

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (7):896-901; 4 July 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一种海洋琼胶酶的分离纯化、酶学性质研究及降解产物分析

解卉, 韩宝芹*, 董文, 杨艳, 常菁, 彭燕飞, 刘万顺

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要: 【目的】对海洋 *Agarivorans albus* QM38 菌株所产琼胶酶的纯化和酶学性质进行了研究。【方法】发酵液通过离心、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、Sephacryl S-100 凝胶过滤等纯化步骤得到 SDS-PAGE 电泳级纯酶, 并用质谱对酶的降解产物进行分析。【结果】得到琼胶酶 A, 纯化倍数为 17.6 倍, 收率为 15.21%, SDS-PAGE 测定其分子量为 127.8 kDa。对琼胶酶 A 进行了进一步的性质分析, 其最适反应温度为 35℃, 最适反应 pH 为 7.6, 最适底物浓度为 0.9%, 多数金属离子为其活性抑制剂。琼胶酶 A 的降解产物经质谱分析主要为四糖和六糖。【结论】从菌株 QM38 的发酵液中纯化得到的琼胶酶 A 具有降解凝胶态琼胶的能力, 其分子量与以往报道过的琼胶酶不同。

关键词: 琼胶酶; 分离纯化; 性质; 降解产物分析

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0896-06

琼胶 (agar) 是一种亲水性多糖, 是由琼胶糖 (agarose) 和硫琼胶 (agarpectin) 组成的混合物^[1]。琼胶寡糖一般是指聚合度为 2-10 的低聚糖, 根据结构的不同可以分为以半乳糖为还原端的新琼胶寡糖和以 3,6-内醚半乳糖为还原端的琼胶寡糖。

在对琼胶寡糖的研究中, 常用酸降解和酶降解两种方法来获得低分子量的琼胶寡糖。较早使用的酸降解法难获得特定聚合度的寡糖且产物组分复杂。酶降解法, 对琼胶酶的分离纯化始于 20 世纪 50 年代, 至今已有多钟不同性质的琼胶酶得到了分离纯化。根据作用方式的不同, 降解琼胶的琼胶酶可以分为两类: (1) α -琼胶酶, 专一降解琼胶糖中的 α -1,3 糖苷键, 生成以 3,6-内醚半乳糖为还原性末端的琼胶低聚糖 (agarooligosaccharides) 系列。(2) β -琼胶酶, 专一降解琼胶糖中的 β -1,4 糖苷键, 生成以半乳糖为还原性末端的新琼胶低聚糖系列 (neoagarooligosaccharides)^[2]。

近年来, 随着糖生物学和化学研究的飞速发展,

人们在对琼胶寡糖结构研究的基础上对其生物活性也进行了深入探讨。日本的 Enoki 等认为琼胶寡糖具有诱导细胞凋亡、抑制 NO 等作用^[3]。另有研究发现琼胶寡糖具抗氧化^[4-5]、促进双歧杆菌生长、清除自由基等多种生理功能^[6-8]。同时研究还认为, 这些活性与寡糖的聚合度 (DP) 有着密切的关系^[9-10]。

目前分离得到的产琼胶酶的菌株大多酶活力低, 如果以平均每毫升发酵液每分钟降解产生 1 μmol 还原糖统一酶活单位, Dong 等^[11]通过克隆表达获得的大肠杆菌重组菌产琼胶酶的能力也仅在 7.13 U, 多数报道的菌株产琼胶酶活力在 10 U 以下^[12-13], 无法满足工业化生产的需求, 阻碍了琼胶寡糖的构效关系研究乃至应用开发的进一步开展。本实验从实验室筛选得到的具有较高琼胶酶活力的菌株出发, 以优化后的发酵培养条件进行培养, 对该菌株产生的琼胶酶进行了分离纯化并进行了酶的性质研究和降解产物分析。

* 通信作者。Tel/Fax: +86-532-82032105; E-mail: baoqin@ouc.edu.cn

作者简介: 解卉 (1983-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物发酵及酶的分离纯化。E-mail: pingguo0526@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-01; 修回日期: 2009-03-27

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基:自海水中筛选得到,经鉴定为 *Agarivorans albus*, 编号为 QM38^[4], 由本实验室保存。

1.1.2 培养基:液体发酵培养基组成:琼胶 0.5%, NaCl 3.0%, 尿素 0.1%, 酵母粉 0.1%, MgSO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.1%, CaCl₂ 0.02%, FeSO₄ 0.002%, Fe₂(SO₄)₃ 0.001%; 接种后置于 30℃ 恒温振荡培养箱中振荡培养, 36 h 后收集发酵液, 测酶活力。

1.1.3 主要试剂和仪器:琼胶:细菌级,杭州微生物试剂有限公司;蛋白标准品,Amersham 公司;DEAE-Sephacryl S-100 凝胶, Pharmacia 公司;其它试剂为国产分析纯;GL-20 全自动高速冷冻离心机,中国湘西仪器仪表总厂;FD-1D 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;HD-21 C-B 型核酸蛋白检测仪,上海康华生化仪器制造厂;LM17-1A 台式记录仪,上海康华生化仪器制造厂;DBS-100 电脑全自动部分收集器,上海康华生化仪器制造厂;DYY 6C 型电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 琼胶酶活力的测定——DNS 法

参考 Imoto 等^[5]方法并作适当的修改。取发酵液的离心上清液 0.1 mL 及 1.9 mL 以磷酸缓冲液 (pH7.6) 配制的浓度为 1.2% 的琼胶底物, 40℃ 反应 10 min 后煮沸 5 min 灭活, 以反应液中还原糖的增加量作为检测酶活力的指标, 反应液中还原糖的量以 DNS 法进行测定。以烘干至恒重的 D-半乳糖做标准曲线, 根据反应组和对照组的差值来计算还原糖的产生量。将平均每 1 mL 发酵液每分钟降解产生 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.3 琼胶酶的分离纯化

将琼胶酶发酵液于低温下离心除去菌体及未降解的底物, 上清液以硫酸铵盐析得沉淀物。沉淀物透析并冷冻干燥得到粗酶粉。将粗酶粉用 pH7.5 的 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解, 并平衡 DEAE-Sephacryl S-100 阴离子交换柱 (Φ2 cm × 10 cm), 上样。用同样缓冲液配制的 0~0.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 检测波长为 280 nm, 洗脱液分部收集, 取有酶活力部分进行冷冻干燥, 得干粉。干粉用相同缓冲液溶解, 经 Sephacryl S-100 凝胶柱 (Φ1.6 cm × 80 cm) 进一步纯化, 洗脱流速 0.1 mL/min, 收集酶活力组分, 冷冻干燥, 获得纯化

琼胶酶制品。

1.4 酶的性质研究

1.4.1 SDS-PAGE 纯度检测及相对分子量的确定^[6]:采用不连续垂直平板电泳系统, 对纯化得到的琼胶酶进行 SDS-PAGE 纯度和分子量测定。根据样品蛋白质相对迁移距离对照标准蛋白质的相对迁移距离, 测定出琼胶酶的相对分子量。

1.4.2 酶的理化性质的确定:① 最适反应温度的测定: 分别以 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃ 作为酶反应温度, 保温一段时间后测反应液的酶活, 确定该酶的最适反应温度。② 最适反应 pH 值的测定: 分别选取 pH 值为 4.00、4.60、5.00、5.60、6.00、6.60、7.00、7.60、8.00、8.60 和 9.00 的缓冲液作为反应体系中的缓冲剂, 以确定该酶的最适反应 pH 值。③ 金属离子对酶活性的影响: 向琼胶酶溶液中分别加入 Pb²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 离子, 最终离子浓度为 0.5 mmol/L, 4℃ 下放置 10 min 后测定酶活力。④ 不同底物浓度对酶活性的影响: 以浓度 (W/V) 分别为 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1.2%, 1.6%, 1.8% 的琼胶为底物, 测定酶活力, 确定酶降解的最适底物浓度。⑤ 酶的底物专一性研究: 分别以浓度为 1.0% (W/V) 的琼胶、CM-纤维素钠、褐藻酸钠、卡拉胶, 及岩藻多糖作为底物, 测定琼胶酶的酶活力, 研究该酶的底物专一性。

1.5 酶解产物分析

1.5.1 琼胶寡糖的制备:称取适量的琼胶底物用 0.02 mol/L, pH 7.6 的磷酸盐缓冲液配成最适降解浓度, 煮沸 5 min 使之完全溶解, 置于最适反应温度下冷却保温待用。向底物溶液中加入足量的酶液, 在最适反应温度下反应 12 h 后沸水浴加热 10 min 灭活酶蛋白, 冷却、离心 30 min 除去不溶物。经浓缩后冷冻干燥得到琼胶寡糖。

1.5.2 酶解产物的分析:采用四级杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-Tof Global) 分析。

2 结果和分析

2.1 酶的分离纯化

经硫酸铵盐析和透析的蛋白, 经 DEAE-Sephacryl S-100 阴离子交换柱纯化 (图 1)。收集其中活力最高的部分峰 1, 再经 Sephacryl S-100 凝胶柱分离纯化, 得到两种不同分子量的具有酶活力的组分, 结果见图 2。SDS-PAGE 显示均为单条带。发酵液经过一系列的分离纯化, 得到电泳纯琼胶酶 A、B, 其

纯化倍数分别为 17.6 倍和 15.4 倍, 收率分别为 15.21% 和 7.27%。分离纯化步骤与结果见表 1。

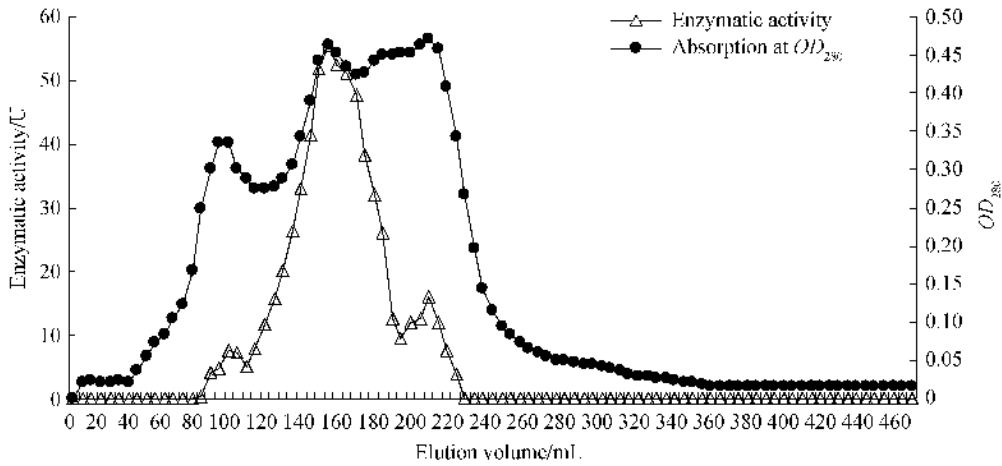


图 1 DEAE-Sepharose F.F 阴离子交换层析

Fig.1 DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography of agarases.

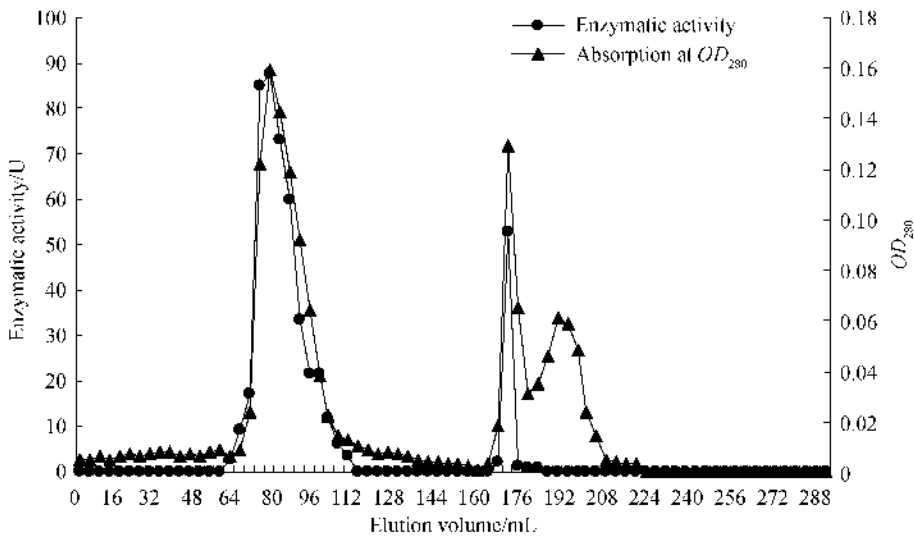


图 2 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析

Fig.2 Sephacryl S-100 chromatography of agarases.

表 1 琼胶酶的纯化结果

Table 1 Purification of agarase

Purification Step	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/U·mg ⁻¹	Purification fold/%	Yield/%
Crude extract	39316.97	76.40	514.62	1	100
Ammonium sulfate precipitation	27657.08	50.03	552.81	1.07	70.34
DEAE-Sepharose F. F chromatography	9641.04	1.67	5773.08	11.22	24.52
Sephacryl S-100 chromatography of agarase A	5982.72	0.66	9064.73	17.61	15.21
Sephacryl S-100 chromatography of agarase B	2860.67	0.36	7946.31	15.44	7.27

2.2 酶的性质

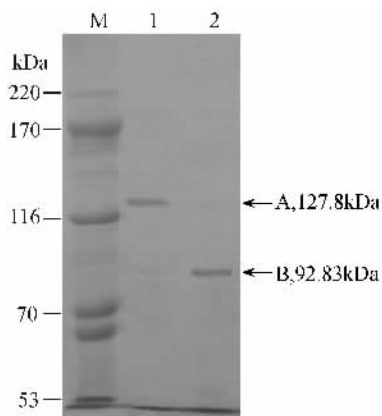
2.2.1 酶的相对分子量: 根据 SDS-PAGE 的试验结果 (图 3), 对比样品蛋白质相对迁移距离与已知分子量标准蛋白的相对迁移距离, 计算得到样品蛋白质的分子量为: 酶 A, 127.8 kDa; 酶 B, 92.83 kDa。

2.2.2 酶 A 的理化性质确定: 酶 A 的最适反应温

度: 根据试验结果, 琼胶酶 A 的最适反应温度在 35℃, 且仅在 35℃ ~ 45℃ 之间保持较高的酶活性, 在 60℃ 时即丧失 80% 的酶活力。该实验结果显示酶 A 对温度依赖性较高且具有降解凝胶态琼胶的能力。

酶 A 的最适反应 pH 值: 缓冲液的 pH 对酶的降解活性有较大的影响, 琼胶酶 A 在 pH 7.6 有最高酶

活性,在 pH7.0 ~ 8.0 的范围内能保持 60% 以上的酶活力。



3 SDS-PAGE 结果

Fig.3 The result of SDS-PAGE. M. Marker; 1. agarase A; 2. agarase B.

现,实验涉及到的金属离子均对琼胶酶 A 具有不同程度的抑制作用,其中 Fe^{3+} 对琼胶酶 A 有强烈的抑制作用,同时酶 A 在含有 $0.5 \text{ mmol/L} Ca^{2+}$ 的缓冲液中酶活性也会显著降低。

不同底物浓度对酶 A 活性的影响:由于琼胶的特性,不同的底物浓度对酶的降解作用有较大影响。酶 A 的最适底物降解浓度为 0.9%。

酶 A 的底物专一性研究:经测定琼胶酶 A 仅对琼胶有降解作用,对其它几种试验的样品均无降解作用。表明该琼胶酶具有较好的底物专一性,具体结果略。

2.3 琼胶酶 A 的降解产物分析

将酶解产物进行质谱分析,结果如图 4 所示。根据降解产物的分子量可推知,酶 A 的降解产物主要为四糖和六糖,另有少量二糖,表明琼胶酶 A 降解琼胶的专一性较好,产生的琼胶寡糖专一性较高。

金属离子对酶 A 活性的影响:根据试验结果发

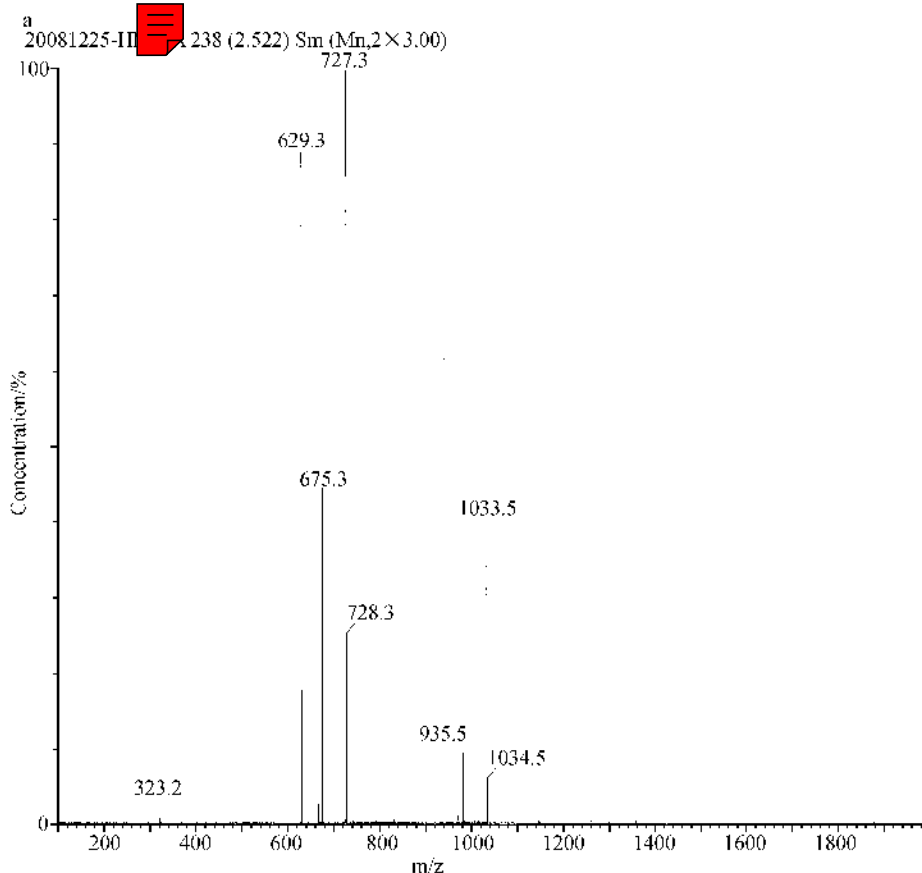


图 4 酶 A 的降解产物质谱分析结果

Fig.4 The result of mass spectrum for the enzymolysis products of agarase A.

3 讨论

Agarivorans 菌属是 2004 年新发现的一个菌属,*Agarivorans albus* 种菌株的特征之一即为可以降解琼

胶^[7],目前已有数篇关于该种菌降解琼胶的报道,且从蛋白序列数据库中检索到 4 种产自该种菌的琼胶酶^[8-19]。本实验中的 QM38 菌株的酶活力高于以往报道过的该种的其他菌,从实验结果中可

以看到,在该菌株的发酵液中含有多种具有琼胶酶活力的蛋白。本实验从 QM38 的发酵上清液中纯化出两种比活力较高的琼胶酶 A 和 B。其中 A 的比活力较 B 更高,且含量更为丰富,分子量高于以往报道过的琼胶酶,为 127.8kDa,与 Dong-Geun Lee^[8] 等于 2006 年报道的 *Agarivorans* sp. JA-1 菌株产琼胶酶的分子量较接近。对酶 A 的理化性质进行了具体分析,琼胶酶 A 的最适反应温度较低,对固体琼胶有较好的降解作用,活性受温度影响较大,这可能与该菌株分离自海洋环境相关;酶 A 的最适反应 pH 偏碱性,与目前报道的多数琼胶酶特性相似;最适底物浓度为 0.9%。本实验中的琼胶酶 A 对实验涉及的几种结构类似与琼胶的多糖均无降解作用,说明其具有较好的底物专一性,酶解位点较为单一。酶 A 的活性受到大多数金属离子的抑制,这与之之前报道过的其他几种琼胶酶类似^[9-20],在酶的储存中应该注意去除金属离子的存在。在以琼胶为底物的情况下,琼胶酶 A 的降解产物主要为四糖和六糖,另有少量二糖。

Agarivorans albus QM38 菌株具有较高的发酵液酶活力,所产琼胶酶 A 的分子量和降解产物均有别与其他报道过的琼胶酶^[8-19],具有较好的工业应用前景。国内外对于琼胶酶的研究已经深入至分子生物学水平,可以通过进一步研究对琼胶酶 A 的降解产物进行分析以确定酶解位点,分析其蛋白质序列或对该段酶基因进行克隆进一步了解其催化机理和特性,为利用该酶降解得到琼胶寡糖提供更丰富的理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] Duckworth M, Yaphe W. The structure of agar, part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 1971, 16: 189 – 197.
- [2] Vera J, Alvarez R, Murano E, et al. Identification of a marine agarolytic *pseudoalteromonas* and characterization of its extracellular agarase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998 Nov, 64 (11): 4378 – 4383.
- [3] Enoki T, Sagawa H, Tominaga T, et al. Drugs, food or drinks with the use of algae-derived physiologically active substances. U. S. Patent, 0105029 A1, 2003.
- [4] Wang JX, Jiang XL, Mou HJ, et al. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16: 333 – 340.
- [5] Chen HM, Yan XJ. Antioxidant activities of agar-oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1722: 103 – 111.
- [6] Weinberger F, Richard C, Kloreg B, et al. Structure-activity relationships of oligoagar elicitors towards *Gracilaria conferta*. *Journal of Phycology*, 2001, 37: 418 – 426.
- [7] Hu Bin, Gong QH, Wang Ye, et al. Prebiotic effects of neoagar-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe*, 2006, 12: 260 – 266.
- [8] 赵雪, 薛长湖, 徐强, 等. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2002, 9 (3): 280 – 282.
- [9] I. Kato, T. Enoki, H. Sagawa. Anti-inflammatory effects of agar – oligosaccharides, *Food Dev.*, 2001, 36: 65 – 71.
- [10] Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, et al. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61: 162 – 163.
- [11] Dong JH, Shinnosuke H, Takafumi K, et al. Cloning of the Novel Gene Encoding β -Agarase C from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain PO-303, and Characterization of the Gene Product. *Applied And Environmental Microbiology*, Sept. 2006, p. 6399 – 6401.
- [12] 刘江涛, 蔡俊鹏, 吴冰. 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定. 现代食品科技 (*Modern Food Science And Technology*), 2005, Vol. 21 No. 1: 43 – 45.
- [13] 王静雪, 江晓路, 牟海津, 等. 海洋弧菌 QJH-12 发酵产琼胶酶条件的优化. 海洋科学 (*Marine Sciences*), 2007, 31 (7): 8 – 14.
- [14] 杜宗军, 赵苑, 李美菊等. 青岛近海琼胶降解细菌的筛选和多样性分析. 中国海洋大学学报 (*Periodical of Ocean University of China*), 2007 年, 第 37 卷 (第 2 期) 277 – 282.
- [15] Imoto T, Yegishita, K. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1971, 35: 1154 – 1156.
- [16] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [17] Midori K, Akira Y. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 693 – 697.
- [18] Lee DG, Park GT, Kim NY, et al. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 b-agarase from a marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 1925 – 1932.
- [19] Fu XT, Lin Hong, Kim SM. Purification and characterization of a novel β -agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78: 265 – 273.

- [20] Suzuki H, Sawai Y, Suzuki T, et al. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 93: 456 – 463.

Isolation and characterization of a marine agarase

Hui Xie, Baoqin Han^{*}, Wen Dong, Yan Yang, Jing Chang, Yanfei Peng, Wanshun Liu

College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: [Objective] This study was carried out to isolate and characterize an agarase from a marine bacterium *Agarivorans albus* QM38. [Methods] SDS-PAGE grade agarase was obtained from the fermentation broth after removing the bacteria by centrifugation, ammonium sulfate precipitation, DEAE-sepharose fast flow anion exchange chromatography and Sephacryl S-100 gel filtration. Enzyme's molecular weight was determined with SDS-PAGE. The catalysates of the isolated enzyme were determined with mass spectrography. [Results] Agarase A was isolated. The molecular weight of agarase A was 127.80 kDa. More characterizations of agarase A were studied and the results showed that the optimal reaction condition for agarase A was at 35°C, pH 7.6, and agar concentration of 0.9% (w/v), while most of the metal ions inhibited the activity of it. The catalysates of agarase A were mainly tetrose and hexose. [Conclusion] Agarase A was purified from the medium. It could hydrolyze jellied agar and yield simple catalysates. Its molecular weight is different from all the agarases reported so far.

Keywords: agarase; purification; characterization; analysis of catalysate

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-53282032105; E-mail: baoqinh@ouc.edu.cn

Received: 1 January 2009/ Revised: 27 March 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:我们的承诺是争取在2个月之内给予答复,5~7个月之内刊出。

①收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审的2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。

②完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出e-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的),作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问:如我的投稿没有被贵刊录用,是否告知退稿原因?对退稿有异议怎么办?

答:本着对每一篇投稿负责的原则,本刊一贯遵循三审制的制度,即:编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿,都会给作者一份比较全面的审稿意见。

①对于每一篇退稿,我们都会详细写明退稿原因,为您进一步修改论文提供帮助。

②如您对退稿意见有异议,可以给我们写信表明看法,本刊将请专家予以复审。

问:我可否指定审稿人,或言明请某审稿人回避?

答:您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单,或请予回避的审稿人名单,供编辑部参考,但编辑部是否采纳将视具体情况而定。