

几丁质酶研究历史和发展前景

陈三凤 李季伦

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

几丁质 (Chitin) 又称甲壳素或甲壳质, 是广泛分布于自然界的生物多聚物, 自然界每年生成的几丁质约有一百亿吨, 在天然聚合物中几丁质的贮量占第二位, 仅次于纤维素。几丁质是构成大多数真菌细胞壁的主要成份, 同时也大量存在于昆虫和动物的甲壳中^[1,2]。几丁质在几丁质酶系作用下分解成几丁质单糖——N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG)。几丁质酶系包括几丁质酶和几丁质二酶, 前者把几丁质分解成几丁质寡糖或几丁质二糖, 后者把几丁质分解成几丁质单糖。已经发现很多动物、植物及微生物都可以产生几丁质酶, 在离体情况下, 已分别将细菌及植物几丁质酶基因转移到烟草、番茄、大豆、马铃薯、莴苣和甜菜等植物中, 获得的转基因植物表达几丁质酶生物活性, 不仅可抗真菌, 还对线虫、昆虫具有一定的抗性。另外, 几丁质酶还被广泛用在海产业, 如虾壳、螃蟹壳的处理。因此, 几丁质酶的研究越来越受到广泛重视。下面就几丁质酶的研究历史和现状作一综述。

(一) 几丁质酶的研究历史和现状

1905年, Benecke^[3]首次分离和研究了能够利用几丁质作为营养物质的微生物, 并定名为 *Bacillus chitinovorus*, 但并没有关于几丁质酶活性方面的直接证据。1921年, Folpmers^[4]发现分解几丁质的真细菌和放线菌在含有几丁质的琼脂上形成透明圈, 从而证明这些培养物内有水溶性的几丁质酶存在。1938年, Zobell和Rittenberg^[5]对海洋里的分解几丁质的细菌试验表明, 几丁质的分解是由于糖苷键的断裂或氨基基团的脱落。

1929年 Karrer和 Hofman^[6]用蜗牛肠酶使85%几丁质转化成N-乙酰氨基葡萄糖, 从而有助于几丁质结构单位的研究。1931年 Grasman和 Rubenbauer^[7]发现从 *Aspergillus* 的提取物

能把几丁质水解成碘可检测出来的还原物质。1938年 Zechmeister等^[8]证明杏仁乳内含有 β -glucosidase, β -galactosidase和chitinase, 进一步证明有N, N-diacetyl-chitobiose的存在。1950年和1951年 Jeuniaux^[9]发现从蜗牛肠道分离的分解几丁质的细菌和土壤中的放线菌能产生胞外几丁质酶。此后, 人们又相继从多种微生物(包括细菌、放线菌、真菌), 多种植物及动物中分离到几丁质酶, 并对几丁质酶的理化特性及生物学性状进行了大量研究。进入80年代以来, 随着分子生物学技术的迅速发展, 人们又把注意力转移到几丁质酶对真菌生长的抑制上, 并希望通过基因工程手段培育出抗真菌的转基因植物。下面分别从微生物、植物及动物几丁质酶的研究情况加以综述。

1. 微生物几丁质酶:

(1) 产生几丁质酶的微生物种类: 自从 Benecke首次报道了 *Bacillus chitinovorus* 能够产生几丁质酶以来, 人们又相继发现多种微生物能够产生几丁质酶。其中包括①细菌: *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter liquefaciens*, *Chromobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp. 和 *Vibrio* sp.^[10,11]。②放线菌 *Streptomyces* sp., *Streptomyces griseus* 和 *S. plicatus*^[12,13]。③真菌: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium lilacinum*, *Mucor subtilissimus* 和 *Trichoderma viride*等^[10]。在这些微生物中, 对 *Serratia marcescens*, *Streptomyces plicatus* 及 *Vibrio vulnificus* 的研究较多, 包括酶的理化性质、作用机理及酶的纯化方法都做了大量工作。

(2) 几丁质酶的诱导作用: 一些真菌、细菌

及放线菌在含有几丁质的培养基中才能产生几丁质酶,象纤维素酶一样,几丁质酶也是诱导酶。几丁质、脱乙酰几丁质、几丁质二糖及部分水解的几丁质能作为诱导物,而几丁质单糖则不能。几丁质酶的诱导可被过量的可溶性代谢物所阻遏。

(3) 几丁质酶的产生条件:能够产生几丁质酶的微生物,一般都能在以几丁质为主要的碳源和氮源及其它微量元素的培养基中良好地生长, pH7.0左右,培养5—7天时酶活性最高。几丁质来源不同,对几丁质酶的产量影响很大,在对 *S. marcescens* 产酶条件的研究中,发现当用蘑菇几丁质和甲虫几丁质作底物时,只产生少量的几丁质酶,用虾几丁质作底物时产量较高,产量最高的是商业用几丁质,将其进一步处理成小颗粒后,几丁质酶产量可提高5倍。

(4) 微生物几丁质酶的基本性质:一般说来,微生物的几丁质酶在 pH3—9 范围内都比较稳定, pH4—7 活性最高, 40—50 °C 酶活性最高, -20 °C 贮存二年以上仍有活性。一些离子也能影响几丁质酶的活性,其作用因几丁质酶的来源不同而有差异。微生物几丁质酶在分子量上差异很大,研究最多的是 *S. marcescens*^[14], 有5种几丁质酶,分子量分别为: 21、36、48、52和57KD。*Streptomyces plicatus*^[15] 有两种,分子量为49和69KD。而 *Verticillium albo-atrum*^[16] 仅有一种,分子量为63KD。

(5) 微生物酶的作用机理:根据酶的作用部位和酶解产物,几丁质酶可分为内切酶和外切酶。内切酶作用于底物是从几丁质链的任一部位进行随机切割,产生包括二糖在内的几丁质寡糖。外切酶是从链的非还原性末端依次切下几丁质二糖(也有人认为是单糖)。纸层析分析表明,微生物几丁质酶的水解产物绝大多数是二糖,属于外切酶,但也有报道 *S. plicatus* 的几丁质酶属于内切酶^[15]。

2. 植物几丁质酶:

(1) 产生几丁质酶的植物种类及其几丁质酶的分布:植物不含几丁质,但几丁质酶却广泛存在于高等植物中,包括单子叶植物和双子叶植

物。几丁质酶分布于植物的茎、叶、种子及愈伤组织中。

早在1938年, Zechmeister 和 Balint 首次报道,杏仁乳(almond emulsin)可以产生几丁质酶和几丁质二糖酶。以后澳大利亚 Poivning 和 Irzykiewicz^[17] 研究比较了十几种不同植物种子内的几丁质酶体系,发现菜豆、小麦和甘蓝种子内几丁质酶活性最高。菜豆、甘蓝、杏和山龙眼内几丁质二糖酶的活性也很高。用不同种子几丁质酶水解几丁质,水解产物进行纸层析,异戊醇:啞啉:水(1:1:0.8)作为展层剂,淀粉-碘作为显色剂,表明其产物主要是寡糖,属于内切酶。以后发现,植物除种子外,茎、叶、根、块茎等部位也有几丁质酶,但一般含量较低。植物受病原侵染或乙烯及其它外界因素的刺激后,植物体内几丁质酶的含量迅速增高,因此人们认为几丁质酶在植物保卫反应中起重要作用。

(2) PR 蛋白与植物几丁质酶的关系:1970年,荷兰 Van Loon^[18] 等首次发现接种烟草 TMV 后,烟草发生过敏反应,在烟草叶片内出现了几种新的可溶性蛋白,以后陆续发现在病毒、类病毒、真菌及细菌侵染后,一些植物都能够产生一种或多种新的蛋白质,这些蛋白质被认为与植物的枯斑反应及其它过敏反应等有关,人们称之为 PR 蛋白(Pathogenesis related protein)。

1987年, Van Loon 等^[19] 对 TMV 接种的烟草做了进一步的研究,发现烟草叶片可积累10种 pH3.0 可溶的低分子量的 PRs, 据在非变性电泳中泳动性越来越低的顺序定为: 1a、1b、1c、2、N、O、P、Q、R 和 S。双向凝胶电泳表明除 R 是由两个大小稍有差异的亚基组成外,其余 PR 蛋白都是由单体组成。经 SDS-PAGE 测定各单体的分子量分别为: 17KD(1a 和 1b)、16.5KD(1c)、31KD(2)、33KD(N)、35KD(O)、27KD(P)、28KD(Q)、13KD 和 15KD(R) 及 25KD(S)。进一步的研究发现在这10种 PR 蛋白中,其中 P 和 Q 实际上是植物产生的酸性几丁质酶。这两种蛋白质在血清学上密切相关,但与烟草中的其它酸性

PR 蛋白不相关。除上述两种酸性几丁质酶外,烟草还可以产生另外两种碱性几丁质酶,分子量分别为 32 和 34KD^[20]。碱性几丁质酶以前没有被发现可能是由于 PRs 总是在碱性条件下电泳鉴定。有趣的是,当用 *Pseudomonas syringae* PV. *phaseolicola*^[21] 的无毒菌株接种菜豆后,无毒菌株诱导的几丁质酶 mRNA 在接种 6 小时后开始增加,几丁质酶活性在 20—24 小时达到高峰,加热杀死或 UV 杀死的无毒和有毒细菌细胞都能诱导几丁质酶的形成。用病原真菌 (*Colletotrichum lagenarium*)^[22] 接种黄瓜叶片,所产生的 PRs 蛋白也含有几丁质酶成份。

用乙烯处理菜豆后,菜豆叶片的几丁质酶活性很快增高。当喷施外源乙烯浓度 0.001 μ l/ml 时就会有明显的诱导作用,6 小时后几丁质酶活性增高,24 小时增高 30 倍。当内源乙烯浓度增高,也诱导几丁质酶活性的提高。乙烯可以诱导很多种植物的几丁质酶的活性增高^[23]。由此可见,植物几丁质酶属于 PR 蛋白,而 PR 蛋白实际上可能是植物对逆境的一种反应,它的功能是保护植物免遭过度伤害。

3. 动物几丁质酶:相对微生物和植物几丁质酶来说,动物几丁质酶方面的研究工作只局限在生产酶的动物种类、酶的基本性质及酶的作用机理方面。有资料表明两栖类动物、鸟类及昆虫等都能产生几丁质酶,如蜗牛、鲫鱼、蜥蜴、麻雀、蟑螂、白蚁和蝙蝠、鳕鱼等动物都能产生几丁质酶,而另外一些动物如兔子和龟则不会产生任何几丁质酶^[24-26]。

一些研究表明动物几丁质酶也属内切酶体系,可将几丁质水解成二糖或三糖。动物的肌肉、肾、肝脏内不含几丁质酶。几丁质酶主要分布于消化液、腺体、胃和肠粘膜,这表明几丁质酶来源于动物本身而非来源于细菌。此外,几丁质酶的有无与其食物有关,其原因可能是因为含有几丁质酶的动物经常或偶而捕食含有几丁质的猎物,而兔子和龟属于植食性动物,因此不含有几丁质酶,仅含有微量的几丁质二糖酶,到目前为止,尚没有纯化动物几丁质酶方面的报道。

(二) 几丁质酶的分子生物学

S. marcescens 可以产生五种不同的几丁质酶,分子量为 21、36、48、52 和 57KD。1986 年美国 Jones 首先把经过 EcoRI 部分酶切后的 *S. marcescens* 染色体 DNA(20—30kb) 插入到载体 pLAF41 中,构建了几丁质酶基因文库,通过在几丁质平板上能否产生透明圈,筛选出含有几丁质酶基因的阳性克隆,经过进一步的亚克隆和 DNA 序列分析,得到了编码 57KD 几丁质酶基因,该基因含有 1686 个核苷酸碱基,可以编码 561 个氨基酸的大分子多肽,它实际上是 57KD 几丁质酶的前体,因此不具有几丁质酶活性。其中前 23 个氨基酸残基为信号肽,在几丁质酶经过细菌细胞壁向胞外分泌过程中起重要作用。在分泌过程中,前体几丁质酶经过进一步的加工,脱去信号肽而成为成熟的几丁质酶。1988 年 Robbins^[15] 改用荧光 (4-Methylumbelliferyl) 标记的几丁质寡糖替代几丁质,表达几丁质酶活性的阳性克隆可将这种荧光性底物水解,从而使荧光消失。使用这种方法,Robbins 在大肠杆菌中筛选出表达量极低的 *Streptomyces plicatus* 几丁质酶基因。

植物几丁质酶基因的研究最早见于菜豆,1986 年 Broglie^[28] 以菜豆 mRNA 为模版,经反转录得到菜豆 cDNA,并进而构建菜豆 cDNA 基因文库。通过差异原位杂交的方法获得了菜豆几丁质酶基因。该基因含有 1132 个核苷酸碱基,在基因 5'-端和 3'-端分别含有 34 和 125 个核苷酸碱基的非编序列。菜豆几丁质酶基因含有 328 个氨基酸,在其 N-端也含有一个含 27 个氨基酸残基的信号肽。在脱去信号肽后才能成为成熟的几丁质酶。1987 年,Hideaki shinshi^[29] 等构建了烟草几丁质酶的 cDNA 基因文库,首先用 ³²P 标记的探针筛选阳性克隆,然后用菜豆几丁质酶的抗体与阳性克隆的体外翻译产物反应做进一步的筛选。最后,选含有最长插入片断(约 1kb)的质粒 pCHN50 进行分析, pCHN50 包含一个单一的、有 310 个氨基酸的阅读框架,包括了成熟的几丁质酶的全部氨基酸序列,它不包括 5'-非编码区和起始密码子,但具有 3'-非编码

区,其中包括两个 AATTA AAA 区,可能用来加工 poly(A)⁺ 的 16 个腺嘌呤。通过烟草几丁质酶 N-端 20 个氨基酸序列分析,发现与 cDNA 中编码 N-端氨基酸序列完全吻合。此外,该氨基酸序列和已经报道的菜豆几丁质酶 N-端 30 个氨基酸也相一致。

迄今为止,已经对多种植物的几丁质酶基因进行了 DNA 序列分析和氨基酸顺序分析。在氨基酸顺序上,菜豆、大麦、马铃薯、番茄及烟草相互之间有 60% 以上的同源性;在 DNA 顺序上有 70% 以上的同源性^[30]。根据氨基酸顺序,可将植物几丁质酶分为三类: Class I, Class II, Class III。Class I 包括烟草碱性几丁质酶、番茄、马铃薯及菜豆的几丁质酶,这些酶在氨基酸顺序上有两个高度保守序列,中间由可变区域分开。酶的 N-端的保守区域是由富含半胱氨酸(8 个半胱氨酸)的约 40 个氨基酸组成,这个区域在一些没有几丁质酶活性的蛋白质中也存在,如伤口诱导的马铃薯蛋白 Win1 和 Win2,橡胶树的橡胶素和凝集素(WGA)。并且已有研究报道,橡胶树的橡胶素也能与几丁质酶发生结合,在浓度较低的情况下就能对病原菌起抑制作用。Class II 包括大麦几丁质酶和烟草酸性几丁质酶,氨基酸顺序与 Class I 酶的主要结构类似,但缺少 N-端富含半胱氨酸区域,大麦几丁质酶虽然缺少交联区和富含半胱氨酸的区域,但从这个酶的部分顺序上看,从 N-端开始,与烟草碱性几丁质酶同功酶的重要结构有 60% 的相似性。烟草酸性几丁质酶也缺少富含半胱氨酸区域和大部分交联区域,但引入二个 gap 后,在氨基酸顺序上烟草碱性几丁质酶有 80% 的相似性。Class III 包括番木瓜,三叶橡胶、爬山虎、悬钩子的溶菌酶/几丁质酶的双功能酶以及黄瓜的几丁质酶。部分氨基酸顺序比较表明,这类酶相互之间很相似,但与 Class I 及 Class II 不相似,也没有富含半胱氨酸的区域。

值得提出的是, β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)象几丁质酶一样,可能也是一种在植物保卫反应中起主要作用的水解酶。受植物激

素、乙烯、病原物(真菌、病毒、细菌)及一些诱导因子(elicitor)的诱导,经常与 chitinase 协同出现。离体实验表明 β -1, 3-glucanase 对病原真菌有抑制作用,特别是与 chitinase 联合作用时,抑菌效果更为明显^[31],故有人认为 β -1, 3-glucanase 在植物保卫反应中起间接作用,首先把多糖水解成寡糖,以寡糖作为诱发因子诱导植物的保卫反应。研究表明烟草在受病毒侵染后,有两类不同的 β -1, 3-glucanase,第一类是碱性同功酶,受病原物和乙烯的诱导,主要位于细胞的液泡内。第二类是酸性同功酶,包括 PR2 和 PR35 等,主要位于细胞间隙,受病原物的诱导。1990 年 Payne 等人研究发现有第三类葡聚糖酶存在,属于酸性酶,通常被分泌到细胞外。这三类酶在氨基酸水平上有 50% 的同源性。其中 PR2 与 PR0 有 91% 的同源性。PR2、PRQ 与碱性酶有 55% 的同源性。碱性酶首先以酶原的形式合成,以后加工为成熟的葡聚糖酶。几丁质酶也分为三类,Class I 是碱性几丁质酶,位于液泡内,另外两类是酸性几丁质酶,主要分布在细胞间隙内。

(三) 几丁质酶在抗病基因工程中的应用

植物及细菌的几丁质酶均能以几丁质为底物,在离体情况下处理真菌,可使其生长受到抑制。其作用机理可能是由于几丁质酶能够分解真菌的细胞壁。1991 年 Toyoda^[33]从 *Streptomyces griseus* 得到纯化的几丁质酶,当用这种几丁质酶处理离体的大麦胚芽鞘以观察对于小麦白粉菌(*Erysiphe graminis* f. sp. hordei)的影响,结果发现在短短 2 个小时内,病菌吸器便被完全消解。当改变试验方法,以活体大麦胚芽鞘替代离体的大麦胚芽鞘,并将几丁质酶注射体内,结果出现两种情况,对于正在发育中的病菌吸器被完全消解,而对于已经成熟的病菌吸器,经几丁质酶处理并未改变其形状,但菌丝的伸长却受到了抑制。基于这一研究结果,作者认为通过基因工程手段,将几丁质酶基因导入大麦,可望获得抵抗白粉菌的大麦新品种。

近来,英国科学家通过向双子叶植物引入编码几丁质酶外源 DNA,产生表达该酶的转基

因植株来抑制真菌病原体。此几丁质酶基因来自细菌(ATCC39637和ATCC67152),与植物启动子融合,利用土壤农杆菌导入植物,转基因植物表达几丁质酶的生物学活性,不仅可抗真菌,还对植物线虫、昆虫和其它一些病原生物具有抗性。已经获得的转基因植株包括烟草、大豆、棉花、水稻和玉米,该研究现已申请专利^[34]。与此同时,美国DNA Plant Technology公司^[35]也已就抗真菌转基因植物获得美国专利。该专利内容是几丁质酶基因能够分解真菌细胞壁,从而摧毁真菌。经基因操作技术将酶基因整合入植物基因组中,从而提高植物的抗病能力。该公司期望除在栽培期间显示耐病性外,还能防止在收获后保存时引起的真菌污染。现已用番茄,马铃薯,莴苣和甜菜等多种作物表达几丁质酶基因获得成功。1991年已进行了第一次田间试验,实用化要到90年代中期。该研究未提及几丁质酶基因的来源。除上述两项研究已获专利外, Broglie^[36]将菜豆几丁质酶基因导入烟草,含有此基因的转基因烟草植株表现较高水平的几丁质酶,对造成幼苗枯萎和根腐病原体立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)都有较高抗性。

值得提出的是,最近日本京都府立大学农学部植物病理学讲师吉川正明以大豆子叶为材料,从大豆中克隆了完整的 β -1,3-葡聚糖酶基因,该基因含有1041个核苷酸碱基,通过农杆菌介导将该基因导入烟草,并获得表达 β -1,3-葡聚糖酶的转基因烟草,在重组烟草植株的所有组织中表达该酶的量是对照的二倍,而且对病原真菌也是有较强的抵抗力^[37]。已知 β -1,3-葡聚糖酶对大多数真菌能够产生拮抗作用,导入了 β -1,3-葡聚糖酶的转基因可使植物对相当范围的病菌产生抗性,尤其是与几丁质酶结合在一起,其抗病能力及抗病的种类都会大大增强。

总之,利用生物技术阐明植物本身的抗病机制,并强化这种机制提高植物抗真菌病害的研究,将是继抗除草剂、抗病毒、抗虫害等的下一个重要开发目标。把几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶同时导入植物,以期获得更加抗病的转基因植物将会成为人们今后研究的焦点。

参 考 文 献

1. 黄秀梨:应用微生物, 3:13-15, 1989.
2. 吴东儒:糖类的生物化学,第349-352页,高等教育出版社,北京,1987.
3. Benecke W: *Bot. Ztg.*, 63:227, 1905.
4. Flopmers T: *Chem. Weekbl.*, 18:249, 1921.
5. Zobell C E and S C Rittenberg: *J. Bact.*, 35:275, 1938.
6. Karrer P and A Hofmann: *Helv. Chim. Acta.*, 12:616, 1929.
7. Grassmann W and H Rubenbauer: *Munch. Med. Wochr.*, 78:1817, 1931.
8. Zechemister L et al.: *Enzymologia*, 5: 302, 1938.
9. Jeuniaux C: *Arch. Int. Physiol.*, 59:242, 1951.
10. Moneral J and E T Reese: *Can. J. Microbiol.*, 15:689-696, 1956.
11. Clarke P H and M V Tracery: *J. Gen. Microbiol.*, 14:188, 1956.
12. Reynolds D M: *J. Gen. Microbio.*, 11:150-159, 1954.
13. Berger L B and D M Reynolds: *Biochimica et Biophysica*, 29:522-534, 1958.
14. Fuchs R L et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 504-509, 1986.
15. Robbins P W et al.: *J. Biol. Chem.*, 263(1):443-447, 1988.
16. Pegg G F: *Physiol Plant Pathology*, 21:389-409, 1982.
17. Powning R F and H Irzykiewicz: *Comp. Biochem. Physiol.*, 14:127-133, 1965.
18. Van Loon L C and Van Kammen A: *Virology*, 40:199-211, 1970.
19. Van Loon L C et al.: *Plant Molecular Biology*, 9:593-609, 1987.
20. Legeand M et al.: *Plant Molecular Biology*, 9:411-420, 1987.
21. Christine R V and A J Slusarenko: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35:403-412, 1989.
22. Siegrist J and H Kaus: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36:267-275, 1990.
23. Boller T et al.: *Planta*, 157:22-31, 1983.
24. jeuniaux C: *Nature*, 192:135-136, 1961.
25. Danulat e and H Kausch: *J. Fish Biol.*, 24:125-133, 1984.
26. Jeuniaux C: *Methods in Enzymology*, 161:644-654, 1966.
27. Jones J D G et al.: *EMBO J.*, 5:467-473, 1986.
28. Broglie K E et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6820-6842, 1986.
29. Shinishi H et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:89-93, 1987.
30. Shinish H et al.: *Plant Molecular Biology*, 14:357-368, 1990.
31. Mauch F et al.: *Plant Physiol.*, p. 936-942, 1988.
32. Payne G et al.: *Plant Molecular Biology*, 15:797-808, 1990.
33. Toyoda H et al.: *Plant Cell Reporter*, 10:217-220, 1991.
34. 李思经:生物技术通讯, 6:93, 1991.
35. 孙国凤:生物技术通讯, 7:12, 1991.
36. Broglie R et al.: *J. Cell Biochem.*, 14:276, 1990.
37. 孙国凤:生物技术通讯, 3:9-10, 1991.