

# 一个 II 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 Methane Monooxygenases Hydroxylase from a Type II Methanotroph : Purification and Physical-chemical Properties

华绍烽, 李树本\*, 辛嘉英, 牛建中, 夏春谷, 唐 威, 胡宵雪

HUA Shao-Feng, LI Shu-Ben\*, XIN Jia-Ying, NIU Jian-Zhong, XIA Chun-Gu, TANG Wei and HU Xiao-Xue

中国科学院兰州化学物理研究所/羧基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000

State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

**摘 要** 甲烷氧化细菌能够催化甲烷和一系列小分子烃类化合物的羟基化反应, 对控制全球变暖起着重要作用, 在工业催化和生物除污中具有非凡的潜能。应用层析方法纯化了 II 型甲烷氧化细菌 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 中甲烷单加氧酶的羟基化酶, 并对其进行了表征。凝胶过滤法测定了该酶分子量为 201.3kD, SDS-PAGE 表明羟基化酶含有三个亚基( $\alpha\beta\gamma$ ), 分子量分别为 58kD、36kD 和 23kD, 比较两种方法证明该羟基化酶是一个同型二聚体构型( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>2</sub>, 总分子量为 234kD。薄层等电聚焦测定该酶的等电点为 5.2。酶的比活力为 603.6nmol/(min·mg), 活力回收为 34.3%。HPLC 法测定该酶的纯度在 95% 以上。原子吸收光谱显示每分子羟基化酶中含有 3.02 个 Fe 原子。羟基化酶的稳定性 pH 值为 6.2~7.5, 稳定性温度为低于 35℃。菌株 IMV 3011 的细胞表观构型呈现了长型、稍微弯曲的杆状形态。

**关键词** 甲烷氧化细菌, 甲烷单加氧酶, 羟基化酶, 纯化, 理化性质

中图分类号 Q814.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-1007-06

**Abstract** Methanotrophs can catalyze hydroxylate of methane and some hydrocarbon. Which play an important role in mitigating global warming and have also potential significance for industrial applications or bioremediation. A high activity of hydroxylase, a crucial component in sMMO, from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 has been purified to homologues by using chromatographic techniques. The molecular weight of the hydroxylase determined by gel filtration is 201.3kD, and SDS-PAGE showed that hydroxylase consists of three subunit( $\alpha\beta\gamma$ ) with molecular weights of 58kD, 36kD and 23kD respectively, drawing a comparison both methods indicated that the hydroxylase is a homodimer with an( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>2</sub> configuration. Purified hydroxylase has a pI at 5.2 judged by thin layer isoelectric focusing. The purified hydroxylase contains 3.02 mol of iron per mol of protein. The stability pH for the hydroxylase in solution is 5.8~8.0 and the stability temperature is below 35℃. The cells form show a long, bent, and rod-shaped with even surface observed by scanning electron microscopy.

**Key words** methanotroph, methane monooxygenases, hydroxylase, purification, physical-chemical properties

Received: June 9, 2006; Accepted: August 7, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 20573124) and the Opening Project of State Key Laboratory of Microbial Technology.

\* Corresponding author. Tel 86-931-4968058; Fax 86-931-4968129; E-mail: lishb@lzb.ac.cn

国家自然科学基金(No. 20573124)和山东大学国家微生物技术重点实验室开放课题资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

甲烷氧化细菌以甲烷为唯一的碳源和能源<sup>[1]</sup>。甲烷单加氧酶(Methane monooxygenase,简称MMO)是甲烷氧化细菌中的主要酶系,在常温、常压下,能够催化甲烷转化为甲醇的反应, $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NAD(P)}\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ,而在化学催化条件下实现该反应是极其困难的。甲烷单加氧酶在细胞中有两种不同表现形式:溶解性甲烷单加氧酶(soluble MMO,简称sMMO)和颗粒性甲烷单加氧酶(particulate MMO,简称pMMO),它们都能催化 $\text{CH}_4$ 生成 $\text{CH}_3\text{OH}$ 。一般来讲,在已发现的甲烷氧化细菌中均能表达pMMO,只有部分甲烷氧化细菌能够表达sMMO,特别是在II型、X型甲烷氧化细菌中,这种不同的表达被Cu离子所控制<sup>[2,3]</sup>。与pMMO相比较,sMMO具有更广泛的底物专一性,存在于细胞质中,因此被认为最有希望在生物催化和生物除污过程中发挥作用。sMMO是由4个组分组成的复合酶体系:羟甲基化酶(MMO Hydroxylase,简称MMOH);调节蛋白B(MMOB);还原酶(MMO Reductase,简称MMOR)和一个未知功能的组分orfY,羟甲基化酶是酶催化反应的活性中心。迄今,已发现的甲烷氧化菌有数百种,对其研究均以菌株的鉴定和催化反应为主,有关酶学性质、结构功能的研究报道较少,仅有来自6个甲烷氧化菌的甲烷单加氧酶被表征(*Methylocystis* sp. WI14, *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylocystis* sp. M, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylobacterium* sp. CRL-26, *Methylomonas* sp. GYJ3)。国内的相关研究主要以本研究室报道的*Methylomonas* sp. GYJ3和*Methylosinus trichosporium* IMV 3011为主<sup>[4-7]</sup>。与其它具有商用价值的酶相比较,显然甲烷单加氧酶的基础性研究是缺乏的,不利于其应用性研究。

*Methylosinus trichosporium* IMV 3011是一个II型甲烷氧化细菌,也是国内仅有的几株甲烷氧化菌株之一,此前,辛嘉英等对*Methylosinus trichosporium* IMV 3011的整细胞催化反应性质进行了报道<sup>[8,9]</sup>,迄今对其sMMO的研究还是空白。为了表明其酶学性质,研究来自不同环境中甲烷单加氧酶的相关性,我们对该菌株中溶解性甲烷单加氧酶进行了表征,报道了细胞的生长状态,溶解性甲烷单加氧酶羟甲基化酶的分离纯化和理化性质,为进一步进行其结构研究和分子生物学研究奠定基础,并与国外已报道的相关研究结果进行比较,有利于其应用研究的进展。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要的仪器与试剂

CR 21 高速冷冻离心机(Hitachi),全自动7L发酵罐(上海保兴生物发酵设备有限公司),GC7890 II型气相色谱(上海天美仪器公司),1090型高效液相色谱(HP),180-80型原子吸收分光光度计(Hitachi),Multiphor II型多功能电泳仪(Pharmacia),JEOL JSM-6400V型电子显微镜(Japan),RF-540型荧光光谱仪(Shimadzu),8453型分光光度计(HP),甲烷(99.9%,兰州化物所特种气体站),BCA蛋白分析试剂盒(Pierce),其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:**菌株甲基弯菌*Methylosinus trichosporium* IMV 3011由俄罗斯科学院催化研究所的科学家友好赠送。菌株培养在基础液体培养基中,培养基的组成(g/L): $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.49,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.40,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{KNO}_3$  1.6,  $\text{NaCl}$  0.3,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.004,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0004,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.00034,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.00024。首先摇瓶培养,当培养液的光密度值 $OD_{590}$ 为1.0~1.2时,接种于发酵罐中放大培养,培养条件( $33 \pm 1$ ) $^\circ\text{C}$ ,300r/min,pH 7.0~7.2,甲烷-空气的混合气(1:3)的流速为0.2L/min。培养液的密度 $OD_{590}$ 达到1.2~1.5时离心收集细胞(4 $^\circ\text{C}$ ),保存在-80 $^\circ\text{C}$ 条件下备用。平均每升培养液中能获得6~10g湿菌体。

**1.2.2 电镜形貌观察:**指数期收获的细胞做扫描电镜形貌观察,固定方法参照文献[10],依次用3%的戊二醛,1%的锇酸固定。然后用乙醇(30%~100%)脱水后置空气中干燥,细胞表面喷胶体金后,在JEOL JSM-6400V电镜下进行观察。

**1.2.3 酶活性分析:**MMO活性分析采用丙烯环氧化法,参照文献[7]进行,产物的检测和定量分析在气相色谱仪上进行,配备SE-54型弹性毛细管柱(25m $\times$ 0.25mm i.d),柱温80 $^\circ\text{C}$ ,FID检测器。反应体积为2mL,最佳反应温度为33 $^\circ\text{C}$ ,以顶空2mL空气被丙烯替代为反应开始,5min后取样进行分析。基础反应液为添加了10mmol/L的NADH(Sigma)和5mmol/L甲酸钠(Fluka)的无细胞提取液。羟甲基化酶的活性用反应液活性减去空白来表示。活力单位定义为:每分钟产生1nmol的环氧丙烷为一个单位

**1.2.4 无细胞提取液的制备**：取冷冻细胞约 30g 悬浮于 50mL 的 25mmol/L MOPS (pH 7.2) 缓冲液中，该缓冲液含 200 $\mu$ mol/L  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ，8mmol/L 巯基乙酸钠，2mmol/L 半胱氨酸，2mmol/L DTT，2 $\mu$ mol/L Dnase I 和 0.5mmol/L  $\text{MgCl}_2$  (Buffer A)，采用超声破碎细胞 (12min，0 ~ 10℃)，离心收集的上清液经 0.22 $\mu$ mol/L 膜超滤后为无细胞提取液。

**1.2.5 羟基化酶的分离纯化**：羟基化酶的纯化方法参照文献 [11]，并进行适当的修改。首先采用 DEAE Sepharose Fast Flow Column (26mm  $\times$  200mm，Pharmacia) 进行初步分离，缓冲液为 Buffer A，洗脱梯度为 40mmol/L 至 500mmol/L NaCl，流速为 1.3 mL/min。羟基化酶、组分 B 和组分 C 分别在 50mmol/L，150mmol/L 和 300mmol/L NaCl 时被洗脱，经 SDS-PAGE 检测和活性分析后收集活性组分，羟基化酶组分经浓缩后，再上 Sephacryl S-300 column (16mm  $\times$  900mm，Pharmacia) 进行纯化，缓冲液为含 50mmol/L NaCl 的 Buffer A，洗脱流速为 0.6 mL/min。经分析后，收集羟基化酶活性组分，最后的纯化采用 Resource Q (Pharmacia) 柱进行，缓冲液为 25mmol/L MOPS，pH 7.0，洗脱梯度 0 ~ 30% NaCl，洗脱流速 1mL/min。以上操作均在 0 ~ 4℃ 条件下进行。活性组分超滤浓缩后保存于 -80℃。

**1.2.6 分子量的测定**：采用 Superdex™ 200 prep grade (Pharmacia) 凝胶过滤法测定羟基化酶的分子量，标准蛋白为 Pharmacia 产品，Ferritin (M = 440 000)，Catalase (M = 232 000)，Aldolase (M = 158 000)，Bovine serum albumin (M = 67 000)，Ovalbumin (M = 43 000)，Chymotrypsinogen A (M = 25 000) 和 Ribonuclease A (M = 13 700)，具体方法参照文献 [12]。羟基化酶的亚基分子量测定采用 SDS-PAGE 方法，凝胶浓度为 12%，操作方法参照文献 [13]，分子量标准蛋白为 Pharmacia 的产品，电泳后进行固定、考马斯亮蓝 R250 染色和脱色，通过比较计算  $R_f$  值获得各亚基的表观分子量。

**1.2.7 等电点 (IEF) 的测定**：羟基化酶的等电点测定采用 0.5mm 薄层胶 (T = 5%，C = 3%)，两性电解质为 LKB-Produkter AB 产品 (pH 3.0 ~ 10)，聚焦电压为 2000 V，电泳后，凝胶被固定、考马斯亮蓝 R250 染色和脱色，IEF 标准蛋白为 Pharmacia 产品，具体操作参照文献 [13]。

**1.2.8 不同条件对羟基化酶活性的影响实验**：添加不同的稳定性试剂到无细胞提取溶液中或  $\text{N}_2$  饱和

酶溶液，观察羟基化酶的残存活力来分析在不同条件下羟基化酶的稳定性。添加的稳定性试剂有 5mmol/L 的连二亚硫酸钠、15% 丙三醇、20mmol/L DTT 或用  $\text{N}_2$  完全饱和酶溶液，放置 48h (4℃) 后测定酶的残余活力。pH 稳定性测定是在 25mmol/L 不同缓冲液中进行 (pH 4.5 ~ 6.0，柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液；pH 6.0 ~ 8.0，磷酸盐缓冲液；pH 8.0 ~ 9.1，Tris-HCl 缓冲液) 4℃ 条件下放置 8h 后测定酶活力。羟基化酶的热稳定性测定是在 25mmol/L PBS，pH 7.0 缓冲液中进行，温度范围 26℃ ~ 55℃，放置 8h 后测定酶的残余活力。

**1.2.9 其它方法**：细胞密度的分析采用 590nm 光吸收法，一个光吸收单位相当于 1.6mg 干重细胞/mL。蛋白质含量的测定使用 BCA 蛋白分析试剂盒，以牛血清白蛋白为标准蛋白，测定方法按照试剂盒说明书进行。羟基化酶的纯度分析使用 1090 型 HPLC 色谱分析，缓冲液为 50mmol/L PBS，pH 7.2，色谱柱为 Biosep Sec-S3000 柱 (7.8mm  $\times$  300mm，Phenomenex Co. USA)。金属离子 Fe、Cu、Zn 的分析采用原子吸收光谱法，样品在无金属离子的缓冲液中充分透析后进行测定，以相同缓冲液为空白对照，标准物质来自中国国家标准物质研究中心，使用前用 ddH<sub>2</sub>O 配制。羟基化酶的荧光光谱分析使用 RF-540 型荧光光谱仪，缓冲液为 25mmol/L Tris-HCl，pH 7.2，280nm 的激发光，扫描范围为 200nm ~ 600nm。羟基化酶的 UV-Vis 光谱测定使用 8453 型分光光度计，扫描范围为 190nm ~ 600nm，缓冲液为 25mmol/L Tris-HCl，pH 7.2。

## 2 结果

### 2.1 羟基化酶的纯化

对 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 中的羟基化酶进行了分离纯化、表征和酶学性质研究，表 1 给出了羟基化酶的纯化结果，经过三步层析纯化，羟基化酶的 HPLC 谱图上显示一个单峰，酶的纯度达到了 95% 以上，这个纯度完全能够满足进一步表征研究的需求，见图 1。SDS-PAGE 显示了三个亚基带，凝胶经激光光密度计 (Pharmacia LKB UltroScan XL) 分析，三个亚基的蛋白含量之和在 97% 以上，纯化的酶分析数据表明，大量的杂质蛋白已经去除，羟基化酶的回收率为 34.3%，随着纯度的增加，酶的比活力也在增加，最后的纯化倍数为 8.08，经过计算，在 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 细胞中，羟基化酶约占 4.1%，纯化后的羟基化酶是无色、无

味的 ,甚至在浓度较高时也呈现为无色液体。

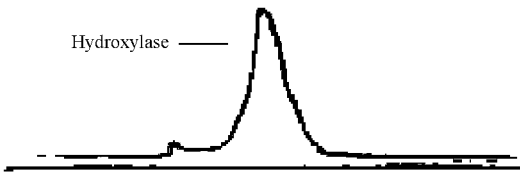


图1 HPLC 法测定甲烷单加氧酶羟基化酶的纯度  
Fig.1 The purity of methane monooxygenase hydroxylase determined by HPLC

Analysis condition : Column temperature 25℃ , flow rate 0.5mL/min , detection wavelength 280nm.

### 2.2 羟基化酶的理化性质

通过凝胶过滤层析法测定 ,羟基化酶的分子量约为 201.36kD。SDS-PAGE 分析表明纯化的羟基化

酶由三个亚基  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  组成 ,分子量分别为 58kD ,36kD 和 23kD ,单体分子量为 117kD ,见图 2 ,两种分子量测定方法经过比较分析说明 ,羟基化酶是一个同源二聚体 ,呈现  $(\alpha\beta\gamma)_2$  构型 ,总分子量应为 234kD。薄层等电聚焦分析证明羟基化酶的等电点(pI)为 5.2 ,呈现了单一紧密的条带 ,见图 3 ,证明羟基化酶是一个微偏酸性的蛋白酶 ,这个结果与 *Methylococcus cupsulutus* Bath 菌的羟基化酶基本一致 (pI 5.1 ~ 5.2 )<sup>[8]</sup> ,而不同于 *Methylocystis* sp. W114 菌的羟基化酶 (pI 4.3 )<sup>[10]</sup>。原子吸收光谱测定表明羟基化酶中约含有 3.02mol Fe/mol 蛋白 ,Cu 和 Zn 未能检出 ,说明该羟基化酶是一个只含 Fe 的金属酶。

表 1 可溶性甲烷单加氧酶的纯化结果\*

Table 1 Purification scheme of the hydroxylase component of soluble methane monooxygenases*						
Step	Total volume /mL	Protein ( mg/mL )	Total activity/u	Specific activity ( nmol/min per mg of protein )	Recovery/%	Purification fold
Cell-free extract	125	17.3	161781.5	74.7	100	1.00
DEAE Sepharose FF	105	4.5	94538.3	198.1	58.4	2.65
Sephacryl S-300	24	5.0	67349.7	559.6	41.6	7.49
Resource Q column	22	4.2	55494.3	603.6	34.3	8.08

\* Hydroxylase activity was measured by propylene oxidation method in presence of component B and component C.

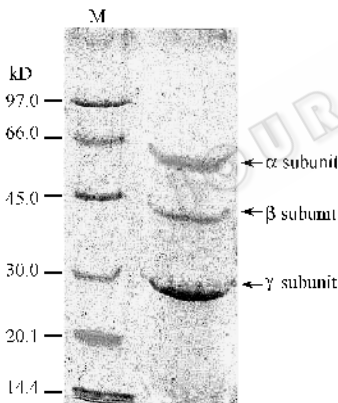


图2 SDS-PAGE 测定羟基化酶亚基分子量  
Fig.2 SDS-PAGE determination of the molecular weight of hydroxylase subunits

### 2.3 羟基化酶的稳定性

羟基化酶的分离液表现出了相对不稳定性 ,在 4℃条件下 ,以放置 48h 后酶活性损失 42% 为对照 ( A )。在同样条件下 ,分别添加 15% 甘油 ( C ) 5mmol/L 的连二亚硫酸钠 ( D ) 20mmol/L DTT ( E ) 和完全用 N<sub>2</sub> 饱和的酶溶液 ( B ) ,羟基化酶的相对活性有不同程度的提高 ,以添加 20mmol/L DTT 最为明显 ,见图 4。

### 2.4 pH 和温度对羟基化酶稳定性的影响

实验表明不同的 pH、温度对酶活性有一定影

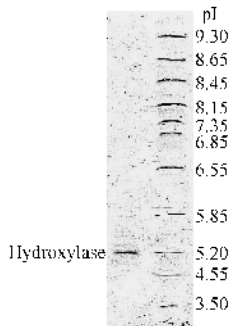


图3 薄层等电聚焦法测定羟基化酶的等电点  
Fig.3 The isoelectric point determination of hydroxylase on thin layer isoelectric focusing gels ( 0.5mm ) using broad pI markers produced by Pharmacia

响 ,在 pH 6.2 到 7.5 范围内 ,羟基化酶活性表现出一定程度的稳定性。羟基化酶热稳定性温度低于 35℃。但在 pH 高于 8.6、低于 4.5 或温度高于 40℃ 的条件下 ,羟基化酶几乎完全失活 ,见图 5。鉴于这一实验结果 ,纯化后的羟基化酶应在适宜条件下立刻使用或在低温冷冻条件下保藏。

### 2.5 羟基化酶的荧光光谱和 UV-Vis 光谱

羟基化酶的 UV-Vis 吸收光谱显示了最大的吸收峰在 281nm ,在 395nm ~ 420nm 有一个弱小的“ 肩峰 ” ,280nm 附近的峰与其它的相关报道基本一致 ,体现了蛋白质的特性 ,395nm ~ 420nm 区域的峰与来

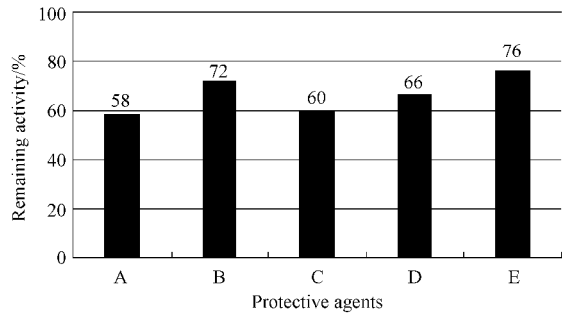


图 4 不同的保护剂对羟基化酶活性的影响

Fig.4 The effect of various protective agents on hydroxylase activity

A :Tris-HCl buffer , B : N<sub>2</sub> atmosphere , C : 15 % glycerin , D : 5mmol/L dithionite , E : 20mmol/L DTT .

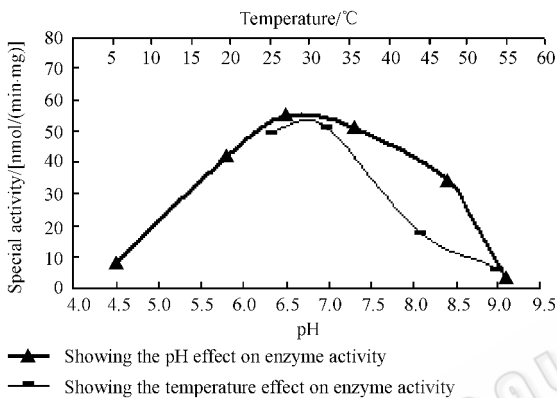


图 5 pH 和温度对羟基化酶活性的影响

Fig.5 Effects of pH value and temperature on stability of hydroxylase

自 *Methylococcus capsulatus* Bath( 406nm ~ 410nm )<sup>[4]</sup>、*Methylobacterium* sp. CRL-26( 408nm )<sup>[5]</sup>的报道相似、从相关报道得知 ,在含 Fe 的羰基桥活性中心的蛋白质中 ,410nm 附近的峰与酪氨酸残基相关。羟基化酶的荧光光谱分析显示荧光发射峰在 341.3nm ,而来自 *Methylobacterium* sp. CRL-26<sup>[5]</sup> 的报道是在 490nm 和 630nm ,其它羟基化酶没有该相关数据。

2.6 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 的扫描电镜观察

菌株 IMV 3011 的细胞表面构型呈现了长型、稍微弯曲的杆状形态 ,细胞表面饱满均匀 ,说明细胞是均一的 ,在多年的储藏过程中既没有变形也没有被污染 ,且能稳定表达 ,见图 6。

3 讨论

我们获得了一个高比活性的羟基化酶 [ 603.6nmol( min · mg ) ] ,这个比活力仅次于来自 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的羟基化酶

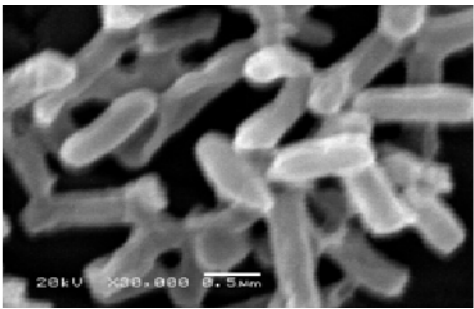


图 6 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 的电镜形貌观察 ,细胞呈现微弯曲的杆状形态

Fig.6 SEM micrograph of *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 isolated from laboratory cultures shows a long rodshaped cells with even cell surface view

[ 1700nmol( min · mg ) ] ,而高于其它已报道的羟基化酶 ,将具有较高的工业应用价值<sup>[4-7]</sup>。在酶的分离纯化中一个最引人关注的问题是酶活性的稳定性 ,一个理想的纯化过程既要保证酶的纯度 ,又要使酶的活性损失最小 ,因此我们在分离纯化中添加了一定的 Fe( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>( SO<sub>4</sub> )<sub>2</sub>、DTT、半胱氨酸和巯基乙酸钠 ,与不添加的情况相比较 (数据未显示) 稳定性有一定的增加。在羟基化酶的提取液中分别添加 15% 甘油、5mmol/L 的连二亚硫酸钠、20mmol/L DTT 或完全用 N<sub>2</sub> 饱和酶溶液保护羟基化酶活性 ,结果以添加 20mmol/L DTT 的结果最为明显 ,说明甲烷单加氧酶对所存在的环境是非常敏感的 ,这一实验结果将有利于甲烷单加氧酶的结构和催化化学研究。尽管酶的活性在一定程度上得到了保护 ,但结果仍然不能令人满意 ,酶活性的稳定性仍然是一个需要解决的问题 ,因为在甲烷单加氧酶中羟基化酶是一个关键性的酶组分。

羟基化酶分子量测定采用了分子筛和 SDS-PAGE 的方法 ,两种方法的测定结果是近似的 ,误差可能是由分子的形状和测定系统带来的 ,与已报道的羟基化酶相比较 ,分子量小于其它菌株的羟基化酶 ,而具有相似的分子结构组成。说明有可能所有的甲烷单加氧酶具有相同或相似的结构功能 ,这将有 利于酶的模拟和催化化学研究。

据文献报道 ,来自于 *Methylosinus trichosporium* OB3b ,*Methylobacterium* sp. strain CRL-26 的羟基化酶中 ,除了含有 Fe 之外 ,还含有少量的 Zn ,而 Zn 的功能是不清楚的 ,也没有证据表明 Zn 参与了酶结构的组成 ,因此我们推测很有可能 Zn 是被污染的成分。甲烷单加氧酶是一个具有双核铁活性中心的酶 ,Fe 含量是一个至关重要的数据 ,Fe 的含量与酶的比活

性有着直接的关系 ,可以假设在 MMO 分子中 ,两个单体具有不同的稳定性 ,在双核铁活性中心 ,一个铁或两个铁脱落都会造成活性中心结构的破坏 ,将失去活性 ,只有两个铁都存在 ,才能保持结构的平衡与完整性 ,能与调节蛋白相互作用 ,与底物形成活性化合物 ,而在纯化过程中 ,若其中一个单体活性中心的铁脱落 ,那么只有另一个单体具有活性 ,造成这种情况越多 ,活性损失就越明显 ,这也解释了为什么理论计算每个分子蛋白中应有 4mol 铁 ,而实际测定只有 3.02mol 铁的原因。从已报道的文献看 ,铁的含量与酶的比活力有着直接关系 ,铁含量越高 ,酶的活力也越高 ,见表 2。有诸多因素可以造成酶失活 ,对于金属酶来讲 ,如何防止金属离子的脱落或金属离子脱落后如何恢复 ,将是一个今后有意义的研究课题 ,我们尝试了在酶溶液中加入少量的  $\text{FeCl}_2$  ,发现活性并没有明显变化 ,这与 Nakajima 的研究有所不同<sup>[14]</sup> ,他们认为在羟基化酶的溶液中添加了  $\text{Fe}^{2+}$  之后 ,羟基化酶的活性可以恢复。在细胞内 ,酶失活后有一个自身修复机制 ,在细胞外 ,可能是由于酶结构的破坏 ,已失去了使之结构恢复的环境条件。

表 2 不同甲烷氧化菌中金属铁含量与活性的比较<sup>[4-7]</sup>

Table 2 Relativity between the Fe content and specific activity from various methanotrophs<sup>[4-7]</sup>

Organism	Fe content ( $\mu\text{mol/mol}$ )	Specific activity ( $\mu\text{nmol/min per mg}$ )
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	4.3	1700
<i>Methylocystis</i> sp. WI 14	3.6	518
<i>Methylosinus trichosporium</i> IMV 3011	3.02	603.6
<i>Methylobacterium</i> sp. CRL-26	2.8	208
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	2.3	72
<i>Methylomonas</i> sp. GYJ3	2.1	222.5

羟基化酶在离开细胞内环境以后 ,酶的不稳定性可能由以下情况引起 ,一是由于位于酶活性中心的 Fe 原子脱落造成 ,特别是在透析过程中 ,这将引起部分酶的活性中心结构改变 ;二是由于酶被提取后改变了酶的自然环境包括 pH ,溶液的离子强度等 ,酶系的三组分间以及与辅酶间精确的结合和协调被破坏 ,难以恢复到细胞内的水平 ;三是在生物体内有很好的电子供体系统和调节系统 ,当这个系统被打乱之后 ,我们补充电子供体 ,有些电子传递链很难恢复 ,或只有一部分能够恢复 ,而不同于细胞内有一个完整的协调反应机制 ,另外细胞内水与脂类物质的环境有利于辅酶的作用 ,而在体外是一个完全水的环境 ,从而影响到辅酶的功效。因此 ,在体外缺

乏一个电子传递系统和酶构象的稳定环境 ,也导致了酶的不稳定性。总之 ,一个有效的酶结构信息 ,将有利于对其反应机理的研究。

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Lipscomb JD. Biochemistry of the soluble methane monooxygenases. *Annu Rev Microbiol* , 1994 , **48** : 371 - 399

[ 2 ] Murrell JC , Gilbert B , McDonald IR. Molecular biology and regulation of methane monooxygenases. *Arch Microbiol* , 2000 , **173** : 325 - 332

[ 3 ] Nielsen AK , Gerdes K , Murrell C. Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol Microbiol* , 1997 , **25** : 399 - 409

[ 4 ] Jing Y , Wilkins PC , Dalton H. Activation of the hydroxylase of sMMO from *Methylococcus capsulatus* ( Bath ) by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* , 1993 , **1163** : 105 - 112

[ 5 ] Patel RN , Savas JC. Purification and properties of the hydroxylase component of methane monooxygenase. *J Bacteriol* , 1987 , **169** : 2313 - 2317

[ 6 ] Grosse S , Laramée L , Wendlandt KD *et al.* Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp strain WI 14. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 3929 - 3935

[ 7 ] Shen RN , Yu CL , Ma QQ *et al.* Direct evidence for a soluble methane monooxygenases form type I methanotrophic bacterial : Purification and properties of a soluble methane monooxygenases from *Methylomonas* sp. GYJ3. *Arch Biochem Biophys* , 1997 , **345** : 223 - 229

[ 8 ] Xin JY , Cui JR , Niu JZ *et al.* Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. *Biocatal Biotransfor* , 2004 , **22** : 225 - 229

[ 9 ] Xin JY , Cui JR , Niu JZ *et al.* Biosynthesis of methanol from  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$  by methanotrophic bacteria. *Biotechnology* , 2004 , **3** : 67 - 71

[ 10 ] Kang LD(康莲娣). Techniques of Biological Electron Microscopy. Hefei : University of Science and Technology of China Press ( 中国科技大学出版社 ) , 2003

[ 11 ] Buzy A , Millar AL , Legros V *et al.* The hydroxylase component of soluble methane monooxygenases from *Methylococcus capsulatus* ( Bath ) exists in several forms as shown by electrospray-ionisation mass spectrometry. *Eur J Biochem* , 1998 , **254** : 6022 - 6029

[ 12 ] Zhao YF(赵永芳). Technology Principles and Applications of Biochemistry. Beijing : Science Press( 科学出版社 ) , 2002

[ 13 ] Multiphor Electrophoresis System , Laboratore Manual. Sweden : LKB produkter AB , 1986

[ 14 ] Nakajima T , Uchiyama H , Yagi O *et al.* Purification and properties of a soluble methane monooxygenases from *Methylocystis* sp. M. *Biosci Biotechnol Biochem* , 1992 , **56** : 736 - 740