

微生物几丁质酶的特性、基因表达调控及应用

李君¹ 曾中文¹ 欧阳石文^{2*}

(湖南永州职业技术学院 永州 425001)¹ (中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)²

摘要:许多微生物均能产生几丁质酶。鉴于几丁质酶广泛的用途,尤其在植保上的应用,研究者对微生物几丁质酶的研究愈来愈深入。在此就微生物几丁质酶的特性、分子生物学进展及其应用作综述。

关键词:微生物几丁质酶, 特性, 基因表达调控, 应用

中图分类号: Q556.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0084-04

在微生物中,许多细菌、放线菌、真菌、酵母及某些病毒能够产生几丁质酶。其中几乎包括了所有昆虫病原细菌和真菌。近年来已从多种微生物中分离和克隆了几丁质酶及其基因。本文欲对微生物几丁质酶的特性,分子生物学进展及其可能的用途进

* 通讯联系人

收稿日期: 2000-07-06, 修回日期: 2000-09-11

行综述。

1 微生物几丁质酶的性质

微生物几丁质酶可产生胞内和胞外几丁质酶。其中大部分微生物能产生胞外酶,是目前研究和应用较多的几丁质酶。微生物几丁质酶与其它来源的几丁质酶一样,也可分为外切几丁质酶和内切几丁质酶^[1]。绝大多数微生物产生的几丁质酶是属于内切酶,若要将几丁质彻底水解成为单体 N-乙酰氨基葡萄糖,还需要 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(又称几丁二糖酶)。

微生物几丁质酶最适 pH 一般在 3~11 之间,但大部分微生物的几丁质酶作用最适 pH 值在 4~6 之间,酶稳定 pH 范围一般在 4~11 之间。酶的等电点一般在 pH3.6~8.6 之间。酶作用的最适温度多在 50℃~60℃,温度过高,酶活力容易丧失。金属离子如 Ag^+ 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Co^{2+} 等对微生物几丁质酶活力都有不同程度的影响,有的离子能增强酶活性而有的却具抑制作用^[1]。微生物几丁质酶的分子量范围一般在 19kD 到 110kD 之间,不过也有大至 134.759kD (来自 *Pyrococcus kodakaraensis* 的胞外外切几丁质酶)^[2]。微生物几丁质酶对底物具有一定的专一性,一般都可水解粉状几丁质,胶状几丁质,可溶性几丁质衍生物如乙二醇几丁质和乙二醇几丁质及可溶性的几丁三糖,四糖,戊糖和六糖等几丁质寡糖。不能水解麦芽糖,淀粉和纤维素等由几丁二糖经糖苷键连接而成的糖类。有的微生物如棉花黄萎病菌,金龟子绿僵菌和粘质沙雷氏杆菌产生的几丁质酶还能水解脱乙酰几丁质^[1]。

2 微生物几丁质酶基因的表达调控

微生物几丁质酶基因的表达是受受体/诱导物系统所控制,一般以几丁质或其降解产物作为诱导物。如在 *Metarhizium anisopolae* 的培养基中附加几丁质可使其产生高水平的几丁质酶,但木质素和纤维素没有诱导作用^[3]。在 *Trichoderma harzianum* 的基因调控中,在培养基中加几丁质时可以发现高活性的几丁质酶,而纤维素、脱乙酰壳多糖不能增强 *T. harzianum* 几丁质酶活性,且还会阻遏几丁质酶的合成。*T. harzianum* IMI206040 中的 *ech42* 基因也受几丁质的诱导。Ulhoa 和 Peberdy^[4] 认为几丁质酶基因的诱导信号是与细胞表面不溶性底物的物理接触有关,若如此,产几丁质酶微生物的表面应当有几丁质的专化性受体,但至今尚未证实。他们研究表明几丁质酶的诱导也受 8-羟基喹啉和放线菌酮的抑制,由于它们分别是 RNA 抑制剂和蛋白质合成抑制剂,所以认为几丁质酶的诱导是从头合成的,即要经过转录翻译的过程。Vasseur 等^[5] 对 *Aphanocladium album* E3 进行了研究。它是几丁质酶超量产生的突变体,其几丁质酶基因受 N-乙酰氨基葡萄糖的诱导但受葡萄糖所抑制,而几丁质和其它寡聚体不增强几丁质酶的表达。*A. album* E3 和 *T. harzianum* 甚至在饥饿条件下都会存在本底组成型的几丁质酶,这些低水平几丁质酶可能已足够于降解几丁质以释放出可溶性寡聚物来诱导几丁质酶的合成。

葡萄糖能抑制几乎所有微生物产生几丁质酶,也说明微生物几丁质酶基因的调控可能涉及分解代谢物阻遏机制。在 *T. harzianum* CECT2431 中几丁质酶 (*chit33*) 基因的表达也受到葡萄糖强烈的抑制,但在饥饿条件下或含几丁质的真菌细胞壁存在时去

阻遏。*chit33*的 mRNA 在饥饿条件下强烈表达,但几丁质酶活性很低,表明存在着转录后调控。其可能的原因是饥饿条件下存在着高水平的蛋白裂解活性。*T. harzianum chit42*在饥饿条件只有微弱的去阻遏,虽受葡萄糖的抑制也受几丁质和含几丁质的细胞壁的诱导,并且丙酮酸对 *CHIT42*的 mRNA 也有较低诱导作用。但与 *chit33*基因不同,*chit42*的蛋白质和 mRNA 水平相一致的,表明 *chit42*基因表达中不存在转录后调控。这样看来 *chit42*和 *chit33*基因受几丁质的诱导和饥饿条件下的去阻遏的调控可能是相互独立的^[6]。

*Pseudoalteromonas sp.*的 S9 菌株的几丁质酶基因启动子可对饥饿和比周围存在更多的碳水化合物的诱导但不受 Ca^{2+} 、热激、冷激及紫外线的诱导^[7]。*Trichoderma atroviride*的几丁质酶 *CHIT423*的 *ech42*基因在长时间的碳饥饿后,不管用葡萄糖还是蔗糖作碳源都能显著激发其表达,说明在饥饿条件下碳水化合物的分解代谢物抑制不起作用,此外该基因还受生理胁迫、高渗透压和乙醇存在的诱导。在其启动子中发现了4个拷贝的应胁迫反应元件(CCCCT)。Ni等^[5]在研究 *Streptomyces*几丁质酶的启动子时,发现其中的顺向重复序列(350bp)既负责对葡萄糖的抑制反应也负责对几丁质诱导的反应,并且发现起始密码子上游的-10, -12, -32, -33, -35, -37中的一个发生突变就会使启动子失效。

3 微生物几丁质酶基因的克隆现状

目前已从多种微生物中克隆了几丁质酶基因^[3,8],包括放线菌(*Streptomyces plicatus*, *S. lividans*)、细菌(*Aeromonas hydrophilia*, *Bacillus licheniformis*, *B. curculans*, *B. pakistani*, *Enterobacter agglomerans*, *Janthinobacterium lividum*, *Pyrococcus kodakaraensis*, *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *Vibrio vulnificus*, *Xanthomonas spp.*)、真菌(*Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Clostridium paraputrificum*, *Metarhizium anisopliae*, *Rhizopus oligosporus*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *Aphanodadium album*)及病毒(PBCV-1, CpGV, HaSNPV)。其中以 *Serratia marcescens*和 *Trichoderma harzianum*中克隆的几丁质酶基因研究最多。

4 微生物几丁质酶的应用

(1) 几丁质酶可以分解许多含几丁质的生物的细胞壁,可用于产生真菌原生质体。如来自 *Streptomyces*的几丁质酶可用于产生 *Aspergillus oryzae*和 *Fusarium solani*的原生质; *Bacillus circulans* WL-12的几丁质酶可以很好的用于获得 *Phaffia rhodozyme*的原生质;而 *Trichoderma harzianum*几丁质酶可用于许多真菌原生质的释放^[9]。此外,产几丁质酶微生物可用于对有壳水生动物废物的生物转换,因而在环境保护中起作用,并且可以从中获得有用的物质^[3]。

(2) 产几丁质酶微生物可以用于农作物病原真菌的生物防治中。这方面已有很多报道。在微生物中 *Trichoderma harzianum*几丁质酶研究最多,它对许多病原物尤其土壤真菌的抗性非常好。*Aeromonas caviae*棉花上的 *Rhizoctonia solani*和 *Fusarium oxysporum*及菜豆上的 *Sclerotium rolfii*的生防作用与几丁质酶密切相关。此外,有些微生物几丁质酶对昆虫也有防治效果,尤其是能增强 BT、核型多角体病毒 NPV 的防治效果,这样

也有利于克服或延缓昆虫对BT等的抗性^[1]。为了获得大量产生几丁质酶的菌株,人们已通过突变或几丁质酶基因导入来改造微生物以提高产几丁质酶的菌株。

(3) 基于几丁质酶的特性,几丁质酶基因可以应用于基因工程中^[10]。已有许多微生物几丁质酶基因导入植物以提高其抗病虫能力或导入生防菌中以提高其生防效果。Lorito等^[11]首次报道了将真菌寄生物 *Trichoderma* 的几丁质酶基因导入烟草,使之对好几种病原真菌均具有抗性。另外有报道转几丁质酶基因增强了作物对昆虫的抗性,其中认为以昆虫及昆虫病原菌来源的几丁质酶基因效果较好。转基因苹果中表达 *Trichoderma harzianum* 的内切几丁质酶而增强了对苹果疮痂病的抗性^[12]。用微生物来源的几丁质酶基因转化的作物有烟草、马铃薯、水稻、creeping bentgrass、苹果等,转基因植物对某些病害的抗性增强。另外也可将微生物几丁质酶基因置于组成性启动子之下,导入生防菌如 *Pseudomonas* sp.、*Trichoderma* sp.、*Rhizobium meliloti* 中,使生防菌过量表达产生几丁质酶,因而提高对相应病原菌的生防作用。如 *ChiA* 导入并表达于 *Pseudomonas* 中,使其抑制植物病原真菌的能力增强。或者将几丁质酶基因导入到 *Bacillus* 中来提高其抗虫性。由此看来从真菌的重寄生菌和昆虫病原菌中克隆抗病虫基因也是很好的思路。

5 展望与讨论

目前对微生物几丁质酶基因的研究主要是关于它的表达调控方面。结果认为几丁质酶基因的表达是以几丁质为诱导物的抑制/诱导物系统所控制的。在有的生物中,葡萄糖能抑制几丁质酶的合成。随着越来越多的几丁质酶基因被克隆,目前几丁质酶在植保上的应用越来越多,几丁质酶基因抗真菌基因工程是当前的热点之一。不过仍有必要加强几丁质酶基因在抗病虫基因工程中的应用范围和实用性,尤其在抗真菌病基因工程中,这要求对基因及其酶的结构与功能关系、几丁质酶的抑菌谱等方面的问题作进一步研究。

参考文献

- [1] 邱立友. 河南农业大学学报, 1995, 29 (2): 184-191.
- [2] Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (12): 5338-5344.
- [3] Felse P A, Panda T. Appl. Microbio. Biotechnol., 1999, 51: 141-151.
- [4] Ulhoa C J, Peberdy J F. J. Gen. Microbiol., 1991, 137: 2163-2169.
- [5] Ni X Y, Westpheling J. Pro. Natl. Acad. Sci. USA., 1997, 94 (24): 13116-13121.
- [6] Limon M C, Lora J M, Irene G, et al. Curr. Genet., 1995, 28: 478-483.
- [7] Techkarnjanarak S, Pongpattanakitshote S, Goodman A E. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63 (8): 2989-2996.
- [8] Patil R S, Gbormade V, Deshpande M V. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26: 473-483.
- [9] Anjani kumari J, Panda T. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 241-248.
- [10] 陈三凤, 李季伦. 微生物学通报, 1993, 29 (3): 156-160.
- [11] Matteo L, Sheridan L W, Irene G F, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998, 95: 7860-7865.
- [12] Garcia I, Cubero B, Lorito M, et al. Phytopathology, 1997, 87 (6): S32.