

中性植酸酶结构与功能关系研究进展

许伟,邵荣,余晓红,仇明,封功能

(盐城工学院 化学与生物工程学院,江苏 盐城 224051)

摘要:中性植酸酶是一种新型、绿色环保的饲料用酶。从中性植酸酶的微生物来源、酶学性质、序列结构特点及分子改造研究等方面进行综述,以期改善中性植酸酶的热稳定性及催化活性提供参考。

关键词:中性植酸酶;结构;功能

中图分类号:Q81 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-5322(2010)04-0009-04

植酸酶(Phytase)即肌醇六磷酸酶(Myoinositol hexaphosphate phosphohydrotase),是催化植酸及其植酸盐水解产生肌醇和磷酸(或者磷酸盐)的一类酶的总称^[1]。由于其能降解植物性饲料中的植酸盐类释放出无机磷酸,对于提高饲料中磷的利用率,减轻因动物高磷粪便所导致的环境污染有着极其重要的意义。近年来我国迅猛发展的水产养殖业已经成为水体污染的一个重要因素,2008年初我国修订了水污染防治法,其中强调了对水产养殖污染防治的力度。然而,传统的酸性植酸酶,不适用于我国水产养殖量最大无胃的鲤科鱼类。因此,中性植酸酶的开发和应用引起了越来越多的科研关注^[2]。本文从中性植酸酶的来源、酶学性质、序列结构特点及分子改造方面进行综述,以期改善中性植酸酶的热稳定性及其蛋白质工程研究提供参考。

1 中性植酸酶的来源及酶学性质

来源于芽孢杆菌的植酸酶属于中性植酸酶,其可在pH为中性的肠道中起作用,有效弥补了酸性植酸酶的不足,拓宽了植酸酶的应用范围^[3]。当前,国内外关于中性植酸酶的研究主要集中在产酶菌筛选和基因工程菌的构建方面^[4]。2001年中国农业科学院饲料研究所和生物技术研究所合作,从枯草芽孢杆菌中提取中性植酸酶,获得初步成功^[5]。姚斌^[6]等进一步对此菌株进

行了克隆并在大肠杆菌中表达。Kim等^[7]用带有诱导型T7启动子的pET22b(+)质粒构建了*Bacillus sp.* DS11的表达载体,在大肠杆菌中经IPTG诱导3h,表达量为出发菌株的50倍,并证明乳糖是工业发酵生产植酸酶的诱导剂。陈艳等将来源于淀粉液化芽孢杆菌的植酸酶在大肠杆菌中进行了表达^[8],结果发现重组酶最适pH值为7.5,最适温度为70℃,37℃时以植酸钠为底物的米氏常数 K_m 值为0.32 mmol/L,单位发酵液工程菌的植酸酶活性为480.6 U/mL,为出发菌株的1.27倍。李朝霞等^[9]从自然界中筛选到高产中性植酸酶的地衣芽孢杆菌,并对其产酶的培养条件进行了研究。目前已分离出多种产中性植酸酶的芽孢杆菌,主要是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、淀粉液化芽孢杆菌及其它菌株等。已经获得的部分中性植酸酶的来源及性质见表1。

表1 部分中性植酸酶来源及酶学性质

Table 1 The sources and properties of neutral phytase

来源	分子量 kDa	最适温度 ℃	最适 pH
<i>Bacillus licheniformis</i> ^[10]	47.0	65	6.0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ^[11]	41.7	55	7.0
<i>Bacillus sp</i> KHU-10 ^[12]	46.0	60	6.5
<i>Bacillus subtilis</i> ^[13]	36.5	55	7.0
<i>Bacillus subtilis</i> VTT E-68013 ^[14]	42.0	55	7.0
<i>Pedobacter nyachensis</i> ^[15]	38.0	45	7.0
<i>Bacillus sp</i> DS11 ^[8]	36.5	55	7.0

收稿日期:2010-07-10

基金项目:江苏省普通高校自然科学研究资助项目(09KJB530011)

作者简介:许伟(1976-),女,山东德州人,副教授,博士,主要研究方向为酶工程。

另外,中性植酸酶的热稳定性比传统的酸性植酸酶要好,而且 Ca^{2+} 对其有明显的激活作用。如在芽孢杆菌植酸酶中加入乙二胺四乙酸(EDTA)等螯合剂很容易导致其失活。去除了钙离子的芽孢杆菌植酸酶脱辅基酶与相同浓度的各种二价阳离子(Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+})的氯化物室温培育过夜,结果表明只有钙离子可以部分恢复植酸酶的活性,即恢复了植酸酶酶活的这种脱辅基酶与金属离子之间的相互作用具有离子特异性^[16]。

2 中性植酸酶催化机理

植酸酶水解植酸是分步进行的,水解反应如图 1 所示。植酸酶将植酸分子的磷酸基团逐个切下,形成肌醇五磷酸酯至肌醇-磷酸酯的不同的中间产物,最终产物是肌醇三磷酸与一些无机磷酸^[16]。但不同来源的植酸酶其作用机理不完全相同。Kerovu 等^[17]利用高效液相色谱法(HPLC)分析了芽孢杆菌 phyC 酶学反应产物,并结合计算

机模拟得到了植酸酶水解植酸的模型。研究表明芽孢杆菌植酸酶只水解植酸中的 3 个磷酸基团,并且趋向于水解每 2 个相邻磷酸基团中的一个,从而产生两种不同的三磷酸肌醇终产物:2,4,6-三磷酸肌醇和 1,3,5-三磷酸肌醇。

植酸首先通过第 2 位和第 4 位磷酸结合在酶的裂缝侧翼,第 3 位磷酸因面对活性部位而被切割,释放出肌醇-1,2,4,5,6-五磷酸中间产物;接着肌醇五磷酸再通过第 2 位和第 6 位结合至裂缝侧翼,第 1 位磷酸基团面对活性部位而被切割,形成肌醇-2,4,5,6-四磷酸;同理,上述肌醇四磷酸仍然能结合到植酸酶的裂缝侧翼,第 5 位磷酸基团面对活性部位被切割后形成-2,4,6-三磷酸;而肌醇-2,4,6-三磷酸已没有磷酸面对活性位点,因此成为植酸水解的终产物。同理,如果植酸是通过第 1 位和第 3 位磷酸基团结合到植酸酶裂缝侧翼,植酸水解终产物将为肌醇-1,3,5-三磷酸^[18,19]。

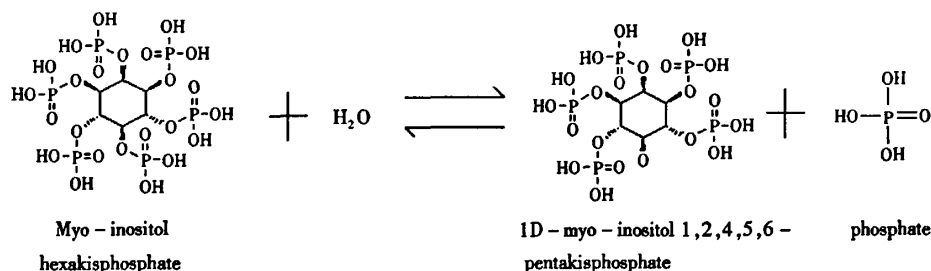


图 1 植酸水解反应

Fig. 1 The hydrolysis reaction of phytic acid

3 中性植酸酶的序列及结构特点

从生物信息学数据库分析,水解植酸的酶可分为 3 类:组氨酸酸性磷酸酶(histidine acid phosphatase)、 β 螺旋植酸酶(β -propeller phytase)和紫酸磷酸酶(purple acid phosphatases)^[20]。目前发现的中性植酸酶属于其中的 β 螺旋植酸酶。迄今为止,Swiss-prot 数据库中已经报道了近 40 条中性植酸酶的序列,这些序列与酸性植酸酶具有显著区别。中性植酸酶与酸性植酸酶相比,蛋白的分子量较小,二者的氨基酸序列也没有同源性。中性植酸酶也不具有酸性植酸酶普遍存在的活性位点保守序列 RHCXRX^[21]。

2000 年,韩国的 Ha 等^[22]运用 X-射线衍射方法测定了淀粉液化芽孢杆菌植酸酶在 Ca^{2+} 满负荷的情况下的晶体结构。结果发现该酶与已经发现的酸性植酸酶结构上不具有同源性,是一种新型的植酸酶。其结构的形状很像螺旋桨,周围分布有 6 个叶片。每个叶片都是一个高度弯曲的薄片,由 4-5 个联结方式完全相同的反螺旋 β -折叠束组成,因此将该酶命名为 β 螺旋植酸酶。研究结果还发现在有 Ca^{2+} 存在的情况下中性植酸酶热稳定性会进一步提高,Ha 等还在一定程度上解释了高温下 Ca^{2+} 对某些植酸酶的保护作用,但这是否是直接影响酶热稳定性的原因,还需要进一点证实。中性植酸酶结构如图 2 所示。



图2 中性植酸酶晶体结构(PDB ID:1H6L)

Fig.2 The structure of neutral phytase(PDB ID:1H6L)

4 运用定点突变方法改造中性植酸酶的研究

目前,中性植酸酶在应用过程中还存在一些问题,其中较为突出的就是该酶在高温制粒杀菌工艺中活力损失较大,因此获得高热稳定性及高活性的中性植酸酶是近年来的研究热点和难点。利用现代基因工程方法对现有的优良菌株进行活性及热稳定性方面的改造,是获得热稳定性突变株的便捷途径^[23-25]。

对于中性植酸酶分子改造方面,科研人员也进行了一定的研究。Oh等^[26]对 *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 植酸酶进行了一系列的单点突变研究。结果发现突变酶D314A、E211A、

E260A 和 Y159F 丧失活性;突变酶 D258A、D55A、E227A、K76E、K76R、R122E、R122K 和 Y159A 的转换数分别只有野生酶的20.87%、0.21%、9.29%、0.26%、0.3%、48.81%、17.11%和0.19%。最近,Tung等^[27]运用定点突变方法对 *Bacillus licheniformis* 植酸酶的热稳定性进行了有效的改善。结果表明,突变酶/H32P/S256P/K304P/K324P/S353P 与野生酶具有类似的 K_m , k_{cat} 和最适的 Ca^{2+} 浓度,其中 G117A/G266A 的热稳定性有大幅上升。

5 展望

中性植酸酶作为一种新型绿色饲料添加剂,在推广应用上具有极其广阔的空间。本文对中性植酸酶的来源、性质、序列、结构及分子改造等方面进行了较全面的综合,将会为理解植酸酶的结构与功能关系提供极有价值的参考。从目前研究水平来看,科研人员虽然对改造中性植酸酶的热稳定性进行了探索,但仍未找到提升其热稳定的普遍有效的方法。因此,进一步加强中性植酸酶结构与功能关系的研究,对于提升其催化性能和稳定性具有极其重要的意义。本课题组已经从淀粉液化芽孢杆菌中克隆到新型的中性植酸酶的基因,该基因已在 GenBank 上登录(登录号为 HM747163)。目前正在积极开展利用基因工程方法改造其综合催化性能的研究,相信随着蛋白质相关理论及技术的不断完善,中性植酸酶在水产饲料中的应用会越来越多,将为缓解我国水体的磷污染现状做出积极的贡献。

参考文献:

- [1] Fu S, Sun J, Qian L, et al. *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives[J]. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2008,151(1):1-8.
- [2] Jorquera M, Martínez O, Maruyama F, et al. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria[J]. *Microbes and Environments*, 2008,23(3):182-191.
- [3] 许晖,曹珂珂,王娜,等.微生物植酸酶的研究进展[J]. *农产品加工*, 2008,148(9):17-21.
- [4] 吴琦. 枯草芽孢杆菌植酸酶 phyC 基因的克隆及其表达研究[D]. 成都:四川大学,2004.
- [5] 王亚茹,姚斌,曾虹,等. 枯草芽孢杆菌中性植酸酶的纯化和酶学性质[J]. *微生物学报*, 2001,41(2):198-203.
- [6] 姚斌,袁铁铮,王元火,等. 来源于 *Bacillus subtilis* 的中性植酸酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *生物工程学报*, 2001,17(1):11-15.
- [7] Kim Y O, lee J K, Kim H K, et al. Cloning of the thermostable phytase gene(p. hy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbial lett*, 1998,162(1):185-191.
- [8] 陈艳,孙建义,赵学新,等. *Bacillus amyloliquefaciens* 中性植酸酶基因的原核表达及蛋白纯化和性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2005,24(2):60-65.

- [9] 李朝霞,王爱民,李小敏. 中性植酸酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 633 - 641.
- [10] Yye A J, Siu F K, Leung T Y, et al. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus licheniformis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(2): 190 - 197.
- [11] Elkhaili E A, Maenner K, Borris R, et al. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens[J]. Sci, 2007, 48(2): 64 - 70.
- [12] Choi Y M, Suh H J, Kim J M. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU - 10[J]. Protein Chem, 2001, 20: 287 - 292.
- [13] Powar V K, Jagannathan V. Purification and properties of phytate specific phosphatase from *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 1982, 151: 102 - 108.
- [14] Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, et al. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2079 - 2085.
- [15] Huang H Q, Shao N, Wang Y R, et al. A novel beta - propeller phytase from *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC2503 with potential as an aquatic feed additive[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83: 249 - 259.
- [16] 吴琦,刘世贵,王红宁. 芽孢杆菌植酸酶研究进展[J]. 中国饲料, 2003, 12: 11 - 14.
- [17] Kerovuo J, Rouvinen J, Hatzack F. Analysis of myo - inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus subtilis*; indication of a novel reaction mechanism[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 2 - 7.
- [18] 付石军,孙建义. 中性植酸酶分子生物学研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(16): 21 - 22.
- [19] Shin S, Ha N C, Oh B C, et al. Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase[J]. Structure, 2001, 9(9): 851 - 858.
- [20] 范继英,何秋月. 枯草芽孢杆菌植酸酶的研究进展[J]. 云南大学学报, 2006, 21(6): 715 - 720.
- [21] Van Hartingsveldt M, Van Zeijl C M J, Hartevelde G M, et al. Cloning, characterization and overexpression of the phytase encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*[J]. Gene, 1993, 127: 87 - 94.
- [22] Ha N C, Oh B C, Shin S, et al. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium - loaded states[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7(2): 147 - 153.
- [23] 姚斌,范云六. 植酸酶的分子生物学与基因工程[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 1 - 5.
- [24] 陈惠,王红宁,杨婉身,等. 植酸酶 PhyA 基因结构延伸突变改善酶的热稳定性[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 983 - 987.
- [25] 谷维娜,杨培龙,姚斌,等. *Aspergillus fumigatus* 来源植酸酶的 Q23L, Q23LG272E 突变研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 273 - 277.
- [26] Oh B C, Chang B S, Park K H, et al. Calcium - dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11[J]. Biochemistry, 2001, 40: 9669 - 9676.
- [27] Tung E T, Ma H W, Cheng C, et al. Stabilization of beta - propeller phytase by introducing Xaa - > Pro and Gly - > Ala substitutions at consensus positions[J]. Protein Pept Lett, 2008, 15: 297 - 299.

The Progress in the Relationship of Structure and Function of Neutral Phytase

XU Wei, SHAO Rong, YU Xiao-hong, QIU Ming, FENG Gong-neng

(School of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Jiangsu Yancheng 224051, China)

Abstract: The neutral phytase is a green environment protection enzyme used in animal feed. The microbiology sources, properties, characteristic in sequence and structure and protein engineering in thermostability were reviewed in this paper. This paper will provide the important information for the improvement of the activity and thermostability of neutral phytase.

Keywords: neutral phytase; structure; function

(责任编辑:范大和;校对:沈建新)