

噬琼胶菌产新琼二糖热稳定琼胶酶的酶学性质及酶解产物的抗氧化活性

刘雪¹, 陈艳红^{1,2}, 姜泽东^{1,2}, 倪辉^{1,2}, 李清彪^{1,2}, 朱艳冰^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

摘要: 利用 PCR 从噬琼胶菌 AL1 中扩增琼胶酶基因, 将其克隆至表达载体 pET-28a; 表达产物用亲和层析纯化, 研究重组酶的酶学性质; 利用薄层色谱和质谱鉴定酶解产物, 并测定酶解产物的还原能力和清除 DPPH、ABTS⁺和·OH 自由基的能力, 分析酶解产物的抗氧化活性。结果表明, 来自噬琼胶菌 AL1 重组琼胶酶的分子质量为 105 ku。该琼胶酶能专一地降解琼脂, 为 β -琼胶酶。重组琼胶酶在 50 ℃ 和 pH 7.0 表现出最大酶活力, 在 50 ℃ 以下, pH 5.00~11.00 宽 pH 范围内稳定性良好, 说明该重组酶具有良好的热稳定性和 pH 稳定性。经薄层色谱和质谱鉴定酶解产物为新琼二糖, 该酶解产物对·OH、ABTS 和 DPPH 自由基的半数抑制剂量 IC₅₀ 分别为 1.28 mg/mL、3.46 mg/mL 和 9.87 mg/mL, 还原能力较强, 说明该酶解产物具有良好的抗氧化活性。

关键词: 噬琼胶菌; 重组琼胶酶; 酶学性质; 酶解产物

文章编号: 1673-9078(2021)05-82-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0970

Characterization of A Neoagarobiose-Producing and Thermostable β -agarase from *Agarivorans* sp. AL1 and Antioxidant Activity of the Enzymatic Hydrolysates

LIU Xue¹, CHEN Yan-hong^{1,2}, JIANG Ze-dong^{1,2}, NI Hui^{1,2}, LI Qing-biao^{1,2}, ZHU Yan-bing^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

Abstract: The agarase gene AL1 was amplified by PCR and cloned into pET-28a expression vector. The expression product was purified by affinity chromatography to study the enzymatic properties of the recombinant enzyme. The enzymatic hydrolysate was identified by TLC and LC-MS, and its reducing ability and scavenging ability of DPPH, ABTS⁺ and ·OH radicals were determined, and the antioxidant activity of the hydrolysate was analyzed. The molecular weight of the recombinant agarase from *Agarivorans* sp. AL1 was 105 ku. The agarase could specifically degrade agar as a β -agarase. The recombinant agarase showed the maximum activity at 50 ℃ and pH 7.00. The recombinant agarase was stable in a wide pH range from 5.00 to 11.00 below 50 ℃, indicating that the recombinant enzyme had good thermal stability and pH stability. The enzymatic hydrolysate product was identified as neoagarobiose by TLC and LC-MS. The enzymatic hydrolysates had the reducing power. The half-inhibition concentration IC₅₀ of the enzymatic hydrolysate to ·OH, ABTS and DPPH free radicals are 1.28 mg/mL,

引文格式:

刘雪, 陈艳红, 姜泽东, 等. 噬琼胶菌产新琼二糖热稳定琼胶酶的酶学性质及酶解产物的抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 82-90

LIU Xue, CHEN Yan-hong, JIANG Ze-dong, et al. Characterization of a neoagarobiose-producing and thermostable β -agarase from *Agarivorans* sp. AL1 and antioxidant activity of the enzymatic hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 82-90

收稿日期: 2020-10-22

基金项目: 福建省海洋经济发展补助资金项目 (FJHJF-L-2020-1); 漳州市科技重大专项 (ZZ2019ZD15)

作者简介: 刘雪 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶学性质

通讯作者: 朱艳冰 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶学

3.46 mg/mL and 9.87 mg/mL, respectively, indicating that the hydrolysate had good antioxidant activity.

Key words: *Agarivorans* sp.; recombinant agarase; enzymatic properties; enzymatic product

琼胶主要由红藻细胞壁中提取出来的一种胶体物质^[1]。琼胶的胶凝性和稳定性好,常被用于凝固剂、增稠剂和乳化剂,广泛应用于食品行业。琼胶可视为主要由琼脂糖和琼脂果胶构成的混合物。琼脂糖是一种由 D-半乳糖和 3,6-内醚- α -L-半乳糖经 $\alpha(1\rightarrow3)$ 和 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键交替连接而成的链状中性多糖,是形成凝胶的主要组分^[2]。琼脂果胶是由一系列复杂的多聚糖链组成,它包括 β -D-半乳糖、3,6-脱水- α -L-半乳糖以及丙酮酸、硫酸基和甲基等^[3]。琼胶的降解产物分子量小,粘度低,水溶性好,易被人体吸收,并且具有多种生物学功能,包括抑菌、抗氧化、美白、保湿、抗病毒等^[4],在食品、化妆品、医药等领域具有应用潜力。

酶法是制备琼胶寡糖高效环保的技术手段。琼胶酶可以通过酶解作用将琼胶降解为琼胶寡糖。根据催化糖苷键的类型,可将琼胶酶分为两类: α -琼胶酶和 β -琼胶酶^[5]。 α -琼胶酶产物是以 3,6-内醚- α -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖(Agaro-oligosaccharides, AOs); β -琼胶酶产物是以 D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖(Neoagaro-oligosaccharides, NAOs)^[5]。琼胶酶应用广泛,例如制备琼胶寡糖,从琼脂糖凝胶中回收脱氧核糖核酸,制备海藻原生质体,从海藻中提取生物活性物质^[5]。

琼胶酶来源于海洋微生物、海洋软体动物,贝类和土壤等中。产琼胶酶的微生物来源包括交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)^[6]、弧菌属(*Vibrio* sp.)^[7]、泡囊假单胞菌(*Pseudomonas vesicularis*)^[8]、微泡菌属(*Microbulbifer* sp.)^[9]、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)^[10]、嗜盐球菌属(*Halococcus* sp.)^[11]、嗜麦芽单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)^[12]、交替单胞菌属(*Saccharophagus degradans*)^[13]、火色杆菌属(*Flammeovirga* sp.)^[14]等。

一般热琼脂溶液在 40 °C 以下时会凝固形成凝胶,粘度也会增大,因此在利用琼胶酶降解琼胶过程中,为提高酶解效率,要求琼胶酶具备一定的热稳定性。因此开发具有良好热稳定性的琼胶酶意义重大。本文中,我们将来自噬琼胶菌 AL1 (*Agarivorans* sp. AL1) 的热稳定琼胶酶基因进行克隆和表达,研究琼胶酶的酶学性质,以及其酶解产物的抗氧化活性,为该热稳定琼胶酶的应用奠定理论基础。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

噬琼胶菌 AL1、大肠杆菌 BL21 (DE3), 由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、dNTPs、*Bam*HI、*Sa*II 和卡那霉素为 TaKaRa 公司产品; 质粒 DNA 小量纯化试剂盒购买自天根生化科技有限公司; 琼脂糖为海川生物科技有限公司产品; 其余均为国产分析纯产品。

1.2 主要仪器与设备

双层全温度恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 高速离心机, 德国 Coeppendorf AG Co; 超声波细胞粉碎机, 宁波新艺超声设备有限公司; 冷冻干燥仪, 美国 Thermo Fisher 公司; UltiMate 3000 液相色谱质谱联用仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 琼胶酶重组表达质粒的构建

设计噬琼胶菌琼胶酶基因的正向引物序列: 5'-CGCGGATCCCTG-CTACCTTAGTCACCTC-3' (划线部分为 *Bam*HI 酶切位点), 反向引物序列: 5'-ACGCGTCGACTTACACTTTACGACGTCTTAG-3' (划线部分为 *Sa*II 酶切位点)。以噬琼胶菌 AL1 的基因组 DNA 为模板, 进行琼胶酶基因的 PCR, 反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 以上循环 30 次; 最后在 72 °C 延伸 10 min。利用 1.00% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物的大小进行测定, 并利用 DNA 回收试剂盒进行纯化回收。利用 *Bam*HI 和 *Sa*II 对目的基因和表达载体 pET-28a 分别进行双酶切反应, 目的基因和表达载体用试剂盒分别回收, 它们的连接产物转化至 *E. coli* BL21 中。转化细胞涂布至含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。经菌落 PCR 验证后, 进行插入序列的测序分析, 获得含有琼胶酶基因的重组表达质粒 PET-28a-aga。

1.4 重组琼胶酶的诱导表达及纯化

挑取单克隆, 接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 °C、180 r/min 培养 12 h。把活化好的菌液按 1.00% 的比例转接于 200 mL LB 培养基

(含卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇动培养至 OD_{600} 值达 0.60~0.80。加入异丙基- β -D-吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 低温诱导表达 20 h 后, 将诱导表达的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 (5000 r/min, 20 min) 收集菌体。参照 Qiagen 公司的 Ni-NTA 使用说明书纯化重组蛋白。收集纯化样品, 利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析目的蛋白的纯度及其分子量大小。

1.5 琼胶酶活力测定

使用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定琼胶酶活力。取 5 μL 酶液 (2.00 mg/mL), 加入 195 μL 0.20% (质量分数) 琼脂糖溶液 (以 50 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 7.00 配制), 混合物在 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 后, 加入 200 μL DNS 溶液终止反应, 煮沸 10 min。于 520 nm 处测量还原糖的吸光度。琼胶酶活性定义为: 在上述条件下, 每 min 生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.6 重组琼胶酶的酶学性质研究

1.6.1 琼胶酶的底物特异性分析

以 0.20% (质量分数) 的琼脂糖、 κ -卡拉胶、海藻酸钠、岩藻多糖、羧甲基纤维素钠为底物溶液来检测琼胶酶的活力, 研究酶的底物特异性。将 5 μL 酶液分别与 195 μL 上述不同底物溶液混合, 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 反应完成后用 DNS 法进行酶活的测定以及计算。此外, 将 500 μL 50 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.0) 与 200 μL 4 mg/mL 人工显色底物 (对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷或对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷) 溶液, 置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min。加入 500 μL 重组酶, 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后, 加入 500 μL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 在 420 nm 下测定样品的吸光度值, 测定酶的活力, 研究酶的底物特异性。

1.6.2 温度对琼胶酶活性和稳定性的影响

以琼脂糖为底物, 按照 1.5 的酶活力测定方法, 测定在不同温度 (30~70 $^{\circ}\text{C}$) 下重组酶的活力, 并以最高酶活力为 100%, 研究温度对琼胶酶活性的影响, 将琼胶酶置于不同的温度 (30~70 $^{\circ}\text{C}$) 中孵育 1 h 后, 测定酶的残余活力, 进行酶的温度稳定性分析, 以未经处理的酶活力为 100%。

1.6.3 pH 对琼胶酶活性和稳定性的影响

配制不同 pH 的缓冲液: pH 3.00~5.00 (柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液)、pH 5.00~7.00 (磷酸钠缓冲液)、pH 7.00~9.00 (Tris-HCl 缓冲液)、pH 9.00~11.00 (甘氨酸-NaOH 缓冲液), 在不同的 pH 条件下测定酶的活

力, 从而研究重组酶的最适反应 pH。将酶在不同 pH 缓冲液中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 测定酶的残余活力, 以未经处理的酶活力为 100%, 测定重组酶的 pH 稳定性。

1.6.4 金属离子对琼胶酶活性的影响

将用蒸馏水透析过的酶液与不同金属离子溶液混合, 使其终浓度为 1 mmol/L 或 10 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 后, 加入 0.20% 的琼脂糖底物, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 测定琼胶酶的活力, 以未添加金属离子的酶活力为 100%。

1.6.5 抑制剂、还原剂、去垢剂和变性剂对琼胶酶活性的影响

将终浓度为 1 mmol/L 或 10 mmol/L 抑制剂 EDTA 或还原剂 (DTT 和 β -巯基乙醇)、0.10% 或 1% (体积分数或质量分数) 去垢剂 (tween 20、tween 80、triton X-100 和 SDS)、1 mol/L 或 5 mol/L 变性剂尿素添加到重组酶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 后, 测定酶的活力。其中, 以未添加检测试剂的酶活力为 100%。

1.6.6 重组琼胶酶的动力学参数测定

用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.00) 配制浓度为 0.50~4.50 mg/mL 的琼脂糖溶液, 将重组琼胶酶分别与不同浓度的琼脂糖溶液反应, 测定琼胶酶的活力。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 计算琼胶酶米氏方程的最大反应速率 (V_{max}) 与底物亲和常数 (K_m)。

1.6.7 重组琼胶酶的酶解产物分析

将 50 U 重组琼脂酶和 100 mL 0.50% (质量分数) 琼脂糖溶液混合后, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育。分别在 0~24 h 内的不同酶解时间点取样, 将样品在硅胶板上点样, 展开剂为正丁醇-冰醋酸-水溶液 (体积比 2:1:1), 显色剂使用含 10% (体积分数) H_2SO_4 的乙醇溶液, 分析不同反应时间的酶解产物。酶解 24 h 后, 煮沸 5 min, 离心取上清液, 上清液加入 100 mL 乙醇, 静置过夜, 待不溶物析出后, 将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤去除杂质, 然后将上清液经旋转蒸发仪除去乙醇并浓缩样品, 最后将样品冷冻干燥至粉末状, 获得酶解产物。取适量样品粉末, 溶于超纯水中, 用液相色谱-质谱联用仪 (LC-MS) 进行分析, 液相分析条件为: 采用 AC-QUTY BEH C18 柱, 以流动相 A (纯乙腈) 和流动相 B (超纯水) 进行梯度洗脱, 流速为 0.30 mL/min。

1.6.8 酶解产物的抗氧化活性研究

取适量冷冻至粉末状的样品溶于超纯水中, 按照 Zhu 等^[15]的方法并稍作修改, 进行抗氧化活性的测定。

1.6.9 蛋白序列和结构分析

采用 DNAMAN 软件对琼胶酶的基因序列进行分

析;利用信号肽预测工具 SignalP v4.10 对琼胶酶的信号肽区域进行预测;在 Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) 数据库中寻找不同家族来源的特征琼胶酶的蛋白质序列,采用 MEGA7.00 构建琼胶酶的系统发育树;利用 ExPASy 中的 ProtParam Tool 对琼胶酶的理化性质进行预测分析;采用 SMART 工具预测琼胶酶的蛋白质结构域;将琼胶酶的蛋白序列提交到 SWISS-MODEL 网站,经同源比对搜索模板,利用 Modeller 9.16 软件构建三维模型,并利用 Verify-3D 对模型进行评分。

1.6.10 数据处理

为了保证实验的准确性和数据的可靠性,上述每组实验重复三次,实验结果用 Micro Soft Office 2016 进行处理分析, $p<0.05$ 代表差异显著。

2 结果与讨论

2.1 噬琼胶菌 AL1 琼胶酶基因及其编码蛋白质的生物信息学分析

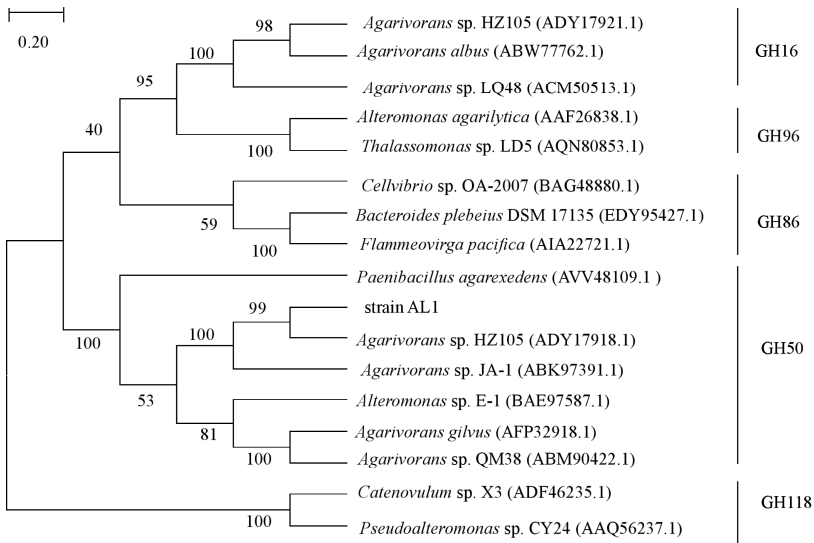


图 1 *Agarivorans* sp. AL1 琼胶酶的系统发育进化树

Fig.1 Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree of *Agarivorans* sp. AL1 agarase

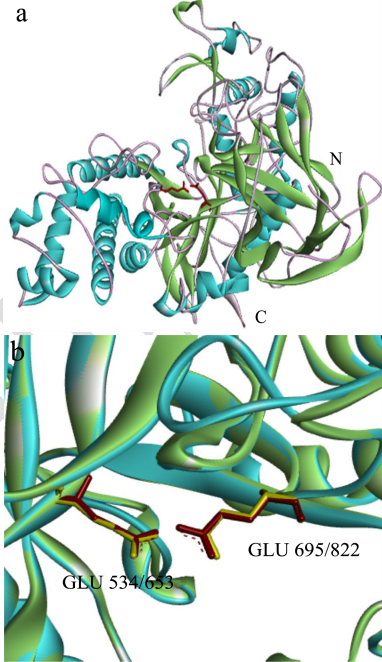


图 2 噬琼胶菌 AL1 琼胶酶的三维建模

Fig.2 3D structure modeling of agarase from *Agarivorans* sp. AL1

注: a: 整体结构; b: 模型与模板结构叠合的局部结构。

利用 DNAMAN 进行分析,结果显示,噬琼胶菌 AL1 琼胶酶基因大小为 2988 bp,预测编码 995 个氨基酸。对琼胶酶的信号肽区域进行预测,结果显示基因编码蛋白质的前 27 个氨基酸被预测为信号肽,27-28 号氨基酸之间为剪切位点。将目的蛋白序列与 NCBI 蛋白数据库进行比对,结果表明,它与来源于 *Agarivorans* sp. QM38 菌株的 β -琼胶酶(ABK51379.1)有 99% 的相似性,与来源于 *Agarivorans* sp. Alg241-V36 菌株的 β -琼胶酶(WP_163131938.1)有 68% 的相似性,与来源于 *Vibrio* sp. EJY3 菌株的 β -琼胶酶(WP_014232191.1)有 52% 的相似性。系统发育进化分析显示,噬琼胶菌 AL1 琼胶酶与来自 *Agarivorans* sp. HZ105 (ADY17918.1) 的琼胶酶在同一支(图 1),后者是 GH50 家族的代表成员,这些结果表明,噬琼胶菌 AL1 琼胶酶归属于 GH50 家族。结构域分析显示,噬琼胶菌 AL1 琼胶酶包含一个碳水化合物结合模块,位于 250~388 位氨基酸残基。将该琼胶酶进行三维建模,模板为来源于交替单胞菌(*Saccharophagus degradans*)的 β -琼胶酶晶体结构(PDB 登入号: 4BQ4),氨基酸残基的范围为 207~920

位氨基酸残基,覆盖率为 69.00%,噬琼胶菌 AL1 琼胶酶与模板的序列相似性为 36.80%。模型利用 Verify-3D 评分为 89.20%,通过评价。构建的噬琼胶菌 AL1 琼胶酶的部分三维(207~920 位氨基酸残基)结构显示,该琼胶酶采用了杂合折叠,该折叠在琼胶酶的 N 端包含一个 β -三明治结构域,并与 C 端精致的 $(\alpha/\beta)_8$ 桶融合(图 2a)。将噬琼胶菌 AL1 β -琼胶酶(蓝色)与模板(绿色)进行结构叠合(图 2b),模板的催化活性位点 Glu534、Glu695(黄色棍状)和噬琼胶菌 AL1 β -琼胶酶的 Glu653、Glu822(红色棍状)高度重合,说明 Glu653 和 Glu822 组成可能的噬琼胶菌 AL1 β -琼胶酶的催化活性位点。

2.2 噬琼胶菌 AL1 琼胶酶的体外表达和纯化

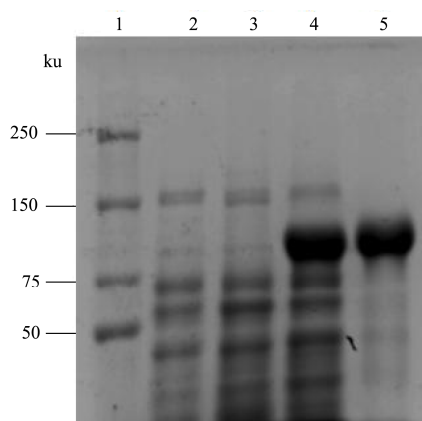


图3 噬琼胶菌 AL1 琼胶酶在大肠杆菌中的表达

Fig.3 Expression of agarase from *Agarivorans* sp. AL1 in *E. coli*

注: 1.分子量标准蛋白; 2.含 pET-28a 阴性菌, IPTG 诱导; 3.含 pET-28a-aga 阳性菌, 未诱导; 4.含 pET-28a-aga 阳性菌, IPTG 诱导; 5.纯化的重组蛋白。

含有琼胶酶基因的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导表达和纯化后,利用 SDS-PAGE 分析,结果显示,重组蛋白的相对分子质量约为 105 ku (图 3)。

2.3 重组琼胶酶的酶学性质

2.3.1 酶的底物特异性

分别以琼脂糖、 κ -卡拉胶、海藻酸钠、岩藻聚糖、羧甲基纤维素钠作为底物,研究酶的底物特异性,结果显示,重组琼胶酶可以降解琼脂糖,降解其他底物的活性很低(图 4),说明该重组酶为琼胶酶。另外,该重组琼胶酶可以特异性地降解对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷($OD_{420}=0.427$),而不降解对硝基苯- α -D-吡喃半乳糖苷($OD_{420}=0.008$),表明它可以特异性识别 β -糖苷键,不能识别 α -糖苷键。上述结果表明,该重组酶属于 β -琼胶酶,与来自噬琼胶菌属(*Agarivorans* sp. JA-1) β -琼胶酶^[16]的底物选择性一致。

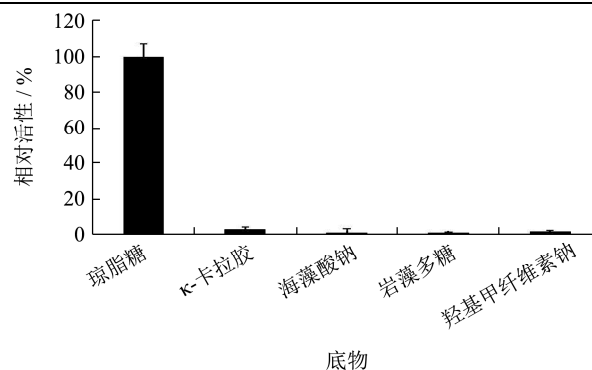


图4 重组琼胶酶的底物特异性

Fig.4 Substrate specificity of the recombinant enzyme

2.3.2 温度和 pH 对酶活性及稳定性的影响

研究温度对酶活性的影响,结果显示,酶的最适反应温度是 50 °C,与假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp. Aga3463)^[10]和火色杆菌属(*Flammeovirga* sp. OC4)^[14]来源的琼胶酶的最适反应温度相同。重组酶在 30 °C 和 70 °C 时分别具有 40.67%和 50.12%的酶活力(图 5a)。酶的热稳定性分析结果(图 5b)显示,重组酶在 40 °C 和 50 °C 处理 1 h 后,酶分别具有 81.12%和 77.71%的残余活力;在 60 °C 处理 1 h 后,仍具有 35.31%的酶活力,红球菌属(*Rhodococcus* sp. Q5)琼胶酶^[17]在 60 °C 温育 30 min,具有 20% 的残余活性;嗜麦芽单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp. NTa)琼胶酶^[12]在 50 °C 下温育 1 h,残余酶活力为 46%;噬琼胶卵链菌属(*Catenovulum Agarivorans* YM01^T)琼胶酶^[18]分别在 50 °C 和 60 °C 下温育 1 h,残余酶活力分别约为 45%和 25%。这些结果说明,本文报道的噬琼胶菌 AL1 来源 β -琼胶酶表现出良好的热稳定性。

在不同的 pH 缓冲溶液中测定酶的最适反应 pH,研究 pH 对酶活性的影响。结果如图 5c 所示,重组琼胶酶在 pH 为 7.00 时活力最高,与交替单胞菌属(*Alteromonas* sp. GNUM-1)^[6]、噬琼胶卵链菌属(*Catenovulum Agarivorans* YM01^T)^[18]最适作用 pH 值一致,高于噬琼胶菌属(*Agarivorans gilvus* WH0801)^[19](最适 pH 为 6.00)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp. Q30F)^[20](最适 pH 为 6.50)来源的琼胶酶。重组琼胶酶在 pH 5.00~11.00 范围内具有 55%以上的酶活力。酶的 pH 稳定性分析结果如图 5d 所示,在 pH 6.00~7.00 保持了较高的 pH 稳定性,在 pH 5.00~11.00 的范围内,重组酶具有高于 50%的残余活力,说明重组琼胶酶具有宽的 pH 稳定性,这与嗜麦芽单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp. NTa)^[12]琼胶酶具有相似性,高于微泡菌属(*Microbulbifer* sp. BH-1)^[21]琼胶酶的 pH 稳定性(pH 为 10.00 时温育

30 min, 残余酶活性为40%左右)。综上所述, 噬琼胶菌 AL1 琼胶酶具有良好的热稳定性和 pH 稳定性, 使其在食品、化妆品和医疗工业应用中成为非常有吸引力的酶。

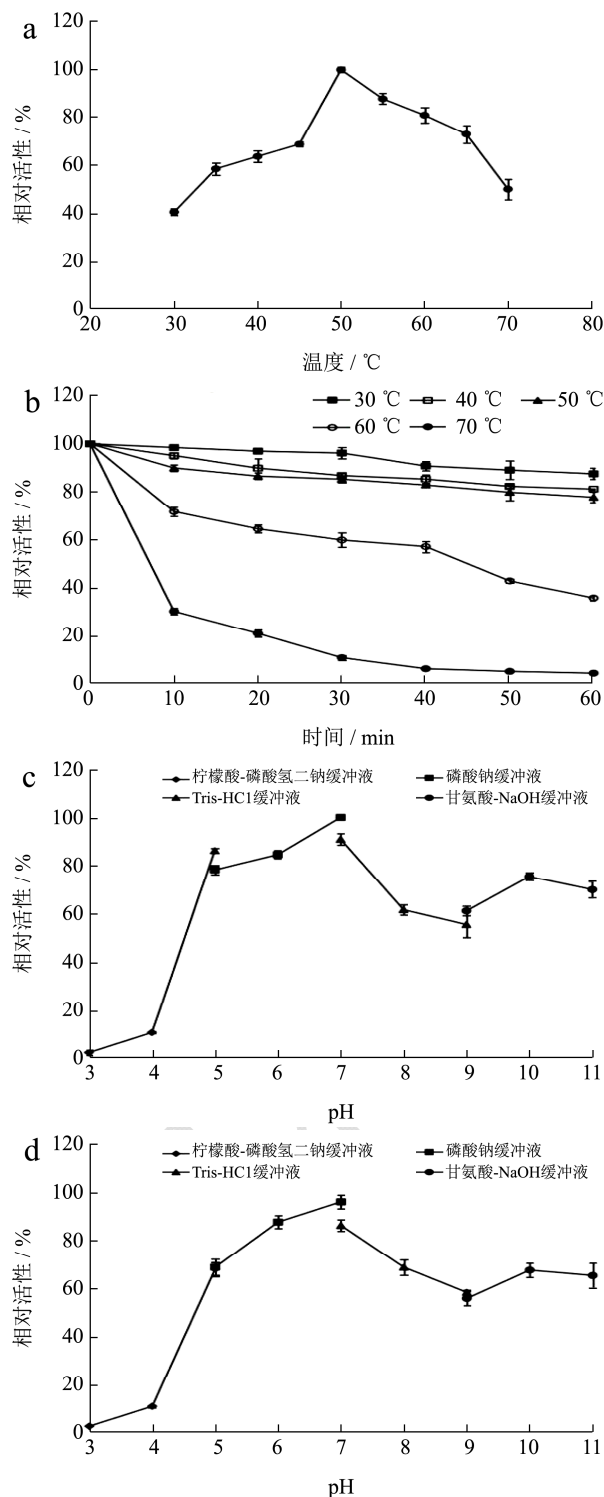


图5 温度对重组琼胶酶活性(a)及稳定性(b)的影响和pH对重组琼胶酶活性(c)及稳定性(d)的影响

Fig.5 Effects of temperature on activity (a) and thermostability (b) and effects of pH on activity (c) and stability (d) of the recombinant agarase

2.3.3 金属离子对酶活性的影响

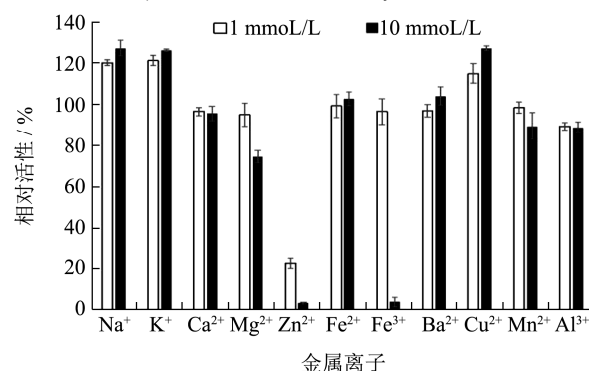


图6 金属离子对重组琼胶酶活性的影响

Fig.6 Effects of metal ions on the activity of the recombinant agarase

研究不同金属离子对重组琼胶酶活性的影响, 如图6所示, 1 mmol/L 或 10 mmol/L 的 K⁺、Na⁺和 Cu²⁺对重组酶活性具有促进作用; 1 mmol/L 或 10 mmol/L 的 Ca²⁺、Fe²⁺和 Ba²⁺对重组酶的活性几乎没有影响; 10 mmol/L Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺和 Al³⁺对重组酶活性有不同程度的抑制作用, 其中 Zn²⁺和 Fe³⁺几乎完全抑制了重组酶的活性。

2.3.4 抑制剂、还原剂、去垢剂和变性剂对酶活性的影响

表1 抑制剂、还原剂、去垢剂和变性剂对重组琼胶酶活性的影响

Table 1 Effects of inhibitors, reducing reagents, detergents and denaturant on the activity of the recombinant agarase

试剂	浓度	相对活性/%
对照	-	100.00±2.10
DTT	1 mmol/L	101.90±3.70
	10 mmol/L	104.90±3.90
β -巯基乙醇	1 mmol/L	100.60±1.30
	10 mmol/L	100.90±3.90
EDTA	1 mmol/L	100.10±2.50
	10 mmol/L	102.70±7.20
triton X-100	0.1% (体积分数)	92.40±3.90
	1% (体积分数)	85.50±5.40
tween 80	0.1% (体积分数)	72.70±2.40
	1% (体积分数)	69.70±2.70
tween 20	0.1% (体积分数)	101.30±0.10
	1% (体积分数)	104.40±3.10
SDS	0.1% (质量分数)	99.70±3.00
	1% (质量分数)	82.40±5.40
尿素	1 mol/L	102.20±0.80
	5 mol/L	74.60±3.40

抑制剂 EDTA 对琼胶酶活性明显不大(表1), 这与 Li 等^[10]的研究结果一致, 而 An 等^[18]研究结果表明,

EDTA 严重抑制噬琼胶卵链菌属 (*Catenovulum Agarivorans* YM01^T) 琼胶酶的活性。EDTA 是一种螯合剂, 可以清除二价阳离子并使金属离子依赖性酶失活, 这些结果表明, 本文中的琼胶酶不是金属离子依赖性酶。本研究中, 硫醇还原剂 (如 DTT 和 β -巯基乙醇) 对重组 β -琼胶酶没有明显影响, 表明二硫键对其催化活性不是必不可少的, 这与 Hou 等^[22]的研究结果一致。重组琼胶酶对去垢剂 triton X-100、tween 80、tween 20 和 SDS 具有良好的抗性, 处理条件下, 仍保持高于 65% 的残余活力 (表 1)。此外, 重组琼胶酶对变性剂尿素也有较好的抗性, 5 mol/L 尿素处理后, 仍具有 74.60% 的残余活力 (表 1)。

2.3.5 重组琼胶酶的动力学参数

以琼脂糖溶液为底物, 研究重组琼胶酶的动力学参数。当琼胶酶与不同浓度的琼脂糖进行反应后, 通过绘制双倒数曲线, 计算出琼胶酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 13.93 mg/mL 和 4.37 U/mg。

2.4 琼脂糖酶解产物的鉴定

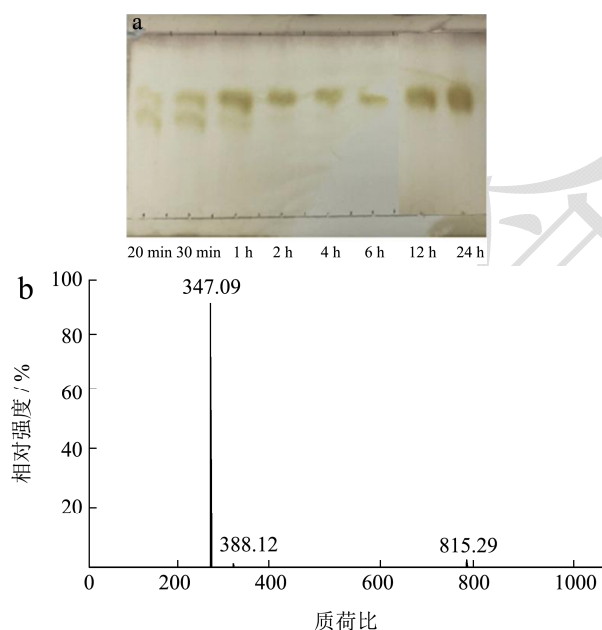


图7 琼脂糖酶解产物的 TLC (a) 和 MS 分析 (b)

Fig.7 The enzymatic hydrolysis products of agarose determined by TLC (a) and MS analysis (b)

由重组琼胶酶、产生的水解产物通过薄层色谱 (TLC) 进行鉴定。如图 7a 所示, 在反应初始阶段产生了一系列不同聚合度的新琼寡糖。随着反应时间的延长, 高聚合度的寡糖明显减少, 反应 2 h 时 TLC 出现 1 个明显的斑点, 延长反应时间未见寡糖组成明显变化。将 24 h 的酶解产物进行 MS 分析, 如图 7b 所示, 在 m/z 347 ($M+Na$)⁺ 有明显的峰, 经分析为新琼二糖产物。综上所述, 重组琼胶酶为以新琼二糖为最

终酶解产物的 β -琼胶酶。

2.5 琼脂糖酶解产物的抗氧化活性

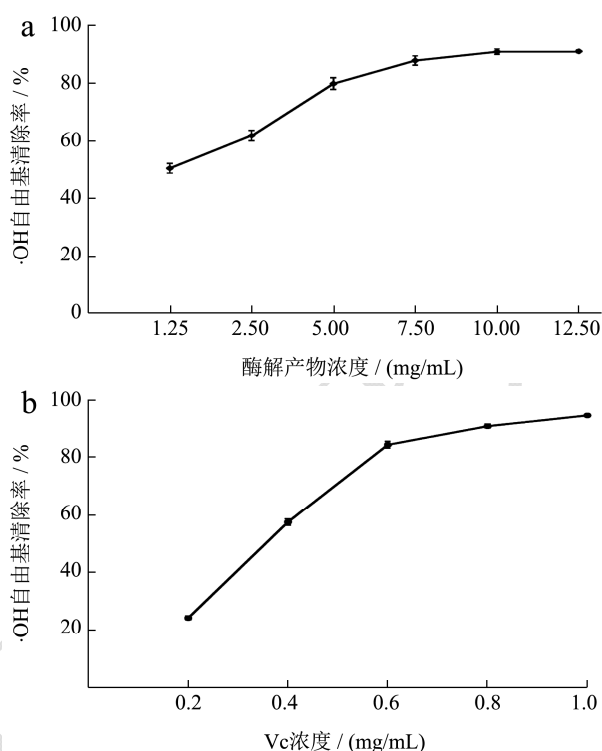


图8 重组琼胶酶酶解产物的 $\cdot OH$ 自由基的清除作用

Fig.8 The scavenging effect of $\cdot OH$ radicals from the hydrolysates of recombinant agarase

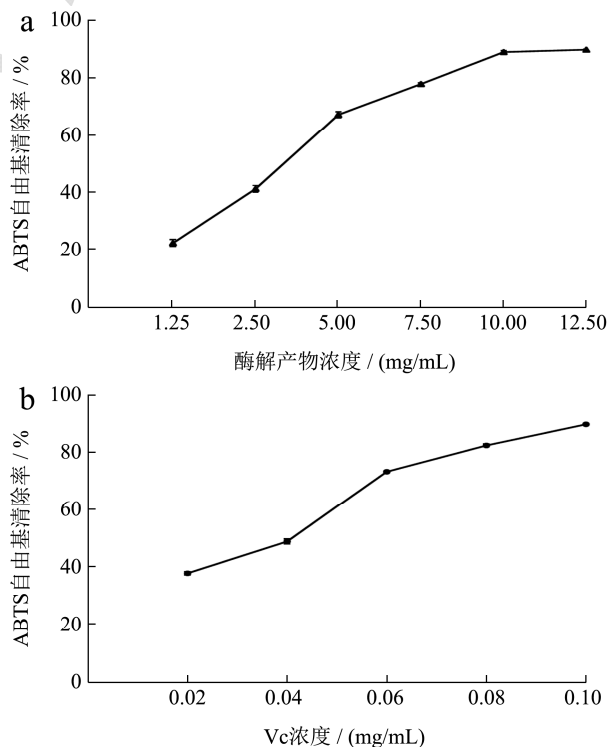


图9 重组琼胶酶酶解产物的 ABTS 自由基的清除作用

Fig.9 The scavenging effect of ABTS free radicals from the digestion products of recombinant agarase

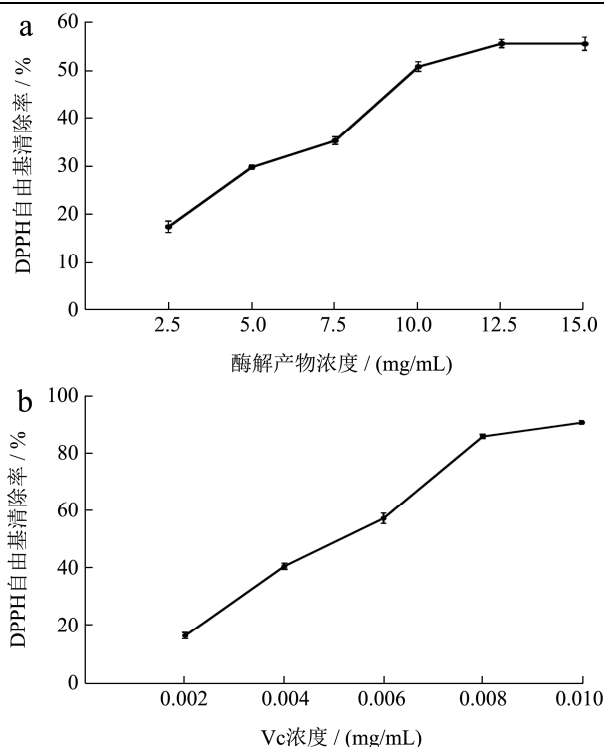


图10 重组琼胶酶酶解产物的DPPH自由基的清除作用

Fig.10 The scavenging effect of DPPH free radicals from the digestion products of recombinant agarase

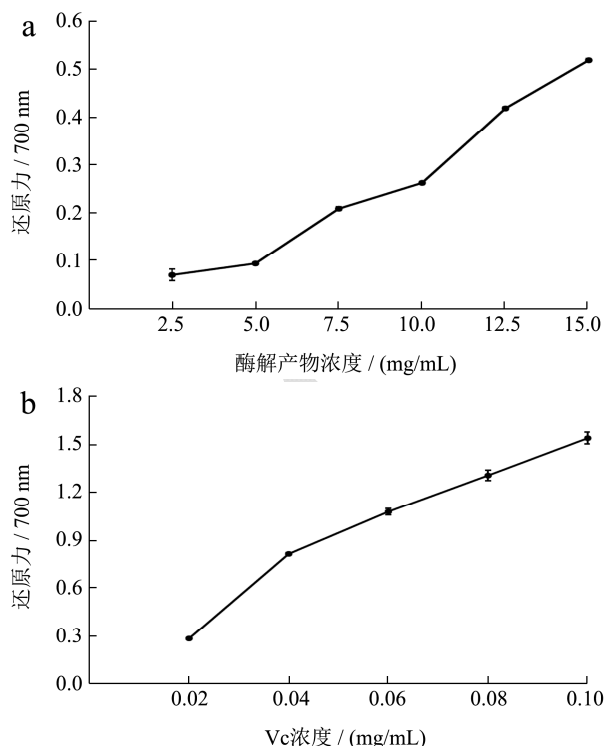


图11 重组琼胶酶酶解产物的还原能力

Fig.11 Reducing power of the recombinant agarase digestion products

琼脂糖酶解产物的抗氧化活性通过测定其清除自由基的能力进行研究。如图 8a 和 9a 所示, 酶解产物对·OH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力随着酶解产

物质质量浓度的增加而增强, 当酶解产物质量浓度为 10.00 mg/mL 时, 对·OH 自由基和 ABTS 自由基的清除率分别为 91.00%和 89.00%, 酶解产物对·OH 自由基和 ABTS 自由基的半数抑制剂量 IC₅₀ 分别为 1.28 mg/mL 和 3.46 mg/mL。由图 10a 可知, 酶解产物的质量浓度为 2.50~12.50 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率的增长速率快; 当酶解产物的质量浓度为 12.50 mg/mL 时, 产物对 DPPH 自由基清除率为 55.60%, 此后清除作用基本不变, 酶解产物对 DPPH 自由基的半数抑制剂量 IC₅₀ 为 9.87 mg/mL。如图 11a 所示, 酶解产物对铁离子的还原能力随着浓度的增高而增强, 酶解产物的质量浓度为 15.00 mg/mL 时, 还原力 (OD₇₀₀) 增加到 0.56。上述结果表明, 利用噬琼胶菌 β -琼胶酶水解琼脂糖的酶解产物具有良好的抗氧化活性。

3 结论

通过对来源于噬琼胶菌 AL1 的琼胶酶进行体外表达和纯化、酶学性质研究、酶解产物鉴定及抗氧化活性分析。结果表明, 来自噬琼胶菌 AL1 的重组琼胶酶分子质量为 105 ku, 琼胶酶的最适温度和 pH 是 50 °C、7.0, 在 60 °C 处理 1 h 后, 仍具有 35.31% 的酶活力, 在 5.00~11.00 的宽 pH 范围内处理 1 h, 仍具有 55% 以上的残余酶活力, 说明该重组酶具有良好的热稳定性和 pH 稳定性。该重组酶对去垢剂 (triton X-100, tween 20、tween 80 和 SDS) 和变性剂尿素表现出良好的耐受性, 有利于该重组琼胶酶的工业应用。利用噬琼胶菌 AL1 琼胶酶水解琼脂糖的终产物为新琼二糖, 产物经分析具有良好的抗氧化活性。新琼二糖具有良好的美白和保湿双重功效, 同时也具有一些抗氧化活性防止机体损伤^[23], 可广泛应用于食品、化妆品和医疗领域。

参考文献

- [1] Lee W K, Lim Y Y, Ho C L, et al. Biosynthesis of agar in red seaweeds: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 23-30
- [2] Hamer G K, Bhattacharjee S S, Yaphe W. Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ¹³C-n.m.r. spectroscopy [J]. Carbohydrate Research, 1977, 54(1): C7-C10
- [3] Duckworth M, Yaphe W. The structure of agar: part I. fractionation of a complex mixture of polysaccharides [J]. Carbohydrate Research, 1971, 16(1): 189-197
- [4] Chi W J, Chang Y K, Hong S K. Agar degradation by

- microorganisms and agar-degrading enzymes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 917-930
- [5] FU X T, Kim S M. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications [J]. Marine Drug, 2010, 8(1): 200-218
- [6] Chi W, Park D Y, Seo Y B, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel GH16 β -agarase AgaG1 from *Alteromonas* sp. GNUM-1 [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2014, 98: 4545-4555
- [7] Su B M, Xu X Q, Lin J, et al. Mutagenesis on the surface of a β -agarase from *Vibrio* sp. ZC-1 increased its thermo-stability [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 127: 22-31
- [8] Hsu P H, Lu W J, Shen F, et al. Extracellular production of a novel endo- β -agarase AgaA from *Pseudomonas vesicularis* MA103 that cleaves agarose into neoagarotetraose and neoagarohexaose [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16: 5590-5603
- [9] Li R K, Chen Z, Ying X J, et al. A novel GH16 beta-agarase isolated from a marine bacterium, *Microbulbifer* sp. BN3 and its characterization and high-level expression in *Pichia pastoris* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 1164-1170
- [10] Li J, Xie M S, Gao Y. Identification and biochemical characterization of a novel exo-type β -agarase Aga3463 from an Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 162-170
- [11] Minegishi H, Shimane Y, Echigo A, et al. Thermophilic and halophilic β -agarase from a halophilic archaeon *Halococcus* sp. 197A [J]. Extremophiles, 2013, 17(6): 931-939
- [12] Zhu Y B, Zhao R, Ni H, et al. Characterization of an alkaline β -agarase from *Stenotrophomonas* sp. NTa and the enzymatic hydrolysates [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86: 525-534
- [13] Ekborg N A, Taylor L E, Hutcheson S W, et al. Genomic and proteomic analyses of the agarolytic system expressed by *Saccharophagus degradans* 2-40 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72 (5): 3396-3405
- [14] Chen X L, Hou Y P, Lin H T, et al. Expression and characterization of a novel thermostable and pH-stable β -agarase from deep-sea *Bacterium flammeovirga* sp. OC4 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7251-7258
- [15] Zhu Y B, Wu L Y, Chen Y H, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginatelyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysate [J]. Microbiological Research, 2016, 182: 49-58
- [16] Lee D G, Park G T, Kim N Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from a marine *Agarivorans* isolate [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(23): 1925-1932
- [17] Feng Z H, Li M Y. Purification and characterization of agarase from *Rhodococcus* sp. Q5, a novel agarolytic bacterium isolated from printing and dyeing wastewater [J]. Aquaculture, 2013, 372: 74-79
- [18] An K, Shi X C, Cui F Y, et al. Characterization and overexpression of a glycosyl hydrolase family 16 beta-agarase YM01-1 from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01^T [J]. Protein Expression and Purification, 2018, 143: 1-8
- [19] Liu N, Mao X Z, Du Z J, et al. Cloning and characterisation of a novel neoagarotetraose-forming- β -agarase, AgWH50A from *Agarivorans gilvus* WH0801 [J]. Carbohydrate Research, 2014, 388: 147-151
- [20] Cui X, Jiang Y C, Meng L, et al. Heterologous expression of an agarase gene in *Bacillus subtilis*, and characterization of the agarase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 657-664
- [21] Ma J W, Yan Q J, Jiang Z Q, et al. Biochemical characterization of a truncated β -agarase from *Microbulbifer* sp. suitable for efficient production of neoagarotetraose [J]. Process Biochemistry, 2019, 87: 119-127
- [22] Hou Y P, Chen X L, Zeng R Y, et al. Expression and characterization of a thermostable and pH-stable β -agarase encoded by a new gene from *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(7): 1068-1075
- [23] Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, et al. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect [J]. bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(1): 162-163