

# 嗜热菌产酶现状的研究

潘丽贞, 陆利霞, 熊晓辉

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 210009)

**摘要:**嗜热菌是应用最广泛的一种极端微生物, 而其产生的酶在工业催化中有着广泛的应用。阐述了嗜热菌产脂肪酶、脱卤酶以及葡萄糖醛酸酯酶等几种酶的研究现状。

**关键词:**嗜热菌, 嗜热酶, 耐热, 脱卤酶, 葡萄糖醛酸酯酶

## Study on the production of enzymes from thermophiles

PAN Li-zhen, LU Li-xia, XIONG Xiao-hui

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Thermophiles are a kind of extremophiles which are most widely used, and the enzymes produced by thermophiles are also widely used in industrial catalysis. The recent studies on the production of enzymes from thermophiles, such as lipase, dehalogenase, glucuronoyl esterase etc were summarized.

**Key words:** thermophiles; thermophilic enzymes; thermal stable; dehalogenase; glucuronoyl esterase

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)03-0422-03

嗜热菌是应用最广泛的一种极端微生物, 自1969年Brock T.D.和他的同事从美国黄石国家公园的温泉中分离到最适生长温度高达70℃的水生栖热菌, 接下来30多年中嗜热菌的研究取得了重要进展, 尤其近十年来嗜热菌已成为科学界的研究热点之一。嗜热菌并非单一的菌属或菌群, 而是广泛分布于各种不同的菌群中, 如芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、栖热菌属、热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*)、闪烁杆菌属 (*Fervidobacterium*)、热袍菌属 (*Thermotoga*) 及产水菌属 (*Aquifex*) 等<sup>[1]</sup>。目前已有约70个属140种嗜热菌得到了鉴定, 均属于古细菌及真细菌。嗜热菌有代谢快、生长率高、世代时间短、酶的热稳定性高等优点, 在造纸行业、环境保护、能源利用、烟草业、石油开采、液体燃料生产、生物转化及抗生素生产等领域都有广泛的应用。嗜热菌的主要应用之一是嗜热酶的开发应用。目前已知的从嗜热菌中分离出来的酶具有极高的热稳定性、传质速率高、耐有机溶剂等特点, 可降低酶制剂的制备成本、提高酶促效率、减少能耗, 其催化功能优于目前在各种工业生产中应用的酶, 故在生物化工合成中有着广泛的应用。

### 1 几种嗜热酶

目前大多数的常温酶都发现了其对应的嗜热酶, 如脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、糖苷酶、酰胺酶、植酸酶、几丁质酶、漆酶、乙醇脱氢酶、胍水解

酶、过氧化氢酶等, 以下主要介绍几种用量较大以及近来新发现的酶。

#### 1.1 脂肪酶

脂肪酶能够催化脂类化合物的水解、合成和酯交换, 广泛应用于油脂水解、食品风味和香味改进、医药生产、皮革绢纺脱脂、低等油脂改性等, 并可作为洗涤剂与化妆品的添加剂。脂肪酶因其具有高度的立体选择性而倍受关注。Yasser R. Abdel-Fattah等<sup>[2]</sup>分离出一株疑似 *Geobacillus thermoleovorans* 的脂肪酶产生菌, 该菌产生的脂肪酶在60℃, pH8下稳定, 经100℃处理1h, 剩余酶活为30%。Melissa L.E. Gutarra等<sup>[3]</sup>使用 *Penicillium simplicissimum* 野生型Brazilian菌株生产脂肪酶, 粗酶在35~60℃, pH4.0~6.0下有较高活性, 最适温度及pH为50℃和4.0~5.0。该酶催化甘油三酯及p-硝基苯基酯的水解, 可降低成本, 故其应用前景可观。

#### 1.2 蛋白酶

蛋白酶广泛应用于食品、有机合成、医药、酒类澄清、洗涤剂、蛋白胨生产、纺织、皮革等方面, 在酶制剂市场占65%的份额。蛋白酶由于其易失活, 故在应用上受到了较大的限制, 而嗜热菌产生的嗜热蛋白酶是一类最适作用温度为60~80℃的蛋白酶, 具有很高的热稳定性、耐变性剂、耐有机溶剂等优点。2006年, 张云峰<sup>[4]</sup>从温泉水中筛选到一株产蛋白酶芽孢杆菌菌株DPE<sub>7</sub>, 该菌产出的蛋白酶在70℃保温3h未见酶活力下降, 90℃时半衰期为20min, 显示出较高的热稳定性。Carolina W. Merheb等<sup>[5]</sup>以嗜热真菌

收稿日期: 2011-02-18

作者简介: 潘丽贞(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

*Thermoascus aurantiacus*为出发菌株,通过固态发酵得到一种新型的蛋白酶。该酶最适温度为60℃,最适pH为5.5,可水解食品工业中一种重要的蛋白质——牛酪素。而Ashis K. Mukherjee等<sup>[6]</sup>则是使用枯草芽孢杆菌DM-04利用餐厨垃圾进行固态发酵,生产碱性蛋白酶,最适反应温度为37~45℃,最适反应pH为8.0~9.0,60℃加热15min后残余酶活为67%。

### 1.3 淀粉工业用酶

淀粉分为直链淀粉和支链淀粉,降解淀粉的酶主要有淀粉酶、支链淀粉酶(即普鲁兰酶)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶等。这些酶可将淀粉转化为更有价值的糊精、葡萄糖、果糖及海藻糖等产品。长期以来,由于缺乏100℃以上耐酸的高热稳定性酶,淀粉的生物转化过程繁琐而昂贵。因此具有高热稳定性的淀粉水解酶的发现,对改进工业淀粉转化工艺是非常有意义的<sup>[7]</sup>。目前国内已有人将嗜热栖热菌HB27的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因克隆到大肠杆菌中,经诱导表达,得到 $\alpha$ -葡萄糖苷酶,该酶最适温度为95℃,最适pH为5.0<sup>[8]</sup>。2008年,Burhan Arikan<sup>[9]</sup>筛选到一株产热稳定性碱性 $\alpha$ -淀粉酶的菌株,产出的蛋白酶最适pH为11.0,最适温度70℃,100℃保温处理30min后残余酶活为原酶活的96%,显示较好的耐热性。

淀粉工业中,嗜热菌的另一重要应用是生产海藻糖。海藻糖对生物膜和生物大分子具有良好的非特异性保护作用,在医药、生物技术、食品、化妆品、农业等领域拥有广阔的应用前景。90年代初,海藻糖的制备方法主要是提取法和微生物发酵法,但随着一些可生成海藻糖的新型酶制剂的发现,酶催化法成为研究的热点。嗜热微生物所产酶通常具备良好的热稳定性,如2007年,张峻等<sup>[10]</sup>从地热水样中筛选出一株产胞内海藻糖合酶的亚栖热菌CBS-01菌株。该菌最适生长温度为55~60℃,其酶最适反应温度为50~65℃;王俊峰等<sup>[11]</sup>从蒙古一高温热泉水中筛出一株产胞内海藻糖合酶的芽孢杆菌SN02004201菌株,该菌所产的酶最适反应温度为60℃;Soo-In Ryu等<sup>[12]</sup>将海栖热孢菌的海藻糖合酶基因克隆到大肠杆菌中,经表达得到的海藻糖合酶的最适反应温度为65℃,这样在海藻糖的制备过程中可以采用较高的酶反应温度,不容易染菌。

### 1.4 纤维素酶

纤维素占植物生物量的40%以上,降解纤维素的酶总称纤维素酶。纤维素酶应用于乙醇生产中可以提高产量,于果汁及红酒生产中可澄清产品,于洗涤剂中可以使衣物颜色鲜艳柔软,还可应用于饲料谷物的前处理以改善其营养价值,工农业废料通过纤维素酶处理能生产优质的化学产品<sup>[13]</sup>。2007年,陈伟钊等<sup>[14]</sup>从耐碱芽孢杆菌Ⅲ23的培养液中分离到比活力高达420U/mg的碱性纤维素酶Ⅲ232A。该酶最适反应pH为9.0,最适反应温度为45℃。在pH为6~11和50℃以下酶活性稳定,且具有耐金属离子和表面活性剂等特性,因而在棉织品的水洗整理及洗涤剂工业中具有良好应用前景。同年,罗颖等<sup>[15]</sup>从温泉热源地区采集的大量泥土和水样中,筛选出一株在

60℃生长的纤维素酶产生菌SH2。该菌株生产的纤维素酶的最适pH为6.0,在45~65℃间酶活差异仅在5%之内,显示了很好的温度耐受性。国外则有Lungisa Mayende等<sup>[16]</sup>从堆肥中分离出一株芽孢杆菌,该菌产纤维素酶及多酚氧化酶,其中纤维素酶最适温度为70℃,在1h内极为稳定。

### 1.5 木聚糖酶

木聚糖是一个非均质的分子,是构成半纤维素的主要多聚化合物。木聚糖酶是一类重要的木糖苷键水解酶,应用于面粉中可提高烘烤产品的质量,应用于禽类的饲料添加剂中可提高其营养价值,代替氯及其衍生物应用于纸浆的预漂白可以避免环境污染问题,同时减少纸浆成分的损失。江正强等<sup>[17]</sup>对一株新的嗜热拟青霉J18进行固体发酵产生木聚糖酶,该酶在pH7.0~9.0范围内,60℃处理24h,残余酶活在80%以上。该酶可水解玉米芯木聚糖生成以木二糖、木三糖和木四糖为主的低聚木糖,对玉米芯的再利用有着重要意义。Rakhee Khandeparkar等<sup>[18]</sup>分离得一株嗜热嗜碱菌*Enterobacter* sp. (肠道菌属) MTCC 5112,该菌生产的胞外木聚糖酶最适pH为9.0,最适温度为100℃;70℃及60℃下放置18h后,残余酶活分别为原酶活的64%及85%,具有相当高的热稳定性。

### 1.6 脱卤酶

卤代有机化合物广泛用于除草剂、杀菌剂、医药、有机合成等各个领域,其中大部分化合物因其毒性会危及人类健康及环境。脱卤酶能催化卤族离子从卤代有机化合物上释放出来,在生物降解环境不友好的卤代有机化合物方面有着重要应用。同时脱卤酶还可应用于手性卤烷酸及环氧化物的合成,具有工业意义。目前关于嗜热脱卤酶的研究有:2008年,Carrie A. Rye等<sup>[19]</sup>通过基因工程方法,得到重组L-2-卤酸脱卤酶。该酶耐热性佳,最适反应温度为60℃,70℃下半衰期为1h。而2009年,Philip G Bachas-Daunert等<sup>[20]</sup>用同一菌种通过基因工程方法得到重组脱卤酶L-2- HADST。该酶70℃保温4h残余酶活约为100%,显示了极好的耐热性。

### 1.7 葡糖醛酸酯酶(glucuronoyl esterase)

这是一种新的碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase),由Silvia Spanikova和Peter Biely在木腐菌*Schizophyllum commune*中发现,并首次发表在2006年的《FEBS Letters》(《欧洲生化学会联合会快报》)上。该酶参与植物细胞壁的降解,是目前唯一可打开葡糖醛酸木糖的4-O-甲基-D-葡糖醛酸残基和木质素的芳香醇之间的酯键的酶,在生物质的降解中有着重要作用<sup>[21]</sup>。目前国内还没有这方面的报道,国外的相关研究也较少,而关于嗜热葡糖醛酸酯酶的研究,只有Evangelos Topakas等<sup>[22]</sup>将*Sporotrichum thermophile*的葡糖醛酸酯酶基因克隆到*Pichia pastoris*中,得到重组葡糖醛酸酯酶。该酶能以葡糖醛酸甲酯为底物,最适反应温度为55℃,在60~70℃范围内相对酶活大于70%;其耐热性也较好,55℃及60℃时其半衰期分别为22.5h及0.5h,而在50℃时相对稳定,保温24h后残余酶活大于90%,表现出极大的生物技术应用前景。

## 2 展望

由于在较大温度及pH范围内仍能保持高活力,具有底物特异性,有机溶剂耐受性,立体选择性等特殊性质,嗜热菌产生的酶有着巨大的工业应用前景。但是嗜热菌有着培养条件苛刻、产酶效率低、酶活性较低等缺点。因而,加强学科间协作,采用基因工程技术使嗜热酶基因在嗜温菌中得到高效表达,通过菌种诱变筛选产酶效率较好且酶活较高的菌株,嗜热菌及其酶在生物合成及生物转化中的应用将会得到更进一步的拓展。

### 参考文献

- [1] Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002(6): 151-160.
- [2] Abdel-Fattah Y R, Gaball A A. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*[J]. Microbiological Research, 2008(163): 13-20.
- [3] Gutarra M LE, Godoy M G, Maugeri F, et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation [J]. Bioresource Technology, 2009(100): 5249-5254.
- [4] 张云峰. 嗜热蛋白酶生产菌的筛选[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006, 31(2): 157-161.
- [5] Merheb C W, Cabral H, Gomes E, et al. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein[J]. Food Chemistry, 2007(104): 127-131.
- [6] Mukherjee A K, Adhikari H, Rai S K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008(39): 353-361.
- [7] Atomi H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2005(9): 166-173.
- [8] 刘军, 周成, 马延和, 等. 嗜热栖热菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因的表达及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 232-235.
- [9] Arıkan B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15[J]. Bioresource Technology, 2008(99): 3071-3076.
- [10] 张峻, 陈晓云, 齐欣, 等. 产海藻糖合酶嗜热菌的筛选[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(9): 20-23.
- [11] 王俊峰, 尹尧, 王萍萍. 高温海藻糖合酶释放处理条件及其酶学性质的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11673-11675, 11678.
- [12] Ryu S I, Kim J E, Huong N T, et al. Molecular cloning and characterization of trehalose synthase from *Thermotoga maritima* DSM3109: Syntheses of trehalose disaccharide analogues and NDP-glucoses[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 47(6): 249-256.
- [13] Brienza M, Arantes V, Milagres A MF. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus* [J]. Fungal Biology Reviews, 2008(22): 120-130.
- [14] 陈伟钊, 刘森林, 刑苗. 耐热碱性纤维素酶分离纯化及酶学特性研究[J]. 深圳大学学报: 理工版, 2007, 24(2): 212-216.
- [15] 罗颖, 欧阳嘉, 许婧, 等. 耐热纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 84-89.
- [16] Mayende L, Wilhelmi B S, Pletschke B I. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006(38): 2963-2966.
- [17] 江正强, 杨绍青, 闫巧娟, 等. 嗜热拟青霉固体发酵产木聚糖酶的纯化和性质[J]. 工业微生物, 2006, 36(3): 1-4.
- [18] Khandeparkar R, Bhosle N B. Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTTC 5112[J]. Research in Microbiology, 2006(157): 315-325.
- [19] Rye C A, Isupov M N, Lebedev A A, et al. Biochemical and structural studies of a L-haloacid dehalogenase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* [J]. Extremophiles, 2009, 13(1): 179-190.
- [20] Bachas-Daunert P G, Law S A, Wei Y N. Characterization of a recombinant thermostable dehalogenase isolated from the hot spring thermophile *Sulfolobus tokodaii* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(2): 382-393.
- [21] Spanikova S, Biely P. Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by *Schizopyllum commune* [J]. FEBS Letters, 2006, 580(19): 4597-4601.
- [22] Topakas E, Moukoulis M, Dimarogona M, et al. Functional expression of a thermophilic glucuronoyl esterase from *Sporotrichum thermophile*: identification of the nucleophilic serine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(5): 1765-1772.

权威·核心·领先·实用·全面