

一种 Kappa-卡拉胶酶的克隆、表达及其酶学性质研究

李佳佳¹, 倪辉^{1,2}, 蔡慧农^{1,2}, 朱艳冰^{1,2}, 肖安风^{1,2}

(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, 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建厦门 361021)

摘要: 将来源于 *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5 菌株的 κ -卡拉胶酶基因克隆到载体 pET-28a 上, 并转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达。克隆得到的 κ -卡拉胶酶基因序列全长 1194 bp, 编码一个由 398 个氨基酸残基组成的蛋白酶, 该蛋白酶的分子量为 48 ku, 结构域分析表明该 κ -卡拉胶酶符合 GH16 家族的特点。对重组 κ -卡拉胶酶的酶学性质进行考察: 重组 κ -卡拉胶酶只能专一性的降解 κ -卡拉胶; 该酶的最适温度和 pH 分别是 55 °C 和 pH 9.0, 重组酶在 40 °C 保温 1 h 可保持 95.0% 的活性, 在 45 °C 保温 1 h 残余酶活与对照比较仍保留 60.0%, 在 pH 8.0~10.0 的缓冲液中处理 30 min, 仍能保持 80% 以上的酶活力, 低浓度的 Na⁺ 和 K⁺ 以及 1 mmol/L 的 Sn²⁺、Fe³⁺、EDTA、DTT、Tween-20、Tween-80 和 Triton X-100、 β -mercaptoethanol、SDS、Urea 对重组酶活具有显著的促进作用; 而高浓度的 Na⁺ 和 K⁺ 以及 1 mmol/L 的 Cd²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺ 对重组酶活性有不同程度的抑制作用。

关键词: 食鹿角菜假交替单胞菌; κ -卡拉胶酶; 克隆表达; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2016)10-72-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.012

Cloning, Expression, and Enzymatic Properties of κ -Carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*

LI Jia-jia¹, NI Hui^{1,2}, CAI Hui-nong^{1,2}, ZHU Yan-bing^{1,2}, XIAO An-feng^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China) (2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: A κ -carrageenase gene from the bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5 was cloned into a pET-28a expression vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The length of the obtained κ -carrageenase gene sequence after cloning was 1194 base pairs (bp), and this gene encoded a protease (molecular weight: 48 ku) composed of 398 amino acid (AA) residues. Based on domain analysis, this κ -carrageenase belonged to the GH16 glycohydrolase family. The enzymatic properties of the recombinant κ -carrageenase were studied, and this enzyme specifically degraded κ -carrageenan. The results also indicated that the optimal temperature and pH for the enzyme were 55 °C and pH 9.0, respectively. The recombinant κ -carrageenase retained more than 95.0% and 60.0% of the maximum enzymatic activity after 1 h of incubation at 40 °C and below 45 °C, respectively, and retained more than 80.0% of the maximum enzymatic activity after 30 min of incubation at a pH range of 8.0~10.0. The activity of the recombinant enzyme was significantly promoted at low concentrations of Na⁺ and K⁺, and 1 mmol/L Sn²⁺, Fe³⁺, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT), Tween-20, Tween-80, Triton X-100, β -mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), and urea. The enzymatic activity was inhibited to various degrees by high concentrations of Na⁺ and K⁺ and 1 mmol/L Cd²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, and Ca²⁺.

Key words: *Pseudoalteromonas carrageenovora*; κ -carrageenase; cloning and expression; enzymatic properties

卡拉胶(Carrageenan)是从海洋红藻细胞壁中提取出来的亲水性的线性硫酸多糖, 由 α -1,3-D-半乳糖和

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401632); 福建省重大专项专题项目 (2015NZ0001-1); 厦门市科技计划项目 (3502Z20120005); 厦门南方海洋研究中心项目 (13GZP004NF10)

作者简介: 李佳佳(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术
通讯作者: 肖安风(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

β -1,4-D-半乳糖交替连接而成。卡拉胶在食品、制药、化妆品、印刷等行业具有广泛的应用^[1], 由于卡拉胶粘度较大, 不容易被机体吸收, 相比之下, 卡拉胶的降解产物卡拉胶寡糖更容易为生物体吸收, 且具有抗氧化^[2]、抗病毒^[3]、免疫调节^[4]等多种生物活性, 因此在农业、食品等领域具有良好的应用前景。

目前, 卡拉胶寡糖的制备方法主要有还原水解法、自由基解聚法、化学降解法和酶解法^[5]。利用卡拉胶

酶水解卡拉胶得到卡拉胶寡糖的酶法降解方法,具有条件温和、反应专一性强等优点。卡拉胶酶是一种具有广泛应用前景的工具酶,主要来源于海洋细菌^[6],李尚勇^[7]通过研究一株高活性的产 κ -卡拉胶酶的菌株 QY203 酶学性质,发现该酶在 pH 6.0~9.0 时保持稳定,在 45 °C 保温 1 h 可保持 80% 的活性,在 40 °C 保温 48 h 可保存 70% 的活性。刘哲民^[8]将 κ -卡拉胶酶基因克隆至大肠杆菌中表达,重组酶在 40 °C 条件下保存 1 h 酶活力损失 50%,在 35 °C 保存 3 h 酶活力没有明显损失,在 pH 6.0~7.0 条件下保存 2 h 酶活力无明显损失。Yao 等^[9]克隆得到的重组卡拉胶酶的最适 pH 为 pH 9.0,最适温度为 40 °C。

利用自然界选育得到的菌株直接发酵生产卡拉胶酶,产量低、培养条件复杂、产酶不稳定、酶纯化成本高,因此难以用于大量生产卡拉胶酶。利用基因工程的方法,将自然界中分离得到的卡拉胶酶基因进行异源表达,以期提高卡拉胶酶的表达量并实现大量制备,是目前研究的热点方向。但是,现已报道的重组卡拉胶酶的温度稳定性较差,0~30 °C 时大多数的卡拉胶酶可以保持较高活性,在温度高于 40 °C 条件下酶活力损失较大,及 pH 大于 6.0 时酶活性开始下降,因此,从自然界获取具有较好耐热性能的卡拉胶酶并在大肠杆菌中大量表达,这对于卡拉胶酶的大规模制备和卡拉胶寡糖的工业化生产具有重要的意义。

本实验室前期筛选得到一株产 κ -卡拉胶酶的菌株 *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5,研究发现,该菌株能够产生重组 κ -卡拉胶酶,对该酶进行分离纯化后,其最适反应温度和 pH 分别为 60 °C 和 pH 7.5,在 50 °C 以下酶的稳定性较好,在 pH 7.0~9.0 范围内酶活力较稳定^[10]。该酶具有较好的热稳定性,所以本实验在此基础上,利用基因工程手段,将来源于该菌株的 κ -卡拉胶酶克隆至大肠杆菌中表达,为卡拉胶酶大规模制备奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

P. carrageenovora ASY5 菌株筛选自厦门红树林土壤(保藏于中国工业微生物菌种保藏管理中心,保藏编号: CICC 23819)。*E. coli* DH 5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 菌株为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

PCR 产物纯化试剂盒、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上

海)股份有限公司; T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 有限公司; 限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 购自 TaKaRa 有限公司; 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导剂,其余生化试剂为分析纯试剂。

1.1.3 培养基

LB 基本培养基: NaCl 1 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 固体培养基再加 20 g/L 琼脂粉。

卡拉胶基本培养基: 牛肉膏 1 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 人工海水 1 L(人工海水: NaCl 26.5 g/L, KCl 0.7 g/L, CaCl₂·2H₂O 1.1 g/L, MgCl·6H₂O 2.4 g/L, NaHCO₃ 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.4 g/L)调节 pH 7.8, 水浴 10 min 调节 pH 7.3, 固体培养基再加 20 g/L 琼脂。

1.2 基本方法

以 *P. carrageenovora* ASY5 基因组 DNA 为模板,以 5'-CGCGGATCCCAAAAAATTAGTATTAT-3' 和 5'-CCCAAGCTTTCGTTTTAGTTCGTAAC-3' 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行结果分析后,纯化回收。将纯化 PCR 产物与 pMD18-T 连接,连接产物 *car*-T 转化 *E. coli* DH5 α 中,筛选卡那抗性的阳性克隆。挑取阳性克隆活化,提取质粒并测序验证。将测序正确的 *car*-T 与表达载体 pET-28a 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后,纯化回收,用 T4 DNA 连接酶连接,转化到 *E. coli* BL21(DE3)中,筛选卡那抗性阳性克隆。挑取阳性单菌落接种于含卡拉霉素的培养基,培养至 OD₆₀₀ 达 0.6,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度为 0.05 mmol/L,于 20 °C 诱导培养 24 h。一定体积的菌液离心后收集沉淀细胞,用缓冲液重悬沉淀细胞,冰浴条件下超声波破碎细胞,高速离心(约 12000 r/min)去除细胞碎片,得到的上清和沉淀利用 SDS-PAGE 检测蛋白质的分子量。卡拉胶酶活性测定参照文献^[2]进行适当调整,反应体系包括 0.5% κ -卡拉胶(以 pH 7.0 磷酸盐缓冲液配制),50 μ L 酶液,在 45 °C 保温 20 min 后,沸水浴 5 min 终止反应,加入 0.7 mL DNS 水浴反应 5 min,在 520 nm 下测定吸收值。重组 κ -卡拉胶酶分别与 0.5% 的底物(κ -卡拉胶、岩藻多糖、*L*-卡拉胶、琼胶、褐藻胶、羧甲基纤维素)反应后,根据重组 κ -卡拉胶酶对不同种类底物的降解能力大小,测定相对酶活性。卡拉胶酶的活力定义为:在上述条件下,每分钟催化生成 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.3 卡拉胶酶基因及其编码产物的生物学信息分析

由生物信息学分析软件 DNAMAN 对 κ -卡拉胶酶的氨基酸序列进行比对, 利用 MEGA 6.0 的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 利用 SWISS-MODEL 进行蛋白质结构的三维建模, 通过 Pymol 软件预测蛋白质的空间结构。

1.4 数据统计分析

试验结果均以 3 次平行测定的均值表示, 应用 SPSS 17.0 进行方差分析及差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 κ -卡拉胶酶序列分析

2.1.1 κ -卡拉胶酶基因及其编码蛋白质的序列分析

通过 NCBI 数据库中 BLAST 进行序列同源性比对, 发现该序列与来自 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的 κ -卡拉胶酶 (P43478.1), *Pseudoalteromonas carrageenovora* 的 κ -卡拉胶酶 (1DYP A), *Pseudoalteromonas tetraodonis* 的 κ -卡拉胶酶 (BAJ61957.1), *Pseudoalteromonas* sp. Bsw20308 的 κ -卡拉胶酶 (EKS11233.1), *Gammaproteobacteria* 的假定蛋白质 (WP033023832.1), *Pseudoalteromonas* sp. LL1 的 κ -卡拉胶酶 (ADD92366.1), *Pseudoalteromonas haloplanktis* 的假定蛋白质 (WP029751403.1), *Pseudoalteromonas* sp. S3431 的假定蛋白质 (WP033038903.1) 分别具有 100%、98%、94%、83%、86%、79%、78%、75% 的相似性。

将本研究的 κ -卡拉胶酶氨基酸序列与相似度较高的序列进行系统发育分析, 从进化树中可看出, 该 κ -卡拉胶酶与来自 *Pseudoalteromonas carrageenovora* (P43478.1) 卡拉胶酶在一个分支。

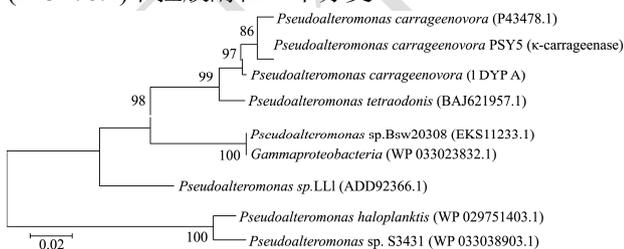


图 1 *P. carrageenovora* 卡拉胶酶氨基酸序列的系统发育树
Fig.1 Neighbor-joining phylogenetic tree of κ -carrageenase aa sequence from *P. carrageenovora* ASY5

注: 图中括号中的代码表示 GenBank 中的登录号, 每个分支点的数字是引导程序的百分比, 每一刻度为 2% 的序列差异。

由 NCBI 网站预测蛋白质的功能结构域, 可

知, 来源于 *P. carrageenovora* ASY5 的 κ -卡拉酶符合 GH16 家族的特点, 由此可以预测该 κ -卡拉胶酶属于 GH16 家族中一员。预测 *P. carrageenovora* 卡拉胶酶的二级结构, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和不规则卷曲所占比例分别为 13.10%、23.75%、9.82% 和 44.33%。利用 SWISS-MODEL 对 *P. carrageenovora* κ -卡拉胶酶序列进行三维建模, 模板为假交替单胞菌 κ -卡拉胶酶 (PDB 登录号为 1dyp.1.A), 序列相似性为 99.63%, 说明模型质量很好。通过 Pymol 软件, 观察 *P. carrageenovora* κ -卡拉胶酶与模板的重叠情况, *P. carrageenovora* κ -卡拉胶酶结构近似球形, 该酶具有 GH16 的特点, 蛋白质的核心结构具有典型的 $\alpha\beta$ 水解酶结构域。通过图像显示, *P. carrageenovora* κ -卡拉胶酶近似由 β 结构组成的蛋白质, 表面主要是疏水区, Asp 165 和 His 183 是主要催化位点, 不对称单元位于 27-297 位氨基酸, *P. carrageenovora* κ -卡拉胶酶与模板的 27-297 位氨基酸可以完全叠加, 说明它们相似性很高。

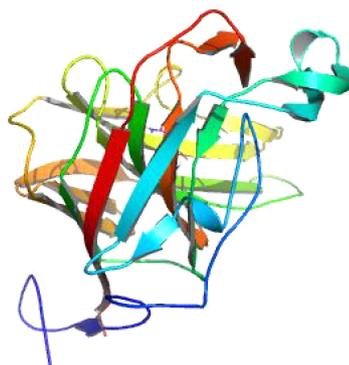


图 2 κ -卡拉胶酶的三级结构预测

Fig.2 Predicted κ -carrageenase tertiary structure

2.2 重组 κ -卡拉胶酶的表达

在细胞内, 蛋白质的积累过多, 将导致三级结构不能正确折叠, 于是容易形成包涵体。重组蛋白在大肠杆菌表达体系中的高水平表达, 经常会导致蛋白质的三级结构不能正确折叠, 从而容易形成大量不溶的、无活性的包涵体^[11]。菌体破碎液上清和沉淀中的蛋白, 采用 12% SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, 1、2 泳道标记的是未经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的组分, 3、4 为经 IPTG 诱导的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的组分, 5、6 为 pET-28a 空质粒转 *E. coli* BL21 破壁后的成分 SDS-PAGE 电泳分析结果。比较不难发现, 经 IPTG 诱导后, 可以观察到重组 κ -卡拉胶酶表达, 该酶的分子量在 48 ku 左右。通过粗酶液 κ -卡拉胶酶活力的测定验证了目的基因得到了有效的表达。

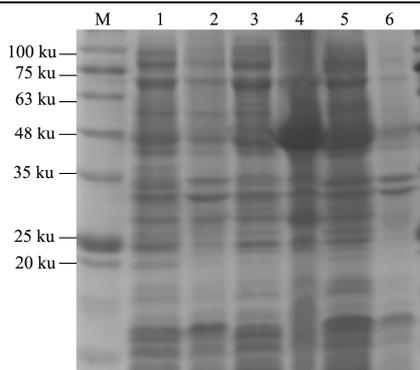


图3 重组 κ -卡拉胶酶的诱导表达的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of κ -carrageenase purified from *E. coli*

注: M, Maker; 1, 未经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的上清; 2, 未经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的沉淀; 3, 经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的上清; 4, 经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21-pET-car 超声破壁后的沉淀; 5, pET-28a 空质粒转 *E. coli* BL21 超声破壁后上清; 6, pET-28a 空质粒转 *E. coli* BL21 超声破壁后沉淀。

2.3 重组 κ -卡拉胶酶酶学性质的测定

2.3.1 酶的底物特异性

研究发现, 来源于 *Pseudoalteromonas* sp. QY203 的重组卡拉胶酶只对 κ -卡拉胶底物具有较强的降解能力, 而对 ι -卡拉胶和琼胶不具有降解能力^[7]。由 *P. carrageenovora* 克隆表达的重组卡拉胶酶对于 κ -卡拉胶有很好的水解作用, 对岩藻多糖、 ι -卡拉胶、琼胶、褐藻胶、羧甲基纤维素没有水解作用, 说明该酶对 κ -卡拉胶具有良好的底物特异性。

2.3.2 酶的最适反应温度及温度稳定性

在不同温度 (温度为 25、30、35、40、45、50、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$ 条件) 下测定重组 κ -卡拉胶酶酶活, 如图 4a 所示, 在一定范围内, κ -卡拉胶酶的活力随着温度的升高而升高, 并在 55 $^{\circ}\text{C}$ 活性达到最高, 随后 κ -卡拉胶酶的活力呈现缓慢下降趋势。图 4b 为温度对重组卡拉胶酶稳定性的影响, 结果表明重组酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1 h, 残余酶活为 95.0%; 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1 h, 残余酶活为 60.0%; 温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时保温 1 h 与 45 $^{\circ}\text{C}$ 时保温 1 h, 残余酶活力没有显著性差异, 但是当保温时间大于 1 h 时, 50 $^{\circ}\text{C}$ 的残余酶活比 45 $^{\circ}\text{C}$ 低。来源于 *Issatchenkia terricola* XJ-2 的卡拉胶酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 只能保持 60.0% 酶活^[9], 来自 *Zobellia* sp. ZM-2 的重组卡拉胶酶在 45 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min 大约有 80.0% 的酶活力损失^[12], 与其它来源的卡拉胶酶比较, 本研究的卡拉胶酶温度稳定性具有显著提高。

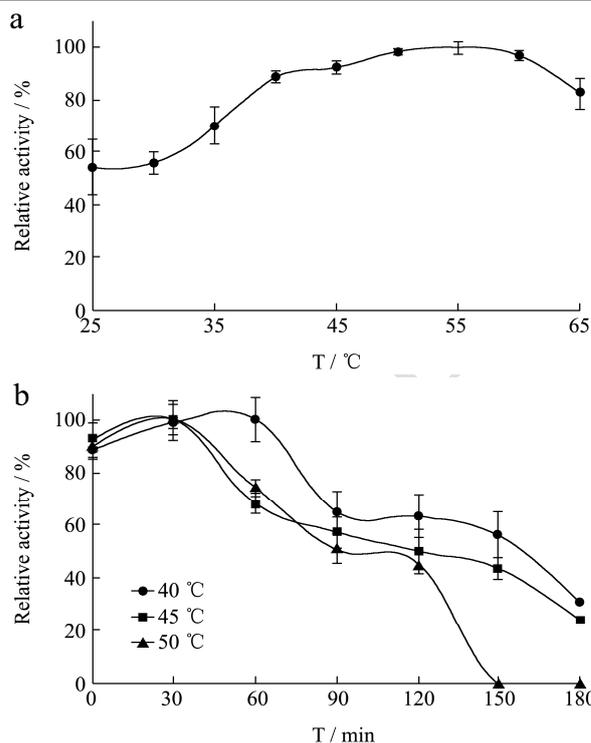


图4 温度对重组卡拉胶酶酶活性 (a) 及稳定性 (b) 的影响

Fig.4 Effect of temperature on the enzymatic activity (a) and thermal stability (b) of κ -carrageenase

2.3.3 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

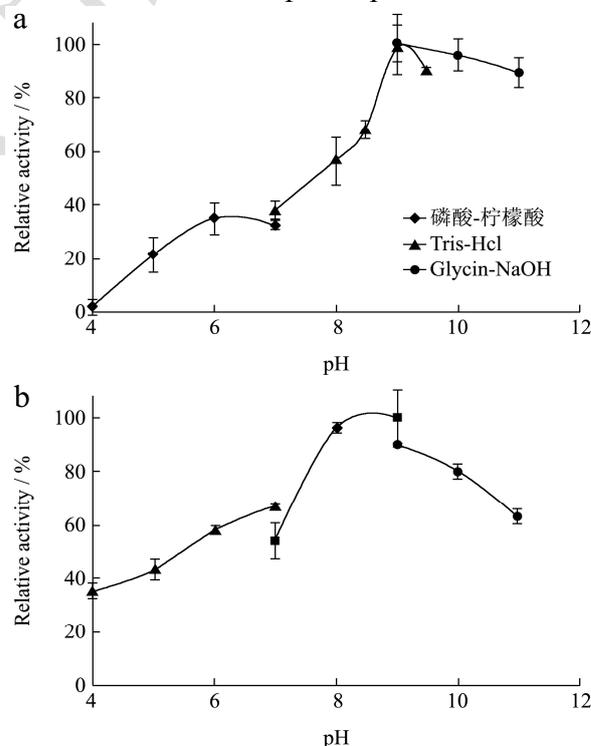


图5 pH 对重组卡拉胶酶酶活性 (a) 及稳定性 (b) 的影响

Fig.5 Effect of pH on the enzymatic activity (a) and thermal stability (b) of κ -carrageenase

现在已经报道的卡拉胶酶中稳定性最好的是来源于

Issatchenkia terricola 的 κ -卡拉胶酶, 在 pH 7.0~10.0 的缓冲液中处理 120 min 时仍有 85.0% 以下的酶活力^[9], 来自 *Zobellia* sp. ZM-2 的重组卡拉胶酶在 pH 8.0 条件下放置 2 h 酶活力保留原来的 80%, pH 10 的条件下放置 2 h, 酶活力几乎完全丧失^[12]。在不同 pH (pH 4~11) 条件测酶活力, 该酶在 pH 9.0 时酶活性最高, pH 低于或高于 9.0 时, 酶活性随着 pH 的升高而逐渐降低 (图 5a)。考察不同条件下 pH 稳定性, 结果表明重组酶在 pH 8.0~10.0 的缓冲液中处理 30 min, 仍能保持 80.0% 以上的酶活力 (图 5b), 该酶的 pH 稳定性较好, 而且该酶的 pH 稳定性也与酶所处的反应体系

有关, 在 Tris-HCl 反应体系下比同等 pH 磷酸盐缓冲体系下要稳定。

2.3.4 金属离子对重组酶活性的影响

测定不同金属离子对酶活力的影响, 结果显示, 低浓度的 Na^+ 和 K^+ 对酶活有促进作用。当 Na^+ 浓度高于 700 mmol/L 或 K^+ 浓度高于 50 mmol/L, 对重组酶活性有抑制作用, Cd^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 对酶活有抑制作用, 主要是因为这些金属离子与酶催化部位的半胱氨酸 (Cys 98) 结合, 从而使蛋白质构象发生改变, 酶活性也随之改变^[8]。而 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 对酶活有促进效果。

表 1 金属离子对重组卡拉胶酶活性的影响

Table 1 Effects of metal ions on carrageenase activity

Metal ions	Concentration/(mmol/L)	Relative activity/%	Metal ions	Concentration/(mmol/L)	Relative activity/%
Na^+	100	113.08±2.49	Ba^{2+}	1	97.78±5.03
	300	120.42±13.33	Mg^{2+}	1	91.13±6.97
	500	107.28±8.91	Fe^{2+}	1	11.41±13.64
	700	93.29±13.49	Ca^{2+}	1	75.31±12.50
	1000	85.78±4.42	Cd^{2+}	1	38.68±9.51
	2000	91.13±7.74	Sn^{2+}	1	135.04±6.98
	3000	97.61±7.74	Fe^{3+}	1	130.94±9.71
	4000	4.95±1.27			
K^+	10	138.74±7.10			
	50	81.17±7.10			
	100	49.43±3.28			
	150	30.03±2.40			
	200	19.96±3.82			

2.3.5 表面活性剂和洗涤剂对重组酶活性的影响

表 2 表面活性剂和去污剂对重组卡拉胶酶活性的影响

Table 2 Effects of surfactants and detergents on the activity of recombinant κ -carrageenase

Reagents	Concentration/(mmol/L)	Relative activity/%	Reagents	Concentration/(mmol/L)	Relative activity/%
EDTA	1	162.68±4.02	Triton X-100	1	162.23±9.29
Tween-80	1	170.47±14.58	β -mercaptoethanol	1	264.84±2.92
Tween-20	1	152.50±15.60	Urea	1	165.47±10.34
SDS	1	143.68±6.97	DTT	1	159.32±12.09

1 mmol/L EDTA 和 DTT, β -mercaptoethanol、SDS、Urea、Tween-20、Tween-80 和 Triton X-100 对重组酶具有促进作用, EDTA 是一种金属螯合剂, 可以与表 1 中的金属离子螯合, 从而使酶的活性提高; DTT 的存在可以提高酶的活性, 可能是由于硫醇的存在对催化氨基酸 (Cys) 有保护作用, 进一步说明, Cys 对酶的活性至关重要^[8]; β -mercaptoethanol 含-SH 基团, 因而可以与二硫键结合, 改变酶的构象, 从而改变其活性; SDS、Urea、Tween-20、Tween-80 和 Triton X-100 对重组酶具有促进作用, 说明一定浓度的表面活性剂

或去污剂, 对酶而言, 又是“激活剂”。研究表明, 表面活性剂可以改变酶的稳定性, 阻止酶失活, 另一方面, 可能是表面活性剂吸附在底物表面, 因此改变了酶的底物特异性^[13]。

3 结论

从 *P. carrageenovora* ASY5 菌株中成功克隆全长 1194 bp 的卡拉胶酶基因, 该基因编码 398 个氨基酸残基组成的蛋白质, 分子量为 48 ku。对该酶的结构域进行分析, 预测该 κ -卡拉胶酶属于 GH16 家族中一员。

预测 *P. carrageenovora* 卡拉胶酶的二级结构, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和不规则卷曲所占比例分别为 13.10%、23.75%、9.82% 和 44.33%。本文得到重组 κ -卡拉胶酶, 最适反应温度和 pH 为 55 °C, pH 9.0。重组酶在 40 °C 下保温 1 h, 残余酶活为 95.0%; 在 45 °C 下保温 1 h, 残余酶活为 60.0%。重组酶也展现了较广的 pH 耐受性, 在 pH 8.0~10.0 范围内酶活力较稳定。Na⁺ 浓度高于 700 mmol/L 或 K⁺ 浓度高于 50 mmol/L, 对重组酶活性有抑制作用; 1 mmol/L Cd²⁺、Ba²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺ 对酶活有抑制作用, 1 mmol/L Sn²⁺、Fe³⁺, EDTA 和 DTT, β -mercaptoethanol、SDS、Urea、Tween-20、Tween-80 和 Triton X-100 对重组酶对酶活有促进效果。

参考文献

- [1] Campo V L, Carvalho D, Ivone C, et al. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis-a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(2): 167-180
- [2] Yuan H M, Song J M, Zang W W, et al. Antioxidant activity and cytoprotective effect of κ -carrageenan oligosaccharides and their different derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16(5): 1329-1334
- [3] Wang W, Zhang P, Yu G L, et al. Preparation and anti-influenza a virus activity of κ -carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives [J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 880-888
- [4] Yuan H M, Song J M, Li X G, et al. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides [J]. Cancer Letters, 2006, 243(2): 228-234
- [5] Sun Y J, Yang B Y, Wang Z F, et al. Structural characterization and antioxidant activities of κ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods [J]. Food Chemistry, 2015, 178: 311-318
- [6] 宓妍妍. 南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L RNA 解旋酶基因功能及印尼产卡拉胶海藻生物多样性分析[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013
MI Yan-yan. Function of RNA helicase gene from the Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L and biodiversity analysis of carrageenan producing seaweeds from Indonesia [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2013
- [7] 李尚勇. 海洋交替假单胞菌 QY203 产 κ -卡拉胶酶研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012
LI Shang-yong. Study on κ -carrageenase of marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. QY203 [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012
- [8] 刘哲民. κ -卡拉胶酶基因克隆表达及酶法制备卡拉胶低聚糖研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014
LIU Zhe-min. Gene cloning and heterologous expression of κ -carrageenase and its use in preparation of carrageenan oligosaccharides [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014
- [9] Yao Z Y, Zhang C, Lu F X, et al. Gene cloning, expression, and characterization of a novel acetaldehyde dehydrogenase from *Issatchenkia terricola* strain XJ-2 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93: 1999-2009
- [10] 许彩云, 朱艳冰, 肖安风, 等. 一株产卡拉胶酶细菌的分离鉴定及其酶学性质[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 140-148
XU Cai-yun, ZHU Yan-bing, XIAO An-feng, et al. Isolation, identification of a κ -carrageenase-producing bacterium and κ -carrageenase characterization [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(2): 140-148
- [11] Liu Z M, Tian L, Mou H J, et al. Efficient extracellular production of κ -carrageenase in *Escherichia coli*: Effects of wild-typesignal sequence and process conditions on extracellular secretion [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 185: 8-14
- [12] Liu Z M, Li G Y, Mo Z L, et al. Molecular cloning, characterization, and heterologous expression of a new κ -carrageenase gene from marine bacterium *Zobellia* sp. ZM-2 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 10057-10067
- [13] 时进刚. 表面活性剂对堆肥过程中微生物胞外酶的作用及其机理研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2007
SHI Jin-gang. The effects and mechanism of surfactants on the extracellular enzymes of microorganisms during composting process [D]. Changsha: Hunan University, 2007