

产褐藻胶裂解酶菌株S10的鉴定、全基因组测序及分析

刘芳¹, 舒志强^{1,2}, 王共明¹, 井月欣¹, 赵云苹¹, 徐英江¹, 矫春娜^{1,*}, 张健^{1,*}

(1.山东省海洋资源与环境研究院, 烟台市海珍品质量安全控制与精深加工重点实验室, 山东 烟台 264006;

2.上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 为了详细解析从仿刺参肠道中分离出1株具有较高酶活力高产褐藻胶裂解酶菌株S10的基因组序列信息, 进而深入挖掘与褐藻胶裂解酶相关的基因资源, 本研究通过形态学观察和16S rRNA序列分析对菌株S10进行菌种鉴定, 然后利用Illumina二代测序技术和第三代高通量PacBio测序平台对菌株S10进行全基因组测序, 并使用相关软件对测序数据进行基因组组装、基因预测及基因功能注释等。此外, 根据注释结果对菌株S10中所含的3组假定褐藻胶裂解酶基因序列进行生物信息学分析及结构预测。结果表明, 菌株S10被鉴定为*Vibrio alginolyticus*, 基因组总长度为5 397 046 bp, GC含量为44.59%, 由2条染色体和1条质粒组成。预测共有4 936个编码基因, 127个tRNA基因和37个rRNA基因。在直系同源集、基因本体论、京都基因与基因组百科全书和碳水化合物活性酶数据库中分别注释到4 039、3 163、3 104个和96个功能基因。此外, 在菌株S10中发现了3组潜在的褐藻胶裂解酶基因*alg4755*、*alg4756*和*alg4760*。生物信息学分析结果表明, 褐藻胶裂解酶*Alg4755*、*Alg4756*和*Alg4760*均属于多糖裂解酶家族7 (polysaccharide lyases, PL7) 蛋白, 具有3个PL7家族高度保守的基序 (R*E*R、Q(I/V)H、Y*KAG*Y*Q)。综上, S10菌株全基因组测序及分析对该菌的高效产酶机制研究和新型褐藻胶裂解酶的挖掘具有重要意义, 可为后期酶的表达及工业化应用提供理论基础。

关键词: 褐藻胶裂解酶; 溶藻弧菌; 全基因组测序; 基因功能注释; 生物信息学

Identification, Whole-Genome Sequencing and Analysis of *Vibrio alginolyticus* S10, a Strain Producing Alginate Lyase

LIU Fang¹, SHU Zhiqiang^{1,2}, WANG Gongming¹, JING Yuexin¹, ZHAO Yunping¹, XU Yingjiang¹, JIAO Chunna^{1,*}, ZHANG Jian^{1,*}

(1. Yantai Key Laboratory of Quality and Safety Control and Deep Processing of Marine Food, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. College of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Strain S10, isolated from the intestine of *Apostichopus japonicus*, is able to produce alginate lyase at a high yield. In order to scrutinize its genome sequence and to explore gene resources related to alginate lyase, strain S10 was identified through morphological observation and 16S rRNA sequence analysis. Then, its whole genome was sequenced using Illumina second-generation sequencing technology and PacBio, the third-generation high-throughput sequencing platform. The sequencing data were used for genome assembly, gene prediction, and gene function annotation. In addition, based on the annotation results, bioinformatics analysis and structure prediction were performed on three sets of putative alginate lyase gene sequences in strain S10. The results showed that strain S10 was identified as *Vibrio alginolyticus*, with a total genome length of 5 397 046 bp and a GC content of 44.59%. The genome was composed of two chromosomes and one plasmid. A total of 4 936 protein-coding genes, 127 tRNA genes and 37 rRNA genes were predicted. Totally 4 039, 3 163, 3 104 and 96 functional genes were annotated in the Clusters of Orthologous Groups (COG), Gene Ontology (GO),

收稿日期: 2024-02-28

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系藻类产业创新团队建设项目 (SDAIT-26-05);

山东省自然科学基金重点项目 (ZR2020KC034)

第一作者简介: 刘芳 (1988—) (ORCID: 0009-0008-8583-3664), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为水产品储藏与加工。

E-mail: 45637059@qq.com

*通信作者简介: 矫春娜 (1986—) (ORCID: 0009-0000-5074-978X), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为水产品储藏与加工。

E-mail: jcnnn@126.com

张健 (1980—) (ORCID: 0000-0001-6394-1228), 男, 研究员, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。

E-mail: zjsd408@163.com

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy) databases, respectively. In addition, three groups of potential alginate lyase genes, *alg4755*, *alg4756* and *alg4760*, were found in strain S10. Bioinformatics analysis showed that alginate lyases Alg4755, Alg4756 and Alg4760 all belonged to the polysaccharide lyase family 7 (PL7) and had three highly conserved motifs of the PL7 family, R*E*R, Q(I/V)H and Y*KAG*Y*Q. In summary, the sequencing and analysis of the whole genome of S10 strain is of great significance for understanding the mechanism of efficient enzyme production by this strain and for exploring new alginate lyases, and also provides a theoretical basis for follow-up research on enzyme expression and industrial application.

Keywords: alginate lyase; *Vibrio alginolyticus*; whole genome sequencing; gene functional annotation; bioinformatics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240228-147

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 22-0073-12

引文格式:

刘芳, 舒志强, 王共明, 等. 产褐藻胶裂解酶菌株S10的鉴定、全基因组测序及分析[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 73-84.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240228-147. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Fang, SHU Zhiqiang, WANG Gongming, et al. Identification, whole-genome sequencing and analysis of *Vibrio alginolyticus* S10, a strain producing alginate lyase[J]. Food Science, 2024, 45(22): 73-84. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240228-147. <http://www.spkx.net.cn>

褐藻胶是褐藻细胞壁的主要成分。它是一种无支链线性多糖, 由 β -D-甘露糖醛酸(M)及其差向异构体 α -L-古洛糖醛酸(G)通过 β -1,4-糖苷键构成^[1]。根据M和G之间连接的不同形式, 褐藻胶分子中存在3种嵌合体: 多聚甘露糖醛酸(polymannuronic acid, PM)、多聚古洛糖醛酸(polyguluronic acid, PG)以及M和G交替排列的杂聚体(heteropolymeric form, PMG)^[2]。褐藻胶因具有良好的生物安全特性(凝胶性、增稠性和保水性等)在食品、化工、纺织和生物医学等领域备受青睐^[3-5]。然而, 由于褐藻胶具有较高的分子量, 导致其水溶性和生物利用率低, 严重限制了它的应用。褐藻胶寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)是由褐藻胶降解得到的一种分子质量为20~250 kDa、聚合度为2~25的寡糖^[6-7]。研究表明, AOS具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎和免疫调节等多种重要的生物活性功能^[8-12], 已广泛应用于食品保健、医疗医药和农药等行业。

目前, 制备AOS的方法主要有物理法^[13]、化学法^[14]和生物酶解法^[15]。与物理法和化学法相比, 酶解法具有高效性、高特异性、可控性和环保等多种优良特性, 是目前制备AOS最广泛、有效的方法。褐藻胶裂解酶的来源广泛, 主要从海洋动物、藻类及微生物中获取, 其中从微生物中获取的褐藻胶裂解酶最为丰富^[16]。根据碳水化合物活性酶(Carbohydrate-Active Enzymes, CAZy)数据库, 褐藻胶裂解酶分为14个多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)家族(PL5、6、7、8、14、15、17、18、31、32、34、36、39、41)^[17], 其中PL7家族的褐藻胶裂解酶数量最多。根据底物的特异性, 褐藻胶裂解酶分为PM特异性裂解酶(EC 4.2.2.3)、PG特异性裂解酶(EC 4.2.2.11)和既能降解PM又能降解PG的双功能裂解酶(EC 4.2.2.-)^[18]。此外, 根据作用模式

的不同, 褐藻胶裂解酶可分为内切型和外切型, 前者通过裂解内链糖苷键产生低聚糖^[19], 后者通过从褐藻胶聚合物末端逐渐降解产生单体或二聚体^[20-21]。迄今为止, 褐藻胶裂解酶已被广泛应用于AOS的生产^[22]、褐藻胶精细结构的揭示^[23]、原生质体的制备^[24]和海藻废物的处理^[1]等方面。此外, 褐藻胶裂解酶还通过降解细菌的多糖生物膜在治疗囊性纤维化方面显示出巨大的潜在应用^[25]。因此, 考虑到目前褐藻胶裂解酶来源较少、底物谱窄以及酶活性普遍较低等问题, 获取高酶活性、底物谱宽的褐藻胶裂解酶具有重要意义。

随着测序技术的改进和测序成本的降低, 通过高通量技术确定全基因组序列, 可以快速获得关于目标菌株的基本信息, 相关编码基因序列也可以通过基因注释快速获得^[26-27]。Tang Xianghai等^[28]使用高通量测序获得了*Cobetia marina* JCM 21022T的完整基因组序列信息, 并通过比较基因组学确定了该菌株与相关科、属的其他菌株之间的分类地位和功能差异。Imran等^[29]使用高通量测序获得了*Microbulbifer mangrovi* DD-13T的完整基因组信息, 通过功能注释鉴定了一系列与多糖降解相关的基因。Cheng Wenwen等^[27]从羊栖菜污泥中成功筛选出*Cobetia* sp.cqz5-12, 并鉴定出3个与褐藻胶降解相关的编码基因*alg2107*、*alg2108*和*alg2112*。

为了筛选出能高效降解褐藻胶的褐藻胶裂解酶, 本实验室前期从仿刺参肠道中分离出1株具有较高酶活性的产褐藻胶裂解酶菌株S10(188.18 U/mL), 并通过单因素试验及响应面优化试验确定了该菌株的最佳产酶条件^[30]。本研究利用形态学观察结合16S rRNA序列分析对菌株S10进行了菌种鉴定, 然后采用Illumina HiSeq 1500和PacBio RS II测序平台对菌株S10进行全基因组测序。此外, 通过基因注释解析S10菌株的功能及代谢特征。同时, 对这3种褐藻胶

裂解酶进行生物信息学分析及结构预测分析,以期为进一步开发菌株S10的应用潜力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株S10分离自山东省长岛海洋生态文明综合试验区仿刺参肠道,现保存于山东省海洋资源与环境研究院,海洋食品与医药研究中心。

TCBS固体培养基 青岛海博生物科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;海藻酸钠、蛋白胨、酵母膏、琼脂粉、氯化钠、氯化钙、氢氧化钠、硫酸亚铁、硫酸镁、磷酸氢二钾 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

5430 R高速冷冻离心机、微量移液器(10、100、1 000 μL) 德国Eppendorf公司;BSP-100F生化培养箱 沙鹰科学仪器(上海)有限公司;GR60DA立式自动压力蒸汽灭菌器 厦门致微仪器有限公司;TU-1810分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存的菌株S10接种于液体培养基(海藻酸钠5 g/L、酵母膏1 g/L、蛋白胨5 g/L、NaCl 30 g/L、 MgSO_4 0.01 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 CaCl_2 0.2 g/L、 FeSO_4 0.002 g/L)中进行活化,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min培养24 h。然后将活化后的样品在固体培养基(在液体培养基的基础上添加体积分数为1.5%的琼脂)上进行平板划线,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h后观察菌落形态。

将菌株S10纯菌落用无菌水从固体平板培养基上冲洗至离心管中,8 000 r/min离心10 min,收集沉淀送至上海美吉生物医药科技有限公司对其进行16S rRNA基因测序。利用EzBioCloud服务器(<https://www.ezbiocloud.net/>)和NCBI数据库对测序数据进行BLAST分析,以确定与模式菌株的同源性。选取同源性较高的菌株16S rRNA基因序列,利用MEGA-X软件构建系统发育树。测序结果已上传至NCBI数据库,序列登录号为OL944400.1。

1.3.2 菌株S10基因组DNA的提取

将冷冻保存的菌株S10在固体培养基上进行复苏,培养24 h后从平板上挑取单一菌落接种于液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min条件下培养24 h。离心收集菌体沉淀,采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株DNA,之后用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取后的DNA纯度和浓度^[31]。

1.3.3 全基因组测序及组装

本次测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。样品质检合格后,使用Illumina HiSeq 1500和PacBio RS II测序平台进行全基因组测序。利用质控后符合要

求的Clean data,通过Unicycler v0.4.9软件^[32]进行三代序列组装,组装过程中借助Pilon v1.2.2软件^[33]进行序列校正,如果最终组装序列两端存在一定长度以上的overlap,则将序列成环并截去其中一端overlap序列。最终可得到完整的染色体及质粒序列。

1.3.4 基因预测

分别使用GeneMarkS^[34]、IslandViewer^[35]和Phage_Finder^[36]软件对基因组进行基因编码、基因组岛和前噬菌体的预测;通过tRNAscan-SE软件^[37]和Barrnap软件^[38]分别对tRNA和rRNA进行预测,获得基因组中tRNA和rRNA序列信息。为了能更全面展示基因组的特征,利用CGview软件^[39]绘制单个样本基因组圈图。

1.3.5 基因功能注释

将预测编码基因的蛋白质序列分别与直系同源集(Clusters of Orthologous Groups, COG)、基因本体论(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)和CAZy数据库中的蛋白质序列进行BLAST比对分析,从而获取基因组功能注释信息。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 褐藻胶裂解酶的生物信息学分析

利用SignalP 6.0服务器(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)预测编码假定褐藻胶裂解酶信号肽的氨基酸残基;利用ExPASy服务器(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测假定褐藻胶裂解酶的理论分子质量和等电点;利用保守结构域数据库(Conserved Domain Database, CDD)对酶的保守结构域进行分析。此外,通过BLAST程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)序列比对分析酶的氨基酸序列;利用MEGA-X软件构建酶的系统发育树;采用ESPrnt 3.0服务器(<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/ESPrnt/>)进行多序列比对。

1.4.2 结构预测及分子对接

利用AlphaFold2程序^[40]预测3种褐藻胶裂解酶的三维结构,然后使用SAVES v6.0在线服务器(<https://saves.mbi.ucla.edu/>)评估预测结构的质量。使用AutoDock 1.5.7工具进行小分子底物(*D*-甘露糖醛酸四糖, M4; *L*-古洛糖醛酸四糖, G4)和3种褐藻胶裂解酶的分子对接,从AlyGC-M4复合物(PDB: 5GKQ)和AlyF-G4(PDB: 6A40)复合物中提取配体M4和G4。利用PyMOL和Discovery studio 4.5软件进行三维结构和对接结果的分析及结构可视化。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株S10为革兰氏阴性菌,菌落呈白色、光滑,不易挑取,直径为3~5 mm。在TCBS固体培养基(硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基)上呈现黄

色菌落(图1A),表明该菌株为弧菌属。为进一步鉴定菌株S10,对其16S rRNA进行测序(序列登录号:OL944400.1)。通过BLAST序列比对后发现该菌株与溶藻弧菌高度相似(99.79%)。利用MEGA-X软件进行聚类分析,发现该菌株与溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) NBRC 15630同属一个分支(图1B)。因此,将该菌株命名为*V. alginolyticus* S10。

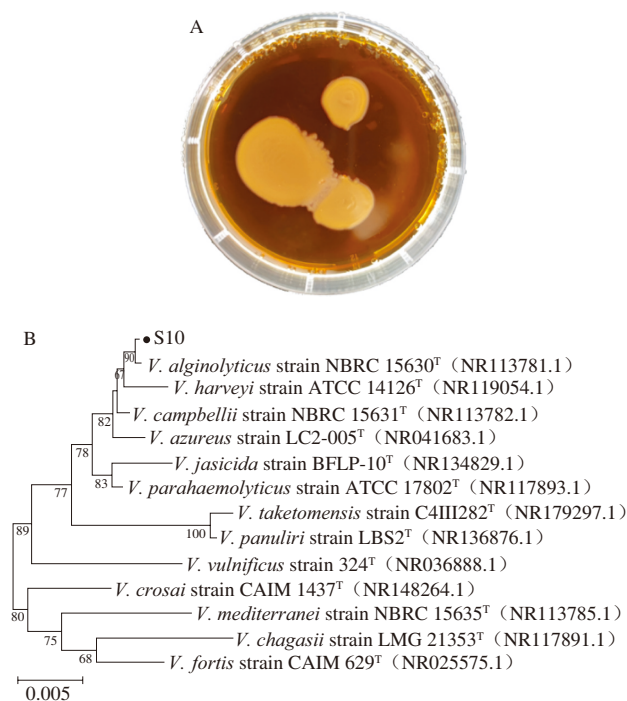


图1 菌株S10的TCBS平板实验(A)和系统发育进化树(B)
Fig. 1 TCBS plate assay (A) and phylogenetic tree (B) of strain S10

2.2 菌株S10基因组的基本信息

利用高通量测序技术获得了*V. alginolyticus* S10全基因组序列的基本信息,结果如图2、3所示。菌株S10基因组总长度为5 397 046 bp, GC含量为44.59%。该基因组由两条染色体和一条质粒组成,染色体1总长度为3 390 843 bp, GC含量为44.64%(登录号:CP135968.1),染色体2总长度为1 876 626 bp, GC含量为44.45%(登录号:CP135969.10),质粒总长度为129 577 bp, GC含量为43.77%(登录号:CP135970.1)。利用GeneMarkS软件对基因组中的编码基因进行预测,结果显示预测了4 936个编码基因,其总长度为4 587 936 bp,占基因组总长度的85.01%,平均长度为929.48 bp。S10编码的最短基因长度为114 bp,最长基因长度为18 618 bp,其中大于1 000 bp的序列有1 735个,数量最多,占全部编码基因的35.15%;基因密度为0.91个/kb;基因区间长度为809 110 bp,基因区间GC含量为39.26%,基因区间占基因百分比为14.99%。

通过预测非编码RNA,得到了菌株S10中含有37个rRNA(23S rRNA 12个、16S rRNA 12个、5S rRNA 13个)、127个tRNA和57个sRNA。此外,S10中还含有12个基因组岛、4个前噬菌体,总长度为83 586 bp。

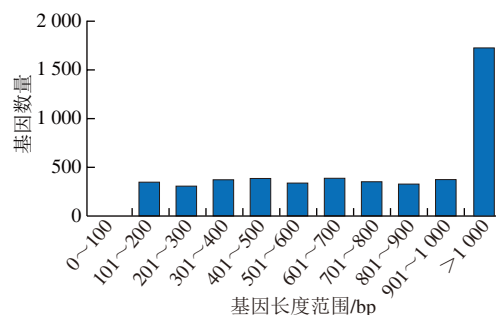
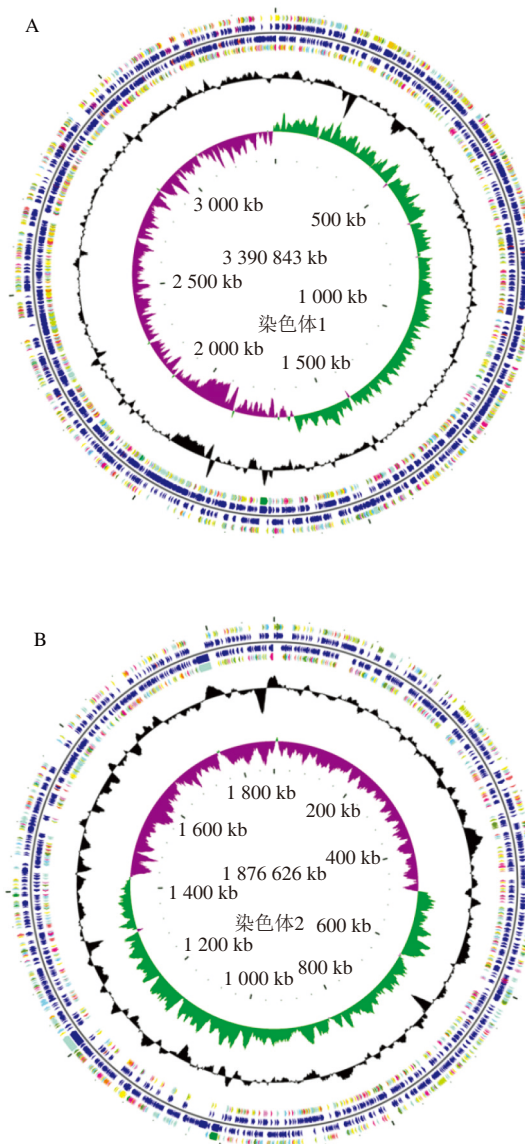


图2 菌株S10编码基因长度
Fig. 2 Length of protein-coding genes in strain S10



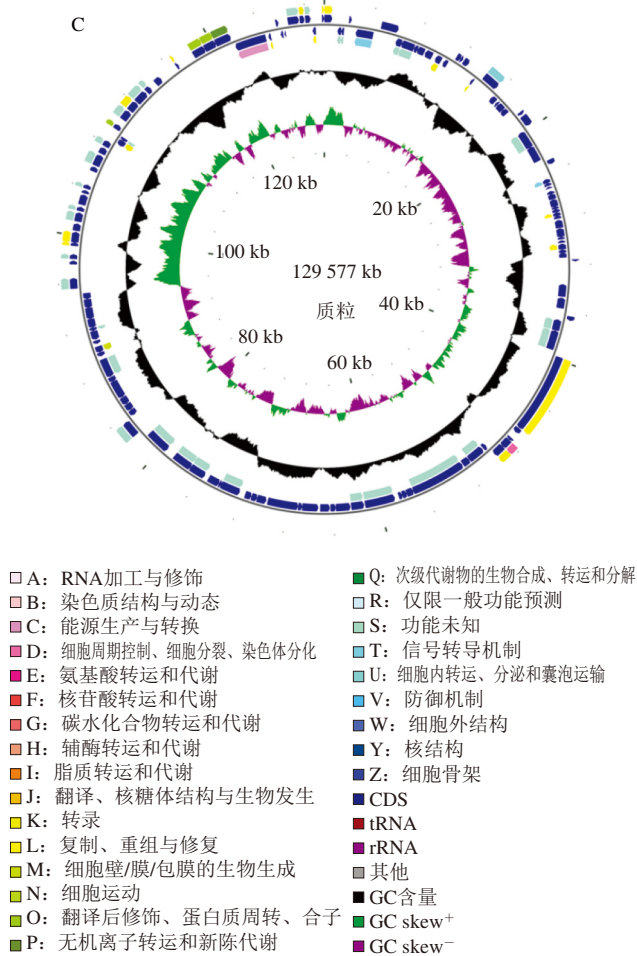


图3 菌株S10基因组图
A.染色体1基因组图; B.染色体2基因组图; C.质粒基因组图; 圈图从外到内第1圈和第4圈为正链、负链上的CDS, 不同颜色表示不同的COG功能分类; 第2圈和第3圈分别为正链、负链上的CDS、tRNA、rRNA; 第5圈为GC含量; 第6圈为GC-Skew值; 最内一圈为基因组大小标识。

图3 Genome circle diagram of strain S10

2.3 基因功能注释分析

为了更深入地探究菌株S10功能, 分别在COG、GO、KEGG和CAZy数据库中对其编码基因进行功能注释。4 039个基因被注释到COG数据库中, 占有所有基因的81.83%; 3 163个基因被注释到GO数据库, 占64.08%; 3 104个基因被注释到KEGG数据库, 占62.88%; 96个基因被注释到CAZy数据库, 占1.94%。

2.3.1 COG数据库注释

COG数据库是基于细菌、藻类和真核生物完整基因组的编码蛋白质系统进化关系而构建的, 利用比对技术可以将蛋白质序列注释到COG数据库中, 并通过这种方式推测序列的功能^[41]。将菌株S10预测基因的蛋白质序列与COG数据库进行Diamond比对后发现, 该菌株的基因被注释到COG数据库的21个不同功能组中。如图4所

示, 共有496个基因与碳水化合物和氨基酸转运、代谢相关, 这意味着菌株S10具有较强的碳水化合物和氨基酸代谢能力。菌株S10的基因与转录相关的有286个, 与细胞壁/膜/包膜生物发生相关的有217个。此外, 还有1 193个未知功能的基因被发现, 有待更进一步的研究。

为了更进一步研究S10在基因水平上对褐藻胶降解的功能, 分析了参与碳水化合物转运和代谢的特定COG。菌株S10中共有164个基因被注释为参与碳水化合物转运与代谢, 涉及85个COG, 其中基因数量最丰富的是COG0366 (α -淀粉酶, 催化)、COG0697 (药物/代谢物转运体超家族的渗透酶)、COG0524 (pfkb结构域蛋白)和COG3979 (几丁质酶)。在菌株S10中还检测到了与磷酸转移酶系统有关的预测基因 (COG1263、COG1762和COG1925)。据报道, 它们可能参与多种单糖、二糖、氨基糖、多元醇和其他糖衍生物的转运和磷酸化^[42]。此外, 还发现了部分与碳水化合物吸收相关的ABC型糖转运体^[43] (COG1653和COG3839) 以及负责糖类、抗菌素和氨基酸等化合物输出与输入的阿拉伯糖外排渗透酶^[44] (COG2814)。综上所述, 菌株S10中功能注释的碳水化合物转运与代谢基因具有多样性, 揭示了其在降解糖类、吸收和运输糖类等方面的巨大潜力。

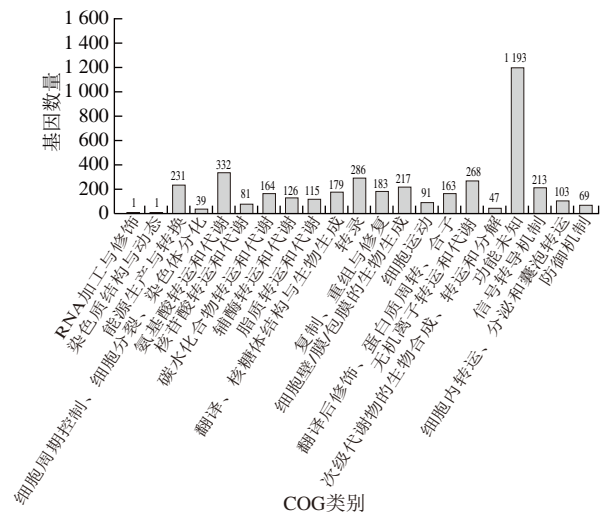


图4 COG注释分析

图4 COG annotation analysis

2.3.2 GO数据库注释

GO数据库注释描述的是生物过程、细胞组分、分子功能信息。如图5所示, 注释到生物过程和细胞组分的基因数量相近, 分别为1 611个和1 664个, 注释到分子功能的基因最多, 有2 494个。在细胞组分类别中, 注释到膜的组成部分 (GO:0016021, 872个)、细胞质 (GO:0005737, 383个)和质膜 (GO:0005886, 280个)的基因数量最多。在生物过程类别中, 注释

到转录调控、DNA模板 (GO:0006355, 93 个)、翻译 (GO:0006412, 65 个) 和跨膜转运 (GO:0055085, 61 个) 的基因明显多于其他过程。在分子功能类别中, 被注释较多的功能为ATP结合 (GO:0005524, 356 个) 和DNA结合 (GO:0003677, 331 个), 其次为金属离子结合 (GO:0046872, 200 个) 和转录因子活性、序列特异性DNA结合 (GO:0003700, 156 个)。此外, 特别分析了可能与褐藻胶降解过程相关的基因, 主要涉及水解酶活性 (GO:0016787, 109 个)、碳水化合物代谢过程 (GO:0005975, 43 个)、裂解酶活性 (GO:0016829, 40 个)、作用于糖基键的水解酶活性 (GO:0016798, 3 个, 分别为gene0810、gene3567、gene3569) 和聚 α -L-古洛糖醛酸裂解酶活性 (GO:0047491, 2 个, 分别为gene4753、gene4756) 等。对注释到聚 α -L-古洛糖醛酸裂解酶活性功能条目的两个基因进一步分析发现, gene4753和gene4756均位于染色体2上。其中gene4753在GO数据库中被描述为肝素酶II/III家族蛋白, 而gene4756被描述为PL7蛋白。目前, 大多数被报道的褐藻胶裂解酶均属于PL7蛋白^[45], 这表明gene4756很可能是一种编码褐藻胶裂解酶的基因, 在菌株S10降解褐藻胶的过程中发挥重要作用。

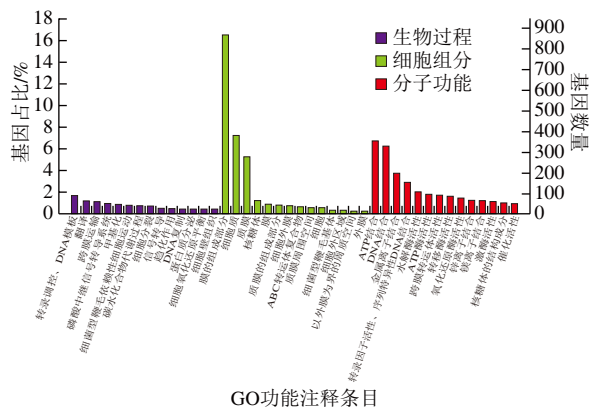


图5 GO注释分析

Fig. 5 GO annotation analysis

2.3.3 KEGG数据库注释分析

KEGG数据库将生物途径划分为8类, 每一类都有细分并用相关基因进行注释^[46]。如图6所示, 共有2 703 个基因被归入到细胞过程、遗传信息处理、环境信息处理、人类疾病、生物体系统和新陈代谢6个KEGG分类中。其中, 参与新陈代谢的基因最多 (1 914 个), 其次是环境信息处理 (413 个)。新陈代谢有12 个子分类, 参与氨基酸代谢通路和碳水化合物代谢通路的基因分别含有226 个和213 个, 占新陈代谢通路注释基因的11.8% 和11.1%。参与全局与概述图谱通路的基因数量最多 (759 个), 占代谢通路注释基因的39.7%。环境信息处

理有膜运输和信号传导两个子分类, 其中参与膜运输通路的基因有227 个, 参与信号转导的基因有186 个。

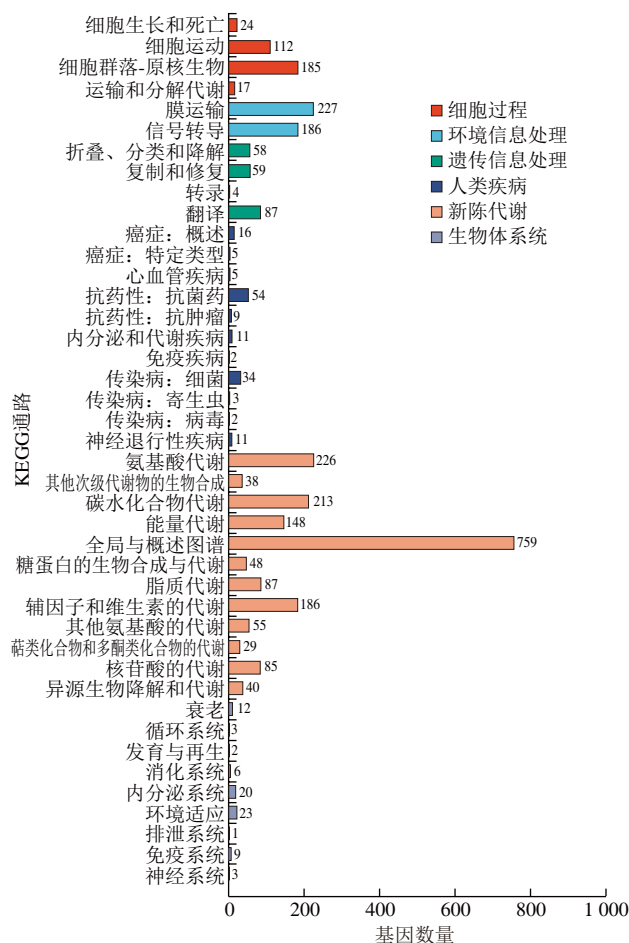


图6 KEGG注释分析

Fig. 6 KEGG annotation analysis

2.3.4 CAZy数据库注释

碳水化合物活性酶是一类十分重要的酶, 具有降解、修饰和生成糖苷键的功能, 对于揭示微生物碳水化合物的代谢机制具有非常重要的意义^[47]。根据蛋白质结构域中氨基酸序列的相似性, 将碳水化合物活性酶分成糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶 (glycosyl transferases, GTs)、PLs、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterases, CEs)、碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBMs)、辅助氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 六大蛋白质家族。利用CAZy数据库和hmmscan软件^[48]对编码基因的碳水化合物活性酶进行分析, 结果如图7所示。菌株S10共注释到96 个基因, 其中GHs 37 个、GTs 34 个、PLs 3 个、CEs 10 个、CBMs 1 个和AAs 11 个。此外, 在S10中注释到了3 个褐藻胶裂解酶基因, 分别由编号为gene4755、gene4756和gene4760的基因编码, 将这些基因分别命名为alg4755、alg4756和alg4760。

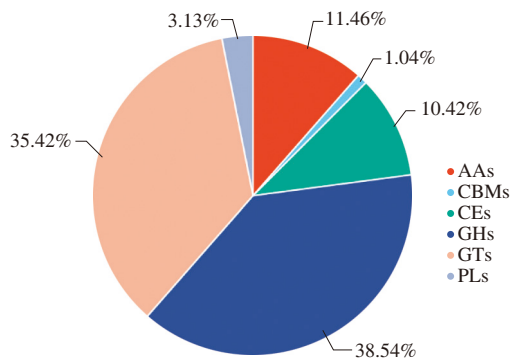


图7 CAZy注释分析
Fig.7 CAZy annotation analysis

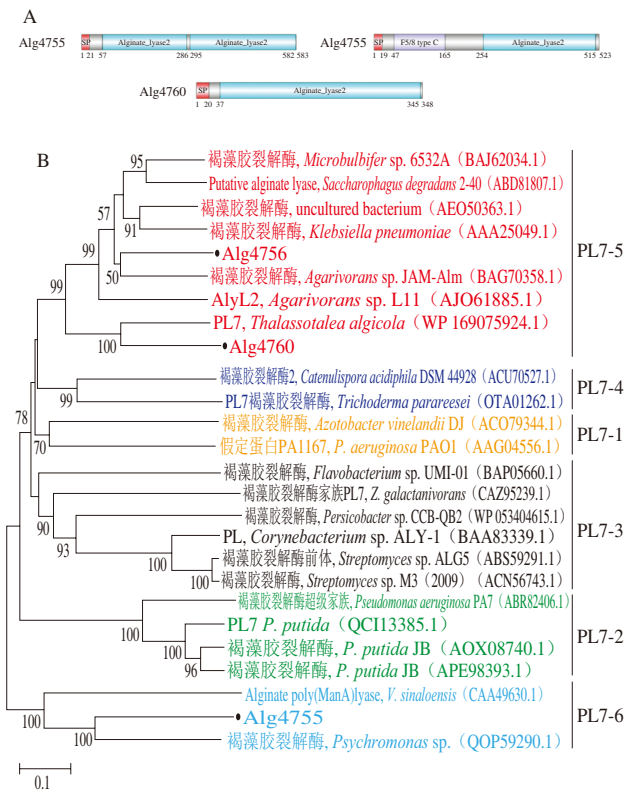
2.4 3种褐藻胶裂解酶的生物信息学分析

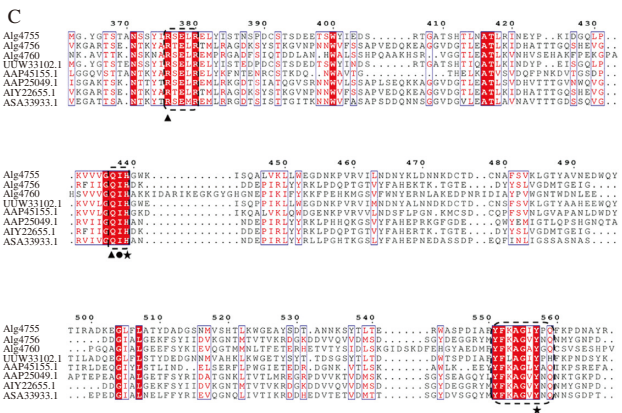
基于CAZy数据库的基因注释结果可知,菌株S10中含有3个编码褐藻胶裂解酶的基因。如表1所示,将这些假定的褐藻胶裂解酶分别命名为Alg4755、Alg4756和Alg4760。其中Alg4755总长度为1 751 bp,编码583个氨基酸,预测其分子质量为65.81 kDa,等电点为5.18;Alg4756总长度为1 565 bp,编码523个氨基酸,预测其分子质量和等电点分别为57.85 kDa和5.01;Alg4760长度最短,为1 043 bp,编码348个氨基酸,其分子质量和等电点分别为38.98 kDa和6.43。通过BLAST序列比对分析发现,这3种褐藻胶裂解酶在NCBI数据库中都获得了高度同源的蛋白,其同源性均超过98%。同时,这些高度同源的酶均来自于*Vibrio*。如Alg4755和来自*V. alginolyticus*的EGQ7647446.1同源性为99.82%,Alg4756和来自*Vibrio* sp.的AIY22655.1同源性为99.81%。由此猜测这3种褐藻胶裂解酶可能在*Vibrio*中较为常见。Alg4755、Alg4756和Alg4760的氨基酸序列均已提交至NCBI数据库,登录号分别为OQ884715.1、PP033235.1和PP033236.1。

表1 菌株S10中褐藻胶裂解酶的生物信息学分析								
Table 1 Bioinformatics analysis of alginate lyases in strain S10								
褐藻胶裂解酶	家族	编码氨基酸数量	分子质量/kDa	等电点	信号肽	序列比对同源性/%	所属微生物	参考的褐藻胶裂解酶
Alg4755	PL7	583	65.81	5.18	是	99.82	<i>V. alginolyticus</i>	EGQ7647446.1
Alg4756	PL7	523	57.85	5.01	是	99.81	<i>Vibrio</i> sp.	AIY22655.1
Alg4760	PL7	348	38.98	6.43	是	98.20	<i>V. alginolyticus</i>	HCZ9548956.1

利用NCBI保守结构域数据库分析这3种褐藻胶裂解酶的结构域,结果如图8A所示。Alg4755和Alg4756均包含2个催化结构域,其中Alg4755具有2个相同的Alginate_lyase2结构域(pfam08787),Alg4756具有2个不同的结构域,包括1个N端的F5/8 type C结构域(pfam00754)和1个C端的Alginate_lyase2结构域,而Alg4760只含有1个Alginate_lyase2结构域。目前,被报道的含有F5/8 type C结构域的褐藻胶裂解酶数量很少,且

更鲜见有关该结构域对其酶活性影响的文献。Yan Junjun等^[49]研究表明,去除F5/8 type C结构域后,重组褐藻胶裂解酶AlgH-II的酶活性和热稳定性得到显著提高。由此猜测,Alg4755在这3种褐藻胶裂解酶中可能具有较高的酶活性。此外,利用SignalP 6.0服务器预测了这3种褐藻胶裂解酶的信号肽^[50]。结果显示,这3种褐藻胶裂解酶的N端均含有一个信号肽,其中Alg4755、Alg4756和Alg4760均为Sec/SP II型信号肽。这表明它们可能是分泌型,在细胞外或外质中发挥作用。系统发育分析表明,这3种褐藻胶裂解酶均属于PL7,其中Alg4755属于第六亚族,Alg4756和Alg4760属于第五亚族(图8B)。如图8C所示,与其他已报道的PL7家族褐藻胶裂解酶的序列比对,这3种褐藻胶裂解酶都含有PL7家族的3个高度保守区域(R*E*R、Q(I/V)H、Y*KAG*Y*Q)。它们构成了PL7家族褐藻胶裂解酶的活性中心,在底物识别和催化中发挥作用^[18]。据报道,PG和PM降解酶在其保守区域分别含有“QIH”和“QVH”,表明氨基酸残基“异亮氨酸(I)”可能识别PG或PMG^[51]。例如,来自*Vibrio* sp. JAM-A9m的褐藻胶裂解酶A9mT^[52]以及来自*Vibrio* sp. O2的褐藻胶裂解酶AlyVOA^[53]都含有保守区域“QVH”,在底物特异性实验中均表现为PM裂解酶。而其他含有“QIH”保守区域的褐藻胶裂解酶^[53-54]则更倾向于降解PG。这3种褐藻胶裂解酶均含有“QIH”保守区域。因此,这3种褐藻胶裂解酶可能更倾向于降解PG。





图C中黑色方框为PL7家族催化结构域的保守序列，黑色三角形表示中和残基，黑色星形表示催化酸/碱，黑色圆圈表示与催化底物有关的残基。
图8 菌株S10中3种褐藻胶裂解酶的结构域分析(A)、系统发育进化树(B)和多序列比对分析(C)

Fig. 8 Structural domain analysis (A), phylogenetic tree (B) and multiple sequence alignment analysis (C) of three alginate lyases in strain S10

2.5 结构预测

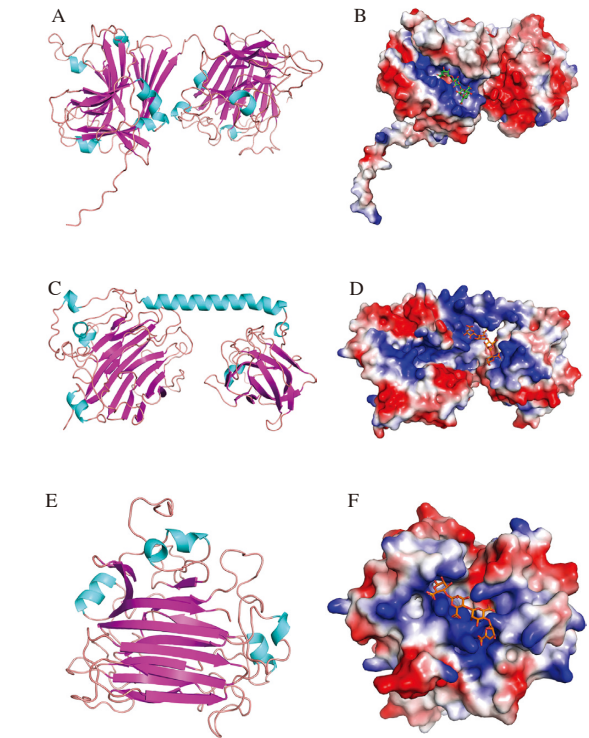
使用AlphaFold2程序预测了3种褐藻胶裂解酶的三维结构(图9A、C和E)，同时利用SAVES v6.0在线服务器评估了预测结构的质量，结果如表2所示。Verify-3D程序分析表明，Alg4755、Alg4756和Alg4760蛋白三维结构与一级结构的兼容性评分大于0.2的氨基酸残基含量均大于80%，故建模的氨基酸残基结构合理。Alg4755、Alg4756和Alg4760的ERRAT评价分别为95.4%、81.5%和87.1%，均远大于50%，故其三维结构中的非键合相互作用整体上是合理的。此外，Procheck程序分析表明，所得拉式构象图中Alg4755、Alg4756和Alg4760均有超过90%的氨基酸位于最佳区域及额外允许区域，由此表明所构建褐藻胶裂解酶模型的氨基酸残基构象是合理的。综上所述，利用AlphaFold2程序预测得到的这3种褐藻胶裂解酶三维结构质量合格，可用于后续的分析研究。

Alg4755由2个Alginate_lyase2结构域构成，它们中间由一个八肽连接体所连接(图9A)；Alg4756则由1个N端的F5/8 type C结构域和1个C端的Alginate_lyase2结构域所构成，中间由1个 α -螺旋连接体连接而成(图9C)；Alg4760只由1个Alginate_lyase2结构域组成，该结构域为典型的 β -胶冻卷结构，符合PL7家族褐藻胶裂解酶的结构特征^[55](图9E)。该结构主要由两组反向平行的 β 片层(SA和SB)组成，内片层(SA)由9条 β 链组成，形成一个包含催化中心的缝隙，褐藻胶底物进入缝隙并与活性中心残基相互作用。外片层(SB)由7条 β 链组成，它们共同构成了酶的主要结构。此外，通过分子对接及表面静电势分析可知，小分子底物均位于一个带正电荷的表面区域内(蓝色区域)，由此猜测，该区域可能包含催化中心的结合缝隙(图9B、D和F)。

表2 三维结构模型质量评价

Table 2 Quality evaluation of three-dimensional structural models

褐藻胶裂解酶	Verify-3D评价/%	ERRAT评价/%	Procheck评价			
			最佳影响区域/%	额外允许区域/%	宽松允许区域/%	不允许区域/%
Alg4755	93.3	95.4	85.0	11.6	2.3	1.1
Alg4756	86.2	81.5	87.6	8.8	1.8	1.8
Alg4760	85.1	87.1	84.7	12.3	2.3	0.7



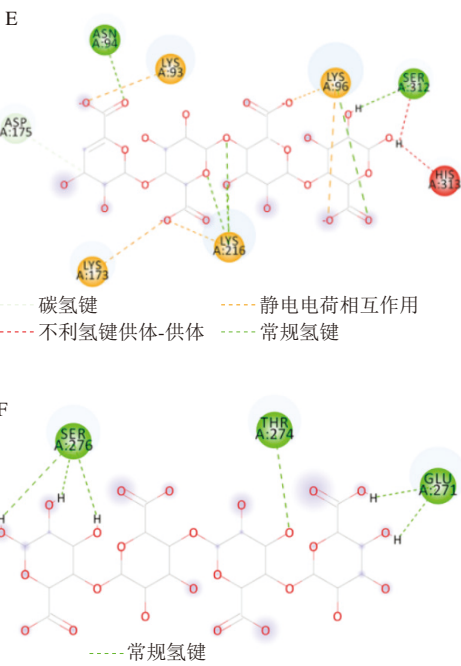
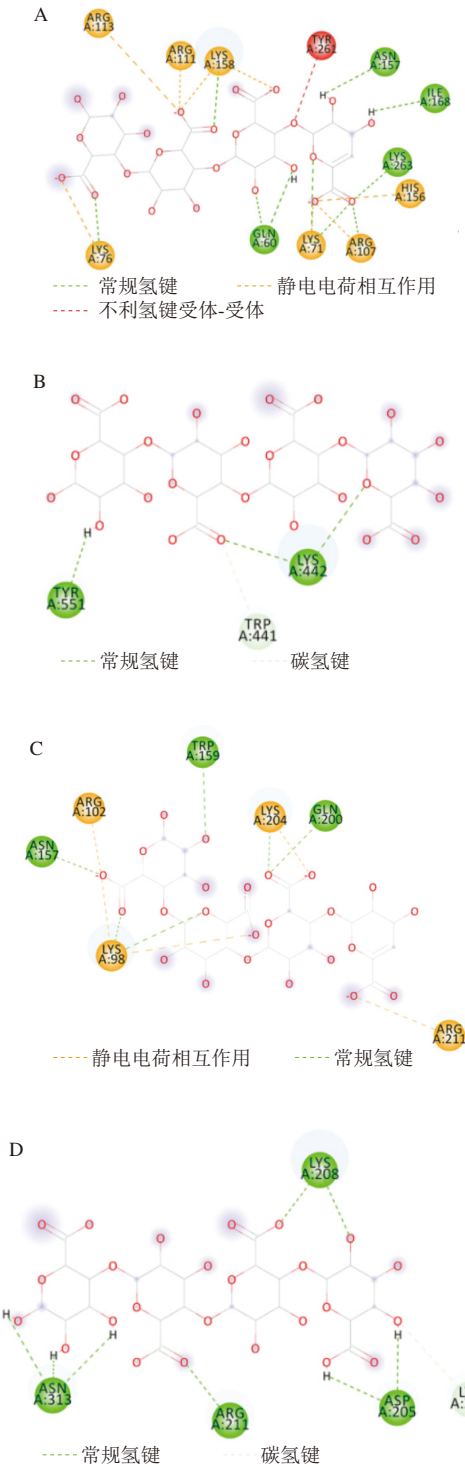
A、C、E分别为Alg4755、Alg4756、Alg4760的三维结构模型；B、D、F分别为Alg4755、Alg4756、Alg4760表面静电势图和底物结合情况。

图9 3种褐藻胶裂解酶的三维结构模型及表面静电势图
Fig. 9 Three-dimensional structural models and surface electrostatic potential diagrams of three alginate lyases

2.6 分子对接

为了揭示酶与小分子底物之间的分子相互作用，理解酶的催化机理，利用AutoDock 1.5.7工具将D-甘露糖醛酸四糖(M4)和L-古洛糖醛酸四糖(G4)分别与Alg4755、Alg4756和Alg4760进行分子对接模拟。选取结合能最低的分子对接结果进行分析，结果如图10所示。在Alg4755-M4复合物中，Lys71、Lys76、Arg107、Arg111、Arg113、His156和Lys158可以与M4小分子形成静电电荷相互作用。Gln60、Lys71、Lys76、Arg107、Asn157、Lys158、Ile168和Lys158与M4形成氢键。对于Alg4755-G4复合物，仅有Trp441、Lys442和Tyr551可以与G4小分子形成氢键。在Alg4756-M4复合物中，Lys98、Arg102、Lys204和Arg211可以与M4小分子形成静电电荷相互作用，Lys98、Asn157、Trp159、Gln200

和Lys204与底物形成氢键。对于Alg4756-G4复合物，Lys201、Asp205、Lys208、Arg211和Asn313可以与底物形成氢键。在Alg4760-M4复合物中，Lys93、Lys96、Lys173和Lys216可以与底物形成静电电荷相互作用，Asn94、Lys96、Lys216和Ser312与底物形成氢键。对于Alg4760-G4复合物，仅有Glu271、Thr274和Ser276可以与G4小分子形成氢键。



A、C、E.分别为Alg4755、Alg4756、Alg4760与M4分子对接的二维结果图；B、D、F.分别为Alg4755、Alg4756、Alg4760与G4分子对接的二维结果图。

图 10 3种褐藻胶裂解酶与M4、G4的分子对接分析

Fig. 10 Molecular docking analysis of three alginate lyases with M4 and G4

3 讨论与结论

目前，研究者们已经从腐烂的海藻、海水或者海洋动物中分离纯化出了大量降解褐藻胶的海洋微生物及褐藻胶裂解酶。而随着测序技术的快速发展和成本的降低，全基因组测序已被广泛应用于新型褐藻胶裂解酶基因的预测和挖掘。Chao Yaxi等^[56]对从腐烂的海带中分离出菌株*Vibrio* sp. QD-5进行全基因组测序，挖掘出一种新型褐藻胶裂解酶Aly-IV并阐明了其酶学性质。Sun Xunke等^[57]对从鲍鱼肠道中分离出的海洋菌株*Agarivorans* sp. B2Z047进行全基因组测序，共发现了12个潜在的褐藻胶裂解酶基因并通过体外表达鉴定其酶活性。

本研究通过形态学观察和16S rRNA序列分析对菌株S10进行菌种鉴定，结果表明该菌属于*V. alginolyticus*，因此将其命名为*V. alginolyticus* S10。利用高通量测序技术对菌株S10进行全基因组测序，并使用相关软件对测序数据进行基因组组装、基因预测及基因功能注释等。结果表明，菌株S10的基因组由2条环状染色体和1条质粒组成，其大小为5 397 046 bp，GC含量为44.59%。预测共有4 936个编码基因，37个rRNA基因、127个tRNA基因和57个sRNA基因。通过COG、GO、KEGG和CAZy数据库

对其进行功能注释,发现菌株S10中参与基因较多的途径包括碳水化合物的转运与代谢、氨基酸的转运与代谢、ATP结合、DNA结合和新陈代谢等。此外,CAZy数据库注释结果表明,S10菌株中共含有3组潜在的褐藻胶裂解酶基因,分别命名为*alg4755*、*alg4756*和*alg4760*。

本研究通过生物信息学手段对菌株S10中的3种褐藻胶裂解酶进行分析,结果表明这3种褐藻胶裂解酶均属于PL7家族,且含有3个PL7家族高度保守的基序。研究表明,褐藻胶裂解酶中的保守氨基酸在酶与底物的催化反应及形成果冻卷 β -三明治结构(被认为是合适底物的结合位点)方面起至关重要的作用^[58-59]。通过AlphaFold2程序预测了这3种褐藻胶裂解酶的三维结构,发现它们的结构均为典型的 β -胶冻卷结构,与上述分析结果一致,符合PL7家族褐藻胶裂解酶的结构特征。PL7家族中的褐藻胶裂解酶结构由两组反向平行的 β 片层(SA和SB)组成,中间弯曲近90°,合在一起折叠成球状^[55]。活性位点位于内片层(SA)形成的缝隙中,底物进入缝隙内与活性残基发生相互作用,产物从中心释放出来从而完成反应^[55]。研究表明,PL7家族褐藻胶裂解酶采用的是His/Tyr β 消除机制参与底物反应^[18,55]。对于这些褐藻胶裂解酶来说,底物上羧酸根阴离子的负电荷主要由谷氨酸(Glu)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)或天冬氨酰(Gln)中和。它们通常与酸性基团形成氢键,使平衡转向烯醇同分异构形式^[60]。分子对接结果表明这3种褐藻胶裂解酶与小分子底物主要通过氢键和静电电荷相互作用的方式结合,参与反应的氨基酸主要包括赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、酪氨酸(Tyr)和天冬氨酰(Asn)等。以上结果表明,菌株S10全基因组测序及分析对该菌的高效产酶机制研究和新型褐藻胶裂解酶的挖掘具有重要意义,也可后期高效褐藻胶裂解酶的表达及应用提供理论基础。

参考文献:

- BARZKAR N, SHENG R L, SOHAIL M, et al. Alginate lyases from marine bacteria: an enzyme ocean for sustainable future[J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3375. DOI:10.3390/molecules27113375.
- XU F, CHA Q Q, ZHANG Y Z, et al. Degradation and utilization of alginate by marine *Pseudoalteromonas*: a review[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(17): e0036821. DOI:10.1128/AEM.00368-21.
- SONG L, GUO Y F, WANG Y L, et al. Preparation of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica* biomass by a novel biofunctional alginate lyase with pH and salt tolerance[J]. *Processes*, 2023, 11(5): 1495. DOI:10.3390/pr11051495.
- 刘海超, 张健, 王共明, 等. 褐藻胶的降解方法及其产物生物活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 350-357; 363. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.055.
- LI Q, ZHENG L, GUO Z L, et al. Alginate degrading enzymes: an updated comprehensive review of the structure, catalytic mechanism, modification method and applications of alginate lyases[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(6): 953-968. DOI:10.1080/07388551.2021.1898330.
- 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.
- 刘以晴, 马月云, 刘宗浩, 等. 褐藻胶寡糖的制备、分离及表征研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 456-468. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021050030.
- XING M C, CAO Q, WANG Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(3): 144. DOI:10.3390/md18030144.
- TRAN V C, CHO S Y, KWON J, et al. Alginate oligosaccharide (AOS) improves immuno-metabolic systems by inhibiting STOML2 overexpression in high-fat-diet-induced obese zebrafish[J]. *Food & Function*, 2019, 10(8): 4636-4648. DOI:10.1039/c9fo00982e.
- WANG X Y, SUN G Q, FENG T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression[J]. *Cell Research*, 2019, 29(10): 787-803. DOI:10.1038/s41422-019-0216-x.
- ZHANG P F, LIU J, XIONG B H, et al. Microbiota from alginate oligosaccharide-dosed mice successfully mitigated small intestinal mucositis[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 112. DOI:10.1186/s40168-020-00886-x.
- ZHAO J X, YAO L Y, NIE S, et al. Low-viscosity sodium alginate combined with TiO₂ nanoparticles for improving neuroblastoma treatment[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167: 921-933. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.048.
- EL-MOHDY H L A. Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10: S431-S438. DOI:10.1016/j.arabjc.2012.10.003.
- MAO S R, ZHANG T T, SUN W, et al. The depolymerization of sodium alginate by oxidative degradation[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2012, 17(6): 763-769. DOI:10.3109/10837450.2011.583927.
- 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. DOI:10.3390/md20080479.
- WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L. ALGINATE LYASE: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 289-340. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.289.
- JOUANNEAU D, KLAU L J, LAROCQUE R, et al. Structure-function analysis of a new PL17 oligoalginate lyase from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* DsijT[J]. *Glycobiology*, 2021, 31(10): 1364-1377. DOI:10.1093/glycob/cwab058.
- 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]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(48): 16380-16392. DOI:10.1074/jbc.RA120.015106.
- ZHU B W, NI F, SUN Y, et al. Elucidation of degrading pattern and substrate recognition of a novel bifunctional alginate lyase from *Flammeovirga* sp. NJ-04 and its use for preparation alginate oligosaccharides[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 13. DOI:10.1186/s13068-019-1352-8.

- [20] KIM H T, CHUNG J H, WANG D M, et al. Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 2233-2239. DOI:10.1007/s00253-012-3882-x.
- [21] SUZUKI H, SUZUKI K I, INOUE A, et al. A novel oligoalginate lyase from abalone, *Halotis discus* Hannai, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(11): 1809-1819. DOI:10.1016/j.carres.2006.04.032.
- [22] ZHU B W, CHEN M J, YIN H, et al. Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lyase[J]. Marine Drugs, 2016, 14(6): 108. DOI:10.3390/md14060108.
- [23] AARSTAD O A, TØNDERVIK A, SLETTA H, et al. Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes[J]. Biomacromolecules, 2012, 13(1): 106-116. DOI:10.1021/bm2013026.
- [24] INOUE A, KAGAYA M, OJIMA T. Preparation of protoplasts from *Laminaria japonica* using native and recombinant abalone alginate lyases[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 633-640. DOI:10.1007/s10811-007-9199-y.
- [25] LAMPPA J W, GRISWOLD K E. Alginate lyase exhibits catalysis-independent biofilm dispersion and antibiotic synergy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(1): 137-145. DOI:10.1128/AAC.01789-12.
- [26] ENDO A, TANIZAWA Y, ARITA M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1887: 3-13. DOI:10.1007/978-1-4939-8907-2_1.
- [27] CHENG W W, YAN X Y, XIAO J L, et al. Isolation, identification, and whole genome sequence analysis of the alginate-degrading bacterium *Cobetia* sp. cqz5-12[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 10920. DOI:10.1038/s41598-020-67921-7.
- [28] TANG X H, XU K P, HAN X J, et al. Complete genome of *Cobetia marina* JCM 21022T and phylogenomic analysis of the family Halomonadaceae[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(2): 528-536. DOI:10.1007/s00343-017-6239-6.
- [29] IMRAN M, PANT P, SHANBHAG Y P, et al. Genome sequence of *Microbulbifer mangrovi* DD-13T reveals its versatility to degrade multiple polysaccharides[J]. Marine Biotechnology, 2017, 19(1): 116-124. DOI:10.1007/s10126-017-9737-9.
- [30] 王艺欣, 张健, 刘芳, 等. 褐藻胶降解菌株S10鉴定及产酶条件优化[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(1): 66-76. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2023.01.008.
- [31] 纪帅奇, 乌日娜, 张淘崴, 等. 枯草芽孢杆菌SNBS-3全基因组测序及其抑菌物质预测分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 57-63. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230409-075.
- [32] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595. DOI:10.1371/journal.pcbi.1005595.
- [33] WALKER B J, ABEEL T, SHEA T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e112963. DOI:10.1371/journal.pone.0112963.
- [34] BESEMER J, LOMSDAZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): 2607-2618. DOI:10.1093/nar/29.12.2607.
- [35] BERTELLI C, LAIRD M R, WILLIAMS K P, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W30-W35. DOI:10.1093/nar/gkx343.
- [36] FOUTS D E. Phage_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(20): 5839-5851. DOI:10.1093/nar/gkl732.
- [37] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [38] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [39] STOTHARD P, WISHART D S. Circular genome visualization and exploration using CGView[J]. Bioinformatics, 2005, 21(4): 537-539. DOI:10.1093/bioinformatics/bti054.
- [40] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589. DOI:10.1038/s41586-021-03819-2.
- [41] 郑雪, 梁琪, 宋雪梅, 等. 1株耗牛乳源产细菌素融合魏斯氏菌ZW21全基因组测序及序列分析[J]. 食品科学, 2023, 44(20): 119-126. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221126-303.
- [42] WANG C, DONG D, WANG H S, et al. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 22. DOI:10.1186/s13068-016-0440-2.
- [43] NANAVATI D M, THIRANGOON K, NOLL K M. Several archaeal homologs of putative oligopeptide-binding proteins encoded by *Thermotoga maritima* bind sugars[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1336-1345. DOI:10.1128/AEM.72.2.1336-1345.2006.
- [44] LAW C J, MALONEY P C, WANG D N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters[J]. Annual Review of Microbiology, 2008, 62: 289-305. DOI:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329.
- [45] CHENG D Y, JIANG C C, XU J C, et al. Characteristics and applications of alginate lyases: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1304-1320. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.199.
- [46] OGATA H, GOTO S, SATO K, et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 29-34. DOI:10.1093/nar/27.1.29.
- [47] LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, et al. The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy) in 2013[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: 490-495. DOI:10.1093/nar/gkt1178.
- [48] KROGH A, BROWN M, MIAN I S, et al. Hidden Markov models in computational biology applications to protein modeling[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 235(5): 1501-1531. DOI:10.1006/jmbi.1994.1104.
- [49] YAN J J, CHEN P, ZENG Y, et al. The characterization and modification of a novel bifunctional and robust alginate lyase derived from *Marinimicrobium* sp. H1[J]. Marine Drugs, 2019, 17(10): 545. DOI:10.3390/md17100545.

- [50] ARMENTEROS J J A, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 420-423. DOI:10.1038/s41587-019-0036-z.
- [51] 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. DOI:10.1016/j.jmb.2005.06.075.
- [52] UCHIMURA K, MIYAZAKI M, NOGI Y, et al. Cloning and sequencing of alginate lyase genes from deep-sea strains of *Vibrio* and *Agarivorans* and characterization of a new *Vibrio* enzyme[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(5): 526-533. DOI:10.1007/s10126-009-9237-7.
- [53] KAWAMOTO H, HORIBE A, MIKI Y, et al. Cloning and sequencing analysis of alginate lyase genes from the marine bacterium *Vibrio* sp. O2[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(5): 481-490. DOI:10.1007/s10126-005-6157-z.
- [54] THOMAS F, LUNDQVIST L C E, JAM M, et al. Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(32): 23021-23037. DOI:10.1074/jbc.M113.467217.
- [55] XU F, WANG P, ZHANG Y Z, et al. Diversity of three-dimensional structures and catalytic mechanisms of alginate lyases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(3): e02040-e02017. DOI:10.1128/AEM.02040-17.
- [56] CHAO Y X, WANG S Y, WU S Q, et al. Cloning and characterization of a new endo-type polyG-specific alginate lyase from bacteria *Vibrio* sp. QD-5[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, 38(6): 65-74. DOI:10.1007/s13131-018-1226-0.
- [57] SUN X K, GONG Y, SHANG D D, et al. Degradation of alginate by a newly isolated marine bacterium *Agarivorans* sp. B2Z047[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(4): 254. DOI:10.3390/md20040254.
- [58] 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. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.164.
- [59] ZHUANG J J, ZHANG K K, LIU X H, et al. Characterization of a novel polyM-preferred alginate lyase from marine *Vibrio splendidus* OU02[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(9): 295. DOI:10.3390/md16090295.
- [60] ERTESVÄG H. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 523. DOI:10.3389/fmicb.2015.00523.