

## 繁茂膜海绵共附生假单胞菌属菌株 DEH138A 中脱卤酶 的分离纯化及性质表征\*

### Purification and Characterization of the Dehalogenases from Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. DEH138A Iso- lated from Marine Sponge *Hymeniacidon perlevis*

张锦友<sup>1,4</sup>, 王亚月<sup>1,4</sup>, 曹旭鹏<sup>1</sup>, 薛松<sup>1\*\*</sup>, 张卫<sup>2\*\*</sup>, 杨艳坤<sup>3</sup>

ZHANG Jin-you<sup>1,4</sup>, WANG Ya-yue<sup>1,4</sup>, CAO Xu-peng<sup>1</sup>, XUE Song<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>,  
YANG Yan-kun<sup>3</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所海洋生物产品工程组, 辽宁大连 116023; 2. Flinders 大学  
医学院, Adelaide, SA5042, 澳大利亚; 3. 郑州大学生物工程系, 河南郑州 450001; 4. 中国科学  
院大学, 北京 100049)

(1. Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian,  
Liaoning, 116023, China; 2. School of Medicine, Flinders University, Adelaide, SA5042, Austral-  
ia; 3. Department of Biological Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450001,  
China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

**摘要:**用硫酸铵沉淀、Q-Sepharose HP 离子交换层析、Superdex 200 凝胶过滤层析和 Mono-Q 离子交换层析方  
法,对从大连潮间带繁茂膜海绵中分离得到的 1 株假单胞菌 DEH138A (*Pseudomonas* sp. DEH138A) 中的脱卤  
酶进行分离纯化和酶学性质表征。结果显示,假单胞菌菌株 DEH138A 中含有一种能降解 L-2-氯丙酸的 L-2-卤  
代酸脱卤酶(L-DEX)。经纯化后,L-DEX 亚基分子量为 27.8 kDa,全酶分子量为 42.5 kDa,推测其为一个二聚  
体蛋白。L-DEX 最适 pH 值及最适反应温度分别为 10.0 和 30℃,  $K_m$  值为 0.63 mmol/L。L-DEX 能够作用于  
多种 2-卤代酸,而且对单溴乙酸的脱卤效果最好。DTT 和 EDTA 对 L-DEX 无抑制作用, $Cu^{2+}$  和  $Co^{2+}$  对 L-DEX  
有明显的抑制作用。L-DEX 具有立体选择性等独特的酶学特性,在环境修复、精细化工等领域具有潜在的应  
用价值。

**关键词:**脱卤酶 假单胞菌 分离纯化 性质表征

中图分类号:Q814.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2013)02-0137-06

**Abstract:** This paper aims at the study of properties of the dehalogenase from bacterium  
*Pseudomonas* sp. DEH138A isolated from marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. The dehalo-  
genase from the bacterium *Pseudomonas* sp. DEH138A was purified by fractional precipitation

of  $(NH_4)_2SO_4$ , ion exchange chromatography with  
Q-Sepharose HP, gel filtration chromatography  
with Superdex 200 and ion exchange chromatog-  
raphy with Mono-Q. The properties of the L-DEX  
were also characterized. The results showed that  
the dehalogenase purified from bacterium  
*Pseudomonas* sp. DEH138A was a L-DEX dehalo-  
genase which could specifically dehalogenate L-2-  
chloropropionate (L-2-CPA). The purified L-DEX  
was a dimer and its subunit molecular weight was  
about 27.8 kDa. The optimum pH value and tem-

收稿日期:2013-04-03

修回日期:2013-04-27

作者简介:张锦友(1979-),男,博士研究生,主要从事酶工程  
研究。

\* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2009CB724700),中  
国科学院百人计划项目(A1097),国家自然科学基金项目  
(31100092)资助。

\*\* 通讯作者:薛松(1972-),女,研究员,博士生导师,主要  
从事酶及结构生物学等研究,Email:xuesong@dicp.ac.cn;

张卫(1969-),男,博士生导师,主要从事天然产物等研究,  
Email:wei.zhang@flinders.edu.au.

perature were 10.0 and 30°C, respectively. The  $K_m$  of the L-DEX was 0.63 mmol/L. The L-DEX could degrade many 2-haloacids and showed the best activity on monobromoacetate. DTT and EDTA could not inhibit the activity of L-DEX, but  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  could inhibit the activity of the L-DEX completely. Considering its promising properties, the dehalogenases from the strain DEH138A may find potential application in environmental and chemical industry.

**Key words:** dehalogenase, *Pseudomonas* sp. DEH138A, purification, characterization

卤代有机化合物是精细化工、医药等行业重要的原料及中间体。随着其广泛的应用,卤代酸等含卤有机化合物逐渐成为环境中主要的污染物之一<sup>[1]</sup>。脱卤酶是一类能够使卤素从卤代化合物中释放出来的一类酶。它不仅在降解环境有机卤化物中起到重要作用,而且其立体选择性催化活性在手性拆分及制备手性化合物上也具有良好的应用前景<sup>[2,3]</sup>。

自从发现脱卤酶以来,已经发现多种不同降解类型的酶类,如卤代醇脱卤酶、卤代烷烃脱卤酶、卤代芳烃脱卤酶、卤代烷酸脱卤酶等<sup>[1,4]</sup>,其中又以卤代烷酸脱卤酶研究最为深入。依据作用底物类型不同,卤代烷酸脱卤酶又可以分为仅作用于 L-2-氯丙酸的 L-2-卤代酸脱卤酶(L-DEX)、仅作用于 D-2-氯丙酸的 D-2-卤代酸脱卤酶(D-DEX),以及作用于 DL-2-氯丙酸的 DL-2-卤代酸脱卤酶(DL-DEX)。

已经发现含卤代酸脱卤酶的微生物主要来源于陆生环境,而来源于海洋微生物的卤代酸脱卤酶的报道却很少<sup>[5]</sup>。海洋微生物来源的酶具有较好的稳定性、耐盐性和耐有机溶剂性<sup>[6]</sup>。我们实验室前期从大连海域的低等多细胞动物繁茂膜海绵中分离得到一株能产脱卤酶的细菌 *Pseudomonas* sp. DEH138A。本研究对该菌株中的脱卤酶进行了初步分离纯化和酶学性质表征,以期为后续的基因克隆、结构和功能等研究奠定基础,发挥其在环境和化工领域的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和试剂

参照共附生菌株的分离方法<sup>[5]</sup>,由我们实验室分离筛选得到 1 株菌株 *Pseudomonas* sp. DEH138A。经 16S rDNA 序列比较分析鉴定,菌株属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

牛血清白蛋白及 SDS 为 Sigma 产品。Tris, TEMED, 丙烯酰胺及甲叉丙烯酰胺为 Amersco 产品。单氯乙酸,二氯乙酸钠,DL-2-氯丙酸及 DL-2-氯丙酸为 Alfa Aesar 产品。2,2-二氯丙酸为 Aldrich 产品。L-2-溴丙酸及 DL-2-溴正丁酸为 Acros 产品。DL-2-氯正丁酸为 TCI 产品。其余试剂均为国产分

析纯产品。

### 1.2 培养条件

菌株在 20L 的发酵罐中培养。培养基各组分如下:NaCl (30 g/L),硫酸铵(4 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (11.9 g/L), $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.1 g/L),酵母浸粉(0.1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L),1% (v/v) 微量元素<sup>[5]</sup>及消旋 2-氯丙酸(DL-2-CPA,10 mmol/L)。接种后在 28°C 暗处 200 r/min 培养。待培养至指数生长期后期时(约 24h),离心(6500 rpm,4°C)收集菌体。

### 1.3 脱卤酶活性和蛋白含量测定

L-DEX 标准反应体系:在 1.0 ml 反应体系中,含有 L-2-CPA (10 mmol/L),Glycine-NaOH(100 mmol/L,pH 值 10.0)及适当量的酶。在 30°C 反应一段时间后,加入 10% (V/V) 的浓磷酸(85%, W/W)终止反应。12000 r/min×10 min 离心(4°C)去除沉淀。酶活性通过 HPLC 检测 2-CPA 的减少量来表示<sup>[5,7]</sup>。每分钟催化转化 1  $\mu\text{mol}$  2-CPA 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

蛋白含量采用考马斯亮蓝法<sup>[8]</sup>测定。SDS-PAGE 采用垂直板凝胶电泳<sup>[9]</sup>。浓缩胶和分离胶分别为 5%及 12%。

### 1.4 脱卤酶的分离纯化

粗酶液制备将 20L 发酵液离心(6500 r/min×20min,4°C)收集菌体,菌体用磷酸钾缓冲液(50 mmol/L,pH 值 7.5)洗涤 3 次后,置于-70°C 保存备用。取 11g 菌体,每克菌体用 20ml 磷酸钾缓冲液(50 mmol/L,pH 值 7.5)重悬。在冰水浴中超声(300 W,超声 5s,间隙 5s,共 180 次)破碎菌体,4°C 下 12000 r/min 离心 30min,所得上清即为粗酶液。共得 215 ml 粗酶液。

硫酸铵盐析将所得粗酶液在 4°C 下逐级加入硫酸铵至 40%、60%、80%、100% 的饱和度,每个饱和度下,待硫酸铵完全溶解后,再搅拌 60min。12000 r/min 离心 10min 收集沉淀,沉淀分别重悬于缓冲液 A (50mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 值 7.5 加 0.65 mmol/L DTT)后,测定 L-DEX 酶活性,保留高活性组分。

Q-Sepharose 阴离子交换层析将硫酸铵沉淀(60%饱和度)重悬组分经超滤膜(截留分子量为10kDa)超滤除盐后用于后续的纯化分离。分离柱 Q-Sepharose HP(7/25, GE healthcare)用缓冲液 A 平衡至电导稳定,进样后用 11 个柱体积的缓冲液 A 洗脱,然后与缓冲液 B(缓冲液 A 加 0.3mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)进行线性梯度洗脱 20 个柱体积。最后再用 10 个柱体积的缓冲液 B 清洗柱子,流速为 1ml/min。每管收集样品 1ml,测定 L-DEX 酶活性大小,合并活性高的组分。

Superdex 200 凝胶过滤层析是将凝胶柱 Superdex 200 (HiLoad 16/60, GE healthcare)经缓冲液 A 平衡后进样,洗脱流速为 0.5 ml/min,每管收集洗脱样品 1ml。测定酶活性大小后,收集合并活性高的组分。

Mono-Q 阴离子交换层析是将 Mono-Q (5/50 GL, GE healthcare)柱经缓冲液 A 冲洗平衡至基线稳定,平衡结束。进样后,用缓冲液 A 清洗 11 个柱体积,然后与缓冲液 B 进行线性梯度洗脱 20 个柱体积。最后用缓冲液 B 清洗柱子 10 个柱体积,流速 0.5 ml/min,每管收集样品 1 ml,测定酶活性大小,收集合并纯度较高的组分。

### 1.5 脱卤酶的酶学性质表征

最适反应 pH 值及 pH 值耐受性表征是配制 pH 值范围为 6~12 的反应缓冲液(pH 值 6~7.5 用 100 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 值 7.5~9.5 用 100 mol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液, pH 值 9.5~12 用 Glycine-NaOH 缓冲液),测定酶在不同 pH 值缓冲液中的酶活力,以确定最适反应 pH 值。以 L-2-氯丙酸为底物,反应时间为 30 min,所测最高酶活为 100%,计算相对酶活。将酶液用不同缓冲液按 1:10 比例稀释后,在 4℃ 放置 24h,测定残余酶活来确定酶的 pH 耐受性。以 L-2-氯丙酸为底物,所测最高酶活为 100%,计算相对酶活。以 DL-2-氯丙酸为底物,反应时间为 120 min,所测最高酶活为 100%,计算相对酶活。

最适反应温度及温度耐受性表征是测定酶液在 20~60℃ 的条件下的酶活力,以确定最适反应温度。以 DL-2-氯丙酸为底物,反应时间为 20 min,所测最高酶活为 100%,计算相对酶活。将酶液在不同温度(4~60℃)下保温 30min,测定剩余的酶活,以孵育 0h 的酶活性作为对照,计算相对活力,以确定酶的温度耐受性。以 DL-2-氯丙酸为底物,反应时间为 25 min,所测最高酶活为 100%,计算相对酶活。

米氏常数是在 100 mmol/L Glycine-NaOH, pH

值 10.0 缓冲液中加入不同浓度的 L-2-CPA, 30℃ 反应一段时间后,检测不同浓度下底物的降解速率。利用米氏方程双倒数法求得  $K_m$  及  $V_{max}$ 。

脱卤酶的底物专一性是在 100 mmol/L Glycine-NaOH, pH 值 10.0 的缓冲体系中,加入 10 mmol/L 的不同卤代物及适当量的酶,于 30℃ 反应 30min 后检测酶活性的大小。

抑制剂对酶活性的影响是在反应体系中,加入浓度为 1 mmol/L 的不同抑制剂,以不加抑制剂的酶活性作为对照。反应体系同 L-DEX 酶活测定体系,反应时间为 30 min。

## 2 结果和分析

### 2.1 脱卤酶的分离纯化

粗酶经过四级纯化,其纯化收率为 5.7%,比活性达到 28.0 U/mg(表 1)。SDS-PAGE 图谱显示得到纯度较高的脱卤酶(图 1)。纯化的脱卤酶只对 L-2-CPA 起作用,表明纯化得到的脱卤酶为 L-DEX。

表 1 L-DEX 纯化结果

Table 1 Purification result of the L-DEX

纯化步骤 Purification step	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (U)	比活性 Specific activity (U/mg)	回收率 Recovery (%)
Crude extract	279.5	98.9	0.35	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precipitation (40%~60%)	240.0	52.2	0.22	52.8
Q-HP	18.0	18.0	1.0	18.2
Superdex 200	0.76	6.0	7.9	6.1
Mono-Q	0.20	5.6	28.0	5.7

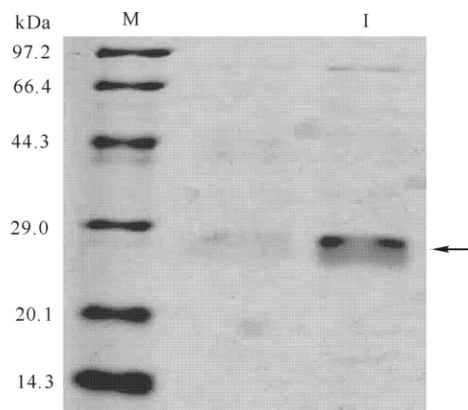


图 1 纯化的 L-DEX SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified L-DEX

M: 蛋白标准品; I: 纯化的 L-DEX(箭头所示)。M: protein marker, I: purified L-DEX (Arrow).

## 2.2 酶学性质

### 2.2.1 脱卤酶分子量

脱卤酶 L-DEX 经 SDS-PAGE 电泳后,计算得到其亚基分子量约为 27.8 kDa,在 Superdex 200 的凝胶柱上分析,其全酶分子量约为 42.5 kDa,表明菌株中 L-DEX 可能为二聚体的酶蛋白。经凝胶柱分析得到的脱卤酶分子量比两倍的亚基分子量低,其原因可能是该脱卤酶在天然状态下不是一个球型蛋白。

### 2.2.2 最适反应 pH 值及 pH 值耐受性

实验结果表明 L-DEX 的最适反应 pH 值为 10.0(图 2),在碱性条件下(pH 值 9~11)具有较高的反应活性,pH 值 <9 导致反应活性迅速降低。在不同 pH 值的缓冲液中孵育 24h 后,脱卤酶在 pH 值 6~9 时能够较好地保持活性,并随着 pH 值的升高,酶的稳定性逐渐降低(图 3)。

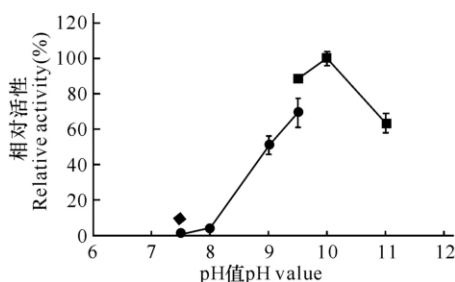


图 2 pH 值对 L-DEX 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH value on the L-DEX activity

◆: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ●: Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; ■: Glycine-NaOH.

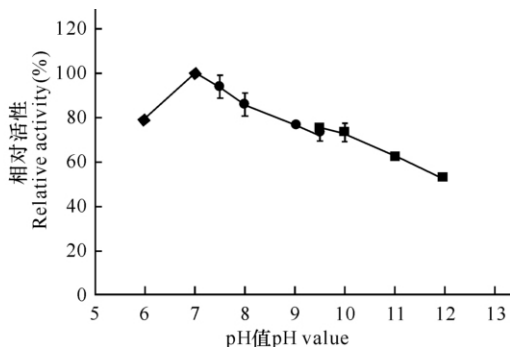


图 3 L-DEX 的 pH 值耐受性

Fig. 3 Effect of pH value on the stability of L-DEX

◆: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ●: Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; ■: Glycine-NaOH.

### 2.2.3 最适反应温度及温度耐受性

脱卤酶在 30℃ 时酶活最高(图 4)。在 20~30℃ 之间,随温度升高,酶活逐渐上升。30℃ 后,随温度的升高,酶活虽然有降低,但是并没有表现出急剧下降的趋势。

在 4℃ 至 30℃ 间,脱卤酶 L-DEX 的相对活性均在 100% 左右,酶活相对稳定。40~60℃,L-DEX 的

热稳定性较差,在 45℃,50℃,55℃ 下孵育 30min 后剩余酶活力已分别降至 12.1%,4.5% 及 2.6%,到达 60℃ 时酶活已经完全丧失(图 4)。

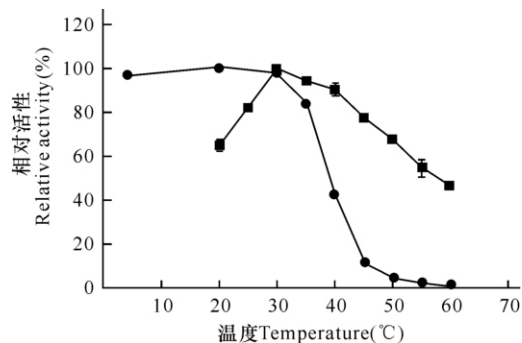


图 4 L-DEX 的最适反应温度及温度耐受性

Fig. 4 Effect of temperature on L-DEX activity and stability

■: 最适反应温度, ●: 温度耐受性。■: Optimal temperature; ●: Thermostability.

### 2.2.4 米氏常数

用 Lineweaver-Burk 作图法求得 L-DEX 对 L-2-CPA 的  $K_m$  值为 0.63 mmol/L,  $V_{max}$  为  $9.5 \times 10^{-5}$  mol/min (图 5)

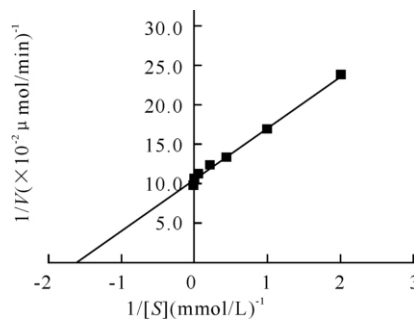


图 5 L-DEX 的 Lineweaver-Burk

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots of the L-DEX

### 2.2.5 底物的专一性

表 2 结果显示,DEH138A 中的 L-DEX 对各种卤代乙酸的催化能力相当,但是对于卤代丙酸和丁酸来说,具有手性选择性。L-DEX 对氯化物和溴化物的降解能力比较强。L-DEX 降解单卤代酸的能力要强于对二卤代酸的降解能力,如单氯乙酸 > 二氯乙酸,DL-2-氯丙酸 > 2,2-二氯丙酸。随着碳链的增加,L-DEX 脱卤酶对单取代的氯化化合物的催化活性大小依次为:2-氯丙酸 > 单氯乙酸 > 2-氯丁酸,而对溴代化合物的催化活性大小则依次为:单溴乙酸 > 2-溴丁酸 > 2-溴丙酸。可见卤代烷酸中的卤素元素种类、个数及位置对脱卤酶的催化活性有很大的影响。

### 2.2.6 抑制剂对 L-DEX 酶活性的影响

表 3 结果显示,1mmol/L 的 EDTA 及 DTT 对 L-DEX 活性没有抑制,1mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup> 及 Mg<sup>2+</sup> 部分

抑制脱卤酶活性,而 1mmol/L 的  $Zn^{2+}$  可以显著地降低酶活,而 1mmol/L  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  可以使酶完全失活。

表 2 L-DEX 的底物专一性

Table 2 Substrate specificity of the L-DEX

底物 Substrates	相对活性 Relative Activity (%)
单氯乙酸盐 Chloroacetate	87.7
二氯乙酸盐 Dichloroacetate	84.4
单溴乙酸盐 Monobromoacetate	115.0
单碘乙酸盐 Monoiodoacetate	95.2
DL-2-氟丙酸盐 DL-2-Fluoropropionate	0
DL-2-氯丙酸盐 DL-2-Chloropropionate	100.0
2,2-二氯丙酸盐 2,2-Dichloropropionate	0
L-2-溴丙酸盐 L-2-Bromopropionate	46.5
DL-2-氯-正丁酸 DL-2-Chloro-n-butyrate	67.5
DL-2-溴-正丁酸 DL-2-Bromo-n-butyrate	59.5

表 3 抑制剂对 L-DEX 的影响

Table 3 Effect of inhibitors on the L-DEX

抑制剂 Inhibitors	相对酶活 Relative enzyme activity (%)
Control	100.0
DTT	96.3
EDTA	114.3
$Ca^{2+}$	68.4
$Mg^{2+}$	92.9
$Co^{2+}$	0
$Cu^{2+}$	0
$Zn^{2+}$	10.7

### 3 讨论

卤代酸脱卤酶主要来自于陆生微生物,而在海洋细菌中鲜有报道。本文从大连海域繁茂膜海绵中分离得到的假单胞菌属 DEH138A 菌株中纯化得到一种具有立体选择性的 L-2-卤代酸脱卤酶。目前, L-2-卤代酸脱卤酶已在假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)<sup>[10,11]</sup>, 固氮菌 (*Azotobacter* sp.)<sup>[12]</sup>, 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)<sup>[13]</sup>, 莫拉氏菌 (*Moraxella* sp.)<sup>[14]</sup> 中发现,而 D-2-卤代酸脱卤酶仅在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)<sup>[15]</sup> 及根瘤菌<sup>[13,16]</sup> 中发现。

菌株 DEH138A 中的 L-DEX 经纯化后,其比活性为 28.0 U/mg。经凝胶过滤及 SDS-PAGE 测定得到 L-DEX 全酶的分子量为 42.4 kDa,亚基分子量为 27.8 kDa,推测该 L-DEX 是二聚体,与卤代酸脱卤酶 DehCII (*Pseudomonas* sp. strain CBS3)<sup>[17]</sup> 及 HdIIVa (*Pseudomonas cepacia* MBA4)<sup>[18]</sup> 相类似,与来源于 *Azotobacter* sp. RC26<sup>[12]</sup> 的 L-2-卤代酸脱卤酶(单聚体)及 *P. putida* AJ1<sup>[19]</sup> 的 L-2-卤代酸脱卤酶(四聚体)则不同。

假单胞菌 DEH138A 菌株中的 L-DEX 最适反应 pH 值为 10.0。在 30℃ 酶活最高,在 30℃ 内能保持较好的活性,EDTA 对 L-DEX 没有抑制作用,这说明从 DEH138A 中所得的 L-DEX,其活性中心无金属离子参与催化,这与其它菌株中的 L-DEX 相类似<sup>[11,12,18,20]</sup>。本文所得到的 L-DEX 对  $Zn^{2+}$  比较敏感(抑制率为 89.3%),对  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  则非常敏感(100% 抑制), $Cu^{2+}$  对来源于 *P. putida* 109<sup>[11]</sup> 及 *Azotobacter* sp. strain RC26<sup>[12]</sup> 的脱卤酶同样具有较强的抑制作用。然而, $Cu^{2+}$  {Van der Ploeg, 1991 # 36; Van der Ploeg, 1991 # 36} 对来源于 *P. cepacia* MBA4 的卤代酸脱卤酶则无抑制作用<sup>[18]</sup>,  $Co^{2+}$  及  $Zn^{2+}$  对其抑制作用也不明显。

菌株 DEH130A 中 L-2-卤代酸脱卤酶对溴代乙酸具有最好的催化活性,对氯乙酸及二氯乙酸的脱卤效果相近。而卤代酸脱卤酶 Dech II<sup>[17]</sup> 及 HdI Va<sup>[18]</sup> 虽然对溴代乙酸有最好的催化活性,但是对二氯乙酸的降解能力要明显低于对氯乙酸的降解能力。以 L-2-CPA 为底物时,本文纯化得到的 L-2-卤代酸脱卤酶的  $K_m$  值为 0.63 mmol/L,较 *Pseudomonas dehalogenans* NCIB 9061 ( $K_m = 0.30$  mmol/L)<sup>[10]</sup> 及 *Pseudomonas* sp. strain YL ( $K_m = 0.37$  mmol/L)<sup>[21]</sup> 中脱卤酶的  $K_m$  值高,但是远低于 *Pseudomonas putida* 中 L-2-卤代酸脱卤酶的  $K_m$  值 ( $K_m = 3.8$  mmol/L)<sup>[11]</sup>。

同来源于陆生环境微生物中的 L-卤代酸脱卤酶相比,来源于海洋环境的菌株 DEH130A 中的 L-2-卤代酸脱卤酶在底物特异性及对抑制剂的耐受性有着一定的独特性。由于海洋微生物已成为众多新酶的资源库,而目前对海洋微生物产脱卤酶的研究还较少,需要进一步开发更多产脱卤酶的海洋微生物并表征相关脱卤酶。本文对来源于海洋的假单胞菌属 DEH138A 菌株中的脱卤酶进行了初步考察与研究,拓宽了对海洋来源的卤代酸脱卤酶的认识,为更深入地研究脱卤酶的基因、蛋白序列及耐盐性等奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Hamid T H T A, Hamid A A A, Huyop F. A review on non-stereospecific haloalkanoic acid dehalogenases[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (48): 9725-9736.
- [2] Kurihara T, Esaki N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications[J]. The Chemical Record, 2008, 8(2): 67-74.

- [3] Swanson P E. Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(4):365-369.
- [4] Fetzner S, Lingens F. Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1994, 58(4):641-685.
- [5] Huang J, Xin Y, Zhang W. Isolation, characterization and identification of a *Paracoccus* sp. 2-haloacid-degrading bacterium from the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(3):318-324.
- [6] Zhang C, Kim S K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects[J]. *Mar Drugs*, 2010, 8(6):1920-1934.
- [7] Lin C, Yang L, Xu G, et al. Biodegradation and metabolic pathway of  $\beta$ -chlorinated aliphatic acid in *Bacillus* sp. CGMCC no. 4196 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2):689-696.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1):248-254.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] Little M, Williams P. A bacterial haloalcohol dehalogenase: its purification, some properties and its modification by specific amino acid reagents[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1971, 21(1):99-109.
- [11] Motosugi K, Esaki N, Soda K. Purification and properties of 2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(3):837-838.
- [12] Diez A, Prieto M I, Alvarez M J, et al. Purification and properties of a high-affinity L-2-haloacid dehalogenase from *Azotobacter* sp. strain RC26[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23(5):279-282.
- [13] Cairns S S, Cornish A, Cooper R A. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of two *Rhizobium* sp. genes encoding haloalkanoate dehalogenases of opposite stereospecificity[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(3):744-749.
- [14] Kawasaki H, Tsuda K, Matsushita I, et al. Lack of homology between two haloacetate dehalogenase genes encoded on a plasmid from *Moraxella* sp. strain B[J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(7):1317-1323.
- [15] Smith J M, Harrison K, Colby J. Purification and characterization of D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23[J]. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136:881-886.
- [16] Leigh J, Skinner A, Cooper R. Partial purification, stereospecificity and stoichiometry of three dehalogenases from a *Rhizobium* species[J]. *Fems Microbiology Letters*, 1988, 49(3):353-356.
- [17] Morsberger F M, Muller R, Otto M K, et al. Purification and characterization of 2-halocarboxylic acid dehalogenase II from *Pseudomonas* spec. CBS3[J]. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1991, 372(10):915-922.
- [18] Tsang J S H, Sallis P J, Bull A T, et al. A monobromoacetate dehalogenase from *Pseudomonas cepacia* MBA4[J]. *Archives of Microbiology*, 1988, 150(5):441-446.
- [19] Jones D H A, Barth P T, Byrom D, et al. Nucleotide sequence of the structural gene encoding a 2-haloalkanoic acid dehalogenase of *Pseudomonas putida* strain AJ1 and purification of the encoded protein[J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138:675-683.
- [20] Kurihara T. A mechanistic analysis of enzymatic degradation of organohalogen compounds[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(2):189-198.
- [21] Liu J Q, Kurihara T, Hasan A, et al. Purification and characterization of thermostable and nonthermostable 2-haloacid dehalogenases with different stereospecificities from *Pseudomonas* sp. strain YL[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7):2389-2393.

(责任编辑: 邓大玉)