运用酶法降解褐藻胶研究糖链序列结构的展望*

PROSPECT ON DETERMINATION OF POLYSACCHARID EQUENTIAL STRUCTURE IN ALGINATE BY ALGIANSE

王 斌　　蒋 疆　　曾竞华　　甘纯玑**

(福建农林大学生物技术中心 福州 350002)

中图分类号 Q556;Q538　　**文献标识码** A　　**文章编号** 1000-3096(2003)10-0035-03

多糖是一种生命的基础物质,其功能和作用日益受到重视,糖生物学与糖工程的研究必将成为基因工程、蛋白质工程及糖链结构分析技术之后新的研究热点。探讨多糖的研究方法、解决糖链的测序问题成为该研究领域的关键。

褐藻胶是一种重要的海藻工业产品,是由古罗糖醛酸(G)和甘露糖醛酸(M)组成的一种典型的多糖类,广泛应用于工业、农业、医药、食品等各个领域。研究发现,不同的褐藻酸酶可以作用于褐藻酸的不同位点,形成不同的糖片段或寡糖,经过分离、纯化,应用电泳、色谱、质谱、核磁共振等方法可以确定糖链的结构、组成及取代基的位置。本文的目的是通过对褐藻胶酶法降解的分析来探索多糖逐步降解的条件。

1　多糖研究的现状

到目前为止,人类对于多糖结构的研究,基本上局限于多糖的分离、提取、纯化,糖单元的组成及其比例的测定,降解的分子片段和端基分析,以及多糖的分子量及其分布范围的研究,但是对于多糖组成结构中的糖链顺序研究,还尚未找到有效的分析、检测方法。虽然多糖研究始于100多年前,却远远落后于蛋白质和核酸的研究,主要原因在于理论上的简单化和方法上的不成熟,未能解决糖链的序列测定问题,限制了多糖的进一步研究。关于多糖的序列分析,近年来已初见报道,Gallagher等人提出,由低pH硝酸部分解聚的多糖用胞外酶和细胞硫酸酯酶,进行选择性分离处理,再应用梯度PAGE测定,由电泳图确定起始糖样中的单糖顺序,经检索,最近这一工作未见进展。因此,多糖研究的关键是寻找合适的条件解决糖链的序列测定。

2　褐藻胶的结构组成及褐藻酸酶的来源和分类

褐藻胶由褐藻酸以及褐藻酸盐类组成,在褐藻酸大分子内除含有$(M)_n$片段和$(G)_n$片段外,还含有$(GM)_n$嵌段,其G/M值大致处于1∶2至2∶1之间。

褐藻酸酶主要来源于海洋细菌、真菌,另外还存在于海洋软体动物、藻类、土壤微生物等体内[1]。根据酶的作用方式,可以分为3类:

(1) α-L-甘露糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.3):裂解褐藻酸分子内的M-M键,亦有特殊的酶可以裂解M-G键,生成糖片段或寡糖或单糖。大多数的假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)产生的酶具有此专一性。

(2) β-D-古罗糖醛酸裂解酶(EC 4.2.2.11):裂解褐藻胶大分子内的G-G键,生成糖片段或寡糖。克里伯氏菌(*Klebsiella* sp.)产生的酶属于此类。

(3) 无选择性的褐藻酸酶:对底物没有特殊的要求,既可以裂解$(M)_n$嵌段也可以裂解$(G)_n$嵌段,还可以作用于M-G或者G-M键。芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、别单胞菌(*Alteromonas* sp.)产生的酶具有该特性。

---

* 福建省自然科学基金项目JA C0110009号。

** 通讯作者,E-mail:ganchunji@hotmail.com

第一作者:王斌,出生于1977年,硕士研究生,研究方向为多糖生物化学。E-mail:binwang4159@hotmail.com

收稿日期:2002-06-19;修回日期:2003-02-25

3 褐藻酸酶对褐藻胶的降解作用

3.1 α-L-甘露糖醛酸裂解酶的降解作用

1996年，Heyraud等人用核磁共振和高效液相色谱对鲍鱼(*Haliotis tuberculata*)酶的降解作用进行了研究，表明该酶对$(M)_n$具有较高的亲和力，可以降解褐藻胶糖链中的M-M和G-M键，而G-G和M-G不能够被裂解。应用各种不同的寡聚物进行的动力学研究发现，该酶的催化位点最适容纳甘露糖的五聚物。1998年Ertesvag[2]等人从维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)中得到一种褐藻酸酶algL，经过克隆、定序，并在*Escherichia coli*中表达，成熟蛋白分子量为39 ku，等电点为5.1，最适pH为8.1~8.4。可以降解M-M和M-G键的多糖，也可以降解含有乙酰基的键，但不能降解G-M和G-G键的多糖，可以利用该酶产生$(G)_n$片段。

1998年Rehm[3]从绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginose* CF1/M1)中分离出一种褐藻酸酶，当用六聚物多糖作为底物时，此酶表现出最高生物活性。表明该酶的活性中心最适合容纳6个褐藻酸残基的链状物，能被接受的最短链长底物为五聚物，少于五聚物的甘露糖醛酸片段不能被作为底物。进一步研究发现裂解以后的产物中三聚物最丰富，推测该酶的作用位点位于糖链末端的第三个糖苷键。Heyraud[4]等由假单胞菌(*Pseudomom* sp.)得到的聚甘露糖醛酸裂解酶Al_xM_B可用于制备聚合度为30的甘露糖醛酸盐片段(聚-M块)，或者聚合度大于20的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸交替片段(聚-MG块)。Chavagant[5]等人也对Al_xM_B进行了研究，结果表明该酶仅对至少含有3个甘露醛酸残基的多糖末端起作用，而对聚古罗糖醛酸序列和G-M、M-G等键不起作用。1999年，Kraiwatanapong[6]等将假单胞菌(*Pseudomonos* sp. OS-ALG-9)的褐藻酸酶ALY II的基因在大肠杆菌内克隆、定序、表达。经研究其分子量为79 ku，等电点为8.3，最适温度和pH分别为30 ℃和7.0。当溶液内存在Hg^{2+}时，活性可被完全抑制。这种酶可以专一性地降解聚β-D-1.4-甘露糖醛酸，当与来自相同菌株的聚β-D-1.4-甘露糖褐藻酸裂解酶ALY相结合时，表现出更强的活性。2000年，Preston[7]等将假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. syringae)的褐藻酸酶的基因在大肠杆菌内克隆、定序、表达，并对其性质进行了研究。在0.2 mol/L NaCl存在的条件下，反应的最适温度、pH分别为42 ℃和7.0。通过底物研究发现该酶对乙酰化的甘露糖活性最强。

3.2 β-D-古罗糖醛酸裂解酶的降解作用

1977年Hee等从假单胞杆菌(*Pseudomom* sp.)中得到一种古罗糖醛酸裂解酶，经凝胶色谱分离可得3个级分。这些级分不耐热，但能降解两种褐藻酸盐链段，一种是聚古罗糖醛酸链段$(G)_n$，另一种是含有甘露糖醛酸(M)和古罗糖醛酸(G)残基的$(GM)_n$嵌段链段，而对聚甘露糖醛酸链段$(M)_n$无活性，降解过程无规律，最终产物是不饱和的单糖醛苷和三糖醛苷混合物。在高浓度的底物条件下，会抑制这种酶的活性。

1998年Matsubara[8]等从棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)培养基的上层纯化得到一种聚古罗糖醛酸裂解酶，应用SDS-PAGE和凝胶色谱，得其分子量为27 ku，等电点为7.3，最适温度和pH为55 ℃和7.0，金属化合物$MnCl_2$和$NiCl_2$可以增强酶的活性。2001年，Svanem[9]等人研究发现维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)基因组可以编码7种分泌型、依赖Ca^{2+}的差向异构酶(ALGl-7)，可以催化褐藻胶的β-D-甘露糖向α-L-古罗糖异构化。ALGl-7由A和R两种蛋白组成，A蛋白可以使糖充分的异构化。ALG7降解富含M和相对富含G的褐藻胶而生成4-7的甘露糖片段，降解的顺序主要是G-MM或G-GM。表明ALG7是一种古罗糖醛酸裂解酶。

3.3 无选择性的褐藻酸酶的降解作用

有些褐藻酸酶没有选择性，但可以形成稳定的糖片段或者寡糖，因此，可以利用其性质对褐藻胶进行预降解，或者进一步裂解降解物。1975年，Shiraiwa等研究发现从褐藻中提取的粗酶萃取物，将其与^{14}C标记的褐藻酸盐、非放射性褐藻酸盐、短链聚甘露糖醛酸、短链聚古罗糖醛酸及混合的短链聚糖醛酸共同培养，发现从短链聚甘露糖醛酸中得到的主要是不饱和的单体和二聚体，而从短链聚古罗糖醛酸中得到的主要是单体、二聚体、三聚体。

1993年，Larsen等用芽孢杆菌(*Bacillus circulaus*)生产的胞外褐藻酸酶既可以降解聚甘露糖醛酸，也可以降解聚古罗糖醛酸。Ca^{2+}可以提高该酶降解聚甘露糖醛酸的活性。1997年Sawabe[10]等研究别单胞菌(*Alteromonas* sp.)产生的褐藻胶酶，发现其既可以降解褐藻酸钠，还可以降解$(G)_n$、$(M)_n$和$(GM)_n$，降解上述4种底物可以得到聚合度为7~8、5~6、3~4的3种主要产物，即该酶基本完全降解褐藻胶，并生成比较固定的产物。2001年，Iwamoto[11]等人研究发现埃氏单胞菌(*Alteromonas* sp.)可以产生一种褐藻酸胞内裂解酶，其分子量为33.9 ku，等电点为3.8。在pH 5~

11 时,可以稳定的存在,而在 pH 7.5 ~ 8.0 时,具有最高的活性。该酶的二级结构为 β 型,可以作用于褐藻酸分子内的聚-α-1,4 古罗糖和聚-β-1,4- 甘露糖,但是不能降解少于 4 个古罗糖或 4 个甘露糖聚合物,通过酶动力学分析发现该酶对聚古罗糖有更高的活性。

对上述 3 类酶的分析表明至今还没有发现一种褐藻酸酶可以完全降解褐藻酸,但是有些酶的作用位点和生成产物较固定,对实现褐藻胶的逐步降解非常重要,这是我们研究多糖逐步降解所需要的工具酶。

4 褐藻酸衍生物在酶降解中的应用

多糖的研究现状和酶降解褐藻胶研究进展表明实现多糖的逐步降解需要引进新的限制条件。关于乙酰基团对酶降解的作用已有研究[6],其它基团对酶降解的影响还未见报道。目前甘纯玑等人已合成了部分褐藻酸衍生物,如褐藻酸苄酯、乙酰褐藻酸、乙酰褐藻酸丙二酯。另外还有大量生产的褐藻酸盐类、褐藻酸丙二酯以及近年来广泛研究的烷基多苷和硫酸酯多糖等。利用化学修饰引入不同极性的保护基团或新的官能团,形成大空间遮蔽,调节和保护链上的糖苷键,进而调节酶的作用方式或者活性,实现酶降解过程的有效控制。

5 小结

实现褐藻酸的逐步降解,应采取化学修饰和酶降解结合的方法。首先对褐藻酸进行预降解,形成特定的糖片段,然后应用衍生试剂对预降解产物进行化学修饰,再利用酶的专一性对衍生物进行酶切处理,特别如维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)、芽孢杆菌(*Bacillus circulaus*)产生的酶等可以作用于特定的糖苷键或者可以形成比较固定的产物,就为以后的序列测定奠定了基础。产物的测定可以应用高效液相色谱、高效毛细管电泳、双向凝胶电泳、核磁共振等方法完成,并从中筛选出最适的降解条件和方法。

因此,褐藻酸酶的专一性和褐藻胶衍生物限制条件的引入,为多糖结构研究提供了可靠的理论依据和和可行性设想。随着对褐藻酸酶进一步研究,将有更多的酶被发现,酶的性质研究也会取得新的进展。借助于基团的屏蔽作用,利用褐藻酸酶降解褐藻胶,从而使多糖序列结构研究成为可能。

参考文献

1 刘岩,江晓路,管华诗. 褐藻胶裂解酶研究进展. 中国水产科学,2001,7(4):99-103

2 Ertesvag H, Erlien F, Skjak-Braek G, et al. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. J Bacteriol, 1998,180(15):3 779-3 784

3 Rehm B H A. Alginate lyase from *Aeruginosa* CF/M1 prefers the hexameric oligo- mannuronate as substrate. FEMS Micro Lett, 1998,165(1):175-180

4 Heyraud A, Colin-Morel P. An enzymic method for preparation of homopoly- mannuronate blocks and strictly alternating sequence of mannuronic and guluronic unit. Carbohydr Res, 1998, 308(3-4): 417-422

5 Chavagnant F, Colin-Morel P, Guinand M, et al. Catalytic properties and specificity of a recombinant, overexpressed D-mannuronate lyase. Carbohydr Res, 1998, 308(3-4): 409-415

6 Kraiwattanapong J, Motomura K, Ooi T. Characterization of alginate lyase (ALY II) from *Pseudomonas* sp. OS-ALG-9 expressed in recombinant *Escherichia coli*. World J Microbiol & Biotechnol, 1999, 15(1): 117-122

7 Preston L A, Wong T Y, Bender C L, et al. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae* pv. syringae. J Bacteriol, 2000, 182(21):6 268-6 271

8 Matsubara Y, Kawada R, Iwasaki K, et al. Extracellular poly(α-L-guluronate) lyase from *Cornebacterium* sp. purification, characteristics, and conformational properties. J Protein Chem, 1998, 17(1): 29-36

9 Svanem B I, Strand W I, Evtesvag H. The catalytic of the bifuntional *Azotobacter vinelandii* mannnuronan C-5-epimerase and alginate lyase Alge7 probably originate from the same active site in the enzyme. J Biol Chem, 2001, 276(34): 31 542-31 550

10 Sawage T, Ohtsuka M. Novel alginate lyase from marine bacterium *Alteromonas* sp. Strain H-4. Carbohydr Res, 1997, 304: 69-76

11 Iwamoto Y, Araki R, Iriyama K, et al. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain No. 272 and its action on saturated ologomeris ubstrates. Bioscience Biotechnol & Biochem, 2001, 65(1): 133-142

(本文编辑:张培新)