

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(9):1121-1128; 4 September 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

海洋细菌活性蛋白、活性肽研究的若干新进展

吕静琳^{1,2}, 王宾香^{1,2}, 郑天凌^{1,2*}

(¹ 厦门大学滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 生命科学学院, 厦门 361005)

(² 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要:海洋蕴藏着丰富的生物活性资源,近年来海洋细菌活性蛋白及活性肽的研究在资源开发与利用领域中很受关注。本文首先分析了海洋细菌来源的各种活性蛋白及活性肽在不同层面上的生物学活性特征,其次对海洋活性蛋白及活性肽的获得方式及其在医药学、工业、水产养殖业及环境保护等领域中的应用现状与潜力作简要介绍,最后对该领域研究前景进行了展望。

关键词:海洋细菌;活性蛋白;活性肽

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1121-08

生命之源海洋作为一个复杂、开放、变化的生物有机系统,承载着各种已知种属的生物,也孕育着尚未发掘的生灵^[1]。海洋复杂的结构特征造就了生物类群的多样性,浮游动植物、真核原核微生物及海洋病毒^[2]等等共同构成了海洋生态系统的重要调控者。作为微生物类群的主要发言者,海洋细菌有着其他生态系统成员不具有的特性,成为新型独特活性物质的重要来源。具有特殊功能的脂质、多糖^[3]、蛋白肽类、抗生素、色素及生物碱等都属于该活性物质范畴。起步的相对滞后使得海洋活性物质中的蛋白及肽类研究报道不如陆地来源的多。但随着资源的不断开发利用,海洋研究领域发展迅速;同时,随着后基因组时代的到来,蛋白研究领域相当活跃,关于海洋活性蛋白及多肽的研究报道与日俱增。本文就海洋细菌蛋白与肽类的生物活性、获得途径及应用前景 3 个方面进行探讨。

1 海洋细菌蛋白及肽类物质的生物活性

细菌在海洋演替中扮演重要角色,是微生物群落与食物链中的重要成员,同时也是各类海洋活性物质的重要来源。海洋细菌来源的蛋白活性主要表现在抗菌抗肿瘤、生物酶及免疫调节等方面。

1.1 抗菌活性

微生物代谢物常表现出抗菌活性,许多海洋细菌来源的抗菌蛋白分子也具有抗菌活性。其中,来自地中海的细菌 *Marinomonas* 能产生一种新型抗菌蛋白 *marinocine*,其热稳定性好,对多种水解酶有抵抗力,抗菌谱广泛^[4]。Loloatin B^[5]和 Bogorol A^[6]分别为新几内亚海虫组织中芽孢杆菌和海洋枯草杆菌所产的新型肽类抗生素,前者为抗 G⁺ 菌的环十肽抗生素,后者能抗万古霉素耐药肠道球菌(VRE)和青霉素耐药金黄色葡萄球菌(MRSE)。Canedo 等^[7]报道了海洋生境芽孢杆菌产生的抑菌物质为环肽。

基金项目:国家“863 计划”(2008AA09Z408);国家自然科学基金重点项目、主任基金项目和面上项目(40930847, 30940002, 40876061);长江学者和创新团队发展计划项目(40821063);近海海洋环境科学国家重点实验室资助项目

* 通信作者。Tel: +86-592-2183217; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

作者简介:吕静琳(1987-),女,福建泉州人,硕士,研究方向为海洋环境微生物学。E-mail:lanx926@qq.com

收稿日期:2010-03-20;修回日期:2010-05-12

Longeon 等^[8]发现小鹅卵石中的海洋细菌 X153 天然培养液中的蛋白成分对致病弧菌有高抑制活性。在国内,漆淑华等^[9]从海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 发酵液中分离鉴定的环二肽,其中环 (Tyr-Ile), 环 (Phe-Pro), 环 (Val-Pro) 和环 (Ile-Pro) 对多种海洋细菌显示一定的抗菌活性。田黎等^[10]从 4 株海洋芽孢杆菌中分离到胞外抗菌蛋白。

近 10 年来,抗菌活性蛋白活性肽的研究随着海洋生物共生现象的发现也获得了不少进展。Wilson 等^[11]对澳大利亚悉尼海港海面表层吸附的微生物群落进行研究,分离到 8 种高效抗菌物质,经蛋白酶解抗菌活性消失,说明活性成分为蛋白。Salvatore 等^[12]在海绵 *Ircinia variabilis* 共生体中分离出 2 株能独立生存的细菌,细菌培养液中存在一系列环二肽 (DKPs), 这些 DKPs 功能并不局限于抗菌、细胞毒活性,还在 LuxR 介导的群体感应调控中充当着信号分子的重要角色。此外,在抗病毒方面,美国国立癌症研究所发现一种海洋细菌蓝绿菌 *cyanobacterium* 的蛋白 CV-N 不但能抵抗人 HIV, 还能抵抗埃博拉病毒 (Ebola Virus) 的感染^[13]。

1.2 抗肿瘤活性

在抗肿瘤活性物质研究中,海绵海藻作为抗肿瘤活性物质的重要来源而备受关注^[14]。而海洋抗肿瘤活性物质的另一重要来源是海洋细菌,来源菌种主要集中在假单胞菌属、弧菌属、微球菌属、芽孢杆菌属^[15]。

海洋细菌来源的短肽是抗肿瘤活性物质研究中的焦点,它们具有高活性、高药效性、高稳定性等特点,在药物开发领域中发挥关键作用。其中,环二肽 (cyclic dipeptides) 由 2 个氨基酸通过肽键环合形成,是自然界中最小的环肽,具有抑菌^[16]、抗癌^[17]、保护心血管^[18]、保护神经系统和改善脑功能^[19]等效用。刘涛等^[15]从海洋细菌 *Bacillus subtilis* 发酵液分离到 11 种化合物,经鉴定其中多数属于环二肽类化合物。化合物 I 对前列腺癌细胞的生长有明显的抑制作用,化合物 VI 能抗鳗弧菌,还具有体外抗肿瘤活性。Thiocoraline 是 Brandon 等从海洋细菌 *Micromonospora marina* 中提取的一种含环状巯基缩酚酸的肽类抗生素,具有抑癌作用,使细胞周期停止在 G1 期,临床开发前景广阔^[20]。Williams 等^[21]报道了来自帕劳群岛海域的藻青菌 *Lyngbya* sp. 中的一种缩酚肽类细胞毒性物质 Ulongapeptin,其对 KB 细胞的 IC₅₀ 为 0.163 mmol/L。近期发现的海洋抗菌肽类 Epinecidin-1^[22], hepcidin TH2-3^[23] 都具有抗肿瘤

活性。

1.3 生物酶活性

海洋环境独特性以及细菌产酶多样性,使得海洋蛋白与陆地生物蛋白有着极大差异。近年来,国内外科研工作者在海洋细菌生物酶资源开发方面取得了许多成果。

首先,国内研究发现深圳海域的多食鞘氨醇杆菌高产琼胶酶^[24],青岛近海的菌株 QM11 产碱性纤维素酶^[25],连云港海域的海洋细菌 L1-9 产蛋白酶、纤维素酶等细胞壁降解酶,且能抑制植物病原真菌^[26]。北极海洋微生物产蛋白水解酶的细菌远多于产多糖水解酶的细菌,温度、盐度是主要环境因子^[27-28]。上海近海的多株海洋细菌,具有胞外淀粉酶、蛋白酶及脂肪酶活性^[29]。

该领域的国外研究也是硕果累累。1997 年, Tomoo 等^[30]从海带叶子分离到的海洋单胞菌 H-4 具有胞外藻酸盐溶解酶活性,且此单胞菌可利用藻酸盐作为主要碳源。1999 年, Turkiewicz 等^[31]发现南极大磷虾肠胃里的海洋少动鞘氨醇单胞菌 116 高产嗜低温金属蛋白酶。海洋硫酸盐降解菌 WN 经硫酸铵沉降和多次柱层析分离到 DMSP: 四叶酸甲基化转移酶^[32]。Elibol 等^[33]利用固体发酵优化船蛀微生物 *Teredinobacter turnirae* 碱性蛋白酶的生产。印度海岸海水耐卤芽孢杆菌 VITP4 在广盐度培养基中生长并分泌新型胞外蛋白酶^[34]。Agrebi 等^[35]从非洲突尼斯海水中的枯草芽孢杆菌 A26 纯化出新型纤维蛋白溶解酶 (枯草杆菌蛋白酶 BSF1), 并实现对其基因的分离与测序。此外,来自海洋弧菌 No. 442 的新型几丁质酶^[36], 来自海洋芽孢杆菌 A-53 的纤维素酶^[37], 都表现出生物酶活性。

1.4 生物治藻活性

基于“以菌治藻”理念,近年关于海洋细菌在赤潮防治中的作用已有大量文献报道。据此,细菌可通过直接或间接方式杀藻^[38],其中活性蛋白一般是通过微生物菌株产生并将其分泌到胞外发挥效应的。杀藻菌常见于弧菌、假单胞菌及假交替单胞菌等。其中,来自海洋假交替单胞菌的活性蛋白研究有如 Lee 等^[39]从来自日本有明海的假交替单胞菌 A28 培养液中纯化获得能溶解骨条藻的丝氨酸蛋白酶。Mitsutani 等^[40]报道 1 株海洋假交替单胞菌 A25 在稳定期产生的蛋白质能够杀死骨条藻,具体为何种蛋白质仍在研究。而国内对抑藻活性物质成功鉴定的例子较少,假交替单胞菌 SP48 通过分泌胞外活性物质间接抑藻,可能是某种小分子蛋白或多

肽在发挥作用^[41]。此外,来自智利南部海湾的链状亚历山大藻共生的3株细菌在营养丰富时能分泌相关杀藻物质,包括氨基肽酶、脂肪酶和碱性磷酸酶等^[42]。

海洋肽类也能有效抑制有害藻,Banin等^[43]从海洋弧菌*V. shiloi*培养液分离得富含脯氨酸的十二肽——毒素P,其序列为PYPVYAPPPVVP。该胞外毒素P在NH₄Cl存在时会抑制珊瑚共生藻类(虫黄藻)的光合作用,导致藻死亡,珊瑚褪色。新型短肽Bacillamide是Jeong等^[44]从海洋高效杀藻芽孢杆菌SY-1培养液经分离并用2D-NMR及¹H-¹⁵N HMBC技术鉴定得到的,它能特异性抑制赤潮多环旋涡藻生长。郑天凌等^[1,45-52]多年来从事海洋赤潮微生物调控研究,立足于藻际微生物群落多样性分析,探索获取胞外抑藻活性物质的有效途径,同时关注赤潮生物对细菌所产生化感物质的响应,并逐步展开耦合“微生物环-赤潮-关键微生物菌群”的研究。此外,王新等^[53]的研究表明藻际细菌产生的β-葡萄糖苷酶与几丁质酶会直接导致藻细胞裂解。

1.5 肽类毒素活性

海洋动植物来源的毒素比例较大,如芋螺毒素、海葵毒素和微藻类毒素等。海洋微生物产生的毒素按其化学结构来分主要有肽类、胍胺类、聚醚类和生物碱^[54]等,多数为次级代谢产物,由基因直接编码的多肽蛋白类毒素在其中毒性最强,通常作用于离子通道,具有特定的生理活性,如镇痛、强心、抗病毒等^[55]。海洋细菌中,目前已报道的能够产生蛋白或肽类毒素的细菌以假单胞菌属、弧菌属较常见。Cheng等^[56]发现日本比目鱼病体内的致病弧菌*harveyi* T4D1分泌的Vhp1是一种具细胞毒性的蛋白酶。而来源于海洋中蓝细菌的某些肽类毒素是强烈的神经毒素,它主要产生的两类毒素中有一种是肽类毒素为肝毒素,属于环状肽,其中由7种氨基酸组成的肽则是微囊藻素(microcystin)^[57-58]。来源于蓝藻特别是铜绿微囊藻的微囊藻素是一大类50多种环肽类肝脏毒素^[59]。王新等^[54]详细论述了海洋微生物毒素的种类分布,产毒种类和机理,检测技术及毒素利用等有价值的研究。此外,近年来对海洋中共生微生物产毒素的研究也使人们对海洋多肽类及蛋白毒素有了新的认识与了解,其中河豚毒素的微生物来源说观点已经为大多数学者所接受,相关研究还表明某些毒素来源于微生物的食物链积累。

2 海洋细菌活性蛋白及活性肽的获取途径

2.1 活性蛋白获得

利用生化方法获取海洋天然蛋白是最为普遍的途径,一般可概括为粗提与精提。常用的分离方法包括:硫酸铵或丙酮梯度或平衡浓度沉降盐析,以富集蛋白;有机溶剂如乙醇、乙酸乙酯等化学抽提将蛋白与其他化合物分开;经各种浓缩获得较高浓度的蛋白样品;离子交换层析法、凝胶过滤法、亲和层析法、薄层层析等柱层析技术可根据蛋白分子量、极性、理化性质分离特异蛋白样品。还有检测蛋白分子量的SDS-PAGE、检测蛋白等电点的等电聚焦技术、测定N-端序列的Edman法等也频繁地用于蛋白理化性质的表征中。如枯草杆菌蛋白酶BSF1经CM-琼脂糖凝胶柱层析、10 kDa超滤膜浓缩及G-100葡聚糖凝胶柱层析而获得,纯化4.97倍,分子量28 kDa,N-端11个氨基酸为AQSVPYGISQI^[35]。如今,有许多新型活性蛋白的发现与获得是通过诱导差异表达的蛋白图谱追踪^[60]以及基因工程构建重组蛋白表达等来实现的。而在后续蛋白成分鉴定中,常结合使用正反相HPLC、MS技术以及NMR技术等。

2.2 活性肽获得

对于海洋活性肽类,国内外研究者主要是通过2种途径获得,其一为从海洋微生物中通过各种生化分离手段直接获取天然肽类,这在一些新型活性肽类中应用较多,如Salvatore等^[12]从海绵*Ircinia variabilis*共生菌中对环二肽(DKPs)的质谱质谱分析,Rosengren等^[61]关于小于100个氨基酸的多肽类毒素的NMR研究。由于天然肽含量低,试图通过直接分离而获得高纯度产物步骤繁多且成本高。其次,对已知生理功能活性肽的获得一般为用一系列商品化酶(如胃蛋白酶^[62-63]、木瓜水解酶^[64]、胰蛋白酶^[65-67]及碱性蛋白酶^[68-69]等)水解海洋蛋白资源,即通过酶解而获得海洋活性肽,这也是基于酶工程技术发展起来的蛋白活性肽的开发手段。此法多用于海洋动物体内活性肽成分的分离,安全性高且成本低,过程易于控制,其中酶的选择及量的控制是关键。此外,人工合成肽技术以及肽库构建的相关研究也在蓬勃发展。

3 海洋细菌活性蛋白及活性肽的应用

随着对海洋认识的提高、现代生物技术的飞速发展及研究中深度与广度的结合,近年来海洋活性

蛋白多肽的实际应用体系得到良好建构与改进。由于来源丰富、结构新颖、活性独特,海洋蛋白与肽类已逐步实现了在工业养殖业、医药卫生、环境保护等领域中的应用。

3.1 医药学应用

海洋、极地环境^[70]的地理特殊性及其微生物多样性特异性使这些生境成为天然药物的重要来源。实践证明,海洋微生物中包括抗菌抗病毒、抗高血压、抗氧化抗衰老、免疫调节及抑制肿瘤等药物的获得是实现海洋蛋白及多肽高值化的重要途径。20多年来,已有不少海洋天然活性蛋白及肽类药物获得提取纯化,进行动物模型研究、临床验证并最终投向市场。海洋微生物部分次生代谢产物作为抗肿瘤药物已进入临床研究阶段^[71],如 Didemnin B, Dolastatin 10 等。近期,来源于日本比目鱼病体内致病弧菌 *harveyi* T4D1 的蛋白酶 Vhp1 有望成为抵抗弧菌感染的有效疫苗^[56]。相信随着生物技术向海洋活性物质研究领域的渗透,海洋药物的产业化发展必将加速。

3.2 海水养殖业应用

因地制宜,海洋活性蛋白多肽可直接用于海水养殖产业中,其中以抗菌肽的研究应用较为普遍。抗菌肽具有广谱抗菌活性,能杀灭某些耐药性病原菌,且不易被酶解,作为饲料添加剂能耐受制备时的高温,在规模化发酵生产中有着突出的优势。因此研究开发海洋抗菌肽,不仅可提高水产养殖生物的抗病能力,而且有望使抗菌肽替代抗生素作为一类无毒副、无残留、无致细菌耐药性的环保型制剂,从而推动绿色养殖事业的发展。鉴于以上优势,抗菌肽的制备与获取随着分子生物学研究发展已逐步实现。该方面的研究思路主要包括:在分子水平上研究抗菌肽体内合成机调控机制;利用转基因技术将抗菌肽基因从“供体”转入“目的受体”自发生产抗菌肽;克隆抗菌肽基因,并通过宿主无毒的融合蛋白技术高效表达有活性的抗菌肽^[72]。此外,结合抗菌肽活性与结构的关系改造已有抗菌肽并设计新抗菌肽分子,也是制备高活力抗菌肽的有效途径。

3.3 工业生产应用

海洋生物活性酶作为海洋细菌的代谢产物,可应用于食品、饲料、医药、洗涤清洁剂、化妆品、纺织及基因工程等众多领域,而且具有广泛的研发前景。2006年,从孙德尔本斯海洋的 γ -变形杆菌中开发出耐盐、耐有机溶剂、耐漂白剂洗涤剂的碱性丝氨酸蛋白酶,由于其广谱耐性被用于洗涤、食品、皮革等工

业中^[73]。研究技术的发展,特别是酶工程技术的应用使得海洋生物酶的开发利用更易于进行。通过蛋白酶水解海洋天然蛋白所获得的生物活性肽具有很多优点,实验条件要求低且便于工业化生产,因此这也成为生物活性肽的一种重要来源方式。

3.4 环境保护应用

就海洋环境而言,沿海城市工业经济的迅速发展,近海生活区的高度聚集使得海洋生境面临着有机污染以及水体富营养化的困境。因此,海洋环保工作成为一项关键任务,其中安全无害的生物修复技术作为环境治理的重要方法,受到了普遍关注^[74]。在海洋有机污染物降解中,海洋微生物的活性成分发挥重要作用。其中,多环芳烃(PAHs)因其高遗传毒性和“三致”性(致癌、致畸和致突变)将造成极大危害,研究发现海洋细菌具有高效多环芳烃降解酶活性,应用前景广阔^[75-76]。在赤潮的生物防治研究中,郑天凌等^[41]通过赤潮海域采样筛选到的杀藻菌,经鉴定有假交替单胞菌、交替单胞菌及弧菌等,它们多数通过间接方式抑制目标赤潮藻生长,活性物质包括蛋白和小分子化合物如肽类、有机小分子等。新近展开的杀藻菌胞外活性蛋白研究发现菌株 DHQ25 发酵液上清经高温处理后丧失了杀藻活性,而超滤后仍有活性,这间接暗示了菌株上清液中可能含有大分子活性蛋白成分。目前从 DHQ25 无菌上清中分离到三个活性峰 P5, P6, P7,其中 P7 已达电泳纯,分子量在 14 kDa 左右, P7 中的蛋白理化特征和杀藻过程及其机理正在研究中。

4 研究展望

综上,海洋细菌活性蛋白与肽类在新世纪海洋科学研究中相当活跃。理论研究及技术发展的相互渗透,促进了海洋天然蛋白与肽类的开发应用。借助各种新兴可行的技术方法展开研究将会是今后该领域发展的必然趋势。笔者认为,未来关于海洋细菌活性蛋白与活性肽的研究探索可以从以下几方面着手:(1)基于分子生物学手段^[77]克隆已获得基因信息的海洋活性蛋白多肽基因,进行异源表达并实现活性的最高程度保留;(2)利用信息学技术并结合合成生物学的方法合成所需的活性蛋白多肽;(3)通过基因表达肽库或化学组合肽库的构建来实现功能目标物的高通量获取^[78];(4)对已获得的活性蛋白、活性肽类进行其功能发挥途径的探索,立体地阐释活性物质的作用机制;(5)运用以 2D-PAGE 及质谱技术为核心的宏蛋白组学研究^[79]在后基因

组领域对海洋细菌群落与功能活性蛋白、活性肽类时空上的关系进行深入探讨;(6)结合借鉴极地环境、海洋极端环境等特殊生境的研究模式,注重从中挖掘出功能特异的蛋白及多肽来探索海洋特殊生境中微生物的存活机制及生命规律;(7)还可从组学角度出发,结合基因组学、转录组学及代谢组学追踪海洋细菌群落中的关键活性蛋白多肽。

诚然,至今我国对该领域的探索尚是一个方兴未艾的领域,机遇与挑战并存,为此我们更应该充分发掘并合理利用我国丰富的海洋资源,发挥多方团队合作精神,构建研究平台并实现技术与资源的交流共享,从而加快海洋活性物质研究与开发步伐。

参考文献

- [1] 郑天凌,田蕴,苏建强,李可,刘慧杰,杨小茹,郑伟,王桂忠,李少菁. 海洋环境微生物研究的回顾与展望. 厦门大学学报(自然科学版) [*Journal of Xiamen University (Natural Science)*], 2006, 45 (S2): 150-159.
- [2] 王慧,柏仕杰,蔡雯蔚,郑天凌. 海洋病毒——海洋生态系统结构与功能的重要调控者. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(5): 551-559.
- [3] 黄益丽,郑天凌. 海洋生物活性多糖的研究现状与展望. 海洋科学 (*Marine Sciences*), 2004, 28(4): 58-61.
- [4] Elio PL, Hernandez P, Sanchez A, Solano F. Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1721(1-3): 193-203.
- [5] Gerard J, Haden P, Kelly MT, Andersen RJ. Loloatin B, A cyclic decapeptide antibiotic produced in culture by a tropical marine bacterium. *Pergamon*, 1996, 37(40): 7201-7204.
- [6] Barsby T, Kelly MT, Gagne SM, Andersen RJ. Bogorol a produced in culture by a marine *Bacillus* sp. reveals a novel template for cationic peptide antibiotics. *Organic Letters*, 2001, 3(3): 437-440.
- [7] Canedo LM, Fernandez Puentes JL, Baz JP, Acebal C, La Calle FD, Grávalos DG, De Quesada TG. PM294128, a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(2): 175-176.
- [8] Longeon A, Peduzzi J, Barthelemy M, Corre S, Nicolas JL, Guyot M. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology*, 2004, 6(6): 633-641.
- [9] 漆淑华,钱培元,张偲. 海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 抗菌代谢产物的研究. 天然产物研究与开发 (*Natural Product Research and Development*), 2009, 21(3): 420-423.
- [10] 田黎,李光友. 海洋生境芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 的培养条件及产生的胞外抗菌蛋白. 海洋学报 (*Acta Oceanologica Sinica*), 2001, 23(4): 87-92.
- [11] Wilson GS, Raftos DA, Corrigan SL, Nair SV. Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiol Research* 2006; (2009), doi:10.1016/j.micres.2009.05.007.
- [12] Salvatore DR, Maya M, Giuseppina T. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20(4-6): 311-316.
- [13] Barrientos LG, O'Keefe BR, Bray M, Sanchez A, Gronenborn AM, Boyd MR. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1, 2 and inhibits infectivity of Ebola virus. *Antiviral Research*, 2003, 58(1): 47-56.
- [14] 徐桂华,毕力夫,苏秀兰. 抗肿瘤生物活性肽研究进展. 中国医药生物技术 (*Chinese Medicine Biotechnology*), 2007, 2(2): 130-132.
- [15] 刘涛,李占林,王宇,王业玲,田黎,装月湖,华会明. 海洋细菌 *Bacillus subtilis* 次级代谢产物的研究. 中国海洋药物杂志 (*Chinese Journal of Marine Drugs*), 2009, 28(5): 1-6.
- [16] Lautru S, Gondry M, Genet R, Pernodet JL. The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 2002, 9(12): 1355-1364.
- [17] Cui CB, Kakeya H, Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, cyclopropanol statins A-D, produced by a *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron*, 1997, 53(1): 59-72.
- [18] Kilian G, Jamie H, Brauns SC, Dyason K, Milne PG. Biological activity of selected tyrosine-containing 2, 5-diketopiperazines. *Pharmazie*, 2005, 60(4): 305-309.
- [19] Faden AI, Movsesyan VA, Knobloch SM, Ahmed F, Cernak I. Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury. *Neuropharmacology*, 2005, 49(3): 410-424.
- [20] Brandon EF, Sparidans RW, Meijerman I, Manzanares I, Beijnen JH, Schellens JHM. In vitro characterization of the biotransformation of thiocoraline, a novel marine anticancer drug. *Investigational New Drugs*, 2004, 22(3): 241-251.

- [21] Williams PG, Yoshida WY, Quon MK, Moore RE, Valerie JP. Ulongapeptin, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a Palauan marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Journal of Natural Products*, 2003, 66(5): 651-654.
- [22] Lin WJ, Chen YL, Pan CY, Lin TL, Chen JY, Chiu SJ, Hui CF. Epinecidin-1, an antimicrobial peptide from fish (*Epinephelus coioides*) which has an antitumor effect like lytic peptides in human fibrosarcoma cells. *Peptides*, 2009, 30(2): 283-290.
- [23] Chen YL, Lin WJ, Lin TL. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. *Peptides*, 2009, 30(9): 1636-1642.
- [24] 陈惠源, 蔡俊鹏, 刘江涛. 海洋细菌产琼胶酶的条件优化. 现代食品科技 (*Modern Food Science and Technology*), 2005, 21(3): 48-50.
- [25] 徐庆强, 张志明, 王延明, 卓跃, 殷丽莎, 杜宗军. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究. 海洋科学 (*Marine Sciences*), 2009, 33(7): 1-5.
- [26] 夏振强, 暴增海, 王增池, 马桂珍. 海洋细菌 L1-9 菌株产蛋白酶发酵条件的优化. 湖北农业科学 (*Hubei Agricultural Sciences*), 2009, 48(5): 1129-1131.
- [27] 曾胤新, 蔡明红, 陈波, 何剑锋. 一株北极海洋细菌及其蛋白酶的生理生化特征研究. 极地研究 (*Chinese Journal of Polar Research*), 2000, 12(4): 263-268.
- [28] 曾胤新, 俞勇, 涂雪梅, 陈波, 何剑锋. 北极海冰细菌产胞外酶及主要环境因子的初步研究. 极地研究 (*Chinese Journal of Polar Research*), 2003, 15(4): 303-309.
- [29] 张慧, 宁喜斌. 我国东海近海海域产胞外酶的海洋细菌的筛选. 食品工业科技 (*Science and Technology of Food Industry*), 2008, 29(1): 121-123.
- [30] Tomoo S, Miwa O, Yoshio E. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydrate Research*, 1997, 304(1): 69-76.
- [31] Turkiewicz M, Gromek E, Kalinowska H, Zielin'ska M. Biosynthesis and properties of an extracellular metalloprotease from the Antarctic marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1-3): 53-60.
- [32] Jansen M, Hansen TA. DMSP: tetrahydrofolate methyltransferase from the marine sulfate-reducing bacterium strain WN. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3-4): 225 - 231.
- [33] Elibol M, Moreira AR. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1951-1956.
- [34] Shivanand P, Jayaraman G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, 2009, 44(10): 1088-1094.
- [35] Agrebi R, Haddar A, Hmidet N, Jellouli K, Manni L, Nasri M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochemistry*, 2009, 44(11): 1252-1259.
- [36] Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y, Kadokura K, Uchida S, Nishio T, Oku T, Sugita H. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1774(9): 1099-1107.
- [37] Kim BK, Lee BH, Lee YJ, Jin IH, Chung CH, Lee JW. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Sbutilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 44(6): 411-416.
- [38] Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, Muraoka W, Yamaguchi K, Oda K. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -*proteobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(3): 684-690.
- [39] Lee SO, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4334-4339.
- [40] Mitsutani A, Takesue K, Kirita M, Ishida Y. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(11): 2159-2169.
- [41] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, Tian Y, Jiao NZ, Cai LZ, Hong HS. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against a toxic algae. *Harmful Algae*, 2007, 6(6): 799-810.
- [42] Amaro AM, Fuentes MS, Ogalde SR, Venegas JA, Suárez-Isla BA. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2005, 52(3): 191-200.
- [43] Banin E, Khare SK, Naider F, Rosenberg E. Proline-rich peptide from the Coral Pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1536-1541.

- [44] Jeong SY, Ishida K, Ito Y, Okada S, Murakami M. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*, 2003, 44(43): 8005-8007.
- [45] 王新,周立红,郑天凌,宁修仁. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27(7): 2864-2871.
- [46] Zheng TL, Su JQ, Maskouki K, Yu ZM, Hu Z, Xu JS, Hong HS. Microbial modulation in the growth and toxin production of a red-tide causing alga. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 51(8-12): 1018-1025.
- [47] 杨小茹,苏建强,郑天凌. 化感作用在赤潮调控中的意义及前景. 环境科学学报(*Journal of Environmental Sciences*), 2008, 28(2): 219-226.
- [48] 邹扬,曾胤新,田蕴,郑天凌. 白令海北部表层沉积物中细菌多样性的研究. 极地研究(*Chinese Journal of Polar Research*), 2009, 21(1): 15-24.
- [49] 曹晓星,苏建强,郑天凌,俞志明,宋秀贤. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用. 海洋科学(*Marine Sciences*), 2007, 31(5): 63-69.
- [50] 席峰,郑天凌,焦念志,张瑶. 深海微生物多样性形成机制浅析. 地球科学进展(*Advance in Earth Sciences*), 2004, 19(1): 38-46.
- [51] 杨小茹,苏建强,郑小伟,周月霞,田蕴,宁修仁,郑天凌. 基于分子技术的1株产毒藻藻际细菌多样性分析. 环境科学(*Environmental Sciences*), 2009, 30(1): 259-267.
- [52] 王新,周艳艳,郑天凌. 海洋细菌生态学的若干前沿课题及其研究新进展. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(3): 291-297.
- [53] Wang X, Li ZJ, Su JQ, Tian Y, Ning XR, Hong HS, Zheng TL. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biological Control*, 2010, 52(2): 123-130.
- [54] 王新,郑天凌,胡忠,苏建强. 海洋微生物毒素研究进展. 海洋科学(*Marine Sciences*), 2006, 30(7): 76-81.
- [55] 王磊,徐安龙. 海洋多肽毒素的研究进展. 中国天然药物(*Chinese Journal of Nature Medicine*), 2009, 7(3): 169-174.
- [56] Cheng S, Zhang WW, Zhang M, Sun L. Evaluation of the vaccine potential of a cytotoxic protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Vaccine*, 2010, 28(4): 1041-1047.
- [57] Codd GA. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science Technology*, 1995, 32(4): 149-156.
- [58] Dahlmann J, Budakowski WR, Luckas B. Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A*, 2003, 994(1-2): 45-57.
- [59] Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxin*, 1998, 36(7): 953.
- [60] 郑伟,黄君,郑天凌,田蕴. 苈诱导下新鞘氨醇单胞菌差异表达蛋白追踪. 厦门大学学报(自然科学版)[*Journal of Xiamen University (Natural Science)*], 2008, 47(增刊2): 49-53.
- [61] Rosengren KJ, Daly NL, Craik DJ. NMR of peptide toxins. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2009, 68: 89-147.
- [62] Nagai T, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of enzymatic hydrolysates from commercial kamaboko type samples. *Food Science and Technology International*, 2006, 12(4): 335-346.
- [63] Yamashita M, Arai S, Fujimaki M. A low-phenylalanine, high-tyrosine plastein as an acceptable dietetic food method of preparation by use of enzymatic protein hydrolysis and resynthesis. *Journal of Food Science*, 1976, 41(5): 1029-1032.
- [64] Adrichi S, Kimura Y, Murakami K, Matsuno R, Yokogoshi H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(4): 925-932.
- [65] Ranathunga S, Rajapakse N, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*, 2006, 222(3-4): 310-315.
- [66] Pedroche J, Maria M, Lqari H, Megías C, Girón-Calle GJ, Alaiz M, Vioque J, Millán F. Production of *Brassica carinata* protein hydrolyzates with a high Fischer's ratio using immobilized proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7621-7627.
- [67] Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources, application of bioprocess used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(15): 1309-1323.
- [68] Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49(4): 1984-1989.

- [69] Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 2007, 31 (2): 266-287.
- [70] 曾胤新, 陈波, 邹扬, 郑天凌. 极地微生物——新天然药物的潜在来源. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48 (5): 695-700.
- [71] 于荣敏, 严春艳, 曲红艳, 姚新生. 近年来海洋生物活性多肽的研究概况与展望. *海洋通报 (Marine Science Bulletin)*, 2004, 23(3): 87-93.
- [72] 杨学明, 江林源, 蒋和生. 水生动物抗菌肽及其基因工程研究. *生物技术通讯 (Letters in Biotechnology)*, 2006, 17(1): 109-111.
- [73] Sana B, Ghosh D, Saha M, Mukherjee J. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new *gamma-Proteobacterium* isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (1): 208-215.
- [74] 曾胤新, 郑天凌. 极地环境污染物的微生物降解及其生物修复研究进展. *极地研究 (Chinese Journal of Polar Research)*, 2008, 20(1): 64-71.
- [75] 曹晓星, 田蕴, 胡忠, 郑天凌. PAHs 降解基因、降解酶的研究现状与趋势. *生态学杂志 (Chinese Journal of Ecology)*, 2007, 26(6): 917-924.
- [76] Tian Y, Luo YR, Zheng TL, Cai LZ, Cao XX. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56(6): 1184-1191.
- [77] 池振明, 龚方, 李静, 王祥红. 海洋酵母菌胞外酶及其基因的最新研究进展. *中国海洋大学学报 (Periodical of Ocean University of China)*, 2008, 38(5): 766-774.
- [78] Falciani C, Lozzi L, Pini A, Bracci L. Bioactive peptides from libraries. *Chemistry and Biology*, 2005, 12(4): 417-426.
- [79] Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(2): 92-97.

Advance in study on active protein and peptide produced by marine bacteria—A review

Jinglin Lv^{1 2}, Binxiang Wang^{1 2}, Tianling Zheng^{1 2*}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(²State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Biological active resources are various and abundant in the ocean. With this realization, active proteins and peptides especially marine bacteria active proteins and peptides have attracted much attention recently. The achievements in the study of bioactivities of marine bacterial proteins and peptides were reviewed in this paper. Acquisition and potential applications of these marine bacteria active products were then proposed. Additionally, we focused on the prospective outline on the study of this field.

Keywords: marine bacteria; active protein; active peptides

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2008AA09Z408), the National Nature Science Foundation of China (40930847, 30940002, 40876061) and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (40821063)

* Corresponding author. Tel: +86-592-2183217; Fax: +86-592-2184528; E-mail: microzh@xmu.edu.cn

Received: 20 March 2010 / Revised: 12 May 2010