

嗜碱细菌研究进展

陈淑贞 郑连爽

(武汉大学生物系, 武汉)

嗜碱细菌 (alkalophilic bacteria) 是指那些适于在高碱性 pH 条件生长的细菌, 包括专性嗜碱细菌和兼性嗜碱细菌。专性嗜碱细菌的最适生长 pH > 10.0, pH 低于 8.5—9.0 时不能生长; 兼性嗜碱细菌的最适生长 pH \geq 10.0, 但在中性 pH 条件下亦能生长^[1]。嗜碱细菌常出现在天然或人为的高碱环境中, 但是在中性或酸性环境中也有分布。已经分离到的嗜碱细菌中, 大多数为好氧菌, 分类上多数属于芽胞杆菌属 (*Bacillus*)^[2]。

嗜碱细菌作为一类新型微生物资源, 近年来受到人们的广泛关注。嗜碱细菌的研究既有理论意义, 又有应用价值。在理论研究方面, 人们对其嗜碱机理尤感兴趣; 在应用方面, 引人注目的是嗜碱细菌的碱稳定性胞外酶。

(一) 嗜碱机理

1. Na^+/H^+ 反向载体维持细胞质 pH 处于正常生理范围: 嗜碱细菌最为突出的生理特征是能在高碱环境中正常生长。实际测定表明, 在 pH 10—11.0 条件下生长的嗜碱细菌, 其细胞质 pH 不超过 9.5。这表明嗜碱细菌能建立起一个逆向的跨膜质子梯度 (ΔpH), 以维持其细胞质 pH 的相对衡稳^[3]。

一系列试验证实, 嗜碱细菌细胞膜上的 Na^+/H^+ 反向载体在调节细胞质 pH 方面起着关键作用。这一载体催化细胞排出 Na^+ 和摄入 H^+ 的离子交换过程, 使 H^+ 净积累于细胞质中, 以保证细胞质的 pH 相对衡稳。 Na^+/H^+ 反向载体有两个基本特征: (1) 对 Na^+ 有专一性; (2) 由呼吸作用供能。

嗜碱细菌对 Na^+ 的需要, 在 pH 跳跃试验中得到最充分的证实, Krulwich 等人^[4]将一种嗜碱细菌细胞首先在 pH 8.5 的介质中平衡, 然后迅速将 pH 调到 10.5。若介质中不含 Na^+ , 细

胞质 pH 就会立即上升到 10.5; 若介质中有一定浓度的 Na^+ , 细胞质 pH 则不超过 9.0。嗜碱细菌对 Na^+ 的依赖性实质上是 Na^+/H^+ 反向载体对 Na^+ 的专一性, 除 Li^+ 外, K^+ , NH_4^+ 等阳离子不能与 Na^+ 竞争同一载体^[5]。专性嗜碱细菌 *B. alcalophilus* 和 *B. firmus* RAB 细胞的 Na^+/H^+ 反向载体对 Na^+ 有不同的 K_m 值, 后者对 Na^+ 的亲性和比前者低得多, 因而, *B. firmus* RAB 的生长需要较高浓度的 Na^+ ^[6]。

和其它细菌一样, 嗜碱细菌细胞通过呼吸链向胞外泵出质子。不同的是嗜碱细菌随后通过 Na^+/H^+ 反向载体进行 Na^+/H^+ 交换, 其结果一方面使质子净积累于细胞质中, 另一方面使呼吸过程中形成的跨膜质子电化学梯度 (ΔpH^+) 部分转化为跨膜钠离子电化学梯度 (ΔpNa^+)。缬氨霉素和氰化物均能抑制嗜碱细菌细胞中 Na^+ 外流, 表明 Na^+/H^+ 反向运输所需的能量来源于呼吸作用, 因此, Na^+/H^+ 反向载体实际上是一种电致的 (electrogenic) 次级载体^[3,7], ATP 能作为 Na^+/H^+ 反向载体的能源, 但是, ATP 首先需要水解, 再经转换成膜电位 ($\Delta\phi$) 后, 才能实现供能^[8]。在一定范围内, Na^+/H^+ 反向载体的活性与 $\Delta\phi$ 的大小有线性关系, H^+/Na^+ 交换率大于 1^[9]。

Na^+/H^+ 反向载体蛋白至今还没有得到纯化和鉴定。Koyama 等^[9]将兼性嗜碱芽胞杆菌 YN-2 分别在 pH 7.5 和 10.5 的条件下培养, 然后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测膜蛋白, 发现在 pH 10.5 条件下多三个膜蛋白带。*B. firmus* RAB 的一变株生长所需的 Na^+ 浓度比亲株低, 似乎是 Na^+/H^+ 反向运输能力有所提高, 比较两者膜蛋白的电泳图谱, 发现分子量为 95000 的膜蛋白带在变株图谱中有所加宽, 推测这种膜蛋白可能与 Na^+/H^+ 反向载体有

关^[10]。

2. Na^+ /溶质同向载体输送溶质进入细胞: 由于 Na^+ / H^+ 反向载体不断向细胞外排出 Na^+ , 其结果使嗜碱细菌细胞建立起一个向内的 $\Delta\mu\text{Na}^+$, 这种 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 可以为细胞摄入溶质提供能量。实验证实, 在嗜碱细菌细胞膜上存在着的一类 Na^+ /溶质同向载体, 这类载体利用 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 进行氨基酸、有机酸和部分离子的主动运输, 值得注意的是 Li^+ 不能替代 Na^+ , 这与 Na^+ / H^+ 反向载体显然不同^[11]。

Na^+ /溶质同向载体在维持细胞质 pH 稳衡方面的作用也得到证实。 α -氨基异丁酸(AIB)是一种非代谢氨基酸类似物, 当实验介质中加入 AIB 后, 能有效地增强嗜碱细菌维持细胞质 pH 稳衡的能力, 并能明显降低嗜碱细菌维持其细胞质 pH 稳衡所需的 Na^+ 浓度^[1]。对这一现象的解释如下: AIB 虽然不能为细胞提供能量, 却能偶联在 Na^+ /溶质同向载体上, 促进被 Na^+ / H^+ 反向载体排出的 Na^+ 返回细胞, 从而保证了 Na^+ 循环的连续性和 Na^+ / H^+ 反向载体的正常运转。

非嗜碱突变株丧失了与 Na^+ 偶联相关的全部功能, 这种突变株也进行主动运输, 而且似乎是利用与亲株相同的载体, 不过此时这类载体是与质子偶联而不与 Na^+ 偶联^[12]。由于嗜碱细菌的 Na^+ /溶质同向载体至今还没有得到纯化, 因此, 上述偶联功能变化的分子基础还是一个谜。

3. 依赖于 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 的运动: 与部分溶质的主动运输一样, 嗜碱细菌的运动也依赖于 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 。 Li^+ 不能替代 Na^+ , 莫能霉素对运动有很强的抑制作用^[13]。测定表明, 嗜碱细菌细胞运动的阈值为 -100mV , 当介质中 Na^+ 浓度为 100mmol/L 时, 细胞内的 Na^+ 浓度为 30mmol/L , 细胞的 $\Delta\psi$ 为 -170mV ^[14]。由此可知, $\Delta\mu\text{Na}^+$ 在嗜碱细菌的细胞中确实存在, 并且足以驱动细胞的运动。

B. firmus RAB 的鞭毛已经得到纯化, 鞭毛亚单位的分子量为 40 000, 与中性细菌的鞭毛相比, 嗜碱细菌鞭毛蛋白中碱性氨基酸含量

较低^[15]。目前还不清楚这种 Na^+ 型鞭毛与 H^+ 型鞭毛结构上的区别, 也难以确定是 Na^+ 真正替代了质子, 还是 Na^+ 启动某种微循环, 继而驱使质子与鞭毛相互作用。

4. 依赖于 $\Delta\mu\text{H}^+$ 的 ATP 合成: 在最适 pH 条件下生长的嗜碱细菌, 由于逆向 ΔpH 的影响, 其细胞的 $\Delta\mu\text{H}^+$ 很低, 一般只有 -60mV 左右^[2], 这与细胞经 $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ 合成 ATP 所需的磷酸化电位(ΔGP)相差甚远(ΔGP 值一般为 $-420\text{—}480\text{mV}$), 而实际测得细胞内 ATP 水平并不低于中性细菌。那么, 嗜碱细菌是通过什么方式来弥合 $\Delta\mu\text{H}^+$ 与 ΔGP 数量上的差距呢? 至少有以下四种可能性需要探讨:

(1) 嗜碱细菌细胞内有供 ATP 合成的特殊细胞器。

(2) 由 $\Delta\mu\text{Na}^+$ 供给 ATP 合成的能量。

(3) 通过向细胞内转移较多的低 $\Delta\mu\text{H}^+$ 质子合成 ATP, 即提高 H^+ /ATP 比率。

(4) $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ 直接利用呼吸链组分传递的高 $\Delta\mu\text{H}^+$ 质子, 催化 ATP 合成。

通过不同研究者多年的努力, 前三种可能性已基本被排除, 第四种可能性则被大多数研究者认可。嗜碱细菌细胞膜中的可溶性 $\text{F}_1\text{-ATPase}$ 已经被纯化, 并且证实的确是一种依赖于 $\Delta\mu\text{H}^+$ 的 ATP 合成酶^[16]。最近, Krulwich 等^[2]提出了一个平行偶联(Parallel coupling)模型, 可以用来阐明嗜碱细菌合成 ATP 的机理。这一模型认为在嗜碱细菌的 $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ 上存在着一些质子结合残基, 经呼吸链组分传递的质子, 一部分被泵到细胞外, 建立起细胞的 $\Delta\mu\text{H}^+$, 这种 $\Delta\mu\text{H}^+$ 值很低, 不能直接作为 ATP 合成的能源, 但在阻止胞内质子向胞外渗漏方面起重要作用; 另一部分则通过呼吸链组分与 $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$ 的碰撞直接传递到后者的质子结合残基上, 这部分质子具有较高的 $\Delta\mu\text{H}^+$, 能满足 ATP 合成的能量需要。同时, 嗜碱细菌的 Na^+ / H^+ 反向载体也以同样的方式获得高 $\Delta\mu\text{H}^+$ 的质子。嗜碱细菌细胞膜中呼吸链组分多样且含量高, 细胞膜的膜脂/蛋白

质比率高且流动性大,这些都有利于膜中相关组分发生碰撞。

与中性细菌相比,嗜碱细菌由于 Na^+/H^+ 反向载体依赖于 $\Delta\mu\text{H}^+$ 而要求其呼吸链能更有效地进行能量转换。 H^+/O 比值可以作为呼吸链功能的一个直接指标,实际测定表明,在 pH9.0 时, *B. firmus* RAB 的 H^+/O 值高达 13,但是在 pH7.0 时, H^+/O 值却非常低,这说明嗜碱细菌的呼吸链在碱性条件下能更有效地运转^[17]。

(二) 应用

1. 胞外酶的工业应用: 在已经研究过的嗜碱细菌胞外酶中,大多数酶为碱性酶,这是嗜碱细菌胞外酶最明显的特性。碱性酶在某些工业领域独占鳌头,如作为洗涤添加剂的蛋白酶,要求酶在碱性条件下保持稳定和活性,并且其活性不受表面活性剂和助剂的影响。嗜碱芽孢杆菌 AH-101 产生的碱性蛋白酶能在 pH13.0 的条件下保持最大活性,而且其活性不受 EDTA 和 SDS 的影响,较好地满足了上述要求^[18]。

在日本,嗜碱芽孢杆菌 No.38-2 产生的环状糊精葡萄糖基转移酶 (CGTase) 已经用于工业生产,酶法生产的环状糊精也被批准在食品中使用^[19]。与其它来源的 CGTase 相比, No.38-2CGTase 在以下三个方面更能满足工业生产的需要:

(1) 酶在 pH 4.9—9.0 范围内都保持很高的活性,并且对热稳定。

(2) 酶反应产物中主要含 β -环状糊精,容易分离和结晶,无须用任何有机沉淀剂。

(3) 环状糊精得率高。

木聚糖是一种比较容易被酶降解的植物组分,可以作为生物转化的原料。由于木聚糖易溶于碱液而难溶于水,因而开发碱性木聚糖酶就显得尤为重要。目前已经发现许多嗜碱细菌都产生碱性木聚糖酶,其中,嗜碱芽孢杆菌 C-125 的木聚糖酶 A 基因已经克隆到大肠杆菌中,由于受体菌中木聚糖酶 A 的表达不需诱导,并能分泌到细胞外,因而具有潜在的工业应用价值^[2]。

嗜碱细菌胞外酶的应用促进了基础研究的发展,对许多有工业应用价值的胞外酶不仅进行了产酶条件、酶反应动力学和酶催化机理方面的研究,而且已深入到基因水平。目前,嗜碱细菌的纤维素酶、木聚糖酶、淀粉酶、环状糊精葡萄糖基转移酶、 β -甘露聚糖酶、青霉素酶均已在中性细菌中得到克隆和表达,这就为嗜碱细菌胞外酶的研究和应用展示了更加广阔的前景。

2. 环境保护方面的应用: 选用嗜碱细菌处理碱性废液不仅经济、简便,而且可变废为宝。已经有关于利用嗜碱细菌将碱性纸浆废液转化成单细胞蛋白的报道^[20]。此外,嗜碱细菌亦有望用于化工、纺织工业中某些废液的处理。

利用嗜碱细菌或其碱性胞外酶降解天然多聚物的能力,对植物纤维加工中的碱降解工艺进行改造,可以大大降低污染。在造纸工业中,当用嗜碱细菌制浆替代传统的碱法制浆工艺时,既能提高纸的质量,又能减轻污染^[21]。在麻纺行业,亦可选用适宜的嗜碱细菌或其碱性胞外酶进行苧麻脱胶,解决碱法脱胶工艺中污染严重的难题。

3. 在基因工程上的应用: 嗜碱细菌的基因可以用来调节其它细菌中基因产物的表达和分泌。Kudo 等^[22]从一株嗜碱芽孢杆菌中得到一种遗传成分,这种成分可以作为质粒 pGR71 编码的氯霉素乙酰转移酶基因 (cat) 的启动子。将这种遗传成分克隆到枯草杆菌中后, cat 基因的表达受受体菌株发育的调节,仅在孢子形成期表达。

嗜碱芽孢杆菌 No.170 的青霉素基因已经重组到质粒 pMB9 上,当用重组质粒转化大肠杆菌时,受体菌株能大量产生青霉素酶,并有 90% 左右的酶被分泌到胞外^[23]。酶的分泌是由质粒 pMB 9 上的 kil 基因被激活引起的,当 No.170 的青霉素酶基因插入到载体上时,碰巧激活了载体中休眠的 kil 基因, kil 基因负责大肠杆菌素 EI 的释放,其基因产物(kil肽)能改变大肠杆菌细胞外膜的透性,从而使克隆的青霉素酶也释放到胞外^[23]。基于同样原

理,相继使人生长激素和人免疫球蛋白 G-Fc 片段基因在大肠杆菌中得到表达和分泌^[24,25]。

嗜碱细菌的研究近年来虽然取得了重大进展,但是,有关嗜碱机理的几个关键问题仍有待于进一步摸索,如专性嗜碱菌为什么不能在中性 pH 条件下生长;除 Na⁺ 外,细胞质 pH 的调节是否需要其它离子的参与;细胞膜中呼吸链组分与相关蛋白质间质子的直接传递是否确实存在,非嗜碱突变为什会产生多重表型效应;为什么一些嗜碱菌有较高的突变率。要最终解决这些问题,很有必要建立起一个嗜碱细菌的遗传体系,以便鉴定出决定菌体嗜碱性的基因和基因产物,弄清这些基因表达的调节方式和基因产物的结构与功能。此外,还需进一步研究嗜碱细菌细胞膜和胞外酶碱稳定性的分子基础。

嗜碱细菌的研究在我国也取得一定进展。一种嗜碱芽胞杆菌的启动子已克隆到大肠杆菌中并得到表达^[26]。嗜碱细菌 CGTase 和果胶酶的研究也有报导^[27,28]。利用嗜碱细菌进行苧麻脱胶,已经可以用于工业化生产。理所当然,今后还需加强基础研究,拓宽应用领域。

参 考 文 献

1. Krulwich TA and AA Guffanti: *Adv. Microbiol. Physiol.*, **24**: 173—214, 1983.
2. Krulwich TA and AA Guffanti: *Ann. Rev. Microbiol.*, **43**: 435—463, 1989.
3. Krulwich TA: *J. Membr. Biol.*, **89**: 113—125, 1986.
4. Krulwich TA et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**: 4055—4058, 1985.
5. Garcia ML et al.: *J. Bacteriol.*, **156**: 1151—1157, 1983.
6. Krulwich TA et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**: 1885—1889, 1982.
7. Kitada M et al.: *J. Bacteriol.*, **171**: 1879—1884, 1989.
8. Guffanti AA: *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**: 307—310, 1983.
9. Koyama N et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**: 214—216, 1983.
10. Krulwich TA et al.: *J. Bacteriol.*, **165**: 884—889, 1986.
11. Krulwich TA and AA Guffanti: *J. Bioenerg. Biomemb.*, **26**: 663—677, 1989.
12. Guffanti AA et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 1481—1484, 1981.
13. Hirota N et al.: *FEBS Lett.*, **132**: 278—280, 1981.
14. Hirota N and Y Imae: *J. Biol. Chem.*, **258**: 10577—10581, 1983.
15. Guffanti AA and HC Eisentein: *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 3239—3242, 1983.
16. Hicks DB and TA Krulwich: *J. Biol. Chem.*, **261**: 12896—12902, 1986.
17. Lewis RT et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**: 2109—2111, 1983.
18. Takami H et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**: 120—124, 1989.
19. Horikoshi K and T Akiba: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan Science Societies Press, Tokyo, 1982.
20. 中村政雄: *科学 & 实验*, **5**: 35—37, 1982.
21. Kudo T et al.: *J. Bacteriol.*, **161**: 158—163, 1985.
22. Kato C et al.: *Emr. J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**: 339—343, 1983.
23. Kobayashi T et al.: *J. Bacteriol.*, **166**: 728—731, 1986.
24. Kato C et al.: *Gene*, **54**: 197—202, 1987.
25. Kitai K et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**: 52—56, 1988.
26. 陈永青,宋大新: *微生物学报*, **27**: 322—328, 1987.
27. 谈家林等: *微生物学报*, **24**: 80—85, 1985.
28. 黄诗笈等: *武汉大学学报(自然科学版)*, **1**: 105—110, 1988.