

假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶的酶解工艺优化及产物分析

李鹤宾¹, 牟明静², 洪璇¹, 吴婷¹, 陈艳红², 姜泽东², 朱艳冰²

(1. 厦门医学院药理学系, 福建 厦门 361023; 2. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为探索假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶的酶解工艺, 以 κ -卡拉胶为底物, 还原糖生成量为评价指标, 对酶解工艺进行优化。采用 3,5-二硝基水杨酸法和苯酚-硫酸法分别测定还原糖和总糖含量, 计算酶解产物的平均聚合度, 并利用质谱鉴定酶解产物。结果显示, 假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶降解 κ -卡拉胶的优化工艺条件为: 加酶量为 0.35 U (反应体系 5 mL), 反应温度为 40 °C, 反应 pH=8.0, κ -卡拉胶底物质量浓度为 9 g/L。在此条件下, 酶解反应 240 min 后产生的还原糖质量浓度为 1.531 g/L, 酶解产物的平均聚合度为 2。该 κ -卡拉胶酶酶解反应的 $K_m = 2.07$ g/L, $V_{max} = 7.25$ U/mg。质谱分析显示, 假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶降解 κ -卡拉胶的产物为 κ -卡拉胶二糖和 κ -卡拉胶四糖。

[关键词] κ -卡拉胶; 酶解; 工艺优化; 聚合度; κ -卡拉胶寡糖

[中图分类号] TQ 925

Optimization of the Enzymatic Hydrolysis Process Using *Pseudoalteromonas* sp. κ -Carrageenase and Analysis of the Hydrolysates

LI Hebin¹, MOU Mingjing², HONG Xuan¹, WU Ting¹, CHEN Yanhong², JIANG Zedong², ZHU Yanbing²

(1. Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China;

2. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to explore the enzymatic hydrolysis process using κ -carrageenase from *Pseudoalteromonas* sp., κ -carrageenan was used as the substrate and the amount of reducing sugar production was used as the evaluation index to optimize the enzymatic hydrolysis process. The contents of the reducing sugar and total sugar were determined by the methods of 3, 5-dinitrogen salicylic acid and phenol-sulfuric acid, respectively. The average polymerization degree of the enzymatic hydrolysates was calculated, and the hydrolysis products were analyzed by mass spectrometry. The results showed that the optimal process for the κ -carrageenan degradation by *Pseudoalteromonas* sp. κ -carrageenase were as follows: enzyme amount of 0.35 U (5 mL reaction system), reaction temperature of 40 °C, reaction pH value of 8.0, and κ -carrageenan substrate concentration of 9 g/L. Under the conditions, the concentration of the reducing sugar produced was 1.531 g/L, and the average polymerization degree of the enzymatic hydrolysates was 2 after reaction for 240 min. The K_m value of the κ -carrageenase was 2.07 g/L, and the V_{max} value was 7.25 U/mg. Mass spectrometry analysis showed that the products of κ -carrageenan degradation by *Pseudoalteromonas* sp. κ -carrageenase were κ -carrageenan disaccharide and κ -carrageenan tetraose.

[收稿日期] 2022-05-04

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2020J01679); 漳州市科技重大专项 (ZZ2019ZD15)

[作者简介] 李鹤宾 (1974—), 男, 副教授, 博士, 从事微生物学方向研究。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@jmu.edu.cn

Keywords: κ -carrageenan; enzymatic hydrolysis; process optimization; degree of polymerization; κ -carrageenan oligosaccharide

0 引言

卡拉胶 (carrageenan) 是由半乳糖和脱水半乳糖单元通过 α -1,3 糖苷键和 β -1,4 糖苷键交替连接而成的一种线性硫酸酯化多糖^[1], 主要从红藻 (如紫菜、角叉菜等) 中提取。卡拉胶寡糖 (carrageenan oligosaccharides) 是卡拉胶的降解产物, 相较于多糖, 寡糖的分子质量低, 溶解性好, 在体内更容易被吸收^[2]。研究表明, 降解后的卡拉胶寡糖因其活性基团的充分暴露, 具有抗氧化^[3]、抗肿瘤^[4]、免疫调节^[5]、降血压^[6]、抗凝血^[7]、抗炎^[8]、抗菌^[9]等多种生物活性。目前, 卡拉胶的降解方法有多种, 包括酸解法^[10]、 H_2O_2 氧化降解法^[11]、酶解法^[12]等。其中, 酶解法降解卡拉胶具有底物特异性高、反应过程及产物分子质量易控制、反应条件温和、环境友好等特点, 更具应用优势, 是制备卡拉胶寡糖的优选方法^[13]。

κ -卡拉胶酶 (κ -carrageenase) 通过切割 β -1,4 糖苷键而降解 κ -卡拉胶, 是一种重要的卡拉胶降解工具酶^[14]。 κ -卡拉胶酶隶属于糖苷水解酶 16 家族, 分布广泛, 主要从海洋细菌中获得^[15]。目前, 已被表征的 κ -卡拉胶酶主要包括 *Pseudoalteromonas* sp. ZDY3^[16]、*Pseudomonas elongata*^[17]、*Vibrio* sp. NJ-2^[18]、*Pedobacter hainanensis*^[19]和 *Pseudoalteromonas carrageenovora*^[20]等。

在先前的研究中, 文献 [21] 表征了假交替单胞菌 JMUZ2 来源 κ -卡拉胶酶的酶学性质, 本文利用该 κ -卡拉胶酶水解 κ -卡拉胶, 优化其酶解工艺条件, 并鉴定酶解产物, 以期利用该 κ -卡拉胶酶降解卡拉胶的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶 *Escherichia coli* BL21 工程菌由集美大学海洋食品与生物工程学院食品生物技术研究室保存; κ -卡拉胶购于深圳恒生生物科技有限公司; BCA 蛋白质质量检测试剂盒购于北京全式金生物技术股份有限公司; 金属镍螯合琼脂糖凝胶 6FF 购于 GE Healthcare Life Sciences 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯产品。

1.2 仪器与设备

Avanti™ J-25 型冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; 超声破碎仪, 上海虔钧科学仪器有限公司; ALP 高压蒸汽灭菌锅, 日本 ALP 公司; FE20 型 pH 计, METTLER TOLEDO 公司; HJ-1 型数显恒温磁力搅拌器, 峥嵘仪器有限公司; ZHWY-2102 型双层全温度恒温培养摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; SW-CJ-2FD 型双人单面超净工作台, 苏州净化设备有限公司; XMTD-8222 型数显恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; Epoch2T 酶标仪, 美国博腾仪器有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 7934070 型冷冻干燥仪, 美国 Thermo Fisher 公司; TSQ Quantum Access MAX LC-MS, Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 重组 κ -卡拉胶酶的诱导表达与纯化

参考张成昊等^[21]的方法, 将假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶基因工程菌按 1% 的接种量接种到 300 mL 含有 50 g/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 $A_{600} = 0.8$ 时, 加入 30 μ L 0.5 mol/L IPTG 溶液, 将菌株在 16 °C、180 r/min 的恒温摇床中诱导培养 24 h。培养液在 4 °C、60 000g 条件下离心 10 min, 弃上清液, 细胞用 12 mL 缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 重悬。在冰浴条件下利用超声波进行破菌后, 4 °C、13 000g 条件下离心 20 min, 获得的上清液即为 κ -卡拉胶酶粗酶液。重组酶的纯化参照金属镍螯合琼脂糖凝

胶 6FF 使用说明书进行, 纯化后的产物利用 SDS-PAGE 进行分析, 利用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒进行蛋白质浓度测定。

1.3.2 还原糖和总糖含量的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 测定还原糖含量, 标准曲线利用半乳糖绘制。采用苯酚-硫酸法^[22]测定总糖含量。

1.3.3 平均聚合度的测定

酶解产物的平均聚合度为总糖含量与还原糖含量的比值, 数值取整数。

1.3.4 κ -卡拉胶酶的活力测定

取 5 g/L κ -卡拉胶溶液 490 μ L (溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH=8.0), 加入 10 μ L 酶液 (30 mg/L), 40 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。100 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后, 加入 500 μ L DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 冷却后在 520 nm 波长处测定吸光度值。 κ -卡拉胶酶的酶活力单位定义为每分钟转化 1 μ mol 还原糖 (以半乳糖计) 所需要的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.3.5 酶解 κ -卡拉胶的单因素实验

取 5 g/L κ -卡拉胶溶液 5 mL, 计算总糖含量。5 mL 底物溶液中分别加入 0.15, 0.35, 0.55, 0.75, 0.95 U κ -卡拉胶酶, 混匀后于 40 $^{\circ}$ C 水浴反应 240 min, 每隔 30 min 取 0.1 mL 酶解液, 沸水浴 5 min 终止反应, 然后加入 0.1 mL DNS 溶液, 沸水浴 10 min, 冷却后在 520 nm 波长处测定吸光度值, 计算还原糖生成量和平均聚合度。保持其他因素不变, 逐一改变反应温度 (30, 35, 40, 45, 50, 55 $^{\circ}$ C)、反应 pH 值 (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5), 以及 κ -卡拉胶底物质量浓度 (3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 g/L) 进行单因素实验。

1.3.6 酶解动力学分析

分别取 5 mL 不同质量浓度 (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 g/L) κ -卡拉胶底物溶液, 分别加入 0.35 U κ -卡拉胶酶, 参照节 1.3.4 的方法测定酶的活力。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 求解 κ -卡拉胶酶的 V_{\max} 和 K_m 值。

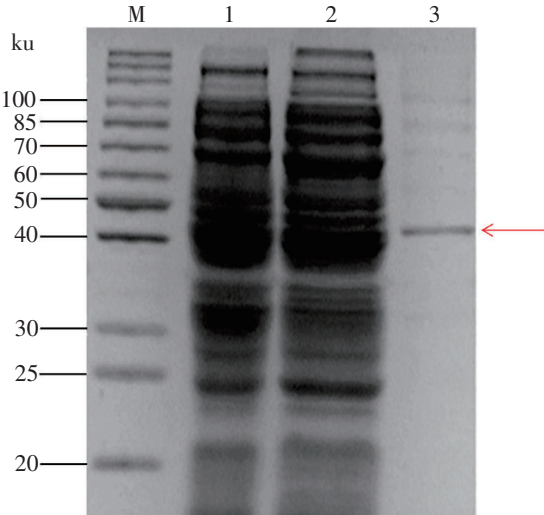
1.3.7 酶解产物的制备与分析

取 9 g/L κ -卡拉胶溶液 30 mL (溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH=8.0), 加入 2.1 U κ -卡拉胶酶, 40 $^{\circ}$ C 下反应 240 min 后, 将反应液沸水浴 10 min。冷却后, 加入 3 倍反应液体积的无水乙醇, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。12 000g 离心 20 min, 收集上清液, 50 $^{\circ}$ C 旋蒸至原体积的 1/4, 收集溶液进行冷冻干燥, 获得酶解产物。配制 1 g/L 酶解产物溶液, 进样量 5 μ L, 利用质谱进行分析。

2 实验结果与分析

2.1 重组 κ -卡拉胶酶的表达与纯化

假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶在 *E. coli* 中诱导表达后, 利用亲和层析纯化重组蛋白。SDS-PAGE 分析显示, 与未诱导的样品 (图 1 的泳道 1) 相比, 诱导后的转化子样品有明显的融合蛋白表达条带 (图 1 的泳道 2), 纯化后获得重组蛋白 (图 1 的泳道 3 箭头所示), 相对分子质量大小约为 45.0 ku。



说明: 泳道 M—蛋白质分子质量标记; 泳道 1—未诱导的假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶基因工程菌; 泳道 2—诱导的假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶基因工程菌; 泳道 3—纯化的重组 κ -卡拉胶酶

Note: lane M—protein molecular weight marker; lane 1—Uninduced gene engineering bacteria of *Pseudoalteromonas* sp. κ -carrageenase; lane 2—induced gene engineering bacteria of *Pseudoalteromonas* sp. κ -carrageenase; lane 3—purified recombination κ -carrageenase

图 1 重组 κ -卡拉胶酶在大肠杆菌中的表达

Fig.1 Expression of recombinant κ -carrageenase in *E. coli*

2.2.3 pH 值对酶解反应的影响

如图 4a 所示, 当 pH 值小于 8.0 时, 还原糖的生成量随 pH 值的增大而增加; 当 pH 值为 8.0 和 8.5 时, 还原糖产量达到最高。因此, 选择酶解反应的最适 pH 值为 8.0。当酶解反应 150 min 时, 还原糖生成量趋于稳定, 与平均聚合度变化趋势保持一致 (见图 4b)。酶活性中心上催化基团中质子的受体或供体所需的离子化状态和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 pH 值的影响, 进而影响酶与底物的结合, 影响酶催化反应^[23]。

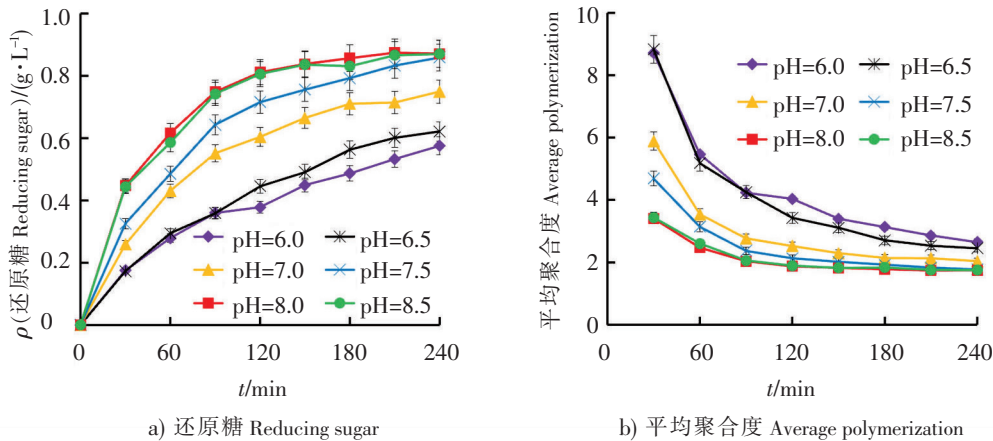


图 4 pH 值对酶解反应的影响
Fig.4 Effect of pH value on the enzymatic hydrolysis reaction

2.2.4 底物质量浓度对酶解反应的影响

探究不同底物质量浓度对酶解 κ -卡拉胶的影响, 结果见图 5。由图 5a 可知, 当底物质量浓度低于 9.0 g/L 时, 还原糖生成量与底物质量浓度成正相关; 相较于 9.0 g/L, 当底物质量浓度为 11.0 g/L 时, 还原糖的生成量相差不大, 与平均聚合度在酶解反应 180 min 的变化趋势接近一致 (见图 5b)。因此, 选择酶解反应的最适底物质量浓度为 9.0 g/L。在加酶量一定的前提下, 底物质量浓度低, 酶与底物充分反应, 随着底物质量浓度的增加, 反应速率加快, 还原糖的生成量也增大, 但生成量到达一定值后不再增加。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 过高的卡拉胶溶液质量浓度会使溶液的黏度变大^[24], 酶不易扩散, 导致反应达到平衡所需的时间增加。综上所述, 在底物质量浓度为 9.0 g/L 下反应 240 min, 此时的还原糖质量浓度为 1.531 g/L, 平均聚合度为 2。

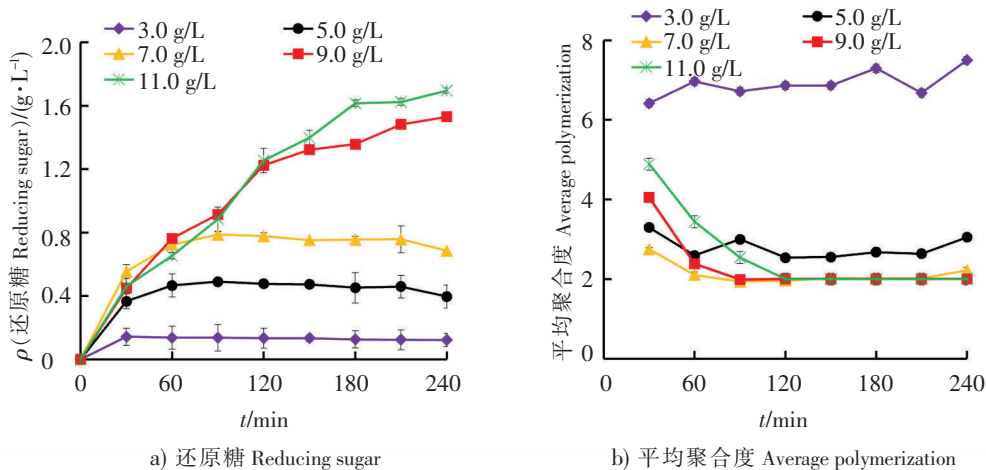


图 5 底物质量浓度对酶解反应的影响
Fig.5 Effect of substrate concentration on the enzymatic hydrolysis reaction

2.3 κ-卡拉胶酶的动力学参数

测定 κ-卡拉胶酶在不同底物质量浓度下的反应初速率，以 $1/[S]$ 为横坐标， $1/V$ 为纵坐标，绘制底物浓度与反应初速率的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线，结果如图 6 所示。计算得到假交替单胞菌 κ-卡拉胶酶的 K_m 值为 2.07 g/L，最大反应速率 V_{max} 为 7.25 U/mg。

2.4 酶解产物的质谱分析

在负离子模式下，利用质谱对假交替单胞菌 κ-卡拉胶酶水解多糖的产物进行分析，结果如图 7 所示，其中，质荷比 404.78 ($[(An-G4S)-H]^-$) 和 710.63 ($[(An-G4S)(An-G)-H]^-$) 分别表示二糖和四糖产物^[16,25]，二糖由 1 个 3,6-内醚-α-D-半乳糖残基和 1 个 4-硫酸-β-D-半乳糖残基组成。图 7 表明，在优化的酶解工艺条件下，假交替单胞菌 κ-卡拉胶酶水解多糖的产物为 κ-卡拉胶二糖和 κ-卡拉胶四糖，而目前大多数 κ-卡拉胶酶降解多糖的终产物是二糖、四糖和六糖^[26]。

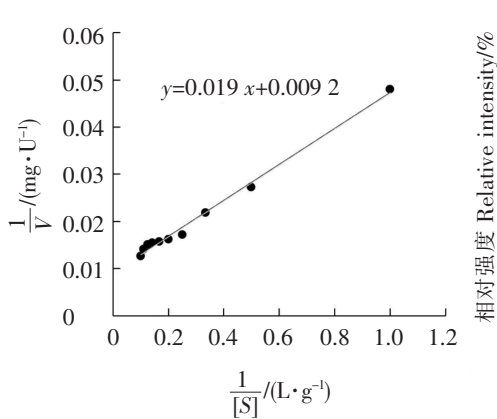


图 6 κ-卡拉胶酶的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线

Fig.6 Lineweaver-Burk double reciprocal fitting curve of κ-carrageenase

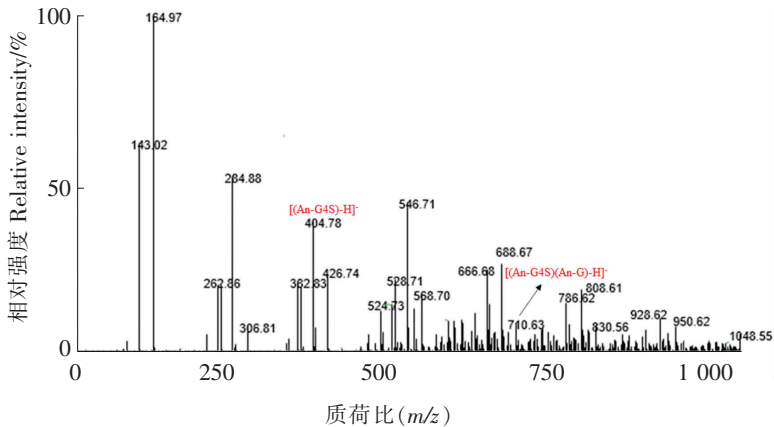


图 7 酶解产物的质谱分析

Fig.7 Mass spectrometry analysis of the enzymatic hydrolysates

3 结论

将假交替单胞菌 κ-卡拉胶酶在大肠杆菌中进行表达，对获得的重组 κ-卡拉胶酶进行酶解卡拉胶多糖工艺研究，获得的优化酶解工艺条件为：加酶量为 0.35 U（反应体系 5 mL），反应温度为 40 ℃，反应 pH = 8.0，κ-卡拉胶底物质量浓度为 9 g/L。在优化条件下酶解反应 240 min，产生的还原糖质量浓度为 1.531 g/L，产物的平均聚合度为 2。经质谱鉴定，酶解产物为 κ-卡拉胶二糖和 κ-卡拉胶四糖。

[参 考 文 献]

[1] SUN H H, GAO L, XUE C H, et al. Marine-polysaccharide degrading enzymes:status and prospects [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 2767-2796. DOI:10.1111/1541-4337.12630.

[2] TRINCONE A. Short bioactive marine oligosaccharides:diving into recent literature [J]. Current Biotechnology, 2015, 4(3): 212-222.

[3] 毛俊龙, 齐贺, 姚玉超, 等. 硒化卡拉胶寡糖的制备及抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(11): 84-92.

[4] CALVO G H, COSENZA V A, SAENZ D A, et al. Disaccharides obtained from carrageenans as potential antitumor agents [J]. Scientific Reports, 2019, 9: 6654. DOI:10.1038/s41598-019-43238-y.

[5] SONG R J, MAO X, TANG S Q. κ/β-carrageenan oligosaccharides promoting polarization of LPS-activated macrophage and their potential in diabetes wound healing [J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2021, 121: 111830. DOI:10.1016/j.msec.2020.111830.

[6] 陈梦, 韩振莲, 付晓丹, 等. 低分子质量 κ-卡拉胶钾的酶法制备及其对原发性高血压大鼠降血压作用的研究 [J]. 海洋科学, 2019, 43(8): 36-42.

[7] DE ARAUJO C A, NOSEDA M D, CIPRIANI T R, et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate

- regiochemistry on anticoagulant properties [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(2): 483-491.
- [8] SUN Y J, CUI X Y, DUAN M M, et al. *In vitro* fermentation of κ -carrageenan oligosaccharides by human gut microbiota and its inflammatory effect on HT29 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 59: 80-91.
- [9] GUO Z, WEI Y, ZHANG Y, et al. Carrageenan oligosaccharides: a comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications [J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2022, 61: 102593. DOI:10.1016/j.algal.2021.102593.
- [10] KAMINSKA-DWORZNICKA A, ANTCZAK A, SAMBORSKA K, et al. Acid hydrolysis of κ -carrageenan as a way of gaining new substances for freezing process modification and protection from excessive recrystallisation of ice [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(8): 1799-1806. DOI:10.1111/ijfs.12820.
- [11] SUN T, TAO H N, XIE J, et al. Degradation and antioxidant activity of κ -carrageenans [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 117(1): 194-199. DOI:10.1002/app.31955.
- [12] 张雪芳, 余倩, 吴昌正, 等. κ -卡拉胶寡糖酶解制备工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(7): 171-175, 182.
- [13] ZHU B W, NI F, SUN Y, et al. Insight into carrageenases: major review of sources, category, property, purification method, structure, and applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(8): 1261-1276.
- [14] LI S Y, HE N N, HAN Q, et al. Production of a thermo-tolerant κ -carrageenase via a food-grade host and anti-oxidant activity of its enzymatic hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128027.
- [15] 郭子龙, 唐天城, 徐寅啸, 等. 卡拉胶酶的来源、性质、结构与应用研究进展 [J]. 生物加工过程, 2021(6) 1-28.
- [16] ZHAO D Y, JIANG B, ZHANG Y, et al. Purification and characterization of a cold-adapted κ -carrageenase from *Pseudoalteromonas* sp. ZDY3 [J]. Protein Expression and Purification, 2021, 178: 105768.
- [17] KHAMBHATY Y, MODY K, JHA B. Purification and characterization of κ -carrageenase from a novel γ -proteobacterium, *Pseudomonas elongata* (MTCC 5261) syn. *Microbulbifer elongatus* comb. nov. [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007, 12(6): 668-675.
- [18] ZHU B W, NING L M. Purification and characterization of a new κ -carrageenase from the marine bacterium *Vibrio* sp. NJ-2 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(2): 255-262. DOI:10.4014/jmb.1507.07052.
- [19] SUN Y J, LIU Y, JIANG K, et al. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of κ -carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with κ -carrageenase from *Pedobacter hainanensis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(11): 2398-2405. DOI:10.1021/jf500429r.
- [20] LEMOINE M, COLLEN P N, HELBERT W. Physical state of κ -carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora* [J]. Biochemical Journal, 2009, 419: 545-553.
- [21] 张成昊, 朱艳冰, 陈艳红, 等. 假交替单胞菌 JMUZ2 重组 κ -卡拉胶酶的异源表达和酶学性质 [J]. 化工学报, 2021, 72(7): 3738-3746.
- [22] SAHA A K, BREWER C F. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method [J]. Carbohydrate Research, 1994, 254: 157-167.
- [23] DUNN R V, MARSHALL K R, MUNRO A W, et al. The pH dependence of kinetic isotope effects in monoamine oxidase A indicates stabilization of the neutral amine in the enzyme-substrate complex [J]. Febs Journal, 2008, 275(15): 3850-3858. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06532.x.
- [24] RAMOS A V, GARCIA ROJAS E E, GIRALDO-ZUNIGA A D. Density and viscosity of ternary mixtures of κ -carrageenan, sodium chloride, and water [J]. International Journal of Thermophysics, 2013, 34(2): 240-249.
- [25] ZHANG Y J, LANG B, ZENG D Y, et al. Truncation of κ -carrageenase for higher κ -carrageenan oligosaccharides yield with improved enzymatic characteristics [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 958-968.
- [26] ZHU B W, NI F, NING L M, et al. Cloning and biochemical characterization of a novel κ -carrageenase from newly isolated marine bacterium *Pedobacter hainanensis* NJ-02 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 1331-1338. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.040.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)