

甲壳素的酶水解机理及动力学研究进展

夏文水, 苏畅

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 甲壳素和壳聚糖不仅可被甲壳素酶、壳聚糖酶和溶菌酶水解, 还可以被一些包括蛋白酶、脂肪酶和其它糖酶的非专一性酶水解, 这些酶对甲壳素和壳聚糖解聚的作用机理和动力学, 对于开发甲壳素和壳聚糖在食品、化工、医药、农业等领域中的应用具有重要意义. 为此, 介绍了近年来国外的研究进展.

关键词: 甲壳素/壳聚糖; 酶水解; 反应机理; 动力学

中图分类号: S 986.2

文献标识码: A

The Reaction Mechanism and Kinetics of Chitin/Chitosan Degradation with Hydrolysaes

XIA Wen-shui, SU Chang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Chitin/chitosan can be degraded not only by chitinase, chitosanase and lysozyme but also by non-specific enzymes such as papain, lipase, hemicellulase and so on. The reaction mechanism and kinetics of those degradations are discussed in detail, which indicates the significance in developing the application of chitin/chitosan in the fields of food, chemicals, medicine, agriculture and so on.

Key words: chitin/chitosan; enzymatic degradation; reaction mechanism; kinetics

甲壳素(Chitin)是一种从虾蟹等外壳中提取的天然多糖, 结构为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖和少量 D-氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的高分子聚合物, 甲壳素脱乙酰基后的产物被称为壳聚糖(Chitosan). 甲壳素和壳聚糖作为一类可再生和可生物降解的物质以及它们在食品、化工、医药、农业等领域中的应用, 在过去的 20 年来受到广泛的重视. 但由于这类多糖不溶于水, 在人体内难以被消化吸收, 使应用受到了限制. 因此, 将甲壳素和壳聚糖大分子水解为水溶性的甲壳低聚糖, 已成为甲壳素研究的一个热点. 近几年的研究表明: 甲壳低聚糖具

有较高的免疫调节功能及抗肿瘤、抗菌等生理活性.

据报道, 甲壳素和壳聚糖除被甲壳素酶、壳聚糖酶和溶菌酶降解外, 还能被葡萄糖酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶、半纤维素酶和果胶酶等在室温及相对较低的 pH 值(pH 3.3 ~ 4.5)下有效地水解^[1].

有些非专一性酶的水解甚至比专一性酶更加有效^[2,3]. 了解这些酶的性质以及这些酶对甲壳素和壳聚糖降解的作用机理和动力学, 对了解甲壳素和壳聚糖在人体内的代谢和消化吸收, 指导甲壳低

聚糖包括单糖的生产有着重要的意义.为此,作者主要介绍了国外近年来在甲壳素酶学方面的研究进展.

1 甲壳素酶和壳聚糖酶

甲壳素酶(E.C. 3.2.1.14)是一种随机催化水解甲壳素和甲壳糊精中以 N-乙酰- β -D-葡萄糖胺连接的 β -1,4 糖苷键的酶.该酶广泛存在于动物、植物和微生物中^[3],最适 pH 值一般较宽,为 pH 3~9,而底物专一性较窄,仅水解甲壳素而不水解纤维素^[4].壳聚糖酶(E.C. 3.2.1.32)是一种催化水解部分 N-乙酰化壳聚糖中 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(GlcNAc)和 D-氨基葡萄糖(GlcN)之间的 β -1,4 糖苷键的酶.最适 pH 范围在 4.0~6.8.底物专一性也很窄.这两种酶最明显的差别就是前者水解 GlcNAc-GlcNAc 糖苷键而不水解 GlcN-GlcN 糖苷键,后者则与前者相反^[4].

在甲壳素酶水解甲壳素的过程中,固态甲壳素被甲壳素酶随机地切断,生成水溶性的较高聚合度的低聚糖,并立即被溶液中的酶水解,主要产物是双糖.甲壳素酶水解甲壳素时,水解部位是无规则的,而在均相条件下,如果以壳聚糖作为底物,水解部位可以是规则的,可获得较高聚合度的低聚糖.因为壳聚糖具有部分 N-乙酰氨基葡萄糖残基,而甲壳素酶能识别 N-乙酰氨基葡萄糖残基,但它不水解氨基葡萄糖序列,所以生成的水解产物是由氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖组成的七糖,它们可以通过乙酸酐的乙酰化作用转化为 N-乙酰化的甲壳低聚糖.从高乙酰度的部分 N-乙酰化壳聚糖制得的低聚糖聚合度低,而从低乙酰度的部分 N-乙酰化壳聚糖制得的是高聚合度的低聚糖^[5].

由于大多数的碳水化合物酶尽管在三级结构及底物结合部位的局部构型上有着很大的差异,但它们在蛋白质-多糖的相互作用关系方面却是相似的.因此,H. Diekmann 根据 Nitta 1971 年提出的多糖酶作用模式,在比较了甲壳素酶与溶菌酶的底物专一性后,提出了一种 6 个活性部位(A~F)的假设,其中 2 个部位(A 和 B)对六糖的亲合力弱于其它几个部位.糖苷键在 D 和 E 之间断裂^[6].

通常用甲壳低聚糖及它们的还原或甲基化衍生物来阐明甲壳素酶的结合方式和作用模式.Hara 等人用不同的部分 O-甲基化甲壳二糖研究甲壳素酶的底物结合方式,发现还原端糖环的 C-6 羟基及非还原端糖环的 C-3 和 C-4 羟基对于酶反应不重要,而还原端糖环 C-2 位的乙酰氨基和 C-3 位的羟

基以及非还原端糖环的 C-6 羟基是用于酶分子定向的^[7].

Masaru 对来源于 *Aeromonas sp.* No10 s-24 的甲壳素酶 II 水解部分 N-乙酰化壳聚糖的水解产物进行了研究,分析了它的断裂模式.水解产物经 CM-Sephadex C-25 柱色谱分离后通过 N-乙酰化 β -GlcNAc 酶和 β -GlcN 酶外切、亚硝基降解,以确定糖的组成及低聚糖的序列.研究结果表明,甲壳素酶水解部分 N-乙酰化壳聚糖中的 GlcNAc-GlcNAc 键及 GlcNAc-GlcN 键^[4].

甲壳素酶 II 对于部分 N-乙酰化壳聚糖中不同键的专一性类似来源于 *Aeromonas hydrophila*, *Streptomyces griseus* 和 *Bacillus circulans* WL-12 的甲壳素酶;另一方面,来自 *S. griseus* HUT 6037 的甲壳素酶在 C-1 断裂 GlcN-GlcNAc 键和 GlcNAc-GlcNAc 键,但不断裂 GlcNAc-GlcN 键或 GlcN-GlcN 键^[8].卷心菜甲壳素酶有着与其一样的专一性.这些结果说明,甲壳素酶需要在水解键的两端至少有一个 GlcNAc 基团.从低聚糖的水解产物的分析上可以看出,来源于 *Pyconporus cinnabarinus* 的甲壳素酶有外切活力,优先水解非还原端的第二个 β -N-乙酰氨基葡萄糖糖苷键.

由于甲壳素酶一般以酶系存在,并具有多样性以及难以分离提纯,这使得研究酶动力学变得复杂.不同来源的甲壳素酶 K_m 值和 V_{max} 值相差较大.从大多数淡水试样中所得到的胞外 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷水解酶(外切甲壳素酶)并不适合简单的 Michaelis-Menten 动力学方程.此外,甲壳素酶可以被阿洛糖脒(allosamidin)抑制.几乎所有昆虫、寄生虫、虾的甲壳素酶都受到阿洛糖脒的抑制.但是对植物甲壳素酶(Yam)和溶菌酶而言,阿洛糖脒并无抑制作用.甲壳素酶在 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} 存在时活力受到抑制.

壳聚糖酶也有外切和内切两种类型.内切壳聚糖酶以释放二聚体、三聚体或低聚糖为主,外切型则从壳聚糖或甲壳低聚糖的非还原末端产生单糖残基——氨基葡萄糖.不同微生物来源的壳聚糖酶水解不同的底物.*Bacillus sp.* No.7-M 壳聚糖酶只水解 GlcN-GlcN 键,而来自 *S. griseus* HUT 6037 和 *B. circulans* MH-K1 的壳聚糖酶不光水解 GlcN-GlcN 键,还水解 GlcN-GlcNAc 键,并且生成有 GlcN 在还原端的杂甲壳低聚糖和 GlcN 寡聚体^[9].Fukamizo 等人报道,来自于 *Bacillus pumilus* BN-262 和 *Streptomyces sp.* N174 的壳聚糖酶能生成 GlcNAc 在还原端、GlcN 在非还原端的甲壳低聚

糖、(GlcN)₂和(GlcNAc)₃,说明这些壳聚糖酶能断裂GlcNAc-GlcN键和GlcN-GlcN键^[10,11]。*Bacillus sp.*壳聚糖酶主要作用于高脱乙酰度(Deacetylation degree, DD)的壳聚糖,*Bacillus sp.* 7-M和R-4壳聚糖酶对完全乙酰化的壳聚糖水解活性最高,*Bacillus circulans* MH-K1水解80% DD壳聚糖,*Bacillus licheniformis* UTK作用于65%~80% DD壳聚糖。相反,*Enterobacter* G-1壳聚糖酶对20%乙酰化度(DA)壳聚糖有最高活性,*Streptomyces*壳聚糖酶适合于25%~35% DA的壳聚糖,*F. solani*和*N. orientalis*壳聚糖酶对30% DD壳聚糖作用最好。

Hutadilok等人通过对壳聚糖酶在均相溶液中和非均相悬浮液中对部分N-乙酰基化的壳聚糖衍生物的作用研究,得出以下结论:壳聚糖酶在均相溶液中对底物的作用遵循Michaelis-Menten动力学方程, K_m 值随着N-乙酰基取代度的增加而提高, V_{max} 则随着N-乙酰基取代度的增加而下降;在N-乙酰基取代度基本相同时,N-乙酰基中的碳原子数增加时, K_m 值增加,其顺序为:N-丁酰基壳聚糖>丙酰基壳聚糖>乙酰基壳聚糖,而 V_{max} 值则几乎不变。在非均相悬浮液中,情况则有不同:对于N-乙酰基取代度0.50和N-丙酰基取代度为0.25的部分N-乙酰基化衍生物,它们被水解的速度要比相应的取代度不同的N-乙酰基化衍生物的速度要快;随着N-乙酰基基团碳原子数的增加,水解速率下降。这可能与底物在水中的疏水性(取决于取代度及其在底物上的分布)和溶胀性有关^[12]。

2 溶菌酶

溶菌酶(E.C. 3.2.1.17)能降解一些微生物细胞壁的糖蛋白,也能降解甲壳素和部分N-乙酰化壳聚糖。溶菌酶的结构中有6个活性结合部位,在催化反应中,6个亚基结合6个糖环,并需要有GlcNAc糖基。溶菌酶对部分N-乙酰化壳聚糖的水解能力随其乙酰化度的增加而提高,但不能催化水解DD>95%的壳聚糖。在大多数的哺乳动物中,甲壳素的降解主要是由溶菌酶所引起的。在人乳和人体血清中也含有丰富的溶菌酶。由于溶菌酶能识别乙酰氨基葡萄糖序列,因此可以从高乙酰度的壳聚糖获得高聚合度的低聚糖。

X-射线分析发现,人体溶菌酶有一个与鸡蛋白溶菌酶非常相似的主链结构,且NMR研究表明,在人体溶菌酶和鸡蛋白溶菌酶中存在相似的结合部位。但是,人体溶菌酶中有53个氨基酸基团与鸡蛋白溶菌酶不同,其中最重要的是鸡蛋白溶菌酶中参

与结合部位的Trp62被人体溶菌酶中的Tyr替代。这些差异使得人体溶菌酶与鸡蛋白溶菌酶在结合亲和性和降解速率上可能有不同^[13]。

Várum等人对人体中溶菌酶降解壳聚糖进行研究,发现对于乙酰度为0.6的壳聚糖,若在体系中加入50 μmol的甲壳素酶抑制剂(allosamidin),并没有阻止壳聚糖的降解。他们还得出,鸡蛋白溶菌酶对部分N-乙酰化的壳聚糖的降解速率有如下关系: $r \propto F_A^{3.6}$,其中 r 代表速率, F_A 代表N-乙酰度。

在不同pH下比较人体溶菌酶对2种水溶性壳聚糖(F_A 为0.42和0.60)的降解初速度,发现底物专一性很大程度上与pH无关,且尽管化学结构不同,其绝对降解速度随着离子强度上升(至0.2 mol/L)而增加(正如一个带正电的酶攻击一个带正电的底物时所会发生的情况一样),但2种溶菌酶的底物专一性与离子强度无关。由于在一个同时影响酶和底物的电荷密度的pH范围内,不同 F_A 值也就是不同电荷密度的壳聚糖的相对降解速率与pH值和离子强度无关,这说明在带正电的溶菌酶与带正电的壳聚糖底物之间对底物的专一性起重要作用的是短程相互作用力(如氢键、范德华力和结合部位的静电引力),而不是长程静电引力。

最近,Kurita等人报道,溶菌酶对β-甲壳素比α-甲壳素更容易发生水解。因为β-甲壳素分子间的结合力更弱,β-甲壳素的脱乙酰度明显影响溶菌酶的水解,50% DD的β-甲壳素水解速度最大,随着DD的增加,水解速度下降,当达到97%时,不发生反应^[14]。

Ragnhid以N-乙酰化度 $F_A = 0.04 \sim 0.60$ 的水溶性壳聚糖为底物,对鸡蛋白溶菌酶的水解动力学进行了研究,发现壳聚糖的降解随时间的变化是非线性的,而在氧化还原解聚反应(使用H₂O₂)中,壳聚糖的降解与时间呈线性关系,与壳聚糖的化学组成无关,是一级随机解聚反应。通过测定溶菌酶浓度和底物浓度对反应初速度的影响,说明这种溶菌酶-壳聚糖体系遵循米氏方程式,壳聚糖与溶菌酶的反应初速度随着乙酰基团的增加而显著增加。通过米氏方程式分析降解数据发现,含有3~4个或更多乙酰化基团的六聚底物对于反应初速度最有影响。可采用乙酰化度非常低的壳聚糖($F_A = 0.0107$)作为酶抑制剂,随着抑制剂浓度的增加,不同 F_A 值的壳聚糖的反应初速度降低,然而相对速率保持不变,这说明有效部位(含3~4个或更多乙酰基团的六聚物)之间的反应初速度的比值不受非有效部位的影响,这一点从竞争性底物的理论上也可推导出

来^[15]。

3 非专一性水解酶

许多非专一性酶如蛋白酶、脂肪酶和其他糖酶对壳聚糖也有水解作用,但并非以其为天然底物,有些酶的水解效果甚至比甲壳素酶、壳聚糖酶和溶菌酶的水解更加有效。由于文献报道中所用的商业酶制剂大都未经过进一步纯化,因此有人认为其中所含的少量酶杂质可能是产生降解活力的原因。但也有人认为,在所有的酶制剂中都存在同一种杂质似乎是不可能的,因为首先这些酶来源于广泛的微生物、真菌、哺乳动物和植物等;其次在所实验的酶制剂中,有大约 1/4 的酶未观察到或仅有微小的水解活力,其中有一些还是来源于微生物,而这些微生物本应具有壳聚糖溶解活力的。此外,Muzzarelli 在采用重组脂酶进行的实验中发现,重组脂酶对于壳聚糖也有一定的解聚作用,他认为这就明确地排除了酶制剂中不明‘杂质’起作用的可能性^[3]。

酶降解碳水化合物的多样性是一种普遍现象,已经发现一些酶有着不同的底物和产物专一性。研究人员目前主要致力于阐明这些非专一性水解酶水解甲壳素或壳聚糖的可能机理,同时还需判定这些水解活力是否是由一个真正的壳聚糖酶催化,还是由一个具有广泛专一性的如纤维素酶等催化。

Manssur 研究发现,在酶与底物比率较低时,菠萝蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、脂酶制剂比商业甲壳素酶和溶菌酶制剂更有效的催化壳聚糖的水解。但是,虽然同样是纤维素酶,由于酶的来源不同,并不是所有的纤维素酶都有降低底物粘度的作用,其中有些就没有或只有轻微的水解作用^[16]。

不同质量分数的壳聚糖溶液(0.5%、1.0%和2.0%)与不同的酶制剂如纤维素酶 TV、半纤维素酶、脂酶 AIE 以及木瓜蛋白酶反应,除木瓜蛋白酶明显地不受底物浓度的影响外,其它的酶制剂活力随着底物浓度的增加都有不同程度的降低。这种专一性活力随着底物浓度的增加而降低的原因并不十分清楚,可能是由于溶液的高粘度使酶失活以及底物或水解产物对酶的抑制。而 Price 和 Storck 曾报道了当壳聚糖质量浓度超过 0.5 mg/mL 时,对来自 *Streptomyces sp.* No.6 菌株的一种甲壳素酶有反应抑制作用^[17];Fenton 和 Eveleigh 报道了甲壳素酶(来源于 *Penicillium islandicum*)会被某些产生

的甲壳低聚糖失活^[18]。为了研究潜在的协同或补充水解作用,研究人员将溶菌酶与其它的甲壳素酶、半纤维素酶或脂酶 AIE 复合使用,发现当溶菌酶与半纤维素酶或脂酶一起使用时,协同或补充水解的效果是显著的,最终的粘度值比这些酶制剂中任何一种单独使用时都要低。这些结果,似乎可以说明反应中所涉及的溶解原则的不同作用模式。

壳聚糖底物的 N-乙酰化度对酶活力也有影响。通常,底物的 N-乙酰化度越高,酶的专一性活力也越高。但是,脂酶可水解 30% 乙酰度的壳聚糖,不水解甲壳素。完全 N-脱乙酰的壳聚糖不能作为这些酶制剂的底物。

Muzzarelli 等人研究木瓜蛋白酶降解壳聚糖时发现,聚合度最高的壳聚糖部分被优先降解,木瓜蛋白酶主要作用于氨基葡萄糖与 N-乙酰氨基葡萄糖之间的糖苷键^[19]。他同时对麦胚脂肪酶的非专一性活力也进行了研究,实验表明,脂肪酶质量浓度在 $4.5 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-1}$ g/L 范围内,解聚初速度与酶浓度呈对数线性关系。从酶解初速度与底物浓度的关系图上可看出,这种酶解反应不遵循普通的酶动力学模型。N-羧甲基壳聚糖比壳聚糖更易被脂肪酶解聚,酶解反应不改变乙酰化度^[20]。脂酶是作用于水-有机界面间不溶性底物的酯酶,如果壳聚糖是人体脂酶的一个底物,那么在膳食中加入相对大量的壳聚糖可以部分阻止脂酶水解脂肪。许多报道表明,在制备甲壳低聚糖时,脂酶比溶菌酶和商业甲壳素酶(*Serratia marcescens*)更有效。

上述研究结果表明:这类酶并不存在共同的水解原则,这些酶制剂的最适 pH 值、最适温度、专一性壳聚糖底物浓度、N-乙酰取代度以及它们的相对分子质量都有不同。

4 结 语

在甲壳素和壳聚糖的直链分子结构中,存在 4 种类型的糖苷键:GlcNAc-GlcNAc, GlcN-GlcN, GlcNAc-GlcN 和 GlcN-GlcNAc。在这类酶催化水解反应中,虽然对甲壳素酶、壳聚糖酶和溶菌酶的水解作用研究取得了很大的进展,但由于这些酶来源的多样性,使得水解反应更加复杂。另外,对非专一性酶水解壳聚糖这类酶的作用机理仍不清楚,有必要进一步深入研究酶水解甲壳素和壳聚糖的特性、规律及作用机理。相信随着甲壳素酶学研究的进展,甲壳素和壳聚糖的应用范围将更加广泛。

参考文献：

- [1] 夏文水. 酶法改性壳聚糖的研究进展[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(5): 550 - 554.
- [2] PANTALEONE D, YALPANI M, SCOLLAR M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1992, 237: 325 - 332.
- [3] MUZZARELLI R A A, TERBOJEVICH M, CASANI A. Unspecific activities of lipases and amylases on chitosans[J]. *Chitin Enzymology*, 1996 (2): 69-81.
- [4] MASARU, MITSUHIRO, MOTOO. Action patterns of microbial chitinases and chitosanase on partially N-acetylated chitosan [J]. *Chitin Enzymology*, 1996 (2): 273 - 284.
- [5] AIBA S. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 265(2): 323 - 328.
- [6] HANS DIEKMANN, ROLAND BREVES. Multiplicity of chitinases and substrate specificity[J]. *Chitin Enzymology*, 1993, 1: 295 - 298.
- [7] HARA S, YAMAMURA Y, FUJII Y. Purification and characterization of chitinase produced by streptomyces erythraeus[J]. *J Biochem*, 1989, 105: 484 - 489.
- [8] MITSUTOMI M, HATA T, KUWAHARA T. Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT 6037 [J]. *J Ferment Bioeng*, 1995, 80(2): 153 - 158.
- [9] ISUME M, NAGAE S, KAWAGISHI H. Action pattern of *Bacillus sp.* No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan Biosc [J]. *Biotech Biochem*, 1992, 56(3): 448 - 453.
- [10] FUKAMIZO T, OHKAWA T, IKEDA Y. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 125(5): 183 - 188.
- [11] FUKAMIZO T, HONDA Y. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces sp.* N174 [J]. *Biochem J*, 1995, 311(2): 377 - 383.
- [12] HUTADILOK N, MOCHIMASU T, HISAMORI H. Kinetics on the Hydrolysis of partially N-acetylated derivatives of chitosan by chitosanase from *Bacillus Pumilus*[J]. *Chitin Enzymology*, 1993, 1: 289 - 294.
- [13] RAGNHILD J, NORDTVEIT. Degradation of partially N-chitosans with hen egg white and human lysozym[J]. *Carbohydr Poly*, 1994, 23: 253 - 260.
- [14] KURITA K, KAJI Y, MORI T. Enzymatic degradation of β -chitin : susceptibility and the influence of deacetylation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 42: 19 - 21.
- [15] RAGNHILD J, NORDTVEIT. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozym[J]. *Carbohydr Poly*, 1994, 23: 253 - 260.
- [16] MANSSUR YALPANI, DAVID PANTALEVNE. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic Hydrolysis[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 256: 159 - 175.
- [17] PRICE J S, STORCK R. Production, purification and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces* [J]. *J Bacteriol*, 1975, 124: 1574 - 1585.
- [18] FENTON D M, EVELEIGH D E. Purification and model of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*[J]. *J Gen Microbio*, 1981, 126: 151 - 165.
- [19] TERBOJEVICH M, COSANI A, MUZZARELLI R. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain [J]. *Carbohydr poly*, 1996, 29(1): 63 - 68.
- [20] MUZZARELLI R, XIA WENSHUI. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation[J]. *Enzyme Microbial Tech*, 1995, 17: 541 - 545.

(责任编辑 朱 明)