



# 细菌生物被膜核心胞外多糖靶向水解酶的生物信息挖掘

田翠芳<sup>1</sup>, 吴倩<sup>1</sup>, 惠潇然<sup>1</sup>, 潘迎捷<sup>1,2,3</sup>, 赵勇<sup>1,2,3\*</sup>, 张昭寰<sup>1\*</sup>

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306

3 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

田翠芳, 吴倩, 惠潇然, 潘迎捷, 赵勇, 张昭寰. 细菌生物被膜核心胞外多糖靶向水解酶的生物信息挖掘[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2633-2655.

TIAN Cui Fang, WU Qian, HUI Xiaoran, PAN Yingjie, ZHAO Yong, ZHANG Zhaohuan. Bioinformatics data mining of hydrolases targeting core extracellular polysaccharides in bacterial biofilm[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2633-2655.

**摘要:** 【目的】胞外多糖是生物被膜不可或缺的重要成分, 在细菌致病和耐药过程中发挥着重要作用。运用酶制剂针对生物被膜的核心胞外多糖进行靶向清除, 能够从根本上破坏细菌生物被膜的核心骨架, 有助于战胜细菌生物被膜导致的危害。【方法】本研究针对常见致病菌生物被膜核心胞外多糖 Pel、Psl、褐藻胶、N-乙酰氨基葡萄糖(Poly- $\beta$ (1,6)-N-acetyl-D-glucosamine, PNAG)和纤维素, 基于 NCBI 数据库中丰富的基因序列信息, 筛选靶向生物被膜核心胞外多糖的水解酶, 进一步运用 phyre2、SWISS-MODEL 等生物信息工具, 分析了这些水解酶的理化性质、遗传进化、功能域及三维结构。【结果】筛选获得了 153 个靶向生物被膜核心胞外多糖的水解酶及其序列信息。其中, 靶向 Pel 胞外多糖的水解酶共 30 个, 属于糖苷水解酶 114 家族(glycoside-hydrolase family GH114); 靶向 Psl 胞外多糖的水解酶共 25 个, 属于糖苷水解酶超家族(glyco\_hydro super family); 靶向褐藻胶胞外多糖的水解酶共 33 个, 属于褐藻胶裂解酶超家族(AlgLyase superfamily); 靶向 PNAG 胞外多糖的水解酶共 30 个, 属于糖苷水解酶 13 家族(glycoside-hydrolase family GH13); 靶向纤维素胞外多糖的水解酶共 35 个, 属于糖苷水解酶 8 家族(glycosyl hydrolases family GH8)。【结论】这些水解酶菌具备靶向瓦解生物被膜核心胞外多糖的潜力, 亟待进一步开发与应用。本研究提供了迄今为止最为全面的生物被膜核心胞外多糖水解酶序列组成及生物信息, 为生物被膜的精准预防和靶向控制奠定扎实的数据基础。

资助项目: 国家自然科学基金(32001800); 上海市优秀学术带头人计划(21XD1401200)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32001800) and the Program of Shanghai Academic Research Leader (21XD1401200).

\*Corresponding authors. ZHANG Zhaohuan, Tel: +86-21-61900503, E-mail: zh-zhang@shou.edu.cn, gongziwuhen@126.com; ZHAO Yong, Tel: +86-21-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Received: 2022-10-08; Accepted: 2022-12-04; Published online: 2022-12-22

关键词：水解酶；生物被膜；胞外多糖；生物信息学分析

## Bioinformatics data mining of hydrolases targeting core extracellular polysaccharides in bacterial biofilm

TIAN Cuifang<sup>1</sup>, WU Qian<sup>1</sup>, HUI Xiaoran<sup>1</sup>, PAN Yingjie<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3\*</sup>, ZHANG Zhaohuan<sup>1\*</sup>

1 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

3 Shanghai Engineering Research Centre of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Objective] Extracellular polysaccharides, indispensable components of biofilm, play a role in bacterial pathogenicity and antibiotic resistance. Targeted elimination of the core extracellular polysaccharides of biofilm by enzyme preparations can fundamentally destroy the core skeleton of the biofilm and help overcome the harm caused by biofilm. [Methods] On the basis of the rich gene sequence information in the NCBI database, we screened the hydrolases targeting the extracellular polysaccharides Pel, Psl, alginate, Poly- $\beta$ (1,6)-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG), and cellulose in the biofilm. Further, we employed the bioinformatics tools such as phyre2 and SWISS-MODEL to analyze the physical and chemical properties, genetic evolution, functional domains, and three-dimensional structures of these hydrolases. [Results] A total of 153 hydrolases targeting extracellular polysaccharides in biofilm were screened out and their sequence information was obtained. Among them, 30, 25, 33, 30, and 35 hydrolases targeted Pel, Psl, alginate, PNAG, and cellulose, respectively, which belonged to the glycoside-hydrolase family GH114, Glyco\_hydro superfamily, AlgLyase superfamily, glycoside-hydrolase family GH13, and glycosyl hydrolase family GH8. [Conclusion] These hydrolases have the potential to cleavage the core extracellular polysaccharides in biofilm and need to be further developed and applied. This study provides the most comprehensive sequence and biological information of hydrolases targeting core extracellular polysaccharides in biofilms so far, laying a solid data foundation for precise prevention and targeted control of biofilms.

**Keywords:** hydrolase; biofilm; extracellular polysaccharide; bioinformatics analysis

细菌耐药性和多重耐药性的出现，对世界范围内的公共卫生造成了极大的危害<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计，到2050年由耐药菌株引起的多重细菌感染造成的死亡人数将超过癌症<sup>[2]</sup>。生物被膜是由微生物细胞及胞外多聚物形成的复杂群落，据报道，当致病菌存在于生物被膜中时，对抗菌药物的耐药性会提高10–1 000倍<sup>[3]</sup>。铜绿假单胞菌生物被膜会增强

免疫缺陷患者和患有慢性肺部疾病(如囊性纤维化和支气管扩张)的患者肺部感染<sup>[4]</sup>，延缓伤口愈合<sup>[5]</sup>。胞外多糖是细菌生物被膜的重要组成部分，在生物被膜形成与细菌耐药性产生过程中发挥着至关重要的作用<sup>[6-9]</sup>，因此，如果针对细菌胞外多糖进行靶向抑制，能够彻底破坏其生物被膜的“核心骨架”，从根本上瓦解生物被膜的形成，从而有效地降低细菌生物被膜的耐药风险<sup>[10]</sup>。

基于细菌生物被膜核心胞外多糖的研究已经广泛开展。其中, Pel、Psl 和褐藻胶是铜绿假单胞菌生物被膜的 3 种核心胞外多糖<sup>[11]</sup>。Pel 是一种阳离子多糖, 由部分去乙酰化的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖和 N-乙酰-D-半乳糖胺组成, 能交联带负电荷的 eDNA, 增强生物被膜结构的稳定性<sup>[12]</sup>。Psl 是一种中性多糖, 由 D-甘露糖、L-鼠李糖和 D-葡萄糖的五糖重复单元组成<sup>[13]</sup>。这 2 种胞外多糖在生物被膜结构中作为重要支架并介导大规模菌落的形成<sup>[7,14]</sup>。褐藻胶与囊性纤维化患者的慢性感染相关, 并影响铜绿假单胞菌生物被膜的发育和结构<sup>[15]</sup>。N-乙酰氨基葡萄糖 (poly- $\beta$ (1,6)-N-acetyl-D-glucosamine, PNAG) 是大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌等细菌生物被膜的主要成分<sup>[16]</sup>, 也是许多致病菌的重要毒力因子<sup>[17]</sup>。除此之外, 纤维素是一种  $\beta$ -1,4 葡聚糖多糖, 在许多细菌生物被膜的形成中发挥着重要作用, 维持了生物被膜与接触表面、生物被膜内部细胞间的相互联系<sup>[18]</sup>。

现阶段, 基于核心胞外多糖水解酶靶向瓦解细菌生物被膜的研究已陆续开展。Lamppa 等使用褐藻胶水解酶 AlgL 来降解假单胞菌生物被膜中的褐藻胶, 从而有效地破坏生物被膜的形成<sup>[19]</sup>。Yu 等研究表明, Psl 胞外多糖转运系统中的 PslG 存在一段糖苷水解酶域, 通过重组表达获得的 PslGh 可降解 Psl 胞外多糖, 从而抑制铜绿假单胞菌生物被膜<sup>[20]</sup>。Baker 等研究证明了糖苷水解酶 PslGh 和 PelAh 可以通过降解 Psl 和 Pel 胞外多糖, 瓦解成熟的假单胞菌生物被膜<sup>[21]</sup>。DspB 是一种能够靶向水解 PNAG 的糖苷水解酶, 可用于控制伤口感染中的细菌生物被膜<sup>[22]</sup>。此类水解酶广泛存在于细菌胞外多糖合成系统中, 例如, 单核李斯特菌中参与 EPs 合成的 PssZ<sup>[23]</sup>、大肠杆菌中的 PNAG 合成系统中的 PgaB 和纤维素合成系统中的

BcsZ 周质蛋白<sup>[24-25]</sup>, 以及荧光假单胞菌中纤维素合成所需的激光酶 WssD 和褐藻胶形成系统中的 AlgL<sup>[26-27]</sup>, 均具备靶向瓦解细菌生物被膜的能力, 具有十分重要的实际应用价值。但是, 相较于目前丰富的细菌已知基因组数据, 对于胞外多糖水解酶序列的挖掘研究还相对较少, 亟待进一步开展此类研究, 以丰富人类对于生物被膜核心胞外多糖水解酶的认知和开发应用。

因此, 本研究针对常见致病菌生物被膜核心胞外多糖 Pel、Psl、褐藻胶、PNAG 和纤维素, 基于 NCBI 数据库中丰富的基因序列信息, 运用生物信息学技术, 深度挖掘了靶向于不同胞外多糖的水解酶序列, 并分析了这些水解酶的理化性质、遗传进化、功能域及三维结构, 以期生物被膜核心胞外多糖水解酶的研究与开发提供最为全面的序列组成及生物信息, 为生物被膜的精准预防和靶向控制奠定扎实的数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 核心胞外多糖水解酶的筛选及理化性质分析

以“exopolysaccharides”“glucoside hydrolase”及“biofilm”等为关键词, 使用 Web of Science 数据库检索相关文献, 筛选出靶向细菌生物被膜核心胞外多糖的水解酶, 在 NCBI 数据库下载水解酶序列, 然后在 Uniprot 网站 BLAST 出所有具有糖苷水解酶域的氨基酸序列, 通过 ExPASy 在线网址(<https://web.expasy.org/protparam/>)对靶向水解酶的理化性质进行分析总结<sup>[28]</sup>。

### 1.2 核心胞外多糖水解酶的进化、结构域及功能分析

利用 MEGA 软件对水解酶构建系统发育树<sup>[29]</sup>, 在 NCBI 网站对所筛选的水解酶结构域进行分析, 然后用 phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page>)结合 SWISS-MODEL 对水解酶的三级结构进行同源建模<sup>[30]</sup>, 并使用

PYMOL 软件对结构可视化分析, 推测靶向水解酶结构的一般规律。

## 2 结果与分析

### 2.1 核心胞外多糖 Pel 靶向水解酶生物信息学分析

#### 2.1.1 靶向水解酶 PelAN 理化性质分析

通过归纳比较共筛选出 30 种靶向水解核心

胞外多糖 Pel 的糖苷水解酶, 其理化性质如表 1 所示, 这些糖苷水解酶大约由 252 个氨基酸组成, 分子量在 27.18–29.39 kDa 之间, 等电点分布在 4.63–6.51 之间, 水解酶整体带负电, 不稳定指数在 28.66–57.93 之间, 大部分为不稳定蛋白, 亲水指数在–0.128––0.497 之间, 均为亲水蛋白(表 1)。

表 1 靶向水解酶 PelAN 的理化性质分析

Table 1 Analysis of physicochemical properties of targeted hydrolase PelAN

Strains	Hydrolase	Amino acids	Molecular weight	pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	GRAVY
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	PelAN-PA	253	27 859.35	5.22	35	27	44.89	–0.260
<i>Pseudomonas carbonaria</i> CIP 111764	PelAN-PC	252	27 656.83	4.63	37	21	40.86	–0.295
<i>Pseudomonas jinjuensis</i> JCM 21621	PelAN-PJ	252	28 117.61	5.17	38	28	42.51	–0.320
<i>Pseudomonas</i> sp. LPB0260	PelAN-PS	252	28 196.77	4.92	37	26	53.23	–0.297
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3	PelAN-PT	253	28 380.99	5.00	37	27	57.93	–0.310
<i>Pseudomonas guineae</i> LMG 24016	PelAN-PG	252	28 457.13	5.21	31	24	52.04	–0.276
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> USDA-ARS-USMARC-56511	PelAN-PO	252	27 470.25	5.53	31	27	40.87	–0.154
<i>Pseudomonas</i> sp. M30-35	PelAN-PS.M30-35	252	28 567.30	5.33	34	27	54.54	–0.386
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC 15842	PelAN-PF	252	28 022.84	5.90	32	29	44.80	–0.262
<i>Pseudomonas mangrovi</i> TC11	PelAN-PM	251	28 081.87	4.74	37	23	36.89	–0.179
<i>Halopseudomonas xinjiangensis</i> NRRL B-51270	PelAN-HX	252	27 958.29	4.54	35	18	47.30	–0.247
<i>Pseudomonas</i> sp. OIL-1	PelAN-PS.OIL-1	251	28 797.36	4.86	41	27	41.35	–0.441
<i>Halopseudomonas pachastrellae</i> CCUG 46540	PelAN-HP	251	27 776.95	4.42	37	16	52.91	–0.333
<i>Pseudomonas</i> sp. PGPPP3	PelAN-PS. PGPPP3	250	28 037.65	4.78	32	21	44.76	–0.187
<i>Atopomonas hussainii</i> JCM 19513	PelAN-AH	249	27 181.74	4.70	29	18	36.62	–0.012
<i>Granulosicoccus antarcticus</i> IMCC3135	PelAN-GA	252	27 971.55	4.77	36	25	36.83	–0.243
<i>Pandoraea thiooxydans</i> DSM 25325	PelAN-PT DSM25325	251	27 995.62	5.37	28	22	43.33	–0.128
<i>Fluviicoccus keumensis</i> DSM 105135	PelAN-FK	252	28 353.11	5.99	31	26	46.44	–0.201
<i>Halomonas urumqiensis</i> BZ-SZ-XJ27	PelAN-HU	254	28 564.05	4.67	38	22	35.96	–0.279
<i>Photobacterium marinum</i> AK15	PelAN-PM AK15	250	28 358.05	5.19	34	26	27.85	–0.359
<i>Halomonas rituensis</i> TQ8S	PelAN-HR	254	29 166.68	4.86	38	24	42.28	–0.395
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	PelAN-PN	252	28 011.25	8.87	26	28	34.88	–0.050
<i>Ectothiorhodospiraceae bacterium</i> WFHF3C12	PelAN-EB	248	27 616.29	5.58	38	31	43.33	–0.260
<i>Nitrosomonas communis</i> Nm2	PelAN-NC	252	29 140.14	6.49	31	29	39.36	–0.373
<i>Leucothrix arctica</i> IMCC9719	PelAN-LA	254	29 294.48	5.27	39	32	30.06	–0.318
<i>Zoogloea ramigera</i> NBRC 15342	PelAN-ZR	257	28 154.68	5.47	32	27	28.66	–0.155
<i>Sphaerotilus montanus</i>	PelAN-SM	253	28 437.17	6.51	30	28	30.73	–0.332
<i>Photobacterium jeanii</i> R-40508	PelAN-PJR-40508	250	28 730.38	4.96	36	26	37.65	–0.497
<i>Ralstonia</i> sp. A12	PelAN-RS	252	28 832.61	6.15	35	33	32.64	–0.487
<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp14	PelAN-NS	252	29 397.38	5.90	34	31	40.54	–0.385

### 2.1.2 靶向水解酶 PelAN 进化分析

将 30 种糖苷水解酶氨基酸序列利用 MEGA 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 1),由图中可以看出, PelAN 糖苷水解酶被分为 2 个亚组: Subgroup I和 Subgroup II, Subgroup I包含 13 种糖苷水解酶, 分别是 PelAN-EB、PelAN-PT DSM25325、PelAN-RS、PelAN-SM、PelAN-FK、PelAN-ZR、PelAN-GA、PelAN-LA、PelAN-HU、PelAN-HR、PelAN-PN、PelAN-NC 和 PelAN-NS; Subgroup II包含 17 种糖苷水解酶,分别是 PelAN-PS、PelAN-PT、PelAN-PG、PelAN-PS.M30-35、PelAN-PF、PelAN-PO、PelAN-PC、PelAN-PA、PelAN-PJ、PelAN-PM、PelAN-HX、PelAN-HP、PelAN-PS.OIL-1、PelAN-PS.PGPPP3、PelAN-AH、PelAN-PM AK15 和 PelAN-PM AK15。水解酶的

来源菌株以假单胞菌为主, 并由图中可以看出支持度较高。

### 2.1.3 靶向水解酶 PelAN 功能域分析及结构预测

在 NCBI 网站对筛选的水解酶 PelAN 功能域进行分析(图 2), 发现 30 种 PelAN 水解酶属于 glycoside-hydrolase family GH114, 该结构域位于 PelA 蛋白的 N 端, 是一种内切  $\alpha$ -1,4-半乳糖胺酶, 能够水解细菌生物被膜核心胞外多糖 Pel 中的 1,4 连接的 N-乙酰-D-半乳糖, 达到抑制生物被膜形成的作用。Phyre2 对水解酶进行同源建模, 发现 30 种 PelAN 模板相同, 使用 Pymol 软件对筛选的所有 PelAN 靶向水解酶同源建模的 PDB 模板进行分析(图 3), 同样发现来自不同菌株靶向 Pel 胞外多糖的水解酶的结构高度相似, 呈现  $\beta_8/\alpha_7$  TIM 桶状结构<sup>[31]</sup>。

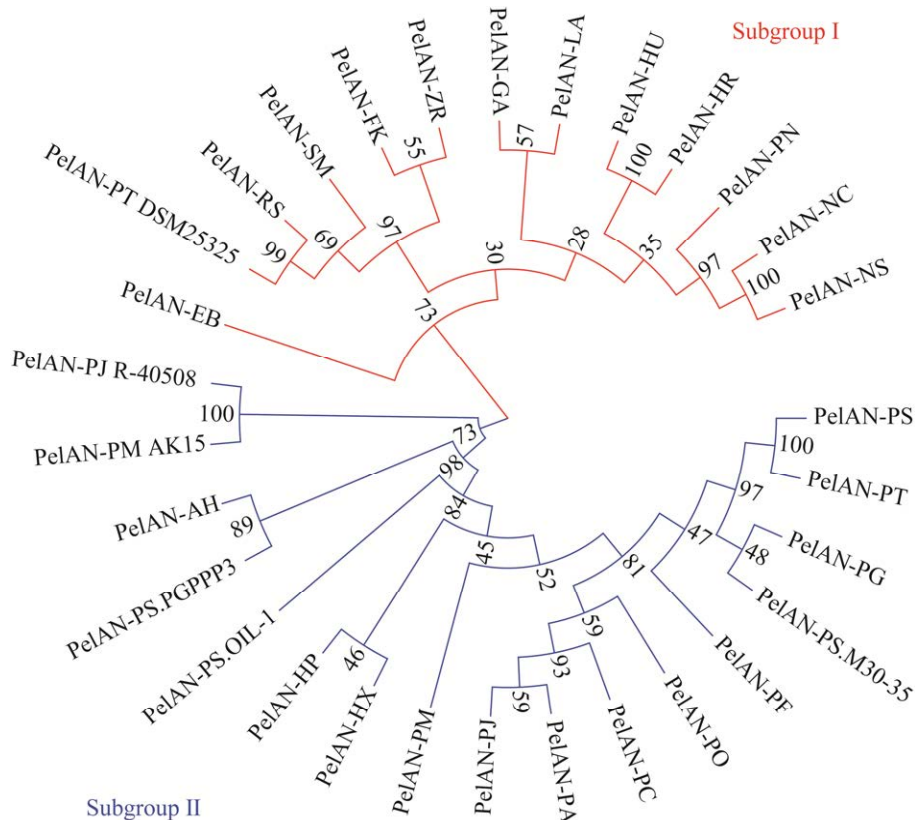


图 1 水解酶 PelAN 遗传进化树分析  
Figure 1 Genetic evolution tree analysis of PelAN.

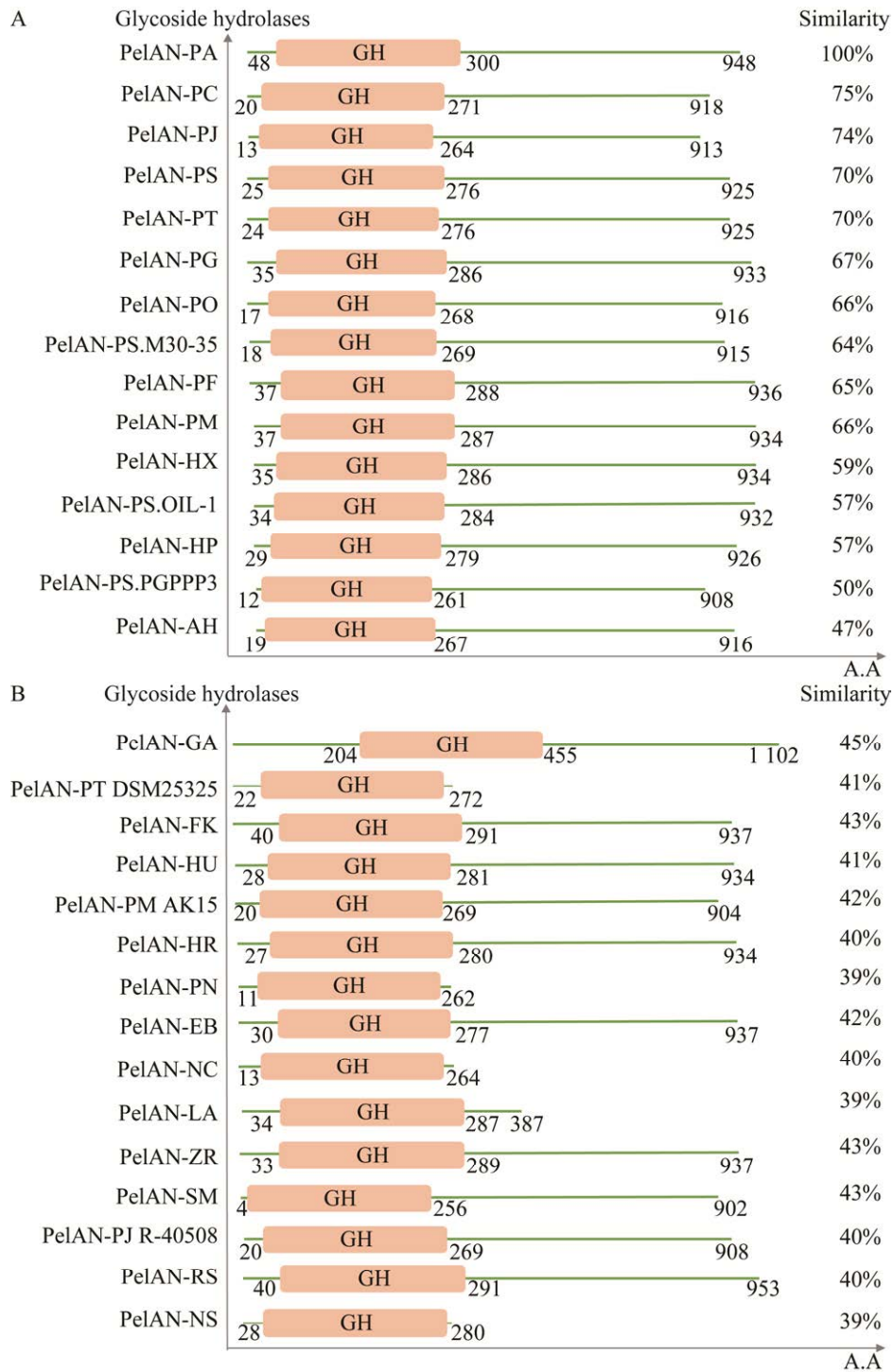


图 2 靶向水解酶 PelAN 功能域分布

Figure 2 Functional domain distribution of targeted hydrolase PelAN. A: Functional domain distribution of PelAN-PA, PelAN-PC, PelAN-PJ, PelAN-PS, PelAN-PT, PelAN-PG, PelAN-PO, PelAN-PS.M30-35, PelAN-PF, PelAN-PM, PelAN-HX, PelAN-PS.OIL-1, PelAN-HP, PelAN-PS.PGPPP3, and PelAN-AH. B: Functional domain distribution of PelAN-GA, PelAN-PT DSM25325, PelAN-FK, PelAN-HU, PelAN-PM AK15, PelAN-HR, PelAN-PN, PelAN-EB, PelAN-NC, PelAN-LA, PelAN-ZR, PelAN-SM, PelAN-PJ R-40508, PelAN-RS, and PelAN-NS.

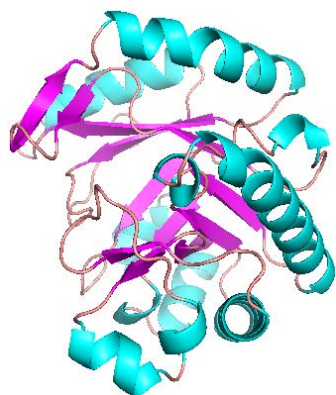


图 3 靶向水解酶 PeiAN 同源建模分析(模板 PDB: c5tcbA)

Figure 3 Homology modeling analysis of PeiAN (template PDB: c5tcbA).

## 2.2 核心胞外多糖 Psl 靶向水解酶生物信息学分析

### 2.2.1 靶向水解酶 PslG 理化性质分析

通过归纳比较共筛选出 25 种靶向水解核心胞外多糖 Psl 的糖苷水解酶, 其理化性质如表 2 所示, 这些糖苷水解酶中有 24 种水解酶氨基酸数量在 372–438 之间, 分子量在 42.27–53.71 kDa, 而 PslG-AA 由 239 个氨基酸组成, 分子量为 27.06 kDa, 25 种糖苷水解酶的等电点分布范围较广, 在 4.90–9.93 之间。PslG-JS、PslG-AS、PslG-RS、PslG-AC、PslG-Asp 及 PslG-AA 总体带正电, 其余水解酶总体带负电, 有 9 种水解酶

表 2 靶向水解酶 PslG 的理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of targeted hydrolase PslG

Strains	Hydrolase	Amino acids	Molecular weight	pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	GRAVY
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	PslG-PA	414	47 103.64	5.34	53	45	38.41	-0.313
<i>Pseudomonas</i> sp. TTU2014-080ASC	PslG-PSh	412	46 463.03	5.65	46	40	33.97	-0.238
<i>Pseudomonas</i> sp. HAR-UPW-AIA-41	PslG-PS Ht	412	46 867.25	5.55	46	37	51.95	-0.450
<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	PslG-CS	415	46 213.08	9.61	41	52	39.62	-0.330
<i>Corticibacter populi</i> DSM 105136	PslG-CP	417	46 155.56	5.65	42	35	44.63	-0.235
<i>Thiopseudomonas denitrificans</i> DSM 28679	PslG-TD	416	46 955.81	5.98	49	44	37.79	-0.337
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	PslG-PF	412	45 531.46	4.85	40	28	33.64	-0.233
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	PslG-PST	409	45 656.83	5.55	37	31	36.02	-0.219
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> IRR1 6609	PslG-PFu	410	45 691.74	5.32	39	32	36.43	-0.256
<i>Janthinobacterium</i> sp. B9-8	PslG-JS	406	45 717.53	9.10	44	50	43.21	-0.323
<i>Pseudomonas cichorii</i> ICMP 6917	PslG-Pci	408	45 611.62	5.44	34	25	38.05	-0.156
<i>Pseudomonas caspiana</i> FBF102	PslG-Pca	413	46 135.37	5.44	41	34	40.97	-0.261
<i>Aquabacterium</i> sp. SJQ9	PslG-AS	416	47 260.76	9.26	45	53	37.25	-0.361
<i>Pseudomonas</i> sp. StFLB209	PslG-PSp StFLB209	408	45 534.74	5.73	38	33	38.22	-0.230
<i>Pseudomonas syringae</i> GAW0119	PslG-Psy	413	45 845.80	5.09	41	29	39.92	-0.213
<i>Pseudomonas</i> sp. V388	PslG-PSp v388	412	46 121.45	5.69	43	37	38.37	-0.268
<i>Pseudomonas</i> sp. M47T1	PslG-PSp M47T1	409	44 352.02	4.90	34	24	29.94	-0.044
<i>Frateuria aurantia</i> DSM 6220	PslG-FA	409	45 961.42	5.37	42	33	49.42	-0.230
<i>Rubrivivax</i> sp. PMG_238	PslG-RS	407	45 605.79	9.24	44	52	36.39	-0.239
<i>Aquabacterium olei</i> NBRC 110486	PslG-AO	418	46 979.02	9.04	45	49	46.22	-0.261
<i>Methylomonas</i> sp. LWB	PslG-MS	409	45 699.22	5.92	42	39	37.65	-0.206
<i>Aquabacterium commune</i> DSM 11901	PslG-AC	421	46 312.24	9.08	37	42	42.42	-0.188
<i>Aquabacterium</i> sp. NJ1	PslG-Asp	407	45 675.50	8.71	43	46	36.15	-0.322
<i>Deinococcus cellulosityticus</i> NBRC 106333	PslG-DC	372	42 279.27	6.77	42	41	41.90	-0.389
<i>Acidihalobacter aeolianus</i> V6	PslG-AA	239	27 069.09	9.93	17	26	35.99	-0.129

为稳定蛋白，分别是 PslG-PS Ht、PslG-CP、PslG-JS、PslG-Pca、PslG-FA、PslG-AO、PslG-AC、PslG-DC 及 PslG-NG，其余为不稳定蛋白，亲水指数在-0.044- -0.45 之间，均为亲水蛋白。

### 2.2.2 靶向水解酶 PslG 进化分析

将 25 种 PslG 糖苷水解酶氨基酸序列利用 MEGA 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 4)，由图中可以看出，PslG 糖苷水解酶被分为 3 个亚组：Subgroup I、Subgroup II 及 Subgroup III。Subgroup I 亚组包含 3 种水解酶，分别是 PslG-PS Ht、PslG-AS 和 PslG-AA。

Subgroup II 共包含 11 种水解酶，分别是 PslG-CS、PslG-TD、PslG-PA、PslG-PCa、PslG-PSy、PslG-AO、PslG-PF、PslG-PSp v388、PslG-CP、PslG-PSh 和 PslG-Pfu。Subgroup III 同样包含 11 种水解酶，分别是 PslG-RS、PslG-MS、PslG-AC、PslG-Asp、PslG-PSp StFLB209、PslG-DC、PslG-JS、PslG-FA、PslG-PSp M47T1、PslG-PST 和 PslG-PCi。PslG 糖苷水解酶菌株来源以假单胞菌为主，Subgroup II 亚组和 Subgroup III 亚组的结果支持度比 Subgroup I 亚组支持度高。

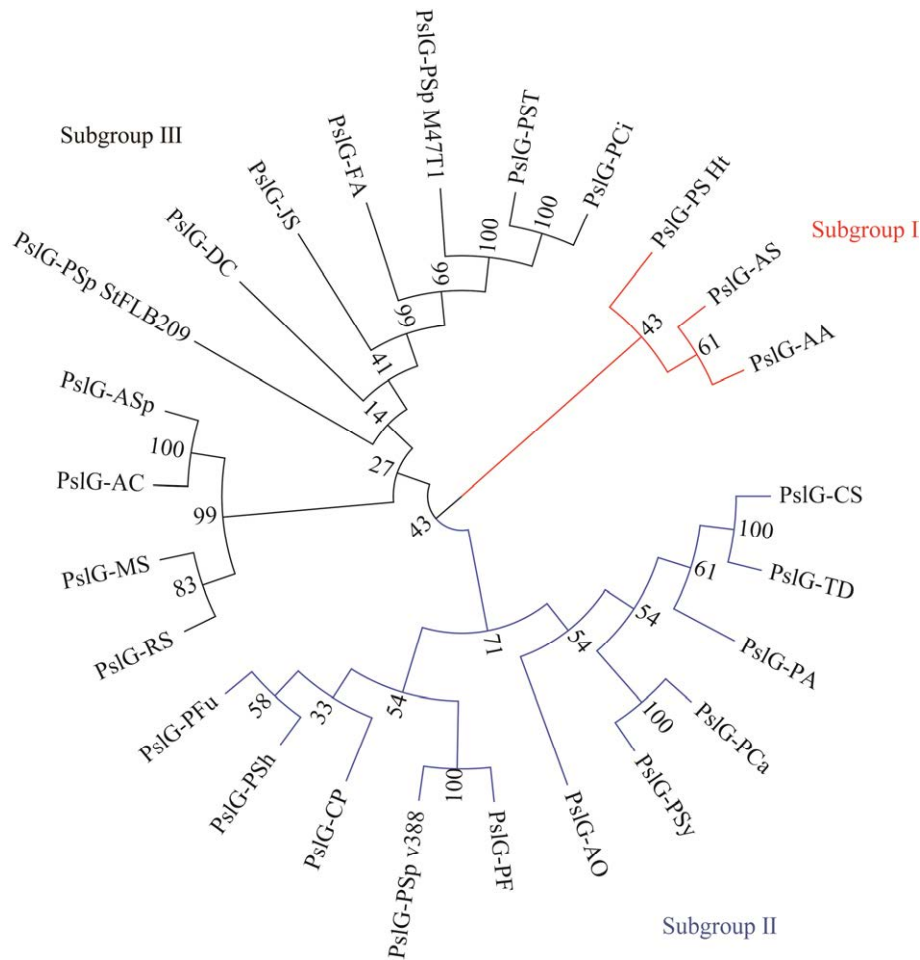


图 4 水解酶 PslG 遗传进化树分析

Figure 4 Genetic evolution tree analysis of PslG.



### 2.2.3 靶向水解酶 PslG 功能域分析及结构预测

通过 NCBI 对 25 种 PslG 功能域分析(图 5),

结果显示靶向水解酶 PslG 均属于 glyco\_hydro super family, 该家族是一个功能多样的超家族,

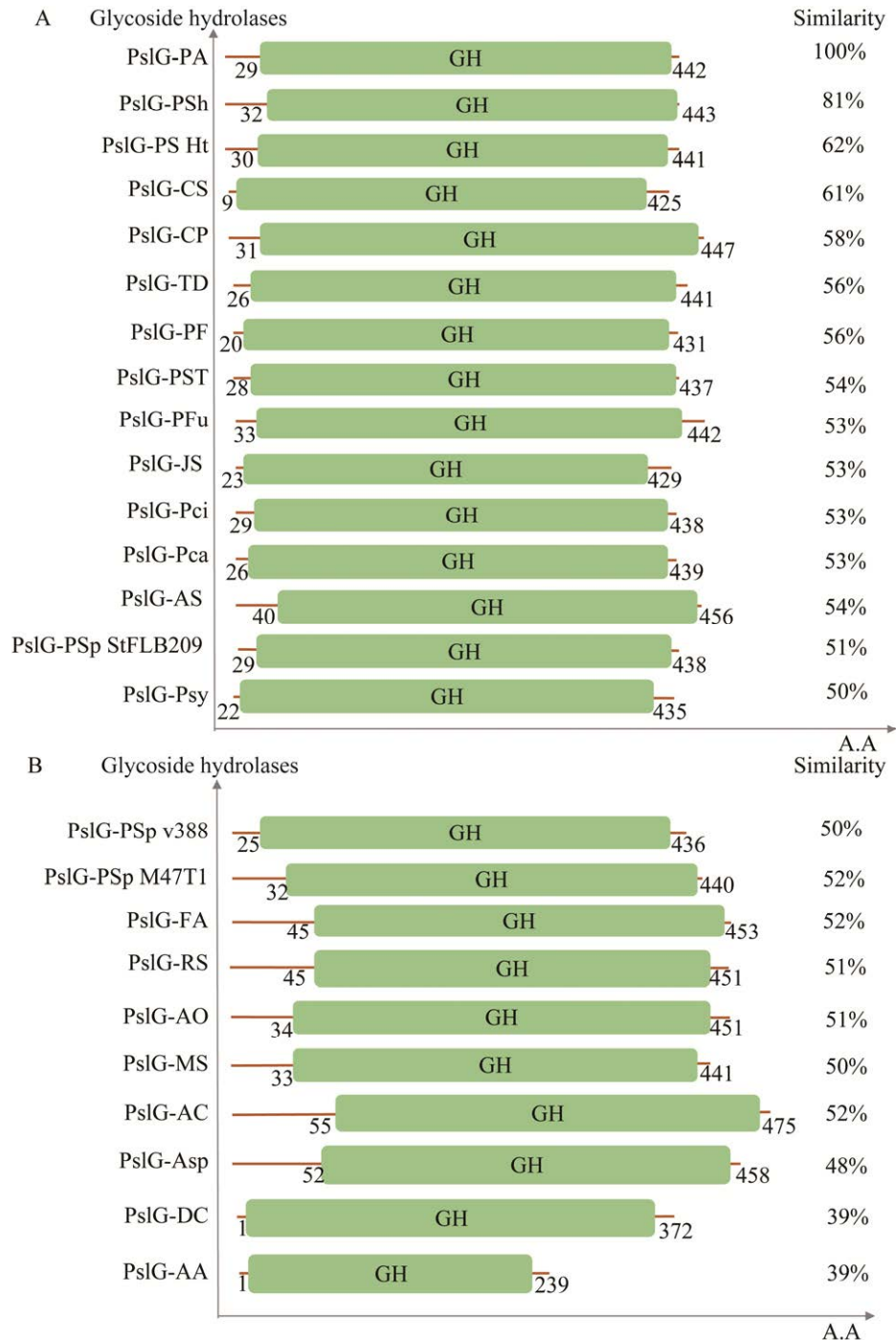


图 5 靶向水解酶 PslG 功能域分布

Figure 5 Functional domain distribution of targeted hydrolase PslG. A: Functional domain distribution of PslG-PA, PslG-PSh, PslG-PS Ht, PslG-CS, PslG-CP, PslG-TD, PslG-PF, PslG-PST, PslG-Pfu, PslG-JS, PslG-Pci, PslG-Pca, PslG-AS, PslG-PSp StFLB209, and PslG-Psy. B: Functional domain distribution of PslG-PSp v388, PslG-PSp M47T1, PslG-FA, PslG-RS, PslG-AO, PslG-MS, PslG-AC, PslG-Asp, PslG-DC, and PslG-AA.

包括糖基水解酶家族 1、5、10、17、44、72 等。PslG 是一种类似  $\beta$ -D-木糖苷酶的胞外蛋白, 该结构去除了一个 N 端跨膜结构域, 产生了一个可溶的、催化活性的糖苷水解酶结构域, 以生物被膜核心胞外多糖 Psl 基质为靶点, 对多种假单胞菌具有生物膜分解和抑制活性。Phyre2 同源建模结果发现 25 种水解酶的模板相同, 使用 Pymol 软件对筛选的所有 PslG 靶向水解酶同源建模的 PDB 模板进行分析(图 6), 同样发现来自不同菌株靶向 Psl 胞外多糖的水解酶结构具有较高的相似度。有研究表明每个 PslG 单体包含 412 个残基, 它们折叠成 2 个结构域, 一个大的结构域和一个小的结构域, 是常见的  $(\beta/\alpha)_8$  桶状褶皱结构, 在多糖水解酶家族中较为保守, 褶皱的另一面包含 6 个大环, 这些大环包括一些二级结构元件, 它们的作用是连接  $(\beta/\alpha)_8$  桶状折叠结构中的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠, 并在分子一侧形成镰刀形槽<sup>[32]</sup>。

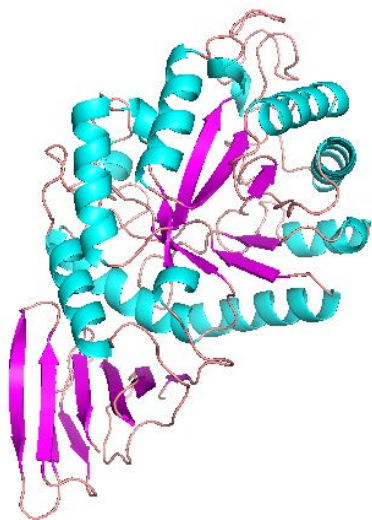


图 6 靶向水解酶 PslG 同源建模分析(模板 PDB: c5bx9A)

Figure 6 Homology modeling analysis of PslG (template PDB: c5bx9A).

## 2.3 核心胞外多糖 Alg 靶向水解酶生物信息学分析

### 2.3.1 靶向水解酶 AlgL 理化性质分析

通过归纳比较共筛选出 33 种靶向水解核心胞外多糖 Alg 的糖苷水解酶, 其理化性质如表 3 所示, 这些糖苷水解酶由 330–337 个氨基酸组成, 长度相差较小, 分子量也集中分布在 36.61–38.94 kDa 之间。AlgL-PS FeS53a、AlgL-AC、AlgL-AV、AlgL-AP、AlgL-DS 及 AlgL-ST 的等电点分别为 6.68、6.90、5.97、6.29、6.82 及 5.81, 其余水解酶等电点在 7.11–9.71 之间。AlgL-PS FeS53a、AlgL-AV、AlgL-AP 及 AlgL-ST 总体带负电, AlgL-AC、AlgL-DS 和 AlgL-Ppe 总体不带电, 其余水解酶整体带正电。AlgL-PA、AlgL-PS StFLB209、AlgL-PS FeS53a、AlgL-AC、AlgL-AV、AlgL-Pag、AlgL-PT、AlgL-Pmu、AlgL-ACM、AlgL-ST 及 AlgL-EC 为不稳定蛋白, 其余均为稳定蛋白。亲水指数在  $-0.287$ – $-0.693$  之间, 均为亲水性蛋白。

### 2.3.2 靶向水解酶 AlgL 进化分析

将 33 种 AlgL 糖苷水解酶氨基酸序列利用 MEGA 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 7), 由图中可以看出, 糖苷水解酶被分为 2 个亚组: Subgroup I 和 Subgroup II。Subgroup I 包含 6 种糖苷水解酶, 分别是 AlgL-AP、AlgL-EC、AlgL-ES、AlgL-Ppe、AlgL-DS 和 AlgL-ST。Subgroup II 包含 27 种糖苷水解酶, 分别是 AlgL-PF、AlgL-CM、AlgL-Pag、AlgL-Pfu、AlgL-PO、AlgL-PMu、AlgL-PS StFLB209、AlgL-PSy、AlgL-PSPS、AlgL-PPu、AlgL-PE、AlgL-PB、AlgL-PM、AlgL-PJ、AlgL-PA、AlgL-PK、AlgL-PS 21、AlgL-PN、AlgL-PC、AlgL-PI、AlgL-PS FeS53a、AlgL-PT、AlgL-AV、AlgL-AC、AlgL-ACM、AlgL-PAI 和 AlgL-OM。33 种 AlgL 水解酶以假单胞菌为主要菌株来源。

表 3 靶向水解酶 AlgL 的理化性质分析

Table 3 Analysis of physicochemical properties of targeted hydrolase AlgL

Strains	Hydrolase	Amino acids	Molecular weight	pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	GRAVY
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AlgL-PA	335	37 628.48	8.27	43	45	41.97	-0.531
<i>Pseudomonas</i> sp. 21	AlgL-PS 21	336	37 852.34	7.78	42	43	38.71	-0.693
<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	AlgL-PN	336	37 779.30	8.50	40	43	34.78	-0.682
<i>Pseudomonas knackmussii</i> B13	AlgL-PK	334	37 489.97	7.81	39	40	37.57	-0.616
<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AlgL-PJ	334	37 720.93	9.71	35	53	33.56	-0.593
<i>Pseudomonas indica</i> PIC105	AlgL-PI	334	38 002.18	8.83	41	46	39.89	-0.530
<i>Pseudomonas putida</i> CSV86	AlgL-Ppu	336	37 726.44	8.98	39	45	29.84	-0.592
<i>Pseudomonas</i> sp. StFLB209	AlgL-PS StFLB209	336	38 085.05	7.83	43	44	42.13	-0.578
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	AlgL-PE	336	37 849.76	8.99	39	45	32.75	-0.540
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	AlgL-PF	336	38 110.09	8.68	42	46	36.50	-0.658
<i>Pseudomonas</i> sp. FeS53a	AlgL-PS FeS53a	334	37 804.43	6.68	42	41	44.35	-0.632
<i>Pseudomonas syringae</i>	AlgL-Psy	336	38 159.37	8.80	43	48	30.29	-0.582
<i>Azotobacter chroococcum</i> NCIMB 8003	AlgL-AC	335	37 499.60	6.90	45	45	41.99	-0.444
<i>Pseudomonas ogarae</i> F113	AlgL-PO	336	38 151.16	7.81	45	46	35.16	-0.604
<i>Pseudomonas carbonaria</i>	AlgL-PC	335	38 033.04	9.23	39	47	33.38	-0.522
<i>Pseudomonas brassicae</i>	AlgL-PB	336	38 035.96	9.16	38	46	37.14	-0.660
<i>Cobetia marina</i>	AlgL-CM	336	38 257.45	8.49	45	48	37.09	-0.646
<i>Pseudomonas mangiferae</i>	AlgL-PM	344	38 948.97	8.22	45	47	37.35	-0.612
<i>Azotobacter vinelandii</i> ATCC BAA-1303	AlgL-AV	335	37 334.37	5.97	45	42	46.69	-0.388
<i>Pseudomonas agarici</i>	AlgL-Pag	336	38 148.21	8.51	42	45	40.55	-0.601
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	AlgL-Pfu	336	37 935.75	8.75	39	43	35.47	-0.617
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3	AlgL-PT	336	38 049.03	8.75	38	42	50.57	-0.561
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	AlgL-PSPS	336	38 041.21	8.47	45	48	32.00	-0.582
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	AlgL-Pmu	336	38 294.47	8.50	43	46	43.03	-0.621
<i>Azotobacter chroococcum</i> mcd 1	AlgL-ACM	334	37 418.67	9.05	42	48	43.29	-0.463
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 1577	AlgL-Pal	332	37 553.40	7.66	38	39	39.71	-0.526
<i>Abyssibacter profundi</i>	AlgL-AP	330	36 886.64	6.29	42	40	29.87	-0.434
<i>Oleiphilus messinensis</i>	AlgL-OM	337	38 251.33	8.72	33	37	35.32	-0.502
<i>Dyella soli</i>	AlgL-DS	336	37 365.14	6.82	38	38	31.03	-0.487
<i>Solimonas terrae</i>	AlgL-ST	335	36 611.01	5.81	40	36	40.58	-0.423
<i>Panacagrimonas perspica</i>	AlgL-Ppe	334	37 326.27	7.11	43	43	31.18	-0.479
<i>Enterobacter cloacae</i> S611	AlgL-EC	335	36 960.88	9.00	26	30	49.30	-0.287
<i>Enterobacter</i> sp. BIGb0383	AlgL-ES	336	37 789.76	9.00	35	40	39.99	-0.472

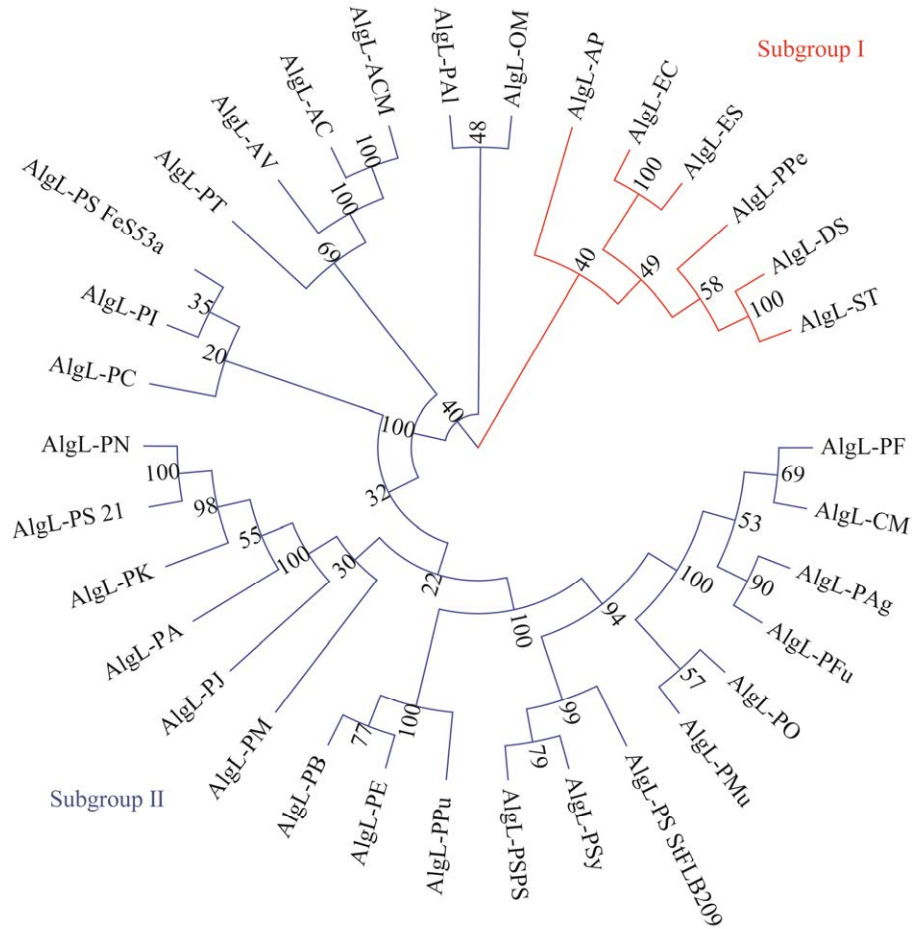


图 7 水解酶 AlgL 遗传进化树分析

Figure 7 Genetic evolution tree analysis of AlgL.

### 2.3.3 靶向水解酶 AlgL 功能域分析及结构预测

NCBI 对 AlgL 水解酶结构域分析结果显示 (图 8), 33 种 AlgL 水解酶都属于 AlgLyase superfamily, AlgL 水解酶通过  $\beta$ -消除机制切割两个相邻糖残基之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键催化海藻酸解聚。使用 Phyre2 对水解酶同源建模的结果显示 33 种 AlgL 水解酶的模板相同, Farrell 等<sup>[33]</sup>对 AlgL 结构解析发现该水解酶是 $(\alpha/\alpha)_6$ 桶状折叠结构, 裂解周质空间无转出的褐藻胶。使用 Pymol 软件对同源建模的 PDB 模板进行可视化分析(图 9), 同样发现来自不同菌株靶向 Alg 胞

外多糖的水解酶的结构高度相似。

## 2.4 核心胞外多糖 PNAG 靶向水解酶生物信息学分析

### 2.4.1 靶向水解酶 PgaB 理化性质分析

通过序列比对共收集了 30 种 PgaB 水解酶, 其理化性质如表 4 所示, 水解酶由 359–367 个氨基酸组成, 分子量在 40.58–42.26 kDa 之间。等电点在 4.77–6.69 之间, 所有水解酶整体带负电, 29 种 PgaB 水解酶中只有 PgaB-HP 为稳定蛋白, 其余均为不稳定蛋白, 且所有 PgaB 水解酶均为亲水蛋白。

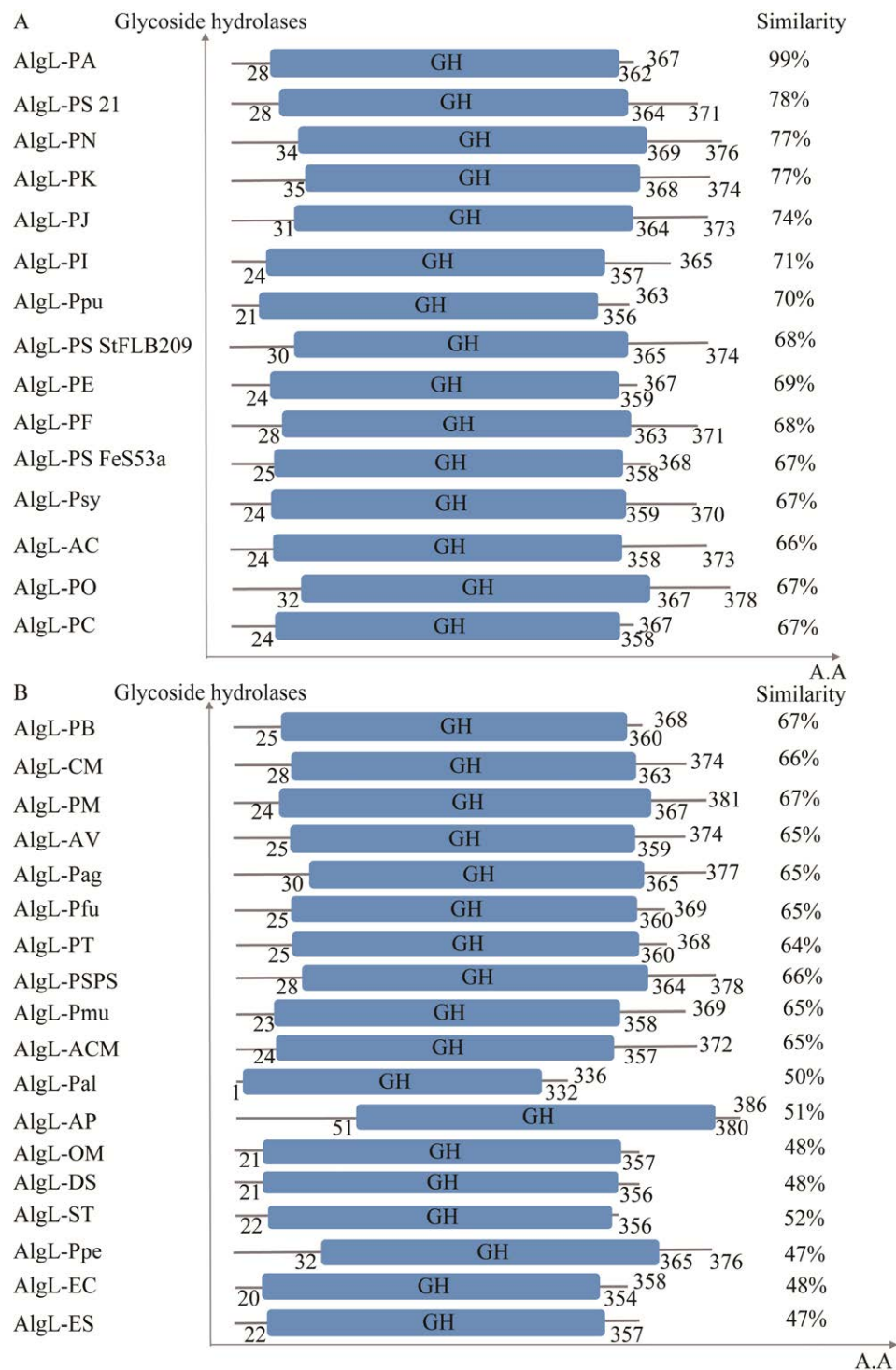


图 8 靶向水解酶 AlgL 功能域分布

Figure 8 Functional domain distribution of targeted hydrolase AlgL. A: Functional domain distribution of AlgL-PA, AlgL-PS 21, AlgL-PN, AlgL-PK, AlgL-PJ, AlgL-PI, AlgL-Ppu, AlgL-PSSStFLB209, AlgL-PE, AlgL-PF, AlgL-PS FeS53a, AlgL-Psy, AlgL-AC, AlgL-PO, and AlgL-PC. B: Functional domain distribution of AlgL-PB, AlgL-CM, AlgL-PM, AlgL-AV, AlgL-Pag, AlgL-Pfu, AlgL-PT, AlgL-PSPS, AlgL-Pmu, AlgL-ACM, AlgL-Pal, AlgL-AP, AlgL-OM, AlgL-DS, AlgL-ST, AlgL-Ppe, AlgL-EC, and AlgL-ES.

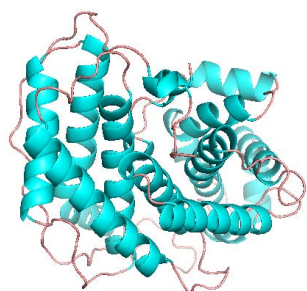


图9 靶向水解酶 AlgL 同源建模分析(模板 PDB: c4ozwA)

Figure 9 Homology modeling analysis of AlgL (template PDB: c4ozwA).

表4 靶向水解酶 PgaB 的理化性质分析

Table 4 Analysis of physicochemical properties of targeted hydrolase PgaB

Strains	Hydrolase	Amino acids	Molecular weight	pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	GRAVY
<i>Escherichia coli</i> K-12 C3026	PgaB-EC	363	41 982.55	5.63	45	37	47.50	-0.474
<i>Klebsiella indica</i>	PgaB-KI	359	41 489.85	5.63	43	38	52.05	-0.429
<i>Halopseudomonas pelagia</i>	PgaB-HP	359	40 649.97	4.86	52	35	38.07	-0.263
<i>Hydrogenophaga</i> sp. BPS33	PgaB-HS	359	40 586.95	5.59	48	41	45.15	-0.323
<i>Cupriavidus</i> sp. HPC(L)	PgaB-CS	359	41 089.68	6.61	48	47	50.27	-0.405
<i>Klebsiella michiganensis</i>	PgaB-KM	359	41 456.06	5.62	45	37	49.21	-0.366
<i>Beauveria bassiana</i> D1-5	PgaB-BB	359	41 456.06	5.62	45	37	85.10	-0.366
<i>Pseudoescherichia vulneris</i> NBRC 102420	PgaB-PV	361	42 110.57	5.12	55	46	56.34	-0.628
<i>Cupriavidus gilardii</i> J11	PgaB-CG	362	41 420.89	5.66	49	44	50.05	-0.383
<i>Jejubacter calystegiae</i>	PgaB-JC	359	41 756.27	6.12	43	40	57.98	-0.462
<i>Klebsiella variicola</i>	PgaB-KV	359	41 626.33	6.69	40	39	49.52	-0.432
<i>Xenorhabdus cabanillasii</i> JM26	PgaB-XC	360	42 249.80	5.43	49	41	55.72	-0.552
<i>Atlantibacter hermannii</i> NBRC 105704	PgaB-AH	360	41 718.12	5.44	46	37	51.03	-0.487
<i>Xenorhabdus stockiae</i>	PgaB-XSt	360	41 993.54	5.32	48	40	50.78	-0.470
<i>Xenorhabdus</i> sp. KJ12.1	PgaB-XS	360	41 977.54	5.43	48	41	50.25	-0.486
<i>Franconibacter pulveris</i>	PgaB-FP	360	42 129.56	5.39	50	41	46.22	-0.611
<i>Parapusillimonas granuli</i>	PgaB-PG	363	41 861.26	5.65	52	42	46.24	-0.475
<i>Candidimonas bauzanensis</i>	PgaB-CB	363	41 129.45	5.80	44	37	41.43	-0.341
<i>Pusillimonas</i> sp. TS35	PgaB-PS	363	41 515.20	5.55	49	41	46.85	-0.337
<i>Citrobacter tractae</i>	PgaB-CiTr	360	41 745.13	5.32	50	42	53.26	-0.544
<i>Erwinia</i> sp. Leaf53	PgaB-ES	360	40 977.18	5.06	46	37	51.04	-0.420
<i>Serratia ficaria</i>	PgaB-SF	363	41 564.18	6.41	44	43	47.44	-0.390
<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	PgaB-XD	360	42 079.85	5.36	50	40	53.63	-0.447
<i>Paralcaligenes ureilyticus</i>	PgaB-PU	363	41 167.88	6.79	43	42	43.24	-0.313
<i>Comamonas terrigena</i>	PgaB-CT	367	41 978.44	5.78	46	40	48.23	-0.452
<i>Xenorhabdus mauleonii</i>	PgaB-XM	360	42 265.07	5.59	47	40	50.96	-0.492
<i>Brenneria goodwinii</i>	PgaB-BG	363	41 940.04	4.77	54	35	58.28	-0.444
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	PgaB-XN	360	41 986.59	5.08	44	34	45.03	-0.453
<i>Yersinia pestis</i>	PgaB-YP	360	41 657.28	4.92	53	41	46.72	-0.503
<i>Pusillimonas noertemannii</i>	PgaB-PN	364	42 010.20	4.85	54	37	44.69	-0.465

## 2.4.2 靶向水解酶 PgaB 进化分析

将 30 种 PgaB 糖苷水解酶氨基酸序列利用 MEGA 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 10), 由图中可以看出, 糖苷水解酶被分为 2 个亚组: Subgroup I 和 Subgroup II。Subgroup I 包含 3 种糖苷水解酶, 分别是 PgaB-HP、PgaB-PV 和 PgaB-PN。Subgroup II 包含 27 种糖苷水解酶, 分别有 PgaB-CB、PgaB-PS、PgaB-PU、PgaB-PG、PgaB-HS、PgaB-CS、PgaB-KV、PgaB-KI、PgaB-JC、

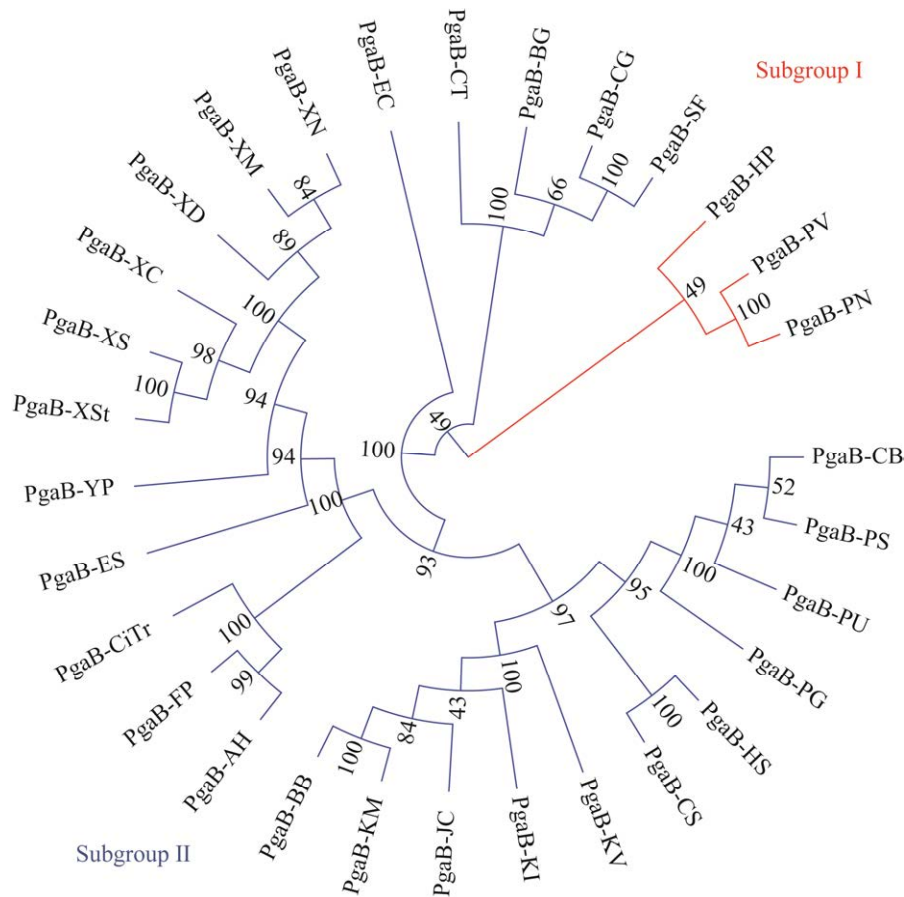


图 10 水解酶 PgaB 遗传进化树分析

Figure 10 Genetic evolution tree analysis of PgaB.

PgaB-KM、PgaB-BB、PgaB-AH、PgaB-FP、PgaB-CiTr、PgaB-ES、PgaB-YP、PgaB-XSt、PgaB-XS、PgaB-XC、PgaB-XD、PgaB-XM、PgaB-XN、PgaB-EC、PgaB-CT、PgaB-BG、PgaB-CG 和 PgaB-SF。所筛选的 30 种 PgaB 糖苷水解酶有 27 种都属于 Subgroup II 亚组, 且所有结果支持度均高于 40, 说明构建的 PgaB 遗传进化树具有很高的可信度。

#### 2.4.3 靶向水解酶 PgaB 功能域分析及结构预测

通过 NCBI 对 30 种 PgaB 糖苷水解酶的结构

域进行分析(图 11), 发现这些糖苷水解酶均属于 pgaB super family, 这个大型超家族包含一系列具有 TIM 桶形折叠的糖苷水解酶, 这 30 种 PgaB 糖苷水解酶则属于该大家族中的 glycoside-hydrolase family GH13, 可裂解去乙酰化的聚-(1,6)-N-乙酰氨基葡萄糖。Phyre2 对水解酶进行同源建模, 结果显示 29 种 PgaB 水解酶同源建模模板相同, 使用 Pymol 软件对筛选的所有 PgaB 靶向水解酶 PDB 模板进行分析(图 12), 发现来自不同菌株靶向 PNAG 胞外多糖的水解酶的结构相似。

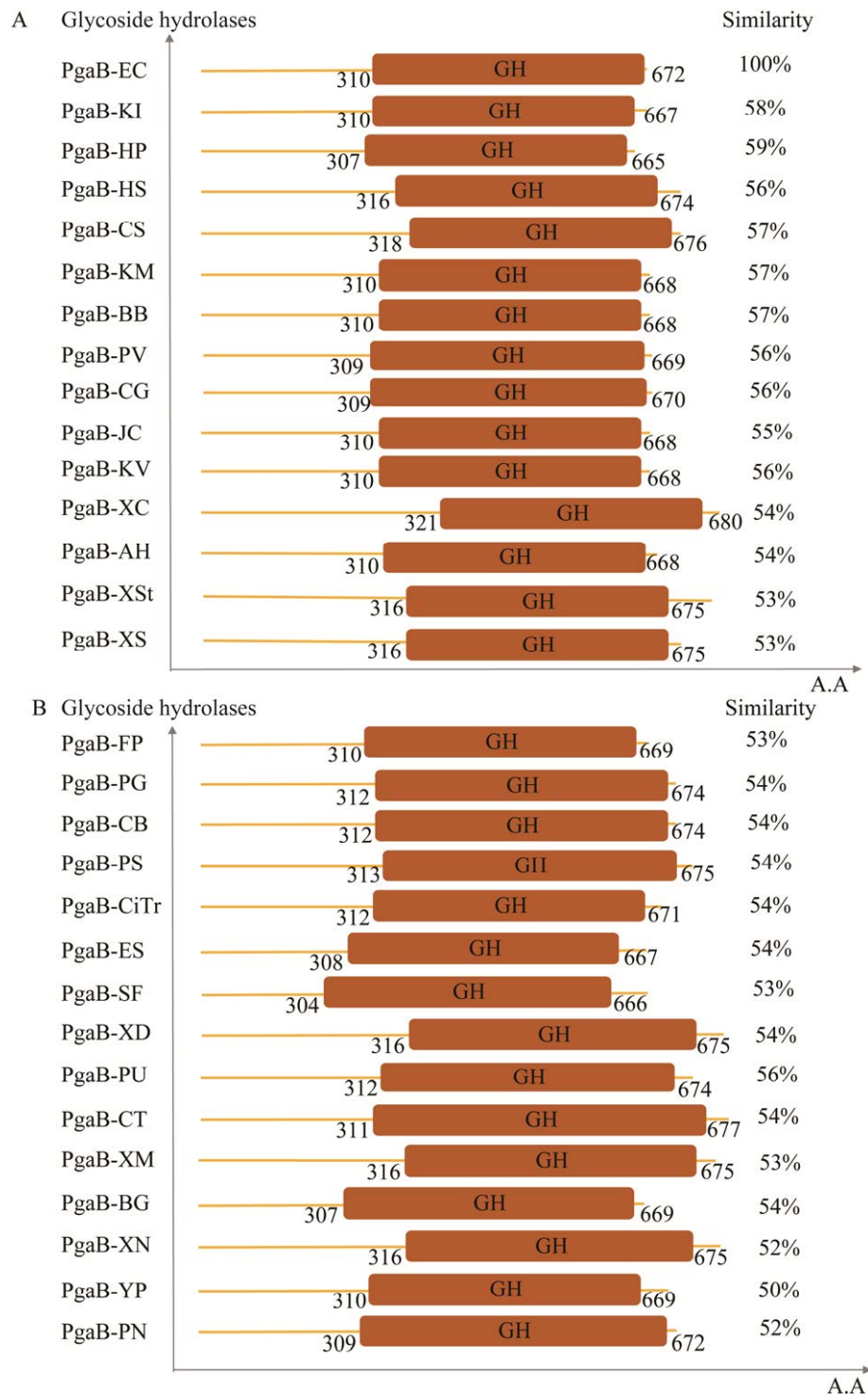


图 11 靶向水解酶 PgaB 功能域分布

Figure 11 Functional domain distribution of targeted hydrolase PgaB. A: Functional domain distribution of PgaB-EC, PgaB-KI, PgaB-HP, PgaB-HS, PgaB-CS, PgaB-KM, PgaB-BB, PgaB-PV, PgaB-CG, PgaB-JC, PgaB-KV, PgaB-XC, PgaB-AH, PgaB-XSt, and PgaB-XS. B: Functional domain distribution of PgaB-FP, PgaB-PG, PgaB-CB, PgaB-PS, PgaB-CiTr, PgaB-ES, PgaB-SF, PgaB-XD, PgaB-PU, PgaB-CT, PgaB-XM, PgaB-BG, PgaB-XN, PgaB-YP, and PgaB-PN.



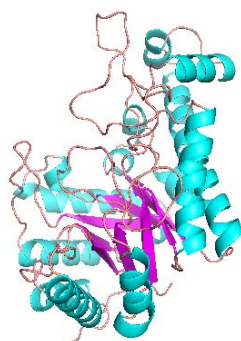


图 12 靶向水解酶 PgaB 同源建模分析(模板 PDB: c4p7nA)

Figure 12 Homology modeling analysis of PgaB (template PDB: c4p7nA).

表 5 靶向水解酶 BcsZ 的理化性质分析

Table 5 Analysis of physicochemical properties of targeted hydrolase BcsZ

Strains	Hydrolase	Amino acids	Molecular weight	pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	GRAVY
<i>Escherichia coli</i> L1_E925	BcsZ-EC	338	38 546.60	8.43	40	42	29.90	-0.565
<i>Trichuris trichiura</i>	BcsZ-TT	338	38 546.60	8.43	40	42	29.90	-0.56
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	BcsZ-CK	338	38 189.38	9.13	34	39	32.57	-0.425
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	BcsZ-CR	338	38 286.15	6.52	39	38	31.28	-0.509
<i>Salmonella arizonae</i> ATCC BAA-731	BcsZ-SA	338	38 330.47	8.99	34	38	30.44	-0.438
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	BcsZ-ST	338	38 357.49	8.80	34	37	31.23	-0.417
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> FGI 57	BcsZ-EB	338	38 085.83	8.47	36	38	24.82	-0.489
<i>Enterobacter</i> sp. BIGb0383	BcsZ-ES	338	38 046.11	7.93	38	39	30.24	-0.392
<i>Trabulsilla guamensis</i> ATCC 49490	BcsZ-TG	337	38 176.13	7.90	40	41	27.88	-0.454
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 102420	BcsZ-PV	338	37 918.91	5.92	39	36	30.16	-0.367
<i>Klebsiella variicola</i>	BcsZ-KV	338	37 986.89	5.58	40	36	37.63	-0.44
<i>Enterobacter lignolyticus</i> SCF1	BcsZ-EL	338	37 760.76	8.78	35	38	32.02	-0.368
<i>Klebsiella grimontii</i>	BcsZ-KG	338	37 694.66	8.45	38	40	26.33	-0.421
<i>Franconibacter pulveris</i>	BcsZ-FP	337	37 679.62	8.77	34	37	29.15	-0.418
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IS43	BcsZ-KP	319	35 614.18	5.53	37	33	35.64	-0.432
<i>Cedecea neteri</i>	BcsZ-CN	338	38 785.85	5.91	42	39	31.07	-0.547
<i>Klebsiella michiganensis</i>	BcsZ-KM	338	38 595.64	6.02	40	37	33.21	-0.486
<i>Jejubacter calystegiae</i>	BcsZ-JC	338	38 638.72	7.97	36	37	34.61	-0.544
<i>Hafnia alvei</i> FB1	BcsZ-HA	343	38 723.89	6.60	36	35	37.41	-0.464
<i>Enterobacillus tribolii</i>	BcsZ-ET	338	37 643.25	5.88	33	30	40.65	-0.421
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI 1043	BcsZ-PA	339	37 968.15	8.50	35	37	38.38	-0.429
<i>Serratia ficaria</i>	BcsZ-Sfi	339	38 112.93	5.60	38	35	38.75	-0.489
<i>Chania multitudinisentens</i> RB-25	BcsZ-CM	339	38 046.06	6.02	33	32	43.43	-0.394
<i>Shimwellia blattae</i> ATCC 29907	BcsZ-SB	338	37 866.86	6.73	32	31	36.22	-0.339
<i>Serratia fonticola</i> AU-P3(3)	BcsZ-SF	339	38 008.03	5.36	35	31	42.93	-0.388
<i>Mangrovibacter</i> sp. MFB070	BcsZ-MS	337	37 816.52	6.15	36	34	39.95	-0.408
<i>Yersinia ruckeri</i>	BcsZ-YR	345	38 551.99	9.46	27	35	42.04	-0.340
<i>Serratia</i> sp. S1B	BcsZ-SS	339	38 351.23	7.23	31	31	33.74	-0.470
<i>Budvicia aquatica</i>	BcsZ-BA	337	37 769.38	4.98	39	30	31.61	-0.418
<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582	BcsZ-SO	337	37 499.40	6.00	36	34	39.57	-0.404
<i>Oceanisphaera psychrotolerans</i>	BcsZ-OP	338	37 554.30	4.72	42	30	44.74	-0.281
<i>Edwardsiella tarda</i>	BcsZ-Eta	340	38 593.20	9.16	29	33	40.18	-0.248
<i>Leminorella grimontii</i> ATCC 33999	BcsZ-LG	339	37 494.26	5.26	40	33	44.68	-0.283
<i>Legionella antarctica</i>	BcsZ-LA	337	38 671.73	6.01	38	32	37.52	-0.493
<i>Pantoea alhagi</i>	BcsZ-Pal	339	37 972.93	6.02	34	31	47.36	-0.385

## 2.5 核心胞外多糖纤维素靶向水解酶生物信息学分析

### 2.5.1 靶向水解酶 BcsZ 理化性质分析

通过序列比对共收集了 35 种 BcsZ 水解酶, 其理化性质如表 5 所示, 水解酶由 319–345 个氨基酸组成, 分子量在 35.61–38.67 kDa 之间, 等电点在 4.76–9.46 之间。BcsZ-SS 整体不带电荷, 15 种 BcsZ 整体带正电, 19 种 BcsZ 整体带负电。BcsZ-ET、BcsZ-CM、BcsZ-SF、BcsZ-YR、BcsZ-OP、BcsZ-Eta、BcsZ-LG 及 BcsZ-Pal 为不稳定蛋白, 其余均为稳定蛋白。35 种 BcsZ 均为亲水性蛋白。

### 2.5.2 靶向水解酶 BcsZ 进化分析

将 35 种 BcsZ 糖苷水解酶氨基酸序列利用 MEGA 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 13), 由图中可以看出, 糖苷水解酶被分为 2 个亚组: Subgroup I 和 Subgroup II。Subgroup I 包含 15 种糖苷水解酶, 分别是 BcsZ-HA、BcsZ-ET、BcsZ-OP、BcsZ-ETa、BcsZ-PAi、BcsZ-BA、BcsZ-LG、BcsZ-LA、BcsZ-PA、BcsZ-YR、BcsZ-SS、BcsZ-SO、BcsZ-CM、BcsZ-SFi 和 BcsZ-SF。Subgroup II 包含 20 种糖苷水解酶, 分别有 BcsZ-EC、BcsZ-TT、BcsZ-CK、BcsZ-CR、BcsZ-SA、BcsZ-ST、BcsZ-ES、BcsZ-PV、BcsZ-EB、BcsZ-TG、BcsZ-EL、BcsZ-KG、BcsZ-KP、BcsZ-KV、BcsZ-FP、BcsZ-CN、BcsZ-KM、BcsZ-MS、

BcsZ-JC 和 BcsZ-SB。所筛选的糖苷水解酶 BcsZ 来源菌株分布范围较广, 说明该类糖苷水解酶存在于很多菌种中。

### 2.5.3 靶向水解酶 BcsZ 功能域分析及结构预测

NCBI 网址对 35 种 BcsZ 结构域进行分析(图 14), 结果显示这 35 种蛋白都是 six-hairpin glycosidase superfamily 中 glycosyl hydrolases family 8 的成员, 是具有内 1,4 葡聚糖酶活性的周脂蛋白, 这些水解酶通过水解纤维素中的  $\beta$ -1,4 糖苷键减少纤维素的合成。35 种 BcsZ 的同源建模结果显示 35 种 BcsZ 模板相同, 使用 Pymol 软件对筛选的所有 BcsZ 靶向水解酶同源建模的 PDB 模板进行分析(图 15), 同样发现来自不同菌株靶向纤维素的水解酶结构高度相似。

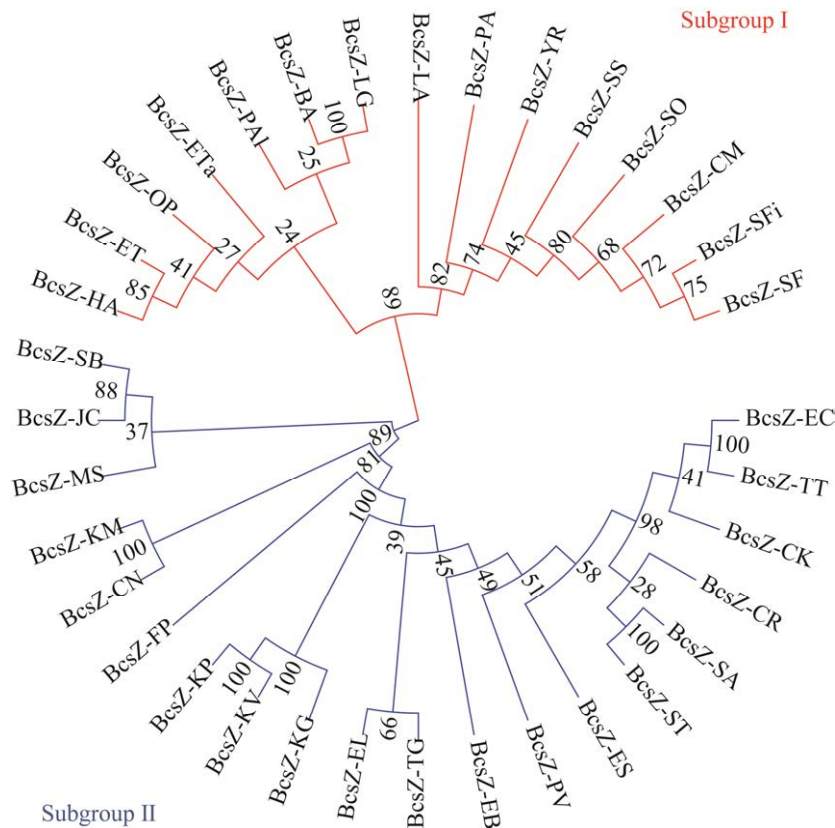


图 13 水解酶 BcsZ 遗传进化树分析

Figure 13 Genetic evolution tree analysis of BcsZ.

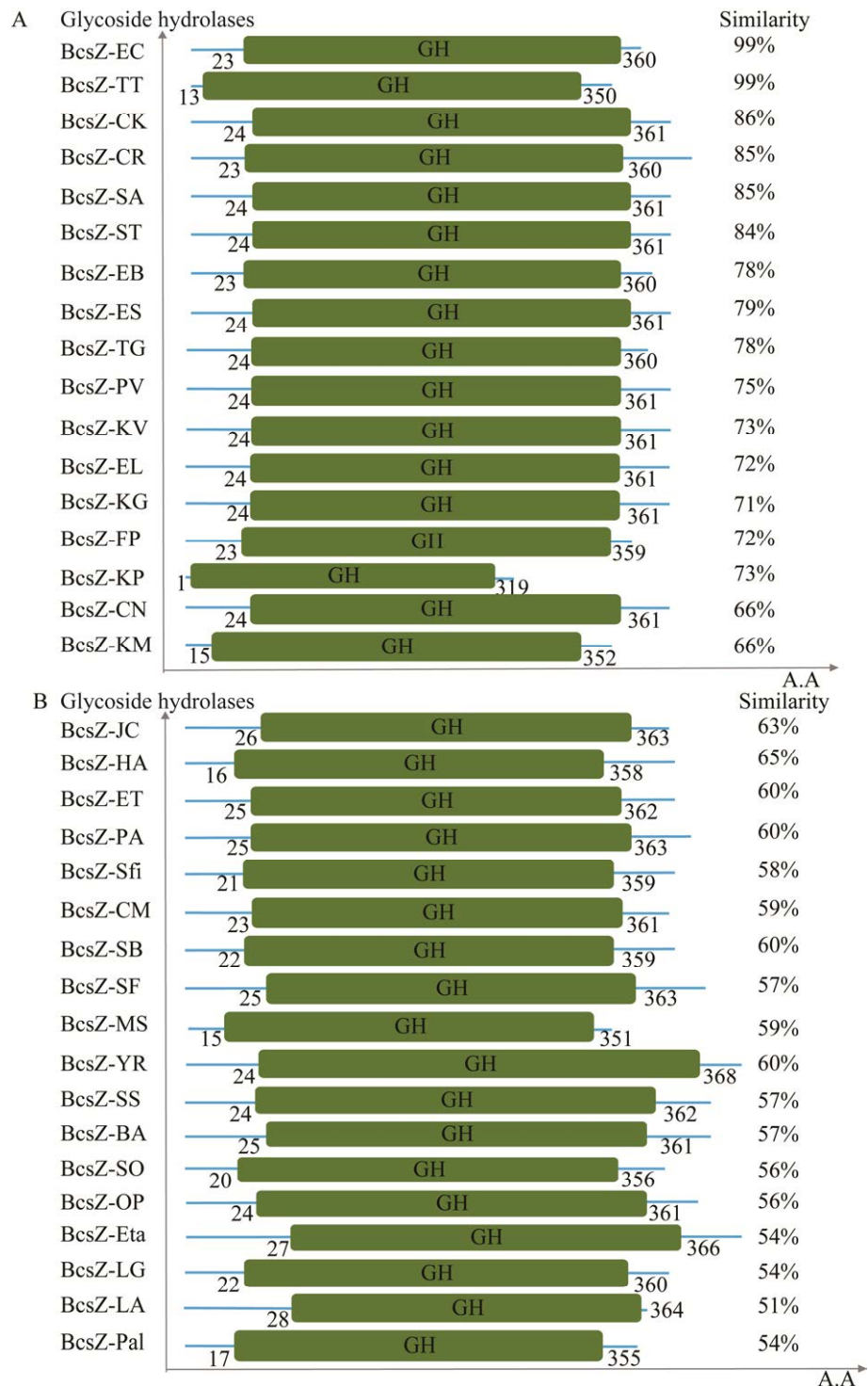


图 14 靶向水解酶 BcsZ 功能域分布

Figure 14 Functional domain distribution of targeted hydrolase BcsZ. A: Functional domain distribution of BcsZ-EC, BcsZ-TT, BcsZ-CK, BcsZ-CR, BcsZ-SA, BcsZ-ST, BcsZ-EB, BcsZ-ES, BcsZ-TG, BcsZ-PV, BcsZ-KV, BcsZ-EL, BcsZ-KG, BcsZ-FP, BcsZ-KP, BcsZ-CN, and BcsZ-KM. B: Functional domain distribution of BcsZ-JC, BcsZ-HA, BcsZ-ET, BcsZ-PA, BcsZ-Sfi, BcsZ-CM, BcsZ-SB, BcsZ-SF, BcsZ-MS, BcsZ-YR, BcsZ-SS, BcsZ-BA, BcsZ-SO, BcsZ-OP, BcsZ-Eta, BcsZ-LG, BcsZ-LA, and BcsZ-Pal.

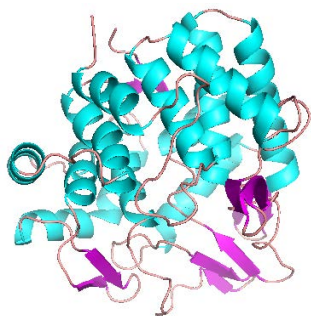


图 15 靶向水解酶 BcsZ 同源建模分析(模板 PDB: c3qxqD)

Figure 15 Homology modeling analysis of BcsZ (template PDB: c3qxqD).

### 3 讨论与结论

酶制剂具有高度的专一性,将其应用于细菌生物被膜中核心胞外多糖的清除,能够从根本上靶向破坏生物被膜的主要构成,实现细菌生物被膜的精准控制,且具备绿色、安全、无污染的优势<sup>[10]</sup>。本研究共筛选获得了 153 种靶向生物被膜核心胞外多糖 Pel、Psl、Alg、PNAG 及纤维素的水解酶,所筛选的水解酶分别属于糖苷水解酶 114 家族(glycoside-hydrolase family GH114)、糖苷水解酶超家族(glyco\_hydro super family)、褐藻胶裂解酶超家族(AlgLyase superfamily)、糖苷水解酶 13 家族(glycoside-hydrolase family GH13)、糖苷水解酶 8 家族(glycosyl hydrolases family GH8)。靶向 Pel、Psl、Alg、PNAG 和纤维素的水解酶分别有 30、25、33、30 和 35 种,分别对所筛选的靶向水解酶的理化性质、功能结构域和系统发育进化进行分析比较,提供了迄今为止最为全面的生物被膜核心胞外多糖水解酶序列组成及生物信息。

本研究对 5 种糖苷水解酶的等电点、稳定性及亲/疏水性进行分析,来自不同菌株的同种水解酶理化性质之间仍存在一定的差异,本研究的数据不仅能够为此类水解酶的重组表达与纯化

提供数据参考,而且能够为这些水解酶的应用条件提供可靠的数据基础。卫东等<sup>[34]</sup>在对糖苷水解酶 SSU05\_1921 和 SSU05\_1922 功能研究中,在 15 ku 处出现单一条带,从而表明了二者的联合作用。水解酶 PslG 分子量在 42.27–53.71 kDa 之间,姜羽等<sup>[35]</sup>成功表达出水解酶 PslG 后,根据分子量选择了 30 kDa 的超滤浓缩管对水解酶进一步纯化浓缩。等电点对水解酶的制备与应用至关重要,水解酶 PelAh 等电点分别在 4.63–6.51 范围内,可见该类水解酶适用于碱性或中性条件下的应用,因此, Baker 等<sup>[21]</sup>在制备该水解酶时选用了碱性缓冲液(pH 7.5)。PgaB 水解酶等电点在 4.77–6.69 之间, Little 等<sup>[16]</sup>选用了中性缓冲液(pH 7.0)进行酶与底物的反应实验。在制备水解酶过程中,调整适宜的条件能保证水解酶的工业化应用。冯杰等<sup>[36]</sup> $\beta$ -葡聚糖酶 F32EG5 进行糖基化修饰,结果表明经修饰过的  $\beta$ -葡聚糖酶对超高温环境耐受性增强,有利于酶制剂生产过程中酶活性的保留。马锐等<sup>[37]</sup>优化诱导菌株产酶条件,得到了浓度更高的木聚糖酶和葡聚糖酶并保留了更强的酶活性。

运用 MEGA 软件分别对 5 种糖苷水解酶氨基酸序列进行系统发育进化分析,得到水解酶氨基酸序列的进化树,该研究可以比较精确地确定到微生物的进化地位<sup>[38-39]</sup>。相似的功能与较为相近的亲缘关系可能存在一定的关联<sup>[40]</sup>,结合水解酶的功能域和进化树结果,可以更严谨地确认水解酶的靶向作用。

本研究使用 NCBI 对水解酶的结构域进行分析,发现所筛选的 PelAN 均位于整个蛋白的 N 端,是一种内切  $\alpha$ -1,4-半乳糖胺酶,能够水解 Pel 中 1,4 连接的 N-乙酰-D-半乳糖,蛋白 C 端还存在一个去乙酰化酶活性的结构域,是具有双结构域的蛋白<sup>[28]</sup>,致病性烟曲霉胞外多糖 GAG 与 Pel 具有相似的结构,研究发现 PelAN 对 GAG 也表

现出了水解活性<sup>[4]</sup>,说明所筛选的靶向水解酶具有广泛的应用场景。本研究所筛选的 PslG、AlgL 和 BcsZ 水解酶均为单结构域蛋白,最新相关研究发现野生型铜绿假单胞菌 PAO1 中 PslG 主要分布在细胞膜内,当 PslG 单独过表达时,更多的 PslG 定位于周质使 Psl 产量下降,说明了处于内膜里的 PslG 有助于 Psl 聚合物的合成,而 PslG 在周质中可以降解 Psl 聚合物<sup>[41]</sup>。AlgL 是一种游离的周质蛋白,通过  $\beta$ -消除机制( $\beta$ -eliminate),作用于单体间的 1-4 糖苷键,随着糖苷键的消除,产物末端六元环 C<sub>4</sub> 和 C<sub>5</sub> 位会生成不饱和双键,底物的非还原性末端也会生成不饱和糖醛酸,从而使得褐藻胶降解成一系列长短不一的寡糖片段<sup>[42]</sup>。PgaB 是一种双结构域的质周蛋白,包含一个 N 端去乙酰化酶结构域和一个 C 端 PNAG 结合结构域<sup>[43]</sup>,研究发现,PgaB 的 C 端结构域 1.76 Å 处显示了一个在表面凹槽中的中心腔,具有识别糖基的活性<sup>[16]</sup>。在革兰氏阴性菌中,纤维素酶复合体至少由 4 个亚基组成,其中 3 个亚基负责多糖的合成和转运,第 4 个亚基 BcsZ 具有水解酶活性,有研究表明 BcsZ 是桶折叠结构,并仅通过催化中心非还原侧高度保守的残基与纤维戊糖的 4 个葡聚糖基团结合<sup>[24]</sup>。

综上所述,本研究共筛选了分别靶向生物被膜核心胞外多糖 Pel、Psl、褐藻胶、PNAG 和纤维素的 153 条水解酶氨基酸序列,并对所筛选水解酶的理化性质、结构功能域和系统发育进化进行系统的归纳分析,结果表明这些水解酶具备靶向瓦解生物被膜核心胞外多糖的潜力,亟待进一步开发与应用,为生物被膜的精准预防和靶向控制奠定扎实的数据基础。

## 参考文献

- [1] CHANG HH, COHEN T, GRAD YH, HANAGE WP, O'BRIEN TF, LIPSITCH M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(1): 101-116.
- [2] World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics[R]. Geneva: WHO Press, 2017: 1-7.
- [3] HALL CW, MAH TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(3): 276-301.
- [4] SNARR BD, BAKER P, BAMFORD NC, SATO Y, LIU H, LEHOUX M, GRAVELAT FN, OSTAPSKA H, BAISTROCCHI SR, CERONE RP, FILLER EE, PARSEK MR, FILLER SG, HOWELL PL, SHEPPARD DC. Microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents with cross-kingdom activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(27): 7124.
- [5] SZYMA M, KARAKULSKA J, SOBOLEWSKI P, KOWALSKA U, GRYGORCEWICZ B, BOTTCHER D, BORNSCHEUER UT, DROZD R. Glycoside hydrolase (PelAh) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 246: 116625.
- [6] FLEMING D, NIESE B, REDMAN W, VANDERPOOL E, GORDON V, RUMBAUGH KP. Contribution of *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides pel and psl to wound infections[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 835754.
- [7] COLVIN KM, GORDON VD, MURAKAMI K, BORLEE BR, WOZNIAC DJ, WONG GC, PARSEK MR. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(1): e1001264.
- [8] BILLINGS N, MILLAN M, CALDARA M, RUSCONI R, TARASOVA Y, STOCKER R, RIBBECK K. The extracellular matrix component psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(8): e1003526.
- [9] MISHRA M, BYRD MS, SERGEANT S, AZAD AK, PARSEK MR, MCPHAIL L, SCHLESINGER LS, WOZNIAC DJ. *Pseudomonas aeruginosa* psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization[J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(1): 95-106.
- [10] 吴倩, 张昭寰, 童金蓉, 黄振华, 刘静, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇. 酶制剂清除食源性致病菌生物被膜的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2366-2378. WU Q, ZHANG ZH, TONG JR, HUANG ZH, LIU J, LIU HQ, PAN YJ, ZHAO Y. Enzyme-based targeted

- disintegration of biofilms formed by food-borne pathogens: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2366-2378 (in Chinese).
- [11] COLVIN KM, IRIE Y, TART CS, URBANO R, WHITNEY JC, RYDER C, HOWELL PL, WOZNIAC DJ, PARSEK MR. The *pel* and *psl* polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(8): 1913-1928.
- [12] JENNINGS LK, STOREK KM, LEDVINA HE, COULON C, MARMONT LS, SADOVSKAYA I, SECOR PR, TSENG BS, SCIAN M, FILLOUX A, WOZNIAC DJ, HOWELL PL, PARSEK MR. *Pel* is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): 11353-11358.
- [13] BYRD MS, SADOVSKAYA I, VINOGRADOV E, LU H, SPRINKLE AB, RICHARDSON SH, MA L, RALSTON B, PARSEK MR, ANDERSON EM, LAM JS, WOZNIAC DJ. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* *psl* exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in *psl* and LPS production[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(4): 622-638.
- [14] MA LY, WANG SW, WANG D, PARSEK MR, WOZNIAC DJ. The roles of biofilm matrix polysaccharide *psl* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 65(2): 377-380.
- [15] WANG Y, MORADALI MF, GOUDARZTALEJERDI A, SIMS IM, REHM BH. Biological function of a polysaccharide degrading enzyme in the periplasm[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31249.
- [16] LITTLE DJ, PFOH R, LE MAUFF F, BAMFORD NC, NOTTE C, BAKER P, GURAGAIN M, ROBINSON H, PIER GB, NITZ M, DEORA R, SHEPPARD DC, HOWELL PL. *PgaB* orthologues contain a glycoside hydrolase domain that cleaves deacetylated poly- $\beta$ (1,6)-N-acetylglucosamine and can disrupt bacterial biofilms[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(4): e1006998.
- [17] CHEN KM, CHIANG MK, WANG M. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2014, 77: 89-99.
- [18] GRANTCHAROVA N, PETERS V, MONTEIRO C, ZAKIKHANY K, RÖMLING U. Bistable expression of *CsgD* in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2): 456-466.
- [19] LAMPPA JW, GRISWOLD KE. Alginate lyase exhibits catalysis-independent biofilm dispersion and antibiotic synergy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(1): 137-145.
- [20] YU S, SU T, WU H, LIU S, WANG D, ZHAO T, JIN Z, DU W, ZHU MJ, CHUA SL, YANG L, ZHU D, GU L, MA LZ. *PslG*, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix[J]. *Cell Research*, 2015, 25(12): 1352-1367.
- [21] BAKER P, HILL PJ, SNARR BD, ALNABELSEYA N, PESTRAK MJ, LEE MJ, JENNINGS LK, TAM J, MELNYK RA, PARSEK MR, SHEPPARD DC, WOZNIAC DJ, HOWELL PL. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Science Advances*, 2016, 2(5): e1501632.
- [22] GAWANDE PV, CLINTON AP, LOVETRI K, YAKANDAWALA N, RUMBAUGH KP, MADHYASTHA S. Antibiofilm efficacy of DispersinB<sup>®</sup> wound spray used in combination with a silver wound dressing[J]. *Microbiology Insights*, 2014, 7: 9-13.
- [23] KÖSEOĞLU VK, HEISS C, AZADI P, TOPCHIY E, GÜVENER ZT, LEHMANN TE, MILLER KW, GOMELSKY M. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(4): 728-743.
- [24] MAZUR O, ZIMMER J. Apo- and cellopentaose-bound structures of the bacterial cellulose synthase subunit *BcsZ*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(20): 17601-17606.
- [25] WANG X, PRESTON JF, ROMEO T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(9): 2724-2734.
- [26] BAKKEVIG K, SLETTA H, GIMMESTAD M, AUNE R, ERTESVG H. Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (*algI*) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(24): 8375-8384.
- [27] SPIERS AJ, BOHANNON J, GEHRIG SM, RAINEY PB. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(1): 15-27.
- [28] 吴倩, 张昭寰, 黄振华, 刘静, 潘迎捷, 赵勇. 三种常见假单胞菌 *Pel* 胞外多糖转运系统相关蛋白 *PelA-G* 的生物信息学比较分析. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(Z3): 3115-3123.
- WU Q, ZHANG ZH, HUANG ZH, LIU J, PAN YJ, ZHAO Y. Bioinformatics comparative analysis of proteins *PelA-G* associated with exopolysaccharide

- transport system in three common *Pseudomonas*[J]. Genomics and Applied Genomics and Applied Biology, 2021, 40(Z3): 3115-3123 (in Chinese).
- [29] VIDOVA B, SRAMKOVA Z, TISAKOVA L, ORAVKINOVA M, GODANY A. Bioinformatics analysis of bacteriophage and prophage endolysin domains[J]. Biologia, 2014, 69(5): 541-556.
- [30] 童金蓉, 张昭寰, 黄振华, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇. 副溶血性弧菌脂蛋白定位系统转运蛋白结构与功能的生物信息学分析[J]. 微生物学报, 2020, 60(10): 2242-2252.
- TONG JR, ZHANG ZH, HUANG ZH, LIU HQ, PAN YJ, ZHAO Y. Bioinformatics analysis for structure and function of localization of lipoprotein system transporters in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(10): 2242-2252 (in Chinese).
- [31] LOW KE, HOWELL PL. Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 53: 32-44.
- [32] BAKER P, WHITFIELD GB, HILL PJ, LITTLE DJ, PESTRAK MJ, ROBINSON H, WOZNIAK DJ, HOWELL PL. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG reveals that its levels are critical for psl polysaccharide biosynthesis and biofilm formation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(47): 28374-28387.
- [33] FARRELL EK, TIPTON PA. Functional characterization of AlgL, an alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochemistry, 2012, 51(51): 10259-10266.
- [34] 卫东, 高广娟, 武柳君, 朱金鲁, 刘思国, 刘冉, 张跃灵. 猪链球菌 2 型 05ZYH33 糖苷水解酶 SSU05\_1921 和 SSU05\_1922 的表达纯化及功能研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022(3): 269-276.
- WEI D, GAO GJ, WU LJ, ZHU JL, LIU SG, LIU R, ZHANG YL. Expression, purification and functional study of glycoside hydrolases SSU05\_1921 and SSU05\_1922 from *Streptococcus suis* 05ZYH33[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022(3): 269-276 (in Chinese).
- [35] 姜羽, 黄星宇, 白利平. 靶向革兰氏阴性菌生物膜的糖苷水解酶挖掘及功能研究[J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(4): 289-296.
- JIANG Y, HUANG XY, BAI LP. Mining and functional study of glycoside hydrolases against biofilms of Gram-negative bacteria[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2021, 16(4): 289-296 (in Chinese).
- [36] 冯杰, Hamed IHamouda, Nasir Ali, 王雨铭, 张培玉, 吕明. 嗜热厌氧菌 *Caldicellulosiruptor* sp. F32 中降解  $\beta$ -1,3-1,4 葡聚糖水解酶的协同性分析及糖基化对 F32EG5 热稳定性影响[J]. 微生物学报, 2019(11): 2144-2154.
- FENG J, IHAMOUDA H, ALI N, WANG YM, ZHANG PY, LÜ M.  $\beta$ -glucan degrading hydrolases from *Caldicellulosiruptor* sp. F32 and influence of glycosylation on F32EG5 thermostability[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019(11): 2144-2154 (in Chinese).
- [37] 马锐, 柏映国, 罗会颖. 嗜酸真菌 *Bispora* sp. MEY-1 酸性糖苷水解酶的产酶优化及在动物饲料中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2014(3): 47-52.
- MA R, BAI YG, LUO HY. Production of multiple acidic glycoside hydrolases in acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1 and their potential application in animal feed[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2014(3): 47-52 (in Chinese).
- [38] 胡彦婷, 安丽康, 尹淑丽, 程辉彩, 张根伟, 张丽萍, 刘洪伟. 推定第四类羊毛硫素合成酶生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2464-2472.
- HU YT, AN LK, YIN SL, CHENG HC, ZHANG GW, ZHANG LP, LIU HW. Bioinformatics to predict type IV lanthipeptide synthetases[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2464-2472 (in Chinese).
- [39] 李宁, 王柏柯, 杨生保, 唐亚萍, 王强, 杨涛, 帕提古丽, 余庆辉. 21 种植物八氢番茄红素合成酶的生物信息学分析[J]. 新疆农业科学, 2015(12): 2157-2165.
- LI N, WANG BK, YANG SB, TANG YP, WANG Q, YANG T, PA TGL, YU QH. Bioinformatics analysis of PSY in 21 plant species[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015(12): 2157-2165 (in Chinese).
- [40] SS A, SK A, RC B. Optimal immobilization of *Trichoderma asperellum* laccase on polymer coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles for enhanced biohydrogen production from delignified lignocellulosic biomass[J]. ScienceDirect. Fuel, 2020, 273: 117777.
- [41] WU H, WANG D, TANG M, MA LZ. The advance of assembly of exopolysaccharide psl biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(10): e857.
- [42] 栾明鉴, 何熹, 林荣芳, 姚艳艳, 赵祥忠. 褐藻胶裂解酶研究进展[J]. 食品工业, 2021(8): 214-217.
- LUAN MJ, HE X, LIN RF, YAO YY, ZHAO XZ. Research progress of alginate lyase[J]. The Food Industry, 2021(8): 214-217 (in Chinese).
- [43] LITTLE DJ, MILEK S, BAMFORD NC, GANGULY T, DIFRANCESCO BR, NITZ M, DEORA R, HOWELL PL. The protein BpsB is a poly- $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine deacetylase required for biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(37): 22827-22840.