

## 假海源菌 ZJCN121 岩藻多糖酶的纯化及其性质

赵先朋<sup>1</sup>, 吴茜茜<sup>1</sup>, 蔡敬民<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 合肥学院生物与环境工程系, 合肥 230601)

**摘要:** 液态发酵培养假海源菌 ZJCN121, 粗酶液经过丙酮沉淀和 Sephadex G-100 柱层析分离纯化得到回收率为 13.5%, 纯化倍数为 21.8, 比活为 20.59 IU·mg<sup>-1</sup> 的电泳纯岩藻多糖酶。采用 SDS-PAGE 电泳和 EIF-PAGE 电泳, 分别测得酶的相对分子质量为 60.2 kDa、等电点为 4.3。该酶的最适反应温度为 50℃, 最适 pH 为 6.5。其催化 *Fucus vesiculosus* 岩藻多糖的  $K_m$  为 5.87 mg·mL<sup>-1</sup>,  $V_{max}$  为 6.11 g·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。Ca<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>对酶稍有激活作用, Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>则强烈抑制酶活, Mn<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>也在一定程度上抑制酶活性, Mg<sup>2+</sup>对酶的作用效果不明显。

**关键词:** 假海源菌; 岩藻多糖酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0833-05

### Purification and characterization of fucoidanase from *Pseudidiomarina* ZJCN121

ZHAO Xian-peng<sup>1</sup>, WU Qian-qian<sup>1</sup>, CAI Jing-min<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Biological and Environmental Engineering, Hefei College, Hefei 230601)

**Abstract:** *Pseudidiomarina* ZJCN121 was cultured by liquid state fermentation. Crude enzyme liquid was separated and purified through acetone precipitation and Sephadex G-100 chromatography with a final fucoidanase purification of 21.8-fold and a specific activity of 20.59 IU/mg and an overall yield of 13.5%. The purified enzyme was identified with molecular mass of 60.2 kDa and isoelectric point of pH 4.3 by SDS-PAGE and EIF-PAGE, respectively. The optimum temperature was 50°C and the optimum pH 6.5.  $K_m$  and  $V_{max}$  for *Fucus vesiculosus* fucoidan were 5.87 mg·mL<sup>-1</sup> and 6.11 g·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, respectively. The fucoidanase was lightly activated by Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup>, and strongly inhibited by Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Its activity also was inhibited by Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, while unaffected by Mg<sup>2+</sup>.

**Key words:** *Pseudidiomarina*; fucoidanase; purification; enzymatic characterization

岩藻多糖又被称为褐藻多糖硫酸酯, 可以从褐藻中获得。研究证明岩藻多糖具有一定的生物学活性, 例如: 抗凝血, 抗病毒, 抗肿瘤, 抗氧化等<sup>[1]</sup>。天然的岩藻多糖是一种独特结合硫酸基团的大分子水溶性多聚糖。由于其分子量大, 而不能被广泛的应用于临床医药、保健和食品领域中。因此, 通过降解天然大分子量岩藻多糖来制备具有多种生理功能的低分子量岩藻多糖(LMWF)成为近年来的研究热点, 被学者们广泛研究, 并取得一定的进展。

目前, 常用于制备 LMWF 的方法有化学法和酶解法。前者反应激烈, 产物 LMWF 的分子量难

以控制。酶解法因具有催化效率高, 底物专一性强, 反应条件温和, 产物不易被破坏、被污染、易于提取纯化等优点, 所以成为生产 LMWF 的一条有效途径并受到重视<sup>[2-3]</sup>。

岩藻多糖酶可来源于海洋软体动物、海洋微生物, 但由海洋软体动物来源的岩藻多糖酶产量较低、提取困难且满足不了实验和生产的需要。微生物因具有发酵周期短、生长条件简单、分布广泛等特点而成为岩藻多糖酶的重要来源<sup>[4]</sup>。目前, 国内对该酶的研究主要集中在产酶菌株的筛选及发酵上, 对酶的纯化研究较少, 纯化效果并不理想。笔者对自

收稿日期: 2013-04-19

基金项目: 安徽省教育厅(2006KJ189B)和安徽省人才开发资金共同资助。

作者简介: 赵先朋, 女, 硕士研究生。E-mail: zxp1986cool@163.com

\* 通信作者: 蔡敬民, 男, 博士, 教授。E-mail: caijingmin@hfu.edu.cn

行筛选出的海洋细菌假海源菌进行了液态发酵产酶,通过丙酮沉淀和 Sephadex G-100 层析柱对粗酶液进行了分离纯化,并对纯化后的酶的部分性质进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

自行分离筛选的霍米海角假海源菌 ZJCN121 (分离自浙江苍南海域,经 16SrDNA 基因测序鉴定为 *Pseudidiomarina* sp.)

### 1.2 培养基和培养条件

种子培养基: LB, 以人工海水配制。

产酶培养基: 麸皮 2.7 g, 岩藻多糖 0.6 g, 葡萄糖 0.43 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, 以人工海水定容至 1 L, pH 6.5。

### 1.3 材料

*Fucus vesiculosus* 岩藻多糖, 标准蛋白, 考马斯亮蓝 G-250 购买于 Sigma 公司; 岩藻糖购买于德国 Merk 公司; 葡聚糖 G-100 购买于上海锐聪科技发展有限公司; 其他试剂为分析纯。

### 1.4 仪器

752 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器股份有限公司; DYY-6C 型电泳仪, DYCZ-24DN 型迷你双垂直电泳槽, DYC-2TA 型圆盘电泳槽, 北京六一仪器厂; Z 型系列层析柱, 上海锦华实验器械厂。

### 1.5 方法

**1.5.1 培养条件** 将斜面保存的菌种活化后, 接入 100 mL 的 LB 液态培养基中, 于 37℃ 下摇床培养 1 d, 然后以 3% 的接种量接入到 250 mL 三角瓶装液量为 100 mL 的产酶液态培养基中, 在 20℃ 的恒温摇床中以 150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  的转速培养 24 h 后, 用 4 层纱布过滤收集发酵液, 将过滤后发酵液于 5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min 去除沉淀, 上清液即为粗酶液。

**1.5.2 纯化** 1) 丙酮沉淀: 向粗酶液中加入 20℃ 冰箱预冷的丙酮, 至丙酮的终浓度为 50%, 静置 10 min 后, 5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 收集沉淀, 复溶于 4℃ 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液 (pH 6.5) 中, 再于 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min 至溶液变透明为止。冷冻干燥后, -20℃ 下保存。

2) Sephadex G-100 柱层析: 将层析柱 (2.6×100 cm) 装好, 用 3~5 倍体积的磷酸缓冲液平衡后, 取 10 mL 酶液上样, 用同一缓冲液洗脱。洗脱速度为每 25 min 一管, 每管 7 mL, 对收集液同时进行

紫外吸收值 ( $A_{280}$ ) 和岩藻多糖酶活力测定, 收集有酶活力的部分。冷冻干燥后, -20℃ 下保存<sup>[5]</sup>。

**1.5.3 蛋白质含量测定** 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 采用 Bradford 法测定蛋白质含量<sup>[6]</sup>。

**1.5.4 岩藻多糖酶活力测定** 采用经典的 DNS 法。取 0.1 mL 的酶液, 加入到 1 mL 1% *Fucus vesiculosus* 岩藻多糖中, 置于 50℃ 的恒温水浴振荡器中反应 10 min, 加入 DNS 试剂 (3 mL) 终止反应, 再于 100℃ 下水浴煮沸 10 min, 立即用流动水冷却, 加入 16.4 mL 的蒸馏水, 摇匀后, 并以灭活的等量酶液作为对照, 用 752 型紫外-可见分光光度计测定波长为 550 处的吸光值<sup>[7]</sup>。

酶活力单位定义为: 每分钟水解 *Fucus vesiculosus* 岩藻多糖产生 1  $\mu\text{mol}$  岩藻糖定义为 1 个酶活力单位。

**1.5.5 岩藻多糖酶的分子量测定** 采用 SDS-PAGE 电泳对纯酶进行相对分子量的测定。分离胶 12%, 浓缩胶 3%, 120 V 恒压电泳 4 h。考马斯亮蓝 R-250 染色至少 4 h, 脱色过夜<sup>[8]</sup>。

**1.5.6 岩藻多糖酶的等电点测定** 用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定岩藻多糖酶的等电点。正极电泳液为 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 负极电泳液为 2% NaOH, 先调电压到 100 V, 待稳定后升至 300 V, 电泳 3 h 以上至电流为零。考马斯亮蓝 R-250 染色 1~2 h, 7% 醋酸脱色<sup>[9]</sup>。

**1.5.7 岩藻多糖酶性质** 岩藻多糖酶最适反应温度及温度稳定性。在不同的温度下 (40~65℃), 分别测定酶活力。设最高酶活力为 100%, 计算各温度下的相对酶活力。温度稳定性测定: 将酶在上述各温度下分别保温 2 h, 迅速冷却后测定酶活性。以未经热处理的酶液活力设为对照。

岩藻多糖酶最适反应 pH 及 pH 稳定性。在最适反应温度下, 分别测定不同 pH 下的岩藻多糖酶力。设最高酶活力为 100%, 计算各 pH 条件下的相对酶活力。所用  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液的 pH 值分别为 5.5、6、6.5、7、7.5 和 8。pH 稳定性的测定: 将酶液分别置于上述不同 pH 的缓冲液中, 室温水浴静置 2 h 后, 测定各自酶活力。以未经热处理的酶液活力设为对照。

不同金属离子对岩藻多糖酶活性的影响。将酶分别置于 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的不同金属离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Li}^{2+}$ ) 溶液中, 室温静置 1 h 后, 分别测定酶活性。以未作处理的酶活为 100%, 得出其他经处理的相对酶活性。

岩藻多糖酶的反应动力学研究。采用

Lineweaver-Burk 法, 测定岩藻多糖酶的动力学常数。配置不同浓度的岩藻多糖底物, 于最适反应条件测定酶活, 计算酶促反应速度。

## 2 结果与分析

### 2.1 Sephadex G-100 柱层析

Sephadex G-100 柱层析的洗脱图谱见图 1 所示。

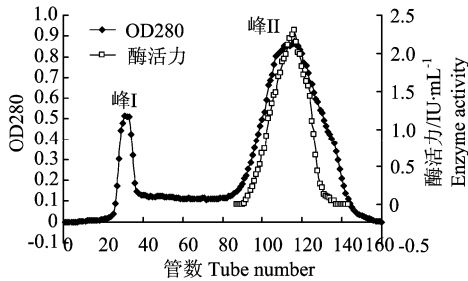


图 1 岩藻多糖酶 Sephadex G-100 层析图  
Figure 1 Gel filtration column chromatography

由图 1 可知, 粗酶液有两处蛋白吸收峰, 峰 I

没有酶活力, 为杂质蛋白; 峰 II 有较高的酶活力, 是岩藻多糖酶吸收峰, 主要集中在第 100~125 管。杂蛋白先于岩藻多糖酶洗脱下来, 说明杂蛋白的相对分子量大于岩藻多糖酶的相对分子量。将有酶活力的部分收集, 透析脱盐后, 冷冻干燥,  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 2.2 纯化效果

经过两步纯化后, 粗酶液提纯了 21.80 倍, 比活力为  $20.59 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 回收率为 13.50%。结果见表 1。

### 2.3 岩藻多糖酶性质

**2.3.1 岩藻多糖酶的相对分子量测定** 纯化后的酶经过 SDS-PAGE 电泳后, 得到一条清晰的条带 (如图 2), 说明纯化效果较佳, 已达到电泳纯度。以标准蛋白的相对迁移率 ( $R_f$ ) 为横坐标, 相对分子量的对数值 ( $\lg M_r$ ) 为纵坐标绘制标准曲线 (如图 3)。根据目标蛋白的相对迁移率, 从标准曲线上查出其分子量大小为 60.2 kDa。

表 1 岩藻多糖酶的提纯结果

Table 1 Summary of purification of fucoindanase

提纯步骤 Purification	总蛋白/mg Total protein	总酶活/IU Total enzyme activity	比活/ $\text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ Specific activity	提纯倍数 Purification multiple	收率/% Field coefficient
粗酶液 Crude enzyme	8 170.8	916.90	0.110	1.00	100.00
丙酮沉淀 Acetone precipitation	395.9	373.73	0.944	8.58	40.76
Sephadex G-100	2.45	50.45	20.59	21.80	13.50

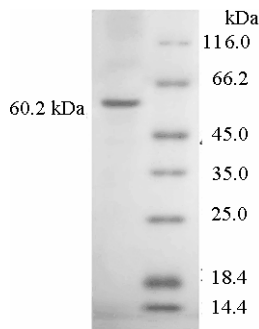


图 2 SDS-PAGE 电泳图谱  
Figure 2 SDS-PAGE of purified fucoindanase

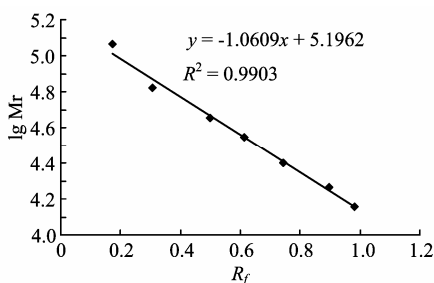


图 3 标准蛋白迁移率对数曲线  
Figure 3 Logarithm course of standard protein



图 4 岩藻多糖酶等点凝胶电泳  
Figure 4 IEF-PAGE of fucoindanase

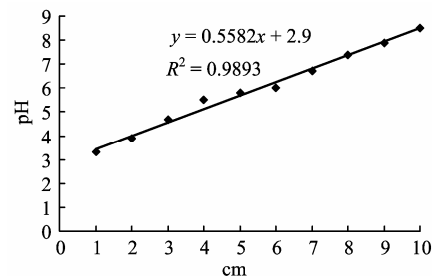


图 5 凝胶标准 pH 梯度曲线  
Figure 5 Gradient course of standard pH of gelatin

**2.3.2 岩藻多糖酶的等电点测定** 用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定岩藻多糖酶的等电点。聚焦后的蛋白条带位置如图 4 所示, 从绘制的凝胶标准 pH 梯度曲线上可以得出酶的等电点为 4.3, 偏酸性。

**2.3.3 岩藻多糖酶的最适反应温度及温度稳定性** 在不同温度下测定岩藻多糖酶活力, 分别研究酶的最适反应温度和温度稳定性(见图6)。结果所示: 随着温度的上升酶活升高, 至50℃达到最高, 随后温度升高, 酶活迅速下降, 表明酶的最适反应温度为50℃。保温2h后的酶, 随着温度的升高, 酶活力损失增多。在63℃时, 酶活力损失一半, 即酶的半失活温度为63℃。

**2.3.4 岩藻多糖酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性** 在不同 pH 下测定岩藻多糖酶活力, 分别研究酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性(见图7), 结果显示。随着 pH 的上升酶活逐渐升高, 到6.5时达到最高, 随后迅速下降, 表明酶的最适反应 pH 为6.5。酶的 pH 稳定性曲线表明, 在最适 pH 下, 酶的稳定性最高。pH 的稳定区间为6.2~7.0, 在此区间内的酶活可保持在90%以上。

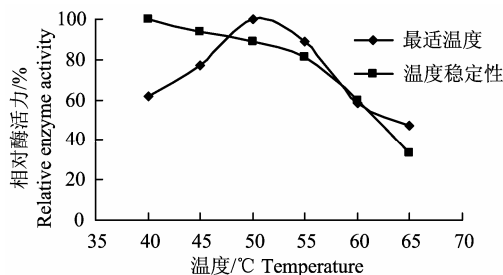


图6 温度对岩藻多糖酶的影响

Figure 6 Effects of temperature on fucoidanase

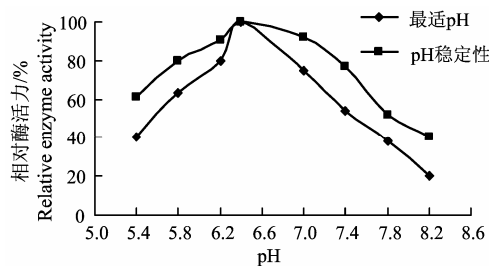


图7 pH对岩藻多糖酶的影响

Figure 7 Effects of pH on fucoidanase

**2.3.5 不同金属离子对岩藻多糖酶活性的影响** 分别用等量  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  不同的金属离子处理纯化过的岩藻多糖酶, 然后在最适条件下测定酶活力, 以未处理的酶活作为对照(CK), 考察各离子对酶活力的影响。与对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果如图8所示:  $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Ba}^{2+}$ 对酶活力稍有促进作用, 而 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 则强烈抑制酶活,  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 对酶活也有一定的抑制作用,  $\text{Mg}^{2+}$ 几乎不影响酶活。

**2.3.6 岩藻多糖酶的反应动力学研究** 酶分别与不同浓度(0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1%)的 *Fucus vesiculosus* 岩藻多糖底物在最适条件反应。测定各浓度下的酶活力, 并计算出酶的反应速度, 按照 Lineweaver-Burk 法, 以  $1/[S]$  为横坐标,  $1/V$  为纵坐标作图, 结果如图9所示。从得出的回归方程中计算得出纯酶的  $K_m$  值为  $5.87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $V_{\max}$  为  $6.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

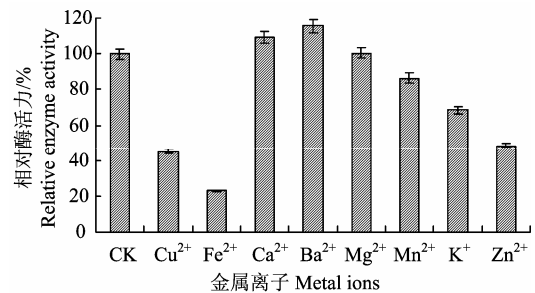


图8 金属离子对岩藻多糖酶活力的影响

Figure 8 Effects of metal ions on fucoidanase

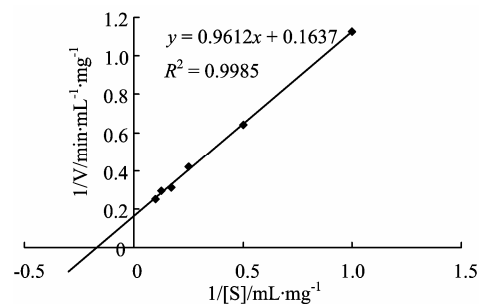


图9 岩藻多糖酶 Lineweaver-Burk 图

Figure 9 Lineweaver-Burk plot of fucoidanase

### 3 讨论

假海源菌 ZJCN121 岩藻多糖酶经过丙酮沉淀和 Sephadex G-100 柱层析后, 去除全部杂质, 得到电泳纯的岩藻多糖酶, 酶的纯化倍数为 21.8, 回收率为 13.5%, 并用 SDS-PAGE 电泳测得酶的相对分子质量为 60.2 kDa。采用 EIF-PAGE 电泳测得酶的等电点为 4.3, 偏酸性。

酶的部分性质研究结果表明: 岩藻多糖酶的最适反应温度为 50℃, 半失活温度为 63℃; 最适反应 pH 为 6.5, 稳定区间为 6.2~7.0, 在此区间内的酶有较高活性。在浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的金属离子存在时,  $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Ba}^{2+}$ 对酶有轻微的激活作用,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 则强烈抑制酶活,  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 也在一定程度上抑制酶活性,  $\text{Mg}^{2+}$ 对酶的作用效果不明显。

研究结果与已报道的相比较, 酶的相对分子质

量、最适反应温度、最适 pH 值、与金属离子的作用效果等均有差异。吴茜茜<sup>[1,10]</sup>报道了海洋真菌 *Dendryphiella Arenaria* TM94 和 *Fusarium* sp. LD8 岩藻多糖酶的相对分子量质量分别为 180 kDa 和 64 kDa, 与底物反应的最大速度分别为  $6.56 \text{ g}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  和  $2.02 \text{ g}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 及  $K_m$  分别为  $6.55 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $8.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但是测得这 2 种不同来源的该酶的最适反应温度均为  $50^\circ\text{C}$ , 这与本实验的结果相同。Descamp<sup>[11]</sup>研究了海洋细菌 *Flavobacteriaceae* 岩藻多糖酶的最适反应温度为  $20\sim 25^\circ\text{C}$ , 最适 pH 为 7.5。Sakai<sup>[12]</sup>研究表明海洋细菌 *Alteromonadacea* 岩藻多糖酶的最适反应温度为  $30\sim 35^\circ\text{C}$ , 最适 pH 为 6.5~8.0。马爽<sup>[9]</sup>研究不同金属离子与海洋镰孢霉岩藻多糖酶作用 1 h 时, 发现  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  对酶有一定的激活作用,  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  略有抑制作用。可见不同来源的岩藻多糖酶的性质部分存在较大差异。这可能与酶自身的不同生理功能有关, 也可能与在研究中所用酶反应底物和实验室处理条件不同有关。

#### 参考文献:

- [1] Wu Q Q, Ma S, Xiao H R, et al. Purification and the secondary structure of fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8 [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 8: 196-190.
- [2] 刘颖, 张敏, 吴茜茜, 等. 岩藻多糖研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 146-155.
- [3] 王春霞, 段高飞, 唐庆娟, 等. 细菌 *Flavobacteriaceae* sp. CZ1127 产海参岩藻聚糖硫酸酯酶的发酵条件优化 [J]. 现代食品科学, 2011, 27(3): 332-336.
- [4] 单瑞芬, 吴茜茜, 蔡敬民. 岩藻多糖降解酶的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(19): 9996-9997.
- [5] 张袁. 温特曲霉 PZ322 产岩藻多糖酶的液态发酵条件研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [7] 张袁. 温特曲霉 PZ322 产岩藻多糖酶的液态发酵条件研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [8] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 马爽. 海洋镰孢霉岩藻多糖酶的制备、酶学性质及表征 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007.
- [10] Wu Q Q, Zhang M, Wu K, et al. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94[J]. J Appl Phycol, 2011, 23: 197-203.
- [11] Descamps V, Colin S, Lahaye M, et al. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8: 27-39.
- [12] Sakai T, Kawai T, Kato I. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 335-346.