

文章编号 1674-7054(2018)02-0142-05

1 株高产琼脂糖酶海洋弧菌的分离与酶活性的测定

张静雅¹, 刘宇鹏², 吴超², 邓益琴³, 尹浩贤⁴, 赵哲^{2,3}

(1. 合肥市第十中学, 合肥 230011; 2. 河海大学 海洋学院, 南京 210098; 3. 中国科学院 南海海洋研究所 / 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广州 510301; 4. 广州大学 生命科学学院, 广州 510006)

摘 要 琼脂糖酶是一类糖苷水解酶, 能够催化琼脂多糖分解为低聚糖, 在食品工业、化妆品及生物医学领域等具有重要的应用价值。笔者从华南沿海海水样品中分离出 1 株海洋弧菌 HN897, 选用以琼脂为唯一碳源的培养基并通过透明圈筛选法筛选, 确定此海洋弧菌为 1 株具有琼脂酶高产能力的细菌。16S rRNA 基因序列分析结果显示, 该菌株属于弧菌属 *Vibrio astriarenae*。通过 DNS- 还原糖法对其在 2 种 TSB 和 LB2 培养液上清中的酶活性进行测定, 测得粗酶液酶活力分别为 0.366 和 0.413 U·mL⁻¹, 说明琼脂糖酶具有潜在开发利用价值。本研究结果可为后续开发研究及应用奠定基础。

关键词 海洋弧菌 琼脂糖酶 酶活力

中图分类号 P 745

文献标志码 A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2018.02.003

琼脂糖酶(Agarase)是一类糖苷水解酶, 能够催化琼脂多糖分解为低聚糖。琼脂糖是一种线性大分子, 由 D- 半乳糖和 3,6- 内醚- α -L- 半乳糖通过 α -1,3 和 β -1,4 糖苷键交替连接形成^[1]。根据所催化糖苷键的不同, 琼脂糖酶又可以分为 α - 琼脂糖酶(EC3.2.1.158) 和 β - 琼脂糖酶(EC3.2.1.81) 2 类^[2]。其中前者专一性作用于琼脂糖的 α -1,3 糖苷键, 生成了琼脂寡糖, 分别以 β -D- 半乳糖为非还原性末端和以 3,6- 内醚- α -L- 半乳糖为还原性末端的琼脂寡糖(Agaro-oligosaccharides), 而后者则特异性作用于琼脂糖的 β -1,4 糖苷键, 生成以 β -D- 半乳糖为还原性末端和以 3,6- 内醚- α -L- 半乳糖为非还原性末端的新琼脂寡糖(Neoagar-oligosaccharides)^[3]。因此, 琼脂糖酶可以帮助制备具有生物活性的琼脂寡糖, 琼脂寡糖有着抗氧化、免疫调节、降血脂等作用, 在医药领域有着广泛的应用前景。琼脂糖酶分布比较广泛, 在多种海洋物质中可以找到, 如海洋软体动物、海藻、海洋微生物和海洋沉积物, 但利用琼脂糖作为碳源的海洋微生物是琼脂糖酶生产的主要来源。海洋微生物来源的琼脂糖酶不仅种类多, 而且具有产量高、适应条件广等优点, 是琼脂糖酶研究领域的热点。自 1902 年 Gram 从海水中分离鉴定出第 1 株降解琼脂的芽孢杆菌以后, 陆续已有 20 多个种属的细菌产琼脂糖酶, 主要集中在弧菌(*Vibrio* spp)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp) 和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* spp) 等革兰氏阴性的海洋细菌中^[4-6]。目前琼脂酶的研究方法已经比较成熟, 国外研究起步较早, 已发现多种能产生琼脂酶的细菌及对应的琼脂酶, 如 AgaA, AgaB 和 AgaC 等, 研究重点已从细菌提取琼脂酶转向对琼脂酶基因进行研究并通过将该基因重组在大肠杆菌中进行原核表达以获得更多更纯净的琼脂酶^[7,8]。国内研究比较晚, 但是在国外研究的基础上, 也取得了一些突破^[9-11]。总结分析国内外当前的研究, 存在以下问题尚待解决, 一部分是 α - 琼脂酶的天然来源较少, 因此, 对 α - 琼脂酶的研究比较少; 另一部分是当前研究得出的高纯度琼脂酶相当昂贵, 琼脂酶降解琼脂生成的副产物尚未能真正广泛用于工业生产。笔者分离、鉴定了 1 株产琼脂糖酶的海洋细菌, 并对其培养上清中的酶活性进行了测定, 可为后续开发研究及应用奠定基础。

收稿日期 2017-12-31 修回日期 2018-04-09

基金项目 国家自然科学基金面上项目(41276163) 江苏省自然科学基金面上项目(BK20171431) 中央高校基本科研业务费专项资金(2017B03814)

作者简介 张静雅(1982-), 女, 大学本科。研究方向 生物学。E-mail: 94233065@qq.com

通信作者 赵哲(1980-), 男, 教授。研究方向 海洋微生物。E-mail: zhezhaoh@hhu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料 (1) 菌株 本研究筛选使用的海洋弧菌菌株来源于华南沿海地区海水样本,菌株经分离纯化后菌种保存于广东省应用海洋生物学重点实验室中。(2) 主要培养基 实验用 TCBS 培养基、TSB 培养基、LB 培养基和 TSA 培养基均购自美国 BD 公司。(3) 主要试剂：弧菌鉴定引物 16S_27F (AGAGTTTGTAT CMTGGCTCAQ) 和 16S_1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;PrimeSTAR MAX 购自宝生物工程(大连)有限公司;NaOH、D- 半乳糖、PBS 缓冲液各组分、卢戈氏碘液各组分和 3,5 二硝基水杨酸(DNS) 法各组分等生化试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 产琼脂糖酶的海洋弧菌筛选 将待筛选菌株划线于 TCBS 培养基进行复苏,30 ℃ 恒温培养 24 h。挑取单菌落,接种于含质量浓度为 15 g·L⁻¹ 的 NaCl 的 TSB 液体培养基中,于 30 ℃ 200 r·min⁻¹ 振荡培养过夜。取过夜培养的菌液 5 μL,点在含质量浓度为 15 g·L⁻¹ 的 NaCl 的 TSA 平板上,30 ℃ 恒温正置培养 24~48 h。培养后的平板用卢戈氏碘液染色,根据平板上菌落周围的凹陷情况以及染色后是否出现透明圈并测量透明圈的大小确定细菌是否具有降解琼脂糖的能力。

1.3 产琼脂糖酶的海洋弧菌分子鉴定 取过夜培养的 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,10 000 r·min⁻¹ 离心 1 min 沉淀菌体,随后使用 200 μL PBS 重悬菌体,100 ℃ 煮沸菌液 5 min,通过 1 000 r·min⁻¹ 离心 3 min 获得细菌基因组 DNA,并用作 PCR 扩增的模板。25 μL PCR 反应体系:2X PrimeSTAR Max 预混物 12.5 μL,引物 16S_27Fs 和 16S_1492Rs 各 1 μL,灭菌超纯水 9.5 μL,基因组 DNA 1 μL。PCR 扩增条件为:98 ℃ 5 min;94 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 10 s,30 个循环,最终 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物由广州擎科生物技术有限公司进行测序。将测序获得序列与其他弧菌已知 16S rRNA 基因进行比对,并使用 MEGA5 软件进行系统进化分析,确定筛选得到的产琼脂糖酶的海洋弧菌在系统发育中的地位及其种属。

1.4 粗酶液的酶活力测定

1.4.1 D- 半乳糖标准曲线的绘制 取 2 mL 离心管,编号,按表 1 往其中加入试剂,混匀后 100 ℃ 金属浴 10 min,冷水冷却至室温。再取 15 mL 离心管,将反应液全部转移到该管中并定容至 12.5 mL。用分光光度计测定波长 520 nm 下吸光值 A₅₂₀。每组做 3 个平行,取平均值。以吸光值 A₅₂₀ 为纵坐标,D- 半乳糖质量浓度(g·L⁻¹) 为横坐标,绘制标准曲线。

表 1 D- 半乳糖标准曲线中各离心管的成分
Tab.1 Ingredient list in each tube for preparing a D- galactose standard curve

编号 Code	加入试剂量 / mL		
	0.1%D- 半乳糖标准溶液 D- galactose Standard solution	超纯水 Ultrapure water	DNS 试剂 DNA agent
0	0.0	1.0	0.75
1	0.1	0.9	0.75
2	0.2	0.8	0.75
3	0.3	0.7	0.75
4	0.4	0.6	0.75
5	0.5	0.5	0.75

1.4.2 酶活力测定 在平板上挑取产琼脂糖酶的海洋弧菌单菌落,接种于含质量浓度为 15 g·L⁻¹ 的 NaCl 的 TSB 液体培养基中,于 30 ℃ 200 r·min⁻¹ 振荡培养 6 h 以活化菌株。将活化后的菌液以 1:100 接种量分别接种于新鲜的 50 mL 含质量浓度为 15 g·L⁻¹ 的 NaCl 的 TSB 液体培养基和 LB 液体培养基中,在最适生长条件下培养 36 h。分别取培养液上清经 4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后作为琼脂糖酶的粗酶液,用于测定其琼脂酶活力。根据已有酶活力测定方法^[8] 并作出改良,操作步骤如下 往 2 mL 离心管中加入 0.2% 琼脂底物 1 mL,粗酶液 1 mL,37 ℃ 水浴 60 min。反应液经 4 ℃,10 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,取 1 mL 上清液注入另一个 2 mL 离心管中,加入 0.75 mL DNS 试剂,100 ℃ 金属浴 10 min。冷水冷却至室温。再取 15 mL 离心管,

将反应液全部转移到该管中并定容至 12.5 mL,空白对照将高温灭活的粗酶液代替原始粗酶液,其他操作不变。在波长 520 nm 下测吸光值 A_{520} 。实验组做 3 个平行,取平均值。根据绘出的 D- 半乳糖标准曲线求得琼脂被降解后,半乳糖的含量。酶活力单位定义为在上述实验条件下,每分钟催化底物产生 1 μg 还原糖所需的酶量作为 1 个酶活力单位 (U)。

$$X = \frac{A \times K \times 1\,000}{1 \times 60},$$

式中 X 代表琼脂酶酶活力单位 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) ; A 代表粗酶液测得的吸光值 ; K 代表 D- 半乳糖标准曲线斜率 ; 1 000 为将 mg 换算成 μg ; 1 代表实验中加入粗酶液量 (mL) ; 60 代表反应时间 60 min。

2 结果与分析

2.1 产琼脂糖酶海洋弧菌的获得 采用透明圈筛选法,从华南沿海地区海水样本中分离的 150 株海洋弧菌进行产琼脂糖酶的筛选,从中分离到 3 株具有琼脂糖降解能力的菌株。其中,编号为 HN897 的菌株降解能力较强,该菌株在平板上形成规则的圆形菌落,表面光滑,边缘比较整齐,整体呈乳白色,同时也发现菌落周围有较明显的凹陷(图 1 A)。卢戈氏碘液染色显示,菌落周围形成较大的透明水解圈,而平板的其他地方则被染成暗红色(图 1 B)。这说明菌落周围的琼脂糖已被该菌分泌的琼脂糖酶所降解,产生具有还原性的琼脂低聚糖,不能被碘液染色。

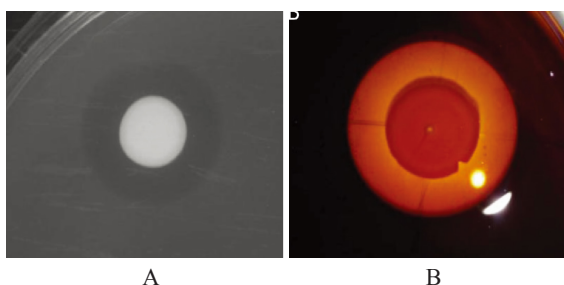


图 1 具有琼脂糖降解能力的菌株

- A. 肉眼观察 HN897 菌落周围琼脂平板凹陷 ;
B. 卢戈氏碘液染色显示菌落周围的透明水解圈

Fig.1 Strains with agarose degrading ability

- A. Concave surface on TSA plate around the HN897 colony;
B. Azone with a clear halo around the HN897 colony on the TSA plate after stained with Lugol's iodine

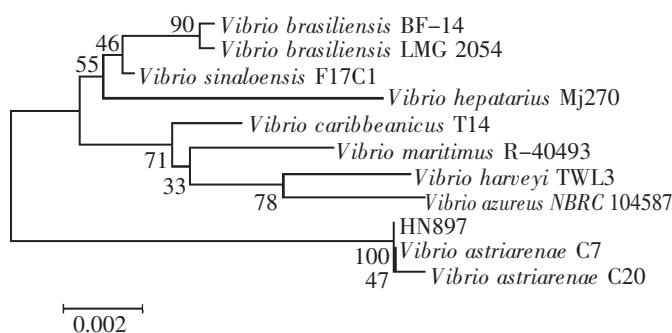


图 2 弧菌菌株 HN897 16S rRNA 基因序列系统发育树

每一分支节点上的数字为自展值,代表该进化树分支的可行度

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequences of the strain HN897 The number at each branch point represents the percentage bootstrap support

2.2 产琼脂糖酶的海洋弧菌 HN897 鉴定结果 以菌株 HN897 的基因组 DNA 为模板,16S_{27F} 和 16S_{1492R} 为引物进行 PCR 扩增,在预期大小位置扩增得到 16S rRNA 基因的单、明亮条带。将 16S rRNA 进行测序并选择 BLAST 软件将测序得到的序列与 GenBank 数据库的序列进行比对,笔者发现该菌株 16S rRNA 基因序列与其他海洋弧菌以及其他种菌株的序列相似度在 98% 以上;系统进化分析显示 HN897 与 2 株 *Vibrio astriarenae* (C7 和 C20) 单独聚为 1 枝,可信度达 100%,这说明 HN897 为 *Vibrio astriarenae* 的成员。

2.3 海洋弧菌 HN897 培养液上清具有琼脂糖酶活性 为测定海洋弧菌 HN897 在 2 种培养液中 (TSB 和 LB) 分泌的琼脂糖酶活性,笔者采用了 DNS 法测定培养液上清中的酶活力。先测定 D- 半乳糖标准曲线用于计算 DNS 反应中还原糖含量,结果如图 3 所示,标准曲线 R^2 为 0.99。将粗酶液在波长 520 nm 下测出的吸光值 A_{520} ,代入 D- 半乳糖含量标准曲线中,求得还原糖的含量,再根据方法 1.4.2 中的公式计算粗酶液的酶活力。结果如图 4 所示,测得 HN897 在 TSB 和 LB 2 种培养液上清中的粗琼脂糖酶酶活力值分别为 $0.366 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.413 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

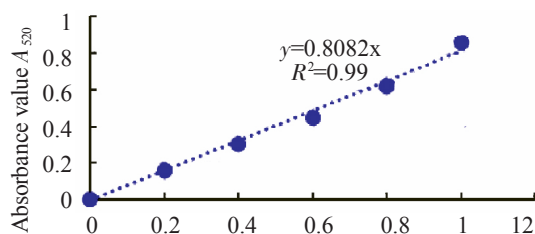


图3 D-半乳糖标准曲线

Fig 3 Standard curve of D- galactose

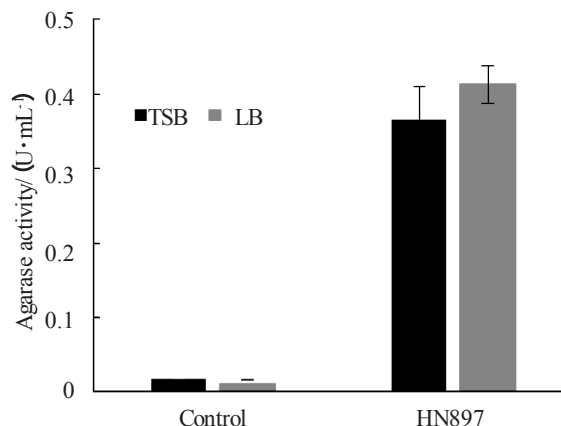


图4 弧菌 HN897 在 2 种培养液上清中的琼脂糖酶活性

Fig.4 Agarase activity on the culture supernatant of the strain HN897 in the TSB and LB mediums

3 讨论

琼脂是一种海藻多聚糖,来源比较广,可以通过石花菜等的细胞壁分离得到,包括琼脂糖和琼脂胶 2 部分。琼脂糖是一种链状分子,而琼脂胶组成比较复杂,包括了多样的多糖链,还包含有多种取代基如硫酸基、甲基等^[8]。琼脂常用于微生物实验,作为固体培养基的固化剂,亦在食品加工行业作为凝固剂及成分稳定剂。研究发现,琼脂糖在琼脂糖酶的作用下可水解成二糖、四糖、六糖、八糖等多种琼脂寡糖,琼脂寡糖具有抗氧化、免疫调节、降血脂等作用,在医疗和制药工业有较高的经济价值^[9]。除此之外,琼脂糖酶也能用于降解海藻细胞细胞壁,在制作海藻原生质体和生产海藻寡糖中发挥重要作用^[10]。

虽然琼脂糖是海洋环境中很多海洋细菌的重要碳源,但是对于弧菌属而言,应用很少^[11]。笔者采用透明圈筛选法,从一批分离于华南沿海的细菌中筛选出具有较强降解琼脂能力的海洋弧菌 HN897 株,基于 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和系统进化分析的结果显示,HN897 与 *Vibrio astriarenae* C7 和 *Vibrio astriarenae* C20 株聚为一个独立的分类枝,说明 HN897 株应为 *Vibrio astriarenae*。*Vibrio astriarenae* C7 和 *Vibrio astriarenae* C20 是在日本冲绳岛附近珊瑚礁海域分离的 2 株海洋弧菌,已被证实具有降解琼脂糖的能力^[11]。另外,在海洋弧菌 PO-303, V134 和 CN41 分离株中也发现它们具有降解琼脂糖的能力,但是它们不属于 *Vibrio astriarenae*^[6,7,13]。

DNS 法可以用于还原糖的测定,该方法操作简便且准确度高,同时可以大量地重复^[8,13]。笔者采用该方法对筛选出来的产琼脂糖酶弧菌的培养液上清进行酶活力的测定,在 2 种培养液上清(TSB 和 LB)中测出的粗酶活力分别为 $0.366 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.413 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,两者并没有明显的差别,但是相较于其他已知的琼脂糖酶,其活力相对偏低,这与培养平板上较强的凹陷很深的表型是不一致的。分析上清液中酶活力偏低原因可能有以下 2 种:(1) 实验中在培养菌株 HN897 时使用的 LB 培养液为基础培养基,不含有诱导产酶的成分,导致分泌液中的琼脂糖酶含量偏低;而在 TSA 平板培养时有琼脂诱导因而产生较多的琼脂糖酶。(2) 菌株 HN897 可能编码多种琼脂酶,但能分泌出胞外的琼脂酶产量较低,而培养液的体积较大,分泌后会较大倍数的稀释,进而在测定培养液上清中的琼脂糖酶活力较小。但是,若要通过发酵提取该菌足够酶活力的琼脂酶,对其培养条件仍有待更进一步的探究。此次实验,笔者通过筛选获得 1 株具有降解琼脂糖能力的海洋弧菌,并通过酶活测定其显示具有潜在应用价值,在后续研究中将通过一系列分子生物学和基因工程手段对其琼脂糖酶的特性、分泌机制等进行深入研究,并通过体外表达等方法制备活力强、纯度高的酶制品。

参考文献:

- [1] Duckworth M, Yaphe W. The structure of agar: Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides [J]. Carbohydrate Research,

- 1971, 16 (1) :189-197.
- [2] Xiao T F, Sang M K. Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications [J]. Marine Drugs, 2010, 8 (1) :200-218.
- [3] Liao L, Xu X W, Jiang X W, et al. Cloning, expression, and characterization of a new β -agarase from *Vibrio* sp. Strain CN41 [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77 (19) :7077.
- [4] Oh Y H, Jung C, Lee J. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 21 (8) :818.
- [5] Kang N Y, Choi Y L, Cho Y S, et al. Cloning, expression and characterization of a beta-agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK38 [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25 (14) :1165-1170.
- [6] 朱磊, 薛永常. 琼胶酶学研究进展 [J]. 生命的化学, 2016 (2) :193-197.
- [7] Zhang W W, Sun L. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134. [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73 (9) :2825-2831.
- [8] 付万冬. 高产琼胶酶菌株的筛选、发酵条件优化及琼胶酶学性质的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [9] Chi W J, Chang Y K, Hong S K. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 94 (4) :917-930.
- [10] 朱英莲. 琼脂酶产生菌发酵产酶条件优化 [J]. 食品科技, 2015 (6) :11-13.
- [11] Maciá n M C, Ludwig W, Schleifer K H, et al. *Vibrio agarivorans* sp. nov. a novel agarolytic marine bacterium. [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2001, 51 (6) :2031-2036.
- [12] Jinhua Dong, Yutaka Tamaru, Toshiyoshi Araki. A unique β -agarase, AgaA, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74 (6) :1248-1255.
- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31 (3) :426-428.

Isolation and Enzyme Activity Assay of An Agarase-producing *Vibrio* sp. Strain

ZHANG Jingya¹, LIU Yupeng², WU Chao², DENG Yiqin³, YIN Haoxian⁴, ZHAO Zhe^{2,3}

(1. Hefei Tenth Middle School, Hefei, Anhui, 230011, China; 2. College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210098, China;

3. Key Laboratory of Applied Marine Biology of Guangdong Province/ South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4. College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Agarases are the enzymes which catalyze the hydrolysis of agar. They have wide applications in food industry, cosmetics, and medical fields since they produce oligosaccharides with remarkable enzyme activities. A *Vibrio* sp. strain, named HN897, was isolated from seawater samples in the South China coastal area using TCBS agar plate. This strain was identified as an agarase-producing bacterium by observation of clear zones around the colonies using agar as the sole carbon source. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene shows that the agar-degrading bacterium HN897 belongs to the member of the genus *Vibrio* and is close to *Vibrio astriarenae*. The agarase activity of the strain was determined by using reducing dinitrosalicylic acid method (DNS method), and the agarase activities of the crude enzymes in the supernatant of HN897 culture of the TSB and LB mediums were $0.366 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.413 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, indicating that this strain has potential applications in the production of agaro-oligosaccharide.

Keywords: *Vibrio* sp. ; strain ; agarase ; enzyme activity

(责任编辑: 钟云芳)