

几丁质及脱乙酰几丁质的微生物降解作用

王士奎 王汉潜*

(廊坊师范专科学校生物系,河北廊坊 102849)

氨基糖(Amino Sugar)在自然界中主要以多糖(几丁质、肽聚糖、糖蛋白、粘多糖等)形式存在。其中,几丁质作为多数真菌和无脊椎动物的主要结构成份,在自然界中,每年含量约 10^{10-11} 吨,是氨基糖的主要存在方式之一。其降解作用主要通过细菌和真菌分泌的几丁质酶来完成,或通过脱乙酰作用形成脱乙酰几丁质,再由脱乙酰几丁质酶降解。几丁质酶和脱乙酰几丁质酶在生物体自溶,形态发生和营养代谢中具有一系列的重要作用。同时发现在一些疾病和生物共生现象中也与这二种酶有关。进而这二种酶的底物及降解产物在生命科学、医学、化工、农业及环境科学等方面潜在的价值越来越受到重视。然而,从生物学的角度开展对几丁质的研究,在国内尚未引起广泛的重视,本文就几丁质降解的生理学、酶学、遗传工程学和生态学等方面进行讨论。

1 几丁质的结构及降解的生化途径

几丁质是 N-乙酰-D-葡萄糖胺以 β -1,4 糖苷键连接起来的直链多聚物,且在自然界中以各种结构类型存在。目前,已确定有三种氢键相连的晶体: α -几丁质,由两条反向平行链组成; β -几丁质,由两条同向平行链组成; γ -几丁质,由三条链组成,两条同向,一条反向。几丁质在生物体中常与其它结构物质交连(硅藻除外),在真菌细胞壁中,几丁质常与 β -葡萄糖共价结合^[1],在昆虫和其它无脊椎动物中,几丁质通过共价和非共价的形式与特定的蛋白质交连,形成各种有序的结构^[2]。几丁质也常涉及到与酚类及脂类分子的相互作用,并发生不同程度的矿化作用,尤其是钙化作用。

几丁质另外一种修饰变化是脱乙酰形成脱乙酰几丁质,是以 β -1,4 糖苷键相连的 D-葡萄糖胺的多聚体,在真菌中是毛霉细胞壁的主要成份^[3],也存在于啤酒酵母的子囊孢子中。

几丁质在自然界中几乎以相等的循环速率产生和消失,微生物在其中起到了关键的作用。在海洋和土壤中,主要由相应的细菌和真菌参与几丁质的降解,Davis 和 Eveleigh 讨论了几丁质降解的生化途径^[4],首先由水解几丁质糖苷键的降解酶系统,如外切酶从将多糖链的非还原端开始以二乙酰壳二糖为单位依次酶解,内切酶则随机地断裂糖苷键, β -N-乙酰葡萄糖胺酶将双糖水解成单糖,某些 β -N-乙酰葡萄糖胺酶也有较弱的外切酶活性,从几丁质多糖链的非还原端开始以单糖为单位水解,因此,几丁质内切酶、外切酶和 β -N-乙酰葡萄糖胺酶被称为几丁质水解系统。其次,几丁质还可通过脱乙酰作用形成脱乙酰几丁质(亦称壳聚糖),再由脱乙酰几丁质酶水解产生壳二糖,最后被葡萄糖胺酶水解为葡萄糖胺,此途径在工业生产中十分重要,开展对几丁质脱乙酰作用的研究,有望改变现有壳聚糖生产工艺,降低成本和减少环境污染。

2 几丁质降解菌的生态分布

细菌:降解几丁质的细菌分布广泛, G^+ 和 G^- 菌的许多属都能产生几丁质酶。在海洋中,由于浮游生物在生长中有规律的换壳,积累了大量的几丁质,其降解菌主要以弧菌和发光细

* 北京师范大学生物系 93 届学生
1993-05-30 收稿

菌为主。Helmke 和 Weyland 推断在南极的海洋深处栖息的细菌能够有效地分解几丁质颗粒^[5]。在河湾中富含分解几丁质的细菌, Reichardt 等从 Chesapeake 湾上部的河滩中分离出 103 株几丁质分解菌^[6], Pel 和 Gottschall 等研究了从河湾淤泥中获得的梭状芽孢杆菌对几丁质的降解作用^[7], 发现在纯培养条件下, 几丁质降解非常缓慢, 积累的二乙酰壳二糖很快随着 N-乙酰葡萄糖胺的积累而消失, 从而推断梭状芽孢杆菌是特殊的二乙酰壳二糖利用菌。通过与其它细菌混合培养而增强对几丁质的分解作用, 其原因可能为生长因子的释放和解除产物对菌体分泌几丁质酶的反馈抑制作用。土壤中含有大量分解几丁质的细菌, 由于土壤环境和分离方法不同, 所报道的数目和种类变化较大。几丁质寡聚体和低水平的 N-乙酰葡萄糖胺对细菌几丁质酶的诱导作用, 具有重要的生态学意义。

真菌: 从土壤中容易分离到分解几丁质的真菌, 其分解活性和细菌相似, 某些种类甚至超过细菌, 多数是 Mucorales, Deuteromycetes 和 Ascomycetes (如 *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Thielavia*, *Penicillium* 和 *Humicola*)。这些真菌具有特征性的诱导几丁质酶分解系统, 在淡水中生长的几丁质分解菌, 壶菌中的 *Chytrium* sp. 和 *Karlingia astereocysta* 属于专嗜几丁质的微生物。

粘菌, 原生生物和藻类: 粘菌纲的某些种类富含几丁质酶, 例如, *Physarum polycephalum* 产生的几丁质酶复合体系。土壤中的变形虫和 *Schizopyrenus* 可产生几丁质酶, 参与几丁质颗粒的消化。具有吞噬作用的纤毛虫可能具有消化几丁质的能力。与虾共生的 *Ascophrys* 对几丁质的取食与几丁质酶的活性有关。有些硅藻能够在真菌菌丝体上打洞后吸取细胞液而取食。

3 在致病机制和共生现象中的几丁质降解作用

嗜几丁质的病原微生物特异地产生几丁质酶, 其作用可能有助于对宿主的穿透作用, 和直

接利用酶解的产物作为营养物质, 例如, Oomycete 中的 *Aphanomyces astai* (一种虾的病原体)^[8], 真菌的 *Paecilomyces lilacius* (一种线虫卵的病原体)^[9], 昆虫病原真菌 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* 和 *Verticillium lecanii*^[10], 嗜菌真菌 *Cladobotryum* 和 *Aphanocladium album*^[11]; 细菌 *Serratia* (昆虫病原菌) 和 *photobacterium* 中的某些种类。以真菌和小虾为食的具有纤毛的原生动物和感染昆虫幼体的杆状病毒是否含有几丁质酶尚需进一步研究。

由昆虫致病真菌产生的几丁质酶可由几丁质寡聚体、N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖胺诱导。St. leger 等报道在 *M. anisopliae* 中几丁质酶和脱乙酰几丁质酶可被同时诱导, 在昆虫的致病过程中, 几丁质酶和蛋白酶的协同作用很重要, Bibachka 和 Khachatourians 报道两种酶的活性是一同被调节的^[12]。进一步证实低水平的 N-乙酰葡萄糖胺可以诱导球孢白僵菌产生一种丝氨酸蛋白质, 从而推测最初分泌的几丁质酶主要用于水解昆虫表皮的几丁质产生 N-乙酰葡萄糖胺, 进而同等地诱导分泌几丁质酶和蛋白酶。

真菌和节肢动物的几丁质构成了许多食草和食肉动物广泛的食谱, 在动物消化系统中有三个几丁质酶来源: 动物自身、内生的肠道微生物区系和摄取的食物。许多研究工作与鱼有关, 在鱼肠道中, 具有分解几丁质作用的弧菌、光合细菌和肠道细菌占优势, 鱼同时可产生自身的几丁质酶, 只用于食物加工处理而不作为直接的营养代谢物。因此, 肠道细菌与鱼之间在利用几丁质时并非是互惠共生关系。鲸在胃中有分解几丁质的微生物系, 类似于瘤胃的作用。在牛的瘤胃中, 通常存在分解几丁质的微生物区系。Kuhl 等发现用几丁质饲喂白鼠时, 肠道细菌参与几丁质的降解^[13]。在无脊椎动物中, 无论分解几丁质的微生物区系参与与否, 几丁质的降解都广泛存在。Borkott 和 Insan 报道某些节肢动物与肠道几丁质分解菌存在着互惠共生的关系^[14]。

4 脱乙酰几丁质的降解

脱乙酰几丁质是某些土壤真菌和接合菌类细胞壁的主要成份,由于自然界中底物的广泛存在,Monaghan 发现并证实了微生物中广泛存在脱乙酰几丁质酶^[15]。细菌中如: *Myxobacter*, *Sporocytophage*, *Arthrobacter*, *Bacillus* 和 *Streptomyces* 等;真菌中如: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium* 和 *Basidiomycete*。针对厩肥、森林和盐碱沼泽土壤而言,脱乙酰几丁质分解菌占异养菌总数的 5.9%、1.5%和 7.4%,而几丁质分解菌占 1.7%、1.2%和 7.4%。对 *Bacillus circulans* 脱乙酰几丁质酶研究发现,脱乙酰几丁质是酶唯一的诱导物,几丁质和羧甲基纤维素无诱导作用,而从土壤中分离的 *Myxobacter*,脱乙酰几丁质和羧甲基纤维素都可诱导酶产生。王士奎和杜声亮等报道了白僵菌对脱乙酰几丁质的降解特性和脱乙酰几丁质酶的基本性质,发现白僵菌在较低 pH 值条件下,可解除高粘度脱乙酰几丁质对菌体生长的抑制作用,分泌大量的脱乙酰几丁质酶^[16,17]。

5 几丁质酶基因克隆及应用

由于水生无脊椎动物和真菌发酵工业产生的废物,几丁质成为巨大的可利用资源。但是成功而大量地利用这类资源,尚需深入研究,特别是通过基因工程手段获得高酶活菌株。

几丁质酶基因的克隆:至今,已经克隆出许多来自细菌、真菌和植物的几丁质酶基因。在分离出的许多几丁质分解菌中,Monreal 和 Reese 发现 *Serratia marcescens* 和 *Serratia liquefaciens* 是两株较高的几丁质酶产生菌^[18]。Suolow 和 Jone 将来自 *S. marcescens* 的两个几丁质酶基因 ChiA 和 ChiB 嵌入大肠杆菌,随后又嵌入 *Pseudomonas fluorescens* 和 *P. putida*,获得了四株高产几丁质酶的工程菌^[19]。Roberts 和 Cabib 对几丁质酶进行了纯化并获得了几丁质酶高产突变株^[20]。将微生物的几丁质酶基因嵌入植物体中,并获得表达等研究工作具有突破性进展,先后获得了对烟草致病菌 *Alternaria longipes* 有较强抗性的植株。Shapi-

ra 等把几丁质酶基因从 *S. marcescens* 克隆到大肠杆菌中,被整合的大肠杆菌和酶的提取液在室温条件下皆表现出对真菌生物防治的潜力^[21]。

链霉菌的几丁质酶已被纯化并测定出氨基酸顺序,它具有 290 个氨基酸残基,分子量为 304000 道尔顿和二二硫键,与其它几丁质酶和溶菌酶无同源性^[22]。酵母菌的基因已被克隆,并获得了高产的转化子。

已证实植物几丁质酶具有比细菌几丁质酶较强的抗真菌活性,其基因已被克隆,并在植物体中表达,显著增强了植物抗真菌病的能力。

6 几丁质酶、脱乙酰几丁质酶及其产物的应用

寡糖素的研究目前受到各国科学家的重视,而氨基糖寡糖素在调节动植物细胞生命代谢活动中起着非常重要的作用^[23]。Suzuki 等报道 6-N-乙酰壳己糖具有抗肿瘤活性^[24];氨基糖寡糖素在动物肠道中可调节微生物的代谢活动,改善肠道微生物区系分布,刺激有利于动物健康的微生物(如双歧杆菌)的生长,作为人体的保健药物具有重要的开发价值。同时,氨基糖寡糖素可作为植物功能性调节剂,可调节植物基因的关闭和开放,诱导植物分泌抗性酶,不但可以调节植物生长,又可增强植物对病原性真菌的抗性。所以为了获得具有生物活性的寡糖片段,生物降解法具有许多优点,例如,反应条件温和,容易控制,并避免了寡聚体结构的破坏。

在基础研究方面,几丁质酶的糖苷转移酶活性和在 N-乙酰葡萄糖胺寡聚体互变中的作用等方面取得了一定的进展,同时,几丁质酶和脱乙酰几丁质酶在真菌原生体制备方面已得到了广泛的应用。

7 几丁质分解菌在生物防治中的应用

由于许多病原真菌和昆虫以几丁质作为基本结构成份,几丁质酶则在生物防治中具有重要作用,Sivan 和 Chet 获得一株能强烈分解几丁质的真菌 *Trichoderma harzianum*,认为对许多植物致病菌的控制很有潜力^[25]。除了应用微生物外,也有许多把几丁质施入土壤以达到生物防治的报道,认为它能刺激土壤几丁质分解

菌的生长,诱导植物分泌几丁质酶,从而增强植物抵抗病原菌感染和害虫侵害的能力。

随着几丁质酶特性研究的深入,几丁质酶抑制剂的研究也有所进展,Sakuda等首次发现链霉菌产生的一类抗生素(Allosamidin和demethylallosamidin)属于几丁质酶抑制剂^[26],由于对昆虫蜕皮和对蠕虫有致杀作用,认为是很有潜力的杀虫剂。

综上所述,微生物对几丁质的降解特性的研究,不论在理论上还是应用中都具有重要的

意义。几丁质酶的多样性、复杂性和种属特异性等问题需进一步研究。脱乙酰几丁质酶的研究将随着其底物研究的日益深入而越来越受到人们的重视。同时,需要进一步认识几丁质和脱乙酰几丁质在自然界和生物工程中的生物学作用和重要性。国内,对几丁质、脱乙酰几丁质及其相关的酶类的研究起步较晚,尤其是几丁质酶和脱乙酰几丁质酶的研究尚未引起广泛的重视^[27,28]。从生物学角度探讨这类生物资源的开发,将对应用微生物学领域的拓宽大有裨益。

参 考 文 献

- [1] Surarit R, Gopel P K, Shepherd M G. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 1723-1730.
- [2] Blackwell J. *Meth Enzymol*, 1988, **161**: 435-442.
- [3] Davis L L, Bartnicki-Garcia S. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**: 2095-2102.
- [4] Davis B *et al.* *Chitin Chitosan and Related Enzymes*, Orlando: Academic Press, 1984, 161-179.
- [5] Helmke E, Weyland H. *Mar Biol*, 1986, **91**: 1-7.
- [6] Reichards W *et al.* *Microb Ecol*, 1983, **9**: 273-294.
- [7] Pel R *et al.* *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 695-704.
- [8] Soderball K, Unestam T. *Physiol Plant*, 1975, **35**: 140-146.
- [9] Darckman C, Chet I *et al.* *FEMS Microbiol, Ecol*, 1989, **62**: 201-208.
- [10] St Leger R J *et al.* *J Gen Microbiol*, 1986, **132**: 1509-1517.
- [11] Srivastava A K *et al.* *Experimentia*, 1985, **41**: 1612-1613.
- [12] Bibochka M J. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 2699-2704.
- [13] Kuhl J *et al.* *Arch Fischererwiss*, 1978, **29**: 99-103.
- [14] Borkott H, Insam H. *Biol Fert Soils*, 1990, **9**: 126-129.
- [15] Monaghan R L *et al.* *Nature*, 1973, **245**: 78-80.
- [16] 王士奎, 杜声亮等. *微生物学通报*, 1993, **20**: (3) 107-110.
- [17] 杜声亮, 王士奎等. *河北省科学院学报*, 1993, **1**: 65-69.
- [18] Monreal J, Reese E T. *J Microbiol*, 1969, **15**: 689-696.
- [19] Suolow T V, Jones J. US Patent No 4751081, 1988.
- [20] Roberts R L, Cabib E. *Anal Biochem*, 1982, **127**: 402-412.
- [21] Shapira R *et al.* *Chitin Chitosan and Related Enzymes*. Orlando: Academic Press, 1984, 189-191.
- [22] Hara S *et al.* *J Biochem*, 1989, **105**: 484-489.
- [23] Gooday G W. *Advances in Microbiol Ecol*, New York: Plenum Press, 1990, 387-431.
- [24] Takiguchi Y, Shimahara K. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 1537-1541.
- [25] Sivan A, Chet L. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 675-682.
- [26] Sakuda S *et al.* *Agric Biol Chem*, 1987, **51**: 3251-3259.
- [27] 张玉臻, 艾武等. *山东大学学报*, 1989, **24**(1): 98-105.
- [28] 黄秀梨. *北京师范大学学报*, 1991, **27**(2): 227-230.