



研究报告

深海太平洋火色杆菌琼胶酶 Aga2660 的克隆表达及发酵优化

产竹华 李丽 吴婕 易志伟 陈兴麟 曾润颖*

自然资源部第三海洋研究所海洋生物资源开发利用工程技术创新中心 福建 厦门 361005

摘要:【背景】琼胶寡糖已成为化妆品、食品、医药等领域的研究热点,而生物酶法被认为是制备琼胶寡糖的高效方法。【目的】从深海太平洋火色杆菌(*Flammeovirga pacifica* WPAGA1)筛选获得琼胶酶基因 *aga2660*,对基因 *aga2660* 进行克隆转化,使其在大肠杆菌中进行表达,分析重组酶的性质以及酶解产物。【方法】采用克隆表达和镍柱纯化方法获得 *aga2660* 基因表达的纯化产物;采用薄层层析和离子色谱法分析酶解产物;5 L 发酵罐采用补料阶段指数流加、诱导阶段乳糖连续流加的策略进行产酶发酵条件的优化。【结果】基因 *aga2660* 是具有 GH50 家族典型特征的基因,酶解产物为单一的新琼二糖。最适温度为 30 °C,最适 pH 为 7.0, Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能促进琼胶酶 Aga2660 的酶活。采用发酵优化策略后的酶活达到 11.81 U/mL,比优化前提高了 13.2 倍。【结论】琼胶酶 Aga2660 具有良好的热、酸、碱稳定性,其酶解产物为单一的新琼二糖,这为特定聚合度琼胶寡糖的制备奠定了良好基础。

关键词: 太平洋火色杆菌, 琼胶酶, 新琼二糖, 发酵优化

Cloning, expression and production optimization of an agarase Aga2660 from a deep sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1

CHAN Zhuhua LI Li WU Jie YI Zhiwei CHEN Xinglin ZENG Runying*

Technology Innovation Center for Exploitation of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian 361005, China

Abstract: [Background] Agar-oligosaccharides (AOS) have become a research hotspot in cosmetics, food, medicine and other fields. Biological enzyme method is considered as an efficient method to prepare AOS. [Objective] The agarase gene *aga2660* was obtained from *Flammeovirga pacifica* WPAGA1. The gene *aga2660* was cloned and transformed to be expressed in *Escherichia coli*. The properties of recombinant enzyme and enzymatic hydrolysate were analyzed. [Methods] The pure expression product was obtained by clone expression and nickel column purification. Enzymatic products of the agarase were analyzed by

Foundation items: Xiamen Ocean Research and Development Institute Co-Construction Project (K200302); Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources (2017004); Xiamen Marine and Fishery Development Special Fund Project (19CZP008HJ06)

*Corresponding author: Tel: 86-592-2195323; E-mail: zeng@tio.org.cn

Received: 11-06-2020; Accepted: 23-10-2020; Published online: 26-03-2021

基金项目: 厦门海洋研究开发所共建项目(K200302); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费(2017004); 厦门海洋与渔业发展专项基金(19CZP008HJ06)

*通信作者: Tel: 0592-2195323; E-mail: zeng@tio.org.cn

收稿日期: 2020-06-11; 接受日期: 2020-10-23; 网络首发日期: 2021-03-26

thin-layer chromatography (TLC) and ion chromatography (IC). The optimization of enzyme production conditions was carried out in a 5 L fermentor using the strategies of exponential feeding in the feeding stage and continuous feeding of lactose in the induction stage. **[Results]** The elected gene *aga2660* possessed typical sequence characteristics of glucoside hydrolase family 50 (GH50). The end-product of agar degradation by Aga2660 was neoagarobiose. The optimum temperature and pH of Aga2660 was 30 °C and 7.0, respectively. Meanwhile, Aga2660 showed outstanding temperature and pH stability. Activities of Aga2660 were enhanced by Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} (1 mmol/L). The enzyme activity reached 11.81 U/mL after fermentation optimization strategy, which was 13.2 times higher than that before optimization. **[Conclusion]** The agarase Aga2660 was an agarase of GH50 family and indentified with high agar-degrading activity and excellent stability against acid, alkali and thermo. Its enzymolysis product is neoagarobiose, which lays a good foundation for large-scale preparation of AOS with single polymerization degree.

Keywords: *Flammeovirga pacifica* WPAGA1, agarase, neoagarobiose, fermentation optimization

我国的海藻产量占世界总产量的 50%左右, 主要经济海藻有龙须菜、紫菜、海带、麒麟菜等^[1]。龙须菜是福建省的主要经济海藻, 约占全国产量的 60%, 主要用来喂食水产动物和提取琼胶。与琼胶相比, 琼胶寡糖分子量小、水溶性好, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化、保湿等多种生理活性, 因此在食品、化妆品、医药等领域表现出更大的应用价值^[2]。目前, 琼胶寡糖的主要制备方法包括化学法和酶解法。化学法因成本低而易于产业化, 但工艺条件不易控制、制备的琼胶寡糖分子量不均一旦污染严重; 酶解法工艺条件简单、污染低, 分子量稳定、污染小, 但多数已报道的琼胶酶活力低、稳定性差, 无法满足工业化生产的需求^[3-5]。因此, 挖掘高活性、高稳定性的琼胶酶对于琼胶寡糖的酶解法制备具有重要的意义。

根据裂解琼胶糖苷键的不同, 琼胶酶可分为 α -琼胶酶(E.C.3.2.1.158)和 β -琼胶酶(E.C.3.2.1.81), 目前大部分报道的琼胶酶都属于 β -琼胶酶^[3]。根据琼胶酶氨基酸保守序列的差异, β -琼胶酶分为 GH118、GH50、GH16、GH86 这 4 个家族 (<http://www.cazy.org/>)^[4]; α -琼胶酶属于 GH96 家族, 但报道较少^[5]。研究表明, GH16 和 GH86 家族的 β -琼胶酶产生的低聚糖是新琼四糖和新琼六糖^[6], GH118 家族的 β -琼胶酶能降解琼脂糖, 终产物为新琼八糖与新琼十糖, 而 GH50 家族琼胶酶

的终产物多为单一聚合度的新琼二糖^[7-11], 也有少数非 GH50 家族琼胶酶酶解产物为新琼二糖^[12-13]。

虽然目前已有产单一寡糖琼胶酶的报道, 并进行了琼胶酶基因的克隆表达, 但多数已报道的琼胶酶活力低、稳定性差, 无法满足工业化生产的需求。本实验室分离鉴定的太平洋火色杆菌 (*Flammeovirga pacifica* WPAGA1)^[14]可降解龙须菜产生琼胶寡糖(主要成分为新琼二糖、四糖和六糖), 建立了“一步法”制备琼胶寡糖工艺^[15]。已有研究对该菌株进行了全基因组测序, 分析了菌株的琼胶降解相关基因, 并对琼胶酶基因 *aga4383* 和 *aga0950* 进行了克隆表达和产物分析, 但产物均为四糖和六糖的混合物^[3,16]。为获得产单一聚合度且活性高的琼胶酶, 本文对该菌株的琼胶酶基因进行进一步挖掘, 以期能获得具有工业应用前景的琼胶酶。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *F. pacifica* WPAGA1 保藏号为 MCCC 1A06425。琼胶酶基因 *aga2660* (GenBank 登录号为 KY826424.1), 克隆菌株和表达菌株分别为 *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21, 表达载体为 pET-28a(+).

1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒, 北京百泰克生物技

术有限公司; 琼脂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 新琼寡糖标准品, 青岛博智汇力生物科技有限公司; 胶回收和质粒抽提试剂盒, Omega 公司; BCA 蛋白定量和 Ni 柱亲和层析试剂盒, Thermo 公司。离子色谱仪, Dionex 公司; 全自动凝胶成像分析系统, 上海天能科技有限公司; 紫外分光光度计, Shimadzu 公司; PCR 仪, Thermo 公司; 发酵罐, Sartorius 公司。

1.3 琼胶酶基因 *aga2660* 序列分析

采用 NCBI、CAZy、dbCAN、SignalP 数据库对琼胶酶基因 *aga2660* 的氨基酸序列进行分析^[17], 并使用 MEGA 7.0 软件对其进行系统发育树分析。

1.4 琼胶酶基因 *aga2660* 的克隆

1.4.1 引物的设计

根据 *aga2660* 的基因序列设计引物并由上海 Invitrogen 公司合成, 引物序列为: *aga2660*-F: 5'-GAATGAATTCAGTGGAATTGTGTTTATCGC C-3' (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点); *aga2660*-R: 5'-GATACTCGAGTGTATTCTCACTTTGCCCAATC T-3' (划线部分为 *Xho* I 酶切位点)^[17]。

1.4.2 克隆载体的构建

以菌株 *F. pacifica* WPAGA1 的基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增目的基因片段^[18]。PCR 体系: 基因组 DNA 模板(50–400 ng) 1 μ L, 高保真 DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增的片段克隆连接到 pET-28a(+)载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆子进行测序, 将测序结果进行比对后结果完全吻合的克隆子可进行下一步重组表达质粒的构建。

1.5 琼胶酶基因 *aga2660* 的表达

1.5.1 重组表达载体的构建

将表达载体 pET-28a(+)和阳性克隆子分别用

EcoR I 和 *Xho* I 进行双酶切。将回收目的 DNA 片段与酶切后的表达载体 pET-28a(+)进行 16 $^{\circ}$ C 连接 3 h。连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 通过菌落 PCR 验证, 挑取阳性克隆子的重组质粒采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。将鉴定正确的阳性克隆子进行测序并将正确的克隆子扩大培养并提取质粒, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存^[2]。

1.5.2 重组基因的诱导表达

挑选转化了重组表达质粒的 *E. coli* BL21 以 1% (体积分数)的接种量将重组菌液接种至 50 mL 液体 LB (含 15 μ g/mL 卡那霉素)培养基中, 220 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 2–3 h 至 *OD*₆₀₀ 为 0.6 左右, 加入异丙基硫代半乳糖(IPTG, 终浓度 1 mmol/L)于 16 $^{\circ}$ C 条件下进行诱导表达 12–16 h, 10 000 r/min 离心 10 min 后取沉淀; 将沉淀用 PBS 缓冲液重悬后超声破碎(超声条件: 功率 400 W, 工作 3 s, 间隔 5 s, 总时间 25 min), 再次离心收集上清液。

1.6 重组表达产物的纯化

由于表达载体 pET-28a(+)自带 6 个 N 端融合 His, 因此用 Ni 柱亲和层析试剂盒进行纯化, 纯化步骤按照操作说明进行(所有步骤在 4 $^{\circ}$ C 条件下完成), 按照参考文献[3]方法进行实验。采用 3 种缓冲液, 平衡液: 含 10 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液(pH 7.4); 洗柱液: 含 25 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液(pH 7.4); 洗脱液: 含 250 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液(pH 7.4)。纯化后的蛋白采用 SDS-PAGE 进行分析, 酶液保存于 PBS 缓冲液, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。蛋白含量测定按照参考文献[2]进行。

1.7 琼胶酶活性检测

结合 Gao 等^[19]实验结果, 以新琼四、六糖的混合物为底物, 加入琼胶酶 Aga2660 进行酶解, 酶活力单位按照参考文献[17]进行。以离子色谱法测定新琼二糖的浓度, 检测条件按照参考文献[17]进行。

1.8 重组琼胶酶 Aga2660 表达条件发酵优化

1.8.1 分批发酵

以体积分数 3%将种子液接入发酵罐中进行培养(发酵罐配制 5 L 培养基), 当 *OD*₆₀₀ 达到 0.4–0.6

时, 加入 IPTG (1 mmol/L)进行诱导表达, 诱导时间为 10–12 h。

1.8.2 补料发酵

补料发酵按照表 1 的工艺进行。

2 结果与分析

2.1 基因 aga2660 的序列分析

序列分析发现基因 aga2660 的核酸长度为 2 067 bp, 编码 689 个氨基酸, 预测分子量约为 80 kD。利用基因编码的氨基酸序列和数据库中的已知分类明确的氨基酸序列构建邻近系统发育树, 结果表明 aga2660 编码的β-琼胶酶归属为 GH50 家族。

按照 CAZy 数据库中的分类筛选 GH50 家族的β-琼胶酶, 将 aga2660 编码的氨基酸序列与筛选的序列进行比对后构建系统发育树(图 1)。结果显

示, aga2660 基因编码蛋白的氨基酸序列与来源于 Flammeovirga sp. MY04 琼胶酶氨基酸序列相似性最高, 达到 100%。

2.2 重组酶的表达与纯化

按照基因 aga2660 的序列设计引物, 以 F. pacifica WPAGA1 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增出的片段大小与预期结果相符, 结果如图 2A 所示。采用纯化试剂盒对扩增结果进行回收, 回收片段和原核表达载体 pET-28a(+)用 EcoR I、Xho I 分别进行双酶切, 双酶切产物回收并用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 将连接产物转化至 E. coli DH5α 感受态细胞, 挑选克隆子并提取质粒经酶切鉴定和测序验证, 结果正确, 表明获得表达成功的克隆子。

表 1 补料发酵工艺
Table 1 Feeding fermentation process

序号 Serial No.	阶段 Stage	发酵工艺 Fermentation process	时间 Time (h)
1	分批培养 Batch culture	起始甘油浓度 10 g/L, 培养至溶氧快速上升 The initial glycerol concentration was 10 g/L until the dissolved oxygen increased rapidly	9
2	补料阶段 Feeding stage	流加甘油浓度 500 g/L, 按照指数流加策略进行 Glycerol was fed with a concentration of 500 g/L according to the exponential feeding strategy	10
3	诱导阶段 Induction stage	保持甘油的流加速度 6 g/(L·h), 达到最大 OD ₆₀₀ 时进行诱导 The flow acceleration of glycerol was maintained at 6 g/(L·h), and the induction was carried out until the maximum OD ₆₀₀	12.5–15

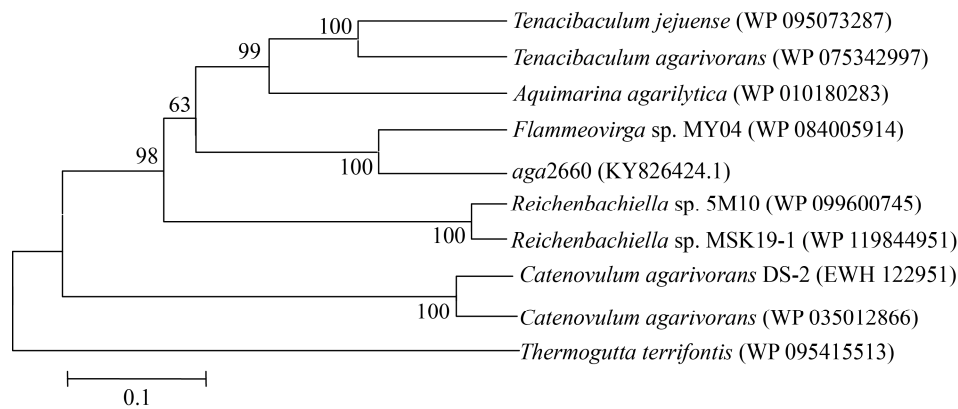


图 1 基因 aga2660 系统进化分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of gene aga2660

注: 步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来

Note: Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points

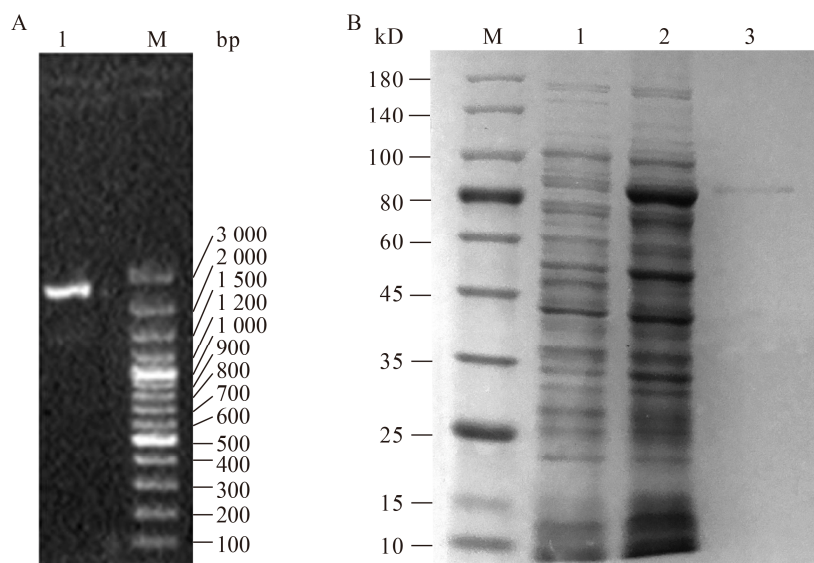


图2 基因 *aga2660* 的 PCR 扩增(A)和琼胶酶 Aga2660 的 SDS-PAGE 检测(B)

Figure 2 Gene *aga2660* amplification (A) and SDS-PAGE analysis of agarase Aga2660 (B)

注: A: M: DNA 分子量标准 Marker; 1: 基因 *aga2660* 扩增结果。B: M: 预染蛋白质标准品; 1: 未加 IPTG 诱导; 2: 加 IPTG 诱导; 3: 纯化的琼胶酶 Aga2660

Note: A: M: DNA Marker, 1: Results of gene *aga2660* amplification. B: M: PageRuler pre-stained protein ladder (kD); 1: Without IPTG induction; 2: IPTG induction; 3: Purified agarase Aga2660

SDS-PAGE (图 2B)结果显示, 与未加 IPTG 的对照组相比, 目的蛋白明显增加(80 kD), 表明重组琼胶酶 Aga2660 在大肠杆菌中实现了高效表达。采用镍柱对重组琼胶酶进行纯化, 当洗脱缓冲液中咪唑浓度为 250 mmol/L 时, 得到一条单一一条带, 与目的蛋白分子量大小相符。经过酶活和蛋白含量的测定, 采用镍柱亲和层析的方法对琼胶酶 Aga2660 的纯化效果好, 纯化后的酶回收率为 87.71%, 酶的比活力达到 3 525 U/mg。

2.3 琼胶酶 Aga2660 酶解产物的分析

如图 3 所示, 薄层层析 (Thin-Layer Chromatography, TLC)检测结果显示, 反应 0.5 h 后, 新琼六糖未检出, 新琼四糖明显减少, 新琼二糖开始累积; 反应 1 h 后, 新琼四糖浓度很低, 新琼二糖浓度增加; 反应 3 h 后, 底物完全被降解, 产物全部为新琼二糖。为了进一步明确酶解产物, 对产物进行了离子色谱分析, 如图 4 所示, 酶解产物与新琼二糖标准品的出峰时间一致, 进一步证明了新琼二糖的产生。

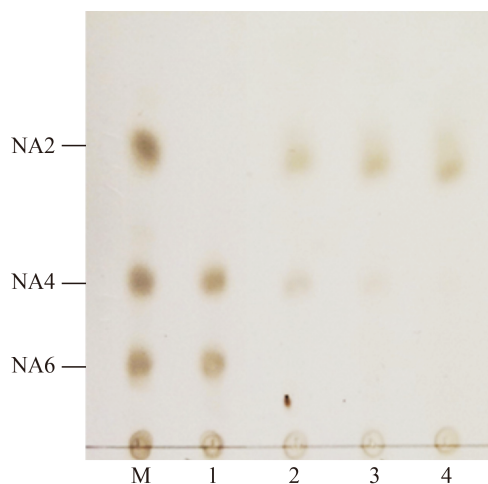


图3 琼胶酶 Aga2660 降解新琼四糖、六糖的产物分析
Figure 3 TLC analysis of hydrolyzed products of neoagarotetraose and neoagarohexaose by agarase Aga2660

注: M: 新琼二糖、新琼四糖和新琼六糖的标准品; 1: 新琼四糖和新琼六糖混合物; 2: 酶解 0.5 h; 3: 酶解 1 h; 4: 酶解 3 h

Note: M: Standards of neoagarobiose, neoagarotetraose and neoagarohexaose; 1: Mixture of neoagarotetraose and neoagarohexaose; 2: Enzymolysis for 0.5 h; 3: Enzymolysis for 1 h; 4: Enzymolysis for 3 h

2.4 琼胶酶 Aga2660 酶学性质分析

琼胶酶 Aga2660 在 20–40 °C 之间表现出较高的相对酶活, 其最适反应温度为 30 °C (图 5A)。在 50–80 °C 范围内仍保留 50% 以上的酶活力, 表明重组琼胶酶 Aga2660 具有良好的耐热性。该酶的

最适 pH 值 7.0, 具有较宽的 pH 适应范围, 在 pH 4.0–8.0 的范围内能保持 80% 以上的酶活, 但 pH 达到 9.0 时, 酶活力迅速下降 (图 5B)。热稳定性结果表明 (图 5C), 分别在 30 °C 和 40 °C 下保温 24 h, 仍能保持 90% 以上的酶活力, 这表明琼胶酶

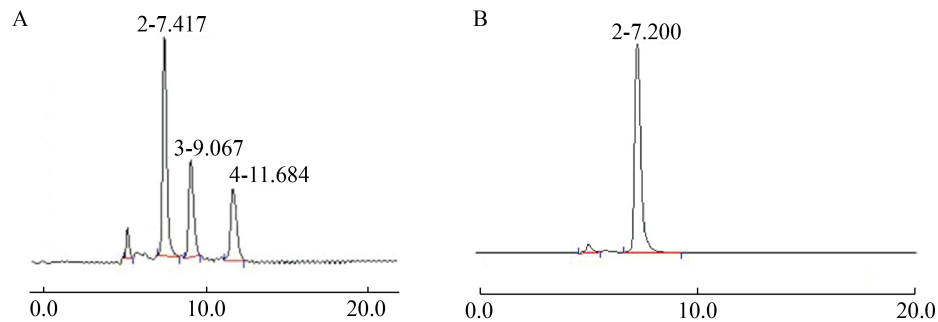


图 4 琼胶酶 Aga2660 降解产物的离子色谱法分析

Figure 4 Ion chromatography analysis of hydrolyzed products by agarase Aga2660

注: A: 新琼寡糖标准品; B: 琼胶酶 Aga2660 酶解产物。2: 新琼二糖; 3: 新琼四糖; 4: 新琼六糖

Note: A: Standards of neoagarooligosaccharides; B: Enzymolysis products of agarase Aga2660. 2: Neoagarobiose; 3: Neoagarotetraose; 4: Neoagarohexaose

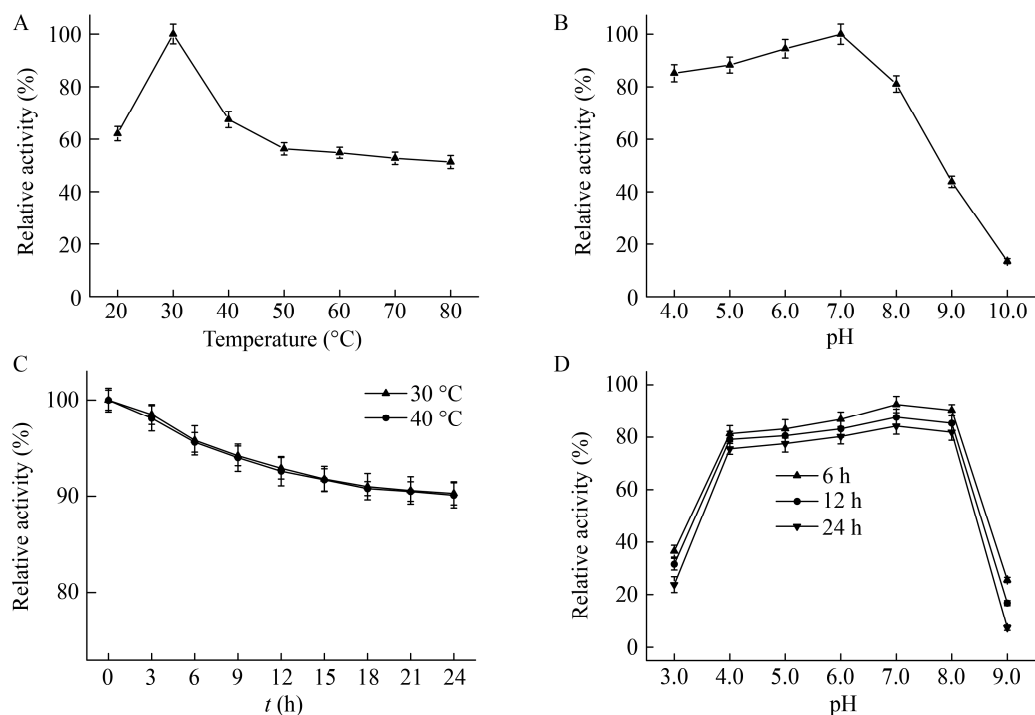


图 5 温度和 pH 对琼胶酶 Aga2660 的影响

Figure 5 Effects of temperature and pH on enzyme activity of agarase Aga2660

注: A: 温度对酶活力的影响; B: pH 对酶活力的影响; C: 琼胶酶 Aga2660 的热稳定性; D: 琼胶酶 Aga2660 的 pH 稳定性

Note: A: Effect of temperature on enzyme activity; B: Effect of pH on enzyme activity; C: Thermal stability of agarase Aga2660; D: pH stability of agarase Aga2660

Aga2660 具有较好的热稳定性。pH 稳定性实验结果显示(图 5D), 该酶在 pH 4.0–8.0 的缓冲液中进行保温 24 h 后其残余活力在 80%以上(30 °C), 表明该酶在酸性和中性环境中具有良好的稳定性, 具有较好的应用前景。

金属离子对琼胶酶 Aga2660 的酶活有不同的影响, 如表 2 所示, 1 mmol/L 的 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 均能提高酶活力, 特别是 Mn^{2+} 能将其活力提高 36.19%; 1 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 明显抑制酶活; 1 mmol/L 的 Na^{+} 、 K^{+} 离子对酶活基本无影响。

2.5 琼胶酶 Aga2660 表达条件的优化

2.5.1 不同比生长速率对细胞生长和琼胶酶 Aga2660 的影响

采用分批发酵进行琼胶酶 Aga2660 的表达, 培养至 OD_{600} 为 0.5 左右时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达 12 h, 将菌体离心破碎后收集上清测定酶活, 酶活力仅为 0.83 U/mL, 而菌体 OD_{600} 也仅为 2.13。为提高菌体浓度和蛋白表达量, 应优化发酵策略, 同时较高浓度的乙酸(>2 g/L)会抑制菌体生长和蛋白表达, 因此应避免

乙酸的过量积累。通过实验条件的摸索, 选择了不同的比生长速率($\mu=0.2$ 、0.4 和 $0.6\ h^{-1}$)的流加策略进行优化(表 3, 图 6), 比较比生长速率对 β -琼胶酶表达和细胞生长的影响(IPTG 浓度为 1 mmol/L, 温度为 25 °C)。当比生长速率 μ 为 $0.6\ h^{-1}$ 时, 诱导开始前菌体干重(Dry Cell Weight, DCW)达到 35.33 g/L。此时开始进入诱导前期, 菌体生长受到严重抑制, 诱导结束后的 DCW 仅为 31.71 g/L, 而酶活仅达到 2.32 U/mL。当补料阶段的比生长速率分别为 $0.2\ h^{-1}$ 和 $0.4\ h^{-1}$ 时, 诱导结束后的 DCW 分别达到 36.74 g/L 和 35.12 g/L, 酶活分别为 6.51 U/mL 和 4.13 U/mL。研究结果表明, 较低的比生长速率对菌体代谢负担影响较低, 从而呈现出较高的生长速率。菌体密度对于异源蛋白表达也有较大的影响, 但诱导前的菌体密度过高会影响诱导阶段的蛋白表达和菌体生长。

由图 6 可以看出, 随着补料阶段比生长速率的变化, 乙酸浓度变化不同。当比生长速率为 $0.2\ h^{-1}$ 时, 发酵过程中乙酸处于较低的含量(最高值仅为 0.86 g/L); 当比生长速率分别达到 $0.4\ h^{-1}$ 和 $0.6\ h^{-1}$

表 2 金属离子对琼胶酶 Aga2660 活性的影响

Table 2 Effects of metal ions on enzyme activity of agarase Aga2660

金属离子 Metal ions (1 mmol/L)	相对酶活 Relative activity (%)
CK	100.00±1.07
Mn^{2+}	136.19±1.03
Co^{2+}	43.33±1.21
K^{+}	97.05±0.73
Cu^{2+}	56.34±1.66
Cd^{2+}	62.11±0.61
Na^{+}	102.12±1.37
Ca^{2+}	121.53±2.31
Mg^{2+}	116.23±0.82
Zn^{2+}	63.56±1.45
Ni^{2+}	52.05±1.12
Ba^{2+}	47.61±0.35
Fe^{3+}	31.39±0.24

表 3 不同比生长速率对菌体生长和琼胶酶 Aga2660 的影响

Table 3 Comparison of different specific growth rate for cell growth and agarase Aga2660 production

参数 Parameter	比生长速率 Specific growth rate (h^{-1})		
	$\mu=0.2$	$\mu=0.4$	$\mu=0.6$
诱导前菌体干重 DCW before induction (g/L)	16.12±0.59	27.12±1.36	35.33±0.96
最终菌体干重 Final DCW (g/L)	36.74±1.09	35.12±0.99	31.71±0.61
琼胶酶酶活 Agarase activity (U/mL)	6.51±0.21	4.13±0.19	2.32±0.22
最大乙酸浓度 Maximum acetic acid concentration (g/L)	0.86±0.08	2.94±0.17	4.73±0.13
甘油消耗 Glycerol consumption (g/L)	73.48±2.79	76.810±3.26	86.59±3.59
诱导时间 Induction time (h)	15	15	12.5

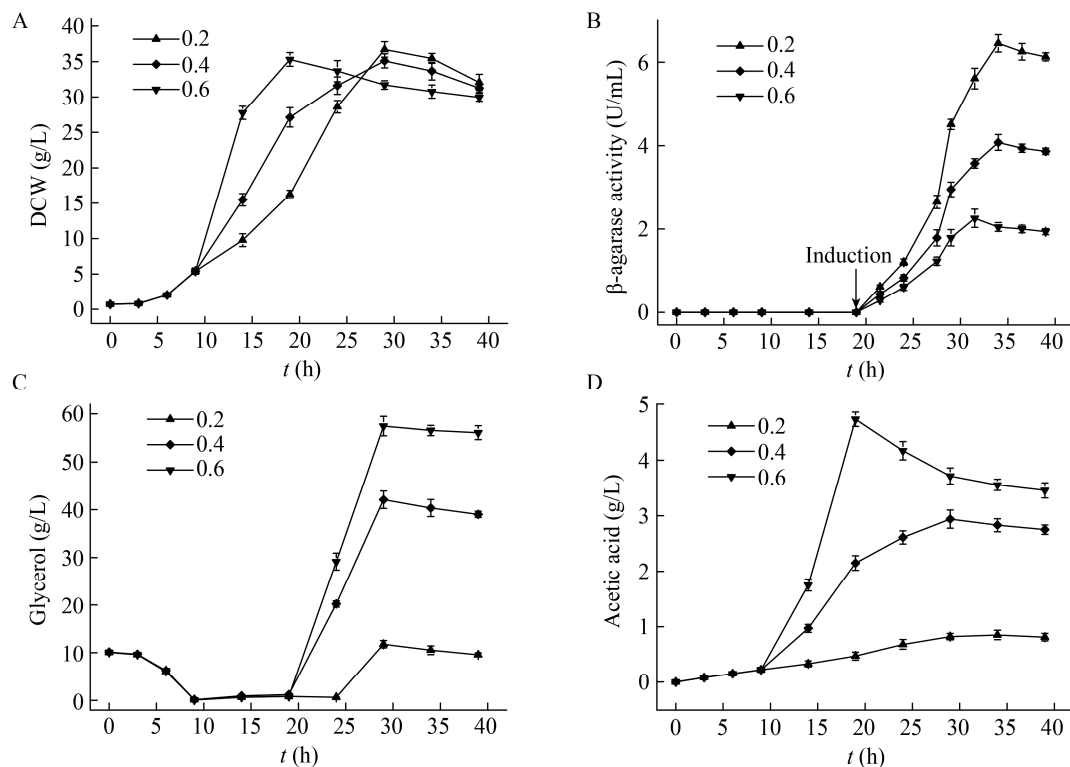


图 6 补料阶段不同比生长速率的发酵过程曲线

Figure 6 Time profiles on different specific growth rate in feeding stage

注: A: 菌体生长; B: 琼胶酶 Aga2660 的表达; C: 甘油消耗; D: 乙酸浓度

Note: A: Cell growth; B: The expression of agarase Aga2660; C: Glycerol consumption; D: Acetic acid concentration

时, 发酵过程乙酸含量较高(最大值分别为 2.94、4.73 g/L)。结果表明, 较低的比生长速率有利于菌体的生长和琼胶酶的表达, 因此, 选择补料阶段维持低比生长速率($\mu=0.2 \text{ h}^{-1}$)。

2.5.2 诱导温度对细胞生长和琼胶酶 Aga2660 的影响

为选择琼胶酶 Aga2660 表达过程中合适的诱导温度, 采用不同温度(16、20、24、28 °C)进行诱导表达(IPTG 的终浓度为 1 mmol/L)。由图 7 可知, 诱导温度分别为 24 °C 和 28 °C 时, 菌体生长维持在较高水平, 最大 DCW 分别达到 36.7 g/L 和 42.5 g/L; 而当诱导温度为 16 °C 时, 低代谢水平使得菌体生长受到抑制, 最大 DCW 仅为 22.73 g/L。当诱导温度为 20 °C 时, 诱导 15 h 后琼胶酶酶活为 8.61 U/mL。结果表明, 温度较高或者较低都不利于琼胶酶的表达, 低温菌体生长受到抑制, 高

温容易引起包涵体的产生; 同时已有研究表明, 较低的诱导温度可减少包涵体的形成^[20-21]。因此, 综合考虑酶活和成本, 将 20 °C 作为重组酶诱导温度。

由图 6 和图 7 也可以看出, 采用不同的比生长速率和诱导温度时甘油的消耗是不一样的。当比生长速率为 0.2 h^{-1} 、诱导温度为 20 °C 时, 剩余的甘油浓度超过 30 g/L, 较高的底物浓度可能抑制重组蛋白的生成, 因此应将诱导阶段甘油的流加速度降低为 3 g/(L·h)。

2.5.3 IPTG 浓度对细胞生长和琼胶酶 Aga2660 的影响

IPTG 浓度影响大肠杆菌重组蛋白的表达, 研究表明, 合适的 IPTG 浓度有利于蛋白质的产生速率, 但是过高的浓度会导致包涵体的产生而降低酶活^[22]。本文比较了不同 IPTG 浓度(0.5、0.8、1.0

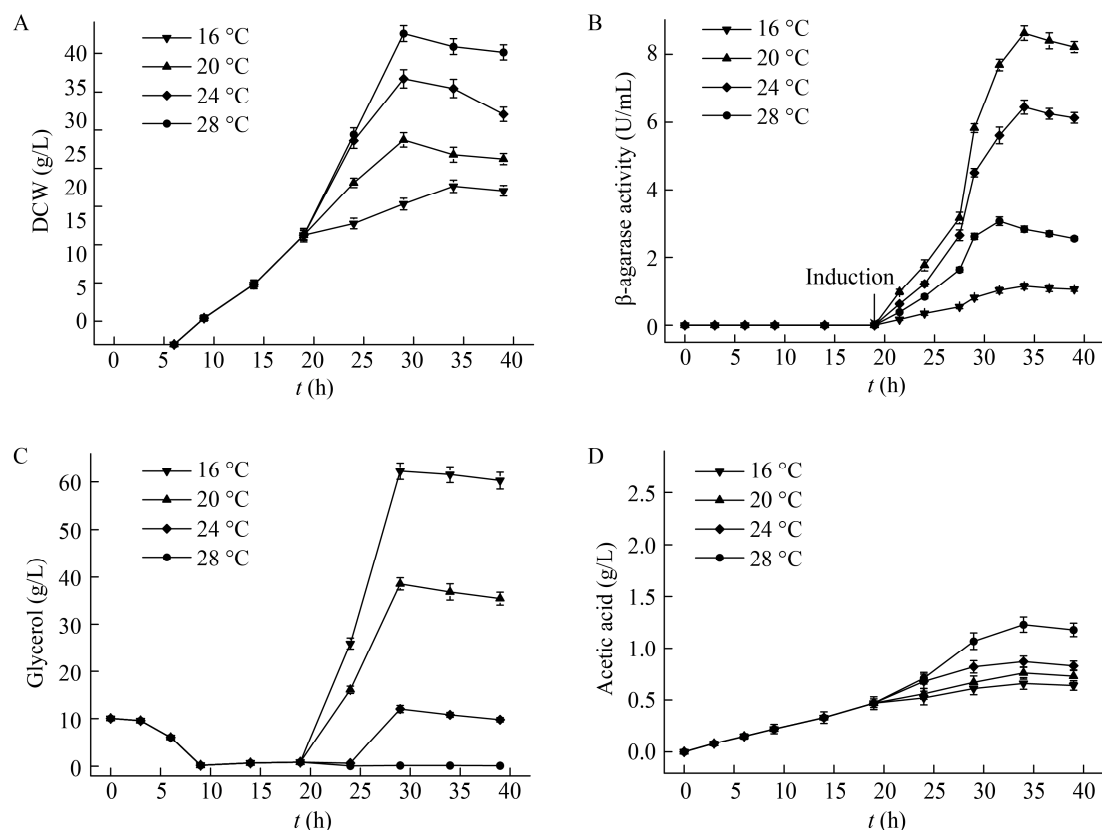


图 7 不同诱导温度的发酵过程曲线

Figure 7 Time profiles on different induction temperatures

注: A: 菌体生长; B: 琼胶酶 Aga2660 的表达; C: 甘油消耗; D: 乙酸浓度

Note: A: Cell growth; B: The expression of agarase Aga2660; C: Glycerol consumption; D: Acetic acid concentration

和 1.2 mmol/L)对琼胶酶表达的影响(诱导温度 20 °C)。由图 8 可知, 当 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时, 最大 DCW 达到 30.5 g/L, 分别是 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时的 1.02 倍和 1.04 倍; 当 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 时, 最大酶活达到 10.63 U/mL, 分别是 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时的 1.47 倍和 1.23 倍; 当 IPTG 浓度为 1.5 mmol/L 时, 细胞生长和重组酶表达量受到明显抑制。实验结果表明, IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 进行诱导表达有利于琼胶酶的表达。

2.5.4 连续流加乳糖诱导表达重组琼胶酶 Aga2660

IPTG 作为大肠杆菌表达重组蛋白常用诱导剂, 对细胞生长和表达具有一定程度的抑制作用^[22]。与 IPTG 诱导相比, 乳糖无细胞毒性, 可

减轻代谢负担, 促进表达蛋白的积累^[23]。为比较不同乳糖浓度的影响, 分别选择乳糖流加速度为 0.5、1.0、1.5 g/(L·h)进行连续流加诱导(图 9)。当乳糖流加速度为 1.5 g/(L·h)时, 最大 DCW 达到 32.6 g/L, 分别是流加速度为 0.5 g/(L·h)和 1.0 g/(L·h)时的 1.08 倍和 1.04 倍。与 IPTG 诱导相比, 乳糖对细胞生长无明显影响, 随着乳糖添加量的增加, DCW 增加不明显。

从琼胶酶酶活比较来看, 当乳糖流加速度为 1.0 g/(L·h)时的最大酶活达到 11.81 U/mL, 分别是流加速度为 0.5 g/(L·h)和 1.5 g/(L·h)时的 1.32 倍和 2.06 倍。结果表明, 乳糖流加速度的增加一定程度上提高了蛋白质合成速率, 但过高的乳糖浓度没有使琼胶酶酶活进一步提高。虽然 IPTG 诱导的

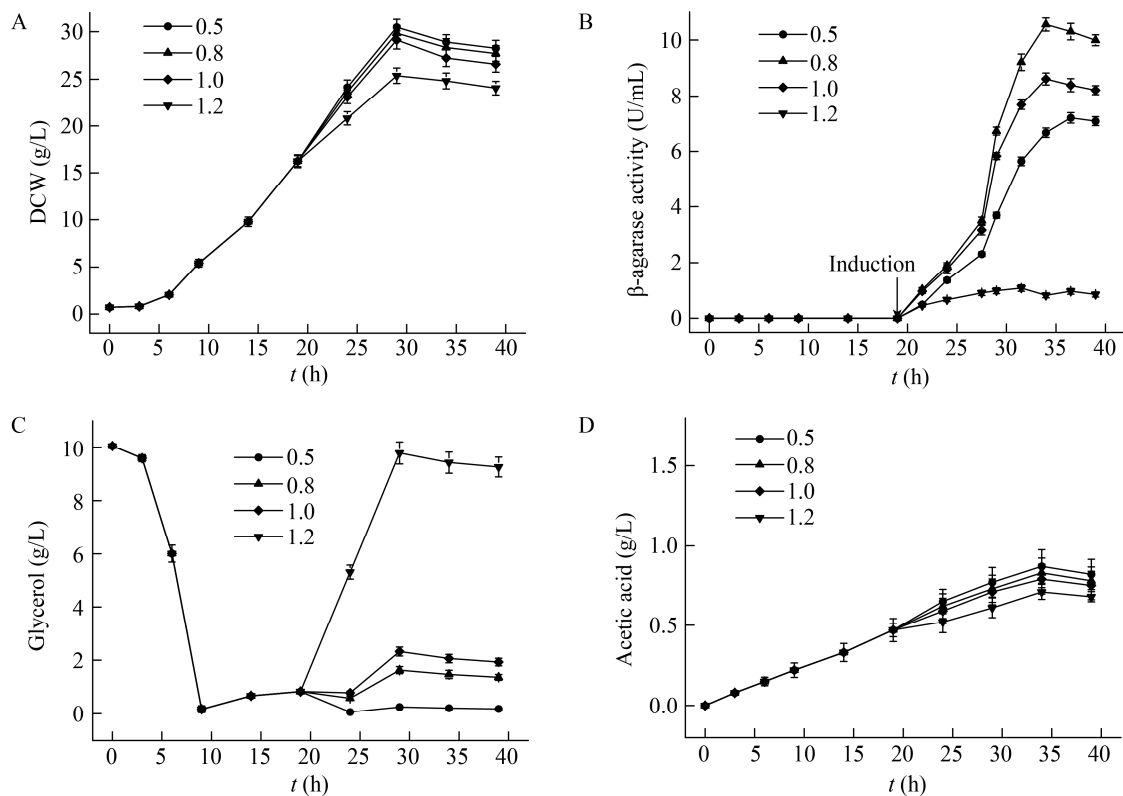


图 8 IPTG 诱导的发酵过程曲线

Figure 8 Time profiles for cultivations induced by IPTG

注: A: 菌体生长; B: 琼胶酶 Aga2660 的表达; C: 甘油消耗; D: 乙酸浓度

Note: A: Cell growth; B: The expression of agarase Aga2660; C: Glycerol consumption; D: Acetic acid concentration

发酵蛋白合成速率较快, 仅 15 h 就达到最大酶活; 而乳糖诱导的发酵蛋白合成达到最大时的时间为 17.5 h, 但乳糖诱导时的琼胶酶活性更高, 因此可以选择乳糖替代 IPTG 进行诱导表达。

3 讨论与结论

高活性、高专一性琼胶酶是酶法制备琼胶寡糖的关键。已报道的琼胶酶及其基因主要来源于微生物, 大部分来自海洋环境, 而源自深海微生物琼胶酶的相关报道较少^[12,15]。随着琼胶寡糖多种生理活性的报道, 琼胶寡糖的应用逐渐成为研究热点。深海因其低温、高压、低氧、寡营养等独特特性外, 已吸引人们不断从这些特殊环境中挖掘出新的菌种、新的基因和新酶资源^[24]。琼胶酶基因 *aga2660* 是太平洋火色杆菌全基因组测序发现的 13 个琼胶

酶基因中唯一属于 GH50 家族的基因。一般认为, 微生物降解琼胶是在 GH86、GH96 或者 GH16 家族琼胶酶的作用下将多糖降解成四糖、六糖, 然后在 GH50 家族琼胶酶的作用下生成二糖, 新琼二糖继续被 GH117 家族的糖苷水解酶降解为 D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半乳糖后进入乳糖代谢或糖酵解途径^[25], 因此说明琼胶酶 Aga2660 是太平洋火色杆菌琼胶降解过程中的关键酶。

琼胶酶 Aga2660 是外切型琼胶酶, 属于 GH50 家族^[9,26], 比活力达到 3 525 U/mg。其酶解产物为新琼二糖, 但该酶不能直接降解琼胶, 只能降解新琼四糖和六糖。据报道^[27], 与高聚合度的琼胶寡糖相比, 新琼二糖在抗氧化、美白、抗肿瘤等方面表现出更好的活性, 因此新琼二糖具有更好的应用前景。

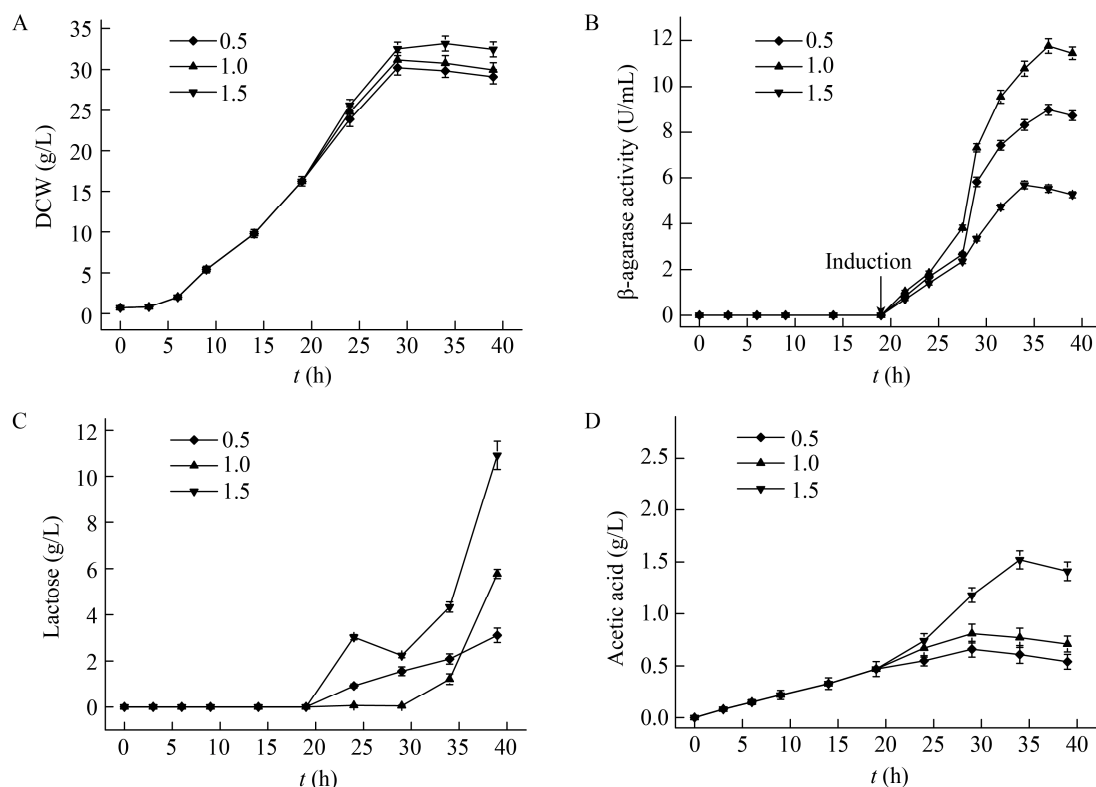


图9 诱导阶段采用乳糖诱导的发酵过程曲线

Figure 9 Time profiles for cultivations induced by lactose in post-induction phase

注: A: 菌体生长; B: 琼胶酶 Aga2660 的表达; C: 乳糖消耗; D: 乙酸浓度

Note: A: Cell growth; B: The expression of agarase Aga2660; C: Lactose consumption; D: Acetic acid concentration

酶学性质分析表明, 琼胶酶 Aga2660 具有较宽的 pH 适应性, 与目前已被报道的产新琼二糖琼胶酶相比(表 4), 本文的琼胶酶 Aga2660 具有较好的酸碱稳定性和较强的 pH 适应性, 有利于该酶的生产应用。该酶在温度为 30–40 °C 处理 24 h 仍保持 90% 以上的酶活力, 同时在 50–80 °C 之间, 仍能保持 50% 左右的酶活力, 表明该酶具有较好的热稳定性。与其他酶相比, 琼胶酶 Aga2660 具有较长时间的贮存期, 从而有利于其开发成商品用酶。

为提高产寡糖效率, 本文在 5 L 发酵罐中研究了重组大肠杆菌高效表达琼胶酶的优化策略, 建立了基于乳糖诱导的高密度发酵策略。通过优化, 琼胶酶 Aga2660 的酶活达到 11.81 U/mL, 而且与已报道的产新琼二糖的琼胶酶酶活相近^[27]。

采用较低的比生长速率的指数流加补料方式有利于重组大肠杆菌的生长和琼胶酶的表达, 说明比生长速率对菌体的生长和副产物的产生影响较大, 特别是乙酸的浓度维持在较低的水平。研究表明采用低成本、无毒的乳糖^[28]替代 IPTG 进行诱导表达表现出一定的优势, 本研究采用补料阶段指数流加、诱导阶段乳糖连续流加的策略使酶活提高了 11.3%, 与已报道的乳糖诱导表达重组酶的结果是一致的^[29]。

综上所述, 琼胶酶 Aga2660 是 GH50 家族琼胶酶, 具有良好的热、酸、碱稳定性, 其酶解产物为单一聚合度的新琼二糖; 通过 5 L 发酵罐进行表达条件优化, 酶活比优化前提高了 13.2 倍, 这为进一步规模化制备琼胶寡糖奠定了良好基础。

表 4 重组琼胶酶 Aga2660 的性质比较
Table 4 Recombinant agarase Aga2660 from engineered microorganisms and their characteristics

蛋白名称 Protein name	家族 Family	分子量 Molecular mass (kD)	菌株 Strain	最适温度 Optimal temperature (°C)	温度稳定性 Temperature stability	最适 pH Optimal pH	pH 稳定性 pH stability	金属离子的影响 Effect of metal ions	产物 Products	参考文献 References
Aga2660	GH50	80.0	<i>F. pacifica</i> WPAGA1	30	30–40 °C (90%, 24 h)	7.0	4–8 (80%, at 30 °C for 24 h)	Activation by Mn ²⁺ , Ca ²⁺ and Mg ²⁺	NA2	This study
Aga50D	GH50	84.0	<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	30	20–40 °C (75%, 1 h)	7.0	6–9 (83%, at 30 °C for 2 h)	Activation by Mn ²⁺ , Ca ²⁺ and K ⁺	NA2	[7]
Aga21	GH50	85.0	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ21	30	10–30 °C (80%, 3 h)	8.0	6.5–8.5 (70%, at 30 °C for 3 h)	Activation by Mg ²⁺	NA2	[8]
AgWH50C	GH50	84.0	<i>Agarivorans gilvus</i> WH0801	30	25–35 °C (70%, 1 h)	6.0	5.5–6.5 (65%, at 30 °C for 1 h)	Activation by Mn ²⁺ and Mg ²⁺	NA2	[29]
AgaB1	GH50	87.0	<i>Thalassomonas agarivorans</i> BCRC 17492	40	30–50 °C (80%, 15 min)	7.4	7–8 (80%, at 40 °C for 15 min)	Not determined	NA2	[9]
Sco3487	GH50	83.9	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	40	20–50 °C (80%, 1 h)	7.0	7–8 (60%, at 40 °C for 1 h)	Activation by Mn ²⁺ and Cu ²⁺	NA2	[10]
AgaYM01-5	GH50	91.6	<i>Catenovulum agarivorans</i> YM01T	40	0–40 °C (70%, 1 h)	9.0	6–10 (70%, at 40 °C for 12 h)	Activation by Fe ³⁺ and Mg ²⁺	NA2	[11]

REFERENCES

- [1] Kang HY, Yang ZY, Zhang ZY. Development of seaweed industry in China[J]. Ocean Development and Management, 2018, 35(6): 11-14 (in Chinese)
康慧宇, 杨正勇, 张智一. 我国海藻产业发展研究[J]. 海洋开发与管理, 2018, 35(6): 11-14
- [2] Chan ZH. The pilot fermentation strategies for agaro-oligosaccharides production by the deep sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 and the characterizations of related enzymes[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of Huaqiao University, 2018 (in Chinese)
产竹华. 深海太平洋火色杆菌生产龙须菜寡糖的中试发酵策略及其相关酶的研究[D]. 厦门: 华侨大学博士学位论文, 2018
- [3] Chan ZH, Hou YP, Di WJ, Zhao CG, Zeng RY, Yang SP. Analysis of agar degradation gene and characterization of an agarase Aga0950 from a deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(3): 411-422 (in Chinese)
产竹华, 侯艳平, 狄文婕, 赵春贵, 曾润颖, 杨素萍. 深海太平洋火色杆菌琼胶降解基因分析和琼胶酶 Aga0950 的表达及酶学性质[J]. 微生物学报, 2018, 58(3): 411-422
- [4] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: D233-D238
- [5] Ohta Y, Nogi Y, Miyazaki M, Li ZJ, Hatada Y, Ito S, Horikoshi K. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68(5): 1073-1081
- [6] Gao BL. Metabolic pathway of crude agar-degrading in *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 and a novel way for producing agaro-oligosaccharides[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2018 (in Chinese)
高波良. 深海太平洋火色杆菌粗琼胶降解代谢途径及寡糖的新型制备方法研究[D]. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 2018
- [7] Kim HT, Lee S, Lee D, Kim HS, Bang WG, Kim KH, Choi IG. Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type β -agarase producing neoagarobiose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(1): 227-234
- [8] Li J, Hu QS, Li YQ, Yuan X. Purification and characterization of cold-adapted beta-agarase from an Antarctic psychrophilic strain[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2015, 46(3): 683-690
- [9] Liang SS, Chen YP, Chen YH, Chiu SH, Liaw LL. Characterization and overexpression of a novel β -agarase from *Thalassomonas agarivorans*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(3): 563-572
- [10] Temuujin U, Chi WJ, Chang YK, Hong SK. Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type β -agarase-producing neoagarobiose[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(1): 142-149
- [11] An K, Shi XC, Cui FY, Cheng JG, Liu N, Zhang XH. Cloning, expression, and characterization of beta-agarase YM01-5 from *Catenovulum agarivorans* YM01^T[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2018, 37(1): 31-39 (in Chinese)
安可, 史晓翀, 崔方元, 程景广, 刘娜, 张晓华. 噬琼胶卵链菌 β -琼胶酶基因 YM01-5 的克隆表达及其酶学性质的研究[J]. 中国海洋药物, 2018, 37(1): 31-39
- [12] Choi U, Jung S, Hong SK, Lee CR. Characterization of a novel neoagarobiose-producing GH42 β -agarase, AgaJ10, from *Gayadomonas joobiniege* G7[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(1): 1-12
- [13] Li J, Xie MS, Gao Y. Identification and biochemical characterization of a novel exo-type β -agarase Aga3463 from an Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 162-170
- [14] Xu H, Fu YY, Yang N, Ding ZX, Lai QL, Zeng RY. *Flammeovirga pacifica* sp. nov., isolated from deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 937-941
- [15] Zeng RY, Chan ZH, Wan W, Gao C. *Gracilaria lemaneiformis* agar oligosaccharide and preparation method and application thereof: China, CN102827899B[P]. 2013-11-27 (in Chinese)
曾润颖, 产竹华, 万玮, 高超. 一种龙须菜琼胶寡糖及其制备方法与应用: 中国, CN102827899B[P]. 2013-11-27
- [16] Hou YP, Chen XL, Chan ZH, Zeng RY. Expression and characterization of a thermostable and pH-stable β -agarase encoded by a new gene from *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(7): 1068-1075
- [17] Li L. Expression of agarase genes from marine sediments and their application in the preparation of neoagarobiose[D]. Xiamen: Master's Thesis of Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, 2019 (in Chinese)
李丽. 海洋沉积物中琼胶酶基因的表达及其在制备新琼二糖中的应用[D]. 厦门: 自然资源部第三海洋研究所硕士学位论文, 2019
- [18] Li RQ, Li YR, Kristiansen K, Wang J. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. Bioinformatics, 2008, 24(5): 713-714
- [19] Gao BL, Li L, Wu H, Zhu D, Jin M, Qu W, Zeng RY. A novel strategy for efficient agaro-oligosaccharide production

- based on the enzymatic degradation of crude agarose in *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1231
- [20] Fang SY, Li JH, Liu L, Du GC, Chen J. Overproduction of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Escherichia coli* by a two-stage glycerol feeding approach[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10671-10678
- [21] Jhamb K, Sahoo DK. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 135-143
- [22] Malakar P, Venkatesh KV. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2543-2549
- [23] Dvorak P, Chrast L, Nikel PI, Fedr P, Soucek K, Sedlackova M, Chaloupkova R, De Lorenzo V, Prokop Z, Damborsky J. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 201
- [24] Gao Y, Li B. Advances and challenges in deep sea microbial resource research and development of China[J]. *Biotic Resources*, 2018, 40(1): 13-17 (in Chinese)
高岩, 李波. 我国深海微生物资源研发现状、挑战与对策[J]. *生物资源*, 2018, 40(1): 13-17
- [25] Gao BL, Jin M, Li L, Qu W, Zeng RY. Genome sequencing reveals the complex polysaccharide-degrading ability of novel deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 600
- [26] Han WJ, Cheng YY, Wang DD, Wang SM, Liu HH, Gu JY, Wu ZH, Li FC. Biochemical characteristics and substrate degradation pattern of a novel exo-type β -agarase from the polysaccharide-degrading marine bacterium *Flammeovirga* sp. strain MY04[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(16): 4944-4954
- [27] Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(1): 162-163
- [28] Amirzada MI, Yu ML, Gong XH, Chen Y, Zhu RY, Lei JY, Jin J. Cost-effective production of recombinant human interleukin 24 by lactose induction and a two-step denaturing and one-step refolding method[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(1): 135-142
- [29] Liu N, Mao XZ, Yang M, Mu BZ, Wei DZ. Gene cloning, expression and characterisation of a new β -agarase, AgWH50C, producing neoagarobiose from *Agarivorans gilvus* WH0801[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(6): 1691-1698