

琼胶酶及其综合应用的研究概况

刘江涛¹, 蔡俊鹏¹, 吴冰²

(¹华南理工大学食品与生物工程学院, 广东广州 510640) (²华南理工大学测试中心, 广东广州 510640)

摘要: 琼胶酶是一组能降解琼胶多糖的酶, 主要有 α -琼胶酶、 β -琼胶酶两种类型, 降解产物在很多方面有独特的活性, 除此以外, 琼胶酶在分子生物学方面也多有应用, 本文从琼胶酶的种类及作用机理、来源、分子生物学研究状况以及应用等方面概述了琼胶酶的研究进展。

关键词: 琼胶酶; 种类; 机理; 来源; 应用

Progress of Studies on Agarase and Its Applications

Liu Jiang-tao¹, Cai Jun-peng¹, Wu Bing²

(1College of Food Science and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

(2Centre for Chemical Analysis, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

Abstract: Agarase, the name for a set of enzymes which can hydrolyse agar, includes α -agarase and β -agarase. The products of agar enzymatic hydrolysis display many functional activities. Moreover, agarase can be applied in the field of molecular biology. This article summarizes the recent research progress on agarase and its applications in food industry.

Keywords: Agarase; Types; Mechanism; Origin; Applications

琼胶是一种从江篱、石花菜等红藻中提取出来的水溶性多糖, 主要由琼胶糖和硫酸琼胶两部分组成, 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]。琼胶酶能降解琼胶多糖, 这些降解产物在很多方面有重要应用, 而且, 琼胶酶在分子生物学等方面也多有应用, 因此, 对于琼胶酶的研究具有重要的意义。

1 琼胶酶的种类及作用机理

1.1 琼胶酶的种类^[1]

根据作用方式, 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。

1.2 作用机理

收稿日期: 2004-10-28

作者简介: 刘江涛, 在读硕士, 主要从事食品生物技术方面的研究工作

早期研究表明, 琼胶酶有两种不同的作用机理。第一种作用机理是在研究 *Pseudoalteromonas atlantica* ATCC 19292 的胞外 β -琼胶酶时发现的。首先, 琼胶聚合物的 β -1,4糖苷键被内切 β -琼胶酶裂解, 形成以新琼四糖为最终产物的寡糖混合物。这些寡糖混合物再被外切的 β -琼胶酶水解, 生成新琼二糖。最后, 新琼二糖水解酶在细胞质内将新琼二糖水解成3,6-内醚- α -L-半乳糖和半乳糖。第二种机理是琼胶糖的1,3-糖苷键被胞外的 α -琼胶酶裂解, 生成以D-半乳糖为非还原末端的琼二糖系列^[2]。

2 琼胶酶的来源及反应的条件

琼胶酶主要通过海洋微生物得到。1902年Groleau第1次从海水中分离到能分解琼胶的细菌—琼胶假单胞菌。从那以后人们已经从海水系统中分离到了多种琼胶分解菌^[1], 包括 *Pseudomonas*(假单胞菌属)、*Pseudoalteromonas*(假别单胞菌属)、*Streptomyces*(链霉菌属)、*Alteromonas*(别单胞菌属)、*Microscilla*、*Vibrio*(弧菌属)、*Cytophaga*(噬细胞菌属)等^[3]。如Leon(1992)分离出了一株别单胞菌^[4], Araki(1998)等分离出了一株高产琼胶酶的弧菌并纯化了胞外酶^[5]; 杜宗军(2002)等分离出了两株塔式弧菌^[6]; 褚艳等(2003)分离出了一株假单胞菌, 并进行了培养条件

优化^[7]等。除微生物,琼胶酶还可以从一些以海藻为食的海洋动物的肠道中分离得到,吴永沛等(2002)采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析和葡聚糖柱层析纯化技术,从九孔鲍内脏器官中提取纯化琼胶酶^[8]。

除此以外,一些非海洋产生琼胶酶的菌株被发现,包括从淡水中分离到的 *Cytophaga* sp.(噬细胞菌)和 *Alteromonas* sp.(别单胞菌),从土壤中分离到的 *Bacillus* sp.(枯草杆菌)、*Cytophaga* sp.(噬细胞菌)以及 *Streptomyces coelicolor*(链霉菌),Hofsten(1975)从废水中分离到了一株能降解琼脂的革兰氏阴性菌(未鉴定)。而且还有报导,在植物的根围中也存在着能产生琼胶酶的菌株^[9]。

菌株的来源和种类不同,其反应最适条件也略有不同,但早期的研究显示,对于很多菌株产生的 β -琼胶酶而言,它们有两个共同特点: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℃。但也有些例外,Yasushi sugano 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^[10]。对于 α -琼胶酶的研究目前还比较少。

3 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测序。1987 年,Buttner M J 等报道了天蓝色链霉菌的琼胶酶基因 *dagA* 的序列;1989 年,Robert Belas 报道了大西洋假单胞菌编码产生 β -琼胶酶的 *agrA* 基因,*agrA* 基因 DNA 序列已经测定,共有 1515 对碱基对^[10]。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,1997 年,Ha J C 对源于假单胞菌的 β -琼胶酶在大肠杆菌上进行了重组^[1]。2004 年,Ohta Y 等克隆和定序了海洋菌 JAMB-A94 产生的 β -琼胶酶的 *agaA* 基因。目前研究证实,即使有些 β -琼胶酶的功能相似,但它们的氨基酸序列、分子量、底物特异性、反应特性等方面存在着很大的差异^[3]。

4 琼胶酶的应用

4.1 制备琼脂低聚糖

琼胶酶降解产生琼脂低聚糖,具有高效性和专一性的特点,而且降解条件温和,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^[1]。由于琼脂低聚糖具有多种特殊功能而倍受关注,主要如下:

4.1.1 作为天然防腐剂

琼脂的酶解产物琼脂糖,具有较强的抑菌作用,在浓度达 3.11%时,能有效的减少菌落产生^[11],因此是一种很好的天然防腐剂。

4.1.2 作为淀粉老化抑制剂

糊化的淀粉低温保存时,容易产生老化,使淀粉等食品质量变差。在淀粉含量较高的食品中添加琼脂低聚糖,能显著延迟淀粉硬化作用,提高制品的质量。目前普遍用于挂面、面包和糕点等食品中。

4.1.3 作为高甜度甜味剂的充填剂及分散剂

琼脂低聚糖不被消化酶分解,也不会被肠内细菌分解。而一般的难消化性糖质,会被肠内细菌发酵、分解转化为短链脂肪酸,被微生物作为能源利用。老鼠口服琼脂低聚糖实验证实,24 小时后有 95% 以上的琼脂低聚糖残留在大便及消化道内容物中。因为琼脂低聚糖具有不被肠内细菌分解的及无热量等为其它低聚糖所没有的独特性,所以可用作高甜度甜味剂的充填剂及分散剂。

4.1.4 作为功能性食品基料

琼脂低聚糖除具有很多低聚糖的一些共同功能外,还有一些独特的功能。其最主要的生理功能为抑制癌细胞的增殖作用、免疫赋活作用以及抗氧化作用等。有研究表明,该低聚糖的生理活性功能是与琼脂低聚糖的还原端结构是分不开的,由此可见,该低聚糖具有其它低聚糖无法代替的生理功能特性,如很强的抗癌活性,有望在各类低聚糖中独开一面^[12]。

4.1.5 作为抗氧化剂

赵雪等对琼脂低聚糖体外清除自由基的活性进行了研究,将琼脂寡糖 A1(以二、四糖为主)和 A2(以己糖、辛糖为主)采用化学发光法和 DPPH 体系分别研究 A1、A2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH 3 种自由基的清除作用。结果表明, A1、A2 对 3 种自由基都有较好的清除作用,而且清除活性随糖浓度的增加而加强。由此说明琼脂寡糖在抗氧化方面具有很好的应用价值^[13]。

4.1.6 在药物方面的应用

近年来在对琼脂寡糖的研究中发现,这些寡糖具有多种生理活性,比如,聚合度在 2~4 的寡糖可以抑制前列腺素 $\text{E}_2(\text{PGE}_2)$ 和肿瘤坏死因子($\text{TNF}\alpha$)的产生,从而抑制癌细胞的发生;可以通过阻止可诱导性 NO 合成酶(iNOS)的表达来抑制过量 NO 自由基的产生,从而消除 NO 过量造成的损伤;治疗一些炎症类疾病,如关节炎等^[14]。一定聚合度的琼脂类硫酸多糖对 B 型流感病毒、腮腺炎及脑膜炎病毒等也有抑制作用^[7]。

4.2 作为海藻遗传工程的工具酶

琼胶是某些红藻细胞壁的重要组成成分,琼胶酶

可水解琼胶,故琼胶酶可用作海藻遗传工程的工具酶^[10],来获得单细胞或原生质体,以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。初建松等利用琼胶酶、纤维素酶等组成的复合酶系处理江篱菜,分离到了大量的原生质体^[15]; Araki T^[16]等利用海洋弧菌(*Vibrio* sp. PO-303)产生的琼胶酶,配合纤维素酶等,降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。

4.3 在分子生物学研究方面的应用

利用琼胶酶降解琼脂糖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。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产物利用高品质低融点琼脂糖进行电泳,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,如此处理的DNA样品即可放入冰箱备用^[10]。

4.4 用于海藻多糖的结构研究

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,是行之有效的方法^[10]。高洪峰等利用β-琼胶酶降解多管藻多糖,然后利用NMR光谱法对其降解产物的结构进行分析,从而推知多管藻多糖的结构^[17]。

5 展望

虽然迄今为止,已有十几种琼胶酶得到了分离纯化,但实现了产业化生产的却只有从*Pseudomonas atlantica*中分离的β-琼胶酶^[7],并且价格昂贵,应用范围也仅限于科研工作中,大大阻碍了琼胶酶及琼胶低聚糖的开发应用。

为了能充分发挥琼胶酶及其酶解产物在国民经济中的作用,进一步提升我国人民的健康水平,今后的工作重点应是加强琼胶酶的基础性研究,拓宽琼胶酶的来源,大力开发琼胶酶酶解产物中具有活性功能的物质,力求形成一个新的产业,一个新的经济增长点。

参考文献

- [1] 王静雪,江晓路等. 细菌降解琼胶的研究进展[J]. 中国水产科学,2001,8(3):94~95.
- [2] Vera J, Alvarez R, et al. Identification of a Marine Agarolytic *Pseudoalteromonas* Isolate and Characterization of Its Extracellular Agarase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998,64(1):4378~4383.
- [3] Qhta Y, Nogi Y, et al. Enzymatic Properties and Nucleotide and Amino Acid Sequences of a Thermostable β-agarase from the Novel Marine Isolate, JAMB-A94[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem, 2004,68(5):1973~1981.
- [4] Leon O, Quintana L, et al. Purification and Properties of an Extracellular Agarase from *Alteromonas* sp. strain c-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992,58 (12): 4060~4063.
- [5] Araki T, Hayakawa M, et al. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1998,(6): 260~265.
- [6] 杜宗军,王鹏等. 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定[J]. 海洋科学, 2002,26(3):1~4.
- [7] 褚燕,于文功等. 琼胶酶高产海洋假单胞菌CY24的筛选及培养条件优化[J]. 中国海洋药物, 2003,(5): 1~4.
- [8] 吴永沛,何碧烟. 九孔鲍褐藻酸酶、琼胶酶及纤维素酶的提取纯化[J]. 海洋科学,2002,26(3):5~7.
- [9] Hosoda A, Sakai M, et al. Isolation and Characterization of Agar-degrading *Paenibacillus* Spp. Associated with the Rhizosphere of Spinach[J]. Biosci. biotechnol. Biochem, 2003, 67(5):1048~1055.
- [10] 杜宗军,王祥红等. 琼胶酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(1):64~67.
- [11] 张红艳,林凯等. 国外天然防腐剂的进展[J]. 粮食加工, 2004, (3):57~60.
- [12] 唐传核,彭志英. 功能性食品基料低聚糖及膳食纤维类开发现状[J]. 粮食与油脂, 2000, (8): 33~35.
- [13] 赵雪,薛长湖等. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J]. 中国水产科学,2002,9 (3): 280~282.
- [14] 陈海敏,严小军等. 琼胶的降解及其产物的分析[J]. 郑州工程学院学报,2004,24(3): 41~44.
- [15] 初建松,刘万顺等. 江篱原生质体分离和培养的初步研究[J]. 海洋通报,1998,17(6): 17~20.
- [16] Araki T, Lu Z, et al. Optimization of parameters for isolation of protoplasts *Gracilaria Verrucosa*[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1998,6(3):193~197.
- [17] 高洪峰,纪明候等. 用β-琼胶酶和NMR光谱法研究多管藻多糖的寡糖结构[J]. 海洋与湖沼,1994,27(5):505~510

作者: [刘江涛](#), [蔡俊鹏](#), [吴冰](#), [Liu Jiang-tao](#), [Cai Jun-peng](#), [Wu Bing](#)
 作者单位: [刘江涛, 蔡俊鹏, Liu Jiang-tao, Cai Jun-peng \(华南理工大学食品与生物工程学院, 广东广州, 510640\)](#), [吴冰, Wu Bing \(华南理工大学测试中心, 广东广州, 510640\)](#)
 刊名: [现代食品科技](#) **ISTIC**
 英文刊名: [MODERN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY](#)
 年, 卷(期): 2005, 21(1)
 被引用次数: 3次

参考文献(17条)

- [1. Hosoda A; Sakai M Isolation and Characterization of Agar-degrading Paenibacillus Spp. Associated with the Rhizosphere of Spinach 2003\(05\)](#)
- [2. 吴永沛; 何碧烟 九孔鲍褐藻酸酶、琼胶酶及纤维素酶的提取纯化\[期刊论文\]-海洋科学 2002\(03\)](#)
- [3. 褚燕; 于文功 琼胶酶高产海洋假单胞菌CY24的筛选及培养条件优化\[期刊论文\]-中国海洋药物 2003\(05\)](#)
- [4. 杜宗军; 王鹏 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定\[期刊论文\]-海洋科学 2002\(03\)](#)
- [5. Araki T; Hayakawa M Purification and characterization of agarases from a marine bacterium, Vibrio sp. PO-303\[外文期刊\] 1998\(06\)](#)
- [6. Leon O; Quintana L Purification and Properties of a Extracellular Agarase from Alteromonas sp. strain c-1 1992\(12\)](#)
- [7. Qhta Y; Nogi Y Enzymatic Properties and Nucleotide and Amino Acid Sequences of a Thermostable \$\beta\$ -agarase from the Novel Marine Isolate, JAMB-A94 2004\(05\)](#)
- [8. Vera J; Alvarez R Identification of a Marine Agarolytic Pseudoalteromonas Isolate and Characterization of Its Extracellular Agarase 1998\(01\)](#)
- [9. 高洪峰; 纪明候 用 \$\beta\$ -琼胶酶和NMR光谱法研究多管藻多糖的寡糖结构\[期刊论文\]-海洋与湖沼 1994\(05\)](#)
- [10. Araki T; Lu Z Optimization of parameters for isolation of protoplasts Gracilaria Verrucosa 1998\(03\)](#)
- [11. 初建松; 刘万顺 江篱原生质体分离和培养的初步研究 1998\(06\)](#)
- [12. 陈海敏; 严小军 琼胶的降解及其产物的分析\[期刊论文\]-郑州工程学院学报 2004\(03\)](#)
- [13. 赵雪; 薛长湖 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究\[期刊论文\]-中国水产科学 2002\(03\)](#)
- [14. 唐传核; 彭志英 功能性食品基料低聚糖及膳食纤维类开发现状\[期刊论文\]-粮食与油脂 2000\(08\)](#)
- [15. 张红艳; 林凯 国外天然防腐剂的研究进展\[期刊论文\]-粮食加工 2004\(03\)](#)
- [16. 杜宗军; 王祥红 琼胶酶的研究进展\[期刊论文\]-微生物学通报 2003\(01\)](#)
- [17. 王静雪; 江晓路 细菌降解琼胶的研究进展\[期刊论文\]-中国水产科学 2001\(03\)](#)

本文读者也读过(10条)

- [1. 杜宗军. 王祥红. 李筠. 陈吉祥 琼胶酶研究进展\[期刊论文\]-微生物学通报2003, 30\(1\)](#)
- [2. 朱启忠. 朱慧文. 孙艳娜. 周晓龙. 郝梅. 郭振博. ZHU Qizhong. ZHU Huiwen. SUN Yanna. ZHOU Xiaolong. HAO Mei. GUO Zhenbo 海洋细菌 Agarivorans albus NBRC102603琼胶酶的分离纯化\[期刊论文\]-生物加工过程2011, 09\(3\)](#)
- [3. 蔡俊鹏. 许少丹. CAI Jun-peng. XU Shao-dan 一株海洋细菌所产琼胶酶酶学特性的研究\[期刊论文\]-现代食品科技2008, 24\(12\)](#)
- [4. 王祥红. 贾仁洁. 张超. 汤志宏 产琼胶酶海洋细菌的分离、鉴定及其分解琼胶实验\[期刊论文\]-生物学通报2011, 46\(5\)](#)
- [5. 时岩玲. 于文功. 路新枝. SHI Yan-ling. YU Wen-gong. LU Xin-zhi 海洋紫色杆菌 \$\beta\$ -琼胶酶的分离纯化及性质\[期刊论文\]-武汉大学学报\(理学版\) 2008, 54\(4\)](#)
- [6. 付万冬 高产琼胶酶菌株的筛选、发酵条件优化及琼胶酶酶学性质的研究\[学位论文\]2006](#)
- [7. 马翠萍. 石超. MA Cui-Ping. SHI Chao 琼胶酶研究进展\[期刊论文\]-微生物学通报2008, 35\(1\)](#)
- [8. 蔡俊鹏. 刘江涛. CAI Jun-peng. LIU Jiang-tao 产琼胶酶菌株的筛选及其胞内外酶活的测定\[期刊论文\]-天然产物研究与开发 2005, 17\(6\)](#)
- [9. 王静雪. 江晓路. 胡晓珂 细菌降解琼胶的研究进展\[期刊论文\]-中国水产科学2001, 8\(3\)](#)
- [10. 王静雪. 江晓路. 牟海津. 管华诗. WANG Jing-xue. JIANG Xiao-lu. MU Hai-jin. GUAN Hua-shi 海洋弧菌QJH-12发酵产琼胶酶条件的优化\[期刊论文\]-海洋科学2007, 31\(7\)](#)

引证文献(3条)

1. [问莉莉](#), [董静静](#), [李思东](#) [琼胶寡糖的制备及其应用研究进展](#)[期刊论文]-[山东化工](#) 2011(5)
2. [刘美英](#), [梅建凤](#), [易喻](#), [陈建澍](#), [应国清](#) [琼胶寡糖生物活性的研究进展](#)[期刊论文]-[药物生物技术](#) 2008(6)
3. [缪伏荣](#), [李忠荣](#) [琼胶的降解及其产物的开发应用](#)[期刊论文]-[现代农业科技](#) 2007(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gzspgykj200501057.aspx