



## 一种内切-1,3-岩藻聚糖酶的乳酸菌表达及性质

李新雨, 陈广宁, 申晶晶, 陈环环, 薛长湖, 常耀光\*  
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 岩藻聚糖是一种具有良好应用潜力的多糖, 具备多种生理活性。内切-1,3-岩藻聚糖酶是岩藻寡糖制备的关键工具。然而, 作用方式清晰的食物工业用岩藻聚糖酶的缺乏阻碍了该类酶的应用。本研究旨在获得来源于 GH174 家族的食物工业用内切-1,3-岩藻聚糖酶 Fun174Sb, 并探究其作用方式。利用乳酸菌表达系统实现了一种内切-1,3-岩藻聚糖酶 Fun174Sb 的异源表达。结果显示, Fun174Sb 对于来源于土耳其刺参的岩藻聚糖 (Ht-FUC) 具有降解能力, 酶活性为 1.90 U/mg。该酶在 35~50 °C、pH 7.5~8.5 条件下显示出较高的活性, 且具有良好的温度稳定性及 pH 稳定性。通过超高效凝胶排阻色谱串联质谱以及核磁共振技术阐明了 Fun174Sb 的酶解产物中主要寡糖的结构, 从而推断出 Fun174Sb 切割 Ht-FUC 的 Fucp2(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 与 Fucp2,4(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 之间的  $\alpha$ -1,3-糖苷键。研究表明, 乳酸菌表达的 Fun174Sb 具有良好的生化性质以及清晰的作用方式。本研究为作用方式清晰的食物级岩藻聚糖的应用奠定基础。

**关键词:** 岩藻聚糖酶; 乳酸菌; 刺参; 克隆表达; 生化性质; 作用方式

**中图分类号:** S 985; TS 254.1

**文献标志码:** A

岩藻聚糖 (fucoidan) 是一种主要由 L-岩藻糖构成的海洋硫酸化多糖, 存在于褐藻以及一些海洋无脊椎动物中, 如海参、海胆等<sup>[1-3]</sup>。岩藻聚糖具有广泛的生理活性, 包括抗凝血<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6]</sup>、免疫调节<sup>[7]</sup>、降血脂<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>、促进伤口愈合<sup>[9]</sup>等。在过去的十几年中, 岩藻聚糖已经被广泛应用于食品医药、美妆护肤等众多领域, 在未来健康产业领域具有巨大的市场和应用潜力<sup>[10]</sup>。

岩藻聚糖酶 (fucoidanase) 能够催化岩藻聚糖发生特异性降解, 根据其作用方式, 可分为内切-1,3-岩藻聚糖酶、内切-1,4-岩藻聚糖酶。岩藻聚糖酶被认为是岩藻聚糖结构解析、构效关系研究以及岩藻寡糖制备的重要工具<sup>[11]</sup>。目前, 已知岩藻聚糖酶家族有 4 个: GH107<sup>[12]</sup>、GH168<sup>[13]</sup>、

GH174<sup>[11]</sup>、GH187<sup>[14]</sup>。GH107 家族岩藻聚糖酶主要切割  $\alpha$ -1,4-糖苷键, GH168、GH174、GH187 岩藻聚糖酶主要切割  $\alpha$ -1,3-糖苷键。虽然近年越来越多的岩藻聚糖酶研究得以报道, 但是多糖底物结构的差异性、多样性限制了对岩藻聚糖酶作用方式的研究, 对于岩藻聚糖酶的作用方式、亚位点特异性的了解仍然不够全面。

实验室前期挖掘得到 GH174 家族岩藻聚糖酶 Fun174Sb 基因序列<sup>[15]</sup>, 并通过大肠杆菌实现了其异源表达。研究发现 Fun174Sb 可降解多种底物, 在极端酸碱环境下依然能维持稳定的活性, 这一特性预示着其在食品工业生产中具有巨大的应用潜力。然而, 鉴于大肠杆菌表达体系在食品工业生产的不适用性, 本研究拟将 Fun174Sb 的目的基

收稿日期: 2024-04-30 修回日期: 2024-05-30

资助项目: 青岛市海洋科技创新专项 (24-1-3-hygg-27-hy); 国家自然科学基金 (U22A20542)

第一作者: 李新雨 (照片), 从事海洋多糖研究, E-mail: 2733248003@qq.com

通信作者: 常耀光, 从事海洋多糖研究, E-mail: changyg@ouc.edu.cn



因克隆至食品级表达体系乳酸菌 NICE (nisin-controlled expression) 系统进行诱导表达, 阐明其生化性质, 以期能够发挥其工业价值。并且利用超高效凝胶排阻色谱串联质谱以及核磁共振技术对 Fun174Sb 的作用方式进行进一步探究, 对其亚位点特异性进行补充, 为作用方式清晰食品级岩藻聚糖的工业化应用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与仪器

**实验材料** 土耳其海参 (*Holothuria tubulosa*) 购于广州熹龙贸易有限公司 (为干海参)。参考实验室前期方案进行岩藻聚糖制备<sup>[16]</sup>, 将干海参破碎后加入木瓜蛋白酶酶解, 后用乙醇分级醇沉, 在 75% 乙醇浓度下所得沉淀即为土耳其海参粗岩藻聚糖 (Ht-FUC)。乳酸菌细胞 NZ3900、质粒 pNZ8149 购于武汉森灵生物科技有限公司。

**实验仪器** JY92-IIN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 3K15 高速离心机, 德国 Sigma 公司; ÄKTA Prime Plus 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent G6125B 质谱仪, 安捷伦科技 (中国) 有限公司。

### 1.2 Fun174Sb 的乳酸菌表达及分离纯化

**克隆表达** 利用 PCR 技术对目的基因进行扩增, 上游引物为 5'-GAGGCACTCACCATGGGCAGTACTAAAAATGGAATTATA-3', 下游引物为 5'-TAGAACTAGTGGTACCCTACTCCTTCCAAGTTAAAGTAG-3'。酶切位点采用 *Nco* I/*Ban* I。将扩增后的目的基因通过无缝克隆技术连接至 pNZ8149 载体 (C 端添加 His 标签), 重组质粒以电转化法转化至 NZ3900 感受态细胞中。Elliker 平板筛选转化成功的乳酸菌, 将获得的阳性克隆菌接种于 M17 培养基中, 30 °C 下静置培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4, 加入乳酸链球菌肽 (nisin) 至终浓度为 50 ng/mL, 30 °C 下诱导 3 h。离心收集沉淀, 以 20 mmol/L、pH 7.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液 (PBS 缓冲液) 重悬菌体, 并添加溶菌酶至终浓度 2 mg/mL, 37 °C 反应 30 min。高压均质破碎 (流出速度 60 L/h, 循环 6 次), 离心取上清液, 即得到粗酶液 Fun174Sb。

**分离纯化** 以 HisTrap™ HP 色谱柱对 Fun174Sb 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 Tris-HCl (pH 8.0) 进行平衡, 使用含有 0.5 mol/L 咪唑的流动相梯度洗脱, 收集紫外信号高的洗脱管并进行酶活性测定。以 HiPrep™ 26/10 Desalting 色谱柱脱盐, 流动相为物质的量浓度 20 mmol/L、pH 7.5 的 PBS 缓冲液。蛋白的纯度及分子质量通过 SDS-PAGE 进行分析, 检测 OD<sub>280</sub> 以确定蛋白浓度。纯化后的蛋白用于后续实验。

**酶活性测定** 以 L-岩藻糖为标准品, 酶活性单位 (1 U) 定义为酶液 1 min 内水解底物产生 1 μmol 还原糖的活性。体积酶活性单位 (1 U/mL) 定义为 1 mL 酶液 1 min 内水解底物产生 1 μmol 还原糖的活性。比酶活性单位 (1 U/mg) 为 1 mg 酶的活性, 由体积酶活性除酶液蛋白浓度计算所得。以 2 mg/mL Ht-FUC 为底物, 按照对羟基苯甲酰肼 (para-hydroxybenzoic acid hydrazide, pHBH) 法测定纯化后 Fun174Sb 酶活性<sup>[15-16]</sup>。将 50 μL 适当稀释的 Fun174Sb 与 50 μL Ht-FUC 底物溶液混合, 于 30 °C 反应 10 min, 置于 100 °C 金属浴中灭酶 5 min, 加入 250 μL pHBH 并用超纯水补足至 1 mL, 100 °C 显色 5 min, 测定 OD<sub>415</sub>。在相同条件下, 以添加相同量灭活酶为对照。

### 1.3 酶学性质测定

将 50 μL Fun174Sb 与 50 μL Ht-FUC 底物溶液混合, 混匀后置于 20~60 °C 温度下反应 10 min, 迅速于 100 °C 金属浴中灭酶 5 min, 测定酶活性。将酶液于 4、25、30 及 40 °C 分别放置 24 h, 间隔取样并检测残余酶活性 (放置 0 h 的酶的活性定义为 100%)。将不同 pH 的缓冲液 (pH 4.0~7.0: 20 mmol/L 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液; pH 7.0~9.0: 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液; pH 9.0~11.0: 20 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液) 与物质的量浓度为 2 mg/mL 的底物溶液混匀, 于 30 °C 反应 10 min, 100 °C 金属浴 5 min 灭酶, 测定酶液在不同缓冲区间活性。使用上述不同 pH 值的缓冲液替换酶液原来的 pH 环境, 于 4 °C 下放置 1 h, 调节 pH 值至 7.5 并测定残余酶活性 (未经任何处理的酶的活性定义为 100%)。

### 1.4 酶解终产物制备及 UPSEC-MS 分析

将 100 mg Ht-FUC 底物溶解于 pH 7.5 的 PBS 缓冲液中, 使其终浓度为 10 mg/mL, 添加过量酶液于 35 °C 下反应 48 h 后置于 100 °C 金属浴灭活。使用高效液相色谱 (high performance liquid chroma-

tography, HPLC) 结合示差折光检测器 (refractive index detector, RID) 检测酶解反应程度, 以流动相 50 mmol/L 甲酸铵平衡色谱柱 Superdex 30 Increase 10/300 GL, 通过示差折光检测器进行分析。

以超高效凝胶排阻色谱-质谱联用技术 (ultra performance size exclusion chromatography-mass spectrum, UPSEC-MS) 对酶解终产物中的寡糖组分进行全覆盖检测<sup>[17]</sup>。系统为 Agilent 1290 超高效液相色谱仪串联 Agilent G6125B 质谱仪, 质谱条件为: 负离子模式, 透镜电压 50 V, 毛细管温度 300 °C, 鞘气压力 40 psi, 正负离子电压 2000 V, 扫描范围 150~2 000 u<sup>[18]</sup>。

### 1.5 寡糖分离纯化

以 ÄKTA Prime Plus 系统分离纯化 Fun174Sb 降解 Ht-FUC 酶解产物<sup>[16, 18]</sup>: 凝胶层析柱 HiLoad 26/60 Superdex 30 PG, 流动相 5 mmol/L 甲酸铵, 流速 2.6 mL/min。高效液相色谱-示差折光检测器 (HPLC-RID) 检测分离纯化后寡糖纯度: 凝胶层析柱 Superdex 30 Increase 10/300 GL, 流动相为 50 mmol/L 甲酸铵, 流速 0.5 mL/min。收集纯化后的寡糖并冻干脱盐, 用于核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 分析。

### 1.6 寡糖 NMR 分析

将 Fun174Sb 酶解 Ht-FUC 降解主产物纯化后得到的纯样品经重水 (99.8%) 交换后, 以重水溶解并转移至 4 mm 核磁管中, Bruker 600 MHz AVANCE III 核磁共振波谱仪测定 <sup>1</sup>H NMR 及二维谱图 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、TOCSY、NOESY; 测定温度: 25 °C、600 MHz; 外标: 4,4-二甲基-4-硅戊烷-1-磺酸 (DSS)<sup>[15]</sup>。

### 1.7 数据分析

实验平行重复 3 次, 数据以平均值±标准差来表示。采用 Excel 2018、GraphPad Prism 7 软件对实验数据进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 Fun174Sb 的乳酸菌体系克隆表达及分离纯化

将去除信号肽序列的 Fun174Sb 基因克隆表达至乳酸菌中 (C 端添加 His 标签), 载体为 pNZ8149, 受体细胞为 NZ3900。纯化过程中, 蛋

白在咪唑浓度梯度约为 20% 时开始洗脱, 并且在咪唑浓度梯度达到约 40% 时得到完全洗脱 (图 1)。

经过诱导表达、破碎纯化得到的蛋白经 SDS-PAGE 检测, 发现该蛋白在上清液中得以表达, 在 56.0 ku 处显示单一条带 (图 2), 与 Fun174Sb 理论分子质量 (53.7 ku) 基本一致, 经检测蛋白表达量为 40 mg/L, 证明 Fun174Sb 乳酸菌体系表达成功。以一系列不同结构的岩藻聚糖为底物对 Fun174Sb 的活性进行验证, 发现其对来源于美国肉参 (*Isostichopus badionotus*) 的岩藻聚糖 (Ib-FUC) 具有活性, 这与过去的报道一致<sup>[15]</sup>, 此外, 研究发现其对 Ht-FUC 也具有活性, 为 1.90 U/mg, Fun174Sb 对于 Ht-FUC 的活性是首次报道。

### 2.2 乳酸菌表达 Fun174Sb 的酶学性质

Fun174Sb 的最适反应温度为 35~50 °C。分别在 4、25 和 30 °C 放置 24 h, 残余酶活性仍能达到 90% 以上, 在较高的温度 40 °C 放置 24 h 后, 残余酶活性仍为初始酶活性的 82%, 说明 Fun174Sb 在 4~30 °C 下酶活性稳定, 且具有良好的温度稳定性 (图 3-a, b)。

Fun174Sb 的最适反应 pH 为 7.5~8.5。在 pH 3.0~10.0 的环境中酶活性均较稳定, 残余酶活性保持在 85% 以上, 具有优异的 pH 稳定性 (图 3-c, d)。

### 2.3 Fun174Sb 的作用方式

**降解产物分析** 使用高效液相色谱-示差折光检测器检测酶解终产物 (图 4), 添加 Fun174Sb 的酶解产物有寡糖峰产生, 底物峰高度明显降低, 表明 Fun174Sb 能够使 Ht-FUC 发生降解, 并且明显产生寡糖。

Fun174Sb 降解 Ht-FUC 的质谱分析结果中, 总离子流 (图 5-a) 显示降解终产物中主要包含一种寡糖组分, 鉴定为分子离子峰  $[M-2H]^{-2}$  (图 5-b), 质荷比 460.2 u, 说明其为四硫酸酯化四糖 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (质荷比 922.1 u)。提取各组分离子流并对其积分分析, Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 组分占比高达 93.7%。因此 Fun174Sb 降解 Ht-FUC 的主要产物为 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub>。

**寡糖结构鉴定** 利用凝胶排阻色谱对 Ht-FUC 酶解产物中的寡糖组分进行分离纯化, 得到主要寡糖组分 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, 通过核磁共振光谱 (NMR) 以获取其精细结构信息。在 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 的 <sup>1</sup>H NMR 光谱中观察到在 5.50、5.39、5.34 和 5.06 ppm 处出现了 4 个清晰的信号 (图 6-a), 这些信号是由于  $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖残基的 H-1 质子共振产生, 意味着

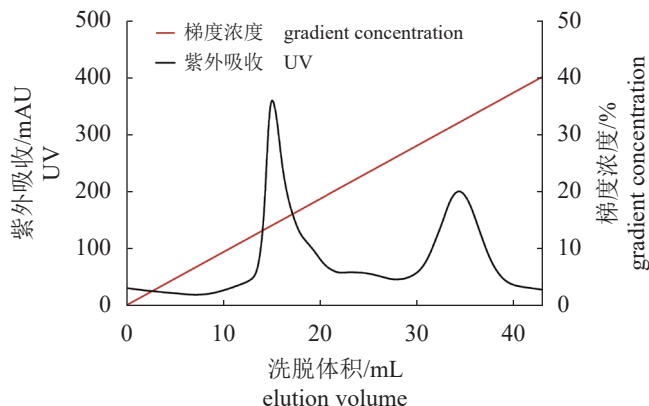


图 1 Fun174Sb 的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of Fun174Sb

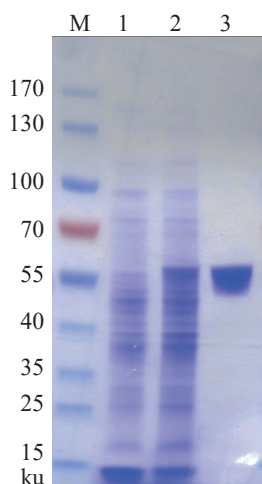


图 2 SDS-PAGE 电泳图

M. marker, 预染蛋白分子质量标准, 1.未诱导菌液上清液, 2.纯化前菌液上清液, 3.纯化后蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE

M. marker, prestained protein ladder, 1. uninduced supernatant, 2. supernatant before purification, 3. purified protein.

它具有 4 个相连接的岩藻糖单元, 将这 4 个糖单元分别命名为 A、B、C、D。相应的, 在 COSY 图谱 (图 6-b) 中也发现了它们的相关化学位移, 同时, 结合 TOCSY、NOESY 图谱确定了  $\text{Fuc}_4\text{S}_4$  中其他位置氢核的化学位移并进行归属 (表 1) (图 6-c, d)。

相比于非硫酸酯化的糖残基, 硫酸酯化取代会使糖残基上相应位置 H 的化学位移向低场偏移 0.4~0.8 ppm<sup>[19]</sup>, 以此可推断该糖残基的硫酸酯化取代位点。根据表 1, 岩藻糖残基 A、B、C 的 H-2 分别在 4.52、4.46 及 4.53 ppm 归属到信号, 对比非硫酸酯化岩藻糖残基 H-2 (3.83 ppm) 向低场偏移, 因此可以判断糖单元 A、B、C 存在 2 位硫酸酯化。同理, 糖环 B 还存在 4 位硫酸酯化, 即 A 为

$\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$ 、B 为  $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$ 、C 为  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$ 、D 为  $\text{Fucp}$ 。

通过 NOESY 谱图确定  $\text{Fuc}_4\text{S}_4$  中的各糖残基通过  $\alpha$ -1,3-糖苷键相连 (图 6-d), B 糖单元上 H-1 与 D 糖单元 H-3 产生交叉峰, D 糖单元上 H-1 与 C 糖单元 H-3 产生交叉峰, C 糖单元上 H-1 与 A 糖单元 H-3 产生交叉峰。因此, 可以确认  $\text{Fuc}_4\text{S}_4$  的残基序列为  $\text{B}1 \rightarrow 3\text{D}1 \rightarrow 3\text{C}1 \rightarrow 3\text{A}$ , 具体化学结构为  $\alpha$ -1- $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$ -1  $\rightarrow$  3- $\alpha$ -1- $\text{Fucp}$ - $\rightarrow$  3- $\alpha$ -1- $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$ -1  $\rightarrow$  3- $\alpha$ -1- $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$ 。这与 Chang 等<sup>[20]</sup>报道的 Ht-FUC 主要结构一致, 说明 Fun174Sb 主要作用于 Ht-FUC 的主要结构区域。由于 Ht-FUC 由该  $\text{Fuc}_4\text{S}_4$  单元连续组成, 可以推断出 Fun174Sb 能够特异性切割 Ht-FUC 的  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$  与  $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$  之间的  $\alpha$ -1,3-糖苷键。

### 3 讨论

食品级表达系统由完全来自“GRAS (generally regarded as safe)”生物体的 DNA 组成, 表达载体、宿主细胞、诱导物等均要求食品级<sup>[21]</sup>, 乳酸菌 NICE 表达系统很好地满足了这一需求<sup>[22]</sup>。除了具有食品安全性之外, 乳酸菌 NICE 表达系统与大肠杆菌表达系统同属于原核表达系统, 不具备高尔基体、内质网等蛋白翻译后加工元件, 防止因蛋白加工修饰如二硫键形成、蛋白糖基化等影响蛋白折叠, 进而造成不同表达体系得到的重组酶活性差异<sup>[23-24]</sup>。此外, Fun174Sb 基因序列来自海洋细菌 *W. aestuarii* OF219<sup>[14]</sup>, 同样属于原核表达系统, 通过乳酸菌表达体系获得食品级 Fun174Sb, 蛋白结构最接近其天然形式。

本研究首次利用食品级表达系统实现了内切-

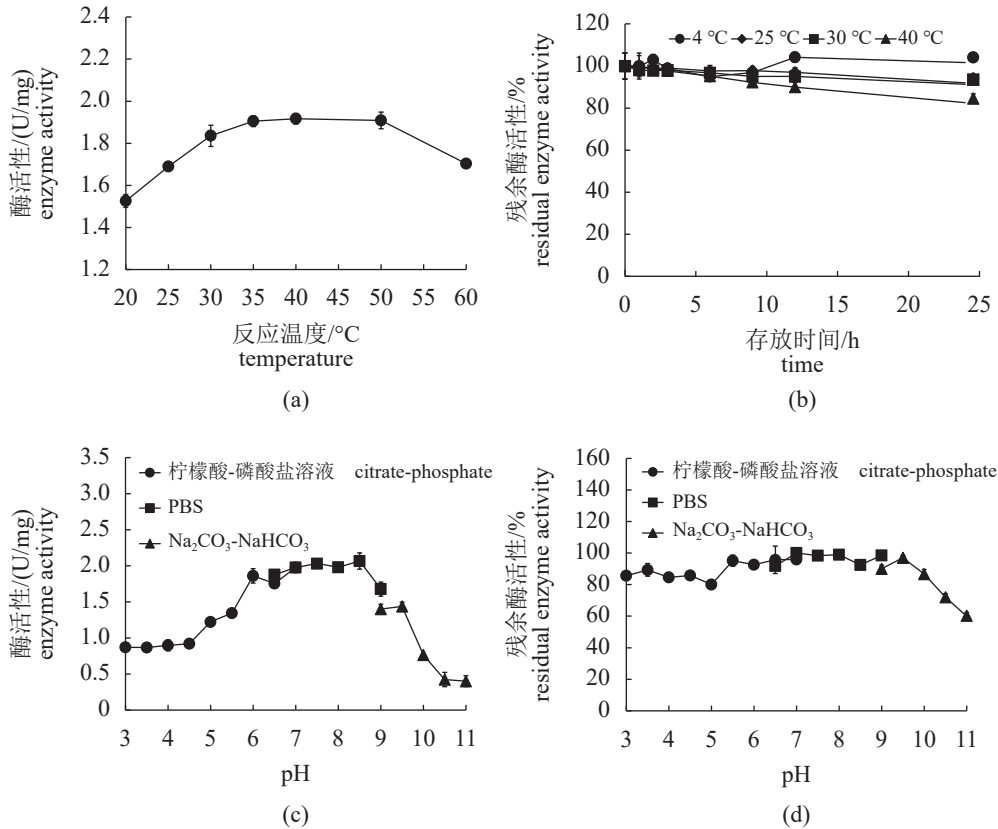


图3 Fun174Sb 的生化性质

(a) 最适反应温度, (b) 温度稳定性, (c) 最适反应 pH, (d) pH 稳定性。 (b) (d) 残余酶活性以初始酶活性的百分比表示。

Fig. 3 Biochemical characteristics of Fun174Sb

(a) optimal temperature, (b) thermal stability, (c) optimal pH, (d) pH stability. (b) (d) residual enzyme activity expressed as a percentage of initial enzyme activity.

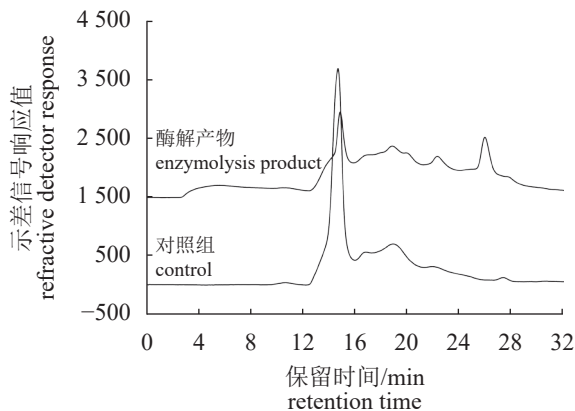


图4 HPLC-RID 检测 Fun174Sb 降解 Ht-FUC 终产物  
Fig. 4 Detecting Ht-FUC degradation of Fun174Sb with HPLC-RID

1,3-岩藻聚糖酶的异源表达, 证明了利用乳酸菌 NICE 系统异源表达岩藻聚糖酶的可行性。目前, 内切-1,4-岩藻聚糖酶的乳酸菌表达还未见报道, 本研究结果为该酶的深入研究提供了经验, 或将

在寡糖制备、低分子质量岩藻聚糖食品开发领域中发挥作用。

Fun174Sb 能够切割 Ht-FUC 的  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$  与  $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$  之间的  $\alpha$ -1,3-糖苷键, 与之前推断的切割来源于美国肉参的岩藻聚糖 (Ib-FUC) 的  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$  与  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$  之间的  $\alpha$ -1,3-糖苷键不同 (图 7), 说明 Fun174Sb 具有新的作用位点。综合 Fun174Sb 对 Ht-FUC、Ib-FUC 的作用方式, 可以推断其亚位点特异性: ① Fun174Sb 的-1 亚位点严格容受  $\text{Fucp}2(\text{OSO}_3^-)$ 。假设-1 位点能够容受  $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$ , 那么在 Ib-FUC 酶解产物中应该有结构为  $\text{F}2\text{S}-\text{F}2\text{S}-\text{F}0\text{S}-\text{F}2,4\text{S} [\alpha\text{-}1\text{-Fucp}2(\text{OSO}_3^-)\text{-}1 \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-}1\text{-Fucp}2(\text{OSO}_3^-) \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-}1\text{-Fucp}\text{-}1 \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-}1\text{-Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$  简写形式] 的四糖出现; 或者假设-1 位点能够容受  $\text{Fucp}$ , Ht-FUC 酶解产物中应含有结构为  $\text{F}2\text{S}-\text{F}2\text{S}-\text{F}2,4\text{S}-\text{F}0\text{S}$  的四糖, Ib-FUC 酶解产物中应含有结构为  $\text{F}2,4\text{S}-\text{F}2\text{S}-\text{F}2\text{S}-\text{F}0\text{S}$  的四糖。② Fun174Sb 的+1 亚位点容受  $\text{Fucp}2,4(\text{OSO}_3^-)$  以

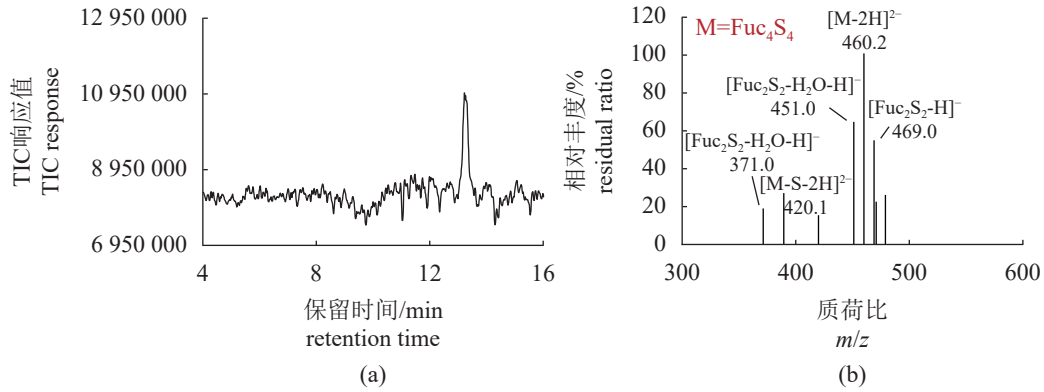


图 5 Fun174Sb 降解 Ht-FUC 的质谱分析结果

(a) 总离子流 TIC 图谱, (b) 主要组分  $Fuc_4S_4$  MS 图谱。

Fig. 5 MS spectrum of Ht-FUC degradation by Fun174Sb

(a) total ion chromatograms, (b) MS spectrum of  $Fuc_4S_4$ .

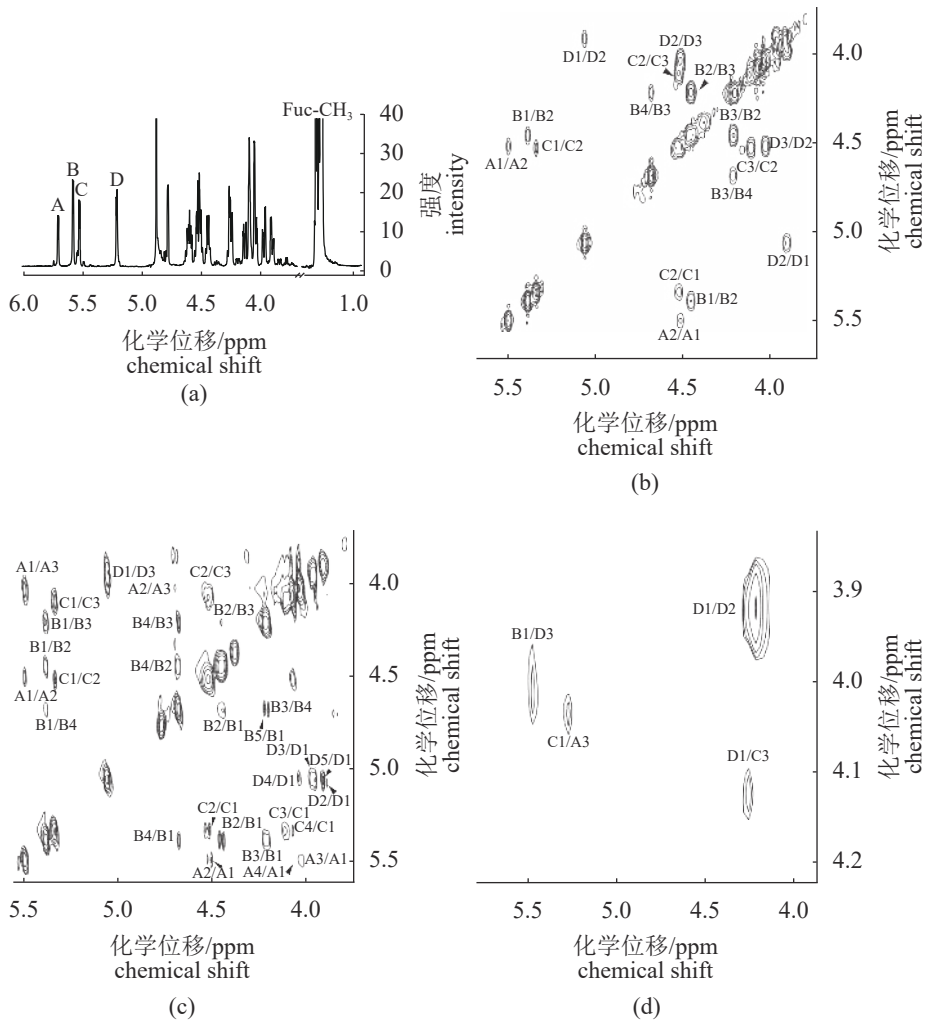


图 6 主要组分  $Fuc_4S_4$  的 NMR 图谱

Fig. 6 NMR spectrum of  $Fuc_4S_4$

(a)  $^1H$ , (b) COSY, (c) TOCSY, (d) NOESY.

表 1 Fun174Sb 降解 Ht-FUC 产生四糖 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub> 的<sup>1</sup>H 化学位移

Tab. 1 <sup>1</sup>H chemical shift of Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub> produced by degradation of Ht-FUC in the presence of Fun174Sb

糖单元 residue	δH1	δH2	δH3	δH4	δH5	δH6
A	5.50	<b>4.52</b>	4.03	4.08	—	1.22
B	5.39	<b>4.46</b>	4.21	<b>4.68</b>	4.22	1.25
C	5.34	<b>4.53</b>	4.12	4.08	—	1.22
D	5.06	3.92	4.04	3.98	3.97	1.20
→3-α-L-Fucp-1→	5.07	3.83	3.93	4.02	4.27	1.25

注: δH1表示1号位氢(H-1)化学位移; δH2表示2号位氢(H-2)化学位移; δH3表示3号位氢(H-3)化学位移; δH4表示4号位氢(H-4)化学位移; δH5表示5号位氢(H-5)化学位移; δH6表示6号位氢(H-6)化学位移; 化学位移以DSS (δH 0.00 ppm)为外标确定; 加粗的数据表示和→3-α-L-Fucp-1→上δH1化学位移比较, 该化学位移偏向低场; “—”未测出信号。

Notes: δH1 is defined as the chemical shift of H-1; δH2 is defined as the chemical shift of H-2; δH3 is defined as the chemical shift of H-3; δH4 is defined as the chemical shift of H-4; δH5 is defined as the chemical shift of H-5; δH6 is defined as the chemical shift of H-6; chemical shift is determined by DSS (δH 0.00 ppm) as external standard, the data in bold are compared with→3-α-L-Fucp-1→ chemical shift, which favors the lower field; “—” no signal.

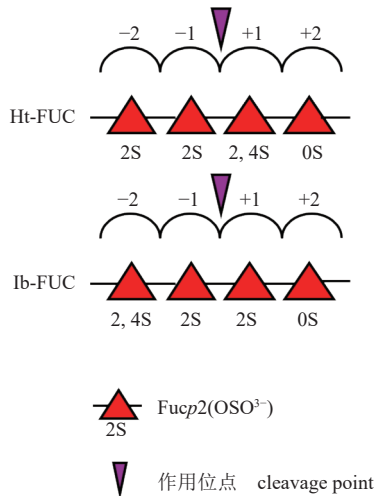


图 7 Fun174Sb 对 Ht-FUC、Ib-FUC<sup>[15]</sup> 的作用位点

Fig. 7 cleavage point of Fun174Sb on Ht-FUC and Ib-FUC<sup>[15]</sup>

及 Fucp<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。同推理①, 若+1亚位点容受 Fucp, 则 Ib-FUC 酶解产物中应相应出现结构为 F0S-F<sub>2</sub>4S-F<sub>2</sub>S-F<sub>2</sub>S 的四糖。③ Fun174Sb 的-2亚位点容受 Fucp<sub>2,4</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 以及 Fucp<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。同推理①, 若-2亚位点容受 Fucp, 则 Ht-FUC 酶解产物中应相应出现结构为 F0S-F<sub>2</sub>S-F<sub>2</sub>S-F<sub>2</sub>4S 的四糖。

综上所述, 本研究通过乳酸菌 NICE 系统进行了内切-1,3-岩藻聚糖酶的克隆表达, 并发现其可降解 Ht-FUC。该酶在 35~50 °C、pH 7.5~8.5 条件下显示出最高酶活性, 且具有良好的温度稳定性及 pH 稳定性。Fun174Sb 降解 Ht-FUC 的主要产物为 Fuc<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, 特异性切割 Ht-FUC 的 Fucp<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 与 Fucp<sub>2,4</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 之间的 α-1,3-糖苷键。Fun174Sb 的-1亚位点严格容受 Fucp<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), +1、-2亚位

点容受 Fucp<sub>2,4</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 以及 Fucp<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。乳酸菌异源表达的 Fun174Sb 的酶学性质良好且作用方式清晰, 为内切-1,3-岩藻聚糖酶的产业化应用提供了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Vo T S, Kim S K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(1): 16-27.

[2] Wang Y C, Su W, Zhang C Y, et al. Protective effect of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan against ethanol-induced gastric damage[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(4): 1414-1419.

[3] Hsu H Y, Hwang P A. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2019, 8(1): e15.

[4] Da Silva L C R P, Todaro V, Do Carmo F A, et al. A promising oral fucoidan-based antithrombotic nanosystem: development, activity and safety[J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(16): 165102.

[5] Torres M D, Flórez-Fernández N, Simón-Vázquez R, et al. Fucoidans: The importance of processing on their anti-tumoral properties[J]. *Algal Research*, 2020, 45: 101748.

[6] Elizondo-Gonzalez R, Cruz-Suarez L E, Ricque-Marie D, et al. *In vitro* characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus[J]. *Virology Journal*, 2012, 9(1): 307.

[7] Feng G, Laijin S, Chen S, et al. In vitro and in vivo

- immunoregulatory activity of sulfated fucan from the sea cucumber *A. leucoprocta*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 187: 931-938.
- [ 8 ] Peng Y B, Wang Y F, Wang Q K, *et al.* Hypolipidemic effects of sulfated fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* through modulating the cholesterol and aliphatic metabolic pathways[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 51: 8-15.
- [ 9 ] Lu Y P, Zhu X P, Hu C, *et al.* A fucoidan-gelatin wound dressing accelerates wound healing by enhancing anti-bacterial and anti-inflammatory activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 223: 36-48.
- [10] Du B, Zhao Q C, Cheng C H, *et al.* A critical review on extraction, characteristics, physicochemical activities, potential health benefits, and industrial applications of fucoidan[J]. *eFood*, 2022, 3(4): e19.
- [11] Liu G C, Shen J J, Chang Y G, *et al.* Characterization of an endo-1, 3-fucanase from marine bacterium *Wenyngzhuangia aestuarii*: the first member of a novel glycoside hydrolase family GH174[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 306: 120591.
- [12] Schultz-Johansen M, Cueff M, Hardouin K, *et al.* Discovery and screening of novel metagenome-derived GH107 enzymes targeting sulfated fucans from brown algae[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(22): 4281-4295.
- [13] Shen J J, Chang Y G, Zhang Y Y, *et al.* Discovery and Characterization of an Endo-1, 3-fucanase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: a novel glycoside hydrolase family[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1674.
- [14] Shen J J, Zheng L, Zhang Y Y, *et al.* Discovery of a catalytic domain defines a new glycoside hydrolase family containing endo-1, 3-fucanase[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 323: 121442.
- [15] Shen J J, Liu G C, Chen G N, *et al.* Biochemical characterization and cleavage specificities analyses of three endo-1, 3-fucanases within glycoside hydrolase family 174[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 335: 122083.
- [16] Chen G N, Yu L, Zhang Y Y, *et al.* Utilizing heterologously overexpressed endo-1, 3-fucanase to investigate the structure of sulfated fucan from sea cucumber (*Holothuria hilla*)[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 272: 118480.
- [17] Shen J J, Chang Y C, Chen F, *et al.* Expression and characterization of a  $\kappa$ -carrageenase from marine bacterium *Wenyngzhuangia aestuarii* OF219: a biotechnological tool for the depolymerization of  $\kappa$ -carrageenan[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 93-100.
- [18] 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.
- [19] Yamada S, Yoshida K, Sugiura M, *et al.* One-and two-dimensional  $^1\text{H-NMR}$  characterization of two series of sulfated disaccharides prepared from chondroitin sulfate and heparan sulfate/heparin by bacterial eliminase digestion[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1992, 112(4): 440-447.
- [20] Chang Y G, Hu Y F, Yu L, *et al.* Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136: 1091-1097.
- [21] Takala T M, Saris P E J. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4-5): 467-471.
- [22] Zhang X J, Feng S Y, Li Z T, *et al.* Expression of *Helicobacter pylori hspA* gene in *Lactococcus lactis* NICE system and experimental study on its immunoreactivity[J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 2015: 750932.
- [23] Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(11): 1179.
- [24] Yin J C, Li G X, Ren X F, *et al.* Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(3): 335-347.



## Expression and properties of an endo-1,3- fucoidanase in *Lactobacillus*

LI Xinyu , CHEN Guangning , SHEN Jingjing , CHEN Huanhuan ,  
XUE Changhu , CHANG Yaoguang \*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Fucoidan is a marine polysaccharide with diverse physiological activities. Endo-1,3-fucoidanase is a favorable tool for the preparation of fucooligosaccharides. Nevertheless, the lack of food-grade fucoidanase with clear cleavage sites has hindered its application. This study aimed to obtain a food-grade endo-1,3-fucoidanase from GH174 family (Fun174Sb) and to investigate its cleavage site. The study demonstrated that the food-grade expression of Fun174Sb could be achieved through the *Lactobacillus* NICE system. Fun174Sb exhibits significant endo-acting hydrolysis activity towards fucoidan from *Holothuria tubulosa* (Ht-FUC), with an enzymatic activity of 1.90 U/mL. Fun174Sb showed significant activity within a temperature range of 35-50 °C and a pH range of 7.5-8.5, and it possessed good temperature and pH stability. Furthermore, the structure of the dominant oligosaccharide in the enzymatic product was analyzed using ultra performance size exclusion chromatography-mass spectrum (UPSEC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). It could be inferred that Fun174Sb cleaves the  $\alpha$ -1,3-glycosidic bond between Fucp2 (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and Fucp2,4 (OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in Ht-FUC. The study showed that Fun174Sb expressed in *Lactobacillus* exhibited favorable biochemical properties and a clear mode of action. It laid the foundation for the application of food-grade fucoidanase.

**Key words:** fucoidanase; *Lactobacillus*; sea cucumber; cloning and expression; biochemical properties; action mode

**Corresponding author:** CHANG Yaoguang. E-mail: [changyg@ouc.edu.cn](mailto:changyg@ouc.edu.cn)

**Funding projects:** Marine Science and Technology Innovation Project of Qingdao (24-1-3-hygg-27-hy); National Natural Science Foundation of China (U22A20542)