



## 厌氧菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 外切型海藻酸裂解酶的异源表达及酶学特征

陈可可 何漫漫 王康 严金平 伊日布斯\*

昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650504

**摘要:**【背景】目前已报道的海藻酸分解菌多数为好氧菌,未见有关厌氧菌的报道。从分离的海藻酸分解菌中表征的海藻酸裂解酶大多为内切型海藻酸裂解酶,外切型较少。【目的】研究来自厌氧海藻酸分解菌的海藻酸裂解酶基因,表征新型海藻酸裂解酶并阐明其酶学性质,为海藻酸裂解酶的多样性和微生物降解海藻酸机制提供理论依据。【方法】对来自厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 的海藻酸裂解酶 SHA-4 编码基因进行克隆,分析基因序列,构建重组质粒 PGEX-4T-1-SHA-4 并在大肠杆菌中实现异源表达,经纯化后对其酶学性质及降解特征进行研究。【结果】该酶在 28 °C、用 0.1 mmol/L IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)条件下诱导 6 h 达到最大表达量,纯化后酶的比活力达到 21 U/mg。酶学性质分析表明 SHA-4 的最适温度为 37 °C; 最适 pH 为 7.5; 对 PolyMG (杂聚古罗糖醛酸-甘露糖醛酸嵌段)具有底物偏好性;  $\text{Na}^+$  对该酶的活性具有抑制作用,而金属离子  $\text{Cu}^{2+}$  具有明显促进作用,使活性提高了约 168%; SHA-4 催化海藻酸的  $K_m$  值为 2.5 mg/mL,  $V_{max}$  为 8.7 mg/(mL·min); SHA-4 为外切型海藻酸裂解酶,降解海藻酸终产物为单糖。【结论】异源表达了来自一株厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 的海藻酸裂解酶 SHA-4, 该酶是 PL6 家族中第一个对 PolyMG 有底物偏好性的外切型海藻酸裂解酶,而且活性较高,作为工具酶有很好的应用前景,为海藻酸降解机制的探索提供了新的线索。

**关键词:** 厌氧海藻酸分解菌, *Sunxiuqinia* sp. SH-52, 外切型海藻酸裂解酶, 异源表达, 酶学性质

## Heterologous expression and characterization of exo-type alginate lyase from anaerobic bacterium *Sunxiuqinia* sp. SH-52

CHEN Ke-Ke HE Man-Man WANG Kang YAN Jin-Ping Irbis Chagan\*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650504, China

**Abstract:** [Background] Most alginolytic bacteria currently reported are aerobic bacteria and studies on anaerobic ones have not been reported yet. Characterization of alginate lyases isolated from alginolytic bacteria are mainly focused on the endo-type alginate lyases and rarely on exo-type ones. [Objective] To investigate the genes encoding alginate lyases isolated from anaerobic alginolytic bacteria, to characterize

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (21366015)

\*Corresponding author: Tel: 86-871-65920211; E-mail: irbisc@qq.com

Received: 09-03-2018; Accepted: 28-05-2018; Published online: 12-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(21366015)

\*通信作者: Tel: 0871-65920211; E-mail: irbisc@qq.com

收稿日期: 2018-03-09; 接受日期: 2018-05-28; 网络首发日期: 2018-06-12

the novel alginate lyase, and to elucidate its enzymatic properties, providing a theoretical basis for the diversity of alginate lyases and the mechanism of microbial degradation of alginate. **[Methods]** The gene encoding SHA-4, an alginate lyase isolated from an anaerobic alginolytic bacterium *Sunxiuqinia* sp. SH-52, was cloned and sequenced. Recombinant plasmid PGEX-4T-1-*SHA-4* was constructed and heterologously expressed in *E. coli*. The expressed enzyme was purified and the enzymatic and degradation characteristics were analyzed. **[Results]** Maximum expression was achieved when induced by 0.1 mmol/L IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactoside) at 28 °C for 6 hours and the specific activity of the purified enzyme was 21 U/mg. Characterization of the enzyme showed that the optimal condition for SHA-4 includes the temperature at 37 °C, pH at 7.5, and PolyMG (heteropolymeric MG blocks) as a preferred substrate. The activity of this enzyme was inhibited by Na<sup>+</sup> and significantly elevated to about 168% by Cu<sup>2+</sup>.  $K_m$  and  $V_{max}$  of SHA-4 when used to catalyze alginate were 2.5 mg/mL and 8.7 mg/(mL·min), respectively. SHA-4 was an exo-type alginate lyase with monosaccharides as the final degradation products. **[Conclusion]** An alginate lyase SHA-4 isolated from an anaerobic alginolytic bacterium *Sunxiuqinia* sp. SH-52 is successfully expressed. Among other PL6 family members, SHA-4 is the first exo-type alginate lyase with PolyMG as a preferred substrate. Along with its relatively high enzymatic activity, SHA-4 may serve as a tool enzyme with promising application and provide new clues for further exploration of the mechanism of alginate degradation.

**Keywords:** Anaerobic alginolytic bacteria, *Sunxiuqinia* sp. SH-52, Exo-type alginate lyase, Heterologous expression, Enzymatic properties

海藻酸是由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸(M)和它的 C5 差向异构体  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸(G)单体组成, 通过 1,4-糖苷键连接成线性多糖, 根据海藻酸分子的多聚体结构可以分为 3 种情况: 单体 M 连续排列形成的聚甘露糖醛酸(PolyM); 单体 G 连续排列形成的聚古罗糖醛酸(PolyG); M 和 G 随机交替排列形成的杂聚古罗糖醛酸-甘露糖醛酸(PolyMG)。海藻酸因具有特殊的化学特性和生物活性在食品、医药和化工等领域具有广泛的应用价值<sup>[1]</sup>, 近年来其作为一种生产乙醇和化学试剂的可再生海洋生物质引起了关注<sup>[2]</sup>。

目前降解海藻酸的方法主要是在高温高压下使用强酸或强碱水解, 但存在效率低、耗能高和污染环境等缺点<sup>[3]</sup>, 一定程度上限制了海藻酸产业的发展, 而利用海藻酸裂解酶对海藻酸进行降解具有反应条件温和可控、偏好性高且降解效率高的优点<sup>[4]</sup>。海藻酸裂解酶可由海藻酸分解菌和一些海洋动植物产生<sup>[5-11]</sup>, 通过  $\beta$ -消除反应将海藻酸降解为一系类不饱和的海藻酸寡糖, 按其降解方式分为内切型海藻酸裂解酶和外切型海藻酸裂解酶, 分布于多糖裂解酶(PL) 5、6、7、14、15、17 和 18 家族中<sup>[12]</sup>。

外切型海藻酸裂解酶在已报道的海藻酸裂解酶中相对较少<sup>[13]</sup>, 它可将海藻酸或海藻酸寡糖降解为单糖, 在利用海藻酸为原料生产生物乙醇时, 多糖降解是海洋生物质转化利用的前提条件<sup>[2]</sup>。在细菌细胞内, 单糖首先通过非酶促作用进行转化, 从而进入 KDPG (2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸)途径被细菌利用<sup>[14]</sup>, 单糖的产生是海藻酸完全降解的标志。通过搜索 NCBI PubMed 中的文献, 自从在 *Sphingomonas* sp. A1 中首次发现外切型海藻酸裂解酶 A1-IV 后<sup>[15]</sup>, 陆续在 15 种细菌中发现了 18 种外切型海藻酸裂解酶, 这些酶分别属于 PL17<sup>[13,15-20]</sup>、PL15<sup>[21-22]</sup>、PL6<sup>[23-24]</sup>和 PL7 家族<sup>[25-26]</sup>。

尽管已经表征了许多海藻酸裂解酶, 但海藻酸分解菌往往拥有复杂多样的海藻酸裂解酶组分系统, 其高效降解海藻酸的机制还不完全清楚, 且目前商业化海藻酸裂解酶制剂的活性仍有较大的提升空间。因此, 关于新菌株和酶的研究仍在持续进行<sup>[27-28]</sup>。此外, 在线数据库, 像碳水化合物活性酶数据库(CAZy)中有大量没有被完全表征或来源未知的海藻酸裂解酶序列, 表明还有大量的海藻酸裂解酶需要表征并阐明其特性, 因此通过基因工程手

段实现海藻酸裂解酶基因在大肠杆菌、酵母等工程菌的异源表达, 研究新型海藻酸裂解酶的酶学特性和降解特征等, 为寻找具有应用价值的海藻酸裂解酶奠定基础。本文克隆和异源表达了来自厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 的海藻酸裂解酶基因 *SHA-4*, 对重组酶 *SHA-4* 的酶学性质及降解产物进行了研究, 表明该酶将是扩展海藻酸裂解酶应用的潜在候选者。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 (本实验室筛选保存); *Escherichia coli* JM109 购自 TaKaRa 公司; *Escherichia coli* BL21 购自北京转基因生物技术有限公司。载体 pMD19-T 和 pGEX-4T-1 购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

DNA、Protein marker 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶、DNA 聚合酶购自全式金及北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 所有试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司; IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside)、GST 琼脂糖凝胶亲和层析柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 海藻酸单糖购自青岛博智汇力生物科技有限公司; 海藻酸钠购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; PolyM 和 PolyG 均为本实验室自制<sup>[29]</sup>; 其余试剂均为国产分析纯。

PCR 仪, Applied Biosystem 公司; 凝胶成像系统, BioSense 公司; 控温摇床, 上海申能博彩生物科技有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 海藻酸裂解酶基因的克隆

根据厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 海藻酸裂解酶 *SHA-4* 的基因序列和原核表达载体 pGEX-4T-1 上的多克隆位点引入酶切位点 *Bam*H I

和 *Not* I, 设计 *SHA-4* 的 PCR 扩增引物。引物 *SHA-4-F*: 5'-GGATCCATGAAAAGCGCAATCAAC TATCTCA-3'; 引物 *SHA-4-R*: 5'-GCGGCCGCTTATT GATTAACATGTGTCAAATTTTCG-3'。以传统法提取厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 的基因组 DNA<sup>[30]</sup>, 作为模板 PCR 扩增海藻酸裂解酶 *SHA-4* 的基因片段。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 10 $\times$ EasyTaq buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 引物 *SHA-4-F* 和 *SHA-4-R* (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu$ L, 基因组 DNA 2  $\mu$ L, EasyTaq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。使用 ClustalW 软件在海藻酸裂解酶 *SHA-4* 和其它家族已表征的外切型海藻酸裂解酶之间进行多序列比对。系统进化树由 MEGA 7.0 通过邻接法构建, 通过 Bootstrap 进行各分支的置信度检测, 自展检测为 1 000 个重复。

#### 1.2.2 克隆和表达载体的构建

使用 TA 克隆方法, *SHA-4* PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收纯化后与 pMD19-T 连接, 并热击转化至大肠杆菌 JM109 中。克隆得到的序列经测序验证后, 对重组质粒 pMD19-T-*SHA-4* 进行 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切并与相同酶切处理的 pGEX-4T-1 载体连接, 转化至大肠杆菌 BL21 后筛选阳性转化子测序, 同时进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的转化子命名为 pGEX-4T-1-*SHA-4*。

#### 1.2.3 重组蛋白的诱导表达及条件优化

转化成功的阳性克隆子于 LB 液体培养基(含 Amp 终浓度为 100 mg/L)中 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养过夜, 按 2%接种至 50 mL LB 液体培养基(含 Amp 终浓度为 100 mg/L)中 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养至  $OD_{600}$  达到 0.4–0.5, 对诱导条件进行优化, 考察不同的诱导时间(0–24 h)、IPTG 浓度(0.1–1.0 mmol/L)和诱导温度(16–37  $^{\circ}$ C)对蛋白表达量及可溶性的影响, 并通过 12% SDS-PAGE 检测确定最佳的诱导条件。

#### 1.2.4 重组蛋白的纯化及活性测定

用直径为 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤超声波破碎

细胞的上清液,将此样品加入到预先平衡好的层析柱中,采用 GST 琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化目的蛋白<sup>[31]</sup>,纯化后进行 12% SDS-PAGE 分析并测定纯化效率。

酶活性的测定方法参照 Yoon 等的方法并在此基础上对缓冲液和底物稍作修改<sup>[32]</sup>,改为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)和 0.3%海藻酸钠。考马斯亮蓝法测定重组酶的蛋白质含量。

### 1.2.5 重组蛋白的酶学性质研究

(1) 反应最适 pH 和 pH 稳定性:在不同 pH 的缓冲体系(pH 5.0–8.0 磷酸盐缓冲液, pH 8.0–9.0 Tris-HCl)中以 0.3%海藻酸钠为底物测定酶的最适反应 pH,反应时间为 10 min,将处于最适 pH 下的酶活力定义为 100%。将酶液分别在不同 pH 缓冲液中保温 30 min 后在最适温度下反应 10 min,测定酶的剩余活力,将剩余活力最高的 pH 下的酶活力设为 100%。

(2) 反应最适温度和热稳定性:以 0.3%海藻酸钠为底物,在最适 pH 条件下测定酶的最适反应温度,反应时间为 10 min,将处于最适温度下的酶活力定义为 100%。酶液分别在不同温度下保温 30 min 后在最适温度下反应 10 min,测定酶的剩余活力,将剩余活力最高的温度下的酶活力设为 100%。

(3) 金属离子对酶活性的影响:在酶反应体系中分别加入 0.5 mmol/L 不同金属离子化合物,以加入相同体积的水作为对照组,测定其酶活力,将对照组的酶活力定义为 100%。

(4) 底物偏好性检测:在最适 pH 缓冲体系中分别以海藻酸钠、PolyG 和 PolyM 为底物测定酶活力,反应时间为 10 min,反应温度为最适温度,将此条件下以海藻酸钠为底物的酶活力定义为 100%。

### 1.2.6 动力学分析

为了测量 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中重组海藻酸裂解酶 SHA-4 的动力学参数,在试管中加入 0.1 mL 酶溶液和 0.9 mL 不同浓度的海藻酸钠,总体积为 1.0 mL,混合物在最佳温度下反应 30 min,测定反应前后的 $A_{235}$ 值。根据双倒数作图法(Lineweaver-

Burk),以  $1/V$  为纵坐标,  $1/[S]$  为横坐标作图,通过横截距和纵截距求出米氏常数  $K_m$  和  $V_{max}$ <sup>[16]</sup>。

### 1.2.7 薄层层析(TLC)分析

采用 TLC 法分析重组酶降解海藻酸的产物。将 100 U 的纯酶 SHA-4 加入 500  $\mu$ L 含有 0.3%的海藻酸钠缓冲液中,混匀后于 37  $^{\circ}$ C、pH 7.0 的条件下反应,对不同时间的降解产物进行分析;采用 Silica Gel 60 F<sub>254</sub> 硅胶板,上样量为 2  $\mu$ L;点样完成后将硅胶板放入层析缸中,展开溶剂为正丁醇:醋酸:水(3:2:2, 体积比);待展开完成后,取出硅胶板吹干,在硅胶板表面喷洒显色剂(1 mL 37.5% HCl, 2 mL 苯胺, 10 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mL 乙酸乙酯和 2 g 二苯胺)后放入 120  $^{\circ}$ C 烘箱加热显色,拍照保存<sup>[33]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 海藻酸裂解酶基因 *SHA-4* 的扩增与序列分析

以厌氧海藻酸分解菌 *Sunxiuqinia* sp. SH-52 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得海藻酸裂解酶基因 *SHA-4* (图 1),片段大小为 2.2 kb 左右,与预期的 2 238 bp 相符。海藻酸裂解酶 SHA-4 的核苷酸序列在 GenBank 上的登录号是 MH013392。使用 MEGA 7.0 对 *SHA-4* 与其它家族已表征的外切型海藻酸裂解酶基于氨基酸序列同源性构建系统进化树(图 2)。明显看到 *SHA-4* 与 PL6 家族的其它 3 种外切型海藻酸裂解酶形成一个深度支化的簇,因此该酶属于 PL6 家族。进行氨基酸序列比对发现在

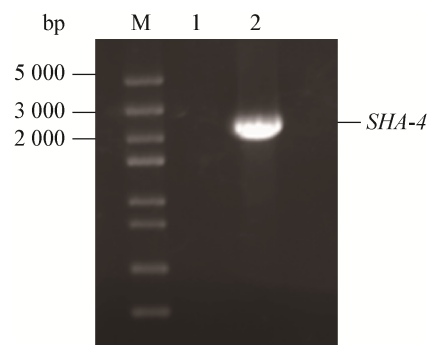


图 1 *SHA-4* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 PCR amplification products of gene *SHA-4*

注: M: DNA marker; 2: 扩增产物。

Note: M: DNA marker; 2: Amplification products.

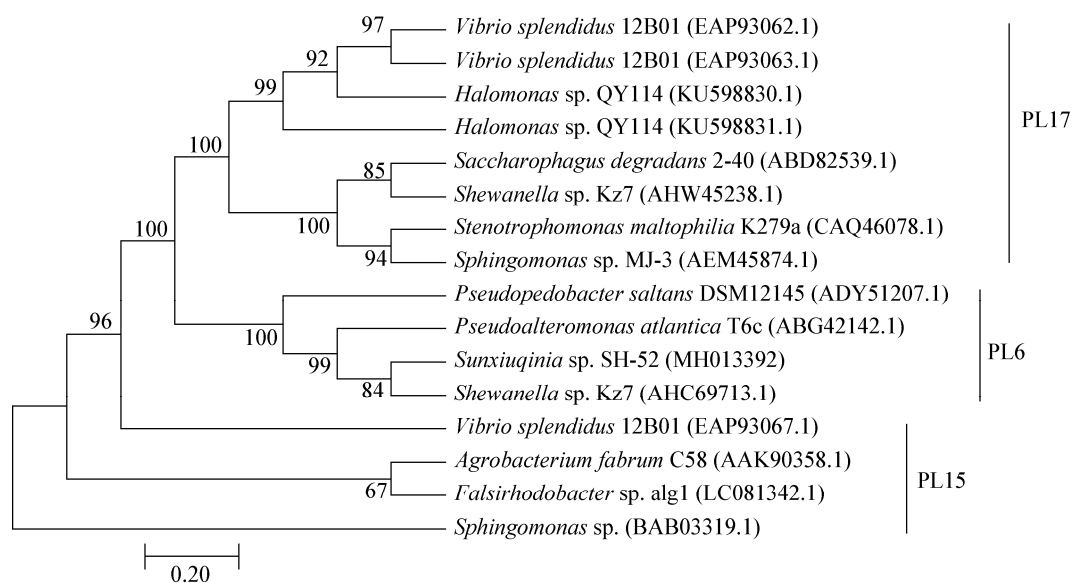


图 2 海藻酸裂解酶 SHA-4 的系统进化树

Figure 2 The phylogenetic tree of alginate lyase SHA-4

注: Bootstrap 是从 1 000 个重复中获得的置信度值(以百分比表示); 每个分支的右侧是海藻酸分解菌的种类和在 GenBank 上的登录号; 标尺表示 20% 的序列差异。

Note: Bootstraps are the confidence values (expressed as percentages) obtained from 1 000 replications; The right of each branch is the species of alginolytic bacteria and the accession number on GenBank; The scale indicates approximately 20% sequence difference.

已经表征的海藻酸裂解酶中, SHA-4 与 PL6 家族的海藻酸裂解酶 OalS6 有着最高的相似性, 为 45.34%。

## 2.2 重组酶表达载体的构建和异源表达

对测序完全正确的表达转化子进行双酶切验证, 分别获得 4.9 kb 和 2.3 kb 的两条条带(图 3), 此两条条带的大小和质粒及目的片段大小一致, 结果表明重组表达质粒 pGEX-4T-1-SHA-4 构建成功。SDS-PAGE 检测结果显示, 与经 IPTG 诱导和未诱导的含空载体 pGEX-4T-1 的大肠杆菌细菌总蛋白以及未经诱导的含重组载体 pGEX-4T-1-SHA-4 的大肠杆菌总蛋白相比, 经 IPTG 诱导后在 102 kD (GST 融合标签)左右出现新生条带, 这与预期的海藻酸裂解酶 SHA-4 的理论值相符。此外, 检测到破碎后的上清液及纯化的融合蛋白均具有海藻酸裂解酶活性, 因此确定海藻酸裂解酶 SHA-4 成功诱导表达(图 4)。对该酶进行诱导条件优化后表明该重组

酶的最佳 IPTG 浓度、最佳温度和最佳时间分别为 0.1 mmol/L、28 °C 和 6 h, 纯化后 SHA-4 的比活力达到 21 U/mg, 纯化倍数为 3.6 (表 1)。

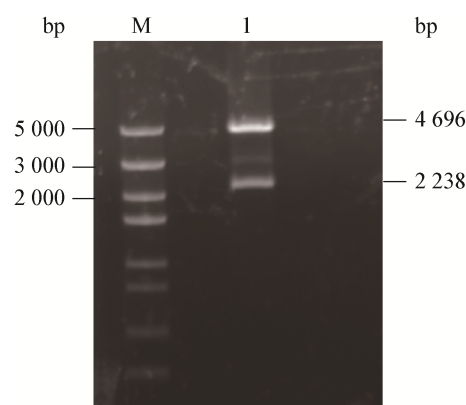


图 3 重组海藻酸裂解酶表达载体的限制性内切酶分析  
Figure 3 The restriction endonuclease analysis of the recombinant alginate lyase expression vector



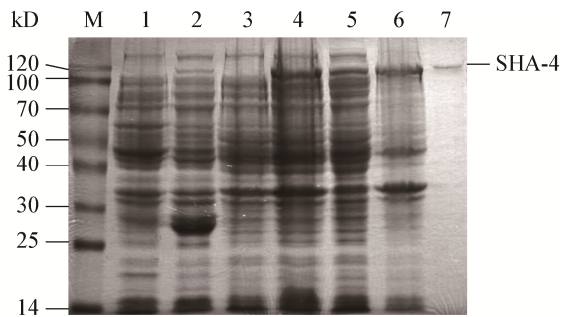


图4 SDS-PAGE检测重组酶SHA-4的表达和纯化

Figure 4 Detection of recombinase SHA-4 expression and purification by SDS-PAGE

注: M: 蛋白Marker; 1: 含 pGEX-4T-1 质粒的 BL21 未经 IPTG 诱导 10 h 的细菌总蛋白; 2: 含 pGEX-4T-1 质粒的 BL21 经 IPTG 诱导 10 h 的细菌总蛋白; 3: 含 pGEX-4T-1-SHA-4 质粒的 BL21 未经 IPTG 诱导 10 h 的细菌总蛋白; 4: 含 pGEX-4T-1-SHA-4 质粒的 BL21 经 IPTG 诱导 10 h 的细菌总蛋白; 5: 含 pGEX-4T-1-SHA-4 质粒的 BL21 经 IPTG 诱导的细菌总蛋白经超声破碎后的上清; 6: 含 pGEX-4T-1-SHA-4 质粒的 BL21 经 IPTG 诱导的细菌总蛋白经超声破碎后的沉淀; 7: 纯化的重组酶 SHA-4.

Note: M: Protein marker; 1: Total bacterial protein of BL21 containing pGEX-4T-1 plasmid without induction of IPTG for 10 h; 2: Total bacterial protein of BL21 containing pGEX-4T-1 plasmid induced by IPTG for 10 h; 3: Total bacterial protein of BL21 containing pGEX-4T-SHA-4 plasmid without induction of IPTG for 10 h; 4: Total bacterial protein of BL21 containing pGEX-4T-SHA-4 plasmid induced by IPTG for 10 h; 5: The supernatant after sonication with IPTG induced total protein of BL21 containing pGEX-4T-1-SHA-4 plasmid; 6: The precipitation after sonication with IPTG induced total protein of BL21 containing pGEX-4T-1-SHA-4 plasmid; 7: The purified recombinant enzyme SHA-4.

表1 海藻酸裂解酶 SHA-4 的纯化结果

Table 1 Purification of alginate lyase SHA-4

Step (SHA-4)	Cell extract	GST Purification
Total protein (mg)	351.7	63.2
Total activity (U)	2 061.0	1 327.2
Specific activity (U/mg)	5.9	21.0
Yield (%)	100.0	64.3
Purification (fold)	1.0	3.6

## 2.3 重组酶的酶学性质

### 2.3.1 重组酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

重组酶的活性和稳定性与 pH 值的关系曲线如图 5 所示。重组酶 SHA-4 的最适反应 pH 为 7.5, 中性条件下具有较高活性; 该酶在 pH 7.0 时稳定性

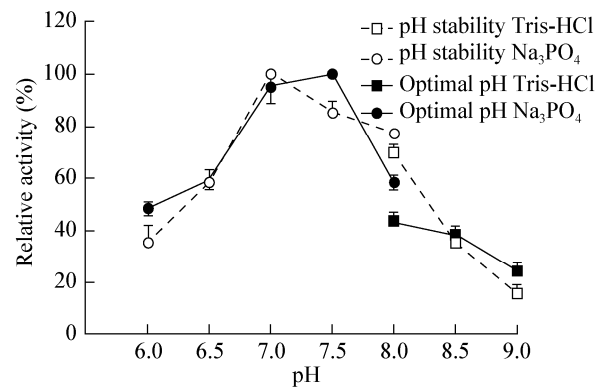


图5 重组酶的最适 pH 和 pH 稳定性分析

Figure 5 Optimal pH and pH stability of the recombinant alginate lyase

最高, 中性及弱碱性 pH 7.0–8.0 条件下酶的稳定性较高, 能保持 60% 以上的酶活力, 表明酶 SHA-4 是中性偏弱碱性酶。

### 2.3.2 重组酶的最适反应温度和热稳定性

重组酶的活性和稳定性与温度的关系曲线如图 6 所示。重组酶 SHA-4 的最适温度为 37 °C, 在 36–40 °C 范围内酶活性较高, 当温度升高到 45 °C 时, 酶活力迅速下降, 仅为峰值的 67%; 探究热稳定性可知, 该酶在 35 °C 保温 30 min 后剩余酶活力为 89%, 在 37 °C 保温 30 min 剩余酶活力为 80%, 在 40 °C 保温 30 min 后酶活力丧失了 54%, 在 55 °C 保温 30 min 后剩余的酶活力为 19%, 由此可知该酶在高于 40 °C 时热稳定性较差。

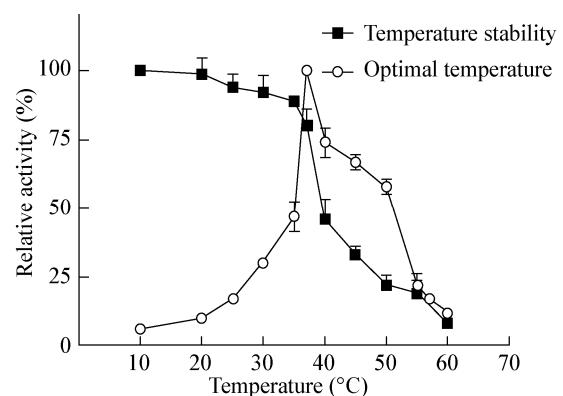


图6 重组酶的最适温度和热稳定性分析

Figure 6 Optimal temperature and temperature stability of the recombinant alginate lyase

### 2.3.3 金属离子对重组酶活性的影响

金属离子对重组酶活性的影响结果如图 7 所示, 对于重组酶 SHA-4 而言,  $Hg^{2+}$  对酶活具有完全抑制作用,  $Na^+$  对酶活具有明显抑制作用,  $Mg^{2+}$  对酶活基本无影响, 而  $Cu^{2+}$  对酶活具有明显的促进作用, 使其活性提高了 168%。

### 2.3.4 重组酶的底物偏好性

重组酶 SHA-4 的底物偏好性结果如图 8 所示, SHA-4 对 3 种底物均可降解, 但对海藻酸钠的酶活性明显高于 PolyG 和 PolyM, 因此重组酶 SHA-4 对海藻酸钠具有底物偏好性。

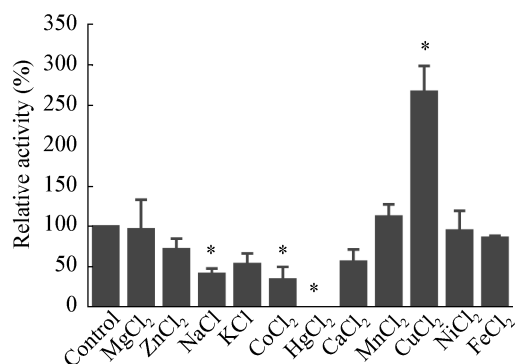


图 7 金属离子对重组酶活性的影响

Figure 7 Effects of metal ions on the activity of the recombinant alginate lyase

注: \*: 与对照组相比具有显著差异性的实验组,  $P < 0.05$ . 数据处理使用 SPSS 22.0 软件的方差分析(One-way ANOVA).

Note: \*: There is a significant difference in the experimental group compared with the control group,  $P < 0.05$ . Data processing (One-way ANOVA) using SPSS 22.0 software.

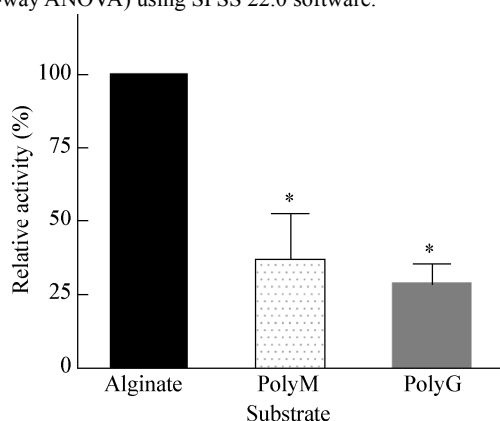


图 8 重组酶 SHA-4 的底物偏好性

Figure 8 Substrate preference of recombinase SHA-4

注: \*: 具有显著差异性,  $P < 0.05$ . 数据处理使用 SPSS 22.0 软件的方差分析(One-way ANOVA).

Note: \*: There is a significant difference,  $P < 0.05$ . Data processing One-way ANOVA using SPSS 22.0 software.

### 2.4 重组酶的催化动力学

使用 Lineweaver-Burk 的双倒数图计算  $K_m$  和  $V_{max}$  值, 重组酶 SHA-4 的最大反应速度  $V_{max}$  为  $8.7 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ , 米氏常数  $K_m$  为  $2.5 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

### 2.5 重组酶的降解产物分析

如图 9 所示, 不同时间的降解产物均为单个斑点, 而且和海藻酸单糖标品所处位置相同, 表明该酶是一种外切型海藻酸裂解酶, 在降解海藻酸的过程中仅产生海藻酸单糖, 而不产生其它低聚糖产物。

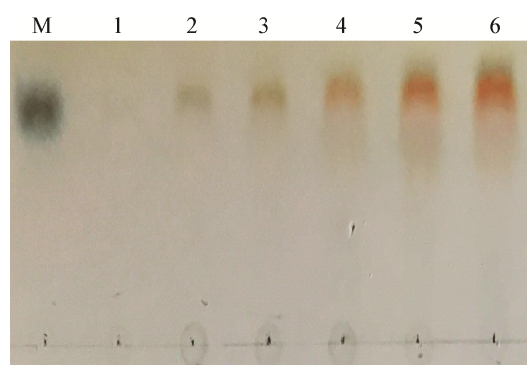


图 9 TLC 分析 SHA-4 降解海藻酸的产物

Figure 9 TLC analysis the alginate degraded products by SHA-4

注: M: 海藻酸单糖; 1: 0 min; 2: 10 min; 3: 30 min; 4: 1 h; 5: 5 h; 6: 12 h.

Note: M: Alginate-monosaccharide; 1: 0 min; 2: 10 min; 3: 30 min; 4: 1 h; 5: 5 h; 6: 12 h.

## 3 讨论与结论

本实验室前期筛选分离到一株厌氧海藻酸分解菌, 并将其命名为 *Sunxiuqinia* sp. SH-52. 系统进化分析发现与该菌株亲缘关系最近的是 *Sunxiuqinia elliptica* DQHS-4<sup>T</sup>, 但两菌株 16S rRNA 基因序列的相似度只有 93%, 并且在细胞形态、需氧性和底物利用等方面具有显著的差异, 因此该菌株可能是一株新型海藻酸分解菌。与好氧菌相比, 厌氧微生物可以直接发酵底物生成乙醇, 并且具有利用单位底物生成的 ATP 较好氧菌少、底物的转化效率高优点, 因此厌氧海藻酸分解菌更有利于海藻生物质生产生物能源<sup>[34]</sup>。

SHA-4 海藻酸裂解酶属于 PL6 家族, 进行氨基

酸相似性分析表明 SHA-4 与其它已知的海藻酸裂解酶序列相似性较低, NCBI 在线分析蛋白质保守结构域发现, 在 N 端包含一个 Chondroitinase B 结构域, 因此在结构上 SHA-4 不同于其它已知的海藻酸裂解酶。值得注意的是, 尽管 PL6 家族的其它海藻酸裂解酶也含有 Chondroitinase B 结构域, 它们却是内切型海藻酸裂解酶<sup>[35-36]</sup>。

利用紫外法测得重组酶 SHA-4 的比活力达到 21.0 U/mg。对该酶降解海藻酸的产物进行分析表明 SHA-4 是外切型海藻酸裂解酶。目前异源表达的外切型海藻酸裂解酶中, 酶的比活力最大的是来自 *Halomonas* sp. 的 OalY2, 为 36.2 U/mg<sup>[13]</sup>, Hirayama 等对来自 *Agrobacterium tumefaciens* 的 Atu3025、*Sphingomonas* sp. A1 的 A1-IV 和 *Saccharophagus degradans* 2-40 的 Alg17C 分别进行异源表达, 纯化这 3 种海藻酸裂解酶后在相同条件下进行酶活测定, 结果表明 A1-IV 的比活力最高, 为 13.5±1.4 U/mg, 而 Alg17C 最低, 为 2.3±0.5 U/mg<sup>[37]</sup>, 相较而言本研究得到了一种酶活性较高的外切型海藻酸裂解酶 SHA-4。

对海藻酸裂解酶 SHA-4 的酶学性质进行研究表明, 该酶的最适温度和 pH 分别为 37 °C 和 7.5, 与来自 *Vibrio splendidus* 的 OalC 类似, 是一种反应条件较为温和的酶<sup>[18]</sup>。金属离子对 SHA-4 的酶活影响表明, Cu<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>具有促进作用, 而 Na<sup>+</sup>等盐离子却具有抑制作用。这一特性与已报道的一些酶不同, 大多海藻酸裂解酶在一定浓度盐离子存在时活性都会增加, 例如同样来自 PL6 家族的 OalS6 和来自 *Azotobacter chroococcum* 的海藻酸裂解酶在不同浓度 Na<sup>+</sup>处理下活性有明显的增加<sup>[23,38]</sup>, 而来自海洋细菌 *Halomonas* sp. 的海藻酸裂解酶 OalY1 和 OalY2 在缺少 Na<sup>+</sup>时, 酶活性很低, 当浓度达到 0.5 mol/L 时酶活达到最高, 其中 OalY1 的活性提高了约 30 倍<sup>[13]</sup>。研究 SHA-4 的底物偏好性发现该酶对海藻酸的底物偏好性大于 PolyM 和 PolyG。海藻酸多糖是由 4 种二元组 M-M、M-G、G-M 和 G-G 组成, 而不同海藻酸裂解酶对 4 种二元组之间糖苷

键的剪切能力不同, 因此导致对 PolyG、PolyM 和海藻酸的偏好性不同, 例如来自 *Haliotis tuberculata* 的内切型海藻酸裂解酶偏好性剪切 M-M 和 G-M<sup>[29]</sup>, 而来自 *Chlorostoma rustica* 的海藻酸裂解酶偏好性剪切 G-G<sup>[39]</sup>。由于天然海藻酸中主要存在 G-M 或 M-G 二元组, 因此 SHA-4 是一种偏好性剪切 M-G 或 G-M 的海藻酸裂解酶。有学者对来自 PL6 家族的海藻酸裂解酶的底物偏好性进行了研究, 该家族的海藻酸裂解酶对 PolyMG 或和 PolyG 具有底物偏好性, 其中已表征的外切型海藻酸裂解酶都仅偏好性降解 PolyG<sup>[23-24]</sup>, 而本研究表征的外切型海藻酸裂解酶则对 PolyMG 具有偏好性。

本研究获得的重组酶 SHA-4 属于 PL6 家族, 是该家族发现的第一个偏好性降解 PolyMG 的外切型海藻酸裂解酶, 作为工具酶有很好的应用前景, 可应用于制备海洋药物、保健食品、化工原料和食品添加剂。在海藻酸裂解酶的不断深入研究中, 本研究有助于重组酶的规模化生产和海藻酸降解机理等相关功能的研究。

## REFERENCES

- [1] Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3279-3305
- [2] Enquist-Newman M, Faust AME, Bravo DD, et al. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform[J]. *Nature*, 2014, 505(7482): 239-243
- [3] Qin GK, Zhang YZ, Chen XL, et al. Research advances on alginate lyases[J]. *China Biotechnology*, 2004, 24(2): 26-29,33 (in Chinese)  
秦国奎, 张玉忠, 陈秀兰, 等. 海藻酸盐裂解酶研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(2): 26-29,33
- [4] Zhu BW, Yin H. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications[J]. *Bioengineered*, 2015, 6(3): 125-131
- [5] Sawant SS, Salunke BK, Kim BS. A rapid, sensitive, simple plate assay for detection of microbial alginate lyase activity[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 77: 8-13
- [6] Ertesvåg H, Erlén F, Skjåk-Braek G, et al. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15): 3779-3784
- [7] Shimizu E, Ojima T, Nishita K. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(24): 2841-2852



- [8] Wakabayashi M, Sakatoku A, Noda F, et al. Isolation and characterization of *Microbulbifer* species 6532A degrading seaweed thalli to single cell detritus particles[J]. *Biodegradation*, 2012, 23(1): 93-105
- [9] Sim SJ, Baik KS, Park SC, et al. Characterization of alginate lyase gene using a metagenomic library constructed from the gut microflora of abalone[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(4): 585-593
- [10] An QD, Zhang GL, Wu HT, et al. Properties of an alginate-degrading *Flavobacterium* sp. strain LXA isolated from rotting algae from coastal China[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54(4): 314-320
- [11] Kobayashi T, Uchimura K, Miyazaki M, et al. A new high-alkaline alginate lyase from a deep-sea bacterium *Agarivorans* sp.[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(1): 121-129
- [12] Xu QQ, Zhu YX, Wang KP, et al. Cloning and identification of alginate lyases genes from *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749[J]. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2013, 39(1): 29-34,41 (in Chinese)  
胥晴晴, 朱云霞, 王克平, 等. 解藻酸弧菌株 ATCC 17749 中海藻酸裂解酶基因的克隆与鉴定[J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2013, 39(1): 29-34,41
- [13] Yang XM, Li SY, Wu Y, et al. Cloning and characterization of two thermo- and salt-tolerant oligoalginate lyases from marine bacterium *Halomonas* sp.[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(9): ffw079
- [14] Gacesa P, Leaves GS, Weightman AJ. Genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* alginate lyase by transposon Tn10 mutagenesis[J]. *Hydrobiologia*, 1987, 151-152(1): 571-575
- [15] Hashimoto W, Miyake O, Ochiai A, et al. Molecular identification of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyase (A1-IV') as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate lyase evolution[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(1): 48-54
- [16] Kim HT, Chung JH, Wang DM, et al. Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2-40[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 2233-2239
- [17] Ryu M, Lee EY. Saccharification of alginate by using exolytic oligoalginate lyase from marine bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2011, 17(5/6): 853-858
- [18] Jagtap SS, Hehemann JH, Polz MF, et al. Comparative biochemical characterization of three exolytic oligoalginate lyases from *Vibrio splendidus* reveals complementary substrate scope, temperature, and pH adaptations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4207-4214
- [19] Shin JW, Lee OK, Park HH, et al. Molecular characterization of a novel oligoalginate lyase consisting of AlgL- and heparinase II/III-like domains from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 and its application to alginate saccharification[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2015, 32(5): 917-924
- [20] Wang LN, Li SY, Yu WG, et al. Cloning, overexpression and characterization of a new oligoalginate lyase from a marine bacterium, *Shewanella* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(3): 665-671
- [21] Ochiai A, Yamasaki M, Mikami B, et al. Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(32): 24519-24528
- [22] Mori T, Takahashi M, Tanaka R, et al. *Falsirhodobacter* sp. alg1 harbors single homologs of endo and exo-type alginate lyases efficient for alginate depolymerization[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155537
- [23] Li SY, Wang LN, Han F, et al. Cloning and characterization of the first polysaccharide lyase family 6 oligoalginate lyase from marine *Shewanella* sp. Kz7[J]. *Journal of Biochemistry*, 2016, 159(1): 77-86
- [24] Mathieu S, Henrissat B, Labre F, et al. Functional exploration of the polysaccharide lyase family PL6[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159415
- [25] Yagi H, Fujise A, Itabashi N, et al. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Cobetia* sp. NAPI isolated from brown algae[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(12): 2338-2346
- [26] Lundqvist L. Structural and interaction studies of polysaccharides by NMR spectroscopy[D]. Uppsala: Doctoral Dissertation of Swedish University of Agricultural Sciences, 2015
- [27] Xu F, Dong F, Wang P, et al. Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase family 6[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(11): 4457-4468
- [28] Zhu BW, Sun YD, Ni FQ, et al. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. W13[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 75: 330-337
- [29] Heyraud A, Colin-Morel P, Girond S, et al. HPLC analysis of saturated or unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates. application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase[J]. *Carbohydrate Research*, 1996, 291: 115-126
- [30] Shen DX, Feng ZC, Du J. The comparison of bacterial DNA extraction methods[J]. *Central Plains Medical Journal*, 2004, 31(10): 20-22 (in Chinese)  
沈德新, 封志纯, 杜江. 细菌 DNA 提取方法比较[J]. *中原医刊*, 2004, 31(10): 20-22
- [31] Ameirika, Sha HX, Hwang JS. Identification of a target protein of *Hydra* actinoporin-like toxin-1 (HALT-1) using GST affinity purification and SILAC-based quantitative proteomics[J]. *Toxicon*, 2017, 133: 153-161
- [32] Yoon HJ, Hashimoto W, Miyake O, et al. Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases[J]. *Protein Expression and Purification*, 2000, 19(1): 84-90
- [33] Hu T, Li CX, Zhao X, et al. Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 373: 53-58
- [34] Qian L, Tang LW, Huang SS, et al. Research progress of

- bioethanol from alginate fermentation[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(1): 122-127 (in Chinese)  
钱龙, 唐丽薇, 黄庶识, 等. 海藻酸转化生物乙醇研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(1): 122-127
- [35] Lee SI, Choi SH, Lee EY, et al. Molecular cloning, purification, and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomas maltophilia* KJ-2[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(6): 1643-1653
- [36] Maki H, Mori A, Fujiyama K, et al. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9[J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(5): 987-993
- [37] Hirayama M, Hashimoto W, Murata K, et al. Comparative characterization of three bacterial exo-type alginate lyases[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 86: 519-524
- [38] Peciña A, Pascual A, Paneque A. Cloning and Expression of the *algL* Gene, Encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase: purification and characterization of the enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(5): 1409-1414
- [39] Sun LP, Xue CH, Xu JC, et al. Purification and characterization of alginate lyase from *Chlorostoma rustica*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(3): 266-271 (in Chinese)  
孙丽萍, 薛长湖, 许家超, 等. 锈凹螺褐藻裂解酶的分离纯化及性质研究[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(3): 266-271

### 2019 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
22	第十二届中国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	2019年7-9月	400	吉林 长春	欧阳浩淼 010-64807420
23	生物安全与大健康产业论坛	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	9月	100	北京	贾晓娟 010-64806013
24	2019年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10月11-15日	1000	山东 济南	杨海花, 王旭 010-64807200
25	第14届全国海洋药物年会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	10月	300	山东 青岛	于广利 13953283219
26	第一届全国根际微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学、微生物资源专业委员会	10月	200	山东 泰安	杜秉海 13053867096
27	特殊病原菌检测专题研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	10月	100	海南	沈定霞 13911861076
28	第一届猪瘟国际学术研讨会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	10月	400	北京	朱良全 010-61255325
29	第六届深港澳台重症医学大会暨第三届深圳国际脓毒症论坛	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	11月1-3日	600	广东 深圳	吴明 15814468590
30	第十一届全国微生物资源学术暨国家微生物资源共享服务平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11月	400	广东 深圳	张瑞福, 李盼 010-82105075
31	第十四届全国芽孢杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11-12月	200	福建 福州	黄天培 tianpei Huang@126.com
32	2019年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	7-12月	2000	待定	毛群颖 18810054059
33	亚太医学真菌学会第七届国际大会	中国微生物学会真菌学专业委员会	11月22-24日	300	广东 广州	刘伟 liuw90@sina.com
34	幽门螺杆菌谷氏快速分离培养、鉴定、药敏试验试剂盒应用培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	12月	50	浙江 宁波	洪梅 0574-87035856