微生物嗜盐酶盐适应性的分子结构基础研究

阎 松^{1,2} 陈 雷³ 林秀坤^{1*}

(¹中国科学院海洋所实验海洋生物学重点实验室, 青岛 266071; ²大连交通大学环境与化学工程学院, 大连 116028; ³哈尔滨工业大学(威海)海洋学院, 威海 264209)

摘要 由高盐环境中生长的微生物里分离出的嗜盐酶在高盐度下仍然具有催化活性,工业 上具有良好的应用前景。一些嗜盐酶已被克隆纯化出来,它们的分子结构特点也已经被广泛研究。 该文从嗜盐酶的蛋白质序列和结构特征等方面综述了嗜盐酶嗜盐的分子结构基础研究进展,分析 了存在的问题并对未来工作提出了展望。研究嗜盐酶盐适应性的分子基础,可以为新的功能蛋白 的发展和鉴定提供依据。

关键词 嗜盐酶;盐适应性;分子结构基础

1 引言

嗜盐菌(halophiles)是在高盐浓度下生长的微生物,主要指中度嗜盐菌(最适生长盐度为3%~15%)和极端嗜盐菌(最适生长盐度为15%~30%),通常生活在海洋、盐湖、盐土、盐场等盐域环境中。嗜盐菌近年来受到越来越多的重视,与此相关的研究也日益广泛和细致。嗜盐菌由于生理性质独特,其体内很多酶在高盐浓度下保持稳定,称为嗜盐酶,通常具有极高的盐耐受性、较高的热耐受性和对有机溶剂的抗性,因而以嗜盐菌作为产酶资源已成为一个新的研究热点。应用于水产、化工、制药、石油、发酵等排放高浓度无机盐废水的工业部门^[1]。

对嗜盐菌的盐适应性机理研究较多,如嗜盐菌 紫膜及H⁺泵作用、高效的渗透压调节机制、菌体 蛋白独特的嗜盐策略、基因组可能的进化机制等^[2], 而嗜盐菌产生的酶的特性也是其盐适应性的重要原 因。对嗜盐酶的分子结构研究可为筛选具有更高应 用价值的嗜盐酶提供基础,促进嗜盐酶的工业应用。 本文综述了嗜盐酶盐适应性分子结构基础的研究进 展,以期为嗜盐酶分子生物学的相关研究提供资料。

2 微生物嗜盐酶基因的克隆表达

研究嗜盐酶的结构与功能并在实际中得以应 用需要有足够量的酶蛋白。对于表达量较小的嗜盐 酶而言,提高酶产量最常用的方法是克隆相应酶基 因,然后在异源宿主菌中实现大量表达。嗜盐菌基 因在*Escherichia. coli*等宿主中的异源表达是在低离 子强度下发生的,这一条件会使嗜盐酶发生错误折 叠或聚集而失活^[3]。在尿素等变性剂存在时嗜盐酶 蛋白发生解折叠或溶解,通常在NaCl中可以进行复 性,得到与天然酶相似性质的活性蛋白^[4-5]。由于嗜 盐酶基因异源表达后酶可能失活,人们寻找可以代 替大肠杆菌的宿主系统,Allers^[6]利用成熟的基因工 程手段建立了一个表达体系,使天然条件下嗜盐蛋 白能够在嗜盐古菌*Haloferax volcanii*中进行高效表 达和纯化。

嗜盐酶基因的克隆和表达仍然是一项具有挑 战性的工作。然而,近年来已有对嗜盐性的糖酶、 蛋白酶和抗氧化剂酶基因的克隆和基因编码特性的 报道,是进一步进行嗜盐酶的序列分析、结构功能 分析及生化性质研究的基础。酶可分类为水解酶、 氧化还原酶、连接酶及异构酶等。部分克隆或表达 的海洋微生物嗜盐酶列于表1。

3 嗜盐酶盐适应性的分子结构基础研究

一般来说, 嗜盐菌菌体内的酶也是嗜盐性的, 其产生、稳定和发挥活性都需要较高盐度。但也有 酶的性质与非嗜盐酶类似, Madern等^[15]由极端嗜盐 菌*Salinibacter ruber*中分离的苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase), 在不加盐时酶非常稳定, 而在低浓 度盐孵育下酶蛋白即解折叠, 高盐浓度下活性下降。

为解释嗜盐酶的盐适应性机制,存在两种理论: 一是高离子强度的环境可通过几个关键离子的相互

收稿日期: 2011-07-25 接受日期: 2011-10-20 中国博士后基金(No.20100471579)资助项目 *通讯作者。Tel/Fax: 0532-82898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com

	Table 1 Examples of some cloned natophilic enzymes from marme incroorganisms		
酶类别	酶	来源	文献
Enzyme class	Enzyme	Source	Reference
Hydrolase	Uracil-DNA glycosylase	Psychrobacter sp.	[7]
	β-lactamase	Vibrio fischeri	[8]
	β-agarase	Flavobacterium Zobellia galactanivorans	[9]
		Marine bacterium Pseudoalteromonas sp.	[10]
Oxido-reductase	Alanine dehydrogenase	Marine psychrophilic Bacterium	[11]
	Flavin reductase	Marine bacterium Photobacterium leiognathi	[12]
Ligase	Carbamoyl phosphate synthetase	Pyrococcus abyssi	[13]
Isomerase	D: -Xylose isomerase	Vibrio sp.	[14]

作用和巨大的水网络来稳定蛋白质^[16];二是酸性的, 高离子表面和弱疏水内核作为这些蛋白的平衡因子 维持它们在高盐浓度下的折叠^[17]。

3.1 离子结合位点对嗜盐酶的影响

有一些关于嗜盐蛋白与阴离子、阳离子结合 的报道。在蛋白亚基间的区域经常可发现氯离子, 氯离子是最普遍的阴离子,有较大的离子半径,蛋 白与氯离子相互作用可导致与表面作用的水分子 数量下降^[18]。Madern等^[19]对来自嗜盐菌Haloarcula marismortui(Hm)的苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MalDH)二聚体进行点突变研究, 说明了氯离 子结合位点在酶对盐的适应性中的作用。氯离子结 合位点的内部亚基K205相关基因突变后,破坏了与 盐桥相关的内部亚基的氯离子结合位点, 在KCl存 在时酶稳定性发生改变,而在KF存在时不变化。因 为电负性强的氟离子能提供亚基间足够有利的相互 作用,来补偿由突变引起的破坏,电负性低的氯离子 则不行。[K205A]低聚物状态随阴离子性质而改变, 高盐情况下,当阴离子是氯离子时,[K205A]突变体 是二聚体, 而使用氟离子时, 是四聚体。高KCl浓度 下蛋白的结晶结构分析也证实了阴离子结合位点在 维持嗜盐蛋白稳定性中的重要作用,有完整盐桥的 [K205A]突变体不能形成四聚体,而有完整阴离子结 合位点的[R207S, R292S]^[20]Hm MalDH可形成四聚 体。

钠、钾有较小的离子半径,蛋白与这些离子相 互作用时,其表面水分子分布更为正常^[18]。Mevarech等^[17]认为需要较高NaCl或KCl浓度使嗜盐菌苹 果酸脱氢酶hMDH(*Haloarcula marismortui*, malatedehydrogenase)稳定存在,是因为几种离子与折叠 多肽表面特殊位点结合的亲和性较低,稳定了蛋白质的活性构像。Britton等^[21]利用模拟嗜盐菌细胞内的环境使结晶生长,进行了嗜盐菌Haloferax mediterranei(Hm)葡萄糖脱氢酶(glucose dehydroge-nase, GlcDH)1.6-Å的结构测定。研究表明酶表面以酸性氨基酸残基修饰,有部分与钾反离子结合而被中和,这在与底物的结合中也有作用,束缚反离子簇(bound counterion cluster)的利用可能代表了一新的盐适应性机制,反离子是否在其他嗜盐蛋白中也有出现,需要这类酶的更多结构数据加以证实。

3.2 嗜盐酶的氨基酸组成特性分析

Kastritis等^[22]利用同源建模(homology modeling) 对来自非嗜盐及嗜盐生物的同源二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductases, DHFRs)的氨基酸组成及序列进 行了比对。发现它们的主要区别是嗜盐DHFRs的酸 性氨基酸残基,尤其是天冬氨酸(aspartic acid, Asp) 和谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量增加,而碱性氨基 酸残基尤其是赖氨酸(lysine, Lys)含量降低;另一显 著且也许更重要的区别是嗜盐蛋白整个疏水氨基酸 残基含量的下降,疏水内核更弱。他们认为来自嗜 盐古菌的DHFRs的嗜盐机制是高电负性的表面以及 较弱的疏水内核作为平衡因子来维持蛋白的折叠能 力。

Altermark等^[18]对嗜盐核酸内切酶I进行了研究, 认为表面等电点和疏水性的降低是酶盐适应性的原 因,表面的Asp及Glu等酸性氨基酸残基增加,Lys残 基减少,引起等电点下降。酸性氨基酸残基增加可 提高溶解性,而负电荷间的排斥力使蛋白可以适应 高盐环境。这一结论符合普遍的嗜盐酶盐适应性机 制。所研究的核酸内切酶与DNA的负电荷磷酸骨 架结合, DNA结合袋内(DNA binding pocket)的等电 点增加, 而DNA结合袋外部的等电点较低, 丙氨酸 (alanine, Ala)和缬氨酸(valine, Val)等残基含量减少 使酶表面疏水性降低。酶中心疏水性较高及极性较 低也是其盐适应性的原因。

Evilia等^[23]鉴别出几种嗜盐古菌半胱氨酰-tRNA 合成酶(cysteinyl-tRNA synthetases, CysRS)中一种特 异性的多肽,是其它非嗜盐种类的CysRS所缺少的, 说明这一多肽与嗜盐CysRS对高盐的适应性相关。 该多肽接近于催化区的活性位点,富含酸性氨基酸 残基。嗜盐菌*Halobacterium species* NRC-1的CysRS 缺失这一多肽,可导致催化效率下降,保持肽的长度 但以中性或碱性氨基酸残基取代酸性残基,对酶没 有大的有害影响,说明肽的酸性对tRNA氨酰化的催 化速率并不重要。

通过嗜盐酶进行表面残基的突变研究, 检测 对酶的嗜盐行为及生化特性,可以看出某些氨基 酸对酶嗜盐性的重要影响。Jolley等^[24]利用来自 Pseudomonas jluorescens的酶结晶结构建立了嗜盐 古菌Haloferax volcarzii的二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase)的同源模拟结构,并 设计了4个Haloferax二氢硫辛酰胺脱氢酶的定点突 变,重组突变体表达之后,数据显示4个带负电荷的 Glu残基簇对二氢硫辛酰胺脱氢酶的盐适应性至关 重要。当被Asp残基取代时,酶显示出对高盐的较 高的依赖性,但如果被中性氨基酸残基取代,这种依 赖性大幅降低。Tokunaga等^[25]对Halomonas sp. 593 的核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, HaNDK)进行了研究,发现HaNDK的C端残基134和 135是Glu-Glu, 而非嗜盐Pseudomonas NDK(PaNDK) 的Ala-Ala, 对酶的134-135残基(E134A-E135A)进行 双突变, HaNDK就失去了嗜盐性质, PaNDK双突变 后则具有了嗜盐特性,说明这两个C端氨基酸决定 了酶的嗜盐性质, 也说明了酸性氨基酸残基对酶盐 适应性的重要作用。

对嗜盐酶氨基酸组成特性的认识有较多的 文献趋于一致,即嗜盐酶蛋白表面富含酸性残基。 但也有例外,Sivakumar等^[26]对嗜盐酶AmyA(一 种来自Halothermothrix orenii的分泌型α-淀粉酶 (α-amylase))进行结构分析,表明AmyA酶表面缺乏 酸性氨基酸残基而使酶蛋白在高盐下保持稳定。对 嗜盐古菌Halobacterium salinarum的核苷二磷酸 激 酶HsNDK(Halobacterium salinarum, diphosphate kinase)的结晶形态研究也显示了不同的结果,增加 的碱性序列——7个组氨酸(histidine, His)和1个精氨 酸(arginine, Arg)残基使酶保持嗜盐性,同时使酶折 叠,增加了其在低盐浓度中的稳定性。观察到的嗜盐 NDKs在低盐下稳定说明它们起源于非嗜盐NDKs^[27]。 在三维结构中,HsNDK末端的相互位置很近,N端负 电荷可能被额外的Arg或His残基覆盖,这可能是在胞 质的低盐环境中酶保持溶解性和活性的原因。

由对嗜盐酶的大多数序列研究可知,蛋白表面 富含酸性残基是嗜盐酶主要的结构共同特性,表面 负电荷有两种作用:(1)提供水合羧基使蛋白在高盐 浓度下维持溶解状态^[17]。因为负电荷的酶蛋白表面 可以与水合离子结合,保持表面的水化层,降低表面 的疏水性,降低其在高盐浓度下的聚集趋势^[3];(2) 静电斥力的不稳定性可以弥补由盐度增加引起的疏 水效应,一般高盐浓度下折叠蛋白不稳定,溶剂优先 与非折叠蛋白相互作用,而蛋白表面的负电荷使溶 剂更倾向与折叠多肽而不是非折叠多肽发生作用。 盐分子大量存在会使酶的疏水内核钝化,使酶的结 构自由能降低,降低催化活性所必需的蛋白质的动 态弹性。即使在稳定的盐度下,静电斥力也会使酶 维持边缘稳定性,这是蛋白结构的特点。

嗜盐酶的分子表面特性不仅是酸性电荷的增加,也可能包含一些独特序列的改变,后者可能更为 重要。显然,对嗜盐酶的基因组序列分析在很大程 度上被忽视了。另外,定点突变研究表明单个氨基 酸残基的变化就会影响酶的嗜盐性,说明空间结构 对嗜盐酶在高盐浓度下保持稳定具有重要作用,需 要更为深入的结构研究来了解嗜盐酶的盐适应性机 制。

3.3 嗜盐酶的空间结构研究

Rafiee等^[28]由嗜盐细菌Virgibacillus halodenitrificans中经盐诱导得到具有激酶活性的肽,为盐诱导 因子Sif-A(salt-inducible factor, Sif-A)。对Sif-A的氨 基酸序列进行二级结构及转膜区预测分析,认为多 肽有27个氨基酸残基的信号肽(2.667 kDa),氨基酸 序列的模体(motif)分析表明肽的C端有一与其功能 相关的p-环NTP酶区。Sif-A可能与菌株的渗透抗性 (osmoresistance)机制相关, V. halodenitrificans对高盐 度下合成的Sif-A有响应,然后利用N端信号肽分泌 到胞质空间, Sif-A的p环区(p-loop domain)扮演了激 酶角色,直接或间接参与离子通道等细胞渗透调节 组份的相互作用,而这些组份的磷酸化作用可能也 与蛋白的盐适应性机制有关,这些结论还需要进一 步的研究确认。

Binbuga等^[29]在高盐溶液(3.5 mol/L NaCl)中利 用NMR技术研究了嗜盐菌Haloferax volcanii的二氢 叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)构象,结 构计算表明蛋白质溶液的结构与以前确定的结晶结 构类似,但在β3的N端及连接β7和β8的β转角处有所 不同。Boroujerdi等^[30]研究了嗜盐酶DHFR1与叶酸 结合的空间结构,并与嗜温叶酸结合酶的空间构象 进行了比较。Tan等^[31]对来自Halothermothrix orenii 的嗜盐、热稳定的α-淀粉酶——AmyB的结晶结构 进行研究,发现AmyB除具有13族糖苷水解酶(glycoside hydrolase)的典型结构外,还有一个额外的N端 区,形成一个大的凹槽:N-C凹槽。对AmyB和除去N 端区的AmyB的结构及生化性质进行分析,表明N端 能够提高酶对粗淀粉的结合能力,而且理论模型显 示N-C凹槽可以在空间和化学结构上容纳类似A-淀 粉类的大分子底物。

Kastritis等^[22]通过DSSP(definition of secondary structure of proteins,蛋白质二级结构构象参数数据 库)计算得到嗜盐古菌DHFRs结构模型β链的平均长 度,并与10个由实验确定的非嗜盐DHFRs结构的平 均长度作了对比。由检晶仪确定的结构中,嗜盐古 菌DHFRs的β折叠比非嗜盐的DHFRs更为狭窄。β 折叠是酶的核心,说明它的形状及链的长度所表现 的结构特性增强了盐适应性。来自嗜盐古菌*Halobacterium volcanii*的DHFR中,酶的结构与非嗜盐 DHFRs非常类似,它包含混合的β折叠,由8个β链组 成酶的核心被4个α螺旋和几个回折包围。

对嗜盐核酸内切酶I的二级结构分析表明,酶的 约45%的氨基酸是螺旋结构,而约15%为β折叠。对 形成螺旋的氨基酸序列分析显示,对盐适应的种群 有明显较高的螺旋倾向及较高的B因子(a new scale of stratified B-factors, derived from the Protein Data Bank), B因子较高可能会防止酶在高盐浓度中的构 像过于刚性^[18]。

对一来自盐沼的铁氧化还原蛋白(ferredoxin)的 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)结构揭 示, 与非嗜盐的植物型(plant-type)铁氧化还原蛋白 相比, 它有2个额外的高酸性α螺旋, 除去这一插入 会导致其失去蛋白的嗜盐性质^[32]。Rao等^[33]的研究 也说明了α螺旋结构在嗜盐酶的盐适应性及酶活性 中所起的作用。他们使来自古菌*Haloarcula marismortui*的嗜盐酯酶LipC在*Escherichia coli* BL21中过 量表达,研究了其在高盐浓度下的溶液特性及活性。 通过圆二色谱(circular dichroism, CD)、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS)及小角中子散射(small angle neutron scattering, SANS)分析了LipC在溶液中 的物理状态, CD测定表明在最适盐度下酶有最高的 α螺旋结构,盐度偏离最适条件,二级结构显著减少, 酶活性也下降,说明α螺旋结构与酶活性相关, SANS 分析揭示了最适盐度下酶有较高比例的单聚体和二 聚体,同时随盐度增加集合体的大小增加,这与DLS 的研究数据一致。

Yonezawa等^[34]利用光散射(light scattering)和化 学交联(cross-linking)分析了来自中度嗜盐菌 Halomonas sp.593的核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, HaNDK)结构,显示其形成的是二聚体 结构,而非嗜盐酶, Pseudomonas NDK(PaNDK)及其 它来自革兰氏阴性细菌的 NDKs均形成四聚体。嗜 盐菌 Haloferax mediterranei(Hm)的葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GlcDH) HmGlcDH也以二 聚体存在,每个亚基包含357个残基的多肽链,折叠 成被一深的裂隙分隔成的2个区域,活性位点位于 其中。HmGlcDH亚基的二级结构与Thermoplasma acidophilum(Ta) GlcDH四聚体的非常相似^[21]。

空间结构测定是研究蛋白质功能的有效手段, 但对嗜盐酶空间结构研究的文献有限,有的认为螺 旋结构在酶的盐适应性中起到一定作用,有的嗜盐 酶主要以二聚体形式存在,还有的酶的结构与非嗜 盐酶非常类似。因此,有必要研究更多嗜盐酶的分 子结构与功能关系,揭示其嗜盐机制。

4 展望

由以上叙述内容可以看出,对嗜盐酶盐适应性 分子结构基础的研究还有待深入,即便是嗜盐酶氨 基酸组成的特性也没有一个统一的认识,二级结构 预测、各种计算软件的分析结果更缺乏总结性的 结论。嗜盐蛋白在高盐浓度中的稳定性与氨基酸 残基群在蛋白质表面的三维空间排列更为相关,而 不是绝对的某类残基数量。因此,对嗜盐酶的空间 结构研究更为重要。需要有更细致、更好的解决 方法,如在高盐、低盐或水中的X射线晶体学(X-ray crystallography, X-ray)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)结构分析,来揭示酶嗜盐机制的精确细节,探讨其盐适应性的分子机制。

通过酶生物技术及高通量筛选的方法对酶分 子进行改造,提高其稳定性、活性及立体选择性,筛 选具有更高应用价值的新酶是一个很有前景的方 向。详细的结构信息有助于蛋白质工程的实施。直 接进化的方法,包括随机突变、易错PCR(error-prone PCR)和DNA改组(DNA shuffling)等可对期望得到的 特性进行筛选。通过突变和直接进化实验进行的筛 选也不仅仅局限于自然发生的酶,通过提高嗜盐酶 稳定性,依赖于克隆基因和表达系统的定向进化(directed evolution)方法,可以改变嗜盐酶的特性。点突 变需要掌握稳定性和活性不同的相似酶家族的氨基 酸序列及三维结构信息,是设计酶的最主要方法之 一。结晶结构可为改变氨基酸序列提供线索,并根 据额外的二硫键、疏水性和盐桥赋予其稳定性,合 理设计产生的酶将提高稳定性而不改变催化活性。

海洋酶生物技术将是未来工业的研究热点, 嗜 盐微生物生产的嗜盐酶在盐域环境中具有更高的稳 定性和适应性, 在生物化工工艺中有良好的应用前 景。我们也注意到这一大类生物中只有少数种类被 分离出来并详细鉴定, 而大量嗜盐酶还未被发现。 对高盐条件下酶稳定性和活性结构基础的研究还远 远不够, 不具备在工程学上选择出稳定嗜盐酶的理 论基础, 也不能以预期的方式改变其特性和催化活 性。因此, 需要对更多的嗜盐酶进行深入的分子结 构与功能研究, 才能提高嗜盐酶在生物催化和生物 转化中的应用, 为嗜盐酶的工业化生产和推广应用 奠定良好的基础。

参考文献 (References)

- 孟凡旭,吴 敏,张会斌,童浩萱,殷佳慧.阿牙克库木湖嗜 盐菌的分离及功能酶的筛选.浙江大学学报(理学版) 2006; 33(6):671-5.
- 2 Kennedy SP, Ng WV, Salzberg SL, Hood L, DasSarma S. Understanding the adaptation of halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. Genome Res 2001; 11(10): 1641-50.
- 3 Hough DW, Danson MJ. Extremozymes. Curr Opin Chem Biol 1999; 3(1): 39-46.
- 4 Díaz S, Pérez-Pomares F, Pire C, Ferrer J, Bonete MJ. Gene cloning, heterologous overexpression and optimized refolding of the

NAD-glutamate dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. Extremophiles 2006; 10(2): 105-15.

- 5 Ishibashi M, Oda K, Arakawa T, Tokunaga M. Cloning, expression, purification and activation by Na ion of halophilic alkaline phosphatase from moderate halophile *Halomonas* sp.593. Protein Expr Purif 2011; 76(1): 97-102.
- 6 Allers T. Overexpression and purification of halophilic proteins in *Haloferax volcanii*. Bioeng Bugs 2010; 1(4): 288-90.
- Lee MS, Kim GA, Seo MS, Lee JH, Kwon ST. Characterization of heat-labile uracil-DNA glycosylase from *Psychrobacter* sp. HJ147 and its application to the polymerase chain reaction. Biotechnol Appl Biochem 2009; 52(Pt2): 167-75.
- 8 Weng SF, Chao YF, Lin JW. Identification and characteristic analysis of the ampC gene encoding beta-lactamase from *Vibrio fischeri*. Biochem Biophys Res Commun 2004; 314(3): 838-43.
- 9 Hehemann JH, Michel G, Barbeyron T, Czjzek M. Expression, purification and preliminary X-ray diffraction analysis of the catalytic module of a beta-agarase from the *flavobacterium Zobellia galactanivorans*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2010; 66(Pt4): 413-7.
- 10 Oh C, Nikapitiya C, Lee Y, Whang I, Kim SJ, Kang DH, et al. Cloning, purification and biochemical characterization of beta agarase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. AG4. J Ind Microbiol Biotechnol 2010; 37(5): 483-94.
- 11 Irwin JA, Lynch SV, Coughlan S, Baker PJ, Gudmundsson HM, Alfredsson GA, *et al.* Alanine dehydrogenase from the psychrophilic bacterium strain PA-43: Overexpression, molecular characterization, and sequence analysis. Extremophiles 2003; 7(2): 135-43.
- 12 Crowley TE. Expression, purification, and characterization of a recombinant flavin reductase from the luminescent marine bacterium *Photobacterium leiognathi*: A set of exercises for students. Biochem Mol Biol Educ 2010; 38(3): 151-60.
- 13 Purcarea C, Hervé G, Cunin R, Evans DR. Cloning, expression, and structure analysis of carbamate kinase-like carbamoyl phosphate synthetase from *Pyrococcus abyssi*. Extremophiles 2001; 5(4): 229-39.
- 14 Umemoto Y, Shibata T, Araki T. D: -Xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214, and D: -Xylulose production from β-1,3-Xylan. Mar Biotechnol (NY) 2011; doi: 10.1007/s10126-011-9380-9.
- 15 Madern D, Zaccai G. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter rubber* behaves like a non-halophilic protein. Biochimie 2004; 86(4/5): 295-303.
- 16 Richard SB, Madern D, Garcin E, Zaccai G. Halophilic adaptation: Novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 A resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. Biochemistry 2000; 39(5): 992-1000.
- 17 Mevarech M, Frolow F, Gloss LM. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. Biophys Chem 2000; 86(2/3): 155-64.

- 18 Altermark B, Thorvaldsen S, Moe E, Smalås AO, Willassen NP. Sequence comparison and environmental adaptation of a bacterial endonuclease. Comput Biol Chem 2007; 31(3): 163-72.
- 19 Madern D, Ebel C. Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. Biochimie 2007; 89(8): 981-7.
- 20 Madern D, Ebel C, Mevarech M, Richard S, Pfister C, Zaccai G. Insights into the molecular relationships between malate and lactate dehydrogenases: Structural and biochemical properties of monomeric and dimeric intermediates of a mutant of tetrameric L-[LDH-like] malate dehydrogenase from the halophilic archae-on *Haloarcula marismortui*. Biochemistry 2000; 39(5): 1001-10.
- 21 Britton KL, Baker PJ, Fisher M, Ruzheinikov S, Gilmour DJ, Bonete MJ. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile Haloferax mediterranei. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(13): 4846-51
- 22 Kastritis PL, Papandreou NC, Hamodrakas SJ. Haloadaptation: Insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. Int J Biol Macromol 2007; 41(4): 447-53.
- 23 Evilia C, Hou YM. Acquisition of an insertion peptide for efficient aminoacylation by a halophile tRNA synthetase. Biochemistry 2006; 45(22): 6835-45.
- 24 Jolley KA, Russell RJ, Hough DW, Danson MJ. Site-directed mutagenesis and halophilicity of dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. Eur J Biochem 1997; 248(2): 362-8.
- 25 Tokunaga H, Arakawa T, Tokunaga M. Engineering of halophilic enzymes: Two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. Protein Sci 2008; 17(9): 1603-10.
- 26 Sivakumar N, Li N, Tang JW, Patel BK, Swaminathan K. Crystal structure of AmyA lacks acidic surface and provide insights into

protein stability at poly-extreme condition. FEBS Lett 2006; 580(11): 2646-52.

- 27 Ishibashi M, Arakawa T, Philo JS, Sakashita K, Yonezawa Y, Tokunaga H, *et al.* Secondary and quaternary structural transition of the halophilic archaeon nucleoside diphosphate kinase under high- and low-salt conditions. FEMS Microbiol Lett 2002; 216(2): 235-41.
- 28 Rafiee MR, Sokhansanj A, Yoosefi M, Naghizadeh MA. Identification of salt-inducible peptide with putative kinase activity in halophilic bacterium *Virgibacillus halodenitrificans*. J Biosci Bioeng 2007; 104(3): 178-81.
- 29 Binbuga B, Boroujerdi AF, Young JK. Structure in an extreme environment: NMR at high salt. Protein Sci 2007; 16(8): 1783-7.
- 30 Boroujerdi AF, Young JK. NMR-derived folate-bound structure of dihydrofolate reductase 1 from the halophile *Haloferax volcanii*. Biopolymers 2009; 91(2): 140-4.
- 31 Tan TC, Mijts BN, Swaminathan K, Patel BK, Divne C. Crystal structure of the polyextremophilic alpha-amylase AmyB from *Halothermothrix orenii*: Details of a productive enzyme-substrate complex and an N domain with a role in binding raw starch. J Mol Biol 2008; 378(4): 852-70.
- 32 Marg BL, Schweimer K, Sticht H, Oesterhelt D. A two-alphahelix extra domain mediates the halophilic character of a planttype ferredoxin from halophilic archaea. Biochemistry 2005; 44(1): 29-39.
- 33 Rao L, Zhao X, Pan F, Li Y, Xue Y, Ma Y, Lu JR. Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration. PLoS One 2009; 4(9): e6980.
- 34 Yonezawa Y, Izutsu K, Tokunaga H, Maeda H, Arakawa T, Tokunaga M. Dimeric structure of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium: Contrast to the tetrameric *Pseudomonas* counterpart. FEMS Microbiol Lett 2007; 268(1): 52-8.

Molecular Structural Basis of Microbial Halophilic Enzymes Related to Their Haloadaptation

Yan Song^{1,2}, Chen Lei³, Lin Xiukun^{1*}

(¹Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; ²School of Environmental Science and Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China; ³College of Marine Science, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract Halophilic enzymes are isolated from microorganisms lived in the environment with high salt concentration, and this kind of enzyme only functions under high salt conditions. Halophilic enzymes have been considered to have a variety of industrial applications due to their tolerance on salt. Some halophilic enzymes have been cloned and purified and their molecular structural properties have been widely studied. In the present review, the recent progresses of molecular structural basis of halophilic enzymes related to halophilic characteristics are presented. Some questions and the prospects of future studies are also discussed. This review will contribute to a further understanding of the molecular basis of haloadaptation in halophilic enzymes and will be helpful for developing and identifying functional novel proteins.

Key words halophilic enzymes; haloadaptation; molecular structural basis

Received: July 25, 2011 Accepted: October 20, 2011

This work was supported by China Postdoctoral Science Foundation (No.20100471579)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: 86-532-82898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com