

文章编号: 1005-8737(2001)03-0094-03

·综述·

细菌降解琼胶的研究进展

Research advance on agar degradation by bacteria

王静雪, 江晓路, 胡晓珂

(青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

WANG Jing-xue, JIANG Xiao-lu, HU Xiao-ke

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

关键词: 琼胶酶; 琼胶; 细菌; 降解

Key words: agarase; agar; bacteria; degradation

中图分类号: Q557

文献标识码: A

琼胶和琼胶糖广泛应用于生化、临床、医药、食品等领域。琼胶类硫酸多糖对B型流感病毒、腮腺炎及脑膜炎病毒等有抑制作用。在琼胶糖结构研究中,人们发现某些细菌的胞外酶能够使琼胶裂解成低分子的寡糖,经过分离、纯化,用纸色谱法、化学方法、核磁共振光谱法确定它们的聚合度、取代基的位置和糖单位的结合顺序^[1]。酶法降解条件温和、专一性强,水解产物不易被破坏,利于产物分析和回收,因而逐渐代替了传统的酸解法。琼胶作为微生物培养基的凝固剂,大多数微生物不能使琼胶液化。因此,寻找一种高效的琼胶降解菌成为研究琼胶降解的关键。

1 琼胶的基本结构和性质

琼胶是琼胶糖(agarase)和硫酸琼胶(agarose)的混合物。琼胶糖是由1,3连接的 β -D-半乳糖和1,4连接的3,6-内醚- α -L-半乳糖残基反复交替连接的链状中性糖。硫酸琼胶结构较复杂,含有D-半乳糖、3,6-半乳糖酐、半乳糖醛酸和硫酸基、丙酮酸^[1]。

琼胶是从某些红藻中提取出来的亲水性多糖。它在冷水中不溶,溶于 $>70^{\circ}\text{C}$ 的热水中。1.5%的水溶液澄清,冷却到 $34\sim 43^{\circ}\text{C}$ 时形成坚固的凝胶。琼胶的硫酸基含量低于卡拉胶,灰分规定不超过5%(一般2.5%~4.0%)。

2 琼胶酶的来源

2.1 微生物来源

从1902年Groleau^[2]第1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降解菌。如*Cytophaga*(噬细胞菌属)^[3]、*Vibrio*(弧菌属)^[4,5]、*Streptomyces*(链霉菌属)^[6]、*Pseudomonas-like*(类假单胞菌属)^[7]、*Alteromonas*(别单胞菌属)^[8]、*Pseudoalteromonas*(假别单胞菌属)^[9]、*Pseudomonas*(假单胞菌属)^[2,10,11]中的某些菌株也能降解琼胶。此外,有报道从土壤中分离出1株能降解琼胶的弧菌^[12]。在琼胶生产工厂周围的土壤中发现了1株新的具有脱色能力的琼胶降解菌*Pseudomonas wellantypicum*^[13]。这些降解琼胶的细菌多为革兰氏阴性杆菌,端生单根鞭毛,呼吸方式以需氧为主。

2.2 其他来源

降解琼胶的酶还可从一些软体动物中分离得到。海兔属(*Aplysia dactylomela*)、鲍属(*Haliotis coccoinea*)、滨螺属(*Littorina striata*)、冠海扇属(*Diadema antillarum*)中可分离出琼胶酶^[3,14]。

3 琼胶酶的分类与作用机制

3.1 琼胶酶的分类

根据其作用方式,降解琼胶糖的琼胶酶可分为2类:

(1) α -琼胶酶 裂解琼胶糖的 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寡糖(agarooligosaccharides)系列。

(2) β -琼胶酶 裂解琼胶糖的 β -1,4糖苷键,生成以 β -D-半乳糖为还原性末端和以3,6-内醚- α -L-半乳糖为非还原性末端的新琼寡糖(neoagarooligosaccharides)系列。

3.2 琼胶酶的作用机制

近几十年研究显示,专一性降解琼胶的琼胶酶具有两种机制^[9]:

收稿日期:2000-12-16

作者简介:王静雪(1976-),女,硕士研究生,从事海洋应用微生物研究。

(1)一种内切 β -琼胶酶断裂大的琼胶聚合物的 β -1,4糖苷键形成以新琼四糖为最终产物的寡糖混合物。这些寡糖再被外切的 β -琼胶酶水解,产生新琼二糖。最后,新琼二糖在细胞质内被新琼二糖水解酶水解成3,6-内醚-L-半乳糖和半乳糖。

(2)胞外 α -琼胶酶裂解琼胶糖的 α -1,3糖苷键,产生以D-半乳糖为非还原端的琼二糖序列。

4 琼胶酶的生物学性质及其酶系

4.1 α -琼胶酶

1955年 Ishimatsu 等^[1]从琼胶液化弧菌(*Vibrio agaritq-*

uefaciens)中分离出琼胶酶。琼胶在分解初期粘度急速下降,生成还原糖,失去凝固性。并证明由此酶分解生成的还原糖多为琼二糖。

1978年 Young 等^[15]从一种革兰氏阴性海洋细菌中分离出一种琼胶酶。此酶经硫酸铵沉淀、DEAE-纤维素柱进行提纯。纸色谱法证明水解产物含有琼四糖和琼六糖,琼胶糖的 α -1,3糖苷键被裂解,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寡糖。由¹³C-NMR谱图的化学位移也证实此水解酶为 α -琼胶酶。这是第一次被提纯的 α -琼胶酶。

几种 α -琼胶酶的化学性质见表1。

表1 几种 α -琼胶酶的化学性质
Table 1 Chemical properties of α -agarase

产酶菌株 Strain	分子量/kD M	最适 pH Optimum pH	等电点 PI	底物 Substrate	产物 Product
别单胞菌 <i>Alteromonas GJ1B</i> ^[5]	360	7.2	5.3	琼脂糖	琼三糖、琼四糖
弧菌 <i>Vibrio J10107</i> ^[8]	42	7.7	4.6	新琼寡糖<6	3,6-内醚半乳糖、D-半乳糖

4.2 β -琼胶酶

1956年 Araki^[16]于琼胶溶液中加入京都假单胞菌(*Pseudomonas kyotoensis*)的胞外酶制品,于适宜条件下进行水解,水解液经活性碳色谱柱吸附,以乙醇梯度洗脱。从7.5%乙醇洗脱液中分离出 α 型的新琼二糖,从17%乙醇洗脱液中分离出新琼四糖。这种酶先使 β -1,4糖苷键水解,生成新琼寡糖,然后在此键处进一步水解生成新琼二糖和新琼四糖,这是同系列寡糖中两种最小的单元。由此表明,这种水解酶是 β -琼胶酶。

1975年 Van der 等^[17]将噬细胞菌属(*Cytophaga flaven-*
sis)在初始 pH 6.6~7.0 的范围内,以琼胶作为唯一碳源、硝酸铵为氮源的 20℃ 下培养。在分批培养液中,葡萄糖抑制酶的合成;在连续培养中随着生长速度的提高,酶的产量降低。在含有 1.3 mmol/L CaCl_2 、0.03% 水解酪蛋白氨基酸以及诱导物的存在下,在 pH 6.9 的磷酸缓冲液及 20℃ 的条件下,酶产量最高。酶产量在 15℃ 和 20℃ 时相同,而在 25℃ 时产量为原来的 50%,当温度达到 30℃ 时酶失活。在 0.03% 的水解酪蛋白氨基酸和 1.3 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在下,酶的产量提高。琼二糖和新琼低聚糖是有效的诱导物,且新琼四糖是最好的诱导物。诱导物浓度过高或加入葡萄糖会抑制分解代谢,且这种抑制不能被 cAMP 拮抗。

1977年 Grolean D 和 Yaphe W^[2]从大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantic*)中分离得到的 β -琼胶酶,产生聚合度(DP)为4、6、8和10的新琼低聚糖。此 β -琼胶酶可降解新琼四糖的 β -糖苷键以及新琼六糖和新琼八糖非还原端的 β -糖苷键,产生新琼二糖。 β -新琼四糖水解释可以被 NaCl、KCl、 CaCl_2 、 MnCl_2 和 MgSO_4 激活,新琼四糖的 K_m (米

氏常数)为 $3.4 \times 10^{-3} \text{M}$,不受 β -琼胶酶和 α -新琼二糖水解释活性的影响,也没有转糖苷酶活性。

1983年 Morrice L M^[18]分离纯化并鉴定了源于大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*)的 β -琼胶酶。用硫酸铵沉淀和 Sephadex G-100 可纯化得到 β -琼胶酶 I,分子量为 32 kD。在 pH 3.0~9.0 的范围内此酶有活性,最适 pH 7.0,40℃ 作用 2 h 以上此酶失活。通过 Sephadex-100 和羟基磷灰石及 DEAE-Sephacrose CL-6B 层析,从破裂的细胞可溶性碎片中得到 5-折叠的 β -琼胶酶 II,这个过程没有 β -琼胶酶 I 和二糖参与。NaCl 可以促进 β -琼胶酶 II 的产生,最适的 NaCl 浓度为 0.10~0.20 mol/L,最适 pH 6.5~7.5。

1993年 Sugano Y 等^[5]经过硫酸铵沉淀和逐级连续阴离子柱层析,分离和纯化出琼胶酶,分子量为 107 kD。经过氨基酸序列分析可知,这种蛋白质含有与其他海洋细菌所分泌的琼胶酶不一样的 N 末端顺序。这种新酶是一种内切型的 β -琼胶酶,在大约 pH 8 时降解琼胶的 β -1,4糖苷键,产生新琼四糖和新琼二糖,最适温度为 30℃。随后的研究发现此 β -琼胶酶不但降解琼胶,而且降解琼四糖产生琼二糖,这在 β -琼胶酶中是比较独特的。

1998年 Araki^[16]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、c,这 3 种琼胶酶通过硫酸铵沉淀和逐级的柱层析得到纯化,分子量大约为 87.5 kD、115 kD、57 kD。这些琼胶酶在 pH 6.5~7.5,温度 38~55℃ 时有最大活性,且氨基酸顺序各不相同。这些琼胶酶都能被 Hg^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 所抑制,且抑制作用对琼胶酶 a、c 要强于琼胶酶 b。琼胶酶 a 水解琼胶的主要产物是新琼四糖和新琼六糖,不能裂解琼四糖。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 不能降解新琼六糖。

几种 β -琼胶酶的化学性质见表 2。

表 2 几种 β -琼胶酶的化学性质
Table 2 Chemical properties of β -agarase

产酶菌株 Strain	分子量/kD M	最适 pH Optimum pH	底物 Substrate	产物 Product	温度/℃ Temperature
弧菌 <i>Vibrio</i> sp. AP-2 ^[4]	34	6.5	琼脂糖	新琼四糖	
	20	5.5	新琼四糖、更大的新 琼寡糖、琼脂糖	新琼二糖	< 45
	18	7.0	琼脂糖	新琼四糖	
噬细胞菌 <i>Cytophaga flevenis</i> ^[17]	26	6.3	含新琼二糖的多糖	新琼四糖 新琼六糖	30
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> ^[18]	32	7.0	未被取代的新琼二糖	新琼二糖 新琼四糖	15~20
假单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> ^[9]	33	7.0	琼脂糖	新琼四糖 新琼六糖	< 30
类假单胞菌 <i>Pseudomonas-like</i> ^[7]	63		新琼八糖	新琼四糖	43
	210	6.7	新琼八糖	新琼二糖 新琼四糖 新琼六糖	38

5 琼胶酶的基因研究

迄今只有几种琼胶酶的基因得到了克隆和定序。1987 年, Bibb M J^[6]得到了源于 *Streptomyces* 的琼胶酶的基因 dagA。1989 年 Belas^[10]第一次提出了源于 *Streptomyces coelicolor* 和 *Alteromonas atlantica* 的 β -琼胶酶存在着氨基酸序列相同的区域。并对源于 *Pseudomonas* 的琼胶酶的基因 agaA 进行了序列分析。1993 年 Yasushi 对来源于 *Vibrio* 的一种独特的基因 agaA 进行了克隆和定序。1994 年他又对同种菌的一种新的 β -琼胶酶的基因 agaB 进行了序列分析^[5,19]。1997 年 Ha J C^[11]对源于 *Pseudomonas* 的 β -琼胶酶在大肠杆菌上进行了重组。

琼胶降解菌主要存在于海洋中。限于海洋环境的特点及海洋微生物的特殊性,我们对海洋细菌的开发和认识还不够,大量的琼胶降解菌需要开发利用。以上这些研究为琼胶酶的工业化生产提供了可靠的理论依据和可行性设想,使琼胶酶的工业化生产成为可能。随着生物技术的不断发展,新的琼胶降解菌及琼胶酶被发现,利用琼胶酶降解得到大量的目的低分子量的琼寡糖将具有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 30-31.
- [2] Groleau D, Yaphe W. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of beta neoglycotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica* [J]. Can J Microbiol, 1977, 23(6): 672-697.
- [3] Usov A I, Miroshnikova L I. Isolation of agarase from *Littorina mandshurica* by affinity chromatography on Biogel A[J]. Carbohydr Res, 1975, 43(1): 204-212.
- [4] Aoki T, Araki T, Kitamikado M. Purification and characterization of a novel beta-agarase from *Vibrio* sp. AP-2 [J]. Eur J Biochem, 1990, 187(2): 461-465.
- [5] Sugano Y, Matsumoto T, Kodama H, et al. Cloning and sequencing of agar, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107 [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(11): 3750-3756.
- [6] Bibb M J, Jones G H, Joseph R, et al. The agarase gene(dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterization of the cloned gene product [J]. J Gen Microbiol, 1987, 133(Pt 8): 2089-2096.
- [7] Malmqvist M. Purification and characterization of two different agarose-degrading enzymes [J]. Biochem Biophys Acta, 1978, 537(1): 31-43.
- [8] Potin P, Richard C, Rochas C, et al. Purification and characterization of the alpha-agarase from *Alteromonas agaralyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B [J]. Eur J Biochem, 1993, 214(2): 599-607.
- [9] Vera J, Alvarez R, Murano E, et al. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* and characterization of its extracellular agarase [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(11): 4378-4383.
- [10] Belas R. Sequence analysis of the agar gene encoding beta-agarase from *Pseudomonas atlantica* [J]. J Bacteriol, 1989, 171(1): 602-605.
- [11] Ha J C, Kim G T, Kim S K, et al. Beta-Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1997, 26(Pt 1): 1-6.
- [12] 李宪臻, 张明, 金芳. *Vibrio* sp. LX 菌的分离及性质研究 [J]. 大连轻工业学院学报, 1998, 3: 3-5.

(下转第 93 页)