

# 低温酶冷适应的分子机制及其在生物技术中的应用

朱 非 王 珊 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

## Molecular Mechanisms of Cold-adapted Enzymes to Cold Environment and Their Application in Biotechnology Industry

Zhu Fei Wang Shan Zhou Peijin

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

关键词:低温微生物,低温酶,冷适应

中图分类号:Q939.13 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0640-05

低温酶(cold-adapted enzymes)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:1. 酶的最适反应温度较同功能的中温酶低 $0^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  2. 在较低温度下( $< 40^{\circ}\text{C}$ )酶的转换数( $K_{\text{cat}}$ )或生理系数( $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ )高于来自中温菌中的同类酶 3. 低温酶的热稳定性差,低温酶主要是由低温微生物(cold-adapted microorganisms)产生的。由于地球表面上存在大量的低温环境使低温微生物分布极为广泛,其在生态系统中起着重要作用,对低温微生物及其产生的低温酶的冷适应机制的研究有着重要的生物学意义;同时,由于低温酶能在低温下有效发挥催化作用的特点,使其在生物工程领域有着广泛的应用前景。因此,对低温微生物的研究无论在理论上还是在实践上都有重要意义。

### 1 低温微生物及低温酶

低温微生物可分为二类:耐冷微生物(psychrotolerants)和嗜冷微生物(psychrophiles)。前者是指能在 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 生长,最高生长温度在 $20^{\circ}\text{C}$ 以上,最适生长温度可超过 $15^{\circ}\text{C}$ 的一类微生物;后者是指能在 $0^{\circ}\text{C}$ 或 $0^{\circ}\text{C}$ 以下生长,最适生长温度低于 $15^{\circ}\text{C}$ ,最高生长温度低于 $20^{\circ}\text{C}$ 的一类微生物<sup>[1]</sup>。在生态圈中,有80%常年平均温度在 $5^{\circ}\text{C}$ 或 $5^{\circ}\text{C}$ 以下,因此低温微生物广泛分布在自然界中。嗜冷菌对热十分敏感,短时间受热也是致死的。分离嗜冷菌应使用预冷的培养基。嗜冷菌主要分布于终年常冷的环境中如南北两极地区、冰窟、高山、深海和土壤等低温环境中,也可从低温植物和冷血动物上分离到。嗜冷菌的分布受环境因子的限制数量较少。即使在南北两极终年常冷的环境中,分离到的微生物中大部分都是耐冷菌,嗜冷菌只占很少部分。相比之下,耐冷菌的分布则要广泛的多。

低温微生物在低温条件下对自然界的物质循环起重要作用,特别是海洋深处物质的循环。有些嗜冷菌产生胞外酶,能分解环境中的大分子物质,如蛋白质、碳水化合物或小分子的环境污染物,还可分解人工合成的一些化合物<sup>[2]</sup>,对全球生态起着重要作用。我国的低温环境很多,有49 198条冰川,总面积达 $59\ 406\text{km}^2$ 。仅次于俄罗斯、加拿大和美国,为世界第四。此外冰川周围的冻土区、雪线以上的地域,

作者简介:朱非(1971-)男,安徽六安人,中国科学院微生物研究所博士,主要从事低温菌分类和低温酶纯化及基因克隆研究。

收稿日期:2001-09-04,修回日期:2002-01-07

以及巨大的深海区,都蕴藏着丰富的微生物资源和冷适应微生物资源。

低温微生物能在低温环境下生存是由于其酶能在低温下有效地发挥催化作用。近来,低温酶的研究广泛开展,主要集中在耐冷机制和生物工程应用方面。已有二十多种低温酶得到了纯化或克隆表达。其中大部份低温酶是从南极和北极以及海水中的低温菌中分离获得的(表 1)。

表 1 低温微生物产生的低温酶

低温酶	参考文献	低温酶	参考文献
丙氨酸脱氢酶	3	$\beta$ -内酰胺酶	14
乙醇脱氢酶	4	3-异丙基苹果酸脱氢酶	15
$\alpha$ -淀粉酶	5	乳酸脱氢酶	16
天冬氨酸氨甲酰基转移酶	6	脂肪酶	17
蛋白酶	7	苹果酸脱氢酶	18
几丁质酶	8	N- $\alpha$ -乙酰基鸟氨酸酶	19
DNA 连接酶	9	果胶酶	20
柠檬酸合成酶	10	磷酸甘油酸激酶	21
EF-2	11	枯草杆菌蛋白酶	22
EF-G	12	丙糖磷酸盐异构酶	23
弹性蛋白酶	13	木聚糖酶	24

## 2 低温酶的冷适应机制

低温条件下保持酶的正常催化功能是低温微生物必须克服的困难之一。Svante Arrhenius 1889 年提出的方程  $k = Ae^{-E_a/RT}$ , 揭示了酶促反应速率与温度之间的关系。k 是速率常数;A 是指前因子,与位阻因素和温度依赖的分子碰撞频率相关; $E_a$  是活化能;R 是气体常数(8.31kJ/mol);T 是绝对温度。从方程可以看出,温度降低导致酶促反应速率呈指数下降。同时在低温条件下,培养基的粘度增加使分子扩散运动减弱,导致酶促反应速率进一步降低。因此低温使酶促反应难以进行。然而,低温酶却能在低温条件下有效发挥催化作用,其冷适应机制成为研究热点。

### 2.1 冷适应机制的研究方法

目前研究低温酶冷适应机制的方法主要有三种。首先是比较来源于不同有机体的同功酶之间的差异,分析低温酶冷适应的结构基础。参与比较的有机体在系统进化上应有显著差异,生存在不同的环境温度中(如来源于极端嗜热古菌,中温菌,以及南极细菌的柠檬酸合成酶)<sup>[25]</sup>。其次是应用随机突变的方法,在酶基因中引入突变,筛选使酶的作用温度改变的突变,鉴定突变,考察由于突变导致的酶结构和功能变化,确定与冷适应相关的氨基酸残基<sup>[26]</sup>。第三种方法是选择在系统进化上较为接近的有机体产生的同功酶进行比较。这样有利于将基因漂移和其它自然选择所造成的氨基酸变化排除,直接研究导致蛋白质温度敏感的氨基酸变化。用这种方法研究了来源于嗜冷和嗜热的枯草芽孢杆菌的乳酸脱氢酶<sup>[27]</sup>冷适应机制。近来,一些新技术也应用于低温酶的冷适应机制的研究中,如错误倾向性 PCR 扩增(error-prone PCR amplification),DNA 步移(DNA shuffling),增变细胞(mutator cells)等技术<sup>[28]</sup>。

### 2.2 低温酶与中温酶、高温酶分子结构上的差异

根据已获得的低温酶的一级序列和高级结构,低温酶同中温酶及高温酶相比有以下差异:甘氨酸含量增加,脯氨酸、精氨酸含量减少,盐桥、芳香环相互作用、疏水作用减弱;分子间、亚基间以及结构域间的相互作用减弱;与溶液间的相互作用增强,环状结构(loop-structure)增加<sup>[21]</sup>。这种结构变化赋予蛋白质较高的柔韧性和较低的热稳定性(表 2)。

表 2 低温、中温、高温枯草杆菌蛋白酶类的结构差异

项目	S4I(低温)	BPN(中温)	Arsberg(中温)	Savinas(中温)	Thermitas(高温)
氨基酸数目	309	275	274	269	279
天冬氨酸数目	21	10	9	5	13
芳香环相互作用	0	4	5	3	11
离子相互作用	2	5	3	7	10
二硫键	1	0	0	0	0

从表 2 可以看出:低温酶的肽链较中温、高温酶要长,这为增加分子表面的环状结构提供了基础;较少的芳香环相互作用,离子相互作用使蛋白质分子间、分子内的相互作用减弱,增加了分子的柔韧性;天冬氨酸数目较多增加了酶分子的亲水表面;低温酶 S4I 上的二硫键与蛋白质的稳定性并无关系<sup>[29]</sup>。

值得注意的是并不是每一种低温酶都同时具有以上特点,它们使用不同的策略保持低温下的催化作用。如在低温 UDGs 中<sup>[30]</sup>,肽链与中温酶长度相似,精氨酸含量(17 个)比来自大肠杆菌(10 个)和枯草芽孢杆菌(12 个)要高,脯氨酸也有类似的情况,在低温菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌中分别为 20、16、12 个。精氨酸通过盐桥,离子相互作用增加酶分子的稳定性,而脯氨酸可降低蛋白质的折叠自由能保持分子稳定。表面看起来,低温 UDGs 应比其对应的中温酶要更稳定。事实上它是高度热不稳定的。这种现象表明,低温酶还有其它未知的冷适应机制。

### 2.3 低温酶的稳定性、柔韧性和活性

酶的活性是指酶的催化能力,可以用  $K_{cat}$  或  $K_{cat}/K_m$  定量。稳定性(stability)是指酶在不同条件下保持酶活的能力。与酶的活性、稳定性相比,酶的柔韧性(flexibility)要复杂的多。蛋白质在天然状态下,有多种不同构象,呈玻耳兹曼分布(Boltzmann distribution),其中天然构象占主导地位。不同构象间可相互转化。这种构象间的转化即是柔韧性。柔韧性使构象异构体数量增加。同时与酶的催化功能相关:它降低了酶与底物结合的诱导契合(induced-fit)过程中的能量消耗;使别构调控(allosteric regulation)易于实现。柔韧性可定义为静态柔韧性和动态柔韧性二种。静态柔韧性(static flexibility)是指不同构象间的平衡状态。它不考虑构象间相互转化所需克服的能障,属于平衡常数。动态柔韧性(dynamic flexibility)是指酶的不同构象间相互转化的速度,是天然构象和它的不同构象间转化所需克服能障的度量,是速度常数。

有关数据表明,低温酶低温条件下高酶活几乎总是与其热不稳定性相关。一般来说,高温酶在室温下催化效率很低,这是因为酶在室温下的紧密构象阻碍了酶分子与底物之间的相互作用。相反,具有高柔韧性或可塑性的低温酶分子可以消耗较低的能量与底物有效结合。但正是低温酶的柔韧性导致其热不稳定。由于酶分子的柔韧性很难定量,使这种解释缺乏足够的实验数据。Zavodsky 等<sup>[31]</sup>利用红外光谱技术检测氢和重氢的相互交换,测定二种 3-异丙基苹果酸脱氢酶的相对柔韧性(分别来自中温菌和高温菌)。结果发现:虽然中温酶和高温酶在各自的环境温度下具有相似的柔韧性,但是在室温下高温酶比中温酶的分子构象更为紧密,而这种构象阻碍了与底物的结合,使酶活下降。

高的柔韧性被认为是低温酶的主要结构特征。在柠檬酸合成酶的研究中,引入了平均温度因子或 B 因子的概念(average temperature factors)来定量描述酶的柔韧性。B 因子描述蛋白质结晶点阵中的无序状态<sup>[32]</sup>,与酶的柔韧性呈正相关。研究发现,来源于南极细菌的低温柠檬酸合成酶的 B 因子比来源于嗜热菌的柠檬酸合成酶要低。理论上,这意味着嗜热酶要比低温酶具有更大的柔韧性。但通过计算发现,低温酶的小结构域比嗜热酶的大结构域具有更强的柔韧性。酶的催化是由小结构域的相互运动引发的,因此正是这二种结构域柔韧性上的差异导致低温酶能在低温条件下有效行使催化功能。最近

发现低温麦芽糖脱氢酶(MDH)的三维结构<sup>[17]</sup>(Kim 1999)主链上原子的 B 因子水平( $15.10 \text{ \AA}^2$ )比高温 MDH( $23.56 \text{ \AA}^2$ )要低的多。这显然与低温酶的柔韧性高的结论相矛盾。然而,严格比较这二种情况,排除蛋白质在折叠,亲水接触,分子间的相互作用等方面的差异,发现低温酶中与催化功能相关的一群原子的 B 因子水平因被其它部分原子的 B 因子分散而降低。因此,事实上低温酶催化中心的 B 因子值要高于嗜热酶,这表明低温酶催化中心的柔韧性高于嗜热酶,从而使具有低温催化活性。以 B 因子表征的酶的柔韧性往往与实验结果不一致,使其具有很大的局限。

酶的热稳定性、柔韧性和活性在进化过程中是紧密相关的。近来,有关低温酶构象稳定性和热力学稳定性的微热量法(microcalorimetry)数据为阐述它们之间的联系提供了新的线索。为适应低温环境,低温酶有二种进化方向:酶分子向最低稳定性方向进化,低温 $\alpha$ -淀粉酶属于这类<sup>[32]</sup>酶分子向具有不同结构域的方向进化,其中一个结构域热不稳定,为酶分子活性中心提供可塑性,低温磷酸甘油酸激酶(PGK)属于此类<sup>[20]</sup>。

### 3 低温酶在应用上的优势

由于低温酶的低温催化能力,高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、脂酶、淀粉酶、纤维素酶可以作为洗涤添加剂在冷洗行业具有广泛应用。

食品工业:低温酶在食品工业中有广泛的应用。例如,低温 $\beta$ -半乳糖苷酶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 $\beta$ -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;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<sup>[34]</sup>。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:商业合成的脂肪酸酯、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。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Morita R Y. *Bacteriol Rev* ,1975 ,**39** :144 ~ 167.
- [ 2 ] Gerday C ,Aittaleb M ,Bentahir M ,et al. *Trends Biotechnol* ,2000 ,**18** ( 3 ) :103 ~ 107.
- [ 3 ] Galkin A ,Kulakova L ,Ashida H ,et al. *Appl Environ Microbiol* ,1999 ,**65** ( 9 ) :4014 ~ 4020.
- [ 4 ] Tsigos I. *EUR J Biochem* ,1998 ,**254** :356 ~ 362.
- [ 5 ] Aghajari N ,Feller G ,Gerday C ,et al. *Protein Sci* ,1998 ,**7** ( 3 ) :564 ~ 572.
- [ 6 ] Sun K. *FEMS Microbiol Lett* ,1998 ,**164** :375 ~ 382.
- [ 7 ] Kristjansson M M ,Magnusson O T ,Gudmundsson H M ,et al. *Eur J Biochem* ,1999 ,**260** ( 3 ) :752 ~ 760.
- [ 8 ] Lonhienne T ,Mavromatis K ,Vorgias C E ,et al. *J Bacteriol* ,2001 ,**183** ( 5 ) :1773 ~ 1779.
- [ 9 ] Georgette D ,Jonsson Z O ,Van Petegem F. *Eur J Biochem* ,2000 ,**267** ( 12 ) :3502 ~ 3512.
- [ 10 ] Gerike V. *Eur J Biochem* ,1997 ,**248** :49 ~ 57.
- [ 11 ] Thomas T ,Cavicchioli R. *J Bacteriol* ,2000 ,**182** ( 5 ) :1328 ~ 32.
- [ 12 ] Berchet V ,Thomas T ,Cavicchioli R ,et al. *Extremophiles* ,2000 ,**4** ( 2 ) :123 ~ 30.
- [ 13 ] Asgeirsson B ,Bjarnason J B. *Biochim Biophys Acta* ,1993 ,**1164** ( 1 ) :91 ~ 100.

- [ 14 ] Feller G ,Zekhnini Z ,Lamotte-Brasseur J ,et al . *Eur J Biochem* ,1997 **244**( 1 ) :186 ~ 191 .
- [ 15 ] Suzuki T ,Yasugi M ,Arisaka F ,et al . *Protein Eng* 2001 **14**( 2 ) 85 ~ 91 .
- [ 16 ] Nandakumar R ,Mattiasson B . *Bioseparation* ,1999 **7**( 6 ) 327 ~ 31 .
- [ 17 ] Choo D W ,Kurihara T ,Suzuki T ,et al . *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64**( 2 ) 486 ~ 489 .
- [ 18 ] Kim S Y . *J Biol Chem* ,1999 **274** :1271 ~ 1279 .
- [ 19 ] Xu Y ,Liang Z ,Legrain C ,et al . *J Bacteriol* 2000 **182**( 6 ) :1609 ~ 1615 .
- [ 20 ] Truong L V ,Tuyen H ,Helmke E ,et al . *Extremophiles* 2001 **5**( 1 ) 35 ~ 44 .
- [ 21 ] Bentahir M ,Feller G ,Aittaleb M ,et al . *J Biol Chem* 2000 **275**( 15 ) :11147 ~ 11153 .
- [ 22 ] Narinx E . *Protein Eng* ,1997 **11** :1271 ~ 1279 .
- [ 23 ] Alvarez M . *J Biol Chem* ,1998 **273** :2199 ~ 2206 .
- [ 24 ] Amoresano A ,Andolfo A ,Corsaro M M ,et al . *Glycobiology* 2000 **10**( 5 ) 451 ~ 458 .
- [ 25 ] Danson M J ,Hough D W . *Trends Microbiol* ,1998 **6** :307 ~ 313 .
- [ 26 ] Taguchi S ,Ozaki A ,Momose H . *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64**( 2 ) 492 ~ 495 .
- [ 27 ] Zuber H . *Biophys Chem* ,1998 **29** :171 ~ 179 .
- [ 28 ] Greener A ,Callahan M . *Mol Biotechnol* ,1997 **7** :189 ~ 195 .
- [ 29 ] Davail S ,Feller G ,Narinx E ,et al . *J Biol Chem* ,1994 **269** :17446 ~ 17453 .
- [ 30 ] Jaeger S ,Schmuck R ,Sobek H . *Extremophiles* 2000 **4** :115 ~ 122 .
- [ 31 ] Zavodsky P . *Proc Natl Acad Sci* ,1998 **95** :7406 ~ 7411 .
- [ 32 ] Russell R J M . *Structure* ,1998 **6** :351 ~ 361 .
- [ 33 ] Feller G ,D 'Amico D ,Gerday C . *Biochemistry* ,1999 **38** :4613 ~ 4619 .
- [ 34 ] Timmis K N ,Pieper D H . *Trends Biotechnol* ,1999 **17** :201 ~ 204 .

## 《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.im.ac.cn actamicro@sun.im.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