

嗜热酶的特性及其应用

王柏婧 冯 雁 王师钰 孔祥菊 曹淑桂

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室 长春 130023)

Characteristics and Application of Thermophilic Enzymes

Wang Baijing Feng Yan Wang Shiyu Kong Xiangju Cao Shugui

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

关键词 嗜热酶, 热稳定性, 工业应用

中图分类号 :Q814 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2002)02-0259-04

海洋微生物作为一类生长在特殊极端环境下的生物正日益引起人们的重视。其中嗜热微生物由于能在高温温泉及火山口附近的高热环境中生长而引起人们的极大关注^[1]。同时,人们也从许多人工高热环境(如堆肥)中分离得到这种嗜热菌。近年来,人们从这些嗜热菌中已分离得到多种嗜热酶(55℃~80℃)及超级嗜热酶(80℃~113℃)^[2]。嗜热酶不仅具有化学催化剂无法比拟的优点,如催化效率高和底物专一性强,而且酶在高温条件下的稳定性极好^[3]。因而它可以克服中温酶(20℃~55℃)及低温酶(-2℃~20℃)在应用过程中常常出现的生物学性质不稳定的现象,从而使很多高温化学反应过程得以实现,这将极大地促进生物技术产业的发展,从而带动技术水平和生活质量的提高。目前,对嗜热酶的研究还处于初期阶段,但对酶的嗜热性机制、稳定性机制及应用前景已有一些文献报道。本文主要对嗜热酶的性质及应用潜力作一介绍。

1 嗜热酶的获得

1.1 利用生物多样性和基因工程技术进行筛选

从高温温泉、火山口、沙漠以及许多人工环境如热水管道等特殊高热环境中,都能够分离得到嗜热菌。由于科学技术的进步,科学家们甚至能够从海底数千米的火山口热流中分离得到超级嗜热性古细菌,从而使人们对嗜热酶的认识进一步深入^[4,5]。嗜热菌产生的嗜热酶大多数在高温条件下依然能保持很高的催化活性,尤其是胞外酶。因而,嗜热菌依然是目前获得嗜热酶最直接和最可靠的来源。

然而,大多数嗜热菌生长速度较慢,培养条件严格,因此通过培养野生菌来获得大量嗜热酶极其困难。随着基因工程技术的发展,人们可以把嗜热菌中的目的基因在中温宿主中表达,这样就能在温和的培养条件下得到大量的嗜热酶。目前,一些从嗜热菌中获得的基因已在大肠杆菌等中温宿主中得到了成功的表达^[6]。

随着 DNA 测序技术的提高,许多嗜热菌的基因组已经被解析^[7-9]。通过与嗜中温菌的已知基因序列对比,已推测得到许多酶蛋白基因序列,但酶的特性还需要在基因表达后得到进一步的表征。在古细

作者简介 王柏婧(1974-),女,博士研究生,研究方向:嗜热菌蛋白酶的研究。

联系电话 8922331-3722 E-mail wangbaijing.1974@263.net

收稿日期 2001-06-15,修回日期 2001-09-10

菌基因组中,还有大约 40%的未知功能基因,对这些基因所表征蛋白的研究和开发,将为工业过程提供新的丰富的酶资源。

1.2 应用定向分子进化技术进行筛选

定向分子进化技术的发展为我们获得新型酶提供了新的途径。定向进化始于某一基因的克隆,后经体外诱变和重组产生大量的突变体。在中温宿主中表达后,再筛选得到在高温条件下有催化活力的突变体。利用这种方法已得到了热稳定性很高的对硝基苯甲酰胺酶^[10]。

另外,利用杂合酶(hybrid enzyme)技术或 DNA 改组(DNA shuffling)技术,把来自相关基因的片段任意重组,从而产生新的基因库,也有希望获得一些新型嗜热酶,这些都为现代酶工程技术展现了新前景。

2 嗜热酶的结构特征

嗜热酶的特殊生物学性质是由其结构决定的。为了研究嗜热酶的热稳定性,通常采用以下方法来分析酶结构与稳定性的关系(1)嗜热酶与嗜中温酶氨基酸序列及空间结构的对比分析(2)对温度敏感突变体的选择(3)对酶蛋白核心及外周氨基酸残基的定点突变(4)结构域之间连接多肽的修饰(5)诱变或溶剂微扰引起的亚基间相互作用的改变。但从目前研究的一些嗜热酶结构来看,没有一个共同的规律来解释酶蛋白对热环境的适应,每一种酶的热适应机制都不相同。

当把具有相同催化活性的嗜热酶与嗜中温酶的氨基酸序列进行对比,可以看到由于一级结构中个别氨基酸的改变,引起酶蛋白高级结构的变化,结果导致其稳定性发生变化。例如,通过对来自 *Bacillus stearothermophilus* 的热稳定的 3-甘油醛脱氢酶(GPDH-ST)与来自 *Bacillus coagulans* 的热不稳定的 3-甘油醛脱氢酶(GPDH-CO)进行对比发现,由于 GPDH-ST 的丙氨酸被 GPDH-CO 的脯氨酸所代替,结果使其一级结构更易折叠,而且不易解开,从而提高了酶蛋白的热稳定性^[11]。一些酶在高温条件下结构的改变,使亚基间的作用力也发生改变,亚基间或亚基内的离子对发生聚集,氢键数量增加,形成了氢键网,更易于形成二级结构;另外还发现,一些酶蛋白分子由于要对抗这种高温条件,其结构也进行了重新排列,使一些空间短距离基团相互作用,堆积的结构更优化,内部空洞的数量和体积减少,在分子内部形成了一个疏水作用很强的疏水核,同时分子外部的极性表面面积增加,还有一些嗜热酶由于水从疏水表面释放而引起熵变,从而使结构刚性增强,这些因素都有利于酶蛋白结构的稳定。

3 嗜热酶的应用潜力

利用嗜热酶作为生物催化剂有如下的优点(1)酶制剂的制备成本降低。因为嗜热酶的热稳定性高,因而在室温下分离提纯和包装运输,并且能长久地保持活性(2)加快了动力学反应。随着反应温度的提高,分子运动速度加快,酶催化能力加强(3)对反应器冷却系统的要求标准降低,因而减少了能耗。由于嗜热酶有耐高温的特性,所以生产中不需要复杂的冷却装置。一方面节省了开支,另一方面也降低了冷却过程对环境所造成的污染(4)提高了产物的纯度。在嗜热酶催化反应条件下(超过 70℃),很少有杂菌生存,从而减少了细菌代谢物对产物的污染。

由于嗜热酶的高温反应活性,以及对有机溶剂、去污剂和变性剂的较强抗性,使它在食品、医药、制革、石油开采及废物处理等方面都有广泛的应用潜力^[12] :

3.1 食品工业方面

食品加工过程中,通常要经过脂肪水解、蛋白质消化、纤维素水解等过程处理。由于常温条件下进行这些反应容易造成食品污染,所以很难用普通的中温酶来催化完成。嗜热性蛋白酶、淀粉酶及糖化酶已经在食品加工过程中发挥了重要作用^[13]。例如用淀粉生产高果糖浆时,普通的葡萄糖异构酶在中温条件下催化果糖产量很少,而提高温度将促进果糖的生成。目前已从嗜热的 *Thermotoga* 中分离出一种超级嗜热的木糖异构酶,这种酶也能把葡萄糖转化为果糖,这样就能在高温条件下提高果糖的产量。

3.2 造纸工业

传统的方法是利用强酸或强碱进行处理,大约 90% 的木质素可以被水解,但产生严重的环境污染。从嗜热菌 *Thermotoga* 中分离得到 1,4- β -木聚糖内切酶,其最适温度为 105℃,用这种酶处理木浆可以有效地去除木质素,减少对化学漂白剂的用量,从而减少了对环境的污染^[14]。

3.3 环境保护

嗜热酶在污水及废物处理方面有着其它方法无法比拟的优越性。科学家们不仅利用嗜热酶的耐热性,更重要的是利用它对有机溶剂的抗性。例如人们从嗜热的 *Sulfolobus solfataricus* 中分离得到了苹果酸脱氢酶,该酶在极性的乙醇溶液中有很高的活性^[15]。另外从 *Thermus thermophilus* HB8 分离得到的 3-P-甘油醛脱氢酶在丙酮、乙醇及甲醇等极性溶剂中也有很高的活性。在许多污染地区,其污染源的主要成分是烷类化合物,由于它们在水中的溶解度随链的增长而降低,随温度的提高而提高,所以用生物法在高温下去除烷类化合物的污染有很大优势。

3.4 能源利用

当前,人们利用的主要能源物质是煤和石油,然而大多数煤和石油中都含有很高的无机或有机硫成分,在天然煤中硫的含量大约是 0.5%~6%,在燃过煤的废物中,它的含量高达 11%,SO₂ 直接进入大气中,促进了酸雨的形成,所以对煤的直接利用已引起了严重的环境污染。在煤和石油脱硫处理中,用化学法脱硫需要 100℃~400℃ 高温,而且由于有硫酸的生成,导致了很强的酸性环境。而用物理方法价格昂贵,同时也会引起好煤的流失。与这些方法相比,微生物除硫所需能量少,同时避免好煤的流失,既提高了煤的质量,又降低了成本。1982 年,Detz 和 Barvinchak 第一次在脱硫过程中利用了嗜热酶,该反应迅速,无硫酸生成,因而具有较高的经济价值和社会效益^[16]。

3.5 烟草业

嗜热菌在烟草行业也有非常重要的应用价值。Malik 等研究发现,烟草经反硝化嗜热菌 *Bacillus* sp. 高温厌氧处理后,烟草燃烧只能释放少量的 NO、CO 和 HCN,对空气净化起到一定的积极作用^[17]。

3.6 石油开采

在石油开采过程中,利用粘胶混合细砂在岩石床上加压,出现裂缝后,用酶或化学法使胶水解,来加速石油或气体的流出。由于井下温度很高,常温酶在高温时活力低,低温又容易使胶在进入井底前被水解。目前,人们已从嗜热的 *Thermotoga* 中分离得到一种纤维素酶,在 100℃ 时仍具有很高的催化活性,从而达到了高温时使胶水解和低温时其活性受到抑制的效果^[18]。

3.7 液体燃料的生产

原油的缺乏迫使人们去寻找汽油的替代品。利用嗜热酶催化不同的反应,可以得到乙醇、甲醇等液体燃料。例如:甲醇可以从果胶上得到;乙醇则要求嗜热菌在葡萄糖上厌氧生长才能获得;而丙醇、丁醇、戊醇、己醇等则需要氨基酸或肽的培养基中加入酵母提取物或蛋白胨而获得。

3.8 生物转化及抗生素的生产

随着对嗜热酶研究的深入,其在生物转化方面的作用日益引起人们的重视。已有报道,嗜热菌对维生素及类固醇等生物物质的修饰有重要作用。在堆肥实验中,Kplan 及合作者利用嗜热菌对 2,4,6-三硝基甲苯进行了转化^[19]。另外,他们也利用 *Pseudomonas thermophila* 中的一种嗜热需氧菌生产出了多种 B 族维生素。在抗生素的生产中,利用嗜热酶催化获得的抗生素也有报道。在利用嗜热菌 *Thermoactinomyces* 获得的 9 种抗生素中,两种热红菌素及热绿链菌素已进行工业化生产并在医药领域得到应用^[20]。

虽然自然界赋予嗜热酶耐高温和极强分子稳定性的特性,但由于嗜热酶的来源有限,培养条件苛刻,虽然利用基因工程技术已在中温宿主中得到表达,但酶的表达量低,限制了嗜热酶的广泛应用。目前已得到成功应用的嗜热酶主要有:在基因工程中起重要作用的 DNA 聚合酶,生产葡萄糖和果糖的淀粉酶及用于氨基酸生产、洗涤和食品加工行业的蛋白酶等。随着对新型嗜热菌的分离及对高温酶反应条件的探索,嗜热酶必将展现更加广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 林 影, 凌晨晖. 海洋科学, 1999, **2** (2) 5 ~ 10.
- [2] Michael W, Adams W. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **15** :261 ~ 277.
- [3] Reth M B, Walter A B, David B W, et al. *Biochemistry*, 1999, **38** :2570 ~ 2576.
- [4] 柯 为. 微生物学通报, 1998, **25** (3) :183.
- [5] 柳耀建, 林 影. 工业微生物, 2000, **30** (3) 53 ~ 55.
- [6] Connaris H, West S M, Hough D W, et al. *Extremophiles*, 1998, **2** :61 ~ 66.
- [7] Smith D R, Daulte-Stomm L A, Delonghery C, et al. *J Bacteriol*, 1997, **179** :7135 ~ 7155.
- [8] Deskert G, Warren P, Gaasterland J, et al. *Nature*, 1998, **392** :353 ~ 358.
- [9] Klenk H P, Clayton K A, Tomb J F, et al. *Nature*, 1997, **390** :364 ~ 370.
- [10] Kuchner O, Arnold F H. *Trends Biotechnol*, 1997, **15** :523 ~ 530.
- [11] 骊惠燕, 邵靖宇. 生命科学, 2000, **12** (1) 30 ~ 33.
- [12] 唐 兵, 周林峰. 微生物学报, 2000, **40** (2) :188 ~ 192.
- [13] 林 影, 卢 德. 工业微生物, 2000, **30** (2) :51 ~ 53.
- [14] Batto M, Mathrani I M, Ahring B, et al. *Appl Microbiol Biotech*, 1994, **41** :130 ~ 133.
- [15] Guagliardi A, Rossi S, Bartolucci S. *Science*, 1989, 174 ~ 179.
- [16] Gokcay C F, Yurteri R N. *Fuel*, 1983, 1223.
- [17] Malik V S, Semp B A, Bravo H G, et al. PCT-international Patent : Wo 83/01 :JF(EP766421), 1983.
- [18] Mc Cutchan C M. *Biotechno Bioen*, 1996, **52** :332 ~ 339.
- [19] Kaplan D L, Kaplan A M. *Can J Microbiol*, 1982, **26** :377.
- [20] Cross T. *J Appl Bacteriol*, 1968, **31** :36.

《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年, 双月刊, 双月 4 日出版, 由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久, 发行量大, 内容涵盖面广, 深受国内外科研工作者、高等院校师生和企事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊, 被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。2001 年《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备, 以及与微生物有关的信息等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情, 信守协议, 保证质量, 价格合理, 竭诚为广大用户服务。

联系电话 (010) 62630422 邮编 :100080 E-mail :gesg@sun.in.ac.cn

通讯地址 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部