

· 综 述 ·

微生物水泥相关酶的研究进展

王磊^{1,2}, 王绪霞^{1,3}, 李斐¹, 崔明娟⁴, 杨晓旭¹, 杨敏¹, 闫云君¹

1 华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074

2 郑州工程技术学院 化工食品学院, 河南 郑州 450044

3 武昌首义学院 城市建设学院, 湖北 武汉 430064

4 华中科技大学 土木工程与力学学院, 湖北 武汉 430074

王磊, 王绪霞, 李斐, 崔明娟, 杨晓旭, 杨敏, 闫云君. 微生物水泥相关酶的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(2): 506-517.

WANG L, WANG XX, LI F, CUI MJ, YANG XX, YANG M, YAN YJ. Advances of enzymes related to microbial cement. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 506-517.

摘 要: 微生物诱导碳酸钙沉积 (microbial induced calcium carbonate precipitation, MICP) 是微生物通过新陈代谢在其周围微环境中形成碳酸钙沉积的一种自然现象, 根据其原理目前研发出了“微生物水泥”。因其具有绿色环保、经济高效的特点, 已成为生物、土木、环境等领域的研究热点。文中就与微生物水泥密切相关的关键酶——脲酶、碳酸酐酶的研究进展进行了系统综述, 主要包括两种酶的基因、蛋白结构、调控机制、工程菌的构建以及脲酶与碳酸酐酶在 MICP 过程中的协同关系等, 并对 MICP 未来的发展作出展望。在现有研究基础上, 借助生物信息学、合成生物学等前沿技术, 开发能适应广泛环境、高性能的生物水泥, 这将开启 MICP 研究的一个新阶段。

关键词: 微生物诱导碳酸钙沉积; 微生物水泥; 酶; 脲酶; 碳酸酐酶

Received: February 6, 2021; **Accepted:** September 18, 2021

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (2019M652622); Research Foundation of Zhengzhou University of Technology, China (zggk202101)

Corresponding author: YAN Yunjun. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@hust.edu.cn

基金项目: 中国博士后科学基金 (2019M652622); 郑州工程技术学院科研基金 (zggk202101)

Advances of enzymes related to microbial cement

WANG Lei^{1,2}, WANG Xuxia^{1,3}, LI Fei¹, CUI Mingjuan⁴, YANG Xiaoxu¹, YANG Min¹,
YAN Yunjun¹

1 School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

2 School of Chemical Engineering & Food Science, Zhengzhou University of Technology, Zhengzhou 450044, He'nan, China

3 School of Urban Construction, Wuchang Shouyi University, Wuhan 430064, Hubei, China

4 School of Civil Engineering and Mechanics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: Microbial induced calcium carbonate precipitation (MICP) refers to the natural biological process of calcium carbonate precipitation induced by microbial metabolism in its surrounding environment. Based on the principles of MICP, microbial cement has been developed and has received widespread attention in the field of biology, civil engineering, and environment owing to the merits of environmental friendliness and economic competence. Urease and carbonic anhydrase are the key enzymes closely related to microbial cement. This review summarizes the genes, protein structures, regulatory mechanisms, engineering strains and mutual synergistic relationship of these two enzymes. The application of bioinformatics and synthetic biology is expected to develop biocement with a wide range of environmental adaptability and high performance, and will bring the MICP research to a new height.

Keywords: microbial induced calcium carbonate precipitation (MICP); microbial cement; enzyme; urease; carbonic anhydrase

微生物诱导碳酸钙沉淀 (microbial induced calcium carbonate precipitation, MICP) 是自然界普遍存在的一种生物矿化现象, 即利用微生物代谢活动中的矿化行为, 诱导碳酸钙沉淀, 在微生物细胞外形成方解石等形式的矿化结构, 从而能将环境中疏松的岩土颗粒胶结形成具有一定硬度的固化体, 表现出特殊的胶结作用, 可作为一种新颖的生物胶凝材料——微生物水泥 (microbial cement)。目前, 已发现的 MICP 主要有 5 种机理, 分别是尿素水解、反硝化作用、硫酸盐还原、三价铁还原和有机物降解等。其中, 尿素水解的碳酸根产率高且量大, 成为了研究热点。人们利用这一生物学过程,

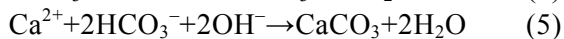
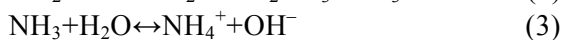
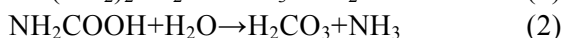
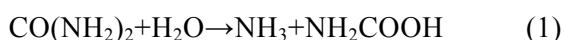
研发了“微生物水泥”。微生物水泥能显著提高土体的抗压性能, 且较传统矿物质水泥具有绿色环保、经济高效等优点, 已应用于生态修复、地基加固、裂缝修补、古迹保护、水利工程渗漏封堵等领域。目前, 欧盟第七研发框架计划已将 MICP 确定为低成本、高强度、环境友好型生物水泥开发, 美国国家科学研究委员会 (National Research Council, NRC) 将 MICP 确立为一项重要研究课题^[1]。当前, 研究人员正努力解决生物水泥的强度和耐久性问题, 以使其各项性能指标能比拟传统水泥^[2-3]。为此, 本文主要对微生物水泥相关的分子生物学研究现状进行系统综述, 主要包括与微生物水泥胶结功

能密切相关的脲酶、碳酸酐酶的基因、蛋白结构、调控机制以及两种酶在 MICP 过程中的协同关系, 以及相关的工程菌构建, 并针对当前研究中存在的问题进行了合理展望, 试图从生物学角度出发寻求可能的解决方法, 比如运用生物信息学、合成生物学等前沿生物技术, 构建具有广泛环境适应性的生物水泥工程菌。相信在不久的将来, 生物水泥这项新技术会迎来发展高潮, 产生更加显著的经济和社会效益。

1 脲酶

1.1 脲酶的作用机理

在 MICP 过程中, 巴氏芽孢八叠球菌 (*Sporosarcina pasteurii*) 等微生物通过表达脲酶使尿素水解, 从而迅速提高细胞微环境的 pH 值与碳酸根浓度, 形成诱导碳酸钙沉淀所需要的碱性环境。同时, 微生物细胞表面通常带有大量负电荷的官能团, 从而吸附溶液中带正电荷的 Ca^{2+} , Ca^{2+} 遇到高浓度的碳酸根就会形成碳酸钙, 并沉淀在细胞表面, 随着碳酸钙沉淀的扩大, 逐渐将微生物包裹, 限制其营养物质的扩散, 导致微生物死亡, 并最终形成生物矿化体^[4]。整个化学反应过程如式(1)–(5)^[5]:



微生物作用下的碳酸钙沉积速率与环境因素密切相关, 主要由 Ca^{2+} 浓度、 CO_3^{2-} 浓度、环境 pH 值和有效的成核晶体 4 个关键因素决定。由于巴氏芽孢八叠球菌产脲酶的活性为目前最高, 因此作为 MICP 功能微生物的代表, 研究较为深入。

1.2 脲酶的基因簇结构

脲酶基因相对较复杂, 通常由 3–7 个不等

的基因组成, 不同来源的微生物其脲酶基因簇的结构亦有所不同 (图 1)。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的脲酶基因数目相对比较少, 只有 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 三个结构基因组成, 无需其他辅助基因和调节基因就可以组装成一个完整的脲酶来发挥作用^[6]。有些微生物来源的脲酶基因数目较大, 不仅包含 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 结构基因, 还包含辅助基因 (*ureD*、*ureE*、*ureH*、*ureF*、*ureG* 和 *ureI* 等) 和调节基因 (*ureR* 等)^[7]。而产气克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 的脲酶基因中除包含 3 个结构基因 (*ureA*、*ureB*、*ureC*) 外, 还包含 *ureD*、*ureE*、*ureF* 和 *ureG* 四个辅助基因 (图 1)。豆科根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 的脲酶基因与产气克雷伯氏菌的顺序和数量一致, 但序列中插入了几个开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[8]。巴氏芽孢八叠球菌 (*S. pasteurii*) 的脲酶基因数目和种类与产气克雷伯氏菌脲酶相同, 但基因排列顺序有所不同, 其辅助基因 *ureD* 位于 *ureG* 之后。而胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 的脲酶基因簇前面是尿素转运的基因 (*utp*) 和编码镍转运的基因 *cbiK*、*cbiL*、*cbiM*、*cbiQ* 和 *cbiO*^[9]。不同于其他细菌, 雪貂螺旋杆菌 (*Helicobacter mustelae*) 脲酶结构基因仅由 *ureA* 和 *ureB* 组成, 而辅助基因则是由 *ureI*、*ureE*、*ureF*、*ureG* 和 *ureH* (与其他细菌辅助基因 *ureD* 同源) 5 个基因组成, 位于结构基因的下游, 并且在完整的脲酶基因簇以外, 还具有第二组结构基因^[10]。

虽然不同来源的微生物其脲酶基因簇的结构不同, 但结构基因基本是脲酶基因的必备组成, 通过图 1 可知, 大多脲酶基因都含有 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 三个结构基因, 但螺旋杆菌属的幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和雪貂螺旋杆菌 (*H. mustelae*) 结构基因仅由 *ureA*

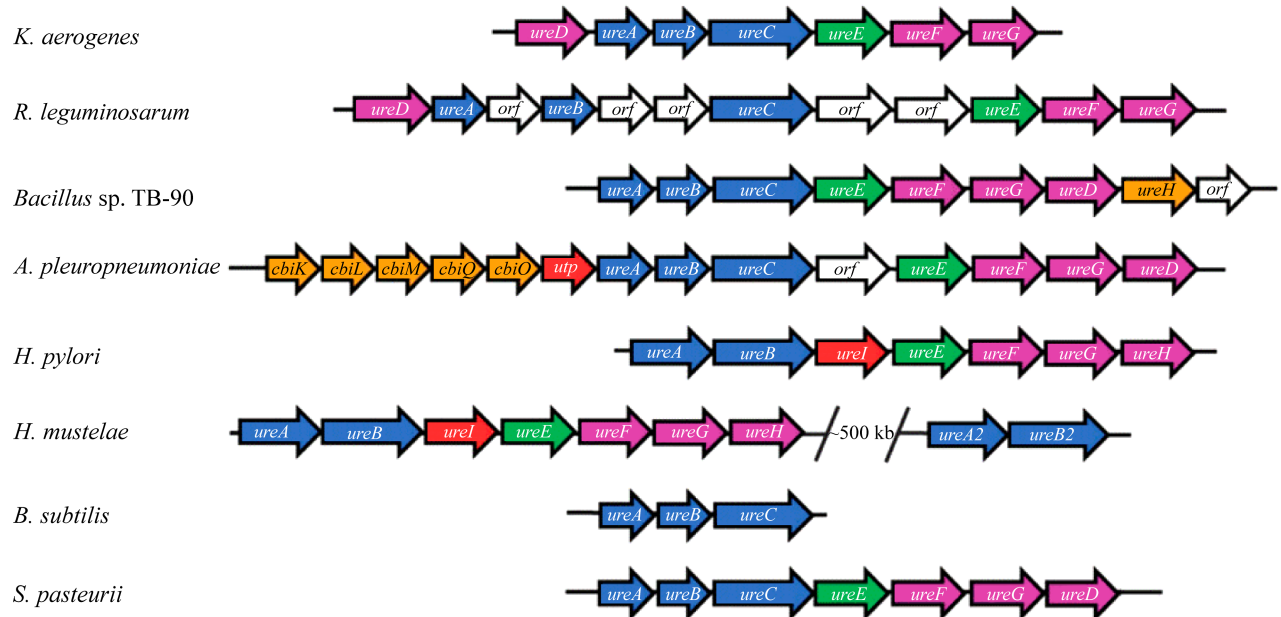


图 1 不同来源的脲酶基因簇组成图^[11]

Figure 1 The gene clusters of urease from different species^[11].

和 *ureB* 组成, 说明结构基因中 *ureA* 和 *ureB* 是发挥脲酶活性的必需要素。

1.3 脲酶的蛋白构成

细菌的脲酶蛋白结构通常由结构蛋白和辅助蛋白组成。脲酶结构基因 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 分别编码脲酶主体结构的 γ 、 β 和 α 三个亚基, 除枯草芽孢杆菌外, 大多数细菌还需要系列辅助基因协助编码的辅助蛋白才能组装成完整具有活性的脲酶。脲酶活性区域位于 α 亚基上, 每个亚基含有双核镍离子的活性位点^[12]。结构蛋白可以通过单体形成更大的三聚体、六聚体复合物结构, 比如巴氏芽孢八叠球菌脲酶组成 $(\alpha\beta\gamma)_3$ 三聚体结构。

脲酶基因簇中的辅助基因 *ureD*、*ureE*、*ureF*、*ureG*、*ureH* 和 *ureI* 等编码相应辅助蛋白, 从而协助将 Ni^{2+} 转运到无活性的酶原上, 以激活脲酶活性。其中, 辅助蛋白 UreE 可以结合细胞中的镍离子, 在脲酶激活过程中作为镍离子的载体。辅助蛋白 UreH 是脲酶的伴侣蛋白,

与脲酶蛋白组成复合物, 维持脲酶蛋白构象或者阻止无效镍离子的结合。UreF 和 UreG 形成一个复合物, 能够促进镍离子有效结合到活性位点。UreI 可能是位于细胞内膜上的尿素转运通道, 可以根据 pH 值的改变调节细胞外尿素向细胞质内的转运, 从而调节细胞质内脲酶的活性, 如图 2 可见微生物脲酶的组装过程^[7]。

1.4 脲酶基因的调控机制

在细菌生长过程中, 脲酶基因的调控机制主要分为以下 3 种:

(1) 氮源调控。这类微生物能够利用脲酶分解尿素产生 NH_4^+ , 将其作为氮源。例如, 产气克雷伯氏菌在含氨等氮源丰富的培养基上不会合成脲酶, 而在低氮条件下则能合成脲酶, 其氮调节系统 (*ntr*) 是脲酶基因表达调控的主要机制, 其中 *ntrA* 编码 σ^{54} , *ntrC* 编码调节蛋白, 能激活依赖 σ^{54} 的启动子的转录。而在低氮条件下, 磷酸化的 *ntrC* 能够激活 σ^{54} 聚合酶的转录, 提高氮同化控制蛋白 (Nac) 的含量, 然后 Nac

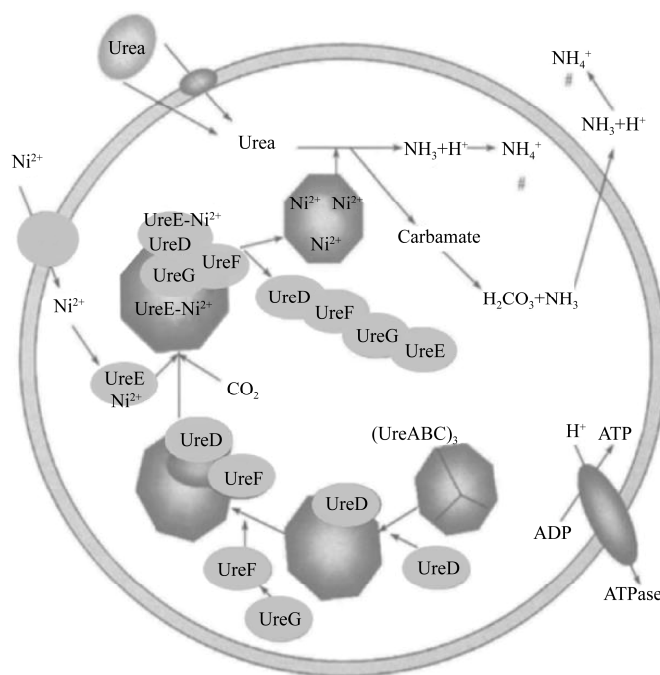


图 2 微生物脲酶的组装过程和尿素代谢模拟图^[7]

Figure 2 Schematic representation of microbial urease activation and urea metabolism^[7].

结合到 *ureD* 上游的 σ^{70} 启动子区，从而激活脲酶的转录^[13]。

(2) 氨根调控。尿素水解作用产生的氨虽然可以作为细菌代谢的氮源，但浓度过高也会对组织产生毒害作用。因此，当环境的铵根浓度较高时，则会抑制脲酶表达，如克雷伯氏菌^[14]。

(3) pH 调控。脲酶表达受 pH 调控，在酸性条件下，脲酶合成增多，在中性条件下，脲酶开始降解。例如，pH 值对唾液链球菌脲酶操纵子的诱导表达调控受到邻近的启动子 *PureI* 的阻遏调控^[15]，具体表现为：在 pH 5.5 时，脲酶合成增多，且比 pH 7.0 时的脲酶活性高 100 倍^[16]。

MICP 最常用的巴氏芽孢八叠球菌，其在不同生长时期的脲酶活性也不同，培养初期脲酶活性迅速上升，在对数期达到最高活性，之后缓慢下降。巴氏芽孢八叠球菌的最适环境 pH 值为 9.25，当外界 pH 高于这个值时，细菌会通过自身代谢下调脲酶活性，防止 pH 值过高

造成的不利于菌体生长情况的发生^[17]。对数期后脲酶活性的下降很可能与培养基中菌体代谢产物的积累以及环境 pH 值的升高有关。因此，在开展 MICP 胶结过程中，要注意代谢产生的铵根离子浓度和体系 pH 值过高产生的不利因素，从而影响矿化效率。

1.5 脲酶基因工程菌

虽然野生巴氏芽孢八叠球菌在生物水泥的应用方面已有很多研究报道，但目前对于脲酶工程菌的研究仍停留在前期探索阶段。早在 20 世纪 90 年代初，Kim 等^[18]曾将巴氏芽孢八叠球菌的脲酶操纵子基因插入 pBR322 重组质粒，并在大肠杆菌中表达，以研究脲酶操纵子基因对脲酶活性的作用机理。后来，Bergdale 等^[19]在此基础上将巴氏芽孢八叠球菌的脲酶基因和胞外聚合物 EPS 基因导入铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中，获得既能诱导产生方解石沉淀又能产生 EPS 的重组体，重组菌

株诱导产生 CaCO_3 沉淀的速率与巴氏芽孢八叠球菌相当, 通过扫描电镜观察到了 CaCO_3 晶体和胞外 EPS 层的复合体有较好的融合, 为生物复合材料的研制提供参考。Connolly 等^[20]则将巴氏芽孢八叠球菌的脲酶基因分别导入能表达绿色荧光蛋白 GFP 的绿脓杆菌和大肠杆菌中, 脲酶基因 *ureDABC* 和 *ureFG* 分别连接到载体 pJN105 中, 使用阿拉伯糖诱导的启动子 pBAD 来快速调控脲酶的表达 (图 3)。构建出两种新型模式生物, 通过 GFP 在荧光显微镜下的成像作用, 方便进行矿化过程中微生物和碳酸钙时空分布的机理研究。可见, 虽然有学者利用分子生物学手段对脲酶进行了表达和研究, 但重点是研究其分子调控机理, 构建的基因工程菌脲酶活性并没有明显的提升, 因此, 尚无公开文献报道成功构建出高效表达脲酶的工程菌。

2018 年, 英国剑桥大学桑格研究院完成了巴氏芽孢八叠球菌全基因组的测序工作并对外公布 (NCBI: NZ_UGYZ01000002), 目前一共注释了 3 215 个基因^[21], 其中与 MICP 相关的脲酶、碳酸酐酶等基因均能找到对应的基因序列。有理由相信, 利用基因组信息、分子生物学和合成生物学技术手段, 未来可以得到更适合工程化应用的新型高效 MICP 工程菌。近期笔者实验室通过合成生物学等技术手段, 已在

枯草芽孢杆菌中实现了脲酶的高效表达。

2 碳酸酐酶

碳酸酐酶 (carbonic anhydrases, CA) 是一类能高效催化二氧化碳、水与碳酸、 H^+ 之间可逆反应的含锌金属酶, pH 值在 4.0–9.0 之间且温度低于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下能够保持较高活性和稳定性^[22]。碳酸酐酶的催化反应速率非常快, 不同家族的催化速率一般为 $(10^4\text{--}10^6)/\text{s}$ ^[23]。因此, 其有望在 MICP 中帮助有效提升生物矿化的速率而备受关注。

2.1 碳酸酐酶的基因家族

至今, 已发现有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ζ 、 η 等 6 个不同家族的碳酸酐酶, 每个家族之间的氨基酸序列无明显同源性。在六大家族中, α -CA 常见于哺乳动物、原生动物、藻类、植物、细菌、真菌和古菌中, β -CA 在高等植物的叶绿体中, 以及在细菌、真菌、藻类、古菌中亦可以找到, γ -CA 主要存在于一些细菌和古菌中, δ -CA 与 ζ -CA 主要存在于海洋硅藻中, η -CA 目前发现主要存在于疟原虫中^[24]。虽然这六大家族酶结构相似度不高, 但每种酶的活性中心都有一个对催化过程起着重要作用的金属离子, 而加快 CO_2 水合的核心机理正是金属离子对 CO_2 的亲核攻击^[25]。表 1 列出了常见细菌的碳酸酐酶。

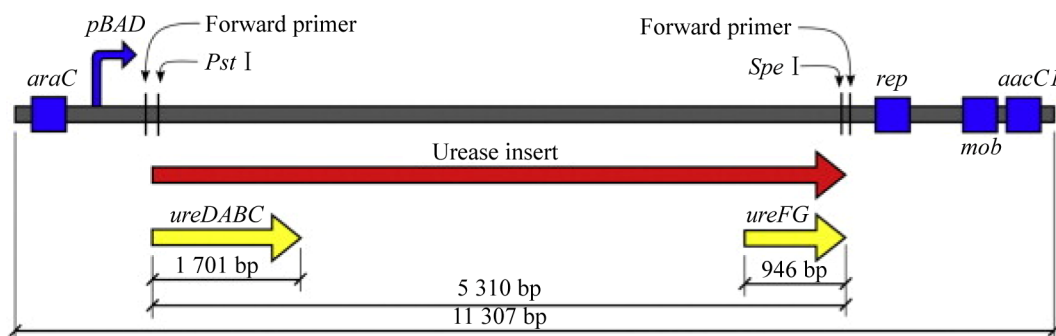


图 3 脲酶基因的载体构建^[20]

Figure 3 Construction of urease gene expression vector^[20].

表 1 细菌中碳酸酐酶基因家族的分布^[26]
Table 1 Distribution of CA families in bacteria^[26]

Gram negative/ positive	Genus/species	CA family		
Gram-negative	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	α	-	-
	<i>Helicobacter pylori</i>	α	β	γ
	<i>Escherichia coli</i>	-	β	γ
	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	β	-
	<i>Brucella suis</i>	-	β	γ
	<i>Salmonella enterica</i>	-	β	-
	<i>Vibrio cholerae</i>	α	β	γ
	<i>Sulfurihydrogenibium yellowstonense</i>	α	-	γ
	<i>Sulfurihydrogenibium azorense</i>	α	-	γ
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	β	γ
	<i>Ralstonia eutropha</i>	α	β	γ
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	β	γ
	Gram-positive	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	β
<i>Clostridium perfringens</i>		-	β	γ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		-	β	γ
<i>Bacillus subtilis</i>		-	β	γ
<i>Leifsonia xyli</i>		-	β	γ
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	-	γ
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	γ

对比可以发现,革兰氏阳性菌中不含有 α -CA,但都含有 γ -CA,有些学者认为革兰氏阳性菌出现的年代较早^[27],而 α -CA可能是由 γ -CA进化而来,除了可以催化加速 CO_2 水合

之外,还衍生出了酯酶活性^[26]。分离自美国黄石公园温泉的*Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1的碳酸酐酶(SspCA)^[28],以及从亚速尔群岛温泉极端微生物*Sulfurihydrogenibium azorense*中分离的碳酸酐酶(SazCA)^[27]均为典型的 α -CA。而幽门螺旋杆菌、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*)则具有 α 、 β 和 γ 型的碳酸酐酶。

2.2 碳酸酐酶的蛋白构成

目前,碳酸酐酶已发现的有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ζ 、 η 等6个不同家族,其中 α 、 β 和 γ 三个结构研究得较为清楚,其蛋白三维结构如图4所示。对比上述蛋白三维结构可以发现, γ -CA的催化腔最小, β -CA的催化腔较大,而在 α -CA的最大,因此 γ -CA的催化效率比 α -CA和 β -CA都要低, α -CA的催化效率相对最高。由此,在寻找高活性碳酸酐酶时,一般均是围绕 α -型的碳酸酐酶开展的^[26]。

Sulfurihydrogenibium yellowstonense YO3AOP1的碳酸酐酶SspCA是典型的 α -CA二聚体结构,每个单体含有一个三角锥活性中心,由 Zn^{2+} 和His89、His91、His108组成畸变四面体,其中导致 CO_2 水化的核心机理是 Zn^{2+} 对于 CO_2 的亲核攻击。SspCA的二聚体结构,主要由 α -螺旋

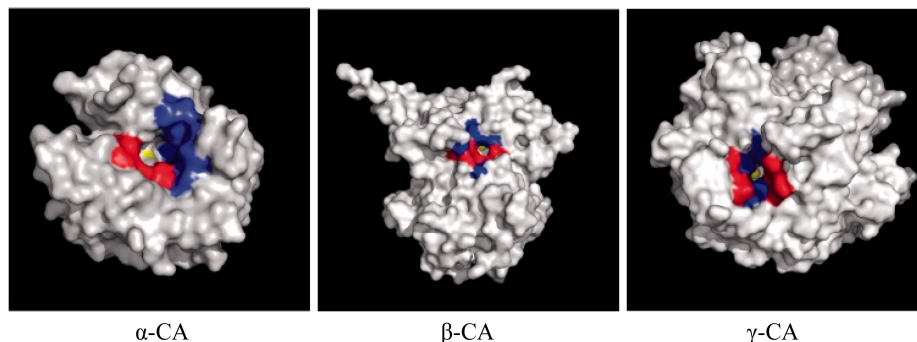


图 4 α -、 β -和 γ -型碳酸酐酶的三维结构^[26]

Figure 4 Three-dimensional structure of α -, β - and γ -CA^[26].

和小 β -折叠的 10 个平行的 β -折叠组成, 其活性中心位于一个圆锥形体腔中, 其蛋白质表面含有较多的带电氨基酸, 形成一个较复杂的离子网络, 可能这也是 SspCA 热稳定性更高的原因^[28-29]。

Sulfurihydrogenibium azorense 的碳酸酐酶 SazCA 的单体结构主要由 10 个平行的 β -折叠, 周围再环绕着 3 个 α -螺旋、3₁₀-螺旋和小 β -折叠组成。不同来源的 α -CA 中, 由 Cys24 与 Cys178 所组成的二硫键相对保守。SazCA 与 SspCA 的结构有 61.3% 的相似度, SspCA 上的 Glu2 和 Gln207 残基被 SazCA 的 His2 和 His207 取代, 这种取代可能影响了 His64 的 pKa 值, 进而增强了其质子穿梭能力^[30], 这些结构信息为设计高催化活性的 α -CA 提供了重要理论参考。

2.3 碳酸酐酶基因工程菌

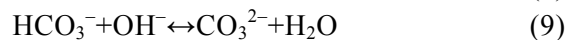
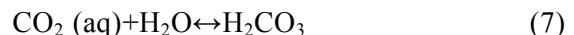
由于碳酸酐酶能够捕获燃烧废气中的 CO₂, 从而减少碳排放量, 因此近年来碳酸酐酶工程菌的研究成为一个热点。一些学者从自然界中筛选具有耐热、耐碱碳酸酐酶基因的微生物资源直接进行异源高效表达。Jun 等从杀鲑异弧菌 (*Aliivibrio salmonicida*) 中克隆到了碳酸酐酶基因 ASCA, 经过密码子优化和去除信号肽, 可实现 ASCA (mASCA) 的高效表达, 并且在 10–60 °C, pH 6.0–11.0 的范围内表现出稳定的活性。当 pH 值为 10.0 时, mASCA 活性可以保持稳定 48 h^[31]。侯娟等将嗜热蓝细菌 (*Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542) 的碳酸酐酶基因 *Ecah* 在大肠杆菌细胞中异源高效表达, 得到的碳酸酐酶 ECAH 经过 50 °C 处理 30 min 后, 酶活比对照提高了 8%^[32], 增强了嗜热碳酸酐酶催化转化高温烟道中 CO₂ 的性能。

虽然已经从自然环境中筛选到了很多新型的碳酸酐酶, 但仍不能有效满足工业对碳酸酐酶的需求, 有学者利用蛋白质工程等生物技术

手段对碳酸酐酶进行修饰来进一步提升其酶活或抗逆性能。正如以高活性的碳酸酐酶 SazCA 为模本, 在其 N 端引入耐热的 SspCA 中的基因结构, 以期得到超级碳酸酐酶 SupCA, 虽然最终效果没有达到预期, 但也为后继碳酸酐酶超级工程菌的设计提供了一定的参考^[33]。蔡丽希等对碳酸酐酶的热稳定性机制的研究进行了总结和分析, 认为蛋白中的二硫键和分子构象的刚性有助于提升碳酸酐酶的热稳定性^[34]。二硫键可降低解旋状态下 CA 的构象熵, 从而维持其热稳定性; 而生物信息学揭示酶的刚性越强其热稳定性越强, 为更高性能的碳酸酐酶工程菌的设计提供了指导。

3 脲酶与碳酸酐酶在 MICP 过程中的协同关系

在自然情况下, CO₂ 的水合反应速率非常低, 仅为 $1.3 \times 10^{-1}/s$ ^[35], 极大限制了碳酸钙沉淀的产生, 这也是 MICP 反应缓慢的主要原因。而自然界存在的碳酸酐酶, 在其作用下 CO₂ 水合速率最高可达 $1.4 \times 10^7/s$ ^[36], 达到自然情况下的 10⁸ 倍左右, 因此, 在其催化下可有效提升生物矿化速率。CO₂ 水合需要经过如下历程^[24]:



式 (6) 为气态的 CO₂ 溶于水形成松散的水化 CO₂ 的过程, 在碱性条件下, CO₂ 与水反应生成 H₂CO₃ (式 7), 这也是该反应过程的限速步骤, 但是碳酸酐酶可有效催化该反应。水合后的 H₂CO₃ 电离出 H⁺ 和 HCO₃⁻ (式 8), 碱性条件进一步生成 CO₃²⁻ 和 H₂O (式 9), 再与环境中的 Ca²⁺ 生成 CaCO₃ 沉淀 (式 10)。

在 MICP 的应用研究中, 目前得到公认且效果最好的是以巴氏芽孢八叠球菌为代表的脲酶水解途径, 通过检索与分析其在 NCBI 数据库中公布的全基因组信息可以发现, 与 MICP 密切相关的功能基因主要包括脲酶和碳酸酐酶两类。如图 5 所示, 在 MICP 过程中, 脲酶的主要功能是将尿素分解为 NH_3 和 CO_2 , 溶于水显碱性可以提高细胞微环境的 pH 值, 而碳酸酐酶可以加速气态的 CO_2 的水合并形成 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} , 为矿物质沉降提供必要条件^[37]。因为巴氏芽孢八叠球菌既有脲酶也有碳酸酐酶, 所以其矿化效果才是目前已发现的自然菌株中最为突出的。

碳酸酐酶可有效促进生物矿化。在自然情况下, CO_2 的水合反应速率相当低, 极大地限制了碳酸钙沉淀的产生。但当上述反应有碳酸酐酶催化时, CO_2 水合速率迅速提升, 可达到自然情况下的 10^8 倍。因此, 生物诱导碳酸钙

矿化快速沉积需要脲酶分解尿素提高环境的 pH 值, 碳酸酐酶促进 CO_2 的迅速水合形成大量的 CO_3^{2-} , 进而与环境中的 Ca^{2+} 形成碳酸钙沉积。

4 总结与展望

MICP 具有广泛的应用领域, 如生态修复^[38]、地基加固^[39]、裂缝修补^[40]、古迹保护^[41]、水利工程渗漏封堵等, 其最大的优势是生态相容性好^[42]。其中土体加固、裂缝修补、生态修复和石质文物保护等方面最具优势, 是其他传统技术无法比拟, 但也存在矿化速率低、硬度低和环境适应性受限的问题, 因此尚未见到大规模实际工程应用, 这也为 MICP 的研究提供了方向。

4.1 加快生物水泥矿化速率

巴氏芽孢八叠球菌虽然是生物水泥应用中常用菌种, 但其矿化速率仍无法在较短时间内达到预期强度以满足大规模实际工程的应用。目前报道的 MICP 应用研究多数处于实验室研究阶段, 效果还无法与常规矿物质水泥的强度相媲美, 完全达到工程化要求的尚不多见, 因此, 需要更深入的基础研究和技术研发与完善^[43-44]。为了提升生物水泥的矿化速率, MICP 的研究一直围绕更高脲酶活性的菌种进行筛选^[45], 以期通过加速尿素的分解来快速产生 CO_3^{2-} , 但却忽略了菌种碳酸酐酶的活性。碳酸酐酶可以将游离态的 CO_2 加速水合, 转化为 HCO_3^- 与 CO_3^{2-} , 如果具有 MICP 的微生物能够将空气中的 CO_2 加以利用, 将进一步加速 CaCO_3 沉积^[34]。目前, 已经有学者已经注意到了脲酶与碳酸酐酶在 CaCO_3 沉积过程中的协同效应^[46], 如果在提升脲酶活性的基础上, 同时提升碳酸酐酶的活性, 并平衡好彼此的协同关系, 将能够显著提升生物水泥矿化的速率^[47]。

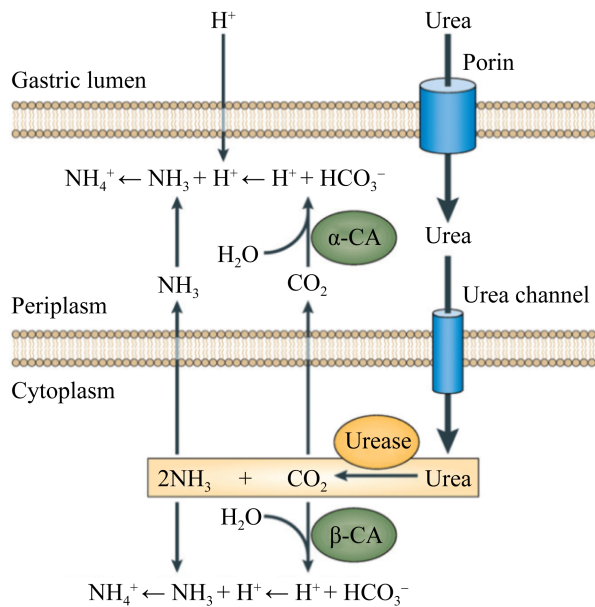


图 5 α 与 β 型碳酸酐酶和脲酶的协同作用^[37]

Figure 5 Synergistic relationship of α - and β -CA and urease^[37].

4.2 提升生物水泥的性能

目前,利用 MICP 研发的生物水泥,因其硬度还达不到现有矿物质水泥的硬度标准,故未能在生产生活中得到大规模实际应用。因此,有学者尝试通过延长钙化时间来增加胶结体的强度,或在胶结体系中添加一些纤维材料,改进后的胶结体强度有所提升^[48-49]。另外,受水泥改性研究^[50-51]的启发,可尝试筛选一株既有高活性的脲酶和碳酸酐酶,又能分泌改性成分,在微生物诱导矿化的过程中,不仅会提升胶结体的硬度,并且还能赋予其很高的韧性,全面提升生物水泥的性能。

4.3 增强生物水泥的使用环境适应性

由于具有 MICP 功能的各菌株特性各不相同,对应用环境的适应性也存在较大差异,目前利用 MICP 的各种应用研究基本都是在实验室模拟环境中进行的^[52],在实地应用中还缺少特别理想的自然菌株。因此,一些科学家一直致力于从自然界中筛选活性更高、适应能力更强的微生物菌种,来拓展生物水泥的应用领域。与此同时,也有一些生物学家利用合成生物学等前沿生物技术,将 MICP 相关的高效脲酶和碳酸酐酶基因,以及诱导调控体系的相关元件构建到环境广适底盘微生物中,构建具有广泛应用环境适应性的高效能 MICP 工程菌,使得生物水泥可以广泛投入到实际应用中^[53]。NCBI 已经公布了巴氏芽孢八叠球菌的全基因组信息,可以检索到其脲酶、碳酸酐酶基因以及调控相关功能的基因序列,为基因工程菌的构建提供了有利条件。

此外,生物水泥是有生命的,当使用了生物水泥的建筑物出现裂缝或破损时,其内部以芽孢形式存在的休眠微生物将在适宜条件下能够复苏,重新启动 MICP 程序,可以把裂缝重新填补,实现建筑物的自行修复^[42]。如果再赋

予生物水泥高韧性、耐腐蚀等常规矿物质水泥所不具备的性能,MICP 将会成为一项真正新颖技术,将开启 MICP 研究的一个新高潮。

REFERENCES

- [1] Okwadha GD, Li J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 2010, 81(9): 1143-1148.
- [2] Bai Y, Guo XJ, Li YZ, et al. Experimental and visual research on the microbial induced carbonate precipitation by *Pseudomonas aeruginosa*. *AMB Express*, 2017, 7(1): 57.
- [3] Ngu LH, Song JW, Hashim SS, et al. Lab-scale atmospheric CO₂ absorption for calcium carbonate precipitation in sand. *Greenhouse Gas Sci Technol*, 2019, 9(3): 519-528.
- [4] De Muynck W, De Belie N, Verstraete W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol Eng*, 2010, 36(2): 118-136.
- [5] Al-Salloum Y, Hadi S, Abbas H, et al. Bio-induction and bioremediation of cementitious composites using microbial mineral precipitation — a review. *Constr Build Mater*, 2017, 154: 857-876.
- [6] Kim JK, Mulrooney SB, Hausinger RP. Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. *J Bacteriol*, 2005, 187(20): 7150-7154.
- [7] 赵圣国, 王加启, 卜登攀, 等. 细菌脲酶的生化 and 分子生物学特点. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1146-1152.
Zhao SG, Wang JQ, Bu DP, et al. Biochemistry and molecular biology of bacterial ureases. *Microbiol China*, 2008, 35(7): 1146-1152 (in Chinese).
- [8] Toffanin A, Cadahia E, Imperial J, et al. Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Arch Microbiol*, 2002, 177(4): 290-298.
- [9] Bossé JT, Gilmour HD, MacInnes JI. Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol*, 2001, 183(4): 1242-1247.
- [10] Stoof J, Breijer S, Pot RG, et al. Inverse nickel-responsive regulation of two urease enzymes in the gastric pathogen *Helicobacter mustelae*. *Environ Microbiol*, 2008, 10(10): 2586-2597.
- [11] Carter EL, Flugga N, Boer JL, et al. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, 2009, 1(3): 207-221.

- [12] Carter EL, Hausinger RP. Characterization of the *Klebsiella aerogenes* urease accessory protein UreD in fusion with the maltose binding protein. *J Bacteriol*, 2010, 192(9): 2294-2304.
- [13] Collins CM, Gutman DM, Laman H. Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. *Mol Microbiol*, 1993, 8(1): 187-198.
- [14] Carter EL, Boer JL, Farrugia MA, et al. Function of UreB in *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochemistry*, 2011, 50(43): 9296-9308.
- [15] Chen YM, Betzenhauser MJ, Burne RA. *Cis*-acting elements that regulate the low-pH-inducible urease operon of *Streptococcus salivarius*. *Microbiology (Reading)*, 2002, 148(pt 11): 3599-3608.
- [16] Li YH, Chen YY, Burne RA. Regulation of urease gene expression by *Streptococcus salivarius* growing in biofilms. *Environ Microbiol*, 2000, 2(2): 169-177.
- [17] 吴洋, 练继建, 闫玥, 等. 巴氏芽孢八叠球菌及相关微生物的生物矿化的分子机理与应用. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(8): 96-103.
Wu Y, Lian JJ, Yan Y, et al. Mechanism and applications of bio-mineralization induced by *Sporosarcina pasteurii* and related microorganisms. *China Biotechnol*, 2017, 37(8): 96-103 (in Chinese).
- [18] Kim SD, Hausinger RP. Genetic organization of the recombinant *Bacillus pasteurii* urease genes expressed in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 1994, 4(2): 108-112.
- [19] Bergdale TE, Pinkelman RJ, Hughes SR, et al. Engineered biosealant strains producing inorganic and organic biopolymers. *J Biotechnol*, 2012, 161(3): 181-189.
- [20] Connolly J, Kaufman M, Rothman A, et al. Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation. *J Microbiol Methods*, 2013, 94(3): 290-299.
- [21] 巴氏芽孢八叠球菌全基因组系列及相关信息(NCBI: NZ_UGYZ01000002) [2021-01-12]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_UGYZ01000002.1?report=genbank
- [22] Cuesta-Seijo JA, Borchert MS, Navarro-Poulsen JC, et al. Structure of a dimeric fungal α -type carbonic anhydrase. *FEBS Lett*, 2011, 585(7): 1042-1048.
- [23] Boone CD, Pinard M, McKenna R, et al. Catalytic mechanism of α -class carbonic anhydrases: CO₂ hydration and proton transfer. *Subcell Biochem*, 2014, 75: 31-52.
- [24] Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J*, 2016, 473(14): 2023-2032.
- [25] De Simone G, Di Fiore A, Capasso C, et al. The zinc coordination pattern in the η -carbonic anhydrase from *Plasmodium falciparum* is different from all other carbonic anhydrase genetic families. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(7): 1385-1389.
- [26] Capasso C, Supuran CT. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, 30(2): 325-332.
- [27] Supuran CT, Capasso C. New light on bacterial carbonic anhydrases phylogeny based on the analysis of signal peptide sequences. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2016, 31(6): 1254-1260.
- [28] Capasso C, De Luca V, Carginale V, et al. Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial α -carbonic anhydrase from *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP₁. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2012, 27(6): 892-897.
- [29] Luca VD, Vullo D, Scozzafava A, et al. An α -carbonic anhydrase from the thermophilic bacterium *Sulphurihydrogenibium azorense* is the fastest enzyme known for the CO₂ hydration reaction. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(6): 1465-1469.
- [30] De Simone G, Monti SM, Alterio V, et al. Crystal structure of the most catalytically effective carbonic anhydrase enzyme known, SazCA from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium azorense*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(9): 2002-2006.
- [31] Jun SY, Kim SH, Kanth BK, et al. Expression and characterization of a codon-optimized alkaline-stable carbonic anhydrase from *Aliivibrio salmonicida* for CO₂ sequestration applications. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2017, 40(3): 413-421.
- [32] 侯娟, 李俐珩, 张海若, 等. 嗜热蓝细菌碳酸酐酶基因的异源表达及酶学性质. *微生物学通报*, 2020, 47(2): 450-458.
Hou J, Li LH, Zhang HR, et al. IPTG-induced, heterologous expression and characterization of carbonic anhydrase from *Thermosynechococcus elongatus* PKUAC-SCTE542. *Microbiol China*, 2020, 47(2): 450-458 (in Chinese).
- [33] Entative to design a super carbonic anhydrase having the biochemical properties of the most thermostable CA (SspCA) and the fastest (SazCA) enzymes. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2015, 30(6): 989-994.

- [34] 蔡丽希, 楚云猛, 张光亚. 可用于二氧化碳捕获过程的微生物碳酸酐酶的挖掘与改造. 生物工程学报, 2019, 35(1): 1-12.
Cai LX, Chu YM, Zhang GY. Mining and engineering of microbial carbonic anhydrases for biomimetic carbon dioxide sequestration. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 1-12 (in Chinese).
- [35] Aquilano D, Otálora F, Pastero L, et al. Three study cases of growth morphology in minerals: halite, calcite and gypsum. Prog Cryst Growth Charact Mater, 2016, 62(2): 227-251.
- [36] Kanth BK, Min K, Kumari S, et al. Expression and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from *Dunaliella* species for CO₂ sequestration application. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167(8): 2341-2356.
- [37] Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(2): 168-181.
- [38] Wong LS. Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. J Clean Prod, 2015, 93: 5-17.
- [39] 张鑫磊, 陈育民, 张喆, 等. 微生物灌浆加固可液化钙质砂地基的振动台试验研究. 岩土工程学报, 2020, 42(6): 1023-1031.
Zhang XL, Chen YM, Zhang Z, et al. Performance evaluation of liquefaction resistance of a MICP-treated calcareous sandy foundation using shake table tests. Chin J Geotech Eng, 2020, 42(6): 1023-1031 (in Chinese).
- [40] Liu SY, Yu J, Peng XQ, et al. Preliminary study on repairing tabia cracks by using microbially induced carbonate precipitation. Constr Build Mater, 2020, 248: 118611.
- [41] Liu SY, Wang RK, Yu J, et al. Effectiveness of the anti-erosion of an MICP coating on the surfaces of ancient clay roof tiles. Constr Build Mater, 2020, 243: 118202.
- [42] 钱春香, 张旋. 新型微生物水泥. 北京: 科学出版社, 2019: 204-207.
Qian CX, Zhang X. New biocement. Beijing: Science Press, 2019: 204-207 (in Chinese).
- [43] 梁仕华, 牛九格, 房采杏, 等. 微生物固化砂土的研究进展. 工业建筑, 2018, 48(7): 1-9, 15.
Liang SH, Niu JG, Fang CX, et al. Research progress of bio-cemented sand. Ind Constr, 2018, 48(7): 1-9, 15 (in Chinese).
- [44] Cui MJ, Zheng JJ, Zhang RJ, et al. Influence of cementation level on the strength behaviour of bio-cemented sand. Acta Geotech, 2017, 12(5): 971-986.
- [45] Fujita M, Nakashima K, Achal V, et al. Whole-cell evaluation of urease activity of *Pararhodobacter* sp. isolated from peripheral beachrock. Biochem Eng J, 2017, 124: 1-5.
- [46] Dhami NK, Reddy MS, Mukherjee A. Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(5): 2552-2561.
- [47] 闫云君, 王磊, 龚梦瑶, 等. 一种用于生物矿化的微复合菌群及其制备与应用. CN202011131690.6
Yan YJ, Wang Lei, Gong MY, et al. Preparation and application of a microbial complex for bio-mineralization. CN202011131690.6
- [48] Xiao Y, He X, Evans TM, et al. Unconfined compressive and splitting tensile strength of basalt fiber-reinforced biocemented sand. J Geotech Geoenviron Eng, 2019, 145(9): 04019048.
- [49] 梁仕华, 曾伟华, 肖雪莉, 等. 纤维长度对微生物胶结砂力学性能的影响. 工业建筑, 2019, 49(10): 136-140.
Liang SH, Zeng WH, Xiao XL, et al. Influence of fiber length on mechanical properties of sand cemented by micp. Ind Constr, 2019, 49(10): 136-140 (in Chinese).
- [50] Yao DF, Wu J, Wang GW, et al. Effect of wool fiber addition on the reinforcement of loose sands by microbially induced carbonate precipitation (MICP): mechanical property and underlying mechanism. Acta Geotech, 2021, 16(5): 1401-1416.
- [51] 闫云君, 姚敦璠, 吴皎, 等. 运用蛋白胶凝材料提高生物胶结松散砂土机械性能的方法. CN202011053799.2.
Yan YJ, Yao DF, Wu J, et al. Methods of improving mechanical properties of bio-cemented loose sand by using protein cementitious materials. CN202011053799.2.
- [52] 张海丽, 徐品品, 冷立健, 等. 微生物诱导碳酸钙沉积研究与应用. 生物学杂志, 2020, 37(1): 86-91.
Zhang HL, Xu PP, Leng LJ, et al. Review on research and application of microbial induced calcium carbonate precipitation. J Biol, 2020, 37(1): 86-91 (in Chinese).
- [53] Tang S, Xi W, Cheng Z, et al. A living eukaryotic autocementation kit from surface display of silica binding peptides on *Yarrowia lipolytica*. ACS Synth Biol, 2016, 5(12): 1466-1474.

(本文责编 陈宏宇)