

海洋细菌来源 β -琼胶酶的生物信息学分析与高效制备

尤钰娴¹, 解文嫣¹, 班宵逢¹, 孔昊存¹, 李才明¹, 李兆丰^{1,2}

1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

2. 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

摘要: 为丰富优质琼胶酶品类, 充分利用海藻资源, 实现功能性琼胶寡糖的高效制备, 采用基因组挖矿技术挖掘得到一个来源于海洋细菌——淡黄色噬琼胶菌 (*Agarivorans gilvus*) WH0801的 β -琼胶酶 (β -AGA酶), 利用生物信息学分析对该酶的理化性质和结构特征进行预测, 发现该酶为非分泌性蛋白。在此基础上, 采用分子生物学手段引入信号肽, 实现了该酶在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的胞外表达, 并通过发酵调控策略优化提高其生产效率。结果表明, 采用种龄5 h的种子培养液进行发酵, 发酵出发培养基为TB (pH 7.0), 碳源为6 g·L⁻¹的果糖, 氮源为30 g·L⁻¹的酵母提取液II, 于25 °C培养2 h后加入终浓度为0.025 mmol·L⁻¹的IPTG诱导48 h, 此条件下发酵所得酶活为16.72 U·mL⁻¹, 相比初始酶活提高了约5倍, 证明 β -AGA酶具有良好的工业应用潜力。

关键词: 琼胶酶; 淡黄色噬琼胶菌; 生物信息学分析; 异源表达; 高效制备

中图分类号: Q 814.9

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Bioinformatics analysis and efficient preparation of β -agarase from marine bacteria

YOU Yuxian¹, XIE Wenyan¹, BAN Xiaofeng¹, KONG Haocun¹, LI Caiming¹, LI Zhaofeng^{1,2}

1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Wuxi 214122, China

Abstract: In order to expand the high-quality agarase categories, make full use of seaweed resources, and realize the efficient preparation of functional agar oligosaccharides, we derived a β -agarase from the marine bacterium (*Agarivorans gilvus* WH0801) (β -AGAase) by using genome mining technology, and predicted its physical and chemical properties as well as structural characteristics by bioinformatics analysis. Based on the results, β -AGAase is a non-secreted protein. The β -AGAase was extracellular expressed in *Escherichia coli* through the introduction of signal peptides by molecular biology methods, and its production efficiency was significantly enhanced through fermentation regulation strategy optimization. The optimal fermentation conditions are as followed: seed culture medium with an inoculation time of 5 h; fermentation starting medium was TB (pH 7.0); carbon source was 6 g·L⁻¹ of fructose; nitrogen source was 30 g·L⁻¹ of yeast extract II. After being cultured at 25 °C for 2 h, IPTG was added with a final concentration of 0.025 mmol·L⁻¹ for 48 h induction. Under these conditions, the obtained enzyme activity was 16.72 U·mL⁻¹ and was about 5 times higher than the initial enzyme activity, which proves that β -AGAase is of great potential for industrial application.

Keywords: Agarase; *Agarivorans gilvus*; Bioinformatics analysis; Heterologous expression; Efficient preparation

收稿日期: 2021-11-03; 修回日期: 2021-12-27

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901901)

作者简介: 尤钰娴(1996—), 女, 博士研究生, 研究方向为淀粉生物技术。E-mail: yuxianyou@stu.jiangnan.edu.cn

通信作者: 李兆丰(1979—), 男, 教授, 博士, 从事淀粉生物技术研究。E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

琼胶是由海洋藻类生物合成的一种天然高分子多糖^[1-2]。琼胶经过水解后生成聚合度为2~20的琼胶寡糖,不仅溶解性好、生物利用度高,还具有改善水产品储藏性能^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、抗炎症^[6]、降血糖^[7-8]、改善肠道菌群结构^[9-10]以及美白保湿^[11]等多项理化和生理功能,在功能性食品、化妆品、药品等多个领域均具有很高的经济价值和广泛的应用前景^[12]。

近年我国对琼胶的开发存在规模较小、附加值低、易污染环境等不足,开发功能性琼胶寡糖等高附加值的琼脂衍生物对高效利用海洋资源、增加经济效益、减轻化学污染等意义重大。目前工业上主要利用酸水解^[13]和酶解^[14]两种方式制备琼胶寡糖,其中利用琼胶酶生物催化水解具有反应条件温和、催化效率高、底物特异性强等优势^[15]。琼胶酶根据水解模式和产物的不同可分为 α -琼胶酶(EC 3.2.1.158)和 β -琼胶酶(EC 3.2.1.81)^[16]。 α -琼胶酶可特异性水解 α -1,3-糖苷键,生成以3,6-内醚- α -L-半乳糖为还原性末端的琼寡糖, β -琼胶酶可特异性水解 β -1,4-糖苷键,生成以 β -D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖。 β -琼胶酶因来源丰富、稳定性好得以广泛应用,但仍存在菌株产酶性状不稳定、产酶量和催化活性低、产物专一性差等问题,难以满足工业化生产需求。因此,寻找水解活力更高、性状稳定的琼胶酶基因,并在基因工程菌中实现异源表达,成为生产琼胶酶最经济、高效的方法。

目前,已有部分细菌来源的琼胶酶实现了在大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[17-18]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[19]、短芽孢杆菌(*B. pumilus*)^[20]、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[21]和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)^[22]中的表达,其中大肠杆菌因具有生长与表达速度快、易于基因组修饰、表达量高等优势得到最广泛的应用。现有 β -琼胶酶在大肠杆菌中的表达量大多高于原始菌株,但绝大多数是胞内分泌表达,不利于后续的分离、纯化和应用,且表达系统的选择多具有随机性,尚未见有结合生物信息学分析等手段指导进行异源表达的报道。本研究利用生物数据库资源挖掘技术和生物信息学分析手段,获得一个来源于海洋细菌——淡黄色噬琼胶菌(*Agarivorans gilvus*) WH0801的 β -琼胶酶(β -AGA酶)基因。通过分子生物学手段和发酵调控策略实现了其在大肠杆菌 BL21(DE3)中的高效胞外

表达,以期为新琼寡糖资源的高效制备与充分利用提供新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET-20b(+) 保藏于本实验室; pUCm-T simple 质粒、限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I、Primer STAR GXL DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶均购自 TaKaRa (大连) 公司; 琼脂糖、质粒小量提取试剂盒、氨苄青霉素等试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 分子级酵母粉和胰蛋白胨均购自 Oxoid (英国) 公司; 大豆蛋白胨、酵母提取物 H07014、酵母提取物 H07002 均购自上海统园食品技术有限公司; 蛋白胨(鱼粉)、牛肉浸膏、酵母浸膏及其他常规培养基均购自国药集团; 所用化学试剂均为分析纯^[23]。

1.2 实验方法

1.2.1 β -琼胶酶的生物信息学分析

分别以来源于嗜琼胶菌 *Agarivorans* sp. QM38 (NCBI 登录号: ABM90422.1)^[24]、弧菌 *Vibrio* sp. PO-303 (NCBI 登录号: BAG71428.1)^[25] 和火色杆菌 *Flammeovirga* sp. OC4 (NCBI 登录号: AJW82061.1)^[26] 的 β -琼胶酶氨基酸序列为探针,利用美国国家生物信息中心 (NCBI) 的 BLASTp 功能 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 设置 *E* 值为 1.0×10^{-10} , 长度覆盖率 90% 以上且同一性大于 30%, 进行同源性蛋白分子筛选^[27], 利用 MEGA 软件中的邻接 (Neighbor-Joining) 法构建系统发生树^[28]。

利用在线生物信息学预测工具分别对 β -琼胶酶的基本理化性质、分泌特性、结构特征、功能潜力等进行预测分析^[29], 利用 RobeTTAFold 在线服务器 (<https://robeta.bakerlab.org/>) 进行蛋白质三级结构分析和预测。

1.2.2 β -AGA 酶基因的克隆

以淡黄色噬琼胶菌 WH0801 基因组 DNA 为模板, 根据其中的 β -AGA 酶序列分别设计含 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点的两端引物, 通过 PCR 扩增得到 β -aga 基因片段^[23]。引物设计如下, 正向 (P1): 5'GCGATGGCCATGGCCACATTTACTAAAAGCAA AATCGCAACCGTTCTT 3' (下划线为 *Nco* I 酶切位点)); 反向 (P2): 5'GGTGGTGCTCGAGTTTTT TGTAACGCAGATTATATAGATCACGGTTGAA 3'

(下划线为 *Xho* I 酶切位点)。

引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系及扩增条件参照李兆丰^[30]进行。将得到的 β -*aga* 基因克隆到质粒 pUCm-T simple, 获得克隆载体 pUCm-T simple/ β -*aga*, 并转化大肠杆菌 JM109。提取含 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素平板筛选所得阳性菌株的质粒进行酶切电泳和测序验证, 序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.3 表达载体 pET-20b(+)/ β -*aga* 的构建和转化

采用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 对克隆载体 pUCm-T simple/ β -*aga* 双酶切, 经碱性磷酸酶消化后回收目的片段, 再用 T4 DNA 连接酶与经同样双酶切处理的 pET-20b(+) 质粒片段连接后转化大肠杆菌 JM109, 提取质粒并测序鉴定, 获得含正确序列的表达载体 pET-20b(+)/ β -*aga*, 将其转化表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 获得基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)(pET-20b(+)/ β -*aga*)。

1.2.4 重组 β -AGA 酶的生产

种子培养和发酵培养参照李兆丰^[30]的方法进行, 发酵结束后收集上清液即为重组 β -AGA 酶粗酶液。

1.2.5 发酵条件优化

以体积分数为 4% 的接种量将种子培养液接至 50 mL 的发酵培养基中, 在不同的发酵初始培养基、诱导剂添加量及添加时间、发酵温度、发酵时间、发酵 pH、碳源和氮源条件下进行发酵, 测定发酵上清液中重组 β -AGA 酶活力, 以确定最佳的发酵条件, 每次优化的结果用于之后的实验。

1.2.6 正交试验

在单因素试验结果的基础上, 选择 3 个影响最大的因素进行正交试验, 测定发酵液中重组 β -AGA 酶活力, 获得发酵产酶的最佳条件。

1.2.7 β -AGA 酶水解活力的测定

以质量分数为 0.25% 的琼脂糖溶液为底物, β -AGA 酶的水解活力参照 Liu 等^[31]和 Dong 等^[32]采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定。

1.2.8 数据处理

实验结果用 3 次平行实验的“平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{X}\pm\text{SD}$)”表示。采用 GraphPad Prism 9.2 软件分析数据和作图; 显著性分析 ($P<0.05$) 通过 SPSS 20.0 软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 中的 Turkey (T) 程序进行。

2 结果

2.1 β -琼胶酶的生物信息学分析

2.1.1 β -琼胶酶系统进化树的构建

来源于嗜琼胶菌 *Agarivorans* sp. QM38、弧菌 *Vibrio* sp. PO-303 和火色杆菌 *Flammeovirga* sp. OC4 的 β -琼胶酶已被报道具有优良的环境适应力和水解活力, 因此以这 3 个氨基酸序列为探针, 利用 NCBI 数据库中的 BLASTp 功能进行搜索, 保留同源性大于 30% 的序列, 共得到 1 039 条序列。对筛选出的序列构建系统进化树 (图 1), 可根据其菌属来源分为 11 大类, 考虑到可获得性和潜在工业价值, 最终选取其中与模板序列亲缘关系较近的来源于淡黄色噬琼胶菌的 β -琼胶酶 (β -AGA 酶, NCBI 登录号: AQT38174.1) 作为后续研究对象。



图1 β -琼胶酶基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of β -agarase

2.1.2 β-AGA 酶理化性质预测

利用 ProtParam 预测了 β-AGA 酶的理化性质。β-AGA 酶的氨基酸数量为 955 个，氨基酸组成见表 1，其中含量较多的是丙氨酸 (82 个，8.6%)、天冬氨酸 (81 个，8.5%)；其中带负电荷的氨基酸残基有 135 个，带正电荷的氨基酸残基有 84 个；仅含有 1 个半胱氨酸，推测可能具有较少的二硫键结构。β-AGA 酶的分子式为 C₄₇₆₇H₇₁₈₄N₁₂₃₈O₁₄₈₄S₂₁，相对分子量为 106.254 kD，理论等电点为 4.66，不稳定指数为 24.45，总亲水性平均值为-0.428，表明 β-AGA 酶为酸性、稳定的亲水性蛋白。

2.1.3 β-AGA 酶二级结构分析

利用 SOPMA 预测了 β-AGA 酶可能包含的二级结构 (图 2)，其中 303 个氨基酸参与构成 α-螺旋，30 个氨基酸参与构成 β-转角，170 个氨基酸参与构成延伸链，452 个氨基酸参与构成无规则卷曲。

2.1.4 β-AGA 酶三维结构预测

采用 RobeTTAFold 对 β-AGA 酶结构进行在线预测，得到 5 个预测结构 (图 3)，置信度均为 0.8 (满分为 1)，比对各模型的误差估算图，其中模型 2 具有相对较小的误差，可以作为基础进行进一步结构解析。

2.1.5 β-AGA 酶亲水性/疏水性分析

利用 Prot Scale 分析了 β-AGA 酶的亲水性/疏水性 (图 4)。β-AGA 酶蛋白的最低分值 (-3.100) 峰

表1 β-AGA酶的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of β-AGAase

氨基酸 Amino acid	数量 Amount	占比 Proportion/%
丙氨酸 Alanine	82	8.6
精氨酸 Arginine	27	2.8
天冬酰胺 Aspartic acid	51	5.3
天冬氨酸 Asparagine	81	8.5
半胱氨酸 Cysteine	1	0.1
谷氨酰胺 Glutamine	38	4.0
谷氨酸 Glutamic acid	54	5.7
甘氨酸 Glycine	73	7.6
组氨酸 Histidine	15	1.6
异亮氨酸 Isoleucine	40	4.2
亮氨酸 Leucine	70	7.3
赖氨酸 Lysine	57	6.0
蛋氨酸 Methionine	20	2.1
苯丙氨酸 Phenylalanine	48	5.0
脯氨酸 Proline	40	4.2
丝氨酸 Serine	74	7.7
苏氨酸 Threonine	56	5.9
色氨酸 Tryptophane	26	2.7
酪氨酸 Tyrosine	39	4.1
缬氨酸 Valine	63	6.6

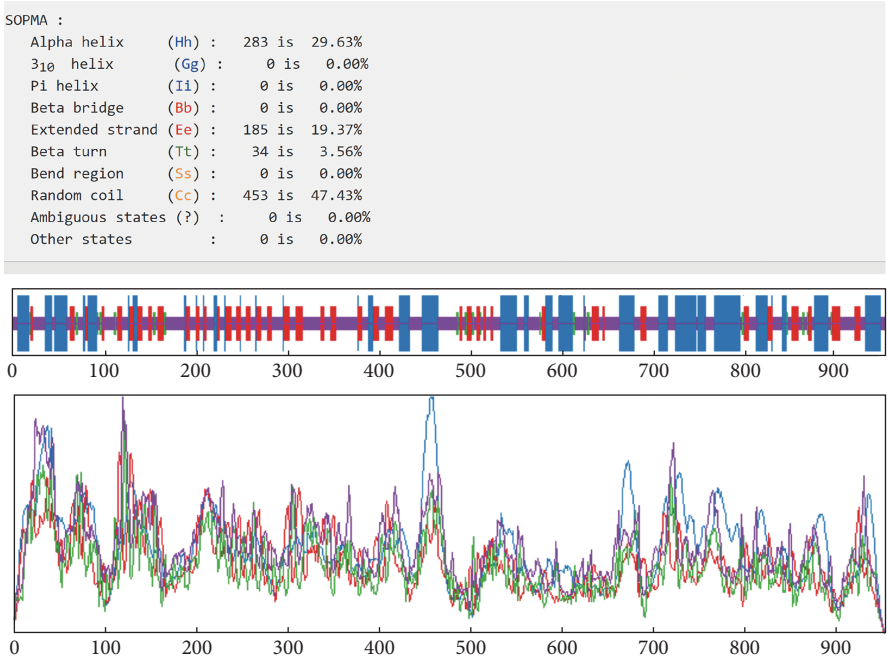


图2 β-AGA酶二级结构预测
Fig. 2 Secondary structure prediction of β-AGAase

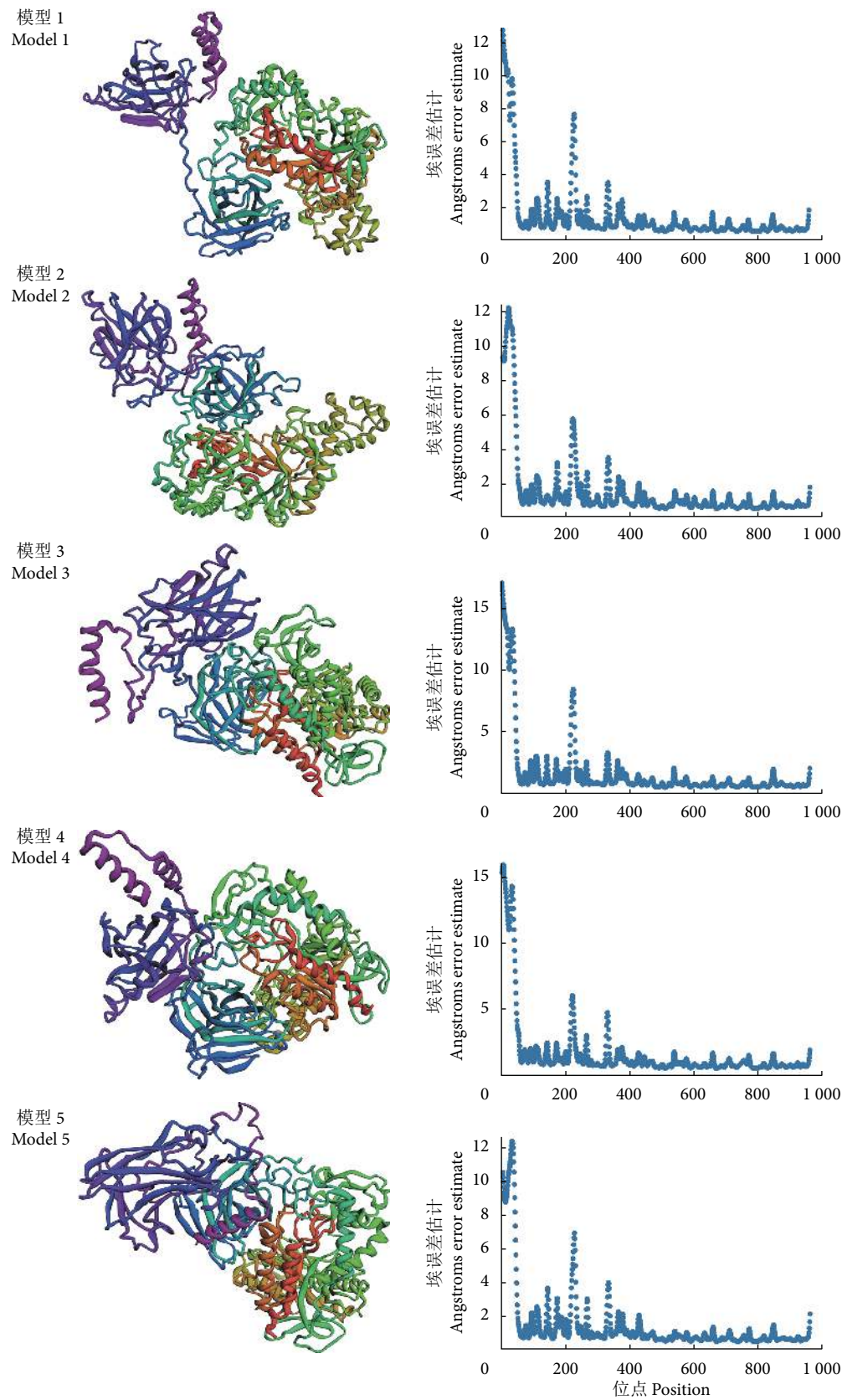


图3 β -AGA酶三级结构预测
Fig. 3 Tertiary structure prediction of β -AGAase

区位于第 537 位脯氨酸，代表其亲水性最强；最高分值 (2.422) 峰区位于第 16 位苯丙氨酸，代表其疏水性最强。分析可得， β -AGA酶蛋白的亲水区多于疏水区，总亲水平均值为-0.400，是一种亲水性蛋白。

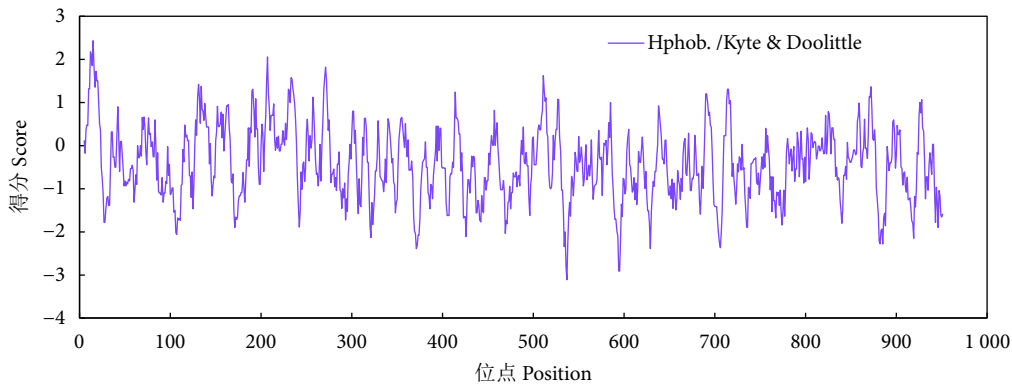


图4 β-AGA酶亲水性/疏水性预测

Fig. 4 Hydropathicity/hydrophobicity prediction of β-AGAase

2.1.6 β-AGA 酶亚细胞定位分析

利用 PSORTb version 3.0 分析了 β-AGA 酶的亚细胞定位, 结果显示无法准确预测其亚细胞定位。同时利用 Loc Tree3 分析其亚细胞定位 (图 5), 结果表明 β-AGA 酶有一定可能定位在细胞周质中, 亚细胞定位分数为 36, 精确度为 89%。

2.1.7 β-AGA 酶信号肽分析

利用 Signal P 5.0 Server 分析了 β-AGA 酶的信号肽 (图 6), 可知 β-AGA 酶的 S-mean 和 Y-max 的平均值 (D) 小于临界值, 代表不具有信号肽序列, 推测 β-AGA 酶为非分泌性蛋白。

2.1.8 β-AGA 酶功能结构域分析

利用 NCBI 的保守域数据库 (CDD) 进行功

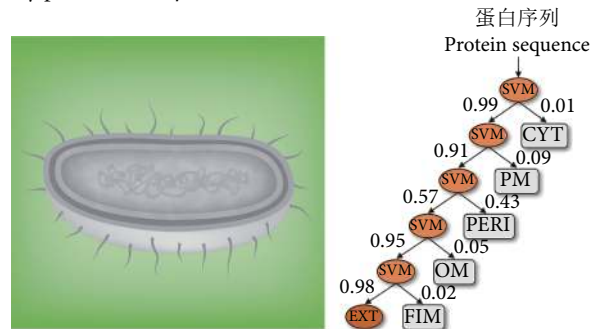


图5 β-AGA酶亚细胞定位预测

Fig. 5 Subcellular localization prediction of β-AGAase

能结构域分析 (图 7)。β-AGA 酶在 N 端 48—211、240—424 位氨基酸处含有 2 个 Agarase_CBM 结构域, 该 CBM 样域在结构上与某些 CBM 家族非常

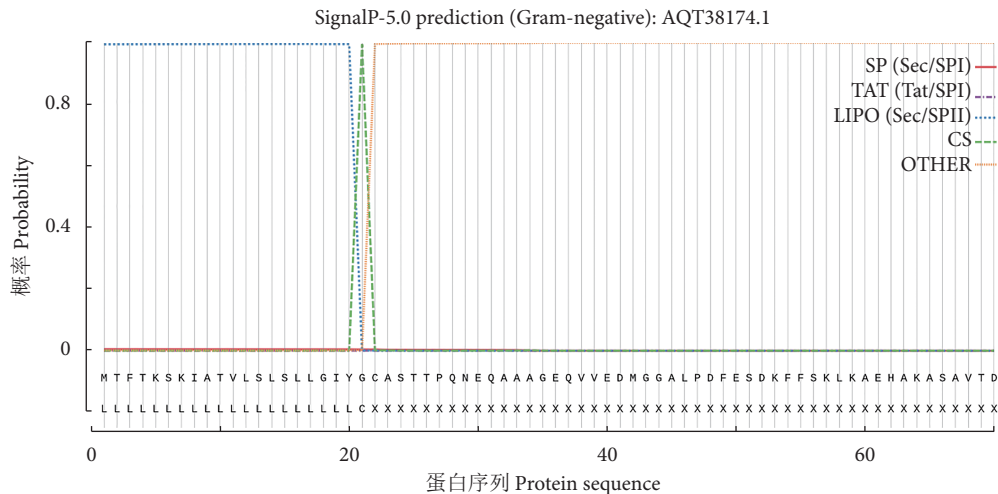


图6 β-AGA酶信号肽分析

Fig. 6 Signal peptide prediction of β-AGAase

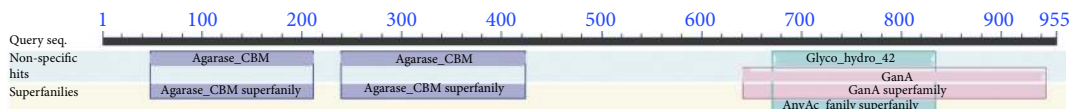


图7 β-AGA酶功能结构域预测

Fig. 7 Conserved domain prediction of β-AGAase

相似, 其中的一个 Loop 参与了催化位点通道顶部的形成, 在 β -琼胶酶的外切水解模式中起到了识别底物的作用。这些结构域与琼脂糖链的非还原末端特异性结合, 并将附加的催化模块引导至受琼胶酶水解的区域, 帮助 β -AGA 酶捕捉底物, 促进参与 1,4- β -D-半乳糖苷键水解的催化模块活性。

2.2 β -AGA 酶大肠杆菌表达系统的构建

β -AGA 酶在大肠杆菌中表达载体 pET-20b(+)/ β -aga 的构建见图 8。通过双酶切法构建获得分泌型表达载体 pET-20b(+)/ β -aga。测序验证序列正确性后将表达载体转化宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 获得 *E.coli* BL21(DE3)(pET-20b(+)/ β -aga), 实现了 β -AGA 酶在大肠杆菌中的胞外分泌表达。经测定, 发酵所得重组 β -AGA 酶的初始酶活为 $2.79 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比酶活为 $121.30 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

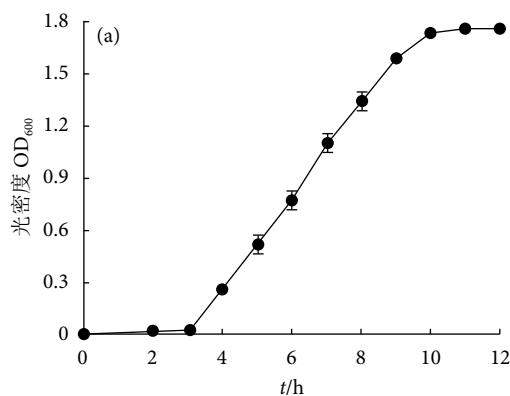
2.3 重组 β -AGA 酶的发酵优化

2.3.1 种子生长曲线与种龄的确定

重组 β -AGA 酶的种子生长曲线见图 9-a, 菌体在培养前 3 h 处于延滞期, 3~10 h 处于对数生长期, 10 h 后进入稳定期。选择种龄 4~9 h 的 β -AGA 酶种子按体积分数为 4% 的接种量接种, 以发酵时间 24 h、发酵温度 25°C 的条件进行培养, 离心后测定上清液中的胞外酶活力。对数中期 ($\geq 5 \text{ h}$) 的种龄对重组 β -AGA 酶活力影响不显著, 综合考虑时间和经济成本, 选择种龄 5 h 的种子培养液进行发酵 (图 9-b)。

2.3.2 发酵初始培养基的选择

发酵初始培养基对酶活的影响结果见图 10。



每个值为 3 次平行实验的平均值, 柱状图上不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。后图同此。
Each value represents the average value of three independent measurements and values with different letters on the top of the bars are significantly different ($P < 0.05$). The same case below.

图9 重组 β -AGA酶的种子生长曲线 (a) 和接种时间对重组 β -AGA酶发酵的影响 (b)

Fig. 9 Seed growth curve of β -AGAase (a) and effect of inoculation time on fermentation (b) of recombinant β -AGAase

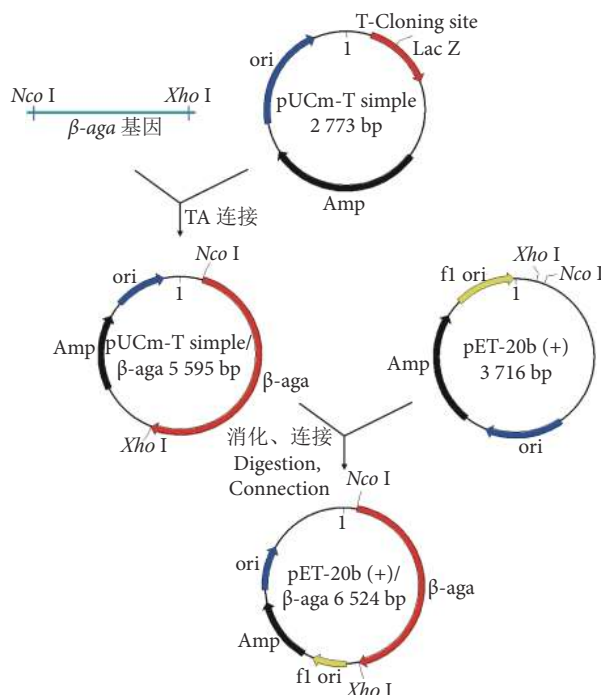


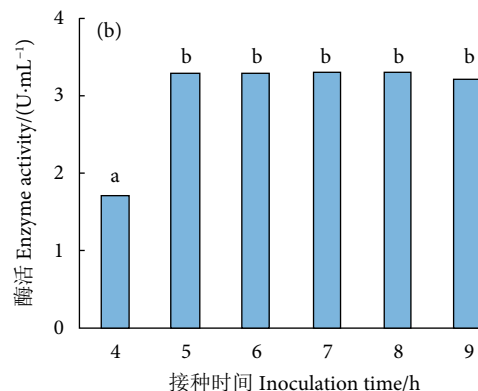
图8 表达载体pET-20b(+)/ β -aga的构建

Fig. 8 Construction of expression plasmid pET-20b(+)/ β -aga

TB 培养基对重组 β -AGA 酶的胞外发酵生产效果最好, 胞外酶活力最高, 达到 $3.20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分析其原因主要为 TB 培养基营养丰富, 更适合菌体生长, 且酵母粉含量更高, 能够促进重组酶释放到大肠杆菌细胞的周质空间并形成高渗透压便于胞外产酶; 同时, TB 培养基的 pH 缓冲能力较强, 能够有效维护重组菌的生长。

2.3.3 诱导剂对重组 β -AGA 酶生产的影响

诱导剂浓度和添加时间也会在一定程度上影响重组 β -AGA 酶的生产 (图 11-a)。当 IPTG 诱导浓度介于 $0.005 \sim 0.050 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时酶活较稳定,



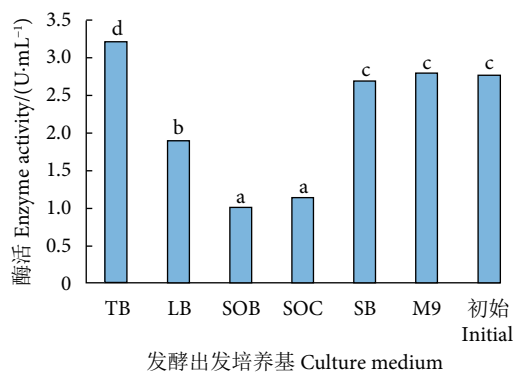


图10 发酵培养基类型对重组β-AGA酶发酵的影响

Fig. 10 Effect of culture medium on fermentation of recombinant β-AGAase

IPTG 浓度为 $0.025 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时酶活最高 ($2.589 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。诱导剂添加时间对重组 β-AGA 酶生产的影响见图 11-b, 添加诱导剂前培养时间超过 0.5 h, 酶活均较稳定, 培养时间为 1 h 时酶活最高 ($3.96 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3.4 发酵时间、温度和 pH 的选择

发酵时间对重组 β-AGA 酶生产的影响见图 12-a, 发酵 32~64 h 其胞外酶活均较稳定, 发酵第 48 小时时酶活达到最高。

发酵温度优化结果见图 12-b, 重组 β-AGA 酶活力在 $20 \sim 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 处于较高水平, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下发酵 48 h

酶活最高, 达到 $4.37 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 超过 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时酶活显著下降。

发酵初始培养基的 pH 会影响微生物的代谢、发酵及分泌, 在 pH 7~8.5 酶活保持稳定 (图 12-c), 综合考虑环境 and 经济因素, 选择 7.0 作为重组 β-AGA 酶发酵初始 pH。

2.3.5 碳源和氮源对重组 β-AGA 酶生产的影响

发酵出发培养基优化结果表明, 在 9 种常见的培养基中, TB 培养基最有利于重组 β-AGA 酶的分泌。以此为基础, 对其碳源组成进行优化以达到降低成本、提高效率的目的。以去除 TB 培养基中的碳源为空白, 选取并添加与该培养基碳含量相等的果糖、麦芽糖、蔗糖等 9 种不同的碳源, 结果表明碳源的种类和添加量对重组 β-AGA 酶表达分泌存在较大影响 (图 13)。除了葡萄糖, 其他碳源在重组 β-AGA 酶发酵中均能取得比甘油更好的效果, 其中果糖作为碳源酶活达到最高 ($6.28 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。进一步优化果糖的添加量, 当果糖添加量为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胞外产酶活力最高 ($7.45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

氮源是微生物合成核酸、蛋白质等的重要原料。氮源分为无机氮和有机氮, 有机氮更适合大肠杆菌重组菌的发酵生产。以去除 TB 培养基中的氮

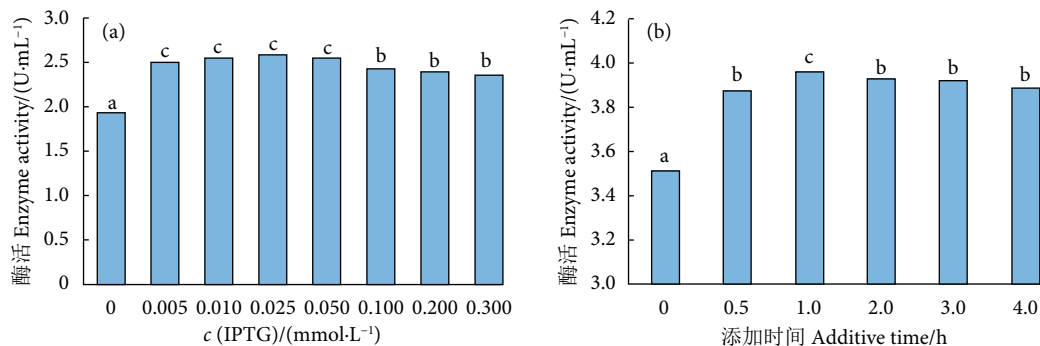


图11 IPTG浓度和添加时间对重组β-AGA酶发酵的影响

Fig. 11 Effects of IPTG concentration and additive time on fermentation of recombinant β-AGAase

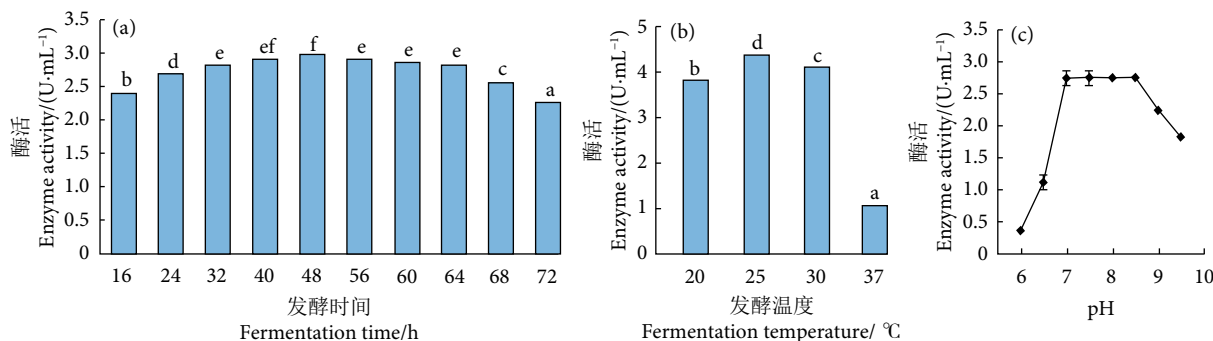


图12 时间、温度和pH对重组β-AGA酶发酵的影响

Fig. 12 Effects of time, temperature and initial pH on fermentation of recombinant β-AGAase

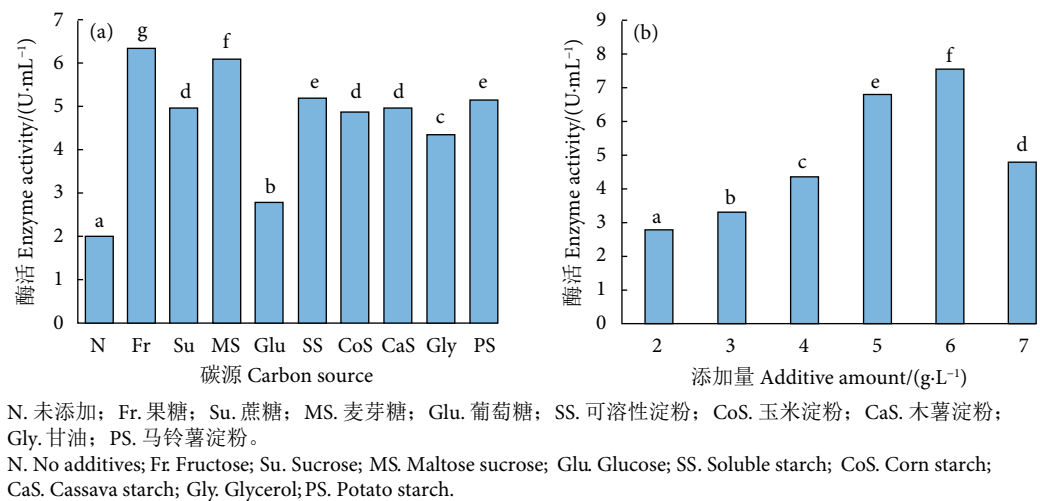


图13 碳源种类和添加量对重组β-AGA酶发酵的影响

Fig. 13 Effect of carbon sources and their additive amount on fermentation of recombinant β-AGAase

源为空白，选取并添加与 TB 发酵培养基氮含量相等的不同种类的蛋白胨、酵母提取物，发现氮源的种类和添加量对重组 β-AGA 酶发酵产酶的影响存在明显差异 (表 2)。酵母提取物作为氮源时的表达量整体明显优于蛋白胨。其中，使 β-AGA 酶发酵量达到最高的氮源种类和浓度为添加量 30 g·L⁻¹ 的酵母提取物 H07014，此时胞外产酶活力达到 15.33 U·mL⁻¹。

2.3.6 正交试验

单因素试验结果表明发酵温度、碳源添加量、

IPTG 添加时间 3 个因素对重组菌株产酶影响最大，选择这 3 个因素做三因素三水平正交试验，正交试验设计见表 3，试验结果见表 4。最佳组合为 A₂B₂C₃，即碳源添加量为 6 g·L⁻¹，发酵温度为 25 ℃，IPTG 添加时间为 2.0 h，在此条件下发酵 48 h 后所得粗酶液酶活为 16.72 U·mL⁻¹。

3 讨论

对琼胶酶进行异源表达可以突破天然酶的分泌限制，利用基因工程菌大幅提高其产量，可实现优

表2 有机氮源对重组β-AGA酶发酵的影响

Table 2 Effect of organic nitrogen source on fermentation of recombinant β-AGAase

U·mL⁻¹

氮源种类 Nitrogen source	添加量 Additive amount/(g·L ⁻¹)					
	0	6	12	18	24	30
①	1.37±0.03 ^a	2.14±0.02 ^b	2.94±0.03 ^c	3.79±0.04 ^d	4.48±0.03 ^e	5.83±0.02 ^f
②	1.37±0.03 ^a	3.03±0.02 ^b	4.26±0.04 ^c	6.22±0.03 ^d	8.04±0.04 ^e	9.21±0.09 ^f
③	1.37±0.03 ^a	3.28±0.02 ^b	4.35±0.02 ^c	6.19±0.03 ^d	8.47±0.06 ^e	8.64±0.07 ^e
④	1.37±0.03 ^a	3.65±0.03 ^b	4.80±0.02 ^c	6.73±0.04 ^d	8.51±0.05 ^e	9.58±0.07 ^f
I	1.37±0.03 ^a	4.10±0.02 ^b	6.67±0.05 ^c	8.92±0.06 ^d	10.44±0.05 ^e	11.87±0.08 ^f
II	1.37±0.03 ^a	4.76±0.02 ^b	7.59±0.04 ^c	10.15±0.05 ^d	12.48±0.06 ^e	15.33±0.10 ^f
III	1.37±0.03 ^a	4.28±0.02 ^b	7.02±0.04 ^c	9.58±0.04 ^d	11.57±0.07 ^e	13.25±0.08 ^f
IV	1.37±0.03 ^a	3.82±0.01 ^b	5.04±0.03 ^c	6.96±0.03 ^d	8.81±0.04 ^e	9.94±0.03 ^f

注：数值为 3 次平行实验的平均值，同一行中不同上标字母表示显著性差异 ($P<0.05$)。

①. 分子级蛋白胨；②. 蛋白胨 (鱼粉)；③. 牛肉浸膏；④. 大豆蛋白胨；I. 分子级酵母提取物；II. 酵母提取物 H07014；III. 酵母提取物 H07002；IV. 酵母浸膏。

Note: Each value represents the average value of three independent measurements, and those with different letters within the same row are significantly different ($P<0.05$).

①. Molecular level peptone; ②. Peptone (fish meal); ③. Beef extract; ④. Soya peptone; I. Molecular level yeast extract; II. Yeast extract H07014; III. Yeast extract H07002; IV. Yeast extract.

表3 正交试验因素和水平表
Table 3 Factors and levels in orthogonal array design

水平 Level	A: 碳源添加量 Carbon source additive amount/ (g·L ⁻¹)	B: 发酵温度 Fermentation temperature/ ℃	C: IPTG添加时间 IPTG additive time/h
1	5	20	1.0
2	6	25	1.5
3	7	30	2.0

表4 发酵条件优化正交试验结果
Table 4 Orthogonal array design layout and experimental results

试验号 Test No.	A: 碳源 添加量 Carbon source additive amount/ (g·L ⁻¹)	B: 发酵 温度 Fermentation temperature/ ℃	C: IPTG 添加时间 IPTG additive time/h	酶活 Enzyme activity/ (U·mL ⁻¹)
1	1 (5)	1 (20)	1 (1.0)	13.99±0.04 ^e
2	1	2 (25)	2 (1.5)	14.15±0.05 ^f
3	1	3 (30)	3 (2.0)	13.02±0.07 ^b
4	2 (6)	1	2	15.63±0.06 ^g
5	2	2	3	16.72±0.06 ^h
6	2	3	1	13.39±0.04 ^e
7	3 (7)	1	3	13.64±0.05 ^d
8	3	2	1	14.18±0.03 ^f
9	3	3	2	12.67±0.02 ^a
K ₁	13.72	14.42	13.85	
K ₂	15.25	15.02	14.15	
K ₃	13.50	13.03	14.46	
R	1.75	1.99	0.61	

注：同一列中不同上标字母表示显著性差异 ($P<0.05$)。

Note: Different superscript letters within the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

良酶制剂的高效制备。目前国内外对琼胶酶在大肠杆菌中的克隆表达主要定位于细胞质或周质空间, 存在酶产量有限、制备工艺复杂、分离纯化困难等瓶颈^[33], 限制了其工业化应用。本研究通过生物信息学分析, 发现来源于淡黄色噬琼胶菌的 β -AGA 酶氨基酸序列中不包含信号肽, 因此引入 pET-20b(+) 质粒中的信号肽进行表达载体的构建, 成功实现了重组 β -AGA 酶的胞外分泌表达。

发酵过程中菌体的生长状态和产酶量可通过多种因素进行系统调控。菌体在生长的不同阶段具备不同的生理特征, 处于对数生长期的种子因其活性高、繁殖快、适应性强, 更适合用于接种发酵。由

于宿主菌 *E.coli* BL21(DE3) 中存在由 *lac I* 基因调控的 T7 RNA 聚合酶基因激活机制^[34], 因此在发酵过程中通常需要添加诱导剂 IPTG 诱导目的基因的转录。本实验结果表明, IPTG 浓度为 0.025 mmol·L⁻¹ 时重组 β -AGA 酶的水解活力最高, 随着诱导剂浓度进一步升高, 酶活逐渐降低。这可能是由于 IPTG 具有一定的细胞毒性, 浓度过高时会抑制菌体生长^[35], 且经高浓度 IPTG 诱导后重组 β -AGA 酶的前体蛋白合成速率会大大提高^[30,36], 容易造成细胞质中无活性包涵体的产生, 从而导致正常折叠的蛋白质分泌量显著降低。同时, 诱导剂的添加时间也会对重组 β -AGA 酶的表达量和酶活造成影响, 先培养一段时间再添加诱导剂, 有利于使菌体增殖到适当的浓度, 从而更好地抵御 IPTG 的毒性, 最大限度地诱导细胞产酶。另外, 随着发酵时间的延长, 菌体在利用营养物质生长繁殖的同时又将更多的代谢产物排出至培养基中, 当代谢产物积累到一定量时, 会反向阻遏菌体的生产及产酶, 因此需要对发酵时间进行严格把控。发酵体系的 pH 也是影响微生物生长的一个重要因素, 适中的 pH 有利于重组菌的生长、代谢和重组 β -AGA 酶在发酵期间活力的稳定。除 pH 外, 发酵温度也是调控重组 β -AGA 酶胞外分泌表达的一项重要指标。本研究结果表明, 重组 β -AGA 酶在 25 ℃ 下发酵活性最高, 可能是由于该温度更接近野生型海洋来源 β -AGA 酶所处的环境温度, 此温度下该酶本身稳定性较高, 且相对较低的温度也更适合宿主大肠杆菌的生长繁殖和分泌产酶。相反, 当发酵温度上升至 37 ℃ 时, 宿主菌和重组酶的稳定性均有所下降, 在拷贝过程中质粒可能存在较严重的丢失现象, 因此胞外酶活显著降低。当诱导温度太低 (20 ℃) 时, 宿主菌的增殖速率和重组酶的转运速率均会降低, 对重组 β -AGA 酶的胞外生产起到一定的限制作用。碳源和氮源的种类和浓度也是影响微生物生长代谢的重要因素, 浓度过低时不足以提供充足的营养, 过高则会反向抑制微生物的生长和代谢^[37], 不同微生物对碳、氮源物质的选择偏好性存在明显差异。

综合上述各因素对重组 β -AGA 酶进行发酵条件优化后的最终条件为: 选取 37 ℃ 下培养 5 h 的种子液用于发酵产酶, 以 TB 作为发酵出发培养基, 设置初始 pH 为 7.0, 以 6 g·L⁻¹ 的果糖代替其中的碳源, 以 30 g·L⁻¹ 的酵母提取液 II 代替其中的氮源, 于 25 ℃ 培养 2 h 后加入终浓度为 0.025 mmol·L⁻¹

的 IPTG, 继续诱导 48 h, 此条件下发酵所得酶活达到 $16.72 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 约为初始酶活的 6 倍, 在目前已报道的 β -琼胶酶中处于领先水平^[38-40]。优良的水解活力和分泌稳定性使得重组 β -AGA 酶具有广阔的应用空间, 有望成为定向水解琼脂糖, 高效生产特异性新琼寡糖的新型酶解工具。

4 结论

本研究利用基因挖掘技术从海洋微生物基因库中筛选得到一个具有优良催化潜力的 β -琼胶酶基因, 采用分子生物学手段实现了其在大肠杆菌系统中的异源表达, 并通过发酵调控策略的优化使其酶活提高了约 5 倍。该酶具有优良的水解活力、稳定的分泌水平和较高的产物特异性, 应用前景广阔。研究结果可为开发新型琼胶水解酶和高效制备不同聚合度的新琼寡糖提供参考。

参考文献:

- [1] 慕欣. 三株海洋新菌的鉴定及细菌 O17~T 和 TS1~T 的琼胶酶研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017: 1.
- [2] 王露楠, 杨少玲, 戚勃, 等. 3 种改性方法对琼胶理化性质的影响 [J]. 南方水产科学, 2021, 17(2): 97-103.
- [3] 戚勃, 杨贤庆, 李来好, 等. 琼胶寡糖对冻虾仁和罗非鱼片品质的影响 [J]. 南方水产科学, 2012, 8(6): 73-79.
- [4] XU X Q, SU B M, XIE J S, et al. Preparation of bioactive neoagaroligosaccharides through hydrolysis of *Gracilaria lemaneiformis* agar: a comparative study[J]. Food Chem, 2018, 240(1): 330-337.
- [5] LEE M H, JANG J H, YOON G Y, et al. Neoagarohexaose-mediated activation of dendritic cells via Toll-like receptor 4 leads to stimulation of natural killer cells and enhancement of antitumor immunity[J]. Bmb Rep, 2017, 50(5): 263-268.
- [6] WANG W, LIU P, HAO C, et al. Neoagaroligosaccharide monomers inhibit inflammation in LPS-stimulated macrophages through suppression of MAPK and NF- κ B pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44252.
- [7] JOO H S, JE-HYEON L, JOO K E, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagarooligosaccharides on high-fat diet-induced obesity in mice[J]. Mar Drugs, 2017, 15(4): 90-101.
- [8] HONG S J, LEE J H, KIM E J, et al. *In vitro* and *in vivo* investigation for biological activities of neoagarooligosaccharides prepared by hydrolyzing agar with β -agarase[J]. Biotechnol Bioeng, 2017, 22(4): 489-496.
- [9] 杨绍青, 刘学强, 刘瑜, 等. 酶法制备几种功能性低聚糖的研究进展 [J]. 生物产业技术, 2019(4): 10.
- [10] ZHANG N, HOU E, SONG J, et al. Neoagarotetraose-modulated gut microbiota and alleviated gut inflammation in antibiotic treatment mice[J]. Food Agr Immunol, 2017, 28(6): 1408-1423.
- [11] YANG M, ZHANG Z L, HE Y, et al. Study on the structure characterization and moisturizing effect of *Tremella* polysaccharide fermented from GCMCC5.39[J]. Food Sci Hum Well, 2021, 10(4): 471-479.
- [12] 李静. 琼脂降解菌的筛选及其琼胶酶的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020: 6.
- [13] KAZLOWSKI B, PAN C L, KO Y T. Monitoring and preparation of neoagaro- and agaro-oligosaccharide products by high performance anion exchange chromatography systems[J]. Carbohydr Polym, 2015, 122: 351-358.
- [14] ZHANG W, XU J, LIU D, et al. Characterization of an α -agarase from *Thalassomonas* sp. LD5 and its hydrolysate[J]. Appl Microbiol Biot, 2018, 102(5): 2203-2212.
- [15] 林福娣. 新琼寡糖的酶法制备及其生物活性研究 [D]. 厦门: 华侨大学, 2020: 2-5.
- [16] LI J, XIE M, GAO Y. Identification and biochemical characterization of a novel exo-type β -agarase Aga3463 from an Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. strain[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 162-170.
- [17] CHEN X, HOU Y, JIN M, et al. Expression and characterization of a novel thermostable and pH-stable β -agarase from deep-sea bacterium *Flammeovirga* sp. OC4[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(38): 7251-7258.
- [18] CHEN Y, WU H, WANG G, et al. Inspecting the genome sequence and agarases of *Microbulbifer pacificus* LD25 from a salt-water hot spring[J]. J Biosci Bioeng, 2019, 127(4): 403-410.
- [19] CUI X, JIANG Y, CHANG L, et al. Heterologous expression of an agarase gene in *Bacillus subtilis*, and characterization of the agarase[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120: 657-664.
- [20] LI R, YING X, CHEN Z, et al. Expression and characterization of a GH16 family β -agarase derived from the marine bacterium *Microbulbifer* sp. BN3 and its efficient hydrolysis of agar using raw agar-producing red seaweeds *Gracilaria sjostedtii* and *Gelidium amansii* as substrates[J]. Catalysts, 2020, 10(8): 885.
- [21] LEE J, HONG S, LEE C, et al. Production of ethanol from agarose by unified enzymatic saccharification and fermentation in recombinant yeast[J]. J Microbiol Biotech, 2019, 29(4): 625-632.
- [22] LI R, CHEN Z, YING X, et al. A novel GH16 beta-agarase isolated from a marine bacterium, *Microbulbifer* sp. BN3 and its characterization and high-level expression in *Pichia pastoris*[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 119: 1164-1170.
- [23] 李才明, 黄敏, 石建中, 等. 金属离子协同氨基酸提高重组 β -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草芽孢杆菌中的表达 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 1-8.
- [24] LEE D, PARK G, KIM N, et al. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from a marine *Agarivorans* isolate[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(23): 1925-1932.
- [25] DONG J, TAMARU Y, ARAKI T. A unique β -agarase, AgaA, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303[J]. Appl Microbiol Biot, 2007, 74(6): 1248.

- [26] CHEN X, LIN H, JIN M, et al. Characterization of a novel alkaline β -agarase and its hydrolysates of agar[J]. Food Chem, 2019, 295(15): 311-319.
- [27] 班宵逢. 静电相互作用对淀粉分支酶热稳定性影响的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2017: 50.
- [28] 杨平, 张边江, 王立科, 等. 豆科家族中的木糖异构酶基因分析 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 23-27.
- [29] 杨艳北, 许晶, 沈城辉, 等. N-酰基高丝氨酸内酯酶的生物信息学分析 [J]. 甘肃农业科技, 2021, 52(2): 31-37.
- [30] 李兆丰. 软化类芽孢杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析 [D]. 无锡: 江南大学, 2009: 22-25.
- [31] LIU J, LIU Z, JIANG C, et al. Biochemical characterization and substrate degradation mode of a novel α -agarase from *Catenovulum agarivorans*[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(37): 10373-10379.
- [32] DONG Q, RUAN L W, SHI H. A β -agarase with high pH stability from *Flammeovirga* sp. SJP92[J]. Carbohydr Res, 2016, 432(2): 1-8.
- [33] 文霞, 周少璐, 杨秀荭, 等. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 38-46.
- [34] 王晨, 赵雨佳, 李春, 等. 动态转录调控微生物代谢途径研究进展 [J]. 化工进展, 2019, 38(9): 4238-4246.
- [35] 冉凡娇, 孙溢, 包静, 等. Bohai sea-9145 重组脂肪酶基因工程菌的发酵表达条件优化 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 178-183.
- [36] 韩来闯. 生物元件的挖掘、改造及在基因表达调控系统中的应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2020: 6.
- [37] 于平, 陈凯飞, 朱祺, 等. 重组大肠杆菌生物合成 γ -氨基丁酸的发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 112-120.
- [38] ZHU Y, ZHAO R, XIAO A, et al. Characterization of an alkaline β -agarase from *Stenotrophomonas* sp. NTa and the enzymatic hydrolysates[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 86: 525-534.
- [39] RAMOSA K R M, VALDEHUESA K N G, NISOLA G M, et al. Identification and characterization of a thermostable endolytic β -agarase Aga2 from a newly isolated marine agarolytic bacteria *Celulophaga omnivescoria* W5C[J]. New Biotechnol, 2018, 40: 261-267.
- [40] AN K, SHI X, CUI F. Characterization and overexpression of a glycosyl hydrolase family 16 beta-agarase YM01-1 from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01^T[J]. Protein Express Purif, 2018, 143: 1-8.