

# 植酸酶及其植物基因工程\*

邹立扣<sup>1,2</sup> 王红宁<sup>1\*\*</sup>

(四川农业大学动物预防医学生物工程实验室 雅安 625014)<sup>1</sup>

(四川农业大学都江堰分校资源与环境系 都江堰 611830)<sup>2</sup>

**摘要:** 综述了植酸酶的来源、其酶学性质及植酸酶的植物基因工程, 并对其存在的问题、应用前景作了展望。

**关键词:** 植酸酶, 植物, 基因工程

**中图分类号:** Q556, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0128-05

## Phytase and its Plant Genetic Engineering\*

ZOU Li-Kou<sup>1,2</sup> WANG Hong-Ning<sup>1\*\*</sup>

(Lab of Veterinary Medicine and Bioengineering, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)<sup>1</sup>

(Faculty of Environment and Resource of Dujiangyan Campus, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830)<sup>2</sup>

**Abstract:** The article summarized the source of phytase, enzyme property and genetic engineering of phytase, discussed the problems existing in phytase genetic engineering and its application.

**Key words:** Phytase, Plant, Genetic engineering

磷是动物生长、繁殖及代谢所必需的矿物质因素之一。猪、禽饲料主要来源的玉米、豆饼粕、谷糠、棉籽饼所含的磷约40%~70%以植酸磷的形式存在。猪、禽等单胃动物, 消化道内缺乏能分解消化植酸磷的酶, 仅能利用玉米中磷的10%~20%、豆饼中磷的25%~35%、典型猪日粮中利用率只有15%, 其余85%左右的磷从粪便中排出<sup>[1,2]</sup>。一些国家从环保的角度对集约化畜牧场已提出了限制排磷的要求<sup>[3]</sup>。此外, 植酸盐可以通过螯合作用降低动物对锌、铁、锰、钙、钾等主要微量元素的利用率, 通过与蛋白质结合成植酸复合体而降低对蛋白质的消化吸收率, 从而使整个饲料的利用率降低<sup>[1-3]</sup>。植酸酶是催化植酸(肌醇六磷酸)及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称。大量研究表明, 在猪、禽日粮中添加植酸酶, 可使饲料中磷的利用率提高40%~60%, 粪便中磷的排出量减少30%~50%<sup>[4]</sup>。因此, 其以能减少磷的排出和保护生态环境而得到世界公认<sup>[1]</sup>。

## 1 植酸酶来源

**1.1 微生物来源植酸酶** 天然植酸酶来源广泛, 包括植物、动物和微生物等。但由于前两者来源的植酸酶作用范围和稳定性不好, 且难以形成规模化生产, 所以微生物来

\*教育部重点资助项目 (No. 03106)

国家“十五”重点科技攻关子课题 (No. 2002BA514A-12)

\*\*通讯作者 Tel: 0835-2886083, E-mail: whongning@163.com

收稿日期: 2005-03-04, 修回日期: 2005-04-22

源植酸酶一直是人们研究的热点。产植酸酶的微生物有丝状真菌、酵母和细菌等。Shieh等<sup>[5]</sup>对200种微生物进行了筛选,发现大量的曲霉菌能产生胞外植酸酶,并由土壤中分离到的无花果曲霉(*Aspergillus ficuum*) NRRL3135能产生最大的酶活性。另外,土曲霉(*A. terreus*)、烟曲霉(*A. fumigatus*)、米曲霉(*A. oryzae*)、黑曲霉(*A. niger*)、青霉(*Penicillium* spp.)、巴斯毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)等都能产生植酸酶。产植酸酶的细菌有芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)如嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*)和干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*)、链球菌(*Streptococcus* spp.)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠杆菌(*Enterobacter* spp.)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)和反刍月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)等<sup>[6-10]</sup>。

目前对真菌产生的酸性植酸酶研究较多,其最适合温度在53℃~70℃<sup>[11]</sup>,最适pH范围在2.0~6.0<sup>[6]</sup>之间,因此主要适用于胃pH值呈酸性的单胃动物(猪、禽等)及少数鱼类如虹鳟、鲑鱼等,但不适用于消化道呈中性的鲤科鱼类,以及在单胃动物中pH值接近中性的肠道段中表现酶活力。随着水产养殖业的发展,水体磷的污染越来越严重,急需开发出适于鱼类饲料用的植酸酶。研究表明,来源于芽孢杆菌(*Bacillus*)的植酸酶属于中性植酸酶,其最适合温度在55℃~70℃,最适pH范围在6.0~8.0之间,不仅具有较好的热稳定性,有助于抵抗饲料制粒或者膨化过程中引起的酶失活,而且可以有效弥补酸性植酸酶的不足,因此具有良好的应用前景<sup>[7-10,12]</sup>。

**1.2 植物来源植酸酶** 植酸作为磷元素的重要贮藏形式,大量存在于植物种子和花粉粒中。小豆籽粒中植酸态磷占种子含磷量的70%以上。在种子或花粉发芽时,植酸酶将植酸水解为肌醇和磷酸盐,为种子萌发和幼苗生长提供必要营养。其作为植物储存磷酸和肌醇的一种重要形式,在静止的种子中起到抗氧化的作用,植物种子在萌发时会合成能够分解植酸的植酸酶。来源于植物种子的植酸酶大部分属于非特异性的磷酸水解酶,最适合温度在45℃~58℃<sup>[11,13]</sup>,最适pH在4.0~6.0<sup>[11,14]</sup>之间,除了植酸,还能水解很多种自然界中或合成的磷酸酯类。植酸酶广泛存在于植物界中,从中分离出具有植酸酶活性的有黑小麦、小麦、玉米、大麦、稻、菜豆、绿豆、豌豆、番茄及麸皮等。除此之外还从白芥菜、马铃薯、萝卜、莴苣、菠菜、草以及百合花粉中检测到了植酸酶活性。但Laura等<sup>[12]</sup>,Hara等<sup>[15]</sup>Jonathan<sup>[16]</sup>分别从百合花粉、一种香蒲(*Typha latifolia*)花粉及豆类种子中分离和纯化出碱性植酸酶,其最适pH值为8.0,钙离子对植酸酶具有激活作用,但是过量的钙离子也会起抑制作用。此种植酸酶对植酸具有特异性,其只水解50%植酸盐磷酸键,产物为1,2,3-肌醇三磷酸。

**1.3 动物来源植酸酶** 相对微生物、植物来源植酸酶,来源于动物的植酸酶研究相对较少。Bitar<sup>[17]</sup>研究了来自鼠、鸡、牛及人肠道黏膜的植酸酶,发现其最适pH值分别为7.0,7.5~7.8、8.2、8.4、7.4,研究表明体内或体外条件对植酸酶活力影响较大,其有可能与碱性磷酸酶属同一种酶,但对其亚基结构了解很少。

## 2 植酸酶植物基因工程

植酸酶现已在细菌<sup>[10]</sup>、酵母<sup>[18,19]</sup>、真菌<sup>[20]</sup>、家蚕<sup>[21]</sup>等多个表达系统中表达成功,各国对这些系统的研究比较多,但总的来说,基因工程菌还存在发酵用培养基成本高,

相关中试生产工艺还不够成熟,植酸酶制剂的耐热保护技术也亟待解决等问题。如果一些植物性饲料本身就含有足量的植酸酶,植酸酶在动物的肠胃中释放出来降解饲料中的植酸盐,这无疑是植酸酶应用的最好方法,但是在植物中存在的内源植酸酶,由于其表达量低、最适 pH 值范围较窄及稳定性差等原因,使其应用受到限制。90 年代科学家们开始尝试在植物中表达微生物来源的植酸酶,并取得了阶段性的进展。

**2.1 植酸酶基因的来源** 目前克隆到的植酸酶基因大致分为 3 类:真菌来源的 *PhyA* (*B*) 基因、芽孢杆菌来源的 *PhyC* (*L*) 基因、大肠杆菌来源的 *appA* 基因以及其它微生物来源及动植物来源植酸酶基因。但目前研究比较多是来源于真菌来源的 *PhyA* (*B*) 基因,经序列分析表明,真菌植酸酶基因存在一个开放阅读框,长度为 1.4 ~ 1.5 kb,大多数编码的成熟肽为 467 个氨基酸的多肽,也有 463、465、466 和 487 个氨基酸的报道。王红宁等<sup>[18]</sup>克隆了来源于黑曲霉 N25 的植酸酶 *phyA* 基因, DNA 序列测定表明,目的基因片段含有植酸酶 *phyA* 基因的完整序列,基因全长 1,506bp,其中包含一段长 102bp 的内含子,编码 467 个氨基酸,5' 端有一段编码 19 个氨基酸的信号肽序列。

芽孢植酸酶基因存在一个开放阅读框,其长度有 1,146bp、1,149bp 和 1,152bp 的报道,分别编码 381、382 和 383 个氨基酸,各基因之间的同源性的 60% 左右和 90% 左右不等。Tye<sup>[22]</sup>等进一步在 DNA 和蛋白质水平对部分基因序列绘制了系统发育树。

Golovan 等<sup>[23]</sup>从大肠杆菌 ATCC 33965 克隆出 *appA* 基因,表现出植酸酶活性的菌株根据其限制性图谱被分为 3 类,一段长为 4,600bp 包含 *appA* 及 *appB*; 4,500bp 片段包含 *agp* 基因; 4,800bp 至少含 3 个不同的开放阅读框。把这 3 种片段表达在植酸酶阴性菌株,发现 *appA*, *agp* 基因编码植酸酶。

Carla<sup>[14]</sup>克隆了大豆植酸酶基因 (*GmPhy*),比较序列后发现 *GmPhy* 与以往报道的植物及微生物来源植酸酶序列没有同源性。

**2.2 植酸酶基因在植物中的表达** 植酸酶基因在植物中的表达首先是从模式植物烟草的研究开始的, Pen 等<sup>[24]</sup>将来源于 *A. niger* 的植酸酶 *phyA* 基因转移到植物烟草中,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%,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,储藏于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<sup>[25]</sup>在 *phyA* 成熟肽前加上了来自烟草病原相关 S 蛋白的 (PR-S) 信号肽,构建烟草表达载体 pMOG413,进叶盘转化法转化烟草,叶子中表达的植酸酶具有生物学活性,其表达量达到叶片可溶性总蛋白的 14.4%,植酸酶表达量在烟草 5 周龄时达到最高,叶片中表达的植酸酶分子量约为 70kD,比天然植酸酶 85kD 的分子量小,去糖基化后分子量降为 67kD,而种子中表达植酸酶分子量为 68kD,经去糖基化处理后分子量降为 64kD。Van Ooyen 等<sup>[26]</sup>利用特异性 *cruciferin* 启动子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。

随着植酸酶在烟草中表达技术的成熟,植酸酶开始在一些植物性饲料中(大豆、玉米、小麦及油菜籽等)表达。Ponstein<sup>[27]</sup>将来源于 *A. niger* 植酸酶 *phyA* 基因转移到油菜籽中,用种子特异性启动子 *CruA* 控制 *phyA*,并在植酸酶成熟肽前加上十字花科信号肽序列,结果发现 95% 的油菜籽实中检测到了植酸酶的活性,此酶对胃蛋白酶具有抗性。大豆中虽然含有较高磷酸盐,但其中 60% 左右以植酸盐的形式存在,因此在大豆

中表达植酸酶基因是降低饲料成本及减少植酸酶添加的很好的方法。Jia Li<sup>[28]</sup> 构建了分别含有组成型启动子 (CaMV 35S) 及种子特异性启动子 (SSP) 的大豆表达载体, 并在 *phyA* 植酸酶基因前插入植物信号肽序列, 结果显示在培养基和大豆细胞浸出物中具有植酸酶活性, 最适 pH 值及温度分别为 5.0 和 63℃, 分子量为 69~71kD, 植酸酶最高活性可达 920pKat/ $\mu$ g 总蛋白, 缺乏信号肽序列的载体不能分泌植酸酶至培养基中。Carla<sup>[13]</sup> 纯化了大豆植酸酶, 天然植酸酶最适 pH 值及温度分别为 4、5、5.0 和 58℃, 分子量为 130kD, 并克隆了此植酸酶基因 (*GmPhy*), 比较序列后发现 *GmPhy* 与以往报道的植物及微生物来源植酸酶序列没有同源性, Carla 之后又构建了 *GmPhy* 表达载体 p35SD, 转入发芽的大豆的幼苗子叶中表达, *GmPhy* 基因以多拷贝形式整合进大豆基因组, 结果显示重组后表达的植酸酶量是出发株的 3 倍左右。Brinch<sup>[29]</sup> 已经将黑曲霉 *phyA* 基因在小麦中表达成功, 微弹轰击小麦愈伤组织, 由玉米的 *ubi* 启动子启动, 在启动子和 *phyA* 基因间插入  $\alpha$ -淀粉酶信号肽, 同时也构建了不含有信号肽的载体, 蛋白印迹表明表达的蛋白质大小和黑曲霉植酸酶相同, 它在胚乳中积累的量超过了在种皮和糊粉中的量, 在胚芽中始终没有检测到 *phyA* mRNA 和植酸酶, 在 *ubi*-SP-*phyA* 转化株种子中, 植酸酶活性增加了 4 倍, *ubi*-*phyA* 转化株中, 植酸酶活性增加了 56%。

本实验室已成功构建了 *phyA* 基因玉米胚乳特异性表达载体 PBA 并成功转化了玉米自交系 18-599, 以期植酸酶能在玉米胚乳中特异性表达, 从而为动物提供可以直接饲用的植物饲料。邹立扣, 王红宁等 (暂未发表) 也成功于 2004 年构建了来源于 *Bacillus subtilis* WHN02 的 *phyC* 基因玉米表达载体 (含 EGH5 启动子及 NOS 终止子), 并成功转化玉米, 目前正在幼苗分化中。

以上结果研究表明, 植酸酶基因可在植物中表达, 也可在种子中特异性表达, 这些结果为植酸酶基因在饲料作物中进一步高效表达提供了依据和可行性。

## 2.3 存在问题及应用前景

### 2.3.1 存在的问题: 植酸酶在植物中表达最大的障碍是缺乏合适的表达系统, 包括表达宿主, 载体及启动子的选择等。密码子的选择也会影响表达效果。就表达宿主而言, 目前国内植酸酶转基因研究大部分还停留在植物模式种烟草上, 且烟草并非动物植物性饲料, 虽然植酸酶在油菜籽、大豆等中表达成功, 但在制油菜饼的过程中需要比较高的温度, 大豆需要经过烘烤以使胰蛋白酶抑制因子及其它抗营养蛋白失活, 导致重组植酸酶失活。因此对植酸酶的植物基因工程, 选择合适的表达宿主 (玉米、黑麦草、苜蓿等) 是至关重要的, 最好能选用能直接饲用的宿主。选择合适的载体及启动子, 会影响植酸酶的表达效果 (表达量, 表达部位等)<sup>[30]</sup>。由于表达宿主对密码子的偏爱性, 也会影响表达效果, 虽然植酸酶基因在不同植物中已经表达成功, 但是普遍表达产量不高, 究其原因之一是目前在宿主中表达的大部分是来源于微生物的植酸酶基因, 因此需要对目的基因加以优化设计, 减少稀有或低频密码子, 选用植物高频密码子, 甚至可以根据宿主的密码子偏爱性人工合成全基因, 这样植酸酶在植物中的表达量才会大幅度提高。另一方面是对植物本身产生的影响, 由于植物种子中的植酸为种子萌发和幼苗生长提供营养, 而在植物中表达的外源植酸酶势必会水解植物种子中必需的植酸, 从而影响种子发芽及幼苗的生长等。再者虽然表达的植酸酶本身对动物及人体不会产生危害, 但是转基因植物中抗性标记及外源基因的引入会产生基因水平的转移和突变<sup>[31]</sup>, 因此转基因植酸酶作物的安全性也是植酸酶植物基因工程面临的重要问题。

2.3.2 应用前景: 虽然植酸酶植物基因工程还存在问题, 但由于在植物中表达可直接饲用的植酸酶, 免去了用基因工程菌生产植酸酶的烦琐的中试生产工艺及植酸酶制剂耐热保护措施, 使生产植酸酶的成本降到最低, 这将是植酸酶应用的最好方法。植物是一种多样化、低成本和可再生的材料资源, 而生物技术的发展则使我们进一步拓宽了植物的使用范围。由于利用转基因植物生产的物质具有可直接食用的特点, 对于高度集约化的畜牧业生产非常便利, 在畜牧生产和动物疾病防治中具有重要的生产应用价值。随着基因工程领域研究的进展, 利用转基因植物作为生物反应器生产外源蛋白质将会有更广阔的前景。

### 参考文献

- [1] 王红宁, 黄勇, 陈惠, 等. 国外畜牧学——饲料, 1999, 3: 9~10.
- [2] Cant, AH, 徐百志. 中国饲料, 1993, 1: 40~43.
- [3] 罗绪刚, 刘彬. 饲料营养研究进展. 北京: 亚洲中医杂志社, 1998. 77~86.
- [4] 武素平. 中国饲料, 1996, 10: 25~26.
- [5] Shieh T R, Ware J H. *Appl. Microbiol*, 1968, 16: 1348~1351.
- [6] Ashok P A, George S, Carlos R S, et al. *Bioresource Technology*, 2001, 77: 203~214.
- [7] Kerovuo J, Lauraeus M., Nurminen, P, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2079~2085.
- [8] Kerovuo J, Tynkkynen S. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30: 325~329.
- [9] Kim Y O, Kim H K, Bar K S, et al. *Enzyme Microbiol Technol*, 1998a, 22: 2~7.
- [10] Kim, Y O, Lee J K, Kim H K, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1998b, 162: 185~191.
- [11] Bing L L, Amjad R, Yew M Tm, et al. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22: 415~424.
- [12] Laura B, Jonathan J S, Pushpalatha P N. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1489~1495.
- [13] Carla E H, Elizabeth A G. *Plant physiol*, 2001, 126: 1598~1608.
- [14] 单安山, 王安, 徐奇友, 等. 东北农业大学学报, 2001, 42(4): 345~351.
- [15] Hara A, Ebina S KA, Funaguma T. *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 3539~3544.
- [16] Jonathan J S. *Plant physiol*, 1991, 95: 1298~1301.
- [17] Bitar K, Reinhold J G. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 268: 442~452.
- [18] 王红宁, 马孟根, 吴琦, 等. 菌物系统, 2001, 20(4): 486~493.
- [19] Yanming H, David B, Wilson, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5): 1915~1918.
- [20] Randym. B, Michael W R, Kimberlym B, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(11): 4423~4427.
- [21] 王文兵, 姚斌, 肖庆利, 等. 生物工程学报, 2003, 19(1): 112~115.
- [22] Tye A J, Siu F K, Leung T Y, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(2-3): 190~197.
- [23] Golovan S, Wang G, Zhang J, et al. *Can J Microbiol*, 2000, 46(1): 59~71.
- [24] Pan J, Verwoerd T C, Paridon P A V, et al. *Biotechnol*, 1993, 11(6): 811~814.
- [25] Verwoerd T C, Paridon P A, Van Ooyen A J, et al. *Plant physiol*, 1995, 109: 1199~1205.
- [26] Van Ooyen A J J. US Patent, 5770413, 1998.
- [27] Ponstein A S, Bacc J B, Verwoerd J C, et al. *Molecular Breeding*, 2002, 10: 31~44.
- [28] Jia L, Cala E H, Regina W H, et al. *Plant physiol*, 1997, 114: 1103~1111.
- [29] Brinch P H., Olesen A, Bassmussen S K, et al. *Mol Breed*, 2000, 6: 195~206.
- [30] 皮灿辉, 易自力, 王志成. 中国生物工程杂志, 2003, 1: 1~4.
- [31] 张艳化, 季静, 王罡. 作物杂志, 2003, 6: 4~7.