极端酶的研究进展

翁 檪 冯 雁*
(吉林大学分子酶学工程实验室, 长春 130023)

摘要 极端酶具有超常的生物学稳定性, 能够在极端温度、pH、压力和离子强度下表现出生物学活性, 因此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, 促进了极端酶的工业应用. 对极端酶的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 极端酶, 异源表达, 生物催化
学科分类号 Q814

生物催化技术的深入研究与广泛应用, 是继生物制药和生物科技农业之后, 生物技术发展的“第三次浪潮”和重要支柱, 这一技术的核心就是生物催化剂的开发. 酶作为生物催化剂, 已经广泛应用于化工、食品、医药、轻工业等领域. 但是工业生产所需的苛刻条件和酶稳定性之间的矛盾, 长久以来一直在制约着酶技术的发展和应用. 而运用化学修饰、固定化及定向进化等技术, 仅仅在一定程度上提高了酶的稳定性和反应的适应性, 还远远达不到要求. 于是, 人们不断努力探寻能在“恶劣”环境下发挥催化作用的酶. 随着相关技术的发展, 从极端环境下分离和培养微生物成为可能, 目前已得到在极端温度 (– 2~ 15 ℃, 60~ 110 ℃)、极端离子强度 (2 ~ 5 mol/L NaCl) 或极端 pH (< 4, > 9) 环境中生长的微生物——极端菌. 极端菌是在与生物物质不相容的条件下稳定生存, 并且具有独特的新陈代谢途径的菌种, 因此可以作为具有独特活性和重要应用价值的极端酶的来源[1]. 极端酶作为生物催化剂的应用已经引起人们的关注.

近期工作表明极端环境中生物体的多样性远远大于最初的预想. 然而大多数极端菌还没有以纯培养的方式分离, 因而对极端酶的认识极为有限. 但是随着分子克隆技术的应用, 一些极端微生物的基因组被测定, 极大地加快了极端酶的研究进程. 同时对极端酶的分离鉴定、稳定性、底物特异性以及对映体选择性的深入了解, 大大促进了在分子水平上对极端酶的理解, 加快了生物催化技术的发展.

1 极端菌和极端酶

极端菌是生活在地球上最极端环境条件下的有机生命, 又称为嗜极菌 (extremophiles). 对极端菌的研究, 有利于了解生命的本质, 并控制、利用它们. 极端菌的发现, 促使人们尝试着去界定最极端生命存在的条件[2]. 与大多数适应特定条件的生物体一样, 极端菌生存的温度、pH 等范围很窄. 例如超级嗜热菌 *Pyrococcus horikoshii* 的最高生长温度为 113 ℃, 在 85 ℃以下生长速度很慢[3]. 根据对 16S rRNA 序列的分析, 大多数极端菌属于古核菌的成员. 古核菌是自然界三种生命 (原核、真核和古核) 形式中重要的一种[4]. 有趣的是, 人们注意到古核菌全部是最原始的细菌, 这一点可由它们的位置靠近通用的进化树根部来证明.

目前只有 0.1% ~ 1% 在极端环境中生长的生物体能够以纯培养方式获得, 而这些微生物可以产生极端酶, 通过研究人们意识到极端酶在生物技术中具有潜在的重要作用. 但是, 极端环境微生物培养条件的严格性和有限的产酶量, 限制了极端酶成为工业用酶. 近年来, 基因研究的迅速发展, 使极端酶的研究有了重要的进展, 即极端菌全 DNA 序列的确定和分析[5]. 在 NCBI 报道的古核菌基因库数据中, 已报道 16 种菌的全基因, 其中 5 个来自极端嗜热菌[6~8]. 将这些基因组序列进行分析, 与来自其他生物体已知功能的蛋白质基因序列比较, 大约一半的开放式阅读框得到鉴定. 对基因组数据库的分析, 使人们能够对用于生物转化的极端酶进行快速和有效的选择. 虽然基因产物的一般功能可以通过序列比较来鉴定, 但是极端酶的相

* 通讯联系人.
Tel: 0431-8922333-2812, E-mail: yfeng@mail.jlu.edu.cn
收稿日期: 2002-04-18, 接受日期: 2002-05-28

关信息如底物特异性、对映体选择性和稳定性等，仍然需要通过分析表达的蛋白质产物来确定.

2 极端酶的制备

在过去的几年里，从极端环境中发现酶的可能性大大提高，这归功于极端环境中微生物培养技术的发展. 但是培养天然极端菌时，极端菌的生长速度极其缓慢，酶产量低，而且还需要使用专用仪器，这与采用标准工业发酵和下游纯化技术的工艺不同，因而极端酶的生产成本提高. 目前人们已经应用微生物酶生产的经典路线来获得极端酶，该路线涉及纯培养生物体的分离、对来自天然宿主相应基因的克隆与表达. 其中最为重要的是将极端菌的基因转移到普通宿主菌中，这样就可以在温和的条件下利用普通微生物来生产极端酶[9]，从而建立大量制备极端酶的方法和生产路线，使极端酶得以广泛应用于工业生产.

目前大多数极端酶是应用大肠杆菌等宿主菌异源表达成功的. 但是在表达具有生物活性的极端酶时，根据菌种、酶性质等的差异，还存在一些技术难关. 首先，古核菌应用的遗传密码子与大肠杆菌略有不同. 尽管大多数古核菌所用的密码子与大肠杆菌相同，但是仍有几个氨基酸的密码子与大肠杆菌在使用频率上存在差异，如古核菌中 Arg 的密码子为 AGG，而在大肠杆菌中的使用频率仅为 1.4%. 因此对于含较多 Arg 的酶或蛋白质，在大肠杆菌中的表达率就会大大降低. 为提高表达率，Novagen 公司已生产富含编码 Arg、Leu、Ile 的 tRNA 的 coden-plus 细胞用于古核菌中蛋白质的表达. 其次，通常来说，酶在与其源微生物生长条件相似的条件下表达才能表现出高活性. 但工程菌的生存环境与极端菌明显不同，因而酶蛋白在表达后是否能形成活性构象是衡量异源表达的重要指标之一. 另外，古核菌中有一些特殊的伴侣蛋白辅助某些蛋白质形成正确构象，因此也增加了古核菌蛋白异源表达的难度.

现在大量嗜热性蛋白已在大肠杆菌中表达成功[10]，而且大多数是应用常规途径在 30~ 37℃获得成功的，如嗜热的谷氨酸脱氢酶[11]. 令人兴奋的是嗜热酶在表达完毕时，可以通过高温加热 (80 ~ 85℃) 来激活，而此时，绝大多数大肠杆菌的蛋白质因为受热而变性沉淀，由此极大地简化了嗜热酶的分离提纯条件. 许多嗜冷酶也已成功地进行了异源表达，如来自南极嗜冷菌中的柠檬酸合成酶[12]. 在这种情况下，一般采用低温 (25~ 27℃) 进行表达，以便于提高酶的生物活性. 嗜盐酶的异源表达是比较复杂的问题. 因为嗜盐菌细胞内环境与其生长基质是等渗的，而嗜盐酶是在大约 3~ 5 mol/L KCl 中进行蛋白质合成和折叠的. 来自嗜盐菌的基因在大肠杆菌中一般在低离子强度环境中进行异源表达，因此常常形成无活性的酶或包涵体[13]. 应用变性剂如盐酸胍或尿素等伸展或溶解蛋白质，然后在氯化钠存在条件下复性，一般会形成与天然嗜盐酶性质相似的产物. 对于极端 pH 下发挥作用的极端酶的生产，目前研究还很有限. 可以预测在应用大肠杆菌进行异源表达时，对于胞内可溶性酶的正确折叠没有影响. 因为嗜酸菌和嗜碱菌的细胞内 pH 值为中性. 但是对于在大肠杆菌中表达的胞外酶，由于是在非天然条件下折叠，因此会导致不溶性或无活性的酶蛋白产生.

3 极端酶的应用

随着对极端酶研究的深入，将有越来越多的酶投入市场. 其中嗜热酶是研究和开发利用最早的极端酶. 目前最重要且有影响的嗜热酶为 DNA 聚合酶和高温 α-淀粉酶. 其他一些嗜热酶如蛋白酶、脂肪酶、糖化酶等在工业中的应用也日益广泛. 与嗜热酶相比，对于嗜冷酶的研究还远远不够，但是考虑到嗜冷酶各种不同的性能，它的潜在价值也很高.

下面主要集中讨论嗜热酶和嗜冷酶的潜在工业应用领域:

3.1 洗涤剂

酶在工业中最重要的应用领域是洗涤剂行业，如蛋白酶，脂肪酶，α-淀粉酶[14] 和纤维素酶等，上述酶均已广泛用作去污剂的添加剂. 然而，一般的酶是在 30~ 40℃中发挥作用，如果水的温度达不到或超过该温度，则洗涤效果将受到影响. 国内和世界上绝大多数地区均使用冷水洗涤，既可以减少能量消耗，也可以减少磨损. 使用加入嗜冷酶的洗涤剂就可以达到较好的效果. 目前 Gerike 小组已经开展了嗜冷酶的研究[12]，并且应用于洗涤剂工业中. 但是使用低温酶的缺点是它的不稳定性，因此应用 DNA 重组技术改造酶，使其在低温下保持高催化效率的同时，还保持一定的稳定性[15]. 另一方面，洗碗机和工业去油污使用的洗涤剂需要在高温下洗涤，因而需要开发高温酶作为添加剂. 因此，极端酶的应用将拓展洗涤剂市场.

3.2 食品工业

嗜冷酶在食品工业方面的应用潜力是巨大的. 例如, 在肉类加工工业中, 蛋白酶有助于使肉变嫩; 在糕点烘烤的过程中, 淀粉酶、蛋白酶和木聚糖酶直接作用于淀粉, 可以改进面团和面包屑的性质, 同时还保持香味和水分. 嗜冷酶的应用不但利用其高特异活性, 节省酶量, 而且也因为它们易失活, 从而使酶作用终止. 这样对食物的口感和质量有很好的保持作用, 而不必担心酶持续作用改变食物的结构. 在以上方面, 嗜冷酶是嗜温酶的良好替代物.

目前很多调味剂是应用蛋白酶水解鸡肉或鱼肉产生的. 应用嗜热酶在进行调味剂加工时可以减少作用时间, 降低酶的使用量, 有效地降解肉类成为多味肽. 另外嗜热酶在淀粉糖化过程中发挥着重要作用[16], 如高温 α-淀粉酶和糖化酶在玉米淀粉深加工中得到大量使用. 在将玉米淀粉水解成葡萄糖过程中, 高温有利于淀粉溶解在水中以促进水解.

3.3 环境保护

应用微生物来减少环境污染是生物技术的重要内容. 在油脂加工厂附近, 油类和脂类造成很严重的有机物污染. 而油类在低温条件下与水的相溶性是很低的, 在高温条件下则有利于产生微生物并易于利用. 因此高温微生物的开发已引起环保工作者的重视.

另一类污染是由于人类活动造成的水污染, 如芳香烃化合物、重金属、生物高聚物 (纤维素、甲壳质和脂肪等), 由于区域和气候的差异, 很多是在低温条件下处理, 因此将能降解污染物的嗜冷酶基因在嗜冷菌中强化, 并将其接种于污染的环境中, 能有效地提高其生物降解力.

3.4 有机相中酶催化合成

生物催化剂在有机溶剂中已经被证明具有合成新化合物、开辟新合成途径的能力. 在微水环境中用脂肪酶、蛋白酶等可以催化合成大批有价值且难溶于水的脂肪酸、多肽、低聚糖等医药中间体及精细化工产品[17]. 酶在有机相中的缺点是催化效率低, 易失活, 但嗜热酶在有机溶剂中表现出特殊的稳定性, 因而具有极大的应用潜力. 极端酶不仅在蛋白质稳定性的基础研究上有非常重要的意义, 而且对了解稳定性、屈曲性或可塑性以及催化效率之间的关系也是重要的.

4 结论与展望

很久以来人们就已经认识到酶的稳定性与工业生产所需的苛刻条件存在矛盾. 提高极端酶在各种极端条件下的稳定性和酶活力, 给这一问题提供了可能的解决办法. 目前, 大部分极端酶尚未被发现. 随着更多的生物体被分离, 更多的极端酶被提取、鉴定, 极端酶在生物催化和生物转化方面的应用一定会大大拓展, 同时很可能进一步扩展限制生命的范围.

基因工程技术的引入, 使极端酶的大规模生产和应用成为现实. 而定向进化技术 (随机诱变、定点突变等) 的运用促进了极端酶的研究及应用, 特别是定向进化实验中产生的选择性突变, 解决了极端酶异源表达所受的限制. 尽管对极端酶在极端条件下的稳定性和活性中心结构的研究、理解还远远不够深入, 也不能很好地改变极端酶的特异性和催化活力, 但是极端酶的研究使人们对酶在酶学水平上有了更加深入的认识, 极大地拓宽了酶的应用领域.

参 考 文 献

1 David W, Michel J. Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology, 1999, **3** (1): 39~ 46

2 Blochl E, Rachel R, Burggraf S, *et al*. gen and sp. nov. represents a novel group of Archaea extending the upper temperature limit for life to 113℃. Extremophiles, 1997, **1** (1): 14~ 21

3 Huber H, Stetter K. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. J Biotechnol, 1998, **64** (1): 39~ 52

4 Damson M J, Hough D W. Strcture, function and stability of enzymes from Archaea. Trends Microbiol, 1998, **6** (8): 307~ 314

5 Brown J R, Doolittle W F. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. Microbiol Mol Bio Rev, 1997, **61** (4): 456 ~ 502

6 Smith D R, Stamm L A, Deloughery C, *et al*. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: functional analysis and comparative genomics. J Bacteriol, 1997, **179** (22): 7135~ 7155

7 Deckert G, Warren P V, Gaasterland T, *et al*. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. Nature, 1998, **392** (6674): 353~ 358

8 Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, *et al*. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. DNA Res, 1998, **5** (2): 55~ 76

9 Connaris H, West S M, Hough D W, *et al*. Cloning and exprssion in *Escherichia coli* of the gene encoding citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Extremophiles, 1998, **2** (2): 61~ 66

10 Muir J M, Hough D, Danson M J. Citrate synthase from the hyperthermophilic Archaea *Pyrococcus Furiosus*. Protein Eng, 1995, **8** (6): 583~ 592

11 Kujo C, Sakuraba H, Nunoura N, *et al*. The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*: cloning, sequencing, and expression of

the enzyme gene. Biochim Biophys Acta, 1999, **1434** (2): 365 ~ 371

12 Gerike U, Danson M J, Russell N J, *et al*. Sequencing and expression of a cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. Eur J Biochem, 1997, **248** (1): 49~ 57

13 Lin S C, Lin K L, Chiu H C, *et al*. Enhanced protein renaturation by temperature-responsive polymers. Biotechnol Bioeng, 2000, **67** (5): 505~ 512

14 Feller G, d'Amico D, Gerday C, *et al*. Thermodynamic stability of a cold-active α-amylase from the Antarctic bacterium alteromonas haloplanctis. Biochemistry, 2001, **38** (14): 4613~ 4619

15 Miyazaki K, Wintrode P L, Grayling R A, *et al*. Directed Evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. J Mol Biol, 2000, **297** (4): 1015~ 1026

16 林 影, 卢荣德. 极端酶及其工业应用. 工业微生物, 2000, **30** (2): 51~ 53
Lin Y, Lu R D. Industrial Microbiology, 2000, **30** (2): 51~ 53

17 Raia C A. Characterisation of redox proteins from extreme thermophilic archeae bacteria: studies on alcohol dehydrogenase and thioredoxins. Bioeletronics, 1995, **10** (2): 135~ 140

Research Development on Extreme Enzymes

WENG Liang, FENG Yan*

(*Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun* 130023, China)

Abstract Extreme enzymes have super biological stability. They demonstrate biological activity at extreme temperatures, pH, pressure and ionic intensities. Thus, extreme enzymes provide good opportunities for biological catalysis and transformation. The discovery of the new extreme species, the confirmation of the genome sequence and the application of gene engineering technology have expedited the discovery and preparation of the new enzymes. Protein engineering and directed evolution further alter the enzymatic activity and peculiarity of the extreme enzymes, which fosters the industrial application of the extreme enzymes. Research on extreme enzymes increases comprehension of the mechanism of enzymatic stability and enriches the theory of molecular evolution.

Key words extreme enzyme, heterogeneous expression, biological catalysis

---

* Corresponding author. Tel: 86-431-8922333-2812, E-mail: yfeng@mail.jlu.edu.cn

Received: April 18, 2002 Accepted: May 28, 2002