文章编号：1001-3555(2018)01-0090-09

颗粒性甲烷单加氧酶分离纯化方法的研究进展

林惠颖[1]，辛嘉英[1,2*]，李春雨[1]，孙立瑞[1]，夏春谷[2]
(1. 哈尔滨商业大学 食品科学与工程重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150076；
2. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室，甘肃 兰州 730000)

摘要：颗粒性甲烷单加氧酶(pMMO)是甲烷氧化菌的特征酶之一，在生物催化方面具有广泛的应用前景，但由于其内膜蛋白的性质以及纯化过程中的不稳定性，使其生物化学性质、金属活性位点等方面仍存在许多未知和争议. 着重总结了颗粒性甲烷单加氧酶的分离纯化方法，并对其活性以及与甲烷氧化菌素-Cu(methanobactin-Cu)和其他物质之间的作用关系进行了概述，以促进颗粒性甲烷单加氧酶的深入研究和应用.

关键词：颗粒性甲烷单加氧酶；分离纯化；酶活；甲烷氧化菌素
中图分类号：O643.32　　**文献标志码**：A

甲烷氧化菌(Methanotrophs)是一类以甲烷作为唯一碳源和能源生长的革兰氏阴性菌，广泛存在于湿地[1]、土壤[2]、水稻中[3]，在全球碳循环中扮演着重要角色. 甲烷单加氧酶(methane monooxygenase，MMO)，是甲烷氧化菌代谢途径中的重要酶之一，它能够催化甲烷氧化成为甲醇[4]，而催化这一反应过程的 MMO 有两种形式：可溶性 MMO(soluble methane monooxygenase，sMMO)和位于细胞质内膜的颗粒性甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase，pMMO)[5-6]. 实际上，两种蛋白是不同基因表达的产物，两者的表达受到培养基中不同程度 Cu^{2+}浓度的限制[7]. 当培养基中 Fe^{3+}充足而 Cu^{2+}有限时，甲烷氧化菌细胞仅表达 sMMO；Cu^{2+}浓度相对较高时，sMMO 的表达就会切换成 pMMO. 除此以外，Cu^{2+}还能作为一种代谢激活剂，促进细胞内膜上 pMMO 的高浓度水平合成. 研究发现，几近所有的类型的甲烷氧化菌都能表达 pMMO，但仅有一小部分甲烷氧化菌在无铜的环境下表达 sMMO[8]. 由于 pMMO 存在范围广、且不受铜浓度条件的制约，因此在生物修复方面具有较高的实际应用价值和应用前景. 有学者将纯化得到的膜水平 pMMO 嵌入到易交联、生物兼容性良好的聚乙二醇双丙烯酸酯水凝胶(PEGDA)中，制成一种催化甲烷转化为甲醇的新型生物催化材料，酶活保存率为 100%，同时能作为 3D 打印的底物，为生物反应器的设计以及甲烷的工业化转换提供了新的思路[9]. 研究发现，pMMO 除能够氧化甲烷之外，还能氧化卤化烃，如三聚乙烯(trichloroethylene，TCE)等[10]. TCE 是一类可疑性致癌物，也是地下水源的主要污染物之一[11]. 由于 pMMO 氧化 TCE 的过程中不会有有毒中间产物生成，因此成为 TCE 生物修复的首选方案.

虽然 pMMO 广泛存在，但由于其内膜蛋白的性质以及纯化过程中的不稳定性[12]，使其生物化学性质、金属活性位点等方面仍存在许多未知和争议. 有一部分学者认为 pMMO 中含有 2 个铜原子和 1~2 个铁原子[13]. 另有一部分人认为，pMMO 是一种含有 15~21 个铜原子的金属酶. 铜原子被整合成 5~7 个自旋耦合的三核铜簇，其中 2~3 个铜簇参与到催化反应中来，另有 3~4 个铜簇与 NADH 到活性中心之间的电子传递有关[4]. 还有一部分学者认为 pMMO 中含有 8~15 个铜原子和 2 个铁原子，其中的 6~13 个铜原子能够与一种荧光小肽(甲烷氧化菌素 methanobactin，mb)结合，形成 mb-Cu，参与电子与活性中心之间的交流，或在铜捕获机制中，起到维持氧化还原状态、抑制氧自由基的

收稿日期：2017-11-07；**修回日期**：2017-12-20.
基金项目：国家自然科学基金(21573055)(NNSF of China(21573055))；哈尔滨商业大学创新团队项目(2016TD006)(The Support Project for Research Team of Harbin University of Commerce (2016TD006)).
作者简介：林惠颖(1994-)，女(汉族)，在读硕士研究生，研究方向为发酵工程，E-mail：linhuiyinglhy@126.com(Lin Hui-ying(1994-)，Female，graduate student，research field：Fermentation Engineering. E-mail：linhuiyinglhy@126.com).
* 通讯联系人，E-mail：xinjiayingvip@163.com.

作用[13].

pMMO 的分离纯化是 pMMO 理化性质、金属活性中心等各方面的研究与发展的前提条件，因此纯化出稳定性较好、酶活力较高的 pMMO 显得至关重要. 目前对 pMMO 纯化的研究主要集中在 *Methylococcus capsulatus*(Bath)和 *Methylosinus trichosporium*(OB3b)两种甲烷氧化菌上[14]：*Methylococcus capsulatus* Bath 属Ⅰ型好氧甲基球菌属，是 γ-变形菌的一种，利用磷酸核酮糖途径(RuMP pathway)同化甲醛，胞内膜呈束状分布[7]；*Methylosinus trichosporium*(OB3b)属Ⅱ型好氧甲基弯菌属，主要代谢途径为丝氨酸途径(Serine pathway)，其双层膜吸附于细胞壁周围[7]. 除利用这两种类型的甲烷氧化菌进行 pMMO 分离纯化外，也有一些学者选择了其他类型的甲烷氧化菌，近年来都取得了不少应用进展.

1 pMMO 的分离纯化

为使 pMMO 高水平表达，甲烷氧化菌的培养一般是在 NMS 培养基的基础上补充一定量的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+}，但不同实验室在 pMMO 分离纯化中选择的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度不同. 一部分人认为培养基中 Cu^{2+} 终浓度为 60 μmol/L 时，pMMO 表达水平最高[15]；终浓度为 80 μmol/L 时，细胞中 Cu^{2+} 已饱和. 但也有人认为培养基中 Cu^{2+} 浓度为 30~35 μmol/L、Fe^{3+} 浓度为 18 μmol/L 时，pMMO 表达水平最高、酶活最好[16]. 培养完成后的发酵液离心，收集菌体细胞沉淀进行 pMMO 的纯化. 一般 pMMO 的分离纯化主要分为细胞质膜的分离、pMMO 的解离以及 pMMO 的纯化这 3 个阶段. 细胞内膜的分离一般是通过机械法破碎细胞(如超声破碎、高压匀浆法)，超速离心分离膜组分. pMMO 的解离是指在表面活性剂(又称去垢剂)的作用下，将 pMMO 等膜蛋白包裹从细胞内膜中分离下来，再采用离心操作达到分离的目的. 对于 pMMO 的纯化操作多采用 FPLC 层析分离、离子交换柱层析以及凝胶过滤层析等手段. 对 pMMO 的分离纯化操作的核心在于细胞破碎方式、表面活性剂在浓度以及用量以及离心分离条件的控制、各种层析分离介质和洗脱液的选择等.

1.1 含 pMMO 细胞质膜的分离

pMMO 位于甲烷氧化菌的细胞质膜，嵌入脂质双分子层的内部[17]，与膜结合紧密，而甲烷氧化菌又是革兰氏阴性菌[18]，与其他革兰氏阳性菌相比，其细胞壁较为脆弱，因此需要采用专门的细胞破碎方法. 一是利用超声波的空穴作用将细胞破碎. 破碎时，超声波强度不宜太大，强度过高易引起蛋白的失活，而且破碎时细胞浓度不宜过高，一般控制在 20%左右，除此之外超声的频率、处理时间以及介质的离子强度、pH 等都会对破碎效果产生一定的影响. 此种方法细胞破碎的效果较为明显，适用于小规模的细胞菌悬液的处理，成本相对昂贵. 1977 年，Tonge 等[19]首次利用超声破碎细胞(150 W，4×45 s)，得到 *Methylosinus trichosporium*(OB3b)细胞破碎物，比活力为 0.22 μmol/min·mg(甲烷氧化反应表示). Masayuki Takeguchi 等[20]在超声破碎时，着重控制温度在 4 ℃且破碎环境密闭无氧，并发现适当的 Cu^{2+} 能够提高 *Methylosinus trichosporium*(OB3b)细胞破碎时 pMMO 活性，同时在破碎过程中适当补充 PMSF，也能够起到防止蛋白降解的作用；除超声外，也可以采用匀浆法，使细胞受到剪切力而破坏. 影响匀浆破碎的主要因素有压力、温度和通过匀浆阀的次数等. 一般通过高压匀浆的破碎率可达 67%，破碎率要达 90%至少将菌悬液通过匀浆法 2 次，但不能单纯追求高破碎率，最好是提高操作压力，减少操作次数. 此法一般用于大规模菌悬液的处理，且样品损失小，成本适中. 1989 年，Smith&Dalton 等[21]利用高压匀浆法，使 *Methylococcus capsulatus*(Bath)在 140 MPa 压力下匀浆破碎. Choi 等[15]利用高压匀浆法(18 000 Ib/in^2)在 4 ℃厌氧(95%氩气，5%氢气)条件下对 *Methylococcus capsulatus*(Bath)细胞进行破碎. Ashraf Kitmitto 等[22]采用连续破碎系统，4 ℃、25 MPa 连续破碎 3 次，分离得到的细胞质膜，以 5 mmol/L NADH 作还原剂，比活力为 230 nmol/min·mg(丙烯环氧化反应表示). Yu 等[16]在滤膜反应器的辅助作用下去除培养基组分收集菌体沉淀，高压匀浆(20 000 Ib/in^2)分离包浆与膜组分，超速离心收集膜组分，并考察了培养基中铜浓度与细胞内膜中 pMMO 含量及比活力之间的相互关系.

破碎后，沉降未破碎的细胞以及细胞碎片，超速离心或透析收集细胞内膜. 用中性 pH 缓冲溶液(含少量 NaCl 或 KCl)盐洗 1~3 次，除去细胞外膜、可溶性蛋白以及质蛋白等. Lieberman 等[23]用超声破碎法将 *Methylococcus capsulatus*(Bath)细胞裂解，超速离心收集膜组分. 选用含 NaCl 的 25 mmol/L Pipes 缓冲液反复重悬 3 次，终浓度为 10~20 mg/mL，并用液氮滴冻，-80 ℃储存. 膜水平下，四甲

基对苯二酚和 NADH 为最有效的还原剂，酶活为 19.4 nmol/min · mg(丙烯环氧化反应表示). 研究发现，盐洗细胞膜能够起到粗略去除外源金属离子以及未紧密结合的蛋白等.

Takeguchi 等[20]在 4 ℃无氧条件下利用超声破碎法对细胞进行破碎，缓冲液事先用纯净氮气脱气. 用含 KCl 的 MOPS 缓冲液盐洗膜沉淀，离心收集沉淀，即得到含有 pMMO 的细胞膜组分. 研究发现，EDTA、甲醇、硫脲、叠氮化物、乙炔等物质会抑制细胞质内膜上 pMMO 的活性；同时对反应条件进行考察，发现利用 55 mmol/L MOPS 缓冲液(pH=7)、45 ℃下反应，细胞内膜上 pMMO 活性效果最好.

细胞质内膜的存在为维持 pMMO 天然构象、催化活性以及稳定性提供了最佳环境，而且内膜上含有一系列电子传递链，虽然电子传递机制尚未明确，这使得含 pMMO 的膜组分成为除含 pMMO 完整细胞外酶活以及电子供体研究的最佳阶段.

1.2 pMMO 从细胞质膜中的解离

纯化中，无论是以改变 pMMO 天然构象或是阻断 pMMO 与其他蛋白、脂质之间相互作用的方式，将 pMMO 从磷脂双分子层的疏水环境中分离都会造成 pMMO 活性的丧失. 因此使用去垢剂解离是 pMMO 解离中使用次数最多、使用范围最广的一种. 去垢剂(detergent)又称表面活性剂，是一类同时具有亲水极性基团和疏水非极性基团的双极性分子[24-25]. 在去垢剂的作用下，细胞膜解体，pMMO 等膜蛋白释放，并在无膜状态下为 pMMO 等膜蛋白提供相对稳定的疏水环境，起到维持和保护蛋白结构和活性的作用.

去垢剂的选择较多，其中十二烷基 β-D-麦芽糖苷(dodecyl β-D-maltoside，DDM)是使用最广的一种，它是一种非离子型去垢剂，常用于膜研究中蛋白的抽提和溶解，但在其浓度及用量的选择上存在差异. Shiemke 等[26]按质量分数为 10%～20%的量向 10 mmol/L pH=7.0 的 Pipes 缓冲液中加入 DDM，并向膜组分的悬浮液中逐滴加入并搅拌，3 ℃下震荡 15～45 min. Piku BASU 等[27]按去垢剂/蛋白=1.5(W/W)的比例，向冰上的膜蛋白组分中持续搅拌逐滴滴加. 这一过程保留了原酶活的近 75%的活性. Choi 等[20]研究发现去垢剂较少 0.5～0.75(DDM/膜蛋白，mg/mg)或较多 2～3(DDM/膜蛋白，mg/mg)时，都会造成 pMMO 提取物的失活. 向纯化产物中额外添加 DDM，考察了去垢剂与金属离子含量之间的关系，研究发现每毫克膜蛋白中 DDM 含量为 0.1、0.2 mg 时，pMMO 活性及其金属离子含量仍保持不变；当 DDM 含量大于 0.3 mg 时，pMMO 丧失活性，每个 pMMO$\alpha\beta\gamma$ 亚基中 Cu 原子数大约为 2. 为降低去垢剂 DDM 对 pMMO 活性的抑制，Miyaji 等[28]向解离后的 pMMO 组分中加入吸附剂 BioBeads SM-2，除去溶解组分中过量的 DDM，并考察吸附时间对 pMMO 活性以及 DDM 含量的影响. Smith 等[21]将 DDM 解离并去除多余 DDM 后得到的 pMMO 储存在卵磷脂中. 除 DDW 外，Brij 58 和 Tween 20 也能解离 pMMO，解离中能够抑制蛋白聚沉，但由于其水油度(hydrophile lipophile balance，HLB)较高，与磷脂双分子层的亲和性较差，限制了它们在 pMMO 解离中的应用. 此外选择去垢剂时要注意，着重选择温和的两性去垢剂和非离子去垢剂，它不会破坏后续纯化(如离子交换)，但离子交换剂会破坏去垢剂与 pMMO 之间的库仑力，使纯化失效.

除使用去垢剂之外，XIN 等[29]研究发现，低 Cu^{2+}浓度条件下培养 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 时，pMMO 极易从细胞内膜中解离，因此并未使用去垢剂而是采用超声的方式使 pMMO 脱落. 膜水平状态下，以琥珀酸盐为还原剂时比活力最高，为 16.8 nmol/min · mg(丙烯环氧化反应表示).

1.3 pMMO 的纯化

对于解离后的 pMMO 等膜蛋白及其他组分，成分复杂，研究者多选用几步柱层析方法相结合的方式进行 pMMO 分离纯化，其中离子交换层析、凝胶过滤层析的使用最为广泛，依据分子间的相互作用、物质的大小以及性状等方面的差异将 pMMO 与其他杂蛋白进行分离，达到纯化的目的. 离子交换层析是 pMMO 纯化中常用的方法，它以离子交换剂为固定相，特定的含离子溶液为流动相，利用离子交换剂对分离物的各种离子结合力的差异，将混合流动相中不同离子进行分离，具有分辨率高、分离效果好的特点. 纯化时常采用阴离子交换剂，交换剂类型不同，交换容量以及蛋白质吸着容量也会存在差异，最常用的阴离子交换剂填料基质 DEAE，如 DEAE Sepharose CL-6B、DEAE Sepharose FF 等. Choi 等[30]选择用 5.0×7 cm DEAE Sepharose FF 将收集到的含 pMMO 的蛋白组分进行纯化，得到 NDH-pMMO 的混合物；经 2.6×20 cm DEAE Sepha-

rose FF 得到 pMMO，厌氧条件下超滤浓缩. 纯化后 NDH-pMMO 的混合物和 pMMO 的活性分别为 147±43 nmol/min · mg 和 134±36 nmol/min · mg. 辛嘉英等[31]等研究发现低 Cu^{2+} 浓度下 pMMO 极易从细胞内膜上解离，利用 DEAE-SepharoseCL-6B 离子交换层析柱对 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 细胞膜中 pMMO 和 NADH 脱氢酶进行了分离纯化，并对不同状态下 pMMO 利用的电子供体进行研究，并提出了 pMMO 可能的电子传递链.

除使用离子交换层析的方法外，多数 pMMO 纯化采用混合层析的方式，即离子交换层析和凝胶过滤层析相结合的方式. 凝胶过滤层析也叫凝胶排阻层析，是将样品混合物通过一定孔径的凝胶固定相使不同分子量的组分得以分离. 凝胶空隙的大小严格决定了其分离范围，较大的分子由于受到空间的阻碍作用未进入凝胶颗粒内部而沿凝胶空隙流出，停留时间短，因而最先被洗脱；小分子物质由于进入凝胶介质内部，停留时间较长. 此方法只需要一种缓冲溶液，且操作条件温和，凝胶介质为惰性载体，常用 Superdex、Sephacryl 等凝胶介质. 挪威学者 Piku 等[27]利用 FPLC 快速蛋白纯化系统对 pMMO 进行纯化. 解离后的 pMMO 超滤浓缩至 20 mg/mL，1.5 cm×68 cm Superdex 200 凝胶层析分离，流速 1.5 mL/min，酶活测定确定 pMMO 组分，分离得到含羟化酶(pMMOH)和还原酶(pMMOR)的 pMMO 复合物(pMMO^c)；经 DEAE-cellulose DE52 离子交换柱(1.5 cm×15 cm)分离得到羟化酶和还原酶. 利用四甲基对苯二酚作还原剂，对 pMMO^{c}及其个体组分(pMMOH、pMMOR)的丙烯环氧化反应进行研究，发现单独的 pMMOH 或 pMMOR 均没有 MMO 活性，这也就说明二者在催化丙烯环氧化反应中都是不可或缺的. 若将 pMMO^{c}中再次添加分离得到的 pMMOH 和 pMMOR，pMMO^{c}活性略有增加，但比活力仍保持不变(约为 28 nmol/min · mg). Kitmitto 等[22]在 Piku 的基础上对 pMMO 进行调整，选择 MonoQ-10 阴离子交换柱纯化得到 pMMO 复合物，Superdex 200 凝胶层析继续纯化，0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱得到 pMMO 羟化酶.

美国的科学家 Lieberman 等[23]使用柱层析的方法分离纯化了 M.capsulatus(Bath)中的 pMMO 组分. 纯化过程如下：事先用柱平衡液稀释的膜蛋白组分，Source 30Q 阴离子交换柱，NaCl 梯度洗提，Centriprep 50 超滤浓缩；Sephacryl S200 凝胶过滤层析，最后浓缩至 5~10 mg/mL. 实验证明，大部分杂蛋白以及脂质类物质都能通过 Source 30Q 除去，而小分子蛋白不能，因此采用 Sephacryl S200 凝胶过滤将其分离除去，纯化后的 pMMO 活性为 17.7 nmol/min · mg(四甲基对苯二酚为还原剂).

Miyaji 等[28]利用 POROS 20 HQ 对解离后的组分进行纯化后得到 4 个组分峰，四甲基对苯二酚存在下组分 1 具有 pMMO 活性，活性为 3.4 nmol/min · mg，与膜水平中酶活相比(3.8 nmol/min · mg)，四甲基对苯二酚存在下纯化后的 pMMO 保持了近 88%的酶活.

纯化时除考虑柱层析类型以及填料种类外也要在维持 pMMO 活性的基础上，考虑流速、洗脱液以及其他因素的影响：流速要视柱填料类型、颗粒大小以及洗脱液粘度等条件而定，填料的颗粒大，流速快，反之则慢；洗脱液的粘度大，流速就慢，反之则快，而且其他层析条件相同时，流速会受层析柱的长度与横截面积的影响；此外，在缓冲液选择时注意避免能与介质相互作用的缓冲盐类，避免因平衡破坏而使 pMMO 解吸，常用的洗脱液有 MOPS、PIPES 等，且缓冲液浓度一般控制在 10~50 mmol/L，pH 控制在 7~7.5，采用梯度洗脱的方式(一般是 NaCl 溶于稀缓冲溶液). 具体柱层析纯化 pMMO 的方法如表 1 所示.

2 pMMO 的活性

pMMO 能够氧化五碳以内的烷烃和烯烃，但不能同 sMMO 一样氧化环烃、芳香烃等物质[7]，因此多采用丙烯环氧化反应对 pMMO 酶活进行测定，酶活用 1 mg 干重细胞 1 min 产生环氧丙烷的纳摩尔数表示[24]，单位：nmol/min · mg，也有一部分人选择用甲烷氧化反应评价 pMMO 活性[32]. 环氧化反应中，需要辅酶 NADH 不断再生，因此在酶活测定中采用 NADH 或四甲基对苯二酚作为还原剂，以维持 pMMO 催化反应的持续进行. 整细胞以及膜水平条件下，以 NADH 或对苯二酚作还原剂，都可检测到 pMMO 活性；然而经 DDM 解离后，NADH 作还原剂几乎不能检测到 pMMO 活性，但对苯二酚可以. 研究发现，pMMO 的活性可能会受到以下几方面的影响.

2.1 培养基成分的影响

培养基中 Cu^{2+}浓度是决定 pMMO 活性的直接因素.Cu^{2+}浓度不仅能够作为切换 sMMO 与 pMMO

表 1 柱层析纯化 pMMO 的方法总结

Table 1 Summary on purification of pMMO by column chromatography

Type of methanotrophs	Column chromatography	Buffer	Activity (purified pMMO) /(nmol/min · mg)	Reductant	Reference
Methylococcus capsulatus Bath	Source 30Q and Sephacryl S200	50 mmol/L Hepes (pH 7.5) (include DDM、NaCl)	17.7	Duroquinol	[23]
Methylococcus capsulatus Bath	5.0×7 cm DEAE Sepharose FF and 2.6×20 cm DEAE Sepharose FF	30 mmol/L MOPS (pH 7.3) (include benzamidine、KCl、DDM)	134±36	Duroquinol+ NADH+NDH	[30]
Methylococcus capsulatus Bath	1.5 cm×68 cm Superdex 200	25 mmol/L Pipes (pH 7.25) (include DDM、benzamidine)	53	Duroquinol	[27]
Methylococcus capsulatus Bath	S-300HR	50 mmol/L PIPES (pH 7.2) (include NaCl、imidazole、ascorbate、DDM)	Not Shown	-	[16]
Methylosinus trichosporium OB3b	POROS 20 HQ	25 mmol/L MOPS (pH 7) (include KCl、Brij58)	3.4	Duroquinol	[28]
Methylosinus trichosporium IMV 3011	DEAE-Sepharose	PBS(include DTT)	6	quinol	[31]

表达的枢纽，更重要的是，它能够激发 pMMO 的高水平表达. 当培养基中 Cu^{2+} 浓度为 4 μmol/L 时，pMMO 开始表现出活性，并生成大量细胞质膜[30]. Masayuki 等[15]研究发现，M. trichosporiumOB3b 中 pMMO 需要一定的 Cu(Ⅱ)离子，但过量的 Cu(Ⅱ)离子会抑制 pMMO 的活性；同时金属离子、牛血清白蛋白(BSA)以及 PMSF 等都会对膜水平下 pMMO 的活性产生一定的影响. Choi 等[15]在对 *Methylococcus capsulatus* Bath 的研究中发现，当 NMS 培养基中 Cu^{2+} 浓度为 60 μmol/L 时，其膜水平 pMMO 的表达效果最高，可达 75~230 nmol min^{-1}(mg protein)$^{-1}$，而 mb-Cu 以及 Cu(Ⅱ)的添加更能提高 pMMO 的酶活；当培养基中 Cu^{2+} 浓度达 80 μmol/L 时，细胞中 Cu^{2+} 浓度几近饱和. 此外，pMMO 的高水平表达也需要一定量的 Fe^{3+}. 当培养基中 Fe^{3+} ∶ Cu^{2+} = 1 ∶ 2.5 时，无细胞状态下 pMMO 的活性较高[23]. 但也有学者研究发现，自然环境中铜含量很低时，仍能检测到大量 pMMO 的存在[33].

2.2 厌氧条件的影响

厌氧条件对 pMMO 活性也会产生一定的影响. 为维持 pMMO 的稳定性，大多数的 pMMO 分离纯化都选择在 4 ℃、无氧条件下进行的，而且研究发现，膜水平下高活性 pMMO 就是在厌氧条件下分离得到的[30]，其比活力为 290 nmol 环氧丙烷(mg protein · min)$^{-1}$. 但也有学者认为，pMMO 并不是氧敏感型蛋白[23]，厌氧条件对 pMMO 活性的影响并不大.

2.3 mb-Cu 对 pMMO 的作用

甲烷氧化菌素(methanobactin，mb)，是甲烷氧化菌分泌的一种能与 Cu 结合、分子量大小为 1218Da 的荧光小肽[34]，在甲烷氧化菌铜捕获体系中起着至关重要的作用，在食品添加剂[35]、食品安

全快速检测[36]、生物催化等[37]方面具有广泛的应用前景. 溶液中的 mb 是一种动态的小分子，与 Cu(Ⅱ)离子结合(如图 1 所示). 当甲烷氧化菌在限铜条件下培养时，mb会以分泌物的形式排放到

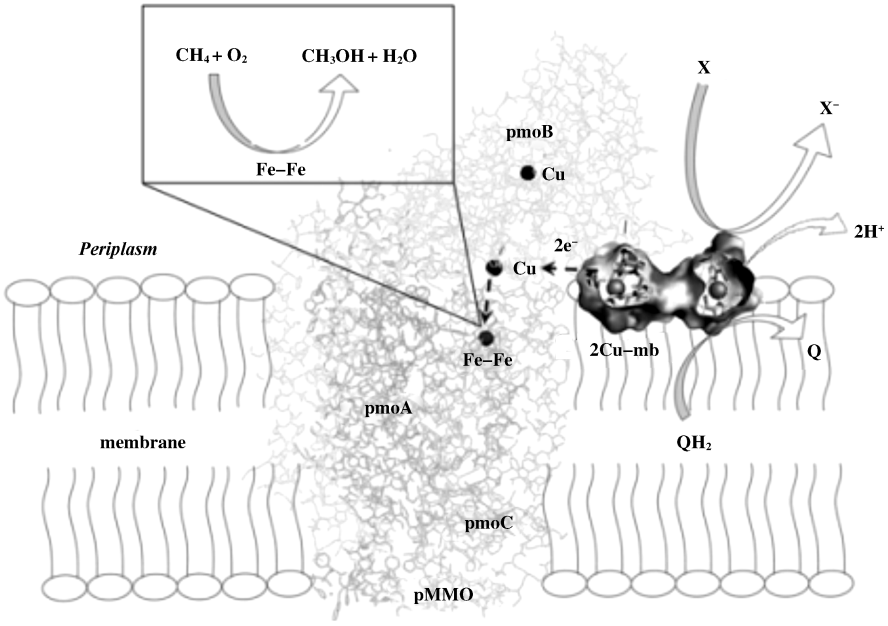


图 1 mb-Cu 与 pMMO 的结构关系图[26]

Fig.1 Structural relationship between mb-Cu and pMMO[26]

细胞外，若培养基中 Cu^{2+}浓度达到一定时，mb 就会与铜结合以 mb-Cu 的形式构成 pMMO 的结构组分存在于细胞膜中[38]，若将其从 pMMO 中分离，会造成 pMMO 的不可逆性失活[39]. 研究发现，从 *Methylococcus capsulatus* Bath、*Methylomicrobium album* BG8 以及 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中分离得到的 mb-Cu 都是具有氧化还原活性的分子，具有自由基清除剂的作用，表现出氧化酶(Oxidase)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD)以及过氧化氢还原酶(hydrogen peroxide)活性，其表现出的 SOD 活性在无细胞水平下能够起到保护 pMMO、防止氧化对其造成损伤的作用[39].

mb-Cu 能够提高电子流向 pMMO 的速率，对 pMMO 活性存在着一定的影响[30]. 有的学者认为无细胞状态下，NADH 作为还原剂，电子传递过程如下：NADH→mb-Cu→Cu-pMMO-H→Fe-Fe-pMMO-H，其中 Cu-pMMO-H 为 pMMO 羟化酶的 Cu(Ⅱ)金属活性中心，Fe-Fe-pMMO-H 为 pMMO 羟化酶的双核铁活性中心[20].

Choi 等[15]研究发现，*Methylococcus capsulatus* Bath 中或 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中分离纯化得到的 mb 均能提高完整 *Methylococcus capsulatus* Bath 细胞水平或膜水平状态下甲烷氧化速率；若向 pMMO 酶活为 290 nmol/min · mg(环氧丙烷)的细胞膜组分中加入 mb-Cu，其酶活显著增加(400 nmol/min · mg)，约为完整细胞酶活的 50%~75%. EPR 光谱表明，mb-Cu 能够提高电子流向 pMMO 的速率. 但 mb-Cu(*Methylosinus trichosporium* OB3b)对 pMMO(*Methylosinus trichosporium* OB3b)以及 mb-Cu(*Methylococcus capsulatus* Bath)对 pMMO(*Methylococcus capsulatus* Bath)的影响并没有报道，有待进一步研究.

2.4 其他物质

纯化过程中，电子传递链中涉及的与 pMMO 相关的细胞色素、脱氢酶等物质的破碎都会造成 pMMO 的失活. 研究发现，这些物质可能与 pMMO 构成一种活性中心复合物[23]. 同时，解离后、纯化后 pMMO 的不规则折叠都会影响 pMMO 的活性. 此外，Chen 等[40]在 *Methylococcus capsulatus* Bath 菌中发现一种非血红素铁蛋白(bacteriohemerythrin，McHr)，并认为它能够作为分子氧的载体携带分子氧到达细胞膜的微环境中参与环氧化反应的进行，

在膜水平条件下具有显著提高 pMMO 催化丙烯环氧化的能力.

3 结论及展望

pMMO 的纯化过程较为复杂, 大部分研究都采用两种或两种以上的操作步骤, 包括细胞破碎、超滤、表面活性剂解离、离子交换层析、凝胶过滤层析等. 此外, 其活性可能受到很多因素条件的限制, 如 Cu^{2+}和 Fe^{3+}浓度、厌氧条件、折叠方式等. 只有获得活性较高、稳定性较好的 pMMO, 才能更深入的了解 pMMO 的催化机理、生化性质以及金属活性中心, 才能更好的应用于环境保护、生物催化等各个领域.

参考文献:

[1] Deng Yong-cui(邓永翠), Che Rong-xiao(车荣晓), Wu Yi-bo(吴伊波), *et al.* A review of the physiological and ecological characteristics of methanotrophs and methanotrophic community diversity in the natural wetlands(好氧甲烷氧化菌生理生态特征及其在自然湿地中的群落多样性研究进展)[J]. *J Acta Ecologica Sin(China)*(生态学报), 2015, **35**(14): 4579-4591.

[2] Huang Meng-qing(黄梦青), Zhang Jin-feng(张金凤), YangYu-sheng(杨玉盛), *et al.* Advance in research method of soilmethanotrophs diversity(土壤甲烷氧化菌多样性研究方法进展)[J]. *J Sub Res Environ(China)*(亚热带资源与环境学报), 2013, **8**(2): 41-48.

[3] Zheng Yong(郑 勇), Zheng Yuan-ming(郑袁明), He Ji-zheng(贺纪正). Response of methanotrophic community structure and oxidation potential to cadmium stress in a Chinese paddy soil(水稻土甲烷氧化菌对镉胁迫的响应)[J]. *J Ecol Environ Sci(China)*(生态环境学报), 2012, **1**(4): 737-743.

[4] Rosenzweig A C. The metal centres of particulate methane mono-oxygenase[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, **36**(6): 1134-1137.

[5] Wu Jun-hua(吴军华). Current research on methanotrophs and methane monooxygenase(甲烷氧化菌及甲烷单加氧酶的研究进展)[J]. *J Chin Brew(China)*(中国酿造), 2011, **234**(9): 11-14.

[6] Sirajuddin S, Rosenzweig A C. Enzymatic oxidation of methane[J]. *Biochem*, 2015, **54**(14): 2283-2294.

[7] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria.[J]. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(2): 439-471.

[8] Hakemian Amanda S, Rosenzweig Amy C. The biochemistry of methane oxidation[J]. *Ann Rev Biochem*, 2007, **76**(1): 223-241.

[9] Blanchette C D, Knipe J M, Stolaroff J K, *et al.* Printable enzyme-embedded materials for methane to methanol conversion[J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 1-9.

[10] Lontoh S, Dispirito A A, Semrau J D. Dichloromethane and trichloroethylene inhibition of methane oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase of Methylosinus trichosporium OB3b [J]. *Arch Micro*, 1999, **171**(5): 301-308.

[11] Tsien H C, Brusseau G A, Hanson R S, *et al.* Biodegradation of trichloroethylene by Methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Appl & Environ Micro*, 1989, **55**(12): 3155-3161.

[12] Zhang S, Karthikeyan R, Fernando S D. Low-temperature biological activation of methane: structure, function and molecular interactions of soluble and particulate methane monooxygenases[J]. *Rev Environ Sci & Biotechnol*, 2017, **16**(4): 1-13.

[13] Antholine W E, Dispirito A A. Membrane-associated methane monooygenase from type X and type I methanotrophs[J]. *Off Sci & Techni Infor Techni Rep*, 2009, **102**(8): 1571-1580.

[14] Su Yao(苏 瑶), KongJiao-yan(孔娇艳), Zhang Xuan(张 萱). Copper in methane oxidation: A review.(甲烷氧化过程中铜的作用研究进展)[J]. *J Appl Ecolo(China)*(应用生态学报), 2014, **4**(5): 1221-1230.

[15] Choi D W, Antholine W E, Do Y A, *et al.* Effect of methanobactin on the activity and electron paramagnetic resonance spectra of the membrane-associated methane monooxygenase in Methylococcus capsulatus Bath [J]. *Microbiol*, 2005, **151**: 3417-3426.

[16] Yu S S, Chen K H, Tseng M Y, *et al.* Production of high-quality particulate methane monooxygenase in high yields from methylococcus capsulatus (Bath) with a hollow-fiber membrane bioreactor[J]. *J Bacter*, 2003, **185**(20): 5915-5924.

[17] Chan Sunny I, Chen Kelvin H, Yu Steve S, *et al.* Toward delineating the structure and function of the particulate methane monooxygenase from methanotrophic bacteria[J]. *Biochem*, 2004, **43**(15): 4421-4430.

[18] Wei Cong(魏 聪), Liu Guo-ren(刘国生). Separation and identification of methanotrophs and study on its physiological characteristics(甲烷氧化菌的筛选与生理特性研究)[J]. *J Anhui Agricul Sci(China)*(安徽农业科学), 2013, **2013**(7): 2832-2832.

[19] Tonge G M, Harrison D E, Higgins I J. Purification and properties of the methane mono-oxygenase enzyme system

from Methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Biochem J*, 1977, **161**(2): 333-344.

[20] Takeguchi M, Miyakawa K, Okura I. Purification and properties of particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium, OB3b[J]. *Mol Catal Chem*, 1998, **132**(2): 145-153.

[21] Smith D D S, Dalton H. Solubilisation of methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus, (Bath)[J]. *Eur J Biochem*, 2010, **182**(3): 667-671.

[22] Ashraf Kitmitto, Natalia Myronova, Piku Basu, *et al.* Characterization and structural analysis of an active particulate methane monooxygenase trimer from methylococcus capsulatus (Bath)[J]. *Biochem*, 2005, **44**(33): 10954-10965.

[23] Lieberman R L, Rosenzweig A C. Biological methane oxidation: Regulation, biochemistry, and activie site structure of particulate methane monooxygenase[J]. *Biochem Mol Biology*, 2004, **39**: 147-164.

[24] Eriks L R, Mayor J A, Kaplan R S. A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins[J]. *Analy Biochem*, 2003, **323**(2): 234-241.

[25] Shi C W, Shao W, Xiong Y, *et al.* A gas chromatographic method for quantification of detergents frequently used in membrane protein structural studies[J]. *Analy Biochem*, 2008, **383**(2): 326-328.

[26] Shiemke A K, Cook S A, Miley T, *et al.* Detergent solubilization of membrane-bound methane monooxygenase requires plastoquinol analogs as electron donors[J]. *Arch Biochem & Biophys*, 1995, **321**(2): 421-428.

[27] Piku Basu, Bettina Katterle, K Kristoffer Andersson, *et al.* The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) is a copper/iron protein[J]. *J Biochem Soc*, 2003, **8**(2): 417-427.

[28] Miyaji A, Kamachi T, Okura I. Improvement of the purification method for retaining the activity of the particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**(22): 1883-1887.

[29] Xin Jia-ying(辛嘉英), Cui Jun-ru(崔俊儒), Hu Xiao-xue(胡霄雪). Study on the electron donors for particulate monooxygenase(颗粒性甲烷单加氧酶的电子供体研究)[J]. *J Mol Catal(China)*(分子催化), 2002, **16**(3): 161-165.

[30] Choi D W, Kunz R C, Boyd E S, *et al.* The membrane-associated methane monooxygenase(pMMO) and pMMO-NADH: Quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* Bath[J]. *J Bacter*, 2003, **6**(10): 5755-5764.

[31] Xin J Y, Cui J R, Hu X X, *et al.* Particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium is a copper-containing enzyme[J]. *Biochem & Biophys Res Commun*, 2002, **295**(1): 182-186.

[32] Culpepper M A, Rd C G, Gunderson W A, *et al.* Identification of the valence and coordination environmentof the particulate methane monooxygenase copper centers by advanced EPR characterization[J]. *J Amer Chem Soc*, 2014, **136**(33): 11767-11775.

[33] Semrau J D, Dispirito A A, Yoon S. Methanotrophs and copper[J]. *Fems Microbiol Rev*, 2010, **34**(4): 496-531.

[34] Choi D W, Semrau J D, Antholine W E, *et al.* Oxidase, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide reductase activities of methanobactin from types I and II methanotrophs[J]. *J Inorg Biochem*, 2008, **102**(8): 1571-1580.

[35] Xing Hai-li(邢海丽), Xin Jia-ying(辛嘉英), Wang Yan(王 艳), *et al.* Optimization of combinations of methanobactin, sodium benzoate and potassium sorbate for enhanced antibacterial effect by response surface methodology(响应面优化甲烷氧化菌素、苯甲酸钠和山梨酸钾复配剂抑菌效果)[J]. *Food Sci(China)*(食品科学), 2016, **37**(18): 1-5.

[36] ChenLin-lin(陈林林), Zhang Wei(张 伟), Wang Zhen-xing(王振兴), *et al.* Determination of superoxide dismutase activity in methanobactin-copper complexes by pyrogallol autoxidation(邻苯三酚自氧化法测定甲烷氧化菌素一铜配合物的超氧化物歧化酶活性)[J]. *J Food Saf & Qual(China)*(食品安全质量检测学报), 2017, **8**(9): 3438-3444.

[37] Xin J, Lin K, Wang Y, *et al.* Improved biological synthesis of gold nanoparticles using methanobactin[J]. *J Korean Soc Appl Biolo Chem*, 2015, **58**(3): 1-9.

[38] Xin Jia-ying(辛嘉英), Yan Ming-fei(阎明飞), Zhou Jie-qiong(周琦琼), *et al.* Copper capture mechanism of methanotrophs.(甲烷氧化细菌的铜捕获机理)[J]. *J Mol Catal(China)*(分子催化), 2009, **23**(5): 470-476.

[39] Pesch M L, Christl I, Barmettler K, *et al.* Isolation and purification of Cu-free methanobactin from Methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Geochem Trans*, 2011, **12**(1): 2-9.

[40] Chen K H, Wu H H, Ke S F, *et al.* Bacteriohemerythrin bolsters the activity of the particulate methane monooxygenase (pMMO) in Methylococcus capsulatus (Bath)[J]. *J Inorg Biochem*, 2012, **111**(6): 10-17.

Progress on Isolation and Purification of Particulate Methane Monooxygenase

LIN Hui-ying[1], XIN Jia-ying[1,2*], LI Chun-yu[1], SUN Li-rui[1], XIA Chun-gu[2]

(1. *Key Laboratory for Food Science and Engineering*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076, *China*;
2. *State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation*, *Lanzhou Institute of Chemical Physics*, *Chinese Academy of Sciences*, *Lanzhou* 730000, *China*)

Abstract: Particulate methane monooxygenase (pMMO) is one of the main enzyme in methanotrophic bacteria, which has broad application prospect in biocatalysis. However, due to its characteristic of membrane protein and instability in purification procedures , there are many controversies in its biological and chemical properties and metal active sites. Purification methods of particulate methane monooxygenase were summarized. Besides, its activity and the relationship with methanobactin-Cu were introduced to improve the comprehensive research and application of particulate methane monooxygenase.

Key words: particulate methane monooxygenase; isolation and purification; activity; methanobactin

《分子催化》简介

《分子催化》是由中国科学院兰州化学物理研究所主办、中国科学院主管、科学出版社出版的向国内外公开发行的学术性刊物. 主要报道有关分子催化方面最新进展与研究成果. 辟有学术论文、研究简报、研究快报及综合述评等栏目. 内容侧重于配位催化、酶催化、光助催化、催化过程中的立体化学问题、催化反应机理与动力学、催化剂表面态的研究及量子化学在催化学科中的应用等. 工业催化过程中的均相催化剂、固载化学的均相催化剂、固载化的酶催化剂等活化、失活和再生; 用于新催化过程的催化剂的优选与表征等方面的内容, 本刊亦有报道. 读者对象主要是科研单位及工矿企业中从事催化工作的科技人员、研究生、高等院校化学系和化工系的师生.

《分子催化》已被美国化学文摘(CA)、俄罗斯化学文摘、中国科学引文数据库、中国化学文献数据库、中国学术期刊文摘、中国化工文摘等国内外文献数据库收录.《分子催化》现为《中文核心期刊要目总览》的中国核心期刊和中国科技核心期刊. 曾荣获中科院和甘肃省科委“优秀期刊三等奖”和“优秀科技期刊”奖.

《分子催化》为双月刊, 每逢双月末出版, 大 16 开本, 约 16 万字, 每册定价 30.00 元. 中国标准刊号: ISSN 1001-3555/CN 62-1039/O6.

欢迎订阅, 欢迎来稿.