

# 微生物壳聚糖酶研究进展

## Advances in chitosanase from microorganism

陈小娥<sup>1, 2</sup>, 夏文水<sup>1</sup>, 余晓斌<sup>1</sup>

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036 ; 2. 浙江海洋学院, 浙江 舟山 316000)

中图分类号 : Q55; Q939.9      文献标识码 : A      文章编号 : 1000 - 3096(2004)03 - 0072 - 04

甲壳素是广泛存在于虾、蟹等甲壳动物中的生物多聚物, 每年生成量近 100 亿吨, 储量仅次于纤维素。壳聚糖是甲壳素脱乙酰产物, 在工业、农业中有重要应用价值, 但由于水溶性差, 其应用受到一定限制。近年来发现壳聚糖降解产物即甲壳低聚糖具有独

---

收稿日期 : 2003 - 04 - 04 ; 修回日期 : 2003 - 06 - 20

作者简介 : 陈小娥(1968 - ), 女, 浙江浦江人, 浙江海洋学院助理研究员, 江南大学食品学院在读博士生, 从事食品生物技术和海洋功能食品开发, E-mail: xiaochen@163.com ; 夏文水, 责任作者, 教授, 博士生导师

特的生理功能,因而筛选产几丁质酶、壳聚糖酶微生物,用酶法制备甲壳低聚糖已成为目前研究热点。壳聚糖酶是专一性降解壳聚糖的水解酶,对甲壳素、壳聚糖降解酶的研究是甲壳素科学中最重要的一个分支。作者综述了国内外产壳聚糖酶的微生物来源及性质和应用研究现状。

## 1 壳聚糖酶的发现和微生物来源

1973年 Monaghan<sup>[1]</sup> 等人在研究用水解酶对抗病原真菌的可能性时,通过对 200 多种微生物的研究,发现 25 种真菌和 15 种细菌的培养液能降解接合菌纲 (Zygomycetes) 的 *Rhizopus rhizopodiformis* 的细胞壁,但对其它纲的微生物细胞壁无作用,于是就提出了一类新的酶—壳聚糖酶,它是一种不同于几丁质酶的新酶,这种酶对胶态几丁质不水解,但是能够降解完全脱乙酰化的壳聚糖,所以它被认为是对线性的壳聚糖具有水解专一性的一种酶。并于 1984 年向国际酶学委员会申请登记编号—EC3.2.1.99。此后,经过将近 30 年的一系列的研究,人们又相继从多种微生物(包括细菌、放线菌、真菌以及病毒等)及单子叶和双子叶植物的不同组织中发现有壳聚糖酶活性。不同产酶微生物来源及部分酶学性质如表 1 所示。

## 2 壳聚糖酶的理化性质

由表 1 可看出不同微生物来源壳聚糖酶性质不同。一般微生物产壳聚糖酶相对分子质量在 10~50 ku,但是 *Rhodotorula gracilis* CFR-1 所产壳聚糖酶相对分子质量为 100 ku, *Bacillus amyloliquefacie* UTK 和 *Aspergillus* Y2K 所产的外切壳聚糖酶的相对分子质量分别为 108 ku, 135 ku。

壳聚糖酶的最适作用 pH 为 4.0~8.0,最适作用温度为 30~70 °C。大部分壳聚糖酶等电点 pI 在 8.0~10.1 之间,但 *Nocardia orientalis* IFO12806, *Mucor rouxii*, *Enterbacter* sp. G-1 的等电点 pI 却分别为 4.0, 4.9, 5.5。微生物壳聚糖酶对底物具有一定的专一性,一般都可水解胶状壳聚糖、水溶性壳聚糖衍生物如乙二醇壳聚糖等,酶解终产物一般为聚合度为 2-4 的壳寡糖。

## 3 壳聚糖酶的特征

不同微生物来源壳聚糖酶水解作用模式不同,其作用底物壳聚糖可看作是部分脱乙酰化或完全脱乙酰化的几丁质,壳聚糖分子中一般包含 4 种糖苷键 GlcNAc-GlcNAc, GlcN-GlcN, GlcN-GlcNAc, GlcNAc-GlcN, 各种糖苷键比例取决于脱乙酰化程度。

壳聚糖酶被认为是能作用于壳聚糖分子中 GlcN-GlcN 糖苷键,而不能作用 GlcNAc-GlcNAc 糖苷键。因此根据其作用底物糖苷键的类型,壳聚糖酶被分为 3 类:作用 GlcN-GlcN, GlcNAc-GlcN 的为 I 类;只作用 GlcN-GlcN 的为 II 类;作用 GlcN-GlcN 和 GlcN-GlcNAc 的为 III 类。其中第 I 类的代表 *Penicillium islandicum*, *Bacillus pumilus*, *Streptomyces* sp. N174, 第 II 类的代表为 *Bacillus* sp. No. 7-M, *Bacillus* PI-7S, 第 III 类的代表为 *Streptomyces griseus* HUT6037 和 *Bacillus circulans* MH-K1。

根据酶解产物的不同,壳聚糖酶可分为内切酶和外切酶。内切酶作用方式是随机切断壳聚糖链,产生相对分子质量较小的低聚糖,适合于制备壳低聚糖。从已报道文献来看,大部分微生物产的壳聚糖酶为内切酶。外切酶则是从糖链的非还原性末端逐个切下单糖体残基,产物为氨基葡萄糖。如 *Bacillus amyloliquefaciens* UTK, *Aspergillus oryzae* IAM2660, 既产内切酶、又产外切酶。

而 Henrissat<sup>[31]</sup> 等从分子水平角度来研究壳聚糖酶的特征,认为大部分壳聚糖酶属于糖苷水解酶的 46 家族。目前研究表明,46 家族包括 12 种氨基酸序列,其中 10 种在细菌中发现,2 种在病毒中发现。而 Tremblay 等<sup>[32]</sup> 最近研究表明,又有 2 个家族的糖苷水解酶有壳聚糖酶活性。75 家族的真菌产壳聚糖酶,即 *Fusarium solani* 所产的壳聚糖酶与细菌所产的壳聚糖酶没有同源性。而 80 家族的细菌壳聚糖酶来自于 *Matsuebacter chitosanotabidus* 和 *Sphingobacterium multirorum*, 则与 46 家族有一个共同的特征单元(保持酶活所必需的),即 E-[DNQ]-x(8,17)-Y-x(7)-D-x-[RD]-[GP]-x-[TS]-x(3)-[AIVFLY]-G-(5,11)-D, 所以 Tremblay 等人认为,所有现已分析的壳聚糖酶基因都有一个序列相似连续区域,他们应该归属于同一类。

## 4 壳聚糖酶的应用

壳聚糖酶在工业上可用于制备甲壳低聚糖(Chitoooligosaccharides, 简称 COSs)。由于 COSs 水溶性好,更利于人体吸收,因而 COSs 在食品工业中可作为食品添加剂;COSs 在医药、诊断试剂方面具有非常诱人的前景,特别是聚合度在 4 以上的 COSs 具有抗感染、抗癌以及调节、改善免疫活性的功能;COSs 在植物生理方面也得到应用,COSs 具有抗菌的功能,能对植物病原菌产生拮抗,同时能诱导植物产生抗菌物质;COSs 还可以用于化妆品领域。正是由于 COSs 的广泛的应用前景,利用壳聚糖酶来制备 COSs 已成为

表 1 产壳聚糖酶微生物来源及部分酶学性质

产酶微生物	相对分子质量 (kDa)	等电点 pI	最适 pH	最适温度 (°C)	作用底物 脱乙酰度 (%)	比活 (U/mg)	纯化倍数	产率 (%)
<i>Streptomyces</i> No. 6 <sup>[21]</sup>	26(SDS)		4.5 ~ 6.0	50	壳聚糖	105	2.1	28
<i>Streptomyces grises</i> HUT6037 <sup>[31]</sup>	35(SDS) 10(GF)	9.7	8.0	37	壳聚糖 CMC	2.76	7.7	22
<i>Streptomyces</i> N174 <sup>[41]</sup>	29.5(SDS)	7.5	5.5	65	壳聚糖(40-99)	59.8	1.72	27
<i>Nocardia orientalis</i> IF012806 <sup>[51]</sup>	24(GF) 26(SDS)	4.0	5.0-6.0	50	壳聚糖(70)	61.4	52	31
<i>Nocardioides</i> sp. K-01 <sup>[61]</sup>	27	8.8	5.0	55-60	壳聚糖(65-100)	41.8	14.9	47
<i>Bacillus</i> R-4 <sup>[71]</sup>	31(GF)	8.3	5.6	40	乙二醇壳聚糖	35.61	3561	17.4
<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M <sup>[81]</sup>	41(SDS) 30(GF)		6.0	50	胶体壳聚糖 乙二醇壳聚糖, CMC	319	319	18.2
<i>Bacillus circulans</i> MH-K1 <sup>[91]</sup>	32(SDS) 27(GF)	9.2	6.5-6.9	50	壳聚糖(80) 乙二醇壳聚糖	160.0	40	43
<i>Bacillus megaterium</i> P1 Chitosanase A <sup>[101]</sup>	43(SDS)	10.1	4.5-6.5	50	壳聚糖(81) 几丁质, CMC	154.8	499	35
<i>Bacillus</i> sp. PI-7s <sup>[111]</sup>	43(SDS)		5.0	37	壳聚糖(99)			
<i>Bacillus licheniformis</i> UTK Ch1 <sup>[121]</sup>	31(SDS) 26(GF)	10.1				245	247	12
<i>Bacillus subtilis</i> 168(PQC10) <sup>[131]</sup>	27.4		5.7	60	壳聚糖	56.9	1.84	33
<i>Bacillus chimensis</i> EAG(IFO15659) <sup>[141]</sup>	31		6	<40	胶体壳聚糖(100)	20.09	3	5.7
<i>Bacillus subtilis</i> KH1 <sup>[151]</sup>	28(SDS)	8.3	7.0	50	壳聚糖(62-99)	26.3	9.39	55.8
<i>Bacillus</i> sp. CK4 <sup>[161]</sup>	31(SDS) 29(GF)		6.5	60	水溶性壳聚糖(99) 胶体壳聚糖	126	156	12.4
<i>Bacillus cereus</i> S1 <sup>[171]</sup>	45(SDS)		6	60	水溶性壳聚糖	196	3.69	17.2
<i>Pseudomonas</i> H-14 <sup>[181]</sup>	35(SDS)	10.1	4.0	30	壳聚糖(62-100)	51.8	1.6	55.2
<i>Pseudomonas</i> sp. VIIIIT39 <sup>[191]</sup>	51.3(SDS)		6.5	25-32				
<i>Enterobacter</i> sp. G-1 <sup>[201]</sup>	50(SDS)	5.5	7.0	50	壳聚糖(80)	5.84	11.0	25.8
<i>Myxobacter</i> AL-1 <sup>[211]</sup>	31(GF)		5.0-6.8	70	CMC 壳聚糖	80.0		2
<i>Matsuebacter</i> Chitosanase 3001 <sup>[221]</sup>	34		4.0	30-40	壳聚糖(80) 乙二醇壳聚糖(90)	250.2	4.8	48.7
<i>Amycolatopsis</i> C <sub>5</sub> O-2 <sup>[231]</sup>	27(SDS)	8.8	5.3	55	壳聚糖(100)	38.8	52	31
<i>Burkholderia gladiol</i> CHB101 Chitosanase (I) <sup>[241]</sup>	37		5-9	65	壳聚糖(70-90)			
Chitosanase (II)	30			50	乙二醇壳聚糖			
Chitosanase (A)	28		5-9		壳聚糖(70-100)	160	80	1.2
<i>Aspergillus</i> sp. Y2K <sup>[251]</sup>	25(SDS)	8.4	6.5	65-70			17	26
<i>Aspergillus Oryzae</i> IAM2660 <sup>[261]</sup>	40(SDS) 135(SDS)					17.2	75.1	12.2
$\beta$ -GlcNase (II)						38.8	169	5.88
<i>Penicillium islandicum</i> <sup>[271]</sup>	30(GF)	4.2	4.5-6.0	45	壳聚糖(40-70)	10.1	38	42
<i>Mucor rouxii</i> ChA <sup>[281]</sup>	76(SDS)	4.9	5.0	55	壳聚糖	42.7	54	72
ChB	58(SDS)	4.7		50	胶体几丁质	102.3	130	25
<i>Rhodotorula gracilis</i> CFR-1 <sup>[291]</sup>	100(GF)		4.5	45	壳聚糖		3	34
<i>Fusarium solani</i> f. sp. phaseoli SUF386 <sup>[301]</sup>	36(SDS)		5.6	40	壳聚糖(70-100) 乙二醇壳聚糖, CMC	5.7	36.0	10

注 SDS 表示通过变性电泳测定的相对分子质量, GF 表示通过凝胶过滤色谱测定的相对分子质量

目前研究的热点。

壳聚糖酶可以作为农业应用中的生物控制剂。它是一种 PR 蛋白( Pathogenesis related protein ),可提高植物的抗病能力。

壳聚糖酶在基础研究方面已得到应用。壳聚糖酶在生物体的自溶、形态发生和营养代谢中有重要的作用,发现一些疾病和生物共生现象与它有关。壳聚糖酶能水解毛霉科霉菌的细胞壁从而可以研究这些细胞壁的结构与合成。也可以用壳聚糖酶并辅以其它手段制备真菌原生质体,为细胞分子生物学提供工具酶。还可以利用该酶进行真菌分类,诊断某些植物或动物中的真菌。用甲壳素酶-壳聚糖酶-金复合物对甲壳素和壳聚糖进行细胞化学定位。

## 5 国内外对壳聚糖酶的研究现状和展望

国外侧重于研究不同来源的壳聚糖酶对不同底物的水解模式及其分子结构研究,并与已知的壳聚糖酶核苷酸序列进行比较,分析其同源性,为基础生命科学提供信息。从目前情况看来,研究得最为深入的是放线菌属的 *Streptomyces* N174,对其三级结构,活性中心基团都进行了研究,另外,已知三级结构的有 *Bacillus circulans* MH-K1。

从已报道微生物产酶能力来看,一般微生物所产壳聚糖酶酶活普遍很低,纯品酶比活率在 5~250 U/mg protein 之间,产率在 1.2%~77% 之间。从目前报导产酶活力最高的 *Streptomyces* N174 的基因工程菌所产发酵液粗酶活为 36.8 U/mL。壳聚糖酶酶解终产物一般以 2~4 糖为主。也有壳聚糖酶水解产物中含 (GlcN) 6 等少量低聚糖。

国内对壳聚糖酶的研究比较少,中国科学院微生物所<sup>[33]</sup>对杀虫真菌球孢白僵菌进行诱变处理,得到发酵液粗酶活为 0.2~2.32 U/mL。郑州粮院微生物所从土壤中筛到了一株细菌属假单胞菌 *Pseudomonas* sp. VIII39 能产壳聚糖酶、发酵液粗酶活为 0.4 U/mL。浙江大学则筛到了一株青霉产壳聚糖酶。作者则从海底污泥中筛到了一株曲霉高产菌株,发酵液粗酶活在 3 U/mL 以上。继续寻找不同微生物来源的壳聚糖酶,以得到具工业化潜在应用价值的新酶原,已迫在眉睫。

参考文献:

[1] Monaghan R L, Eveleigh D E, Tewari F P, *et al.* Chitinase, a novel enzyme[J]. *Nature New Biol*, 1973, 245: 78-80.

[2] Price J S, Storck R. Production, purification and characterization of an extracellular chitinase from *Streptomyces*

[J]. *J Bact*, 1975, 124: 1 574-1 585.

[3] Ohtakara A, Ogata H, Taketomi Y, *et al.* Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces griseus*. In: Zikakis J P. Chitin, Chitosan and Related Enzymes; Orlando FL: Academic Press, 1984, 147-59.

[4] Boucher I, Dupuy A., Vidal P, *et al.* Purification and characterization of a chitinase from *Streptomyces* N174 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992,38:188-193.

[5] Sakai K, Katsumi R, Isobe A, *et al.* Purification and hydrolytic action of a chitinase from *Nocardia orientalis* [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1991, 1097: 65-72.

[6] Okajima S, Kinouchi T, Mikami Y, *et al.* Purification and some properties of a chitinase of *Nocardioides* sp. [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1995,41:351-357.

[7] Tominaga Y, Tsujisaka Y. Purification and some enzymatic properties of the chitinase from *Bacillus* R-4 which lyses *Rhizopus* cell walls[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1975,410:145-155.

[8] Uchida Y, Ohtakara A. Chitinase from *Bacillus* species [J]. *Meth Enzymol*, 1988, 161:501-505.

[9] Saito J I, Kito A, Higuchi Y, *et al.* Crystal structure of chitinase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6? resolution and its substrate recognition mechanism[J]. *J Biol Chem*, 1999,43:30 818-30 825.

[10] Pelletier A, Sygusch J. Purification & characterization of three chitinase activities from *Bacillus megaterium* P1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 844-852.

[11] Seino H, Tsududa K, Shimazue Y. Properties and action pattern of a chitinase from *Bacillus* sp. PI-7S[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55, 2 421-2 423.

[12] Uchida Y, Tateishi K, Shida O, *et al.* Purification and enzymic properties of chitinases from *Bacillus licheniformis* UTK and their application. In: Brine C J, Sandford P A, Zikakis J P. *Adv Chitin Chitosan*; Elsevier: London, 1992. 282-291.

[13] Parro V, San R M, Galindo L, *et al.* A 23911 bp region of the *Bacillus subtilis* genome comprising genes isolated upstream and downstream of the lev operon[J]. *Microbiol*, 1997a, 143: 1 321-1 326.

[14] Akiyama K, Fujita T, Kuroshima K I, *et al.* Purification and gene cloning of a chitinase from *Bacillus ehimensis* EAG1[J]. *J Biosci Bioeng*. 1999, 87(3):383-385.

[15] Omumasaba C A, Yoshida N, Sekiguchi Y, *et al.* Purification and some properties of a novel chitinase from *Bacillus subtilis* KH1[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2000, 46: 19-27.

[16] Yoon H G, Kim H Y, Lim Y H, *et al.* Thermostable chitinase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme [J]. *Appl Environ Microbiol*. 2000, 66: 3 727-3 734.

[17] Kurakake M, You S, Nakagawa K, *et al.* Properties of chitinase from *Bacillus cereus* S1[J]. *Curr Microbiol*. 2000, 40(1):6-9.



- [18] Y oshihara K J , Hosokawa T, Kubo M, *et al.* Purifica-  
tion and properties of a chitosanase from *Pseudomonas*  
sp. H - 14[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1992, 56:  
972 - 973.
- [19] 蔡静平, 王钦宏. 假单胞菌 *Pseudomonas* sp. VIII39  
壳聚糖酶的纯化和性质研究[J]. 郑州工程学院学  
报, 2001 **22**(4): 1 671 - 1 629.
- [20] Yamasaki Y, Hayashi I, Ohta Y, *et al.* Purification and  
mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter*  
sp. G - 1[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1993, 57:  
444 - 449.
- [21] Hedges A, Wolfe R S. Extracellular enzyme from *Myxo-*  
*bacter* Al - 1 that exhibits both  $\beta$  - 1 - 4 glucanase and  
chitosanase activities[J]. **J Bact**, 1974, 120: 844 - 853.
- [22] Park J K, Shimono K, Ochiai N, *et al.* Purification,  
characterization, and gene analysis of a chitosanase  
(ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001[J].  
**J Bacteriol**. 1999, 181(21): 6 642 - 6 649.
- [23] Okajima S, Ando A, Shinoyama H, *et al.* Purification and  
characterization of an extracellular chitosanase produced by  
*Amycolatopsis* sp. CsO - 2[J]. **J Ferment Bioengng**,  
1994, 77: 617 - 620.
- [24] Shimosaka M, Nogawa M, Wang X Y, *et al.* Production of  
two chitosanase from a chitosan - assimilating bacterium  
*Acinetobacter* sp. strain CHB101[J]. **Appli Environ**  
**Microbiol**. 1995, 619(2): 438 - 442.
- [25] Cheng C Y, Li Y K. An *Aspergillus chitosanase* with  
potential for large - scale preparation of chitosan oligo -  
sac charides[J]. **Biotechnol Appl Biochem**. 2000, 32:  
197 - 203.
- [26] Zhang X Y, Dai A L, Kuroiwa K, *et al.* Cloning and  
characterization of a chitosanase gene from the Koji Mold  
*Aspergillus oryzae* strain IAM 2660[J]. **Biosci Biotechnol**  
**Biochem**, 2001, **65**(4): 977 - 981.
- [27] Fenton D, Davis B, Rotgers C, *et al.* Purification and  
mode of action of a chitosanase from *Penicillium is -*  
*landicum*[J]. **J Gen. Microbiol**, 1981, 126: 151 - 165.
- [28] Alfonso C, Martinez M J. Reyes F O. Purification and  
properties of two endo - chitosanases from *Mucor rouxii*  
implicated in its cell wall degradation[J]. **FEMS Mi -**  
**crobiol Lett**, 1992, 95: 187 - 194.
- [29] Somashekar D, Joseph R. Partial purification and proper -  
ties of a novel chitosanase secreted by *Rhodotorula gracilis*  
[J]. **Lett Appl Microbiol**, 1992, 14: 1 - 4
- [30] Shimosaka M, Nagawa M, Ohno Y, *et al.* Chitosanase  
from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp.  
phaseoli purification and some properties[J]. **Biosci**  
**Biotechnol Biochem**, 1993, 57: 231 - 235.
- [31] Henrissat B, Bairch A. Updating the sequence - based  
classification of glycosyl hydrolases[J]. **Biochem J**,  
1996, 316: : 695 - 696.
- [32] Tremblay H, Blanchard J, Brzezinski R. A common  
molecular signature unifies the chitosanases belonging to  
families 46 and 80 of glycoside hydrolases[J]. **Can J**  
**crobiol**, 2000, 46: 952 - 955.
- [33] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 等. 球孢白僵菌胞外壳聚  
糖酶的纯化和性质[J]. 菌物系统, 2002 **21**(1):  
77 - 83.