

微泡菌昆布多糖酶 Lam128A 的酶学性质 及酶解产物抗氧化活性

李鹤宾¹, 王杨¹, 银小倩², 胡青松², 吴婷¹, 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: 该研究探讨微泡菌 ALW1 来源的昆布多糖酶 Lam128A 的酶学性质及其酶解产物的抗氧化活性。利用毕赤酵母异源表达重组蛋白 rLam128A, 该昆布多糖酶的分子量为 70 ku, 最适反应温度和最适反应 pH 值分别为 45 °C 和 pH 值 5.5; 温度低于 45 °C 时稳定, 分别在 pH 值 3.0、5.0 和 11.0 条件下处理 96 h 后, 残余酶活力不低于 60%。还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 对昆布多糖酶活力有促进作用, rLam128A 对螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 表现出良好的稳定性, 对去垢剂 Tween 20 和 Tween 80、变性剂尿素表现出一定的稳定性。昆布多糖经 rLam128A 水解后, 酶解产物对 DPPH、ABTS 和 OH· 自由基的半数抑制剂量 IC₅₀ 分别为 7.12、1.01 和 2.40 mg/mL, 相比未经酶解处理的昆布多糖表现出更显著的抗氧化活性。微泡菌昆布多糖酶 Lam128A 的酶学性质为该酶开发利用昆布多糖生物资源提供了理论基础。

关键词: 微泡菌; 昆布多糖酶; 毕赤酵母; 酶学性质; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2022)12-176-182

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0095

Enzymatic Properties of Laminarinase Lam128A from *Microbulbifer* sp.

ALW1 and Antioxidant Activity of Its Enzymatic Hydrolysates

LI Hebin¹, WANG Yang¹, YIN Xiaoqian², HU Qingsong², WU Ting¹, ZHU Yanbing^{2*}

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

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

Abstract: The enzymatic properties of laminarinase Lam128A derived from *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of its enzymatic hydrolysates were investigated. Recombinant laminarinase (rLam128A) with a molecular mass of 70 ku was heterologously expressed in *Pichia pastoris*. The optimal reaction temperature and pH were 45°C and 5.5, respectively. The enzyme was stable at temperatures below 45 °C, and the residual enzyme activity did not drop below 60% following treatment at pH 3.0, 5.0, and 11.0 for 96 h. The reducing reagent dithiothreitol promoted laminarinase activity. rLam128A showed good stability in the presence of the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid as well as certain stability in the presence of the detergents Tween 20, Tween 80, and denaturant urea. Following laminarin hydrolysis by rLam128A, the IC₅₀ values of the hydrolysates against DPPH, ABTS, and OH free radicals were 7.12, 1.01, and 2.40 mg/mL, respectively. These results indicate that the enzymatic hydrolysates exhibited more significant antioxidant activity than the unhydrolyzed laminarin. The above enzymatic properties of laminarinase Lam128A from *Microbulbifer* sp. ALW1 provide a theoretical basis for its application in the development and utilization of biological resources of laminarin.

Key words: *Microbulbifer*; laminarinase; *Pichia pastoris*; enzymatic properties; antioxidant activity

引文格式:

李鹤宾,王杨,银小倩,等.微泡菌昆布多糖酶 Lam128A 的酶学性质及酶解产物抗氧化活性[J].现代食品科技,2022,38(12):176-182

LI Hebin, WANG Yang, YIN Xiaoqian, et al. Enzymatic properties of laminarinase Lam128A from *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of its enzymatic hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 176-182

收稿日期: 2022-01-26

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2020J01679); 福建省大学生创新创业训练计划项目(201912631028)

作者简介: 李鹤宾 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学, E-mail: lhb@xmmc.edu.cn

通讯作者: 朱艳冰 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学, E-mail: yanbingzhu@jmu.edu.cn

昆布多糖 (Laminarin) 是一种水溶性天然多糖, 主要来源于海带 (*Laminaria digitata*) 等褐藻细胞, 是褐藻的重要贮藏多糖, 约占其干重 35%^[1,2]。昆布多糖是一种带有 β -1,6-侧链的线性 β -1,3-葡聚糖分子, 其结构特征随藻类不同而存在差异^[3]。昆布多糖可作为糖化和发酵后生物燃料生产的初始物质, 属于可再生生物质^[4]。昆布多糖的降解产物具有抗氧化、抗凝血、抗细胞凋亡和抗肿瘤等生物活性, 具有广泛的应用前景^[5-7]。目前已有许多方法应用于昆布多糖降解, 例如光催化降解^[8]、 γ 射线辐射降解^[9]和酶水解^[10]。由于酶法降解具有专一性强、效率高、反应条件温和、产物易于控制, 且最大限度地减少对糖分子修饰等特点, 成为昆布多糖降解的优选方法。

昆布多糖酶 (EC 3.2.1.39) 又称为内切 β -1,3-葡聚糖酶, 是一种专一性水解 β -1,3-葡聚糖中的 β -1,3-糖苷键的酶类^[11]。昆布多糖酶来源广泛, 包括细菌、真菌、植物和软体动物等, 其中微生物是该酶的重要来源。植物来源昆布多糖酶主要归属于糖苷水解酶 17 家族 (GH17), 而细菌来源昆布多糖酶主要归属于 GH16。目前已经报道的产昆布多糖酶的微生物包括强烈烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*)^[12]、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.)^[13]、纤维化纤维菌 (*Cellulosimicrobium cellulans*)^[14]、海洋嗜热菌 (*Rhodothermus marinus*)^[15]、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)^[16]、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)^[17]等。

在前期研究中, 从腐烂海带中分离到海洋微泡菌 ALW1 (*Microbulbifer* sp. ALW1)^[18,19], 该菌株的全基因组分析显示, 基因 *Lam128A* 预测编码昆布多糖酶, 本文进行微泡菌昆布多糖酶 *Lam128A* 的克隆表达、酶学性质及酶解产物的抗氧化活性研究, 为昆布多糖酶 *Lam128A* 和昆布寡糖的进一步开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

海洋细菌 *Microbulbifer* sp. ALW1、*E. coli* DH5 α 、*Pichia pastoris* GS115 以及 pPIC9K 质粒均为本实验室保藏。10 kDa 的超滤离心管为 Millipore 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、dNTPs、*Not* I、*Eco* R I、BCA 蛋白质测定试剂盒为 TaKaRa 公司产品; 质粒 DNA 小量纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司; DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂为 GE Healthcare 公司产品; 昆布多糖、普鲁兰多糖、可溶性淀粉、木聚糖购于 Sigma-Aldrich 公司; 石耳葡聚糖购

于 ELICITYL-OligoTech 公司; 其余化学试剂均为分析纯级产品。

1.2 主要仪器与设备

Avanti J-25 冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; Epoch2T 微量酶标仪, 美国 BioTek 公司; 冷冻干燥机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 昆布多糖酶 *Lam128A* 的序列分析

利用 ExPASy 中的 ProtParam 工具对昆布多糖酶 *Lam128A* 的 DNA 和蛋白质序列、理论分子量和等电点等理化性质进行预测分析。采用信号肽预测工具 SignalP v4.1 对昆布多糖酶的信号肽进行预测。在碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-Active Enzyme, CAZy) 数据库中寻找不同家族来源的特征昆布多糖酶的蛋白质序列, 利用 MEGA7.0 构建微泡菌昆布多糖酶 *Lam128A* 的系统发育树。

1.3.2 昆布多糖酶 *Lam128A* 的克隆及其在毕赤酵母中的表达

以微泡菌 ALW1 的基因组为模板, 利用正向引物 *Lam128A*-F (5'-ATTGCGGCCGCTATGACTGCAGTCAACCC-3', 下划线为 *Not* I 位点) 和反向引物 *Lam128A*-R (5'-CCGGAATTCGCGATTGCGGATTTG TCC-3', 下划线为 *Eco* R I 位点) 扩增昆布多糖酶 *Lam128A* 基因, 将目的基因克隆到 pPIC9K 载体中, 并经测序验证 DNA 序列后, 利用毕赤酵母 GS115 细胞表达目的蛋白。将含有昆布多糖酶 *Lam128A* 基因的毕赤酵母 GS115 接种于 YPD 种子培养基 (20 g/L 胰蛋白酶、10 g/L 酵母提取物、20 g/L 葡萄糖、pH 值 6.0) 中, 30 °C、220 r/min 培养 18 h。将菌液按 1% 接种量接入 BMGY 培养基 (20 g/L 胰蛋白酶、10 g/L 酵母提取物、100 mmol/L 磷酸钾、1.34 g/L YNB、4 \times 10⁻⁵% 生物素、10% 甘油, pH 值 6.0) 中, 30 °C、220 r/min 进行培养, 当 OD₆₀₀ 达到 3.0~5.0 时, 静置使菌体沉降。弃去上清, 加入 100 mL BMMY 培养基 (20 g/L 胰蛋白酶、10 g/L 酵母提取物、100 mmol/L 磷酸钾、1.34 g/L YNB、4 \times 10⁻⁵% 生物素、0.5% 甲醇, pH 值 6.0) 重悬菌体, 继续进行培养 (30 °C、220 r/min)。每隔 24 h, 按体积比 0.5% 向培养基中加入甲醇, 进行昆布多糖酶的诱导表达。培养 7 d 后, 4 °C 条件下 8 000 \times g 离心 20 min, 获得的上清液即为昆布多糖酶的粗酶液。

1.3.3 重组昆布多糖酶 (r*Lam128A*) 的分离纯化

利用 10 ku 的超滤膜对粗酶液样品进行浓缩, 浓缩

液经 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.0) 透析后, 上样于 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析柱 (1.5×10 cm)。用相同缓冲液以 1 mL/min 的流速进行流洗, 待流出液的 OD₂₈₀ 趋近于零后, 用含 0.05~1.0 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.0) 缓冲液以 1 mL/min 的流速对结合蛋白进行线性洗脱。在 280 nm 处监测洗脱液, 并进行昆布多糖酶的活力测定, 收集有酶活性的样品, 并利用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.0) 进行透析。利用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定样品的蛋白质浓度, 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 昆布多糖酶的活力测定

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定昆布多糖酶的活力^[20]。取 450 μL 浓度 5 mg/mL 昆布多糖底物溶液 (溶于 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液, pH 值 5.5), 加入 50 μL 昆布多糖酶 (0.5 mg/mL), 于 45 °C 条件下反应 30 min 后, 加入 500 μL DNS 试剂, 沸水浴处理 10 min 后, 在 540 nm 处测定反应液的吸光值。在上述条件下, 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)。

1.3.5 重组昆布多糖酶的底物特异性分析

以 5 mg/mL 的昆布多糖、普鲁兰多糖、可溶性淀粉、木聚糖和石耳葡聚糖为底物来测定酶的活力, 研究酶对不同糖苷键的水解能力。分别将 50 μL 酶溶液 (0.5 mg/mL) 加入 450 μL 相应底物溶液 (溶于 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液, pH 值 5.5), 45 °C 反应 30 min 后, 利用 DNS 法测定酶的活力。

1.3.6 温度对重组昆布多糖酶活性和稳定性的影响

以 5 mg/mL 昆布多糖为底物, 测定不同温度 (25~65 °C) 下 rLam128A 的活力, 以最高酶活力为 100%, 研究酶的最适反应温度。将 rLam128A 置于不同的温度 (25~60 °C) 下处理 1 h, 测定酶的残余活力, 以未经热处理的酶活力为 100%, 研究温度对 rLam128A 稳定性的影响。

1.3.7 pH 值对重组昆布多糖酶活性和稳定性的影响

配制不同 pH 值的缓冲液: 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 值 3.0~6.0)、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.0~7.0)、50 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.0~9.0)、50 mmol/L 甘氨酸-NaOH (pH 值 9.0~11.0), 在不同 pH 值条件下测定酶的活力, 以最高酶活力为 100%, 研究昆布多糖酶 rLam128A 的最适反应 pH 值。将昆布多糖酶 rLam128A 在不同 pH 值条件下 (pH 值 3.0、5.0、11.0)、25 °C 处理 120 h, 每隔 24 h 检测昆布多糖酶 rLam128A 的残余酶活力, 以未处理的酶活力为 100%, 研究 pH

值对昆布多糖酶 rLam128A 稳定性的影响。

1.3.8 重组昆布多糖酶的动力学参数测定

用 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 值 5.5) 配制浓度为 0~18 mg/mL 的昆布多糖溶液, 将昆布多糖酶 rLam128A 分别与不同浓度的昆布多糖反应, 测定酶的活力。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 计算昆布多糖酶 rLam128A 的最大反应速度 (V_{max}) 与米氏常数 (K_m)。

1.3.9 化学试剂对重组昆布多糖酶稳定性的影响

将昆布多糖酶 rLam128A 分别利用终浓度为 1 mmol/L 或 10 mmol/L 的不同金属离子、终浓度为 2 mmol/L 或 10 mmol/L 的金属整合剂乙二胺四乙酸 (EDTA) 和还原试剂二巯苏糖醇 (DTT)、终浓度为 0.2% (m/V 或 V/V) 或 2% (m/V 或 V/V) 的去垢剂 [Triton X-100、Tween 20、Tween 80、十二烷基硫酸钠 (SDS)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)]、终浓度为 2 mol/L 或 5 mol/L 的变性剂尿素, 在 25 °C 处理 1 h 后, 测定 rLam128A 的残余酶活力, 以未经化学试剂处理的酶活力为 100%, 研究化学试剂对 rLam128A 稳定性的影响。

1.3.10 酶解产物的制备及抗氧化活性研究

利用 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 值 5.5) 配制 10 mg/mL 的昆布多糖溶液, 100 mL 底物溶液中加入 2.6 U 重组昆布多糖酶, 40 °C 反应 12 h, 用沸水浴处理 10 min。4 °C 条件下 8000×g 离心 20 min, 利用 10 ku 的超滤离心管对所得上清液样品进行浓缩, 收集滤过液, 冷冻干燥至粉末。参考 Zhu^[18] 的方法, 对酶解产物清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、·OH 自由基的能力及酶解产物的还原能力进行测定, 研究酶解产物的抗氧化活性。

1.3.11 数据处理

每组试验设置 3 次平行, 数据应用 Excel 软件计算平均值, 利用 SPSS Statistics V17.0 软件进行差异显著性分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 微孢菌昆布多糖酶 Lam128A 的序列分析

微孢菌 ALW1 的昆布多糖酶 Lam128A 基因的开放阅读框由 1545 bp 组成, 编码具有 514 个氨基酸的蛋白质, 预测的理论分子质量为 54.46 ku, 理论 pI 值为 4.16。1-23 个氨基酸残基预测为信号肽。系统进化分析显示, Lam128A 与 *Lentinula edodes* 来源的昆布多糖酶 (BAL27560.1) 在同一分支 (图 1), 后者是 GH128 家族的代表, 说明本研究的微孢菌昆布多糖酶归属于 GH128 家族。

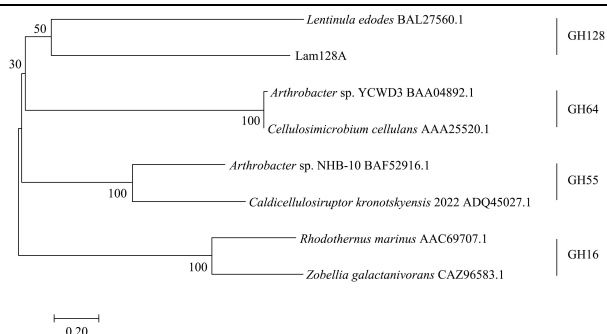


图1 微泡菌 ALW1 昆布多糖酶的系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of laminarinase from *Microbulbifer* sp. ALW1

2.2 昆布多糖酶 Lam128A 的体外表达与底物特异性

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对表达蛋白进行检测,重组昆布多糖酶 rLam128A 的大小在 70 ku 左右(图 2a),大于理论预测值,可能是由于蛋白质的糖基化修饰。酶的底物特异性分析显示,微泡菌 rLam128A 除了对昆布多糖 (β -1,3, β -1,6) 有较好的水解性能外,对普鲁兰多糖 (α -1,4, α -1,6)、可溶性淀粉 (α -1,4)、木聚糖 (β -1,4) 和石耳葡聚糖 (β -1,6) 底物的水解效果不明显(图 2b)。rLam128A 对上述多糖的活性谱表明,rLam128A 主要作用于含有 β -1,3-糖苷键的昆布多糖,表明其是一种 β -1,3-葡聚糖酶。rLam128A 的底物特异性与 *Flavobacterium* sp. 来源的昆布多糖酶相似^[21],但与来自 *Vibrio. campbellii* 的昆布多糖酶不同,后者对海

带二糖 (β -1,3) 有强烈的偏好,但也催化纤维二糖 (β -1,4) 和龙胆二糖 (β -1,6) ^[22]。

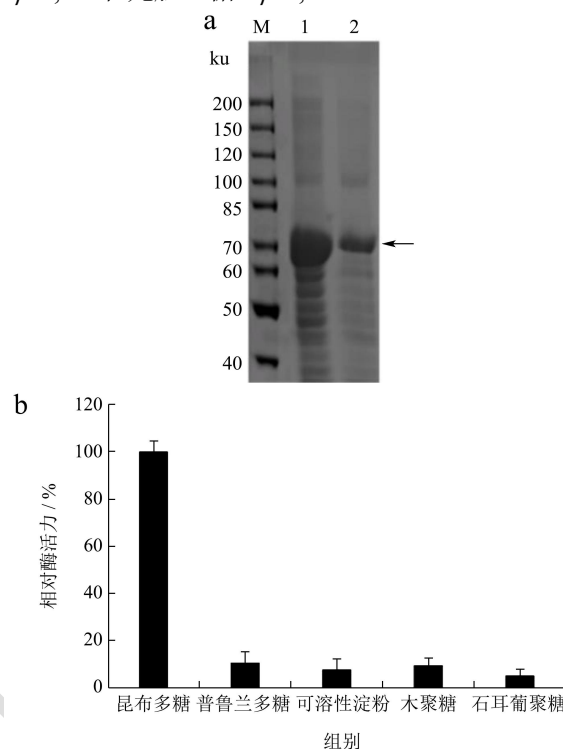


图2 昆布多糖酶 Lam128A 的体外表达 (a) 及底物特异性 (b)
Fig.2 Expression of laminarinase Lam128A (a) and its substrate specificity (b)

注:图 a 中 M 为分子量标准蛋白;1 为超滤浓缩样品;2 为阴离子交换层析纯化样品。

2.3 重组昆布多糖酶的酶学性质

表 1 一些表征的昆布多糖酶的热稳定性和 pH 稳定性

Table 1 Thermostability and pH stability of some characterized laminarinases

来源	最适温度/℃	最适 pH 值	温度稳定性	pH 值稳定性
<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1 (本研究)	45	5.5	45 °C 以下处理 60 min, 保持稳定	pH 值 3.0、5.0 和 11.0 下处理 96 h, 保持超过 60%的残余活力
<i>Arca inflata</i> ^[23]	40	6.0	在 55 °C 处理 30 min, 无酶活力	在 pH 值 9.0 处理 30 min, 保留约 30%酶活力
<i>S. cerevisiae</i> ^[24]	50	6.0	在 37 °C 以下保持稳定	pH 值 5.5~8.5
<i>Aplysia kurodai</i> ^[25]	50	5.7	45 °C 处理 15 min, 保留 50%酶活力	-
<i>Streptomyces matensis</i> ^[26]	55	6.0	50 °C 以下处理 60 min, 保持稳定	在 pH 值 9.0 处理 90 min, 保留约 20%酶活力
<i>Mitsuaria chitosanitabida</i> ^[27]	52	5.2	50 °C 处理 2 h, 保留 40%酶活力	在 pH 值 4.6~6.4 处理 2 h, 保留约 80%酶活力

测定不同温度下 rLam128A 的活力,发现酶的最适反应温度为 45 °C (图 3a)。该酶在 25~45 °C 处理 1 h 后,残余酶活性在 95%以上;在 50 °C 处理 1 h 后,酶活力保留 39.37%(图 3b)。rLam128A 与来自 *Arca inflata* 的昆布多糖酶类似^[23],在 55 °C 下失活(表 1);而

S. cerevisiae 来源的昆布多糖酶只在小于 37 °C 的情况下稳定^[24](表 1);*Aplysia kurodai* 来源的昆布多糖酶 AKLam33 在 45 °C 下温浴 15 min 后,残余酶活力仅剩 50%^[25](表 1)。在不同 pH 值缓冲液中测定昆布多糖酶的活力,酶的最适反应 pH 值为 5.5 (图 3c)。4 °C 条件

下,分别在 pH 值 3.0、5.0 和 11.0 条件下处理 96 h 后,残留酶活力仍有 60%以上(图 3d),说明在强酸和强碱环境下,微泡菌 rLam128A 的 pH 稳定性都非常好。rLam128A 在极端酸性和碱性条件下的 pH 值稳定性优

于来自 *Streptomyces matensis*^[26] 和 *Mitsuaria chitosanitabida*^[27] 的昆布多糖酶(表 1)。微泡菌重组昆布多糖酶的动力学参数 K_m 和 V_{max} 分为 4.34 mg/mL 和 0.21 U/mg。

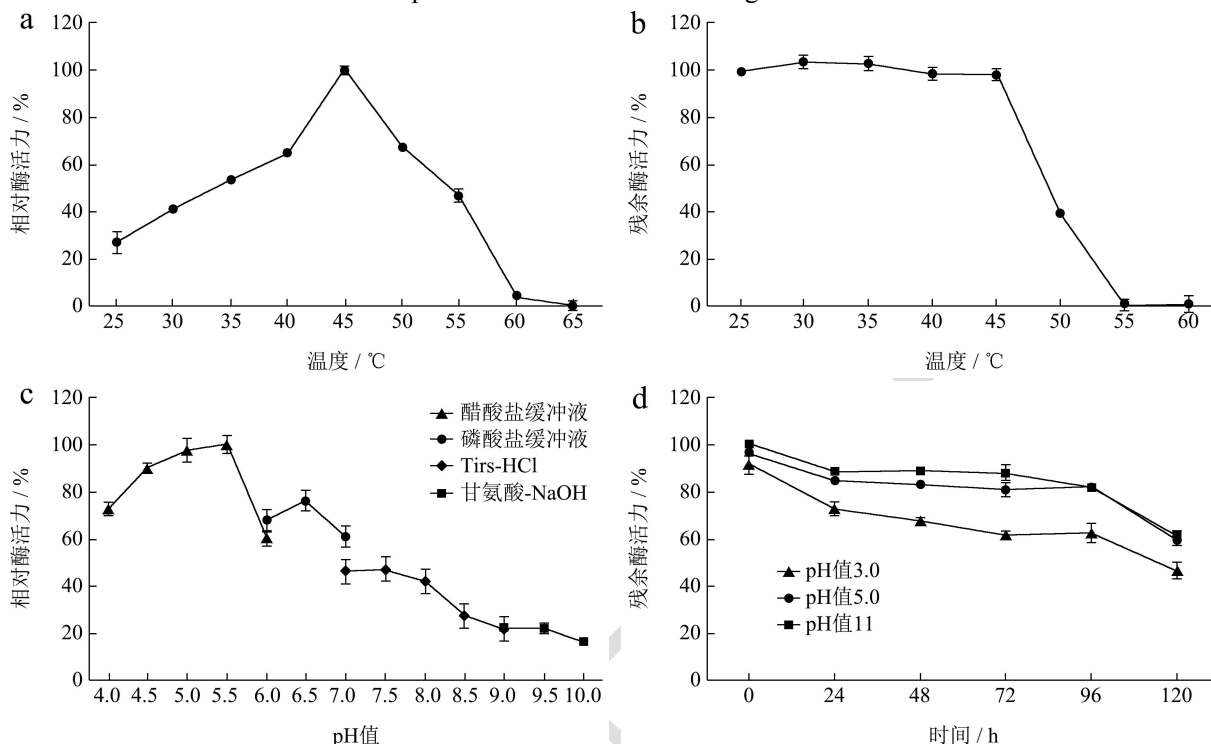


图 3 温度和 pH 对 rLam128A 活性和稳定性的影响

Fig.3 Effects of temperature and pH on the activity and stability of rLam128A

注: a: 温度对酶活性的影响; b: 温度对酶稳定性的影响; c: pH 对酶活性的影响; d: pH 对酶稳定性的影响。

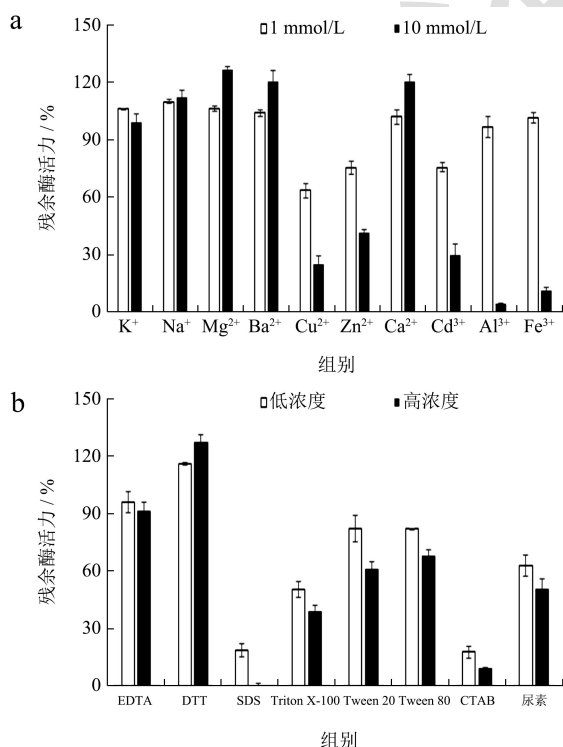


图 4 化学试剂对 rLam128A 稳定性的影响

Fig.4 Effects of chemical reagents on the stability of rLam128A

2.4 化学试剂对重组昆布多糖酶稳定性的影响

测定不同金属离子对 rLam128A 稳定性的影响,结果如图 4a 所示。1 mmol/L K^+ 对酶活力有微弱促进作用; Na^+ 、 Mg^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶活力有促进作用,随着浓度升高促进作用增强。与之类似的,郑必胜等^[28]的研究表明, Ba^{2+} 对裂褶菌来源的酶具有促进作用。10 mmol/L 的 Ca^{2+} 对酶活力有促进作用,而低浓度对酶活力无影响。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{3+} 、 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 对酶活力产生不同程度的抑制作用, Lee 等^[11]的研究也表明, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对昆布多糖酶具有抑制作用。1 mmol/L 的金属离子中, Cu^{2+} 的抑制作用最强; 10 mmol/L 的金属离子中, Al^{3+} 的抑制作用最强,酶活力基本丧失。

测定其他化学试剂对 rLam128A 稳定性的影响,结果如图 4b 所示。还原试剂 DTT 对酶活力有促进作用,且随浓度的升高促进作用明显增强,而螯合剂 EDTA 对酶活力影响不大。除了 SDS 和 CTAB, rLam128A 对测试的其他去垢剂表现出一定的稳定性,2%的 Tween 20 和 Tween 80 室温处理 1 h,可以保留不低于 60%的酶活力,而同样条件下经 Triton X-100 处理后,酶活力

保留 38.57%。rLam128A 对尿素表现出一定的稳定性, 5 mol/L 尿素室温处理 1 h, 可保留 50.44% 残余酶活力。

2.5 酶解产物的抗氧化活性

研究表明, 分子结构、单糖单元的数量、支化度和长度, 都可能影响昆布多糖的抗氧化活性^[29]。昆布多糖经昆布多糖酶水解的产物主要为单糖、二糖和五糖等小分子单糖和寡糖^[30]。本研究中, 利用重组昆布多糖酶 rLam128A 制备昆布多糖酶解产物, 并进行产物的抗氧化活性分析。结果显示, 当质量浓度为 12.50 mg/mL 时, 酶解产物对 DPPH 自由基的清除率达到 63.62%, 而昆布多糖对该自由基的清除率仅为 14.40% (图 5a),

酶解产物对 DPPH 自由基的半抑制浓度 IC_{50} 为 7.12 mg/mL。当质量浓度达到 2.40 mg/mL 时, 酶解产物对 ABTS 自由基的清除率达到 84.45%, 而昆布多糖对该自由基的清除率仅为 3.27% (图 5b), 酶解产物对 ABTS 自由基的半抑制浓度 IC_{50} 为 1.01 mg/mL。昆布多糖及其酶解产物均对 $\cdot OH$ 自由基表现出良好的清除效果(图 5c), 酶解产物对 $\cdot OH$ 自由基的半抑制浓度 IC_{50} 为 2.40 mg/mL, 低于昆布多糖。由图 5d 可知, 随着质量浓度的增大, 昆布多糖及其酶解产物的还原能力均增强, 但相较于昆布多糖, 酶解产物的还原能力更强。综上, rLam128A 水解昆布多糖, 获得的酶解产物具有更高的抗氧化活性。

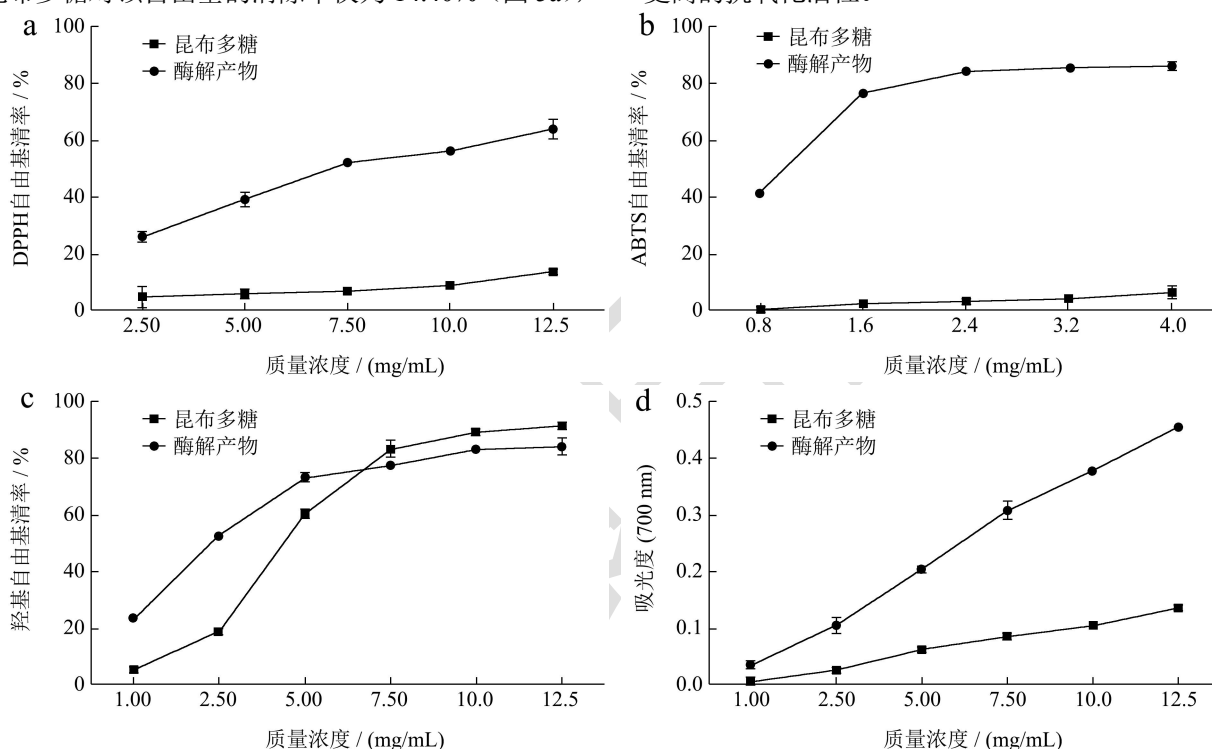


图5 昆布多糖及其酶解产物的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activities of laminarin and its enzymatic hydrolysis products

3 结论

本研究中, 从海洋细菌 *Microbulbifer* sp. ALW1 中克隆昆布多糖酶 Lam128A 基因, 并在毕赤酵母中进行表达, 获得的重组昆布多糖酶 rLam128A 具有良好的温度稳定性, 以及强酸和强碱环境中的稳定性。rLam128A 能特异性水解昆布多糖, 且水解产物的抗氧化能力提高。重组昆布多糖酶 rLam128A 成为可能的工具酶, 促进昆布多糖的高值化开发利用。

参考文献

[1] Kusaykin M I, Belik A A, Kovalchuk S N, et al. A new recombinant endo-1,3- β -D-glucanase from the marine

bacterium *Formosa algae* KMM 3553: enzyme characteristics and transglycosylation products analysis [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(2): 40

[2] Labourel A, Jam M, Legentil L, et al. Structural and biochemical characterization of the laminarinase ZgLamCGH16 from *Zobellia galactanivorans* suggests preferred recognition of branched laminarin [J]. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 2015, 71(2): 173-184

[3] Kadam S U, Tiwari B K, O'donnell C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(1): 24-31

[4] Kim D H, Kim D H, Lee S H, et al. A novel β -glucosidase from *Saccharophagus degradans* 2-40^T for the efficient

- hydrolysis of laminarin from brown macroalgae [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 64
- [5] Jonsson M, Allahgholi L, Sardari R R R, et al. Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 930
- [6] Kumagai Y, Okuyama M, Kimura A. Heat treatment of curdlan enhances the enzymatic production of biologically active β -(1,3)-glucan oligosaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 146: 396-401
- [7] Menshova R V, Ermakova S P, Anastuyk S D, et al. Structure, enzymatic transformation and anticancer activity of branched high molecular weight laminaran from brown alga *Eisenia bicyclis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99: 101-109
- [8] Kovac N, Bajt O, Sket B. Photocatalyzed degradation of water soluble polysaccharides [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2000, 9(3-4): 217-224
- [9] Choi J I, Kim H J, Lee J W. Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 520-523
- [10] Mitsuya D, Sugiyama T, Zhang S, et al. Enzymatic properties and the gene structure of a cold-adapted laminarinase from *Pseudoalteromonas* species LA [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(2): 169-175
- [11] Lee Y, Lee J H, Shim W B, et al. Molecular cloning, over-expression and enzymatic characterization of an endo-acting β -1,3-glucanase from marine bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* S86 in *Escherichia coli* [J]. *Ocean Science Journal*, 2014, 49(4): 425-432
- [12] Ilari A, Fiorillo A, Angelaccio S, et al. Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*- structural basis of substrate recognition [J]. *Febs Journal*, 2009, 276(4): 1048-1058
- [13] Hong T Y, Meng M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(5-6): 472-478
- [14] Tanabe Y, Oda M. Molecular characterization of endo-1,3- β -glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans*: Effects of carbohydrate-binding module on enzymatic function and stability [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(12): 1713-1719
- [15] Bleicher L, Prates E T, Gomes T C F, et al. Molecular basis of the thermostability and thermophilicity of laminarinases: X-ray structure of the hyperthermostable laminarinase from *Rhodothermus marinus* and molecular dynamics simulations [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(24): 7940-7949
- [16] Zhou P, Chen Z Z, Yan Q J, et al. The structure of a glycoside hydrolase family 81 endo- β -1,3-glucanase [J]. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2013, 69: 2027-2038
- [17] Hartl L, Gastebois A, Aïmanianda V, et al. Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(2): 185-191
- [18] 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
- [19] Jiang Z D, Guo Y X, Wang X X, et al. Molecular cloning and characterization of AlgL17, a new exo-oligoalginate lyase from *Microbulbifer* sp. ALW1 [J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 161: 17-27
- [20] Guan N, Yu J, Liu W, et al. A high-yielding enzymatic process for production of bioactive β -1,3-glucan oligosaccharides with defined size [J]. *Journal of Glycobiology*, 2018, 7: 131
- [21] Qin H M, Miyakawa T, Inoue A, et al. Laminarinase from *Flavobacterium* sp. reveals the structural basis of thermostability and substrate specificity [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11425
- [22] Wang Z, Robertson K L, Liu C, et al. A novel *Vibrio* beta-glucosidase (LamN) that hydrolyzes the algal storage polysaccharide laminarin [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2015, 91(8)
- [23] Li C, Wen Y, He Y, et al. Purification and characterization of a novel β -1,3-glucanase from *Arca inflata* and its immune-enhancing effects [J]. *Food Chemistry*, 2019, 290: 1-9
- [24] Martin-Cuadrado A B, Fontaine T, Esteban P F, et al. Characterization of the endo- β -1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(4): 542-553
- [25] Kumagai Y, Ojima T. Isolation and characterization of two types of β -1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2010, 155(2): 138-144
- [26] Woo J B, Kang H N, Woo E J, et al. Molecular cloning and functional characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Streptomyces matensis* ATCC 23935 [J]. *Food Chemistry*, 2014, 148: 184-187
- [27] Duan F, Lu X. Enzymatic properties and kinetics of an endo- β -1,3-glucanase of *Mitsuaria chitosanitabida* H12 and preparation of 1,3- β -D-glucooligosaccharides from yeast β -glucan [J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 62: 307-312
- [28] 郑必胜,周萌.裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶的特性研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(7): 731-733
- [29] Rajauria G, Ravindran R, Garcia-Vaquero M, et al. Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106332
- [30] Hu Q S, Yin X Q, Li H B, et al. Characterisation of a novel laminarinase from *Microbulbifer* sp. ALW1 and the antioxidant activity of its hydrolysates [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 56(8): 4129-4138

现代食品科技