



(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

刘晨光 刘成圣 刘万顺 郑立 王绪敏:

海洋生物酶的研究和应用

STUDY AND APPLICATION OF MARINE ENZYMES

海洋生物代谢过程中的酶类在性质、功能上与陆地生物有很多不同,因此从海洋生物中筛选提取有应用价值的酶类,就成为海洋生物资源开发的一个重要方面。

由于受地理环境的限制和海洋生物在采集、培养等方面尚存在一些技术难题,海洋生物酶类方面的研究和应用远不如陆地生物的,以下将一些海洋生物酶的研究和开发做一介绍。

1 核酸酶

古细菌是从深海火山口附近发现的一类原核生物,同细菌有着明显的区别,被认为是有别于现存

原核和真核生物的第三类生物。这类生物目前已发现了 500 多种,其代谢途径与现存的生物有严格的区别,可以在 100 °C 以上的极端环境生存,当然这就要求其在高温下稳定的酶系统。热稳定性的核酸酶如 DNA 修饰酶(聚合酶、连接酶、限制性内切酶等)在分子生物学中有重要的应用价值。Lundberg 等从嗜热古细菌激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*)中纯化了一种耐高温的 DNA 聚合酶,该酶具有多聚酶和校对的双重功能,应用该酶可以扩增出高保真的 PCR 产物。

连接酶链式反应(LRC)是测定 DNA 突变的新技术。从海洋古细菌

分离纯化的热稳定性 DNA 连接酶可用 LRC 技术来测定、放大和区分特殊的 DNA 序列。

2 蛋白酶

70 年代初, Nobou Kato 在农业生化杂志上发表一篇关于从海洋嗜冷杆菌获得一种新型海洋碱性蛋白酶的文章,引起学术界和酶制剂公司的高度重视。迄今为止研究开发的海洋生物蛋白酶产品有 20 多个,并申请了国际专利。

2.1 碱性蛋白酶

收稿日期: 1999-07-26;

修回日期: 1999-12-20



日本开发的一种碱性蛋白酶,是从海洋共生菌发酵提取的,酶的MW为31 kD,作用pH5~11,最适pH为10,最适温度20℃,用于洗衣粉添加剂。

美国从海洋船蛆共生菌(ATCC39867)发酵生产一种新型碱性蛋白酶,分子量3.6 kD, pI 8.6,作用pH4~12,最适温度50℃,可在复杂试剂中保持稳定性,并有抗氧化的功能,已应用于洗衣粉和镜头清洁剂。

挪威将海洋微生物蛋白酶用于鱼类加工以生产蛋白胨和用于鲑鱼脱皮。

中科院微生物所邱锈宝报道筛选到一种海洋中性蛋白酶,该酶最适作用温度为50℃,最适pH为8^[21]。

2.2 低温蛋白酶

海洋生物特别是地球的南极和北极的海洋生物,由于长期生活在低温的环境中,适应这种极端环境而产生的海洋酶,大多数具有低温催化和对热不稳定的特征,其活性的最适温度移向低温和在低温下(如4℃甚至0℃)仍保持高比例的活性,据此被称为低温酶。

从海洋鱼类的内脏中提取的胃蛋白酶,胰蛋白酶活性较高且耐低温,可广泛地应用于水产品的加工。最近报道,从南极磷虾的头中提取到一种耐低温蛋白酶。

2.3 胶原酶

Reid等从溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)中提取到一种胶原酶,在工业上有广泛的用途。

3 多糖水解酶

海洋多糖水解酶主要包括:甲壳质酶、琼胶酶、褐藻酸酶、卡拉

胶酶等。酶的来源主要包括两类生物:一类是海洋动物主要是无脊椎动物,如:紫贻贝、日本鲟、滨螺、石鳖、鲍、海兔等;另一类是海洋微生物,如:产气单胞菌、假单胞菌、交替单胞菌、弧菌等。

3.1 甲壳质酶

甲壳质是乙酰氨基葡萄糖组成的均一多糖。甲壳质酶类是降解甲壳质的一组酶,包括甲壳质酶、甲壳质二糖酶、甲壳质脱乙酰基酶等。海洋中筛选的多种菌分泌的甲壳质酶,可将甲壳质降解成不同分子量的寡糖、二糖和单糖。

3.2 琼胶酶

琼胶主要是由琼胶素和琼胶酯两部分组成。琼胶素主要是由D半乳糖和3,6-内醚-L半乳糖交替连接而成的多糖;而琼胶酯主要是由D半乳糖、3,6-内醚-L半乳糖和L半乳糖-6-硫酸组成的杂多糖。琼胶酶主要水解D半乳糖和3,6-内醚-L半乳糖之间的 α -L(1,3)和 β -D(1,4)糖苷键。

琼胶酶的研究50年代就有报道。主要从海洋微生物中提取的胞外酶琼胶酶,可分为 α 琼胶酶和 β 琼胶酶两种类型,其中 α 琼胶酶主要来自假单胞菌属、单胞菌属和弧菌属,分子量范围大约在20~360 kD。例如一种来自*Alteromonas agalacticus*(G11B株)的琼胶酶,经离子交换层析和SDS-PAGE测定其分子量是180 kD,而经亲和层析和正电电泳分析,其分子量是360 kD,说明此酶有两个亚基。Oswa,1995年报道,酶的pI 5.3,酶可以维持活性的pH范围是6.0~9.0,酶的最适pH 7.2,低于pH 6.5长时间处理,高于45℃或去掉钙离子均会使酶失活。

β 琼胶酶主要来自弧菌属、交替单胞菌属和海洋软体动物。例如从*Vibrio* sp.(AP2株)提取的一种 β 琼胶酶,其分子量是20 kD,酶的pI 5.3,酶在pH 4.0~9.0的范围和低于45℃的条件下可以保持稳定,最适pH 5.5。

3.3 卡拉胶酶

卡拉胶是不均一多糖,多糖的相对含量和成分随海藻来源的不同而变化,目前已发现卡拉胶有13种类型。如 κ -卡拉胶、 λ -卡拉胶、 τ -卡拉胶等。其中, κ -卡拉胶是D半乳糖,3,6-内醚半乳糖和硫酸酯组成, κ -卡拉胶酶可以水解 κ -卡拉胶的 β -(1,4)糖苷键。

目前已从交替单胞菌属和*Cytophaga*属分离到 κ 卡拉胶酶和 λ 卡拉胶酶,从一种未鉴定棒状细菌分离到 τ 卡拉胶酶。例如来自交替单胞菌属和*Cytophaga*属的两种 κ 卡拉胶酶分子量分别是35 kD和40 kD,最适pH 5.5,酶的活力范围是pH 4.0~9.0。二者的 K_m 相差不大,说明它们对底物的亲和力相近。

3.4 褐藻酸酶

褐藻酸存在于海带等褐藻细胞间质中,化学组成是聚古罗糖醛酸和聚甘露糖醛酸或是古罗糖醛酸和甘露糖醛酸交替连接。褐藻酸酶可水解糖残基间的1,4糖苷键。褐藻酸酶主要来源于微生物和海藻的海洋软体动物如海螺、鲍鱼等。例如从杆菌属提取的褐藻酸酶其分子量是40 kD,最适pH 7.5。

3.5 多糖水解酶的应用

3.5.1 在海藻原生质体制备方面的应用

海藻原生质体的制备主要用途在于:(1)用于海藻细胞生理生



化的研究,如藻细胞的生物合成、质膜的结构与功能、物质转运、能量转换、细胞识别、信息传递、细胞间的相互作用等;(2)进行目的基因的导入、创造新品种或作为生物反应器生产所需的物质;(3)进行细胞间的融合,以改变体细胞的遗传物质,创造优良杂交品种。海洋多糖水解酶已成功应用于紫菜、海带、裙带菜、江蓠、羽藻、蜈蚣藻、马尾藻和角叉藻等海藻的单细胞和原生质体的分离。如应用一种琼胶酶、褐藻酸酶、纤维素酶等组成的多糖复合酶(海螺酶法)分离紫菜细胞,进行育苗试验获得成功,养殖藻体长10~20 cm,达到采收要求。在此基础上还进行了原生质体诱变育种和种间细胞融合研究。

3.5.2 在单细胞饵料生产中的应用

在目前的海水养殖中,为养殖动物育苗期提供充足的优质饵料一直是制约生产的一个关键因素。由于单胞藻活体饵料的供应不足,严重影响着育苗的产量和质

量。酶解大型海藻,分离成单细胞,作为海洋养殖动物的饵料,具有营养全面、材料易得、生产加工简便等优点。因而,采用酶解大型海藻生产单细胞饵料这一技术,对于海水养殖业的发展有着重要的实际意义^[1]。

3.5.3 用于单糖和寡糖的制备

琼胶经琼胶酶水解可以形成寡糖如三糖和四糖,然后经 β 半乳糖苷酶降解可形成单糖。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。另外,近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^[3]。

目前普遍认为6个糖残基的甲壳寡糖具有抗肿瘤的作用;小分子的甲壳寡糖或单糖可提高机体免疫力,有活化肠道乳酸杆菌、双歧杆菌的作用。甲壳寡糖的生产多采用盐酸水解法,反应条件剧烈,产

物得率较低。而采用甲壳质酶生产甲壳寡糖反应温和可控,且有较高的产率,是一种很有应用前景的方法。

4 脂酶

日本、美国等报道了从冷海水区域分离得到的微生物可产生耐低温的脂酶,Beotec-Mhezymal将海洋磷酸单脂酶用于PCR和分子克隆。

总之,海洋生物酶类研究开发的时间短、成果少,但由于海洋生物的多样性及生物体代谢的特殊性,开发应用的潜力巨大。因此海洋生物酶的开发愈来愈引起世界各沿海国家的重视。🌊

参考文献

- 1 韩宝芹等.海洋科学,1997,3:47~49
- 2 Greene R.V. et al.. Biotechnol.Lett., 1996, 18:759~764
- 3 Segami Kazumi et al..Jpn.Kakai Tokyo Koho JP 0733621 03.1995