

海洋微生物极端酶的研究*

STUDY ON EXTREMOZYMES OF MARINE MICROORGANISM

林 影 凌晨晖

(华南理工大学生物工程系 广州 510641)

海洋微生物是海洋生物的重要成员,它们所处的环境具有很大的特殊性,如:高盐、低温、高压、热流床、碳酸气出口及高浓度有机物沉积地等等,在这些极端环境微生物的研究中,提取到很多新的极端酶,并发现其具有重要的工业应用潜力。近年来日本和

欧美多国纷纷投资开展海洋微生物极端酶的研究,并

* 广东省自然科学基金资助项目 970533 号。

收稿日期:1998-03-03;修回日期:1998-05-06

取得很大的进展。

1 海洋微生物极端酶的特性

1.1 嗜冷酶

低于 10℃ 才能生长的微生物称为嗜冷微生物,最适生长温度往往为 -2℃,嗜冷菌中产生的很多酶在低温下才显示高效的催化效率,这类酶称为嗜冷酶。在深海和南北极的海洋环境中发现不少嗜冷菌群,海洋微生物学家从这些嗜冷菌群中分离得到各种嗜冷酶,如:来自南极细菌的 α -淀粉酶^[1]、枯草杆菌蛋白酶^[2]和磷酸丙糖异构酶等,这些酶均在低温和常温中显示较高的催化效率,而在高温下很快失活,通过对这些嗜冷酶的蛋白质模型和 X-射线衍射分析的结果表明,因嗜冷酶分子间的作用力减弱,与溶剂的作用加强,使酶结构的柔韧性增加,使酶在低温下容易被底物诱导产生催化作用,温度提高,嗜冷酶的弱键则容易被破坏,使酶变性失活。例如:从南极海水中分离的枯草杆菌蛋白酶与 Novo 公司的嗜温枯草杆菌蛋白酶比较,肽链销长,酶分子中的盐键数量减少,芳香作用减低,对 Ca^{2+} 亲和力减少,与溶剂的相互作用增加,尽管活性中心序列是保守的,由于这些变化有利于增加酶的柔韧性,使其在低温下容易与底物结合,在 4℃ 时其活性是其他两种嗜温酶的 20 倍,体现了典型的嗜冷酶的特性。

1.2 嗜热酶

继深海的嗜冷微生物发现后,人们又发现在很多地理活跃地带出现热流床,在这些热流地域温度可以高达 350℃,水底沉积物含有丰富的矿物质,因此常常发现很多嗜热和超嗜热微生物,这些嗜热微生物具有潜在的生物应用价值,有几个大的研究机构已经从这些嗜热菌中筛选到热稳定性的酶^[3],包括:淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶及 DNA 聚合酶等,这些酶在 75~100℃ 之间具有良好的热稳定性。酶的耐热性主要由分子内部结构决定,维持其内部立体结构的化学和物理键(二硫键、盐键、氢键和疏水键等)数越多,热稳定性越大,对立体键不利的因素将对酶的稳定性的产生影响。Ken Takai 等人从日本浅海热流床中分离的 *R. obamensis* 嗜热菌^[4]中纯化的磷酸烯醇丙酮酸激酶(PEPC)的研究中,发现 PEPC 的最适反应温度为 70℃,在 85℃ 下作用 2 h 活力保持不变,乙酰 CoA、1,6-二磷酸葡萄糖、L-天冬氨酸和苹果酸的一价阴离子引起酶的正变构,有利于酶的热稳定性提高,而二价金属离子则破坏酶的热稳定性。

1.3 嗜压酶

近期的研究表明,静压力可以增加酶的活性和稳定性^[5],尤其对酶的热稳定性有明显的促进作用。此外,在高温和高压下,底物溶解度增加,溶剂粘度减少,从而提高物质的传输速率和反应速度。此外,Shin H. J. 等 1994 年报道,高压作用下酶往往有良好的立体专一性,在化学工业上有潜在的应用前景。但是当压力超过一定的范围时,酶的弱键产生破坏,酶的构象解体,使酶失活^[13]。因此,有必要重筛选嗜压酶,挖掘嗜压酶的应用潜力。

深海嗜压微生物是嗜压酶的重要来源。1979 年 Yayanos 等人第一次从深海 4 500 m 以下的环境中分离嗜压菌。最近,日本 DEEPSTAR 研究小组从日本海中分离到多株嗜压菌,并从分类学和分子生物上研究了这些嗜压菌的特征^[6],发现这些深海嗜压菌中的基因、蛋白质和酶对高压条件具有很高的适应性,因此为进一步嗜压酶的研究提供了良好的基础。

1.4 嗜酸和嗜碱酶

海底还有一些高酸碱的区域,这些区域分离得到的微生物往往具有嗜酸或嗜碱性,这些嗜酸菌和嗜碱菌分泌的胞外酶往往是相应的嗜酸酶(最适 pH < 3.0)和嗜碱酶(最适 pH < 9.0)^[1,9],在嗜极菌的酶学研究中发现,与中性酶相比,嗜酸酶在酸性环境的稳定性是由于酶分子所含的酸性氨基酸的比率高,尤其在酶分子的表面;而嗜碱酶对碱的稳定性则因为其酶分子含碱性氨基酸的比率高^[2]。

1.5 嗜盐酶和耐有机溶媒的海洋细菌

海水的平均含盐量为 3%,部分区域为高富盐地区,是耐盐和嗜盐微生物的重要来源,嗜盐菌内的很多酶在高盐浓度下保持稳定性,为嗜盐酶。据报道,海藻嗜盐氧化酶在催化结合卤素进入海藻体内代谢中起作用,这对化学工业的卤化过程有潜在的价值。本单位从北部湾海水和海泥中分离几株生菌中,发现它们所分泌蛋白酶和谷氨酰胺酶有较高的耐盐性。

Moriya K. 等 1993 年在众多海洋嗜盐菌中发现了一些嗜盐菌具有耐有机溶媒的特性,继而在海底有机沉积区分离到一系列耐有机溶媒的海洋微生物,由日本 DEEPSTAR 研究小组从日本深海中分离的各种耐有机溶媒菌株,包括:原油降解菌 DS-117^[11],利用硫的 DS-944 菌,降解聚芳香烃菌 DS-1906^[4],降解胆固醇的 ST-1 菌^[11]和烃降解酵母 Y-40^[8]等,有些耐有机溶媒的浓度达 50%,这将使酶在有机化工和环境保护上的应用翻开新的一页。

2 海洋微生物极端酶的研究进展

2.1 基因重组技术的应用

综上所述,人们从海洋极端环境中已经分离得到各种极端酶,它们分别具有独特的结构以适应不同的环境,使其在极端环境中保持有效的稳定性。利用基因重组技术,把极端酶的基因克隆,并进行序列分析,进一步探讨酶的结构与功能的关系^[5],是目前极端酶学研究的方法之一。

尽管世界多国已投入巨资,希望分离得到各种嗜极菌,并挖掘其商业应用潜力^[5]。但仍然有很多未能培养的嗜极菌,使海洋微生物极端酶的研究受到限制。最近,DeLong E. F. 等人利用多形基因克隆技术,从海洋嗜冷菌的 DNA 中克隆并表达了 DNA 聚合酶^[7],为广泛开采海洋微生物极端酶提供了有力的工具。

从嗜极菌中分离得到极端酶后,人们面临的是在极端条件下嗜极菌大规模细胞培养和极端酶发酵生产,这对传统的发酵工艺无疑是一个极大的挑战。基因克隆技术帮助人们解决了这一难题,一些海洋微生物极端酶已成功地在大肠杆菌中大量表达,并表达产物仍能保持对极端环境的稳定性^[10]。

2.2 海洋微生物极端酶的应用

海洋微生物生产的酶,由于具有广泛的适应性,在生物技术和工业应用中已担任了重要的角色。由美国华盛顿州立大学的海洋微生物学家研究的嗜冷碱性蛋白酶应用于洗涤剂工业,将可能改变欧洲传统的热水洗涤方式,节约能源,使加酶洗涤剂在冷水洗

涤中发挥显著的效益。嗜冷乳糖酶和淀粉酶为乳品和淀粉加工提供了新的工艺,对保持食品营养和风味起着重要作用。另一组独特的海洋微生物,超嗜热原细菌中分离的超嗜热酶,如:DNA 聚合酶、连接酶和限制性内切酶等 100℃ 仍保持活力,它们已被开发应用在 DNA 修饰中。深海耐有机溶媒菌株的探索,在化学工业的化合物合成、石油工业的原油精炼及污水处理等方面的应用潜力亦正在被开拓^[3]。

参考文献

- 1 方金瑞、黄维真. 中国海洋药物, 1996, 1: 5~9
- 2 徐恒平、张树政. 生物工程进展, 1997, 7(1): 2~51
- 3 井上明. 化学工业(日), 1996, 5: 53~58
- 4 Abe, A. *et al.* *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **59**(6): 1154~1156
- 5 Alfredo, A. *FEMS Microbio. Rev.*, 1996, 18: 89~92
- 6 Chiaki, K. *et al.* *Trends Biotechnol.*, 1996, 14: 6~12
- 7 DeLong, E. F. *Trends Biotechnol.*, 1997, 15: 203~207
- 8 Fukumaki, T. *et al.* *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, **58**(7): 1784~1788
- 9 Hiroshi, T. *et al.* *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, **60**(8): 1284~1288
- 10 Leuschner, C. & Antranikian, G. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 11: 95~114
- 11 Moriya, K. *et al.* *J. Mar. Biotechnol.*, 1995, 2: 135~138
- 12 Mozhaev, V. V. *et al.* *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 52: 320~331
- 13 Pascal, D. & Pierre, L. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 20: 550~557