

· 综 述 ·

几丁质酶的研究进展

糜艳霞, 任 慧, 张 常, 刘建红, 范晓军*

(太原理工大学 化学化工学院, 中国山西 太原 030024)

摘 要: 几丁质是自然界中含量仅次于纤维素的第二大类多糖, 已从各种细菌、真菌、植物、哺乳动物和昆虫中分离并鉴定出来。随着近年来对几丁质及其衍生物的了解, 发现此类多糖的物理化学特性在现实中有非常广泛的应用。几丁质酶是一类分解几丁质的酶, 广泛分布于细菌、真菌、植物、哺乳动物、昆虫等物种中, 并发挥着重要作用。近年来国内外工作者对这些不同来源的几丁质酶做了深入研究, 为其在医学和农业上更广泛的应用提供理论基础。

关键词: 几丁质; 几丁质酶; 分类; 功能; 应用

中图分类号: Q556+.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)05-0437-07

Advances in Study and Application on Chitinase

MI Yan-xia, REN Hui, ZHANG Chang, LIU Jian-hong, FAN Xiao-jun*

(College of Chemical Engineering and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China)

Abstract: Chitin is the second largest polysaccharide after the cellulose in nature and it has been isolated and identified from a variety of bacteria, fungi, plants, mammals and insects. With the new understanding of chitin and its derivatives, their physical and chemical properties have been found possessing a broad possibility of applications in reality. Chitinase is a class of chitinolytic enzymes, which widely distributed in bacteria, fungi, plants, mammals and insects and plays important roles. Recent study of chitinases derived from different sources have provided theoretical basis for its further application in medical and agricultural areas.

Key words: Chitin; Chitinase; classification; function; application

(Life Science Research, 2015, 19(5): 437~443)

1 几丁质和几丁质酶

1.1 几丁质

几丁质, 又称甲壳素或甲壳质, 是由 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)通过 β -1,4 糖苷键连接而成的线性多糖, 是地球上仅次于纤维素的第二丰富的生物聚合物^[1], 已在昆虫、真菌、藻类、螃蟹、虾的外骨骼以及其他无脊椎动物的内部结构中发现^[2]。它存在 3 种形式, 分别为 α -几丁质、 β -几丁质和 γ -几丁质, 这些不同形式的几丁质在组装和相邻链的极化方面有所不同^[3]。 α -几丁质是其主要的存在形式, 由 N-乙酰葡萄糖胺以反向平行的方式线性排列而成, β -几丁质是由两条同向平行链

排列形成的, 而 γ -几丁质则是由 3 条链组成, 两条同向, 一条反向^[4]。

1.2 几丁质酶

1.2.1 生物体中的几丁质酶

几丁质酶是一类可水解几丁质的大小从 20 kD 到 90 kD 变化的糖基水解酶^[2]。其广泛存在于生物体中, 如细菌、真菌、酵母、植物、放线菌、节肢动物和人类等。这些生物中都含有多个编码几丁质酶的基因, 如大多数丝状真菌中都含有 10~20 个不同的几丁质酶基因, 而真菌寄生虫体内会含 30 个甚至更多的基因^[5]。Hossain 等也已报道在拟南芥中也含有大量的几丁质酶基因^[6]。这些基因编码的几丁质酶通过协同作用降解几丁质, 但并

收稿日期: 2014-12-17; 修回日期: 2015-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101490)

作者简介: 糜艳霞(1990-), 女, 山西忻州人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究; * 通讯作者: 范晓军(1980-), 男, 山西运城人, 太原理工大学副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: fxjbio@163.com。

非所有基因编码的几丁质酶蛋白均有活性。有些植物、无脊椎动物和高等动物的基因会编码类几丁质酶,这类蛋白关键催化残基的替换导致酶活的丧失^[7],但仍可结合几丁质。近年来对于几丁质酶的研究越来越深入,从最初 1905 年 Benecke 首次分离了可利用几丁质作为营养物质的微生物并命名为 *Bacillus chhinovorius* 之后^[8],对几丁质酶的研究不断深入,目前为止已有 10 多种几丁质酶的三维结构可在 NCBI 数据库中检索到,如真菌粗球霉菌分泌的几丁质酶和橡胶树几丁质酶 Hevamine 的三维结构等。

1.2.2 几丁质酶的分类

根据几丁质酶作用时的切割位点不同,可将几丁质酶分为内切几丁质酶和外切几丁质酶两大类。内切几丁质酶在几丁质内部随机切割,主要作用于几丁质内部的 β -1,4-糖苷键,从而形成二乙酰壳二糖和可溶的低分子壳寡糖如壳三糖和壳四糖等^[9]。外切几丁质酶分为两类:催化几丁质从非还原性末端释放二乙酰壳二糖的几丁质水解酶^[10],以及可以分解内切几丁质酶产生的低聚物为 N-乙酰葡萄糖胺的 β -1,4-葡萄糖苷酶^[9]。一般情况下几丁质的内切酶和外切酶是同时作用的。

基于各种生物几丁质酶催化区氨基酸的同源性,可将几丁质酶分为两个家族,18 家族和 19 家族的糖苷水解酶^[11]。但近年来,确定了一些几丁质酶属于 20、23 家族和 48 家族的糖苷水解酶。18 家族几丁质酶在生物体中广泛分布,包括细菌、真菌、植物、哺乳动物、昆虫和病毒等,而 19 家族的几丁质酶在植物中局限存在,仅在一些病毒、细菌、线虫和蛛形纲动物中有报道过,20 家族几丁质酶包括人类和链霉菌属中的几丁质酶。

2 各类几丁质酶

2.1 细菌几丁质酶

一些细菌可以产几丁质酶,如链霉菌属、交替单胞菌属、埃希氏菌属、气单胞菌属。目前已从土壤、贝类废弃物、花园和温泉等地方分离得到几丁质酶产生菌。这些细菌几丁质酶的相对分子质量范围为 20~60 kD^[12],一般包含多个功能区域,从 N 端到 C 端依次为信号肽区、催化区、几丁质结合区和一个短的 C 端区域^[13]。其中,一些细菌中的几丁质结合区对于不溶性几丁质的降解的重要性已得到证实。

大部分的细菌几丁质酶已经分离并测序,包含了 18、19 和 23 家族的糖苷水解酶,且大多属

于 18 家族糖苷水解酶,而 19 家族几丁质酶仅局限于放线菌和紫细菌中,如从灰色链霉菌 I-IUT6037 中分离出的几丁质酶^[14]。目前为止仅确定了一种分离自细菌的鹅型溶菌酶属于 23 家族糖苷水解酶^[15]。根据序列同源性,细菌 18 家族几丁质酶又可分成 A、B、C 三类亚族^[16]。

在分解几丁质的细菌中,自身并不合成几丁质、壳寡糖等,几丁质酶可分解一些几丁质作为碳源和氮源的原料。链霉菌属可将不溶性几丁质转化为可溶性的,这些可代谢的几丁质是通过不同的几丁质酶和可吸附几丁质的几丁质结合蛋白共同作用而分解的。几丁质酶还可为细菌生长提供必不可少的营养物质。例如,疏螺旋菌体本身不能合成其细胞壁合成所必需的 N-乙酰葡萄糖胺,但可通过分解其寄主围食膜中的几丁质得到丰富的 N-乙酰葡萄糖胺^[17]。一些几丁质酶还参与了细菌的发病机制,如耶尔森菌在感染昆虫时,会产生 A、B、C 3 种复合毒素蛋白,从而在感染后 72 h 内将宿主杀死。研究表明,复合物中含两种几丁质酶活性亚基,它可协助毒素结合和渗透到围食膜里^[18]。在一些不含几丁质的宿主细胞内,细菌几丁质酶也可通过结合到另一种替代底物,如免疫相关的免疫糖蛋白的碳水化合物来增强细菌毒力^[19]。因此,一些细菌的几丁质酶可用于通过水解真菌细胞壁的几丁质来阻止其生长,从而生物防治由不同真菌引起的植物疾病^[20]。细菌几丁质酶还可作为食物和种子防腐剂,也可使工程植物抵抗植物病原菌^[21]。对细菌几丁质酶热稳定性的研究表明,在 4~60 °C 范围内均有较好的热稳定性,这对于其在生物技术产业应用方面有重大的应用潜力^[22]。与此同时,仍有一些细菌几丁质酶存在酶活相对较低的问题,不能很好地应用于实际生产中,如维氏气单胞菌几丁质酶 ChiC。有相关研究表明,几丁质结合蛋白 CBP21 可促进 ChiC 降解胶体几丁质的能力,从而突破了该几丁质酶酶活较低的应用瓶颈^[23]。

2.2 真菌几丁质酶

几丁质是真菌细胞壁的主要成分。真菌几丁质酶是一种诱导酶,几丁质及其可溶性衍生物和一些病原真菌细胞壁均可作为诱导物诱导真菌产生几丁质酶。其基本结构包括 5 个结构域区域:催化结构域、N-末端信号肽区域、几丁质结合结构域、丝氨酸/苏氨酸丰富区和 C-末端延伸的区域^[24]。然而,在部分真菌几丁质酶中虽然没有丝氨酸/苏氨酸丰富区,几丁质结合结构域和 C-末端

延伸区域,但它们仍有几丁质酶活性,推测这几个结构域并不是几丁质酶活性所必需的。

真菌几丁质酶大多属于18家族糖苷水解酶,且具有较高的氨基酸同源性。基于真菌几丁质酶的序列相似性,可将其再分为A、B、C 3个亚类。A亚类仅包含了一个催化区,且没有几丁质结合区,但是几丁质可结合在其蛋白结构中的一个较深的几丁质结合裂缝内;B亚类除了催化区以外,还有一个C末端的几丁质结合区和富含丝氨酸或苏氨酸的区域;C亚类几丁质酶是由一个N末端的几丁质结合区和一个C末端的催化区所组成的。与A亚类相似,C亚类有一个深而窄的几丁质结合裂缝。

真菌几丁质酶在真菌的营养、形态变化和发育过程中都有重要作用。例如,通过破坏酿酒酵母中的几丁质酶基因(CTS1)可导致细胞分裂和细胞聚集后分离不能正常进行,从而影响裂殖酵母的正常形态变化^[25]。由于几丁质酶可作为丝状真菌和寄主病原物相互作用的蛋白,已成为生物防治的热点。研究表明转真菌几丁质酶作物具有较高的抗病性,可以增加植物抗病虫能力。哈茨木霉的chi42基因编码的几丁质酶,对一些植物病原性真菌有很强的抗真菌活性,并已在苹果、烟草和马铃薯中表达,这些转基因植物表现出对植物病原真菌很高的抗性^[26]。另外在转基因水稻中,可提高水稻纹枯病抗性^[27],转入柠檬可提高真菌抗病能力^[28]以及转入棉花中增加其对黄萎病的抗性^[29]。此外,由于较难检测到真菌早期感染,所以真菌感染是免疫发育不全病人的主要致死原因^[30]。目前已经提出了利用放射性标记几丁质酶和几丁质结合蛋白来做真菌感染的早期检测方法^[31]。

2.3 植物几丁质酶

植物几丁质酶存在于植物的茎、种子、花中,它们对发育的调节存在组织特异性。大多植物几丁质酶相对分子质量都比昆虫几丁质酶相对分子质量小,其中最小的几丁质酶大小为22 kD^[32]。

根据氨基酸序列的不同,可将植物几丁质酶分为4类。I类几丁质酶是由N端几丁质结合区,中间交联区和催化区3个区域组成;II类仅含催化区;III类与I、II类没有同源性;IV类与I类相似,但在几丁质酶结合区处有一处缺失,在催化区有约22个氨基酸的缺失,而且C端延伸区也不完整。

植物几丁质酶是防御病原菌和外界不良环境的重要蛋白,包括水解酶、酶抑制剂、膜透多肽等。植物几丁质酶的产生可能是受到植物病原菌体侵

害时为自我保护而产生的,也可能是接触到壳寡糖或生长调节剂如乙烯等诱导剂产生的^[33];还有一些几丁质酶是由于存在环境压力,如高盐、寒冷、干旱等不良环境下产生的。一些几丁质酶类蛋白缺少抗菌活性,但可能在植物生长中一些重要的生理过程中起重要作用,如胚胎发生和乙烯的合成^[34]。几丁质酶还是一种主要的发病机理相关的多肽蛋白,存在于受感染的植物组织细胞外。由于植物几丁质酶在抵抗含几丁质病原菌方面的重要性,人们开始研究转基因植物表达几丁质酶,从而增加植物抗性^[35]。近年来,人们转向研究几丁质与抗体激酶结合启动植物抗病信号转导途径,以提高植物抗病性^[36]。为了更好地利用植物几丁质酶,从分子生物学方向研究就很有必要,目前克隆得到的几丁质酶基因约300个,但比对发现这些基因的同源性并不高,进而没有相对保守的区域,使得植物几丁质酶基因在克隆中存在一定的困难,因而在植物基因工程中可利用的几丁质酶基因较少^[37],近几年国内外研究者开始对植物来源的几丁质酶基因进行克隆和表达及蛋白构象进行深入研究,为进一步研究该几丁质酶奠定了基础^[38-41]。

2.4 哺乳动物几丁质酶

哺乳动物几丁质酶属于18家族的糖苷水解酶,它可分为没有活性的类几丁质酶相似蛋白和有活性的几丁质酶。18家族几丁质酶的N-末端是 β/α 组成的8倍体桶状结构,包含了一个保守的氨基酸区,DXXDXDXE,构成了酶的活性位点。研究表明,谷氨酸是水解几丁质 β -1,4糖苷键的关键残基^[42]。

哺乳动物几丁质酶分为壳三糖苷酶、酸性哺乳动物几丁质酶以及一些类几丁质酶蛋白。壳三糖苷酶是第一个发现的哺乳动物几丁质酶,由戈谢病人的巨噬细胞产生的^[43]。后来的研究表明,约5%的白人都缺乏有活性的壳三糖苷酶,表明这个酶并不是先天性免疫应答的直接效应物^[44]。在壳三糖苷酶发现后几年,第二种叫做酸性哺乳动物几丁质酶被分离出来,这种酶主要在老鼠和人类的胃肠道和肺中产生^[45]。最近对蝙蝠的研究表明,酸性哺乳动物几丁质酶在食虫性的哺乳动物中有降解几丁质的作用^[46]。除了编码有活性的几丁质酶外,哺乳动物还编码没有活性的几丁质酶类蛋白,目前已有3种人类几丁质酶类蛋白被确定。

在几丁质较少的哺乳动物中,几丁质酶可用来调节免疫反应^[47]。自从已知哺乳动物几丁质酶有抗真菌特性以来,人们一直认为它可以抵御含

几丁质的真菌,这一理论目前已被许多研究所证实。还有人提出酸性哺乳动物几丁质酶可能具有先天免疫和降解几丁质的双重功能。壳三糖和酸性哺乳动物几丁质酶可能都与结膜炎、鼻息肉、淋巴组织肿大、神经骨髓炎和胃炎等相关。几丁质酶类蛋白的生物学功能还没有被确定,它们可能参与了组织重构、营养和先天免疫。王曼等利用实时定量 PCR 技术,对鼻息肉患者组织研究表明,酸性哺乳动物几丁质酶中的表达量明显高于未患鼻息肉的对照组,推测该酸性哺乳动物几丁质酶基因的表达量可作为鼻息肉预后判断参考指标^[48]。研究表明,酸性哺乳动物几丁质酶样蛋白 YKL-40 在子宫内膜异位症患者异位内膜腺体的上皮细胞胞质中,子宫腺肌病在位内膜、异位内膜腺上皮细胞胞质以及卵巢癌、子宫内膜癌组织中表达量都相对正常人较高,可作为这些相关妇科疾病的预后^[49]。

2.5 昆虫几丁质酶

在昆虫中,除了在酸模叶甲中发现的昆虫几丁质酶属于 48 家族糖苷水解酶外^[50],其他昆虫几丁质酶均属于糖苷水解酶的 18 家族,且大多为内切酶,几乎分布在所有的昆虫目中,已在各种双翅类、鳞翅类、鞘翅类、膜翅类以及半翅类昆虫中报道过,几丁质酶的结构均由催化区、富含半胱氨酸的几丁质酶结合区,以及富含丝氨酸或苏氨酸的连接区构成的模块结构组成。

昆虫几丁质酶在进化过程中形式变化多样,包含 8 种不同的结构,他们在基本结构和区域排列上都有所不同。这个分类主要是以疟蚊、冈比亚按蚊、黑腹果蝇以及赤拟谷盗的催化区蛋白氨基酸序列为基础划分的。然而,近期豌豆长管蚜中基因组编码的催化区序列修正了这个分类的范围;并且来自更多昆虫种类的催化区序列分析结果不能很好地支持 IV、VI、VII 型几丁质酶^[51]。I 型几丁质酶仅含 1 个信号肽区、1 个催化区、1 个富含丝氨酸、苏氨酸的连接区和 1 个几丁质酶结合区。II 型几丁质酶明显比 I 型大的多,因为包含了 1 个信号肽区、4~5 个催化区、4~7 个几丁质酶结合区。III 型几丁质酶是由 1 个 N 端跨膜螺旋、2 个相邻的催化区和 1 个 C 端的几丁质酶结合区构成。IV 型几丁质酶是由 1 个 N 端信号肽区和 1 个催化区组成的。V 型几丁质酶通常有 1 个 N 端信号肽和 1 个催化区,缺少几丁质酶结合区。成虫盘生长因子就属于这一类,它对成虫盘细胞增殖、极化和运动性都是必需的。VI 型几丁质酶和

I 型几丁质酶很相似,但其 C 末端的丝氨酸或苏氨酸富含区域高度糖基化,可能起到保护与其结构相似的几丁质酶不被蛋白酶所降解的作用。VII 型几丁质酶整体结构都与 IV 型几丁质酶相似,它有 1 个 N 末端信号肽区和催化区,但缺乏几丁质酶结合区。VIII 型几丁质酶有 1 个催化区,但缺少信号肽区和几丁质酶结合区,其信号肽区被一个跨膜区所取代,表明 VIII 型几丁质酶是一种膜相关蛋白。

几丁质酶在这些昆虫中的最基本功能就是改变几丁质结构、先天免疫和发育。人们已对烟草天蛾和家蚕中的昆虫几丁质酶做了相关研究。研究表明,昆虫几丁质酶在几丁质代谢,尤其蜕皮过程中起着非常重要的作用。内切酶将昆虫表皮分解为壳寡糖,然后再由外切酶水解为 N-乙酰葡萄糖胺,用以形成新的表皮^[52]。所以,昆虫在其变形过程中会产生几种功能特异的几丁质酶^[53]。在昆虫蜕皮阶段,新表皮的合成和旧表皮的降解是同时发生的,此时,保护新表皮不被几丁质酶和其他蜕皮酶降解就非常重要,这主要是通过特定的蛋白质与新合成的几丁质直接作用,并将其组织到薄层里以防御外界几丁质酶的降解^[54]。因而几丁质酶的前期表达应该得到很好的控制,若控制不当将严重影响昆虫的生长,甚至会致死。生物害虫防治就是利用这一机理而作用的。目前对昆虫几丁质酶的研究主要利用 RNA 干扰技术,发现昆虫几丁质酶家族成员对几丁质幼虫蜕皮、化蛹、成虫羽化和翅等发育阶段的影响^[55]。笔者课题组也对舞毒蛾几丁质酶做了相关研究,分别扩增其 I 型和 II 型几丁质酶,通过注射舞毒蛾成虫,观察各阶段的形态变化。还有对几丁质酶的体外表达、纯化和活性检测及基因克隆和诱导表达分析^[56,57],笔者实验室同时也对舞毒蛾 I 型几丁质酶利用 Bac to Bac 表达系统进行了体外表达、纯化以及酶学性质研究^[58]。黄海云等还对 6 种昆虫中的 131 条几丁质酶氨基酸序列进行同源性分析,得到了几丁质蛋白保守区域,并通过 PMAL 软件计算出几丁质酶的正向选择位点,并发现了一种新的几丁质酶,即豌豆蚜虫中的 *A. pisum xp003243674.1*^[59]。近年来对昆虫几丁质酶的研究还有利用实时定量 PCR 对几丁质酶在昆虫体内各个发育阶段及组织表达量的研究,结果表明昆虫几丁质酶在昆虫中的表达还存在时空和组织特异性,如对冈比亚按蚊的研究表明,几丁质酶基因 *AgChit8* 在幼虫阶段不表达,主要在成虫和化

蛹阶段表达,而几丁质酶 *AgCht2* 和 *AgCht12* 主要在前肠中表达,而 *AgCht13* 却主要在中肠中表达^[60]。目前在对昆虫几丁质酶的时空表达研究中,大多处于研究幼虫、成虫和蛹等阶段,对卵中几丁质酶的表达相对较少,张建珍等就对飞蝗卵、幼虫及成虫各个时期的几丁质酶表达量做了相关研究,结果表明 *LmCHS2* 在卵发育的前期和中期均没有表达,却在后期表达量急剧上升^[61],冈比亚按蚊中 *AgCHS2* 在卵中的表达同样有相似规律^[62]。

3 功能

3.1 医学功能

几丁质酶降解几丁质后得到的产物壳寡糖在医学中有很大的应用潜能。它们可作为临床药物,如具有抗肿瘤活性的壳寡糖^[63,64]。N-乙酰葡萄糖胺本身就是一种消炎药,在人体中可由葡萄糖转化而来。Aloise 等已报道过通过口服、肌肉和静脉注射 N-乙酰葡萄糖胺可对溃疡性结肠炎和其它胃肠道炎症性疾病有效消炎。孔祥焯等制备的新型非对称完整糖膜,可作为创伤敷料,具有良好的通气性,并阻止外源性微生物的入侵^[65]。除此之外,壳聚糖还有抗菌、调节凝血功能。目前国内学者都开始尝试用壳聚糖开发研制止血敷料^[66]。褚薛慧等在寻找合适的肝脏组织工程支架材料时发现,壳聚糖有较好的生物相容性,且干细胞可在壳聚糖纳米材料表面形成球形聚集体^[67]。壳寡糖可作为植物抗病物质,康云艳等研究表明壳寡糖还可诱导植物对立枯病的抗性^[68]。基于几丁质及壳聚糖的这些生物性功能,发掘有用的几丁质生产原料就很有必要,研究表明家蝇蛆壳中含 95%几丁质,可作为生产几丁质的重要原料^[69]。

几丁质类衍生物也具有广泛的医药用途,目前已经知道,相当多的几丁质衍生物是无毒、非过敏性、生物相容性和生物可降解的^[70]。一些人造的医疗用品,如隐形眼镜、人工皮肤和手术针大多是用几丁质衍生物制成。

几丁质酶在人类保健中也有重要的作用。它的一个重要用途是在治疗真菌性疾病时,可增加抗真菌药物的抗性^[71]。许多证据表明,几丁质酶在哺乳动物宿主防御系统中起着重要的作用。例如,人类由于缺乏壳三糖,从而抑制了几丁质酶活,导致微丝蚴的感染速率增强,最终使寄生虫在宿主内迅速生长。重组人的壳三糖酶,就可抑制白色念珠菌菌丝形成,从而表现出抗真菌活性,

并降低实验小鼠在念珠菌病和曲霉病中的死亡率。Zhu 等还发现哮喘病人的上皮细胞和巨噬细胞中有大量的酸性哺乳动物几丁质酶,从而首次发现几丁质酶在哮喘中的重要作用^[72]。几丁质酶样蛋白(YKL-40)是一种新发现的炎症标志物,可通过调控机制重构,促进新生血管形成,保护细胞免受凋亡等机制从而有效发挥作用,已作为糖尿病及微血管并发症的标志物^[73]。

3.2 农业功能

几丁质酶不仅可将含几丁质的生物物质转化为有用的成分,而且在农业和蚊虫控制上有重要的作用。几丁质酶添加在杀虫剂和抗真菌剂里可有效增加药效,且使杀虫剂和抗真菌剂的用量达到最小,预防因为用药浓度过大而引起的对人体健康危害和环境破坏等问题^[74,75]。几丁质酶也可通过生物转化应用到化肥中。直接使用产生几丁质酶的生物或利用其产生的纯化蛋白,或通过基因调控可实现生物控制。几丁质酶的活性也可以作为土壤中真菌的活性的指标。Miller 等通过使用特定的甲基伞形基底物得出了几丁质酶的活性与真菌特异性指示剂磷脂脂肪酸和麦角固醇分子的含量的相关性^[76]。几丁质酶还可用作食品防腐剂,从而延长食品的保质期。

4 展望

虽然经过对几丁质长时间的研究,目前已取得了一些成果,已广泛应用于医药、化工、纺织、印染、造纸、功能食品以及环境保护等领域^[77],但是还有很大的研究空间。几丁质不仅可以作为能源物质,如近期对几丁质微生物肥料的研究,分解土壤中的几丁质,产生植物生长所需的碳源、氮源等^[78],还可以作为基因和药物的运送载体等新兴的纳米生物技术材料。但是利用酸碱法制备几丁质相关产品,易造成严重的环境污染,故研发新的生产工艺是目前的一个几丁质研究热点。另外,若想利用几丁质的机械性能,就应该不加任何化学修饰直接利用,为了达到这一目标,就应该对几丁质的基础性质做进一步研究。

目前对几丁质酶的研究也越来越多,但是其作用基质常被忽略,如果想要利用几丁质这一丰富的自然资源,从自然界中得到丰富的几丁质并进行几丁质的纯化以及利用几丁质生产新型材料将至关重要。对不同的几丁质酶的生物作用的理解将帮助我们进行疾病的早期检测以及开发新的

疾病治疗方法。但目前从自然界中分离的几丁质酶酶活不是太高,距离工业应用还有一定的距离,因而为了更进一步的应用几丁质酶,还需加强基础理论研究,并利用现代生物学技术对现有的几丁质酶进行定向改造或筛选出新的活性更强的几丁质酶,克隆到高效表达载体,甚至应用酶的诱导与阻遏机制等以适应工业化生产的需要。

参考文献(References):

- [1] 陈西广,刘万顺,刘晨光.几丁质的研究与进展[J].生物工程进展(CHEN Xi-guang, LIU Wan-shun, LIU Chen-guang. The study and progress of chitinase[J]. Progress in Biotechnology), 1997, 17(3): 5-9.
- [2] BHATTACHARYA D, NAGPURE A, GUPTA R K. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2007, 27(1): 21-28.
- [3] BUSSINK A P, SPEIJER D, AERTS J M F G, et al. Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases[J]. Genetics, 2007, 177(2): 959-970.
- [4] 王士奎,王汉潜.几丁质及脱乙酰几丁质的微生物降解作用[J].微生物学通报(WANG Shi-kui, WANG Han-qian. Microbial degradation of chitin and de-acetylation chitin[J]. Microbiology), 1994, 21(3): 180-183.
- [5] HARTL L, ZACH S, SEIDL-SEIBOTH V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 533-543.
- [6] HOSSAIN M A, NOH H N, KIM K I, et al. Mutation of the chitinase-like protein-encoding *AtCTL2* gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis seedlings*[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(8): 650-658.
- [7] ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S. Insect chitinase and chitinase-like proteins[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(2): 201-216.
- [8] 叶辉.粘质沙雷氏菌几丁质酶 *chiB* 基因的分离与表达分析[D].合肥:安徽农业大学研究生院(YE Hui. Isolation and expression of *Serratia marcescens* chitinase *chiB* gene[D]. Hefei: G-graduate School of Anhui Agricultural University), 2005.
- [9] SAHAI A S, MANOCHA M S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1993, 11(4): 317-338.
- [10] HARMAN G E, HAYES C K, LORITO M, et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase[J]. Phytopathology, 1993, 83(3): 313-318.
- [11] HENRISSAT B, BAIRÓCH A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1993, 293(3): 781-788.
- [12] SUZUKI K, SUGAWARA N, SUZUKI M, et al. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(5): 1075-1083.
- [13] 钟万芳,丁少军.细菌几丁质酶的结构与功能研究进展[J].江苏农业科学(ZHONG Wan-fang, DING Shao-jun. Advance in structure and function on chitinase of bacterial[J]. Jiangsu Agricultural Sciences), 2012, 40(4): 1-3.
- [14] OHNO T, ARMAND S, HATA T, et al. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(17): 5065-5070.
- [15] UEDA M, OHATA K, KONISHI T, et al. A novel goose-type lysozyme gene with chitinolytic activity from the moderately thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471: cloning, sequencing, and expression[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(6): 1077-1085.
- [16] LI H, GREENE L H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8654.
- [17] RHODES R G, ATOYAN J A, NELSON D R. The chitobiose transporter, *chbC*, is required for chitin utilization in *Borrelia burgdorferi*[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 21.
- [18] BUSBY J N, LANDSBERG M J, SIMPSON R M, et al. Structural analysis of *chil* chitinase from *Yersinia entomophaga*[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 415(2): 359-371.
- [19] CHAUDHURI S, BRUNO J C, ALONZO F, et al. Contribution of chitinases to *Listeria monocytogenes* pathogenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7302-7305.
- [20] DOWNING K J, THOMSON J A. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(4): 363-369.
- [21] SILVA H, KLESSIG D F. Engineering disease and pest resistance in plants[J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(2): 54-61.
- [22] 李丽,杨雪松,刘红全.微生物几丁质酶的特性及其应用的研究进展[J].广西民族大学学报(自然科学版)(LI Li, YANG Xue-song, LIU Hong-quan. Advance in study and application on chitinase of microorganism[J]. Journal of Guangxi University for Nationalities (Natural Science Edition), 2011, 17(1): 92-96.
- [23] 霍凤敏,杨雅麟,徐俐,等.维氏气单胞菌几丁质酶 *ChiC* 的性质和与几丁质结合蛋白协同作用的研究[J].中国农业科技导报(HUO Feng-min, YANG Ya-lin, XU Li, et al. Studies on character of a chitinase *ChiC* from *Aeromonas veronii* B565 and its synergism with chitin binding protein[J]. Journal of Agricultural Science and Technology), 2014, 16(4): 167-175.
- [24] 冯俊丽,朱旭芬.微生物几丁质酶分子生物学研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版)(FENG Jun-li, ZHU Xu-feng. Molecular biology of microbial chitinase[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Science), 2004, 30(1): 102-108.
- [25] SHIMONO K, MATSUDA H, KAWAMUKAI M. Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66(5): 1143-1147.
- [26] LORITO M, WOO S L, FERNANDEZ I G, et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(14): 7860-7865.
- [27] SHAH J M, RAGHUPATHY V, VELUTHAMBI K. Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(2): 239-244.
- [28] GENTILE A, DENG Z, LA MALFA S, et al. Enhanced resistance to phoma tracheiphila and botrytis cinerea in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene[J]. Plant Breeding, 2007, 126(2): 146-151.
- [29] 朱荷琴,冯自力,李志芳,等.转几丁质酶和葡聚糖酶双价基因棉花株系对黄萎病的抗性[J].棉花学报(ZHU He-qin, FENG Zi-li, LI Zhi-fang, et al. Verticillium wilt resistance of a transgenic cotton line with chitinase and glucanase genes[J]. Cotton Science), 2011, 23(1): 58-63.
- [30] 刘勇,马钧,景炳文.危重患者医院真菌感染的原因及对预后的影响[J].中华医院感染学杂志(LIU Yong, MA Jun, JING Bing-wen. Reason for fungal infection in critically patients and its impact on prognosis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology), 2002, 12(10): 748-749.
- [31] LUPETTI A, DE BOER M G J, ERBA P, et al. Radiotracers for fungal infection imaging[J]. Medical Mycology, 2011, 49(S1): S62-S69.
- [32] ZHU X, ZHANG H, FUKAMIZO T, et al. Properties of *Manduca sexta* chitinase and its C-terminal deletions[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(12): 1221-1230.
- [33] 冯小强,李小芳,杨声,等.壳聚糖抑菌性能影响因素,机理及其应用研究进展[J].中国酿造(FENG Xiao-qiang, LI Xiao-fang, YANG Shen, et al. Current research on anti-microbial mechanisms related in fluencing factors and applications of chitosan[J]. China Brewing), 2009, 28(1): 19-23.
- [34] FUKAMIZO T, SAKAI C, TAMOI M. Plant Chitinases: Structure-function relationships and their physiology[J]. Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 2003, 208(8): 631-632.
- [35] 高必达.转几丁质酶基因防植物病害研究:进展,问题与展望[J].生物工程进展(GAO Bi-da. A study on transgene chitinase to protect plants from disease: progress, problems and prospects[J]. Current Biotechnology), 1999, 19(2): 21-28.
- [36] 范伟,李雪姣,关明俐,等.稻几丁质酶基因的转录与表达特征[J].作物学报(FAN Wei, LI Xue-jiao, GUAN Ming-li, et al. Transcriptional and translational characterization of rice chitinase genes[J]. Acta Agronomica Sinica), 2014, 40(4): 571-580.
- [37] 陈爱葵,庄文宋,陈冬梅.植物几丁质酶及其基因工程研究进展[J].广东教育学院学报(CHEN Ai-kui, ZHUANG Wen-song, CHEN Dong-mei. The progress on plant chitinase and genetic engineering[J]. Journal of Guangdong Education Institute), 2010, 30(3): 47-53.
- [38] 张振鲁,张佳诗,隋丽,等.百日草几丁质酶基因片段克隆及其序列分析[J].安徽农业科学(ZHANG Zhen-lu, ZHANG Jia-shi, SUI Li, et al. Gene cloning and sequence analysis of chitinase gene in *Zinnia elegans*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences), 2013, 41(25): 10256-10258.

- [39] 赵艳, 沙伟, 金忠民, 等. 大豆 class III 酸性内切几丁质酶基因及其启动子表达方式[J]. 中国油料作物学报(ZHAO Yan, SHA Wei, JIN Zhong-min, *et al.* Expression on pattern of soybean class III acidic endochitinase gene and promoter[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 2013, 35(2): 221.
- [40] AKREM A, IQBAL S, BUCK F, *et al.* Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of a chitinase from *Crocus vernus*[J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(3): 340–343.
- [41] KOPPARAPU N K, LIU Z, FEI F, *et al.* Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(6): 1370–1374.
- [42] CHOU Y T, YAO S, CZERWINSKI R, *et al.* Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase[J]. Biochemistry, 2006, 45(14): 4444–4454.
- [43] HOLLAKC E, van WEELY S, van OERS M H, *et al.* Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 1994, 93(3): 1288.
- [44] BOOT R G, BUSSINK A P, VERHOEK M, *et al.* Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2005, 53(10): 1283–1292.
- [45] BOOT R G, BLOMMAART E F C, SWART E, *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9): 6770–6778.
- [46] STROBEL S, ROSWAG A, BECKER N I, *et al.* Insectivorous bats digest chitin in the stomach using acidic mammalian chitinase[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72770.
- [47] 黄乾生, 谢晓兰, 陈清西. 几丁质酶的结构特征与功能[J]. 厦门大学学报(自然科学版) (HUANG Qian-sheng, XIE Xiaolan, CHEN Qing-xi. The structural features and functions of chitinase[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science)), 2008, 47(2): 232–235.
- [48] 王曼, 杨英, 马新春, 等. 酸性哺乳动物几丁质酶和嗜酸性粒细胞趋化因子 mRNA 在鼻息肉中的表达及意义[J]. 青海医学院学报 (WANG Man, YANG Ying, MA Xin-chun, *et al.* Expression of acidic mammalian chitinase and eotaxin-1 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Journal of Qinghai Medical College), 2012, 33(1): 39–42.
- [49] 尹绪爱, 于宁. YKL-40 在妇科恶性肿瘤中的表达和意义[J]. 国际妇产科学杂志 (YIN Xu-ai, GAN Ning. The research progress of relationship between YKL-40 and gynecological diseases[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology), 2013, 40(2): 146–148.
- [50] FUJITA K, SHIMOMURA K, YAMAMOTO K, *et al.* A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345(1): 502–507.
- [51] NAKABACHI A, SHIGENOBU S, MIYAGISHIMA S. Chitinase-like proteins encoded in the genome of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*[J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(2): 175–185.
- [52] ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S. Insect chitinase and chitinase-like proteins[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(2): 201–216.
- [53] ZHU Q, ARAKANE Y, BEEMAN R W, *et al.* Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(18): 6650–6655.
- [54] PETKAU G, WINGEN C, JUSSEN L C A, *et al.* Obstructor-a is required for epithelial extracellular matrix dynamics, exoskeleton function, and tubulogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(25): 21396–21405.
- [55] ZHU Q S, ARAKANE Y, BANERJEE D, *et al.* Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(4): 452–466.
- [56] TAKAHASHI M, KIUCHI M, KAMIMURA M. A new chitinase-related gene, BmChIR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(2): 147–151.
- [57] PAN Y, CHEN K, XIA H, *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of *BmIDGF* gene from *Bombyx mori*[J]. Zeitschrift für Naturforschung, C, A Journal of Biosciences, 2010, 65(3): 277.
- [58] 范晓军, 宋志芳, 仙笑笑, 等. 舞毒蛾几丁质酶基因的真核表达与重组病毒的获得[J]. 应用昆虫学报(FAN Xiao-jun, SONG Zhi-fang, XIAN Xiao-xiao, *et al.* Eukaryotic expression of the chitinase gene in *Lymantria dispar* and construction of a recombinant baculovirus[J]. Chinese Journal of Applied Entomology), 2013, 50(5): 1211–1218.
- [59] 黄海云, 张屹, 万张勇. 昆虫几丁质酶的进化与保守性质的比较基因组学研究[J]. 河北科技大学学报(HUANG Hai-yun, ZHANG Yi, WAN Zhang-yong. Evolution and consensus exploration of insects' chitinase by comparative genomics[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology), 2013, 34(4): 350–354.
- [60] ZHANG J, ZHANG X, ARAKANE Y, *et al.* Identification and characterization of a novel chitinase-like gene cluster (*AgCht5*) possibly derived from tandem duplications in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(8): 521–528.
- [61] 刘晓健, 崔森, 李大琪, 等. 飞蝗几丁质合成酶 2 基因的表达特性、功能及调控[J]. 中国农业科学(LIU Xiao-jian, CUI Miao, LI Da-qi, *et al.* Expression, function and regulation of Chitin synthase 2 gene in *Locusta migratoria*[J]. Scientia Agricultural Sinica), 2014, 47(7): 1330–1340.
- [62] ZHANG X, ZHANG J, PARK Y, *et al.* Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 42(9): 674–682.
- [63] KHOSHAB F, YAMABHAI M. Chitin research revisited[J]. Marine Drugs, 2010, 8(7): 1988–2012.
- [64] SHEN K T, CHEN M H, CHAN H Y, *et al.* Inhibitory effects of chito oligosaccharides on tumor growth and metastasis[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(8): 1864–1871.
- [65] 孔祥辉, 郑静, 王晓军, 等. 壳聚糖在组织工程中的应用[J]. 中国医学工程(KONG Xiang-ye, ZHENG Jing, WANG Xiao-jun, *et al.* Application of chitosan in tissue engineering[J]. China Medical Engineering), 2009, 17(3): 185–187.
- [66] 郭兴锋, 侯春林, 张伟, 等. 几丁糖/海藻酸钠敷料止血性能的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究(GUO Xing-feng, HOU Chun-lin, ZHANG Wei, *et al.* Experimental study of Chitosan/alginate dressings' hemostatic properties[J]. Opaedic Biomechanics Materials and Clinical Study), 2008, 5(2): 4–6.
- [67] 褚薛慧, 施晓雷, 冯章启, 等. 肝脏组织工程纳米纤维支架材料的比较研究[J]. 中国生物医学工程学报(CHU Xue-hui, SHI Xiao-lei, FENG Zhang-qi, *et al.* Comparative study of different nanofiber scaffolds for liver tissue engineering[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering), 2009, 28(3): 476–481.
- [68] 康云艳, 刘兵, 杨暹, 等. 壳寡糖诱导菜薹对立枯病的抗性研究[J]. 华北农学报(KANG Yun-yan, LIU Bing, YANG Xian, *et al.* Studies on chito oligosaccharide-induced resistance to rhizoctonia solani in flowering chinese cabbage[J]. Acta Agricuturae Boreali-Sinica), 2014, 29(4): 145–150.
- [69] 王璐, 王效杰. 家蝇几丁质的研究进展[J]. 沈阳医学院学报(WANG Lu, WANG Xiao-jie. Advance in study on fly chitin[J]. Journal of Shenyang Medical College), 2013, 15(1): 58–60.
- [70] MUZZARELLI R A A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53(2): 131–140.
- [71] ORANUSI N A, TRINCI A P. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B[J]. Microbios, 1984, 43(172): 17–30.
- [72] ZHU Z, ZHENG T, HOMER R J, *et al.* Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation[J]. Science, 2004, 304(5677): 1678–1682.
- [73] 陈雅宁, 王战建. 几丁质酶 3 样蛋白 1 与糖尿病及其微血管并发症[J]. 临床荟萃(CHEN Ya-ning, WANG Zhan-jian. C-hitinase 3-like protein 1 and microvascular complications of diabetes[J]. Clinical Focus), 2013, 28(3): 357–360.
- [74] DI GIAMBATTISTA R, FEDERICI F, PETRUCCIOLI M, *et al.* The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* P9: purification, partial characterization and potential applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3): 498–505.
- [75] GOVINDSAMY V, GUNARATNA K R, BALASUBRAMANIAN R. Properties of extracellular chitinase from *Myrothecium verrucaria*, an antagonist to the groundnut rust *Puccinia arachidis*[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1998, 20(1): 62–68.
- [76] MILLER M, PALOJARVI A, RANGGER A, *et al.* The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 613–617.
- [77] 王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯(WANG Zhi-wei, LIU Zhi-min. Advance in study and application on chitinase produced by microbes[J]. Letters in Biotechnology), 2006, 17(3): 439–442.
- [78] 闫海洋, 吴海燕, 李锋, 等. 几丁质微生物肥料在农业上的应用[J]. 吉林农业科学(YAN Hai-yang, WU Hai-yan, LI Feng, *et al.* Application of chitin microbial fertilizers in agriculture[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences), 2012, 6(37): 35–38.