



# 极端微生物及其应用研究进展

庄滢潭<sup>1,2,3†</sup>, 刘芮存<sup>1†</sup>, 陈雨露<sup>1</sup>, 杨岑玥<sup>4</sup>, 余岩<sup>4</sup>, 王涛<sup>5</sup>, 王友亮<sup>6</sup>, 宋亚军<sup>1</sup>, 滕越<sup>1\*</sup>

1. 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071;

2. 山东中医药大学药学院, 济南 250300;

3. 山东大学基础医学院, 济南 250100;

4. 四川大学生命科学学院, 成都 610064;

5. 天津大学生命科学学院, 天津 300110;

6. 军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100071

† 同等贡献

\* 联系人, E-mail: yueteng@me.com

收稿日期: 2021-04-12; 接受日期: 2021-08-03; 网络版发表日期: 2021-09-14

**摘要** 极端微生物是指在高/低温、高/低pH、高盐、高压等极端环境条件下生存的微生物. 特殊的生存条件导致其具有特殊的遗传背景和代谢途径, 并可产生功能特殊的酶类和活性物质. 随着系统生物学和合成生物学技术的发展, 极端微生物作为一类特殊的微生物群体, 在生物医疗、生物能源和生物材料等领域具有巨大的应用潜力. 极端微生物相关研究也对生命起源与演化、生物工程技术等领域的发展具有重大意义. 本文对极端环境及极端微生物的概念和分类进行了回顾, 综述了极端微生物在不同环境条件下的适应机制及其酶的应用, 并介绍了合成生物学在极端微生物研究中的应用情况. 此外, 由于极端微生物和极端酶的特殊性和高效性, 本文还探讨了极端微生物开发过程中的挑战, 以及其在航空航天与国防安全领域的综合应用潜力, 并指出了相关研究的必要性.

**关键词** 极端微生物, 极端酶, 极端环境, 适应机制, 合成生物学

极端微生物是指在极端环境条件下繁衍生息的微生物<sup>[1]</sup>, 嗜好高碱性、高酸性或高盐类等环境, 甚至能够在近沸点的高温或近冰点的低温以及在含金属或放射性物质的环境中生存<sup>[2]</sup>. 根据其所生存极端环境的不同, 可将目前已知的主要极端微生物分为嗜冷微生物(psychrophiles)(最适生长温度 $\leq 15^{\circ}\text{C}$ , 最高生长温度 $< 20^{\circ}\text{C}$ )、嗜热微生物(thermophiles)(最适生长温度为 $45\sim 80^{\circ}\text{C}$ )、超嗜热微生物(最适生长温度 $\geq 80^{\circ}\text{C}$ , 甚至可以在 $90^{\circ}\text{C}$ 以上生长)、嗜酸微生物(acidophiles)(最适生长 $\text{pH} \leq 3$ )、嗜碱微生物(alkaliphiles)(最适生长 $\text{pH} \geq 9$ ,

通常在 $\text{pH } 10\sim 12$ 之间生长)、嗜盐微生物(halophilic microorganisms)(适宜在高NaCl条件下生长,  $\text{NaCl} > 0.2 \text{ mol/L}$ )、嗜旱微生物(最适生长条件为水分活度(water activity,  $a_w$ ) $< 0.85$ )、嗜压微生物(适宜在高压 $\geq 50 \text{ MPa}$ 条件下生长)等类型. 其中, 本身能够耐受高辐射以及重金属等极端条件, 但此类条件并非其最适生长所需的一类极端微生物被称为极端耐受菌(或称极端抗性菌). 尤其是有些极端微生物可同时耐受多种类型的极端条件, 称为聚嗜极生物(polyextremophile), 又称多重嗜极生物<sup>[3]</sup>. 分类学研究表明, 绝大多数极端

引用格式: 庄滢潭, 刘芮存, 陈雨露, 等. 极端微生物及其应用研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 204–222

Zhuang Y T, Liu R C, Chen Y L, et al. Extremophiles and their applications (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 204–222, doi: 10.1360/SSV-2021-0096

微生物属于古细菌和真细菌,也有多种单细胞和多细胞真核生物的报道<sup>[4]</sup>.

极端微生物所产生的极端酶可在苛刻工业条件下起作用,部分极端酶已应用于各种工业过程.另外,作为极端微生物应对极端环境的重要适应机制之一的相容性溶质也被广泛应用,例如被用于制备抗癌药物和细胞周期阻断剂等<sup>[5]</sup>.从极端微生物中还发现了大量其他具有药学作用和营养功能的生物活性物质,例如从南极链霉菌*Streptomyces griseus* NTK 97代谢产物中分离的新型抗生素frigocyclinone以及从高温放线菌*Thermoactinomyces antibioticus*中分离的热红菌素(thermorubin)等<sup>[6]</sup>.除了这些生物活性物质外,极端微生物也是工业化学品的来源,如有机酸、脂类、类胡萝卜素、胞外多糖等<sup>[7]</sup>.极端微生物具有独特的代谢途径和结构以保证其在极端环境下进行生存繁殖,主要极端微生物的代谢途径与关键酶活性(异养微生物)如表1<sup>[8-38]</sup>所示.

合成生物学可设计并构建基于合成遗传回路和通路的新高潜力生物系统,由于极端微生物具有特殊的代谢途径,以其为底盘生物,设计和构建生物合成途径,可为解决人类面临的资源、能源和环境等问题提供新方向,同时也为工农业生产中的生物防治以及药物筛选提供重要参考.极端微生物相关研究不仅关系到生命的起源与演化,对生物工程技术等领域的发展也具有重大意义.本文首先依次介绍了不同极端微生物的概念、极端微生物对极端环境的适应机制以及极端微生物及其酶的应用;然后介绍了利用合成生物学技术开发极端微生物的最新研究进展;最后探讨了在寻找和开发极端微生物过程中面临的挑战,以及极端微生物在太空与国防领域的综合应用潜力.

## 1 嗜热微生物

### 1.1 嗜热微生物的定义及分布

嗜热微生物是指能在41~122℃下生长,最适生长温度为45~80℃的微生物,其所分布的嗜热生态环境包括火山和地热区(陆地、地下和海洋热泉)、温泉、堆肥、储油库等地球上的高温极端地区.嗜热微生物通常可分为中度嗜热菌(moderate thermophiles)(最适温度:45~60℃)、极端嗜热菌(extreme thermophiles)(最适温度:60~80℃)和超嗜热菌(hyperthermophiles)

(最适温度:80~110℃)<sup>[39]</sup>.嗜热微生物分布于真核生物、细菌和古菌域,其中大多数嗜热微生物属于细菌和古菌.一般来说,中度嗜热菌主要是细菌,而超嗜热菌多为古菌.据报道,嗜热细菌起源于中温环境,后期移居至高温环境,而嗜热古菌则起源于高温环境<sup>[40]</sup>.嗜热菌主要分布于硫化杆菌属、铁质菌属、金属球菌属、硫化叶菌属、灼热球菌属等.例如,已发现的甲烷嗜热菌*Methanopyrus kandleri* 116可以在122℃下生长<sup>[41]</sup>.

### 1.2 嗜热微生物的适应机制

(1) 细胞膜水平.嗜热细菌主要通过改变磷脂成分来调节膜流动性,例如增加支链异脂肪酸、长链脂肪酸和饱和脂肪酸的含量.嗜热古菌的细胞膜类脂含有饱和的类异戊二烯链,通过醚键而不是像真核生物或细菌通过酯键与甘油主链相连<sup>[42]</sup>.在嗜热古菌中还发现单分子层膜结构,该结构可提高细胞膜机械强度,降低膜流动性<sup>[43]</sup>.

(2) 基因组水平.超嗜热细菌和古菌具有特异性的逆促旋酶,能诱导脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)形成正性超螺旋,在高温下维持双链螺旋结构<sup>[44]</sup>.部分小分子DNA结合蛋白通过与染色质结合来提高DNA的解链温度,维持其结构稳定.例如,来自嗜热硫磺硫化叶菌*Sulfolobus acidocaldarius*的DNA结合蛋白Sso7d和Sac7d可提高DNA的热稳定性<sup>[45]</sup>.转运RNA(transfer ribonucleic acid, tRNA)和核糖体RNA(ribosomal ribonucleic acid, rRNA)的高GC含量支持嗜热菌高效翻译蛋白质,以维持在高温下的正常功能<sup>[46]</sup>.

(3) 蛋白质水平.在氨基酸组成上,嗜热菌蛋白质中的赖氨酸、精氨酸和谷氨酸等极性带电荷氨基酸残基比例升高,谷氨酰胺、天冬酰胺、苏氨酸和丝氨酸等极性不带电荷氨基酸残基比例降低<sup>[47]</sup>.2003年,Farias和Bonato<sup>[47]</sup>的研究将(谷氨酸+赖氨酸)/(谷氨酰胺+组氨酸)的比值作为蛋白质热稳定性的指标.此外,蛋白质组学分析显示,嗜热蛋白的丝氨酸、甘氨酸、赖氨酸和天冬氨酸通常被苏氨酸、丙氨酸、精氨酸和谷氨酸取代<sup>[48]</sup>,该替换可增加内核疏水性,降低分子表面疏水性,从而提高嗜热蛋白的稳定性.嗜热菌还通过提高 $\alpha$ -螺旋结构的稳定性、增强氢键、离子键、二硫键和疏水相互作用以及利用糖基化、磷酸化等翻译后修饰来提高嗜热蛋白的耐热性和稳定性<sup>[49,50]</sup>.

表 1 极端条件下异养微生物的代谢途径和关键酶活性

Table 1 Metabolic pathways and key enzyme activities of heterotrophic microorganisms under extreme conditions

| 种类      | 最佳生长条件                     | 代谢途径(中心代谢 <sup>a)</sup> )                        | 酶活性(肽/氨基酸 <sup>b)</sup> )                                                     | 参考文献    |
|---------|----------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 嗜酸微生物   | pH≤3                       | 细菌: EMP、ED和PP途径(根据生长环境使用不同的代谢途径); TCA循环(部分细菌不完整) | 大多数参与途径中氨基酸的合成基因已被鉴定                                                          | [8~10]  |
| 嗜碱微生物   | pH≥9                       | 古菌: EMP途径(经过修饰并且只存在于部分古菌)和ED途径(主要)               | 特征蛋白酶和肽酶以及蛋白质降解的完整途径                                                          |         |
| 嗜热微生物   | 60~80℃                     | 细菌: EMP途径(主要)、ED和PP途径; TCA循环(部分细菌不完整)            | 除丝氨酸降解途径外, 发现氨基酸代谢的特征蛋白酶和基因                                                   | [11~13] |
| 嗜热微生物   | 60~80℃                     | 细菌: EMP途径(主要)、ED(仅存在于部分细菌中)和PP途径(缺乏氧化部分); TCA循环  | 表征了蛋白酶、肽酶, 检测到氨基酸降解途径的典型酶类的基因                                                 | [14~16] |
| 嗜热微生物   | 60~80℃                     | 古菌: EMP途径(修饰, 主要)、ED(只在部分古菌中存在)和PP途径; TCA循环      | 表征了蛋白酶, 参与氨基酸分解代谢途径的基因已被鉴定                                                    |         |
| 超嗜热微生物  | ≥80℃                       | 细菌: EMP途径(修饰, 主要), ED(只在部分细菌中存在)和PP途径; TCA循环     | 表征了蛋白酶                                                                        |         |
| 超嗜热微生物  | ≥80℃                       | 古菌: EMP途径(修饰, 主要)、ED(只在部分古菌中存在)和PP途径; TCA循环      | 表征了丝氨酸蛋白酶和吡咯烷酮羧肽酶, 所有氨基酸降解的基因已被鉴定                                             | [17~19] |
| 嗜冷微生物   | 最适生长温度≤15℃, 最高生长温度<20℃     | 细菌: EMP途径(主要)、ED和PP途径; TCA循环                     | 表征了丝氨酸蛋白酶、肽酶和金属蛋白酶, 参与氨基酸降解的基因已被鉴定                                            |         |
| 嗜冷微生物   | 最适生长温度≤15℃, 最高生长温度<20℃     | 古菌: EMP途径(主要)、ED和PP途径; TCA循环(部分不完整)              | 表征了金属蛋白酶, 参与20种氨基酸降解途径的基因已被鉴定                                                 | [20~22] |
| 嗜盐微生物   | NaCl >0.2mol/L             | 细菌: EMP途径(糖酵解途径, 部分利用)、ED(主要)和PP途径; TCA循环        | 表征了蛋白酶, 鉴定了编码转氨酶的基因, 表征了丝氨酸蛋白酶, 发现了参与氨基酸降解途径, 包括间苯二甲酸途径的基因, 但有部分细菌不能合成8种以上氨基酸 | [23~26] |
| 嗜盐微生物   | NaCl >0.2mol/L             | 古菌: EMP途径(修饰), ED(修饰)和PP途径; TCA循环                |                                                                               |         |
| 嗜高渗微生物  | 高浓度有机溶质和糖                  | 真核生物: EMP途径(主要)和PP途径; TCA循环                      | 表征了碱性蛋白酶                                                                      |         |
| 嗜高渗微生物  | 高浓度有机溶质和糖                  | 细菌: EMP途径、ED途径(主要)、PP途径(仅部分存在); TCA循环(部分不完整)     | 鉴定了参与包括氨基酸脱氢酶和氧化酶在内的氨基酸完全降解途径的基因                                              | [27~29] |
| 嗜旱微生物   | a <sub>w</sub> <0.85       | EMP途径(主要)、ED和PP途径                                | —                                                                             | [30,31] |
| 嗜压微生物   | ≥50 MPa (专性嗜压菌)            | 细菌: EMP途径; TCA循环(不完整)                            | 在基因组中检测到多达46种蛋白酶和肽酶, 预测这些物种可以降解多种底物                                           | [32,33] |
| 耐辐射微生物  | 耐高辐射 抗辐射剂量≥1 kGy           | 细菌: EMP途径(不使用, 但发现其中关键酶)、ED和PP途径; TCA循环          | 不能利用氨作为氮源, 完全依赖外源氨基酸作为氮源, 赖氨酸、丝氨酸和半胱氨酸的生物合成途径不完整, 但能够在这三种氨基酸中生长, 氨基酸降解途径完整    | [34~36] |
| 耐辐射微生物  | 耐高辐射 抗辐射剂量≥1 kGy           | 古菌: EMP途径(主要)和PP途径; TCA循环                        | 异亮氨酸、脯氨酸、精氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸生物合成途径的基因缺失                                          |         |
| 耐重金属微生物 | 耐高浓度重金属, 耐受重金属浓度 >1 mmol/L | 细菌: 在低碳环境中发现, 细菌为自养型                             | —                                                                             | [37,38] |

a) 中心代谢的主要代谢途径, 主要是通过酶活性的测定和具有代表性的极端微生物基因组序列分析得到. b) 数据主要通过酶测定和基因组序列的基因鉴定获得, 这些基因参与了相应的极端微生物中的氨基酸代谢. EMP(Embden-Meyerhof-Parnas)途径: 糖酵解途径. ED(Entner-Doudoroff)途径: 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖裂解途径. PP(pentose phosphate)途径: 戊糖磷酸途径. TCA(tricarboxylic acid)循环: 三羧酸循环

1.3 酶及其应用

尽管中温微生物也能产生热稳定酶, 甚至嗜冷微生物也可产生部分热稳定酶, 但是嗜热微生物所产生

的热稳定酶具有更高的热稳定性, 更适用于工业. 由于高温能够提升底物的溶解度, 使环境黏度降低而加速其扩散, 并且高温还可降低中温或嗜冷微生物污染的风险, 有助于控制工艺, 提高产品收率, 因此嗜热微

生物产生的热稳定酶在生物技术工业中具有广泛的应用前景, 在食品、化工、制药、造纸、纸浆和废物处理等工业中发挥着重要作用. 例如, 2009年Royter等人<sup>[51]</sup>报道来自热硫化氢高温厌氧杆菌*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1的热稳定酯酶对于仲醇酯具有较高的偏好性, 以及对药物相关底物的R-对映体具有较高的选择性, 该酶在高温下具有活性且能够抵抗有机溶剂, 因此它可作为生物转化领域非水相介质应用的候选酶. 2012年, Gurumurthy等人<sup>[52]</sup>报道从温泉中分离出的嗜热土芽孢杆菌*Geobacillus* sp. Iso5能产生在140℃下具有最佳酶活性的高耐热 $\alpha$ -淀粉酶, 可应用于生物炼制产业中. 利用嗜热菌*Geobacillus* sp. R7产生的耐热纤维素酶处理生物质, 水解产物经酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24860<sup>T</sup>发酵后, 每1 g葡萄糖可产生0.45~0.50 g乙醇, 葡萄糖利用率为99%<sup>[53]</sup>. 2017年, Mechelke等人<sup>[54]</sup>从沼气反应器中分离出来的嗜热菌——解半纤维植雪菌(*Herbinix hemi-cellulosilytica*)能产生六种嗜热木聚糖酶, 可被应用于高温下纤维素和木制品的加工. 利用经过预处理的木质纤维素生物质和嗜热菌的联合生物加工(consolidated bioprocessing, CBP)效果更好, 成本更低<sup>[55]</sup>. 一类芦竹根茎木质纤维素生物质联合生物加工方案如图1所示. 除产生热稳定酶外, 嗜热微生物是耐热性胞外多

糖的重要来源. 嗜热菌合成的热稳定性胞外多糖可以在较高温度下作为食品制剂和美容霜乳液制剂, 在食品工业和化妆品工业中具有潜在的应用前景, 且作为絮凝剂在城市废水热处理中具有巨大的应用价值.

## 2 嗜冷微生物和耐冷微生物

### 2.1 嗜冷微生物的定义及分布

最高生存温度 $<20^{\circ}\text{C}$ , 最适生长温度 $\leq 15^{\circ}\text{C}$ , 在 $0^{\circ}\text{C}$ 可生长繁殖的微生物被称为嗜冷微生物. 最高生存温度 $\geq 20^{\circ}\text{C}$ , 最适生长温度 $> 15^{\circ}\text{C}$ , 在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 可生长繁殖的微生物被称为耐冷微生物(psychrotrophs)或兼性嗜冷菌<sup>[56]</sup>. 嗜冷微生物和耐冷微生物所分布的环境包括南极、北极、冰川、深海、高海拔大气层以及冰冻物体等地球上的低温地区<sup>[57]</sup>. 嗜冷菌主要分布于假单胞菌属、芽孢杆菌属、耶尔森氏菌属和李斯特菌属等. 例如, 从阿拉斯加永久冻土中分离出的新型兼性嗜冷肉杆菌*Carnobacterium pleistocenium* sp. nov.<sup>[58]</sup>以及从南极洲戴维斯站附近沙土中分离出的新型耐冷嗜碱肉杆菌*Carnobacterium antarcticum* CP1<sup>[59]</sup>.

### 2.2 嗜冷微生物的适应机制

(1) 膜水平上. 嗜冷微生物细胞膜对低温的恒黏

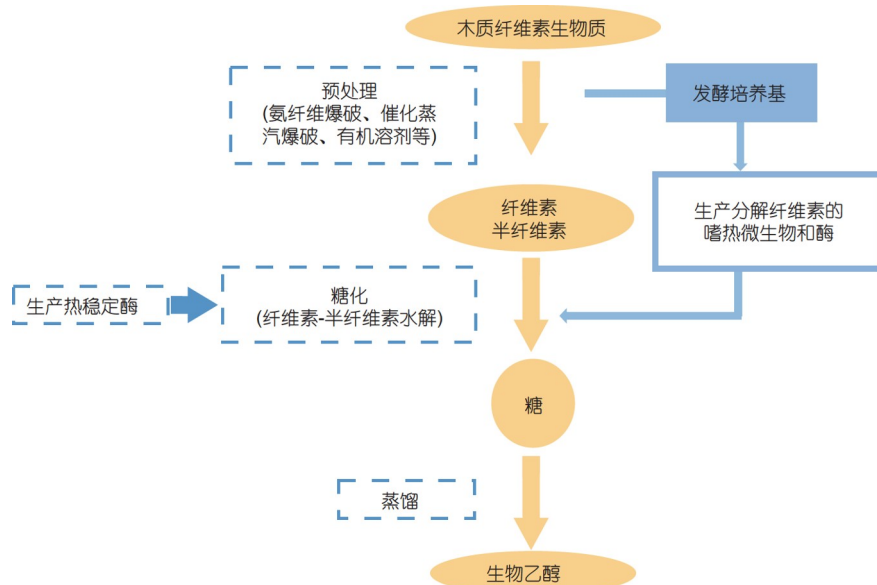


图1 芦竹根茎木质纤维素生物质联合生物加工方案(网络版彩图)

Figure 1 A consolidated bioprocessing method of lignocellulose biomass from asparagus rhizome (color online)

适应性是通过改变脂质双层的脂肪酸组成实现的<sup>[60]</sup>. 嗜冷菌主要通过增加不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、甲基支链脂肪酸和(或)单体脂肪酸的含量来保护细胞膜免受低温的破坏<sup>[61]</sup>. 在部分嗜冷菌中还观察到其通过上调膜转运蛋白来应对低温所导致的扩散和转运速率的降低<sup>[62]</sup>. 嗜冷微生物中的色素生成很常见, 在从冰川<sup>[63]</sup>、海洋表层水<sup>[64]</sup>等地分离出的嗜冷微生物中均有报道, 色素(尤其是类胡萝卜素)也被认为与调节细胞膜流动性有关.

(2) 冰冻保护. 嗜冷菌通过产生包括相容性溶质、抗冻蛋白和冰核蛋白、胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)以及生物表面活性剂来应对冷冻. 例如, 2015年Ghobakhlou等人<sup>[65]</sup>报道, 来自北极的中慢生根瘤菌*Mesorhizobium* sp. N33中与甘氨酸甜菜碱、海藻糖、甘油、蔗糖、甘露醇和山梨醇等相容性溶质合成有关的基因显著上调. 嗜冷菌中相容性溶质的积累有助于维持渗透平衡, 从而抵消冰冻过程中的水分流失和细胞收缩, 同时还降低了溶液的冰点以及细胞内玻璃转移温度(glass transition temperature, Tg)<sup>[66]</sup>.

(3) 分子伴侣. 蛋白质和RNA(DNA)分子伴侣分别促进蛋白质和RNA(DNA)的有效折叠, 在对抗蛋白质的错误折叠和聚集以及维持RNA和DNA二级结构的低温稳定性方面发挥着重要作用. RNA(DNA)分子伴侣在中温和嗜热微生物中作为冷休克反应的一部分短暂产生, 但在嗜冷微生物中通常作为冷休克蛋白持续过度表达或在低温时上调<sup>[67]</sup>.

(4) 其他. 近年来, 研究人员利用基因组学、转录组学和蛋白质组学等现代组学方法揭示了多种嗜冷微生物共有的其他特征. 例如, 2005年, 研究人员分别对来自南极海洋的假交替单胞菌*Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125<sup>[68]</sup>和冷红科尔韦氏菌*Colwellia psychrerythraea* 34H<sup>[69]</sup>的基因序列进行分析, 冷适应的基因标签特性都得到确定, 包括缺失产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的整个通路以应对低温下氧气溶解度的增加, 以及扩充与细胞膜合成、影响耐寒性物质的摄入与合成相关的基因家族. 2010年, Garnier等人<sup>[70]</sup>报道嗜冷菌*Lactococcus piscium* CNCM I-4031通过上调甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性来克服糖酵解中的温度限制. 2013年, Mykityczuk等人<sup>[71]</sup>对来自永冻层的嗜盐动性球菌*Planococcus halocryophilus* Or1

的研究报道, 部分嗜冷菌能上调肽聚糖生物合成基因, 增厚肽聚糖层, 从而通过强化物理屏障来保护自身免受低温下结冰、冻融以及渗透压增加导致的损伤. 2015年, Tribelli等人<sup>[72]</sup>报道来自南极的假单胞菌*Pseudomonas extremaustralis* sp.的氧化代谢过程, 即糖酵解途径、戊糖磷酸途径、三羧酸循环等, 以及涉及金属离子和钼蝶呤代谢的途径在低温时下调. 嗜冷微生物与嗜热微生物对温度的细胞、分子适应机制如图2所示.

## 2.3 酶及其应用

适冷酶在中低温度下具有较高的催化常数( $k_{cat}$ )并在高温下具有热不稳定性, 因而在使用过程中不但能够节省能源提高经济效益, 还能减少副产物的产生. 适冷酶在分子生物学、医学研究、食品、洗涤剂 and 化妆品等领域都有广泛应用. 例如, 通过在大肠杆菌中克隆表达来自北极的红球菌属细菌*Rhodococcus* sp. AW25M09编码的适冷酶脂肪酶在高pH、有机溶剂(乙腈、二乙醚)和高盐浓度(1 mol/L NaCl)条件下仍保持活性, 被应用于衣物清洗剂中, 可进行工业大规模生产<sup>[73]</sup>. 来源于嗜冷微生物的脂肪酶和酯酶还可用于生物制药领域, 例如合成单一异构体手性药物<sup>[74]</sup>, 以及合成作为中间产物的光学活性胺<sup>[75]</sup>. 此外, 嗜冷微生

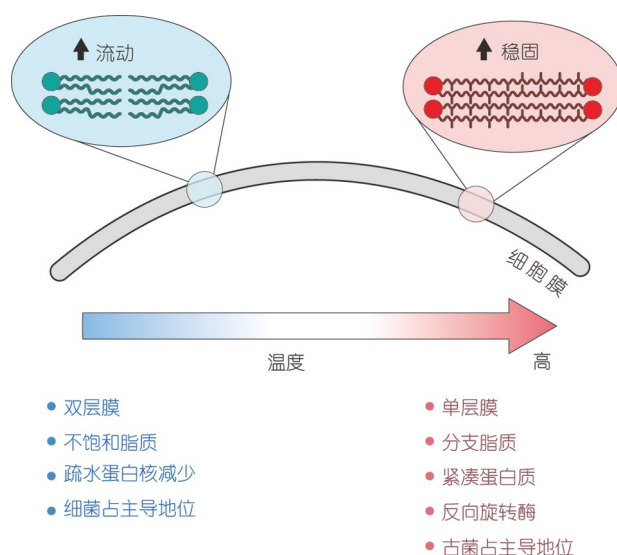


图2 嗜冷微生物与嗜热微生物对温度的细胞、分子适应机制(网络版彩图)

Figure 2 Cellular and molecular mechanisms for the adaptation of thermophiles and psychrophiles microorganisms to temperature (color online)

物是适冷性 $\beta$ -半乳糖苷酶的主要来源, 适冷性 $\beta$ -半乳糖苷酶可用于生产低乳糖牛奶(专用于乳糖不耐受个体的乳制品). 特别的是, 与中温酶相比, 适冷性 $\beta$ -半乳糖苷酶可以在低温( $<10^{\circ}\text{C}$ )条件下有效水解乳酸, 从而使水解乳糖的过程可以控制在牛奶运输或储存期间, 显著节约生产过程所需时间, 还将有效降低中温微生物污染风险, 并防止非酶促褐变产物的产生. 目前适冷性 $\beta$ -半乳糖苷酶仍有广阔的开发空间, 考虑到目前低聚半乳糖在功能性食品领域的关键作用, 需要开发具有高半乳糖基转移活性的 $\beta$ -D-半乳糖苷酶的微生物, 并分析低聚半乳糖混合物的具体组分,  $\beta$ -D-半乳糖苷酶有望成为具有良好前景的合成工具. 除产生适冷酶外, 嗜冷微生物是新型抗生素的重要潜在来源, 部分来源于嗜冷微生物的生物活性分子具有抗菌活性<sup>[76]</sup>. 此外, 由于嗜冷微生物显示出广泛的重金属抗性和碳氢化合物降解能力, 南极的嗜冷微生物是南极地区原位生物修复的重要资源<sup>[77]</sup>.

### 3 嗜盐微生物

#### 3.1 嗜盐微生物的定义及分布

嗜盐微生物是指生存在如深海沉积物、盐湖、盐田、盐土和海水等高盐含量( $\text{NaCl} > 0.2 \text{ mol/L}$ )环境中的极端微生物, 存在于真核生物、细菌和古细菌三个生命域, 且大部分为细菌和古菌. 根据最适盐浓度的差异, 嗜盐微生物可被分为三类: 极端嗜盐菌( $2.5 \sim 5.2 \text{ mol/L NaCl}$ )、中等嗜盐菌( $0.5 \sim 2.5 \text{ mol/L NaCl}$ )和轻度嗜盐菌( $0.2 \sim 0.5 \text{ mol/L NaCl}$ )<sup>[78]</sup>. 特别地, 不仅能在高盐环境下生存, 还可在一般条件下正常生存的微生物被称为耐盐微生物(halotolerant microorganisms). 自2018年以来, 全部记录在案的嗜盐物种及其基本信息都收集于“HaloDom”新在线数据库中<sup>[79]</sup>. 该数据库显示, 至今有超过1000种嗜盐物种, 按照古细菌21.9%、细菌50.1%和真核生物27.9%的比例分布. 嗜盐菌主要包括盐芽孢杆菌属、盐杆菌属、嗜盐单胞菌属、嗜盐小盒菌属、嗜盐富饶菌属、嗜盐球菌属、嗜盐嗜碱杆菌属和嗜盐嗜碱球菌属等. 嗜盐微生物和耐盐微生物在生物技术领域具有重要应用价值, 极端嗜盐杆菌*Halobacterium* sp. NRC-1在抗原和疫苗的生产方面具有无毒、不含脂多糖、低渗条件下易裂解等优势, 可被用于构建抗原生产和疫苗研发的创新平

台<sup>[80]</sup>, 该*Halobacterium* sp. NRC-1表达系统目前已用于表达300 nm的抗原蛋白质纳米颗粒, 最新的研究用该系统表达了疟原虫子孢子的表面蛋白质.

#### 3.2 嗜盐微生物的适应机制

嗜盐菌的适应机制包括“盐内”(salt-in)和“盐外”(salt-out)机制(图3).

(1) 盐内. “盐内”机制主要存在于古菌中<sup>[81]</sup>, 使用 $\text{K}^+/\text{Na}^+$ 反转运蛋白在细胞质中积累高水平KCl. 这需要蛋白质适应, 包括由于高酸性氨基酸含量而增加的负表面电荷<sup>[82]</sup>. 此外, 在强光和低氧条件下, 嗜盐菌通过细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)生成ATP来驱动逆向转运蛋白并维持渗透平衡<sup>[81]</sup>.

(2) 盐外. “盐外”机制发现于细菌和真核生物中, 绝大部分嗜盐和耐盐细菌都采用此机制. “盐外”机制通过在细胞内积累高浓度的甘油、甜菜碱等相容性溶质以维持渗透平衡. 积累的相容性溶质具有低分子量、高水溶性、在生理pH值下呈中性且不干扰细胞代谢的特点, 可在高温、冷冻和干燥条件下保护蛋白质<sup>[83]</sup>, 在生物燃料、化妆品等领域具有重要应用. 例如, 四氢嘧啶可用于生物燃料生产, 在运动发酵单胞菌的生长培养基中补充四氢嘧啶可以提高乙醇产量<sup>[84]</sup>. 生物在不同胁迫条件下积累相容性溶质具有差异性, 2013年, Saum等人<sup>[85]</sup>报道, 嗜盐芽孢杆菌(*Halobacillus halophilus*)在不同生长时期和不同的盐浓度下合成不同的相容性溶质以应对环境胁迫. *H. halophilus*利用的相容性溶质大多数都是谷氨酸家族成员, 当盐浓度低于 $1.5 \text{ mol/L NaCl}$ 时主要是谷氨酸和谷氨酰胺, 高于 $2 \text{ mol/L NaCl}$ 时, 脯氨酸占主导地位. 另外, 对嗜盐微生物进行基因组学分析, 基因组GC含量高是嗜盐菌的一个共同特征, 与其抗紫外线诱导的胸腺嘧啶二聚体形成的适应机制有关<sup>[86]</sup>.

嗜盐微生物产生的酶, 如DNA酶、脂解酶(脂肪酶和酯酶)、蛋白酶、淀粉酶和明胶酶等水解酶, 不但在高盐浓度下具有稳定性, 而且通常还可耐高温和有机溶剂<sup>[87]</sup>. 据报道, 来源于*Haloarcula* sp. 菌株(嗜盐古菌)的 $\alpha$ -淀粉酶在 $4.3 \text{ mol/L NaCl}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 下具有最佳活性, 并在氯仿、苯和甲苯等部分有机溶剂的存在下具有良好的稳定性. 来自耐盐芽孢杆菌菌株US193的耐盐碱性蛋白酶在中性到碱性的pH值范围(pH 7~12)内、 $40 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 和 $2 \text{ mol/L NaCl}$ 的条件下表现出高稳定性, 并

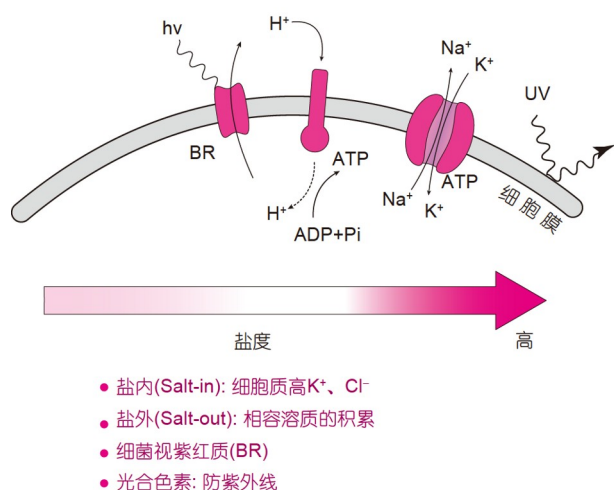


图3 嗜盐菌的细胞、分子适应机制(网络版彩图)

Figure 3 Cellular and molecular mechanisms for the adaptation of halophilic microorganisms (color online)

在甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇、乙腈和二甲基亚砜等有机溶剂中具有高稳定性<sup>[88]</sup>。因此,嗜盐菌、耐盐菌及相关酶为食品工业、生物合成带来了巨大的发展机遇,是生物燃料生产和其他工业过程应用微生物的最佳选择之一。从中国运城盐湖发现的耐盐菌菌株*Halorcula* sp. LLSG7具有高纤维素分解活性和稳定性,由其酶解产物作为生物乙醇发酵底物时,酿酒酵母可产生10.7 g/L乙醇,显著高于其他纤维素酶<sup>[89]</sup>。嗜盐蛋白酶是由嗜盐微生物产生的蛋白酶,其催化活性通常需要NaCl存在,而耐盐蛋白酶不一定来源于嗜盐微生物,对NaCl无依赖<sup>[90]</sup>。嗜盐蛋白酶及耐盐蛋白酶可被应用于食品工业,包括鱼和肉产品的盐发酵过程以及酱油的生产。来自嗜盐芽孢杆菌属*Halobacillus* sp. SR5-3和*Halobacterium*的蛋白酶被用于鱼酱的生产过程<sup>[91]</sup>。

来源于嗜盐微生物的脂解酶在生物技术领域具有巨大应用潜力和生态效益。脂解酶在水性和非水性介质中的区域选择性和多功能性使其成为不同反应中能优良的生物催化剂,如生物聚合物的合成、手性药物的生物合成<sup>[92]</sup>,还可用于食品加工及农业废弃物处理<sup>[93]</sup>。尽管目前用于上述工业应用的许多商业化脂解酶已经从嗜中温微生物中分离<sup>[94]</sup>,但由于对有机溶剂和高温的耐受性低,反应过程中易失活,所以不仅增加了生产成本,而且降低了工业用酶的有效性。而来源于嗜盐微生物的脂解酶在苛刻的条件下仍具有较高

活性,为工业化应用提供了可能性。2006年报道的来自嗜盐碱球菌*Natronococcus* sp. TC6的脂肪酶在4 mol/L NaCl下具有最高活性,能够在高盐浓度下水解橄榄油,是古菌域中第一个被鉴定的脂肪酶<sup>[95]</sup>。尽管嗜盐微生物的脂解酶具有特殊酶学性质,但目前仅有少数来自嗜盐微生物的脂解酶实现了商业化,例如来源于解脂海杆菌(*Marinobacter lipolyticus*)的脂解酶LipBL<sup>[96]</sup>。除酶以外,嗜盐微生物产生的表面活性剂和胞外多糖可用于土壤和水体的生物修复。产生表面活性剂的嗜盐和耐盐微生物被认为是加速盐渍地碳氢化合物污染修复的关键因素<sup>[97]</sup>。嗜盐微生物还用于聚羟基烷酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)、细菌视紫红质、四氢嘧啶、类胡萝卜素等的生产<sup>[98]</sup>。

## 4 嗜碱微生物

### 4.1 嗜碱微生物的定义及分布

嗜碱微生物是在pH≥9时生长最佳,在中性pH值(pH 6.5~7.0)时不能生长或生长非常缓慢的微生物<sup>[99]</sup>。嗜碱微生物起源于数十亿年前的深海碱性热液喷口,被认为是地球上最早的生命形式<sup>[100]</sup>,根据其生存条件可分为兼性嗜碱微生物(中性pH下生长良好)、专性嗜碱微生物(在pH 9以上生长良好,在中性pH下不能生长)和耐碱微生物(在pH 10以下生长良好,但在pH 9.5以下生长最佳)。许多嗜碱微生物也同时耐高盐,在高碱性(pH>9)和高盐度(高达33%(w/v) NaCl)的条件下生长,被称为嗜盐嗜碱菌。嗜碱微生物生存的碱性环境包括莫哈韦沙漠苏打湖、热液喷口、昆虫后肠、深海沉积物及富含碳酸盐的土壤等自然碱性环境,以及电镀加工、水泥制造、靛蓝染料制备、铝土矿加工等一系列工业活动废液流域的人为高碱性环境<sup>[1]</sup>。此外,从中性环境中也已分离出嗜碱微生物<sup>[101]</sup>。已分离到的嗜碱微生物主要包括芽孢杆菌属、微球菌属、链霉菌属、假单胞菌属和无色杆菌属等的一些种。

### 4.2 嗜碱微生物的适应机制

(1) 维持细胞内pH稳态。嗜碱微生物维持细胞内pH稳态的适应机制如图4所示。其中,单价阳离子/质子逆向转运蛋白可将细胞内阳离子(如Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>)交换为细胞外H<sup>+</sup>,被认为是嗜碱微生物维持细胞内pH稳态的最重要的机制<sup>[102]</sup>。同时,产酸作用也是维持细胞内pH

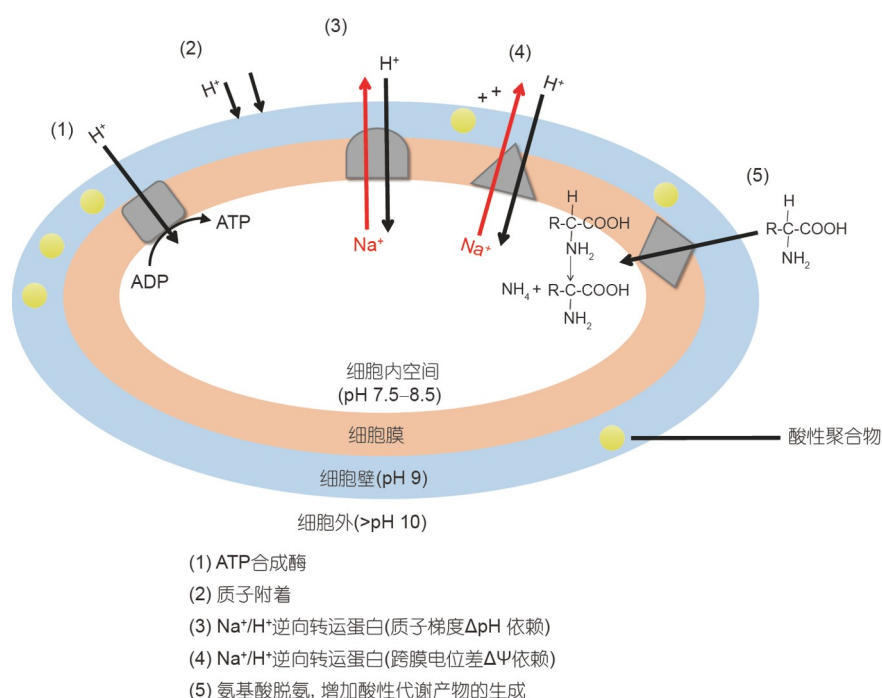


图4 嗜碱微生物维持细胞内pH稳态的细胞适应机制(网络版彩图)

Figure 4 A diagrammatic representation of the various cellular adaptations involved in the pH homeostasis in alkaliphiles (color online)

稳态的一个重要途径。细胞外pH值会影响代谢过程,许多嗜碱微生物通过糖酵解反应和氨基酸脱氨以增加酸性代谢产物的生成,通过提高细胞质 $\text{H}^+$ 浓度来维持pH值的稳定<sup>[103]</sup>,产酸作用还可提高细胞附近 $\text{H}^+$ 的利用率。对嗜碱芽孢杆菌*Bacillus pseudofirmus* OF4的ATP合酶进行突变,研究表明,嗜碱微生物的ATP合酶可有效捕获转移 $\text{H}^+$ ,并将 $\text{H}^+$ 保留在细胞质中<sup>[104]</sup>。此外,嗜碱微生物通过增加细胞表面酸性,使阳离子( $\text{H}^+$ 和 $\text{Na}^+$ )结合量增加<sup>[105]</sup>。

(2) 生物能学。尽管在碱性环境中进行ATP合成存在热力学障碍,但嗜碱微生物并未表现出能量短缺,这是由于嗜碱微生物具有独特的适应机制,在高pH下有效合成ATP。血红素蛋白(如细胞色素)是呼吸链产生ATP的重要组成部分,嗜碱微生物细胞色素c还具有高电子保留能力。对革兰氏阴性兼性嗜碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila*)的可溶性细胞色素c-552进行的研究表明,其在碱性pH环境下具有很高的电子保留能力,并可作为周质空间的电子库<sup>[102]</sup>。高电子保留能力有助于高的膜电位的形成( $\Delta\Psi$ ),吸引 $\text{H}^+$ ,增强ATP合成酶驱动力。研究发现,细胞色素在嗜碱性革兰氏阴性菌和阳性菌中发挥作用具有差异性。在高pH环境下,

c552为革兰氏阴性细菌的生长提供较高支持,而革兰氏阳性细菌中富含膜结合细胞色素c<sup>[106]</sup>。高pH条件通常有利于提高ROS的稳定性,从而对血红素蛋白产生不利影响。2017年,Popinako等人<sup>[107]</sup>报道,嗜盐嗜碱菌通过增加芳香族氨基酸的数量来增强疏水性,以保护血红素蛋白质在高pH条件下免受ROS产生的应激条件的影响。

### 4.3 酶及其应用

嗜碱微生物是碱性活性酶的主要和可靠来源。碱性活性酶在纺织、环糊精生产、含纤维素酶或蛋白酶的洗涤剂生产、生物漂白纸浆等工业中具有广泛应用。在纺织工业中,碱性活性果胶酶已被成功地应用于亚麻、苧麻、黄麻和大麻纤维的脱胶工艺<sup>[108]</sup>。传统的脱胶工艺使用高浓度的氢氧化钠,且伴随沸腾、洗涤和中和步骤,不仅成本昂贵、耗时,还会导致污染。碱性活性果胶酶的使用可降低脱胶过程中氢氧化钠浓度,缩短浸泡时间,降低蒸煮温度。在脱胶过程中需要添加稀释的碱,从而从纤维中有效去除木质素成分,最大限度地减少漂白化学品的消耗,以及减少纤维素降解污染物,因此用于脱胶工艺的酶应具有高pH稳定

性, 通常从嗜碱微生物中获取<sup>[109]</sup>。纸张回收加工过程中的一个关键步骤是彻底去除黏性污染物。利用碱性活性酯酶和脂肪酶可以有效去除黏性污染物, 改善纸张质量<sup>[110]</sup>, 显著提高经济和环境效益。在药学方面, 研究表明, 具有纤溶活性的碱性活性蛋白酶在治疗血栓形成和癌症方面具有潜力<sup>[111]</sup>。具有弹性溶解特性的碱性活性丝氨酸蛋白酶已被用于制备治疗烧伤、脓肿、痈肿等伤口的制剂<sup>[112]</sup>。

除碱性活性酶以外, 嗜碱微生物还产生多种生物活性产物。(i) 有机酸: 糖分解代谢的研究表明, 部分嗜碱微生物可利用不同的碳水化合物生产甲酸、乙酸、琥珀酸和乳酸等有机酸, 因此嗜碱微生物可利用植物生物质等廉价混合碳水化合物作为底物来水解生产有机酸。同时, 嗜碱微生物生产介质的高pH和高盐浓度, 可降低被其他菌污染的风险。嗜碱芽孢杆菌*Bacillus* sp. WL-S20可高水平积累有机酸, 能够产生225 g/L的L-乳酸, 产率达99.3%<sup>[113]</sup>。尽管已知许多嗜碱微生物能够生产有机酸, 但对甲酸、乙酸、琥珀酸等其他有机酸的生产研究依然有限, 进一步对不同有机酸进行筛选和优化研究可提高生产率。(ii) 类胡萝卜素: 1991年, Aono和Horikoshi<sup>[114]</sup>分离得到一株产类胡萝卜素的嗜碱芽孢杆菌菌株。2003年, Takaichi等人<sup>[115]</sup>报道, 嗜日菌属(*Heliorestis*)的不同嗜碱性菌株可以产生新型类胡萝卜素葡萄糖苷脂。(iii) 抗菌物质: 2003年, Dietera等人<sup>[116]</sup>报道, 嗜碱性链球菌*Streptomyces* sp. AK可产生抗真菌、原生动物以及人类不同癌细胞系的活性物质。2010年, Thumar等人<sup>[117]</sup>报道, 耐盐嗜碱链霉菌菌株*Streptomyces aburaviensis* Kut-8可产生有效针对革兰氏阳性菌的化合物。通过嗜碱微生物生产抗菌药物的筛选研究仍十分有限, 还需进一步开发相应商用抗生素, 部分相关研究表明, 基于良好的广泛筛选, 嗜碱微生物可成为新型抗生素的重要潜在来源。

## 5 嗜酸微生物

### 5.1 嗜酸微生物的定义及分布

嗜酸微生物是在pH≤3的酸性条件下最适生长的极端微生物, 其分布的酸性环境多样, 如硫酸池、硫质温泉、硫矿山、酸性工业废水等天然和人工酸性环境。部分嗜酸菌最适pH值<1, 例如古菌*Picrophilus oshimae*的最适pH值为0.7<sup>[118]</sup>。嗜酸微生物包含古菌、

真菌、真核生物三大生物域中的许多自养和异养生物, 主要包括嗜酸硫杆菌属、钩端螺菌属、酸性杆菌属、嗜酸菌属、铁原体属、酸微菌属、硫化杆菌属、金属球菌属和酸菌属等。最早(1922年)发现的嗜酸菌是嗜酸氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)<sup>[119]</sup>。

### 5.2 嗜酸微生物的适应机制

嗜酸微生物对酸性环境的适应机制如图5所示。

(1) 细胞膜。嗜酸微生物细胞膜具有对质子的高不可渗透性<sup>[120]</sup>。在古菌中, 该功能是通过四醚脂质、类异戊二烯链以及存在于细菌和真核生物中的酯键所不同的醚键等结构<sup>[121]</sup>实现的。醚键与酯键相比, 对酸水解的敏感性更低, 使膜脂质更不易被酸解, 膜脂质对于维持细胞膜内pH恒定、膜质子梯度和ATP合成酶的正常功能至关重要。同时, 嗜酸微生物的细胞膜表面通过聚集大量金属离子与H<sup>+</sup>发生交换作用。减小膜通道大小是嗜酸微生物维持pH稳态的另一机制。研究发现, 在氧化亚铁硫杆菌中, 嗜酸微生物细胞膜通道的孔径有所减小, 根据电荷和大小对进入膜孔蛋白的离子进行选择<sup>[122]</sup>。此外, 对*Ferroplasma*等嗜酸细菌进行的基因组分析证实了质子驱动型外排泵的存在, 包括H<sup>+</sup>-ATP酶质子外排系统、逆向转运体和协同转运体<sup>[123]</sup>。有关嗜酸菌中的二级转运体也已有报道, 激活的二级转运体利用跨膜质子或钠离子的电化学梯度来驱动运输的膜蛋白。

(2) 跨膜电位差。嗜酸微生物质子梯度与跨膜电位差之间的关系为 $\Delta p = \Delta \Psi - 2.3(RT/F)\Delta pH$ ,  $\Delta pH = pH(\text{膜外}) - pH(\text{膜内})$ 。其中,  $\Delta p$ 为质子推动力,  $\Delta \Psi$ 是跨膜电位差,  $\Delta pH$ 是质子梯度,  $R$ 是气体常数,  $T$ 是热力学温度,  $F$ 是法拉第常数。尽管嗜碱菌以及中性菌的 $\Delta \Psi$ 为负, 但嗜酸菌的 $\Delta \Psi$ 为零, 甚至为正。这种内膜正电位可由唐南电势产生的K<sup>+</sup>离子等正离子产生<sup>[124]</sup>。正膜电位具有保护作用,  $\Delta \Psi$ 迅速升高抵消了质子内流的推动力 $\Delta p$ , 抑制质子进入, 从而使细胞内的pH基本保持稳定, 防止细胞质酸化。

(3) 耐重金属机制。金属在酸性环境中的溶解度增大, 过量重金属可抑制转运系统, 取代其天然结合位点的必需金属, 导致蛋白质及核酸构象改变, 产生毒害作用。嗜酸微生物耐重金属机制包括通过渗透障碍阻止重金属进入细胞, 降低对重金属的敏感性, 转化有毒重金属、在细胞内(外)对重金属进行绑定, 降低重

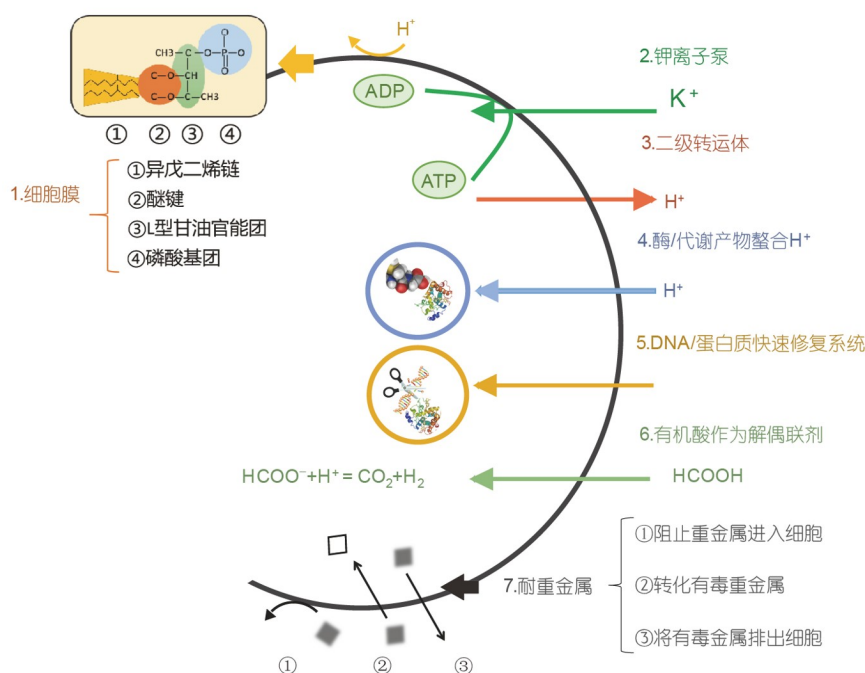


图 5 嗜酸微生物对酸性环境的适应机制(网络版彩图)

Figure 5 Adaptation mechanism of acidophiles to acidic environment (color online)

金属的毒性, 将有毒金属排出细胞<sup>[125]</sup>.

(4) 其他. 嗜酸微生物的基因组中含有大量DNA和蛋白质修复基因. 在低pH下, 嗜酸微生物中参与蛋白质重折叠的分子伴侣高度表达, 表明其对于微生物在酸性条件下存活具有重要作用<sup>[78]</sup>. 研究发现, 异养嗜酸细菌普遍能够高效降解有机酸. 由于有机酸在酸性pH下可作为呼吸链的解偶联剂, 促进质子在低pH下跨膜转移, 因而会对嗜酸菌产生不利影响<sup>[121]</sup>, 有机酸降解被认为是嗜酸微生物适应酸性环境的机制之一. 此外, 细胞质缓冲体系通过赖氨酸、组氨酸和精氨酸等碱性氨基酸的脱羧反应消耗质子, 从而使细胞质pH值因质子的消耗而提高<sup>[126]</sup>.

### 5.3 酶及其应用

嗜酸微生物是工业用酸稳定性酶的重要来源. 在淀粉工业中, 由于传统淀粉工业所用 $\alpha$ -淀粉酶最适酶活条件为95℃、pH 6.8, 不适宜在天然淀粉pH条件(pH 3.2~4.5)下进行工业生产, 在生产过程中需要多次调整淀粉浆pH并补充Ca<sup>2+</sup>, 既消耗时间又提高了生产成本. 从嗜酸微生物中提取满足特殊工业应用需求的

极端酶可有效解决这一问题<sup>[127]</sup>. 来源于酸热脂环酸芽胞杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)和酸居芽孢杆菌(*Bacillus acidicola*)的酸稳定 $\alpha$ -淀粉酶以及来源于嗜酸热原体(*Thermoplasma acidophilum*)等嗜热嗜酸古菌的葡萄糖淀粉酶在淀粉工业中应用广泛<sup>[128]</sup>. 与淀粉工业不同, 在烘焙工业中所应用的麦芽糖淀粉酶还需具有中等强度热稳定性的特点, 以确保在烘焙结束后失活, 阻止反应持续进行, 避免产品变质. 上述来自于酸居芽孢杆菌的酸稳定 $\alpha$ -淀粉酶最适pH为4.5, 且具有中等强度热稳定性, 因此也可被应用于烘焙工业. 此外, 耐酸木聚糖酶可分解面粉中的半纤维素, 调整水分, 使面团更加柔软, 也被广泛应用于烘焙工业. 2006年, Shah等人<sup>[128]</sup>报道嗜酸真菌臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)中的酸稳定木聚糖酶(最适pH 5.3)可作为全麦面包的改进剂. 在动物饲料生产工业中, 嗜酸微生物产生的耐酸酶被应用于动物饲料添加剂, 促进动物胃消化功能, 以改善饲料的可消化性. 由草酸青霉*Penicillium oxalicum* GZ-2产生的耐酸木聚糖酶可用于动物饲料、食品工业和生物燃料<sup>[129]</sup>. 在制浆造纸工业中, 利用耐酸木聚糖酶在低pH值生产条件下漂白纸浆比

一般工艺更有利<sup>[130]</sup>。嗜酸微生物还在低品质矿石的生物冶炼过程中发挥重要作用, 并用于生物发电以及酸性矿井排水和重金属污染产生的酸性废水的生物修复。

## 6 极端微生物在下一代工业生物技术中的应用

近年来, 基于合成生物学技术与发酵技术的开发和优化, 利用极端微生物进行工业发酵的下一代工业生物技术(next generation industrial biotechnology, NGIB)取得显著进步。下一代工业生物技术作为低成本生物加工技术, 其核心是利用极端微生物作为底盘细胞, 建立开放、无灭菌的连续发酵生产体系<sup>[131]</sup>, 具有无需灭菌、节能节水、产物浓度高、分离操作简单等优点。

特别地, 由于嗜盐微生物具有耐盐、不易染菌、生长速度快和鲁棒性强等优势, 已经成为下一代工业生物技术重要的底盘细胞, 被广泛应用于PHA、蛋白质和小分子化合物等多种工业产品的高效、高产合成。例如, 2011年, Tan等人<sup>[132]</sup>利用从新疆盐湖中分离到的盐单胞菌*Halomonas bluephagenesis* TD01研发了无需灭菌的连续发酵工艺。嗜盐菌*Halomonas bluephagenesis* TD01在pH 9.0、盐浓度5~6%(w/v)时生长最佳, 他们将该菌株在葡萄糖盐培养基上培养56小时, 细胞干重(cell dry weight, CDW)达到80 g/L, 并在葡萄糖盐培养基上累积超过80%的聚3-羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)。2014年, 他们又应用合成生物学和代谢工程的方法开发了重组盐单胞菌*Halomonas bluephagenesis*, PHB产量提升至92%, 并用于生产3-羟基丁酸酯和3-羟基戊酸酯共聚物(3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate copolymers, PHBV)、聚3-羟基丁酸-4-羟基丁酸共聚酯(poly3-hydroxybutyrate4-hydroxybutyrate, P34HB)以及5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)<sup>[133]</sup>。采用两阶段开放式连续发酵工艺, 将第一个发酵罐中的培养物连续泵送至第二个含缺氮葡萄糖盐培养基的发酵罐, *Halomonas bluephagenesis* TD01在葡萄糖转化率高于50%的情况下, PHB的累积量高达70wt% CDW, 表明氮限制有利于*Halomonas bluephagenesis* TD01生产PHB。野生型和工程化的*Halomonas bluephagenesis*已成功地从实验室1 L发酵罐

扩大应用到1000 L工业发酵罐, 用于生产PHA<sup>[134]</sup>。合成生物学技术的使用也使*Halomonas bluephagenesis*实现了可控形变, 从而有利于更多胞内产物的合成和下游的细胞分离<sup>[135]</sup>。

在利用极端微生物进行工业发酵的下一代工业生物技术中, 合成生物学技术与极端微生物特性相结合, 可为工业生产中遇到的一些问题提供新的解决思路。例如, 在工业发酵过程中, 酵母的生长和生产受热应激和氧化应激的严重抑制, 2017年, Sun等人<sup>[136]</sup>利用合成生物学方法, 结合极端微生物特性, 为其设计含有分别来自嗜热栖热菌*Thermus thermophilus* HB8和嗜热嗜热杆菌*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4的热休克蛋白(heat shock protein, HSP)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的合成基因电路, 该组合协同缓解热应激和氧化应激, 显著提高了酿酒酵母在高温生产条件下的活性和生产力。结果表明, 具有该组合遗传装置(FBA1p-sod-MB4-FBA1p-shsp-HB8)的酿酒酵母耐热性提高了250%, 可在42℃温度条件下生长良好, 且乙醇产量明显高于野生型。再如, 由于节约化石资源和保护环境的需要, 利用可再生资源生物合成芳香醛化合物的研究受到广泛关注, 而芳香醛可被内源醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)还原为芳香醇, 这影响了芳香醛产量。2018年, Ni等人<sup>[137]</sup>结合极端微生物特点与合成生物学技术, 设计热调节遗传系统, 通过来源于嗜热放线菌*Amycolatopsis thermoflava* N1165的阿魏酰辅酶A合成酶(trans-feruloyl-CoA synthetase, Fcs)及烯脂酰辅酶A水合酶(enoyl-CoA hydratase, Ech)的异源表达, 使大肠杆菌以阿魏酸为原料在30℃的反应温度下生产香草醇, 在50℃的反应温度下转化为香草醛。其机制是在50℃的反应温度下, 内源醇脱氢酶不再活跃, 而嗜热菌的功能酶仍然具有较高活性。

## 7 结论与展望

总之, 极端微生物由于生存环境的特殊性、作用的鲁棒性和对不利环境条件的高度耐受性, 具有巨大应用价值, 预计未来更多的极端微生物、极端酶将为高效生产提供更有效的底盘细胞和催化剂。这些目标的实现离不开传统和现代尖端分子生物学工具的帮助。例如, 极端微生物的应用为生物燃料生产带来了曙

光, 利用能够转化木质纤维素材料的热稳定酶以及嗜热微生物可以提高生产率和减少能量消耗. 除经典方法外, 根据对降解木质纤维素底物的嗜热微生物基因组草图进行分析, 可揭示编码纤维素或木质素降解酶的基因, 进而帮助进一步探索生物燃料的生产过程. 全基因组知识可以对用于废弃生物质(秸秆、锯末等)利用的极端微生物进行初步筛选. 此外, 由于目前极端酶的生产成本仍远高于传统酶制剂, 因此需要采用合成生物学方法转化极端微生物的底盘细胞, 利用组织化学技术筛选高活性的极端微生物, 探索新的代谢途径, 优化技术路线.

由于极端微生物的特殊性, 极端微生物的研究过程具有很多挑战. 因其生存环境特殊, 在寻找极端微生物的过程中, 科学家们需要前往地球各环境条件苛刻、生命罕至的极端地区. 近来, 德国不来梅大学的研究人员在日本东侧海底沉积层 1200 m 左右的极端环境中发现了处在分裂增殖状态的极端微生物<sup>[138]</sup>. 对极端微生物进行实验室培养以及对其进行分子操纵是研究过程中的另一挑战. 实验室极端微生物培养需要特殊的技术和设备, 以维持其所需的极端环境和复杂的营养需求. DiRuggiero 团队<sup>[139]</sup>在研究厌氧嗜热菌时, 为满足其高温和缺氧的生存条件, 将其放置在耐高温培养罐中, 再放于温度设置为 95℃ 的培养箱中维持高温, 而为了避免普通塑料培养皿中的琼脂受高温后融化, 研究者们转而使用添加有盖伦胶衍生物的玻璃培养皿. 研究过程中用来转移遗传物质的质粒等实验室常用的工具和技术往往也不再适用于极端微生物, 研究者们对此采取了新的解决办法, 例如为极端微生物调整了基因编辑技术<sup>[1]</sup>, 发展适用极端微生物的基因组编辑技术体系. 极端微生物研究的另一个重要瓶颈是缺乏模式生物. 通常在分离后, 极端微生物的基因将被克隆并转化至大肠杆菌等成熟的模式生物. 该步骤一次仅允许针对少数基因或蛋白质, 而非整个生物体, 具有局限性. 组学实验在一定程度上解答了部分问题, 然而依旧不能真正取代体内研究. 目前已经有了部分模式生物, 例如嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)(嗜酸菌)<sup>[140]</sup>、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)(嗜酸嗜热菌)<sup>[141]</sup>、盐碱单孢菌(*Natronomonas pharaonis*)(嗜碱嗜盐菌)<sup>[142]</sup>、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)(嗜盐菌)<sup>[143]</sup>、沃氏嗜盐富饶菌(*Haloferax volcanii*)(嗜盐菌)<sup>[144]</sup>. 对这些模式生物的研究

也带来了一些重大发现. 例如, 在盐杆菌 *Halobacterium* sp. NRC-180 中发现了一种新的基因调控机制, 该机制也被证明存在于具有多个 TATA 结合蛋白(TATA-binding proteins, TBP)或转录因子 B(transcription factor B, TFB)或两者皆备的其他古菌细胞中<sup>[145,146]</sup>. 类似于后动物中发现的机制<sup>[147]</sup>, 该基因调控机制利用成对的 TBP 和 TFB 来表达(调节)特定的基因集.

有关极端微生物的研究进展提供了对天体生物学和宇宙生命分布的新见解. 一项天体生物学实验“Tanpopo 计划”利用国际空间站进行微生物收集实验以验证生命在宇宙行星之间转移的可能性. 空间技术使先进的空间暴露设施得以发展, 以研究在行星际转移期间微生物生命对空间应力条件的反应, 在了解微重力、真空和辐射等空间环境因素对暴露在真实或模拟外层空间条件下的微生物的影响方面取得了重大进展. 聚嗜极生物可在干燥、辐射、零下温度和高氯酸盐氧化剂存在等与火星相似的各类极端环境中生存, 研究者借助空间技术发现其被发射到地球平流层和暴露于空间条件下也能存活<sup>[148,149]</sup>. 聚嗜极生物因此成为天体生物学中十分有吸引力的模式生物<sup>[150]</sup>. 相关研究不仅是对空间暴露微生物生存潜力的认识, 而且是确定优势物种在极端空间环境下生存的适应机制, 即揭示微生物适应极端环境的分子机制. 组学研究中的先进技术已允许对暴露宇宙空间极端环境中微生物的分子变化进行基因组规模的研究. 据报道, 由于能够合成用于光保护和光修复的红色-橙色类异戊二烯类胡萝卜素和用于光营养和趋光性的紫色视网膜色素蛋白, 嗜盐古菌可作为潜在远程生物信号, 进行远程天文生物表征<sup>[151]</sup>.

在过去的几年里, 极端微生物所产生的小分子化合物被越来越多地应用于化妆品、医疗领域. 这离不开卓越的基础研究的推动, 这些研究发现了新的小分子化合物, 并阐明了它们的遗传学、生物化学和作用方式<sup>[152,153]</sup>, 未来需要更多的基础研究来推动这一领域的发展. 当然, 目前只触及了冰山一角, 可能还有许多未知的极端微生物蕴藏着巨大潜力, 且已发现的极端微生物在未知领域的应用潜力也还有待开发. 极端微生物是地球留给人类独特的宝贵生物资源. 对极端微生物的研究将促进其在环境保护、人类健康和生物技术等领域的应用, 并有望广泛应用于航空航天与国防建设等相关领域.

## 参考文献

- 1 Dance A. Studying life at the extremes. *Nature*, 2020, 587: 165–166
- 2 Becker J, Wittmann C. Microbial production of extremolytes—high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Curr Opin Biotech*, 2020, 65: 118–128
- 3 Cavicchioli R, Amils R, Wagner D, et al. Life and applications of extremophiles. *Environ Microbiol*, 2011, 13: 1903–1907
- 4 Lanzén A, Simachew A, Gessesse A, et al. Surprising prokaryotic and eukaryotic diversity, community structure and biogeography of Ethiopian soda lakes. *PLoS ONE*, 2013, 8: e72577
- 5 Gabani P, Singh O V. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 993–1004
- 6 Giddings L-A, Newman D J. Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles. Cham: Springer International Publishing, 2015. 1–75
- 7 F Bosma E, van der Oost J, M de Vos W, et al. Sustainable production of bio-based chemicals by extremophiles. *Curr Biotechnol*, 2013, 2: 360–379
- 8 Dopson M, Baker-Austin C, Hind A, et al. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 2079–2088
- 9 Angelov A, Liebl W. Insights into extreme thermoacidophily based on genome analysis of *Picrophilus torridus* and other thermoacidophilic archaea. *J Biotechnol*, 2006, 126: 3–10
- 10 Zhang D S, Lovitt R W. Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *J Appl Microbiol*, 2005, 99: 565–572
- 11 Garnova E S, Krasil'nikova E N. Carbohydrate metabolism of the Saccharolytic alkaliphilic anaerobes *Halonatronum saccharophilum*, *Amphibacillus fermentum*, and *Amphibacillus tropicus*. *Mikrobiologiya*, 2003, 72: 627–632
- 12 Detkova E N, Kevbrin V V. Cellobiose catabolism in the haloalkaliphilic hydrolytic bacterium *Alkaliflexus imshenetskii*. *Microbiology*, 2009, 78: 267–272
- 13 Paavilainen S, Oinonen S, Korpela T. Catabolic pathways of glucose in *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*. *Extremophiles*, 1999, 3: 269–276
- 14 Feng X, Mouttaki H, Lin L, et al. Characterization of the central metabolic pathways in *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 via isotopomer-assisted metabolite analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 5001–5008
- 15 de Vrije T, Mars A E, Budde M A W, et al. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1358–1367
- 16 Schönheit P, Schäfer T. Metabolism of hyperthermophiles. *World J Microbiol Biotech*, 1995, 11: 26–57
- 17 Huber R, Langworthy T A, König H, et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch Microbiol*, 1986, 144: 324–333
- 18 Morikawa M, Izawa Y, Rashid N, et al. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 4559–4566
- 19 Kaushik J K, Ogasahara K, Yutani K. The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol*, 2002, 316: 991–1003
- 20 Allen M A, Lauro F M, Williams T J, et al. The genome sequence of the psychrophilic archaeon, *Methanococcoides burtonii*: the role of genome evolution in cold adaptation. *ISME J*, 2009, 3: 1012–1035
- 21 Aghajari N, Van Petegem F, Villeret V, et al. Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins*, 2003, 50: 636–647
- 22 Riley M, Staley J T, Danchin A, et al. Genomics of an extreme psychrophile, *Psychromonas ingrahamii*. *BMC Genomics*, 2008, 9: 210
- 23 Oren A, Mana L. Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 223: 83–87
- 24 Gonzalez O, Gronau S, Falb M, et al. Reconstruction, modeling & analysis of Halobacterium salinarum R-1 metabolism. *Mol Biosyst*, 2008, 4: 148–159
- 25 Rawal N, Kelkar S M, Altekar W. Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J Biochem Biophys*, 1988, 25: 674–686
- 26 Sánchez-Porro C, Mellado E, Bertoldo C, et al. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic

- bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles*, 2003, 7: 221–228
- 27 Moran J W, Witter L D. Effect of sugars on D-arabitol production and glucose metabolism in *Saccharomyces rouxii*. *J Bacteriol*, 1979, 138: 823–831
  - 28 de Montigny J, Straub M L, Potier S, et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Lett*, 2000, 487: 52–55
  - 29 Seo J S, Chong H, Park H S, et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 63–68
  - 30 Hocking A D, Norton R S. Natural-abundance  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies on the internal solutes of xerophilic fungi. *Microbiology*, 1983, 129: 2915–2925
  - 31 Leong S L L, Lantz H, Pettersson O V, et al. Genome and physiology of the ascomycete filamentous fungus *Xeromyces bisporus*, the most xerophilic organism isolated to date. *Environ Microbiol*, 2015, 17: 496–513
  - 32 Lucas S, Han J, Lapidus A, et al. Complete genome sequence of the thermophilic, piezophilic, heterotrophic bacterium *Marinitoga piezophila* KA3. *J Bacteriol*, 2012, 194: 5974–5975
  - 33 Aono E, Baba T, Ara T, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of *Shewanella violacea*, a psychrophilic and piezophilic bacterium from deep sea floor sediments. *Mol Biosyst*, 2010, 6: 1216–1226
  - 34 Yuan M, Chen M, Zhang W, et al. Genome sequence and transcriptome analysis of the radioresistant bacterium *Deinococcus gobiensis*: insights into the extreme environmental adaptations. *PLoS ONE*, 2012, 7: e34458
  - 35 Zivanovic Y, Armengaud J, Lagorce A, et al. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. *Genome Biol*, 2009, 10: R70
  - 36 Zhang Y M, Wong T Y, Chen L Y, et al. Induction of a futile embden-meyerhof-parnas pathway in *Deinococcus radiodurans* by Mn: possible role of the pentose phosphate pathway in cell survival. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 105–112
  - 37 Carapito C, Muller D, Turlin E, et al. Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant beta-proteobacterium with an unsequenced genome. *Biochimie*, 2006, 88: 595–606
  - 38 Bertin P N, Heinrich-Salmeron A, Pelletier E, et al. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J*, 2011, 5: 1735–1747
  - 39 Schmid A K, Allers T, DiRuggiero J. SnapShot: microbial extremophiles. *Cell*, 2020, 180: 818–818.e1
  - 40 Takano K, Aoi A, Koga Y, et al. Evolvability of thermophilic proteins from archaea and bacteria. *Biochemistry*, 2013, 52: 4774–4780
  - 41 Martin A, McMinn A. Sea ice, extremophiles and life on extra-terrestrial ocean worlds. *Int J Astrobiol*, 2017, 17: 1–16
  - 42 Charlier D, Droogmans L. Microbial life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 2974–2984
  - 43 Siliakus M F, van der Oost J, Kengen S W M. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 2017, 21: 651–670
  - 44 Heine M, Chandra S B C. The linkage between reverse gyrase and hyperthermophiles: a review of their invariable association. *J Microbiol*, 2009, 47: 229–234
  - 45 Kalichuk V, Béhar G, Renodon-Cornière A, et al. The archaeal “7 kDa DNA-binding” proteins: extended characterization of an old gifted family. *Sci Rep*, 2016, 6: 37274
  - 46 Li H, Ji X, Zhou Z, et al. *Thermus thermophilus* proteins that are differentially expressed in response to growth temperature and their implication in thermoadaptation. *J Proteome Res*, 2010, 9: 855–864
  - 47 Farias S T, Bonato M. Preferred amino acids and thermostability. *Genet Mol Res*, 2003, 2: 383–393
  - 48 Zeldovich K B, Berezovsky I N, Shakhnovich E I. Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation. *PLoS Comput Biol*, 2007, 3: e5
  - 49 Kumar S, Tsai C J, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*, 2000, 13: 179–191
  - 50 Pack S P, Kang T J, Yoo Y J. Protein thermostabilizing factors: high relative occurrence of amino acids, residual properties, and secondary structure type in different residual state. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171: 1212–1226
  - 51 Royter M, Schmidt M, Elend C, et al. Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles*, 2009, 13: 769–783
  - 52 Gurumurthy D M, Neelagund S E. Molecular characterization of industrially viable extreme thermostable novel alpha-amylase of *geobacillus* sp

- Iso5 isolated from geothermal spring. *J Pure Appl Microbiol*, 2012, 6: 1759–1773
- 53 Zambare V P, Bhalla A, Muthukumarappan K, et al. Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles*, 2011, 15: 611–618
- 54 Mechelke M, Koeck D E, Broeker J, et al. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*—Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *J Biotech*, 2017, 257: 122–130
- 55 Olson D G, McBride J E, Joe Shaw A, et al. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23: 396–405
- 56 Xin M X, MA Y H. Psychrophiles and psychrotrophs (in chinese). *Microbiol China*, 1999, 26: 155–159 [辛明秀, 马延和. 嗜冷菌和耐冷菌. 微生物学通报, 1999, 26: 155–159]
- 57 Collins T, Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 2857–2871
- 58 Pikuta E V, Marsic D, Bej A, et al. *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 473–478
- 59 Zhu S, Lin D, Xiong S, et al. *Carnobacterium antarcticum* sp. nov., a psychrotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil in Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2018, 68: 1672–1677
- 60 Siddiqui K S, Williams T J, Wilkins D, et al. Psychrophiles. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 2013, 41: 87–115
- 61 Chintalapati S, Kiran M D, Shivaji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol*, 2004, 50: 631–642
- 62 De Maayer P, Anderson D, Cary C, et al. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep*, 2014, 15: 508–517
- 63 Shen L, Liu Y, Wang N, et al. Variation with depth of the abundance, diversity and pigmentation of culturable bacteria in a deep ice core from the Yuzhufeng Glacier, Tibetan Plateau. *Extremophiles*, 2018, 22: 29–38
- 64 Dieser M, Greenwood M, Foreman C M. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arct Antarct Alpine Res*, 2010, 42: 396–405
- 65 Ghobakhloo A F, Johnston A, Harris L, et al. Microarray transcriptional profiling of Arctic Mesorhizobium strain N33 at low temperature provides insights into cold adaption strategies. *BMC Genomics*, 2015, 16: 383
- 66 Fonseca F, Meneghel J, Cenard S, et al. Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro organisms under conditions relevant for cryopreservation. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0152939
- 67 Lim J, Thomas T, Cavicchioli R. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J Mol Biol*, 2000, 297: 553–567
- 68 Médigue C, Krin E, Pascal G, et al. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res*, 2005, 15: 1325–1335
- 69 Methé B A, Nelson K E, Deming J W, et al. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10913–10918
- 70 Garnier M, Matamoros S, Chevret D, et al. Adaptation to cold and proteomic responses of the psychrotrophic biopreservative *Lactococcus piscium* strain CNCM I-4031. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 8011–8018
- 71 Mykytczuk N C S, Foote S J, Omelon C R, et al. Bacterial growth at  $-15^{\circ}\text{C}$ ; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J*, 2013, 7: 1211–1226
- 72 Tribelli P M, Solar Venero E C, Ricardi M M, et al. Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the Antarctic bacterium pseudomonas extremaustralis. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0145353
- 73 Domenico M, Giudice A L, Michaud L, et al. Diesel oil and PCB-degrading psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawaters (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Polar Res*, 2004, 23: 141–146
- 74 Gotor-Fernández V, Brieva R, Gotor V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2006, 40: 111–120
- 75 Kavitha M. Cold active lipases—an update. *Front Life Sci*, 2016, 9: 226–238
- 76 Pan S Y, Tan G, Convey P, et al. Diversity and bioactivity of actinomycetes from signy Island terrestrial soils, maritime Antarctic. *Adv Polar Sci*, 2013, 24: 208–212
- 77 Chaparro M A E, Nuñez H, Lirio J M, et al. Magnetic screening and heavy metal pollution studies in soils from Marambio Station, Antarctica.

- Antarct Sci*, 2007, 19: 379–393
- 78 Pikuta E V, Hoover R B, Tang J. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol*, 2007, 33: 183–209
- 79 Loukas A, Kappas I, Abatzopoulos T J. HaloDom: a new database of halophiles across all life domains. *J Biol Res (Thessalon)*, 2018, 25: 2
- 80 DasSarma S, Karan R, DasSarma P, et al. An improved genetic system for bioengineering buoyant gas vesicle nanoparticles from Haloarchaea. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 112
- 81 Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev*, 2018, 42: 353–375
- 82 Reed C J, Lewis H, Trejo E, et al. Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*, 2013, 2013: 373275
- 83 Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst*, 2008, 4: 2
- 84 Zhang L, Lang Y, Wang C, et al. Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. *Process Biochem*, 2008, 43: 642–646
- 85 Saum S H, Pfeiffer F, Palm P, et al. Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol*, 2013, 15: 1619–1633
- 86 Liang X, Sun C, Chen B, et al. Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill: an alkaliphilic silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 4951–4962
- 87 Yin J, Chen J C, Wu Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 1433–1442
- 88 Daoud L, Hmani H, Ben Ali M, et al. An original halo-alkaline protease from *Bacillus halodurans* strain US193: biochemical characterization and potential use as bio-additive in detergents. *J Polym Environ*, 2018, 26: 23–32
- 89 Li X, Yu H Y. Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40: 1357–1365
- 90 Graziano G, Merlino A. Molecular bases of protein halotolerance. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844: 850–858
- 91 Akolkar A V, Durai D, Desai A J. *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *J Appl Microbiol*, 2010, 109: 44–53
- 92 Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbiol Tech*, 2006, 39: 235–251
- 93 Jordan S N, Mullen G J. Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system. *Waste Manag*, 2007, 27: 1820–1828
- 94 Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 390–397
- 95 Boutaiba S, Bhatnagar T, Hacene H, et al. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2006, 41: 21–26
- 96 Pérez D, Martín S, Fernández-Lorente G, et al. A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS ONE*, 2011, 6: e23325
- 97 Martínez-Espinoza R M, Lledó B, Marhuenda-Egea F C, et al.  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ -assimilation in halophilic archaea: physiological analysis, *nasA* and *nasD* expressions. *Extremophiles*, 2009, 13: 785–792
- 98 Daoud L, Ali M B. Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. In: Salwan R, Sharma V. eds. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. New York: Academic Press, 2020. 51–64
- 99 Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 735–750
- 100 Sojo V, Herschy B, Whicher A, et al. The origin of life in alkaline hydrothermal vents. *Astrobiology*, 2016, 16: 181–197
- 101 Danchin A. Microorganisms in alkaline environments. *Biochimie*, 1992, 74: 594
- 102 Krulwich T A, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 330–343
- 103 Paavilainen S, Heliö P, Korpela T. Conversion of carbohydrates to organic acids by alkaliphilic bacilli. *J Ferment Bioeng*, 1994, 78: 217–222
- 104 Fujisawa M, Fackelmayer O J, Liu J, et al. The ATP synthase a-subunit of extreme alkaliphiles is a distinct variant: mutations in the critical alkaliphile-specific residue Lys-180 and other residues that support alkaliphile oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, 2010, 285: 32105–32115
- 105 Wang Z X, Hicks D B, Guffanti A A, et al. Replacement of amino acid sequence features of a- and c-subunits of ATP synthases of Alkaliphilic *Bacillus* with the *Bacillus* consensus sequence results in defective oxidative phosphorylation and non-fermentative growth at pH 10.5. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26546–26554
- 106 Matsuno T, Yumoto I. Bioenergetics and the role of soluble cytochromes C for alkaline adaptation in gram-negative alkaliphilic *Pseudomonas*.

- Biomed Res Int, 2015, 2015: 847945
- 107 Popinako A, Antonov M, Tikhonov A, et al. Structural adaptations of octaheme nitrite reductases from haloalkaliphilic *Thioalkalivibrio* bacteria to alkaline pH and high salinity. [PLoS ONE](#), 2017, 12: e0177392
- 108 Kapoor M, Beg Q K, Bhushan B, et al. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. [Process Biochem](#), 2001, 36: 803–807
- 109 Kobayashi T, Koike K, Yoshimatsu T, et al. Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate Lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. [Biosci Biotechnol Biochem](#), 1999, 63: 65–72
- 110 Fabry B, Delagoutte T, Serieys L, et al. Enzyme in paper recycling: effect of enzyme on stickies. ATIP Assoc Tech de L'Industrie Papetiere, 2014, 68: 10–18
- 111 Simkhada J R, Mander P, Cho S S, et al. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. [Process Biochem](#), 2010, 45: 88–93
- 112 Kudrya V A, Simonenko I A. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 1994, 41: 505–509
- 113 Yokaryo H, Tokiwa Y. Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid. [J Gen Appl Microbiol](#), 2014, 60: 270–275
- 114 Aono R, Horikoshi K. Carotenes produced by alkaliphilic yellow-pigmented strains of *Bacillus*. [Agric Biol Chem](#), 1991, 55: 2643–2645
- 115 Takaichi S, Oh-Oka H, Maoka T, et al. Novel carotenoid glucoside esters from alkaliphilic heliobacteria. [Arch Microbiol](#), 2003, 179: 95–100
- 116 Dietera A, Hamm A, Fiedler H P, et al. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. [J Antibiot](#), 2003, 56: 639–646
- 117 Thumar J T, Dhulia K, Singh S P. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. [World J Microbiol Biotechnol](#), 2010, 26: 2081–2087
- 118 Schleper C, Piihler G, Kuhlmoegen B, et al. Life at extremely low pH. [Nature](#), 1995, 375: 741–742
- 119 Waksman S A, Joffe J S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. [J Bacteriol](#), 1922, 7: 239–256
- 120 Davidenko T I, Chuenko A V, Zakharova I Y, et al. Immobilized elastoterase. [Pharm Chem J](#), 1997, 31: 396–398
- 121 Konings W N, Albers S V, Koning S, et al. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. [Antonie van Leeuwenhoek](#), 2002, 81: 61–72
- 122 Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. [Trends Microbiol](#), 2007, 15: 165–171
- 123 Amaro A M, Chamorro D, Seeger M, et al. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. [J Bacteriol](#), 1991, 173: 910–915
- 124 Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. [Nature](#), 2004, 428: 37–43
- 125 Gimpler H, Weis U, Weis C, et al. *Dunaliella acidophila*—an alga with a positive membrane potential. [New Phytol](#), 1989, 113: 175–184
- 126 Crossman L, Holden M, Pain A, et al. Genomes beyond compare. [Nat Rev Microbiol](#), 2004, 2: 616–617
- 127 Alvarez-Ordóñez A, Fernández A, Bernardo A, et al. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. [Int J Food Microbiol](#), 2010, 136: 278–282
- 128 Shah A R, Shah R K, Madamwar D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. [Bioresource Tech](#), 2006, 97: 2047–2053
- 129 Sharma A, Satyanarayana T. High maltose-forming, Ca<sup>2+</sup>-independent and acid stable  $\alpha$ -amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola*. [Biotechnol Lett](#), 2010, 32: 1503–1507
- 130 Liao H, Xu C, Tan S, et al. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. [Bioresource Technol](#), 2012, 123: 117–124
- 131 Kaunietis A, Buivydas A, Čitavičius D J, et al. Heterologous biosynthesis and characterization of a glycosin from a thermophilic bacterium. [Nat Commun](#), 2019, 10: 1115
- 132 Tan D, Xue Y S, Aibaidula G, et al. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. [Bioresour Technol](#), 2011, 102: 8130–8136
- 133 Fu X Z, Tan D, Aibaidula G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. [Metab Eng](#), 2014, 23: 78–91

- 134 Li T, Guo Y Y, Qiao G Q, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1264–1274
- 135 Chen X, Yin J, Ye J, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresour Technol*, 2017, 244: 534–541
- 136 Sun H, Jia H, Li J, et al. Rational synthetic combination genetic devices boosting high temperature ethanol fermentation. *Synth Syst Biotech*, 2017, 2: 121–129
- 137 Ni J, Gao Y Y, Tao F, et al. Temperature-directed biocatalysis for the sustainable production of aromatic aldehydes or alcohols. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 1214–1217
- 138 Heuer V B, Inagaki F, Morono Y, et al. Temperature limits to deep seafloor life in the Nankai Trough subduction zone. *Science*, 2020, 370: 1230–1234
- 139 Williams E, Lowe T M, Savas J, et al. Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles*, 2007, 11: 19–29
- 140 Christel S, Herold M, Bellenberg S, et al. Multi-omics reveals the lifestyle of the acidophilic, mineral-oxidizing model species *Leptospirillum ferriphilum*<sup>T</sup>. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84: e02091–17
- 141 Quehenberger J, Shen L, Albers S V, et al. *Sulfolobus*—a potential key organism in future biotechnology. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2474
- 142 Falb M, Pfeiffer F, Palm P, et al. Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Res*, 2005, 15: 1336–1343
- 143 Van-Thuoc D, Hashim S O, Hatti-Kaul R, et al. Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using *Bacillus halodurans* xylanase as a model. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 6271–6278
- 144 Allers T, Barak S, Liddell S, et al. Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of his-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 1759–1769
- 145 Kramm K, Engel C, Grohmann D. Transcription initiation factor TBP: old friend new questions. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47: 411–423
- 146 Reichlen M J, Murakami K S, Ferry J G. Functional analysis of the three TATA binding protein homologs in *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol*, 2010, 192: 1511–1517
- 147 Wang Y L, Duttke S H C, Chen K, et al. TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev*, 2014, 28: 1550–1555
- 148 DasSarma P, DasSarma S. Survival of microbes in Earth's stratosphere. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 43: 24–30
- 149 Horneck G, Klaus D M, Mancinelli R L. Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74: 121–156
- 150 DasSarma S, DasSarma P, Laye V J, et al. Extremophilic models for astrobiology: haloarchaeal survival strategies and pigments for remote sensing. *Extremophiles*, 2020, 24: 31–41
- 151 Dalton J B, Palmer-Moloney L J, Rogoff D, et al. Remote monitoring of hypersaline environments in San Francisco Bay, CA, USA. *Int J Remote Sens*, 2009, 30: 2933–2949
- 152 Sahle C J, Schroer M A, Jeffries C M, et al. Hydration in aqueous solutions of ectoine and hydroxyectoine. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20: 27917–27923
- 153 Castro-Ochoa K F, Vargas-Robles H, Cháñez-Paredes S, et al. Homoectoine protects against colitis by preventing a claudin switch in epithelial tight junctions. *Dig Dis Sci*, 2019, 64: 409–420

## Extremophiles and their applications

ZHUANG YingTan<sup>1,2,3</sup>, LIU RuiCun<sup>1</sup>, CHEN YuLu<sup>1</sup>, YANG CenYue<sup>4</sup>, YU Yan<sup>4</sup>, WANG Tao<sup>5</sup>,  
WANG YouLiang<sup>6</sup>, SONG YaJun<sup>1</sup> & TENG Yue<sup>1</sup>

*1 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;*

*2 School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China;*

*3 School of Basic Medical sciences, Shandong University, Jinan 250100, China;*

*4 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;*

*5 School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300110, China;*

*6 Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*

Extremophiles are a group of organisms that thrive under extreme environmental conditions (e.g., high/low temperature, pH, salinity, and pressure) in which most life forms find difficulty to survive. Special living conditions lead to their special genetic background and metabolic pathways, and they can produce special enzymes (extremozymes) and active ingredients (extremolytes). As a special microbial community, extremophiles have great potential in biomedicine, bioenergy, biomaterials and other fields. The study of extremophiles is not only related to the origin and evolution of life, but also significant to the development of biotechnology and other fields. This review summarizes the concept of extreme environment and extremophiles, and the potential application of extremophiles and extremozymes in the medical, biorefinery and other fields. In addition, the adaptation mechanism of extremophiles under various conditions and the application of synthetic biology in extremophiles are also introduced. Furthermore, this review explores the challenges in the development of extremophiles and the comprehensive application potential of extremophiles and extremozymes in space and national defense, which is partly due to their specificity and efficiency, and points out the necessity for accelerating extremophile research.

**extremophiles, extremozymes, extreme environment, adaptation mechanism, synthetic biology**

doi: [10.1360/SSV-2021-0096](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0096)