

印尼热泉菌产热稳定褐藻胶裂解酶的 酶学性质研究*

高 杨¹ 李 江^{2①} 宋益民¹

(1. 青岛科技大学 青岛 266042; 2. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

摘要 以印尼热泉菌为材料, 采用以褐藻酸钠为唯一碳源的培养基筛选产褐藻胶裂解酶的菌株, 通过 16S rDNA 序列对产酶菌株进行种属鉴定, 并通过硫酸铵沉淀、离子交换层析和凝胶过滤层析从高产酶菌株 Aly-B5 发酵液上清中纯化获得褐藻胶裂解酶, 并对该酶的酶学性质进行了研究。结果表明: 高产酶菌株经鉴定为 *Bacillus* 属; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)显示纯化的褐藻胶裂解酶 Aly-B5 分子量为 45kDa, 该酶最适作用温度为 65°C, 75°C 时的半衰期为 110min, 最适 pH 为 7.0; Zn²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺对酶活具有明显的抑制作用, 但该酶对乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)并不敏感; 同时, 底物特异性实验表明 Aly-B5 是一种偏好降解聚古罗糖醛酸(polyG)的双功能裂解酶, 降解产物主要是二糖。该酶优良的耐热性使其在海藻高值化利用领域具有潜在的应用前景。

关键词 印尼热泉菌; 褐藻胶裂解酶; 酶学性质; 热稳定性

中图分类号 TS201.3 **doi:** 10.11693/hyhz20170800213

褐藻胶是一种由 α -L-古罗糖醛酸(G)和其 C5 差向异构体 β -D-甘露糖醛酸(M)随机组合形成的线性高分子聚合物(徐凡等, 2017)。因其螯合金属离子、黏性高、原料成本低、功能活性多等优点被广泛应用于食品、医药、纺织、化工、饲料等行业(李云涛等, 2017)。而褐藻胶寡糖因分子量小、溶解度高且具有抗肿瘤、降血糖血脂、抗凝血、抗炎症、增强免疫等多种活性, 可作为糖尿病、肥胖症、消化性溃疡、免疫力低下患者的疗效食品(祝玲等, 2006), 因而具有更加广阔的应用前景。

褐藻胶寡糖的制备方式主要有三种(邵宏博等, 2015), 包括化学法、物理法和酶解法。其中化学法操作步骤繁琐, 需使用大量化学试剂, 易腐蚀设备, 污染环境; 物理法制备的褐藻胶寡糖产量低, 难以达到工业化生产的要求; 而酶解法因其具有反应条件温和、底物专一性强、产量高、副产物少、环境友好等

优点, 成为目前制备褐藻胶寡糖的主要方法。

褐藻胶裂解酶主要通过 β 消除作用催化降解褐藻胶, 切割位点在单体间的(1 \rightarrow 4)-O-糖苷键, 于六元环上的 C4 与 C5 之间形成双键, 使 4-O-糖苷键被消除, 褐藻胶被降解, 同时在非还原性末端产生 4-脱氧-L-异丙基-4-烯醇式吡喃糖醛酸。根据褐藻胶裂解酶降解底物的专一性, 可以将褐藻胶裂解酶分为三类: 专一裂解甘露糖醛酸均聚体(poly M)的裂解酶, 如铜绿假单胞菌 E03 产生的褐藻胶裂解酶(Zhu *et al*, 2015); 专一裂解古罗糖醛酸均聚体(poly G)的裂解酶, 如由 *Streptomyces* sp. ALG-5 产生的褐藻胶裂解酶(Kim *et al*, 2009); 以及可以同时裂解甘露糖醛酸和古罗糖醛酸异聚体(poly M/G)的裂解酶, 又被称为双功能褐藻胶裂解酶, 如来自假交替单胞菌 CY24 的褐藻胶裂解酶(Duan *et al*, 2009)。褐藻胶裂解酶作用位点及作用方式见图 1。

* 海洋公益性行业科研专项经费, 201505026-4 号; 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放基金, MBSMAT-2015-06 号。高 杨, 硕士研究生, E-mail: 1079021584@qq.com

通讯作者: 李 江, 硕士生导师, 副研究员, E-mail: lijiaang@fio.org.cn

收稿日期: 2017-08-28, 收修改稿日期: 2018-03-16

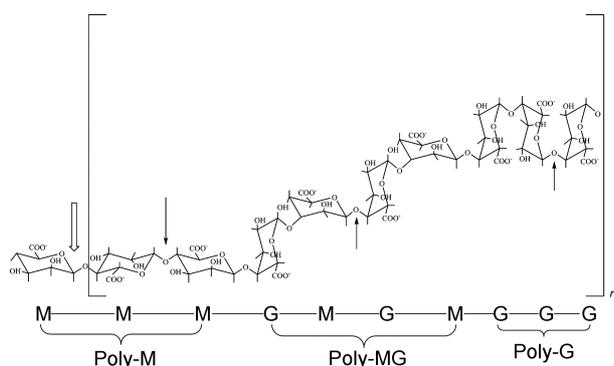


图1 褐藻胶裂解酶酶切位点及作用方式图(罗丹丹等, 2016)

Fig.1 The degradation position and the action of alginate lyase in alginate acid

褐藻胶裂解酶具有十分广泛的生物来源, 如细菌(Li *et al.*, 2011)、真菌(Singh *et al.*, 2011)、海洋腹足类软体动物(Rahman *et al.*, 2011)、土壤微生物(高王宇等, 2017)等, 其中细菌是褐藻胶裂解酶的最主要来源。不同来源的褐藻胶裂解酶分子量差异较大, 根据分子量的不同, 可以将其大致分为三类(Miyake *et al.*, 2004): 第一类分子量在 20—35kDa 之间; 第二类分子量约为 40kDa; 第三类分子量约为 60kDa。另外, 依据酶的初级结构, 碳水化合物酶数据库(CAZy)将多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL)分为 27 个家族, 褐藻胶裂解酶被划分在 PL-5、PL-6、PL-7、PL-14、PL-15、PL-17 和 PL-18 等 7 个家族中, 其中 poly M 型褐藻胶裂解酶主要分布在 PL-5 家族中, poly G 型褐藻胶裂解酶主要分布在 PL-7 家族中(李丽妍等, 2011)。作为生产褐藻寡糖的重要工具酶, 尽管其来源广泛, 种类繁多, 但现有的褐藻胶裂解酶普遍存在的酶活较低以及对生产条件要求苛刻等问题, 成为了制约褐藻胶利用和转化的关键因素。因此, 发掘反应温度高、热稳定性好的新酶仍具有重要意义。

温泉是发掘生物催化剂最具吸引力的资源之一, 生存于温泉中的微生物由于能够产生多种热稳定性高、有机溶剂和变性剂耐受强的酶类, 成为近年来微生物行业研究的热点。高温能够改善底物及产物溶解性, 减少杂菌污染, 降低染菌风险, 有利于产物的富集、回收; 同时加速反应进程, 减少反应时间, 提高产物转化率, 缓解物质与反应器的贴壁效应, 降低生产成本, 有望在食品、医疗、饲料、废弃物处理等领域替代传统常温酶。本文从印度尼西亚的热泉样品中筛选获得一株高产褐藻胶裂解酶的菌株, 并对该菌

产生的褐藻胶裂解酶的酶学性质进行初步研究以期开发获得新型热稳定的褐藻胶裂解酶。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株 产褐藻胶酶的菌株分离自印度尼西亚卡利安达岛东海岸的热泉样品(5°44'46"N, 105° 35'12"E), 纯化菌株现保存于国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室菌种库中(-80°C)。

1.1.2 培养基 LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, 1000mL 蒸馏水配制;

固体平板培养基: 蛋白胨 5g, 酵母粉 1g, 琼脂 10g, 海藻酸钠 10g, 1000mL 蒸馏水配制;

分离培养基: 蛋白胨 5g, 酵母粉 1g, 琼脂 10g, 褐藻酸钠 10g, 氯化钙 5g, 1000mL 蒸馏水配制;

液体发酵培养基: 蛋白胨 5g, 酵母粉 1g, 褐藻酸钠 5g, 1000mL 蒸馏水配制;

富集培养基: 褐藻酸钠 10g, 蛋白胨 5g, K₂HPO₄·3H₂O 2g, FeSO₄·7H₂O 0.1g, MgSO₄·7H₂O 1g, NaCl 30g, 1000mL 蒸馏水配制。

1.1.3 仪器与试剂 蛋白胨、酵母粉(Oxoid 公司); 褐藻酸钠(国药集团上海化学试剂有限公司); 3, 5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、氢氧化钠、苯酚、亚硫酸氢钠和氯化钙等均为分析纯。

紫外分光光度计(上海尤尼柯公司); 台式冷冻离心机(德国赛默飞世尔公司); 数显恒温水浴锅(常州丹瑞实验仪器公司); 恒温振荡培养箱(北京东联哈尔有限公司); 高压蒸汽灭菌器(日本三洋电器集团); 数显黏度计(上海邦西仪器科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 平板初筛 将富集培养的印尼热泉菌接种到筛选平板上, 55°C 培养 2d, 对降解圈明显的菌落分离纯化后甘油保种至-80°C 超低温保存箱。

1.2.2 摇瓶复筛 初筛具有酶活的菌株按 2% 的接种量接入到装有 50mL 液体发酵培养基的 150mL 的锥形瓶中, 55°C、120r/min 培养 42h, 在 4°C、7500r/min 条件下离心 20min 后取上清, 即为粗酶液。通过测定粗酶的酶活, 获得高产酶菌株。

1.2.3 褐藻胶裂解酶产生菌的 16S rDNA 鉴定 以产酶菌株基因组 DNA 为模板, 利用通用引物 27F 和 1492R (Ludwig, 2007)对产酶菌株进行 PCR 扩增, 扩增产物委托青岛擎科梓熙生物有限公司进行测序拼接。测序结果通过 BLAST 进行分析比对。

1.2.4 酶活的测定 酶活测定采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS)比色法(赵凯等, 2008)。取 1mL 酶液, 与 1mL 0.3% 的褐藻酸钠在 65°C、pH7.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中反应 15min 后, 通过测定反应体系中还原糖的含量来计算酶活。1 个酶活力单位(U)定义为 1mL 酶液在 65°C 和 pH 为 7 的条件下, 1min 内催化褐藻酸钠产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量。

1.2.5 酶的分离纯化 取 1L Aly-B5 菌株的发酵液在 4°C、7500r/min 条件下离心 20min, 制成粗酶液。粗酶液在冰浴中逐渐加入研磨均匀的硫酸铵至 80% 饱和度, 将含硫酸铵的粗酶液离心后收集沉淀, 取适量的磷酸缓冲液(20mmol/L pH7.0)溶解后透析除盐 36h。除盐后的酶液手动上样至 DEAE-Sepharose FF 柱(2.6cm \times 30cm), 用含 0—0.5mol/L NaCl 的磷酸缓冲液(20mmol/L pH7.0), 以流速为 1.5mL/min 进行线性梯度洗脱。测定每管洗脱液在 280nm 下的紫外吸光值, 并采用 DNS 法测定洗脱液的褐藻胶裂解酶酶活。将高酶活洗脱液合并后进行 Sephadex G-100 (1.6cm \times 30cm)层析柱纯化, 用 20mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)以 0.3mL/min 的流速进行洗脱, 收集并合并酶活高的洗脱液, 浓缩、去离子水透析 36h 后, 真空冷冻浓缩, 保存在 4°C, 用于后续酶学性质研究。

1.2.6 酶学性质分析 (1) 最适作用温度和热稳定性 取 100 μ L 酶液加入到 900 μ L 含 0.3% 褐藻酸钠的磷酸缓冲液(20mmol/L pH7.0)中, 分别置于不同温度条件(45、50、55、60、65、70、80°C)下反应 15min, DNS 法测定酶活力, 以确定其最适反应温度。为研究该酶的热稳定性, 将酶液分别置于 55、65 和 75°C 下保存 180min, 每隔 30min 测定酶活。以初始酶活为 100%。

(2) 最适 pH 及 pH 稳定性 分别用不同的缓冲液体系(pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0)配制 0.3% 的褐藻酸钠底物, 加入 100 μ L 酶液, 在 65°C 条件下反应 15min, 测定酶活力, 以确定其

pH 适应范围。为研究该酶的酸碱稳定性, 取 100 μ L 酶液分别加入到不同 pH 值(pH 分别为 5.0、7.0、9.0)的底物中, 在 65°C 条件下静置 180min, 每隔 30min 测定酶活力。以初始酶活为 100%。

(3) 金属离子对酶活的影响 分别向反应体系中加入终浓度为 10mmol/L 的金属离子(KCl、NaCl、ZnCl₂、MgCl₂、CaCl₂、FeSO₄)和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液, 于 pH7.0、65°C 条件下反应 15min, 反应结束后测定酶活, 以研究金属离子对酶活的影响。以未添加金属离子的酶活为 100%。

(4) 底物特异性分析 分别向 900 μ L 含 0.3% 聚甘露糖醛酸、0.3% 聚古罗糖醛酸和 0.3% 褐藻酸钠的底物中加入 100 μ L 酶液, 置于 65°C 条件下反应 15min。DNS 法测定 Aly-B5 对两种底物的酶活, 以确定其底物特异性。

(5) 酶解产物分析 分别向 900 μ L 含 0.3% 聚甘露糖醛酸、0.3% 聚古罗糖醛酸的和 0.3% 褐藻酸钠的底物中加入 100 μ L 酶液, 置于 65°C 条件下反应, 对不同反应时间(15min、30min、45min、1h、2h、3h、7h、12h)的酶解产物进行薄层层析分析(Li *et al*, 2011)和黏度测量, 并对反应 12h 的产物进行质谱分析, 以确定其酶解产物的种类和类型。质谱分析(MS)采用 6320 型离子阱质谱仪, 分析前须将酶解产物经 Amicon 的超滤管(Ultra15, 5kDa)浓缩和纯化, 分析条件为: 电喷雾(ESI)离子源(美国 Agilent 公司), 毛细管电压 1.8kV, 干燥气流速 4L/min, 干燥气温度 325°C, 质量扫描范围 m/z 300—700。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

经过初筛和复筛, 获得 12 株具有褐藻胶裂解酶酶活的菌株, 产酶菌株的筛选及鉴定结果见表 1。选择酶活最高的 Aly-B5 作为进一步研究的目标菌株。

表 1 印尼热泉样品中具有褐藻胶酶活性菌株统计结果
Tab.1 Screening of thermophilic strains having alginate lyase production activity

序号	菌株编号	种属鉴定	酶活	序号	菌株编号	种属鉴定	酶活
1	Aly-B1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	7	Aly-B16	<i>Bacillus</i> sp.	+
2	Aly-B2	<i>Bacillus</i> sp.	++	8	Aly-B17	<i>Colwellia</i> sp.	+
3	Aly-B5	<i>Bacillus</i> sp.	+++	9	Aly-B19	<i>Bacillus</i> sp.	++
4	Aly-B7	<i>Bacillus</i> sp.	++	10	Aly-B21	<i>Bacillus</i> sp.	++
5	Aly-B8	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	++	11	Aly-B25	<i>Shewanella</i> sp.	+
6	Aly-B13	<i>Bacillus</i> sp.	++	12	Aly-B26	<i>Bacillus</i> sp.	++

注: “+”代表该菌具有弱褐藻胶裂解酶活性; “++”代表该菌具有较强褐藻胶裂解酶活性; “+++”代表该菌具有强褐藻胶裂解酶活性

2.2 纯化结果

经过硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose FF 柱和 Sephadex G-100 层析纯化(表 2), 获得纯酶。

SDS-PAGE 凝胶电泳图显示, 纯化后的褐藻胶裂解酶 Aly-B5 在 40—50kDa 间有一条相对明显的条带, 表明其相对分子质量约为 45kDa。

表 2 褐藻胶裂解酶 Aly-B5 的纯化结果
Tab.2 Purification results of alginate lyase Aly-B5

纯化过程	总酶活力(U)	总蛋白(mg)	比活力(U/mg)	纯化倍数	收率(%)
发酵上清液	4.14	119.89	0.04	1	100
80%硫酸铵沉淀	2.27	30.34	0.08	2.17	54.89
DEAE-Sepharose FF	1.27	2.91	0.44	12.62	30.68
Sephadex G-100	0.72	0.61	1.18	34.08	17.40

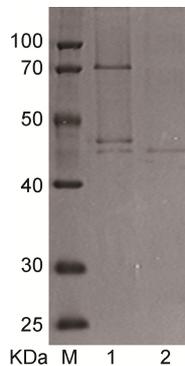


图 2 不同纯度 Aly-B5 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 The Aly-B5 separation by DEAE-Sepharose FF and Sephadex G-100 and SDS-PAGE of the elution part of alginate lyase activity

注: M: 已知分子量的标准蛋白; 1: 经 DEAE-Sepharose FF 柱层析后具有褐藻胶酶活性的洗脱液; 2: 经 Sephadex G-100 层析后具有褐藻胶酶活性洗脱液

2.3 褐藻胶裂解酶的酶学性质

2.3.1 Aly-B5 的最适作用温度和热稳定性

温度对酶活的影响如图 3 所示, 该酶在 45—65°C 的温度范围内酶活随温度升高而增加, 该酶的最适反应温度为 65°C, 当反应温度高于 65°C 后酶活迅速降低, 但该酶在 70°C 时仍保持 75% 以上的酶活。

Aly-B5 在 55、65 和 75°C 体系中反应 180min 后, 剩余的酶活如图 4 所示。该酶在 65°C 水浴条件下, 半衰期约为 180min; 在 75°C 条件下, 半衰期约为 90min; 而在 55°C 水浴 180min 后仍有 60% 以上的活性。总的来说该酶具有较好的热稳定性。

2.3.2 Aly-B5 的最适 pH 和 pH 稳定性

由图 5 可见, 该酶在 pH 小于 7.0 时, 酶活力随 pH 升高而升高, 当 pH 大于 7.0 时酶活呈现下降的趋势, 该酶的最适 pH 为 7.0。由图 6 可知, pH 在 7.0 时, 酶的稳定性最好; pH 在 5.0 和 9.0 时, 酶的稳定性较差。在 pH 9.0 时, 半衰期约为 130min, 在 pH 5.0 时半衰期仅为

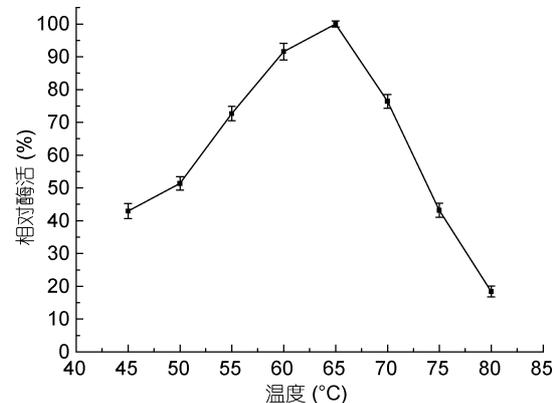


图 3 温度对酶活的影响

Fig.3 Effect of temperatures on enzyme activity

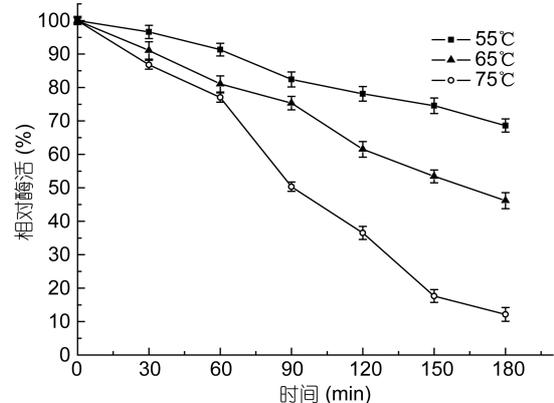


图 4 酶的稳定性的研究

Fig.4 Effect of temperatures on enzyme stability

60min, 因此相对与酸性环境而言, Aly-B5 在碱性条件下更加稳定。

2.3.3 金属离子及 EDTA 对酶活的影响

从图 7 中可以看出, 在添加的各种金属离子中, Na^+ 、 K^+ 及 Ca^{2+} 对酶活性均略有促进作用; 而 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活具有显著的抑制作用; 同时实验结果表明 EDTA 对该酶无显著影响, 由此可见, 该酶的催化活

性并不依赖于金属离子的参与。

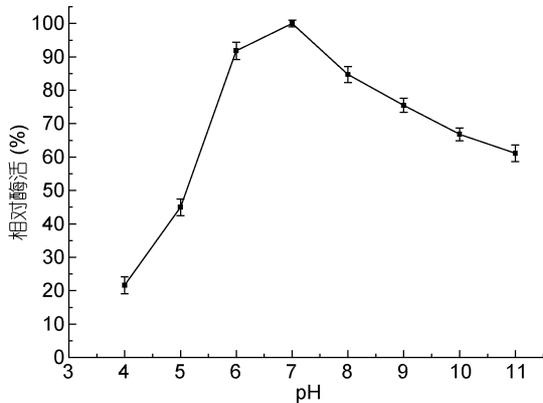


图 5 pH 对酶活的影响
Fig.5 Effect of pH on enzyme activity

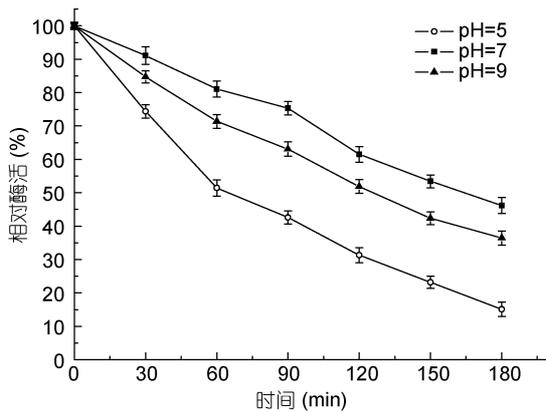


图 6 pH 稳定性研究
Fig.6 Effect of pH on enzyme activity stability

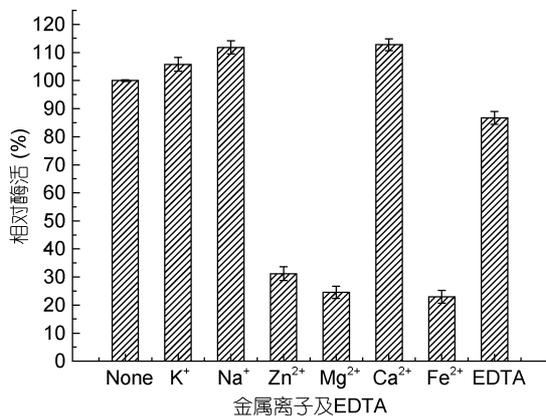


图 7 金属离子及 EDTA 对酶活的影响
Fig.7 Effect of metal ions and EDTA on enzyme activity

2.3.4 Aly-B5 的底物特异性及酶解产物分析 从图 8 可以看出, Aly-B5 对于聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸以及褐藻酸钠均具有降解能力, 但其对聚古罗糖醛酸的降解活性略高于聚甘露糖醛酸, 因此是一

种偏好聚古罗糖醛酸的 polyM/G 型双功能褐藻胶裂解酶。

图 9 的薄层层析结果显示, 经过不同的反应时间 (15min—12h), Aly-B5 降解褐藻酸钠的主要产物均为二糖(图 10), 且未检测到中间产物。结合不同反应时间(15min—12h)反应体系的黏度变化曲线可见(图 11), 反应体系的黏度未出现骤然下降, 而是呈现缓慢下降的趋势, 同时伴随着产物中寡糖含量(OD520)的持续升高。综上表明 Aly-B5 可能是一种外切型褐藻胶裂解酶, 并且其最终产物是二糖。其产物种类的单一性使得后续寡糖的分离纯化操作更为简便, 可以有效节省回收及制剂成本。

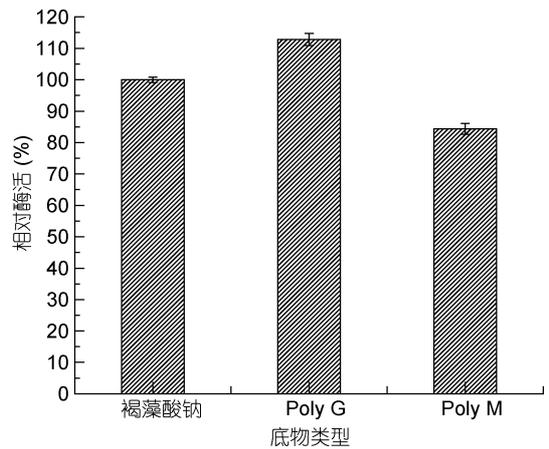


图 8 Aly-B5 的底物特异性
Fig.8 The substrate specificity of Aly-B5

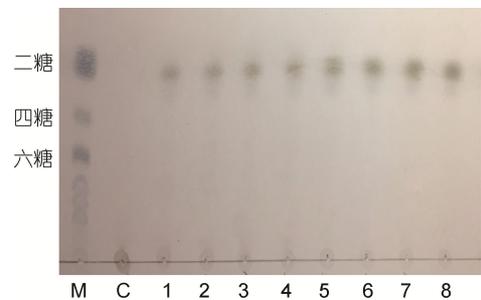


图 9 不同时间酶解产物的薄层层析
Fig.9 TLC analysis of enzymatic hydrolysate at different time
注: M: 标准二糖、四糖、六糖混合物; C: 对照组; 1: 15min 酶解产物; 2: 30min 酶解产物; 3: 45min 酶解产物; 4: 1h 酶解产物; 5: 2h 酶解产物; 6: 3h 酶解产物; 7: 7h 酶解产物; 8: 12h 酶解产物

3 讨论

近年来, 褐藻寡糖在医药、食品、化工等领域的广泛应用使得寻找催化活性高、稳定性好的褐藻胶裂解酶成为一个行业热点。目前碳水化合物活性酶数据

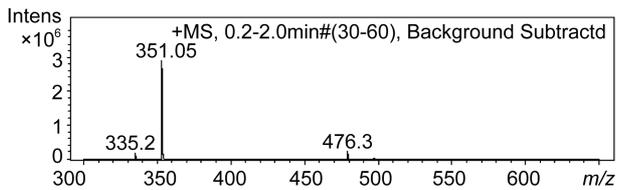


图 10 酶解 12h 产物的质谱图

Fig.10 ESI-MS analysis of the main product at 12h

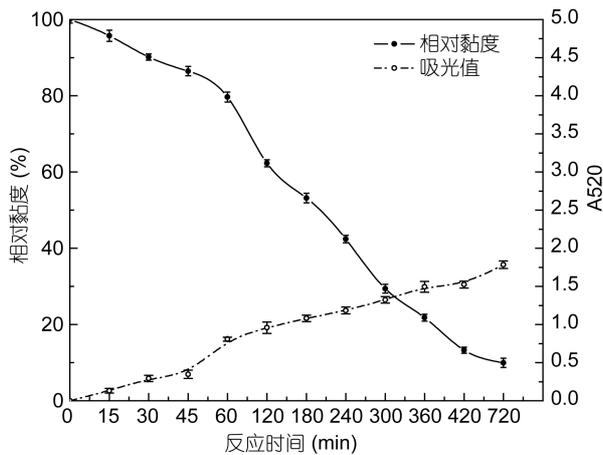


图 11 不同时间反应体系的黏度变化

Fig.11 Viscosity reduction during enzymatic degradation of alginate

库(CAZy, <http://www.cazy.org/>)已有各种来源的 80 多种褐藻胶裂解酶得到分离并完成了性质研究, 本文中所筛选的产酶菌株来自印尼热泉, 经 16S rDNA 鉴定确定该菌为芽孢杆菌属。褐藻胶裂解酶产生菌的来源十分广泛(表 3), 其中多数为细菌, 主要包括有铜绿假单胞菌(Kraiwattanapong *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015)、假交替单胞菌(Ma *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; 韩伟等, 2017)、棒状杆菌(Matsubara *et al.*, 1998), 弧菌(Song *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007)以及芽孢杆菌属(Nakagawa *et al.*, 1998), 但来源于热泉菌的热稳定褐藻胶裂解酶尚未见报道。

现有褐藻胶裂解酶最适温度大多在 30—50°C 之间(表 3), Singh 等(2011)从 *Aspergillus oryzae* 中得到的一种米曲霉类褐藻胶裂解酶, 其最适温度及最适 pH 分别为 35°C、pH 6.5, 在 50°C 反应 30min 后完全失活; 在 pH 7.0 的条件下, 酶活仅为最适 pH 的 70% 左右。Li 等(2011)对 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 进行了研究, 从中得到的褐藻胶裂解酶 aly-SJ02 其最适温度和 pH 分别为 50°C、pH 8.5, 在 40°C 下条件下半

表 3 部分褐藻胶裂解酶的最适作用温度及底物特异性
Tab.3 The optimal temperature and substrate specificity of some alginate lyases

菌株名称	最适作用温度(°C)	底物特异性	参考文献
<i>Bacillus</i> sp. Aly-B5	65	poly M/G	本研究
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	poly M/G	(Singh <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CY24	40	poly M/G	(Duan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. QD03	37	poly G	(Xiao <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. Os-ALG-9	30	poly M	(Kraiwattanapong <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	42	poly M	(Preston <i>et al.</i> , 2000)
<i>Vibrio</i> sp. 510	35	poly G	(Hu <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio</i> sp. QY101	30	poly M/G	(Song <i>et al.</i> , 2003)
<i>Vibrio</i> sp. YWA	25	poly M	(Wang <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio</i> sp. YKW-34	40	poly M/G	(Fu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	30	poly M/G	(Ma <i>et al.</i> , 2008)
<i>Streptomyces</i> sp. A5	37	poly G	(Cao <i>et al.</i> , 2007)
<i>Streptomyces</i> sp. ALG-5	30	poly G	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
<i>Corynebacterium</i> sp.	55	poly G	(Matsubara <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pseudomonas</i> sp. E03	30	poly M	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HZJ216	35	poly M/G	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524	50	poly M/G	(Li <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BYS-2	45	poly M/G	(韩伟等, 2017)
<i>Bacillus</i> sp. Strain ATB-1015	37	poly M/G	(Nakagawa <i>et al.</i> , 1998)

衰期为 41min, 在 50°C 条件下半衰期仅为 20min, pH 7.0 条件下酶活为最适 pH 的 60%。本文所研究的褐藻胶裂解酶 Aly-B5 最适温度为 65°C, 远高于一般褐藻胶裂解酶, 且具有较好的热稳定性。良好的热稳定性可以有效减少反应冷却装置的使用, 从而降低能耗, 节约生产成本, 减少因冷却造成的环境污染。同时高温加热褐藻胶不但可以提高褐藻胶的溶解性, 还可以使杂菌在反应体系中难以生存, 减少杂菌对产物的污染, 并且减少物质的贴壁效应, 有利于后续产物收集。另外, 相较于上述两种酶(Li *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011)而言, 该酶的最适 pH 为 7.0, 在反应过程中无需调节 pH 即可达到最佳酶活, 提高了生产效率, 并且在后期褐藻胶寡糖的富集回收中也无需中和反应体系, 有利于褐藻胶寡糖的生产。

此外, 底物特异性实验表明 Aly-B5 能够同时降解聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸, 属于 poly M/G 型褐藻胶裂解酶, 其酶解产物主要为二糖。底物的专一性可能与微生物生存环境中可利用的褐藻胶的来源有关。另外, 根据褐藻胶裂解酶的作用方式可以将褐藻胶裂解酶分离为内切型和外切型两类, 其中, 已探明的褐藻胶裂解酶大多为内切型, 只有少数为外切型, 其主要是从褐藻胶酸的非还原性末端切下单糖或者二聚体寡糖。本研究结果表明, 随着反应的进行, 褐藻酸钠溶液的黏度逐渐降低, 且其变化幅度较为缓慢, 变化趋势也与体系中寡糖含量的升高(A520 值)紧密相关, 结合降解过程中酶解产物仅为二糖、未检测到大大段中间产物的情况, 推测 Aly-B5 可能是外切型的褐藻胶裂解酶。由于 Aly-B5 较宽的底物特异性, 结合其最适反应温度高、热稳定性好的优良性质, 该酶是一种极具工业应用潜力的褐藻胶裂解酶。

金属离子通常会对酶的活性产生影响, 在本文中 Zn²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺对酶活具有明显的抑制作用, 这是因为重金属离子可以跟蛋白催化或结合区域结合从而抑制酶的催化效率。EDTA 是一种金属离子螯合剂, 可以螯合酶蛋白中的辅基金属离子从而抑制酶的活性, 然而 EDTA 对 Aly-B5 并没有明显的抑制作用, 在含终浓度为 10mmol/L EDTA 的反应体系中反应 15min, 酶活力仍可达初始值的 90%, 这与以往报道中 EDTA 对褐藻胶裂解酶抑制作用不同, 韩伟等(2017)研究的褐藻胶裂解酶 rAlg738 最适温度为 45°C, 在含终浓度为 1mmol/L EDTA 的反应体系中反应 15min, 剩余酶活仅为初始值的 67.91%, 而在 5mmol/L EDTA 的反应体系中, 酶活仅剩 56.93%;

Nakagawa 等(1998)从 *Bacillus* sp. Strain ATB-1015 中分离得到的褐藻胶裂解酶, 其最适温度为 37°C, 在终浓度为 1mmol/L EDTA 的反应体系中反应 15min 后, 剩余酶活仅为初始值的 10%。这表明 Aly-B5 是一种非金属蛋白酶, 并不依赖于某一种金属离子。

4 结论

本文从印尼热泉样品中筛选到一株高产褐藻胶裂解酶菌株 *Bacillus* sp. Aly-B5, 初步的酶学性质研究表明: 该菌所产的褐藻胶裂解酶最适作用温度为 65°C, 且具有良好的热稳定性, 在 75°C 时的半衰期为 110min; 最适 pH 为 7.0, 且在 pH 6.0—11.0 的范围内保持 60%以上的酶活; 该酶是一种偏好 poly G 的双功能褐藻胶裂解酶, 其酶解产物主要是二糖。鉴于褐藻胶裂解酶 Aly-B5 良好的热稳定性和 pH 适应性以及对底物无特殊要求的优点, 该酶在海藻高值化利用领域具有潜在的应用前景。在接下来的工作中, 克隆获得该酶的编码基因并采用基因工程手段实现其高效异源表达是我们的工作重点。

参 考 文 献

- 李云涛, 汪立平, 张 孟等, 2017. 鲍鱼来源褐藻胶裂解酶菌株的筛选及发酵条件优化. 大连海洋大学学报, 32(5): 574—583
- 李丽妍, 管华诗, 江晓路等, 2011. 海藻工具酶——褐藻胶裂解酶研究进展. 生物工程学报, 27(6): 838—845
- 邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣等, 2015. 褐藻胶寡糖制备的研究进展. 生命科学研究, 19(1): 75—79
- 罗丹丹, 薛永常, 2016. 褐藻胶裂解酶的研究进展. 生物学杂志, 33(6): 95—98
- 赵 凯, 许鹏举, 谷广焯, 2008. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究. 食品科学, 29(8): 534—536
- 祝 玲, 程 璐, 蔡俊鹏, 2006. 褐藻胶寡糖潜在药用价值的研究进展. 中药材, 29(9): 993—996
- 徐 凡, 林 娟, 叶秀云等, 2017. 交替假单胞菌 BYS-2 产褐藻胶裂解酶条件研究. 福州大学学报(自然科学版), 45(3): 446—453
- 高王宇, 黄惠琴, 刘敏等, 2017. 产褐藻胶裂解酶菌株 HB12274 的鉴定和发酵优化. 基因组学与应用生物学, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20170920.1644.006.html>
- 韩 伟, 林 娟, 谢 勇等, 2017. 褐藻胶裂解酶基因的克隆表达及重组酶酶学性质. 微生物学通报, 44(5): 1074—1080
- 宋 凯, 于文功, 韩 峰等, 2003. 海洋弧菌褐藻胶裂解酶的分离纯化及性质. 生物化学与生物物理学报, 35(5): 473—477
- Cao L X, Xie L J, Xue X L *et al.*, 2007. Purification and characterization of alginate lyase from *Streptomyces* species strain A5 isolated from banana rhizosphere. Journal of

- Agricultural and Food Chemistry, 55(13): 5113—5117
- Duan G F, Han F, Yu W G, 2009. Cloning, sequence analysis, and expression of gene *alyPI* encoding an alginate lyase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CY24. Canadian Journal of Microbiology, 55(9): 1113—1118
- Fu X T, Lin H, Kim S M, 2007. Purification and characterization of a Na⁺/K⁺ dependent alginate lyase from turban shell gut *Vibrio* sp. YKW-34. Enzyme and Microbial Technology, 41(6—7): 828—834
- Hu X K, Jiang X L, Hwang H M, 2006. Purification and characterization of an alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. Mutant strain 510-64. Current Microbiology, 53(2): 135—140
- Kim D E, Lee E Y, Kim H S, 2009. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. Marine Biotechnology, 11(1): 10—16
- Kraiwananpong J, Motomura K, Ooi T *et al*, 1999. Characterization of alginate lyase (ALYII) from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9 expressed in recombinant *Escherichia coli*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(1): 105—109
- Li J W, Dong S, Song J *et al*, 2011. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. Marine Drugs, 9(1): 109—123
- Li L Y, Jiang X L, Guan H S *et al*, 2011. Three alginate lyases from marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* HZJ216: purification and characterization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(3): 305—317
- Ludwig W, 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. International Journal of Food Microbiology, 120(3): 225—236
- Ma L Y, Chi Z M, Li J *et al*, 2008. Overexpression of alginate lyase of *Pseudoalteromonas elyakovii* in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the recombinant alginate lyase. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(1): 89—96
- Matsubara Y, Kawada R, Iwasaki K I *et al*, 1998. Extracellular poly(α -L-guluronate)lyase from *Corynebacterium* sp.: purification, characteristics, and conformational properties. Journal of Protein Chemistry, 17(1): 29—36
- Miyake O, Ochiai A, Hashimoto W *et al*, 2004. Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and-7 in *Sphingomonas* sp. strain A1. Journal of Bacteriology, 186(9): 2891—2896
- Nakagawa A, Ozaki T, Chubachi K *et al*, 1998. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. Journal of Applied Microbiology, 84(3): 328—335
- Preston L A, Wong T Y, Bender C L *et al*, 2000. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Journal of Bacteriology, 182(21): 6268—6271
- Rahman M M, Inoue A, Tanaka H *et al*, 2011. cDNA cloning of an alginate lyase from a marine gastropod *Aplysia kurodai* and assessment of catalytically important residues of this enzyme. Biochimie, 93(10): 1720—1730
- Singh R P, Gupta V, Kumari P *et al*, 2011. Purification and partial characterization of an extracellular alginate lyase from *Aspergillus oryzae* isolated from brown seaweed. Journal of Applied Phycology, 23(4): 755—762
- Wang Y H, Yu G L, Wang X M *et al*, 2006. Purification and characterization of alginate lyase from marine *Vibrio* sp. YWA. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 38(9): 633—638
- Xiao L, Han F, Yang Z *et al*, 2006. A novel alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 from *Pseudomonas* sp. QD03. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(1): 81—88
- Zhu B W, Huang L S X, Tan H D *et al*, 2015. Characterization of a new Endo-type polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp. Biotechnology Letters, 37(2): 409—415

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THERMOSTABLE ALGINATE LYASE OF A STRAIN FROM AN INDONESIAN HOT SPRING

GAO Yang¹, LI Jiang², SONG Yi-Min¹

(1. *Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;*

2. *The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China*)

Abstract A hot spring strain producing alginate lyase, Aly-B5, was screened on a plate using alginate as the sole carbon source and was identified by 16S rDNA sequencing. The alginate lyase Aly-B5 was purified by ammonium sulfate precipitation, and DEAE (diethylaminoethyl) -sepharose Fast Flow and Sephacryl G-100 column chromatography. The biochemical characteristics of Aly-B5 was determined by dinitrosalicylic acid method, including the optimal temperature, pH, thermal and pH stability, metal ions, substrate specificity, and enzymolysis product. The results show that the high-yield alginate lyase strain from Indonesian hot spring was *Bacillus* sp. The molecular weight of purified alginate lyase Aly-B5 was about 45kDa by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal catalytic activity of Aly-B5 occurred at 65°C and pH 7.0 and it can maintain half of initial activity at 75°C for more than 110 min. The alginate lyase was inhibited by Zn²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, and it was insensitive to EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Aly-B5 showed activities toward both α -L-guluronic acid and β -D-mannuronic acid, indicating that it is a bifunctional alginate lyase that prefers α -L-guluronic acid, and the product is mainly disaccharide. The high tolerance toward high temperature implied that this enzyme might be an interesting candidate for seaweeds industrial processes.

Key words hot spring bacterium; alginate lyase; biochemical characteristics; thermostability