

# 褐藻胶裂解酶 AlgL17 酶解工艺优化及酶解产物分析

梁梅芳<sup>1</sup>, 吴利洋<sup>1</sup>, 倪 辉<sup>1,2,3,4</sup>, 姜泽东<sup>1,2,3,4</sup>, 肖安风<sup>1,2,3,4</sup>, 朱艳冰<sup>1,2,3,4</sup>

(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. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市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)

**[摘要]** 为探索重组褐藻胶裂解酶 AlgL17 酶解工艺的优化条件, 采用 3, 5-二硝基水杨酸法(3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS) 和苯酚-硫酸法分别测定反应生成的还原糖及总糖含量, 计算平均聚合度, 从反应温度、反应 pH 值、底物质量分数、加酶量及振荡速率 5 方面探讨各因素对酶解反应的影响, 确定褐藻胶裂解酶酶解工艺的最优条件。结果表明, AlgL17 酶解海藻酸钠的最优工艺条件: 反应温度为 35 ℃, pH=8.0, 初始底物质量分数为 1.1%, 加酶量为 1.16 U, 不振荡反应 180 min。在此条件下, 产生的还原糖质量浓度为 7.09 g/L, 酶解产物的平均聚合度为 2。液相色谱质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 分析海藻酸钠酶解终产物为单糖、二糖、三糖和四糖。

**[关键词]** 褐藻胶裂解酶; 酶解; 工艺优化; 产物

**[中图分类号]** S 188

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process and Analysis of Hydrolysates by Alginate Lyase AlgL17

LIANG Meifang<sup>1</sup>, WU Liyang<sup>1</sup>, NI Hui<sup>1,2,3,4</sup>, JIANG Zedong<sup>1,2,3,4</sup>,  
XIAO Anfeng<sup>1,2,3,4</sup>, ZHU Yanbing<sup>1,2,3,4</sup>

(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. Research Center of Food Bioengineering of Xiamen City, Xiamen 361021, China;

4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed, Xiamen Southern Ocean Technology Center of China, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to explore the optimal conditions for enzymatic hydrolysis process of the recombinant alginate lyase AlgL17, the contents of reducing sugar and total sugar in sodium alginate hydrolysates were measured by DNS method and phenol-sulfuric acid method, respectively. The average degree of polymerization was calculated. The effects of various factors, such as reaction temperature, pH, substrate concentration, amount of enzyme added and oscillating rate, on enzymatic hydrolysis were investigated. The results showed that the optimum conditions for the hydrolysis of sodium alginate by AlgL17 were as follows: temperature 35 ℃, pH = 8.0, initial substrate mass concentration 1.1%, enzyme 1.16 U, reaction time 180 min with non-oscillation. At these conditions, the mass concentration of the produced reducing sugar was 7.09 g/L and the average poly-

**[收稿日期]** 2018-07-13

**[修回日期]** 2018-08-28

**[基金项目]** 福建省自然科学基金项目(2016J01162)

**[作者简介]** 梁梅芳(1994—), 女, 硕士生, 从事食品科学与工程方向研究。通信作者: 朱艳冰(1976—), 女, 教授, 博士, 从事食品生物化学方向研究。E-mail: yanbingzhu@163.com

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

merization degree was 2. LC-MS analysis showed that the final enzymatic hydrolysates of sodium alginate were monosaccharide, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide.

**Keywords:** alginate lyase; enzymolysis; process optimization; products

## 0 引言

褐藻胶是一种线性多糖, 由不同顺序的 $\beta$ -D-甘露糖醛酸(M)和 $\alpha$ -L-古罗糖醛酸(G)通过共价(1-4)-键连接<sup>[1]</sup>, 它是褐藻酸亲水衍生物的统称, 在墨角藻、海带、马尾藻和巨藻等褐藻的细胞壁中大量存在。

褐藻寡糖(alginate oligosaccharides)是褐藻胶的裂解产物, 它具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗菌<sup>[4]</sup>和促进植物生长<sup>[5]</sup>等生理活性, 在农业、医药和食品等多个领域都有应用<sup>[6]</sup>。酶解法、化学法及物理法是现在主要的降解褐藻胶的方法<sup>[7]</sup>。与化学法、物理法相比, 酶解法有更高的寡糖得率, 有利于定向制备, 并且反应条件相对温和, 不会对褐藻寡糖的还原末端造成伤害。有研究表明<sup>[8]</sup>, 酶解法产生的褐藻寡糖比其他种类寡糖有更好的生物活性。

褐藻胶裂解酶(alginate lyase)通过消除糖苷键而降解海藻酸钠<sup>[9-10]</sup>, 是一种重要的海藻工具酶。褐藻胶裂解酶的酶学性质与其来源有关, 不同来源的褐藻胶裂解酶的酶学性质存在较大差异<sup>[11]</sup>, 现今研究的热点是微生物来源的褐藻胶裂解酶, 如来源于假交替单胞菌 *Pseudoaltermonas elyakovii*、固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 以及棒杆菌 *Corynebacterium* sp. ALY-1 的褐藻胶裂解酶。

在先前的研究中, 本课题组筛选到一株褐藻胶裂解酶高产菌 *Microbulbifer* sp. ALW1<sup>[12]</sup>。本文将菌株 ALW1 的褐藻胶裂解酶基因 *AlgL17* (GenBank 收录号 KY780301) 在大肠杆菌中大量诱导表达, 从反应温度、pH 值、底物浓度、加酶量及振荡速率等方面着手, 以单因素试验探讨重组褐藻胶裂解酶 *AlgL17* 降解海藻酸钠的条件, 探索适合降解的相关工艺参数, 以期酶法降解褐藻胶研究积累实践资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株 褐藻胶裂解酶 *AlgL17* 大肠杆菌基因工程菌, 由本实验室构建与保藏。

1.1.2 主要仪器与设备 HH-4/HH-8 水浴锅数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; 冷冻离心机, BECKMAN COUNTER; JO92-II N 超声波细胞粉碎机, 宁波新艺超声设备有限公司; Epoch2T 微量酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; ACQUITY HPLC/MALDI SYNAPT Q-TOF MS, 美国 Waters Corp。

1.1.3 主要试剂 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。

### 1.2 实验方法

1.2.1 褐藻胶裂解酶粗酶的制备 将实验室保存的重组褐藻胶裂解酶 *AlgL17* 大肠杆菌基因工程菌按 1.2% 的接种量接种到加有 250  $\mu$ L 卡那霉素 (50 g/L) 的 250 mL LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至  $A_{600}$  为 0.6~0.8, 加入 25  $\mu$ L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) (0.5 mol/L) 进行发酵培养, 在 18  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 20 h。将发酵的菌液在 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集菌体沉淀, 用 10 mL 50 mmol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=8.0) 缓冲液重悬菌体, 冰浴条件下对重悬的菌体进行超声破碎, 接着在 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 收集上清液, 即为粗酶液。

1.2.2 还原糖的测定 利用 3, 5-二硝基水杨酸法 (3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS)<sup>[13]</sup> 测定还原糖含量, 标准曲线利用葡萄糖绘制。

1.2.3 总糖含量的测定 利用苯酚-硫酸法<sup>[14]</sup>测定体系中的总糖含量。

1.2.4 平均聚合度的测定 酶解反应体系中的平均聚合度 (average degree of polymerization, DP) 按照以下公式计算: 平均聚合度 = 总糖含量 / 还原糖含量, 其值取整数<sup>[15]</sup>。

1.2.5 褐藻胶裂解酶的活力测定 取 490  $\mu\text{L}$  质量体积比为 0.5% 海藻酸钠底物溶液 (利用  $\text{pH} = 8.0$  的 50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液配制), 向其中加入 10  $\mu\text{L}$  粗酶液, 35  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 后, 沸水浴 5 min 终止反应, 加入 500  $\mu\text{L}$  DNS 试剂, 沸水浴 10 min, 迅速冷却后, 在 540 nm 下测定吸光度值。根据还原糖的生成量计算酶活力。褐藻胶裂解酶的酶活力单位定义为: 在上述条件下, 每分钟降解底物产生 1  $\mu\text{mol}$  还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.6 单因素试验 取 4.9 mL 质量分数 0.5% 海藻酸钠底物溶液, 向其中加入 0.1 mL 粗酶液, 混匀后分别置于 25, 30, 35, 40, 45, 50  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 210 min, 每隔 30 min 取出 0.5 mL, 沸水浴 5 min, 然后加入 0.5 mL DNS 试剂, 沸水浴 10 min, 取 0.1 mL 反应液稀释至 1 mL, 在 540 nm 下测定吸光度值。以灭活的酶液作为对照组, 与样品组在同等条件下反应。保持其他因素不变, 按上述方法逐一改变底物质量浓度、底物溶液 pH 值、酶用量和振荡速率进行单因素试验, 每个因素最优结果用于下一个单因素试验。

1.2.7 酶解动力学 分别取 4.9 mL 质量分数 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%, 1.1% 的海藻酸钠底物溶液, 向其中加入 0.1 mL 粗酶液, 按照节 1.2.5 的方法测定吸光度值。以底物质量浓度的倒数 ( $1/[S]$ ) 为横坐标, 还原糖产生速率的倒数 ( $1/V$ ) 为纵坐标, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 求解褐藻胶裂解酶的  $V_m$  和  $K_m$ 。

1.2.8 重组褐藻胶裂解酶的酶解产物分析 取质量分数 0.5% 海藻酸钠溶液 30 mL, 加入 6 U 褐藻胶裂解酶, 35  $^{\circ}\text{C}$  下反应, 每小时取一次样, 测定还原糖含量, 当还原糖含量稳定时, 补加 3 U 褐藻胶裂解酶继续反应, 直到还原糖含量再次稳定。将反应液沸水浴 10 min, 冷却后, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 收集上清液即为酶解产物。将酶解产物上样于液质联用仪的进样口中, 通过液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 进行分析。液相分析条件为: 采用 ACQUITY BEH C18 柱 (2.1 mm  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 以流动相 A (质量分数 0.1% 甲酸) 和流动相 B (体积分数 100% 乙腈) 进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min。根据液相峰的不同, 利用质谱检测各峰的成分。

## 2 结果与分析

### 2.1 褐藻胶裂解酶活力

以海藻酸钠为底物, 利用 DNS 法测定得到的褐藻胶裂解酶的活力为 11.6 U/mL。

### 2.2 单因素对褐藻胶裂解酶酶解海藻酸钠的影响

2.2.1 反应温度对酶解反应的影响 探究不同反应温度对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响, 结果如图 1 所示。由图 1a 可见, 当反应温度低于 35  $^{\circ}\text{C}$  时, 反应温度越高, 还原糖生成量也随之增高, 其原因是: 温度升高使得底物的热能被提高, 导致反应速率加快进而增大了还原糖生成量。当反应温度高于 35  $^{\circ}\text{C}$  时, 还原糖生成量随反应温度的升高而减小, 可能是温度过高影响了酶的活力, 使得还原糖生成量减少。当反应温度在 35  $^{\circ}\text{C}$  和 30  $^{\circ}\text{C}$  时, 还原糖生成量最大, 在 35  $^{\circ}\text{C}$  下比在 30  $^{\circ}\text{C}$  下更快达到反应平衡。在此条件下, 平均聚合度在反应 60 min 后降至 2, 此后聚合度无明显下降 (见图 1b), 这与还原糖生成量达到平衡的时间一致。因此, 综合考虑, 反应温度选 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 底物质量分数对酶解反应的影响 探究不同底物质量分数对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响, 结果如图 2 所示。由图 2a 可见, 当底物质量分数低于 1.1% 时, 还原糖生成量随底物浓度的增大而持续升高; 当海藻酸钠质量分数高于 1.1% 时, 还原糖生成量明显减小, 可能是由于海藻酸钠水溶液有一定粘性, 浓度过大不利于底物扩散, 从而降低反应效率; 当底物质量分数为 1.1% 时, 还原糖生成量达最大值。由图 2b 可见, 当底物质量分数为 1.3% 时, 平均聚合度随反应时间逐渐降低; 当底物质量分数  $\leq 1.1\%$  时, 酶解体系的平均聚合度随底物浓度的变化波动并不明显, 在酶解 60 min 时, 平均聚合度均降至 2, 继续酶解基本不变。综合考虑, 选择底物质量分数为 1.1%。

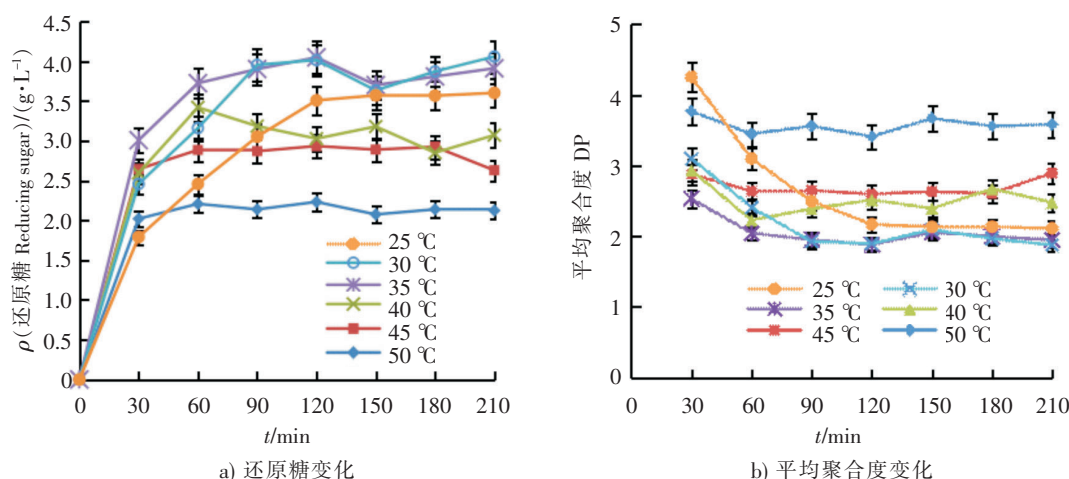


图 1 反应温度对酶解反应的影响

Fig.1 The effects of temperature on the enzymatic hydrolysis reaction

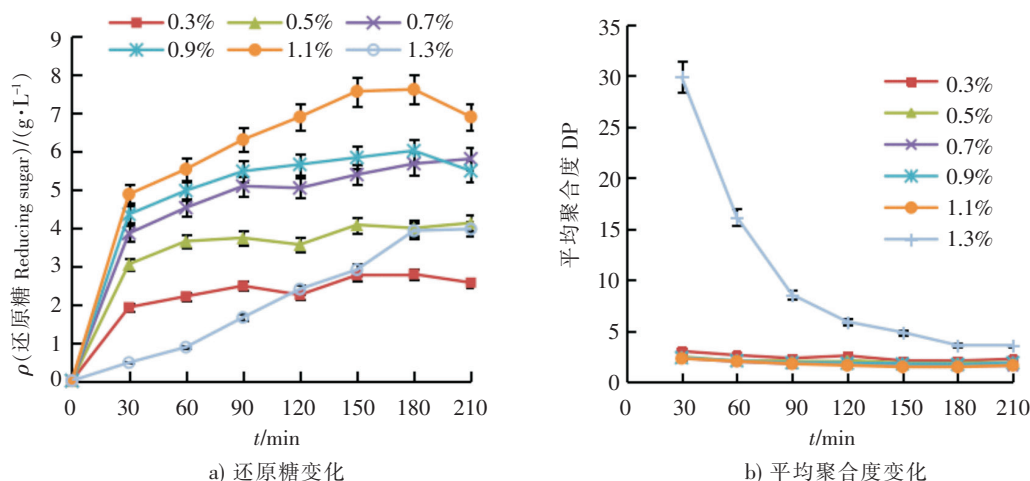


图 2 底物质量分数对酶解反应的影响

Fig.2 The effects of substrate concentration on the enzymatic hydrolysis reaction

2.2.3 pH 值对酶解反应的影响 酶活性中心上的催化基团中质子的受体或供体所需的离子化状态以及必需基团的解离程度是影响酶解反应的重要因素,它们都会受到 pH 值的影响,进而影响酶与底物的结合。探究反应体系不同 pH 值对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响,结果如图 3 所示。在  $\text{pH} < 8.0$  时, pH 值的变化对褐藻胶裂解酶的影响较大,除  $\text{pH} = 6.5$  外,体系内还原糖生成量随着 pH 值的增加而升高;  $\text{pH} > 8.0$  时,还原糖生成量随反应时间增加而增加,180 min 后呈下降趋势;  $\text{pH} = 8.0$  时还原糖生成量最大,在此条件下,随反应时间的延长,还原糖生成量迅速增加,在 180 min 时还原糖生成量达最高 (见图 3a), 平均聚合度稳定在 2 左右 (见图 3b)。因此,选择  $\text{pH} = 8.0$ 。

2.2.4 加酶量对酶解反应的影响 探究反应体系不同加酶量对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响,结果如图 4 所示。反应体系中添加不同的酶量,还原糖最终的生成量相近。加酶量为 0.1 mL 和 0.2 mL 的反应体系平衡趋势相近;加酶量  $\geq 0.3$  mL 时,反应体系平衡趋势相近,但平衡所用时间比加酶量为 0.1 mL 和 0.2 mL 时更短 (见图 4a),在底物一定的情况下,酶浓度增加,加快了反应速率,使其更快达到平衡状态。在反应 150 min 时所有反应体系的 DP 值均达到 2 左右 (见图 4b)。因此,为了节约成本,选择加酶量 0.1 mL。

2.2.5 振荡速率对酶解反应的影响 探究反应体系不同振荡速率对褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的影响,结果如图 5 所示。在各振荡速率下,体系所产生的还原糖量均相同,平衡趋势相近,到达平衡所用时间相同 (见图 5a)。平均聚合度的变化也相似,在 150 min 时不同振荡速率的反应,DP 值均达 2 左右

(见图 5b)。综上所述, 振荡速率对酶解反应没有明显影响。因此, 从节约能源的角度考虑, 选择不振荡反应。不振荡反应 180 min, 产生的还原糖质量浓度为 7.09 g/L, 平均聚合度为 2。

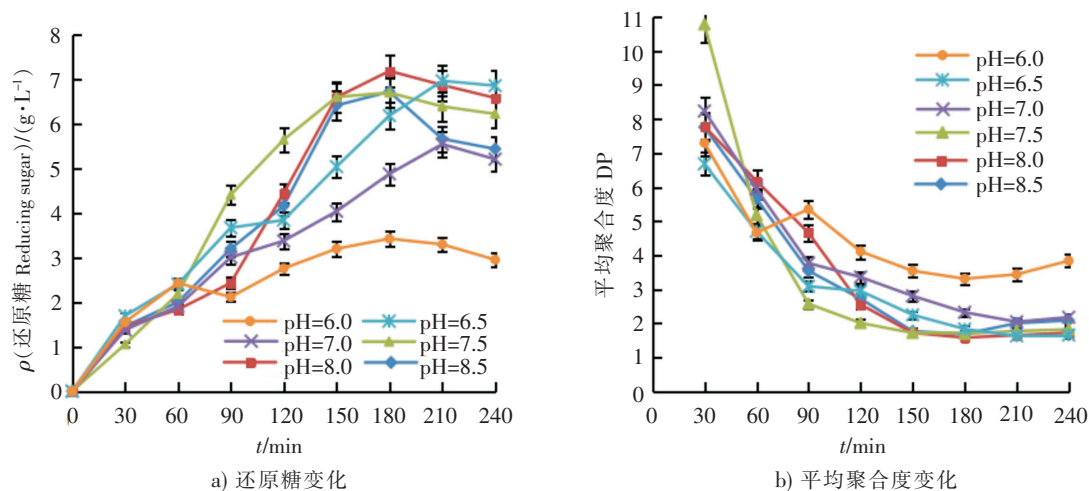


图3 pH值对酶解反应的影响

Fig.3 The effects of pH on the enzymatic hydrolysis reaction

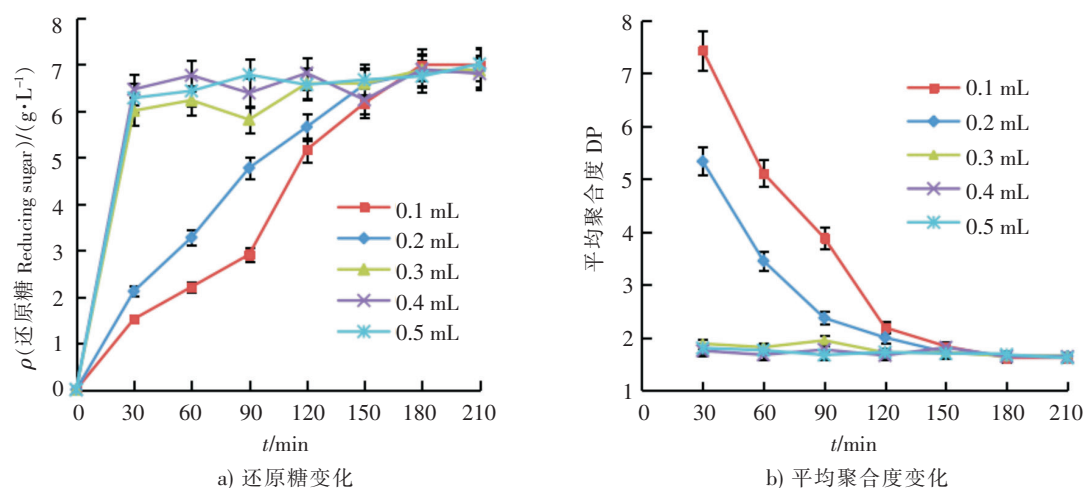


图4 加酶量对酶解反应的影响

Fig.4 The effects of enzyme dosage on the enzymatic hydrolysis reaction

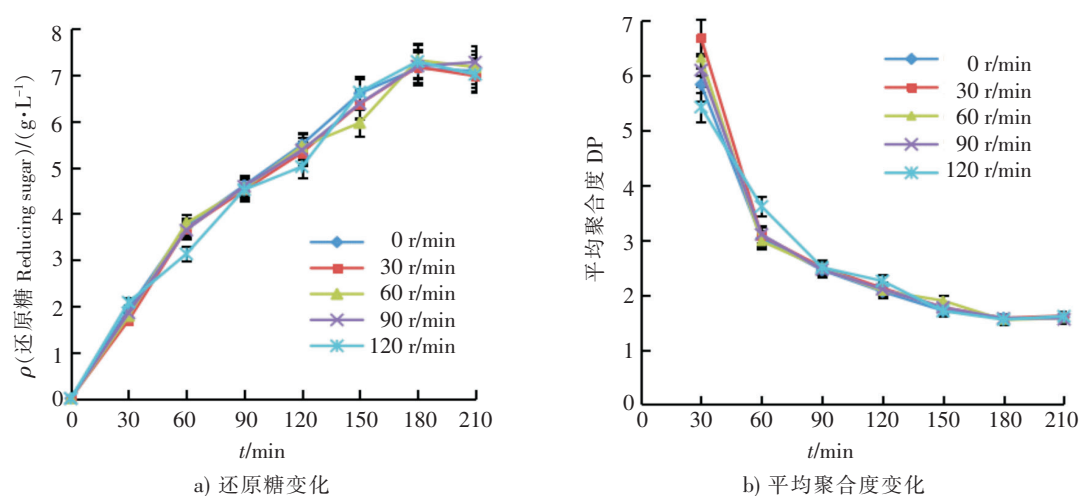


图5 振荡速率对酶解反应的影响

Fig.5 The effects of oscillation rate on the enzymatic hydrolysis reaction

### 2.3 动力学参数

测定褐藻酸钠不同质量浓度时反应体系的反应初速率,按双倒数作图法作  $1/V-1/[S]$  曲线,结果如图 6 所示。根据方程求得酶的  $K_m$  为 20.31 g/L,  $V_{max}$  为 2.68 U/mL。

### 2.4 酶解产物的质谱分析

利用 AlgL17 降解海藻酸钠,将其酶解产物进行 LC-MS 分析。液相色谱峰图中,海藻酸钠降解物分别在保留时间 5.28 min 和 6.94 min 存在两个主要峰(见图 7a);未酶解海藻酸钠的 LC 峰图显示在保留时间 5.28 min 和 6.94 min 不存在峰(见图 7b)。采用 MS 对液相主要峰进一步分析,在负离子模式下,产物平均聚合度和质荷比根据  $[DP_x - H]^- (x = 1, 2, 3, 4, 5)$  定为 1 (质荷比为 175), 2 (质荷比为 351), 3 (质荷比为 527), 4 (质荷比为 703), 5 (质荷比为 879)。从图 7c 可知,液相色谱 5.28 min 的主峰中包括单糖、二糖和三糖产物;从图 7d 可知,6.94 min 的主峰中包括单糖、二糖、三糖和四糖产物。结果表明,海藻酸钠经褐藻胶裂解酶 AlgL17 降解生成单糖、二糖、三糖和四糖。

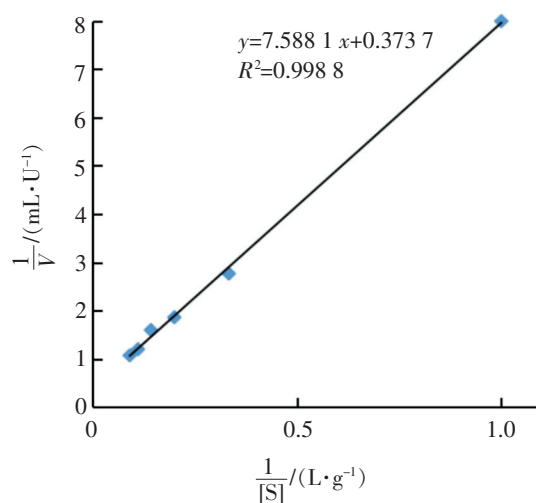
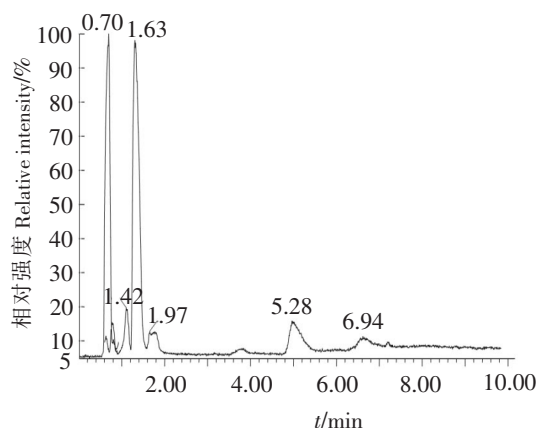
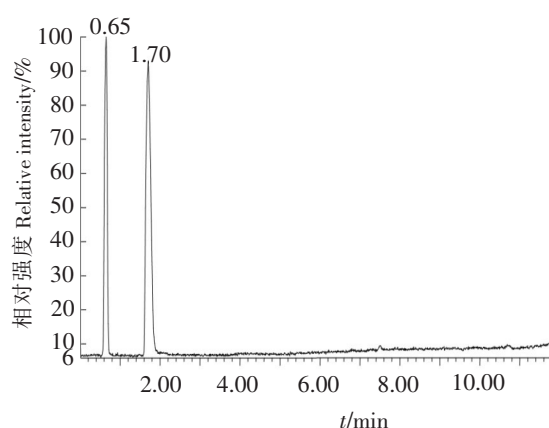


图 6 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线

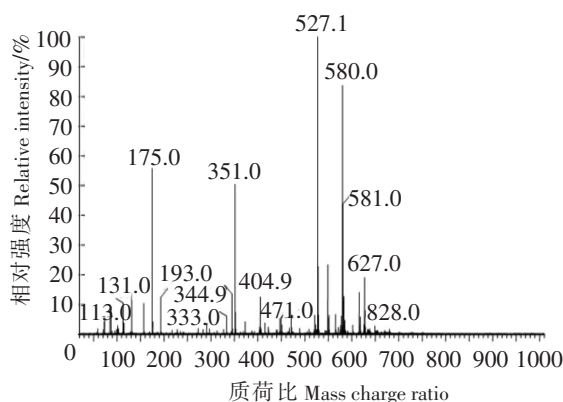
Fig.6 Lineweaver-Burk plots for determination of the kinetic parameters of enzymatic hydrolysis process



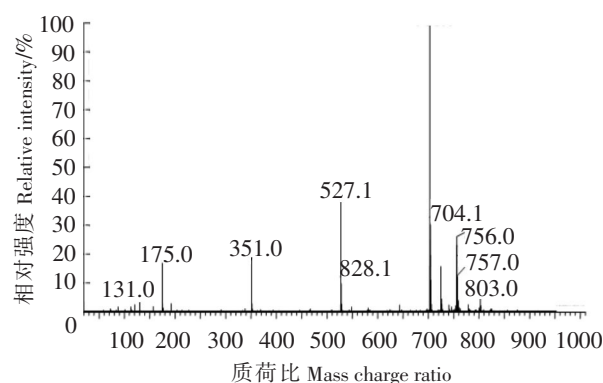
a) 酶解海藻酸钠的 LC 峰图



b) 未酶解海藻酸钠的 LC 峰图



c) 主峰 5.28 min 的产物 MS 分析



d) 主峰 6.94 min 的产物 MS 分析

图 7 海藻酸钠酶解产物的 LC-MS 分析

Fig.7 LC-MS analysis of enzymatic hydrolysates of sodium alginate

### 3 结论

将来源于 *Microbulbifer* sp. ALW1 的褐藻胶裂解酶基因 *AlgL17* 在大肠杆菌中重组表达, 重组的褐藻胶裂解酶 AlgL17 的最适酶解条件: 反应温度为 35 ℃, pH = 8.0, 初始底物质量分数为 1.1%, 加酶量 1.16 U, 不振荡反应 180 min。达到平衡时, 产生的还原糖质量浓度为 7.09 g/L, 产物的平均聚合度为 2。LC-MS 分析显示, 海藻酸钠酶解终产物为单糖、二糖、三糖和四糖。

### [ 参考文献 ]

- [1] WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 289-340. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.289.
- [2] FALKEBORG M, CHEONG L Z, GIANFICO C, et al. Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 185-194. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.05.053.
- [3] HU X K, JIANG X L, HWANG H M, et al. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives [J]. European Journal of Phycology, 2004, 39(1): 67-71. DOI:10.1080/09670260310001636695.
- [4] 陈丽, 张林维, 薛婉立. 褐藻寡糖的制备及抑菌性研究 [J]. 中国饲料, 2007, 14(9): 34-35.
- [5] IWASAKI K, MATSUBARA Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward lettuce [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 64(5): 1067-1070. DOI:10.1271/bbb.64.1067.
- [6] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: a review of chemistry properties and applications [J]. Biomaterials, 2012, 33(11): 3279-3305. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.01.007.
- [7] 邵宏博, 唐丽薇, 陈带娣, 等. 褐藻胶寡糖制备的研究进展 [J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 75-79.
- [8] WANG Y, HAN F, HU B. *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate [J]. Nutrition Research, 2006, 26(11): 597-603. DOI:10.1016/j.nutres.2006.09.015.
- [9] 陈俊帆, 石波, 范红玲, 等. 褐藻胶裂解酶的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 428-431.
- [10] XU F, WANG P, ZHANG Y Z, et al. Diversity of three-dimensional structures and catalytic mechanisms of alginate lyases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(3): 1-12. DOI:10.1128/AEM.02040-17.
- [11] 罗丹丹, 薛永常. 褐藻胶裂解酶的研究进展 [J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 95-98.
- [12] ZHU Y B, WU L Y, CHEN Y H, et al. Characterization of an extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates [J]. Microbiological Research, 2016, 182: 49-58. DOI:10.1016/j.micres.2015.09.004.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] DOUBOIS M, GILLES K, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and substance [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350-356.
- [15] ANQ 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 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 106(1): 161-170.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)