

副溶血弧菌C20褐藻胶裂解酶的纯化及酶学特性研究

万小飞¹, 伦璇², 程璐³, 钟毅敏², 陆东雯², 吴冰⁴, 蔡俊鹏¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510641)

(3. 中山大学东校区教学实验中心, 广东 广州 510006) (4. 华南理工大学分析测试中心, 广东 广州 510640)

摘要: 副溶血弧菌 C20 发酵液经离心, 超滤浓缩, 盐析, DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 分离纯化得到电泳纯的褐藻胶裂解酶, 其分子量为 40 kD。酶的最适温度为 30 ℃, 在此温度下保温 3.5 h, 相对酶活仍保持在 90%; 酶的最适 pH 为 7.2, 在 pH 7.0~7.6 范围内稳定; Mg²⁺、Na⁺、NH₄⁺、Ca²⁺、甲醇和适量浓度的 Tween-80 对酶有激活作用; Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Al³⁺、乙醇、丙三醇、DTT、尿素和 SDS 等对酶有较强的抑制作用; 此褐藻胶裂解酶对聚古罗糖醛酸有很强的底物专一性, 其 K_m 值为 1.38 mg/mL, V_{max} 为 0.052 mg/(mL·min)。

关键词: 褐藻胶裂解酶; 纯化; 酶学特性

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0415-05

Purification and Enzymatic Characteristics of Alginate Lyase from *V. parahaemolyticus* C20

WAN Xiao-fei¹, LUN Xuan², CHENG Lu³, ZHONG Yi-min², LU Dong-wen², WU Bing⁴, CAI Jun-peng¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640,

China)(2. College of Life Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510641, China)(3. Experiment Center,

Sun Tat-Sen University, Guangzhou 510006, China)(4. Analytical and Testing Center, South China University of

Technology, Guangzhou, 510640, China)

Abstract: Alginate lyase was successfully purified from fermented broth of *V. parahaemolyticus* C20 by ultra-filtration, ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and size exclusion chromatography. The purified alginate lyase with molecular mass of 40 kD had optimal temperature of 30 ℃ and maintained 90% of its activity after 3.5-hour incubation at 30 ℃. The enzyme with optimal pH of 7.2 was stable within the pH value range of 7.0 to 7.6. Mg²⁺, Na⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, methanol and Tween-80 with certain concentration had activation of the enzyme while ethanol, acetone, DTT, urea, SDS, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ and Al³⁺ showed inhibition. This enzyme specifically degraded polyguluronate with K_m of 1.38 mg/mL and V_{max} of 0.052 mg/(ml·min).

Key words: alginate lyase; purification; enzymatic characteristics

褐藻胶 (algin) 是一种褐藻间质多糖, 是由 L-古罗糖醛酸 (guluronic acid) 和 D-甘露糖醛酸 (mannuro- nic acid) 随机组合而成的线性高分子聚合物^[1], 它包括三种片段: 聚古罗糖醛酸 (polyguluronate), 聚甘露糖醛酸 (polymannuronate) 和聚甘古糖醛酸片段。在我国, 生产褐藻胶所用褐藻主要有海带、马尾藻、鹿角菜和裙带菜, 其来源丰富, 广泛分布于辽东和山东半岛, 浙江、福建以及广东汕头等地区。而作为褐藻胶降解产物的褐藻寡糖已被证明具有抗肿瘤^[2], 抗凝血^[3], 降血糖血脂^[4], 抗自由基氧化^[5], 促生长^[6]等多种重要的生理活性。目前, 褐藻

寡糖可以通过酸法、氧化降解法, 酶法等方法制备, 其中, 酶法主要通过褐藻胶裂解酶基于消去反应使褐藻胶多糖的β-1,4糖苷键断裂, 从而形成具有双键的褐藻寡糖。据报道, 这种不饱和双键对褐藻寡糖所具有的生理活性功能有非常重要的影响^[7]; 而酸法, 氧化降解法所得产物却没有这种双键, 再加上酶法制备条件温和、容易控制, 产物专一等优点, 因此, 酶法生产褐藻寡糖具有非常大的前景。鉴于此, 当前, 寻找稳定高效的褐藻胶裂解酶正成为国内外研究的热点^[8]。本实验从海洋环境中分离鉴定了一株褐藻胶裂解酶高分泌型的副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) C20, 由此菌株出发进行发酵, 分离纯化出褐藻胶裂解酶, 研究其酶学特性, 为进一步将褐藻胶裂解酶用于工业

收稿日期: 2008-01-18

通讯作者: 蔡俊鹏(1963-), 男, 教授, 主要从事海洋生物技术的研究

制备褐藻寡糖提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器

中空纤维素膜 PM10 为美国 Koch Membrane System 公司产品。DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 购自 GE Healthcare 公司。垂直电泳槽 DYCZ-24D 购自北京市六一仪器厂。所用电泳试剂均购自日本 TaKaRa 公司。其它试剂均为市售且具有最高级别纯度。

1.1.2 菌种来源

本实验自广东汕尾分离鉴定并保存的一株副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) C20。

1.1.3 培养基及缓冲液

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 海水晶 33.3, 褐藻酸钠 3.0, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0

发酵培养基 (g/L): 褐藻酸钠 3.0, (NH₄)₂SO₄ 5.0, 海水晶 30.0, K₂HPO₄·3H₂O 7.0, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0

缓冲液 X: A 液: NaH₂PO₄·2H₂O 31.21 g 用蒸馏水定容至 1000 mL, B 液: Na₂HPO₄·2H₂O 71.64 g 用蒸馏水定容至 1000 mL, 取 A 液 28 mL, B 液 71 mL 即为缓冲液 X。

1.2 方法

1.2.1 褐藻胶裂解酶活力的测定

酶活测定参照 Preiss^[9]的紫外吸收法。取 1 mL 0.3%褐藻酸钠(用缓冲液 X 配制)加入 0.1 mL 酶液, 在 30 °C 下保温 20 min, 用紫外分光光度计测量 235 nm 处的吸收值。在波长 235 nm 处光密度每分钟增加 0.1 定义为一个酶活力单位 (U)。

蛋白质测定方法: 按蛋白质在 280 nm 下紫外吸收法测定^[10]。

1.2.2 酶的分离纯化

取适量菌株 C20 接种于液体种子培养基中, 于 28 °C 培养 12~24 h 使菌液的 OD₆₅₀ 达到 0.6, 按发酵培养液体积的 10% 取种子培养液接种于发酵培养基中, 28 °C, 摇床转速为 200 r/min 条件下培养 72 h 后, 将发酵液冷冻离心 (8000×g, 4 °C) 30 min, 弃沉淀, 上清液经 0.45 μm 膜过滤去除残渣, 然后经截留分子量为 10 kDa 的中空纤维超滤膜浓缩至原体积的 1/10, 向浓缩液中缓慢加入固体(NH₄)₂SO₄ 至饱和度为 80%, 静置 12 h 后, 4000×g 下冷冻离心, 沉淀用截留分子量为 14 kDa 的半透膜于缓冲液 X 中透析过夜, 然后

用聚乙二醇 80000 浓缩得粗酶液。

将粗酶液经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液上样于 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱 (1.6×60 cm), 上样后先用缓冲液 X 洗脱未吸附蛋白至基线平稳, 再用含 0.3 mol/L NaCl 的缓冲液 X 进行洗脱。按标准方法测定每管洗脱液的蛋白质含量和酶活力, 此时直接以寡糖在 235 nm 处的吸收值表示酶活力。将得到的酶液冻干后, 上样于 Superdex G100 分子筛凝胶柱(1.6×60 cm), 以缓冲液 X 洗脱, 同上收集酶液冷冻干燥。以上操作均在 4 °C 层析柜中进行, 酶液均保存于 -20 °C。

1.2.3 蛋白质 SDS-PAGE 分析

纯化后的酶按文献[11]方法进行 SDS-PAGE 分析, 以确定酶的纯化程度与酶的分子量。

1.2.4 酶的特性研究

用纯化所得电泳纯的褐藻胶裂解酶进行酶的特性研究, 包括酶最适反应温度及 pH 值, 酶的热稳定性及酸碱稳定性, 金属离子及有机试剂对酶活性的影响和酶的底物专一性。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

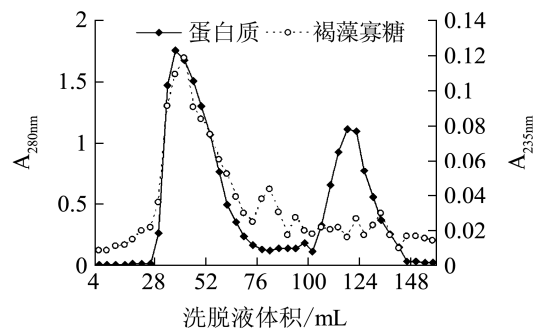


图1 褐藻胶裂解酶 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱纯化洗脱图

Fig.1 Elution profile of alginate lyase on DEAE-Sepharose Fast

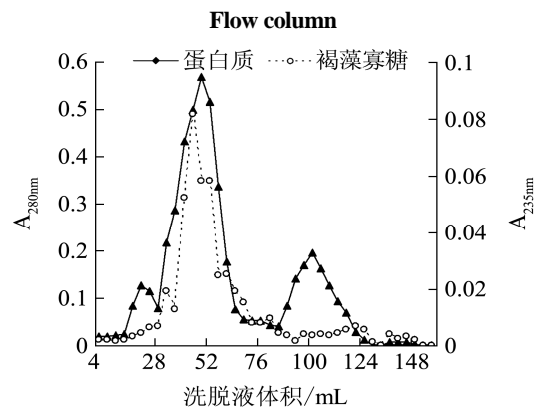


图2 褐藻胶裂解酶的 Sephadex G100 柱纯化洗脱图

Fig.2 Elution profile of alginate lyase on Sephadex G100 column

发酵液经离心、超滤浓缩、硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadose Fast Flow (图 1) 和 Sephadex G-100 (图 2) 分离纯化, 各步分离纯化的回收率, 纯化倍数等相关纯化参数见表 1, 最终纯化倍数为 7.7, 回收率为 22.5%。SDS-PAGE 结果显示纯化后的酶蛋白在电泳图为单一条带 (图 3), 因此, 酶经上述纯化操作后已达电泳纯。在电泳图上将酶蛋白与标准蛋白进行比照可知, 纯化所得褐藻胶裂解酶的表现相对分子量为 40 kD。

表 1 褐藻胶裂解酶的纯化

Table 1 Purification of alginate lyase from *V. parahaemolyticus*

C20			
参数	比活力	纯化倍数	回收率
纯化步骤	/(U/mg)		%
发酵上清液	50.0	1.0	100
超滤浓缩	56.9	1.1	88.2
80%硫酸铵沉淀	126.0	2.5	61.2
DEAE-Sephadose FF	358.7	7.1	32.1
Sephadex G100	386.6	7.7	22.5

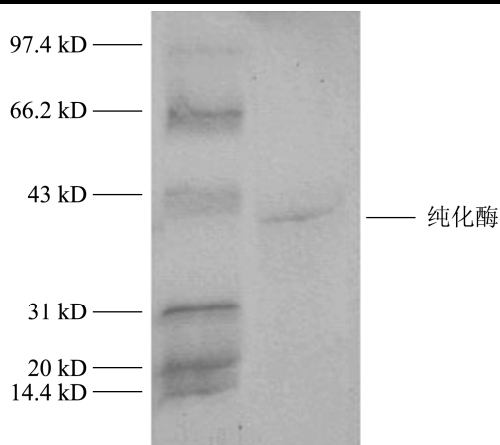


图 3 褐藻胶裂解酶的 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified alginate lyase

2.2 酶的特性研究

2.2.1 酶的最适温度与热稳定性

将酶与褐藻胶在不同温度下反应以测定酶的最适反应温度。结果如图 4 所: 酶的最适反应温度为 30 °C, 且在 25~35 °C 范围有较高的酶活力; 当温度升高到 50 °C 时, 酶活迅速下降, 只有峰值的 11.3%。

将酶与底物在 0~70 °C 保温 3.5 h, 每隔 0.5 h 取样, 以初始酶活为 100% 测定相对酶活。酶的热稳定性结果如图 5 所示: 在最适温度 30 °C 下, 保温 3.5 h, 酶活仍保持在 70%, 由此可见, 此酶在最适温度下的热稳定性很好, 适合在最适温度下长时间使用; 当温度为 0 °C 时, 保温 3.5 h, 酶活未见下降, 说明此酶适合

在 0 °C 条件下短时贮存; 当温度升高到 60 °C 时, 保温 0.5 h, 酶活力残留仅约 20%, 保温 3.5 h, 酶活基本丧失。由此, 此酶在温度高于 60 °C 时极不稳定。同时也说明, 当使用此酶时, 只需将酶液于较高温度下短时加热即可使酶促反应停止。以上结果所显示的酶的温度特性可能与菌种原始生长的海洋环境相关。

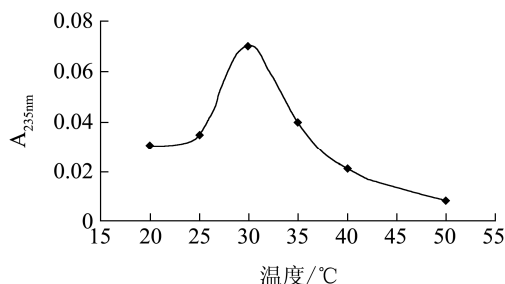


图 4 温度对褐藻胶裂解酶的影响

Fig.4 Effect of temperature to alginate lyase activity

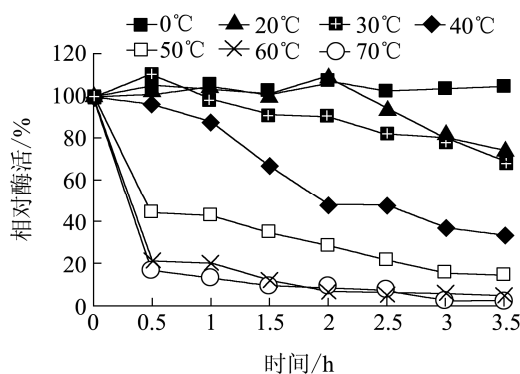


图 5 褐藻胶裂解酶温度稳定性

Fig.5 Temperature stability of alginate lyase

2.2.2 酶的最适 pH 与酸碱稳定性

分别在不同 pH 值的缓冲液中测定褐藻胶裂解酶活力以确定酶的最适 pH, 结果如图 6 所示, 酶的最适 pH 为 7.2, 酶在 pH 为 7.0~7.6 范围活力较高。

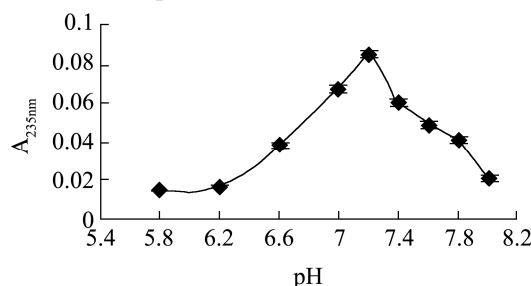


图 6 pH 对褐藻胶裂解酶的影响

Fig.6 Effect of pH on alginate lyase activity

将酶和褐藻胶于不同 pH 下保温 2.5 h, 每隔 0.5 h 取样以初始酶活为 100% 测定相对酶活。酶的酸碱稳定性结果如图 7 所示: 在最适 pH 7.2 时, 保温 2.5 h, 相对酶活仍维持在 90%, 说明此酶在最适 pH 下有很好稳定性; 当 pH 处在稳定范围以内, 即 7.0~7.6 时,

保温 2.5 h, 相对酶活仍以维持在 50%以上; 而当 pH 值超出此范围, 如 pH 为 8.0 时, 随着时间的延长, 相对酶活迅速下降, 保温 2.5 h, 相对酶活仅为 7.0%。因此, 在 pH 稳定范围以内, 酶的酸碱稳定性较好, 而超出此范围时, 酶的酸碱稳定性迅速下降。

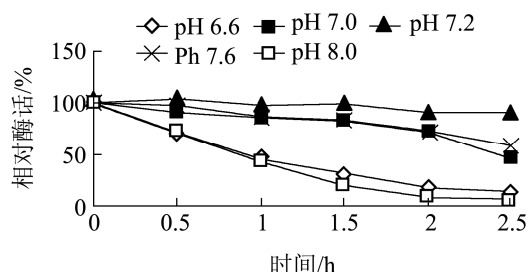


图 7 褐藻胶裂解酶的酸碱稳定性

Fig.7 Acid and base stability of alginate lyase

2.2.3 离子对酶促反应的影响

表 2 离子对褐藻胶裂解酶的影响

Table 2 Effect of ions to alginate lyase activity

离子种类	离子浓度 /mmol/L	相对酶活/%	离子种类	离子浓度 /mmol/L	相对酶活/%
空白	0	100	Zn ²⁺	18	74
	250	129	Cu ²⁺	18	40
	500	141	Fe ²⁺	18	55
Na ⁺	750	404	Mn ²⁺	18	25
	850	105	Co ²⁺	18	26
	1000	28	Fe ³⁺	18	19
K ⁺	18	76	Al ³⁺	18	23
Ca ²⁺	18	119	NH ₄ ⁺	18	203
Mg ²⁺	18	398	EDTA	18	2

在酶与底物反应时, 向体系内加入不同的离子, 以不加任何离子的酶活为 100%测定其相对酶活。结果如表 2 所示: Mg²⁺ (18 mmol/L) 显示出强烈的激活作用, 可使酶活提高 3.98 倍; NH₄⁺ (18 mmol/L) 和 Ca²⁺ (18 mmol/L) 也显示出激活作用, 其它同浓度的金属离子如 K⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Al³⁺等具有抑制作用, 但如表中所示, 低浓度的 Na⁺具有激活作用, 但是当离子浓度高过 850 mmol/L 时, 则显示出抑制作用。因此, 离子对褐藻胶裂解酶的作用不仅因离子种类而异, 也因离子的浓度而异。另外, 当向酶促反应液中加入 18 mmol/L 的 EDTA 时, 酶的活力被强烈抑制, 由此可以初步推断此褐藻胶裂解酶为含有金属离子作为辅基的复合酶。

2.2.4 有机试剂对酶促反应的影响

在酶与底物反应时, 向体系内加入不同的有机试

剂, 测定其酶活, 以不加任何有机试剂的酶活为 100% 结果如表 3 所示: 作为常见的有机溶剂, 1%的乙醇, 丙酮和丙三醇对酶的活性有较强抑制作用, 而甲醇却显示出一定的激活作用, 可能是因为甲醇羟基较其它三种有机溶剂中相应的羟基易于提供质子, 从而使酶由于电子效应而更易于与底物结合; 同时 SDS 的抑制作用可以印证这一点, 因为 SDS 为阴离子表面活性剂, 易于吸引质子, 从而夺取酶分子本身的质子而使酶催化底物的活性降低, 而且结果显示, 随着 SDS 浓度越高, 抑制作用越强烈; DTT 作为酶学中常用的保护剂可以防止酶分子中的巯基被氧化破坏, 本实验中 DTT 显示出抑制作用, 可初步推断此酶分子活性中心或别构中心不含有二硫键; 另外, 作为非离子型的表面活性剂对 Tween-80, 低浓度下对酶激活作用, 而高浓度时却有抑制作用, 其原因还有待研究。

表 3 有机试剂对褐藻胶裂解酶的影响

Table 3 The effect of organic reagents to alginate lyase activity

有机试剂	浓度	相对酶活/%
空白对照	0	100
甲醇	1.0%	112.2
乙醇	1.0%	51.3
丙酮	1.0%	24.3
丙三醇	1.0%	31.0
DTT	0.02 mol/L	44.5
尿素	0.02 mol/L	36.4
	0.4%	225.0
	0.6%	302.5
	0.8%	556.2
Tween-80	1.0%	537.5
	0.2 mol/L	41.5
	0.4 mol/L	35.0
	0.2 mol/L	41.5
SDS	0.4 mol/L	35.0
	0.8 mol/L	17.5

2.2.5 底物对酶促反应的影响

在最适条件下, 酶分别与 0.3%琼胶、褐藻胶、κ-卡拉胶、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、聚古罗糖醛酸和聚甘露糖醛酸反应, 因为琼胶、κ-卡拉胶、CMC-Na 降解的产物不含有双键, 所以统一按 DNS 法^[13]测定酶活。结果如表 4 所示: 此褐藻胶裂解酶对聚古罗糖醛酸有很强的底物专一性, 其中褐藻胶为底物的酶活只所以较高, 是因为褐藻胶由聚古罗糖醛酸和聚甘露糖醛酸组成所造成的。进一步以不同浓度的聚古罗糖醛酸为底物测定酶的反应速率, 以 Lineweaver-Burk

双倒数法测定酶促反应常数, 结果如图 8 所示, K_m 值为 1.38 mg/mL, V_{max} 为 0.052 mg/(mL·min)。

表 4 褐藻胶裂解酶的底物专一性

Table 4 The substrate specificity of alginate lyase

底物种类	褐藻胶	琼胶	κ -卡拉胶	CMC-Na	聚古罗糖醛酸	聚甘露糖醛酸
酶活力/U	0.329	0.043	0.034	0.001	45.33	7.3

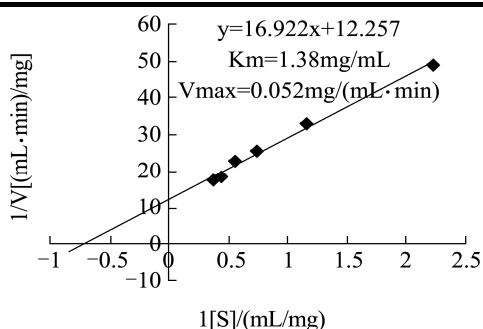


图 8 催化水解聚古罗糖醛酸的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.8 Lineweaver-Burk plot of alginate lyase towards polyguluronate

3 结论

菌株 *V. parahaemolyticus* C20 发酵培养所产褐藻胶裂解酶经离心、超滤浓缩、盐析、离子色谱和凝胶色谱分离纯化得到电泳纯的单一蛋白质, 过纯化倍数 7.7, 回收率为 22.5%。纯化所得褐藻胶裂解酶分子量为 40 kD, 酶促反应最适温度为 30 °C, 在最适温度下保温 3.5 h, 酶活力仍保持在 70%以上, 热稳定性很好。但温度超过 60 °C时, 酶极易失活; 酶最适 pH 为 7.2, 在酸碱稳定范围 pH 7.0~7.6 内保温 2.5 h, 酶活力保持在 50%以上, 但超过此范围时, 酶易失活; 金属离子 Mg^{2+} 、 Na^+ 可表现出很强的激活作用, NH_4^+ 和 Ca^{2+} 也具有较好的激活作用, 其它离子如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等具有抑制酶活的作用。有机试剂中甲醇的适量浓度的 Tween-80 具有激活作用, 而乙醇, 丙三醇, DTT, 尿素和 SDS 都对酶有较强的抑制作用; 此褐藻胶裂解酶对褐藻胶中的聚古罗糖醛酸 (PG) 显示出很强的专一性, 而对琼胶, 卡拉胶和聚甘露糖醛酸 (PM) 的降解能力很差, 此褐藻胶裂解酶催化聚古罗糖醛酸 (PG) 的 K_m 值为 1.38 mg/mL, V_{max} 为 0.052

mg/(mL·min)。

参考文献

- [1] 陈正霖,高金城.褐藻胶[M].青岛:青岛海洋大学出版社, 1989,27-28
- [2] Iwamoto Y, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytodine production in humanmononuclearcells[J].Biosci.Biotech.biochem.,2003,67 (2): 258
- [3] Wall D, et al. Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosacchaitides [J]. Thromb. Res.,2001,103(4):325
- [4] 王庭欣,等.海带多糖对小鼠免疫功能的调节作用[J].卫生毒理学杂志,2000,14(2):75
- [5] 孙丽萍,等.褐藻胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J].中国海洋大学学报,2005,35(5):811-814
- [6] Iwasaki K, et al. Purification of alginate oligosaccharides with root growth promoting activity toward lettuce[J].Biosci. Biotech. Biochem.,2000,64 (5):1067
- [7] Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in theinduction of cytokine production from RAW264.7 cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 4423-4429
- [8] 蔡俊鹏,程璐.褐藻胶裂解酶及其裂解产物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 219-222
- [9] Preiss J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria.I. Enzymeatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid[J]. J.Biol.Chem., 1962,237:309-316.
- [10] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,2001
- [11] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].科学出版社,2002.111-124
- [12] Miller, G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal. Chem., 1959, 31: 426-428.