

# 南极低温降解菌 *Shewanella* sp. NJ49 羟化酶分离纯化及最适产酶条件研究

刘芳明<sup>1,2,3</sup>, 王以斌<sup>3</sup>, 曲长凤<sup>3</sup>, 梁强<sup>3</sup>, 郑洲<sup>3</sup>, 缪锦来<sup>3</sup>, 肖天<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 羟化酶是细菌降解烷烃的关键酶, 本文以南极低温降解菌 *Shewanella* sp. NJ49 为研究对象, 通过硫酸铵沉淀、超滤浓缩及葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 柱层析方法, 分离纯化 NJ49 的羟化酶, 获得了单一羟化酶组分, 研究了温度、pH、表面活性剂和盐度等环境因素对 NJ49 羟化酶酶活活性影响。结果表明, 羟化酶组分由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三个亚基组成, 分子质量分别为 56, 45 和 36 kD。NJ49 最适产酶条件为: 温度 15℃、pH7.2、盐度 55; 不同类型表面活性剂对酶的活性影响效应不一, 两性离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂对酶活没有作用, 阴离子表面活性剂+非离子表面活性剂混和剂和阳离子表面活性剂+非离子表面活性剂混和剂能提高羟化酶的活性。

**关键词:** *Shewanella*; 羟化酶; 分离纯化; 环境因素

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)05-0001-08

doi: 10.11759/hyxx20151031001

烷烃的生物降解过程中, 第一步反应通常是烷烃在加氧酶的作用下转化为相应的醇, 这是一个关键步骤, 很大程度上决定了烷烃的降解速率和降解范围。羟化酶是加氧酶的一种, 细菌的降解过程一般由烷烃羟化酶基因(*alkB*)及其同源体编码的烷烃羟化酶启动<sup>[1]</sup>, 研究羟化酶的组成、结构和基因信息有助于了解细菌的代谢机制。

当前对烷烃降解菌的研究以菌株筛选、羟化酶基因克隆为主, 刘晔等<sup>[2-3]</sup>发现 3 株能够高效降解 C<sub>20</sub> 到 C<sub>33</sub> 长链烷烃的细菌, 并分离确定了 *Pseudomonas aeruginosa*1785 和 *P.marginata*766 的羟化酶基因(*alkB*)片段, 邵宗泽等<sup>[4-6]</sup>从不同地点的海水中筛选了大量烷降解菌, 并对烷降解菌的分子生物学特征进行了较深入的研究, 2008 年从一株来自表层海水的石油降解菌中克隆到大小为 426 bp 的烷烃羟化酶基因(*alkB*)片段和 843 bp 的 P450 烷烃羟化酶基因的部分序列, 2009 年在一株能够降解 C10-C36 直链烷烃的菌株中, 发现至少编码两套与烷降解相关的单加氧酶系统(*AlkB* 和 CYP153 羟化酶); 同年在印度洋深层海水中筛选到一株具有强柴油降解能力的革兰氏阴性菌 P40, 并从中克隆到两个烷烃羟化酶 *alkB* 基因片断。余瑛等<sup>[7]</sup>筛选到 9 株细菌均能分解利用润滑油, 其 *alkB* 基因扩增片段大小介于 160 bp

和 400 bp 之间; 孙敏等从菌株 *Acinetobacter* sp.W3 的基因组 DNA 和质粒 DNA 上分别获得了大小为 540 bp 的烷烃羟化酶基因 *alkB* 和 864 bp 的 CYP153A 烷烃羟化酶基因 DNA 片段<sup>[8]</sup>。已有的研究报道针对羟化酶基因水平的研究较多, 且多关注常温细菌的羟化酶, 对羟化酶蛋白属性尤其是低温菌的羟化酶研究欠缺。低温菌在低温海洋环境(南北极海域、我国北方海域、深海)溢油污染物清除中具有很大修复潜力, 南极 *Shewanella* sp. NJ49 是本实验室前期筛选的低温降解菌, 我们对 NJ49 的羟化酶进行了定域, 并对酶代谢进行了初步研究<sup>[9]</sup>, 结果表明 NJ49 的羟化酶位于胞外, 本文将报道羟化酶纯化和最佳产酶条件, 以期为南极低温降解菌的实际修复应用

收稿日期: 2015-10-31; 修回日期: 2015-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200097; 41576187); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2013G33; 2015G10); 国家自然科学基金-山东省联合资助开发项目(U1406402-5)

[Foundation: National Science Foundation of China, No. 31200097, No. 41576187; Basic science and technology research funds projects of central level Public Scientific Research Institute, 2013G33, 2015G10; The Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China and Shandong Province, U1406402-5]

作者简介: 刘芳明(1978-), 男, 山东乳山人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事环境污染及生态修复研究。电话: 0532-88961195, E-mail: liufangming@fio.org.cn; 肖天, 通信作者, 电话: 0532-82898586, E-mail: txiao@qdio.ac.cn

提供基础数据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

试验所用细菌为南极低温降解菌 *Shewanella* sp. NJ49, 为2001年11月至2002年3月中国第十八次南极科学考察期间采集的海冰样品中筛选分离所得。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种的培养

超净工作台里挑取 NJ49 单菌落, 加入含有 2216E 培养基(蛋白胨 5 g, 酵母 1 g, 经过滤的海水 1 L, pH 7.6, 121℃ 湿热灭菌 20 min)的锥形瓶, 同时加入经 0.45 μm 滤膜过滤的正十六烷烃, 在 15℃ 下, 以 120 r/min 恒温振荡大量培养, 培养 3 d。

#### 1.2.2 酶的分离和纯化

取活化好的菌液 5 mL, 转入 100 mL 的 MMC 培养基(MMC 人工海水培养基为 A、B 液 121℃ 湿热灭菌 20 min, 混匀并补加适量微量元素混合液形成。A 液组分: NaCl 24 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 7 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g/L, KCl 0.7 g/L; B 液组分 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/L, 海水 1 L, pH 7.4), 在 15℃ 下, 以 120 r/min 恒温振荡大量培养, 培养 7 d, 参照文献[10]用静息细胞技术分步大量提取胞外酶(约 10 L)。

##### 1.2.2.1 硫酸铵盐析

将装有上清液(9.8 L)的烧杯放在另一装有冰水的大烧杯内, 并置于磁力搅拌器上搅拌; 缓慢加入研细的固体硫酸铵, 使其饱和度达到 70%, 置于 4℃ 过夜, 将盐析后的溶液 12 000 r/min 离心 30 min, 弃去上清液, 将沉淀溶于 50 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5) 缓冲液中。4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃去没有溶解的沉淀, 上清液即为硫酸铵沉淀纯化的酶。

##### 1.2.2.2 酶的透析与超滤

将盐析所得上清液溶液装入打结的透析袋中, 透析袋放入 10 倍于该溶液体积的 50 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5)缓冲液中, 4℃ 透析 24 h; 透析袋规格为 MD44(8000~14 000), 直径 28 mm。将透析后的液体经分子质量为 30~100 kD 的超滤膜超滤浓缩。

##### 1.2.2.3 酶活性跟踪与测定

按文献[11]中的方法绘制标准曲线。取透析后的溶液 1 mL 置 10 mL 刻度试管中, 依次加入磷酸缓冲液(pH=7.0)、0.1 mol/L 葡萄糖溶液和 0.4% TTC 溶液各 2 mL, 在 37℃ 下暗保温 1~2 h, 待显色充分后立即

加入适量 1 mol/L 硫酸以停止反应, 加乙酸乙酯 3~4 mL 常温萃取以提出 TTF; 同时设置不加酶液的空白对照, 于 485 nm 下测定吸光值(OD<sub>485nm</sub>), 查标准曲线, 可求出 TTC 还原量; 在上述条件下, 将 1 h 产生 1 μg TTF 的量定义为 1 个酶活力单位。

##### 1.2.2.4 Sephadex G-75 柱层析

将葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 充分溶胀并抽气后, 装柱(100 cm×2.0 cm), 用 0.0175 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=6.7)充分平衡, 加入上一步纯化的样品, 加样量为 3 mL, 缓冲液流速为 10 mL/h, 收集量为 3 mL/管。测定每管收集液在 280 nm 下的光吸收值  $A_{280}$ <sup>[12]</sup>。

以上操作均在 4℃ 环境下进行。

##### 1.2.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

纯化酶分子质量的采用 SDS 变性凝胶电泳<sup>[13]</sup>。分离胶为 12.5% 的丙烯酰胺, 浓缩胶为 5% 的丙烯酰胺, 恒流先以 4 mA 电泳、进入分离胶后再以 10 mA 电泳, 完成后剥离胶用考马斯亮蓝 R-250 或银染法进行染色。考染法为: 20% 三氯醋酸固定 1 h; 以含 0.1% R-250、40% 无水乙醇、10% 冰醋酸的染液, 染色 2 h; 以含 40% 无水乙醇、10% 冰醋酸的洗脱液, 脱色 1 h, 中间换一次洗脱液; 最后用去离子水清洗 30 min。对电泳结果进行凝胶扫描拍照。

### 1.2.3 培养条件的优化

#### 1.2.3.1 最适培养温度测定

设置 0、10、15、20、25 和 30℃ 的温度梯度, 将 NJ49 置于 pH 为 7.2 的 MMC 液体培养基中 120 r/min 培养 7 d, 取样测定酶活力, 得出酶的最适温度<sup>[13]</sup>, 分别于 250 nm 和 540 nm 测定吸光值, 计算降解率。

#### 1.2.3.2 最适 pH 测定

用缓冲液调节 MMC 液体培养基 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9 和 10, 接种 NJ49, 于 15℃, 120 r/min 培养 7 d, 取样测定在不同 pH 值下酶的活性, 得出酶的最适 pH; 反应体系中所用缓冲液: 乙酸钠缓冲液(pH 值 3.0~5.0); 磷酸缓冲液(pH 值 6.0~7.0); Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.0~9.0); 碳酸钠缓冲液(pH 值 9.5~11.0)。降解率计算同 1.2.3.1。

#### 1.2.3.3 最适盐度测定

南极低温降解菌 NJ49 依次接种于盐度分别为 30、35、40、45、55、65 和 75 的 MMC 液体培养基中, 15℃, pH 7.2, 120 r/min 培养 7 d, 取样测定不同盐度下酶的活性。

#### 1.2.3.4 表面活性剂对酶活性的影响

选取阴离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、

阳离子表面活性剂和非离子表面活性剂, 研究其对 NJ49 产酶活性的影响。在 MMC 液体培养基中分别加入 100 mg/L 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、卵磷脂、季铵化物、脂肪酸甘油酯(FG)、SDBS+FG 和季铵化物+FG, 分别接种南极低温降解菌 NJ49, 于 15℃, pH 7.2, 盐度 55, 120 r/min 培养 7 d, 取样测定不同表面活性剂下酶的活性。

## 2 结果

### 2.1 酶活检测结果

根据在 485 nm 波长下测定的吸光度值绘制 TTF 标准曲线, 如图 1 所示。其标准曲线相关性方程为  $y=0.0037x+0.1314$ ,  $R^2=0.9987$ , 吸光值与 TTF 浓度呈良好的线性相关。经计算, MMC 培养基中羟化酶的活力为 62 mg/(L·h)。

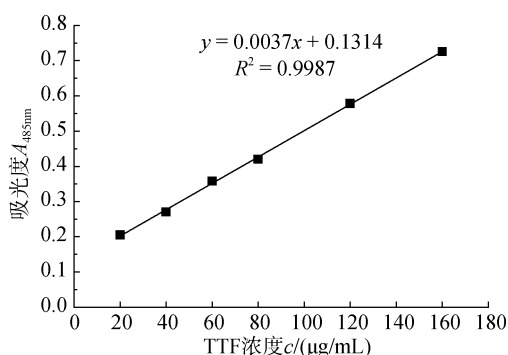


图 1 TTF 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of TTF

### 2.2 Sephadex G-75 凝胶过滤

将经透析后的酶液经分子质量为 30~100 kD 的超滤膜超滤浓缩后上样于 Sephadex G-75 凝胶过滤柱, 过滤分离的结果如图 2 所示, 凝胶过滤后蛋白质测定为 3 个峰, 分别在 6~9 管、12~17 管出现, 第 17 管后收集的超滤浓缩后样品在 280 nm 下的光吸收值均很小, 无峰值出现, 可知有活性的目的酶应在第 6~9 管和 12~17 管收集的样品中。

### 2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE 分析结果见图 3。电泳结果显示杂带较多, 粗酶液中含有大量的杂蛋白质(图 3 泳道 1); 纯化后的蛋白条带相比粗酶条带较弱(图 3 泳道 2), 但仍然清晰地显示出纯化后的羟化酶由三个亚基组成, 分子质量分别为 56, 45 和 36 kD, 表明经层析柱分离纯化后得到了含量低但纯度高的单一酶。

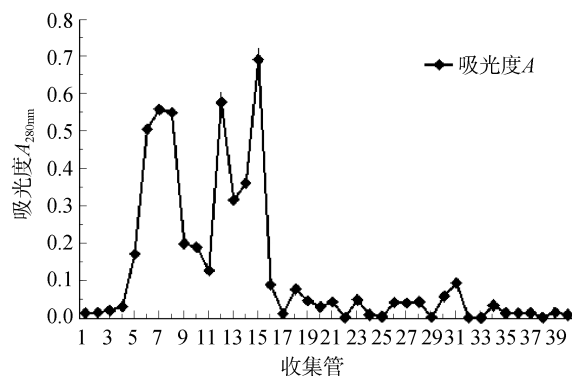


图 2 Sephadex G-75 凝胶过滤结果

Fig. 2 Elution profile of gel filtration on Sephadex G-75

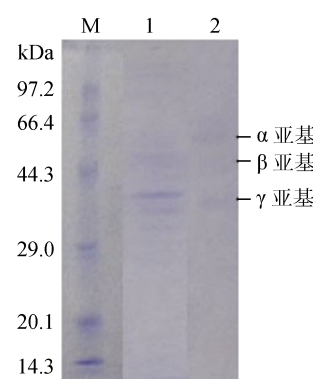


图 3 羟化酶各步骤纯化产物 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 Protein profile of purification step on 12.5% SDS-PAGE

M. 蛋白标准分子质量; 1. 粗酶; 2. Sephadex G-75

M. protein molecular weight marker; 1. Enzyme; 2. Sephadex G-75

### 2.4 培养条件对酶活的影响

#### 2.4.1 培养温度对酶活性影响

培养温度对酶活性的影响结果如图 4 所示, 经分离纯化后所得酶在 0~15℃ 区间内, 酶活性随温度升高而相应增加, 15℃ 时酶活性最高, 表明其最适温度为 15℃, 之后酶活开始下降, 超过 25℃ 时已完全去活性, 热稳定性相对较差。

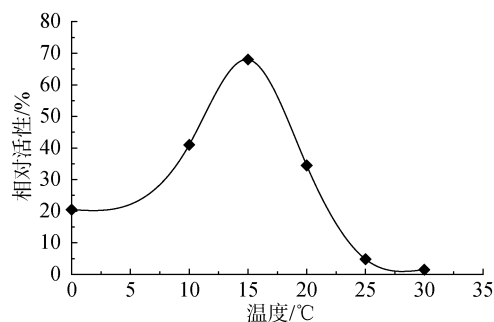


图 4 酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of the enzyme

### 2.4.2 最适 pH

在中性(pH=7 左右)环境条件下, 羟化酶活性最高, 如图 5 所示, 强酸或者强碱的环境均能使羟化酶丧失活性, 证明该羟化酶是一种中性蛋白酶, 酶的最适 pH 为 7.2。

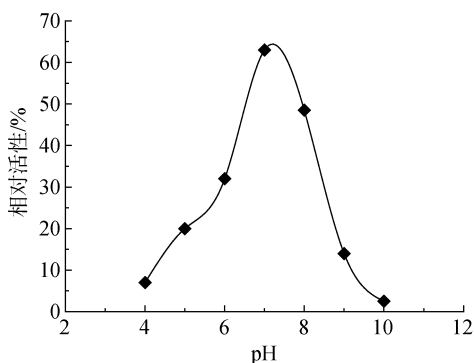


图 5 酶的最适 pH

Fig. 5 Optimum pH of the enzyme

### 2.4.3 盐度对酶活性影响

菌株 NJ49 细胞分泌的羟化酶在盐浓度为 30~60 区间内均能保持较高的酶活性(图 6), 在盐度 55 时其酶活性达到最高, 当盐度超过 70 时, 其酶活性迅速下降。

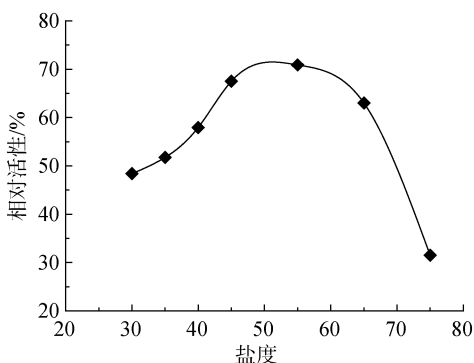


图 6 酶的最适盐度

Fig. 6 Optimum salinity of the enzyme

### 2.4.4 表面活性剂对酶活的影响

如图 7 结果所示, 不同的表面活性剂单独使用和混和使用, 对羟化酶活性均有积极的促进作用, 其中, 以阴离子表面活性剂 SDBS+非离子表面活性剂 FG 混和对酶活性提高效果最佳。

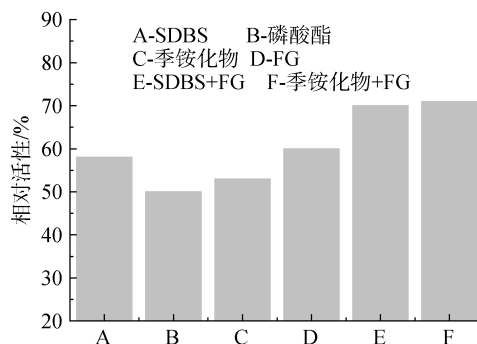


图 7 表面活性剂对酶活性的影响

Fig. 7 Effect of surfactant on the enzyme

SDBS: 十二烷基苯磺酸钠, FG: 脂肪酸甘油酯  
SDBS: Sodium dodecyl benzene sulfonate, FG: fatty glyceride

一些金属作为电子受体, 有些菌株还能还原硝基芳香化合物。电子受体还包括硝酸及亚硝酸、元素硫、延胡索酸等, 多样化的代谢能力不仅显示了其在地球碳循环中的作用, 也赋予了希瓦氏菌在环境生物修复(包括放射性核素污染的环境)和微生物燃料电池方面的巨大应用潜力<sup>[14]</sup>, 国内筛选的具有降解功能的希瓦氏菌包括: 可降解甲基对硫磷的 *Shewanella* sp. L-10<sup>[15]</sup>, 可以利用甲苯、苯胺作为电子受体的 *Shewanella cinica* D14<sup>T[16]</sup>和 *Shewanella* sp. J5<sup>[17]</sup>、可降解十六烷的 *Shewanella* sp. H-1<sup>[18]</sup>、可利用甲苯、三氯乙酸和对硝基苯酚作为电子受体的 *Shewanella* sp. CICC 21940、咪唑乙烟酸高效降解菌 *Shewanella hafniensis* P14<sup>[19]</sup>, 说明了希瓦杀菌的降解多样性。*Shewanella* sp. NJ49 是一株可在低温环境中降解碳氢化合物的希瓦氏菌, 我们前期的研究已表明其有广泛的降解底物, 可以降解 C9~C14 和 C22~C26 范围的长链烷烃以及萘、菲等芳香烃, 其在 15℃ 条件下对柴油降解率可达 68%, 远高于海洋假单胞菌 Y4(16%±2.1%)和 Y7(24%±2.6%)的降解率<sup>[20]</sup>, NJ49 在 10℃ 条件下对于萘的降解率为 43.5%, 高于施氏假单胞菌 YC-YH1 的 33.8%<sup>[21]</sup>, 这充分显示了 NJ49 在低温环境中对烷烃和芳香烃的修复潜力, 未来可制做成商品菌, 用于低温海域溢油污染物的清除。

烷烃好氧降解的起始酶统称为烷烃羟化酶, 该类酶是烷代谢途径的关键酶之一, 目前鉴定的羟化酶包括了有整合膜的单加氧酶、细菌细胞色素 P450( 型和 型)、双加氧酶等<sup>[22]</sup>。有关常温烷烃羟化酶的结构特征、催化活性等研究较多, 对低温微生物的产生羟化酶报道较少。本文分离纯化了低温降解菌 NJ49 的羟化酶, 获得了三个亚基( 、 和 )的组分, 分

## 3 结论与讨论

希瓦氏属(*Shewanella*)细菌因其可以使用多种多样的电子受体而广为人知, 该属细菌通常都能利用

子质量分别为 56 kD, 45 kD 和 36 kD。已报道的三株常温菌 *Methylomonas* sp. GYJ3<sup>[23]</sup>、*Methylococcus Capsulatus* IMV 3021<sup>[24]</sup>和 *Methylosinus trichosporium* IMV3011<sup>[25]</sup>的甲烷加氧酶羟基化酶也是由三个亚基组成, GYJ3 羟化酶亚基分子质量分别为 56、43 和 27 kD, IMV 3021 羟化酶三个亚基分子质量分别为 56、43 和 23 kD, IMV3011 分子质量分别为 58、36 和 23 kD。从三个亚基分子质量大小看, 低温菌与常温菌羟化酶非常近似, 本文测定了 NJ49 羟化酶在 15℃ 时仍保持较高活性, 显示了酶的低温特性。低温能限制微生物的酶活性和酶的分泌水平, 微生物能在低温环境下生存, 主要是由于其酶能从生理代谢和生化特征两方面发挥作用。NJ49 羟化酶的亚基数量和分子量和一些常温菌相似, 酶的亚基空间结构、折叠方式和柔性特征等是否相同, 有待进一步探究。

南极海洋生态系统的环境特征是低温、高盐、强辐射, 特殊环境造就了南极降解菌 NJ49 特殊的代谢机制, 使其在低温高盐条件下, 仍能分泌较高活性的羟化酶。pH 值是影响微生物生命活动的重要因素之一, 其不但能够引起细胞膜电荷的变化和微生物对营养物质的吸收, 而且还能影响代谢过程中酶的活性。本文设定了不同的温度、pH、盐度梯度研究了理化因子对南极降解菌 NJ49 羟化酶活性的影响, 确立了酶的最适条件为温度 15℃、pH7.2、盐度 55, 有研究报道, *Pseudomonas* sp. L-1 甜菜碱羟化酶最佳温度为 30℃<sup>[26]</sup>, 中度嗜盐菌 *Marteletella* sp. AD-3 中水杨酸-5-羟化酶催化水杨酸降解时的最适温度、pH 和盐度分别为 30℃、7.5 和 30<sup>[27]</sup>, 与这些菌株的羟化酶相比, NJ49 菌株羟化酶在低温高盐环境的污染修复中能发挥更大优势。

表面活性剂可以增加疏水性物质在水相中的溶解度, 增加其生物可利用性, 提高油脂降解速率。单一的表面活性剂其增溶能力有限, 浓度过高又会抑制微生物活性且易造成表面活性剂污染<sup>[28]</sup>。有研究认为, 不同类型表面活性剂混合使用可以有效解决这一问题, 如阴离子表面活性剂中混入非离子表面活性剂能有效降低表面活性剂的临界胶束浓度和提高胶束分子的大小<sup>[29]</sup>。本研究显示, 表面活性剂的添加能够不同程度地提高酶活, 复合的表面活性剂提高活性的能力要优于单一活性剂, 这一发现为该菌在低温海洋环境的石油污染生物修复提供了理论参考, 未来开发商用降解菌制剂时, 可辅以不同的表面活性剂促进羟化酶的活性, 或者与天然产表面活性

剂的菌株复配, 提高菌制剂在低温环境中对溢油污染物的代谢清除能力。

#### 参考文献:

- [1] Kok M, Oldenhuis R, van der Linden M P, et al. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression[J]. The Journal of biological chemistry, 1989, 264(10): 5435-5441.
- [2] 刘晔, 周卫民, 牟伯中, 等. 长链烷烃降解菌的降解特性[J]. 微生物学杂志, 2005, (6): 14-18.  
Liu Ye, Zhou Weimin, Mu Bozhong, et al. Degradation Characteristics of Long-chain Aliphatic Alkanedegrading Bacteria[J]. Journal of Microbiology, 2005, (6): 14-18.
- [3] 刘晔, 李辉, 牟伯中, 等. 长链烷烃降解菌 *alkB* 片段的分离和鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4): 562-565.  
Liu Ye, Li Hui, Mu Bozhong, et al. Isolation and identification of *alkB* fragment from long-chain alkane degrading bacteria[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(4): 562-565.
- [4] 吴业辉, 邵宗泽. 海洋烷烃降解菌 *Alcanivorax* sp. A-11-3 的分离鉴定及其降解酶基因研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 427-434.  
Wu Yehui, Shao Zongze. Isolation and identification of a novel alkane-degrading bacterial species *Alcanivorax* sp. A-11-3 and alkane hydroxylase gene detection[J]. Journal of oceanography in Taiwan strait, 2008, 27(4): 427-434.
- [5] 王丽萍, 刘昱慧, 邵宗泽. 一株来自大西洋表层海水的烷烃降解菌 *Gordonia* sp. S14-10 的分离鉴定及其降解相关特性的分析[J]. 微生物学报, 2009, (12): 1634-1642.  
Wang Liping, Liu Yihui, Shao Zongze. Isolation and identification of a hydrocarbon-degrading bacterium *Gordonia* sp. S14-10 from the surface water of Atlantic Ocean and analysis on its related characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, (12): 1634-1642.
- [6] 赖其良, 袁军, 邵宗泽. 一株印度洋深海食烷菌 (*Alcanivorax* sp. P40) 的烷烃羟化酶基因的克隆[J]. 台湾海峡, 2008, (2): 141-146.  
Lai Qiliang, Yuan Jun, Shao Zongze. Clone of alkane hydroxylase Gene from a strain *Alcanivorax* sp. P40 isolated from deep sea of Indian Ocean[J]. Journal of oceanography in Taiwan strait, 2008, (2): 141-146.
- [7] 余瑛, 郭志龙, 卫泽峰, 等. 润滑油降解菌的筛选及其 *alkB* 基因的 PCR 分析[J]. 西南农业学报, 2011, (1): 282-285.  
Yu Ying, Guo Zhilong, Wei Zefeng, et al. Screening of bacterial strains for degradation of Lubricating oil and their analysis for presence of alkane hydroxylase gene (*alkB*) by PCR[J]. Southwest China journal of agricul-

- tural science, 2011, (1): 282-285.
- [8] 孙敏, 沈先荣, 侯登勇, 等. 高效柴油降解菌 *Acinetobacter* sp.W3 分离鉴定及降解酶基因扩增分析[J]. 生物技术通报, 2012, 16(6): 49-51.  
Sun Min, Shen Xianrong, Hou Dengyong, et al. Isolation, identification of alkane-degrading bacteria strain *Acinetobacter* sp. W3 and alkane hydroxylase genes analysis[J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 16(6): 49-51.
- [9] 刘芳明, 王以斌, 梁强, 等. 南极 *Shewanella* sp. NJ49 低温降解酶的定域及特性研究[J]. 海洋科学进展, 2011, (A1): 43-48.  
Liu Fangming, Wang Yibin, Liang Qiang, et al. Localization of Antarctic *Shewanella* sp. NJ49 bacteria degradation enzyme and characteristics study[J]. Advances in Marine Science, 2011, (A1): 43-48.
- [10] 陈延君, 王红旗, 熊樱. 正十六烷微生物降解酶的定域和酶促降解性[J]. 环境科学研究, 2007, 20(6): 120-125.  
Chen Yanjun, Wang Hongqi, Xiong Ying. Study on localization of degradation enzyme for n-hexadecane and enzymatic degradability[J]. Research of Environmental Science, 2007, 20(6): 120-125.
- [11] 牛志卿, 刘建荣, 吴国庆. TTC-脱氢酶活力测定法的改进. 微生物学通报, 1994, 21(1): 15-18.  
Niu Zhiqing, Liu Jianrong, Wu Guoqing. Improvement of determination method of TTC-dehydrogenase activity[J]. Microbiology China, 1994, 21(1): 15-18.
- [12] Buzy A, Millar A L, Legros V. The hydroxylase component of soluble methane monooxygenases from *Methylococcus capsulatus* (Bath) exists in several forms as shown by electrospray-ionisation mass spectrometry[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 254(3): 602-609.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [14] Fredrickson J, Romine M, Beliaev A. Towards environmental systems biology of *Shewanella*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 592-603.
- [15] 王凌, 刘勃, 黎先春, 等. 高效液相色谱与飞行时间质谱联用技术研究甲基对硫磷的细菌降解产物[J]. 分析化学, 2006, 34(8): 1058-1062.  
Wang Ling, Liu Jie, Li Xianchun, et al. Identification of biodegradation products of methyl parathion in aqueous environment by high performance liquid chromatography/mass spectrometry with time of flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(8): 1058-1062.
- [16] 许志诚, 洪义国, 罗微, 等. 中国希瓦氏菌 D14T 的厌氧腐殖质呼吸[J]. 微生物学通报, 2006, 46(6): 973-938.  
Xu Zhicheng, Hong Yiguo, Luo Wei, et al. Anaerobic humus respiration by *Shewanella cinica* D14<sup>T</sup>[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 973-938.
- [17] 诸葛斌, 徐巧, 褚国成, 等. 一株耐冷菌所产降解酶的特性及应用[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 6: 870-874.  
Zhu Gebin, Xu Qiao, Chu Guocheng, et al. Properties and application of cold-adapted enzymes produced by a psychrotrophic bacterium[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2010, 6: 870-874.
- [18] 陈凯, 靳冰冰, 姚明庆, 等. 热区高效石油降解菌降解性能的研究[J]. 环境工程, 2014, 32(7): 63-66.  
Chen Kai, Jin Bingbing, Yao Mingqing, et al. Degradation performances and screening of highly efficient petroleum degrading bacteria[J]. Water Pollution Control, 2014, 32(7): 63-66.
- [19] 陈玉洁, 束长龙, 刘新刚, 等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及降解特性研究[J]. 农药学报, 2011, 13(4): 387-393.  
Chen Yujie, Shu Changlong, Liu Xingang, et al. Isolation, identification and characterization of a *Shewanella hafniensis* strain capable of degrading imazethapyr[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2011, 13(4): 387-393.
- [20] 田胜艳, 刘廷志, 高秀花, 等. 海洋潮间带石油烃降解菌的筛选分离与降解特性[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25: 301-305.  
Tian Shengyan, Liu Tingzhi, Gao Xiuhua, et al. Biodegradation of hydrocarbons by two strains of marine intertidal bacteria[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25: 301-305.
- [21] 史延华, 任磊, 贾阳, 等. 施氏假单胞菌 YC-YH1 的萘降解特性及产物分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1866-1876.  
Shi Yanhua, Ren Lei, Jia Yang, et al. Characteristics and product analysis of naphthalene degradation by *Pseudomonas stutzeri* YC-YH1[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1866-1876.
- [22] 于寒颖, 杨慧. 石油烃降解酶及其基因的结构、功能和表达调控[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 1066-1074.  
Yu Hanying, Yang Hui. Q78 Structure, Function and expression regulation of hydrocarbon-degrading enzymes and their encoding genes[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(6): 1066-1074.
- [23] 沈润南, 马清泉, 尉迟力, 等. 甲基单胞菌 *Methylobacterium* sp.GYJ3 中甲烷单加氧酶还原酶组分的纯化和性质[J]. 生物化学杂志, 1997, 4(4): 432-490.  
Shen Runnan, Ma Qingquan, Yu Chili, et al. Purifica-

- tion and properties of hydroxylase component of soluble methane monooxygenase from *Methylomonas* sp. GYJ3[J]. Chinese Biochemical Journal, 1997, 4(4): 432-490.
- [24] 尉迟力, 沈润南, 夏春谷, 等. 可溶性甲烷单加氧酶羟基化酶组分的分离纯化及反应功能[C]//生命科学与生物技术: 中国科协第三届青年学术年会论文集, 1998.
- Wei Chili, Shen Runnan, Xia Chungu, et al. Separation and purification of soluble methane monooxygenases hydroxylase and its reaction functions. Life Science and Biotechnology: The Third Annual Conference Proceedings of China Association for Science, 1998.
- [25] 华绍烽, 李树本, 辛嘉英, 等. 一个型甲烷氧化菌中甲烷单加氧酶羟基化酶的分离纯化和理化性质[J]. 生物工程学报, 2006, (6): 1007-1012.
- Hua Shaofeng, Li Shuben, Xin Jiaying, et al. Methane monooxygenases hydroxylase from a type methanotroph: purification and physical-chemical properties[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, (6): 1007-1012.
- [26] 卢向锋, 张鹏程, 李倩延, 等. 一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)L-1 菌株 -丁基甜菜碱羟基化酶基因 bbh 的克隆、表达及酶学性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 602-610.
- Lu Xiangfeng, Zhang Pengcheng, Li Qianyan, et al. Cloning, expression and characterization of a Gamma-butyrobetaine hydroxylase gene bbh from *Pseudomonas* sp. L-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 602-610.
- [27] 董斐, 崔长征, 冯天才, 等. 中度嗜盐菌 *Marteella* sp.AD-3 降解菲过程中水杨酸-5-羟基化酶的酶学性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 985-993.
- Dong Fei, Cui Changzheng, Feng Tiancai, et al. Characterization of salicylate 5-hydroxylase for phenanthrene degradation using moderately halophilic *Marteella* sp. AD-3[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(8): 985-993.
- [28] Marchesi J R, Russell N J, White G F, et al. Effects of surfactant adsorption and biodegradability on the distribution of bacteria between sediments and water in a freshwater microcosm[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1991, 57(9): 2507-2513.
- [29] 王洋, 王秋玉. 生物表面活性剂在生物修复石油污染中的应用[J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 455-458.
- Wang Yang, Wang Qiuyu. Applications of biosurfactants in bioremediation of environment contaminated by petroleum[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(24): 455-458.

# Separation and purification of hydroxylase from Antarctic psychrophilic bacterium *Shewanella* sp. NJ49 and optimum conditions for its enzyme production

LIU Fang-ming<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Yi-bin<sup>3</sup>, QU Chang-feng<sup>3</sup>, LIANG Qiang<sup>3</sup>, ZHENG Zhou<sup>3</sup>, MIAO Jin-lai<sup>3</sup>, XIAO Tian<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China)

**Received:** Oct. 31, 2015

**Key words:** *Shewanella*; hydroxylase; separation and purification; environmental factors

**Abstract:** Hydroxylase is a key enzyme with respect to bacteria during hydrocarbon degradation. In this paper, we investigate the Antarctic psychrophilic bacterium *Shewanella* sp. NJ49. To obtain a single component of hydroxylase, we separated and purified hydroxylase from NJ49 in a series of steps, i.e., ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration concentration, and column chromatography with Sephadex G-75 as the column media. In addition, we studied the relationships between the activity of NJ49 hydroxylase and environmental factors such as temperature, pH, surfactant, and salinity. We found that purified hydroxylase comprised subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , with estimated molecular masses of 56, 45, and 36 kD, respectively. The optimum conditions for producing NJ49 hydroxylase were a temperature of 15°C, a pH of 7.2, and a salinity of 55‰. Different types of surfactants had different effects on enzyme activity. Although individual amphoteric, cationic, and nonionic surfactants did not inhibit enzyme activity, a mixture of anionic and nonionic surfactants, as well as a mixture of cationic and nonionic surfactants, improved the activity of the hydroxylase.

(本文编辑: 康亦兼)