

# 卡拉胶酶的研究进展

刘岩 江晓路 管华诗

(青岛海洋大学 青岛 266003)

**摘要:**卡拉胶酶主要有 $\kappa$ -卡拉胶酶, $\iota$ -卡拉胶酶, $\lambda$ -卡拉胶酶,是水解酶的一种。本文从酶的分类和来源,底物专一性和作用方式,酶的性质,产酶菌株及酶系,酶的应用五个方面综述了卡拉胶酶的研究进展。

**关键词:** $\kappa$ -卡拉胶, $\iota$ -卡拉胶, $\lambda$ -卡拉胶,卡拉胶酶

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)-02-0089-05

卡拉胶是一种红藻硫酸多糖,卡拉胶酶主要有 $\kappa$ -卡拉胶酶, $\iota$ -卡拉胶酶和 $\lambda$ -卡拉胶酶。本文从酶的分类和来源,底物专一性和作用方式,酶的性质,产酶菌株及酶系,酶的应用六个方面综述了卡拉胶酶的研究进展。

## 1 卡拉胶酶的分类及来源

卡拉胶酶的分类:卡拉胶酶主要有 $\kappa$ -卡拉胶酶, $\iota$ -卡拉胶酶, $\lambda$ -卡拉胶酶等。卡拉胶是硫酸多糖,用S(35)标记的卡拉胶可检测到水解硫酸酯键的酶类。

微生物来源的卡拉胶酶:海洋细菌(*Pseudoalteromonas carrageenovora*),假单胞菌(*Pseudomonas carrageenovora*)<sup>[1,2]</sup>,食鹿角菜交替单胞菌(*Alteromonas carrageenovora*)<sup>[3]</sup>和噬纤维菌属的细菌(*Cytophaga drobachiensis*)<sup>[4]</sup>可检测出卡拉胶酶。

其他来源的卡拉胶酶:在海洋软体动物(Marine molluscs)体内有卡拉胶酶<sup>[5]</sup>。Mori (1943)曾用海洋软体动物中的水解酶(其中有卡拉胶酶)处理皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)提取多糖<sup>[6]</sup>。

## 2 底物专一性与作用方式

卡拉胶是几种多糖的复杂混合物,其结构组成示于表1。 $\kappa$ -卡拉胶酶水解 $\beta(1-4)$ 连接的 $\kappa$ -卡拉胶,由DsiJ产生的 $\kappa$ -卡拉胶酶水解卡拉胶的终产物为硫酸 $\kappa$ -新卡拉四糖( $\kappa$ -neocarrate-triose sulfate)和硫酸 $\kappa$ -新卡拉六糖( $\kappa$ -neocarrahexaose sulfate);*Pseudomonas carrageenovora*产生的卡拉胶酶水解卡拉胶终产物为硫酸 $\kappa$ -新卡拉二糖( $\kappa$ -neocarrabiose sulfate)。 $\iota$ -卡拉胶酶对1-4连接的 $\iota$ -卡拉胶有专一性,由*Pseudomonas carrageenovora*产生的 $\lambda$ -卡拉胶酶可水解 $\lambda$ 族卡拉胶<sup>[7]</sup>。

表1 不同类型卡拉胶的结构组成

族	1,3连接的 $\beta$ -D-半乳糖	1,4连接的 $\alpha$ -D- 半乳糖单位	类型
$\beta$ 族卡拉胶	D-半乳糖	6-硫酸基-D-半乳糖	$\gamma$
		3,6-内醚-D-半乳糖	$\gamma, \beta$
		2,6-二硫酸基-D-半乳糖	$\delta$
$\kappa$ 族卡拉胶	4-硫酸基-D-半乳糖	6-硫酸基-D-半乳糖	$\mu$
		3,6-内醚-D-半乳糖	$\kappa$
		2,6-二硫酸基-D-半乳糖	$\nu$
		2-硫酸基-3,6-内醚-D-半乳糖	$\iota$
$\lambda$ 族卡拉胶	2-硫酸基-D-半乳糖	2-硫酸基-D-半乳糖	$\zeta$
		2,6-二硫酸基-D-半乳糖	$\lambda$
		2-硫酸基-3,6-内醚内醚-D-半乳糖	$\theta$
$\pi$ -卡拉胶	2-硫酸基-4,6-O-(1-羧 亚乙基)-D-半乳糖	2-硫酸基-D-D半乳糖	$\pi$
$\omega$ -卡拉胶	6-硫酸基-D-半乳糖	3,6-内醚-D-半乳糖	$\omega$

## 3 卡拉胶酶的性质

Potin P等1991年报道从红叶藻属(*Delesseria sanguinea*)分离了一株能够降解不同硫酸化半乳糖聚合物(琼胶或卡拉胶)的细菌,用硫酸铵,凝胶过滤色谱(Sephacryl S 200 HR),离子色谱(DEAE-Sepharose-CL6B)纯化 $\kappa$ -卡拉胶酶,用SDS/PAGE电泳检测为单一蛋白质,测定酶分子量为40,000,最适pH7.2,30°C稳定,但在40°C只维持1h<sup>[7]</sup>。Sarwar G等1987年报道用2216E培养基添加商业0.1%卡拉胶培养噬纤维菌属的细菌*Cytophaga* sp. 1k-C783,分离胞外卡拉胶酶。用硫酸铵沉淀,离子交换色谱,凝胶过滤色谱(G-200)纯化得到 $\kappa$ 卡拉胶酶,纯化的酶分子量用SDS/PAGE电泳测定为100000, $\kappa$ -卡拉胶酶的最适pH为7.6,最适温度为25°C。金属离子对*Cytophaga*,1k-C783生长的影响,NaCl和MgCl<sub>2</sub>可被细菌利用,2216E中培养基最小浓度为0.05mol/L NaCl,0.25MgCl<sub>2</sub>。KCl和CaCl<sub>2</sub>对产酶没有作用,当营养物质充足的时候,卡拉胶酶在休眠和生长的细胞都可以合成和释放<sup>[8,9]</sup>。

#### 4 微生物卡拉胶酶的产生菌及其酶系

Michel G 等 1999 年报道了 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 卡拉胶酶重组体被表达纯化和晶体化。晶体用 V-D(Vapour-diffusionmethod)方法获得,用聚乙烯乙二醇(Polyethylene glycol Mr=4000)作为沉淀剂。这些晶体属于 P212121 空间基团组,单位晶胞参数: $a=58.2$ ,  $b=62.8$ ,  $c=77.9\text{\AA}$ <sup>[1]</sup>。Barbeyron T 等 1998 年报道,从噬纤维菌属的细菌克隆  $\kappa$ -卡拉胶酶。结构部分的核苷序列已经测定,包括存在一个与真核生物和原核生物的核糖体结合部位的  $\omega$ -八聚体序列。*CgkA* 基因编码一个 55 个氨基酸的蛋白质,带有一条 35 个氨基酸的肽链和一个 229 个氨基酸的长的后转录表达的碳末端。酶显示了全部第 16 族糖苷键水解酶的折叠和催化领域的特性<sup>[4]</sup>。Erasmus J H 1997 年报道从鲍鱼内脏分离的细菌可以降解海带,CMC,褐藻胶,琼胶和卡拉胶,说明细菌协助鲍鱼降解这些多糖。在无菌的情况下,其肝胰腺内检测出海带多糖酶,羧甲基纤维素酶,琼胶酶,卡拉胶酶的活性,说明鲍鱼能产生一系列的多糖酶<sup>[5]</sup>。Potin P 等 1991 年报道食鹿角菜交替单胞菌的 *cgkA* 基因编码的  $\kappa$ -卡拉胶酶预测的分子量为 44212D,比从发酵液提取 SDS/PAGE 电泳纯化的蛋白质推测的分子量较大(35kD)。免疫杂交(Immunoblotting)实验表明无论是天然的还是重组的细菌的提取物都存在一个分子量在 44 +/- 2kD 的蛋白质,可以推测  $\kappa$ -卡拉胶酶作为前体蛋白质产生并在分泌过程中经历了两次蛋白水解的过程。为了测定 C-末端裂解的确切部位,用电离喷雾质谱(Electrospray-ionization/mass spectrometry)测定纯化的胞外  $\kappa$ -卡拉胶酶的精确分子量为 31,741 +/- 3D。因此 *A. Carrageenovora*  $\kappa$ -卡拉胶酶应由 275 个氨基酸组成,从 Ala26 残基到 Asn301 残基是 *cgkA* 基因产物。为了评定这个糖苷键水解酶家庭成员的分子机制,用凝胶过滤色谱和 <sup>13</sup>C-NMR 分析  $\kappa$ -卡拉胶酶水解产物,结果表明有硫酸  $\kappa$ -新卡拉二糖和硫酸  $\kappa$ -新卡拉四糖形成<sup>[10]</sup>。Oestgaard K 等 1994 报道用发酵罐培养 *Pseudomonas carrageenovora* 生产  $\kappa$ -卡拉胶酶,用乳糖做碳源,添加 0.15% 的卡拉胶诱导酶产生<sup>[2]</sup>。Barbeyron T 等 1994 年报道了食鹿角菜交替单胞菌产生的卡拉胶酶的基因 *cgkA* 和蛋白质序列,该基因编码一个 397 个氨基酸的蛋白质,并带有一个 25 个氨基酸的肽链。该酶是糖苷键水解酶的新成员,可推测谷氨酸(163)在  $\kappa$ -卡拉胶酶和谷氨酸(155)在琼胶酶的催化中非常重要<sup>[3]</sup>。Potin P 等 1991 年报道从红叶藻属(*Delesseria sanguinea*)分离了一株能够降解不同硫酸化的半乳糖聚合物(琼胶或卡拉胶)的细菌,用硫酸铵,凝胶过滤色谱(Sephacryl S 200 HR),离子色谱(DEAE-Sephacryl CL6B)纯化  $\kappa$ -卡拉胶酶,用 SDS/PAGE 电泳检测为单一蛋白质,测定酶分子量为 40,000,最适 pH7.2,在 30°C 稳定,但在 40°C 只维持 1h。通过凝胶过滤色谱和 <sup>13</sup>C-核磁共振分析酶降解产物为硫酸  $\kappa$ -新卡拉四糖<sup>[7]</sup>。1990 年 Saini A 等分析卡拉胶的酶解产物,产酶菌株假单胞菌(*P. carrageenovora*)在室温下生长快代时 0.8h,但酶活力几乎为 0,在 6°C 时生长缓慢,代时 2.61h,但酶活力一直很高,硫酸铵沉降后酶活力较高(140mu/mL)并切得到相对较纯的蛋白质,酶的 pH 和最适温度与文献报道的一致,但分离的离子色谱柱不同<sup>[20]</sup>。Sarwar G 等 1987 年报道用 2216E 培养基添加商业 0.1% 卡拉胶培养 *Cytophaga* sp. 1k-C783,分离胞外卡拉胶酶。用硫酸铵沉淀,离子交换色谱,凝胶过滤色谱(G-200)纯化得到  $\kappa$ -卡拉胶酶,纯化的酶分子量用 SDS/PAGE 电泳测定为 100,000, $\kappa$ -卡拉胶酶的最适 pH 为 7.6,最适温度为 25°C。人造海水对该细菌的生长是必须的,但葡萄糖,半乳糖和纤维二糖对细菌的生长和酶的产生有抑制作用。最适活力在 pH7,温度在 20°C~50°C。高于 50°C 酶活力不稳定,在 55°C 处理 10min 酶活力全部丧失 HgCl<sub>2</sub> sub (2),AgNO<sub>3</sub> sub (3) (1mmol/L)和 NaCl (1.5%可以完全抑制酶活力)<sup>[8]</sup>。McLean M W 等

1979年报道用 *Pseudomonas carrageenovora* 生产的  $\kappa$ -卡拉胶酶,用硫酸铵沉淀,CM-Sephrose CL-6B 离子交换色谱纯化酶,聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量为 35000,酶降解产物用凝胶过滤色谱,分光光度计和<sup>13</sup>C 核磁共振分析,产物为硫酸新卡拉二糖<sup>[11]</sup>。

## 5 卡拉胶酶的应用研究

卡拉胶被广泛应用在各种工业生产中,降解的卡拉胶具有许多生物活性,因此近来也受到重视。已有几种酸降解的卡拉胶制剂临床应用,卡拉胶具有抗凝血性,硫酸酯含量越多抗凝血性能越大。未降解的卡拉胶与血纤维蛋白原形成不溶络合物,而降解的卡拉胶象肝素一样与血纤维蛋白原形成可溶络合物且毒性小。卡拉胶或其分级产物经特定的方式改性后,有特殊的生理活性。卡拉胶的降解方法可归纳为三类:酸水解法、超声波降解法和酶解法。目前,普遍采用的方法是酸水解法。这种方法的降解速度慢,且需高温,高压,操作较复杂,酶法降解条件温和,有待以酶法降解取代酸水解,因此卡拉胶酶最近受到重视,而且酶法降解卡拉胶使这种多糖有了更广泛的应用潜力。Kloareg B 等 1997 年报道纯化一系列卡拉胶酶和琼胶酶,这些表现出严格的底物专一性和识别半乳糖硫酸盐的能力。这一系列专一性半乳糖水解酶可降解硫酸多糖,提供了研究硫酸基团结构和功能关系的方法<sup>[12]</sup>。

卡拉胶酶在研究卡拉胶的化学结构以及细菌的卡拉胶代谢等方面具有一定的意义。Greer C W 等 1985 年用  $\lambda$ -、 $\kappa$ -、 $\iota$ -卡拉胶为碳源培养细菌得到  $\lambda$ -、 $\kappa$ -、 $\iota$ -卡拉胶酶,由细菌 1 和 5 产生的  $\iota$ -卡拉胶酶具有相同的性质,对 1-4 连接的  $\iota$ -卡拉胶有专一性。细菌 5 产生的  $\kappa$ -卡拉胶酶与 *Pseudomonas carrageenovora* 产生的  $\kappa$ -卡拉胶酶性质相同,水解 1-4 连接的  $\kappa$ -卡拉胶,由 *Pseudomonas carrageenovora* 产生的  $\lambda$ -卡拉胶酶可水解  $\lambda$  族卡拉胶。纯化的  $\kappa$ -、 $\iota$ -卡拉胶酶与红外光谱和核磁共振用于卡拉胶的结构分析,*Hypnea musciformis* 卡拉胶是  $\kappa$ -和  $\iota$ -卡拉胶的混合物其中以  $\kappa$ -卡拉胶为主,麒麟菜卡拉胶 *Eucheuma nudum* 由  $\iota$ -卡拉胶有规律的掺杂着少量  $\kappa$ -卡拉胶和  $\iota$ -卡拉胶的前体  $\mu$ -卡拉胶。*Eucheuma gelatinae* 卡拉胶由非硫酸化的  $\beta$  卡拉胶和  $\kappa$ -卡拉胶组成。酶法水解卡拉胶提供了一种简单,灵敏的光谱和化学方法所不能完成的测定卡拉胶结构的方法<sup>[13]</sup>。

另外,卡拉胶酶还用作海藻解壁酶,以获得 DNA,单细胞,蛋白质和原生质体。卡拉胶的黏度很大,使得提取 DNA 非常困难,添加卡拉胶酶以后使卡拉胶很快降解,黏度下降,大大方便了 DNA 的提取。Fleurence J 等 1995 年报道用  $\kappa$ -卡拉胶酶,琼胶酶,木聚糖酶,纤维素酶降解细胞壁提取蛋白质。用纯底物测定各种酶的动力学参数和最适条件,所有酶测定米氏动力学,相应的饱和底物浓度为卡拉胶酶:8000mg/litre(卡拉胶),琼胶酶:8000mg/litre(琼胶),木糖酶:5000mg/litre(木聚糖),纤维素酶:6000mg/litre(CMC)。最适活力条件为卡拉胶酶:pH6.5~6.8,45°C,琼胶酶:pH6~6.5,55°C,木聚糖酶:pH5,55°C,纤维素酶:pH3.8,50°C。不同的酶在最适条件下与不同的海藻组合,[卡拉胶酶/*Chondrus crispus*,琼胶酶/*Gracilaria verrucosa* (*G. gracilis*),木聚糖酶/*Palmaria palmata*]。海藻/纤维素酶+专一性酶(e.g. *C. crispus*/纤维素酶+卡拉胶酶)体系也在专一性酶的最适条件下做了研究。除了 *P. palmata*,用纤维素酶与卡拉胶酶或琼胶酶结合可以在 2h 内得到蛋白质的最高产量。*C. crispus*/纤维素酶+卡拉胶酶和 *G. verrucosa*/纤维素酶+琼胶酶体系与空白比较使蛋白质产量分别提高了 10 和 3 倍。对于 *P. palmata*,最好的蛋白质生产体系是在用木聚糖酶保温 14h,木聚糖酶和纤维素酶混用不能有效的提高蛋白质的产量。说明了应用多糖酶可以有效的提高某些红藻的蛋白质提取。这种生物技术的方法适用于原生质体的制备或酶法液化较高等的植物,也可以从营养学角度作

为从海藻中获得蛋白质的方法<sup>[14]</sup>。Zablackis E 等 1990 年利用纤维素酶和卡拉胶酶从红藻中获得原生质体。纤维素酶和  $\kappa$ -卡拉胶酶只产生一些角质层细胞原生质体而纤维素酶和  $\iota$ -卡拉胶酶只产生表皮层细胞原生质体,当这两种卡拉胶酶与纤维素酶一起可以使原生质体从各种类型的细胞释放出来<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Michel G, Barbeyron T. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999, 55(Pt 4): 918~920.
- [2] Oestgaard K, Wangen B. ENZYME MICROB, TECHNOL, 1994, 15(4): 326~333.
- [3] Barbeyron T, Henrissat B B. Kloeag. Gene, Amsterdam, 1994, 139(1): 105~109.
- [4] Barbeyron T, Gerard A. Mol Biol Evol, 1998, 15(5): 528~537.
- [5] Erasmus J H, Cook P A, Coyne V E. Amsterdam, 1997, 155(1~4): 381~390.
- [6] Mori T The enzyme catalyzing the ideciomposition of mucilage of Chondrus ocellatus III. Purification unit determination and distribution of enzyme. J. Age. Chem. Soc. Jpn, 1943 19: 740.
- [7] Potin P, Sanseau A. Berlin, 1991 201(1): 241~247.
- [8] Sarwar G, Matayoshi S, Oda H. Microbiol Immunol 1987, 31(9): 869~77.
- [9] Sarwar G, Oda H, Sakata T. Microbiol Immunol 1985, 29(5): 405~11.
- [10] Potin P, Barbeyron T, Bouget F-Y *et al.* Biochemical characterization and molecular cloning of phycocolloid-modifying enzymes from marine bacteria and algae. 1991, 68.
- [11] McLean M W, Williamson F B. Eur J Biochem, 1979, 93(3): 553~558.
- [12] Kloereg B, Barbeyron T, Flament D. Microbial degradation of sulfated galactans. Toward novel utilizations of red algae polysaccharides. CONFERENCE, Microorganismes marins pour l'Industrie, Brest(France), 1997, 17~19.
- [13] Greer C W. A study of carrageenases from marine bacteria. D: SS, Ph. D; DISS. ABST. INT, PT, B-SCI. & ENG. 1985, vol. 45, 9.
- [14] Fleurence J, Massiani L, Guyader O *et al.* Journal of Applied Phycology, 1995, 7(4): 393~397.
- [15] Zablackis E, Perez J. Berlin New York NY, 1990, 33(3): 273~276.