

海洋极端微生物和极端酶分子生物学研究

汪天虹¹ 侯运华²
(山东大学微生物技术国家重点实验室,教授¹,博士研究生² 济南 250100)

[摘要] 分离自海洋极端微生物的极端酶具有超常的生物学稳定性,能够在极端温度、pH 值、压力和离子强度下表现出生物学活性,因此海洋极端酶为生物催化和生物转化提供了良机。新的极端物种的发现、基因组序列的确定及基因工程技术的应用,加快了发现和制备新酶的进程。蛋白质工程和定向进化技术进一步改善酶的活性和特异性,促进了海洋极端酶的工业应用。对极端酶的分子生物学研究加深了人们对酶稳定性机制的理解,丰富了分子进化理论。

[关键词] 海洋 极端微生物 极端酶 [中图分类号] Q93 Q81

[文献标识码] A [文章编号] 1000-7857(2004)09-0007-04

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EXTREME ENZYMES
ISOLATED FROM MARINE EXTREMOPHILES

WANG Tian-hong HOU Yun-hua

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Enzymes from extremophiles (extremozymes) show activity and stability at extremes of temperature, pH value, low water activity and high hydrostatic pressure. Thus, extremozymes have potential applications in biological catalysis and biotransformation. The discovery of the new extremophiles, the sequencing of the genomes and the development of gene engineering technology have expedited the discovery and preparation of the novel enzymes. The enzymatic activity and specificity of the extreme enzymes have further been improved by protein engineering and directed evolution, which accelerates the industrial application of the extreme enzymes. Research on the extreme enzymes not only have enhanced our understanding of the have enzymes but also enriched the theory of molecular evolution.

Key Words: marine, extremophiles, extreme enzyme **CLC Number:** Q93 Q81

Document Code: A **Article ID:** 1000-7857(2004)09-0007-04

世界海洋所占面积超过地表面积的 70%, 海洋生态环境复杂多样, 海洋微生物具有一些特殊的结构和功能来适应这样的生态环境, 因而海洋微生物是开发新颖生物活性物资的极好的天然资源。在海洋中存在一些能在高温、寒冷、高酸、强碱、高盐、高压或高辐射强度等极端环境下生活的微生物, 如嗜冷菌(psychrophiles)、嗜热菌(thermophiles)、嗜酸菌(acidophiles)、嗜碱菌(alkalophiles)、嗜盐菌(halophiles)、嗜压菌(barophiles)和耐辐射菌等, 统称为海洋极端微生物。海洋极端微生物构成了地球生命形式的独特风景线, 其存在的原理与意义为更好地认知生命现象、发展生物技术提供了宝贵的知识源泉。

极端微生物可以产生在极端环境下发挥作用的极端酶。长期以来, 人们对此并未给予充分的重视。20 世纪 50 年代以后, 各国学者相继开展了对极端微生物的研究工作。20 世纪 90 年代以来, 随着海洋生物技术的勃起, 国外学者相继从深海中分离得到多种新的海洋极端微生物。随着对海洋极端微生物培养和发酵技术、极端酶酶学性质、酶蛋白结构生物学的研究, 以及对酶基因的克隆和表达的探索, 一方面推进了对生命本质的认识, 同时也得到了越来越多的广泛用于化学合成、食品工业、医药行业及其它工业的新酶制剂。本文简要报道了近年来对海洋极端微生物和极端酶研

究的进展情况。

1 海洋极端微生物和极端酶的生物学特性

近年来国内外对海洋极端微生物和极端酶的研究进展很快。日本和欧美等国纷纷投资开展海洋极端微生物及极端酶的研究。如从海洋极端微生物获得嗜冷 α -淀粉酶、枯草杆菌蛋白酶、嗜热淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶、DNA 聚合酶、耐盐蛋白酶、谷氨酰氨酶、耐有机溶剂的菌株等报道, 利用海洋蓝细菌 *Anabaena Species*TU37-1 在氩气和氮气环境中光合作用产氢^[1]、从海洋链霉菌中分离到抗赤腐病病原菌 *Pythium porphyrae* (引起紫菜属赤腐病) 的抗真菌蛋白^[2]等报道。最令人振奋的是美国文特尔等人在马尾藻海的细菌中发现了 121 万余种基因, 超过以前公共数据库所列微生物种基因的总数, 其中全新基因仍达 7 万余种, 有 782 个基因蛋白质产物对光敏感, 还发现约 5 000 个新基因的功能涉及氢能的开发。整个进展情况都显示了开发海洋微生物基因资源的重要性和紧迫性。

1.1 嗜冷菌, 嗜冷酶

嗜冷菌是指在低于摄氏 10℃才能生长的微生物, 最适生长温度往往为-2℃。嗜冷菌产生许多在低温下具有高催化活性的酶, 这类酶称为嗜冷酶^[3]。研究者在深海和南北极

的海洋环境中发现不少嗜冷菌群,并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、枯草杆菌蛋白酶和磷酸丙糖异构酶等。这些酶均在低温和常温下显示较高的催化效率,而且对高温敏感。目前,来自嗜冷菌的低温酶因为具有降低能耗的特点而在工业应用中受到重视。例如:低温酶用于洗涤剂工业的需要与日俱增;低温蛋白酶、低温淀粉酶和低温脂酶具有巨大的应用价值;低温多聚物降解酶在制浆和造纸方面也有重要作用;另外,低温酶还能促进食品加工业的发展^[4]。

与常温酶相比,低温酶分子结构的柔韧性增强。研究表明,嗜冷菌蛋白质在低温下能够保持结构上的完整性,可能是由于其蛋白质分子有更多的氢键和盐键,从而能形成相对松动和具有弹性的结构^[4]。因此,低温酶具有高催化活性和温度敏感性的显著特征。在蛋白质二级结构和三级结构的研究水平上比较嗜冷酶和高温酶的分子结构,探讨酶结构与功能的相互关系,为阐明生物多样性的分子基础提供了一种模型。

1.2 嗜热菌,高温酶

嗜热菌广泛分布在草堆、厩肥、温泉、煤堆、火山地、地热区土壤及海底火山附近等处^[3]。在海洋环境中,很多地理活跃地带出现热流床,这些热流地域的温度可高达 350℃;水底沉积物含有丰富的矿物质,已发现有许多嗜热和超嗜热微生物存在。从深海中已分离的原核嗜热菌有十几个属,它们对高温的适应机制主要表现在细胞膜上脂肪酸成分、耐高温酶和生物大分子的热稳定性上。嗜热菌具有潜在的生物应用价值,有许多研究机构已经从这些嗜热菌中筛选出具有热稳定性的酶,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。如:Barros J. A. 等在太平洋底部发现可生长在 250~300℃高温高压下的嗜热菌^[3];Schuliger JW 报道对海洋超热古菌新的解淀粉酶进行了纯化和性质研究;Leveque E 等克隆了从深海热液口处分离到的超热古菌 *Thermococcus hydrothermalis* 的热活性和热稳定的 α -淀粉酶基因^[5];Ken Takai 等人从日本浅海热流床中分离得到嗜热菌 *R. obamensis*,从中纯化得到磷酸烯醇丙酮酸激酶(DEPC)^[6]。据了解,植物界中最耐热的种类可能是南非的生石花,最高的耐受温度为 50℃,脊椎动物能生长的最高温度也只有 50℃。存在 200℃以上高温下生长的微生物确实是自然界的一项奇迹。

对高温酶的研究表明^[7]:酶的热稳定性主要由分子内部的结构决定,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)的数目越多,热稳定性越高。相反,对立体键不利的因素将对酶的热稳定性产生影响。

1.3 嗜压菌,嗜压酶

嗜压菌仅仅分布在深海底部和深油井等少数地方。嗜压菌和耐压菌不同,它们必须生活在高净水压条件下。一种生活在深海的假单胞菌 *Pseudomonas bathycete* 可在 1 000 个大气压、30℃下生长。在太平洋深 4 000m 处,已经发现有 4 属酵母菌。在 6 000m 深海中可以找到 *Micrococcus*(微球菌属)、*Bacillus*(芽孢杆菌属)、*Vibrio*(弧菌属)和 *Spirillum*(螺菌属)等细菌^[3]。在 10 000m 深海处,水压高达 1 140 个大气压,仍可找到许多种嗜压菌。目前关于嗜压菌或耐压菌的耐压机制仍然不清楚。

近期研究表明^[7],适当的静压力可以增加酶的活性和稳

定性,但是当压力超过一定的范围时,酶的弱键被破坏,酶的三维构象解体,使酶丧失活性。在高压条件下,底物的溶解度增加,溶剂的粘度降低,从而提高了物质的传输速率和反应速度。此外,在高压下酶往往具有更高的特异性,因此有必要从嗜压菌中分离嗜压酶,而深海嗜压菌正是嗜压酶的重要来源。

1.4 嗜酸菌和嗜碱菌,嗜酸酶和嗜碱酶

最适生长 pH 值在 8.0 以上,通常在 9~10 之间的微生物称之为嗜碱菌^[8]。而嗜酸菌能生活在 pH 值 1 以下的环境中。从海底一些高酸碱的区域分离得到的微生物大多具有嗜酸或嗜碱性,从中分离纯化的酶也大多是相应的嗜酸酶(最适 pH<3.0)和嗜碱酶(最适 pH 为碱性,一般在 9.0~11)。对嗜酸酶和嗜碱酶酶学性质的研究^[7]显示,与中性酶相比,嗜酸酶在酸性环境的稳定性是由于酶分子中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中含有较高比率的碱性氨基酸所致。

1.5 嗜盐菌,嗜盐酶

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,称为嗜盐酶。日本海洋科学技术中心 Takami H 从深海沉积物中分离到碱性和极端耐盐的 *Oceanobacillus iheyensis* HTE831^[9]。嗜盐菌通过保持胞内渗透压的平衡来适应高盐度的环境。它们主要在细胞内积累与外界环境相同浓度的盐,如氯化钠或氯化钾。因此从嗜盐菌中分离得到的酶可以在高盐浓度条件下具有催化活性(KCl 约 4M, NaCl >5M)^[7]。这些来自嗜盐菌的蛋白的氨基酸序列中含有大量的带负电的氨基酸以避免在高盐条件下形成沉淀。这一特点决定了在低盐条件下嗜盐酶的溶解性通常很差,这就限制了这些酶在工业上的应用。但是,可以利用这一特性将嗜盐菌产生的酶用于液相/有机溶剂和非液相介质中。Dordick K J 报道了来自极端嗜盐菌 *Halobacterium halobium* 的胞外蛋白酶可以在水/N'-N'-二甲替甲酰胺溶液有效地合成多肽^[10]。

继 Moriya K 等发现了一些嗜盐菌具有耐有机溶媒的特性后,从海底有机物沉积区已经分离到一系列耐有机溶媒的海洋微生物。日本 DEEPSTAR 研究小组从日本深海中分离到多种耐有机溶媒的菌株,包括原油降解菌 DS-117、利用硫的 DS-944 菌、降解聚芳香烃菌 DS-1906、降解胆固醇的 ST-1 菌和烃降解酵母 Y40 等,有些菌耐受有机溶媒的浓度达 50%,这将使耐有机溶剂酶在有机化工和环境保护上的应用翻开新的一页。

2 海洋微生物极端酶分子生物学研究进展情况

2.1 极端酶基因的克隆

利用基因重组技术,克隆极端酶的编码基因,并进行序列分析,从而进一步探讨酶的结构与功能的关系,是目前研究极端酶的主要方法之一。

极端酶基因克隆的常规程序为:(1)分离纯化极端酶;(2)测定目的蛋白的 N 末端和 C 末端的氨基酸序列;(3)根据两端氨基酸序列推导的核苷酸序列设计简并引物;(4)通过 PCR 扩增杂交探针;(5)构建基因组文库或 cDNA 文库;(6)通过分子杂交从文库中筛选目的基因。极端酶基因的克隆技术与常规酶基因克隆技术没有太大的差别。由于极端酶和

常规酶的生物学特性相差很大,因此蛋白质的保守序列难以确定,这使得通过非同源探针杂交获取目的基因的方法不适用于极端酶基因的克隆。极端微生物难以培养,以及培养获得的菌体有限,这些都给基因克隆带来了一定的困难。

随着海洋微生物培养技术的发展,可供研究用的极端微生物基因组数目不断增加,这有利于新型极端酶基因的发现和鉴定。目前至少已有10种古细菌的基因组序列已经完全测序,另有12种古细菌的基因组全序列测序也接近尾声^[7]。此外,大量极端细菌基因组的研究也正在努力进行当中。通过对极端微生物基因组全序列的分析,人们发现其中很多开放性阅读框架和现有核苷酸序列数据库中的序列几乎没有同源性,这些开放性框架所编码的蛋白质则很可能是极端微生物适应极端环境的原因,而且在这些未知基因中一定存在很多其编码产物是具有重大应用前景的酶的基因。这些不断增加的基因资源对于解决在活性检测中难以检测到活性酶这一困难是一笔很大的财富。由于单基因的表达受培养基组分的影响很大,所以在功能性检测中会漏掉一些重要的功能基因。例如掘越氏热球菌(*Pyrococcus horikoshii*)生存于冲绳岛附近海底约1395m火山口,其最适生长温度为摄氏95~105℃,分类上属广古菌^[11]。它的基因组已经被测出(Kawarabayashi等1998年)。根据基因组测序结果,研究人员已成功克隆得到*Pyrococcus horikoshii* DNA聚合酶、 α -淀粉酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、 α -甘露糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、纤维素酶和木聚糖苷酶等基因。

2.2 极端酶基因表达系统的构建

由于极端微生物生长缓慢,且产酶量低、需要特殊的设备,所以传统的生物发酵技术不能适应极端微生物极端酶的生产,必须发展其它方法来获得大量极端酶。极端酶基因在常温宿主中高效表达是一个引人注目的替代方案^[12]。采用该方案使极端酶的产量高且易于纯化,非常经济。研究发现许多极端酶基因可以在常温宿主(*E.coli*)中表达,从而实现工业化生产。如南极嗜冷菌河豚毒素交替单胞菌的 α 淀粉酶基因在中温菌中得到了表达,且表达产物实现了正确的折叠。其它在大肠杆菌中表达的极端酶有嗜冷嗜压光合细菌中的苹果酸脱氢酶、嗜冷芽孢杆菌中的丙酮酸激酶、静止嗜冷杆菌的嗜冷脂酶、嗜冷弧菌磷酸丙糖异构酶、嗜冷弧菌的天冬氨酸氨甲酰基转移酶、嗜盐单胞菌属的二磷酸激酶、极端嗜热菌海栖热胞菌MSB8(*Thermotogamaritima* MSB8)木聚糖酶等。这些工作为极端酶的基础研究和应用研究奠定了基础。

在大肠杆菌中进行高效表达的分子技术已经相当成熟,并且有许多现成的诱导型表达载体可以直接使用。然而,大肠杆菌中高效表达所造成的包涵体问题促使人们寻找可以代替大肠杆菌的宿主系统,如原核系统*Bacillus*、*Pseudomonas*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*和真核系统*Pichia*、*Khuyveromyce*、*Candida*和*Hansenula*等系统。若我们要表达需经糖基化修饰后才有催化活性的极端酶时,应当首先考虑真核表达系统。

3 国内对海洋极端酶的研究现状及前景展望

近年来,国内多所研究单位和大专院校已陆续开展了对海洋生物资源(包括基因资源)的研究工作。国家科技部于1999年立项"海洋药源生物资源及基因库的构建"基础

性研究项目,开始全面地、大规模地收集和筛选海洋药源生物,建立种质库和标本库。由国家海洋局第三海洋研究所徐洵院士和中国海洋大学管华诗院士共同承担的该研究项目目前已收集到312种海洋药源生物标本,收集极端微生物65种395株,并已得到极端微生物基因16个。

中科院北京微生物研究所马延和2002年从新疆盐湖中分离得到嗜盐古菌ZP-6,并对该菌所产乙酰辅酶A硫解酶进行了分离纯化和性质研究。2004年又报道从西藏扎布耶茶卡盐湖中分离到一株产木聚糖酶的嗜碱菌^[13],分离纯化得到的木聚糖酶在pH5.5~10.5范围内均有较高酶活和稳定性,最适反应温度为65℃。

山东大学微生物技术国家重点实验室对海洋微生物和极端酶也作了多方面研究工作。包括:克隆了海洋交替假单胞菌冷活性纤维素酶基因,并在大肠杆菌中进行了表达;构建了海洋适冷产黄青霉FS010的cDNA文库,克隆得到木聚糖酶cDNA基因和碱性丝氨酸蛋白酶基因,并对蛋白酶进行了分离纯化和特性研究;对掘越氏热球菌*Pyrococcus horikoshii*所产高温DNA聚合酶进行了分子生物学研究,等等。目前正在通过基因差异表达技术构建部分基因组文库,进一步克隆低温淀粉酶、纤维素酶和其它功能基因。

极端微生物不仅可以提供新的遗传信息,而且具有独特的细胞结构、特殊代谢机制以及各种各样的特殊功能。对极端微生物的新型代谢产物包括极端酶等的研究与应用有可能改变整个生物制剂和生物催化剂的面貌。目前用来筛选和获得极端酶的工具也在持续增加。据估计,特定环境中可以培养的微生物不到总数的10%,因此极端酶基因表达系统的进一步改善将会促进海洋极端微生物资源的开发,而且将使从这些多样性资源构建基因表达文库成为可能。如果能够快速而准确地筛选表达文库,那么将会发现更多新型的极端酶。这些极端酶将更准确、更具特异性和更环境友好地催化生物反应过程。此外,蛋白质工程和随机突变技术的共同发展也将提高极端酶在工业上的应用。

我国的地域环境复杂、多样,生物资源丰富。利用这一优势,从资源的发掘、机制研究到应用开发,系统地认识、保护、开发和持续利用极端微生物及其天然产物,进一步利用现代分子生物学技术挖掘、开发极端微生物和极端酶在环境、能源、农业、健康、轻化工等领域的应用潜力,有可能突破当前生物技术领域中的某些局限,使我们的生物技术能力发生革命性的变化,最终产生重要的工业生产价值。可以预见,极端微生物和极端酶在人类社会的各个方面,将会发挥越来越重要的作用。

参考文献(References)

- [1] Kumazawas. Photoproduction of hydrogen by the marine Heterocystous cyanobacterium *Anabaena* species TU37-1 under a nitrogen atmosphere [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5(3): 222~226
- [2] Woo JH et al. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(6): 2666~2675
- [3] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993
- [4] Cavicchioli R et al. Low-temperature extremophiles and their applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(3): 253~261
- [5] Leveque E et al. Cloning and expression of an α -amylase

海水养殖鱼类抗病分子育种研究进展及前景展望^{*}

陈松林

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 研究员、博士生导师 山东青岛 266071)

〔摘要〕 病害是限制水产养殖业可持续发展的关键因素。而我国目前尚缺乏优良的抗病养殖鱼类品种。鱼类功能基因组和分子标记技术的发展为筛选鱼类抗病相关功能基因和分子标记提供了机遇。基因转移、分子标记和基因标记等分子育种技术是培育抗病优良鱼类新品种的很有潜力的技术手段,已成为国际上的发展趋势,也是我国今后应大力发展的研究领域。本文结合笔者实验室的工作,对某些海水养殖鱼类抗病相关功能基因及抗病分子育种研究的最新进展作一综述介绍。

〔关键词〕 海水鱼类 抗病基因 基因转移 基因标记 分子标记 分子育种 抗病品种

〔中图分类号〕 Q2 Q3 S9 P7 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1000-7857(2004)09-0010-04

PROGRESS IN MOLECULAR BREEDING FOR
DISEASE-RESISTANT MARINE FISHES AND ITS PROSPECTS

CHEN Song-lin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, Shandong Province, China)

Abstract: Disease is key factor restricting sustainable development of fisheries. No fish species with enhanced disease-resistance are available in China. The development of fish functional genomics and molecular marker techniques provides chance for screening functional genes or molecular markers related to disease-resistance. Molecular breeding techniques such as transgenesis, gene marker-assisted selection breeding and molecular marker-assisted selection breeding are potential approaches to developing new strains with enhanced disease-resistance in aquaculture, which should be strengthened in China. The aim of this paper is to provide a survey on the progress in the field of fish disease resistance-related functional genes and molecular breeding.

Key Words: marine fish, disease resistance-related genes, transgenesis, gene marker, molecular marker, molecular breeding, disease-resistant stock

CLC Number: Q2 Q3 S9 P7 Document Code: A Article ID: 1000-7857(2004)09-0010-04

1 前言

近 20 年来,我国的海水养殖业有了突飞猛进的发展,

* 本文为作者在第 225 次香山科学会议“海洋生物基因资源的研究与利用”上所作专题报告的部分内容。本项研究得到国家“863”高技术研究发展计划(2002AA626010)和国家自然科学基金(30170740)的支持。

养殖规模越来越大、种类越来越多、产量逐年增加。海水养殖产量从 1987 年的 193 万吨增加到 2001 年的 1 132 万吨,占海洋渔业产量的比重从过去的 10%左右上升到 44%,约占全球海水养殖总产量的 1/3 以上,我国已成为世界海水养殖大国。海水养殖鱼类,特别是真鲷、牙鲆、大菱鲆和大黄鱼等名贵鱼类已成为我国重要的海水养殖对象。目前,我国海洋渔业总产值达 1 500 亿元,约占全国整个海洋产业的

encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 186(1): 67~71

[6] Takai K et al. The gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from an extremely thermophilic bacterium, *Rhodothermus oba* mensis: cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* [J]. *Microbiology*, 1998, 144 (5): 1 423~1 434.

[7] Bertus van den Burg. Extremophiles as a source for novel enzymes [J]. *Current Opinion in Microbiology* [J]. 2003, 6(3): 213~218

[8] 马延和. 嗜碱微生物[J]. 微生物学通报, 1999, 26(4): 309

[9] Lu J et al. *Oceanobacillus ihyensensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a

depth of 1050 m on the Iheya Ridge [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 205(2): 291~297

[10] Ryu K et al. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(4): 266~275

[11] Gonzalez JM et al. *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough [J]. *Extremophiles* [J], 1998, (2): 123~130

[12] Schiraldi C et al. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles [J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20 (12): 515~521

[13] 曾艳等. 嗜碱菌 (*Bacillus* sp.) ZBAW6 的木聚糖酶的分离纯化及其性质 [J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 75~79

(责任编辑 胡春华)