

深海细菌 *Pseudomonas* sp. IOFA1 中甲醛歧化酶 FM11 的纯化及性质研究

余翔^{1,2}, 陈兴麟^{1,2}, 金敏^{1,2}, 曾润颖^{1,2}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所、海洋生物遗传资源省部共建国家重点实验室培育基地, 福建 厦门 361005;

2. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361005)

摘要:从印度洋深海沉积物中分离出一株能够高效降解甲醛的假单胞菌(*Pseudomonas* sp. IOFA1), 该菌株可在 40 min 内完全降解 100 mg/cm³ 的甲醛. 通过阴离子交换柱层析对菌株破碎液中的粗酶液进行纯化, 得到一条具有甲醛降解活性的单一蛋白条带. 经 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定, 该蛋白为甲醛歧化酶蛋白(FM11). 序列分析表明 FM11 与其它物种已知醛脱氢酶的氨基酸序列最高相似性为 65%; 结构域分析表明 FM11 含有 2 个保守的锌结合位点和一个 NAD 结合位点. 酶学性质分析结果显示, FM11 的最适反应温度为 40℃, 在 25~50℃ 范围内能够保留 95% 以上的酶活力, 尤其是在高于 70℃ 的高温环境下仍保有约 50% 的活力, 表现出广泛的温度适应性. FM11 具有非常广泛的最适反应 pH 值范围(pH 值为 5~9), 且在 pH 值 4 和 pH 值 10 时仍分别保留 50% 和 80% 左右的酶活力, 表现出广泛的 pH 适应性. 在 pH 值为 5~7 的条件下孵育 1 h 后, FM11 仍保有 97% 以上的酶活, 且在 pH 值为 7~10 条件下孵育 1 h 后, 仍保留 90% 以上的酶活, 表现出极好的酸性和碱性稳定性. Ca²⁺、Mg²⁺ 在低浓度时(0.5 mmol/dm³) 对 FM11 有较明显的激活作用. 这些研究为我们进一步开发 *Pseudomonas* sp. IOFA1 甲醛歧化酶在降解甲醛方面的用途奠定了基础.

关键词:海洋生物学; 深海; 假单胞菌; 甲醛歧化酶; 甲醛降解; 温度和 pH 适应性; pH 稳定性

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2016. 03. 014

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2016)02-0418-08

甲醛在工业和农业生产中具有广泛的应用. 在工业中, 它主要作为一些工业产品的辅助成分, 在农业、医学上, 它具有杀菌防腐保鲜等用途. 甲醛污染主要来源于工业废气、汽车尾气、垃圾焚烧^[1]. 当室内甲醛浓度大于 0.08 mg/m³ 时便可引起一系列症状, 如眼红、眼痒、咽喉炎、气喘等^[2]. 此外, 甲醛还被证明是人类一级致癌物^[3] 与白血病具有显著的相关性^[4-5]. 因此, 如何防控甲醛污染也越来越受到人们的重视.

目前主要有三种甲醛防控方法: 物理法、化学法和生物降解法. 物理法通过将甲醛吸附在多孔固体材料表面来去除甲醛污染, 但受温度以及饱和影响, 可能会再次释放出甲醛造成二次污染^[6]. 化学法是利用紫外光照射 TiO₂ 等光敏半导体材料产生自由

基, 从而将甲醛降解为 CO₂ 和 H₂O 等无机小分子物质. 虽然光催化是无污染, 且安全的方法, 但是其成本较高, 且需要紫外照射等前提条件^[7]. 生物降解法主要利用微生物, 或者甲醛降解酶制剂来降解甲醛, 具有一些其他方法所不具有的优点, 如效率高、条件温和、成本低、适用性强等. 因此有越来越多的研究关注于甲醛的生物降解方法^[8-9].

甲醛歧化酶(Formaldehyde dismutase, EC No. 1.2.99.4) 是甲醛生物降解的关键酶之一, 它可以催化甲醛的歧化作用. 甲醛歧化酶对甲醛、乙醛和丙酮醛等具有较高的催化活性^[10]. 从恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* F61 中得到的甲醛歧化酶由 4 个分子量为 44 000 的亚基构成, 每个亚基都结合 1 分子的 NAD 和 2 分子的锌原子^[11]. NAD 是以非共价

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 中国大洋矿产资源研究开发协会资助项目(DY125-15-T-06); 福建省科技计划资助项目(2013N0018)

作者简介: 余翔(1989~), 硕士研究生; E-mail: 283847635@qq.com

通讯作者: 曾润颖(1972~), 研究员; E-mail: zeng@tio.org.cn

键的形式牢固的结合在各个亚基的活性位点上,因此不需要额外的辅酶,甲醛歧化酶即可直接降解甲醛。正由于甲醛歧化酶的这个特性,甲醛歧化酶可以应用于一些产物的工业化生产,如以甲醇为底物生产甲酸等^[12]。在这些工业化生产过程中,由于甲醛歧化酶不需要额外添加辅酶,因此生产体系不需要配备辅酶循环系统,从而大大地提高了生产效率并降低生产成本^[13-14]。

虽然微生物甲醛歧化酶的研究起步较早,但目前国内外对甲醛歧化酶的研究主要集中于基因序列及蛋白结构特征方面^[13-14],其酶活性质的研究较少。在本论文中,我们从印度洋深海沉积物中分离得到一株具有高效降解甲醛能力的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. IOFA1^[15],并对该菌株的甲醛歧化酶进行分离纯化和酶学性质研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *Pseudomonas* sp. IOFA1 为我们从印度洋深海沉积物样品中分离的高效降解甲醛的菌株。*Pseudomonas* sp. IOFA1 由中国典藏培养物保藏中心保藏 (CCTCC M2010280)。

1.1.2 试剂 DEAE-Sepharose 介质购自美国 GE 公司;十二烷基磺酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (AP) 为美国 Promega 产品;Tris、丙烯酰胺、IPTG 购自美国 Sigma 公司;酵母粉、蛋白胨购自美国 Difco 公司;其他实验所需常规试剂均为国产分析纯化学试剂。

1.1.3 培养基及培养条件 采用 LB 培养基来培养 *Pseudomonas* sp. IOFA1 菌株,培养条件为 37℃、200 r/min 振荡培养。液体 LB 培养基配方如下:1 dm³ 液体培养基中含有 5 g 酵母粉、10 g 氯化钠、10 g 胰蛋白胨。固体 LB 培养基额外添加 15 g 琼脂。

1.2 方法

1.2.1 甲醛含量测定 培养基中甲醛含量采用乙酰丙酮法进行测定^[16]。取乙酰丙酮反应液与样品按照 1:1 体积混合,并在 80℃ 下孵育 10 min。待反应液冷却到室温时,测定其在 412 nm 波长上的吸收值,并与标准曲线比较计算培养基中的甲醛含量。

1.2.2 *Pseudomonas* sp. IOFA1 菌株甲醛降解特性研究 用 LB 培养基在 37℃ 下摇瓶培养 *Pseudomonas* sp. IOFA1 菌株,待培养基 OD_{600} 到达 2 时,加入终浓度 (质量浓度) 为 100 mg/cm³ 的甲醛。在甲醛添加后的不同时间点 (0、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60 min) 收集培养基上清并进行甲醛含量的测定。

1.2.3 甲醛歧化酶的纯化 在室温条件下,均匀填充 DEAE-Sepharose 介质到色谱柱中,预先用磷酸钠缓冲液 (0.1 mol/dm³, pH 值 7.0) 平衡 DEAE-Sepharose 色谱柱。以 0.5 m/min 的流速进样,同时用紫外吸收仪器检测流出液在 280 nm 波长下的吸收峰。然后用磷酸钠缓冲 (0.1 mol/dm³, pH 值 7.0) 进行流洗,直至洗脱液在 280 nm 波长下的吸收峰降至基线附近。随后用含有 0.1 ~ 0.3 mol/dm³ NaCl 的磷酸钠缓冲液 (0.1 mol/dm³, pH 值 7.0) 进行梯度洗脱。收集流洗和洗脱流出液,并测定其甲醛降解酶活,获得具有甲醛降解活性的样品,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 蛋白质谱鉴定 从 SDS-PAGE 中切下单一的目的蛋白条带。目的蛋白条带经胰蛋白酶水解后,进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析 (BrukerDaltonics)。利用 Mascot (Matrix Science) 软件对获得的质谱数据进行蛋白数据库搜库鉴定。搜索的蛋白数据库为 NCBI 的细菌蛋白非冗余数据库 (包含 16 587 343 条蛋白序列)。

1.2.5 甲醛歧化酶酶活力的测定 采用甲酸合成测定法测定甲醛歧化酶活性^[17]。反应体系如下:在 10 cm³ 标准反应液中加入 20 mmol/dm³ 甲醛,100 mmol/dm³ KCl 和 2 cm³ 稀释酶溶液,37℃ 条件下孵育进行酶解反应。酶解产生的甲酸含量采用 pH 滴定法进行检测 (10 mmol/dm³ NaOH, pH 值 7.0)^[11]。一个酶活力单位定义为 37℃ 下 1 min 产生 1 μmol 甲酸所需要的酶量。

1.2.6 FM11 的酶学性质分析 (1) FM11 的最适反应温度:为了确定 FM11 的最适反应温度,在不同的酶解反应温度下 (15、20、25、30、37、40、50、60、70℃) 检测 FM11 的酶活力,并计算不同温度条件下的相对酶活 (以酶活最高值为 100%), 每组实验设置 3 个平行样品。(2) FM11 的最适反应 pH 值:不同 pH 值的反应溶液如下:酸性条件 (pH 值为 3.09、4.04、5.04、6.02): Na₂HPO₄/Citric acid 缓冲液;中性条件 (pH 值为 7.04、7.51、8.00): Tris/HCl 缓冲液;碱性条件 (pH 值为 9.00、10.00): NaOH/Gly 缓冲液。分别检测 FM11 在不同 pH 缓冲液中的酶活,确定 FM11 酶的最适反应 pH 值,每组实验设置 3 个平行样品。(3) FM11 的热稳定性:FM11 酶液分别于不同温度条件下 (15、20、25、30、37、40、50、60、70℃) 孵育 1 h,待温度达到室温 (25℃) 后分别检测 FM11 的残余酶活力。以未孵育的 FM11 酶液 (pH 值 7.0, 保藏于 4℃) 的酶活为 100%, 计算其余 FM11 酶液的相对残余酶活。每组实验设置 3 个平行样品。(4) pH 值稳定性:FM11 酶液分别于不同 pH 值条件下

(3.09、4.04、5.04、6.02、7.04、7.51、8.00、9.00、10.00) 孵育 1 h 后分别检测 FM11 的残余酶活力. 以未孵育酶液(保藏于 4℃, pH 值为 7.0) 的酶活作为对照, 计算不同孵育温度下的相对残余酶活, 每组实验设置 3 个平行样品. (5) 金属离子对 FM11 酶活力的影响: 在酶反应体系中分别添加不同终浓度的金属离子(0.5、5.0 mmol/dm³), 并测定添加金属离子后样品中的 FM11 的酶活力. 以无添加任何金属离子时的 FM11 酶活为对照, 计算添加不同金属离子条件下的相对酶活. 检测的金属离子如下: Mg²⁺、Ag⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、K⁺、Na⁺、Ni⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Rb⁺、Li⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Sr²⁺、Cs⁺. 除 FeSO₄、Fe₂(SO₄)₃、ZnSO₄、CuSO₄ 外, 其余金属离子均为氯盐形式. 每组实验设置 3 个平行样品.

2 结果和讨论

2.1 *Pseudomonas* sp. IOFA1 菌株甲醛降解特性研究

我们从印度洋深海沉积物中分离得到一株具有降解甲醛活性的细菌, 16S rRNA 测序分析表明其与 *Pseudomonas putida* 菌株相似性最高(>99%), 为 *Pseudomonas* 属细菌. 如图 1 所示, IOFA1 菌株能在 40 min 之内快速降解 100 mg/dm³ 的甲醛, 其中约 75% 的甲醛在 5 min 内即被降解, 表明该菌株具有高效降解高浓度甲醛的能力.

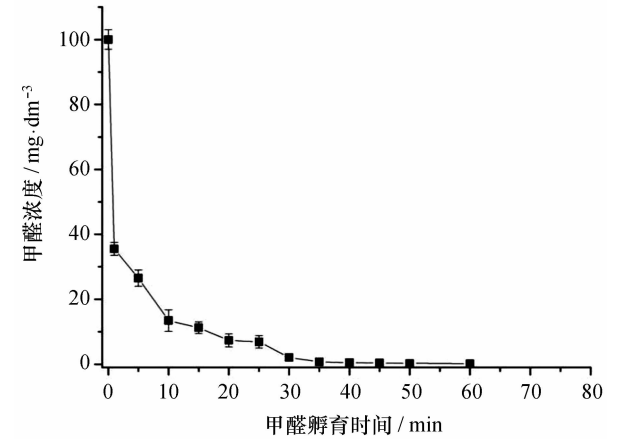


图 1 IOFA1 菌株的甲醛降解特征
Fig. 1 Formaldehyde degradation profile of *Pseudomonas* sp. IOFA1

2.2 IOFA1 菌株甲醛歧化酶 FM11 的纯化

IOFA1 菌株在 LB 培养基中培养至 OD₆₀₀ = 0.6, 经 8 000 r/min 离心收集菌体, 将菌体超声破碎后, 取上清进行硫酸铵盐析获得 IOFA1 粗酶液. 将透析后的粗酶液上样于阴离子交换层析柱 DEAE-Sepharose (2.5 cm × 10 cm), 并测定未吸附部分的蛋白含

量以及甲醛降解活性. 对结合蛋白再用含有 0.1 ~ 0.3 mol/dm³ NaCl 的磷酸钠缓冲液作梯度洗脱, 测定洗脱液中的蛋白含量和甲醛降解活性.

从图 2 可以看出, 粗酶液在经过 DEAE-Sepharose 层析柱分离后, 在 0.2 mol/dm³ NaCl 梯度洗脱处出现具有甲醛降解活力的蛋白峰. 酶活峰和最高蛋白峰有部分重叠, 取该样品进行 SDA-PAGE 鉴定(图 3). 结果表明, 硫酸铵盐析获得的粗酶液含有较多的蛋白杂质, 但经 DEAE-Sepharose 离子交换柱分离后, 得到一条分子量大约为 45kD 的单一蛋白条带(图 3, 泳道 4 ~ 7). 用洁净的手术刀切下目的条带, 进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定. 鉴定结果表明该蛋白为甲醛歧化酶(图 4).

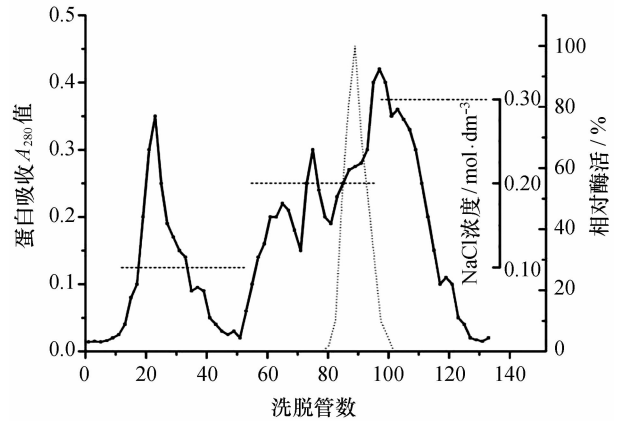


图 2 粗酶液的 DEAE-Sepharose 层析柱分离结果
Fig. 2 Separation of crude enzyme by DEAE-Sepharose Column

实线代表洗脱组分的 A₂₈₀ 吸收值, 虚线代表洗脱缓冲液中 NaCl 的浓度, 点线代表洗脱组分的相对酶活

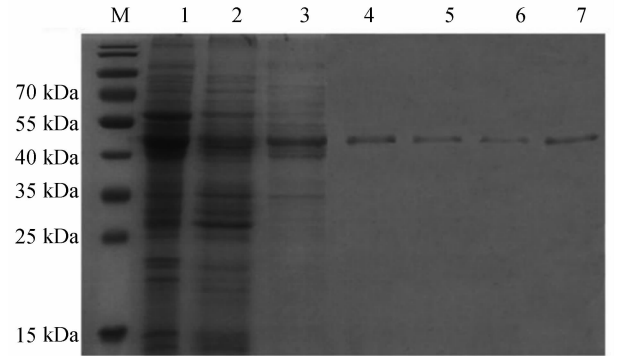


图 3 活性组分的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 3 SDS-PAGE of enzymatic active components

M 为蛋白 maker; 泳道 1 为菌体破碎后上清; 泳道 2 为硫酸铵盐析后获得粗酶液; 泳道 3 ~ 7 为 DEAE-Sepharose 层析过程中按照时间先后顺序收集的不同管酶活峰样品

2.3 甲醛歧化酶 FM11 的序列分析

将蛋白质谱分析获得的甲醛歧化酶肽段数据与

IOFA1 基因组序列进行比对分析,确定了 IOFA1 甲醛歧化酶 FM11 的基因和蛋白序列. IOFA1 的甲醛歧化酶基因长度为 1 200 bp,编码由 399 个氨基酸构成、预计分子量为 43.9 kD 的蛋白,这与 DEAE-Sephrose 层析柱纯化获得的具有甲醛降解活性的蛋白大小一致. 通过序列比对分析发现,FM11 的基因和蛋白序列与一株 *Pseudomonas putida* F61 菌株的甲醛歧化酶具有 100% 的同源性,但与其他物种已发现的醛歧化酶同源性较低. 最相近的其他物种

醛歧化酶蛋白为蓝细菌 *Mastigocoleus testarum* 的 aldehyde dismutase (gi|654353042,65%) 和金黄色杆菌 *Chryseobacterium* sp. UNC8MFCol 的 aldehyde dismutase (gi|653125403,63%). 选取 BlastP 结果中与 FM11 同源性最高的 3 条蛋白序列,与 FM11 蛋白序列进行多重比对,结果发现在 FM11 氨基酸序列中存在保守的锌结合位点(催化锌结合位点和第二个锌结合位点)及 NAD 结合位点,这也进一步验证了 FM11 为甲醛歧化酶蛋白(图 5).

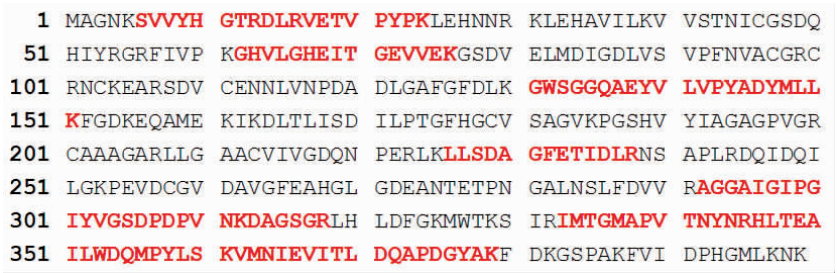


图 4 纯化蛋白的 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定结果
Fig.4 Identification of purified protein by MALDI-TOF/TOF MS
质谱鉴定结果显示,匹配度最高的蛋白为 *Pseudomonas putida* 的甲醛歧化酶 (gi|81308896),匹配度为 35%,匹配的肽段用红色标出

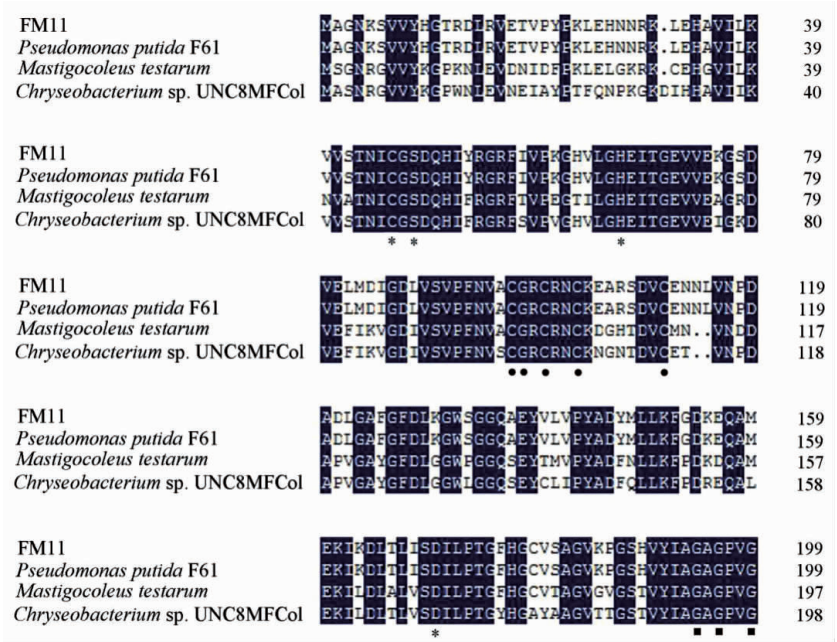


图 5 FM11 的保守序列分析结果
Fig.5 Conserved motif of FM11

多重比对的甲醛歧化酶氨基酸序列分别来自 *Pseudomonas putida* F61 (WP_016974636.1)、*Mastigocoleus testarum* (gi|654353042) 和 *Chryseobacterium* sp. UNC8MFCol (gi|653125403). 不同蛋白序列之间的相同氨基酸用阴影标示. 甲
醛歧化酶的 NAD 结合位点、催化锌结合位点和第二个锌结合位点分别用方框、星号和圆圈标示

2.4 FM11 的基本性质分析

2.4.1 FM11 的最适反应温度 FM11 的最适反应温度为 40℃. FM11 在中低温范围内(25 ~ 50℃)能

够保留 95% 以上的酶活力,表现出良好的中低温适应性(图 6). 此外,FM11 在 15 ~ 60℃ 范围内能保留 70% 以上的酶活力,具有广泛的温度适应性.

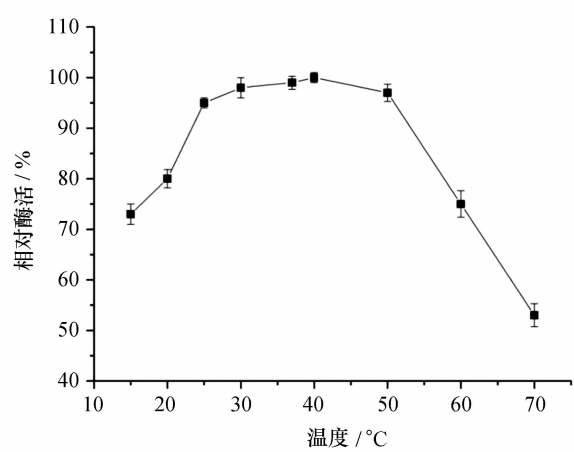


图 6 FM11 的最适反应温度
Fig. 6 Optimum temperature for FM11

2.4.2 FM11 的最适反应 pH 值 FM11 具有非常广泛的最适反应 pH 值范围 (pH 值为 5 ~ 9), 且在 pH 值 4 和 pH 值 10 时仍分别具有 50% 和 80% 左右的酶活力. 此外, FM11 在 pH 值 3 时仍保有 20% 左右的酶活力 (图 7).

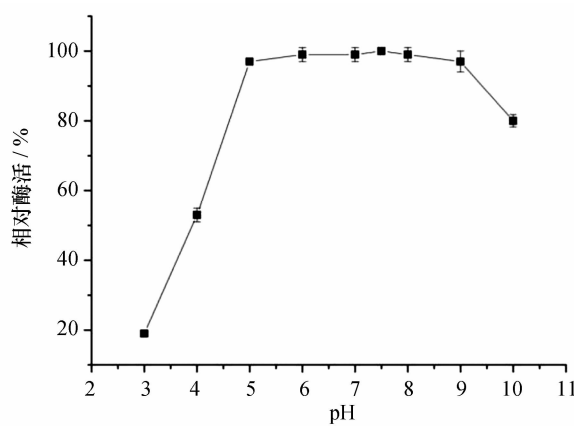


图 7 FM11 的最适反应 pH 值
Fig. 7 Optimum pH for FM11

2.4.3 FM11 的热稳定性 FM11 在 15 ~ 30°C 的温度下孵育 1 h 后, 仍保有 95% 以上的酶活 (图 8). 在 37°C 下孵育 1 h 后, 保有 80% 左右的酶活, 但当孵育温度继续升高时, FM11 的稳定性急剧下降, 表明 FM11 在高温环境中的稳定性较差.

2.4.4 FM11 的 pH 值稳定性 通过将 FM11 在不同 pH 溶液中孵育 1 h 来检测 FM11 的 pH 稳定性. 结果显示 FM11 在 pH 值为 5 ~ 7 时, 仍保有 97% 以上的酶活; 在 pH 值为 7 ~ 10 时, 仍保留 90% 以上的酶活, 显示出良好的碱性 pH 稳定性 (图 9).

2.4.5 金属离子对 FM11 酶活力的影响 Na⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Ni⁺、Mg²⁺、Li⁺、Mn²⁺ 在终浓度为 0.5 mmol/dm³ 时对 FM11 有明显的激活作用, 尤其是 Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 可使 FM11 酶活显著提高 20% 以上

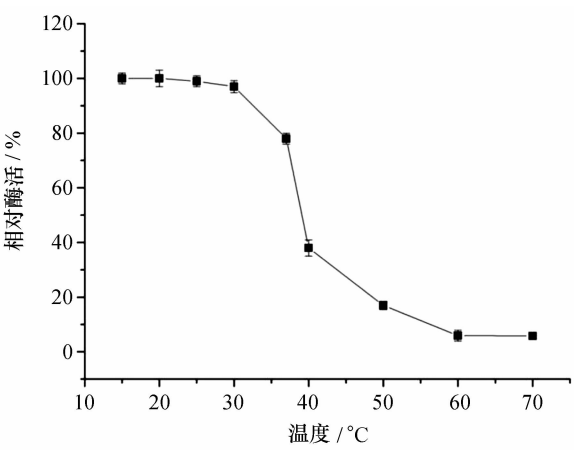


图 8 FM11 的热稳定性
Fig. 8 Thermostability of FM11

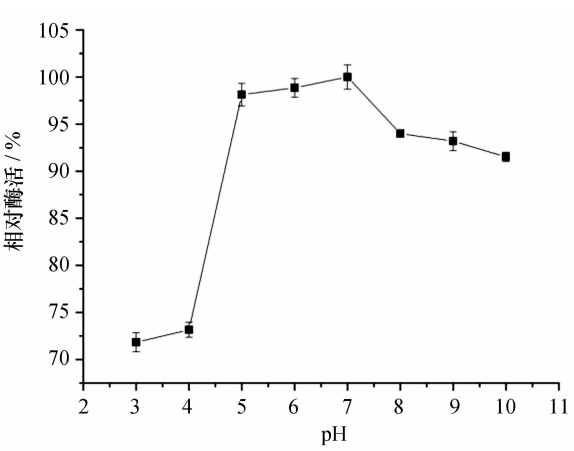


图 9 FM11 的 pH 稳定性
Fig. 9 pH stability of FM11

(表 1). 相反地, 大多数的金属离子在高浓度时 (5.0 mmol/dm³), 对 FM11 的酶活具有明显的抑制作用, 其中 Cu²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺ 在高浓度时 (5.0 mmol/dm³) 对 FM11 的抑制效果最明显 (表 1). 此外, 高浓度的 K⁺、Na⁺ 对 FM11 的酶活略有抑制作用.

表 1 金属离子对 FM11 酶活力的影响

Tab. 1 Effects of metal ions on FM11 activity

金属离子	相对酶活 / %	
	0.5 mmol/dm ³	5.0 mmol/dm ³
K ⁺	96.6	93.6
Na ⁺	116.2	95.5
Ca ²⁺	128.9	58.6
Cu ²⁺	108.9	41.8
Co ⁺	94.0	56.6
Zn ²⁺	93.1	77.9
Fe ³⁺	114.9	41.8
Ni ⁺	114.4	51.4
Mg ²⁺	133.8	57.0

金属离子	续表	
	相对酶活/%	
	0.5 mmol/dm ³	5 mmol/dm ³
Mn ²⁺	112.7	41.8
Ag ⁺	102.8	56.8
Cd ²⁺	105.4	53.5
Li ⁺	108.4	72.5
Rb ⁺	100.5	57.8
Sr ⁺	98.5	52.8
Cs ⁺	99.1	65.4
对照	100.0	100.0

2.5 讨论

从印度洋深海沉积物中分离获得的 *Pseudomonas* IOFA1 菌株具有高效降解甲醛的能力. 我们的研究表明,其甲醛耐受性高达 10 mmol/dm³,远远地高于其他文献报道的甲醛耐受菌株,如 *Burkholderia*^[18]、*E. coli*^[19]、*Bacillus*^[20]、*Thermococcus*^[21] 和其他 *Pseudomonas putida* 菌株^[22]. 此外,我们对 IOFA1 菌株多个基因研究发现 IOFA1 在密码子偏好性上与其他物种如大肠杆菌等存在着一定的差异,其编码基因包含多种稀有密码子.

我们在 IOFA1 菌株基因组测序结果中发现了多个甲醛脱氢酶、甲醛歧化酶、醇脱氢酶、甲酸脱氢酶等相关酶的基因,说明 IOFA1 的高甲醛耐受性可能与菌株中完整的甲醛降解相关酶相关. 而酶液纯化的结果表明,甲醛歧化酶 FM11 是其中的关键酶. FM11 在 25 ~ 50℃ 范围内能够保留 95% 以上的酶活力,在 10℃ 仍保持 70% ~ 75% 的活力(图 6),表现出良好的低温适应性,可能与该菌株适应深海低温环境相关. 甲醛歧化酶由于在活性位点上以非共价键的形式结合了 NAD^[11],不需要额外添加辅酶即可发挥体外降解甲醛的功能,因此在应用中具有特别重要的优势,而其酶学性质的研究是实现应用的

前提条件之一. 虽然 IOFA1 菌株的甲醛歧化酶 FM11 的氨基酸序列与 *Pseudomonas putida* F61 甲醛歧化酶同源性为 100%,但 Yanase 等(1995)仅分析了 F61 菌株甲醛歧化酶的序列特征^[17],并未研究其酶学性质. 此外,FM11 与其他物种已知的醛歧化酶氨基酸同源性较低,同源性最高的为 *Mastigocoleus testarum* 的 aldehyde dismutase (gi | 654353042, 65%). 而这些菌株序列的酶学性质也同样未见报道. 实际上,目前尚未有微生物甲醛歧化酶得到纯化,以及开展酶学性质的研究. 我们对 IOFA1 菌株的甲醛歧化酶 FM11 的分析结果显示,FM11 在 25 ~ 50℃ 范围内能够保留 95% 以上的酶活力,在 pH 值为 4 ~ 10 时保有 50% 以上的酶活力,显示出非常好的温度和 pH 的适应性. 同时,FM11 在 pH 值为 5 ~ 7 的条件下孵育 1 h 后,仍保有 97% 以上的酶活,且在 pH 值为 7 ~ 10 条件下孵育 1 h 后,仍保留 90% 以上的酶活,表现出极好的酸性和碱性 pH 稳定性. 这些特性使得 FM11 能够更广泛地应用于不同环境和不同需求的日常生活和工业生产应用中.

3 结论

印度洋深海沉积物中分离的 *Pseudomonas* sp. IOFA1 菌株能在 40 min 内完全降解 100 mg/cm³ 的甲醛. 通过阴离子交换柱层析纯化到具有甲醛降解活性的甲醛歧化酶蛋白(FM11). 序列分析表明 FM11 与其它物种已知醛脱氢酶的氨基酸序列最高相似性为 65%. 酶学性质分析结果显示,FM11 的最适反应温度为 40℃,最适反应 pH 值为 5 ~ 9,具有广泛的温度、pH 适应性及极好的酸性和碱性稳定性. Ca²⁺、Mg²⁺ 在低浓度时(0.5 mmol/dm³)对 FM11 有较明显的激活作用. 这些研究为我们进一步开发 *Pseudomonas putida* IOFA1 甲醛歧化酶在降解甲醛方面的用途奠定了基础.

参考文献:

[1] 洪志强,童智敏,施健. 甲醛对作业工人呼吸系统及肺功能影响[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(7): 849-850.

[2] 樊冬梅,谢华. 甲醛对呼吸系统毒性作用的研究现状[J]. 广东医学院学报, 2009,27(5): 1 660-1 662.

[3] Maltoni C, Failla G, Kassapidis G. First experimental demonstration of the carcinogenic effects of styrene oxide; long-term bioassays on Sprague-Dawley rats by oral administration[J]. La Medicina Del Lavoro, 1979, 70(5): 358.

[4] Goldstein B D. Hematological and toxicological evaluation of formaldehyde as a potential cause of human leukemia[J]. Human & Experimental Toxicology, 2011, 30(7): 725-735.

[5] Schwikl E, Zhang L, Smith M T, et al. Formaldehyde and leukemia: an updated meta-analysis and evaluation of bias[J]. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2010, 52(9): 878-886.

[6] Boonamnuyayvitaya V, Sae-ung S, Tanthapanichakoon W. Preparation of activated carbons from coffee residue for the adsorption of formaldehyde[J]. Separation and Purification Technology, 2005, 42(2): 159-168.

- [7] Liu T, Li F, Li X. TiO₂ hydrosols with high activity for photocatalytic degradation of formaldehyde in a gaseous phase[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(1): 347-355.
- [8] Eiroa M, Kennes C, Veiga M C. Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2004, 79(5): 499-504.
- [9] Oliveira S, Moraes E M, Adorno M A T, et al. Formaldehyde degradation in an anaerobic packed-bed bioreactor[J]. Water Research, 2004, 38(7): 1 685-1 694.
- [10] Kato N, Yamagami Y, Kitayama Y, et al. Dismutation and cross-dismutation of aldehydes, and alcohol: aldehyde oxidoreduction by resting-cells of *Pseudomonas putida* F61-a[J]. Journal of Biotechnology, 1984, 1(5): 295-306.
- [11] Kato N, Yamagami T, Shimao M, et al. Formaldehyde dismutase, a novel NAD-binding oxidoreductase from *Pseudomonas putida* F61[J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 156(1): 59-64.
- [12] Kato N, Mizuno S, Imada Y, et al. Formate production from methanol by formaldehyde dismutase coupled with a methanol oxidation system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 27(5/6): 567-571.
- [13] Yanase H, Moriya K, Mukai N, et al. Effects of GroESL coexpression on the folding of nicotinoprotein formaldehyde dismutase from *Pseudomonas putida* F61[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(1): 85-91.
- [14] Kato N, Yamagami T, Shimao M, et al. Regeneration of NAD (H) covalently bound to formate dehydrogenase with several second enzymes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, 25(5): 415-418.
- [15] Jin M, Yu X, Chen X. et al. *Pseudomonas putida* IOFA1 transcriptome profiling reveals a metabolic pathway involved in formaldehyde degradation[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(2): 220-228.
- [16] Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction[J]. Biochemical Journal, 1953, 55(3): 416.
- [17] Yanase H, Noda H, Aoki K, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding formaldehyde dismutase from *Pseudomonas putida* F61[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(2): 197-202.
- [18] Marx C J, Miller J A, Chistoserdova L, et al. Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(7): 2 173-2 178.
- [19] Kümmerle N, Feucht H H, Kaulfers P M. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(10): 2 276-2 279.
- [20] Jakobsen Ø M, Benichou A, Flickinger M C, et al. Upregulated transcription of plasmid and chromosomal ribulose monophosphate pathway genes is critical for methanol assimilation rate and methanol tolerance in the methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(8): 3 063-3 072.
- [21] Orita I, Sato T, Yurimoto H, et al. The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(13): 4 698-4 704.
- [22] Roca A, Rodríguez-Herva J J, Duque E, et al. Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 1(2): 158-169.

Purification and characterization of formaldehyde dismutase FM11 from deep-sea bacterium *Pseudomonas* sp. IOFA1

YU Xiang^{1,2}, CHEN Xing-lin^{1,2}, JIN Min^{1,2}, ZENG Run-ying^{1,2}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China;

2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Pseudomonas* sp. IOFA1, the strain isolated from the deep-sea sediments of Indian Ocean, was found to degrade formaldehyde efficiently. IOFA1 could rapidly degrade 100mg/cm³ formaldehyde within 40 min. The crude enzymes in cell lysate were purified with a DEAD-sepharose ion exchange column and analyzed with SDS-PAGE. After segregation, a pure protein with formaldehyde-degrading activity was obtained and was further identified as formaldehyde dismutase (FM11) by MALDI-TOF/TOF mass spectrum. Sequence analysis showed that FM11 shared 65% maximum amino acid sequence identity to known formaldehyde dismutase from other species. Domain

analysis suggested the existence of two conserved zinc atom binding sites and one conserved NAD binding site in FM11. FM11 was most active at 40°C and retained more than 95% of its maximum activity at temperatures ranging from 25°C to 60°C, exhibiting well adaption to temperatures. FM11 displayed a broad range of optimal pHs (pH 5 ~ 9), and could adapt to wide pH environments as it could retained more than 50% and 80% of its maximum activity in pH 4 and pH 10, respectively. FM11 could retained more than 97% and 90% of its initial activity after incubation for 1 h in pH 5 ~ 7 and pH 7 ~ 10 environments, respectively, displaying a excellent acidic and alkaline stability. The presence of Ca^{2+} 、 Mg^{2+} at low concentration could significantly increase the activity of FM11. Collectively, our findings should provide a foundation for the utilization of *Pseudomonas* sp. formaldehyde dismutase in the decontamination of environmental formaldehyde.

Key words:marine biology; Deep-sea;*Pseudomonas* sp. ;formaldehyde dismutase;formaldehyde degradation; temperature and pH adaption;pH stability

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2016. 03. 014

(责任编辑:肖 静)