



海洋褐藻多糖的复杂结构、降解酶系 以及生物学功能*

李 雪 吴秀芸 李颖杰** 王禄山

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 青岛 266237)

摘要 海洋大型藻类(包括褐藻、红藻和绿藻)具有生物质资源产量高、生长过程中不占用耕地和淡水资源等优点,是未来生物炼制的优良原料。2021年,中国褐藻产量为190万吨,远高于其他经济藻类。但是与绿藻相比,褐藻所含的褐藻酸盐和红藻所含的3,6-脱水-L-半乳糖等多糖组分不容易发酵,极大地限制了其高值转化的进程。本文针对褐藻多糖的高效降解与高值转化这一研究热点,总结了褐藻的系统发育与褐藻多糖(褐藻胶、岩藻多糖以及昆布多糖)的复杂结构组成,分析了3类海洋多糖降解酶系的家族、空间结构及其特异性识别专一底物的活性架构等特征,并对褐藻多糖降解产物及其衍生寡糖的生物学功能进行了构效分析,以期揭示海洋多糖降解酶系的高效催化机制和特异性识别机理,推动褐藻的高效生物降解转化,为精准定制生物活性寡糖,构建绿色低碳工业化生产工艺提供参考。

关键词 海洋多糖, 褐藻细胞壁, 降解酶系, 生物学活性

中图分类号 Q5, Q93, Q94

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0361

海洋生态系统约占地球表面积的71%,是地球上最大的碳汇系统。据统计,海洋生态系统中大型藻类(包括褐藻、红藻和绿藻)、红树林和盐沼植物等“蓝碳”植物的碳封存量是陆地生态系统的10倍^[1]。大型海藻等初级生产者在碳循环中发挥重要作用,除了作为移动碳汇之外,它们还可通过光合作用捕获碳元素并长久储存在沉积环境中,或经过生物转化形成惰性溶解有机碳,在某些条件下,海藻中的有机碳会发生矿化,其生成的可溶性无机碳也是重要的蓝色碳汇之一^[2-3]。大型海藻的全球年产量超过3 000万吨,具有生物质产量高、生长速度快和多糖含量高等特点,并且在生长过程中不占用耕地和淡水资源^[4]。与主要由葡聚糖组成的绿藻相比,红藻所含的3,6-脱水-L-半乳糖(3,6-anhydro-L-galactose, L-AHG)和褐藻所含的褐藻酸盐等主要多糖组分不容易发酵,从而导致红藻和褐藻的利用相对更加困难^[5]。2021年,中国褐藻(包括海带、裙带菜和羊栖菜等)海水养殖产量约为190万吨,远高于其他经济藻类的产量^[6]。褐藻除了可以直接作为食品消费外,还是生物炼制过程中的重要原料,可用于生产各种化学品、药品以及制备生物燃料,在未来的生物经济中扮演重要角

色。有数据表明,褐藻生态系统占据了全球约25%的海岸线,其每年产生的价值高达上千亿美元^[7-8]。值得注意的是,褐藻中碳水化合物含量高达60%,其含有的褐藻多糖及其衍生物具有抗肿瘤、抗凝血、抗病毒和免疫调节等多种生物活性^[9]。

自2014年以来,随着人们对碳水化合物结构、相关降解酶及纯化方法研究的深入,利用代谢工程等新一代生物技术将褐藻多糖转化为高附加值的产品已成为可能^[10]。制备海藻低聚糖的传统技术主要是化学法,该方法提取率低,并且在过程中产生的残留物容易造成环境污染。相比之下,生物酶法更为绿色环保,制备条件温和,催化效率高,可形成生物相容的活性产物。来自海洋微生物的碳水化合物降解酶在海洋碳循环过程中可充当稳定的酶库,对海洋多糖的降解发挥重要作用^[11]。因此,充分认识褐藻多糖的化学结构、降解酶系及其活性架构特征,有助于揭示酶和底物特异性识别的物质

* 国家自然科学基金(32100022)和山东大学基本科研业务费专项(2019HW022)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-58631569, E-mail: yingjie.li@sdu.edu.cn

收稿日期: 2022-08-01, 接受日期: 2022-11-24

基础, 推动褐藻多糖的高效生物降解转化, 对精准定制生物活性寡糖、形成绿色环保的工业化生产工艺具有重要意义。

1 褐藻的系统发育及形态结构

褐藻门与陆地植物、绿藻和红藻具有某些共同的特征, 均能够进行光合作用且具有细胞壁结构。系统发育表明, 褐藻隶属于真核生物冠群不等鞭毛生物, 它在进化上不同于红藻、绿藻和陆生植物等原始色素体生物, 也不同于真菌和动物等后鞭毛生物^[12]。独立的进化过程使得褐藻具有独特的代谢、生理、细胞和生态特征, 包括卤素的代谢、特有的细胞壁多糖和对渗透胁迫现象的高耐受性^[13]。褐藻纲成员共包含 20 个目、285 个属、2 098 个种, 其中, 酸藻目 (Desmarestiales) 和部分水云目 (Ectocarpales) 的藻体类型相对简单, 为单列细胞

组成的异丝体结构, 而海带目 (Laminariales)、线翼藻目 (Tilopteridales)、墨角藻目 (Fucales) 和部分水云目的结构相对复杂, 已分化出类似根、茎、叶或气囊等组织 (图 1a)。藻类形态结构最复杂的是海带目, 最具代表性的就是海带 (*Laminaria japonica*), 海带的孢子体由固着器 (假根)、柄和叶片三部分组成 (图 1b)^[14]。固着器位于海带基部, 类似于植物的根, 起锚定作用, 可吸附在棕绳或岩石上, 但内部无维管组织和根冠的分化。柄是连接固着器和叶片的部分, 在海带幼期呈现圆柱形, 表面光滑, 藻体成熟后则呈扁圆形。叶状体呈褐色带状, 革质有光泽, 藻体一般长 2~4 m, 叶片边缘生长速度快于中部。海带的生长方式为居间生长, 分生组织位于海带的基部, 即柄与叶片连接处, 该部位细胞具有很强的分裂能力^[15]。

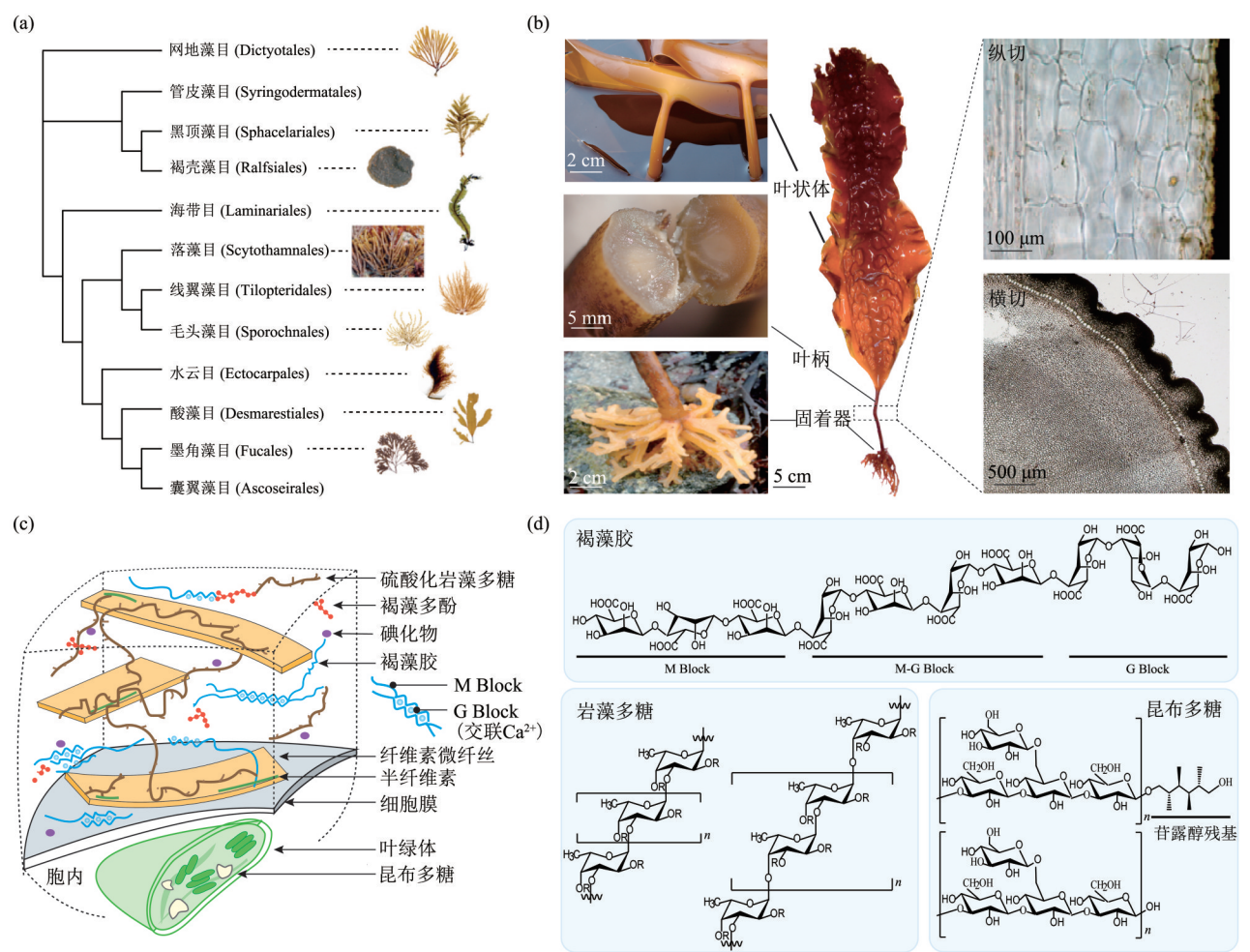


Fig. 1 The classification of brown algae and the biological characteristics of its representative species *Laminaria japonica*

图1 褐藻纲分类和褐藻细胞壁及其多糖结构

(a) 褐藻的系统发育树 (改绘自Teagle等^[12], Charrier等^[14])。 (b) 海带 (*Laminaria japonica*) 形态及微观结构 (改绘自Charrier等^[14])。 (c) 褐藻细胞壁结构模型 (改绘自Deniaud-Bouët等^[16])。 (d) 褐藻特有海洋多糖的化学结构^[17-19]。

2 褐藻的碳水化合物组分

褐藻不同的起源与进化过程使得其存在独特的生物活性物质,主要包括碳水化合物、卤化物和酚类物质等^[20]。从褐藻中分离提取的碳水化合物统称为褐藻多糖,主要包括褐藻胶(alginate)、岩藻多糖(fuoidan)、昆布多糖(laminarin)、纤维素和半纤维素等,其中褐藻胶、岩藻多糖和纤维素为结构型多糖,主要存在于褐藻细胞壁中,昆布多糖为储存型多糖,位于叶绿体和液泡中(图1c)。纤维素和半纤维素是陆生植物细胞壁的主要成分,但是在褐藻细胞中含量很低,褐藻多糖以阴离子酸性多糖为主^[18, 21]。下面就褐藻中特有的碳水化合物成分加以介绍。

2.1 褐藻胶

褐藻胶是一类线性的阴离子酸性多糖,最初是从褐藻细胞壁中分离得到,约占细胞干重的40%~50%,随后又在假单胞菌(*Pseudomonas*)、固氮菌属(*Azotobacter*)等细菌中观察到褐藻胶的存在,充当细菌生物膜的主要成分。目前商业化褐藻胶主要来源于泡叶藻(*Ascophyllum*)、海带(*Laminaria*)、巨藻(*Macrocystis*)和马尾藻(*Sargassum*)等海洋藻类^[22]。褐藻胶由 β -D-甘露糖醛酸(β -D-mannuronic acid, M)和 α -L-古罗糖醛酸(α -L-guluronic acid, G)两种单体组成, M和G互为差向异构体,它们的差异仅在于C-5位羧基的构象^[23]。两类单体通过1,4-O-糖苷键连接形成MM、MG、GG和GM 4种二糖单元,并进一步以均聚方式形成多聚M(PolyM)或多聚G(PolyG)嵌段,或以杂聚的方式随即交替形成PolyMG嵌段,结构上的混杂性使得褐藻胶是相对难降解的海洋多糖之一^[24](图1d)。褐藻胶单体的排列方式、M/G比例、分子质量和乙酰化程度等因素均会影响它的结构,也决定了其理化性质,如黏度、溶胶/凝胶性质和吸水率等^[25]。例如,富含G的褐藻胶单元刚性更强,具有更高的热稳定性和持水能力,容易形成孔隙较大的水凝胶,便于固定化生物组分从聚合物网络中扩散^[26],而富含M的单元柔软且有弹性,适合制备低渗透率的微胶囊等递送材料^[27]。此外,褐藻胶G嵌段对阳离子的亲和力大于M嵌段,与果胶“蛋盒”模型类似,两个相邻G单体的羧基易与二价金属离子(如 Ca^{2+} 或

Ba^{2+} 等)相互作用,钙依赖性凝胶化主要依靠静电相互作用, Ca^{2+} 可与褐藻胶的羧基相互作用,使得分子链间交联,减少分子间的静电排斥,有助于凝胶结构的形成^[28-29]。据报道,褐藻胶具有生物相容性、无毒性和高稳定性等多种理化性质,是组织工程中理想的生物惰性基质,广泛用于药物递送、组织工程和基因治疗等领域,并且还可作为胶凝剂和增稠剂应用于化妆品行业 and 食品工业中^[30-31]。目前,各种化学改性褐藻胶的结构和相应性质已有报道,包括乙酰化褐藻酸盐、硫酸化褐藻酸盐、疏水改性褐藻酸盐和共价交联褐藻酸盐等。通过改变褐藻酸盐的结构,可以定制溶解度、疏水性、机械性能和物理化学稳定性等性质,构建特定用途的理想材料,为生物活性成分的递送提供了新的方向^[32-33]。

2.2 岩藻多糖

岩藻多糖又称岩藻多糖硫酸酯,是一类天然的硫酸化杂多糖,主要从褐藻细胞壁和细胞间质中分离得到,作为细胞壁的支撑结构和“亲水涂层”,能够维持细胞湿润的环境,抵御过度光照对藻体的破坏^[34]。此外,岩藻多糖也存在于少量海洋无脊椎动物(如海胆和海参)中。1913年, Kylin^[35]首次从掌状海带(*Laminaria digitata*)中提取出这类多糖,经水解确定其主要单体为L-岩藻糖。随着鉴定和纯化分离方法的发展,人们对岩藻多糖结构的研究日趋深入。研究发现,除了L-岩藻糖和硫酸盐基团组成的核心骨架结构之外,岩藻多糖还含有葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、木糖、甘露糖和葡萄糖醛酸残基等分支结构,少数还存在乙酰基^[36]。岩藻多糖的结构和组成、取代基位置与其来源、部位和分离提取方法密切相关,有研究表明从墨角藻(*Fucus vesiculosus*)中分离的岩藻多糖含有84%岩藻糖、6%木糖、7.3%半乳糖和2%的甘露糖,而从*Fucus distichus*中发现的岩藻多糖由51.6%岩藻糖、2.7%木糖、1.5%半乳糖、0.7%甘露糖和0.2%葡萄糖组成^[37-38]。来自墨角藻(*F. vesiculosus*)和绳藻(*Chorda filum*)的岩藻多糖主链虽然均由 α -1,3-糖苷键连接,但它们发生硫酸化取代的位置明显不同,前者主要取代C-4位置,而后的硫酸基主要位于O-4位上,部分位于O-2位上^[39-40]。岩藻多糖的异质性使得人们很难从整体上对其进行研究, Cumashi等^[41]研究发现,岩藻多糖主链的骨

架结构可作为分类的物质基础, 复杂多变的主链结构大致可分为两种类型, 包括以1,3- α -L-岩藻糖为重复单元的I型主链结构, 和以交替的1,3- α -L-岩藻糖和1,4- α -L-岩藻糖为重复单元的II型主链结构(图1d)。据报道, 来自海带目和水云目的岩藻多糖多为I型结构, 而从墨角藻目中分离出的岩藻多糖往往含有主链重复单元^[42]。岩藻多糖的生物活性与它的结构特征密切相关, 如多糖的分子质量与结构、硫酸基的含量和位置, 以及是否存在其他取代基等, 但到目前为止, 岩藻多糖的精细结构尚未完全阐明, 结构与特定生物活性功能之间的构效关系有待深入探究^[43-44]。

2.3 昆布多糖

昆布多糖又称海带淀粉、褐藻淀粉, 主要来源于海带目(例如 *Laminaria*、*Saccharina* 和 *Undaria*) 和墨角藻目(例如 *Ascophyllum* 和 *Fucus*), 广泛存在于胞内叶绿体和液泡中。作为褐藻的储存型碳水化合物, 昆布多糖含量随季节变化显著, 在藻类快速生长的春季含量极低, 主要在生长的中后期积累^[45]。与其他海洋多糖相比, 昆布多糖的结构简单且平均分子质量低, 化学结构由 β -1,3-O-糖苷键连接的D-葡萄糖残基主链和 β -1,6-O-糖苷键连接的D-葡萄糖侧链组成(图1d), 分子质量约为5 ku, 聚合度在20~30之间。根据聚合链末端结构的不同, 昆布多糖分为两大类, 在主链还原端含有D-甘露醇残基的称为M链; 反之, 还原端被葡萄糖残基取代而不含甘露醇残基的链称为G链^[46]。多糖中主链和侧链的比例与褐藻种类和环境因素(栖息地、水温、盐度、海流和季节)密切相关, 通常在1:1至10:1之间^[19]。例如, 来自网地藻(*Dictyota dichotoma*)的昆布多糖含有重复四糖结构单元, 主侧链比为3:1, 但从糖海带(*Saccharina cichorioides*)分离出的昆布多糖结构并不规律, 分子中 β -1,6-O-连接的葡萄糖残基主要集中在非还原末端附近^[47]。更为复杂的是, 从墨角藻(*Fevanescens*)中分离的昆布多糖, C-6处的分支不仅是单个葡萄糖残基组成, 而是 β -1,6-O-连接的葡萄糖残基短链组成^[48]。有研究表明, 昆布多糖的分支度决定了溶解性, 来自 *Turbinaria*

conoides 昆布多糖的 β -1,6-支链含量约为1%~2%, 仅在温水(60~80℃)中可溶, 而分支度高的昆布多糖可以在冷水中完全溶解, 结构的分支度不仅会影响多糖的理化性质, 还可能影响其生物活性功能^[49-50]。与其他海洋多糖(例如褐藻胶, 琼胶和卡拉胶)不同, 昆布多糖不具有增稠和凝胶特性。但大量研究表明, 作为天然的 β -1,3-葡聚糖聚合物之一, 昆布多糖具有的潜在的生物活性, 并且通过辐照、硫酸化、氧化和还原等多种手段可改善多糖的理化和机械性能^[51]。

3 褐藻多糖降解酶系及其活性架构

3.1 褐藻胶裂解酶及其活性架构

褐藻胶的生物降解由褐藻胶裂解酶(alginate lyase)催化完成, 该类酶采用 β -消除机制使褐藻胶多糖的 β -1,4-O-糖苷键断裂, 形成在非还原端糖环的C-4和C-5间带有不饱和键的寡糖或单糖4-脱氧-L-赤-5-己糖醛酸(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)。在具有褐藻酸盐代谢功能的微生物中, DEH在还原酶作用下生成2-酮-3-脱氧葡萄糖酸(2-keto-3-deoxygluconate, KDG), 然后通过激酶磷酸化为2-酮-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸(2-keto-3-deoxy-phosphogluconate, KDPG), 该产物随后进入Entner-Doudoroff途径, 产生丙酮酸和3-磷酸甘油醛^[52](图2a, b)。目前, 褐藻胶裂解酶已从各种细菌、真菌、病毒、海藻和海洋软体动物中分离得到, 基于对一级结构的聚类分析, 褐藻胶裂解酶共分为14个家族(PL5、PL6、PL7、PL8、PL14、PL15、PL17、PL18、PL31、PL32、PL34、PL36、PL39和PL41)^[53]。根据底物特异性, 褐藻胶裂解酶可分为甘露糖醛酸特异性裂解酶(PolyM裂解酶, EC 4.2.2.3)、古罗糖醛酸特异性裂解酶(PolyG裂解酶, EC 4.2.2.11)和双功能裂解酶(PolyMG裂解酶, EC 4.2.2.-)(表1)。此外, 褐藻胶裂解酶还可根据作用方式分为内切酶和外切酶, 前者从聚合物链内切割糖苷键并释放出不同聚合度的不饱和褐藻酸盐低聚糖, 外切酶只能作用于聚合物末端降解产生单体或二聚体, 大多数已表征的裂解酶为内切酶^[54-55]。

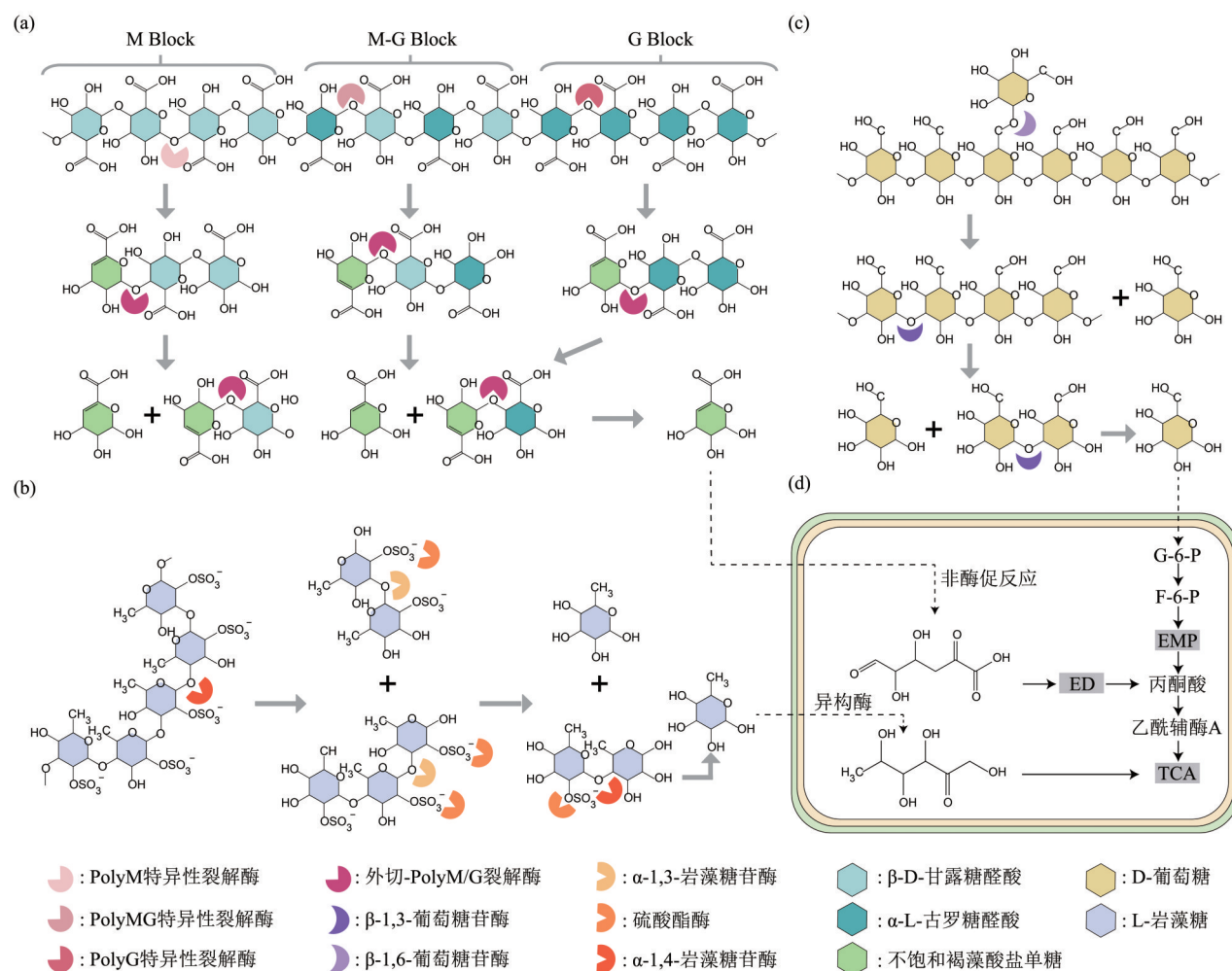


Fig. 2 Schematic diagram of multi-enzyme synergistic degradation and microbial metabolism of marine polysaccharides [51, 55-57]

图2 多酶协同降解及微生物代谢海洋多糖示意图 [51, 55-57]

(a) 内切型PolyM、PolyMG和PolyG特异性褐藻胶裂解酶可分别作用于褐藻胶的M区域 (block)、M-G block和G block结构嵌段, 产生在非还原端具有双键的不饱和褐藻寡糖。外切型褐藻胶裂解酶识别不饱和褐藻寡糖并将它们裂解成不饱和褐藻酸盐单糖。(b) 岩藻多糖在 α -1,3-岩藻糖苷酶、 α -1,4-岩藻糖苷酶和硫酸酯酶的共同作用下降解为岩藻糖, 最终进入TCA循环。(c) 昆布多糖的胞外降解涉及到 β -1,3-昆布多糖酶和 β -1,6-昆布多糖酶的协同作用, 终产物为葡萄糖。(d) 褐藻胶、岩藻多糖和昆布多糖酶解终产物——单糖进入胞内代谢途径。G-6-P: 葡萄糖-6-磷酸; F-6-P: 果糖-6-磷酸; EMP: 糖酵解; ED: ED途径 (Entner-Doudoroff pathway); TCA: 三羧酸循环。

Table 1 Structural characteristics of marine polysaccharides in brown algae and their degradation CAZymes [18, 58–60]

表1 褐藻中海洋多糖的结构特征及其降解CAZymes [18, 58–60]

海洋多糖	单体组成	硫酸化修饰	含量	降解酶	CAZyme 家族	骨架类型	催化机制	亲核试剂	质子供体	已表征数量	已解析构数	主要降解微生物及其丰度	
褐藻胶	β -1,4-D-甘露糖醛酸; α -1,4-L-古罗糖醛酸	无	0.3%~58.8%	甘露糖醛酸特异性裂解酶 (EC 4.2.2.3)	PL5	(α/α) ₆ 桶状	β 消除	Tyr	Tyr	12	2	交替假单胞菌属 (<i>Alteromonas</i>) 副嗜海水冰菌属 (<i>Paraglaciicola</i>) 食琼脂菌属 (<i>Agarivorans</i>) 假交替单胞菌属 (<i>Pseudoalteromonas</i>) 克雷伯氏菌属 (<i>Klebsiella</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 发光杆菌属 (<i>Photobacterium</i>) 冷单胞菌属 (<i>Psychromonas</i>) 科贝特氏菌属 (<i>Cobetia</i>) 嗜糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 微孢菌属 (<i>Microbulbifer</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 固氮菌属 (<i>Azotobacter</i>) 鞘氨醇单胞菌属 (<i>Sphingomonas</i>) 反硝化菌属 (<i>Nitratiruptor</i>) 类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i>) 棒杆菌属 (<i>Corynebacterium</i>) 链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 嗜几丁质菌属 (<i>Chitinophaga</i>) 桃色杆菌属 (<i>Persicobacter</i>) 火色杆菌属 (<i>Flammeovirga</i>) 假土地杆菌属 (<i>Pseudopedobacter</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 不滑动菌属 (<i>Nonlabens</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 食纤维菌属 (<i>Cellulophaga</i>)	变形菌门
					PL8	(α/α) ₆ 桶状	β 消除			1	0		
					PL15	(α/α) ₆ 桶状	β 消除			1	0		
					PL17	(α/α) ₆ 桶状	β 消除	Tyr	Tyr	4	1		
					PL6	平行 β 螺旋	β 消除	Lys	Arg	2	1		
					PL31	平行 β 螺旋	β 消除	Lys	Tyr	1	1		
					PL7	β 果冻卷	β 消除	His	Tyr	21	4		
					PL14	β 果冻卷	β 消除			3	1		
					PL36	β 果冻卷	β 消除	Lys	Lys	2	1		
					PL32		β 消除			1	0		
					PL41		β 消除			1	0		
				古罗糖醛酸特异性裂解酶 (EC 4.2.2.11)	PL6	平行 β 螺旋	β 消除	Lys	Arg	11	4		
					PL7	β 果冻卷	β 消除	His	Tyr	20	4		
					PL18	β 果冻卷	β 消除			3	2		
岩藻多糖	α -1,3-L-岩藻糖; α -1,4-L-岩藻糖	有	0.8%~25.7%	外切-1,3- α -L-岩藻糖苷酶 (EC 3.2.1.111)	GH29	(β/α) ₈ 桶状	保留型	Asp	Glu	10	4	梭菌属 (<i>Clostridium</i>) 地中海杆菌属 (<i>Mediterraneibacter</i>) 类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i>) 链球菌属 (<i>Streptococcus</i>) 热袍菌属 (<i>Thermotoga</i>) 双歧杆菌属 (<i>Bifidobacterium</i>) 链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>) 黄单胞菌属 (<i>Xanthomonas</i>) 冷单胞菌属 (<i>Psychromonas</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 螺状菌属 (<i>Spirosoma</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 海曲菌属 (<i>Mariniflexile</i>) 霍乱弧菌属 (<i>Vibrio cholerae</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 坦纳氏菌属 (<i>Tannerella</i>) 伊丽莎白金菌属 (<i>Elizabethkingia</i>)	厚壁菌门
					GH168		保留型			1	0		
					GH29	(β/α) ₈ 桶状	保留型	Asp	Glu	35	6		
					GH95	(α/α) ₆ 桶状	反转型	Asn	Glu	1	0		
					GH141	平行 β -螺旋		Asp	Asp	1	1		
				内切-1,4- α -L-岩藻糖苷酶 (EC 3.2.1.212)	GH151		保留型			3	1		
					GH107	(β/α) ₈ 桶状	保留型	Asp	His	7	2		
					GH29	(β/α) ₈ 桶状	保留型	Asp	Asp	1	0		
					GH95	(α/α) ₆ 桶状	反转型	Asn	Glu	11	2		

续表1

海洋多糖	单体组成	硫酸化修饰	含量	降解酶	CAZyme 家族	骨架类型	催化机制	亲核试剂	质子供体	已表征数量	已解析构数	主要降解微生物及其丰度							
昆布多糖	β -1,3-D-葡萄糖; β -1,6-D-葡萄糖	无	0.4%~19%	内切-1,3- β -D-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.6)	GH8	$(\alpha/\alpha)_6$ 桶状	反转型	Asp	Glu	5	0	拟无核糖菌属 (<i>Amycolatopsis</i>) 放线束丝菌属 (<i>Actinosynnema</i>) 链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>) 纤维菌属 (<i>Cellulomicrobium</i>) 节杆菌 (<i>Arthrobacter</i>) 游动放线菌属 (<i>Actinoplanes</i>) 克里布所菌属 (<i>Kribbella</i>) 拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiopsis</i>) 嗜热裂孢菌属 (<i>Thermobifida</i>) 滑柱菌属 (<i>Herpetosiphon</i>) 放线菌门							
					GH9	$(\alpha/\alpha)_6$ 桶状	反转型	Asp	Glu	2	0		醋酸弧菌属 (<i>Acetivibrio</i>) 瘤胃球菌属 (<i>Ruminococcus</i>) 丁酸弧菌属 (<i>Butyrivibrio</i>) 热解纤维素菌属 (<i>Caldicellulosiruptor</i>) 胞环糖芽孢杆菌属 (<i>Allicyclobacillus</i>) 藻高氏菌属 (<i>Laceyella</i>) 类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i>) 盐碱球菌属 (<i>Halalkalicoccus</i>) 尼尔菌属 (<i>Nitella</i>) 厚壁菌门						
					GH16	β -果冻卷	保留型	Glu	Glu	8	3			螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 螺旋体门					
					GH5	$(\alpha/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	1	0				食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 变形菌门				
					GH17	$(\alpha/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	32	5					嗜热裂孢菌属 (<i>Thermobifida</i>) 滑柱菌属 (<i>Herpetosiphon</i>) 醋酸弧菌属 (<i>Acetivibrio</i>) 瘤胃球菌属 (<i>Ruminococcus</i>) 丁酸弧菌属 (<i>Butyrivibrio</i>) 热解纤维素菌属 (<i>Caldicellulosiruptor</i>) 胞环糖芽孢杆菌属 (<i>Allicyclobacillus</i>) 藻高氏菌属 (<i>Laceyella</i>) 类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i>) 盐碱球菌属 (<i>Halalkalicoccus</i>) 尼尔菌属 (<i>Nitella</i>) 厚壁菌门			
					GH128	$(\alpha/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	4	4						螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 螺旋体门		
					GH157	$(\alpha/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	1	0							食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 变形菌门	
					GH158	$(\alpha/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	3	1								嗜热裂孢菌属 (<i>Thermobifida</i>) 滑柱菌属 (<i>Herpetosiphon</i>) 醋酸弧菌属 (<i>Acetivibrio</i>) 瘤胃球菌属 (<i>Ruminococcus</i>) 丁酸弧菌属 (<i>Butyrivibrio</i>) 热解纤维素菌属 (<i>Caldicellulosiruptor</i>) 胞环糖芽孢杆菌属 (<i>Allicyclobacillus</i>) 藻高氏菌属 (<i>Laceyella</i>) 类芽孢杆菌属 (<i>Paenibacillus</i>) 盐碱球菌属 (<i>Halalkalicoccus</i>) 尼尔菌属 (<i>Nitella</i>) 厚壁菌门
					GH64	新月状	反转型	Asp	Glu	5	1								
				GH16	β 果冻卷	保留型	Glu	Glu	46	10	螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门								
				GH152	β 果冻卷	保留型	Glu	Glu	1	0		螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门							
				外切-1,3- β -D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.58)	GH5	$(\beta/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu	18			3	螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门					
					GH55	平行 β 螺旋	反转型	Glu	15	3			螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门						
					内切-1,6- β -D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.75)	GH5	$(\beta/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu					10	0	螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门		
						GH30	$(\beta/\alpha)_8$ 桶状	保留型	Glu	Glu					7	1		螺旋体属 (<i>Spirochaeta</i>) 美丽菌属 (<i>Formosa</i>) 黄杆菌属 (<i>Flavobacterium</i>) 佐贝尔氏菌属 (<i>Zobellia</i>) 拟杆菌属 (<i>Bacteroides</i>) 红嗜热菌属 (<i>Rhodothermus</i>) 丝状杆菌属 (<i>Fibrobacter</i>) 奇异球菌属 (<i>Deinococcus</i>) 食谷菌属 (<i>Vicivallis</i>) 中华根瘤菌属 (<i>Sinorhizobium</i>) 伯克霍尔德氏菌属 (<i>Burkholderia</i>) 溶杆菌属 (<i>Lysobacter</i>) 弧菌属 (<i>Vibrio</i>) 噬糖菌属 (<i>Saccharophagus</i>) 纤维弧菌属 (<i>Cellvibrio</i>) 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 螺旋体门	

截至2022年8月,对Czay数据库中褐藻胶、岩藻多糖和昆布多糖降解酶系的家族分类、蛋白质骨架结构、催化特性和已表征或解析的数目进行汇总,并统计了主要降解微生物的种类和已表征个数。

随着已表征蛋白质三维结构数量的增加,褐藻胶裂解酶在结构上大致分为4类: $(\alpha/\alpha)_n$ 桶状(PL5)、 β 果冻卷(PL7、PL14、PL18、PL36)、平行 β 螺旋(PL6、PL31)和 $(\alpha/\alpha)_n$ 桶状反接平行 β 折叠(PL8、PL15、PL17)^[61]。 β 果冻卷是最常见的构象,该结构由两个弯曲的反平行 β 片(SA和SB)组成,催化位点由内凹片(SA)形成的裂隙所包围,以该构象中表征数量最多的PL7家族为例,SA片中心的3个 β 链排列有序,主要识别底物还原端内侧基团。PL7家族的酶具有混杂性,其中,AlyC3(PDB: 7C8F)以寡聚甘露糖醛酸为底物,主要识别底物-1和+1亚位点,活性中心的保守残基Arg78和Gln125与底物羧基形成相互作用^[62]。而来自鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)的褐藻胶裂解酶(PDB: 2ZAB)以寡聚古罗糖醛酸为底物,该类褐藻胶裂解酶活性中心序列图谱表明,His191、Gln189和Tyr284氨基酸残基构成催化中心,其中His和Tyr分别作为酶促反应的催化碱和催化酸,其余保守氨基酸残基分布于+1和+2亚位点且均为极性氨基酸残基^[63](图3)。 $(\alpha/\alpha)_n$

是由 n 个反平行 α 螺旋形成的桶状结构(n 从3~7不等),其中PL5家族是单结构域蛋白,对PolyM底物具有专一性。A1-III是PL5家族第一个报道采用 $(\alpha/\alpha)_n$ 折叠的褐藻酸盐裂解酶,底物分子可伸入隧道装裂隙中,在6个内螺旋包围下与催化残基Tyr246相互作用^[5, 64]。然而,PL15和PL17家族除了催化结构域外,一般还包含1~2个额外结构域,并且-1亚位点只能容纳1个糖环,以外切形式发挥作用^[65]。值得注意的是,最新表征的PL39家族褐藻胶裂解酶Dp0100,它的催化结构域与PL15和PL17家族相似,但它与五糖复合结构表明,Dp0100的底物结合裂隙深而长,以内切方式发挥作用^[66]。 β 螺旋包含二聚体和单体催化模式,如来自PL6家族的AlyGC为同型二聚体,催化断键需要金属离子的辅助, Ca^{2+} 通过与褐藻胶的羧基相互作用激活C-5质子,同时Lys220和Arg241分别作为质子供体和质子受体发挥功能^[67]。而在PL6家族的AlyF中,水分子可以部分替代金属离子的功能,在稳定褐藻胶C-5位置羧基的定向过程中发挥了重要作用^[68]。

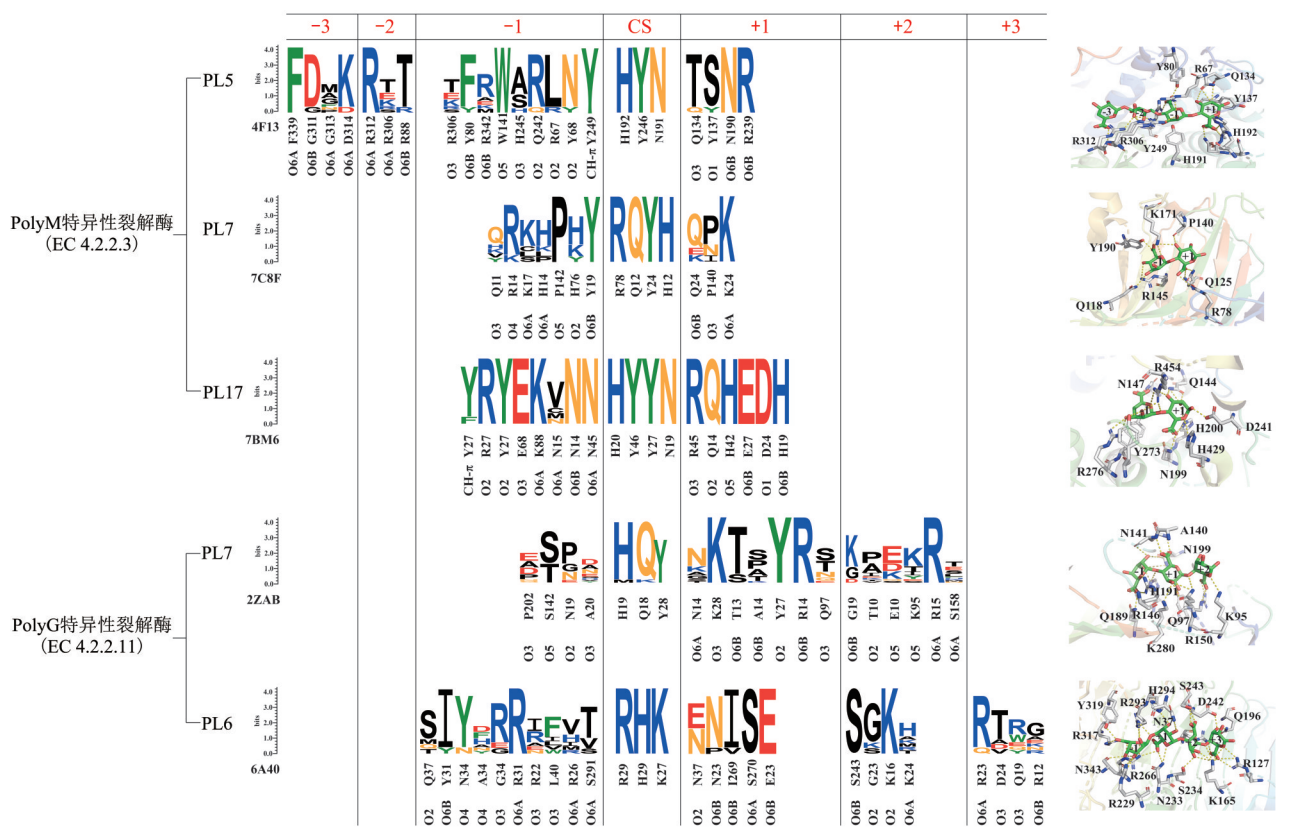


Fig. 3 Conservation of amino acids in the active architecture of some alginate-degrading enzymes and the interaction network with substrates

图3 部分褐藻胶降解酶系活性架构氨基酸保守性及与底物形成相互作用网络分析

通过对CAZy数据库中目标家族已表征的蛋白质进行结构和序列比对, 绘制PL5家族 (PDB: 4F13)、PL6家族 (PDB: 6A40)、PL7家族 (PDB: 7C8F, 2ZAB) 和PL17家族 (PDB: 7BM6) 褐藻胶裂解酶活性中心序列谱及底物相互作用网络。序列谱的纵坐标表示相对保守程度, 横坐标表示模板结构的PDB ID以及各氨基酸序列号, 并在横坐标底部标记了配位原子与每个亚位点氨基酸残基相互作用的位置。每种氨基酸用相应颜色的缩写字母表示 (KRH, 蓝色; DE, 红色; NQ, 橙色; WFY, 绿色; 其他, 黑色), 其中相似的颜色代表具有相似的物理化学性质, CS代表酶切割位点, 切点往非还原端方向的糖环分别为-1、-2、-3……, 往还原端方向的糖环分别为+1、+2、+3……。此外, 利用Pymol软件对蛋白质活性位点周围5 Å范围内的氨基酸残基进行分析, 将与底物存在相互作用的氨基酸残基用球棍模型显示。

3.2 岩藻多糖降解酶及其活性架构

岩藻多糖降解酶系主要分布于海洋细菌中, 少数海洋无脊椎动物和真菌也能够降解岩藻多糖^[69]。根据CAZy数据库最新统计, 岩藻多糖降解相关酶系包含GH29、GH95、GH107、GH141、GH151和GH168家族, 根据其作用位点的不同, 可分为 α -1,3-L-岩藻糖苷酶 (EC 3.2.1.111和EC 3.2.1.211)、 α -1,4-L-岩藻糖苷酶 (EC 3.2.1.51和EC 3.2.1.212) 和 α -1,2-L-岩藻糖苷酶 (EC 3.2.1.63)^[70] (表1)。值得注意的是, 岩藻多糖高度硫酸化且具有支链, 其修饰作用会阻碍糖苷键的断裂, 因此支链水解酶和硫酸酯酶需要先发挥作用。如图2b所示, 内切 α -1,4-岩藻多糖酶首先作用于 α -1,3/1,4-交替连接的L-岩藻糖主链 (C-2位硫酸化修饰), 该类酶底物特异性高, 只能水解特定的骨架生成硫酸化岩藻寡

糖。随后, 在S1家族外切硫酸酯酶的作用下, 硫酸化岩藻寡糖通过酯交换机制释放C-2位置的硫酸基团, 经脱硫作用后多糖结构进一步简化。最后, α -1,3-L-岩藻糖苷酶将寡糖水解成L-岩藻糖, 在异构酶修饰后进入三羧酸循环 (图2b)^[53]。

与其他海洋多糖相比, 岩藻多糖底物的结构相对复杂, 因此已表征和解析的岩藻多糖降解酶数量有限, 目前研究主要集中于GH29、GH95和GH107 3个家族。GH107和GH168属于内切型岩藻多糖酶, 其他家族均以外切方式发挥作用。相比之下, GH29家族是目前最大的岩藻糖苷酶家族, 具有广泛的底物特异性。该家族酶催化中心高度保守, Asp和Glu分别作为亲核试剂和质子供体, 通过双取代反应催化 α -L-岩藻糖基残基的水解, 可切割不同类型的糖苷键, 包括糖缀合物中由 α -1,2-

α -1,3-、 α -1,4-和 α -1,6-连接的L-岩藻糖和N-乙酰葡糖胺残基之间的键^[71-72]。Sakurama等^[73]根据其底物特异性和系统发育分析将GH29家族分为两个亚家族。亚家族A的岩藻糖苷酶（EC 3.2.1.51）保守氨基酸残基主要集中于-1亚位点，底物特异性较为宽松，而亚家族B（EC 3.2.1.111）的岩藻糖苷酶主要识别-1和+2亚位点，可容纳半乳糖残基的存在，特异性水解非还原末端的 α -1,3糖苷键。与GH29类似，GH95家族作用于糖链的非还原末端，释放L-岩藻糖，但其催化机制与GH29不同，该家

族的 α -1,4-L-岩藻糖苷酶和 α -1,2-L-岩藻糖苷酶采用单取代催化机制。Glu作为质子供体在GH95家族内高度保守，Asn通过激活水分子对C-1原子进行亲核攻击^[74]。此外，岩藻多糖降解酶的结合位点往往存在Trp和Tyr等芳香族氨基酸，芳香族氨基酸的苯环与吡喃糖环平行，起到稳定残基的作用，使得酶分子在执行功能时能够精准定位于糖链^[75]（图4）。GH139和GH141家族中某些成员可以特异性识别果胶中特定的 α -L-岩藻糖基序，GH151岩藻糖苷酶未详细表征^[76]。

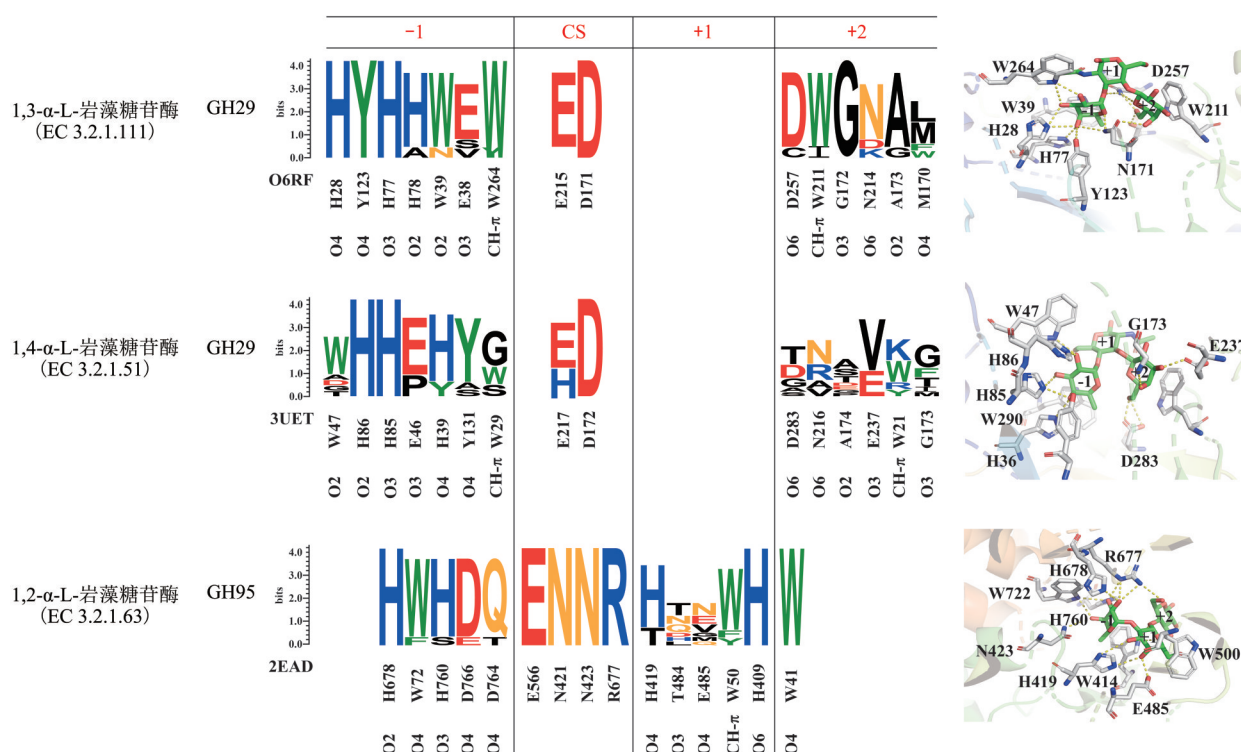


Fig. 4 Conservation of amino acids in the active architecture of some fucoidan-degrading enzymes and the interaction network with substrates

图4 部分岩藻多糖降解酶系活性架构氨基酸保守性及与底物形成相互作用网络分析

通过对CAZy数据库中GH29家族（PDB: O6RF, 3UET）、GH95家族（PDB: 2EAD）已表征岩藻多糖降解酶进行结构和序列比对，绘制目标家族活性中心序列谱及与底物相互作用网络，具体绘制方法见图3。

3.3 昆布多糖降解酶系及其活性架构

昆布多糖中不同糖苷键的比例和支链结构随藻类的种类和收获季节而变化，因此昆布多糖的生物降解需要主链和侧链糖苷水解酶的共同参与，该降解酶系广泛存在于真菌、酵母、细菌和海洋无脊椎动物等多种生物体中^[77]。昆布多糖降解酶系根据作用方式不同，可分为内切- β -1,3-葡聚糖酶（EC 3.2.1.6和EC 3.2.1.39）、外切- β -1,3-葡聚糖酶（EC 3.2.1.58）和 β -1,6-葡聚糖酶（EC 3.2.1.75）（表1）。内切- β -1,3-葡聚糖酶主要分布在GH5、GH8、

GH9、GH16、GH17、GH64、GH128、GH152、GH157和GH158家族，它们可随机切割昆布多糖中 β -1,3-键连接的骨架部分并释放葡萄糖和 β -1,6-键连接的寡糖^[54]（图2c）。外切 β -1,3-葡聚糖酶作用于糖链的非还原性末端将昆布寡糖转化为葡萄糖，从土星拟威尔酵母（*Williopsis saturnus*）中分离的WsEXG1和从白假丝酵母（*Candida albicans*）中纯化的Xog1p均发挥该功能^[77]，该类酶主要分布于GH5和GH55家族。此外， β -1,6-葡聚糖酶也是水解昆布多糖必需的酶，可随机裂解昆布多糖分

支中的 β -1,6-糖苷键。

据统计,已解析的昆布多糖降解酶的结构数量分别为GH16家族13个, GH17家族5个, GH128家族4个, GH5和GH55家族各3个, GH30、GH64和GH158家族各1个。糖苷水解酶家族成员通过一步反转或两步保留水解机制作用于底物,大多数昆布多糖降解酶(如GH16、GH17、GH128、GH5、GH30、GH158)通过保留机制进行水解, GH55和GH64家族则通过反转机制进行水解^[78]。来自GH16家族的成员采用典型的 β 果冻卷构象,其催化残基(两个Glu)虽然在家族内部相对保守,但在进化过程中发展出不同的底物特异性。与其他GH16家族的酶相比, ZgLamA含有一个17个氨基酸组成的附加环,使酶的底物结合口袋呈弯曲形状,与U型构象的底物糖链相适应^[79]。GH16家

族的Lam16A具有底物混杂性,除了可催化昆布多糖之外,还可作用于 β -1,4-连接的地衣多糖^[80],该蛋白质中存在一段富含色氨酸残基的保守序列, Trp110和Trp257残基充当疏水平台,分别与-2和+2位葡萄糖残基对齐,有助于底物正确定向和结合^[81]。GH17、GH128和GH158家族均为 $(\alpha/\alpha)_8$ 桶状构型且催化机制保守。GH17家族GluB晶体结构表明,该类蛋白质具有深而宽的裂隙允许酶分子以内切形式作用于长链底物,氨基酸残基的保守程度从催化位点向两端延伸,与糖链的结合能相对均匀^[82-83]。GH5家族成员的催化酸碱氨基酸残基均为Glu,值得注意的是,该家族Exg蛋白的底物结合口袋入口处存在一对反平行的苯丙氨酸残基(F144和F258),可与 β -1,3-葡聚糖基质相互作用^[84](图5)。GH55家族的催化机制为反转型,

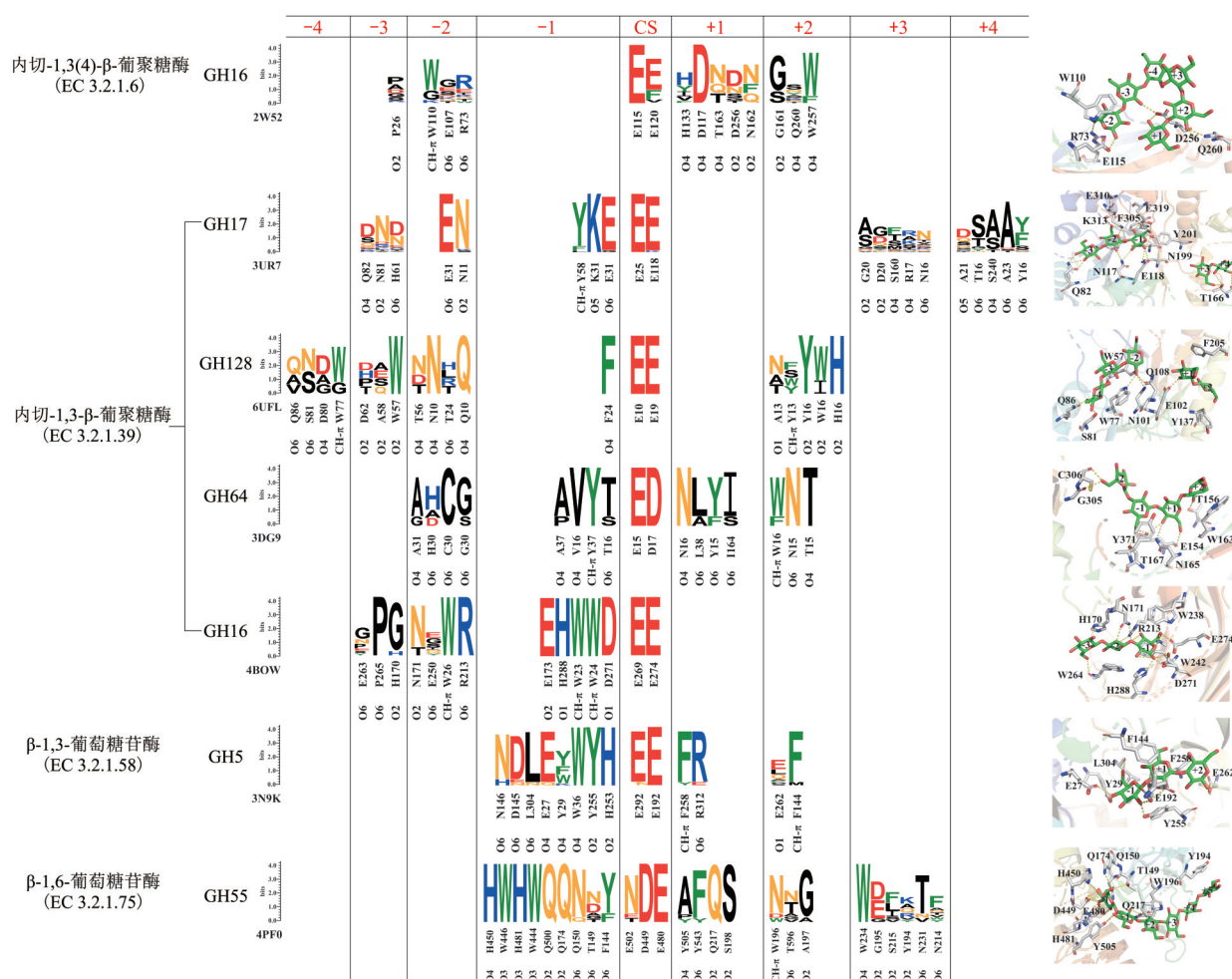


Fig. 5 Conservation of amino acids in the active architecture of some laminarin-degrading enzymes and the interaction network with substrates

图5 部分昆布多糖降解酶系活性架构氨基酸保守性及与底物形成相互作用网络分析

通过对CAZy数据库中GH5家族(PDB: 3N9K)、GH16家族(PDB: 2W52, 4BOW)、GH17家族(PDB: 3UR7)、GH55家族(PDB: 4PF0)、GH64家族(PDB: 3DG9)和GH128家族(PDB: 6UFL)已表征昆布多糖降解酶进行结构和序列比对,绘制目标家族活性中心序列谱及与底物相互作用网络,具体绘制方法见图3。

SacteLam55A的整体结构由两个右旋 β 螺旋结构域组成,其中Glu520为催化酸,水分子为亲核试剂,亲核试剂被四个氨基酸残基组成的质子传递网络激活^[85]。LPHase是GH64家族的成员,它由桶状结构域和(α/β)混合结构域组成,两个结构域之间存在一段较宽裂隙,整体结构呈现新月状(crescent like fold),裂隙内部的Glu154和Asp170分别作为酸催化剂和碱催化剂发挥作用^[86]。

4 褐藻多糖及寡糖的生物学功能

4.1 褐藻胶寡糖的生物活性研究

通过酶解法制备的褐藻胶寡糖(alginate oligosaccharide, AOS)表现出独特的理化性质,Liu等^[87]将AOS与人体健康相关的生物活性和潜在应用进行了详细的综述,主要包括免疫调节、抗氧化、抗糖尿病、抗高血压、抗肿瘤、抗炎症和抗凝血活性等。酶解产生的不饱和褐藻胶寡聚物(M3-9和G3-9)能够以结构依赖性的方式诱导RAW264.7巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α),而通过酸水解制备的饱和褐藻胶寡聚物只显示出相当低的生物活性,这暗示着寡聚物非还原端的不饱和和结构在某些信号通路的诱导中起着关键作用^[88]。Fang等^[89]进一步阐明了该细胞中GAOS的信号转导过程,Toll样受体(TLR)4作为TLR家族的重要成员,是激活先天免疫细胞和触发炎症信号转导的功能膜表面受体,GAOS经TLR4识别可以激活MAPK途径,使JNK磷酸化,随后激活下游转录因子AP-1。另一方面,GAOS还可激活PI3K通路,诱导Akt磷酸化并触发I κ B激酶,释放出NF- κ B易位进入细胞核内,最终通过级联反应启动靶基因表达并诱导炎症介质的产生,包括一氧化氮合酶和TNF- α 等促炎细胞因子(图6a)。mTOR通路参与细胞骨架重塑和细胞迁移,当巨噬细胞经GAOS处理后,伪足延长且相对细胞面积增加,有助于巨噬细胞与周围病原体的接触,促进吞噬作用^[90]。在抗氧化方面,AOS可以显著增强人静脉内皮细胞(HUVECs)中自由基清除剂和抗氧化酶的活性,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽(GSH)^[91]。AOS还能够以浓度依赖性的方式清除超氧化物和羟基自由基,有趣的是,GAOS诱导巨噬细胞产生一氧化氮(NO)的水平显著强于MAOS,这与二者分子构象的差异密切相关^[92]。此外,寡聚甘露糖醛酸及其铬(III)复合物可增强C2C12骨骼肌细胞对胰岛素的敏

感性,提高细胞中葡萄糖转运蛋白和胰岛素受体的表达水平^[93]。

4.2 岩藻多糖及其衍生寡糖的生物活性研究

近年来,海洋天然产物的开发推动了多糖药物研究领域的发展,岩藻多糖具有调节机体免疫、抗凝血、抗肿瘤、降血脂、抗病毒和抗炎等生物学活性,使得其成为新的研究热点。在目前已表征的多种岩藻多糖生物活性中,国内外学者对其抗肿瘤作用的相关研究最为深入。岩藻多糖及其衍生寡糖对多种类型的癌细胞和肿瘤细胞的作用机制主要分为以下4个方面。首先,抑制癌细胞有丝分裂、调节细胞周期,岩藻多糖处理肝癌细胞系(Huh7)可能导致G0/G1细胞积累并诱导其他细胞周期停滞^[19]。其次,岩藻寡糖可以激活癌细胞的凋亡信号。Zhang等^[94]研究发现,使用820 mg/L低分子质量的岩藻寡糖处理乳腺癌细胞MDA-MB231后,抗凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-xl和Mcl-1)的表达量显著降低,促凋亡蛋白(如Bax、Bid和Bak)的表达水平有所提高,最终激活效应物Caspase-3/7导致细胞的内源性凋亡(图6b)。此外,岩藻寡糖可通过死亡诱导信号复合物(FADD)激活胞内凋亡机制,但是目前关于岩藻寡糖与肿瘤细胞作用的受体靶点尚无报道^[95]。另一方面,岩藻寡糖可调节自噬关键激酶mTORC1活性,诱发自噬作用并激活自噬调控关键蛋白Beclin-1的表达,过度的自噬作用触发非凋亡程序性细胞死亡^[96-97]。第三,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可特异性识别岩藻寡糖FP08S2上的硫酸化基团,竞争性阻断ERK/VEGF/VEGFR信号通路,切断肿瘤细胞营养和氧气的供应^[98]。第四,岩藻寡糖通过与巨噬细胞和树突细胞膜上特定的糖蛋白受体结合激活MAPK信号通路,调节宿主免疫反应^[99]。最新研究表明,来自海带(*L. japonica*)的岩藻寡糖可以显著减轻头孢哌酮诱导的肠道损伤,调节小鼠肠道的微生物菌群,且它的诱导活性与分子质量相关,中等分子质量岩藻寡糖(mid-molecular-weight fucoidans, MF)($MW=26.7$ ku)的诱导效果优于低分子质量岩藻寡糖(low-molecular-weight fucoidans, LF)($MW=1.13$ ku)^[100]。岩藻寡糖在心脑血管疾病的治疗中也具有应用潜力,它可加快胆固醇的反向转运过程,抑制脂质合成并提高脂质的代谢^[101]。

4.3 昆布多糖及其衍生寡糖的生物活性研究

昆布多糖及其衍生寡糖作为天然的 β -1,3-葡萄

糖聚合物之一, 具有广泛的生物活性, 已有文献报道该类物质能够激活先天性免疫反应, 刺激抗肿瘤反应, 抑制细胞凋亡并促进伤口修复^[102-103]。昆布多糖与真菌细胞壁成分 β -1,3-葡聚糖分子结构相似, 是先天性免疫反应中的重要配体, 可与葡聚糖特异性识别受体Dectin-1相互作用^[104]。Dectin-1与配体结合后, 可招募脾酪氨酸激酶激活转录因子NFAT, 进而诱导环氧合酶2 (COX-2) 和白介素-2 (IL-2) 等细胞因子的分泌, 增强机体免疫力^[105] (图6c)。作为免疫刺激剂, 昆布多糖可诱导鱼类激活非特异性先天免疫, 增强鱼类对细菌或病毒感染的抵抗力^[106]。此外, 昆布多糖衍生物可通过诱导肿瘤细胞凋亡从而实现抗肿瘤的作用。有研究指出, 昆布寡糖可通过线粒体介导的细胞凋亡途径抑

制人结肠癌细胞 LoVo 增殖, 其信号传导过程与岩藻寡糖激活的内源性凋亡途径类似^[107]。Huang 等^[108]指出, 与昆布寡糖相比, 45.92% 硫酸化的寡糖 (LAMS) 能更显著地抑制 LoVo 细胞的生长, 这表明 LAMS 具有更好的抗肿瘤活性, 分子修饰技术为生产具有高抗肿瘤活性的昆布寡糖提供了新的思路。有研究表明, 昆布多糖对人体上消化道中的水解酶存在抗性, 其可作为益生元调节人类肠道健康。在小鼠饮食中添加昆布多糖可明显降低肠道中厚壁菌门与拟杆菌门的比例, 增强肠道菌群的代谢能力。另一方面, 昆布多糖有利于动物双歧杆菌和干酪乳杆菌的生长, 使得乳酸和乙酸等短链脂肪酸产量提高, 有助于维护肠道的功能、缓解高脂饮食带来的副作用^[109]。

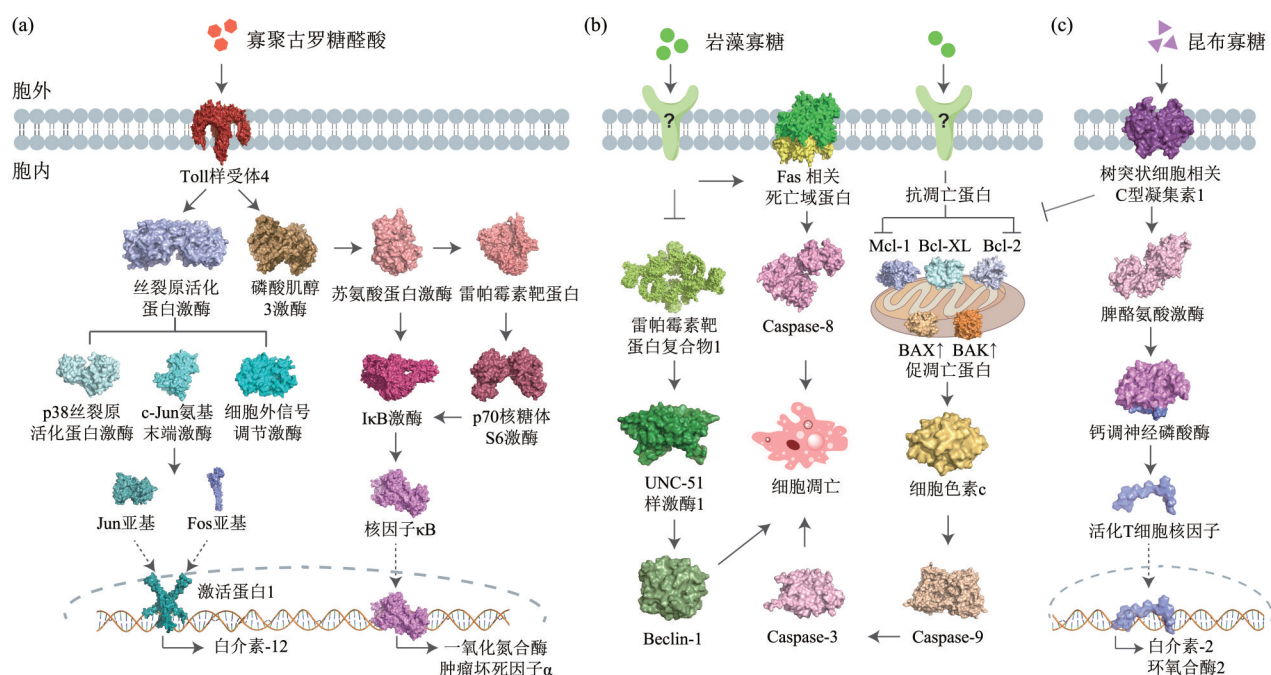


Fig. 6 Bioactivity and mechanism of fucoidan oligosaccharides

图6 褐藻寡糖生物活性及其作用信号通路

(a) Toll样受体4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 介导寡聚古罗糖醛酸激活巨噬细胞免疫活性的信号通路^[87-88]。(b) 岩藻寡糖调节癌细胞与肿瘤细胞凋亡的分子机制^[89-92]。(c) 昆布寡糖激活先天性免疫反应的信号通路^[93-94]。信号通路中相关蛋白质结构利用Pymol软件显示为表面模型, 各蛋白质的PDB数据库ID如下。TLR4: 3VQ2; 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK): 6Q0K; p38丝裂原活化蛋白激酶: 2GHL; 细胞外信号调节激酶 (extracellular-signalregulated protein kinase, ERK): 6HKN; c-Jun氨基末端激酶 (c-jun N terminal kinase, JNK): 3E7O; Jun亚基: 4KKE; Fos亚基: 2WT7; 激活蛋白1 (activator protein 1, AP-1): 4HMY; 磷酸肌醇3激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K): 6DGT; 苏氨酸蛋白激酶: 2OH0; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR): 3JBZ; IkB激酶: 4KIK; p70核糖体S6激酶: 3A60; 核因子-κB (NF-κB): 1IKN; Fas相关死亡域蛋白 (Fas-associated with death domain protein, FADD): 3OQ9; Caspase-8: 5JQE; 雷帕霉素靶蛋白复合物1: 5GLC; UNC-51样激酶1 (UNC-51 like kinase 1, ULK-1): 4WZG; Beclin-1: 2PON; Caspase-3: 1GFW; Caspase-9: 1JXQ; 细胞色素c: 1AKK; Mcl-1: 5MES; Bcl-XL: 1PQ0; Bcl-2: 1K3K; BAX: 5W62; BAK: 6ODH; 树突状细胞相关C型凝集素1 (dendritic cell-associated C-type lectin-1, Dectin 1): 2BPE; 脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk): 4XG2; 钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN): 5SVE; 活化型T细胞核内因子 (nuclear factor of activated T-cells, NFAT): 1OWR。

5 展 望

海洋藻类产量巨大并且蕴含着丰富的生物质资源,随着海洋生物技术的进步和发展,海藻的高值化利用已成为新兴的研究领域,海藻衍生生物活性物质在生物医学和食品工业中展现出巨大的潜力。然而,目前海藻的高效降解和高值转化过程还存在许多问题与挑战。一方面,海洋多糖具有复杂的异质结构,如褐藻胶和岩藻多糖的结构多样且高度可变,相关降解酶和底物的特异识别作用机制尚未完全阐明。在商业应用方面,海洋多糖降解酶的稳定性和有效性往往不能满足工业应用的要求,未来除了寻找具有合适特性的新型海洋多糖降解酶之外,还可通过定向进化或理性设计等蛋白质工程修饰现已表征的酶,以期获得高稳定性、高活性和适合工业应用的底物特异性酶。此外,各多糖降解酶家族的蛋白质晶体结构数量有限,GH168和PL32等新家族的拓扑结构尚未解析。近年来,随着AlphaFold2等新一代蛋白质结构预测技术的出现,大量结构未知的蛋白质可被精准预测,2022年7月,DeepMind宣布AlphaFold数据库已从100万个结构拓展到2亿个结构,基本涵盖了地球上所有已进行过基因组测序的植物、细菌、动物和其他生物的结构^[110]。这些新技术有助于快速精确定位酶分子的活性架构、定量分析酶与底物作用的潜在靶位点及构效关系,并且使得预测免疫信号转导中细胞受体结构和其与配体特异性识别的作用机制成为可能,加速了相关药物研发的进程。另一方面,大型藻类生物碳可用于生物精炼技术,海洋多糖降解酶和相关代谢途径在生物精炼中的潜力已得到证实,可将生物质资源转化为燃料、化学品及部分药品^[111]。但目前关于利用绿色工业微生物转化褐藻生物质的系统研究较少,其原因是海洋多糖降解酶等生物大分子结构与功能的关系仍不明确,相关降解微生物的遗传操作方法和调控模型仍不清楚,使得探究微生物藻类多糖降解代谢途径仍较困难,尚未形成工业化藻类生物转化的通用方法。随着结构与组学技术的快速发展,利用合成生物学技术可有目的地设计并精确配制酶系,基于所选底盘微生物建立合理高效的体内代谢途径,构建可实现特定功能的合成微生物组,这些新型技术的出现为未来大型藻类的高效生物转化提供了更多可能,海洋生物质资源的集约化开发和海洋低聚糖的商业化生产具有广阔的发展前景^[112]。

参 考 文 献

- [1] Lubchenco J, Haugan P M, Pangestu M. Five priorities for a sustainable ocean economy. *Nature*, 2020, **588**(7836): 30-32
- [2] Lai Q Y, Ma J, He F, *et al.* Current and future potential of shellfish and algae mariculture carbon sinks in China. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, **19**(14): 8873
- [3] Ren W. Study on the removable carbon sink estimation and decomposition of influencing factors of mariculture shellfish and algae in China—a two-dimensional perspective based on scale and structure. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, **28**(17): 21528-21539
- [4] Poblete-Castro I, Hoffmann S, Becker J, *et al.* Cascaded valorization of seaweed using microbial cell factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, **65**: 102-113
- [5] Zhang L Z, Li X, Zhang X Y, *et al.* Bacterial alginate metabolism: an important pathway for bioconversion of brown algae. *Biotechnol Biofuels*, 2021, **14**(1): 158
- [6] 中华人民共和国国家统计局. 中国渔业统计年鉴. 北京:中国统计出版社, 2022
National Bureau of Statistics of the People's Republic of China. *China Fishery Statistical Yearbook*. Beijing: China Statistics Press, 2022
- [7] Sudhakar K, Mamat R, Samykano M, *et al.* An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renew Sustain Energy Rev*, 2018, **91**: 165-179
- [8] Wernberg T, Krumhansl K, Filbee-Dexter K, *et al.* Status and trends for the world's kelp forests. *World Seas: An Environmental Evaluation*, 2019
- [9] Cikoš A M, Jerković A, Molnar I, *et al.* New trends for macroalgal natural products applications. *Nat Prod Res*, 2019, **35**(7): 1180-1191
- [10] Zhu B, Ni F, Xiong Q, *et al.* Marine oligosaccharides originated from seaweeds: source, preparation, structure, physiological activity and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, **61**(1): 60-74
- [11] Kadam S U, Tiwari B K, O'Donnell C P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J Agric Food Chem*, 2013, **61**(20): 4667-4675
- [12] Teagle H, Hawkins S, Moore P, *et al.* The role of kelp species as biogenic habitat formers in coastal marine ecosystems. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2017, **492**: 81-98
- [13] Bringloe T, Starko S, Wade R, *et al.* Phylogeny and evolution of the brown algae. *Crit Rev Plant Sci*, 2020, **39**(4): 281-321
- [14] Charrier B, Bail A, Reviers B. Plant proteus: brown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends Plant Sci*, 2012, **17**(8): 468-477
- [15] Patil N P, Le V, Sligar A D, *et al.* Algal polysaccharides as therapeutic agents for atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*, 2018, **26**(5): 153
- [16] Deniaud-Bouët E, Hardouin K, Potin P, *et al.* A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated

- polysaccharides: cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydr Polym*, 2017, **1**(175): 395-408
- [17] Al A, Maodb C, Ma D, *et al*. Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: an updated review. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, **122**: 115-130
- [18] Bumgen M, Dutschei T, Bornscheuer U. Marine polysaccharides: occurrence, enzymatic degradation and utilization. *ChemBioChem*, 2021, **22**(13): 2247-2256
- [19] Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, *et al*. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol*, 2013, **60**(6): 366-374
- [20] Torode T A, Marcus S E, Jam M, *et al*. Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae. *PLoS One*, 2015, **10**(2): e0118366
- [21] Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, *et al*. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from *Fucales*: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann Bot*, 2014, **114**(6): 1203-1261
- [22] Xu F, Cha Q Q, Zhang Y Z, *et al*. Degradation and utilization of alginate by marine *Pseudoalteromonas*: a review. *Appl Environ Microbiol*, 2021, **87**(17): e0036821
- [23] Ci F, Jiang H, Zhang Z, *et al*. Properties and potential applications of mannanuronic C5-epimerase: a biotechnological tool for modifying alginate. *Int J Biol Macromol*, 2021, **31**(168): 663-675
- [24] Li Y, Zheng Y, Zhang Y, *et al*. Brown algae carbohydrates: structures, pharmaceutical properties, and research challenges. *Mar Drugs*, 2021, **19**(11): 620
- [25] Khalil H, Lai T, Tye Y. A review of extractions of seaweed hydrocolloids: properties and applications. *Express Polym Lett*, 2018, **12**(4): 296-317
- [26] Okolie C, Mason B, Mohan A, *et al*. Extraction technology impacts on the structure-function relationship between sodium alginate extracts and their *in vitro* prebiotic activity. *Food Biosci*, 2020, **37**: 100672
- [27] Gómez-Mascaraque L G, Martínez-Sanz M, Hogan S, *et al*. Nano- and microstructural evolution of alginate beads in simulated gastrointestinal fluids. Impact of M/G ratio, molecular weight and pH. *Carbohydr Polym*, 2019, **223**: 115121
- [28] Goh C, Heng P, Lai W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr Polym*, 2012, **88**(1): 1-12
- [29] Cao L, Lu W, Mata A, *et al*. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: a review. *Carbohydr Polym*, 2020, **42**: 116389
- [30] Aderibigbe B, Buyana B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(2): 42
- [31] Ghosh S, Sarkar T, Pati S, *et al*. Novel bioactive compounds from marine sources as a tool for functional food development. *Front Mar Sci*, 2022, **9**: 832957
- [32] Wu Z, Wu J, Zhang R, *et al*. Colloid properties of hydrophobic modified alginate: surface tension, zeta-potential, viscosity and emulsification. *Carbohydr Polym*, 2018, **181**: 56-62
- [33] Chang X, Feng W W, He L, *et al*. Fabrication and characterisation of whey protein isolate-propolis-alginate complex particles for stabilising alpha-tocopherol-contained emulsions. *Int Dairy J*, 2020, **109**: 104756
- [34] Shannon E, Conlon M, Hayes M. Seaweed components as potential modulators of the gut microbiota. *Mar Drugs*, 2021, **19**(7): 358
- [35] Kylin H. Zur biochemie der meeresalgen. *J Biol Chem*, 1913, **83**(3): 171-197
- [36] Hsu H Y, Hwang P A. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin Transl Med*, 2019, **8**(1): 15
- [37] Lahrsen E, Schoenfeld A K, Susanne A. Size-dependent pharmacological activities of differently degraded fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus*. *Carbohydr Polym*, 2018, **189**: 162-168
- [38] Bilan M I, Grachev A A, Ustuzhanina N E, *et al*. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydr Res*, 2004, **339**(3): 511-517
- [39] Chizhov A O, Dell A, Morris H R, *et al*. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res*, 1999, **320**(1): 108-119
- [40] Patankar M S, Oehninger S, Barnett T, *et al*. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem*, 1993, **268**(29): 21770-21776
- [41] Cumashi A, Ushakova N A, Preobrazhenskaya M E, *et al*. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 2007, **17**(5): 541-552
- [42] 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. *Glycobiology*, 2006, **16**(11): 1021-1032
- [43] Hsiao H H, Wu T C, Tsai Y H, *et al*. Effect of oversulfation on the composition, structure, and *in vitro* anti-lung cancer activity of fucoidans extracted from *Sargassum aquifolium*. *Mar Drugs*, 2021, **19**(4): 215
- [44] Pereira L. Seaweeds as source of bioactive substances and skin care therapy-cosmeceuticals, algotherapy, and thalassotherapy. *Cosmetics*, 2018, **5**(4): 68
- [45] Kadam S U, Tiwari B K, O'donnell C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int J Food Sci*, 2015, **50**(1): 24-31
- [46] Chen J, Yang J, Du H, *et al*. Laminarin, a major polysaccharide in *Stramenopiles*. *Mar Drugs*, 2021, **19**(10): 576
- [47] Usoltseva R V, Shevchenko N M, Malyarenko O S, *et al*. Structure and anticancer activity of native and modified polysaccharides from brown alga *Dictyota dichotoma*. *Carbohydr Polym*, 2018, **180**: 21-28
- [48] Malyarenko O S, Usoltseva R V, Shevchenko N M. *In vitro*

- anticancer activity of the laminarans from Far Eastern brown seaweeds and their sulfated derivatives. *J Appl Phycol*, 2017, **29**(1): 543-553
- [49] Zhang R, Zhang X, Tang Y, *et al.* Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: a review. *Carbohydr Polym*, 2020, **228**: 115381
- [50] Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, *et al.* Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: structural features and antioxidant capacity. *Food Chem*, 2010, **118**(3): 823-829
- [51] Zargarzadeh M, Amaral A J R, Custódio C A, *et al.* Biomedical applications of laminarin. *Carbohydr Polym*, 2020, **232**: 115774
- [52] Takase R, Ochiai A, Mikami B, *et al.* Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(9): 1925-1936
- [53] Barzkar N, Sheng R L, Sohail M, *et al.* Alginate lyases from marine bacteria: an enzyme ocean for sustainable future. *Molecules*, 2022, **27**(11): 3375
- [54] Dharani S R, Srinivasan R, Sarath R, *et al.* Recent progress on engineering microbial alginate lyases towards their versatile role in biotechnological applications. *Folia Microbiol*, 2020, **65**(6): 937-954
- [55] Li Q, Zheng L, Guo Z, *et al.* Alginate degrading enzymes: an updated comprehensive review of the structure, catalytic mechanism, modification method and applications of alginate lyases. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, **41**(6): 953-968
- [56] Ale M, Meyer A. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *Rsc Advances*, 2013, **3**(22): 8131-8141
- [57] Jagtap A S, Manohar C S. Overview on microbial enzymatic production of algal oligosaccharides for nutraceutical applications. *Mar Biotechnol*, 2021, **23**(2): 159-176
- [58] Catarino M, Silva A, Cardoso S. Phytochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Mar Drugs*, 2018, **16**(8): 249
- [59] Charrier B, Rabillé H, Billoud B. Gazing at cell wall expansion under a golden light. *Trends Plant Sci*, 2019, **24**(2): 130-141
- [60] Salehi B, Sharifi-Rad J, Seca A, *et al.* Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules*, 2019, **24**(22): 4182
- [61] Gao S K, Yin R, Wang X C, *et al.* Structure characteristics, biochemical properties, and pharmaceutical applications of alginate lyases. *Mar Drugs*, 2021, **19**(11): 628
- [62] Xu F, Chen X L, Sun X H, *et al.* Structural and molecular basis for the substrate positioning mechanism of a new PL7 subfamily alginate lyase from the arctic. *J Biol Chem*, 2020, **295**(48): 16380-16392
- [63] Yamasaki M, Ogura K, Moriwaki S, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of alginate lyases A1-II and A1-II' from *Sphingomonas* sp. A1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005, **61**(3): 288-290
- [64] Yoon H J, Hashimoto W, Miyake O, *et al.* Crystal structure of alginate lyase A1-III complexed with trisaccharide product at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, 2001, **307**(1): 9-16
- [65] Yamasaki M, Ogura K, Hashimoto W, *et al.* A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. *J Mol Biol*, 2005, **352**(1): 11-21
- [66] Ji S, Dix S R, Aziz A A, *et al.* The molecular basis of endolytic activity of a multidomain alginate lyase from *Defluviitalea phaphyphila*, a representative of a new lyase family, PL39. *J Biol Chem*, 2019, **294**(48): 18077-18091
- [67] Xu F, Dong F, Wang P, *et al.* Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase family 6. *J Biol Chem*, 2017, **292**(11): 4457-4468
- [68] Stender E G P, Andersen C D, Fredslund F, *et al.* Structural and functional aspects of mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus*. *J Biol Chem*, 2019, **294**(47): 17915-17930
- [69] Fernando I P S, Kim D, Nah J W, *et al.* Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio)polymers by structural modifications: a review. *Chem Eng J*, 2019, **355**: 33-48
- [70] 张柯柯, 刘伟治, 律倩倩. 海洋微生物来源的岩藻多糖降解酶. *微生物学通报*, 2018, **45**(9): 2054-2062
- Zhang K K, Liu W Z, Lyu Q Q. *Microbiol China*, 2018, **45**(9): 2054-2062
- [71] Sakurama H, Fushinobu S, Hidaka M, *et al.* 1, 3-1, 4- α -L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *J Biol Chem*, 2012, **287**(20): 16709-16719
- [72] Silchenko A S, Rubtsov N K, Zueva A O, *et al.* Fucoidan-active α -L-fucosidases of the GH29 and GH95 families from a fucoidan degrading cluster of the marine bacterium *Wenyinzhuangia fucanilytica*. *Arch Biochem Biophys*, 2022, **728**: 109373
- [73] Sakurama H, Tsutsumi E, Ashida H, *et al.* Differences in the substrate specificities and active-site structures of two α -L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, **76**(5): 1022-1024
- [74] Li Q, Jiang C, Tan H, *et al.* Characterization of recombinant *E. coli* expressing a novel fucosidase from *Bacillus cereus* 2-8 belonging to GH95 family. *Protein Expr Purif*, 2021, **186**: 105897
- [75] Hobbs J K, Pluvinage B, Robb M, *et al.* Two complementary α -fucosidases from *Streptococcus pneumoniae* promote complete degradation of host-derived carbohydrate antigens. *J Biol Chem*, 2019, **294**(34): 12670-12682
- [76] Schultz-Johansen M, Stougaard P, Svensson B, *et al.* Characterization of five marine family 29 glycoside hydrolases reveals an α -L-fucosidase targeting specifically Fuc(α 1, 4) GlcNAc. *Glycobiology*, 2022, **32**(6): 529-539
- [77] Wang D, Kim D, Kim K. Effective production of fermentable sugars from brown macroalgae biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**(22): 9439-9450
- [78] Usoltseva R V, Belik A A, Kusaykin M I, *et al.* Laminarans and 1,3- β -D-glucanases. *Int J Biol Macromol*, 2020, **163**: 1010-1025
- [79] Labourel A, Jam M, Jeudy A, *et al.* The β -glucanase ZgLamA from

- Zobellia galactanivorans* evolved a bent active site adapted for efficient degradation of algal laminarin. *J Biol Chem*, 2014, **289**(4): 2027-2042
- [80] Vasur J, Kawai R, Andersson E, *et al.* X-ray crystal structures of *Phanerochaete chrysosporium* laminarinase 16A in complex with products from lichenin and laminarin hydrolysis. *FEBS J*, 2009, **276**(14): 3858-3869
- [81] Badur A H, Ammar E M, Yalamanchili G, *et al.* Characterization of the GH16 and GH17 laminarinases from *Vibrio breoganii* IC10. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **104**(1): 161-171
- [82] Wojtkowiak A, Witek K, Hennig J, *et al.* Structures of an active-site mutant of a plant 1, 3- β -glucanase in complex with oligosaccharide products of hydrolysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2013, **69**(1): 52-62
- [83] Wojtkowiak A, Witek K, Hennig J, *et al.* Two high-resolution structures of potato endo-1, 3- β -glucanase reveal subdomain flexibility with implications for substrate binding. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, **68**(6): 713-723
- [84] Patrick W M, Nakatani Y, Cutfield S M, *et al.* Carbohydrate binding sites in *Candida albicans* exo- β -1,3-glucanase and the role of the Phe-Phe 'clamp' at the active site entrance. *FEBS J*, 2010, **277**(21): 4549-4561
- [85] Bianchetti C M, Takasuka T E, Deutsch S, *et al.* Active site and laminarin binding in glycoside hydrolase family 55. *J Biol Chem*, 2015, **290**(19): 11819-11832
- [86] Wu H M, Liu S W, Hsu M T, *et al.* Structure, mechanistic action, and essential residues of a GH64 enzyme, laminaripentaose-producing beta-1, 3-glucanase. *J Biol Chem*, 2009, **284**(39): 26708-26715
- [87] Liu J, Yang S, Li X, *et al.* Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2019, **18**(6): 1859-1881
- [88] Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, *et al.* Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett*, 2005, **579**(20): 4423-4429
- [89] Fang W, Bi D, Zheng R, *et al.* Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 1663
- [90] Xu X, Bi D, Wu X, *et al.* Unsaturated guluronate oligosaccharide enhances the antibacterial activities of macrophages. *FASEB J*, 2014, **28**(6): 2645-2654
- [91] Zhao J, Han Y, Wang Z, *et al.* Alginate oligosaccharide protects endothelial cells against oxidative stress injury *via* integrin- α /FAK/PI3K signaling. *Biotechnol Lett*, 2020, **42**(12): 2749-2758
- [92] Ueno M, Hiroki T, Takeshita S, *et al.* Comparative study on antioxidative and macrophage-stimulating activities of polyguluronic acid (PG) and polymannuronic acid (PM) prepared from alginate. *Carbohydr Res*, 2012, **352**: 88-93
- [93] Hao C, Hao J J, Wang W, *et al.* Insulin sensitizing effects of oligomannuronate-chromium (III) complexes in C2C12 skeletal muscle cells. *PLoS One*, 2011, **6**(9): e24598
- [94] Zhang Z, Teruya K, Eto H, *et al.* Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, **77**(2): 235-242
- [95] Kwak J Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar Drugs*, 2014, **12**(2): 851-870
- [96] Pradhan B, Patra S, Nayak R, *et al.* Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: a journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. *Int J Biol Macromol*, 2020, **164**(1): 4263-4278
- [97] Lin Y, Qi X, Liu H, *et al.* The anti-cancer effects of fucoidan: a review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. *Cancer Cell Int*, 2020, **20**(1): 154
- [98] Chen H, Cong Q, Du Z, *et al.* Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth *in vivo* by disrupting angiogenesis *via* targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. *Cancer Lett*, 2016, **382**(1): 44-52
- [99] Ale Mt, Mikkelsen J D, Meyer A S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs*, 2011, **9**(10): 2106-2130
- [100] Luo J, Wang Z, Fan B, *et al.* A comparative study of the effects of different fucoidans on cefoperazone-induced gut microbiota disturbance and intestinal inflammation. *Food Funct*, 2021, **12**(19): 9087-9097
- [101] Wang K, Xu X, Wei Q, *et al.* Application of fucoidan as treatment for cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Ther Adv Chronic Dis*, 2022, **13**: 20406223221076891
- [102] Kim K H, Kim Y W, Kim H B, *et al.* Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**(6): 439-446
- [103] Cui D, Ma J, Liang T, *et al.* Selenium nanoparticles fabricated in laminarin polysaccharides solutions exert their cytotoxicities in HepG2 cells by inhibiting autophagy and promoting apoptosis. *Int J Biol Macromol*, 2019, **137**: 829-835
- [104] Caseiro C, Dias J N R, De Andrade Fontes C M G, *et al.* From cancer therapy to winemaking: the molecular structure and applications of β -glucans and β -1, 3-glucanases. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(6): 3156
- [105] Dulal H, Adachi Y, Ohno N, *et al.* β -Glucan-induced cooperative oligomerization of Dectin-1 C-type lectin-like domain. *Glycobiology*, 2018, **28**(8): 612-623
- [106] Zhang Z, Chi H, Dalmo R A. Trained innate immunity of fish is a viable approach in larval aquaculture. *Front Immunol*, 2019, **10**: 42
- [107] Ji Y, Ji C, Zhang H. Laminarin induces apoptosis of human colon cancer LOVO cells through a mitochondrial pathway. *Molecules*, 2012, **17**(8): 9947-9960
- [108] Huang Y, Jiang H, Mao X Z, *et al.* Laminarin and laminarin oligosaccharides originating from brown algae: preparation,

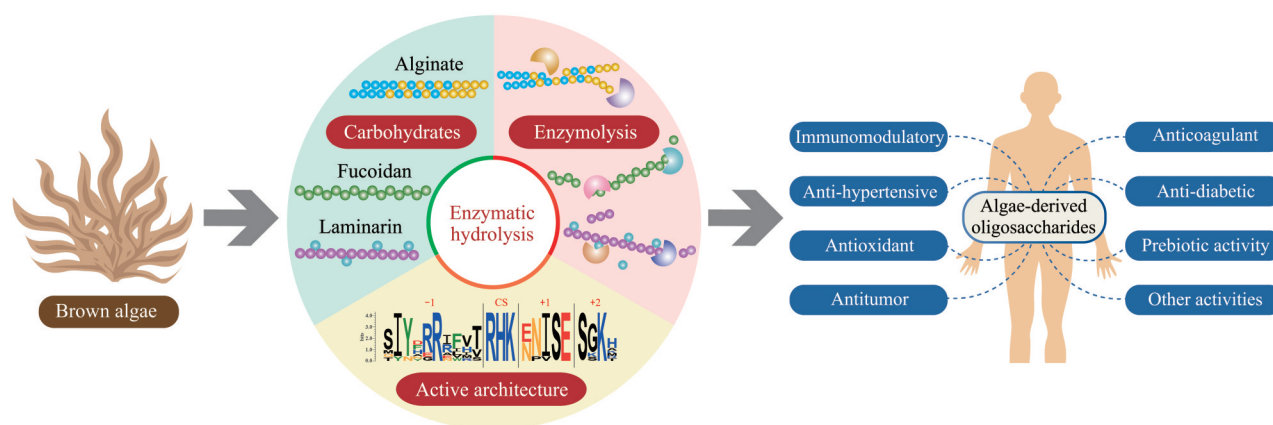
- biological activities, and potential applications. J Ocean Univ China, 2021, **20**(3): 641-653
- [109] Lynch M B, Sweeney T, Callan J J, *et al.* The effect of dietary laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. J Sci Food Agric, 2010, **90**(3): 430-437
- [110] Callaway E. ‘The entire protein universe’: AI predicts shape of nearly every known protein. Nature, 2022, **608**(7921): 15-16
- [111] Mohan S V, Hemalatha M, Chakraborty D, *et al.* Algal biorefinery models with self-sustainable closed loop approach: trends and prospective for blue-bioeconomy. Bioresour Technol, 2020, **295**: 122128
- [112] Leggieri P A, Liu Y, Hayes M, *et al.* Integrating systems and synthetic biology to understand and engineer microbiomes. Annu Rev Biomed Eng, 2021, **13**(23): 169-201

Complex Structure, Degrading Enzymes and Biological Activity of Brown Algae-associated Polysaccharides*

LI Xue, WU Xiu-Yun, LI Ying-Jie**, WANG Lu-Shan

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China)

Graphical abstract



Abstract Marine macroalgae (including brown algae, red algae, and green algae) exhibit several features of an excellent feedstock for biorefinery, such as high yield of biomass, no occupation of arable land, and no requirement of fresh water. In 2021, the production of brown algae in China was 1.9 million tons, which was much higher than other economic algae. It is worth noting that the carbohydrate content of brown algae is as high as 60%, and three sugars, including alginate, fucoidan and laminarin are unique to brown algae. Amongst them, alginate is a linear anionic polysaccharide which consists of 1,4-linked C-5-epimers β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G). The decomposition of alginate is catalyzed by alginate lyases *via* β -elimination of glycosidic bonds. They produce various oligosaccharides with unsaturated uronic acid at the non-reducing end, or 4,5-unsaturated uronic acid monomers mannuronate (Δ ManUA) and guluronate (Δ GulUA). Fucoidans usually consist of a backbone of α -1,3-L-fucopyranose residues or alternating α -1,3-linked and α -1,4-linked L-fucopyranosyls, and side branches containing glucose, galactose, rhamnose, xylose, mannose or glucuronic acid. The fucopyranose residues may be substituted with sulfate. The highly modified structure of fucoidans can significantly affect the cleavage of glycosidic linkages. Therefore, hydrolases that act on a branched chain and sulfatases are required for the primary degradation. Subsequently, L-fucoses are produced by a series of sulfatases

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32100022) and The Fundamental Research Funds of Shandong University (2019HW022).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-58631569, E-mail: yingjie.li@sdu.edu.cn

Received: August 1, 2022 Accepted: November 24, 2022

and fucosidases belonging to GH29, GH95, GH107, GH141, GH151, or GH168 families. Laminarin, the storage polysaccharide in algae, is composed of a linear backbone of 20–30 residues of β -1,3-linked-D-glucopyranose and a branched chain of β -1,6-linked-D-glucopyranose. The glycosidic bond in its backbone can be broken by endo- β -1,3-laminarinases (EC 3.2.1.6 and EC 3.2.1.39) and exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58). The β -1,6-glucanase (EC 3.2.1.75) releases glucose by breaking the glycosidic bond in the branched chain of laminarin. Algae-derived polysaccharides and their oligosaccharides have shown health beneficial effects, such as immunomodulatory, antitumor, anti-inflammatory, and other activities, which possess great potential as alternative, renewable resources in cosmetics and functional foods. In this review, we mainly focus on the efficient degradation of brown algae, and summarize the mechanisms adopted by these enzymes for catalysis and conformation changes of substrate specific recognition. Furthermore, it will provide insights for the precise customization of oligosaccharides and the construction of industrial biorefinery platform, thereby promoting the efficient conversion of brown algae.

Key words marine polysaccharides, brown algae cell wall, degrading enzymes, biological activity

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0361