

[文章编号] 1007-7405(2016)05-0338-07

重组褐藻胶裂解酶酶解工艺的优化及产物分析

王新侠¹, 乔超超¹, 倪辉^{1,2,3,4}, 肖安风^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}

- (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, 福建 厦门 361021;
3. 厦门南方海洋研究中心经济海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021;
4. 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为探索假交替单胞菌(*Pseudomonas syringae*)重组褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的动态过程变化, 采用DNS法和苯酚-硫酸法分别测定体系还原糖和总糖, 根据二者比例, 得出酶解产物随时间变化的平均聚合度, 从而研究各因素对褐藻胶降解过程的影响, 确定褐藻胶酶解工艺条件。结果表明, 重组褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的适宜工艺条件为: 水解温度 25 ℃, pH 7.5, 初始底物质量浓度 7 g/L, 加酶量 0.48 U, 静置条件下酶解反应 210 min。在此工艺条件下, 产生的还原糖的质量浓度达 0.878 g/L, 平均聚合度为 3。酶解终产物的质谱鉴定结果显示为单糖、二糖和四糖。

[关键词] 褐藻胶; 酶解; 工艺优化; 褐藻胶寡糖; 聚合度

[中图分类号] S 188

Optimization of the Enzymatic Process and Analysis of the Hydrolysates by the Recombinant Alginate Lyase

WANG Xin-xia¹, QIAO Chao-chao¹, NI Hui^{1,2,3,4}, XIAO An-feng^{1,2,3,4},
CAI Hui-nong^{1,2,3,4}, ZHU Yan-bing^{1,2,3,4}

- (1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China; 3. Key Laboratory of Recycling Application and Deep Processing in Economic Marine Alga, Xiamen South Oceanographic Reserach Center, Xiamen 361021, China; 4. Food Bioengineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: The aim of the study is to determine the dynamic process and technical conditions of alginate degradation by the recombinant alginate lyase from *Pseudomonas syringae*. The contents of the reducing sugar and the total polysaccharide were determined by 3, 5-dinitrosalicylic acid assay and phenol-sulfuric acid method, respectively. According to the ratio of reducing sugar and total sugar, the variation regularity of average polymeric degree of the enzymatic hydrolysates were obtained. The influence factors in the enzymatic process were studied, and the optimal conditions for alginate degradation by the recombinant alginate lyase were determined. The results showed that optimal conditions for enzymatic hydrolysis were: temperature 25 ℃, pH 7.5, initial substrate concentration 7 g/L, enzyme 0.48 U, and reaction time 210 min. Under these condition, the concentration of reducing sugar reached 0.878 g/L and the average polymeric degree fell

[收稿日期] 2016-03-14

[修回日期] 2016-05-12

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(2016J01162)

[作者简介] 王新侠(1990—), 女, 硕士生, 从事微生物学研究。通信作者: 朱艳冰(1976—), 女, 副教授, 从事微生物学研究。

to 3. The enzymatic hydrolysates were identified by mass spectrometer and the final products mainly included monosaccharide, disaccharide and tetrasaccharide.

Keywords: alginate; enzymolysis; process optimization; alginate oligosaccharides; degree of polymerization

0 引言

我国海藻资源丰富。褐藻是一种重要的经济海藻, 它包括海带、鹿角菜和马尾菜等。海洋褐藻含有褐藻胶 (alginate)、褐藻淀粉 (laminarans) 和褐藻糖胶 (fucoidans) 等多糖, 占脱脂褐藻干重的 40% ~ 80%, 其中褐藻胶含量最为丰富^[1]。

褐藻胶是由 (1, 4) - β - D - 甘露糖醛酸和 α - L - 古罗糖醛酸均聚或杂聚而形成的酸性粘多糖, 广泛应用于食品、医药、化学工业 (如印染、纺织、造纸等行业) 中^[2-4]。褐藻寡糖具有多种生物活性, 能促进植物生长、保湿、抑菌、抗肿瘤等^[5-8]。目前利用褐藻胶制备低分子量寡糖的方法主要有化学方法、物理方法和酶法^[9-11]。化学方法因会破坏多糖特有结构、操作过程不易控制和造成环境污染等而被限制使用; 物理方法虽克服了化学法的部分缺点, 但反应依旧不易控制且产物复杂。利用褐藻胶裂解酶生产褐藻胶寡糖, 具有高效、降解条件温和、水解产物不易被破坏、回收工序简单、不污染环境等优点, 为褐藻寡糖在功能性食品、多功能化妆品、新产品药物等方面的研究应用提供了新的手段。

文献 [12] 成功克隆了假交替单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 褐藻胶裂解酶基因, 并在大肠杆菌中大量表达, 得到了重组的褐藻胶裂解酶, 该酶具有水解海藻酸钠的活力。本文在此基础上, 拟通过单因素试验探讨酶法降解褐藻酸钠的条件, 探索适合降解的相关工艺参数, 同时研究其酶解产物, 以为酶法降解褐藻胶研究积累实践资料。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

海藻酸钠 (国药集团化学试剂有限公司), 化学纯; 其他试剂均为分析纯产品。含有假交替单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 褐藻胶裂解酶基因 (GenBank 登录号 AF222020) 的大肠杆菌工程菌株, 由本实验室构建和保存。

高速离心机 Avanti J-26S XP (BECKMAN COULTER), 小型高速离心机 Centrifuge 5415D (德国 Eppendorf Co. Ltd), 数显恒温水浴锅 HH-4 型 (国华电器有限公司), 电热恒温振荡水槽 DK2-2 (上海精宏实验设备有限公司), 紫外可见分光光度计 Unic7200 (上海尤尼柯仪器有限公司), MALDI SYNAPT Q-TOF MS (Waters Corp, USA)。

1.2 方法

1.2.1 褐藻胶裂解酶粗酶液的制备

将实验室构建的大肠杆菌工程菌株接种于 LB (Luria - Bertani) 培养基 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 为 0.8 ~ 0.9 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/mL , 22 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 16 h。1000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用 0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH = 7.0) 重悬菌体, 在冰浴条件下超声波破菌后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 10 min, 获得的上清液即为粗酶液。

1.2.2 测定还原糖的方法

采用 3, 5 - 二硝基水杨酸 (DNS) 法^[13]进行测定。

1.2.3 褐藻胶裂解酶的活力测定

取 460 μL 含 0.5% (质量分数) 海藻酸钠的 0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH = 7.0), 加入 40 μL 粗酶液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min 后, 用沸水终止反应。加入 0.5 mL DNS 试剂, 混匀后先沸

水浴 10 min, 再流水冷却, 然后于 540 nm 波长下测定反应液的吸光度值。通过制作葡萄糖标准曲线确定还原糖的含量, 再根据还原糖的产生量计算褐藻胶裂解酶的活力。褐藻胶裂解酶活力定义为: 在上述反应条件下, 每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.4 测定平均聚合度的方法

用苯酚-硫酸法测定体系中的总糖浓度^[14], 体系的平均聚合度是总糖含量与还原糖含量的比值, 其值取整数。

1.2.5 单因素考查褐藻胶裂解酶酶解褐藻胶的过程

称取一定质量的海藻酸钠溶于 0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH = 7.0) 中, 配制成 5 g/L 海藻酸钠溶液。取 10 mL 溶液装入 50 mL 具塞三角瓶中, 再加入 0.5 mL 褐藻胶裂解酶粗酶液 (1.6 U/mL), 在一定温度下进行水解反应 210 min, 且每隔 30 min 取 0.5 mL 酶解液, 沸水浴 5 min 终止反应, 测定还原糖含量, 并计算酶解过程中聚合度的变化。保持其他因素不变, 逐一改变底物质量浓度、底物溶液 pH 值、酶用量、酶解温度、振荡速率进行单因素试验^[15]。

1.2.6 酶解动力学分析

分别配制不同质量浓度的海藻酸钠溶液 (1, 3, 5, 7, 9, 11 g/L), 测定重组酶在不同质量浓度的底物下的酶活力。以产生还原糖速率的倒数 ($1/V$) 为纵坐标, 底物海藻酸钠的质量浓度的倒数 ($1/[S]$) 为横坐标, 用 Lineweaver - Burk 双倒数作图法作图, 求解酶的 V_m 和 K_m 。

1.2.7 酶解产物的质谱鉴定

以 7 g/L 海藻酸钠溶液 (pH = 7.5) 为底物, 加酶量 0.48 U, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 210 min。产物沸水浴 10 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按 1:3 (体积比) 边搅拌边加入无水乙醇, 混匀后静置 2 h, 沉淀多糖, 再 10 000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清, 直接上样 Q - TOF MS。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 底物质量浓度

根据 1.2.5 的条件, 分别考察不同质量浓度的底物对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响, 结果如图 1 所示。从图 1a 可知, 当底物质量浓度小于 7 g/L 时, 底物褐藻胶降解产生的还原糖含量随底物质量浓度的增大而增大; 当底物质量浓度大于 7 g/L 时, 随底物质量浓度的增大, 还原糖生成量增大不明显。图 1b 显示底物褐藻胶酶解反应体系的平均聚合度在反应初始阶段随底物质量浓度的增加而相应增加, 即底物质量浓度越小, 平均聚合度相对较小, 从而可以得出在酶量一定的条件下, 底物质量浓度越小, 褐藻胶的降解速率越高。酶解达到 210 min 时聚合度平均降至 3, 且继续酶解时聚合度保持不变。聚合度可进一步说明反应在 210 min 时不再进行, 还原糖生成量不再增加。

根据底物性质、产物的反馈抑制和反应体系中的微环境可解释此实验结果。因海藻酸钠本身具有粘性, 当底物质量浓度较低时, 产物还原糖易于扩散到溶液中, 不会造成还原糖局部积累而形成反馈抑制, 当底物质量浓度在一定范围内时, 生成还原糖的量随底物质量浓度升高而升高。当底物质量浓度超过此范围时, 由于溶液粘性的阻碍, 酶与底物结合到饱和和反应的时间延长, 加上产物反馈抑制等因素使酶解过程中的酶与底物结合的阻力增大, 所以当底物质量浓度较大时还原糖产量增加不显著。由此, 从褐藻胶的降解率和利用率考虑, 选取海藻酸钠质量浓度为 7 g/L 的海藻酸钠溶液为最佳。

2.1.2 底物溶液 pH 值

不同褐藻胶裂解酶的最适 pH 值不一样, 褐藻胶裂解酶的最适 pH 值一般在 7 左右。过酸或过碱的条件下可能使酶的活性中心构象改变而使酶变性失活。按照 1.2.5 的条件, 分别考察底物溶液的不同 pH 值对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的过程变化的影响, 结果如图 2 所示。从图 2a 可以看出, 在酸性条件下, pH 值的变化对褐藻胶裂解酶的影响较大, 当 $\text{pH} \leq 7.0$ 时, 生成还原糖的量随着 pH 值的增

加而大幅度增加; 当 pH = 7.0, 7.5 时, 生成还原糖的量达到最高且基本相同, 同时高于其他 pH 值条件下的还原糖生成量; 当 pH > 7.5 时, 还原糖产量随着 pH 值的增加而逐渐下降。随反应时间延长, 生成还原糖的量缓慢增加, 90 min 还原糖生成量达到稳定。pH 值为 7.0 和 7.5 时聚合度变化趋势一致, 在 90 min 后不再变化 (见图 2b)。

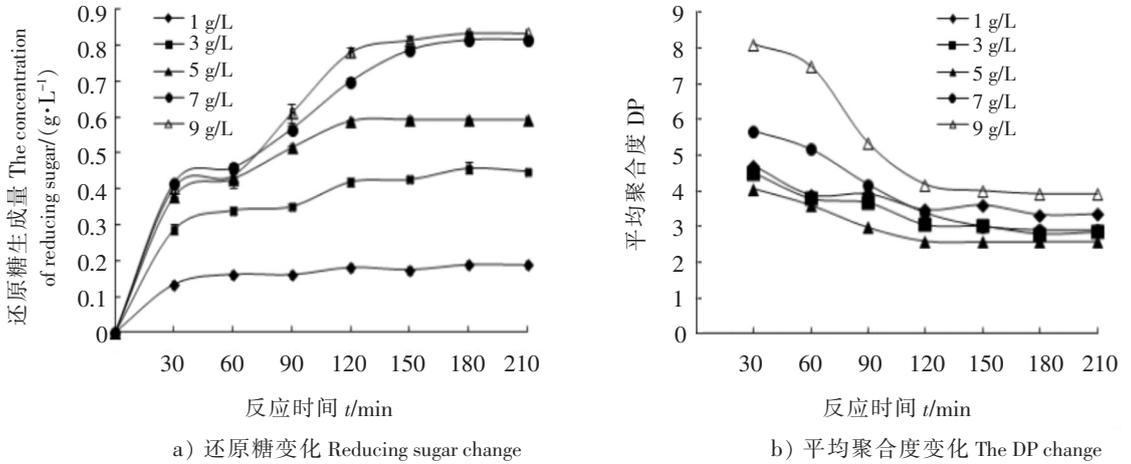


图1 底物质量浓度对酶解褐藻胶反应的影响

Fig.1 Effect of substrate concentration on alginate degradation by alginate lyase

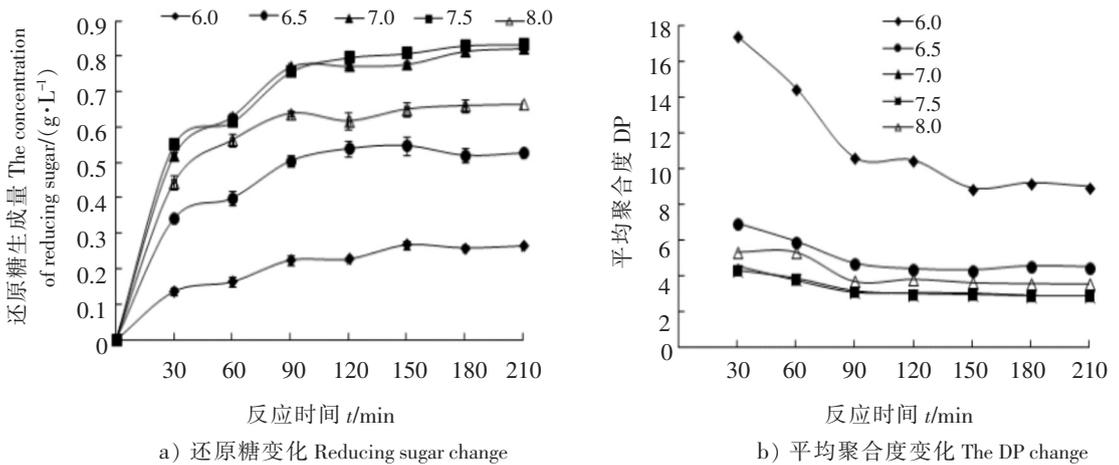


图2 pH 值对酶解褐藻胶反应的影响

Fig.2 Effect of pH value on alginate degradation by alginate lyase

2.1.3 加酶量

考察不同加酶量对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的酶解过程变化。从图 3a 可以看出, 在加酶量小于 0.48 U 时, 还原糖产量随褐藻胶裂解酶用量的增加而逐渐增加; 当加酶量大于 0.48 U 时, 还原糖产量随褐藻胶裂解酶用量的增加没有明显变化。从酶促动力学原理可知, 底物质量浓度在一定范围内, 酶分子与底物结合完全的情况下, 酶量增加会使初始催化反应速率加大。所以, 当酶过量时, 酶与底物结合已达到饱和, 水解反应速率不会随酶量增加再增大。从经济效益角度考虑, 褐藻胶裂解酶用量以 0.48 U 为最适。在此条件下, 聚合度在反应 90 min 后降至 3 且保持不变 (见图 3b), 其与还原糖生成量达到稳定的时间一致。

2.1.4 温度

考察不同温度对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的动态过程变化的影响, 结果见图 4。图 4a 显示, 当温度小于 30 ℃ 时, 还原糖产量随着温度的升高而增加; 当温度大于 30 ℃ 时, 随温度升高还原糖产量

呈下降趋势; 在 30 ℃ 时还原糖产量达到最高。此外, 随着反应时间的增加, 25 ℃ 和 30 ℃ 时的还原糖生成量基本相同, 因而从经济效益考虑, 确定酶水解最适温度为 25 ℃。在此条件下, 平均聚合度在反应 120 min 后降至 3, 此后聚合度没有明显下降 (见图 4b), 这与还原糖生成量达到稳定的时间一致。

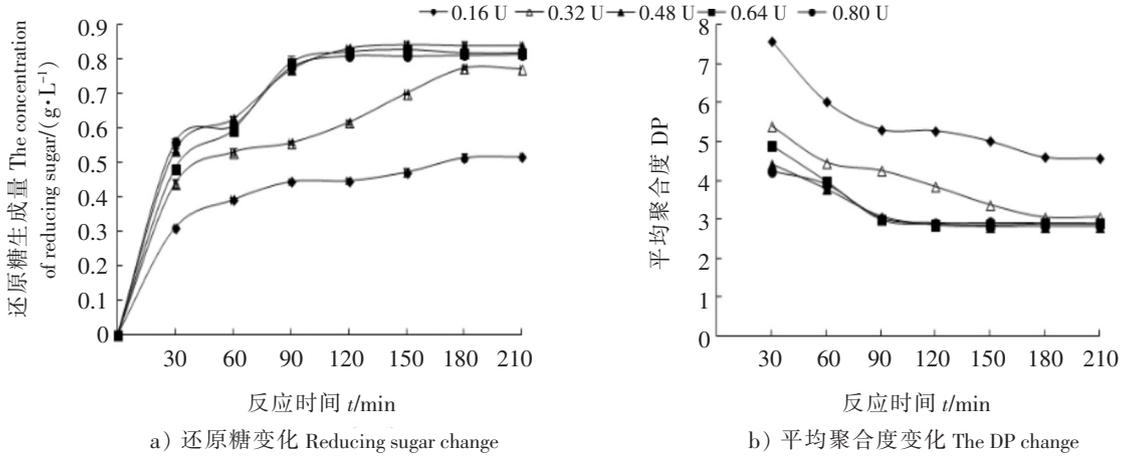


图 3 加酶量对酶解褐藻胶反应的影响

Fig.3 Effect of alginate lyase dosage on alginate degradation by alginate lyase

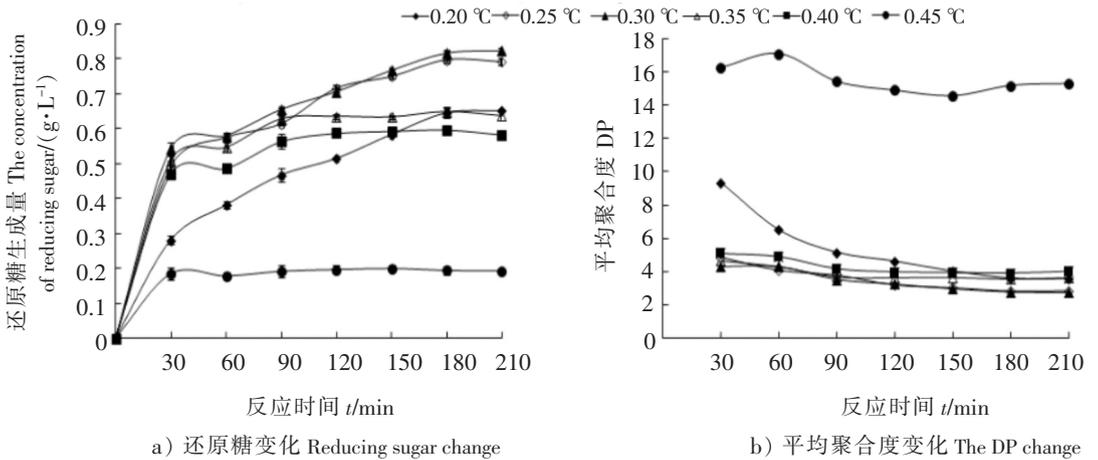


图 4 温度对酶解褐藻胶反应的影响

Fig.4 Effect of temperature on alginate degradation by alginate lyase

2.1.5 振荡速率

当酶解反应在振荡的环境时, 会增加酶与底物的接触机会, 及加速体系的传质和传热等过程, 从而使反应加快进行。考察不同振荡速率下褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的酶解过程变化, 结果见图 5。由图 5a 可知, 当振荡速率为 0, 30, 60 r/min 时, 对褐藻胶裂解酶降解影响不大, 生成还原糖的量基本相同。由图 5b 可知, 在振荡速率为 0, 30, 60 r/min 时反应体系的平均聚合度最先降到最低值 3。当高于 60 r/min 时, 还原糖含量随反应速率减缓而降低, 聚合度达到最低值的时间增加。在振荡速率为 0 r/min 时, 酶解 210 min 还原糖生成量为 0.878 g/L。

2.2 动力学参数

根据单因素试验结果, 在 pH 值为 7.5、酶用量为 0.48 U、温度为 25 ℃、静置条件下反应 210 min, 测定同一底物不同质量浓度的反应初速率。Lineweaver - Burk 双倒数拟合方程为: $y = 3.0831x + 0.577$ (见图 6), 计算得到褐藻胶裂解酶反应的 K_m 值为 5.34 mg/mL, V_{max} 为 1.73 U/mL。

2.3 酶解产物的质谱分析

由图 7 可知, 本试验单糖的信号峰在 183.02 ($M + 2H^+$), 二糖的信号峰在 460.08 ($2M + 8H^+ + 4Na^+$), 四糖的信号峰在 838.62 ($4M + 4H^+ + 3Na^+$)。即在海藻酸钠 7 g/L, 酶用量 0.48 U, pH 7.5, 温度 25 °C, 静置条件下反应 210 min, 所得的酶解产物为单糖、二糖和四糖。

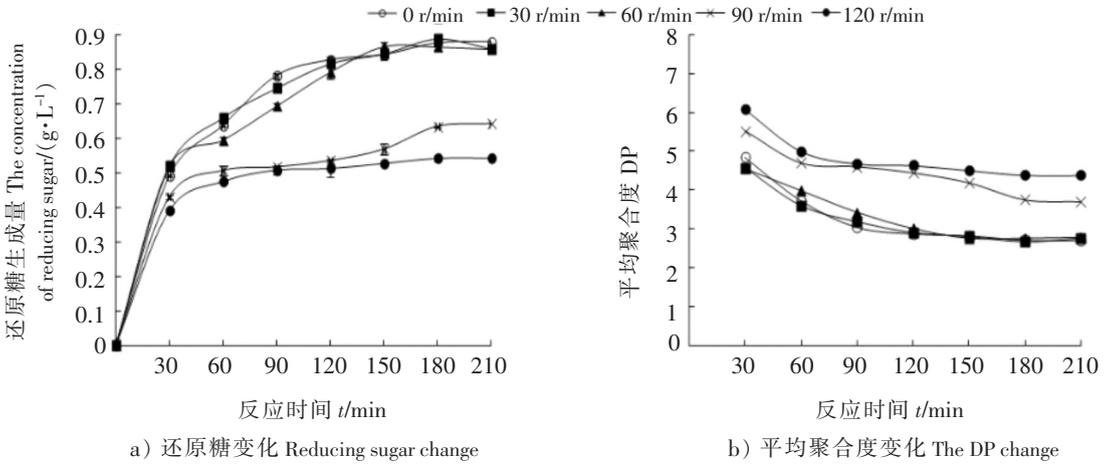


图 5 振荡速率对酶解褐藻胶反应的影响

Fig.5 Effect of shaking speed on alginate degradation by alginate lyase

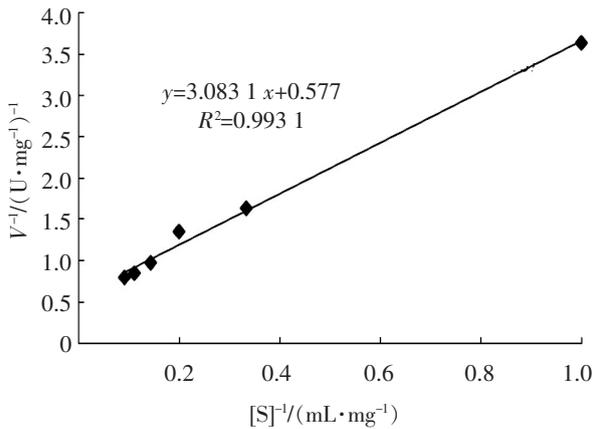


图 6 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线

Fig.6 Lineweaver-Burk plots for determination of the kinetic parameters of enzymatic hydrolysis process

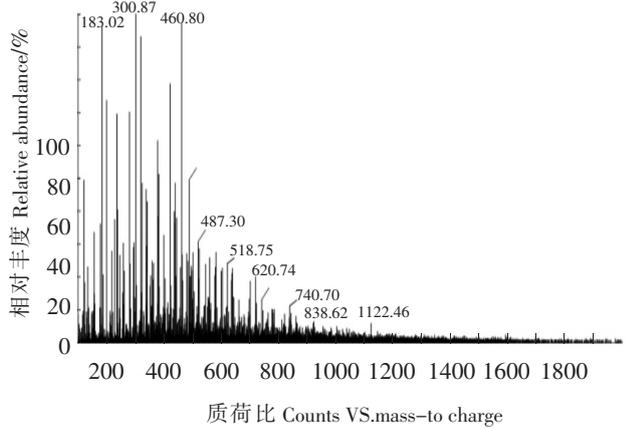


图 7 酶解产物的质谱鉴定

Fig.7 Identification of enzymatic hydrolysis products by MS

3 结论

将来源于假交替单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的褐藻胶裂解酶基因克隆至大肠杆菌中, 发酵培养大肠杆菌获得重组褐藻胶裂解酶进行酶解工艺研究, 分别考察不同因素对酶解过程的影响, 从而得出比较合适的酶解条件为: 在 pH 7.5 的磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液体系中, 以 7 g/L 的海藻酸钠溶液为底物, 加酶量 0.48 U, 在酶解温度 25 °C 且静置下酶解反应 210 min。在此条件下, 酶解反应体系中产物还原糖质量浓度为 0.878 g/L, 寡糖平均聚合度为 3, 质谱结果主要包括单糖、二糖和四糖。

[参考文献]

[1] ZVYAGINTSEVA T, SHEVCHENKO N, NAZARENKO E, et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of <http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- the Russian far-east: structure and biological action of low-molecular mass polyuronans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 320: 123-131. DOI:10.1016/j.jembe.2004.12.027.
- [2] VERA J, CASTRO J, GONZALEZON A, et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs*, 2011, 9(12):14-25. DOI:10.3390/md9122514.
- [3] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: a review of chemistry properties and applications. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 279-305. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.01.007.
- [4] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(1): 106-126. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [5] 黄菊, 丁晨, 谢超, 等. 海藻胶低聚寡糖的酶法制备纯化技术及保水理化性质分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 595-602. DOI:10.11693/hyhz20150200054.
- [6] LASKY L A. Selection-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annual Review of Biochemistry*, 1995, 64: 113-39.
- [7] HU X K, JIANG X L, HWANG H M, et al. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their substitution derivatives. *European Journal of Phycology*, 2004, 39(1): 67-71. DOI:10.1080/09670260310001636695.
- [8] YOKOSE T, NISHIKAWA T, YAMAMOTO Y, et al. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(2): 450-453. DOI:10.1271/bbb.80692.
- [9] 刘翼翔, 吴永沛. 褐藻胶裂解酶在制备海洋寡糖中的应用. *食品工业科技*, 2007, 6(28): 220-222.
- [10] 邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣, 等. 褐藻胶寡糖制备的研究进展. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 75-79.
- [11] SEN M. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Applied Radiation and Isotopes*, 2011, 69(1): 126-129. DOI:10.1016/j.apradiso.2010.08.017.
- [12] 吴丽云, 刘韩, 倪辉, 等. *Pseudomonas syringae* 褐藻胶裂解酶基因的克隆及信息学分析. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2015, 20(3): 179-185.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] AN Q D, ZHANG G L, WU H T, et al. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginate from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 106(1): 161-170. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.03988.x.
- [15] 肖琼, 肖安风, 姚德恒, 等. 琼胶酶水解工艺条件的优化及产物初步分析. *中国食品学报*, 2015, 15(12): 99-106. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2015.12.014.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)