



需钠弧菌 WPAGA4 菌株 3 条琼胶酶基因克隆、表达与酶学性质分析

童秀芳^{1#}, 王宁^{1#}, 张孟源¹, 王雯欣¹, 张牟莹珂¹, 邓帅¹, 王健鑫¹,
曾润颖², 曲武^{1*}

1 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316000

2 自然资源部海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 福建 厦门 361000

童秀芳, 王宁, 张孟源, 王雯欣, 张牟莹珂, 邓帅, 王健鑫, 曾润颖, 曲武. 需钠弧菌 WPAGA4 菌株 3 条琼胶酶基因克隆、表达与酶学性质分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3667-3678.

TONG Xiufang, WANG Ning, ZHANG Mengyuan, WANG Wenxin, ZHANG Mouyingke, DENG Shuai, WANG Jianxin, ZENG Runying, QU Wu. Cloning, expression, and characterization of three agarases in *Vibrio natriegens* WPAGA4[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3667-3678.

摘要:【目的】本文拟从西太平洋深海沉积物中分离得到的需钠弧菌(*Vibrio natriegens*) WPAGA4 菌株中克隆并表达 3 条 β -琼胶酶基因 *agaW3418*、*agaW3419* 和 *agaW3472*, 并对其酶学性质进行研究。【方法】通过克隆表达技术将得到的 3 条琼胶酶基因在大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中进行表达, 通过二硝基水杨酸(DNS)法测定重组琼胶酶的酶活, 并对其中活性最优的一种琼胶酶进行热稳定性和产酶条件优化。【结果】三种琼脂酶均为属于 GH50 家族。AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 在温度分别为 50、60 和 30 °C 以及 pH 值分别为 6.0、7.0 和 7.0 条件下, 发挥作用的能力最强。其中琼胶酶 AgaW3472 表现出最优的酶活性质, 在 20 °C 下保持良好的稳定性, 且在 SOB (super optimal broth)培养基条件下以 1% (质量体积分数)的乳糖作为碳源, 同时添加 20 mmol/L MgCl₂, 并将诱导温度和异丙基-1 硫代- β -D-半乳糖苷(isopropyl-1 thio- β -D-galactoside, IPTG)浓度分别设置为 37 °C 和 0.1 mmol/L 时能够获得最高的表达量。【结论】三条重组酶具有琼胶酶活性,

资助项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2022C02040); 浙江省教育厅一般科研项目(Y202147737); 舟山市科技局项目(2021C21009); 大学生创新创业训练项目(202110340051)

This work was supported by the “Pioneer” and “Leading Goose” Research and Development Program of Zhejiang (2022C02040), the Scientific Research Fund of Zhejiang Provincial Education Department (Y202147737), the Bureau of Science and Technology of Zhoushan Program (2021C21009), and the College Students’ Innovative Entrepreneurial Training Plan Program (202110340051).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: quwu2165@zjou.edu.cn

Received: 2023-02-05; Accepted: 2023-06-01; Published online: 2023-06-08

为 WPAGA4 菌株代谢琼胶多糖并参与海洋碳循环过程提供物质基础。琼胶酶 AgaW3472 具有较高的酶活性、低温适应性与稳定性, 为琼胶降解相关产业的发展提供了潜在的生物工具酶。

关键词: 琼胶酶; 琼胶寡糖; 深海弧菌; 冷适应性

Cloning, expression, and characterization of three agarases in *Vibrio natriegens* WPAGA4

TONG Xiufang^{1#}, WANG Ning^{1#}, ZHANG Mengyuan¹, WANG Wenxin¹,
ZHANG Mouyingke¹, DENG Shuai¹, WANG Jianxin¹, ZENG Runying², QU Wu^{1*}

1 Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, Zhejiang, China

2 Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361000, Fujian, China

Abstract: [Objective] To clone and express three β -agarase genes *agaW3418*, *agaW3419*, and *agaW3472* in *Vibrio natriegens* WPAGA4 isolated from the deep-sea sediment and study the enzymatic properties of the proteins. [Methods] The three agarase genes were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells, and the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method was employed to measure the activities of the recombinant agarases. [Results] The three agarases, AgaW3418, AgaW3419, and AgaW3472, belonged to the GH50 family, with the highest activities at 50, 60, and 30 °C and pH 6.0, 7.0, and 7.0, respectively. AgaW3472 showed the highest activity and maintained good stability at 20 °C. The highest production of AgaW3472 was detected in the super optimal broth (SOB) medium with 1% (W/V) lactose as the carbon source, 20 mmol/L MgCl₂, and 0.1 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at the induction temperature of 37 °C. [Conclusion] The agarase AgaW3472 has high enzyme activity, low temperature adaptability, and good stability, serving as a potential bio-tool for the development of agar degradation-related industries. The three recombinant agarases provided a foundation for understanding the agarose metabolism in *V. natriegens* WPAGA4 and the role of this strain in the marine carbon cycling.

Keywords: agarose; agarose oligosaccharides; *Vibrio*; cold adaptation

琼胶是世界三大海藻胶之一, 主要从江蓠、石花菜和龙须菜等红藻中提取而来^[1]。琼胶由琼脂糖和琼脂胶组成^[2]。琼脂糖是一种由 β -D-半乳糖和 3,6-内醚- α -L-半乳糖残基交替连接而成的线性高分子聚合物^[3]。琼胶寡糖是由琼脂水解后产生的低聚合度寡糖, 分为琼寡糖(agarooligosaccharides, AOS)和新琼寡糖(neoagarooligosaccharides, NAOS)^[4]。琼胶黏度高, 常温下不易溶于水, 人体较难吸收, 在

食品等行业的应用受到较大限制^[5]。与琼胶相比, 琼胶寡糖分子量小, 水溶性较好, 易于人体吸收^[6], 同时具有抗氧化^[7]、抗肿瘤^[8]、美白^[9]和抗龋齿^[10]等生物活性, 因此在美妆、食品和医药等行业具有广泛的应用价值^[11]。

目前, 琼胶降解方法主要有化学法和酶解法 2 种, 其中化学降解法造成大量污染和浪费, 对环境危害极大^[11]。与化学法相比, 以琼胶酶为基础

的酶解法特异性更高、反应条件温和, 对环境的污染和对生产设备的要求更低, 因此受到越来越多的关注^[12]。琼胶酶可降解琼胶, 是糖苷水解酶的一种, 按其水解方式分可为 α -琼胶酶(EC3.2.1.158)和 β -琼胶酶(EC3.2.1.81)^[13]。 α -琼胶酶水解 α -1,3 糖苷键生成以 3,6-内醚- α -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖; β -琼胶酶水解 β -1,4 糖苷键生成以 β -D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖^[14]。

琼胶酶主要来源于海洋微生物^[15]。深海环境的低温特性赋予了部分琼胶酶冷适应性, 即在低温条件下依旧保持较高活力, 该性质可以节约寡糖生产过程中反应液的加热成本^[16]。此外, 冷适应性也可以使菌株在深海等低温环境中高效降解琼胶以获取能量。海洋冷适应性酶的研究, 拓宽了对酶特性的认识和应用范围, 为许多传统能源、化工和环保等领域提供了新的生物学工具^[17], 具有较强的工业级生态价值。

弧菌是琼胶酶的主要来源微生物之一^[15]。在本团队前期研究中, 从深海沉积物分离得到一株深海需纳氏弧菌(*Vibrio natriegens*), 并将该菌株命名为 WPAGA4, 并对其降解活性和其中 1 条琼胶酶 AgaW3420 的酶学性质进行了探究^[18]。但是, 根据基因组信息, 该菌株具有 4 条琼胶酶基因, 然而其他琼胶酶的进化关系及酶学性质尚未被揭示。本研究拟对 WPAGA4 菌株其他 3 条琼胶酶基因进行克隆表达并研究其酶活性质, 揭示其中具有冷适应性的琼胶酶, 并优化其表达量, 为深入了解该菌株的工业应用价值及生态角色奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究所用需纳氏弧菌菌株 WPAGA4, 为团队前期试验^[18]中从西太平洋深海沉积物样品(157°24'31"E, 19°30'30"N; 水深 5 378 m)中分离得

到。该菌株保存于本实验室-80 °C 超低温冰箱中。

1.1.2 培养基和主要试剂

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-1 thio- β -D-galactoside, IPTG)、Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂、氨苄青霉素、标准分子量蛋白(170 kDa)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。 β -巯基乙醇购自上海阿拉丁生物科技有限公司。大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)、pEAZY[®]-Blunt E2 表达载体购自北京金全式金生物技术有限公司。Premix Ex Taq、MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司。酒石酸钾钠、三羟甲基氨基甲烷、氯化钠、3,5-二硝基水杨酸、硫酸镁、硫酸铁、硫酸锰、硫酸铜、硫酸铵、硫酸锌、硫酸铁铵、苯酚、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、硫酸钾、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、琼脂粉、氯化钙、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、乙酸、色氨酸、酵母提取物、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

本试验用于菌株培养和后续产酶条件优化的基础培养基分别为 LB (Luria-Bertani)培养基, 其组成为每升蒸馏水含 10.0 g 胰蛋白胍, 5.0 g 酵母提取物, 10.0 g 氯化钠; SOB (super optimal broth)培养基, 其组成为每升蒸馏水含 20.0 g 胰蛋白胍, 5.0 g 酵母提取物, 5.5 g 氯化钠; SOC (super optimal broth with catabolic repressor)培养基, 其组成为每升蒸馏水含 20.0 g 胰蛋白胍, 5.0 g 酵母提取物, 0.5 g 氯化钠; 2 \times YT (2 \times yeast extract and tryptone)培养基, 其组成为每升蒸馏水含 16.0 g 胰蛋白胍, 10.0 g 酵母提取物, 5.0 g 氯化钠。将上述培养基用 0.1 mol/L 氢氧化钠和盐酸将 pH 值调整为 7.4, 于 121 °C 条件下灭菌 15 min。

1.2 主要仪器

SHKE4450-1 小型恒温培养摇床购自 Thermo

Fisher 公司; 5804R 冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; ZXDP-B2120 恒温培养箱购自上海智诚分析仪器有限公司; JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技有限公司; DYCP-琼脂糖水平电泳槽、DYY-6C 电泳仪电源购自北京市六一仪器厂; Biotek Sy 酶标仪购自 Bio Tek 公司。

1.3 方法

1.3.1 序列进化分析

将 WPAGA4 菌株基因组中注释到的 3 条琼胶酶^[18]: AgaW3418 (登录号: ON803642)、AgaW3419 (登录号: ON803643)和 AgaW3472 (登录号: ON803644)的蛋白质序列使用 MAGE-X 软件的邻接(neighbor-joining)法进行系统发育树构建, bootstrap 值设定为 1 000。

1.3.2 基因克隆表达

按照基因 *agaW3418*、*agaW3419*、*agaW3472* 设计特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增, 并与 pEAZY[®]-BluntE2 表达载体连接。将重组载体转化到 BL21(DE3)感受态细胞, 挑选克隆子进行验证, 将成功含有重组质粒的 BL21(DE3)菌落接种于 LB 培养基(含终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素)中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为 0.6。随后, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 17 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 条件下诱导 14 h。诱导后的细胞经超声处理后, 使用镍亲和层析柱纯化目的蛋白, 并利用 SDS-PAGE 进行分子量及纯度分析。

1.3.3 琼胶酶热力学性质测定

酶活力的测定采用二硝基水杨酸(DNS)法进行测定^[19]。取 25 μL 酶液与 225 μL 0.4%的琼

脂糖溶液(质量体积分数)混合, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 40 min。随后, 加入 750 μL DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 于 OD_{550} 处测定吸光值。将加入灭活酶液(90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min)的试验组设定为对照组。琼胶酶酶活力单位(U)的定义为每分钟水解琼脂糖产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。

将各反应体系分别置于不同的温度条件下(0、10、20、30、40、50、60 和 70 $^{\circ}\text{C}$)反应 40 min 并测定酶活性, 以确定最适反应温度。在不同 pH 下(pH 值 3.0–8.0, 50 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液; pH 值 8.0–9.0, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 值 10.0–10.6, 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液)测定酶活性以确定最适反应 pH, 并将试验组最大琼胶酶活性设定为 100%。

在终浓度为 1 mmol/L 的金属离子溶液 [MgCl_2 、 CuSO_4 、 CaCl_2 、 NaCl 、 ZnSO_4 、 MnSO_4 、 FeSO_4 、 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 和 KCl]和化学试剂(EDTA、SDS、 β -巯基乙醇和 DTT)中测定酶活性以确定金属离子和化学试剂对酶活性的影响, 并将对照组琼胶酶活性设定为 100%。本部分所有试验均进行 3 组生物学重复测定。

1.3.4 琼胶酶动力学性质测定

配置不同质量分数的琼脂糖溶液(0.5%、0.75%、1.0%、1.25%和 1.5%), 在各个酶的最适反应条件下测定不同浓度底物条件下纯化重组琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 的酶活力, 利用双倒数曲线法计算酶动力学参数 (K_m 、 V_{max} 和 k_{cat})。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Gene	Primer name	Sequence (5'→3')
<i>agaW3418</i>	3418F	GCTACAAAAACACCAGACACATCC
	3418R	TTTGTTAATAGATCCGAATCGTCG
<i>agaW3419</i>	3419F	TCAACGTTAGTGACTTCTTTTGAAAG
	3419R	TGATACGTATTTTCTACGTACCCATC
<i>agaW3472</i>	3472F	ACACCAACTATAAATGATGTGGTTAG
	3472R	CTTATAACGCCGTTTATACATACAGC

1.3.5 琼胶酶 AgaW3472 稳定性测定

将酶液分别置于 10、20 和 30 °C 条件下孵育, 每隔 10 min 测定一次剩余酶活, 并将未经处理的酶活性设定为 100%, 以此探究重组琼胶酶的热稳定性。在不同浓度 Ca^{2+} (0、1、2、3、4 和 5 mmol/L) 和 Mg^{2+} (0、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30 和 40 mmol/L) 条件下, 于 30 °C 下反应 40 min, 将未添加金属离子的酶活性设定为 100%, 以此来研究特定金属离子浓度对琼胶酶活性的影响。

1.3.6 产酶条件优化

采用 LB、SOB、SOC、2×YT 这 4 种培养基对重组琼胶酶的基础培养基进行优化, 选取最适培养基进行下一步试验。随后, 对诱导温度(17、22、27、32 和 37 °C)和 IPTG 浓度(0、0.01、0.1、1.0 和 2.0 mmol/L)进行优化。在培养基中添加不同浓度 MgCl_2 (0、10、20、30 和 40 mmol/L) 和不同碳源(1%乳糖、麦芽糖、葡萄糖和甘油), 以优化培养基成分。将含 0.5 mol/L NaCl 和不含 0.5 mol/L NaCl 的脯氨酸、谷氨酸和甜菜碱(终浓度 20 mmol/L)这 3 种天然渗透剂分别添加到培养基中并测定酶活。酶活测定方法见 1.3.3, 特异性产酶率为每克干细胞产生的琼胶酶活性, 总产酶量为每升发酵液产生的琼脂酶活性, 以最高值为 100% 分别计算其相对特异性产酶率和相对总产酶量, 以此来评估不同发酵条件对产酶的影响。

2 结果与分析

2.1 序列进化分析

序列分析结果发现基因 *agaW3418* 的核酸序列全长为 2 916 bp, 编码 971 个氨基酸, 分子量为 107.9 kDa; 基因 *agaW3419* 的核酸序列全长为 3 021 bp, 编码 1 006 个氨基酸, 分子量约为 109.6 kDa; 基因 *agaW3472* 的核酸序列全长为 2 235 bp, 编码 744 个氨基酸, 分子量约为 85.4 kDa。

系统发育分析表明 *AgaW3418*、*AgaW3419* 和 *AgaW3472* 这 3 条琼胶酶分别与 *Vibrio* sp. CN41 *Aga41A* (登录号: HM563685.1)、*Vibrio* sp. EJY3 *agarase* (登录号: WP_014232191.1) 和 *Vibrio* sp. BY *agarose* (登录号: AIW39921.1) 具有最近的系统发育关系, 且 3 种琼胶酶均与 GH50 家族琼胶酶聚类。纯化后 3 种重组琼胶酶均得到了单一条带(图 1D、1E), 且与预测大小相近, 可以确定其为目标蛋白。

2.2 温度对琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 酶活性的影响

琼胶酶 *AgaW3418*、*AgaW3419* 和 *AgaW3472* 的在温度分别为 50 °C (图 2A)、60 °C (图 2E) 和 30 °C (图 2I) 条件下, 发挥作用的能力最强。其中琼胶酶 *AgaW3418* 在 10 °C 其相对酶活为 33%, 0 °C 条件下其相对酶活为 25% (图 2A); 琼胶酶 *AgaW3419* 在 10 °C 时其相对酶活为 12%, 0 °C 条件下其相对酶活下降至 5% (图 2E); 琼胶酶 *AgaW3472* 在 30 °C 条件下酶活最高, 20 °C 条件下其相对酶活为 51%, 10 °C 时其相对酶活为 27%, 0 °C 条件下其相对酶活为 26% (图 2I)。因此, *AgaW3418* 和 *AgaW3472* 具有良好的冷适应性, 但是 *AgaW3419* 冷适应性较差。

2.3 pH 对琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 酶活性的影响

琼胶酶 *AgaW3418*、*AgaW3419* 和 *AgaW3472* 在 pH 值分别为 6.0 (图 2B)、7.0 (图 2F) 和 7.0 (图 2G) 条件下, 酶活最高。其中琼胶酶 *AgaW3418* 在 pH 值为 3.0 和 4.0 时只有 3.5% 和 7.0% 相对酶活(图 2B); 琼胶酶 *AgaW3419* 在 pH 值 4.0–9.0 之间依旧保持 50% 以上的相对酶活, 证明其 pH 作用范围较为广泛(图 2F); 琼胶酶 *AgaW3472* 在 pH 值 4.0–10.0 之间的依旧保持 40% 以上的相对酶活(图 2G)。

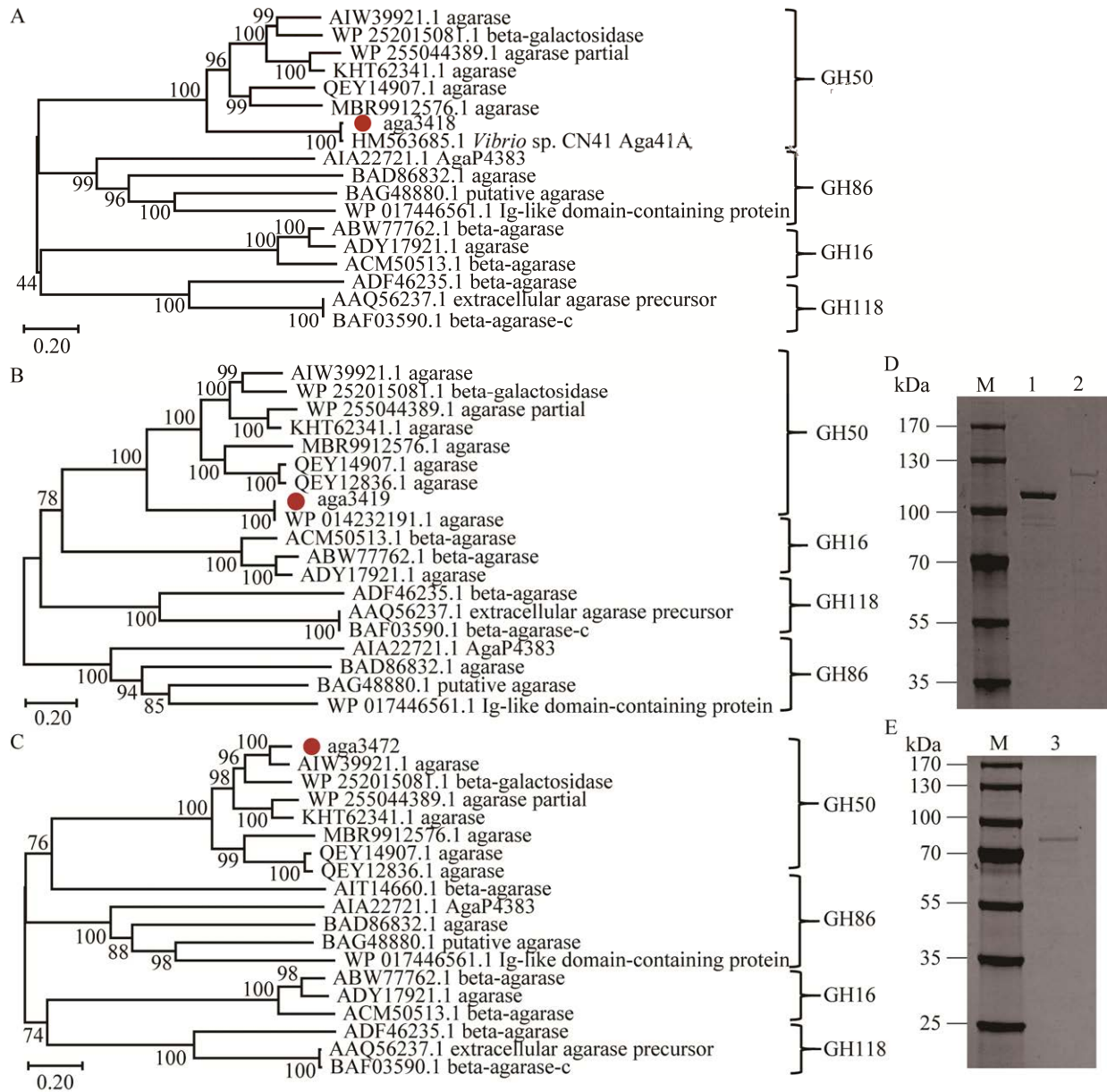


图 1 琼胶酶序列系统发育与重组琼胶酶 SDS-PAGE 分析

Figure 1 The phylogenetic analysis and SDS-PAGE results for the agarases. A–C: The phylogenetic analysis of AgaW3418, AgaW3419, and AgaW3472, respectively. D–E: SDS-PAGE of recombinant AgaW3418, AgaW3419, and AgaW3472, respectively. Lanes M, 1, 2, and 3 were the standard protein molecular weight marker, purified recombinant AgaW3418, AgaW3419, and AgaW3472, respectively.

2.4 金属离子对琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 酶活性的影响

金属离子 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对琼胶酶 AgaW3418 的酶活具有促进作用, 其中 Fe^{2+} 的促进最强, 将相对酶活提高至 126%; 金属离子 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、

Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 K^{+} 对琼胶酶 AgaW3418 的酶活具有抑制作用, 其中金属离子 Cu^{2+} 的抑制作用最强, 将相对活性降低至 32% (图 2C)。金属离子 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 K^{+} 对于琼胶酶 AgaW3419 具有促进作用, Fe^{3+} 的促进作用最强,

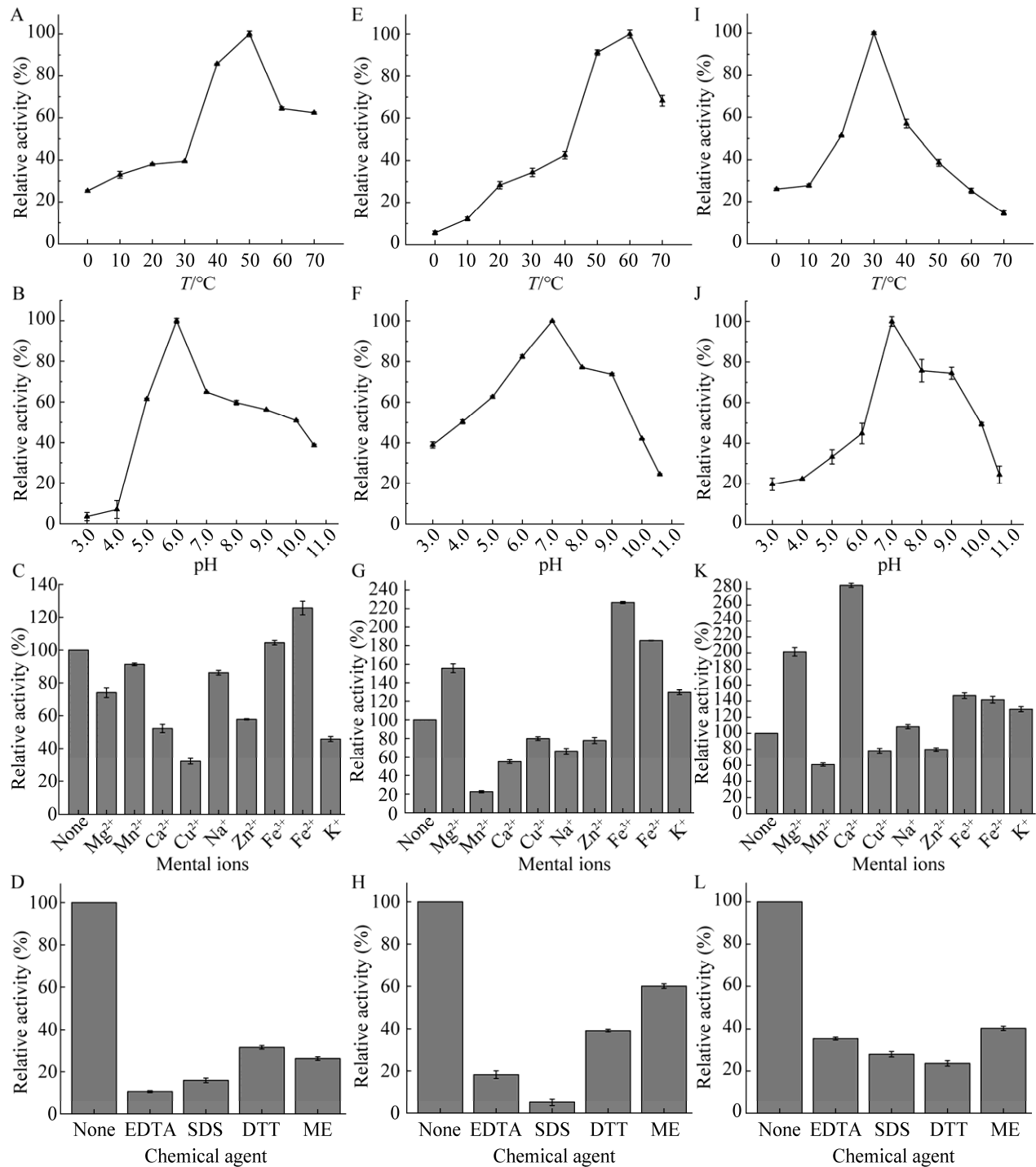


图 2 温度、pH、金属离子和化学试剂对琼胶酶活性的影响

Figure 2 The effects of temperature, pH, metal ions, and chemical agents on the relative activity of the agarases. A–D: The effects of temperature, pH, metal ions, and chemical reagents on the activity of AgaW3418, respectively. E–H: The effects of temperature, pH, metal ions and chemical reagents on the activity of AgaW3419, respectively. I–L: The effects of temperature, pH, metal ions and chemical reagents on the activity of AgaW3472, respectively. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

相对酶活提高至 185%；金属离子 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对琼胶酶 AgaW3418 的酶活具有抑制作用(图 2G)。金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 K^+ 对于琼胶酶 AgaW3472 的酶活具有促进作用,其中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的促进作用最强,将相对酶活分别提高至 284%和 201%；金属离子 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对于琼胶酶 AgaW3472 的酶活具有抑制作用,其中金属离子 Mn^{2+} 的抑制作用最强,相对酶活下降为 60%(图 2K)。

2.5 化学试剂对琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 酶活性的影响

本研究采用的 4 种化学试剂 EDTA、SDS、DTT 和 β -巯基乙醇对 3 种酶的活性 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 起到抑制作用。其中 EDTA 对琼胶酶 AgaW3418 酶活性的抑制作用最强,将其相对酶活下降至 10.6% (图 2D)；SDS 对琼胶酶 AgaW3419 酶活性的抑制作用最强,将其相对酶活下降至 5.0% (图 2H)；DTT 对琼胶酶 AgaW3472 的酶活性抑制作用最强,将其相对酶活性下降至 23% (图 2L)。

2.6 琼胶酶 AgaW3418A、AgaW3419 和 AgaW3472 动力学参数测定

琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 的 K_m 分别为(0.13±0.02) mg/mL、(0.10±0.01) mg/mL

和 (0.10±0.01) mg/mL； V_{max} 分别为 (2.40±0.10) U/mg、(1.90±0.15) U/mg 和(2.71±0.19) U/mg； k_{cat} 分别为(140.83±5.72) s^{-1} 、(103.21±7.94) s^{-1} 和 (188.00±12.99) s^{-1} (表 2)。其中琼胶酶 AgaW3472 的 K_m 值最低,对底物的亲和力最大； V_{max} 和 K_{cat} 值最高,催化效率最高,在 3 个琼胶酶中表现出最好的动力学活性。

2.7 热稳定性

通过上述试验,证明 AgaW3472 在本研究的琼胶酶中具有最高的酶活性。因此,后续试验着重对该酶进行详细研究分析。研究表明,琼胶酶 AgaW3472 在 10 °C 和 20 °C 下都可以保持良好的稳定性,孵育 1 h 后依旧维持 80%的相对酶活。但是,该酶在 30 °C 下的稳定性较差。在孵育 20 min 后,琼胶酶 AgaW3472 相对酶活下降至 85%；孵育 40 min 后,其相对酶活降低 53%；孵育 60 min 后,琼胶酶 AgaW3472 的相对酶活为 42% (图 3A)。

表 2 琼胶酶动力学参数

Table 2 The kinetic parameters of agarases

Agarase	K_m (mg/mL)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	R^2
AgaW3418	0.13±0.02	2.40±0.10	140.83±5.72	0.992 2
AgaW3419	0.10±0.01	1.90±0.15	103.21±7.94	0.996 5
AgaW3472	0.10±0.01	2.71±0.19	188.00±12.99	0.995 2

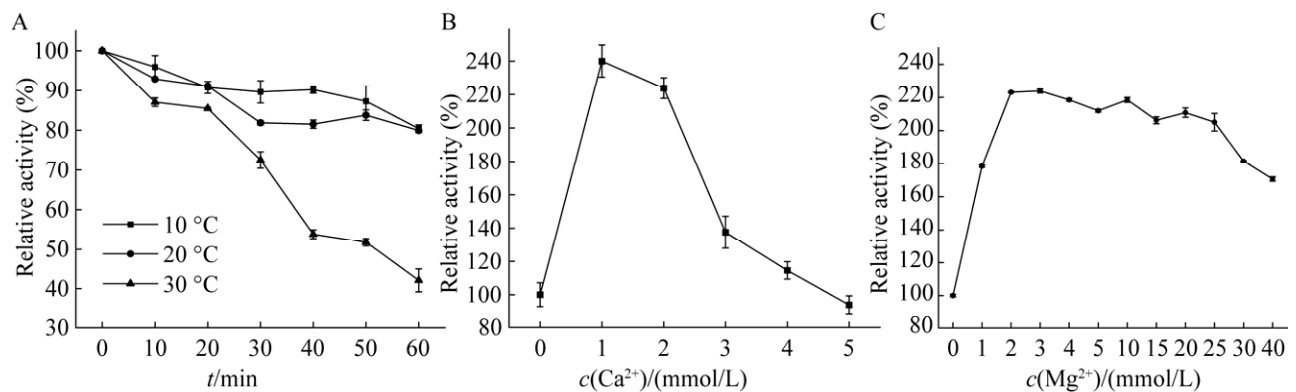


图 3 琼胶酶 AgaW3472 热稳定性以及 Ca^{2+} 浓度和 Mg^{2+} 浓度对酶活性影响

Figure 3 The stability of the agarase activity. A: The thermal stability of agarase AgaW3472. B: The influence of Ca^{2+} concentrations on the agarase activity. C: The influence of Mg^{2+} concentrations on the agarase activity. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

2.8 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对AgaW3472酶活性影响

本研究选取对琼胶酶AgaW3472活性促进作用最强的2种金属离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 进行后续研究,以进一步探究其浓度对酶活促进作用的影响。结果表明, Ca^{2+} 浓度为1 mmol/L时,对琼胶酶AgaW3472活性的促进作用最强,将相对酶活提高至240%。继续增加 Ca^{2+} 浓度,会对该酶活性产生抑制作用(图3B)。 Mg^{2+} 浓度为

3 mmol/L时,对琼胶酶AgaW3472活性的促进作用最强,将相对酶活提高至224%,但继续增加镁离子浓度对琼胶酶AgaW3472的酶活性没有明显的影响(图3C)。

2.9 产酶条件优化

培养基类型对AgaW3472的特异性产酶率和总产酶量均有较大的影响,且SOB培养基能够更大程度地提高琼胶酶总产酶(图4A)。在培

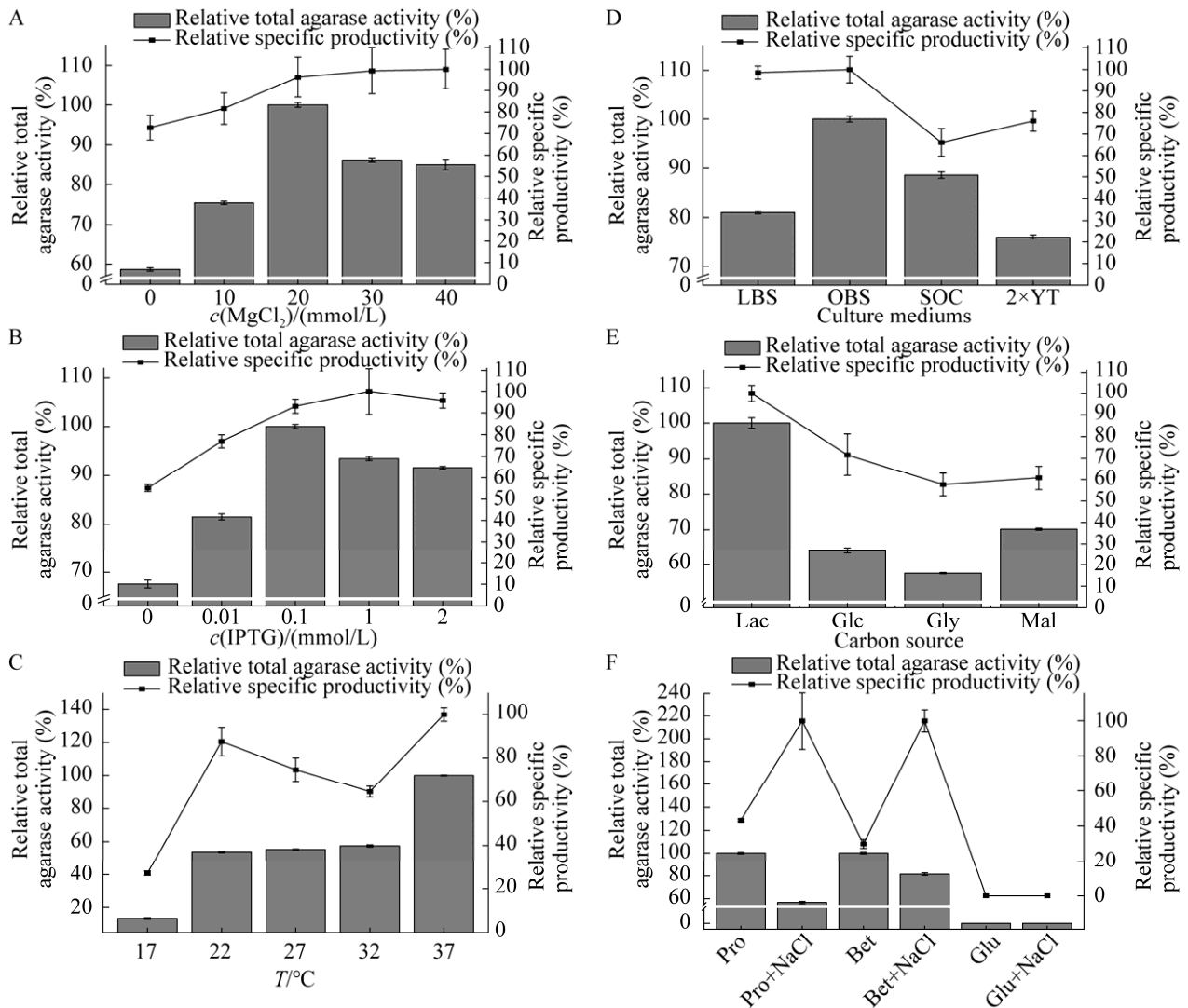


图4 不同培养基条件对琼胶酶AgaW3472产酶的影响

Figure 4 The influence of the basic fermentation media on AgaW3472 expression production. A: The influence of MgCl_2 concentration. B: The influence of temperature IPTG concentration. C: The influence of temperature. D: The influence of culture mediums. E: The influence of carbon source. F: The influence of compatible solute including proline, betaine, and glutamate on AgaW3472 expression production, respectively. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent standard error.

培养基中添加不同浓度的 $MgCl_2$ 对 AgaW3472 的特异性产酶率和总产酶量均有提高,且浓度为 20 mmol/L 时为最优(图 4C)。乳糖为 AgaW3472 产酶的最优碳源,且 1% (质量体积比)的乳糖可以最大程度地提高特异性产酶率和总产酶量(图 4D)。AgaW3472 产酶的最佳诱导温度和 IPTG 浓度分别为 37 °C 和 0.1 mmol/L (图 4B、4E)。脯氨酸和甜菜碱的添加提高总产酶量,但是额外添加 0.5 mmol/L NaCl 会抑制产酶量(图 4F)。添加谷氨酸则完全抑制酶蛋白的表达(图 4F)。

3 讨论与结论

本研究对深海菌株 WPAGA4 中 3 条琼胶酶的酶活性质进行研究。其中,琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 的最适反应温度分别为 50 °C 和 60 °C,在较高温度下仍具有较强降解活性,这与包括 VejGH50B、VejGH50C^[20]、Aga50A 和 Aga50C^[21]等在内的琼胶酶相似,而琼胶酶 AgaW3472 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ZSL-2^[22]、交替单胞菌 (*Alteromonas* sp.) SH-1^[23]等来源的琼胶酶最适反应温度一致 (30 °C)。琼胶酶 AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 在 pH 值分别为 6.0、7.0 和 7.0 条件下,发挥作用的能力最强,且在 pH 值 6.0–10.0 之间都保持 40 % 以上的相对酶活,与 Aga50A、Aga50B、Aga50C^[21]和 AgaY^[24]相比具有较好的 pH 耐受性。

微生物是海洋碳循环的重要推动者,而多糖代谢是碳循环的重要组成部分^[25]。前人文献中分离得到若干具有多糖降解活性的深海弧菌,如深海弧菌 *Vibrio* sp. JAM-A9m 和 *Vibrio* sp. 4-3 分别被检测到具有藻酸盐裂解酶活性^[26]和淀粉酶活性^[27]。至今为止,已从深海环境中分离得到包括希瓦氏菌 (*Shewanella* sp.) WPAGA9^[16]、太平洋火色杆菌 (*Flammeovirga pacifica*)

WPAGA1^[28]、微泡菌 (*Microbulbifer* sp.) JAMB A3^[29]等多种具有琼胶酶的菌株。本研究揭示了深海需钠弧菌 WPAGA4 菌株的 3 种琼胶降解酶活性,证明该菌株能够参与深海多糖降解,在深海低温条件下直接降解海藻琼胶作为碳源,参与深海碳循环过程。

在所研究的 3 条琼胶酶中, AgaW3418、AgaW3419 和 AgaW3472 的比酶活分别为 10.20、23.37 和 42.10 U/mg,其中琼胶酶 AgaW3472 具有较强的降解活性,因此本研究进一步探究了该琼胶酶的酶学性质。结果表明, AgaW3472 在 20–40 °C 温度范围内仍保持较强的降解活性,同时在 10 °C 和 20 °C 条件下具有良好的稳定性,在室温下不易失活,因此 AgaW3472 能够在较低温度下高效制备寡糖,从而节约加热琼胶底物过程中所消耗的能量,降低琼胶寡糖的制备成本^[30]。此外, Ca^{2+} 在 1 mmol/L 浓度下促进作用最强,将相对酶活提高至 240%; 3 mmol/L 浓度的 Mg^{2+} 促进作用最强,将相对酶活提高至 223%。超过 5 mmol/L 浓度的 Ca^{2+} 对琼胶酶 AgaW3472 酶活性起到抑制作用,但是超过 40 mmol/L 浓度的 Mg^{2+} 对酶活性没有明显的抑制或促进作用。上述结果表明,钙镁离子可以提高琼胶酶 AgaW3472 的酶活,从而降低琼胶寡糖生产成本。

本研究从一株深海需钠弧菌 WPAGA4 菌株中克隆并鉴定了 3 种新型 β 琼胶酶,经过系统发育研究发现三者均属于 GH50 糖苷水解酶家族,为该菌株在深海环境中的琼胶利用过程提供分子基础。同时,选取琼胶酶 AgaW3472 进行产酶条件优化,其较高的琼胶降解活性、较低最适反应温度、低温下稳定的酶活等性质,可以减少琼胶寡糖制备过程中的生产成本,提高经济效益,为相关寡糖的工业生产提供潜在的生物学工具。

参考文献

- [1] LEE WK, LIM YY, LEOW ATC, NAMASIVAYAM P, ONG ABDULLAH J, HO CL. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 23-30.
- [2] ROCHAS C, LAHAYE M, YAPHE W, VIET MTP. ¹³C-N.M.R.-spectroscopic investigation of agarose oligomers[J]. Carbohydrate Research, 1986, 148(2): 199-207.
- [3] DUCKWORTH M, YAPHE W. The structure of agar[J]. Carbohydrate Research, 1971, 16(1): 189-197.
- [4] KAZŁOWSKI B, PAN CL, KO YT. Separation and quantification of neoagar- and agaro-oligosaccharide products generated from agarose digestion by β -agarase and HCl in liquid chromatography systems[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(14): 2443-2450.
- [5] 袁志坚, 包磊, 张灵敏, 储彬, 毛萱, 汤顺清. 大型海藻多糖-琼脂糖的改性及作为皮肤敷料的研究: 琼脂糖的降解及其特性[J]. 材料导报, 2010(2): 460-462.
- YUAN ZJ, BAO L, ZHANG LM, CHU B, MAO X, TANG S. Modification of seaweed polysaccharide-agarose and its application as skin dressing—degradation of agarose and its features[J]. Materials Reports, 2010(2): 460-462 (in Chinese).
- [6] 周凤, 谭黄虹, 孙慧敏, 郑兆娟, 欧阳嘉. 基于海藻多糖的生物转化研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 326-334.
- ZHOU F, TAN HH, SUN HM, ZHENG ZJ, OUYANG J. Progress in biotransformation of red algal polysaccharides for industrial utilization[J]. Food Science, 2021, 42(13): 326-334 (in Chinese).
- [7] WU SC, WEN TN, PAN CL. Algal-oligosaccharide-lysates prepared by two bacterial agarases stepwise hydrolyzed and their anti-oxidative properties[J]. Fisheries Science, 2005, 71(5): 1149-1159.
- [8] ENOKI T, TOMINAGA T, TAKASHIMA F, OHNOGI H, SAGAWA H, KATO I. Anti-tumor-promoting activities of agaro-oligosaccharides on two-stage mouse skin carcinogenesis[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(7): 1145-1149.
- [9] KOBAYASHI R, TAKISADA M, SUZUKI T, KIRIMURA K, USAMI S. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(1): 162-163.
- [10] YUN EJ, LEE AR, KIM JH, CHO KM, KIM KH. 3,6-anhydro-L-galactose, a rare sugar from agar, a new anticariogenic sugar to replace xylitol[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 976-983.
- [11] 问莉莉, 董静静, 李思东. 琼胶寡糖的制备及其应用研究进展[J]. 山东化工, 2011, 40(5): 28-30.
- WEN LL, DONG JJ, LI SD. Synthesis and application progress of agaro-oligo saccharide[J]. Shandong Chemical Industry, 2011, 40(5): 28-30 (in Chinese).
- [12] 缪伏荣, 李忠荣. 琼胶的降解及其产物的开发应用[J]. 现代农业科技, 2007(2): 125-128.
- MIAO FR, LI ZR. Degradation of agar gum and the development and application of its products[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2007(2): 125-128 (in Chinese).
- [13] HONG SJ, LEE JH, KIM EJ, YANG HJ, PARK JS, HONG SK. Toxicological evaluation of neoagarooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agar[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017, 90: 9-21.
- [14] DAY DF, YAPHE W. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and *p*-nitrophenyl α -galactoside hydrolases[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1975, 21(10): 1512-1518.
- [15] 马翠萍, 石超. 琼胶酶研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 107-111.
- MA CP, SHI C. Advance in research of agarase[J]. Microbiology China, 2008, 35(1): 107-111 (in Chinese).
- [16] WANG WX, WANG JX, YAN RH, ZENG RY, ZUO YQ, WANG DQ, QU W. Expression and characterization of a novel cold-adapted and stable β -agarase gene *agaW1540* from the deep-sea bacterium *Shewanella* sp. WPAGA9[J]. Marine Drugs, 2021, 19(8): 431.
- [17] 莫意平, 娄永江, 吴祖芳. 海洋微生物低温酶特性及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(4): 101-103.
- MO YP, LOU YJ, WU Z. Characteristics of marine microbial cold-adapted enzymes and their role in the food industry [J]. Food Research and Development. 2004, 25(4): 101-103 (in Chinese).
- [18] ZHANG MY, WANG JX, ZENG RY, WANG DQ, WANG WX, TONG XF, QU W. Agarose-degrading characteristics of a deep-sea bacterium *Vibrio natriegens* WPAGA4 and its cold-adapted GH50 agarase Aga3420[J]. Marine Drugs, 2022, 20(11): 692.

- [19] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
ZHAO K, XU PJ, GU GY. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method[J]. Food Science, 2008, 29(8): 534-536 (in Chinese).
- [20] YU S, YUN EJ, KIM DH, PARK SY, KIM KH. Dual agarolytic pathways in a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain EJY3: molecular and enzymatic verification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(6): e02724-19.
- [21] ANGRAENI SR, ANSORGE-SCHUMACHER MB. Characterization and modeling of thermostable GH50 agarases from *Microbulbifer elongatus* PORT2[J]. Marine Biotechnology, 2021, 23(5): 809-820.
- [22] ZIAYODDIN M, MANOHAR S, LALITHA J. Isolation of agar degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2 from a marine sample[J]. Bioscan, 2010, 5(2): 279-283.
- [23] LEE SJ, SHIN DY, KIM JD, LEE DG, LEE SH. Characterization of α -agarase from *Alteromonas* sp. SH-1[J]. KSBB Journal, 2016, 31(2): 113-119.
- [24] 时岩玲, 于文功, 路新枝. 海洋紫色杆菌 β -琼胶酶的分离纯化及性质[J]. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(4): 497-502.
SHI YL, YU WG, LU XZ. Purification and characterization of a new β -agarase from marine bacterium *Janthinobacterium*[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2008, 54(4): 497-502 (in Chinese).
- [25] ARNOSTI C, WIETZ M, BRINKHOFF T, HEHEMANN JH, PROBANDT D, ZEUGNER L, AMANN R. The biogeochemistry of marine polysaccharides: sources, inventories, and bacterial drivers of the carbohydrate cycle[J]. Annual Review of Marine Science, 2021, 13(1): 81-108.
- [26] UCHIMURA K, MIYAZAKI M, NOGI Y, KOBAYASHI T, HORIKOSHI K. 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.
- [27] HAMAMOTO T, HORIKOSHI K. Characterisation of an amylase from a psychrotrophic *Vibrio* isolated from a deep-sea mud sample[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 84(1): 79-83.
- [28] GAO BL, JIN M, LI L, QU W, ZENG RY. Genome sequencing reveals the complex polysaccharide-degrading ability of novel deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 600.
- [29] MIYAZAKI M, NOGI Y, OHTA Y, HATADA Y, FUJIWARA Y, ITO S, HORIKOSHI K. *Microbulbifer agarilyticus* sp. nov. and *Microbulbifer thermotolerans* sp. nov., agar-degrading bacteria isolated from deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(5): 1128-1133.
- [30] 孙溢, 洪义国, 李勃生, 修朝阳. 海洋微生物低温酶特性及其在工业中的潜在用途[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(3): 44-49.
SUN M, HONG YG, LI BS, XIU ZY. Characteristic of low-temperature enzyme from marine bacteria and its potential use on the industry[J]. Marine Fisheries Research, 2002, 23(3): 44-49 (in Chinese).