

南极微生物低温酶的研究进展

ADVANCES IN RESEARCH OF COLD-ADAPTED ENZYMES FROM ANTARCTIC BACTERIA

林学政 侯旭光 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

南极微生物,包括细菌、酵母及丝状真菌等,不但在南极的生态系统及物质的生物地球化学循环中扮演了重要角色,在基础研究和开发应用方面也具有广阔的前景。由于南极独特的地理位置及气候特

第一作者:林学政,出生于1971年,博士,助研,主要从事极端环境微生物活性物质研究。E-mail: linlyjw@public.qd.sd.cn

收稿日期:2001-04-06;修回日期:2001-08-16

征,形成了一个干燥、酷寒、强辐射的自然环境,生存于其中的微生物必然具备了相应独特的分子生物学和生理生化特性,如嗜盐和耐盐、嗜冷和适冷等特性。

南极生物学研究的重点多侧重于生态和环境方面,即使进入20世纪90年代后期仍是如此,但随着EASIZ(南极海冰区生态学研究)计划和CS-EASIZ(南极海冰区近岸和陆架系统生态学研究)计划的相继推出,近年来欧美及日本的科研人员对南极微生物的潜在应用性方面,尤其低温酶的理化性质、适冷机制及其应用研究作了大量的工作,取得了较大的进展。本文就近10年来南极微生物低温酶的研究概况予以综合评述,以期为国内南极微生物资源的开发与利用提供参考。

1 南极微生物低温酶

研究表明,在南极低温微生物中,大部分为适冷型,小部分为嗜冷型。Kobori等1984年从南极海水中获取的155株细菌中,77%是适冷菌,23%是嗜冷菌。根据Nichols等1995年的定义,嗜冷菌(psychrophile)是指在温度低于0℃能缓慢生长,最适生长温度低于15℃,高于20℃则不能生长的细菌;适冷菌(psychrotolerant或psychrotrophic bacteria)是指在0℃能够生长,但最适生长温度在20~30℃之间的细菌。根据Marsin等1991年的定义,通常把最适催化温度在30℃左右,在0℃左右仍有一定催化效率的酶称为低温酶。在南极的海洋环境中发现许多低温微生物菌群,海洋微生物学家已从这些菌群中分离得到各种低温酶。低温微生物不仅是研究在低温条件下生物适应性的极好材料,而且也是获得在低温条件下具有较大催化能力的低温酶类的最佳来源。目前,国外学者已对南极微生物的低温酶类进行了大量的研究工作,涉及酶的产生及理化性质、酶的分子生物学和表达与调控等各个方面。

1.1 低温酶及理化性质

Draia等从南极适冷嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp.) TAD1中分离得到两种性质截然不同的谷氨酸脱氢酶(GDH),两者分别对NADP⁺和NAD⁺具有专一性,这一现象在细菌中是极其罕见的,因为细菌通常只含有其中一种GDH^[7]。Tsigos等分离纯化了南极嗜冷菌莫拉氏菌(*Moraxella* sp.)中的乙醇脱氢酶(ADH),并对其理化性质作了进一步研究。该酶分子量为240 kDa,由4个相同的分子量为52 kDa的亚基组成;其pI值为5.5,而酶活的最适pH为7.5;每个亚基含有1个Zn²⁺,具有明显的温度易变性;与哺乳动

物的ADH一样,该酶具有底物相对专一性,而与其它微生物ADH恰恰相反^[8]。Okuyman等在适冷假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) E3中可溶性16:1(9c)顺-反异构酶(9-lase),该酶能将游离的9-顺式-棕榈油酸[16:1(9c)]转化成9-反式-棕榈油酸[16:1(9c)],并能将被酯化的16:1(9c)转化成磷脂酰乙醇胺。由于在菌体细胞中游离脂肪酸的含量非常低,而在有细胞膜存在的情况下,这种顺-反异构酶在胞内能有效地将酯化的16:1(9c)转化成磷脂酰乙醇胺,因此他们认为9-lase可能是一种细胞在生长温度剧烈变化时调节膜流动性的必需因子^[9]。

此外,南极微生物的其它低温酶,如β-内酰胺酶、α-淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、枯草杆菌蛋白酶、碱性磷酸酶等也分别作了研究,而且对其中的枯草杆菌蛋白酶α-淀粉酶^[10]、谷氨酸脱氢酶^[7]、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)^[11]的结构也作了详细的研究。

1.2 低温酶的分子生物学

南极微生物低温酶的分子生物学研究主要是利用基因重组技术,克隆低温酶的基因,并进行序列分析,然后在宿主(主要是大肠杆菌)中表达。Feller等1991年报道了来自一株南极适冷莫拉氏菌的脂肪酶基因在中温大肠杆菌中的克隆与表达:包含有适冷型脂肪酶基因的克隆子只有在生长温度从对应中温菌的最适生长温度37℃降至25℃或17℃以后,才表达脂解能力,从而防止基因产物的热变性。Rentier-Delrieu等1993年将从南极鱼类肠道中分离到的适冷莫拉氏菌TAL37的磷酸丙糖异构酶基因克隆至大肠杆菌中并获表达。Bentahir等将南极假单胞菌TAC118的PGK基因克隆,然后连接在质粒pET22b和pET28a的NdeI位点上,并在大肠杆菌中成功表达。作者对野生型PGK和重组PGK的性质也作了研究^[11]。

1.3 低温酶的表达与调控

有关低温酶的表达与调控方面的研究较少,目前只有极少数的相关报道。Feller等1994年筛选到一株产α-淀粉酶的南极嗜冷菌交替单胞菌(*Alteromonas haloplanctis*) A23,该菌在4℃时生长良好,在18℃时细胞繁殖和酶分泌将会受到影响,作者对该酶的合成与分泌情况作了详尽的研究。结果表明,A. haloplanctis产的α-淀粉酶的前体是由一个多肽(24个氨基酸残基),成熟的α-淀粉酶(453个氨基酸残基,49 kDa)和很长的C末端前肽或分泌辅助因子(192个氨基酸残基,21 kDa)构成的前酶原。在指数生长期的中期,菌株分泌70 kDa的前体,由非特异性蛋白酶

剪切形成成熟的 α -淀粉酶和前肽^[12]。

2 低温酶适冷机制的研究进展

酶在生物体的生命活动中占有极其重要的地位。研究低温酶的理化性质及其作用机理,对于了解酶分子的热稳定性与催化性质的分子机理具有重要意义。南极微生物能够在极端恶劣的自然环境下保持快速生长、繁殖的能力,其中的低温酶在低温条件下必然有较高的催化效率,在组成与结构上也必然有着相应独特的特征。近年来,欧美及日本的科学家对低温酶的理化性质作了大量的研究,并与同类的中温酶、嗜热酶相比较,从中试图解释低温酶的适冷机制。

关于低温酶的适冷机制,目前主要从以下两点来解释:(1)有别于中温酶的分子结构特征,使得低温酶分子在低温下具有良好的“分子柔性”;(2)低温下酶促反应的热力学特性,即具有较低的活化能,使得酶分子在低温下催化时能耗较低。

2.1 低温酶的结构特性

同中温酶相比,低温酶具有很高的比活力与较低的温度稳定性,这可能是由于酶分子结构柔性增加的结果,这一结构特征被认为是低温酶适冷的主要因素。低温酶的结构柔性有利于与底物分子更好地接触和低温催化所需要的酶分子构象的快速变化^[13,14]。目前,仅有少数低温酶的晶体结构已弄清楚,有关低温酶适冷机制的研究主要通过比较低温酶与相应中温酶、嗜热酶的一级、二级结构以及建立计算机模型来进行。

Argigny 等 1993 年对南极嗜冷菌静止嗜冷杆菌 (*Psychrobacter immobilis*) 的一种脂肪酶基因进行了克隆和测序。对酶序列的分析表明,该脂酶中稳定的碱性氨基酸残基精氨酸与精氨酸-赖氨酸 [Arg/ (Arg + Lys)] 的摩尔比例,比中温菌及嗜热菌中的比值低得多,在低温脂酶中如精氨酸等稳定性残基的低数量可能有助于形成更具屈伸性的三级结构。另外,增加的甘氨酸残基可能会起到有力的促进作用,在低温催化过程中促进酶的构象改变。这些特性可能与该脂酶的适冷性有关。

在低温蛋白酶中,结构研究得比较清楚的是嗜冷菌芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. TA41) 分泌的枯草杆菌蛋白酶 S41。Davail 等 1994 年对该酶进行氨基酸序列分析与结构分析表明,酶的催化部位没有什么改变,但在底物结合部位有两个氨基酸被取代, S41 缺少 129 位的 Pro 残基,在所有的中温酶中该残基的作用是限制底物结合环的运动。在酶分子的 104 位上,Ala 取代了

脂肪族或芳香族的氨基酸残基,因而减少了活性部位入口的空间位阻。这两个氨基酸取代使酶分子变得柔顺,降低了催化过程中构象改变所耗费的能量。另外,在 S41 中,盐桥与芳香族相互作用的减少也使酶分子的柔性增加。在 S41 酶分子表面有 4 个长连的氨基酸残基以及大量的极性氨基酸残基,主要是 Asp, 这使酶分子表面的长度与极性增加,从而增强酶分子与溶剂的相互作用,降低酶分子的紧密度,也降低了酶分子的稳定性。 Ca^{2+} 能够结合在蛋白酶分子上,增加酶分子的稳定性,但降低酶分子的柔性。在 S41 中,钙结合部位 Asn 被 Thr 取代,从而使 Ca^{2+} 的结合减弱。这个氨基酸残基的改变使 Ca^{2+} 的解离常数由 10^{-10} 增大为 10^{-6} ,这是低温酶对热敏感的原因之一。从 S41 的这些结构特征可以看出,低温蛋白酶为了适应低温环境,在低温下保持高的催化效率,酶分子结构发生了一系列适应低温的改变,使酶分子的柔性增加,构象能迅速改变,降低反应活化能,但热稳定性降低。因为在低温环境下,酶没有必要保持高的热稳定性^[1]。

Kim 等的研究表明,尽管嗜冷菌北极水螺菌 (*Aquaspirillum arcticum*) 的苹果酸脱氢酶 (Aa MDH) 和嗜热菌黄栖热菌 (*Thermus flavus*) 的苹果酸脱氢酶 (Tf MDH) 的热稳定性有很大差异,如 Aa MDH 在 55 °C 保温 10 min, 酶活将损失 50%; 而 Tf MDH 在 90 °C 保温 1 h, 酶活基本不损失,但二者的酶分子具有 61% 的序列同一性和超过 90% 的序列相似性。通过比较二者的分子结构,表明 Aa MDH 在低温条件下保持酶的催化效率可能与以下因素有关:酶活性部位柔性的相对增加;分子表面电荷的分布对底物和辅助因子较为有利;亚基间离子对的相互作用力减弱^[15]。

PGK 是糖酵解中的一个关键酶。到目前为止,已有 40 多种 PGK 的主要结构特征已解释清楚。Bentahir 等通过比较南极嗜冷假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) TACIII8、中温菌酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和 *Trypanosoma brucei*、嗜热菌嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 和海栖热孢菌 (*Thermotoga maritima*) 的 PGK 的主要结构特征,试图来解释低温酶的低温结构适应性(见表 1)^[11]。从表 1 可以看出,Arg 具有形成多离子对和氢键的能力,而在低温酶 PGK 中的数量较少,这说明了该酶形成离子对和氢键的可能减少;同中温酶和嗜热酶相比,低温酶的离子对和芳香族相互作用的减少与其适冷特征相一致,而且这些弱相互作用从嗜冷菌到极端嗜热菌具有明显增加的特征;几乎所有低温酶 PGK 的离子对都位于酶分子的表面。以上这些都说明低温酶 PGK 分子的柔性增加。

表 1 低温酶 PGK、中温酶 PGK 和嗜热酶 PGK 中与温度适应性有关的主要结构特性

参数	嗜冷菌	中温酶		嗜热酶	
	<i>Pseudomonas .sp</i>	<i>S. cerevisias</i>	<i>T. brucei</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>T. moritima</i>
GLY 含量	34	37	43	35	38
Pro 含量	16	17	20	15	18
Arg 含量	9	12	16	20	13
离子对(全部)	10	17	20	29	24
离子对(表面)	7	14	ND*	29	22
芳香族间相互作用	1	5	3	6	5

* 文中未给出有关数据

此外,有关低温酶的结构与低温适应性的论述还有许多^[2-4],这里不一一赘述。

2.2 低温酶的热力学特性

有关南极微生物低温酶热力学特征的报道较少。Bentahir 等对南极假单胞菌 TACH18 的 PGK 与酿酒酵母的 PGK 相比较,在 25℃ 时对 ATP 和 3-磷酸甘油酸(3-PGA)的 K_m , k_{cat} 示于表 2^[11]。可以看出,当以 ATP 和 3-PGA 为底物时,低温酶 PGK 比中温酶 PGK 的 k_{cat}/K_m 分别增加了 2.56 和 1.79 倍,这说明了低温酶具有较低的活化能。Margesin 也报道,从冰川分离到的 3 株低温菌所产蛋白酶的活化能为 36.9~38.0 kJ/mol,而中温蛋白酶的活化能一般在 60 kJ/mol^[11]。

综上所述,嗜冷菌能适应低温环境,必然要求酶分子克服低温对疏水作用、催化作用及蛋白柔韧性的影响,有许多因素有助于形成这种冷适应性,归结起来主要有以下几点^[16]: (1)离子对的增加有利于消除低温条件下疏水作用对维持蛋白折叠状态作用减少的影响;(2)氢键、盐键的减少以及伸展的多电荷的分子表面环状结构有助于形成合适的结构柔性;(3)酶活性中心的更可靠近性有助于克服在低温条件下底物扩散性的降低,在某些情况下,酶分子表面的电荷有助于底物分子接近酶活性中心;(4)嗜冷酶常常具有较高的 K_m/k_{cat} 值,通过降低酶的活化能将进一步提高催化效率。

表 2 南极假单胞菌 TACH18 和酿酒酵母的动力学参数

菌名	ATP			3-PGA		
	$K_{cat}(s^{-1})$	$K_m(mmoll/L)$	$k_{cat}/K_m(L/mmol \cdot s)$	$K_{cat}(s^{-1})$	$K_m(mmoll/L)$	$k_{cat}/K_m(L/mmol \cdot s)$
假单胞菌	500	0.21	2 380	537	0.53	1 002
酿酒酵母	345	0.37	930	335	0.59	560

3 低温酶的应用前景及挑战

在低温酶中,蛋白酶、淀粉酶和酯酶等均具有相当大的市场潜力。酯酶可应用于许多方面,如作为食品风味改变剂、去污添加剂或立体特异性催化剂等;蛋白酶可应用于奶酪成熟、牛奶加工、洗涤剂^[15]。因此合理开发利用南极的低温微生物资源,不仅可以丰富人类利用的微生物种类,将其应用于医药、食品、日化及环保等诸多领域,将会给人们的生活带来巨大的方便。

应用低温微生物具有以下许多优势:在低温下,有利于防止微生物污染,尤其是在连续运转系统中(此时同源的中温酶不活泼);经过温和的热处理即可使低温酶的活力丧失,而且低温或适温处理不会影响产品的品质;在研究一株南极低温细菌的碱性磷酸酶

时,这些酶的热不稳定性还可被利用于在复合培养基中选择性地使菌株失活;在低温条件下,相对中温酶而言,来自低温微生物的酶反应所需的时间更短。低温微生物及其酶还可替代化学法,将废水处理之所需减少到最低程度^[6]。

Niedelman 1990 年用 3 个例子阐述了低温酶在基础及应用方面的重要性:四环素分子的酶促修饰(该反应属温度依赖型,在 6~9℃ 会比在 25℃ 产生一种更为简单的转化模式),微生物的酶促去饱和活性(该活性随温度的下降而升高,可在由乙醇制成的蜡酯中产生更高的不饱和程度)以及在三酰甘油(可可脂)合成中不饱和脂肪酸的掺入(这应归功于可可脂合成过程中酰基转移酶的选择性,它只在 15~25℃ 起作用,高出这一范围则不行)。

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主要作用。

从南极微生物中分离得到低温酶后,人们面临的是在常温条件下南极微生物的大规模细胞培养和低温酶的发酵生产,这对传统的发酵工业无疑是一个巨大的挑战。在嗜冷酶大规模开发利用以前,必须有经济有效的生产方法。目前有两种选择:(1)将嗜冷酶的基因在普通的宿主,如大肠杆菌中表达。目前已有一些嗜冷酶基因,如一株南极细菌中的柠檬酸合成酶基因^[17]和交替单胞菌(*Alteromonas haloplantis*)中的 α -淀粉酶基因^[18]分别在大肠杆菌中得到了成功表达。在上述两个例子中,在低温条件(25~27℃)均更有利于嗜冷酶基因的表达,嗜冷酶的活性更高。(2)DNA重组技术对大约占生物圈99%的未培养过或不能培养的生物的酶的生产具有重要意义^[19],如利用Preston等1996年的方法,Schleper等已报道了一种未培养过的嗜冷古细菌(*Cenarchaeum symbiosum*)中的DNA聚合酶的鉴定与产生^[20]。

综上所述,近几年有关南极微生物低温酶的研究进展很快。低温酶的研究,大大拓宽了人们对酶的特性的认识和生物催化剂的应用范围,但是南极微生物的工业化生产尚不成熟,实际应用也很少。相信会随着研究的持续深入以及DNA重组技术的利用,低温酶的开发和应用会出现诱人的前景。

参考文献

- 1 陈秀兰,张玉忠,高培基.低温蛋白酶的研究进展与应用前景,工业微生物,2001,31(1):52~57
- 2 林影,凌晨晖.海洋微生物极端酶的研究,海洋科学,1999,23(2):19~21
- 3 徐恒平,张树政.嗜极菌的极端酶,生物工程进展,1997,17(1):2~5
- 4 柳耀建,林影,吴晓英.极端微生物的研究概况,工业微生物,2000,30(3):53~55
- 5 林影,卢荣德.极端酶及其工业应用,工业微生物,2000,30(2):51~53
- 6 曾胤新,陈波.南极低温微生物研究及其应用前景,极地研究,1999,11(2):143~152
- 7 Di Fraia R., Wilquet V., Ciardiello M.A. et al.. NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase in the Antarctic psychrotolerant bacterium *Psychrobacter* sp. TAD1. Characterization, protein and DNA sequence, and relationship to other glutamate dehydrogenases, *European J. Biochem.*, 2000, 267(1):121~131
- 8 Tsigos I., Velloni K., Smonou I. et al.. Purification and

characterization of an alcohol dehydrogenase from the antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123, *European J. Biochem.*, 1998, 254(2):356~362

- 9 Okuyama H. et al.. Identification and characterization of a 9-cis-hexadecenoic acid cis-trans isomerase from a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain E3, *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, 1997, 10:153~162
- 10 Feller G., Dominique d'Amico, Gerday C.. Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase from the antarctic bacterium *Alteromonas haloplantis*, *Biochemistry*, 1999, 38(14):4613~4619
- 11 Bentahir M., Feller G., Aittaleb M. et al.. Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the Antarctic *Pseudomonas* sp. TACH18, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(15):11147~11153
- 12 Feller G., D'Amico S., Benotmane A.M. et al.. Characterization of the C-terminal propeptide involved in bacterial wall spanning of α -amylase from the psychrophile *Alteromonas haloplantis*, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(20):12109~12115
- 13 Fields P.A., Somero G.N.. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs Antarctic notothenioid fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95:11476~11481
- 14 Zavodszky P., Kardos J., Petsko G.A.. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95:7406~7411
- 15 Kim S., Hwang K.Y., Kim S. et al.. Structural basis for cold adaptation: sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(17):11761~11767
- 16 Sellek G.A., Chaudhuri J.B.. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles, *Enzyme and Microbiol. Technology*, 1999, 25(7):471~482
- 17 Genke U., Danson M.J., Russel N.J. et al.. Sequencing and expression of a cold-active citrate synthase from an antarctic bacterium, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 248:49~57
- 18 Fell G., le Bussy O., Gerday C.. Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts: assessment of the folding state of a recombinant α -amylase, *App. Environ. Microbiol.*, 1998, 64:1163~1165
- 19 Adams M.W.W., Kelly R.M.. Finding and using a hyperthermophilic enzymes, *TIBTECH.*, 1998, 16:329~332
- 20 Schleper C., Swanson R.V., Mathur E.J. et al.. Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*, *J. Bacteriol.*, 1997, 179:7803~7811

(本文编辑:刘珊珊)