

植酸酶的分子生物学与基因工程

姚 斌¹ 范云六²

(¹ 中国农业科学院饲料研究所和² 生物技术研究中心 北京 100081)

摘 要 植酸酶是一种新型的、可作为动物饲料添加剂的重要酶制剂,它对提高饲料中磷的利用率,提高动物的生产性能,以及减轻因动物高磷粪便所导致的环境水域的磷污染有着重要意义。本文综述了植酸酶的分子生物学及基因工程研究的最新进展,讨论了其进一步的研究发展方向。

关键词 植酸酶,分子生物学,基因工程

中图分类号 Q943 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)01-0001-05

植酸酶是一种能水解植酸的磷酸酶类。它能将植酸磷(六磷酸肌醇)降解为肌醇和无机磷酸。此酶分为两类:3-植酸酶(EC.3.1.3.8)和6-植酸酶(EC.3.1.2.6)。植酸酶广泛存在于植物、动物和微生物中,如玉米、小麦等高等植物,枯草芽孢杆菌、假单胞杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌等原核微生物及酵母、根霉、曲霉等真核微生物中。

在谷物、豆类和油料等作物籽实中,磷的基本贮存形式是植酸磷^[1],其含量高达1%~3%,它占植物中总磷的60%~80%。但是以植酸磷形式存在的磷却因单胃动物体内缺乏能分解植酸的酶而难以被利用,其利用率仅在0%~40%,从而造成了许多问题:首先是造成磷源浪费^[2],一方面饲料中的磷源不能得到有效利用,另一方面为了满足动物对磷的需求,又必须在饲料中添加无机磷,提高了饲料成本;其次是形成高磷粪便污染环境^[2]。饲料中85%左右的植酸磷会被动物直接排出体外,粪便中大量的植酸磷使水和土壤受到严重污染。另外,植酸磷还是一种抗营养因子,它在动物胃肠道的消化吸收过程中会与多种金属离子如Zn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺等以及蛋白质整合成相应的不溶性复合物,降低了动物对这些营养物质的有效利用^[3]。

植酸酶可作为一种单胃动物的饲料添加剂,它的饲喂效果已在世界范围内得到了确证^[4]。它可使植物性饲料中磷的利用率提高60%,粪便中磷排泄量减少40%,同时还可降低植酸的抗营养作用。因此在饲料中添加植酸酶对提高畜禽业生产效益及降低植酸磷对环境的污染有重要意义。但是植酸酶到目前为止并没有在饲料中得到广泛的推广应用,主要原因在于:1. 植酸酶在天然材料中的含量太低,难以大量生产,生产成本昂贵;2. 植酸酶的抗逆性,尤其是热稳定性不能完全满足饲料及饲料加工的要求。随着基因工程技术的发展,为这些问题的解决提供了一条有效的途径,植酸酶的基因工程研究已成为世界性的研究热点。

1 植酸酶的分子生物学

早在1907年Suzuki等^[5]就在谷糠中发现了具有植酸酶活性的磷酸酶,接下来的较长的一个时期中,研究都集中在植物和动物器官中的植酸酶,第一个纯化的植酸酶来源于麸皮,研究发现它虽然具有植酸酶活性,但植酸并不是它的特异性底物。来源于植物的植酸酶均属于6-植酸酶,最适pH范围在5.0~7.5,不适合在单胃畜禽酸性的胃中起作用,而且在植物中含量极低,因而从应用的角度出发,60年代末植酸酶的研究转向最适pH值为酸性、酶含量较高的微生物来源的植酸酶。

1.1 微生物来源的植酸酶的酶学性质

许多微生物都能产生植酸酶,尤其在曲霉属中。1968年Shieh等^[6]发现所用的22株黑曲霉菌中有21株能产生植酸酶。第一个被分离纯化的植酸酶来源于*Aspergillus terreus* No.9A-1^[7],它的最适pH值为4.5,最适酶反应温度为70℃,此酶在pH1.2~9.0均能稳定维持其活性。从此以后,陆续从十几种微生物中分离到植酸酶,如枯草芽孢杆菌^[8]、假单胞杆菌^[9]、乳酸杆菌^[10]、大肠杆菌^[11]、酵母^[12]、曲霉^[7]、隔孢伏革菌^[13]等,并对酶的生理生化性质进行了较深入的研究。其中来源于*A. ficuum* NRRL3135(*A. niger* var. *awamori*)的植酸酶PHYA具有较好的耐热性,在酸性条件下有较高的酶活性,被认为是目前最具有应用前景的饲用植酸酶,其酶学性质研究也较为深入^[14]。

来源于*A. ficuum* NRRL3135(*A. niger* var. *awamori*)的植酸酶PHYA属于3-植酸酶,是一种糖基化蛋白,糖基化含量为27.3%,糖链中富含甘露糖,表观分子量约为85kD。它的最适pH值为2.5和5.5,最适温度为55℃,在37℃、pH2.5的条件下,以植酸钠为底物的K_m值为50mmol, Ca²⁺、Fe²⁺对酶活性无影响,Mn²⁺、Co²⁺有激活作用,能使

酶活性分别提高 30% 和 13%。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{+} 对酶活性有抑制作用,其中前两种为非竞争性抑制,后两种为竞争性抑制。另外,对一些来源于动物、植物的酸性磷酸酶有抑制作用的抑制剂如 $\text{L}(+)$ -酒石酸、磷霉素(Phosphomycin)对它却没有抑制作用。它对植酸钠有很高的底物特异性,酶的特异比活性为 10^5 u/mg 酶蛋白,是目前发现的比活性最高的植酸酶之一,它降解植酸磷形成的终产物是单磷酸肌醇和无机正磷酸。

来源于 *A. niger* 963 的植酸酶 PHYA^[15] 的酶学性质与来源于 *A. ficuum* NRRL3135(*A. niger* var. *arwamori*) 的植酸酶 PHYA 基本相似,仅在最适 pH 上有所差异,前者最适 pH 值为 1.8 和 5.7。来源于 *E. coli* 的植酸酶^[11] 的分子量为 42kD,最适 pH 值为 3.5,特异性活性为 750 u/mg 。来源于 *Bacillus subtilis* 的植酸酶^[16] 的分子量为 43kD,最适 pH 值为 7.0。目前发现的绝大部分微生物来源的植酸酶分解植酸盐形成的终产物均是单磷酸肌醇和无机正磷酸,但 1998 年 Mochizuki 等^[17] 从 *Schwanniomyces occidentalis* 中分离出的植酸酶可将植酸盐分解为肌醇和无机磷酸。另外一类微生物来源的酸性磷酸酶虽然最适底物不是植酸盐,但也具有部分植酸酶的活性,如来源于 *A. niger* 的最适 pH 2.5^[18] 的酸性磷酸酶,来源于 *E. coli* 的最适 pH 2.5 的磷酸酶^[11] 来源于 *Saccharomyces cerevisiae* 的酸性磷酸酶 PH03 和 PH05 等^[12]。

1.2 植酸酶基因

到目前为止,共有十余个植酸酶编码基因得到了分离克隆(表 1)。几乎所有分离到的植酸酶基因都申请了专利。最先分离出的植酸酶基因是 *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 的 *phyA* 基因。来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 结构基因全长 1506bp,其中 +46 ~ +147 的 102bp 的核苷酸序列是一典型的真菌内含子序列,其上有真菌内含子的特征保守序列:Donor 序列—GTATGC、Lariat 序列—GCTGAC 及 Acceptor 序列—CAG。它的基因编码 467 个氨基酸,根据信号肽序列的结构规则推断,N 端的 19 个氨基酸为信号肽,信号肽的切割位点在 +19 位的 Gly 之后。来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的植酸酶是一种糖基化蛋白,在 *phyA* 编码的氨基酸序列上,发现了 10 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr,X 为任意氨基酸)。从氨基酸推断出的理论分子量约为 51.4kD,糖基化后的表现分子量在 85kD 左右。氨基酸序列上存在组氨酸酸性磷酸酶的活性位点保守序列(Active-site sequence)^[19]:CQVTFAQVL-SRHGARYPTDSK GK,它位于氨基酸序列的 +52 ~ +74,可归为组氨酸酸性磷酸酶这一家族。*Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 基因中 G+C 含量达到 68.3%,这是丝状真菌中高表达蛋白编码序列所具有的特征之一。

来源于丝状真菌,尤其是曲霉的 *phyA* 基因无论在核苷酸来源、编码的氨基酸序列等基因结构上,还是在基因产物的酶学特征上均有较高的相似性,例如它们的编码基因长度相当,核苷酸同源性较高,编码的氨基酸个数都在 460 ~ 480

之间,氨基酸序列上也有较高同源性,均具有活性位点保守序列 RHGxRxP,在氨基酸序列上有数量不等的潜在糖基化位点,翻译后的蛋白都需进行糖基化修饰后才具有正常的生物学活性。

phyB 基因与 *phyA* 相比,虽然也属于组氨酸酸性磷酸酶家族,有活性位点保守序列 RHGxRxP,但核苷酸序列及编码的氨基酸序列同源性较低,实际上它的最适底物不是植酸盐,它仅是具有植酸酶活性的酸性磷酸酶。来源于细菌的植酸酶是另一类植酸酶,它的编码基因较短,编码蛋白的分子量也较小,它的核苷酸序列及编码的氨基酸序列与 *phyA* 和 *phyB* 及已报道的磷酸酶基因没有同源性,它也没有普遍存在于 *phyA* 和 *phyB* 编码蛋白上的活性位点保守序列 RHGxRxP,这说明它不属于组氨酸酸性磷酸酶家族。对这一类植酸酶研究仅在近年来才开始涉及,1998 年 Kerovuo 等^[16] 首次从 *Bacillus subtilis* 中分离出其完整的编码基因。来源于 *Bacillus subtilis* 的植酸酶基因 *phyC* 全长 1152,编码 383 个氨基酸,其中 N 端的 26 个氨基酸是信号肽序列。生物学活性依赖于钙离子的存在。

目前唯一报道的植物来源的植酸酶基因是 Mogensset 等^[20] 于 1998 年从萌发的玉米种子中分离的,成熟酶由两个相同的亚基组成,亚基的结构基因(cDNA)全长 1167bp,编码 387 个氨基酸,理论分子量为 41kD。它与微生物来源的植酸酶没有氨基酸序列同源性,但存在一个包含活性位点保守序列 RHGxRxP 的 33 个氨基酸的同源区,与来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 和 *phyB* 相比,这一段氨基酸序列的同源性分别达到 48% 和 51%。丝状真菌来源的 *phyA* 基因编码的植酸酶,其 RHGxRxP 序列一般位于 N 端,如 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 中它的位置在 +81 ~ +87,而玉米植酸酶中,RHGxRxP 序列位置较靠后,在 +204 ~ +210 的区域上。

1.3 植酸酶的高级结构

对植酸酶的高级结构研究较多的是来源于 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 编码的植酸酶 PHYA, Kostrewa 等^[28] 利用 X-衍射分析了它的晶体结构。PHYA 的高级结构中有 5 对二硫键:Cys8-Cys17、Cys48-Cys391、Cys192-Cys442、Cys241-Cys295、Cys413-Cys421,用盐酸胍变性处理后,植酸酶活性丧失,说明二硫键在植酸酶的折叠上扮演着重要的作用^[29]。

PHYA 的晶体结构可分为两部分:一个大的 $\alpha\beta$ 结构域和一个较小的 α 结构域。 $\alpha\beta$ 结构域的中心是一个由 6 片组成的 β 折叠片。结构中共有 14 个 α 螺旋,对应的氨基酸序列的位置分别为:+58-+82;+88-+95;+107-+123;+141-+159;+193-+197;+200-+210;+213-+223;+231-+246;+257-+261;+264-+281;+290-+305;+334-+345;+423-+429;+439-+443。 β 折叠片中的 6 个片相对应的氨基酸序列的位置分别为:+48-+82;+134-+138;+173-+177;+332-+337;+383-+391;+398-+403。在两个结构域的内表面有一很深的凹套,凹套中有酶催化活性的

表 1 已分离克隆到的植酸酶基因

Table 1 The phytase genes isolated from microorganism

来源	编码基因	ORF 长度/ (bp)	氨基酸 /个数	理论分子 量/D	最适 pH	最适温度 /°C	RHGx Rxp	氨基酸序列 同源性*/%	参考文献
<i>Aspergillus niger</i> (ficuum) NRRL3135 ,ALK0243	<i>phyA</i>	1506	467	51075	2.5 5.5	55	有	—	[18 21 22]
<i>A. niger</i> 963	<i>phyA</i>	1506	467	51142	1.8 5.7	57	有	92	[15]
<i>Aspergillus terreus</i> 9A-1	<i>phyA</i>	1449	467	51411	5.5	70	有	60	[23]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>phyA</i>	1455	465	60321	5.5—6.5	70	有	66	[24]
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>phyA</i>	1521	487	52537	5.5 6.0	NR	有	48	[25]
<i>Talaromyces thermophilus</i>	<i>phyA</i>	1521	466	51450	NR	NR	有	61	[26]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>phyA</i>	1481	474	51920	6.0	75	有	48	[27]
<i>Emericella nidulans</i>	<i>phyA</i>	1446	463	51785	NR	NR	有	63	[26]
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>phyA</i>	1283	461	51560	2.7 5.0	70	有	18	[17]
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>phyC</i>	1152	383	41802	7.5	50	无	6	[16]
<i>Aspergillus niger</i> (ficuum) NRRL3135 ,ALK0243	<i>phyB</i>	1616	479	52611	2.5	55	有	20	[18]
玉米 <i>Zea mays</i>	<i>PHYS11</i>	1167	388	41662	4.8	55	有	5	[20]

* 与来源于 *Aspergillus niger* (ficuum) NRRL3135 ,ALK0234 的 *phyA* 编码的植酸酶相比 NR 未报道

必需氨基酸——Arg58 和 His59 ,它们是植酸酶活性位点保守序列 RHGxRxp 中的前两个氨基酸 ,在以前的研究中利用化学修饰的方法就已证实 RHGxRxp 序列中的 Arg58 直接涉及其酶活性^[30] ,Arg58 在其晶体结构中的位置也与它的作用相吻合。PHYA 的晶体结构与鼠的低分子量酸性磷酸酶的晶体结构有很高的结构相似性^[28] ,说明它属于组氨酸酸性磷酸酶家族。

2 植酸酶的基因工程

植酸酶的基因工程主要是要解决两个问题 ,一个是植酸酶在天然材料中表达水平太低 ,这造成植酸酶难以大量生产及生产成本过高的问题 ,通过基因工程技术利用生物反应器则有望成百上千倍地提高它的表达量。另一个问题是天然植酸酶的一些性质不能完全适合饲料加工业和饲料养殖业的要求 ,如抗逆性、在动物体内的有效性等 ,特别是植酸酶的热稳定性 ,利用基因工程的手段在分子水平上对基因进行遗传操作 ,则有望使这些性质得到改善。

2.1 在微生物中高效表达植酸酶基因

目前 ,植酸酶基因表达的研究主要集中在来源于曲霉的植酸酶基因 *phyA* 和 *phyB* 上。1993 年 Piddington 等^[18] 将产植酸酶的 *A. niger* Var. *Awamori* ALK0243 通过紫外诱变获得植酸酶表达量较高的突变株 *A. niger* ALK02268 (*phyA* 植酸酶的分泌量为 45u/mL 发酵液) ,以它为受体 ,将同样来源于 *A. niger* var. *Awamori* ALK0243 的植酸酶基因 *phyA* 和 *phyB* 分别导入其中 ,阳性克隆子中 *phyA* 的表达量达到 329u/mL ,比受体菌提高了 7.3 倍 ,*phyB* 的表达量提

高了 59 倍。同年 ,Van Hartingsveldt 等^[21] 将来源于 *A. ficuum* NRRL3135 的 *phyA* 基因导入原菌株 ,使 *phyA* 基因的拷贝数增加到 15 个以上 ,从而使植酸酶的表达量提高到 7600u/mL。Moore E. 等^[22] 在 *A. oryzae* 中表达来源于酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的植酸酶基因和来源于 *A. niger* 762 的 *phyB* 基因 ,其结果也是使表达量分别提高到 840u/mL 和 750u/mL。从总体上看 ,以上的这些表达研究获得的表达水平还较低 ,但却证实了利用基因工程手段来提高植酸酶的表达、生产这一途径的有效性。

Van Gorcomd 等^[31] 将植酸酶基因 *phyA* 置于来源于 *A. niger* 的淀粉葡萄糖苷酶(AG)启动子之下 ,信号肽序列用 AG 信号肽的 18 个氨基酸序列等、AG 信号肽的 24 个氨基酸序列及植酸酶原来的信号肽序列 3 种构建 ,植酸酶基因重组到 *A. niger* 基因组中获得阳性克隆子 ,在这 3 种构建中其植酸酶在重组菌株中的表达量分别达到了 1.1 0.5 2.8 × 10⁵u/mL ,与天然植酸酶产生菌株仅有不到 100u/mL 相比有了大幅度的提高 ,目前 ,这一菌株已用来工业化生产植酸酶。

1998 年我国采用异源受体——毕赤酵母(*Pichia pastoris*) 作为生物反应器高效表达了来源于 *A. niger* 963 的植酸酶基因 *phyA*^[32]。为了能在毕赤酵母中高水平表达 ,首先对其结构基因进行了改造 ,去掉原 *phyA* 基因中的内含子和信号肽编码序列 ,在不改变所编码氨基酸的情况下定点突变优化了对此基因在酵母中高效表达起关键作用的 Arg 密码子。改造后的植酸酶基因与来源于酿酒酵母的 α -因子信号肽编码序列 3 端以正确的阅读框架融合 ,启动子采用诱型高效 α -因子启动子(酒精氧化酶启动子) ,电击转化后将植酸酶

基因整合到毕赤酵母基因组中,重组酵母中表达的植酸酶能分泌到培养基中,与天然植酸酶在酶学性质上没有差异,具有正常的生物学活性。Arg 密码子经优化改造后,其植酸酶表达量比未经优化的高约 37 倍。重组酵母经高密度发酵后,植酸酶的表达量达到 5×10^5 u/mL 以上,比原植酸酶产生菌 *A. niger* 963 的表达量高约 3000 倍。

2.2 植酸酶的植物基因工程

植酸酶作用的底物—植酸磷是存在于植物性饲料中的,如玉米、大豆等种子,如果在它们种子中本身就含有足量的植酸酶,在饲喂过程中在动物的肠道中释放出来降解饲料中植酸磷,这样就省去了植酸酶添加剂的生产及在饲料中的添加,一举两得,这无疑是植酸酶应用的最佳方法。90 年代科学家们开始尝试这一方面的研究,并取得了阶段性的进展。

首先是从对模式植物烟草的研究开始的,Jan Pen 等^[33]将来源于 *A. niger* 的植酸酶基因 *phyA* 转移到植物烟草中,用 35S 启动子控制 *phyA*,并用烟草的 PR-5 蛋白的信号肽序列取代 *phyA* 上原有的信号肽序列,结果发现,在烟草种子中检测到了植酸酶活性,其表达积累量可达到种子中可溶性蛋白的 1%,表达的植酸酶能够进行糖基化,其分子量约为 67kD,脱糖基化处理后分子量降低到 60kD。烟草中表达的植酸酶的分子量比天然植酸酶 85kD 的分子量小,其原因可能与植酸酶的糖基化上差异有关。动物饲喂试验表明,其饲喂效果与在饲料中直接添加等量的植酸酶相当。另外,储藏在种子中的植酸酶有很好的稳定性,在种子磨成粉的加工过程中及在室温下储存一年后植酸酶活性不丧失。Verwoerd 等^[34]也做了类似的工作,由于是利用非组织特异性启动子组成型表达植酸酶,所以在转基因烟草中检测到了植酸酶,其中在叶子中植酸酶的表达量最高,达到可溶性蛋白的 14.4%。另外,植酸酶在烟草中表达,似乎并不影响烟草的形态、生长、及种子的萌发。Van Ooi jen 等^[35]利用特异性 cruciferin 启动子(来源于油菜 12S 储藏蛋白 cruciferin 基因)在烟草种子中特异性表达植酸酶,表达量达到种子中可溶性蛋白的 0.15%,而在转基因茎、根中未检测到植酸酶的表达。

以上仅是在模式植物烟草上进行的一些初步研究,但却证明了这一思路的可行性,首先,植酸酶基因可在植物中高表达,也可在种子中特异性表达;第二,植酸酶基因的表达对植物生长、形态及种子萌发没有显著影响。第三,在种子中的植酸酶具有很好的稳定性。这些结果为进一步将植酸酶基因转化到真正的饲料作物玉米、大豆中,培养出种子富含植酸酶的大豆、玉米提供了依据和可行性。目前,许多研究机构都在尝试此项工作,预计将在近期内取得较大进展。

2.3 植酸酶的热稳定性

目前,通过基因工程微生物发酵来大规模廉价生产饲料用植酸酶酶制剂使这一问题已基本得到解决,但植酸酶制剂应用上的另一个关键性问题始终没有得到解决,即酶的热稳定性。加工饲料都需经过一个制粒工艺,在制粒过程中有一个短暂的高温过程,温度一般在 $75 \sim 93^\circ\text{C}$,一般的植酸酶活性在此高温下大幅度地不可逆丧失。所以能在饲料中

真正得到推广利用的植酸酶必须是具有良好热稳定性的,但另一方面,饲料用酶又必须在常温下具有较高的酶活性,因为饲料用酶最终的作用场所又是动物正常体温(37°C 左右)的肠道中,这与工业上所使用的一些高温酶不同。从嗜温微生物 *Myceliophthora thermophila*、*Aspergillus terreus* 等^[23,25]中分离到的高温植酸酶其最适温度在 $70 \sim 80^\circ\text{C}$,虽然具有很好的耐温性,但它在 37°C 下的酶活性极低,在饲料中没有使用价值,而相反,来源于 *A. niger* 等的植酸酶在 37°C 下具有较高酶活性,但它又不能经受制粒时的高温。如何解决使其又耐短暂的制粒高温,又能在动物正常体温下具有高酶活性这一对矛盾是目前包括植酸酶在内的所有饲料用酶制剂均需解决的问题。在酶的耐热性方面已进行了许多富有成效的研究,一种较简单有效的方法就是对酶进行后加工处理,即研究酶的包被技术,使酶包裹在包衣中而免受制粒高温的破坏,包衣在动物胃中可被消化而释放出酶,目前一些商品化的植酸酶就是采用这种技术,但它的加工成本较高,如能通过基因工程、蛋白质技术等使植酸酶本身就具有良好的热稳定性无疑是很有意义的。

植酸酶的热稳定性研究目前还处于知识积累阶段,还未取得大的突破。近年来,已从嗜温微生物中发现多种高温植酸酶,对它们的结构与热稳定性的研究将为植酸酶的热稳定性改造提供信息^[24]。

3 我国开展植酸酶研究的重要意义

植酸酶是一种能将饲料中植酸磷水解成无机磷和肌醇的新型单胃动物饲料添加剂,现在是世界性的研究热点之一。主要应用于猪、鸡、鸭等单胃动物和水产养殖类动物,应用范围广、需求量大。它在欧洲使用较为广泛,在我国目前还没有商品化的植酸酶生产,但是,考虑到我国的国情,植酸酶在我国的推广使用有着极为重要的意义。第一,植酸酶的使用能减轻江河、水域等环境的磷污染。我国江河、水域的富营养化污染极为严重,如滇池的严重污染、近期发生的红潮等,造成污染的关键因子是水体中的氮和磷过量。我国每年从畜禽粪便中排出的磷就达 250 万 t 之多,是水体富营养化污染的罪魁祸首之一。形成高磷粪便的原因是饲料中的磷没有得到有效利用。植酸酶的使用将使畜禽粪便中磷的排出量减少 40%~75%,即我国每年磷的排放量减少约 180 万 t,将大大减轻江河、水域等环境的磷污染。第二,植酸酶的使用能缓解我国磷资源匮乏、磷供应不足的局面。我国是一个缺磷大国,磷的产量不足需求量的 1/10,是仅亚于蛋白质的第二大缺口饲料原料。植酸酶的使用可代替饲料原料中所添加的无机磷(磷酸氢钙),全国每年少用磷酸氢钙 80~120 万 t,从而可关停相应一批污染重的磷酸氢钙生产厂,这对我国这种严重缺磷的国家而言,有着更为重要的社会效益和生态效益。

利用基因工程手段可解决目前植酸酶生产成本过高、植酸酶性质不能满足动物营养及饲料加工的要求等问题,从而促进植酸酶的产业化生产与其在养殖业中的广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Graf E. *J Am Oil Chem Soc* ,1983 **60** :1861~1867
- [2] Nelson T S. *Poult Sci* ,1967 **46** :826~871
- [3] Sharma C B ,Goel M ,Irshad M. *Phytochemistry* ,1978 **17** :201~204
- [4] Nelson T S ,Shieh T R , Wodzinski R J *et al.* *Poult Sci* ,1968 **47** :1842~1848
- [5] Peers F G. *Biochem J* ,1953 **53** :102~107
- [6] Shieh T R ,Ware J H. *Applied Microbiol* ,1968 **16** (9) :1348~1351
- [7] Yamada K ,Minoda Y ,Yamamoto S. *Agri Biol Chem* ,1968 **32** (10) :1275~1282
- [8] Powar V K ,Jagannathan V. *J Bacteriol* ,1982 **151** (3) :1102~1108
- [9] Cosgrove D J. *Austral J Biol Sci* ,1970 **23** :1207~1220
- [10] Shirai K ,Revah-moiseev S ,Garcia-Garibay M *et al.* *Letters Appl Biol Sci* ,1994 **19** :366~369
- [11] Greiner R ,Konietzny U ,Jany K D. *Arch Biochem Biophys* ,1993 **303** (1) :107~113
- [12] Bajwa W ,Meyhack B ,Rudolph H *et al.* *Nucleic Acids Res* ,1984 **12** (20) :7721~7739
- [13] Lambrechts C ,Boze H ,Segueilha L *et al.* *Biotech lett* ,1993 **15** (4) :399~404
- [14] Ullah A H. *J Prep Biochem* ,1988 **18** (4) :459~471
- [15] 姚 斌 ,张春义 ,王建华等 . 农业生物技术学报 ,1998 **1** (1) :1~6
- [16] Kerovuo J ,Lauraeus M ,Nurminen P *et al.* *Appl Enviroment Microbiol* ,1998 **64** (6) :2079~2085
- [17] Mochizuki. U S patent 5840561 ,1998
- [18] Piddington C S ,Houston C S ,Paloheimo M *et al.* *Gene* ,1993 **133** :55
- [19] Kostrewa D ,Gruninger-Leitch F ,Arcy A D ' *et al.* *Nature Structrual Biology* ,1997 **4** (3) :185~190
- [20] Ullah A H J ,Dischinger H C Jr. *Biochem Biophys Res Comm* ,1993 **192** :754~759
- [21] Hartingsveldt M Van ,Van Zeijl C M J ,Harteveld G M *et al.* *Gene* ,1993 **127** :87~94
- [22] Ehrlich K C ,Helly V R ,Connelly O M *et al.* *J Ind Microbiol* ,1995 **14** :396~402
- [23] Loon ,Mitchell Van. EP Patent 0684313A2 ,1995
- [24] Pasamontes L ,Haiker M ,Wyss M *et al.* *Appl Environment Microbiol* ,1997 **63** (5) :1696~1700
- [25] Mitchell D B ,Vogel K ,Weimann B J *et al.* *Microbiology* ,1997 **143** :245~252
- [26] Pasamontes L ,Hailer M ,Henriquez-Huecas M *et al.* *Biochim Biophys Acta* ,1997 **1353** (3) :217~223
- [27] Berka R M ,Rey M W ,Byun T *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** (11) :4423~4427
- [28] Maugenest S ,Martinez I ,Lescure A. *Biochem J* ,1997 **322** :511~517
- [29] Ullah A H J ,Mullaney E J. *Biochem Biophys Res Comm* ,1997 **227** (2) :311~317
- [30] Ullah A H J ,Dischinger H C. *Ann N Y Acad Sci* ,1995 **750** :51~57
- [31] Van Gorcom R F M. US Patent 5436156 ,1995
- [32] BIN Y ,CHUNYI Z ,JIANHUA W *et al.* *Science in China* ,1998 **41** (3) :330~336
- [33] Pan Jan ,Verwoerd T C ,Paridon P A Van *et al.* *Bio/Technol* ,1993 **11** :811~814
- [34] Verwoerd T C ,Paridon P A Van ,Ooyen A J J Van *et al.* *Plant Physiol* ,1995 **109** :1199~1205
- [35] Ooyen A J J Van. U S Patent 5770413 ,1998

Molecular Biology and Gene Engineering of Phytase

YAO Bin¹ FAN Yun-liu²¹Feed Research Institute ²Biotechnology Research Center ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100081)

Abstract Phytase is a new-style enzyme used in monogastric animal feed. The addition of phytase to feed can increase phosphorus availability ,decrease environmental phosphorus pollution and improve the performance of animal. This paper reviews the research progress and trend in recent studies related to molecular biology and gene engineering of phytase.

Key words Phytase , molecular biology , gene engineering