

中度嗜盐菌 *Martelella* sp. AD-3 降解菲过程中水杨酸-5-羟化酶的酶学性质

董斐, 崔长征*, 冯天才, 冯耀宇, 刘勇弟

华东理工大学资源与环境工程学院, 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237

摘要: 【目的】研究中度嗜盐菌 *Martelella* sp. AD-3 在降解菲过程中水杨酸-5-羟化酶的活性与菲降解效率的关系及其酶学性质。【方法】通过 HPLC 分析菲的降解效率和 AD-3 菌粗酶液催化水杨酸的产物, 根据 NADH 在 340 nm 处的吸光度变化计算水杨酸-5-羟化酶的活性。【结果】水杨酸-5-羟化酶是一种诱导酶, 在 AD-3 菌的对数生长期和稳定初期时活性较高, 酶活力大小与该菌对菲的降解速率基本一致。在菲浓度为 200 mg/L、生长盐度为 3%、pH 为 9.0 的培养条件下, AD-3 菌株表达的水杨酸-5-羟化酶的活力最高, 为 132.8 nmol/(min·mg)。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°C、7.5 和 3%, 酶的最大反应速率为 200 nmol/(min·mg)、米氏常数 K_m 为 8.7 $\mu\text{mol/L}$ 。【结论】AD-3 菌在降解菲的过程中表达水杨酸-5-羟化酶, 该酶的活性与菲降解速率具有相关性。

关键词: 菲, 水杨酸-5-羟化酶, 酶活, 盐度

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-0985-09

生物降解是修复多环芳烃污染土壤的一种有效手段, 而采用非嗜盐微生物对高盐污染土壤进行生物修复的效果较差^[1]。利用嗜盐微生物降解高盐环境的 PAHs 可能是有效的途径, 近年来备受关注^[2]。

菲通常作为多环芳烃生物修复研究的模式化合物^[3], 其好氧微生物代谢途径主要有两条—邻苯二甲酸途径和萘代谢途径。在萘代谢途径中菲在芳香环氧化酶的催化作用下被氧化成二氢二醇式结构, 再被转化为 1-羟基-2-萘甲酸和水杨酸, 水杨酸在水杨酸-1-羟化酶的催化下生成邻苯二酚或者在水杨酸-5-羟化酶的作用下生成龙胆酸^[4]。

水杨酸-5-羟化酶是芳香环氧化酶家族中的一类, 可催化水杨酸羟化生成龙胆酸^[5], 与多环芳烃双加氧酶共用电子传递链^[6]。Deveryshetty 等^[7]在 2% 盐度研究 *Pseudomonas* sp. PPD 对水杨酸的代谢, 结果显示该菌可以表达水杨酸-5-羟化酶, 且该酶受水杨酸的诱导。*Rhodococcus* sp. B4 在 1.4% 的盐度条件下降解萘时为龙胆酸途径, 其 *nagAaGHAb* 基因能够表达有活性的水杨酸-5-羟化酶^[8]。*Pseudomonas aeruginosa* JB2 在 1.4% 的盐度降解多氯联苯时表达水杨酸-5-羟化酶, 且该酶是非黄素蛋白氧化酶, 需要添加 NADH 做辅因子^[9]。水杨酸-5-羟化酶的研究主要集中在单环和双环芳烃类化合

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (WB1114031); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20110074130002); 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室专项经费 (11K02ESPCT)

* 通信作者。Tel: +86-21-64253988; E-mail: cuichangzheng@ecust.edu.cn

作者简介: 董斐 (1986-), 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物。E-mail: dongfei86@gmail.com

收稿日期: 2012-03-16; **修回日期:** 2012-04-22

物,菌株的生长盐度通常较低,而在三环芳烃类化合物的降解过程中报道较少且耐盐及嗜盐菌属未见相关报道。细菌可以通过萜代谢途径降解多种多环芳烃,而水杨酸-5-羟化酶是萜代谢途径中的降解酶,研究 AD-3 的水杨酸-5-羟化酶对于丰富中度嗜盐菌菲代谢途径具有重要意义。

本文研究了中度嗜盐菌 *Martellella* sp. AD-3 在降解菲过程中水杨酸-5-羟化酶的活性与菲降解速率的关系,水杨酸-5-羟化酶表达的最优条件以及其酶学性质,为开展中度嗜盐菌水杨酸-5-羟化酶的特性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: *Martellella* sp. AD-3 (CCTCC No: M 2011218)。

1.1.2 培养基: 所用培养基为 SSDM 合成培养基^[10], pH 为 9.0。

1.1.3 主要试剂和仪器: 菲 (Alfa Aesar, >98%), 龙胆酸, 邻苯二甲酸, 水杨酸, N, N-二甲基甲酰胺, NADH, 邻苯二酚 (Sigma-Aldrich)。冷冻离心机 (Eppendorf 5810R), 紫外分光光度计 (UNIQ UV2000), 超声波细胞粉碎机 (Scientz JY92-II)。

1.2 粗酶液的制备

以菲为底物培养 AD-3 菌株至对数生长期, 4℃ 离心收集细胞, 用磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 洗涤 3 次, 最后加入磷酸钾缓冲液重悬, 制成菌悬液。将制备好的菌悬液超声破碎 (超声功率 400 W, 工作 4 s, 停止 6 s, 工作 100 次) 后, 4℃、10800 × g 离心, 将上清液转移至具塞试管中, 以 Bradford 法定量粗酶液的蛋白含量。

1.3 菲降解酶的活性分析

30℃ 下, 分析 AD-3 粗酶液中是否具有邻苯二甲酸双加氧酶、水杨酸羟化酶、邻苯二酚-1,2-双加氧酶、邻苯二酚-2,3-双加氧酶、龙胆酸-1,2-双加氧酶的活性。

邻苯二甲酸双加氧酶: 体系为 1 mL, 含有适量粗酶液, 磷酸盐缓冲液 50 mol/L (pH 7.5), 邻苯二甲酸 100 μmol/L, 分析酶反应产物顺-4,5-二羟基-1,2-二羧酸-1 (6), 2-环己二烯在 575 nm 处吸光度的变化情况, ε₅₇₅ 为 2380 L/(mol·cm)。邻苯二甲酸双加

氧酶活单位定义为: 30℃ 下, 每分钟生成 1 nmol 顺-4,5-二羟基-1,2-二羧酸-1 (6), 2-环己二烯所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活^[11]。

水杨酸羟化酶: 体系为 1 mL, 含有适量粗酶液, 磷酸盐缓冲液 50 mol/L (pH 7.5), 水杨酸 50 μmol/L, NADH 100 μmol/L, 分析酶反应底物 NADH 消耗在 340 nm 处的吸光度变化情况, ε₃₄₀ 为 6220 L/(mol·cm)^[6]。水杨酸羟化酶酶活单位定义为: 30℃ 下, 每分钟消耗 1 nmol NADH 所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活^[5]。

邻苯二酚-1,2-双加氧酶: 体系为 1 mL, 含有适量粗酶液, 磷酸盐缓冲液 50 mol/L (pH 7.5), 邻苯二酚 100 μmol/L, 分析酶反应产物顺, 顺-己二烯二酸在 260 nm 处的吸光度变化情况^[12], ε₂₆₀ 为 16800 L/(mol·cm)。邻苯二酚-1,2-双加氧酶酶活单位定义为: 30℃ 下, 每分钟生成 1 nmol 顺, 顺-己二烯二酸所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活。

邻苯二酚-2,3-双加氧酶: 体系为 1 mL, 含有适量粗酶液, 磷酸盐缓冲液 50 mol/L (pH 7.5), 邻苯二酚 100 μmol/L, 分析酶反应产物 2-羟粘糠酸半醛在 375 nm 处的吸光度变化情况^[12], ε₃₇₅ 为 33400 L/(mol·cm)。邻苯二酚-2,3-双加氧酶酶活单位定义为: 30℃ 下, 每分钟生成 1 nmol 2-羟粘糠酸半醛所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活。

龙胆酸-1,2-双加氧酶: 体系为 1 mL, 含有适量粗酶液, 磷酸盐缓冲液 50 mol/L (pH 7.5), 龙胆酸 100 μmol/L, 分析酶反应产物马来酰丙酮酸在 330 nm 处吸光度变化值情况, ε₃₃₀ 为 10800 L/(mol·cm)^[13]。龙胆酸-1,2-双加氧酶酶活单位定义为: 30℃ 下, 每分钟生成 1 nmol 马来酰丙酮酸所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活。

1.4 酶反应的光谱分析

以菲为底物培养 AD-3 菌株, 制备粗酶液, 全波长扫描以水杨酸为底物的酶反应随时间在 250 - 400 nm 波长范围内吸光度变化情况。反应组含有 50 μmol/L 水杨酸, 100 μmol/L NADH, 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 适量粗酶液。对照组除了不含水杨酸外其他物质相同, 反应从加入粗酶液开始^[6]。

以水杨酸为底物培养 AD-3 菌株, 制备粗酶液, 全波长扫描以龙胆酸为酶反应底物的酶反应随时间在 250 - 400 nm 范围内吸光度变化情况。反应组

含有 100 $\mu\text{mol/L}$ 龙胆酸, 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 适量粗酶液。对照组中粗酶液先经高温灭活, 其他成分与反应组一致^[13]。

1.5 HPLC 分析

1.5.1 水杨酸羟化酶产物鉴定: 酶促反应体系为适量粗酶液, 50 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸, 100 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 以添加经高温灭活的粗酶液为对照, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。经盐酸酸化至 pH 为 2.0, 用等体积乙酸乙酯萃取两次, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹浓缩至近干 (约 100 μL), 用甲醇定容至 1 mL 用于 HPLC 分析。HPLC (Shimadzu LC-2010HT, Japan) 条件: 进样量为 10 μL , 色谱柱为 C18 反相柱 (Agilent, USA, 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm), 流动相为甲醇: 水 = 80: 20, 流速 1 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长: 300 nm^[14]。水杨酸和龙胆酸的保留时间分别为 2.2 min 和 2.7 min。

1.5.2 菲降解率分析: 培养液用等体积的乙酸乙酯液萃取两次, 合并两次萃取液并摇匀, 取 5 mL 的有机相 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹浓缩至近干 (约 100 μL)。HPLC 检测波长: 254 nm, 保留时间为 14.6 min, 其他条件同 1.5.1, 测定结果为 3 个平行样的平均值^[11]。

1.6 水杨酸-5-羟化酶的活性优化

1.6.1 不同生长时期的酶活性分析: 以菲为碳源培养 AD-3 菌, 每隔 1 天收集细胞, 按照 1.3 测定水杨酸-5-羟化酶的活性。水杨酸-5-羟化酶酶活单位定义为 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 每分钟消耗 1 nmol NADH 所需要的酶量, 比活为每毫克蛋白的酶活^[5]。取 100 μL 培养液, 按照微生物学实验标准方法将菌液稀释涂布, 对平板上的菌落进行计数, CFU 计算公式: 每毫升菌落形成单位 (CFU) = 平均菌落数 $\times 10^7$ ^[15]。

1.6.2 不同诱导物作用下的酶活性分析: 分别以 200 mg/L 菲、200 mg/L 水杨酸、200 mg/L 葡萄糖为碳源培养 AD-3 菌, 对数生长期收集细胞分别测定水杨酸-5-羟化酶的活性。

1.6.3 不同浓度菲下的酶活性分析: 配制菲浓度分别为 100、200、300、400 mg/L 的无机盐培养基 (3%) 培养 AD-3 菌, 对数生长期收集细胞测定水杨酸-5-羟化酶的活性。

1.6.4 不同生长盐度下的酶活性分析: 配制盐度分别为 0.5%、1%、3%、8%、15% 的无机盐培养基, 以菲 (200 mg/L) 为碳源培养 AD-3 菌, 对数生长期收集细胞测定水杨酸-5-羟化酶的活性。

1.7 水杨酸-5-羟化酶的酶学性质

1.7.1 温度对酶活力的影响: 以菲为碳源培养 AD-3 菌株, 对数生长期收集细胞, 分别在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 下测定水杨酸-5-羟化酶的活性。

1.7.2 pH 对酶活力的影响: 以菲为碳源培养 AD-3 菌株, 对数生长期收集细胞, 分别在 pH 为 6.5、7、7.5、8 的磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L) 中测定水杨酸-5-羟化酶的活性。

1.7.3 盐度对酶活力的影响: 以菲为碳源培养 AD-3 菌株, 对数生长期收集细胞, 分别在盐度为 0.5%、1%、3%、5%、8%、15% 的磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 中测定水杨酸-5-羟化酶的活性^[16]。

1.7.4 酶促反应动力学参数分析: 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 7.5 条件下, 测定水杨酸浓度分别为 5、10、15、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 时水杨酸-5-羟化酶的活性。计算粗酶液中水杨酸-5-羟化酶的米氏常数 K_m 及最大反应速率 V_{max} ^[17]。

2 结果和讨论

2.1 菲降解酶的活性分析

以菲为碳源培养的 AD-3 菌株的粗酶液有水杨酸羟化酶的活性, 但未检测到邻苯二甲酸双加氧酶、邻苯二酚-1,2-双加氧酶、邻苯二酚-2,3-双加氧酶和龙胆酸-1,2-双加氧酶的活性。

邻苯二甲酸和水杨酸为菲降解下游途径的中间代谢物, 邻苯二甲酸双加氧酶、邻苯二酚-1,2-双加氧酶、邻苯二酚-2,3-双加氧酶、水杨酸羟化酶, 龙胆酸-1,2-双加氧酶是区分菲代谢途径的关键酶^[4]。根据 AD-3 菌株粗酶液中相关的酶活性推测菌株可以通过水杨酸途径降解菲。水杨酸羟化酶分为水杨酸-1-羟化酶 (EC 1.14.13.1) 和水杨酸-5-羟化酶。水杨酸-1-羟化酶将一分子的氧引入水杨酸的芳香环上, 取代水杨酸的羧基, 生成邻苯二酚; 而水杨酸-5-羟化酶将氧引入 5-碳位, 生成龙胆酸^[5]。

2.2 酶反应的光谱分析

水杨酸在以菲为碳源生长的 AD-3 粗酶液催化下, 292 nm 处水杨酸的特征吸收峰峰值随着反应不断降低, 340 nm 处 NADH 的特征吸收峰也随之降低 (图 1-A)。龙胆酸在以水杨酸为碳源生长的 AD-3 粗酶液催化下, 特征吸收峰 320 nm 逐渐向 330 nm 处

偏移,这是因为龙胆酸在龙胆酸-1,2-双加氧酶的催化作用下开环生成马来酰丙酮酸所致(图1-B)。Zhou^[6]研究了 *Ralstonia* sp. Strain U2 粗酶液中水杨酸-5-羟化酶的活性,分析了反应样在250-400 nm 的吸光度变化情况,NADH 和水杨酸同时减少说明菌株 U2 的 *nagGH* 基因能够表达水杨酸羟化酶。Liu^[17]等纯化了 *Ralstonia solanacearum* GMI1000 的龙胆酸-1,2-双加氧酶并研究了该酶的特性,龙胆酸底物在320 nm处有最大吸收峰,在龙胆酸-1,2-双加氧酶作用下随着龙胆酸转化为马来酰丙酮酸,峰值偏向330 nm处。

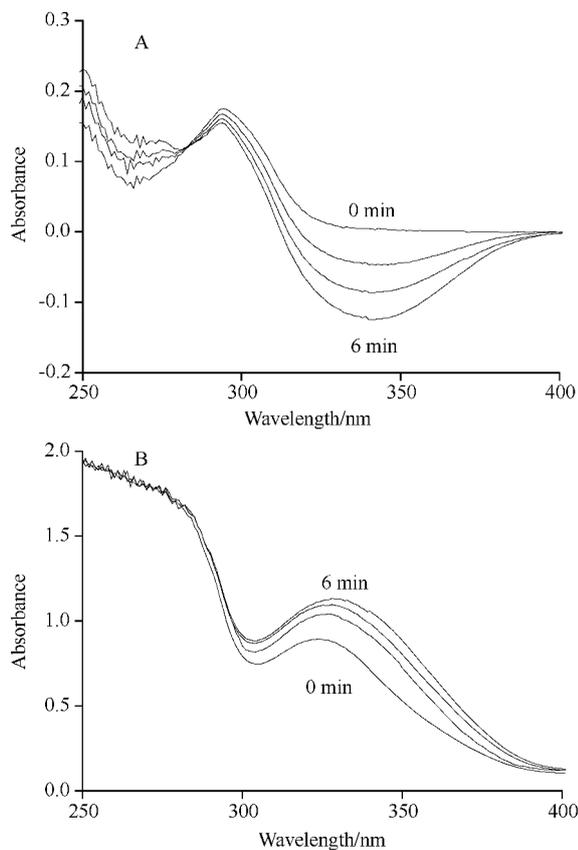


图1 *Marteella* sp. AD-3 粗酶液以水杨酸(A)和龙胆酸(B)为底物的酶反应光谱扫描分析

Fig. 1 Time-dependent spectral changes during the enzyme reactions performed with salicylic acid (A) and gentisic acid (B) for the cell-free extract prepared from *Marteella* sp. AD-3.

2.3 水杨酸羟化酶的产物鉴定

通过 HPLC 分析 AD-3 粗酶液催化水杨酸的反应情况,峰型 I(2.69 min) 为水杨酸(图 2-A、2-C、2-D),峰型 II(2.09 min) 为龙胆酸(图 2-B、2-D)。图 2-A、2-B 分别为水杨酸、龙胆酸标准品的 HPLC 图

谱,图 2-C、2-D 分别为对照组、反应组的 HPLC 图谱。反应前有水杨酸的峰型 I,没有龙胆酸的峰型 II(图 2-C);反应后水杨酸峰型 I 下降同时有新的龙胆酸峰型 II 生成(图 2-D),这是由于在水杨酸-5-羟化酶的催化下,水杨酸作为底物被消耗,生成龙胆酸。实验结果说明,菌株 AD-3 在非降解过程中水杨酸-5-羟化酶得到表达,羟化水杨酸生成龙胆酸。

水杨酸-5-羟化酶的研究主要集中在水杨酸^[7]、萘^[8]等物质的降解菌中。萘降解菌 *Ralstonia* sp. Strain U2^[6]的 *nagAaGHAb* 基因能够在大肠杆菌中表达水杨酸-5-羟化酶,氧化水杨酸生成龙胆酸。AD-3 菌在非降解过程中表达水杨酸-5-羟化酶,通过菲-水杨酸-龙胆酸途径代谢多环芳烃菲。*Sphingomonas* sp. Strain GY2B^[19], *Ochrobactrum* sp. Strain PWTJD^[20] 通过水杨酸-邻苯二酚途径降解菲, *Mycobacterium* sp. PYR1^[21], *Nocardia otitidiscaviarum* TSH1^[12] 通过邻苯二甲酸途径降解菲,而菌株 AD-3 通过水杨酸-龙胆酸途径代谢菲则为首次报道。

2.4 水杨酸-5-羟化酶的活性分析

2.4.1 不同生长时期的活性分析:水杨酸-5-羟化酶在 AD-3 培养初期活性较高,24 h 即对数生长期达到峰值,比活为 128 nmol/(min·mg),此时菲降解速率最大(AD-3 对菲的降解速率方程为 $Xt' = -168 e^{-0.84t}$,其中 Xt' 为 t 时刻 AD-3 对菲的降解速率,t 为时间)。稳定期初期比活为 107 nmol/(min·mg),低于对数生长期,菲降解速率也较对数生长期低。随着 AD-3 进入稳定后期,水杨酸羟化酶的活性为 27 nmol/(min·mg),菲的降解速率降低(图 3)。在对数生长期水杨酸-5-羟化酶的活性大时,菲的降解速率也大,在衰亡期时,水杨酸-5-羟化酶的活性小,菲的降解速率也小。所以,AD-3 菌株酶活力大小和多环芳烃降解速率快慢是一致的。通过测定水杨酸-5-羟化酶可以反映 AD-3 对菲的降解率。萘降解菌 *Ralstonia* sp. Strain U2^[6]的 *nagAaGHAb* 基因表达水杨酸-5-羟化酶和 U2 表达的萘双加氧酶共用电子传递蛋白,推测 AD-3 的水杨酸-5-羟化酶可能和菲双加氧酶共用电子传递蛋白,进而若菲双加氧酶的活性高,菲降解率高。

Pseudomonas sp. Strains C4^[22] 表达的 1-萘基-N-甲基氨基甲酸酯水解酶、1-萘酚羟化酶和龙胆酸双加氧酶在对数生长期酶的比活最高,本文的结果与已经报道的结果是基本一致的。在利用 AD-3 菌株

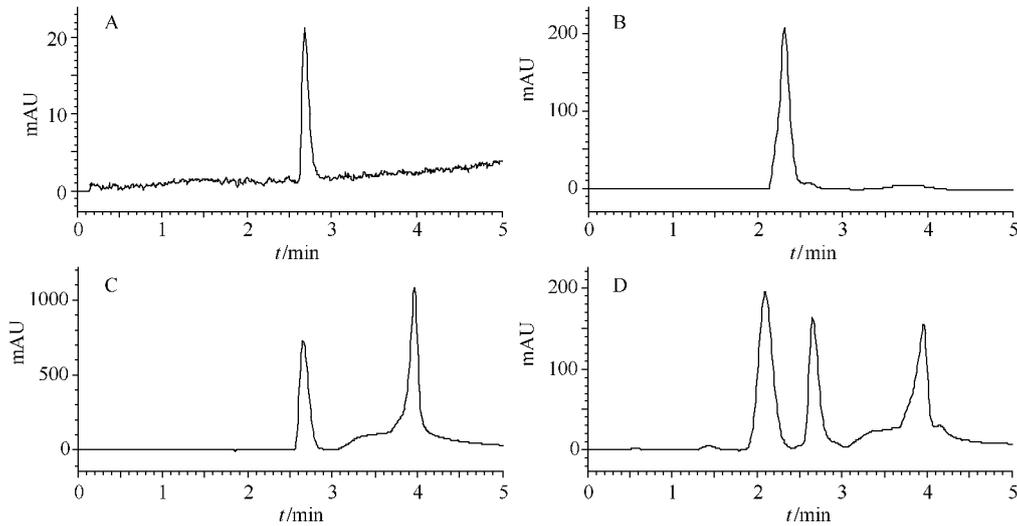


图2 HPLC 图谱, 水杨酸(A), 龙胆酸(B), 对照组(C), 实验组(D)

Fig.2 HPLC analysis on salicylic acid(A); gentisic acid(B); control(C); active cell-free extract from *Marteella* sp. AD-3(D).

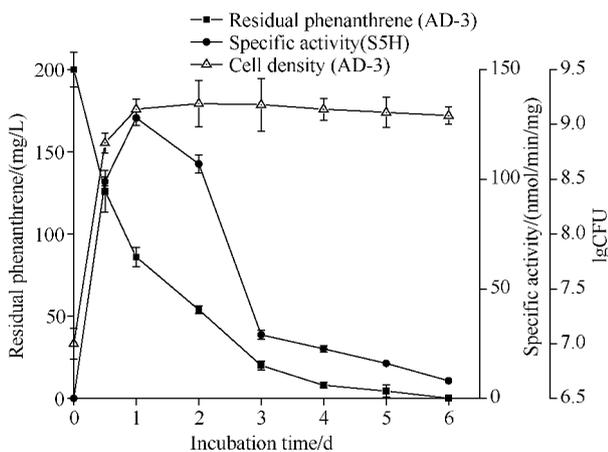


图3 *Marteella* sp. Strain AD-3 水杨酸羟化酶活性随培养时间变化情况

Fig.3 Growth versus specific activities of salicylate 5-hydroxylase from *Marteella* sp. Strain AD-3.

修复污染场地时,可以根据水杨酸-5-羟化酶的活性大小初步判断 AD-3 细菌的生长情况和对多环芳烃的降解速率,对于生物修复具有指导意义。

2.4.2 不同诱导物作用下的酶活性分析:在以菲、水杨酸为碳源的 AD-3 菌株的粗酶液中可以检测较高的水杨酸-5-羟化酶活性,水杨酸诱导的水杨酸-5-羟化酶的活性是菲诱导的水杨酸-5-羟化酶的活性 1.5 倍,而在以葡萄糖为底物的 AD-3 菌株粗酶液中不能检测到水杨酸-5-羟化酶(表 1),说明水杨酸-5-羟化酶是诱导酶。其中菲和水杨酸可以诱导该酶的

表达,而葡萄糖则不能诱导。

表 1 不同底物培养的 AD-3 菌株粗酶液中水杨酸-5-羟化酶的活性分析

Table 1 Specific activity of salicylate 5-hydroxylase in the cell-free extract of strain AD-3 grown on different substrates

Cells grown on	Specific activity / [nmol / (min·mg)]
Phenanthrene	128
Salicylate	185
Glucose	0

水杨酸是下游途径的起始代谢物,可以诱导水杨酸-5-羟化酶的表达。*Pseudomonas* sp. strain PPD^[5] 在含水杨酸的培养基中可以通过水杨酸-5-羟化酶羟化水杨酸生成龙胆酸,在龙胆酸-1,2-双加氧酶的催化下进一步代谢。PPD 菌株在含 4-羟基苯甲酸的培养基中不能表达这两种酶,说明水杨酸羟化酶是诱导酶。Chen 等^[23] 报道了菌株 *Pseudomonas saccharophila* P15 在经水杨酸诱导后对高分子量多环芳烃的起始降解率明显加快。因此,在分子量多环芳烃污染场地的生物修复过程中,向污染场地添加毒性较低的低分子量化合物能够诱导降解酶的表达,促进多环芳烃的降解。

2.4.3 不同浓度菲下的酶活性分析:测定 AD-3 菌株在不同浓度菲诱导下水杨酸-5-羟化酶的活性大小(图 4-A),以 200 mg/L 的菲诱导 AD-3 菌,其水杨酸羟化酶的活力最高为 123.4 nmol / (min·mg),以

100 mg/L 的菲诱导 AD-3 菌, 其水杨酸羟化酶的活力为 103.4 nmol/(min·mg), 以 400 mg/L 的菲诱导 AD-3 菌, 其水杨酸羟化酶的活力为 71.4 nmol/(min·mg)。菲浓度过低, 诱导作用弱, 降解酶的活性低; 菲浓度过高, 对细胞产生毒害作用, 导致降解酶的活性低。

2.4.4 不同生长盐度下的酶活性分析: 培养至对数生长后期的 AD-3 细胞表达的水杨酸羟化酶的活性 (图 4-B) 在盐度为 3% 时为最高, 在 1% 时, 活性达到 60 nmol/(min·mg), 在 0.5%、8% 的盐度相对较低, 为 45 nmol/(min·mg) 左右, 在 15% 盐度时水杨酸-5-羟化酶活力最低, 只有 10 nmol/(min·mg)。

所以, 要使降解酶发挥最大活性, 必须要有适宜的盐度范围。高盐场地的高盐环境就会抑制嗜盐降解酶的活性, AD-3 菌株表达的水杨酸-5-羟化酶在 0.5% - 8% 的盐度范围活性较高。

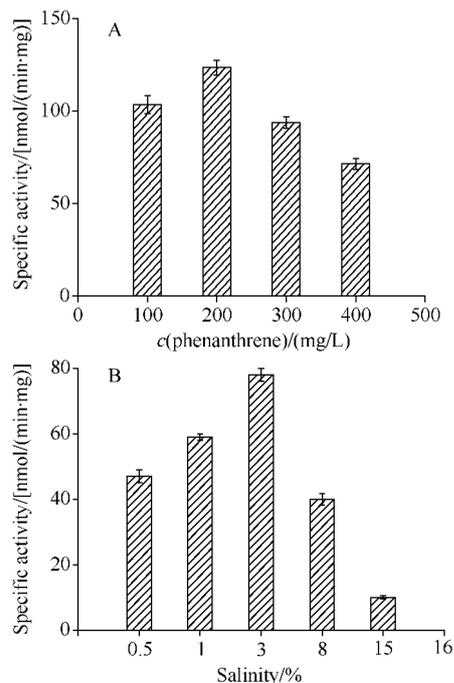


图 4 (A) 不同浓度菲、(B) 不同生长盐度对水杨酸-5-羟化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of phenanthrene (A), salinity (B) on specific activities of salicylate 5-hydroxylase.

AD-3 菌在盐度为 3%、pH 为 9.0、菲浓度为 200 mg/L 的培养条件下, 生长至对数生长后期时所表达的水杨酸-5-羟化酶活力最大。在相同的培养条件下, AD-3 菌对菲的降解速率是最高的。

2.5 水杨酸-5-羟化酶的酶学性质

2.5.1 不同温度下的酶活性分析: 图 5-A 为 AD-3 菌水杨酸-5-羟化酶不同反应温度的酶活变化情况, 由此看出, 当温度为 30℃ 时, 水杨酸-5-羟化酶有较高的活性, 为 132.8 nmol/(min·mg), 但在 25℃ 时水杨酸-5-羟化酶的活力为 103 nmol/(min·mg), 40℃ 时水杨酸-5-羟化酶的活性为 116 nmol/(min·mg), 这说明水杨酸-5-羟化酶的最适温度在 30℃ 左右。

2.5.2 不同 pH 下的酶活性分析: 图 5-B 为 AD-3 菌水杨酸-5-羟化酶不同反应 pH 值的酶活变化情况, 由此看出, 当 pH 为 7~8 时, 水杨酸-5-羟化酶有较好的活性, 但在酸性条件下水杨酸羟化酶的活力为 36.6 nmol/(min·mg), 这说明水杨酸-5-羟化酶的最适 pH 在 7.5 左右。

2.5.3 盐度对酶活力的影响: 测定粗酶中水杨酸-5-羟化酶在不同盐度下活性大小, 如图 5-C 所示。结果显示该酶的最适盐度为 3%, 且在盐度为 0.5% - 5% 具有较高的活性。嗜盐耐热古生菌 *Haloterrigena thermotolerans* Z4^[24] 的脂肪酶至少需要 2.9% NaCl 维持其活性, 属于嗜盐脂肪酶。

2.5.4 酶促动力学参数分析: 米氏常数的大小能够反映酶与底物之间亲和力的大小, 其值越小, 则酶与底物的亲和力越大^[25]。水杨酸-5-羟化酶酶促反应的公式为 $C/V = 43.6 + 5.03C$ ($C/V = K_m/V_{max} + C/V_{max}$, 其中 C 为水杨酸浓度, V 为反应速率即酶活性), 得到最大速率 V_{max} 为 200 nmol/(min·mg) (图 6-A), 米氏常数 K_m 为 8.7 $\mu\text{mol/L}$ (图 6-B)。当水杨酸浓度远小于 8.7 $\mu\text{mol/L}$ 时, 多数酶以游离状态存在, 反应速率为一级反应特征; 当水杨酸浓度远大于 8.7 $\mu\text{mol/L}$ 时, 酶处于结合状态, 反应为零级反应特征。

3 结论

(1) AD-3 菌在降解菲的过程中表达水杨酸-5-羟化酶, 通过水杨酸-龙胆酸途径代谢菲。在对数生长后期和稳定期初期的酶活性较高, 稳定后期活性很低。该酶的活力大小与 AD-3 降解菲的速率基本一致, 水杨酸-5-羟化酶受菲和水杨酸的诱导。

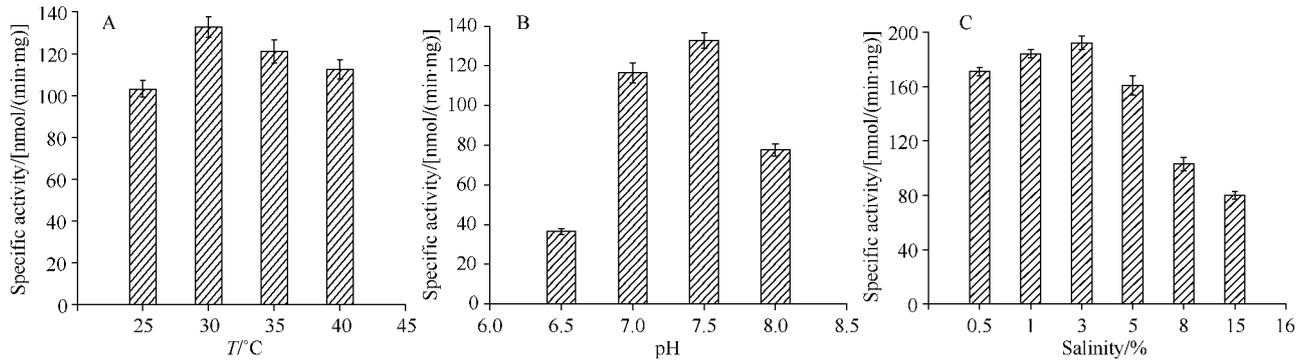


图5 温度(A)、pH(B)、盐度(C)对水杨酸羟化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature (A), pH (B), salinity (C) on specific activities of salicylate 5-hydroxylase.

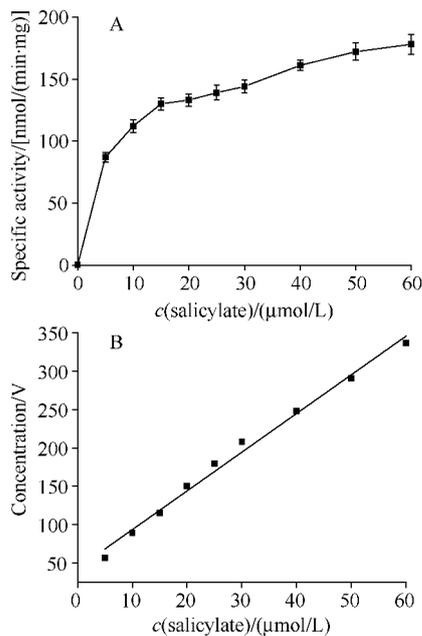


图6 水杨酸-5-羟化酶对水杨酸的酶促动力学反应

Fig. 6 Enzyme kinetics of salicylate 5-hydroxylase in the presence of salicylic acid. A: V versus concentration; B: Plot of Lineweaver-Burk.

(2) AD-3 菌株在盐度为 3%、pH 为 9.0、菲浓度为 200 mg/L 的培养条件下所表达的水杨酸-5-羟化酶活力最大。

参考文献

- [1] Díaz MP, Boyd KG, Grigson SJ, Burgess JG. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 79 (2): 145-153.
- [2] Arulazhagan P and Vasudevan N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62 (2): 388-394.
- [3] 肖嘉俊, 陆贻通. 土壤微生物降解多环芳烃菲的研究进展. *科技通报 (Bulletin of Science and Technology)*, 2009, 25 (5): 673-679.
- [4] Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environment Research and Public Health*, 2009, 6: 278-309.
- [5] Ishiyama D, Vujaklija D, Davies J. Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (3): 1297-1306.
- [6] Zhou NY, Al-Dulayymi J, Baird MS, Williams PA. Salicylate 5-Hydroxylase from *Ralstonia* sp. Strain U2: a Monooxygenase with Close Relationships to and Shared Electron Transport Proteins with Naphthalene Dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (6): 1547-1555.
- [7] Deveryshetty J, Suvékala V, Varadamshetty G, Phale PS. Metabolism of 2-, 3- and 4-hydroxybenzoates by soil isolates *Alcaligenes* sp. Strain PPH and *Pseudomonas* sp. Strain PPD. *FEMS Microbiology Letter*, 2007, 268: 59-66.
- [8] Grund E, Denecke B, Eichenlaub R. Naphthalene Degradation via Salicylate and Gentisate by *Rhodococcus* sp. Strain B4. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (6): 1874-1877.
- [9] Hickey WJ, Sabat G, Yuroff AS, Arment AR, Pérez-

- Leshner J. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Functional Analysis of a Novel, Mobile Cluster of Biodegradation Genes from *Pseudomonas aeruginosa* Strain JB2. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (10) : 4603-4609.
- [10] Zhao BS, Wang H, Mao XW. Biodegradation of Phenanthrene by a Halophilic Bacterial Consortium Under Aerobic Conditions. *Current Microbiology*, 2009, 58 (3) : 205-210.
- [11] Jaganaman S, Pinto A, Tarasev M, Ballou DP. High levels of expression of the Iron-Sulfur Proteins Phthalate Dioxygenase and Phthalate Dioxygenase Reductase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52 (2) : 273-279.
- [12] Sanakis Y, Mamma D, Christakopoulos P, Stamatis H. Catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* in organic media—an electron paramagnetic resonance study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 33: 101-106.
- [13] Pumphrey GM, Madsen EL. Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology*, 2007, 153: 3730-3738.
- [14] Shen XH, Jiang CY, Huang Y, Liu ZP, Liu SJ. Functional Identification of Novel Genes Involved in the Glutathione-Independent Gentisate Pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005: 3442-3452.
- [15] 周德庆. 微生物学教程. 第二版. 北京:高等教育出版社, 2002.
- [16] 张萌, 张晓梅, 窦文芳, 许泓瑜, 许正宏. 嗜盐脂肪酶产生菌的筛选及其粗酶性质. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36 (1) : 14-19.
- [17] Jouanneau Y, Micoud J, Christine M. Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from *Sphingomonas* sp. Strain CHY-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (23) : 7515-7521.
- [18] Liu DQ, Zhu SN, Ni JR. Purification and characterisation of a gentisate 1, 2-dioxygenase from *Ralstonia solanacearum* GMI 1000. *Annals of Microbiology*, 2007, 57 (3) : 307-312.
- [19] Tao XQ, Lu GN, Dang Z, Yang C, Yi XY. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 401-408.
- [20] Ghosal D, Chakraborty J, Khara P, Tapan KD. Degradation of phenanthrene via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid by *Ochrobactrum* sp. Strain PWTJD. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 313: 103-110.
- [21] Stingley RL, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322: 133-146.
- [22] Swetha VP, Phale PS. Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates *Pseudomonas* sp. Strains C4, C5, and C6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (10) : 5951-5956.
- [23] Chen SH, Aithen MD. Salicylate stimulates the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33: 435-439.
- [24] Fu WJ, Oriel P. Gentisate 1, 2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles*, 1998, 2: 439-446.
- [25] 李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (8) : 1058-1064.

Characterization of salicylate 5-hydroxylase for phenanthrene degradation using moderately halophilic *Marteella* sp. AD-3

Fei Dong, Changzheng Cui^{*}, Tiancai Feng, Yaoyu Feng, Yongdi Liu

State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] To identify the relationship between salicylate 5-hydroxylase activity and the degradation rate of phenanthrene by moderately halophilic *Marteella* sp. AD-3, and to investigate their enzymatic characteristics.

[Methods] The products resulted from degradation of salicylic acid using the crude enzyme produced by AD-3 was analyzed using HPLC analysis, and salicylate 5-hydroxylase activities at different conditions was calculated according to the change of NADH absorbance at 340 nm.

[Results] The salicylate 5-hydroxylase activity was higher during log-phase and early stationary phase of AD-3, and the enzyme activity was in consistent with phenanthrene degradation rate. The enzyme production was induced by phenanthrene and salicylic acid. The highest enzyme activity, 132.8 nmol/(min·mg), from strain AD-3 was obtained under the phenanthrene concentration of 200 mg/L, 3% salinity and a pH of 9.0. The optimum conditions for degradation of salicylic acid using this enzyme were 30°C, pH 7.5, and salinity 3%. The V_{max} and K_m for the enzyme were 200 nmol/(min·mg) and 8.7 μ mol/L, respectively. [Conclusion] The salicylate 5-hydroxylase was produced in the degradation of phenanthrene in AD-3. The enzyme activity was related to phenanthrene degradation rate.

Keywords: phenanthrene, salicylate 5-hydroxylase, enzyme activity, salinity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund of the Fundamental Research Funds for the Central Universities (WB1114031), by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20110074130002) and by the State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control (11K02ESPCT)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-21-64253988; E-mail: cuichangzheng@ecust.edu.cn

Received: 16 March 2012 / Revised: 22 April 2012