

深海微生物极端酶的研究进展

The progress of research on bioactive enzymes of extremophiles from deep sea

李升康^{1,2}, 王玉桥²

(1. 汕头大学 理学院生物系, 广东 汕头 515063; 2. 国家海洋局 海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)05-0098-05

21 世纪是海洋的世纪, 海洋生物资源的开发和利用已成为世界各海洋大国竞争的焦点之一, 其中基因资源的争夺更是焦点中的重点。抢占国际海洋生物基因资源研究的制高点刻不容缓, 因此海洋生物基因资源的保护和利用就显得更加紧迫。研究海洋生物基因组及其功能, 能深层次地探究海洋生命的奥秘; 发掘海洋生物基因, 有利于保护海洋生物资源。深海微生物种类繁多, 是一个宝贵的资源库。在我国由于对深海微生物资源的研究起步较晚, 而且由于条件和技术的限制, 能够分离培养的种类较少, 这大大限制了对深海微生物的开发利用。目前对深海微生物的开发利用基本上处于应用研究阶段, 主要集中在生物活性代谢产物和新酶开发两个方面^[1, 2]。

在深海微生物的分离培养方面, 已分离鉴定出嗜压、嗜碱、嗜酸、嗜盐、嗜冷、嗜热等极端微生物, 已经获得其中几株极端微生物的全基因组序列^[3, 4], 对这些极端微生物的嗜压、嗜碱、嗜酸、嗜盐、嗜冷、嗜热等适应机制的研究还在进行中。日本、美国、欧洲等国都启动了极端微生物的研究计划。日本 Deep Star 计划每年斥资 300 万美元, 采集太平洋不同深度(300~10 897 m)的各种深海沉积物, 进行细菌的分离培养, 获得很多菌株, 包括多株深海沉积物中的嗜压菌和耐压菌^[5~8]。科学家们调查了深海的火山口生境中的微生物群落, 发现了高浓度的化能异养菌, 研究表明这些氧化硫细菌是火山口附近生物群的初始生产者^[9]; 对海底沉积物和火山口的细菌进行了分离培养和多样性研究^[10]。在深海沉积物中发现了放线菌(*Actinomycetes*)、*Alpha* 亚群和 *Gamma* 亚群 *Proteobacteria* 以及低 GC 含量的革兰氏阳性菌^[11], 对其中的放线菌进行了种类及其生物转化活性的调查研究^[12]。Nold 等^[13] 研究表明 *Beta* 亚群 *Proteobacteria* 是海底沉积物微生物中的主要菌群。

Roberto 等^[14] 研究了深海沉积物中细菌和病毒的丰度与分布状况, 发现了病毒丰度和分布在深海沉积物中和在水体中不同, 在深海沉积物中细菌数量多于病毒。

1 极端高温酶

深海环境是一个低温, 高压, 贫营养的暗环境。作为能够在这种环境生长繁殖的极端微生物, 显示了在其开发和应用方面的巨大潜力。而在这些应用方面, 最突出的便是极端酶的发现及其应用。

深海热液区是深海中具有独特的极端环境, 热液口高温(250~400℃)、酸性、富含矿质及还原物质。自从 1977 年发现第一个热液区、并首次从中发现古细菌以来, 已在热液区发现 300 多种新物种, 尤其是微生物资源丰富, 热液区嗜热微生物已成为研究热点。我国在近两年来也逐步加大了海洋生物研究和开发的力度, 但对深海热液区的生物学研究仍是空白。迄今为止, 在深海热液区发现了 50 多个新属、160 多个新种的古菌和细菌, 最近在太平洋中脊热液口发现了一株可在 121℃下生长的古菌, 这是目前为止已知的地球上生命耐受的最高温度^[15]。现代理论和环境证据证明嗜热微生物是地球上形成的第一类生命形式, 因此热液区的嗜热微生物对于生命起源的认识具有重要意义。深海热液区的微生物在极端环境下, 形成了独特的组织结构、酶系统及代谢机制, 探讨这些微生物的适应性机理, 对认识生物的生理活动、应激反应等方面具有重要的科学意义。热

收稿日期: 2008-12-26; 修回日期: 2009-02-26

基金项目: 国家大洋开发协会项目(DY7000M-02)

作者简介: 李升康(1975-), 男, 湖北恩施人, 博士, 副教授, 主要从事海洋微生物研究工作, 电话: 0754-82902081, E-mail: eslsk002@hotmail.com

液区微生物处于食物链底部,比其它任何生物更能忍受高温,嗜热微生物耐高温的特点,可用于获得遗传工程上的热稳定酶。

近年来,感染嗜热微生物的高温病毒(高温嗜菌体)引起越来越多的科研工作者的关注^[16]。因为,高温嗜菌体可以作为一种模式系统来研究海洋微生物的生物化学及分子生物学特性,而且它们还影响生物地球化学和生态系统进化过程,包括营养循环、生物分类、生物种群结构、遗传转换、生物进化等。高温嗜菌体的研究不仅可以丰富和发展对生命形式的认识,而且在研究、开发热稳定的工业用高温酶以及分子生物学工具酶等,有着广泛的应用前景。迄今为止,国际上有关高温嗜菌体的研究尚处于开始阶段,有关这方面的研究主要集中在嗜热古菌方面,噬菌体本身可作为独立的复制单元,用做克隆或表达载体。

嗜热微生物高温酶的极端性质超出了传统酶催化功能的临界范围,而现代工业加工过程正是极端酶作用的范围,极端酶无疑会给众多的应用领域增添新的活力。高温酶具有典型的热动力学稳定性,它们与嗜温同系物具有相同的催化机制。虽然核酸序列同源分析、氨基酸组成比较、晶体结构比较、突变实验都表明与嗜温酶(最适作用温度为 25~50℃)相同,但当在嗜温宿主中表达时,高温酶却表现出热稳定性。高温酶的热稳定性不是单一机制发生作用,因此高温酶被生物学家、化学家、物理学家广泛地用作模式系统认知酶的进化、蛋白质热稳定性的分子机制以及高温对酶功能的抑制研究,这些研究成果有助于发展更有效的蛋白质工程策略和广泛的生物工程应用前景。

超嗜热古生菌中的热网菌属(*Pyrodictium*)^[17]在 110℃ 的条件下生长分泌的一种蛋白质具有两种酶活性:一种是催化合成 ATP 的活性,另一种是具有分子伴侣的活性。当环境温度达到最高生长温度并接近胞内蛋白质与酶的变性温度时,这种分子伴侣通过重新折叠来保护其它蛋白质及酶对高热的稳定性。但是在接近热网菌的最适生长温度时,细胞仅合成少量分子伴侣。说明在一定温度条件下,细菌能主动调节代谢并使合成分子伴侣的量随着温度的升高而增加。只有在最高生长温度时才能合成大量的分子伴侣,用于保护蛋白质与酶的活性,从而使

自身适应高温环境。

嗜热酶和超嗜热酶相对来说是人们最了解其三维结构的两类酶,高温谷氨酸脱氢酶和柠檬酸合成酶的结构的研究表明了离子相互作用在嗜热酶中的重要性^[18]。在这两种酶系中,嗜热酶在离子偶联的数量和程度上都胜过中温酶,而且柠檬酸合成酶嗜热酶还包括亚单位的相互作用和羧基端氨基酸残基的作用。但是,高温稳定性和离子相互作用的正比关系并不是普遍存在的。和嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 相比,从嗜热细菌 *Thermotoga maritima* 中分离的谷氨酸脱氢酶则有较少的离子偶联和较强的疏水相互作用^[19]。这可能是细菌和古细菌在耐热机制上的差异造成的。至今还没有一个普遍的机理可以解释蛋白质的耐热性,而且,目前大部分的研究都是定性的,有关嗜热酶稳定性结构因素的定量研究还很少。深海极端嗜热菌 *Methanococcus jannaschii* 产生的蛋白酶的最适催化温度为 116℃, 130℃ 下仍有活性,是目前已知最大耐受温度的高温酶^[20]。耐热的蛋白酶,而且该酶酶活性和热稳定性随压力提高而升高。实验表明升压可以提高海洋嗜热菌的 DNA 多聚酶的稳定性。

人们对嗜高温酶和常温酶的氨基酸序列差异进行了大量的研究,发现两者的序列大部分同源性很大,只有在某些关键区域有少数的氨基酸变化。另外有些同源酶是氨基酸序列同源性很小,出现大量的氨基酸的取代和插入。因此氨基酸序列的一级结构在某种程度上决定了嗜高温酶的性质。相比于常温酶,高温酶一级结构的变化会引起这些次级键变化或者增加了次级键的数量,从而使酶分子的结构更加稳定,因而也更具抗热性。

高温酶的研究方面,美国、日本、德国走在前列,他们主要研究来自海底热液口或火山口附近的嗜热菌,利用从嗜热菌获得的高温酶研究酶的进化、酶的稳定和活性机制、蛋白结构与功能关系、极端环境的生物催化机制等。至今,许多高温酶基因已经被克隆,如 *Taq* DNA 聚合酶、淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶、葡萄糖苷酶、果胶质酶、木聚糖酶、纤维素酶、荧光酶、光裂合酶、麦芽四糖水解酶等,其中来自于深海的嗜热古细菌如 *Thermococcus litoralis*^[21]、*Thermatoga maritima*^[22] 等的热稳定聚合酶得到了商业开发利用,已经创造了数十亿美元的经济效益。

然而,我国此类研究刚刚起步,因此,对高温酶的研究开发大有可为,不仅可以形成新产业,而且为传统产业的改造注入新的动力。

2 极端细菌低温酶

除海底火山口及其附近的地方,深海的温度一般始终保持在 $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 范围内(少数例外,如 Sulu 海的海底温度为 9.8°C ,地中海的海底温度为 13.5°C),有人称之为世界上最大的冷藏箱。在这里生存的生物必须能耐受低温。从目前能够分离得到的低温微生物是寻找低温酶的绝佳资源库。

低温微生物的特殊基因及活性物质的研究与开发是生物资源应用的重要方面。例如,自然界中许多污染发生在河流、湖泊及地下水等相对低温的环境中,在这些环境中低温微生物对污染物的降解与转化、对自然界的物质循环起重要作用。研究表明耐冷菌能矿化甲苯等多种有机污染物。冰晶产生细菌在 $-3 \sim 5^{\circ}\text{C}$ 形成冰晶,将冰晶形成负突变菌株接种到植物上,这些植物可免遭冰晶产生菌的攻击,从而对植物起到保护作用。利用低温微生物进行低温发酵可用来生产许多风味食品,不仅可以节约能源,而且可以减少中温菌的污染。有些分离自嗜冷菌的水解酶在相对低的温度下具有活性。分离自低温微生物的脂酶、蛋白酶等在食品工业和洗涤剂添加剂中具有很大潜力。低温微生物在低温条件下具有相对高的生长速率且不受中温菌的污染,因而具有广泛的应用前景。

低温酶(cold-adapted enzymes, cold-active enzymes)是低温微生物资源应用中最重要的一类活性物质,它是指在低温条件下能有效催化生化反应的一类酶。低温酶与中温酶相比有以下特点:酶的最适反应温度较同源的中温酶低 $0 \sim 30^{\circ}\text{C}$;在较低温度下($<40^{\circ}\text{C}$),酶的转换数(Kcat)或生理系数(Kcat/Km)高于来自中温菌中的同类酶;低温酶的热稳定性差。

低温酶的低温催化能力,低热稳定性使其在工业应用上有以下的优势:通过温和的热处理使低温酶失活,快速而经济地终止反应;生产过程在低温或室温下进行,无需加热和冷却,可以降低成本;生产过程便于监控。低温酶在工业领域的应用包括以下方面。

洗涤添加剂:如蛋白酶^[23]、脂肪酶^[24]、纤维素酶^[25]可以作为洗涤添加剂,在洗涤行业具有广泛应用。目前研究得较为深入的低温丝氨酸碱性蛋白酶是由嗜冷菌 *Shewanella* strain Ac10 所产生的,该菌能在 4°C 生长,最适生长温度在 20°C 附近,但上限生长温度不超过 30°C ^[26]。在酶的氨基酸组成中,低温酶多偏好酸性氨基酸,以此来增加蛋白质与溶剂之间的相互作用,从而赋予蛋白质更多的柔韧性^[27]。酶的热稳定性也与疏水性氨基酸的含量和组成密切相关,由疏水侧链聚集成簇所形成的疏水核,是蛋白质稳定折叠构象的重要力量与相应的中温蛋白酶相比,低温丝氨酸碱性蛋白酶中疏水性氨基酸的含量明显减少。这些结构因素的改变都导致了其热稳定性的下降。对海洋微生物产生的酶已有很多研究。海洋细菌和古菌产生的酶常常具有特殊的性质,特别是在极端环境下的活性和稳定性。从 6 500 m 深的海底沉积物中分离到的 *Sporosarcina* sp. DSK25^[28] 产生的碱性丝氨酸蛋白酶活性在 60 MPa 下比在 1 个大气压提高了近 1 倍。而且升压可以提高深海细菌某些酶的产酶量。从西太平洋分离的低温耐压菌 *Shewanella piezotolerance* WP3^[29] 在高压条件下培养,可以观察到某些酶的表达量增强和活性升高的情况,有关这方面的研究正在进行之中。

食品工业:低温酶在食品工业中有广泛的应用。例如,低温 β -半乳糖苷酶^[30]可以在低温条件下降低牛奶中乳糖的含量,而世界上有 2/3 的人由于缺乏 β -半乳糖苷酶不能代谢乳糖;在果汁工业中,低温果胶酶可以降低果汁的粘性,使终产品变得澄清;在肉食品工业中,低温蛋白酶有助于肉的嫩化;在面包工业中,低温淀粉酶、蛋白酶、木糖酶可以减少生面发酵时间,提高面包质量;低温淀粉酶是目前国际上研究得最为成熟和透彻的酶。与相应的中、高温酶相比,低温淀粉酶中与蛋白质稳定性构象有关的氨基酸残基的含量基本上都有所减少,并且酶分子的结构柔韧性有所提高。另外,低温酶还可以用在奶酪、酿酒工业等方面。

环境生物治理:利用低温微生物来处理土壤和水体中的污染物具有特别的优势。环境温度季节性大范围的变化,降低了微生物分解有机污染物的效率。低温酶能在低温或中温下有效发挥催化作用,所以低温菌是生物治理的理想材料。例如多元醇的

低温降解已用于飞机跑道附近污染土壤的治理。

低水活条件下的生物催化:商业合成的脂肪酸脂、多肽、寡聚糖衍生物和其它一些化合物水溶性较差。这一问题可以通过使用低温酶在低水活条件下的生物催化作用来解决,因为低温酶具有更强的柔韧性,在低水活条件下易与底物结合。除了低温酶的生物工程应用以外,对低温酶的耐冷机制的研究也是一个热点,它对于其它生物的基因工程改造具有重要的应用前景。

由于低温酶独特的分子结构,使其具有了明显不同于与其对应的中、高温酶的特征:酶的最适反应温度低;酶反应所需的活化自由能低;酶的热稳定性低,在高温下易失活。因此,深海来源的低温酶在生物技术应用中可作为一种既能在低温下高效催化又能在高温下快速失活的酶而具有独到的优势,在冷洗行业、食品添加剂、被污染环境的生物修复、生物转化和分子生物学研究应用等方面具有潜在的广泛应用价值。可以预见,随着低温酶研究的不断深入,在不久的将来,低温酶的应用将更加广阔。

3 前景与展望

从目前的研究结果可以肯定深海具有丰富的微生物资源,但由于我们对海洋微生物的特殊营养要求和培养条件了解不多,使得能在实验室培养的种类还较少,据估计只有 1 % 左右。深海微生物培养所要求的特殊条件如高压、高温或低温以及特殊的营养要求,目前世界大多数实验室难以达到,这极大地限制了对深海微生物资源的研究开发和利用。对一些深海细菌如 *Sphingomonas* sp. PB2256, *Shewanella piezotolerance* WP3 和 *Cycloclasticus oliogotrophus* 的基因组全序列测定有助于了解深海细菌的各种特性,以增加深海细菌的可培养性^[31]。尽管从深海取得的样品目前能够在实验室内进行高压低温培养,但由于目前培养技术的限制和对深海微生物的了解不充分,许多深海微生物不可培养,特别是寡营养微生物。因此,传统的分离培养方法在深海微生物种类调查中不可避免地漏掉一些种类。

深海中存在各种各样的极端微生物如嗜高温菌、嗜冷菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜压菌、嗜盐菌等等。他们是各种极端酶的产生菌。深海因此成为分离和纯化各种极端酶的重要资源库。对这些极端菌产生

的极端酶进行纯化和性质研究,可以丰富我们所研究的酶的种类,进一步了解酶的结构和功能,从而更好地开发好利用极端酶。

近几年来,随着分子生物学的发展,分子生物学方法在分类上的应用日益广泛,特别是 PCR 扩增和 16S rDNA 序列同源性比较的应用,近年来一些较为前沿的分子生物学研究手段开始运用于深海研究,如大规模的大片段 DNA 随机测序,基因芯片,实时荧光定量 PCR 技术,这些技术以及将来可能开发的新的研究手段的运用,必将揭示海洋中具有巨大利用价值的基因资源及微生物来源的酶类物质,直接造福于人类。

参考文献:

- [1] Davidson B S. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganism [J]. **Curr Opin Biotechnol**, 1995, 6: 284-289.
- [2] DeLong E F. Extreme genomes [J]. **Genome Biol**, 2000, 1(6): 10 291-10 293.
- [3] DeLong E F, Karl D M. Genomic perspectives in microbial oceanography. **Nature**, 2005, 437(7 057): 336-342.
- [4] DeLong E F. Microbial population genomics and ecology [J]. **Curr Opin Microbiol**, 2002, 5(5): 520-524.
- [5] Kato C, Bartlett D H. The molecular biology of barophilic bacteria. **Extremophiles**, 1997, 1(3): 111-116.
- [6] Hubel A, Brandau S, Dresel A, *et al*. A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp [J]. **Mol Biochem Parasitol**, 1995, 70(1-2): 107-118.
- [7] Kato C, Li L, Nakaumura Y, *et al*. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11 000 meters [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 64: 1 510-1 513.
- [8] Kato C, Sato T, Horikoshi K. Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples [J]. **Biodivers Conserv**, 1995, 4: 1-9.
- [9] Ishii A, Nakasone K, Sato T, *et al*. Isolation and characterization of the *dcw* cluster from the piezophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea* [J]. **J Biochem (Tokyo)**, 2002, 132(2): 183-188.
- [10] Durand P, Benyagoub A, Prieur D. Numerical taxonomy of heterotrophic sulfur-oxidizing bacteria isolated from southwestern Pacific hydrothermal vents [J].

- Can J Microbiol**, 1994, 40: 690-697.
- [11] Takami H, Inoue A, Fuji F, *et al.* Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1997, 152: 279-285.
- [12] Colquhoun J A, Heald S C, Li L, *et al.* Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomyces [J]. **Extremophiles**, 1998, 2(3): 269-277.
- [13] Nold S C, Zhou J, Devol A H, *et al.* Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the Proteobacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66(10): 4 532-4 535.
- [14] Roberto D, Michela S. Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 1 857-1 861.
- [15] Cary S C. Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi* [J]. **Mol Mar Biol Biotechnol**, 1994, 3(3): 121-130.
- [16] Sharp R J, Ahmad S I, Munster A, *et al.* The isolation and characterization of bacteriophages infecting obligately thermophilic strains of *Bacillus* [J]. **J Gen Microbiol**, 198, 132(6): 1 709-1 722.
- [17] Uemori T, Ishino Y, Doi H, *et al.* The hyperthermophilic archaeon *Pyrodicticum occultum* has two alpha-like DNA polymerases [J]. **J Bacteriol**, 1995, 177(8): 2 164-2 177.
- [18] Hough D W, Danson M J. Extremozymes [J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 1999, 3: 39-46.
- [19] Knapp S, de Vos W M, Rice D, *et al.* Crystal structure of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* at 3.0 Å resolution [J]. **J Mol Biol**, 1997, 267: 916-932.
- [20] Im Y J, Na Y, Kang G B, *et al.* The active site of a lon protease from *Methanococcus jannaschii* distinctly differs from the canonical catalytic Dyad of Lon proteases [J]. **J Biol Chem**, 2004, 279 (51): 53 451-53 457.
- [21] Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, *et al.* Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase-an extremely heat stable enzyme with proofreading activity [J]. **Nucleic Acids Research**, 1991, 19(18): 4 967-4 973.
- [22] Rinker K D, Kelly R M. Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production for the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima* [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2000, 69(5): 537-547.
- [23] Turkiewicz M, Gromek E, Kalinowska H, *et al.* Biosynthesis and properties of an extracellular metalloprotease from the Antarctic marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis* [J]. **J Biotechnol**, 1999, 70: 53-60.
- [24] Mayordomo I, Randez-Gil F, Prieto J A. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans* [J]. **J Agric Food Chem**, 2000, 48: 105-109.
- [25] Coombs J M, Brenchley J E. Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active β -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65: 5 443-5 450.
- [26] Wu C, Shivakumar S. Back-propagation and counter-propagation neural networks for phylogenetic classification of ribosomal RNA sequences [J]. **Nucleic Acids Research**, 1994, 22(20): 4 291-4 299.
- [27] Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, *et al.* Improvement of thermostability of cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. strain Ac10 by rational mutagenesis [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 22(2): 113-117.
- [28] Boruah H P, Bezbaruah B. Protease from *Sporosarcina* sp. RRLJ 1 [J]. **Indian J Exp Biol**, 2000, 38(3): 293-296.
- [29] Wang F, Wang J, Jian H, *et al.* Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3 [J]. **PLOS ONE**, 2008, 3(4): e1937.
- [30] Iyo A H, Forsberg C W. A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65: 995-998.
- [31] Tyson G W, Banfield J F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective [J]. **Trends Microbiol**, 2005, 13(9): 411-415.

(本文编辑:康亦兼)