

琼胶酶研究进展

马翠萍* 石超

(青岛科技大学化学与分子工程学院 青岛 266042)

摘要: 琼胶酶是一种多糖水解酶, 根据其降解琼脂糖的作用方式不同, 可以分为 α -琼胶酶(EC 3.2.1.-)和 β -琼胶酶(EC 3.2.1.81)。本文结合自己的研究, 从琼胶酶的生物学研究、酶的分类、晶体结构、催化机理以及酶的应用等几个方面综述了琼胶酶的研究进展。

关键词: 琼胶酶, 糖苷水解酶, 综述

Advance in Research of Agarase

MA Cui-Ping* SHI Chao

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042)

Abstract: Agarases are glycoside hydrolases. They are grouped into α and β types, which hydrolyze α -1, 3 linkages and β -1, 4 linkages respectively. The paper is about advance in research of agarase including the research of biology, the classification, the crystal structure, the catalysis mechanism and application of agarases.

Keywords: Agarase, Glycoside hydrolase, Review

琼胶酶(Agarase)是能够降解琼胶的水解酶, 根据其作用方式不同, 可以把琼胶酶分为两类: α -琼胶酶和 β -琼胶酶。 α -琼胶酶裂解琼脂糖的 α -1, 3糖苷键, 生成以 3, 6-内醚- α -L 半乳糖为还原性末端的琼寡糖系列; β -琼胶酶裂解琼脂糖的 β -1, 4糖苷键, 生成以 β -D-半乳糖为还原性末端的新琼寡糖系列^[1]。目前所发现的琼胶酶中, 大多数都是 β -琼胶酶, 只有 3 种是 α -琼胶酶^[2]。根据氨基酸序列相似性, 琼胶酶被归属在糖苷水解酶家族(Glycoside hydrolase family)中的 GH-16, GH-50 和 GH-86 (<http://www.cazy.org/>)^[3]。迄今, 除了马翠萍等发现的 β -琼胶酶 AgaB 降解琼脂糖的终产物为新琼八糖和十糖外, 其他的琼胶酶主要产物是二糖、四糖或六糖^[4]。琼

胶酶已广泛应用于食品、化妆品、医药行业以及基础研究领域。

1 琼胶酶的生物学研究

能够产生琼胶酶的微生物主要来自于海洋细菌, 其中 α -琼胶酶主要来自假单胞菌属、单胞菌属和弧菌属; β -琼胶酶主要来自弧菌属和交替单胞菌属。Groleau^[5]第一次从海水中分离到琼胶的分解细菌—琼胶假单胞菌(*Pseudomonas galatica*)以来, 人们已经从海水系统中分离到多种琼胶分解菌并分离纯化出了多种海洋细菌产生的琼胶酶, 对其酶学性质进行了研究。1977年, Groleau 和 Yaphe^[5]从大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantic*)中分离得到一种产

基金项目: 青岛科技大学博士科研启动基金

* 通讯作者: Tel: 0532-84022681; Fax: 0532-84023927; 信箱: sc169@163.com

收稿日期: 2007-05-31; 接受日期: 2007-07-11

物为新琼二糖的 β -琼胶酶。1983年, Morrice^[6]等对大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*)产生的琼胶酶系进行研究时发现: 大西洋假单胞菌不仅具有分泌于细胞外的 β -琼胶酶, 还有一种连接在细胞膜上的 β -琼胶酶。这两个 β -琼胶酶都能降解琼脂糖产生新琼二糖。

1990年, Aoki^[7]等分离出一株弧菌(*Vibrio* sp. AP-2)。它产生的琼胶酶是 β -琼胶酶, 此酶在低于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, 以新琼二糖作为主产物。

1993年, Sugano^[8]等分离和提纯了弧菌(*Vibrio* sp. JT0107)的胞外琼胶酶, 此酶分子量为107 kD, 是一种内切型的 β -琼胶酶。在pH为8时降解琼胶的 β -1, 4糖苷键, 产生新琼四糖和新琼六糖。

1998年, Araki^[9]等研究发现海洋弧菌(*Vibrio* sp. PO-303)能产生3种胞外琼胶酶a、b和c。这三种琼胶酶经硫酸铵沉淀和逐级柱层析后, 分子量分别为87.5 kD、115 kD和7 kD。琼胶酶a水解琼胶的主要产物是新琼四糖和新琼六糖; 琼胶酶b的主要水解产物是新琼二糖和新琼低聚糖; 琼胶酶c的主要产物是新琼八糖和十糖(无后续报道和基因克隆)。

2004年, Ohta^[10]等从深海中分离到1株*Microbulbifer* Strain JAMB-A7。3个 β -琼胶酶基因agaA7、agaA和agaO从这个菌株中被克隆, 它们分别编码了分子量为48.989 kD、48.203 kD和126.921 kD的三个蛋白R agaA7、rAgaA和rAgaO。R agaA7的最适pH和温度分别为7.0和50℃, 该酶的降解方式表现为内切, 降解琼脂糖的主要终产物是新琼四糖。rAgaA的最适pH和温度分别为7.0和55℃, 以新琼四糖作为主要的终产物。RagaO由两个碳水化合物结合模序和一个催化模序组成, 以内切的方式作用于琼脂糖和六糖以上的寡糖片段, 产生新琼六糖作为主产物。

2005年, 从海洋细菌*Zobellia galactanivorans* Dsij中克隆到两种 β -琼胶酶AgaA和AgaB的基因, 其编码蛋白的理论分子量分别为60 kD和40 kD。AgaA表现为多模块蛋白, 包括一个催化区域和两个C末端未知功能区域; 而AgaB表现为单模块蛋白, 由N末端的信号肽和催化区域组成。经分子排阻和质谱分析发现, AgaB在溶液中以二聚体形式存在, AgaA催化区域是单体蛋白。两个琼胶酶都随机切割 β -1, 4糖苷键: AgaA降解琼脂糖的终产物是新琼四糖和六糖, AgaB降解琼脂糖的终产物是新琼四糖和二糖^[11]。

随着分子生物学的发展, 更多海洋微生物来源的海藻多糖降解酶被发现和纯化, 并且其基因也得到了克隆和测序。迄今为止, 有二十几种琼胶酶的基因得到了克隆和测序: 来自*Streptomyces coelicolor* A3(2) (GenBank X05811)^[12]、*Aeromonas* sp. (GenBank U61972)、*Pseudomonas* sp. ND137(GenBank AB063259)、*Pseudoalteromonas* sp. CY24 (GenBank AY150179)、*Pseudoalteromonas atlantica* ATCC 19262 (GenBank M73783)和*Zobellia galactanivorans* Dsij (GenBank AX008608和GenBank AX008610)^[11]等不同菌的 β -琼胶酶。与 β -琼胶酶的生物学研究相比, α -琼胶酶的研究较少。

1978年, Young^[13]等从一种革兰氏阴性海洋细菌中分离出一种 α -琼胶酶。此酶经硫酸铵沉淀和DEAE-纤维素柱被提纯。它断裂琼脂糖的 α -1, 3糖苷键, 生成以 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四糖和琼六糖, 这是第一次被提纯的 α -琼胶酶。

1993年, Potin^[14]等从交替假单胞菌*Alteromonas agaralytics* GJ1B分离纯化出一种 α -琼胶酶, SDS-PAGE电泳测得其分子量为180 kD。然而, 亲和层析后的酶Native电泳显示其分子量为360 kD, 表明此酶是一个二聚体。它的最适作用pH在7.2, 酶活性依赖于Ca²⁺的存在。

到目前为止, 只有三种 α -琼胶酶的基因被克隆, 它们来自于*Pseudoalteromonas* sp. KJ 2-4 (GenBank AY164641和AY488029)和一个海洋细菌菌株2-40^[15]。

2 琼胶酶在糖苷水解酶家族中的分类及序列比较

现有糖苷水解酶的分类主要根据底物和产物特异性、作用方式(内切还是外切)或立体化学机制。但是, 这些分类方法都存在一定的缺陷。随着糖苷水解酶的氨基酸序列和3D结构研究的不断增多, 以及各种催化残基鉴定方法的出现, 在1991年, 一个新的结合序列特征、3D结构、底物特异性和反应机制的糖苷水解酶分类方法被确立^[3]。因为这个方法是建立在氨基酸序列相似性的基础上, 酶的3D结构与它们的一级结构有很大的相关性。所以从它们的一级结构可以得出一些有用的结构和反应机制的信息。根据这个分类方法, 糖苷水解酶家族已经从2001年的85个增长到现在的108个家族(<http://www.cazy.org/>)。

已知琼胶酶被归属在糖苷水解酶家族中的

GH-16, GH-50 和 GH-86。图 1 显示了部分琼胶酶的进化关系。在琼胶酶的三个糖苷水解酶家族中, GH-16 是研究最深入的一个家族, 大多数 β -琼胶酶都属于 GH-16, 它包括来自于 *Streptomyces coelicolor* A3(2)^[12]、*Aeromonas* sp.、*Pseudomonas* sp. ND137、*Pseudoalteromonas* sp. CY24、*Pseudoalteromonas atlantica* ATCC 19262 和 *Zobellia galactanivorans* Dsij 等不同菌的 β -琼胶酶。它们的三维结构酷似一个“三明治”, 球状结构几乎全部由 β -折叠和表面 loop 组成, 其中的每一个 β -折叠片层由 8 个 β -链组成; 其活性中心都是两个酸性氨基酸 Glu, 它们分别作为保持异头构型的两步置换反应(Retaining mechanism)的催化亲核基团(Catalytic nucleophile)和酸碱催化剂(Acid/base catalyst)。这两个谷氨酸之间相隔三个或四个其它的氨基酸, 其保守的催化模序是 E[ILV]D[IVAF][VILMF](0, 1)E。在对 16 家族的琼胶酶基因序列进行了同源性比较后发现, 这些琼胶酶中的相似性区域都在 N 末端^[11]。海洋细菌 JAMB-A94 的 β -琼胶酶 AgaA 在 NCBI 的保守区域网站搜索发现在 Gly338–Leu433 存在一个碳水化合物结合模序 6(CBM6)。来自于海洋细菌 *Microbulbifer* 菌株 JAMB-A7 的 RagaA7 的 C 末端有一个碳水化合物结合模序。AgaO 来自类似于 *Microbulbifer* 的分离物。它的氨基酸序列分析发现, 此酶是一个模块蛋白, 有两个碳水化合物结合模序(CBM)^[10]。

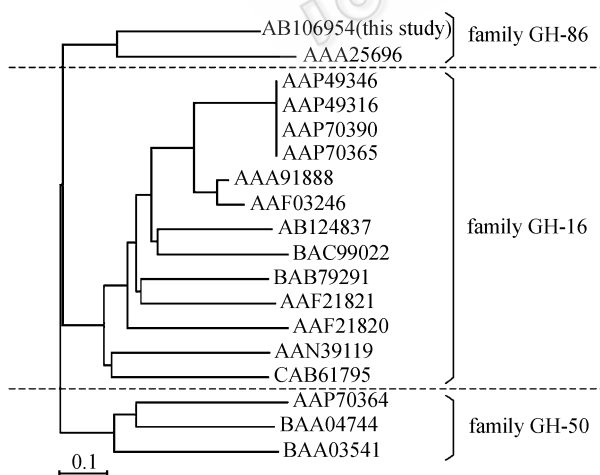


图 1 部分琼胶酶的进化关系^[10]

Fig. 1 The evolution relationship of agarases^[10]

GH-50 家族包括 5 种琼胶酶, 它们来自于 *Vibrio* sp. JT0107^[8]和不可培养细菌, 这个家族的三维结

构、水解机制和活性中心仍然未知。

GH-86 家族只有两种来自于 *Pseudoalteromonas atlantica* 和 *Microbulbifer* sp. JAMB-A94 的 β -琼胶酶^[10], 它们被推断采用了 $(\beta/\alpha)_8$ 的桶状结构和与 GH16 家族成员一样的水解机制——保持异头构型的两步置换反应。

因为蛋白质的三维结构比一级结构更保守, 所以一些建立在氨基酸序列相似性基础上的糖苷水解酶家族表现出了相似的三维结构, 这些在三维结构上相似的家族建议被归为超家族(Clans)。这样的超家族已经从 1997 年的五个猛增到现在的 14 个 (GHA-GHN) (<http://www.cazy.org/>), 其中最大的一个是糖苷水解酶家族 GHA。GHA 超家族也被称为 4/7 超家族, 因为它的质子供体和亲核基团分别在 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构的第四条和第七条链(strands)上。在超家族 GHA 中有一些酶的结构已经被报道, 疏水簇分析(Hydrophobic cluster analysis HCA)被用来寻找其他属于这个超家族的成员^[16]。

3 琼胶酶的晶体结构

2003 年, 来自于 *Zobellia galactanivorans* Dsij 的 β -琼胶酶 A 和 B 的晶体结构被测定, 这对于研究琼胶酶和糖苷水解酶的构效关系起到了重要的作用。这两个琼胶酶属于 GH-16 家族, 其折叠结构与其它 GH-16 家族中已知晶体结构的酶相比有很大的相似性。它的三维结构酷似一个“三明治”, 球状结构几乎全部由 β -折叠和表面 loop 组成, 其中的每一个 β -折叠片层由 8 个 β -链组成。该酶三维结构表明其催化腔呈裂缝状, 与其内切的作用方式相适应。催化腔有 35Å, 能够容纳 8 个糖单位。根据传统的底物结合位点命名法, 其底物结合位点从-4 到+4^[11]。经研究发现, 催化腔的大小与降解产物的大小有直接关系。从该酶的三维结构可以看出, 虽然它与 GH-16 家族的其它成员有很低的序列相似性, 但是它们的二级结构都采用了 β -jelly-roll 的形式, 三维结构也表现出很大的相似性。

在 2004 年, Julie Allouch 等^[17]收集了 *Zobellia galactanivorans* Dsij 的 β -琼胶酶 A 的突变体 E147S 与琼八糖的共晶体 1.7 Å 分辨率的衍射数据。两个寡糖链结合到蛋白上, 第一条链结合到活性位点的-4 到-1 位, 平行于活性位点的对面结合了八个糖单位。

这两个晶体的获得提供了关于琼胶酶对琼脂糖底物识别的详细信息。 β -琼胶酶 A 的活性位点位于由弯曲的 β -折叠片层形成的催化腔中, 两个酸性氨

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

基酸 Glu-147 和 Glu-152 定位在紧连-1 底物结合位点的地方。晶体结构表明, 琼八糖的前四个糖环占据了四个底物结合位点的糖苷结合一边, 而其余的四个糖环在晶体结构中紊乱并不可见。

4 琼胶酶的水解作用机理

在 1953 年, Koshland 第一次提出了糖苷水解酶的水解反应是典型的酸碱和亲核水解反应。根据产物异头碳构象的不同, 糖苷水解酶的催化反应可分为两大类, 即保持异头构型的两步置换反应 (retaining mechanism) 和形成倒位异头构型的一步置换反应 (invertin mechanism)^[18]。

对于琼胶酶水解机理方面的研究还比较少。在 1993 年, Potin^[14] 等报道 GH16 家族 β -琼胶酶的催化机制采用了两步置换反应, 其水解产物的异头碳构象没有发生变化。2005 年, 通过核磁共振氢谱, 来自 *Zobellia galactanivorans* 的 β -琼胶酶 AgaA 和 AgaB 的水解机制被鉴定。将 10 mg 的琼脂糖干粉直接放在核磁管中用重水 (D_2O) 溶解, 然后在 500 MHz Bruker 核磁共振波谱仪中冷却到 45 $^{\circ}C$, 记录谱图后, 迅速加入 1 mg 冷冻干燥的重组 β -琼胶酶 AgaA 和 AgaB, 每隔 5 min 记录一次谱图, 直到 2 h, 24 h 后酶解反应完成。经谱图分析发现, 该酶采用的也是两步置换反应^[19]。

5 新型 β -琼胶酶 AgaB

最近本实验室从青岛近海发现了一株高产琼胶酶的假单胞菌 CY24 (*Pseudoalteromonas* sp. CY24)。利用构建基因组 DNA 文库和水解圈筛选的方法, 从中筛选到一个编码琼胶酶基因 *agaB*^[4]。*agaB* 基因的开放阅读框架为 1437 bp, 编码 478 个氨基酸, 理论分子量为 50.9 kD, 在 N 末端有一个包含 38 个氨基酸的信号肽。成熟蛋白质的分子量和等电点分别为 47.2 kD 和 4.83。AgaB 的氨基酸序列与已知蛋白质包括所有的糖苷水解酶序列完全没有相似性; HCA 的蛋白质二级结构分析结果表明 AgaB 也不同于其他已知琼胶酶。在底物特异性方面, AgaB 能够降解琼胶和琼脂糖, 但是不能降解卡拉胶、褐藻胶和几丁质。AgaB 不同时间降解产物的 FACE 电泳显示, 其降解模式表现出了明显的内切酶特征。AgaB 降解琼脂糖的主要终产物是新琼八糖和十糖, 不同于已报道的琼胶酶 (降解琼脂糖的主要终产物是新琼二糖、四糖或六糖)。AgaB 不同时间降解产物的 1H -NMR 谱图结果表明: AgaB 的水解

机制是一步置换反应的倒位型, 这是首个被发现以此水解机制降解的琼胶酶。综上所述, AgaB 是一个结构和功能全新的 β -琼胶酶, 推测它代表一个新的糖苷水解酶家族。 β -琼胶酶 AgaB 的发现必将为琼胶酶乃至糖苷水解酶构效关系的研究开辟一个崭新的阶段。

6 琼胶酶的应用

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^[20]。在分子生物学实验中, 利用琼胶酶从琼脂糖凝胶中回收 DNA 和 RNA 已经是常规手段。也有报道通过研究测定琼胶酶水解某些海藻多糖的水解产物的结构来推测海藻多糖的结构^[21]。

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、卡拉胶等) 的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。随着糖生物学和化学研究的飞速发展, 人们逐渐发现不同聚合度的琼胶寡糖也具有抗氧化等多种生理功能。另外, 琼胶寡糖在食品生产中有广泛的应用, 如可用于饮料、面包及一些低热量食品的生产。近年来, 在日用化工领域又发现了琼胶寡糖的一些新用途。日本以琼胶寡糖为添加剂生产的化妆品对皮肤的保湿效果良好, 对头发有很好的调理效果。但是, 寡糖的制备仍是一个世界性的难题, 传统的降解琼胶的方法反应条件比较剧烈, 专一性差, 水解产物容易破坏, 不利于产物的分析和回收。酶解反应条件易于控制, 有利于特定寡糖的大量制备。迄今为止, 已报道琼胶酶的降解产物大多是新琼二糖、新琼四糖和新琼六糖。而我们发现的琼胶酶 AgaB 具有高比活力和降解琼脂糖产生高聚合度寡糖等特性, 相信它将会在食品、化妆品、医药行业以及生物技术研究领域发挥更大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Arnott S, Fulmer A, Scott WE, *et al.* The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J Mol Biol*, 1974, **90**(2): 269-284.
- [2] Kloareg B, Quatrano RS. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological function of the matrix polysaccharides. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*, 1988, **26**: 259-315.
- [3] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid similarities. *Biochem J*, 1991, **280** (2): 309-316.

- [4] Ma CP, Lu XZ, Shi C, *et al.* Molecular Cloning and Characterization of a Novel β -Agarase, AgaB, from Marine *Pseudoalteromonas* sp. CY24. *J Biol Chem*, 2007, **282** (6): 3747–3754.
- [5] Groleau D, Yaphe W. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of beta neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can J Microbiol*, 1977, **23**(6): 672–679.
- [6] Morrice LM, McLean MW, Williamson FB. Beta-agarase and from *Pseudomonas atlantica*: purification and some properties. *Eur J Biochem*, 1983, **135**(3): 553–558.
- [7] Aoki T, Araki T, Kitamikado M. Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur J Biochem*, 1990, **187**(2): 461–465.
- [8] Sugano Y, Terada I, Arita M, *et al.* Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(5): 1549–1554.
- [9] Araki T, Hayakawa M, Lu Z, *et al.* Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303. *J Mar Biotechnol*, 1998, **6**(4): 260–265.
- [10] Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 beta-agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**(3): 266–275.
- [11] Allouch J, Jam M, Helbert W, *et al.* The three-dimensional structures of two beta-agarases. *J Biol Chem*, 2003, **278**(47): 47171–47180.
- [12] Buttner MJ, Fearnley IM, and Bibb M. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *J Mol Gen Genet*, 1987, **209**(1): 101–109.
- [13] Young KS, Bhattacharjee SS, Yaphe W. Enzyme cleavage of the alpha linkages in agarose to yield agarooligosaccharides. *Carbohydr Res*, 1978, **66**: 207–212.
- [14] Potin P, Richard C, Rochas C, *et al.* Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarilyticus* (cataldi), strain GJ1B. *Eur J Biochem*, 1993, **214**(2): 599–607.
- [15] Whitehead LA, Stosz SK, Weiner RM. Characterization of the agarase system of a multiple carbohydrate degrading marine bacterium. *Cytobios*, 2001, **106**(Suppl 1): 99–117.
- [16] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, **7**(5): 637–644.
- [17] Allouch J, Helbert W, Henrissat B, *et al.* Parallel substrate binding sites in a beta-agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose. *Structure*, 2004, **12**(4): 623–632.
- [18] Koshl DE. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1953, **28**: 416–436.
- [19] Jam M, Flament D, Allouch J, *et al.* The endo- beta-agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochem J*, 2005, **385** (Pt 3): 703–713.
- [20] 戴继勋, 胡景杰, 王海, 等. 大型藻酶解单细胞用于贝类育苗的研究. *中国海洋大学学报*, 2004, **34**(5): 795–798.
- [21] Morrice LM, McLean MW, Long MW, *et al.* Porphyran primary structure: An investigation using beta-agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 1983, **133**(3): 673–684.

名师讲堂

为进一步发挥期刊的优势, 为全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 从2008年起, 本刊特设了“名师讲堂”栏目。该栏目主要邀请有多年生物学教学经验的名师撰写, 力求通过推广名师教学的经验, 作为青年教师提高教学水平的参考材料。

竭诚欢迎所有的教学名家不吝赐稿, 将您的教学体会、独家心得整理出来, 在这个平台上与全体教学工作者共享。