

碱性环境中的放线菌的生物学研究*

张永光¹ 李文均^{1,2} 张忠泽² 姜成林¹

(云南大学云南微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)¹

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110161)²

摘要: 碱性环境中存在有一些嗜碱放线菌 (*Alkalophilic actinomycetes*), 这些放线菌具有特殊的生理特征及代谢途径, 可产生多种碱性酶及生物活性物质。综述了近 20 年来嗜碱放线菌的分类学研究, 嗜碱菌的嗜碱机理, 应用方面的研究进展, 并展望了嗜碱放线菌的应用前景。

关键词: 嗜碱放线菌, 分类, 碱性酶

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0073-05

放线菌是抗生素的主要产生者, 同时也产生许多酶和酶抑制剂。目前已知的抗生素中, 70% 以上是由放线菌产生的^[1]。从普通环境中的放线菌中寻找新抗生素越来越困难, 于是人们把目光转向了极端环境放线菌。在高碱性环境中存在有一类放线菌, 我们称之为嗜碱放线菌。嗜碱放线菌是极端环境中的放线菌的一个特殊类群, 其可以产生多种碱性酶和生物活性物质, 如抗生素和酶的抑制剂。由于其产物的特殊性和广阔的应用前景, 引起了国际上许多微生物学者的广泛关注。

1 嗜碱菌的定义及嗜碱放线菌分布

到目前为止, 嗜碱菌还没有确切的定义。日本微生物学家 Horikoshi 把那些在 pH9 以上、在 pH10~12 之间最适或生长良好、但在 pH6.5 左右不能或仅能缓慢生长的微生物称为嗜碱菌^[2]。嗜碱放线菌的定义参照嗜碱菌的定义。嗜碱菌分为耐碱菌 (*Alkaline-tolerant alkaliphiles*) 和嗜碱菌 (*Alkaliphiles*), 嗜碱菌又分为兼性嗜碱菌 (*Facultative alkaliphiles*) 和专性嗜碱菌 (*Obligate alkaliphiles*)^[3]。嗜碱放线菌主要分布在高碱性环境, 如盐碱湖、碱湖、碱池。这些环境中的 pH 值都在 10 左右, 有时可高达 11.5 以上。在海水、碱性泉水、沙漠土壤、含有腐烂蛋白质的土壤和许多人为造成的碱性环境中, 也存在有嗜碱放线菌。

2 已描述的嗜碱放线菌的特点

在碱性环境中虽然含有一部分嗜碱放线菌, 但其中大部分为耐碱放线菌, 所以目前尚未报道真正的嗜碱放线菌新种, 而且有关嗜碱放线菌分类学研究的报道很少, 已有效发表的嗜碱放线菌实际为耐碱放线菌, 即新科 *Bogoriellaceae* fam. nov. 和 3 个新种 *Nocardiosis prasina* sp. nov., *Deutzia natronolimnaea* sp. nov. 和 *Dietzia psychrocaliphila* sp. nov.。

国外对嗜碱放线菌的研究大约始于 20 世纪 70 年代末至 80 年代初, 日本人最先开

* 云南省自然科学基金资助项目 (No.2000C0014M, No.2001C0001Q)

收稿日期: 2002-01-18, 修回日期: 2002-05-20

展这方面的研究。1982 年 Mikami 等从碱性土壤中分离到 20 株嗜碱放线菌 (最适生长 pH 9.0~9.5) 并比较了其细胞壁的 DAP 组成, 他们发现其中 9 株含有 meso-DAP^[4]。随后 Miyashita 等研究了一株嗜碱放线菌, 其最适生长 pH 9~10, 在 pH 6.5 不生长。胞壁 III 型, 但不含有特征性糖, 他们将其命名为 *Nocardiopsis dassonvillei* subsp., *prasina* subsp. nov.^[5]。1997 年, Yassia 等依据 16S rDNA 序列分析和 DNA-DNA 杂交结果, 将其定名为一个新种 *Nocardiopsis prasina* sp. nov.。

Groth 等从非洲的 Bogoria 盐碱湖中分离到了一个新属 (只含一个种) *Bogoriella caseilytica* gen. nov., sp. nov.。该菌不产生孢子, 杆状, 不游动, 不抗酸, 耐盐, 微需氧, 最适 pH 为 9~10, 胞壁肽聚糖为 A4 α 型, 主要甲基萘醌为 MK-8 (H₄), DNA 的 G + Cmol% 含量为 70mol%。依据多相分类结果, 表明其为一新属^[6]。2000 年 Stackebrandt 等依据 16S rDNA 把 *Bogoriella* gen. nov. 修正为 *Bogoriellaceae* fam. nov.。

Dietzia natronolimnaea sp. nov. 是从东非一中度盐碱湖分离到的嗜碱放线菌, 其在 pH 6~10 范围内生长, 最适 pH 为 9.0, 盐浓度为 0~10% (w/v)。这株菌与 *Dietzia maris* 的碳源利用类型和在碱性培养基中耐盐性相差极大, 依据多相分类结果, 将其命名为 *Dietzia natronolimnaea* sp. nov.^[7]。*Dietzia psychrhalcaliphila* sp. nov., 是由 Yumoto 等分离到的一株能够利用烃类物质的兼性嗜冷嗜碱放线菌。他们利用 n-链烷作为唯一碳源的合成培养基, 从鱼产品处理工厂的一鱼脑中分离到这株菌的。该菌在生长温度和一些生理特征方面与已知的 *Dietzia natronolimnaea* 和 *Dietzia maris* 不同, 依据多相分类结果, 将其命名为 *Dietzia sychrhalcaliphila* sp. nov.^[8]。

另外, 1997 年 Maltseva 等从美国俄勒冈附近碱湖中分离到一株微嗜盐碱菌 *Nocardio-ides* sp. M6 菌株, 它可以降解 2, 4, 6-三氯酚, 也可以利用 2, 4-二氯酚和 2, 4, 5-三氯酚。其最适生长 pH 为 9.0~9.4, Na⁺ 浓度为 0.2~0.4mol/L, 但其不是有效发表的嗜碱放线菌新种。

国内对嗜碱放线菌的分类研究开始于 20 世纪 80 年代中期, 目前报道的只有云南大学微生物所的姜成林等和河北大学的王来福、张利平等开展此项研究工作。1985 年姜成林等对从云南程海泥样中所分离到的 26 株耐碱小单孢菌 (最适 pH 9.0~10.0), 进行了形态和细胞壁组分分析, 结果其中 9 株同时含有 L-DAP 和 meso-DAP^[9]。1993 年姜成林等分析了从新疆、云南采集土样中所分离到的 39 株嗜碱放线菌 (最适 pH 9.0~10.0) 的生理生化、形态和化学分类特征, 并比较了嗜碱放线菌和非嗜碱放线菌的特征差异^[10]。1992 年王来福等从云南省祥云县采集了盐碱土样, 初步研究了嗜碱放线菌的分离方法, 并对所分离出的嗜碱放线菌进行了分类学研究。目前姜成林等正开展嗜碱放线菌分子生态研究。

3 嗜碱微生物的嗜碱机制

嗜碱菌生活在高碱环境中, 但研究发现其胞内 pH 值却维持在 8.0 左右。近几年来, 关于嗜碱菌嗜碱机制的研究报道有许多, 但因为目前所分离到的只是在碱性环境中的耐碱放线菌, 真正的嗜碱放线菌 (专性嗜碱放线菌) 还没有, 故此有关嗜碱放线菌嗜碱机制的报道还没有。

3.1 嗜碱菌的自动调节细胞质 pH 的机制 (1) 嗜碱菌的细胞壁具有酸性化合物^[2], 如半乳糖醛酸、葡萄糖酸、谷氨酸、磷酸, 这些化合物所带的负电荷可在细胞表面降低

pH 值。(2) 质膜可能通过反向载体 (antiporter) 系统, 如 Na^+/H^+ 、 K^+/H^+ 反向载体系统来维持胞内 pH 值的相对稳定。这是细胞质酸化的基本原因。质膜上的 Na^+/H^+ 反向载体系统能催化细胞向胞外排出 Na^+ , 并摄入因呼吸而排出胞外的 H^+ , 使 H^+ 积累于细胞质中, 以维持细胞质 pH 的相对稳定^[3]。目前许多研究证明 Na^+/H^+ 反向载体系统对于嗜碱菌获得嗜碱性和维持细胞质 pH 的衡稳性具有重要作用。

3.2 获得能量的机制 嗜碱菌能量的获得依赖于 $\Delta\mu\text{Na}^+$ (跨膜钠离子电化学梯度) 和 $\Delta\mu\text{H}^+$ (跨膜质子电化学梯度), 且对于 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 有一定的依赖性。嗜碱菌在呼吸过程中, 通过呼吸链向胞外泵出 H^+ , 从而建立起 $\Delta\mu\text{H}^+$, 催化 ATP 的合成。同时 Na^+/H^+ 反向载体将胞外 H^+ 不断摄入胞内, 胞内 Na^+ 不断排出胞外。嗜碱菌并利用 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 把胞外的溶质, 如氨基酸、有机酸主动运输到胞内^[3]。

嗜碱菌如何适应碱性环境是一个具有挑战性的问题, 这个问题需通过基因组分析来澄清。国外对嗜碱菌 *Bacillus halodurans* C-125 的全基因组测序已经完成, 并同中性菌 *Bacillus subtilis* 全基因组做了比较, 发现有 10 个属于胞外功能家族的 σ 因子 (the extra-cytoplasmic function family factors, ECF factors) 是 *Bacillus halodurans* C-125 所特有的。众所周知 ECF factors 广泛存在于许多细菌中, 它们控制着特殊分子、离子的吸收和分泌, 及细胞对胞外多种胁迫信号的反应。表明这 10 个 σ 因子可能在适应特殊的碱性环境中起作用^[11]。基因组分析是研究嗜碱机制的有效途径, 这还要基于更好地开展嗜碱菌的生理学、酶学和分子遗传学研究。

4 嗜碱放线菌的应用

嗜碱放线菌产生多种碱性酶和有生物活性的物质。到目前为止, 人们已发现嗜碱放线菌产生多种有工业用途的碱性酶, 还产生一些抗生素和酶抑制剂。

4.1 工业酶制剂 嗜碱放线菌产生的碱性酶主要有碱性蛋白酶、淀粉降解酶、纤维素酶、木聚糖酶和几丁质酶。其产生的碱性酶具有在高 pH 下稳定和高酶活等优点, 主要应用于去污剂工业、制革业、食品工业和造纸业。碱性蛋白酶已报道的有 *Thermoactinomyces* sp. HS682 产生的耐热碱性蛋白酶, *Streptomyces* sp. YSA-130 产生的胞外碱性丝氨酸蛋白酶, *Streptomyces pactum* DSM40530 和 *Nocardiopsis dassonvillei* OPC-210 产生的丝氨酸蛋白酶。碱性蛋白酶主要用于去污剂工业, 也可用于皮革脱毛。嗜冷嗜碱放线菌可产生一些低温下有高酶活的淀粉降解酶, 在食品工业中有广阔的应用前景。Kimura 等报道了一株嗜冷嗜碱放线菌 *Micrococcus* sp. strain 207, 可产生胞外淀粉酶和支链淀粉酶^[12]。也有人从 *Micrococcus* sp. Y-1 分离到了支链淀粉酶, 从 *Micrococcus halobius* OR-1 分离到了胞外淀粉酶和热稳定的支链淀粉酶。纤维素酶可作为洗涤剂的添加剂, 目前报道的有嗜碱放线菌 *Streptomyces* sp. KSM-9 产生的半碱性纤维素酶和嗜碱放线菌 *Streptomyces* sp. S36-2 产生的纤维素酶。 *Nocardiopsis prasina* OPC-131 可产生几丁质酶 A 和几丁质酶 B。

嗜碱放线菌产生的碱性酶的研究促进了与碱性酶有关的基础研究的发展, 特别是那些有重要工业应用价值的碱性酶, 从产酶条件、酶学特性、酶催化机理到基因水平, 微生物学者进行了深入研究。碱性酶结构与功能的研究对于中性酶的改造也具有重要意义。1997 年 Tsuchiya 等在研究了嗜碱高温放线菌 *Thermoactinomyces* sp. HS682 产生的耐热碱性蛋白酶酶学特性后, 克隆了该酶基因, 并在 *Escherichia coli* 中表达成功。嗜碱放线菌产生的木聚糖酶在造纸业有一定的开发应用潜力。1998 年 Garg 等对嗜碱放线菌

Streptomyces thermoviolaceus 产生的木聚糖酶在造纸工业上的应用做了深入研究,发现该酶在 65℃ 具有高酶活和热稳定等优点,同时可以提高纸质^[2]。这些研究为嗜碱放线菌碱性酶的研究和应用展示了更加广阔的前景。

4.2 抗生素和酶抑制剂 自从嗜碱微生物发现以来,世界上,尤其是日本许多制药公司用碱性培养基分离到了一些产生新抗生素的嗜碱放线菌。限于商业性质,许多研究没有公开报道。*Nocardiopsis dassonvillei* 菌株 OPC-15 在碱性培养基和不同培养温度下产生两种吩嗪类抗生素 I、III^[13]。该菌在 27℃ 培养 6~8d,产生 1, 6-二羟吩嗪 I,但该菌在 27℃ 培养 6d,然后在 4℃ 培养 2d,产生 3, 5-二氧-1, 6-二吩嗪 III。Bahn 等分离到一株可产生醛糖还原酶抑制剂 YUA001 的嗜碱放线菌 *Corynebacterium* sp. 菌株 YUA25-1^[14]。醛糖还原酶抑制剂 YUA00 可以推迟和防止几种糖尿病,对于治疗糖尿病有特殊疗效。此外,许多嗜碱链霉菌还能产生 β -内酰胺类抗生素、诺卡地霉素等抗生素^[15]。

4.3 环境保护及资源利用中的应用 嗜碱放线菌产生的碱性酶,可以用来处理工业生产过程中排出的大量碱性污水,如造纸工业废水和轻纺工业废水,不仅能减少对环境的污染,又可变废为宝。另外,嗜碱放线菌如嗜盐碱放线菌 *Nocardioides* sp. M6,可利用和分解环境中的某些污染物质。

5 展望

在生物技术开发利用方面,嗜碱放线菌具有巨大的开发潜力,特别是在碱性酶和抗生素方面。近几年来嗜碱放线菌的研究主要集中在获得新活性物质、分离新菌种。但嗜碱放线菌的研究中面临着一些难题,如菌种极易衰退;其产生的碱性酶有些为胞内酶,或其产量、酶活不太高;所产生的抗生素在碱性培养基中不稳定。这些问题的解决有待于嗜碱放线菌遗传体系的建立,以便鉴定出决定嗜碱性的基因及其产物,弄清这些基因表达的调控方式及其产物的结构与功能,进一步研究细胞膜和碱性酶稳定的分子基础。随着嗜碱放线菌嗜碱机制的阐明和生理学研究的深入,其将在生物技术中发挥越来越重要的作用。

目前日本、欧盟、美国等都在开展对嗜碱微生物全面深入的研究,特别是在利用其特殊产物方面的竞争,已形成国际趋势。而我国对于嗜碱放线菌的研究还处于起步阶段,特别是在开发利用方面。所以,系统深入地研究嗜碱放线菌的分类、嗜碱机制、生理学和次生代谢产物等已迫在眉睫,这对于如何利用和开发我国嗜碱放线菌资源具有重要的理论和实用意义。

参考文献

- [1] 山田晴宙. 生物工学会志, 1998, 76 (2): 58~81.
- [2] Horikoshi K. Micro Molec Biol Rev, 1999, 63 (4): 735~750.
- [3] Krulwich T A, Guffanti A A. Annu Rev Microbiol, 1989, 26: 663~677.
- [4] Mikami Y, Miyashita K, Arai T. J Gen Microbiol, 1982, 128 (8): 1709~1712.
- [5] Miyashita K, Mikami Y, Arai T. Int J Syst Bacteriol, 1984, 34 (4): 405~409.
- [6] Groth I, Schumann P, Rainey F A, et al. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47 (3): 788~794.
- [7] Duckworth A W, Grant S, Grant W D, et al. Extremophiles, 1998, 2 (3): 359~366.
- [8] Yumoto I, Nakamura A, Iwata H, et al. Int J Syst Bacteriol, 2002, 52 (1): 85~90.
- [9] 徐丽华, 姜成林. 微生物学报, 1985, 25 (3): 204~207.
- [10] Jiang C L, Xu L H, Yang Y R, et al. Actinomycetologica, 1993, 7 (2): 58~64.

- [11] Takami H, Nakasone K, Takaki Y, *et al.* Nucleic Acids Research, 2000, **28** (21): 4317 ~ 4331.
- [12] Kimura T, Horikoshi K. Agric Biol Chem, 1989, **53** (11): 2963 ~ 2968.
- [13] Tsujibo H, Sato T, Inui M, *et al.* Agric Biol Chem, 1988, **52** (2): 301 ~ 306.
- [14] Bahn Y S, Park J M, Bai D H, *et al.* J Antibiot, 1998, **51** (10): 902 ~ 907.
- [15] Kroll R G. Alkalophiles. In Edwards C (ed), Microbiology of Extreme Environments. New York: Open University Press, 1990, 55 ~ 92.