

甲壳素脱乙酰酶的研究概况及应用展望

段 杉 彭志英

(华南理工大学食品与生物工程学院,广州,510640)

摘 要 综述了目前对甲壳素脱乙酰酶(CDA)的研究状况,包括酶的来源、分离纯化及生化性质、酶的基本生化性质、酶的生物学功能,利用基因工程的方法选育生产菌株等。并对 CDA 的应用前景做了展望。

关键词 甲壳素脱乙酰酶,甲壳素,壳聚糖

甲壳素(chitin)又称几丁质,是由 N-乙酰氨基-D-葡萄糖单体(D-GlcNAc)通过 β -1,4 糖苷键连接而成的直链高分子化合物,当分子中的乙酰基被部分或全部脱除后,则称为壳聚糖(chitosan)。由于壳聚糖分子中有大量的游离氨基,分子带正电荷,化学性质活泼,易于对其进行各种化学修饰,并且可以溶于酸性及中性水溶液中,因而得到了十分广泛的应用。例如用于污水处理,饮用水及饮料的澄清,食品的防腐剂、增稠剂、稳定剂,可降解包装材料,化妆品保湿剂,人造皮肤,手术缝合线,反渗透膜和超滤膜,酶的固定化载体,层析材料,药物缓释剂,赋形剂等。另外,壳聚糖还有许多保健功能,可以作为膳食纤维添加到食品中,还可以降血脂,促进免疫球蛋白的产生,抗肿瘤,促进伤口愈合,促进骨骼生长等等。目前壳聚糖大都采用浓碱热解法生产。

甲壳素脱乙酰酶(chitin deacetylase, E. C.3.5.1.41,以下简称 CDA)可以水解脱掉甲壳素上的乙酰基。因此,可以利用它代替现有的浓碱热解法生产高质量的壳聚糖,这不但可以解决目前壳聚糖生产中的环境污染问题,而且可以生产出某些用化学法不能生产的壳聚糖产品,如乙酰化程度均匀、分子量分布范围窄的壳聚糖产品,以及具有特定乙酰化位置的壳聚寡糖等,因此该酶还有重要的工业应用的潜在价值。正因为如此,国外

已经对该酶进行了较多的研究,但目前在国内尚未有这方面的研究报道。本文将就这些研究及应用前景作一综述。

1 CDA 的来源

自从 Yoshio^[1]等最初于 1974 年在接合菌纲(Zygomycetes)的 *Mucor rouxii* 中发现 CDA 以来,Kauss 等^[2]于 1982 年又从半知菌纲(Deuteromycetes)的 *Colletotrichum lindemuthianum* 中发现该酶存在,这是首次从非接合菌中发现该酶。以后在这 2 纲中又陆续发现许多真菌可以产生 CDA,包括:*Mucor racemosus*、*Mucor miehei*、*Rhizopus nigricans*、*Absidia coerulea*、*Absidia glauca*、*Aspergillus nidulans*、*Colletotrichum lagenarium*、*Fusarium solani*、*Fusarium oxysporum*、*Puccinia striiformis* 等;另外,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中^[3]以及无脊椎动物中^[4]也有存在;甚至在感染了 *Colletotrichum lagenarium* 的黄瓜叶中也检出了 CDA 的活力^[5]。最近美国专利报道了 1 株产碱杆菌属的细菌 *Alcaligenes* sp. ATCC 55938 也可以产生 CDA^[6]。值得一提的是,在许多细菌中存在肽聚糖脱乙酰酶,由于肽聚糖的结构与甲壳素很相似,故肽聚糖脱乙酰酶对甲壳素也能表现出微弱的活性^[1],这是需要与 CDA 区分的。

2 对 CDA 的生化研究及其生化性质

Dimitris 等人通过 3 步层析法将 *M. rouxii* 的粗提物进行了纯化,达到电泳纯,纯化倍数为 97.3,得率 11.9%,电泳纯的酶的比活力为 2.968 U/mg^[7]。

Martinou 等改进了前述纯化方法,采用免疫亲和层析法对 *M. rouxii* 的 CDA 进行了纯化,只需 1 步纯化即可达到电泳纯,得率为 29.1%,比活力为 13.33 U/mg^[8],均有很大提高。

可以将不同菌株所产 CDA 的生化性质归纳为表 1。从中可以看到,这些酶既有共性也有较大的差别。如这些酶都是糖蛋白,1 个亚基,不需要辅助因子,热稳定性高等。但

其分子质量、等电点、最适 pH、抑制剂、酶分布的位置等又不完全一样,这些差异导致不同来源的 CDA 的生理功能不同。如 *M. rouxii* 和 *A. coerulea* 的 CDA 的功能相同,都参与细胞壁的形成^[9],因此这 2 种 CDA 的生化性质最接近;而 *Aspergillus nidulans* 及 *C. lindemuthianum* 的 CDA 的生理功能与前 2 者不一样(这在后面还要详细说明),则其生化性质也不完全一样,例如它们不会被乙酸抑制^[10~12](而 *M. rouxii* 和 *A. coerulea* 的 CDA 则被乙酸抑制),这一特点对该酶的应用很有意义,因为在脱乙酰基的过程中不可避免的会产生乙酸,如果酶被乙酸抑制,则脱乙酰反应很难持续进行下去。

表 1 部分菌株所产生的甲壳素脱乙酰酶(CDA)的分子组成及生物化学性质

产生 CDA 的菌株					
	<i>Mucor rouxii</i> ATCC24905	<i>Absidia coerulea</i> IFO5301	<i>Aspergillus nidulans</i> CECT2544	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ATCC 56676	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> DSM 63144
产酶模式	与细胞生长同步产生 ^[13]	与细胞生长同步产生	细胞自溶时产生	滞后于细胞的生长	滞后于细胞的生长
酶的位置	周质空间	周质空间	胞外	胞外	胞外
分子质量/ku	75~80	75	27.5	31.5~33	150
酶的组成	单肽链糖蛋白,糖占 30%	单肽链糖蛋白 ^[14]	单肽链糖蛋白,糖占 28%	单肽链糖蛋白	单肽链糖蛋白,糖占 67%
等电点	3.0	—	2.75	3.7	3~5
最适 pH	4.5	5.0	7.0	11.5	8.5
最适温度/℃	50	50	50	60	50
是否被乙酸抑制	羧酸尤其是乙酸抑制 ^[1]	乙酸抑制	不被乙酸抑制	不被乙酸抑制	不被乙酸抑制
其他抑制剂	Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Na ⁺ , EDTA ^[1]	Fe ³⁺	Ag ⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Sn ²⁺ , CN ⁻ , EDTA 等	Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺
参考文献	[1, 7, 13]	[14, 15]	[10]	[12]	[11]

从 *M. rouxii*、*C. lindemuthianum*、*A. coerulea* 中得到的 CDA 对底物的要求较严格,只能以甲壳素、壳聚糖及其衍生物为底物^[7, 11, 12, 14],而 *Aspergillus nidulans* 的 CDA 对底物的特异性要求要低得多,它不仅可以水解上述底物,而且可以水解 α -1,3 及 α -1,6 键连接的 N-乙酰氨基半乳糖,另外对丙烯酰胺、N-乙酰氨基-D-葡萄糖等也有微弱作

用^[10]。CDA 对不同底物的活性是不同的,一般是对甲壳寡糖的活性高于长链多糖,对可溶性甲壳素衍生物的活性高于胶态甲壳素,而对胶态甲壳素的活性又高于结晶态甲壳素。来自 *M. rouxii* 的 CDA 的作用模式是 1 种多点进攻模式,即酶与 1 条底物分子链结合后,从底物结合位置的非还原端开始,依次水解下来数个乙酰基,然后酶与底物解离,重

新与 1 条新的底物分子结合,并且酶与底物分子中任何序列的结合没有倾向性,是随机的^[16,17]。

现已有几种不同来源的 CDA 的基因被克隆出来,包括 *M. rouxii*^[18]、*C. lindemuthianum*^[19]、*Saccharomyces cerevisiae*^[20,21]。其中,*M. rouxii* 的 CDA 基因中的 1 段序列与根瘤菌 *Rhizobium meliloti* 的 *Nod B* 因子的基因的 1 段序列十分相似^[18],提示这 2 种进化上相距甚远的物种间存在着某些功能上的相似性,有关研究也表明,*Nod B* 因子能从底物的非还原端开始,依次将 N-乙酰氨基葡萄糖寡糖分子上的乙酰基脱除,形成 N-葡萄糖胺寡糖,这同 *M. rouxii* 的 CDA 的作用方式是很相似的^[17],正是 *Nod B* 因子催化形成的 N-葡萄糖胺寡糖刺激豆科植物的根部形成根瘤。

3 CDA 的生物学功能

在某些接合菌中,如 *M. rouxii* 和 *A. coerulea*,它们的 CDA 与甲壳素合成酶(chitin synthetase)一起参与细胞壁的形成^[9]。首先,甲壳素合成酶利用尿嘧啶二磷酸 N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)合成甲壳素,然后再由 CDA 脱除新生甲壳素上的乙酰基成为壳聚糖。所以,在这类菌株中,其细胞壁的成分中含有壳聚糖,而不完全是甲壳素^[9,45]。这类菌株所分泌的 CDA 位于周质空间,是组成酶,酶的产生与细胞的生长同步^[13],这些特点是与该酶的生理功能相一致的。在一些植物的病原体中,如 *C. lindemuthianum* 所分泌的 CDA 参与抵抗植物体的防御作用,是胞外酶^[11,42]。植物来源或真菌来源的内切甲壳素酶可以水解真菌细胞壁,产生甲壳寡糖,而甲壳寡糖可以引发植物体的防御机制发生作用,如木质化、产生愈创葡聚糖及植物抗毒素等。*C. lindemuthianum* 所分泌的胞外 CDA 可以将甲壳寡糖转化为壳聚寡糖,使其丧失引发植物体防御作用的能力^[11,22]。而且,壳聚寡糖还可以改变植物细胞膜的通透性,这有利于真菌摄取营养^[22]。

据推测,CDA 还可能参与细胞壁的降解^[10],在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中,首先由甲壳素内切酶(endochitinase, E. C. 3. 2. 1. 14)将甲壳素水解成为甲壳寡糖,再由 CDA 与 N-乙酰氨基葡萄糖酶一起将寡糖进一步降解。这类 CDA 也是胞外酶,并且是在细胞自溶时产生^[10]。

4 CDA 生产菌株的选育

已发现的菌株产 CDA 能力均很低,必须加以改造后才能应用。目前已经有利用基因工程手段成功改造菌株的报道,Ken 等将 *C. lindemuthianum* 的 CDA 基因成功克隆到大肠杆菌(*E. coli*)中,并借助于 *Streptomyces lividans* 的甲壳素酶(chitinase)的信号肽序列,使 CDA 分泌到胞外,并且酶活力与野生型真菌的 CDA 相比没有明显差别^[23]。

Vadake 等^[6]从城市污水中分离到 1 株产碱杆菌属的细菌 *Alcaligenes* sp. ATCC 55938,可以大量分泌 CDA 到胞外,在大规模发酵体系中比真菌更容易培养,生长也更快,而且不需提取纯化 CDA,只要与甲壳素共同培养即可生产出壳聚糖。在这一菌株的筛选过程中,采用了对硝基-N-乙酰苯胺作为检测试剂,细菌产生的 CDA 可脱除对硝基-N-乙酰苯胺(无色)的乙酰基,将其转化为对硝基苯胺(黄色),根据颜色变化可判断出产 CDA 菌株。

5 CDA 应用的可能性展望

CDA 有希望用于工业生产的方向有:

(1)用 CDA 取代 NaOH 热解法生产壳聚糖^[12~24]。目前脱除甲壳素的乙酰基都是采用碱法,即用浓 NaOH 溶液加热处理甲壳素脱除乙酰基。这种方法严重污染环境,能耗高,产品脱乙酰程度不均匀,多糖在热碱中易降解等^[14]。如能用 CDA 生产壳聚糖,则不存在上述问题,并可以生产出脱乙酰程度均匀,分子质量分布范围窄的高质量壳聚糖产品,可用于一些新型功能材料的制造中,如人

造皮肤等。

然而,有研究表明,结晶态的甲壳素并不是 CDA 的良好底物,而天然存在的甲壳素都是结晶态的。CDA 可以比较容易地作用于新生的甲壳素(如前所述,在形成细胞壁时作用于新生的甲壳素),但一旦甲壳素结晶成微纤维束,由于 CDA 难以进入其分子内部,故很难起作用^[9]。

人们考虑是否可以通过预处理,先改变甲壳素的结晶态结构,比如先用几丁质酶或溶菌酶处理,破坏结晶结构,或用膨化、超声波以及溶解的办法处理甲壳素,然后再与 CDA 作用。

但产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. ATCC 55938 的 CDA 似乎同前述真菌的 CDA 不同,据报道只要同甲壳素共同培养即可将其转化为壳聚糖^[6]。我们可以根据专利说明书对这种差别作一些推断:第 1,该专利没有报道所获壳聚糖的脱乙酰度究竟有多高,因此很难判断同真菌的 CDA 相比较,其脱乙酰基的效果究竟有多大差别;第 2,在用该菌株处理甲壳素的过程中,甲壳素有 5%~7% 的降解,故推测是否是因为该菌株会同时产生甲壳素酶,先将甲壳素切断成为相对较短的片段,在一定程度上破坏了甲壳素分子原有的结晶态结构,使 CDA 容易与其进一步作用;第 3,从菌株筛选过程看,该菌株产生的 CDA 可脱除对硝基-N-乙酰苯胺(无色)的乙酰基,将其转化为对硝基苯胺(黄色),这表明该 CDA 的底物专一性不高,这与前述真菌 CDA 的底物专一性明显不同,说明该酶与真菌的 CDA 有较大差别,是否其作用模式与真菌的 CDA 也不一样,对结晶态的甲壳素是否有更高的活力,有待于进一步研究证实。

(2)利用生物合成途径生产壳聚糖。在一些接合菌中,甲壳素合成酶同 CDA 一起合成壳聚糖^[9],在这类真菌中,细胞壁中含有壳聚糖,并且有些真菌的壳聚糖含量及脱乙酰度均很高,如 *A. coerulea* 中壳聚糖含量占细胞干重的 10.4%,脱乙酰度高达 95%^[15],可

以直接利用它来发酵生产壳聚糖。

(3)用 CDA 生产具有特定乙酰化位置和程度的壳聚寡糖。*M. rouxii* 的 CDA 在催化甲壳寡糖脱乙酰基时,会在寡聚三糖、六糖、七糖的还原端留下 1 个乙酰基^[17]; *C. lindemuthianum* 来源的 CDA 还可以催化脱乙酰反应的逆反应,将乙酰基加到壳聚寡糖的特定位置上,如在壳聚二糖的非还原断加上 1 个乙酰基,成为 β -D-GlcNAc-(1-4)-GlcN^[25];在壳聚四糖的前 3 个单体上分别加上乙酰基成为 β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-(1-4)- β -D-GlcN^[25],这些寡糖产品是很难用化学方法生产的。

参 考 文 献

- 1 Martinou A, Kafetzopoulos D et al. Carbohydr. Res., 1995, 273: 235~242
- 2 Aggeliki M, Vassilis B et al. Carbohydr. Res., 1998, 311: 71~78
- 3 Anna C, Vassilis B et al. J. Biological Chem., 1996, 271: 31420~31425
- 4 Anna C, Peter B et al. FEBS Letters, 1999, 460: 275~279
- 5 Arachami M, Gowri N et al. Chitin Deacetylase in Invertebrates. In: Chitin in Nature and Technology, Muzzarelli R & Jeuniaux C et al, ed. New York: Plenum Press, 1986. 263~268
- 6 Carlos A, Oscar M Nuero et al. Current Microbiology, 1995, 30: 49~54
- 7 Christine D, Dietrich K. Food Biotech., 1994, 8(1): 67~74
- 8 Chung L, Schmidt R et al. J. Biomed. Mater. Res., 1994, 28: 463~469
- 9 Dimitris K, Aggeliki M et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90: 2564~2568
- 10 Dimitris K, George T et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90: 8005~8008
- 11 Kauss H, Jeblick W et al. Plant Sci. Letters, 1982/83, 28: 231~236
- 12 Hadwiger L A, Beckman M J. Plant Physiol., 1981, 67: 170~175
- 13 Hadwiger L A, Line R F. Physiol. Plant Pathol., 1981, 19: 249~255
- 14 Heinrich K, Barbel B. Methods in Enzymology,

- 1988 , 161 :518 ~ 523
- 15 Jason T , Vassilis B. J. Biological Chem. , 1995 , 27(44) :26286 ~ 26291
- 16 Jason T , Nathalie Z et al. Eur. J. Biochem. , 1999 , 261 :698 ~ 705
- 17 Jason T , Aggeliki M et al. Trends in Biotech. , 2000 , 18(7) :305 ~ 312
- 18 Jean T , Alain A. Anal. Biochem. , 1990 , 189 , 249 ~ 253
- 19 Kazuo O , Masaaki Y et al. Biosci. Biotech. Biochem. , 1997 , 61(7) :1113 ~ 1117
- 20 Ken T , Mayumi O et al. Biosci. Biotech. Biochem. , 1996 , 60(10) :1598 ~ 1603
- 21 Ken T , Hiroshi O et al. Carbohydr. Res. , 1997 , 303 :353 ~ 358
- 22 Ken T , Hiroshi O et al. Carbohydr. Res. , 1999 , 322 :26 ~ 31
- 23 Ken T , Mayumi O et al. J. Biosci. Bioeng. , 1999 , 87(4) :418 ~ 423
- 24 Ken T , Satoshi K et al. FEBS letters , 1999 , 458 :23 ~ 26
- 25 Ken T , Hiroshi O et al. Carbohydr. Res. , 2000 , 325 :211 ~ 215
- 26 Klokkevold P R , Vandemark L et al. J. Periodont. , 1996 , 67 :1170 ~ 1175
- 27 Kyoji Toei , Teiji Kohara. Analytica Chimica Acta , 1976 , 83 :59 ~ 65
- 28 Laurel L et al. Biochem. , 1984 , 23 :1065 ~ 1073
- 29 Maeda M. , Murakami H. Biosci. Biotech. Biochem. , 1992 , 56 :427 ~ 431
- 30 Maezaki Y , Tsuji K et al. Biosci. Biotech. Biochem. , 1993 , 57 :1439 ~ 1444
- 31 Martinou A , Kafetzopoulos D et al. J. Chromatography , 1993 , 644 :35 ~ 41
- 32 Matsumoto T , Watanabe T et al. Chitin Chitosan Research , Pro. the 10th Sympo. , Jap. Soc. for Chitin and Chitosan(abstract A3). 1996 , 2 :94 ~ 95
- 33 Mishra C , Semino C et al. Yeast , 1997 , 13(4) :327 ~ 336
- 34 Naoko Y , Shizu F et al. Biosci. Biotech. Biochem. , 1994 , 58(1) :193 ~ 195
- 35 Naoko Y , Yasushi M et al. Biosci. Biotech. Biochem. , 1996 , 60(8) :1320 ~ 1323
- 36 Siegrist J , Kauss H. Physiol. Mol. Plant Pathol. , 1990 , 36 :267 ~ 27
- 37 Suzuki K , Mikami T et al. Carbohydr. Res. , 1986 , 51 :403 ~ 408
- 38 To-Anum Ch , Toyoda H et al. Nippon Shokobutsu Byori Gakkaiko , 1992 , 57 :609 ~ 642
- 39 Vadake R S , Baton R. US 5739015 , April , 14 , 1998 , Filed Mar , 10 , 1997 , Ser , No. 815282
- 40 Xiao-Dong Gao , Tetsuo Katsumoto et al. J. Biochem. , 1995 , 117 :257 ~ 263
- 41 Yoshio Araki , Eiji Ito. Eur. J. Biochem. , 1975 , 55 , 71 ~ 78
- 42 杜予民.武汉大学学报(自然科学版).2000 , 46 (2) :181 ~ 186

The Research Outline of Chitin Deacetylase and Its Application Prospect

Duan Shan Peng Zhiying

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

ABSTRACT This paper reviews the present researches on chitin deacetylase (CDA). It includes the sources of the enzyme , the purification and research methods of CDA , the basic biochemical properties and biological functions of CDA , and the the breeding of production strain by gene-engineering method. Besides , the paper also discusses the possibilities of future application of CDA.

Key words chitin deacetylase , chitin , chitosan