

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200427001

http://www.yykxjz.cn/

张文彬, 白露, 刘彬, 王朋梅, 莫照兰, 李杰. 海洋细菌来源低温褐藻胶裂解酶的分泌表达和酶学性质研究. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 117-124

ZHANG W B, BAI L, LIU B, WANG P M, MO Z L, LI J. Secretary expression and enzymatic properties of low-temperature-adapted alginate lyase from marine bacteria. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 117-124

海洋细菌来源低温褐藻胶裂解酶的 分泌表达和酶学性质研究*

张文彬^{1,2#} 白露^{1,2#} 刘彬³ 王朋梅² 莫照兰⁴ 李杰^{2①}

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 国家水生动物病原库 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;

3. 青岛市精神卫生中心 山东 青岛 266034; 4. 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003)

摘要 为了筛选稳定性较好的低温褐藻胶裂解酶,本研究进行了海洋细菌分离鉴定、酶的编码基因克隆与分析、酶分泌表达与纯化、不同因素对酶活力和稳定性的影响以及酶解产物分析实验。结果显示,用以褐藻胶为唯一碳源的平板,筛选出一株能分泌低温褐藻胶裂解酶的海洋细菌 SJ-H-12,基于 16S rDNA 序列构建进化树,该菌株鉴定为 *Yangia* sp. SJ-H-12。进而克隆酶的编码基因 *Alyya*, *ALYYA* 属于 PL5 家族褐藻胶裂解酶。将基因在食品级宿主解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)中进行分泌表达,重组 *ALYYA* 的活力达到 34.2 U/mL,分子量约为 39.0 kDa,具有较强的 PolyM 偏好性。*ALYYA* 在 25°C~35°C 时表现出 80% 以上的活力,且在 30°C 时表现出最高活力;在 pH 为 5.0~10.0 的范围内稳定性较好,孵育后剩余超过 60% 的活力;0~2.0 mol/L 的 NaCl 能明显激活 *ALYYA* 的活力。*ALYYA* 降解褐藻胶的产物主要是二糖,另有少部分单糖和三糖,该酶是一种内切褐藻胶裂解酶。综上所述,本研究筛选到一株产低温褐藻胶裂解酶细菌,所产 *ALYYA* 是典型的低温褐藻胶裂解酶,具有优良的酶活力和稳定性。本研究为低温褐藻胶裂解酶的筛选和开发利用提供了参考数据。

关键词 褐藻胶裂解酶;分泌表达;编码基因;pH 稳定性

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0117-08

褐藻生物量巨大,生长速度较快,被视为最有前景的生物资源之一(Flórez-Fernández *et al*, 2019)。褐藻含有多种生物活性物质,如褐藻胶、岩藻聚糖、岩藻黄质、甘露醇、多酚和植物激素等(Li *et al*, 2019a; Sharma *et al*, 2014、2016)。其中,褐藻胶约占褐藻干物质的 22%~44% (w/w),是褐藻细胞壁的主要成分(Wargacki *et al*, 2012)。

褐藻胶是一种线性聚合物,由 β -d-甘露糖醛酸(M)和 α -1-古罗糖醛酸(G)作为单体单元组成。单体通过 1,4-糖苷键以不同顺序结合,构成聚古罗糖醛酸片段(PolyG)、聚甘露糖醛酸酯片段(PolyM)和杂聚物片段(PolyMG)(Wong *et al*, 2000)。褐藻胶裂解酶能切断褐藻胶的 1,4-糖苷键,在相对温和和可控的条件下,将褐藻胶水解成褐藻寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)

* 国家藻类产业技术体系(CARS-50)资助 [This work was supported by National Algae Industry Technology System (CARS-50)]. #共同第一作者,张文彬, E-mail: zbzwb1996@163.com; 白露, E-mail: bailubai@163.com

① 通讯作者: 李杰, 副研究员, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-04-27, 收修改稿日期: 2020-07-06

(Li *et al.*, 2019b)。AOS 具有抗氧化、抗肿瘤和抗凝血等生理活力, 在医疗健康相关领域具有潜在的应用(孙丽萍等, 2005; Iwamoto *et al.*, 2003; 辛现良等, 2001; Lin *et al.*, 2007)。此外, AOS 对植物根系发育具有显著的促进作用(Xu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014)。

多种海洋细菌可以产生褐藻胶裂解酶, 包括链霉菌(*Streptomyces* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、沙门氏菌(*Salmonella* sp.)、黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和弧菌(*Vibrio* sp.)等(Chen *et al.*, 2016; Inoue *et al.*, 2016; Jagtap *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Schiller *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2013)。为了提高褐藻胶裂解酶的活力, 研究者克隆了多种褐藻胶裂解酶的编码基因并进行重组表达(He *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020)。其中, 低温褐藻胶裂解酶受到广泛关注。在低温条件下, 植物激素等活性物质的不稳定性能够得到控制, 并且低温催化具有低污染风险和低能耗的优势(Gao *et al.*, 2018)。但由于低温酶通常稳定性差且活力低, 已报道的褐藻胶裂解酶并不能满足工业要求。因此, 需要筛选出符合工业应用需求的、具有鲁棒性的低温褐藻胶裂解酶。

本研究筛选到的海洋细菌 *Yangia* sp. SJ-H-12 能在低温条件下分泌褐藻胶裂解酶, 克隆褐藻胶裂解酶编码基因 *Alyya* 并在食品级真核宿主解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)中表达, 分泌的褐藻胶裂解酶 ALYYA 具有较好的温度稳定性和 pH 稳定性, 可以适应不同盐度, 并可制备较低分子量的寡糖, 说明 ALYYA 可以成为褐藻胶降解的有效工具。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

褐藻胶购自明月海藻集团(青岛)。PolyM 和 PolyG 购自青岛博智汇力生物技术有限公司。分泌表达采用解脂耶氏酵母系统, URA⁻菌株和表达载体 pINA1312 由中国海洋大学池振明教授提供。在以褐藻胶为单一碳源的 ASC(褐藻酸唯一碳源培养基, alginate as sole carbon source)固体培养基中筛选和培养产褐藻胶裂解酶的菌株。ASC 培养基包含 10 g/L 褐藻胶钠、5.0 g/L (NH₄)₂SO₄、1.0 g/L MgSO₄·7H₂O 和 0.1 g/L FeSO₄, 海水配制。在含有 1.7 g/L 酵母基础氮源、10.0 g/L 葡萄糖、5.0 g/L (NH₄)₂SO₄ 和 25.0 g/L 琼脂的 YNB 板上筛选解脂耶氏酵母转化子(Madzak *et al.*, 2015)。GPPB 培养基用于重组酶生产, 包含 30.0 g/L 葡萄糖、1.0 g/L (NH₄)₂SO₄、2.0 g/L 酵母提取物、2.0 g/L KH₂PO₄、3.0 g/L K₂HPO₄ 和 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, pH

为 6.8。2216E 培养基包含 1.0 g/L 酵母提取物、5.0 g/L 蛋白胨、0.01 g/L 磷酸铁和 20.0 g/L 琼脂, 海水配制。

1.2 产褐藻胶裂解酶菌株的筛选

对采集的绿烂海带(*Saccharina japonica*)样品使用无菌海水清洗 3 次, 加 0.5 mL 无菌海水研磨成匀浆液, 稀释涂布在 ASC 平板, 放置于 20℃培养 7 d。平板上分离得到的菌株转移至 ASC 液体培养基中, 并在 20℃下培养 48 h, 发酵液以 5000×g 离心。以 0.5%(w/v)褐藻胶溶液作为底物, 采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法检测褐藻胶裂解酶活力, 1 U 酶活力定义为 1 min 产生 1 μmol 还原糖所需酶量(褚洪蕊等, 2008)。分离得到的菌株在含 30%甘油的 2216E 保种液中-80℃保藏。

1.3 菌种鉴定

产褐藻胶裂解酶菌株于 2216E 液体培养基中培养 2~3 d。从每个培养基取 1 mL 菌液离心, 取菌体, 95℃保温 5 min, 破碎细胞释放细菌 DNA, 作为 PCR 模板 DNA, 用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')扩增细菌的 16S rDNA。对菌株的 16S rDNA 进行测序。通过 BLAST, 与其他 16S rDNA 序列进行比较。使用 MEGA 7.0 软件根据 Neighbor-Joining 的方法构建系统发育树。

1.4 褐藻胶裂解酶 ALYYA 的生物信息学分析

SJ-H-12 菌株基因组 DNA 已完成测序和注释(诺禾致源)。序列分析显示, 基因组中存在 1 个潜在的褐藻胶裂解酶基因, 大小为 1113 bp。使用 SignalP 4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)分析信号肽; 在保守域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)中进行结构域分析; 在线预测理论 pI 和 MW(http://web.expasy.org/compute_pi/)。基于报道的褐藻胶裂解酶, 使用 MEGA 7.0 软件根据 Neighbor-Joining 的方法构建系统发育树。

1.5 ALYYA 的分泌表达与纯化

对 *Alyya* 基因进行密码子优化, 连接 XPR2 信号肽基因(Synbio Technologies, 中国)。合成的 DNA 片段连接 pINA1312 质粒, 用于转化 URA⁻菌株。在 GPPB (glucose in phosphate buffer)液体培养基中 30℃培养 84 h, 检测到阳性转化子的褐藻胶裂解酶活力。将菌株 M34 上清液调节 pH 为 7.5, 然后加至 Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare, 美国)。将 ALYYA 酶连接至凝胶, 用咪唑溶液洗涤。用 12%(w/v)凝胶 SDS-PAGE 验证 ALYYA 的纯度和分子量。以 polyM、polyG

和褐藻胶为底物, 研究 ALYYA 的底物偏好性。

1.6 温度和 pH 对 ALYYA 活力和稳定性的影响

在温度为 10℃~60℃、pH=8.0 的 10 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液中进行 ALYYA 催化水解反应。检测活力以确定最佳反应温度。为评估 ALYYA 的热稳定性, 将纯化的 ALYYA 在 10℃~60℃下孵育 12 h, 然后在 35℃下测量剩余活力。在不同 pH 的 10 mmol/L 缓冲液[Na₂HPO₄-柠檬酸(pH 3.0~8.0), 甘氨酸-NaOH (pH 8.5~11.0)]中, 制备褐藻胶溶液作为底物。使用这些褐藻胶溶液测定酶活力以确定最佳反应 pH。通过估计在不同 pH 的缓冲液中于 4℃孵育 12 h 后剩余的酶活力来检测 pH 的稳定性。所有反应均重复 3 次。

1.7 NaCl 对 ALYYA 活力的影响

配制 0.5%(w/v)的褐藻胶溶液(pH 8.0), 分别加入不同量的 NaCl。以不同盐度的褐藻胶溶液为底物, 加入等量的 ALYYA, 在 35℃下测定酶活力, 研究 NaCl 对 ALYYA 活力的影响。

1.8 酶解产物的分析

将纯化的 ALYYA (40 U)加入 10 mL、pH 8.0 的 0.5%(w/v)褐藻胶溶液中, 35℃下反应 40 min。每 5 min 检测黏度和 235 nm 的吸光度。当黏度和吸光度均稳定时, 将降解产物脱盐并通过 ESI-MS 确定聚合度 (DP)。

2 结果与讨论

2.1 产低温褐藻胶裂解酶菌株的筛选

从绿烂海带中共分离得到 46 株海洋细菌。其中, 7 个菌株 20℃下能在 ASC 平板上生长, 说明这些菌株能够产生低温褐藻胶裂解酶。SJ-H-12 菌株在液体 ASC 培养基中能分泌最高活力的褐藻胶裂解酶, 达到 2.44 U/mL。在 2216E 平板上, 菌株 SJ-H-12 的菌落光滑且不透明, 呈乳黄色, 圆形菌落边缘整齐(图 1a); 显微镜下, 该菌株呈不规则球形(图 1b)。Blast 比对分析发现, 其 16S rDNA 序列与海洋细菌 *Yangia* 属相似度最大。聚类分析表明, 菌株 SJ-H-12 与 *Yangia* sp. CDJ15B-A02 在同一分支上(图 2)。综合 Blast 和系统发育树的结果, 认为 SJ-H-12 属于 *Yangia* 属, 命名为 *Yangia* sp. SJ-H-12。

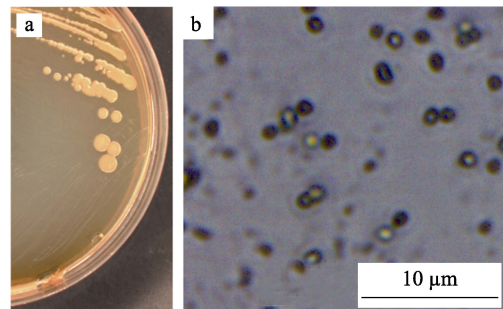


图 1 SJ-H-12 菌株的平板菌落形态(a)和细胞形态(b)
Fig.1 Plate colony (a) and cell (b) morphology of SJ-H-12 strain

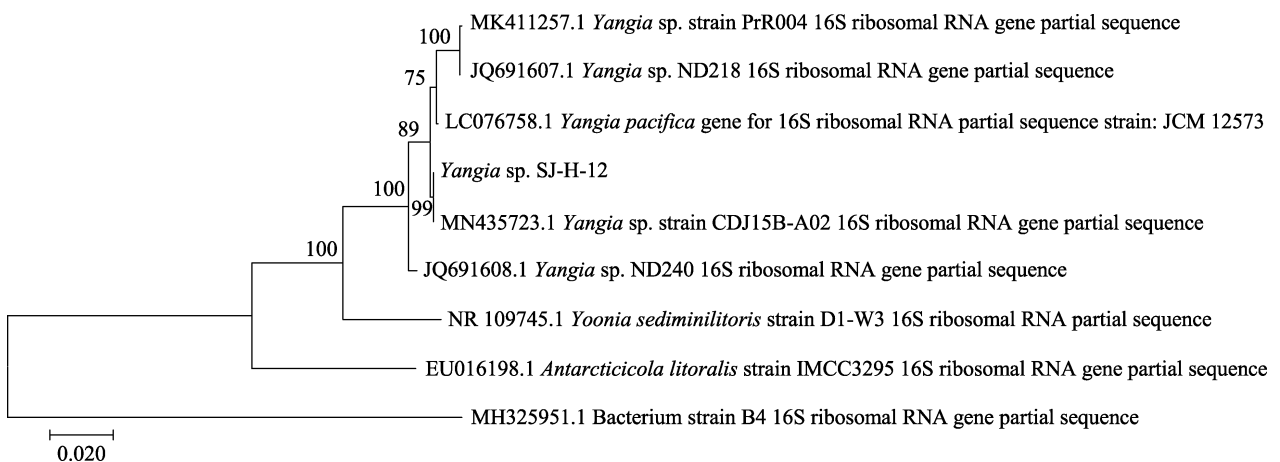


图 2 基于 16S rDNA 序列以 Neighbor-Joining 的方法构建系统发育树(比例尺表示 0.020 的遗传距离)

Fig.2 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence (The scale bar indicated a genetic distance of 0.020)

2.2 褐藻胶裂解酶 ALYYA 的生物信息学分析

菌株 SJ-H-12 的基因组中存在 1 个潜在的褐藻胶裂解酶编码基因。开放阅读框由 1113 bp 组成, 编码 370 个氨基酸的蛋白质(MT533612)。该酶被命名为

ALYYA, 并进行进一步的生物信息学分析。ALYYA 的前 23 个氨基酸是信号肽, 与分泌特征一致。去掉信号肽后, 成熟酶的理论等电点(pI)为 4.00, 分子量(MW)为 38.1 kDa。在 NCBI 上分析发现, ALYYA 具

有单个保守结构域。为确定 ALYYA 的进化位置, 根据氨基酸序列和其他已报道的褐藻胶裂解酶构建了系统进化树。如图 3 所示, ALYYA 与 *Pseudomonas* sp. E03 的 AlgA 和 *Enterobacter* sp. FY-07 的 AlgL 位于同一分支。已报道的多数褐藻胶裂解酶属于多糖水解酶

7 家族(PL7)和 17 家族(PL17), 而 AlgA 和 AlgL 均属于 5 家族(PL5), 具有 polyM 片段偏好性(Inoue *et al*, 2016; Qin *et al*, 2018; Uchimura *et al*, 2010)。ALYYA 的发现丰富了 PL5 家族褐藻胶裂解酶的研究, 推测具有较强的 polyM 片段偏好性。

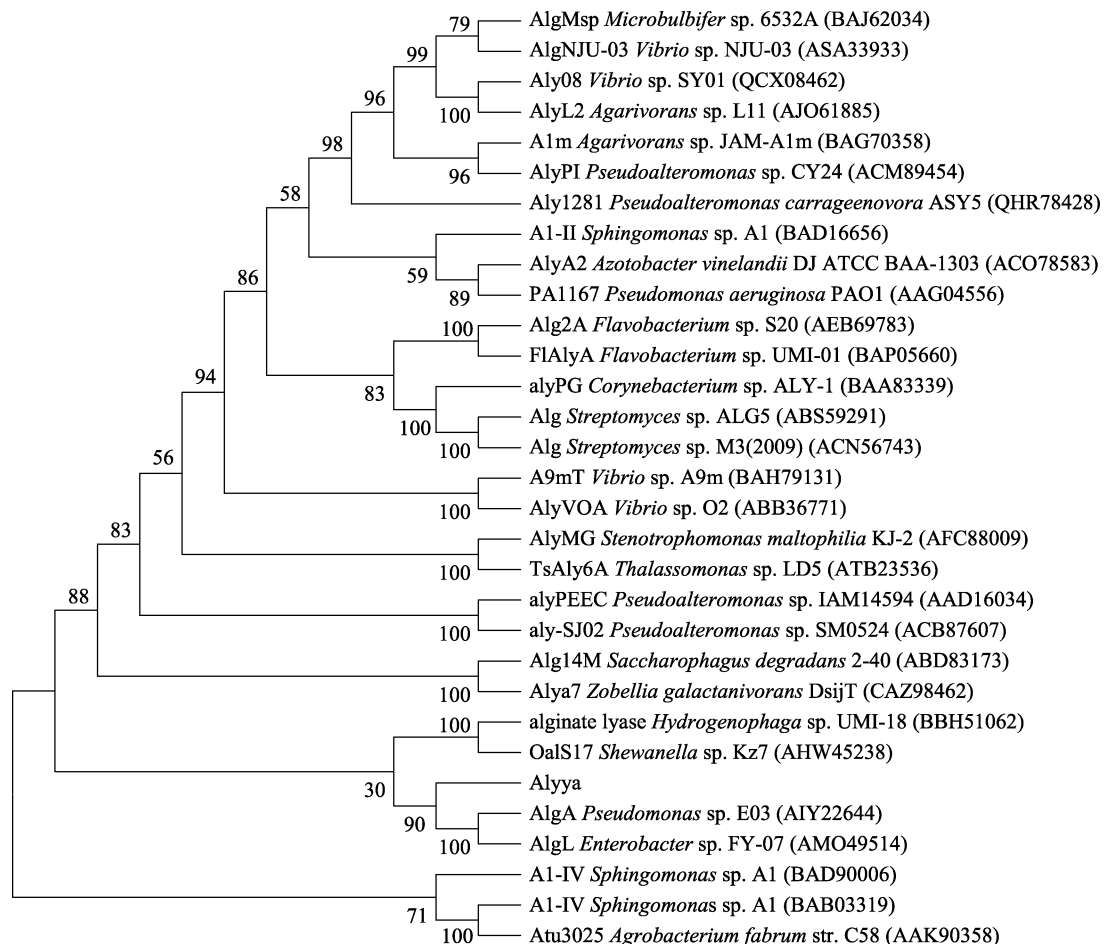


图 3 基于褐藻胶裂解酶氨基酸序列构建的 Bootstrap consensus 系统发育树

Fig.3 Bootstrap consensus phylogenetic tree based on alginate lyase amino acids sequence

2.3 Alyya 的分泌表达与纯化

在以往研究中, 大多数褐藻胶裂解酶在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达。然而, 由于大肠杆菌分泌能力弱、合成内毒素且具有细胞壁抗原物质, 大肠杆菌表达褐藻胶裂解酶在工业生产中受到了限制 (Miyamoto *et al*, 2009)。本研究在食品级宿主解脂耶氏酵母中表达了 ALYYA, 这是一种广泛使用的异源宿主, 具有出色的分泌能力 (Madzak, 2015)。重组菌株 M34 显示出最高的细胞外活力。如图 4a 所示, 在 GPPB 培养基中培养 60 h 后, 重组菌株 M34 中的 ALYYA 活力达到 34.2 U/mL, 生物量为 16.2 g/L。胞外酶的活力是野生菌株 (2.44 U/mL) 的 14 倍。从上清液中纯化 ALYYA 蛋白, 并通过 SDS-PAGE 分析, 如

图 4b 所示, 在泳道上具有单一条带, 分子量约为 39.0 kDa, 与去掉信号肽的氨基酸序列加上有 His 标签得到的理论分子量接近。纯化的 ALYYA 对褐藻胶的比活力为 676.4 U/mg, 而对 polyG 片段和 polyM 片段的比活力分别为 213.2 U/mg 和 913.6 U/mg。此结果验证了生物信息学分析 ALYYA 对 polyM 偏好的预测。

2.4 ALYYA 的温度和 pH 特性

在酶纯化的基础上, 研究了 ALYYA 的酶学性质。如图 5a 所示, ALYYA 的催化活力在 30℃ 时最高; 在 25℃~35℃ 之间检测到 80% 以上的最高活力。当温度升至 40℃ 以上时, 活力急剧下降。在较低温度 10℃ 和 20℃ 下的催化活力分别为最高值的 53.2% 和 38.4%。低于 35℃ 时, ALYYA 非常稳定; 在 40℃ 下孵育

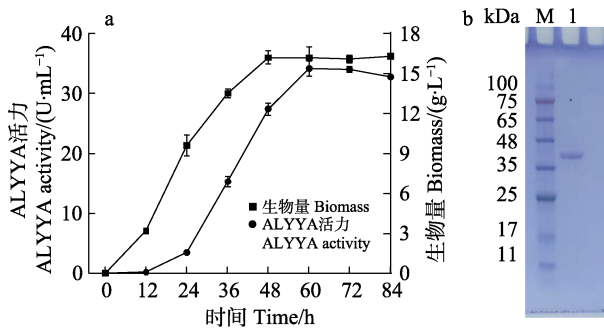


图 4 分泌到培养基中的 ALYYA 活力的时间曲线(a)和纯化 ALYYA 的 SDS-PAGE 分析(b)

Fig.4 Time curve of ALYYA activity secreted into the culture medium (a) and SDS-PAGE analysis of purified ALYYA (b)

数据均基于 3 个平行; M 泳道表示预染色蛋白梯; 泳道 1 表示纯化的 ALYYA

Data were based on 3 parallels; Lane M represents pre-stained protein ladder; Lane 1 represents purified ALYYA

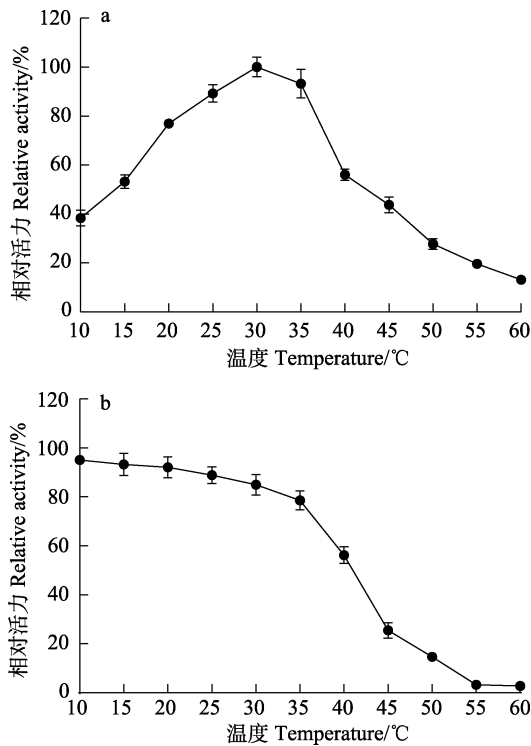


图 5 不同温度对 ALYYA 活力(a)和稳定性(b)的影响
Fig.5 Effects of different temperature on the activity (a) and stability (b) of ALYYA

2 h 后, 剩余约 60%的活力。高于 45°C时, ALYYA 丧失大部分活力。多数褐藻胶裂解酶在约 40°C时具有最高活力, 而低温褐藻胶裂解酶在低于 35°C时具有最高的催化活力, 在 20°C时具有最高活力的 50%以上。当前, 尚无能应用于工业生产的商品化褐藻胶裂解酶, 且报道的褐藻胶裂解酶多数为中温酶。与已经报道的少数低温褐藻胶裂解酶相比, ALYYA 在 20°C

时的活力更高, 并具有更好的热稳定性(图 5b)。ALYYA 可作为降解褐藻胶的新型工具酶。

如图 6a 所示, ALYYA 活力在 pH 8.0 时最高, 且在 pH 6.0~9.0 时超过 80%。此外, 在孵育 12 h 后, ALYYA 在 pH 5.0~10.0 的范围内保留了超过 60%的活力。在本研究的整个 pH 范围(3.0~11.0), 孵育 12 h 后均保留了 40%以上的活力(图 6b)。而细菌来源的褐藻胶裂解酶多数倾向于在中性附近催化水解反应 (Mochizuki *et al*, 2015)。与其他低温褐藻胶裂解酶相比, ALYYA 在更大的 pH 范围内表现出催化活力。例如, TsAly6A 和 AlgNJU-03 的 pH 稳定范围分别仅为 6.60~8.95 和 6.0~9.0 (Zhuang *et al*, 2018; Zhu *et al*, 2017)。实际上, ALYYA 的 pH 稳定范围甚至比中温褐藻胶裂解酶 AlgNJ04 的还要大(Zhu *et al*, 2018)。这种独特的 pH 稳定性使 ALYYA 可以在不同催化环境下完成褐藻中活性物质的提取和转化。另外, *Pseudomonas* sp. E03 的 AlgA 同样属于 PL5 家族, 最适反应温度为 30°C, 最适反应 pH 为 8, 与本研究中 ALYYA 的 pH 和温度特性类似(Zhu *et al*, 2015)。

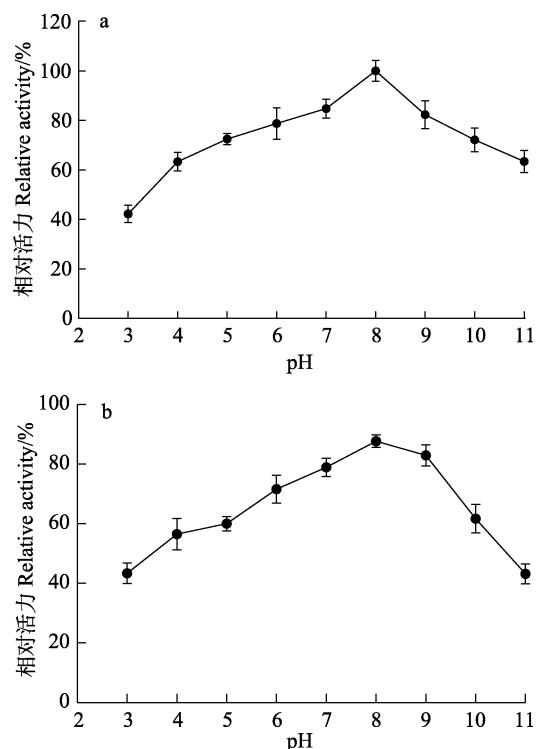


图 6 不同 pH 对 ALYYA 活力(a)和稳定性(b)的影响
Fig.6 Effects of different pH on the activity (a) and stability (b) of ALYYA

2.5 NaCl 对酶活力的激活作用

如图 7 所示, NaCl 在 0~2.0 mol/L 的浓度下能够明显激活 ALYYA 的活力。在 0.75 mol/L NaCl 浓度下,

ALYYA 的活性达到最高(290.0%)。NaCl 对大多数褐藻胶裂解酶的活化是必不可少的。在 1 mol/L NaCl 中, AlgM4 活力比无 NaCl 时增加了 7 倍左右(Huang *et al.*, 2015)。在 0.3 mol/L NaCl 中的 Aly08 活力是无 NaCl 时的 8 倍左右(Wang *et al.*, 2019)。相比之下, ALYYA 的活力较为稳定, 对 NaCl 的依赖较弱, 并具有耐盐性。不同来源、品种和加工方法得到的褐藻的成分和盐度均有所区别。因此, ALYYA 是一种可以适应不同盐度的酶, 能满足各种加工需求。

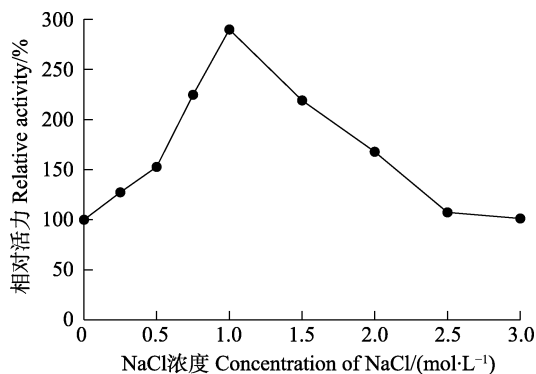


图7 不同浓度 NaCl 对 ALYYA 活力的影响
Fig.7 The effect of different concentration of NaCl on activity of ALYYA

2.6 酶解产物分析

使用 ALYYA 水解褐藻胶溶液 40 min, 当黏度不再下降时, 通过负离子 ESI-MS 检测终产物。如图 7 所示, 产物主要为二糖(351.05 m/z), 另有少部分单糖(175.00 m/z)和三糖(526.90 m/z)。因此, ALYYA 是一种内切褐藻胶裂解酶。而低温褐藻胶裂解酶 AlgB 和 AlgNJU-03 产生的寡糖主要是 DP2~DP5 (Zhu *et al.*, 2017)。ALYYA 可制备较低分子量的寡糖, 具有潜在的药物应用前景。

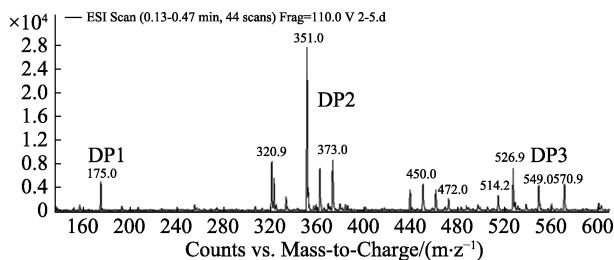


图8 通过 ESI-MS 分析 ALYYA 的降解产物
Fig.8 Analysis of degradation products of ALYYA by ESI-MS

3 结论

综上所述, 本研究克隆了一种新型的低温褐藻胶裂解酶的编码基因, 并对其进行了胞外分泌表达和性

质研究。ALYYA 在温度为 25℃~35℃时表现出 80% 以上的活力, 且在 30℃时表现出最高活力, 是典型的低温褐藻胶裂解酶;此外, ALYYA 在 pH 为 4.0~10.0 的范围内保持了 70% 以上的活力, 在 pH 为 3.0~11.0 的范围内保持了 40% 以上的活力, 它的 pH 稳定范围比中温褐藻胶裂解酶大, 表现出优异的 pH 稳定性;研究发现, ALYYA 是一种可以适应不同盐度的酶, 并可制备较低分子量的寡糖。因此, ALYYA 可以成为工业应用的有效工具。

参 考 文 献

- CHEN X, DONG S, XU F, *et al.* Characterization of a new cold-adapted and salt-activated polysaccharide lyase family 7 alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1120–1129
- CHU H R, TANG J C. Study on fermentation and enzyme production conditions of alginic acid degrading bacteria A7. *Marine Science*, 2008, 32(11): 93–96 [褚洪蕊, 唐景春. 褐藻酸降解菌 A7 的发酵及产酶条件研究. *海洋科学*, 2008, 32(11): 93–96]
- FLÓREZ-FERNÁNDEZ N, TORRES M D, GONZÁLEZ-MUÑOZ M J, *et al.* Recovery of bioactive and gelling extracts from edible brown seaweed *Laminaria ochroleuca* by non-isothermal autohydrolysis. *Food Chemistry*, 2019, 277: 353–361
- GAO S, ZHANG Z, LI S. Characterization of a new endo-type polysaccharide lyase (PL) family 6 alginate lyase with cold-adapted and metal ions-resisted property. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 729–735
- HE M, GUO M, ZHANG X, *et al.* Purification and characterization of alginate lyase from *Sphingomonas* sp. ZH0. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 126(3): 310–316
- HUANG G, WANG Q, LU M, *et al.* AlgM4: A new salt-activated alginate lyase of the PL7 family with endolytic activity. *Marine Drugs*, 2018, 16(4): 120–133
- INOUE A, ANRAKU M, NAKAGAWA S, *et al.* Discovery of a novel alginate lyase from *Nitratiruptor* sp. SB155-2 thriving at deep-sea hydrothermal vents and identification of the residues responsible for its heat stability. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(30): 15551–15563
- JAGTAP S, HEHEMANN J, POLZ M, *et al.* Comparative biochemical characterization of three exolytic oligoalginate lyases from *Vibrio splendidus* reveals complementary substrate scope, temperature, and pH adaptations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(14): 4207–4214
- LI S Y, HE N N, WANG L N. Efficiently anti-obesity effects of unsaturated alginate oligosaccharides (UAOS) in high-fat diet (HFD)-fed mice. *Marine Drugs*, 2019a, 17(9): 540
- LI S Y, WANG Z P, WANG L N, *et al.* Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Bioresource Technology*, 2019b, 281: 84–89

- LI S, YANG X, BAO M, *et al.* Family 13 carbohydrate-binding module of alginate lyase from *Agarivorans* sp. L11 enhances its catalytic efficiency and thermostability, and alters its substrate preference and product distribution. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(10): 54–61
- LIN C Z, GUAN H S, LI H H, *et al.* The influence of molecular mass of sulfated propylene glycol ester of low-molecular-weight alginate on anticoagulant activities. *European Polymer Journal*, 2007, 43(7): 3009–3015
- MADZAK C. *Yarrowia lipolytica*: Recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(11): 4559–4577
- MIYAMOTO T, OKANO S, KASAI N. Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5058–5063
- MOCHIZUKI S, NISHIYAMA R, INOUE A, *et al.* A novel aldo-keto reductase HdRed from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*, which reduces alginate-derived 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconate. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(52): 30962–30974
- QIN H M, MIYAKAWA T, INOUE A, *et al.* Structural basis for controlling the enzymatic properties of polymannuronate preferred alginate lyase FIAlyA from the PL-7 family. *Chemical Communication*, 2018, 54: 555–558
- SCHILLER N, MONDAY S, BOYD C, *et al.* Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(15): 4780–4789
- SHARMA H S S, FLEMING C, SELBY C, *et al.* Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 465–490
- SHARMA S, HORN S J. Enzymatic saccharification of brown seaweed for production of fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 2016, 213: 155–161
- SUN L P, XUE C H, XU J C, *et al.* A study of the antioxidant abilities of alginate oligosaccharides. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2005, 35(5): 811–814 [孙丽萍, 薛长湖, 许家超, 等. 褐藻胶寡糖体外清除自由基活性的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2005, 35(5): 811–814]
- THOMAS F, LUNDQVIST L, JAM M, *et al.* Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288: 23021–23037
- UCHIMURA K, MIYAZAKI M, NOGI Y, *et al.* Cloning and sequencing of alginate lyase genes from deep-sea strains of *Vibrio* and *Agarivorans* and characterization of a new *Vibrio* enzyme. *Marine Biotechnology*, 2010, 12: 526–533
- WANG Y, CHEN X, BI X, *et al.* Characterization of an alkaline alginate lyase with pH-stable and thermo-tolerance property. *Marine Drugs*, 2019, 17(5): 308–322
- WARGACKI A J, LEONARD E, WIN M N, *et al.* An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 2012, 335(6066): 308–313
- WONG T Y, PRESTON L A, SCHILLER N L. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 289–340
- XIN X L, GENG M Y, QI X, *et al.* Study on the action mechanism of a new type anti-cerebral ischemia marine drug 989. *Periodical of Ocean University of China (Natural Sciences)*, 2001, 31(4): 535–536 [辛现良, 耿美玉, 戚欣, 等. 新型抗脑缺血海洋新药 989 作用机理的初步探讨. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, 2001, 31(4): 535–536]
- XU X, YOSHIKO I, YOSHIE K, *et al.* Root growth-promoting activity of unsaturated oligomeric uronates from alginate on carrot and rice plants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003, 67(9): 2022–2025
- YOSHIKO I, XU X, TADASHI T, *et al.* Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytosine production in human mononuclear cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003, 67(2): 258–263
- ZHANG Y, YIN H, ZHAO X, *et al.* The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in *Oryza sativa* L. mediated by auxin signaling. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 113: 446–454
- ZHANG Z, TANG L, BAO M. Functional characterization of carbohydrate-binding modules in a new alginate lyase, TsAly7B, from *Thalassomonas* sp. LD5. *Marine Drugs*, 2020, 18(1): 25–35
- ZHU B W, HUANG L S X, TAN H D, *et al.* Characterization of a new endo-type polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(2): 409–415
- ZHU B, NI F, NING L, *et al.* Cloning and characterization of a new pH-stable alginate lyase with high salt tolerance from marine *Vibrio* sp. NJ-04. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 1063–1070
- ZHU B, SUN Y, NI F, *et al.* Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. NJU-03. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 164: 1140–1147
- ZHUANG J, ZHANG K, LIU X, *et al.* Characterization of a novel polyM-preferred alginate lyase from Marine *Vibrio splendidus* OU02. *Marine Drugs*, 2018, 16(9): 295–230

Secretory Expression and Enzymatic Properties of Low-Temperature-Adapted Alginate Lyase from Marine Bacteria

ZHANG Wenbin^{1,2#}, BAI Lu^{1,2#}, LIU Bin³, WANG Pengmei², MO Zhaolan⁴, LI Jie^{2①}

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Qingdao Mental Health Center, Qingdao, Shandong 266034, China; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract Low-temperature-adapted alginate lyase has unique advantages for alginate oligosaccharide preparation and brown algae processing. Producing a low-temperature-adapted alginate lyase with better stability remains an urgent need for industrial applications. In this study, to screen for a low-temperature-adapted alginate lyase with good stability, we identified and isolated marine bacteria, by cloning and analyzing enzyme-encoding gene and secretory expression and purification of enzyme. The effects of different factors on enzyme activity and stability, as well as analysis of enzymatic hydrolysis products were evaluated. Results showed that the marine bacterium SJ-H-12 is capable of secreting low-temperature-adapted alginate lyase when cultivated with alginate as the sole carbon source. An evolutionary tree was constructed based on 16S rDNA sequences, and the strain was identified as *Yangia* sp. SJ-H-12. Furthermore, the gene encoding the enzyme ALYYA was identified as belonging to the PL5 alginate lyase family. The gene was secreted and expressed in *Yarrowia lipolytica*, a food-grade host. The activity of recombinant ALYYA reached 34.2 U/mL; the molecular weight of ALYYA was about 39.0 kDa, and it had a strong PolyM preference. ALYYA showed more than 80% vitality at 25°C~35°C, with peak vitality at 30°C; it demonstrated good stability in the pH range of 5.0~10.0, with more than 60% vitality remaining after incubation. NaCl could activate the activity of ALYYA at a concentration of 0~2.0 mol/L. The products of ALYYA-degraded alginate are mainly disaccharides and small amounts of monosaccharides and trisaccharides, resulting from its endoalginate lyase activity. In summary, a low-temperature-adapted alginate lyase-producing bacterium was screened, and most of the alginate lyases found were mesophilic enzymes. This study showed that ALYYA is a typical low-temperature-adapted alginate lyase with excellent enzyme activity and stability, providing reference data for the screening and industrial development and utilization of low-temperature-adapted alginate lyase.

Key words Alginate lyase; Secretory expression; Coding gene; pH stability

① Corresponding author: LI Jie, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn