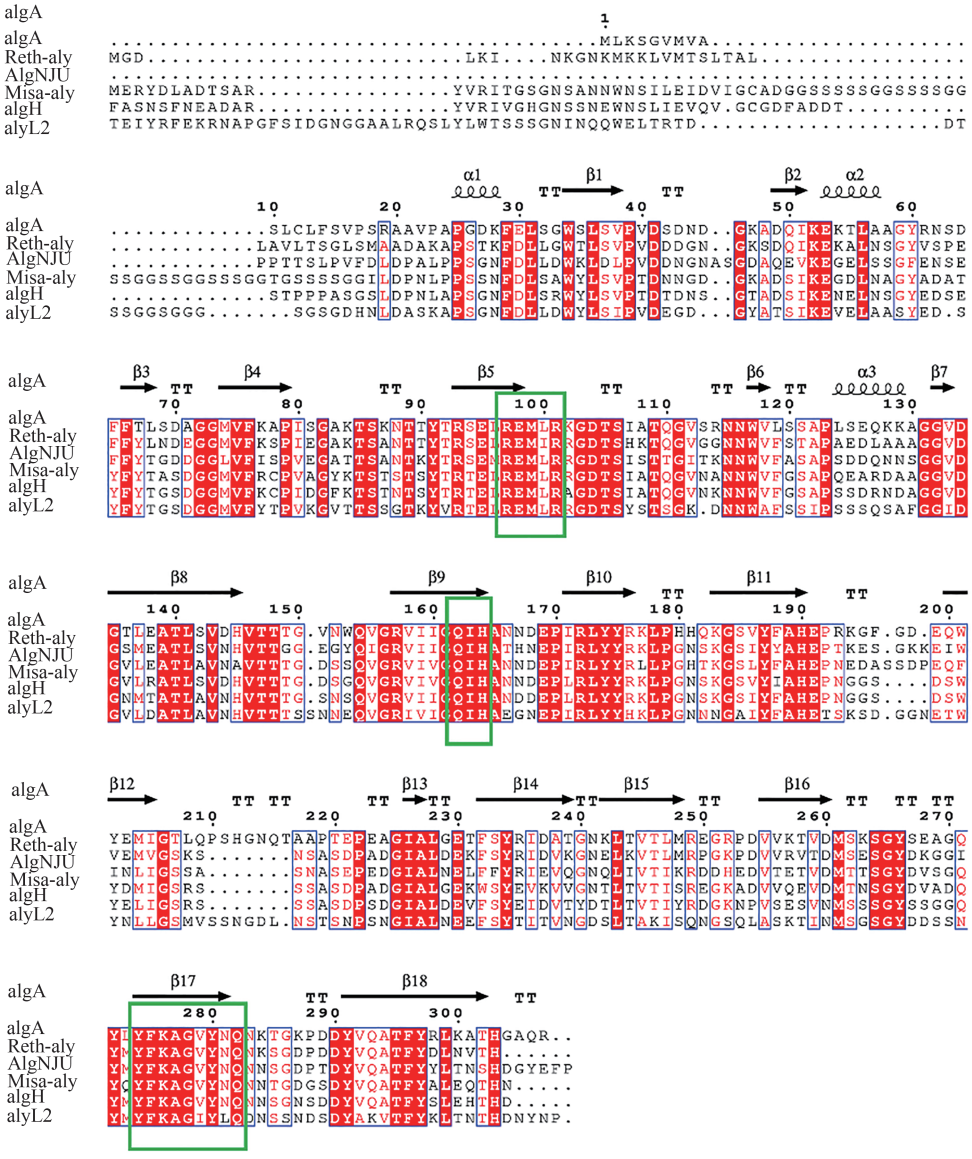
2.1 同源性分析

将来源于 *Reinekea thalattae* 的可能为褐藻胶裂解酶的氨基酸片段 WP_147714992.1 命名为 Reth-aly。图 1 为 Reth-aly 与其他几个 PL-7 家族褐藻胶裂解酶的序列比对图。

Reth-aly 蛋白序列与已报道的一种属于 PL-7 家族、来源于 *Vibrio* sp. 的裂解酶 AlgNJU（登录号 ASA33933.1）比对，相似度为 57.4%。从序列比对图可见，Reth-aly 同样具有 PL-7 家族的独有保守区域（RXEXR、YXKAGXYXQ、QXH），由此可以证实该酶属于 PL7 家族中一种新的褐藻胶裂解酶。

2.2 蛋白质表达纯化

通过镍柱纯化系统分离纯化大肠杆菌诱导表达的重组蛋白 Reth-aly。截去信号肽后，该蛋白质序列含有 285 个氨基酸，通过 ExPASy 网站在线预测，得到理论蛋白质相对分子质量为 31.27。对纯化

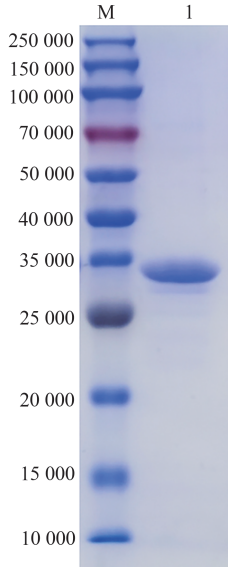


algA—微生物来源为 *Klebsiella pneumoniae*，GenBank 编号为 AAA25049.1，PDB 编号为 4ozx；Reth-aly—微生物来源为 *Reinekea thalattae*，GenBank 编号为 WP_147714992.1；AlgNJU—微生物来源为 *Vibrio* sp.，GenBank 编号为 ASA33933.1；Misa-aly—微生物来源为 *Microbulbifer salipaludis*，GenBank 编号为 WP_207000102.1；algH—微生物来源为 *Marinimicrobium* sp.，GenBank 编号为 QGU34249.1；alyL2—微生物来源为 *Agarivorans* sp. L11，GenBank 编号为 AJO61885.1。

图 1 PL-7 家族几种褐藻胶裂解酶的氨基酸序列比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of amino acids from several PL-7 family alginate lyases

后的酶液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳验证，结果见图2。在理论蛋白质相对分子质量25 000~35 000范围内出现明显的单一纯净条带，证实Reth-aly成功在大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3）异源表达并得到纯化。



M：蛋白质Marker；1：纯化的酶液

图2 Reth-aly的纯化酶液电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis image of the purified Reth-aly

2.3 酶学性质鉴定

2.3.1 褐藻胶裂解酶最适温度 温度是影响酶活的重要条件之一。如图3（a）所示，Reth-aly的最适温度为35 ℃，与来自 *Vibrio* sp. 的褐藻胶裂解酶AlgNJU相似（最适温度30 ℃）[12]。PL-7家族中很多褐藻胶裂解酶来源于海洋细菌，其最适温度通常低于50 ℃，多集中在30~40 ℃。当反应温度升高10 ℃，Reth-aly的相对酶活比最高值下降50%以上，对高温较为敏感；而反应温度降低到15 ℃时，仍有50%的残余酶活。这种耐低温酶有助于降低生产能耗，保持产物性质稳定，利于控制反应程度。

2.3.2 褐藻胶裂解酶最适pH 反应体系的不同pH也会在一定程度上影响褐藻胶裂解酶的酶活。如图3（b）所示，Reth-aly的最适pH为7.5（Tris-HCl缓冲液体系），同样地，来自 *Vibrio* sp. 的褐藻胶裂解酶AlgNJU的最适pH也为7.5[12]。Reth-aly在pH 6.5~8.5都能有85%以上的相对酶活，在中性到弱碱性范围内有较宽的适用范围；但对于酸性环境（pH<6），Reth-al的酶活迅速下降，弱酸性条件时，相对酶活下降至少50%。褐藻胶裂解酶的底物褐藻酸钠在偏酸性条件下会形成难溶的褐藻酸，而在碱性环境下其溶解性与流动性增强，因此大多数褐藻胶裂解酶只能在中性及碱性条件下才能表现出较高酶活。

2.3.3 褐藻胶裂解酶最适NaCl浓度 NaCl浓度对于褐藻胶裂解酶的活力往往有着显著影响。如图3（c）所示，Reth-aly的最适NaCl浓度为600 mmol/L，且在200~1 000 mmol/L都能保持80%以上的相对酶活；而在低浓度（<25 mmol/L）和高浓度范围（>1 500 mmol/L）时，相对酶活迅速降低到50%以下；当反应体系中完全不额外添加 Na^+ 时，相对酶活只有最高酶活的20%左右，故Reth-aly属于一种 Na^+ 依赖酶。

具有高盐特性的褐藻胶裂解酶并不多，少数此类酶包括：来源于 *Nitratiruptor* sp. SB155-2 的褐藻胶裂解酶（在800~1 400 mmol/L Na^+ 条件下都能保持完全活力）[13]，来源于 *Microbulbifer thermotolerans* DAU221的褐藻胶裂解酶（在NaCl为100~600 mmol/L时的酶活是不含NaCl的2倍以上）[14]，来源于 *Vibrio* sp. W2的褐藻胶裂解酶（最适NaCl浓度为750 mmol/L）[15]，来源于 *Vibrio* sp. Ni1的褐藻胶裂解酶（在 Na^+ 为1 000~2 000 mmol/L时的相对酶活是最高酶活的50%以上）[16]。褐藻胶广泛来源于海洋中褐藻类生物的细胞壁，因此具有一定盐离子耐性的褐藻胶裂解酶适用于此类海洋生物材料的后续生产；其对 Na^+ 具有的高度依赖性，适合用于控制反应的启动。

2.3.4 褐藻胶裂解酶底物特异性 在最适反应条件下，以海藻酸钠、polyM、polyG作为底物，分别测定Reth-aly的催化活力，结果见图3（d）。Reth-aly对海藻酸钠的酶活高达765.7 U/mg，在褐藻胶裂解酶中属于活性较高。褐藻胶裂解酶有多种酶活计算方法，例如DNS测还原糖法和235 nm吸光度变化法，但两者难以互相换算比较。以DNS法作为标准，同为PL-7家族酶，Reth-aly的酶活明显高于Alg7A（638.1 U/mg，来源于 *Vibrio* sp. W13）[17]、AlgSH7（71.7 U/mg，来源于 *Microbulbifer* sp. SH-1）[10]、AlyM（8.7 U/mL，来源于 *Microbulbifer* sp. Q7）[18]和Misa-aly（53.0 U/mg，来源于 *Microbulbifer salipaludis*）[19]。

以对海藻酸钠的酶活作为100%，Reth-aly对polyM和polyG的相对酶活分别为36.0%和71.5%。催化反应中的底物polyM和polyG（DP<50）的链长远短于海藻酸钠（DP>1 000），表

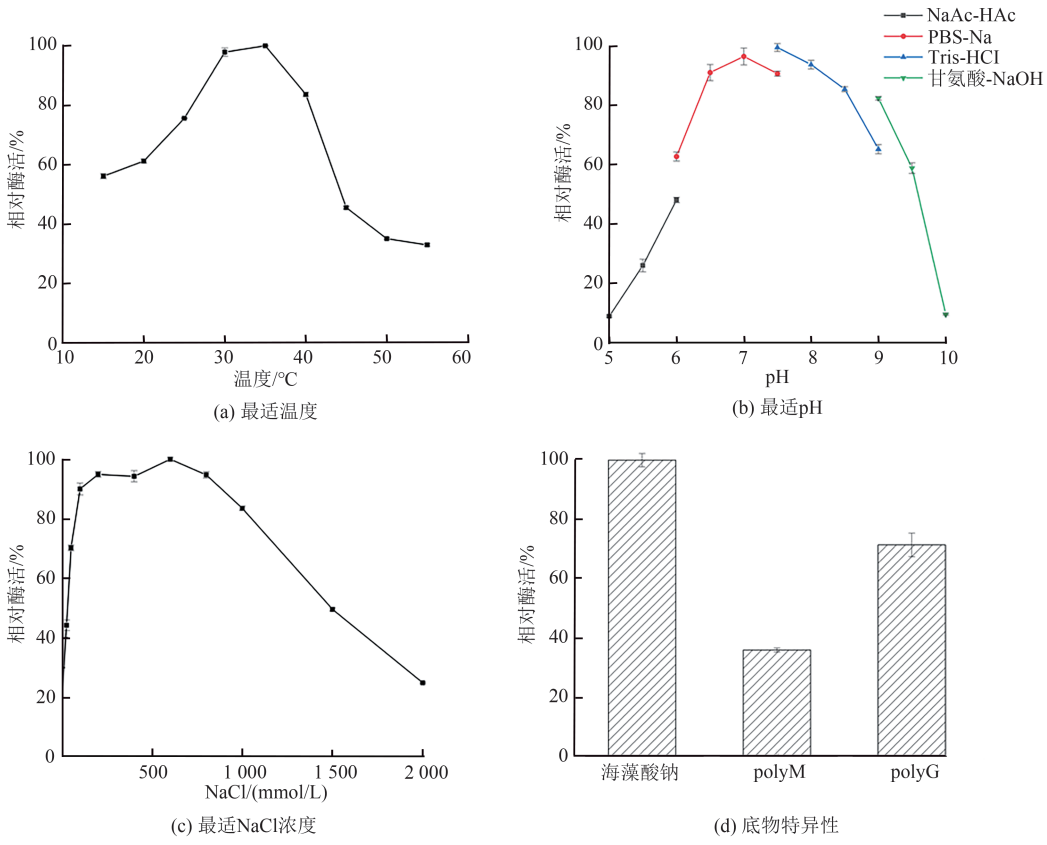


图 3 Reth-aly 的酶学性质鉴定

Fig. 3 Enzymatic characterization of Reth-aly

明 Reth-aly 对长链海藻酸钠的 polyG 区域有较高催化活性，这种对长链底物的偏好在 Itoh 的研究中也有类似结果[20]。有研究显示，PL-7 家族中含有 QIH 或 QVH 保守区域的褐藻胶裂解酶[21]，分别具有对 polyG 或 polyM 的底物偏好，而从 2.1 的分析结果可见，Reth-aly 具有保守区域 QIH，这与其底物偏好特性相符。

2.3.5 褐藻胶裂解酶热稳定性 如图 4 所示，在 35 ℃以下时，Reth-aly 较为稳定；在 35 ℃保温 6 h，仍有接近 50% 的残余酶活；在 30 ℃保温 9 h，仍具有 40% 以上的残余酶活；而在 40 ℃时，则会较快失活，保温 3 h 后的残余酶活下降到 40% 以下。褐藻胶裂解酶的 PL-7 家族中很大一部分酶热稳定性较差，见表 1。例如：来自 *Microbulbifer salipaludis*、*Pyropia yezoensis*、*Thalassotalea algicola* 的 3 种褐藻胶裂解酶在相对温和的温度和时间条件下，酶活均有约 50% 的下降幅度[19,22-23]。而同属 PL-7 家族的褐藻胶裂解酶 Reth-aly 不仅具有较高的酶活，同时在最适温度下稳定性也较高，具有良好的应用前景。

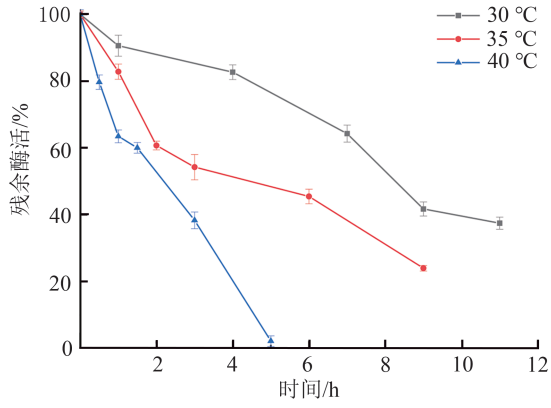


图 4 不同温度对 Reth-aly 稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the stability of Reth-aly

2.4 产物组成分析

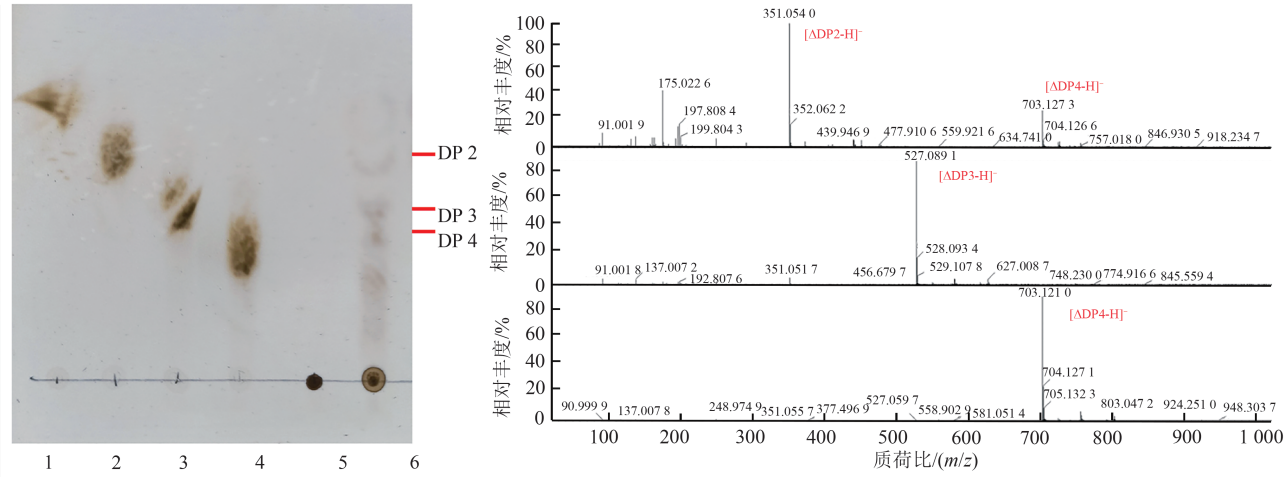
如图 5(a)所示，经过 Reth-aly 处理后，相对于未加酶处理组，酶解产物产生了明显的 DP 2~4 的低聚糖；再经醇沉淀去除大分子多糖后，经 LC-MS 检测，可以找到 3 处分别对应二糖到四糖的质荷比：351.054 0、527.089 1 和 703.121 0，见图 5(b)，验证了反应产物包含聚合度 2~4 的寡糖。

表 1　部分 PL-7 家族褐藻胶裂解酶性质汇总

Table 1　Summary of biochemical properties of selected alginate lyases from PL-7 family

来源	最适温度/℃	最适 pH	热稳定性	最高酶活/(U/mg)	文献
Reinekea thalattae	35	7.5	35 ℃，6 h，50%	765.7*	本文
Microbulbifer salipaludis	45	8.5	40 ℃，1 h，50%	53.0*	[19]
Pyropia yezoensis	35	8.0	32.5 ℃，0.5 h，50%	146^	[22]
Thalassotalea algicola	15	8.0	35 ℃，1 h，50%	418.61^	[23]
Vibrio sp. W13	30	7.0	40 ℃，0.5 h，> 60%	638.1*	[17]
Microbulbifer sp. SH-1	40	9.0	35 ℃，2 h，13%	71.7*	[10]
Vibrio sp. NJU-03	30	7.0	40 ℃，0.5 h，40%	6 468.99^	[12]
Nitratiruptor sp. SB155-2	70	6.0	67 ℃，0.5 h，50%	162^	[13]
Microbulbifer thermotolerans DAU221	45	7.4	40 ℃，1 h，73%	790^	[14]

注：*表示酶活单位定义为 1 min 产生 1 μmol 还原糖的酶量；^表示酶活单位定义为 1 min 在 235 nm 下吸光度增加 0.1 的酶量。



(a) TLC　　(b) 质谱图

图(a)中泳道 1~4 表示 DP 1~4 标准品；泳道 5 表示 0 h 反应产物；泳道 6 表示 8 h 反应产物。

图 5　酶解产物组成分析

Fig. 5　Analysis of the composition of enzymatic hydrolysis products

3　结 论

课题组筛选出一种来源于 *Reinekea thalattae* 的新型褐藻胶裂解酶 Reth-aly，并实现了在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中的异源表达。Reth-aly 属于 PL-7 家族的多糖裂解酶，其最适 pH 为 7.5(Tris-HCl 缓冲液)，最适温度为 35 ℃，最适 NaCl 浓度为 600 mmol/L，具有明显 Na^+ 依赖性，底物偏好聚古罗糖醛酸(polyG)，DNS 法测定的酶活为 765.7 U/mg，35 ℃下半衰期约在 6 h。海藻酸钠在 Reth-aly 处理下，可产生 DP 2~4 的寡糖。Reth-aly 具有较高酶活，耐盐性好，稳定性较强，因此在褐藻寡糖的生物制备中具有良好的应用前景。

参考文献

[1] ZHU B W，NI F，XIONG Q，et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds：source，preparation，structure，physiological activity and applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2021，61(1)：60-74.

[2] HE X J，HWANG H M，AKER W G，et al. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiological Research，2014，169(9/10)：759-767.

[3] YAN F，CHEN J Y，CAI T，et al. Cloning，expression，and characterization of a novel endo-type alginate lyase from *Microbulbifer* sp. BY17[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2022，102(11)：4522-4531.

[4] 陈岩君. 低聚合度褐藻寡糖的分离制备及其脂蛋白代谢影响初步研究[D]. 无锡：江南大学，2018.

[5] BOSE S K，HOWLADER P，WANG W X，et al. Oligosaccharide is a promising natural preservative for improving postharvest preservation of fruit：a review[J]. Food Chemistry，2021，341(1)：128178.

[6] ZHANG C G，WANG W X，ZHAO X M，et al. Preparation of alginate oligosaccharides and their biological activities in plants：a review[J]. Carbohydrate Research，2020，494：108056.

[7] 陈淑琼，李晓月，吴晨烁，等. 酶解制备褐藻寡糖工艺优化及活性研究[J]. 食品研究与开发，2019，40(13)：51-56.
CHEN S Q，LI X Y，WU C S，et al. Optimization of process conditions and activity for enzymatic hydrolysis of sodium alginate[J]. Food Research and Development，2019，40(13)：51-56. (in Chinese)

[8] ZHU B W，HU F，YUAN H，et al. Biochemical characterization and degradation pattern of a unique pH-stable polyM-specific alginate lyase from newly isolated *Serratia marcescens* NJ-07[J]. Marine Drugs，2018，16(4)：129.

[9] WANG M P，CHEN L，LOU Z Y，et al. Cloning and characterization of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. LJ-23[J]. Marine Drugs，2022，20(1)：66.

[10] YANG J，CUI D D，CHEN D W，et al. Purification and characterization of a novel endolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. SH-1 and its agricultural application[J]. Marine Drugs，2020，18(4)：184.

[11] LI S Y，WANG L N，HAN F，et al. Cloning and characterization of the first polysaccharide lyase family 6 oligoalginate lyase from marine *Shewanella* sp. Kz7[J]. Journal of Biochemistry，2016，159(1)：77-86.

[12] ZHU B W，SUN Y，NI F，et al. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. NJU-03[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，108：1140-1147.

[13] INOUE A，ANRAKU M，NAKAGAWA S，et al. Discovery of a novel alginate lyase from *Nitratiruptor* sp. SB155-2 thriving at deep-sea hydrothermal vents and identification of the residues responsible for its heat stability[J]. Journal of Biological Chemistry，2016，291(30)：15551-15563.

[14] JEONG H R，YOO J S，CHOI Y L，et al. Characterization of an organic solvent-tolerant polysaccharide lyase from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2021，169：452-462.

[15] MA Y，LI J，ZHANG X Y，et al. Characterization of a new intracellular alginate lyase with metal ions-tolerant and pH-stable properties[J]. Marine Drugs，2020，18(8)：416.

[16] SHA L，HUANG M H，HUANG X N，et al. Cloning and characterization of a novel endo-type metal-independent alginate lyase from the marine bacteria *Vibrio* sp. Ni1[J]. Marine Drugs，2022，20(8)：479.

[17] ZHU B W，LI K K，WANG W X，et al. Preparation of trisaccharides from alginate by a novel alginate lyase Alg7A from marine bacterium *Vibrio* sp. W13[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，139：879-885.

[18] YANG M，YU Y，YANG S，et al. Expression and characterization of a new polyG-specific alginate lyase from marine bacterium *Microbulbifer* sp. Q7[J]. Frontiers in Microbiology，2018，9：2894.

[19] 张文立，王鑫绣，徐炜，等. *Microbulbifer salipaludis* 褐藻胶裂解酶的酶学性质研究[J]. 食品研究与开发，2022，43(11)：18-25.
ZHANG W L，WANG X X，XU W，et al. Characterization of A novel alginate lyase from *Microbulbifer salipaludis*[J]. Food Research and Development，2022，43(11)：18-25. (in Chinese)

[20] ITOH T，NAKAGAWA E，YODA M，et al. Structural and biochemical characterisation of a novel alginate lyase from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7[J]. Scientific Reports，2019，9：14870.

[21] YAMASAKI M，OGURA K，HASHIMOTO W，et al. A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7[J]. Journal of Molecular Biology，2005，352(1)：11-21.

[22] INOUE A, MASHINO C, UJI T, et al. Characterization of an eukaryotic PL-7 alginate lyase in the marine red alga *Pyropia yezoensis*[J]. Current Biotechnology, 4(3): 240-248.

[23] CAO S S，LI L，ZHU B W，et al. Biochemical characterization and elucidation of the hybrid action mode of a new psychrophilic and cold-tolerant alginate lyase for efficient preparation of alginate oligosaccharides[J]. Marine Drugs，2022，20(8)：506.

（责任编辑：周玥）