

# 产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. P156 中 龙胆酸 1,2-双加氧酶 GdoP 的研究

胡春辉<sup>1</sup>, 王菲<sup>2</sup>, 郭立忠<sup>2</sup>, 于浩<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学中心实验室, 山东青岛 266109; 2. 青岛农业大学生命科学学院/山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

**摘要:**龙胆酸是芳香族化合物微生物降解的核心代谢产物,龙胆酸降解研究对于芳香族化合物的降解研究具有重要意义。龙胆酸 1,2-双加氧酶是催化龙胆酸降解的关键酶。本研究利用双加氧酶催化保守结构域在产碱杆菌 P156 的基因组上通过多序列比对找到一个龙胆酸双加氧酶基因 *gdoP*; 利用分子生物学技术对该基因进行异源表达; 并利用重组蛋白对酶学性质和动力学参数进行测定。酶学性质研究表明, GdoP 催化反应的最适 pH 为 7.5, 最适温度为 40℃。GdoP 是一个 Fe<sup>2+</sup> 依赖型双加氧酶, 含有 Fe<sup>2+</sup> 离子结合结构域。Fe<sup>2+</sup> 离子能够明显促进 GdoP 酶活, Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 离子对 GdoP 的酶活有明显抑制。以龙胆酸为底物, GdoP 的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别为 641 μmol/L 和 23.9 U/mg。GdoP 具有较强的底物特异性, 能够催化龙胆酸开环生成 3-马来酰丙酮酸, 不能催化 5-氨基水杨酸、水杨酸和 1-羟基-2-萘酸的转化。本研究系统的研究了龙胆酸 1,2-双加氧酶 GdoP 的酶学性质, 有助于更好的研究芳香族化合物的微生物降解过程。

**关键词:**龙胆酸 1,2-双加氧酶; 产碱杆菌; 基因表达; 酶学性质

中图分类号: Q936

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2019. 03. 004

## Study on Gentisate 1,2-Dioxygenase GdoP in *Alcaligenes* sp. P156

HU Chunhui<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>2</sup>, GUO Lizhong<sup>2</sup>, YU Hao<sup>2</sup>

(1. Central Laboratory, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. College of Life Science, Qingdao Agricultural University/ Agricultural Applied Mycology Laboratory)

**Abstract:** Gentisate is the central intermediate in microbial degradation of aromatics; therefore, the study of gentisate degradation could accelerate the study of microbial degradation of aromatics. Gentisate is the key enzyme to catalyze the degradation of gentisic acid in bacteria. In this study, a gentisate 1,2-dioxygenase gene, *gdoP*, was identified in the genome of strain P156 by sequence alignment. The gene was heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells and the catalytic and kinetic parameters of the purified enzyme were investigated. The optimal pH and temperature of GdoP were 7.5 and 40℃, respectively. GdoP is a Fe<sup>2+</sup> dependent dioxygenase and contains the conserved Fe<sup>2+</sup> binding domain. Fe<sup>2+</sup> could significantly increase the activity of GdoP and Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> could significantly decrease the enzyme activity of GdoP. The  $K_m$  and  $V_{max}$  value of gentisate for GdoP catalytic reaction were 641 μmol/L and 23.9 U/mg, respectively. GdoP had strict substrate specificity, which could catalyze the ring-cleavage of gentisate but it could not catalyze the ring-cleavage reaction of 5-aminosalicylate, salicylate and 1-hydroxy-2-naphthalate. The systematic research of gentisate 1,2-dioxygenase GdoP in this study contributes to the knowledge on the microbial degradation of aromatics.

收稿日期: 2018-12-17

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31600086); 山东省自然科学基金青年项目(ZR2016CQ06); 青岛农业大学人才科研启动基金(6631115052)

作者简介: 胡春辉和王菲为并列第一作者

胡春辉(1987-), 女, 山东潍坊人, 在读博士, 研究方向: 环境微生物, E-mail: hollyhuchunhui@163.com

王菲(1994-), 女, 山东济南人, 硕士, 研究方向: 环境微生物

通讯作者: 于浩(1985-), 男, 山东青岛人, 博士, 讲师, 研究方向: 环境微生物和应用真菌研究, E-mail: yuhaosunshine@163.com

**Key words:** gentisate 1,2-dioxygenase; *Alcaligenes*; gene expression; enzymatic properties

芳香族化合物在自然界中广泛存在,是煤炭、石油等化石性燃料的天然组成成分;植物体也可产生多种芳香族次生代谢产物;另外,人类在工业(特别是制药、印染等工业)生产过程中也会产生大量结构复杂的芳香烃类化合物。在自然界中它们多以酚类或卤代烃的形式存在。由于它们的化学结构具有特殊的热稳定性,同时又难溶于水,所以很难用常规的方法将其消除,而这类物质在含量较低的情况下可以对人体造成较强的或潜在的危害<sup>[1,2]</sup>。

微生物降解是去除环境中芳香族有机污染物的最有效手段之一。根据已有文献报道,微生物对于芳香族化合物的代谢首先通过单加氧酶或者双加氧酶在苯环上引入羟基,将苯环活化,发生开环反应,生成脂肪族化合物。脂肪族化合物通过一系列的氧化还原反应被分解代谢成为小分子化合物,最终进入三羧酸循环实现完全矿化<sup>[3-5]</sup>。其中双加氧酶是参与微生物降解芳香烃类化合物的主要酶类,它们能将空气中的氧分子活化,使芳香烃类化合物在邻位碳上进行氧化开环,是一类具有重要生物学功能和较高潜在应用价值的酶类<sup>[1,2,6]</sup>。

龙胆酸是芳香族化合物代谢的核心中间代谢产物,龙胆酸的降解对于研究芳香族化合物的降解具有重要的生物学意义<sup>[1,7,8]</sup>。龙胆酸 1,2-双加氧酶可以活化分子氧攻击龙胆酸,形成开环产物 3-马来酰丙酮酸(3-maleylpyruvic acid),后者可以进一步被水解生成马来酸和丙酮酸,进入三羧酸循环。龙胆酸 1,2-双加氧酶常以多聚体形式存在,多是四聚体,少数为二聚体,并且多以亚铁离子作为电子传递体,反应过程中需要氧气的参与<sup>[9-11]</sup>。龙胆酸 1,2-双加氧酶是参与龙胆酸代谢过程第一步的酶,目前对该酶的研究较少,其相关基因和酶学性质的研究较少,其催化开环的机理尚不清楚,因此对龙胆酸 1,2-双加氧酶的研究对于阐明芳香族化合物的降解过程有重要的意义<sup>[1-3]</sup>。

产碱杆菌 P156 是实验室分离获得的一株能够降解芳香族有机化合物和吡啶类化合物的菌株<sup>[12]</sup>。该菌株能够以龙胆酸作为唯一碳源和能源进行生长。通过对全基因组进行测序和分析找到一个疑似龙胆酸双加氧酶的基因 *gdoP*,并对该基因的功能进行了异源表达验证,对蛋白 GdoP 的酶学性质进行了较为深入的研究。这是第一个从产碱杆菌中分离获得并得到功能验证的龙胆酸 1,2-双加氧酶,该研究对阐明产碱杆菌芳香族化合物的降解过程有

重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

试剂:龙胆酸、水杨酸、1-羟基-2-萘酸、3,4-一二羟基苯甲酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸、卡那霉素、isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside (IPTG)为分析纯,购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。甲醇为色谱纯,购买自上海安普化学试剂有限公司。试验中用到的其他试剂均为分析纯。

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、San-Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Ni-NTA 琼脂糖树脂购买自生工生物工程(上海)股份有限公司,pET28a 载体购买自 Invitrogen,内切酶和 T4 DNA 连接酶购买自 Takara。

仪器:分光光度计(Eppendorf Biophotometer Plus)、HPLC(Waters Alliance HPLC)、PCR 仪(ABI 9700)。

菌株:产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)P156,大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 用于载体的克隆,*E. coli*BL21(DE3)用于蛋白表达。

### 1.2 生物信息学分析

菌株 P156 的基因组信息已经递交到 DDBJ/ENA/GenBank 数据库,序列号为 CP021079。龙胆酸双加氧酶的寻找利用 Blast 软件进行,以 P156 基因组作为数据库,选取文献中报道的龙胆酸双加氧酶的基因作为参比序列(参比蛋白的序列号见图 1)进行比对。多序列比对采用的是 ClustalW 软件,进化分析由 Mega6.0 软件完成,采用 Neighbor-joining 算法,bootstrap 为 1000。所有试验重复三次取平均值,显著性分析采用 *t* 检验,利用 SPSS 软件完成。数据作图由 Origin 软件完成。

### 1.3 *gdoP* 基因克隆与蛋白表达纯化

产碱杆菌 P156 在无机盐培养基(MSM)<sup>[13]</sup>中进行培养,培养温度为 30 $^{\circ}$ C,加入 1 mg/mL 的龙胆酸作为碳源,1 mg/mL 的氯化铵作为氮源。利用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程)提取菌株 P156 的基因组。以菌株 P156 的基因组作为模板,利用引物 pET28a-*gdoP*-F(CGCGGATCCATGTCGGAAGAACGTTTTG)和 pET28a-*gdoP*-R(CCGCTCGAGTTACAGCAAGACTTGATGG)进行 *gdoP* 基因的 PCR 扩

增,扩增程序如下:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工生物)对电泳条带进行回收。将回收的 DNA 片段与提取的 pET28a 载体分别利用内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切。将酶切后的线性化 DNA 片段进行纯化,并利用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物利用热激转化法转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中进行验证(转化方法参考分子克隆实验指南(第三版))。挑取单克隆接种至含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素(kan)的 LB 培养基中,利用菌液作为模板,利用 pET28a-*gdoP*-F/R 引物进行 PCR 扩增,如果能够扩增出 1.1 kb 大小的目的条带说明该转化子为阳性转化子。将含有 pET28a-*gdoP* 质粒的转化子送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

将 pET28a-*gdoP* 重组质粒采用热激法转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,并在 37℃、120 r/min 的恒温振荡摇床中进行培养。培养至 OD<sub>600</sub> (600 nm 处的吸光值)在 0.6~0.8 之间时,加入 0.5 mmol/L 的 IPTG,同时将培养温度调整至 30℃对 GdoP 蛋白进行诱导表达。10 h 后 8000 $\times$ g 离心 5 min 收集 *E. coli* 细胞,利用蒸馏水洗涤沉淀一次后,将 *E. coli* 细胞重悬于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中,利用超声波进行细胞破碎。超声功率为 240 W,超声有效时间为 16 min(工作 3 s,冷却 6 s)。将超声破碎后的细胞 10000 $\times$ g 离心 5 min,加入到含有 Ni-NTA 琼脂糖树脂的重力柱上面,纯化步骤如下:平衡,向 Ni-NTA 琼脂糖树脂重力柱中加入 10 mL 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液;上样,将细胞破碎液上清加入到重力柱中;冲洗,加入 10 mL 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液;洗脱,用含有 3 mL 40 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液洗脱蛋白,并收集洗脱液。洗脱的蛋白利用超滤的方法去除高浓度咪唑,在-20℃冰箱中进行保存。最后利用改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度的测定。

#### 1.4 GdoP 的酶活测定

利用分光光度计测定 GdoP 的酶活,酶催化反应体系为 800  $\mu$ L,首先将 40  $\mu$ L 龙胆酸(终浓度为 0.25 mmol/L)和 10  $\mu$ L 的亚铁离子(终浓度为 2.5  $\mu$ mol/L)加入 690  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中,最后加入 60  $\mu$ L GdoP 蛋白(10  $\mu$ g),混匀后检测 340 nm 处吸光值的变化<sup>[9]</sup>。当龙胆酸

转化为 3-马来酰丙酮酸时,340 nm 处的吸光值会上升,因此可以根据 340 nm 处吸光值的变化表征酶活力变化。亚铁离子需要现用现配:用 1 mmol/L 的维生素 C 溶液配制成 0.5 mmol/L 的氯化亚铁储藏液。酶活单位(U)的定义:将 1 min 内转化 1  $\mu$ mol 龙胆酸所需要的酶量定义为一个酶活单位。

利用 HPLC 检测 GdoP 酶催化反应的底物和产物,使用的仪器为 Waters Alliance HPLC,检测器为 Waters 2998 PDA Detector,层析柱为 Waters ODS2 C18 反向柱。流动相为 A 为甲醇(20%),流动相为 B 为含有 0.5% (w/v) 甲酸的超纯水(80%),流速为 1 mL/min,柱温 30℃。

#### 1.5 GdoP 的酶学性质研究

##### 1.5.1 pH 对酶活力的影响

分别配制(50 mmol/L)pH 为 5.5、6.0 的柠檬酸/柠檬酸三钠缓冲液,pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,和 pH 为 9.0、9.5、10.0、11.0 的碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液。使用不同 pH 的缓冲液,根据 1.3 中的酶活测定方法测定 GdoP 在不同 pH 缓冲液中的酶活,测得酶活力最高的 pH 即为酶促反应的最适 pH 值,每组做 3 个重复。

##### 1.5.2 温度对酶活力的影响

在 pH 8.0 条件下,根据 1.3 中的酶活测定方法测定 GdoP 在不同温度下的酶活。首先将缓冲液、底物放到不同温度(10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃)的水浴锅中孵育 2 min,随后加入 GdoP 并开始测定酶活,确定不同温度对 GdoP 的活性的影响,酶活最高时对应的温度即为酶促反应的最适温度,每组做 3 个重复。

##### 1.5.3 金属离子对 GdoP 酶活的影响

分别配制浓度为 200 mmol/L 的 K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Li<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、MoO<sub>4</sub><sup>2+</sup> 的金属离子储存液,800  $\mu$ L 的反应体系中含有 692  $\mu$ L 的 Tris-HCl (pH 7.4),60  $\mu$ L GdoP 蛋白,40  $\mu$ L 龙胆酸,8  $\mu$ L 金属离子,以不加金属离子测定的 GdoP 酶活作为对照,比较各种金属离子对 GdoP 活性的影响。

#### 1.6 GdoP 蛋白的催化动力学研究

在最适反应条件下,分别测定不同浓度龙胆酸(0.05、0.1、0.2、0.3、0.5 mmol/L)条件下 GdoP 的酶活,并利用 Origin 软件进行米氏方程的非线性拟合计算  $K_m$  值和  $V_{max}$  值。

#### 1.7 底物特异性分析

分别以龙胆酸、水杨酸、5-氨基水杨酸和 1-羟基-2-萘酸作为 GdoP 的酶催化底物,分别在

320 nm、300 nm、340 nm 和 300 nm 处,检测吸光值的变化<sup>[9]</sup>,用吸光值的变化表征酶活力变化,确定 GdoP 的催化底物。

将活化后的 P156 菌株分别接种到以龙胆酸、3,4-二羟基苯甲酸、水杨酸、3-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、邻苯二酚、苯甲酸作为唯一碳源的 MSM 培养基中置于 170 r/min、30 °C 摇床培养,每隔 12 h 取样测定 600 nm 处的吸收值,绘制标准曲线,比较菌株 P156 在不同碳源的培养基中的生长状况。

### 1.8 数据处理与分析

以不加金属离子反应条件下的 GdoP 的酶活作为对照,将添加不同金属离子反应条件下 GdoP 的酶活跟对照进行比较。所有数据均三次重复,利用 SPSS 软件对配对样本进行 t 检验,计算 *p*-value 值。 $0.01 < p\text{-value} < 0.05$ ,表示差异显著,用 \* 标记; $p\text{-value} < 0.01$ ,表示差异非常显著,用 \*\* 标记。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

前期的研究表明菌株 P156 能够催化龙胆酸的开环反应,可能存在龙胆酸双加氧酶基因。跟已有的龙胆酸双加氧酶的基因序列进行比对后,在 P156 的基因组上发现一个具有双加氧酶催化保守结构域(COD3435)的 *gdoP* 基因,推测该基因编码的蛋白 GdoP(ARP51958)具有龙胆酸 1,2-双加氧酶的功能。将该蛋白的氨基酸序列跟已报道的龙胆酸 1,2-双加氧酶的氨基酸序列进行比对,结果如图 1 所示(图中括号内为该蛋白的序列号),该蛋白的氨基酸序列跟已报道的龙胆酸 1,2-双加氧酶的氨基酸序列的序列相似性较低,最高仅为 33.7%(*Sphingomonas* sp. RW5 中的龙胆酸 1,2-双加氧酶,序列号为 CAA12267)。

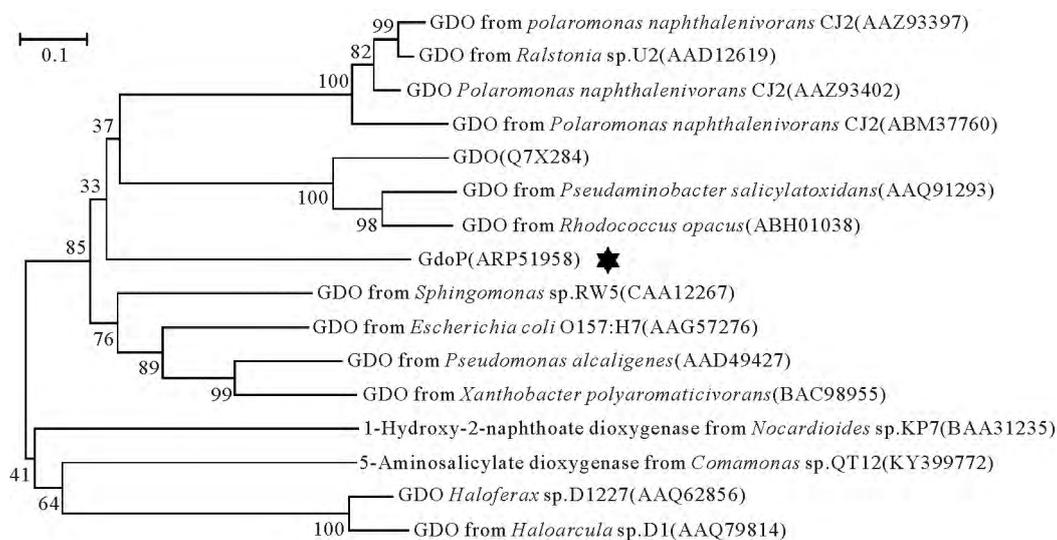


图 1 GdoP 与细菌中双加氧酶的进化分析,GdoP 用星号标记

Fig.1 Phylogenetic analysis of GdoP and related dioxygenases, GdoP is indicated with star

### 2.2 *gdoP* 基因的克隆与 GdoP 蛋白纯化、酶活测定

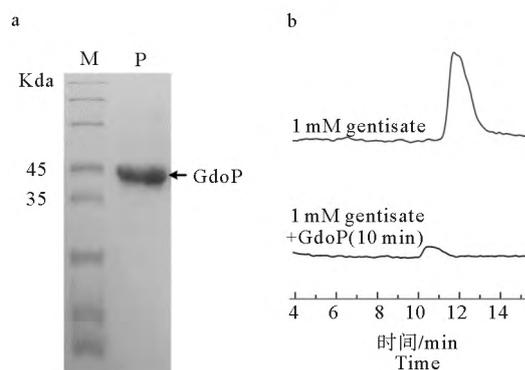
利用菌株 P156 的基因组作为模板利用 pET28a-*gdoP*-F/R 引物可以扩增出一条单一、片段长度为 1.1 kb 左右的 DNA 条带,与 *gdoP* 基因大小一致。挑取的转化子的测序结果表明 *gdoP* 成功的连接到 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点之间。

利用 SDS-PAGE 对纯化后的 GdoP 蛋白进行电泳检测,结果表明蛋白条带单一,没有杂蛋白条带(图 2a),蛋白大小为 40 kDa,与根据氨基酸序列计

算出的 GdoP 蛋白的分子量大小一致。

HPLC 检测结果显示,龙胆酸与 GdoP 混合反应 10 min 后,检测不到龙胆酸的信号,也没有出现新的特征吸收峰(图 2b),这说明 GdoP 蛋白催化了龙胆酸的开环反应。目前微生物代谢龙胆酸的途径主要有两条:一条是通过龙胆酸脱羧酶(EC 4.1.1.62)催化生成对苯二酚,另一条是通过龙胆酸 1,2-双加氧酶(EC 1.13.11.4)催化生成 3-马来酰丙酮酸<sup>[4,5,14]</sup>。利用 HPLC 检测并没有检测到对苯二酚吸收峰,另外序列比对证明 GdoP 具有龙胆酸双加

氧酶催化的保守结构域(COD3435),因此可以推测 GdoP 为龙胆酸 1,2-双加氧酶,催化了龙胆酸的开环反应,生成开环产物 3-马来酰丙酮酸。



(a) 纯化后的 GdoP 的 SDS-PAGE 电泳图谱;

(b) HPLC 检测 GdoP 催化反应产物

(a) SDS-PAGE analysis of purified GdoP;

(b) HPLC analysis of GdoP catalyzed reaction

图 2 GdoP 的纯化与催化反应研究

Fig. 2 Purification and characterization of GdoP

### 2.3 GdoP 的酶学性质

利用重组蛋白研究 pH 对 GdoP 酶活的影响。结果如图 3a 所示,GdoP 在 pH 为 7.5 时相对酶活最高,在 pH 6.5~8.0 范围内均能保持较高的活力。但当 pH 低于 6.5 时,酶活力会随着 pH 值的降低而降低;当 pH 高于 8.0 时,酶活力会随着 pH 值的升高而降低。在 pH 5.5 和 pH 11.0 条件下,酶活力降为零。

在 pH 8.0 的条件下,研究不同温度对 GdoP 酶活力的影响。结果如图 3b 所示,GdoP 催化的最适温度为 40℃。在 40℃ 以下酶活力随温度的升高而增加,在高温条件下(50℃ 和 60℃)仍能维持较高的酶活力。

在 pH 8.0、温度为 30℃ 的条件下,研究不同金属离子对 GdoP 酶活力的影响,结果如图 4 所示,可以看出  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  能够增加 GdoP 的酶活,其中  $\text{Fe}^{2+}$  的激活效果最为明显; $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  会抑制 GdoP 的活性,其中  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  对酶活的抑制作用最为明显(图 4)。

亚铁离子对于 GdoP 的酶活有明显的促进作用,这说明了 GdoP 是一个  $\text{Fe}^{2+}$  依赖的双加氧酶。已报到的该类环裂解双加氧酶均为  $\text{Fe}^{2+}$  依赖型,含有三个保守的组氨酸可能跟  $\text{Fe}^{2+}$  的结合有关<sup>[15-18]</sup>。将 GdoP 与亲缘关系较近的双加氧酶进行多序列比对,结果如图 5 所示,与  $\text{Fe}^{2+}$  结合相关的三个组氨酸在相关蛋白中高度保守,因此 GdoP

中这三个组氨酸(His120, His122 和 His161)可能与亚铁离子的结合有关。

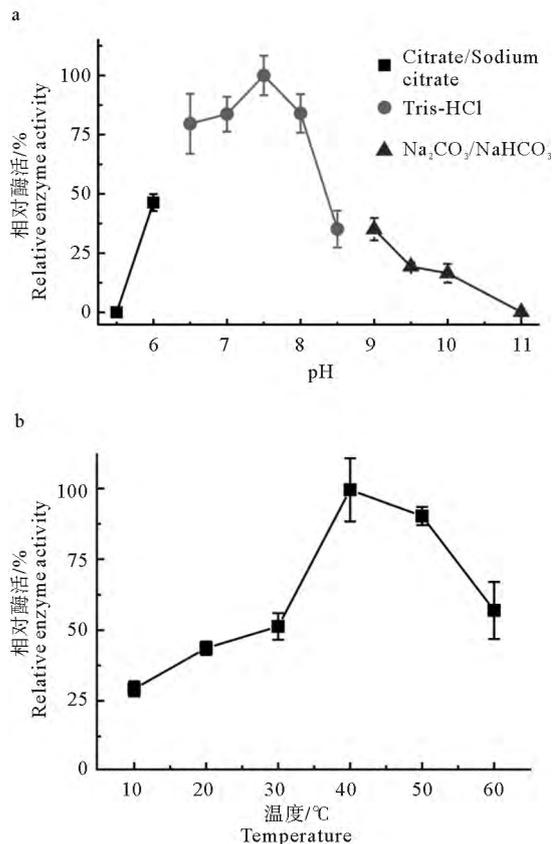


图 3 pH 和温度对 GdoP 酶活的影响

Fig. 3 Effects of pH and temperature on enzyme activity of GdoP

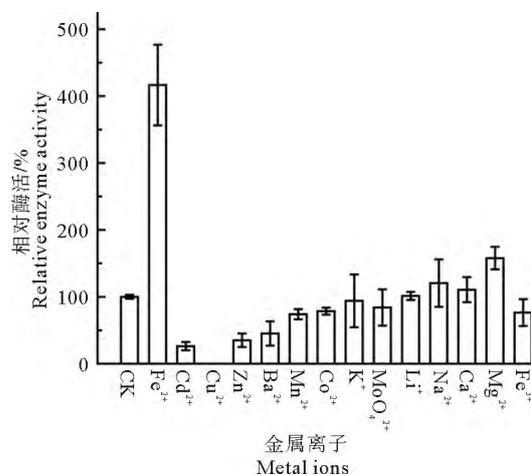


图 4 金属离子对 GdoP 酶活力的影响

Fig. 4 The effect of metal ions on enzyme activity of GdoP

### 2.4 GdoP 的动力学参数

在 pH 8.0、30℃ 条件下,分别在不同的龙胆酸浓度下测定 GdoP 的酶活,根据酶活曲线(图 6)计算出 GdoP 的  $K_m$  值为 641  $\mu\text{mol/L}$ ,最大酶活  $V_{max}$  为 23.9 U/mg。

GdoA AVGWLYSGLQVMKPGEAASAHSSALRFIMEGRG--AYTIVDGHKMTLGANDFVLTPNGCWHEHGVEAD  
 CAA12267 ITPSLYAGLQLILPGEVAPCHRHTQCALRFILLEGEG--AYTAVDGEKAVMSPFDLVLTGGQWHDHGNGTD  
 AAG57276 ITATLYAGLQLIMPGEVAPSHRNQSAALRFIVEGKG--AFTAVDGERTPMNEGDFILTPQWRWHDHGNGPD  
 Q7X284 ATPPLWTAIQYLGPREVAPSHRHSQGAFRFVVEGEG--VWTVNDGDAVAMRRGDLLLLTPSWAFHEHQNVTD  
 AAQ91293 ISPTMWAGIQYLGPRETAPSHRHSQNAFRFVVEGEG--VWTVVNGDPVVRMRGDLLLLTPGWCFFHGHNDTD  
 ABH01038 VTPTLWAAIQYLGPKVEAPEHRHAQNAFRFVVEGQG--VWTVVNGDPVAMRRGDLLLLTPGWHFFHGHNKTD

图 5 GdoP 和其他双加氧酶的多序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment between GdoP and related dioxygenases

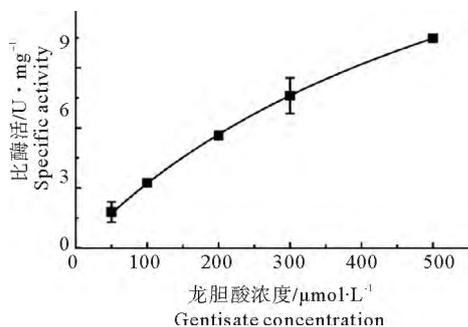


图 6 GdoP 酶活的动力学曲线

Fig. 6 Kinetic study of GdoP enzyme activity

## 2.5 底物特异性分析

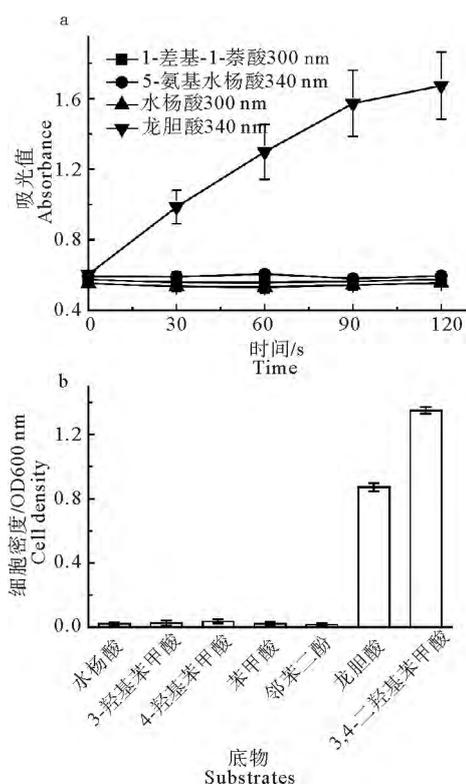
分别利用龙胆酸、水杨酸、5-氨基水杨酸和 1-羟基-2-萘酸为底物进行反应,测定 GdoP 的酶活,结果显示 GdoP 只能催化龙胆酸的氧化,不能够催化水杨酸、5-氨基水杨酸和 1-羟基-2-萘酸的氧化反应(图 7a)。

测定 P156 菌株在不同底物 MSM 培养基中的生长情况,结果如图 7b 所示,表明产碱杆菌 P156 在以龙胆酸、3,4-二羟基苯甲酸为唯一碳源的培养基中的生长情况较好。P156 菌株不能以水杨酸、3-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、苯甲酸、邻苯二酚为底物进行生长(图 7b)。

## 3 讨论

本研究前期筛选到的一株高效芳香族类化合物降解菌 *Alcaligenes* sp. P156,该菌株能够对吡啶类化合物(2-吡啶甲酸和烟酰胺)有较好的降解效果<sup>[19]</sup>,在研究过程中发现菌株 P156 对芳香族化合物龙胆酸也有较好的降解作用。微生物代谢芳香族化合物首先将其降解为龙胆酸、邻苯二酚和原儿茶酸等核心代谢中间物,进一步通过开环反应实现化合物的完全降解,其中龙胆酸是萘、水杨酸、间羟基苯甲酸等<sup>[20-22]</sup>物质的核心代谢中间物质。本研究通过基因组测序和生物信息学技术,利用双加氧酶催化保守结构域在 P156 的基因组上找到一个疑似龙胆酸双加氧酶基因。利用分子生物学技术对 GodP 蛋白进行异源表达,获得纯度较高的蛋白,并对其功能进行了验证,这是产碱杆菌中报道的第一

个龙胆酸双加氧酶。通过对重组蛋白的酶学性质进行研究,发现该蛋白是一个  $\text{Fe}^{2+}$  依赖的双加氧酶,具有较强的催化活性。



(a) GdoP 与不同底物反应时的吸光值的变化;  
 (b) 菌株 P156 在不同底物下培养 48 小时后的细胞密度  
 (a) Enzyme activity of GdoP with different kind of substrates;  
 (b) Cell density of strain P156 with different substrates in MSM for 48 hours

图 7 底物特异性研究

Fig. 7 Substrate specificity

目前尽管已有多个龙胆酸双加氧酶被报道,但是跟已报道的龙胆酸 1,2-双加氧酶氨基酸序列比对发现本研究得到的龙胆酸双加氧酶跟它们的亲缘关系较远,序列相似性较低,有独特的催化特性。菌株 *C. glutamicum* ATCC 13032 中的龙胆酸双加氧酶还能够催化 2,5-二羟基苯甲酸的开环反应<sup>[23]</sup>;菌株 *Pseudaminobacter salicylatoxidans* 中的龙胆酸双加氧酶 SDO 能够催化 2,5-二羟基苯甲酸、水杨酸和 1-羟基-2-萘甲酸等的开环过程<sup>[24]</sup>;菌株 *Co-*

mamonas sp. Strain QT12 中的 5ASA 能够催化 2-氨基水杨酸、3-氨基苯甲酸、3-羟基苯甲酸和龙胆酸的开环反应<sup>[16]</sup>; 跟这些菌株相比产碱杆菌 P156 中的龙胆酸双加氧酶 GdoP 的底物谱有较大的不同, 说明该蛋白具有较强的底物特异性。但是 GdoP 的  $K_m$  值为 641  $\mu\text{mol/L}$ , 均高于上述菌株的  $K_m$  值, 通常  $K_m$  值越高对底物的亲和性就越低, 底物特异性越差, 因此可以通过改造特异性的位点提高 GdoP 的底物谱范围。另外 GdoP 可以催化龙胆酸的转化, 却不能催化水杨酸、5-氨基水杨酸和 1-羟基-2-萘酸等的反应过程, 猜测 GdoP 可能是由催化其他底物的酶逐渐进化而来, 这对于研究龙胆酸双加氧酶的进化过程有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] 高晓莉, 周宁一. 芳香烃分解代谢的龙胆酸途径[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 81-85
- [2] 赵渝, 郭鲁申, 徐亚同. 芳香烃龙胆酸降解途径蛋白质组学的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 95-100
- [3] 章俭, 夏春谷. 芳香烃双加氧酶的结构与功能研究[J]. 化学进展, 2004, 16(1): 116-122
- [4] Romero-Silva MJ, Méndez V, Agulló L, et al. Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56038
- [5] Liu TT, Xu Y, Liu H, et al. Functional characterization of a gene cluster involved in gentisate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 671-678
- [6] 巩红云, 周羽, 许楹, 等. 嗜盐古菌 *Haloferax volcanii* WFD11 中龙胆酸 1,2-双加氧酶 HagA 的研究[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1793-1801
- [7] 孙向楠. 苯甲酸钠降解菌的筛选、龙胆酸 1,2-双加氧酶基因的克隆与异源表达[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2015
- [8] Rahaman R, Chakraborty B, Paine TK. Mimicking the aromatic ring-cleavage activity of gentisate 1,2-dioxygenase by a nonheme iron complex [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55: 13838-13842
- [9] Eppinger E, Stolz A. Expansion of the substrate range of the gentisate 1,2-dioxygenase from *Corynebacterium glutamicum* for the conversion of monohydroxylated benzoates[J]. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS, 2017, 30(1): 57-65
- [10] Huang L, Hu HY, Tang HZ, et al. Identification and characterization of a novel gentisate 1,2-dioxygenase gene from a *Halophilic marteella* Strain[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14307
- [11] Yeo CC, Wong MV, Feng Y, et al. Molecular characterization of an inducible gentisate 1,2-dioxygenase gene, xlnE, from *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867[J]. Gene, 2003, 312: 239-248
- [12] Hu CH, Zhao SX, Li KR, et al. Microbial degradation of nicotinamide by a strain *alcaligenes* sp. P156[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3647
- [13] Yu H, Zhao SX, Lu WD, et al. A novel gene, encoding 3-aminobenzoate 6-monooxygenase, involved in 3-aminobenzoate degradation in *Comamonas* sp. strain QT12[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(11): 4843-4852
- [14] Grant DJ, Patel JC. The non-oxidative decarboxylation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*) [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1969, 35(3): 325-343
- [15] Yao YX, Tang HZ, Ren HX, et al. Iron(II)-dependent dioxygenase and N-formylamide deformylase catalyze the reactions from 5-hydroxy-2-pyridone to maleamate[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3235
- [16] Yu H, Zhao SX, Guo LZ. Novel gene encoding 5-aminosalicylate 1,2-dioxygenase from *comamonas* sp. strain QT12 and catalytic properties of the purified enzyme[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(1): e00395-e00317
- [17] Werwath J, Arfmann HA, Pieper DH, et al. Biochemical and genetic characterization of a gentisate 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(16): 4171-4176
- [18] Hintner JP, Reemtsma T, Stolz A. Biochemical and molecular characterization of a ring fission dioxygenase with the ability to oxidize (substituted) salicylate(S) from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37250-37260
- [19] Hu CH, Zhao SX, Li KR, et al. Microbial degradation of nicotinamide by a strain *alcaligenes* sp. P156[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3647
- [20] Fang T, Zhou NY. Purification and characterization of salicylate 5-hydroxylase, a three-component monooxygenase from *Ralstonia* sp. strain U2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(2): 671-679
- [21] Holesova Z, Jakubkova M, Zavadiakova I, et al. Gentisate and 3-oxoadipate pathways in the yeast *Candida parapsilosis*: identification and functional analysis of the genes coding for 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase and 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase[J]. Microbiology (Reading, England), 2011, 157 (Pt 7): 2152-2163
- [22] Lee HJ, Kim JM, Lee SH, et al. Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation [J]. Microbiology (Reading, England), 2011, 157 (Pt 10): 2891-2903
- [23] Eppinger E, Stolz A. Expansion of the substrate range of the gentisate 1,2-dioxygenase from *Corynebacterium glutamicum* for the conversion of monohydroxylated benzoates[J]. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS, 2017, 30(1): 57-65
- [24] Eppinger E, Ferraroni M, Bürger S, et al. Function of different amino acid residues in the reaction mechanism of gentisate 1,2-dioxygenases deduced from the analysis of mutants of the salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1854(10 Pt A): 1425-1437