

琼胶酶研究进展*

杜宗军 王祥红 李 筠 陈吉祥

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要: 琼胶酶是一种多糖水解酶, 根据降解琼脂糖的作用方式不同, 可以分为 α -琼胶酶 (EC3.2.1.-) 和 β -琼胶酶 (EC3.2.1.81)。文中从琼胶酶的分类及酶活测定, 酶的来源, 产酶微生物的酶系及酶学性质, 琼胶酶的分子生物学研究, 酶的应用几个方面综述了琼胶酶的研究进展。

关键词: 琼胶, 海洋细菌, 琼胶酶, 工具酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0064-04

琼胶 (琼脂) 由琼脂糖 (agarose) 和琼脂胶 (agarpectin) 组成, 琼脂糖是由 (1→3) -O- β -D-半乳糖和 (1→4) -O-3, 6-内醚- α -L-半乳糖交替组成的线形链状分子; 琼脂胶由复杂的长短不一的半乳糖残基的多糖链组成, 其中包含有多种取代基如硫酸基、甲基等, 对于其结构的具体细节还不是很清楚。天然琼胶主要存在于某些海藻的细胞壁中, 琼胶酶能够水解琼胶多糖, 在这些海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等过程中具有重要的使用价值, 是一种海藻遗传工程的工具酶; 同时, 琼胶酶在分子生物学方面也多有应用。因此, 琼胶酶的研究具有重要的理论意义和应用价值。文中从琼胶酶的分类及酶活测定、酶的来源、产酶微生物的酶系及酶学性质、酶的应用几个方面综述了琼胶酶的研究进展。

1 琼胶酶的分类及酶活测定

Sugano^[1] 根据琼胶酶降解琼脂糖的作用方式不同, 而把它们分为两类: α -琼胶酶 (EC3.2.1.-), 作用于琼脂糖的 α (1→3) 糖苷键, 产物为琼胶寡糖, 以 3, 6-内醚- α -L-半乳糖作为还原性末端; β -琼胶酶 (EC3.2.1.81) 水解 D-半乳糖残基和 3, 6-内醚- α -L-半乳糖残基之间的 β (1→4) 糖苷键, 产生的琼胶寡糖以 D-半乳糖残基作为还原性末端。琼胶酶活力的测定一般利用测定还原力的方法, 即测定产物中还原性末端的产生量, 常用的方法有 Somogyi 法和 Dygert 法等。

2 琼胶酶的来源

微生物来源的琼胶酶主要来自于细菌, 一部分细菌是从河流、土壤和污水中分离得到的, 但能够产生琼胶酶的微生物主要来自海洋细菌。由于琼胶被降解, 这些细菌的菌落周围会出现凹陷或液化。Agbo 和 Moss^[2] 把这些能够降解琼胶的细菌分为两大类: 第一类细菌在平板上生长时, 分泌的胞外琼胶酶能够使琼胶平板松软 (soften), 在菌落周围产生凹陷; 第二类细菌分泌的琼胶酶能够使平板崩解直至完全液化 (liquefied)。

* 达尔文计划资助项目 (No.162/8/065)

收稿日期: 2001-12-03, 修回日期: 2002-02-08

1993 年, Potin^[3]等分离出第一种产 α -琼胶酶的细菌并进行了深入研究。研究者们已经分离出多种可以产生 β -琼胶酶的细菌, 许多菌株产生的 β -琼胶酶有两个共同特点, 一是酶作用最适 pH 在中性或微酸性, 二是酶作用最适温度高于 40℃。然而 Yasushi sugano^[1]等从弧菌 JT0107 中分离出一种新 β -琼胶酶, 酶作用最适温度为 30℃, 最适 pH 在 8 左右。另外, 尽管不同菌株 β -琼胶酶功能相似, 但酶蛋白分子量呈现出多样性。

Oscar Leon^[4]等研究了一株从 San Vicente 海湾的海水中分离得到的交替单胞菌 (*Altermonas* sp. C-1), 在底物琼胶的诱导下, 它能产生高水平的琼胶酶, 但如果以葡萄糖或半乳糖作为唯一碳源时, 琼胶酶的产量则急剧下降。Ghadi^[5]等也报道了从印度近海筛选琼胶降解细菌的情况, 他们提出了一个新方法, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 利用卢哥氏碘液对琼胶酶进行定位。2001 年, I Hassairi^[6]等对交替单胞菌 (*Altermonas agar-lytics* GJ1B) 发酵培养条件进行了研究, 利用琼胶作为碳源, 研究了其分批培养、补料分批培养和连续培养的情况, 在连续培养过程中, 稀释率为 0.03h⁻¹ 时, 流出的发酵液中 α -琼胶酶活力可达 0.9U/mL, 他们还研究了发酵液用中空纤维微孔滤膜分离的情况。

海洋软体动物的消化液中含有复杂的多糖水解酶系, 其中包括琼胶酶、藻胶酶、纤维素酶等, 这些多糖水解酶类是由生活在其消化道中的细菌产生的。

3 微生物琼胶酶的酶系及其酶学性质

研究者们已经分离纯化出了多种海洋细菌产生的琼胶酶, 并对其酶学性质进行了研究。

1983 年, L M Morrice^[7]等对大西洋假单胞菌 (*Pseudomonas atlantic*) 产生的琼胶酶系进行了深入的研究。他们发现, 大西洋假单胞菌不仅具有分泌于细胞外的 β -琼胶酶 I, 还有一种连接在细胞膜上的 β -琼胶酶 II, 它们共同作用, 可以水解琼脂糖和某些带有取代基的琼脂糖。经过硫酸铵沉淀、Sephadex G100 凝胶层析等步骤, β -琼胶酶 I 被提纯了 670 倍, 凝胶电泳显示为一条带, 其分子量为 32 kD, 此酶作用的最适 pH 为 7.0, 在 pH 3.0~9.0 范围内对琼脂糖有降解作用, 在低于 30℃ 时稳定。 β -琼胶酶 II 得到了部分纯化, 其最适 pH 范围在 6.5~7.5, 在 Na⁺、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ 存在时, 能明显提高其活力。

1990 年, T Aoki^[8]等分离出一株弧菌 (*Vibrio* sp. AP-2), 它产生的琼胶酶是 β -琼胶酶, 经过硫酸铵沉淀和多种凝胶层析步骤, β -琼胶酶被提纯 328 倍, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳时呈现单一条带。酶分子量为 20 kD, 最适 pH 在 5.5, pH 稳定范围在 4.0~9.0, 低于 45℃ 时酶活性保持稳定。这种 β -琼胶酶可作用于琼胶和长链的琼胶寡糖, 对 κ -卡拉胶无水解作用。

1992 年 Oscar Leon^[4]等筛选出一株交替单胞菌 (*Altermonas* sp. C-1) 并提纯了其胞外琼胶酶, 酶活收率为 45%。此酶是 β -琼胶酶, 酶分子量为 52 kD, 最适 pH 在 6.5, 低于 45℃ 时酶活性保持稳定。盐离子对它有抑制作用, 0.1mol/L 的 Na⁺、K⁺ 和 NH₄⁺ 都会使酶活降到 50% 以下, 这是比较特殊的一点。

1993 年 Yasushi sugano^[1]等提纯了弧菌 (*Vibrio* sp. JT0107) 的胞外琼胶酶, 提纯倍数为 45 倍, 酶分子量为 107 kD, 此酶是内切 β (1→4) 琼胶酶, 酶作用最适温度为 30℃, 最适 pH 在 8 左右, 它没有藻胶酶活性, 也不能水解卡拉胶。

1998 年, Jorge vera^[9]等从南太平洋近岸分离出一株可降解琼胶的革兰氏阴性细菌,

经鉴定为 *Pseudoalteromonas antarctica* Strain N-1。它产生的胞外琼胶酶被提纯 125 倍,达到电泳纯,酶活收率为 44%,此酶是 β -琼胶酶,酶分子量为 33 kD,最适 pH 在 7.0,在 30℃ 以下酶活性保持稳定,在不高于 0.5mol/L 的 Na^+ 存在的条件下,不会影响其活性。

相比之下,仅有少数几种 α -琼胶酶得到研究和报道。1993 年, Potin^[3] 等分离纯化出第一个 α -琼胶酶,所用菌种是交替单胞菌 *Altermonas agarlytics* GJ1B。此酶被提纯,在 SDS-PAGE 电泳显示为一条带,据此测得其分子量为 180 kD,然而通过亲和层析得到的酶经过 Native 电泳显示其分子量为 360 kD,表明此酶是一个二聚体。它的等电点约为 pH 5.3,最适作用 pH 在 7.2,在 pH 6.0 ~ 9.0 范围内酶活性较高,酶活性依赖于 Ca^{2+} 的存在,长时间处于低于 pH 6.5 或高于 45℃ 条件下,都会导致酶活性的丧失。

4 琼胶酶的分子生物学研究

迄今为止,有少数几种琼胶酶的基因得到了克隆和定序。1987 年, Buttner M J^[10] 等报道了天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor* A3 (2)) 的琼胶酶基因 *dagA* 的序列。1989 年, Robert Belas^[11] 报道了大西洋假单胞菌 (*Pseudomonas atlantica*) 编码产生 β -琼胶酶的 *agrA* 基因。*agrA* 基因的 DNA 序列已经测定,共有 1,515 对碱基对。通过其碱基对序列预测其蛋白质一级结构为 504 个氨基酸残基构成,分子量为 57,486D。把这个推理得出的大西洋假单胞菌产生的 β -琼胶酶蛋白质的氨基酸序列同天蓝色链霉菌 A3 (2) 的 β -琼胶酶蛋白质结构比较,结果表明它们有几个共同的功能域。1993 年, Yasushi sugano^[12] 等从弧菌 JT0107 的基因组克隆了 *agaA* 基因,共有 2985 对碱基对,编码产生的琼胶酶 0107 有 975 个氨基酸残基,分子量为 105,271 D,并且测得其 N 末端有一段 20 个氨基酸残基组成的信号肽。把推测出的琼胶酶 0107 的氨基酸序列同天蓝色链霉菌和大西洋假单胞菌编码产生的 β -琼胶酶蛋白质结构比较,发现它们有两个共同的功能域。把 *agaA* 基因克隆到大肠杆菌中并得到表达,分泌出的蛋白 AgaA 具有琼胶酶活性。

5 琼胶酶的应用研究

5.1 用作海藻酶解的工具酶 由于琼胶是某些红藻细胞壁的重要组成成分,因此琼胶酶可用作大型海藻酶解的工具酶,来获得单细胞或原生质体。海藻原生质体可用于海藻细胞生理生化的研究,也可以进行细胞间的融合以及进行目的基因的导入,因此,琼胶酶可用作海藻遗传工程的工具酶。

用酶法分解大型海藻来获取单细胞,是比较理想的方法。过去所用的海藻解壁酶多是从海洋动物消化系统中分离制备的,动物源的海藻解壁酶是一种复合酶,琼胶酶是其中的主要成分之一。从海洋动物中提取海藻解壁酶要受到诸多条件的限制,难以进行大规模生产。因此,开发微生物源的海藻解壁工具酶,具有重要应用价值。

Araki T^[13] 等利用海洋弧菌 (*Vibrio* sp. PO-303) 生产的琼胶酶,配合纤维素酶及其它酶种,水解红藻获得大量海藻单细胞。海藻单细胞可以作为替代饵料用于海水动物的养殖。贝类育苗通常是以天然单细胞藻类作为饵料,但在现代化大规模工厂化育苗中,单细胞藻类远不能满足需要。戴继勋等应用海藻解壁酶从大型海藻中分离单细胞,用作替代饵料投喂扇贝,扇贝发育完全正常。^[14]

5.2 在分子生物学方面的应用 利用琼胶酶从琼脂糖凝胶中回收 DNA 和 RNA,已经被证明是最好的方法之一。Y Sugano 利用弧菌 (*Vibrio* sp. Strain JT0107) 产生的 β -琼胶酶

进行了从琼脂糖凝胶电泳中回收 DNA 的研究。^[1]目前,已经有成熟的技术方法进行 DNA 的回收:琼胶酶 5000U/mL, -20℃ 冰箱保存。PCR 产物利用高等级低熔点琼脂糖进行电泳,切下感兴趣的条带,将其放入小管里融化(温度一般在 65℃ ~ 70℃),冷却 30s,加入适量琼胶酶(每 100μL 凝胶加入 1.5μL 琼胶酶),40℃ 左右保温直至琼脂糖完全液化, DNA 样品即可放入冰箱备用。

5.3 用于海藻多糖结构的研究 用琼胶酶水解某些海藻的多糖,测定其水解产物的结构,进而推测多糖的结构,是行之有效的办法。Lora M Morrice^[15]等利用大西洋假单胞菌生产的高纯度 β-琼胶酶降解紫菜聚糖,然后用 NMR 光谱法测定其降解产物结构,从而推知紫菜聚糖的结构。

5.4 用于琼胶寡糖的制备 近年来,寡糖由于具有多种生理功能而倍受关注。海藻多糖,如褐藻胶、琼胶、卡拉胶等,一定分子量的降解产物具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等作用。天然多糖因其粘度高、溶解性低,影响了其在医药中的应用。已经有报道用 β-琼胶酶处理英国江蓠 (*Gracilaria verrucosa*) 水溶性多糖级分 GWS 和条斑紫菜多糖 PASF,使其粘度降低,可溶性增加,活性增强。另外,琼胶寡糖在食品生产中应用前景广阔,如可用于饮料、面包的生产及低热量食品,近年来,在日用化工领域也发现了琼胶寡糖的一些新用途。

参 考 文 献

- [1] Sugano Y, Terada I, Arita M, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59** (5): 1549 ~ 1554.
- [2] Agbo J A C, Moss M O. J Gen Microbiol, 1979, **115**: 355 ~ 368.
- [3] Potin P, Richard C, Rochas C. *et al.* Eur J Biochem, 1993, **214**: 599 ~ 607.
- [4] Leon O, Quintana L, Peruzzo G, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58** (12): 4060 ~ 4063.
- [5] Ghad S C, Muraleedharan U D, Jawaid S. Journal of Marine Biotechnology, 1997, **4/5**: 194 ~ 200.
- [6] Hassairi I, Amar R B, Nonus M. *et al.* Bioresource Technology, 2001, **79**: 47 ~ 51.
- [7] Morrice L M, Mclean M W, Williamson F B, *et al.* Eur J Biochem, 1983, **135**: 553 ~ 558.
- [8] Aoki T, Araki T, Kitamikado M. Eur J Biochem, 1990, **187**: 461 ~ 465.
- [9] Vera J, Alvarez R, Murano E, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64** (11): 4378 ~ 4383.
- [10] Buttner M J, Fernley I M, Bibb M J. Mol Gen Genet, 1987, **209**: 101 ~ 109.
- [11] Belas R. Journal of Bacteriology, 1989, **171** (1): 602 ~ 605.
- [12] Sugano Y, Matsumoto T, Kodama H, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59** (11): 3750 ~ 3756.
- [13] Araki T, Lu Z, Morishita T. Journal of Marine Biotechnology, 1998, **6** (3): 193 ~ 197.
- [14] Dai J X, Wang H, Han B Q, *et al.* Marine Biotechnology, 2000, **2** (1): 1 ~ 4.
- [15] Morrice L M, Mclean M W, Long W F, *et al.* Eur J Biochem, 1983, **133**: 673 ~ 684.