

冷适应微生物产生的冷活性酶

辛明秀 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

COLD-ACTIVE ENZYME PRODUCED BY COLD ADAPTED MICROORGANISMS

Xin Mingxiu Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

关键词 冷活性酶 冷适应微生物 生物技术

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)06-0661-64

冷适应微生物(Cold adapted microorganism)包括嗜冷菌和耐冷菌。嗜冷菌可在 0℃ 生长,其最适和最高生长温度分别低于 15℃ 和 20℃。耐冷菌可在 0℃~5℃ 生长繁殖,其最适和最高生长温度分别低于 20℃ 和 35℃。冷适应微生物通过产生冷活性酶(Cold-active enzyme)来调节它们的代谢活动并以此来适应低温环境。依 Feller(1996)提出的定义,冷活性酶具有如下特征:1. 酶活性曲线作为温度的函数趋向于低温;2. 在低温范围内(<40℃)酶的转换数(k_{cat})或生理系数(k_{cat}/K_m)高于来自中温菌中的同类酶;3. 在室温条件下酶的热稳定性较中温菌低^[1]。近年来对嗜热酶已经作了相当深入的研究,与嗜热酶相比对冷活性酶所进行的研究则相对较少。但冷活性酶研究的意义却十分重要。通过这类酶与同种的中温酶或高温酶相比较在酶的二级结构和三级结构上探讨酶的结构与功能的相互关系,为从分子水平上阐明生物多样性的分子基础提供一种模型。另一方面这类酶在生物技术领域中具有潜在的应用价值。这类酶有可能取代具有同类作用的来自中温菌的同类酶,因为冷活性酶在低温条件下或较低的中温条件下具有很高的催化活性。

1 冷适应微生物产生的冷活性酶

从嗜冷菌中研究冷活性酶最早是 Morita 及合作者^[2]。他们报道了海产弧菌(*Vibrio marinus*)苹果酸脱氢酶。该酶在 15℃~20℃ 具有活性,而超过 20℃ 时则很快失活。现已对许多冷适应微生物所产生的冷活性酶进行了研究(表 1)。关于冷适应微生物产生的冷活性酶必须明确以下几点。①冷活性酶分离自冷适应微生物,但并不是冷适应微生物所产生的所有酶都是冷活性酶。如有报道指出来自嗜冷菌中的蛋白酶在 50℃ 甚至以上还是稳定的^[3]。我们对分离自南极的嗜冷菌中的代谢酶类进行了研究发现琥珀酸脱氢酶对温度很敏感,而柠檬酸合成酶则对温度不敏感(待发表)。②在冷适应微生物中有些酶是以同功酶方式存在,这些同功酶对热的敏感性有差异,这可能是冷适应微生物适应低温的一种方式。如 Branchley 等研究了同一个嗜冷细菌中的 β -半乳糖苷酶的同功酶,发现它们具有不同的最适温度特性且编码这一同功酶的三个基因的表达产物也具有不同的温度特性。③在相当多的情况下这种酶的最适反应温度与菌体的最适生长温度并不完全吻合,但总的说来嗜冷菌细胞中的酶其最适和最高反应

温度要比来自中温菌和高温菌的同类酶低。

表 1 嗜冷菌及所产生的冷活性酶

冷活性酶	菌株
葡聚糖酶	产琥珀酸丝状杆菌(<i>Fibrobacter succinogenes</i>)
磷酸酶	嗜冷细菌
α -淀粉酶	河豚毒素交替单胞菌(<i>Alteromonas haloplanctis</i>)
碱性蛋白酶	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
β -半乳糖苷酶	节杆菌(<i>Arthrobacter</i>)
β -内酰胺酶	静止嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter immobilis</i>)
苹果酸脱氢酶	嗜冷嗜压光合细菌(<i>Photobacterium</i> sp.)
苹果酸脱氢酶	深海嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp. strain no.5710)
磷酸丙糖异构酶	嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp.)
丙酮酸激酶	嗜冷芽胞杆菌(<i>Bacillus psychrophilus</i>)
枯草杆菌蛋白酶	枯草杆菌(<i>Bacillus</i> TA41)
碱性丝氨酸蛋白酶	枯草杆菌(<i>Bacillus</i> sp.) 希瓦氏菌(<i>Shewanella</i> sp.)
柠檬酸合成酶	南极细菌(Antarctic bacterium)
蛋白酶	大比目鱼金黄杆菌(<i>Flavobacterium balustinum</i>)
磷酸酶 I	希瓦氏菌属(<i>Shewanella</i>)
丙氨酸消旋酶	冷解糖芽胞杆菌(<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>)
乙醇脱氢酶	莫拉氏菌属(<i>Moraxella</i> sp.)
β -甘露聚糖酶	黄杆菌(<i>Flavobacterium</i> sp.)
天冬氨酸甲氨酰基转移酶	嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp.) 南极嗜冷菌
碱性磷酸酶	节杆菌(<i>Arthrobacter</i>)
谷氨酸脱氢酶	气单胞菌(<i>Aeromonas</i> sp.)
脂酶	假单胞菌(<i>Pseudomonas</i> sp.)

2 冷活性酶的特性

冷活性酶具有较低的最适反应温度,在低温范围具有很高的活性。如产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)的冷活性葡聚糖酶,其最适反应温度为 25℃,在 0℃ 能保持最高活性的 70%,而中温菌的同一个酶的最适反应温度为 35℃,在 0℃ 的最高活性只有 18%。我们从嗜冷酵母中分离纯化的琥珀酸脱氢酶其最适反应温度为 20℃,在 0℃ 能保持最高活性的 60%(待发表)。冷活性酶在低温条件下与底物结合能力及催化活性很强。这种催化活性是通过高的转换数(K_{cat})或者是通过低的 K_m ,或者是两者的结合实现的。如在 4℃ 时冷活性酶比中温酶的转换数(k_{cat})高 33 倍。在推测的催化残基的周围只存在少量氨基酸被认为增加了酶的柔韧性,从而增加了酶在低温条件下的催化活性^[4]。冷活性酶在低温下能保持结构的稳定性从而保持很高的催化活性。当温度升高乃至室温时冷活性酶即表现出对热的敏感性。如海产弧菌细胞中的苹果酸脱氢酶于 30℃ 处理 10min 酶活力完全丧失^[5]。丙酮酸脱羧酶在 35℃ 处理 30min 酶活力损失 90%。

3 冷活性酶的结构特性

通过比较嗜冷菌,中温菌和嗜热菌的酶基因发现酶蛋白的整体结构比单纯酶的催化中心更为重要。Rentier-Delrue 等比较了嗜冷菌和嗜热菌的 D-糖磷酸异构酶基因发现,虽然整个酶的 DNA 同源性只有

34% ,但这两个酶的活性区域非常保守^[6]。来自节杆菌的冷活性 β -半乳糖苷酶与大肠杆菌的 LacZ 酶虽然只有 19% 的同源性 ,但它们的亲核和酸性氨基酸的区域包括推测的位于活性中心的氨基酸残基谷氨酸却是非常保守的^[7]。来自冷解糖芽胞杆菌(*Bacillus psychrosaccharolyticus*)的乳酸脱氢酶的同功酶基因同来自中温菌和嗜热菌的同类酶的基因进行比较发现 ,可置换的氨基酸都位于 α -螺旋中^[8]。冷活性酶的活性中心并未发现特殊结构 ,而是酶蛋白的整体结构及其低温催化活性有关。通过比较不同类酶高度保守的序列或分散的区域可提供功能结构域的线索 ,但单独的序列比较不能揭示哪个区域和酶的温度特性有关。

冷活性酶中被测定的第一个三维空间结构是河豚毒素交替单胞菌所产生的 α -淀粉酶。其结构与哺乳动物 α -淀粉酶结构具有较高的相似性^[9]。此酶是目前所知道的最大的多结构域蛋白 ,显示出可逆的两种伸展状态。而中温菌的 α -淀粉酶只有不可逆的状态。冷活性 α -淀粉酶不依赖钙离子和氯离子的结合即可实现酶蛋白的变构作用 ,而中温菌的 α -淀粉酶则这两种离子的结合是实现酶蛋白变构所必须的。冷活性 α -淀粉酶的自由能比中温菌的 α -淀粉酶的自由能低 4 倍 ,同时冷活性 α -淀粉酶趋向于在自然状态下处于构象稳定的能量最低点^[10]。冷活性 α -淀粉酶的分子表面的柔韧性和不具刚性的蛋白核心及蛋白内部功能域之间的较少的相互作用是决定冷活性酶构象柔韧性的主要因素 ,这种结构保证了冷活性酶在低温下发挥催化活性^[11]。

通过对 α -淀粉酶和脂酶等冷活性酶的空间结构和来自中温菌的相应酶进行比较 ,发现冷活性酶的分子适应似乎是氨基酸残基之间具有弱的相互作用 ,在某些情况下 ,和溶剂分子的作用增加 ,从而形成较伸展的分子结构。这种结构可在低耗能的情况下发挥催化作用。分离自冷解糖芽胞杆菌的丙氨酸消旋酶和其它已报道的丙氨酸消旋酶相比 ,酶在第 150 位氨基酸周围含有一个明显的亲水区域 ,而其它的同类酶的这一区域则是疏水区域。被推测酶的三维结构中这一区域位置中的碳原子位于一个围绕活性中心的表面环之中 ,从而这一区域可以和溶剂相互作用 ,减少活性中心的致密性(Compactness)^[12]。

比较耐冷菌希瓦氏菌属(*Shewanella*)的冷活性丝氨酸碱性蛋白酶与枯草杆菌蛋白酶家族 ,除发现两者被推测的活性中心周围区域具有很高的保守性外 ,还发现冷活性酶组氨酸-65 与丝氨酸-369 之间的区域比其它同类蛋白酶的此区域长大约 150 个氨基酸残基^[13]。分离自南极嗜冷菌的天冬氨酸转甲酰酶在低温下的高活性被认为是由于位于酶活性中心分散的基团的修饰而引起的^[14]。

含有一个底物更容易接近的活性中心 ,具有相对的柔韧性和小的功能域 ,减少亚基表面的相互作用 ,同时缺乏亚基内部离子对网络 ,增加暴露在溶剂部分的疏水残基 ,增加分子内的离子对等被认为是冷活性酶的结构特性^[15]。

4 冷活性酶的基因克隆和表达

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^[16]。其它一些完成基因克隆和(或)在大肠杆菌中表达的冷活性酶有 :嗜冷嗜压光合细菌中的苹果酸脱氢酶^[17] ,嗜冷芽胞杆菌中的丙酮酸激酶^[18] ,静止嗜冷杆菌的嗜冷脂酶^[19] ,枯草杆菌的枯草杆菌蛋白酶^[20] ,嗜冷弧菌磷酸丙糖异构酶^[21] ,节杆菌的 β -半乳糖苷酶^[22] ,嗜冷弧菌的天冬氨酸氨甲酰基转移酶^[23] ,聚球蓝细菌的去饱和酶等。这些工作为冷活性酶的基础研究和应用研究奠定了基础。

5 冷适应酶在生物技术中的应用^[24]

嗜热酶 ,特别是 TaqDNA 聚合酶在 PCR 中的广泛应用 ,为其它极端酶的开发应用奠定了基础。J. Brenchley 研究小组从嗜冷细菌中分离纯化了冷活性碱性磷酸酶 ,这种酶的活性不需要特殊的附加因子 ,在常规的分子生物学实验的缓冲液中即可表现出生物活性。酶反应结束后 ,利用酶的热不稳定性只需将反应混合物置于常温即可使之失活。

通过研究冷活性酶不仅可使我们理解蛋白质结构与功能的相互关系 ,还可开发具有工业应用价值

的酶。冷活性 β -半乳糖苷酶可被用于降解冰箱中储存的奶制品中乳糖的含量,使许多对乳糖敏感的人能够饮用。冷活性酶可在低温条件下对食品和饮料进行加工。在食品加工过程中,较低的温度可减少其它中温菌的污染,缩短加工时间,避免加热系统的热能消耗。冷活性淀粉酶和蛋白酶还可在低温条件下加速原料的粉碎过程。冷活性的蛋白酶、脂酶、果胶酶、纤维素酶等已被用于食品加工过程中。

冷活性酶可用于有机化合物极端化学合成。较低的温度可使产物彼此分离的较好同时又降低了成本。冷活性酶还可加到去污剂中,在低温下即可发挥清洁去污作用。

嗜冷菌和其冷活性酶在自然界的物质循环和转化中可在较低的环境条件下加速生物降解过程,在北方地区嗜冷甲烷菌在无氧情况下可增加甲烷的产量。冷适应酶的应用前景将是十分广阔的。

参 考 文 献

- [1] Feller G ,Narinx E ,Arpigny J L ,et al . *FEMS Microbiol Rev* ,1996 ,**18** :189~202.
- [2] Morita R Y. *Bacteriol Rev* ,1975 ,**39** :144~167.
- [3] Nunokawa Y ,Mkonald I J. *Can J Microbiol* ,1968 ,**14** :215~24.
- [4] Iyo A H ,Forsberg C W. *Appl Environ Microbiol* ,1999 ,**65** (3) :995~8.
- [5] Langridge P ,Morita R Y. *J Bacteriol* ,1966 ,**92** :418~423.
- [6] Rentier D F ,Mande S C ,Moyens S ,et al . *J Mol Biol* ,1993 ,**229** :85~93.
- [7] Trimbur D E ,Gutshall K R ,Prema P ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1994 ,**60** :4544~4552.
- [8] Vckovski V ,Schlatter D ,Zuber H. *Biol Chem* ,1990 ,**371** :103~110.
- [9] Aghajari N ,Feller G ,Gerday C ,et al . *Protein Sci* ,1998 ,**7** (3) :564~572.
- [10] Feller G ,d'Amico D ,Gerday C. *Biochemistry* ,1999 ,**38** (14) :4613~4619.
- [11] Aghajari N ,Feller G ,Gerday C ,et al . *Structure* ,1998 ,**6** (12) :1503~1516.
- [12] Okubo Y ,Yokoigawa K ,Esaki N ,et al . *Biochem Biophys Res Commun* ,1999 ,**256** (20) :333~340.
- [13] Kulakova L ,Galkin A ,Kurihara T ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1999 ,**65** (2) :611~617.
- [14] Sun K ,Camardella L ,Di Prisco G ,et al . *FEMS Microbiol Lett* ,1998 ,**164** (2) :375~382.
- [15] Russell R J ,Gerike U ,Danson M J ,et al . *Structure* ,1998 ,**6** (3) :351~361.
- [16] Feller G ,Bussy L O ,Gerday C. *Appl Environ Microbiol* ,1998 ,**64** (3) :1163~1165.
- [17] Welch T J ,Bartlett D H. *Biochim Biophys Acta* ,1997 ,**1350** (1) :41~46.
- [18] Tanaka K ,Sakai H ,Ohat T ,et al . *Biosci Biotechnol Biochem* ,1995 ,**59** (8) :1536~1542.
- [19] Dong Q C ,Kurihara T ,Takeshi S K S ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1998 ,**64** (2) :486~491.
- [20] Davail S ,Feller G ,Narinx E ,et al . *J Biol Chem* ,1994 ,**269** (26) :17448~17453.
- [21] Adler E ,Knowles J. *Arch Biochem Biophys* ,1995 ,**321** (1) :137~139.
- [22] Donald E T ,Kevin R ,Gutshall P ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1994 ,**60** (12) :4544~4552.
- [23] Ying X ,Yuan F Z ,Liang Z Y ,et al . *Microbiology* ,1998 ,**144** :1435~1441.
- [24] Brenchley J E. *J Industrial Microbiol* ,1996 ,**17** :432~437.