

从海洋中分离的弧菌 QY102 褐藻胶裂解酶的 纯化 and 性质研究

李京宝 于文功* 韩 峰 韩文君 宋 凯

(中国海洋大学 海洋药物与食品研究所 青岛 266003)

摘 要 从马尾藻(*Sargassum*) 表面分离到一株产生高效胞外褐藻胶裂解酶的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) QY102。以褐藻胶为唯一碳源发酵培养后, 发酵液上清通过 0.22 μ m 滤膜过滤、DEAE-Sephacrose 离子交换和 Superdex75 凝胶过滤得到电泳纯的褐藻胶裂解酶。酶的性质研究表明: 其分子量约为 28.5kD(SDS-PAGE), 反应最适温度为 40 $^{\circ}$ C, 最适 pH 为 7.1, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活有促进作用, 而 Ni^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 对酶活有抑制作用。该酶的活性明显高于已报道的褐藻胶裂解酶, pH 稳定范围广(5~10), 并且对聚甘露糖醛酸的活性高于对聚古罗糖醛酸的活性。

关键词 褐藻胶裂解酶 纯化 海洋弧菌 酶学性质

中图分类号: Q555 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)06-0753-05

褐藻胶是由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸通过 β -1,4 糖苷键连接形成的线形阴离子多糖。两种糖醛酸随机排列组合成聚甘露糖醛酸(Polymannuronate, PM)、聚古罗糖醛酸(Polyguluronate, PG)或甘露糖醛酸和古罗糖醛酸交替嵌段^[1,2]。褐藻胶的来源丰富, 并已广泛应用于食品、化工和医药等行业^[3,4]。近几年来, 随着褐藻寡糖的生理作用不断被发现^[5], 使其引起了人们更大的关注。褐藻多糖的降解通常有酸水解、酶解和加热等方法, 其中酶解反应有条件温和、易控制及产物专一等优点, 使褐藻胶裂解酶成为褐藻寡糖制备方面研究开发的热点^[6]。褐藻胶裂解酶主要来源于细菌、无脊椎动物和病毒等^[7~12], 通过 β 消除反应切割聚甘露糖醛酸(EC.4.2.2.3 活性)或聚古罗糖醛酸(EC.4.2.2.11 活性)的 β -1,4 糖苷键, 并在非还原末端产生 C_4 不饱和双键^[13], 这些还原末端不饱和双键的产生对寡糖的某些生物活性有重要影响, 而物理、化学降解方法降解的产物却没有这些特性。本研究分离到一株褐藻胶裂解酶的海洋弧菌, 并从发酵上清液中分离纯化到一种新的高活力褐藻胶裂解酶, 并研究了其酶学基本参数。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

AKTA FPLC 层析系统、DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱、Superdex 75 HR 10/30 凝胶过滤预装柱、PhastSystem 水平电泳仪、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺为 Amersham Pharmacia Biotech 产品, DU640 Nucleic Acid and Protein Analyzer、J2-MC 冷冻离心机为 Beckman 公司

基金项目: 国家 863 计划(2001AA626010)、教育部优秀青年教师资助计划(2002-350)

* 通讯作者。Tel: 86-532-2031680; Fax: 86-532-2033054; E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

作者简介: 李京宝(1979-), 男, 甘肃漳县人, 在读硕士研究生, 从事褐藻胶裂解酶的研究。E-mail: alginat79@sina.com.cn

收稿日期: 2003-01-10; 修回日期: 2003-07-15

产品, TB-12R-3F 摇床为 Takasaki Scientific 产品, SL-2 数控层析冷柜为北京松原华兴产品, Bio Imaging System 为 Syngene 公司产品, MDF-U71V 超低温冰箱为 SANYO 产品, 微孔滤膜为上海新亚净化器件厂产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株的分离纯化

将马尾藻浸泡于灭菌海水中, 25℃放置一周后, 取其悬浮液稀释接入褐藻胶单一碳源培养基中富集培养, 一周后划线于固体培养基培养, 经过连续 5 代挑取单克隆纯化培养后, 将得到的菌株进行酶活测定, 筛选酶的高产菌株。

1.3 培养基和发酵条件

选择性培养基: 每升含褐藻酸钠 3g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g、NaCl 30g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, pH 6.0, 100kPa 灭菌 15min。将种子按 1% 的比例接入发酵培养基, 于 25℃ 200 r/min 培养 3d, 4℃ 12000r/min 离心 10 min 去除菌体, 上清液即为粗酶液。

1.4 菌种鉴定

按文献 [14] 的方法对细菌进行初步分类, 并通过 PCR 扩增得到该菌的 16S rDNA, 上游引物为 16SF 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8 ~ 27 个碱基位置), 下游引物为 16SR 5'-TAGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492 ~ 1510 个碱基位置)。PCR 反应条件为: 96℃ 预变性 6min; 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 延长 6min。PCR 产物测序后在 GenBank 中进行同源性检索, 将菌种鉴定到属^[15]。

1.5 酶活力检测

取 1mL 0.3% 褐藻酸钠 (0.2mol/L pH7.0 磷酸钠缓冲液配制) 加入 0.1mL 酶液, 在 40℃ 下保温 20min, 用紫外分光光度计测量 235nm 处的吸收值。在波长 235nm 处光密度每分钟增加 0.1 定义为一个酶活力单位。

1.6 蛋白质含量测定

以牛血清白蛋白配置蛋白标准溶液, 用 Lowry 法进行蛋白质含量测定^[16]。

1.7 酶的纯化

将粗酶液经 0.22μm 滤膜过滤, 用灭菌的去离子水冲洗滤膜, 得到的酶液以 12000r/min 离心 10 min 去除不溶物。上清液过 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱 (1.0cm × 20cm), 上柱和洗柱缓冲液为 0.04mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 用含有 0.4 ~ 0.6mol/L NaCl 的该缓冲液进行分阶段梯度洗脱, 在紫外 280nm 的检测下收集蛋白。将得到的酶液经冻干蒸发浓缩后, 上 Superdex75 (10/30) 分子筛预装柱, 洗脱缓冲液为 0.02mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 收集蛋白峰。以上操作均在 4℃ 层析柜中进行, 酶液均保存于 -20℃。

1.8 蛋白质 SDS-PAGE 分析

纯化后的酶经过变性处理后进行 SDS-PAGE 染色后照相、分析。

1.9 酶的性质研究

用分子筛纯化后的酶进行酶的性质研究, 包括酶的分子量、反应最适温度及 pH 值、酶的热稳定性及 pH 稳定性、金属离子对酶活性的影响、底物专一性。

2 结果

2.1 菌株的分离和鉴定

实验共筛选得到 12 株有褐藻胶裂解酶活性的海洋细菌,分别记录、编号,保存于-80℃冰箱。选取酶活力较高的一株为研究材料,革兰氏染色阴性,短杆状,可运动,无鞭毛。由 PCR 得到该菌的 16S rRNA 基因并测定其序列,不包括引物结合区,所获得 16S rRNA 基因序列长 1507bp,在互联网上通过 BLAST 分析,结果显示在最相近的 100 个序列中,有 86 个为弧菌。其中与双氮养弧菌(*V. diazotrophicus*)ATCC 33466T 的序列同源性为 99%,与创伤弧菌(*V. vulnificus*)ATCC 27562T 的序列同源性为 98%。所以鉴定该菌属于弧菌属,命名为 *Vibrio* sp. QY102。

2.2 酶的纯化

酶的纯化步骤、纯化倍数及产率等数据如表 1 所示,经过 3 步纯化,最终得到纯化 16.5 倍的褐藻胶裂解酶,产率为 5.9%。

表 1 褐藻胶裂解酶的纯化
Table 1 Purification of alginate lyase from *Vibrio* sp. QY102

Step	Volume /mL	Activity (U/mL)	Protein (mg/mL)	Specific activity (U/mg)	Folds	Yield /%
Crude extract	1000.0	37.8	0.227	16	1.00	100.00
0.22μm membrane	200.0	86.7	0.138	63	3.77	56.19
DEAE-sepharose column	25.3	254.0	0.067	376	24.40	20.82
Superdex75 column	38.6	46.8	0.018	254	16.50	5.90

2.3 酶学性质研究

2.3.1 酶的分子量:纯化的褐藻胶裂解酶在 SDS-PAGE 中为单一条带(图 1)。通过 GeneGenius 全自动凝胶成像分析系统进行线性回归分析,计算出该酶的分子量大约为 28.5kD。

2.3.2 温度和 pH 值对酶的影响:在不同温度下测定酶活性,酶的反应最适温度为 40℃。将酶液在不同的温度下保温 1h 后,立即在-20℃下冷却,然后在 40℃测酶活,以未经处理的酶活为 100%,结果显示该褐藻胶裂解酶在 40℃以上时酶活力迅速衰减。用不同 pH 值的磷酸缓冲液配制底物进行酶反应,该酶的最适 pH 值为 7.1。将适量酶液于不同 pH 缓冲液在 25℃温育 5h 后,调整 pH 值为 7.1,在标准条件下测酶活,结果表明该酶在较大的范围内(pH5~10)稳定性较高,酶活性均保持在 80%以上。

2.3.3 金属离子对酶活性的影响:在酶与底物反应时,向体系内加入不同的金属离子(终浓度均为 1mmol/L),测定其酶活,以不加任何金属离子的酶活为 100%,结果见表 2。Ca²⁺、Mg²⁺对酶活有激活作用;而 Zn²⁺、Ni²⁺、Al³⁺、Ba²⁺对酶活有抑制作用,SDS、EDTA 对酶活的抑制作用更为明显。

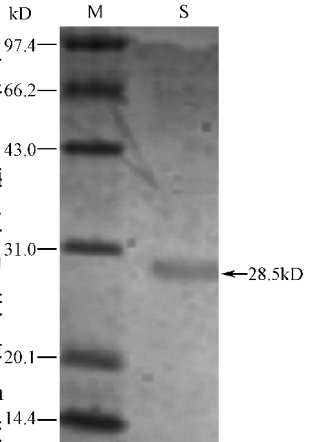


图 1 纯化的褐藻胶裂解酶 SDS-PAGE 图
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified alginate lyase
M. Molecular Marker ;
S. Purified alginate lyase.

表 2 金属离子及化合物对酶活性的影响

Table 2 Effects of metals and compounds on alginate lyase activity

Compound	Relative activity/%	Compound	Relative activity/%	Compound	Relative activity/%
Control	100.0	MgSO ₄	117.3	MnCl ₂	79.2
CaCl ₂	123.5	ZnSO ₄	45.2	CuSO ₄	72.4
NiCl ₂	54.6	BaCl ₂	51.3	EDTA	9.2
AlCl ₃	63.9	SrCO ₃	101.4	SDS	43.4

2.3.4 底物专一性 :为了证明该酶是否具有底物专一性 ,分别以 PM 和 PG 为底物进行酶解反应 ,以前述方法测定酶活 ,结果显示 ,该褐藻胶裂解酶对 PM 的活性高于对 PG 的活性 ,其相对活性比例为 100:47。

3 讨论

本研究利用褐藻胶唯一碳源的选择培养基 ,从马尾藻表面分离得到一批有降解褐藻胶活性的菌株 ,其中一株 *Vibrio* sp. QY102 不但产酶量高 ,而且酶的活性强 ,发酵液上清酶的比活性高达 16 U/mg ,比已报道的高出 2~37 倍 ,因此有重要的研究开发价值。

在褐藻胶裂解酶的纯化过程中 ,本文采用 0.22μm 滤膜代替超滤膜 ,大大降低了纯化的成本 ,同样能起到浓缩和脱盐的作用 ,且将粗酶液纯化了 3.77 倍。这可能是由于酶结合于大分子量的褐藻胶 ,从而难以通过滤膜 ,而其他一些没有结合的蛋白就被滤出。褐藻胶与酶的结合是比较普遍的 ,Teotia 等^[17]曾用褐藻胶亲和层析的方法一步得到电泳纯的 β-淀粉酶 ,活性回收率达到 80%。

在酶的纯化过程中 ,我们发现酶与底物褐藻胶的结合力很强 ,常规方法不易使底物与酶分离 ,降低了酶的回收率 ,这可能是迄今绝大多数关于褐藻胶裂解酶纯化研究论文中酶得率低的主要原因。

酶学性质研究表明 ,该褐藻胶裂解酶对金属离子比较敏感 :Ca²⁺、Mg²⁺ 对酶活有激活作用 ,而它们又在元素周期表中同属于一族 ,这就提示我们 ,具有与 Ca²⁺、Mg²⁺ 结构相似的离子可能对该褐藻胶裂解酶有激活作用。研究发现该酶不但活性高 ,而且 pH 稳定范围为 5~10 ,比已报道的褐藻胶裂解酶广 ,从而拓宽了酶的应用领域 ,为利用不同来源的褐藻多糖制备寡糖创造了有利条件。

参 考 文 献

[1] 陈正霖 ,高金城.褐藻胶.青岛:青岛海洋大学出版社,1989.
[2] 纪明侯.海藻化学.北京:科学出版社,1997.231~244.
[3] 赵齐川,张万群.褐藻胶的性质、用途及在人体中的作用.四川工业科技,1991,10(1):52~56.
[4] 张晨.海藻双酯钠对血清高密度脂蛋白亚组含量影响的观察.中国海洋药物,1992,1(1):23~25.
[5] Natsume M, Kamo Y, Hirayama M. Isolation and characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities. Carbohydr Res, 1994, 258:187~197.
[6] 刘岩,江晓路,管华诗.褐藻胶裂解酶研究进展.中国水产科学,2001,18(4):99~103.
[7] Sawabe T, Yoshio E. Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp.. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(3):521~527.

- [8] Miyazaki M , Obata J , Iwamoto Y , *et al.* Calcium-sensitive extracellular poly(α -L-gulonate) lyase from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. strain F6 : purification and some properties. *Fisheries science* 2001 **67** :956 ~ 964.
- [9] Takeshita S , Sato N , Igarashi M , *et al.* A highly denaturant-durable alginate lyase from a marine bacterium : purification and properties. *Biosci Biotech Biochem* 1993 **57** (7) :1125 ~ 1128.
- [10] Matsubara Y , Kawada R , Iwasaki K , *et al.* Extracellular poly(α -L-gulonate) lyase from *Corynebacterium* sp. : purification , characteristics and conformational properties. *Journal of Protein Chemistry* 1998 **17** (1) :29 ~ 36.
- [11] Iwamoto Y , Araki R , Iriyama K I , *et al.* Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain No. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci Biotech Biochem* 2001 **65** (1) :133 ~ 142.
- [12] Wong T Y , Preston L A , Schiller N L , *et al.* Alginate lyase : review of major sources and enzyme characteristics , structure-function analysis , biological roles , and applications. *Annu Rev Microbiol* , 2000 **54** :289 ~ 340.
- [13] Nakada H I , Sweeny P C. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem* 1967 **242** (5) :845 ~ 851.
- [14] 卢振祖. 细菌分类学. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
- [15] 李衍达, 孙之荣. 生物信息学. 基因和蛋白质分析的实用指南. 北京: 清华大学出版社, 2000. 146 ~ 156.
- [16] 北京大学生物系生物化学教研组. 生物化学试验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979. 73 ~ 74.
- [17] Teotia S , Khare S K , Gupta M N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. *Enzyme and Microbial Technology* 2001 **28** :792 ~ 795.

Purification and Characterization of a Novel Alginate Lyase from Marine *Vibrio* sp. QY102

Li Jingbao Yu Wengong* Han Feng Han Wenjun Song Kai
(Marine Drug and Food Institute , Ocean University of China , Qingdao 266003 , China)

Abstract A marine bacterium *Vibrio* sp. QY102 with high alginate-degrading activity was isolated from surface of *sargassum*. The alginate lyase recovered from culture supernatant was purified to electrophoretic homogeneity by a procedure of 0.22 μ m membrane filtration , DEAE-sepharose ion-exchange and Superdex75 gel filtration chromatography. The molecular mass of the enzyme determined by SDS-PAGE was 28.5kD. The optimum pH and temperature for enzyme activity were pH 7.1 and 40 $^{\circ}$ C , respectively. The enzyme was stable from pH 5 to 10 and at temperature below 40 $^{\circ}$ C. Ca^{2+} and Mg^{2+} enhanced the enzyme activity , whereas Ni^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} and Ba^{2+} inhibited the activity , and the lyase activity was strongly inhibited by SDS and EDTA. The activity of the alginate lyase purified in this experiment was obviously higher than that of others reported so far , and this enzyme showed a preference for polymannuronic acid in substrate specificity.

Key words Alginate lyase , Purification , Marine *Vibrio* , Characterization