

周玉珍,汪伟,金皓,等. 能量耦合存在于产甲烷菌甲基辅酶 M 还原酶 MCR 活化过程[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):329-333.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.082

# 能量耦合存在于产甲烷菌甲基辅酶 M 还原酶 MCR 活化过程

周玉珍,汪伟,金皓,姚萍,徐建明

(淮阴师范学院/江苏省环洪泽湖生态农业技术重点实验室,江苏淮安 223300)

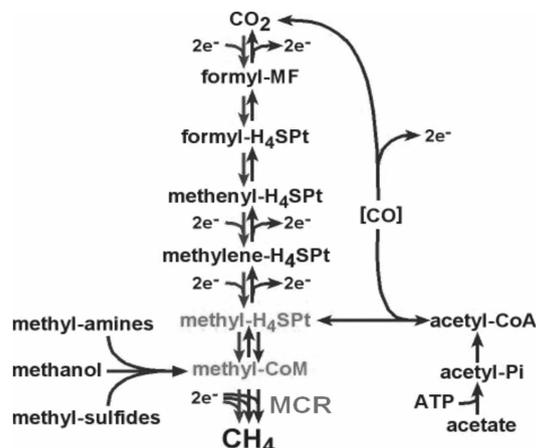
**摘要:**产甲烷菌中甲基辅酶 R 还原酶(MCR)催化甲烷合成途径中的最后一步,也是甲烷合成途径中速率限制的一步。MCR 的活化中心有一必须的辅酶 F430。有活性的 MCR 酶的辅酶 F430 活性中心的镍处于 +1 价态。快速有效地活化 MCR 对于阐明 MCR 的催化机理和人为控制天然甲烷的合成起到相当重要的作用。然而 MCR 的活化相当困难,因为辅酶 F430 的 Ni( I)的氧化还原电势极低( $< -600$  mV),很容易被氧化而失活。目前为止,人们还没有找到体外活化 MCR 的有效方法,但发现  $H_2$  和 CO 可以在体内活化 MCR,虽然其活化机理还是一个迷。研究发现,在培养基中添加钨和硒可以提高  $H_2$  活化 MCR 速度 8 倍和  $H_2$  活化 MCR 的效率约 65%;添加 fumarate 和  $CH_3 - SCoM$  使  $H_2$  能够在体外活化 MCR(为体内 MCR 活化程度的 30% ~ 40%),让 CO 体外活化的 MCR 更稳定。这都说明  $H_2$  和 CO 活化 MCR 的过程中存在能量耦合反应,正是这种能量耦合反应使得氧化还原电势较高的  $H_2$  ( $-420$  mV) 和 CO ( $-520$  mV) 能还原氧化还原电势较低的 MCR 的活性中心 F430 ( $< -600$  mV)。

**关键词:**能量耦合;MCR;活化;产甲烷菌

**中图分类号:** S188+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0329-04

产甲烷菌转化厌氧发酵的产品(如氢气、二氧化碳、甲醇、甲酸和乙酸)为甲烷<sup>[1-2]</sup>,同时除去生物氧化代谢过程中形成的氢气( $H_2$ ),从而促进复杂的有机化合物(如木质素,纤维素等)的降解。因此产甲烷菌在碳循环中发挥着关键的作用<sup>[3]</sup>。甲烷生成途径非常复杂,大多数的步骤涉及很多产甲烷菌新颖独特的辅因子<sup>[4-6]</sup>。产甲烷菌可以转化各种一碳化合物为甲烷,底物不同,所用的甲烷生成途径也不同(图1)。这3种途径只有最后一步催化反应共享,该反应由甲基辅酶 R 还原酶(MCR)催化。由于 MCR 在产甲烷菌 *Methanothermobacter marburgensis* 细胞内表达量很高(约占细胞总蛋白量的 10%),MCR 是第 1 个被纯化的明确显示参与甲烷生产途径的酶<sup>[7-9]</sup>。它催化甲烷生成途径中的最后一步,同时也是甲烷生成途径中速率限制的一步。因此研究 MCR 的机理是研究产甲烷菌来人为抑制或加快其甲烷生成途径的最有效方法。

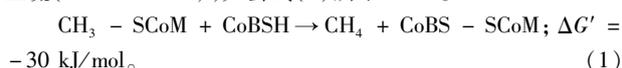
MCR 是一种含镍的酶,它的催化作用需要产甲烷菌独有的辅酶 F430(镍四吡咯)。MCR 将甲基辅酶 M( $CH_3 - SCoM$ )、辅酶 B(CoBSH)转化为甲烷( $CH_4$ )和辅酶 M 与辅酶 B 的杂



[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Black\\_Sea](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Black_Sea)

图1 产甲烷菌的 3 种甲烷生成途径

二硫( $CoBS - SCoM$ ),如公式(1)所示<sup>[10-11]</sup>。



MCR 的辅酶 F430 有很低的氧化还原电势( $< -600$  mV),而其活性状态是还原状态(镍为 +1 价),细胞的培养液中只能加入氧化态的镍(+2 价),因此在体内肯定存在二价镍还原的过程,即 MCR 的活化过程。如果没有添加还原剂和辅酶 HSCoM,以及对细胞进行特殊的处理,裂解细胞将导致 99% 以上的 MCR 失去活性<sup>[12]</sup>。由于不能得到活性蛋白将无法研究其催化机理,因此研究 MCR 活化机理是研究其催化机理的首要条件。

研究显示在细胞悬浮液中加入 MCR 的一个底物  $CH_3 -$

收稿日期:2017-07-28

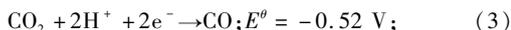
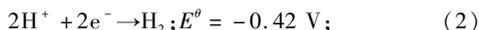
基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(编号: BK20131213);江苏省淮安市科技计划(编号: HG201307);江苏省生物质与酶技术重点实验室项目(编号: JSBEET1303)。

作者简介:周玉珍(1977—),女,湖北武汉人,博士,副教授,主要从事微生物代谢相关酶的酶活机理及其表达调控研究。E-mail: zyz@hytc.edu.cn。

通信作者:徐建明,硕士,研究员,主要植物生理生化方面的研究。

E-mail: xjm@hytc.edu.cn。

SCoM(或 HSCoM)和柠檬酸钛(Ⅲ)(Ti(Ⅲ)citrate,氧化还原电势约 $-700\text{ mV}$ ),并在破碎细胞前对悬浮细胞进行通 $\text{H}_2$ 处理可以活化 MCR<sup>[13]</sup>。 $\text{H}_2/\text{H}^+$ 的氧化还原电势( $E^\theta$ )约为 $-420\text{ mV}$ ,这个电势远远高于 MCR 辅助因子的氧化还原电势( $< -600\text{ mV}$ )<sup>[9]</sup>。氢气是如何活化 MCR 的,至今还是一个谜。由于 $\text{CO}/\text{CO}_2$ 的氧化还原电势( $-520\text{ mV}$ )比 $\text{H}_2/\text{H}^+$ 低,CO 能更快、更有效地还原 MCR,而且其重复性好<sup>[9]</sup>。一般来说,由于 $\text{H}_2/\text{H}^+$ ( $-420\text{ mV}$ )和 $\text{CO}/\text{CO}_2$ 的氧化还原电势( $-520\text{ mV}$ )均高于 MCR 的辅酶 F430 的氧化还原电势( $< -600\text{ mV}$ ),CO 和 $\text{H}_2$ 是不可能还原 MCR 的。



在 1988 年, Bobik 和 Wolfe 发现甲烷菌可以利用 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2$ 合成甲烷,细胞破碎液不能利用 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2$ 合成甲烷,然而在细胞破碎液里添加 CoMS - SCoB 就可以利用 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2$ 合成甲烷,并称这种现象为 RPG 效应<sup>[14]</sup>。后来他们发现在细胞破碎液里添加 $\text{CH}_3 - \text{SCoM}$ 、富马酸盐(fumarate)、丝氨酸也可以使细胞破碎液利用 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2$ 合成甲烷<sup>[15-17]</sup>。在 2008 年, Thauer 等首次提出用生物体内生物能量耦合现象来解释这个谜<sup>[18]</sup>。这种能量耦合利用放能过程来推动吸能过程。随后 Kaster 等和 Costa 等先后证实了这种能量耦合存在于这种远古的产甲烷菌中,并推测生命的起源可能就是利用能量耦合而出现的<sup>[19-20]</sup>。Kaster 等发现了在产甲烷菌中 MvhADG/HdrABC 复合物能耦合 $\text{H}_2$ 还原铁氧化还原蛋白 Fd(氧化还原电势为 $-450 \sim -500\text{ mV}$ )的吸能反应和 $\text{H}_2$ 还原 CoBS - SCoM 的放能反应<sup>[19]</sup>。

由于 MCR 的辅酶 F430 氧化还原电势极低( $< -600\text{ mV}$ ), $\text{H}_2$ 和 CO 是如何还原 MCR 的,这里笔者猜测 $\text{H}_2$ 和 CO 还原 MCR 的过程中也存在上述能量耦合反应。本研究从几个方面证实了这一猜想。

## 1 材料与方 法

### 1.1 生化试剂、混合气体和产甲烷菌的生长

所有的缓冲溶液、培养基和试剂都订购于阿拉丁试剂(上海)有限公司,除非额外说明,均买分析纯及以上的纯度。溶液都采用超纯水配制。液氮、 $\text{N}_2$ (99.98%)、CO(99.99%)、 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ (80%和20%)和超高纯 $\text{H}_2$ (99.999%)购于江苏淮安瑞丰气体有限公司。还原剂柠檬酸钛(Ⅲ)是通过在30%(质量百分比)的 $\text{TiCl}_3$ 溶液里添加柠檬酸钠,并将 pH 值调至 7.0 配制而成<sup>[8]</sup>。柠檬酸钛(Ⅲ)的浓度通过甲基紫精滴定测量<sup>[8]</sup>。产甲烷菌 *Methanothermobacter marburgensis*(原称 *M. thermoautophicum* strain Marburg)来自美国密西根大学 Stephen W. Ragsdale 实验室。产甲烷菌 *M. marburgensis* 的培养基按照以前的配方配制<sup>[8]</sup>,需要时在培养基中添加不同浓度的钨酸钠和硒酸钠来调节培养基中钨和硒的浓度。产甲烷菌培养于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 、10 L 发酵罐中,并用 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ (80%/20%)作为还原剂和碳源。

### 1.2 体内活化 MCR

所有溶液都是在严格厌氧条件下(氧气 $< 1\text{ mg/L}$ )的无

氧操作台里配制,并在无氧操作台内存存 7 d 以上才使用。厌氧操作台的厌氧通过维持约 $9.0\text{ kPa}$ 的氮气来实现。*M. thermoautotrophics* 按照之前发表文章的方法用 $\text{H}_2/\text{CO}_2$ 培养<sup>[7]</sup>。在回收细胞之前,在发酵罐通 $\text{H}_2$  30 min 以活化 MCR。然后,在无氧条件下离心回收细胞,并将细胞转移到无氧操作台。在无氧操作台内将细胞重悬于 $50\text{ mmol/L}$  Tris, pH 值为 7.6,加入 $10\text{ mmol/L}$  HSCoM、 $0.1\text{ mmol/L}$  柠檬酸钛(Ⅲ),并分装到 $150\text{ mL}$ 的无氧血清瓶中<sup>[7,21]</sup>。用 CO 或 $\text{H}_2$ 体内活化 MCR 时,在重悬细胞分装好后,立即在其顶部橡皮封口上通过针头给血清瓶顶部空间通气(CO 或 $\text{H}_2$ )10 min。为了使溶液中的气体平衡,通气过程中每 2 min 摇动血清瓶几下。通气结束后保存血清瓶内约 $10.3\text{ kPa}$ 的气压。随后每次取样之前也进行同样的通气操作。每次通气结束后,血清瓶倒置于无氧操作台内的 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅内以减少气体流失<sup>[8]</sup>。通 $\text{H}_2$ 是在无氧操作台内完成的;出于安全考虑,通 CO 是在无氧操作台外的通风橱里完成的。为了监测 MCR 是否被活化及其活化的程度,于不同时间在无氧操作台内从血清瓶内取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 样品于 EPR 试管中,并在无氧操作台内用液氮迅速冷冻样品后才移到无氧操作台外的液氮罐中保存以备后续电子顺磁共振谱(EPR 谱分析, EPR spectroscopy)检测。

用甲酸盐(formate)体内活化 MCR 时,采用上述相同的步骤,只是在细胞重悬液中添加不同浓度的 formate(formate 的添加并没有改变缓冲液的 pH 值)来取代上述通气。

### 1.3 体外活化 MCR

在体外活化 MCR 时,使用上述方法培养、回收和在无氧操作台内重悬细胞,并用 JY92 - 2D 超声波细胞破碎机冰浴破碎细胞。设置超声功率为 $220\text{ W}$ ,超声总时间为 $10\text{ min}$ ,每次辐射时间为 $10\text{ s}$ ,间隔时间为 $30\text{ s}$ 。细胞破碎完毕的混合液用作细胞破碎液。细胞破碎液在无氧操作台内用离心机在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $35\text{ }000\text{ g}$ 离心 $30\text{ min}$ 后,取上清液。用 $\text{H}_2$ 或 CO 在体外(细胞破碎液或上清液)活化 MCR 的操作步骤和上述体内活化 MCR 相同。在检测 fumarate 和 $\text{CH}_3 - \text{SCoM}$ 对 $\text{H}_2$ 和 CO 体外活化 MCR 的作用时,在细胞破碎液或上清中直接加入 fumarate 和 $\text{CH}_3 - \text{SCoM}$ 到所需浓度。

### 1.4 甲酸脱氢酶的酶活性测定和 MCR 的 EPR 波谱分析

甲酸脱氢酶的酶活性测定和 MCR 的 EPR 波谱分析是严格按照参考文献[9]完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 金属离子钨和硒能提高氢气活化 MCR 的效果

MCR 的活化最初是通过在细胞重悬液中通 $\text{H}_2$ 而实现的<sup>[22]</sup>。2013 年,笔者研究发现,CO 由于具有更低的氧化还原电势,能够更有效地活化 MCR;然而 $\text{CO}_2/\text{COOH}$ 有着与 $2\text{H}^+/\text{H}_2$ 相似的氧化还原电势却不能活化 MCR<sup>[9]</sup>。在甲烷 2 种形式的甲酸脱氢酶中,一种以钨为活性中心,一种以钨为活性中心,2 种甲酸脱氢酶都有硒代半胱氨酸作为金属活性中的一个配体。然而 2013 年笔者在甲酸钠活化 MCR 时,培养甲烷菌的培养基里没有添加钨和硒<sup>[9]</sup>,本研究检测发现添加钨和硒能使甲酸活化 MCR。

为了检测在培养基中添加钨和硒能否提高甲酸脱氢酶的活性,从而使甲酸能够活化 MCR,在培养基中分别添加 $0.1$ 、

0.3、0.6、0.9、1.1、1.5、2.0、4.0、6.0  $\mu\text{mol/L}$  的钨和硒,回收细胞之后,通过在细胞重悬液中添加 0.1 mol/L 或 0.5 mol/L 的甲酸钠来活化 MCR。试验结果显示 30 h 内 0.1 mol/L 或 0.5 mol/L 的甲酸盐并不能活化 MCR(添加 0.6  $\mu\text{mol/L}$  钨和 1.1  $\mu\text{mol/L}$  硒的试验数据)(图 2)。本研究检测添加钨和硒后甲酸还原酶的活性发现,在培养基中添加不同浓度的钨和硒并没有提高甲酸还原酶的活性<sup>[9]</sup>。当用  $\text{NADP}^+$  和甲基紫精(MV)作为电子受体时,甲酸还原酶的活性还是分别为 3~4、2~3 mU/mg。 $\text{CO}_2/\text{COOH}$  与  $2\text{H}^+/\text{H}_2$  虽然有相似的氧化还原电势,但是 *M. marburgensis* 体内氢化酶的活性是甲酸还原酶的 20 000 倍<sup>[9]</sup>。因此甲酸不能活化 MCR 很有可能是由于 *M. marburgensis* 体内甲酸还原酶的活性太低。

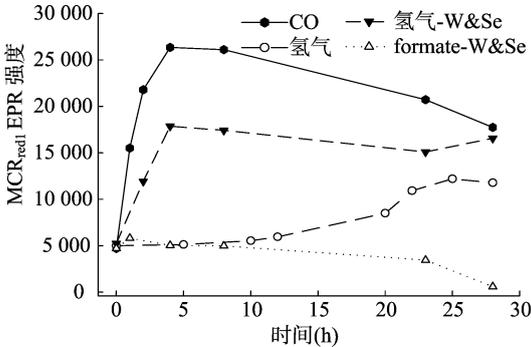


图2 H<sub>2</sub>、CO 和甲酸盐(formate)体内活化 MCR

研究发现,添加钨和硒虽然不能使甲酸盐活化 MCR,却能提高 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的效果约 65%,加快 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的速度 8 倍(72 min 和 8 min),并且使得 H<sub>2</sub> 活化 MCR 没有了滞后期。钨和硒能如此有效地提高 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的效果确实令人惊讶。然而 Thauer 等发现,甲烷合成途径中由甲酰基甲基咪唑脱氢酶催化的 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 合成甲酰基甲基咪唑的吸能反应和由异二硫还原酶催化的异二硫 CoMS-S-CoB 和 H<sub>2</sub> 合成 SHCoM 和 CoBSH 的放能反应通过能量耦合完成(图 3)<sup>[18]</sup>。由于甲酰基甲基咪唑脱氢酶在甲烷菌种也有 2 种形式的酶,分别以钼和硒或钨和硒为活化中心(图 4)。因此添加钨和硒很有可能大大提高了甲酰基甲基咪唑脱氢酶(催化甲烷合成途径的第 1 步反应)的活性,从而加快了以氢化酶

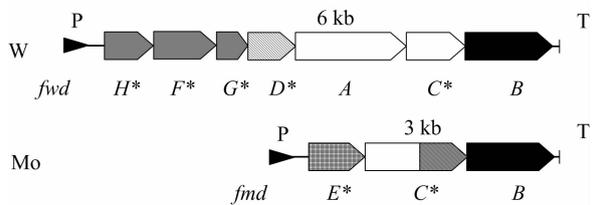


图4 含钨或钼的 2 种甲酰基甲基咪唑脱氢酶示意

为媒介的由甲酰基甲基咪唑脱氢酶催化的吸能反应和由异二硫还原酶催化的放能反应之间的能量耦合反应,证实了能量耦合反应存在于 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的吸能过程中。

在 *M. marburgensis* 的细胞破碎液中添加 CH<sub>3</sub>-SCoM、CoBS-S-CoM 使得其细胞可缓慢利用 CO<sub>2</sub> 合成甲烷<sup>[15,17]</sup>。这一现象被称为 RPG 效应,其本质是 CH<sub>3</sub>-SCoM、CoBS-S-CoM 的加入使得甲酰基甲基咪唑脱氢酶催化的吸能反应和由异二硫还原酶催化的放能反应之间的能量耦合反应成为可能<sup>[14]</sup>。后来发现在 *M. marburgensis* 的细胞破碎液中添加 fumarate 和丝氨酸(serine)也可以使细胞缓慢地利用 CO<sub>2</sub> 合成甲烷,而且证实这也是能量耦合反应的结果<sup>[15]</sup>。Kaster 等发现甲烷合成途径中由甲酰基甲基咪唑脱氢酶催化的 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 合成甲基咪唑和水的吸能反应和由异二硫还原酶催化的异二硫 CoMS-S-CoB 和 H<sub>2</sub> 合成 CoMSH 和 CoBSH 的放能反应通过能量耦合完成<sup>[19]</sup>。而且只有 CoBS-S-CoM 存在的条件下 H<sub>2</sub> 才能还原铁氧化还原蛋白。因此推测类似于 RPG 效应的能量耦合反应存在于 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的吸能过程中。

图 3 引自文献[19]。短横线部分显示氢化酶(MvhADG)通过铁氧化还原蛋白(Fd)能量耦合由甲酰基甲基咪唑脱氢酶催化的甲烷合成途径的第 1 步。

### 2.2 CH<sub>3</sub>-SCoM, fumarate 使 H<sub>2</sub> 能在体外活化 MCR

就像细胞破碎液在没有添加可以进行能量耦合反应的小分子时不能利用 CO<sub>2</sub> 合成甲烷一样, H<sub>2</sub> 也不能在细胞破碎液或上清中活化 MCR。为了证实类似于 RPG 效应的能量耦合反应是否存在于 H<sub>2</sub> 活化 MCR 的吸能过程中,在细胞破碎液或上清中添加 fumarate 或 CH<sub>3</sub>-SCoM。由于金属离子钨和硒能提高氢气活化 MCR 的效果,在此试验过程中,细胞培养时其培养基中添加了 0.6  $\mu\text{mol/L}$  钨和 1.1  $\mu\text{mol/L}$  硒。本研究发现,在细胞破碎液中添加 10 mmol/L fumarate 和 10 mmol/L CH<sub>3</sub>-SCoM 时,能使 H<sub>2</sub> 在细胞破碎液中活化 MCR,其 MCR 的活化程度分别为体内活化的 48%、34%;在上清中添加 10 mmol/L fumarate 和 10 mmol/L CH<sub>3</sub>-SCoM 时,也能使 H<sub>2</sub> 在上清中活化 MCR,其 MCR 的活化程度分别为体内活化的 29%、27%(图 5)。

### 2.3 CH<sub>3</sub>-SCoM, fumarate 使 CO 体外活化的 MCR<sub>red</sub> 更稳定

不像 H<sub>2</sub>、CO 能在体外活化 MCR。CO 在细胞破碎液和上清中活化 MCR 的程度分别为体内活化的 41%、16%,然而 CO 体外活化的 MCR 不稳定,4 h 后活化的 MCR 开始失活,但是细胞破碎液或上清中添加 10 mmol/L fumarate 和 10 mmol/L CH<sub>3</sub>-SCoM 可以使得体外 CO 活化的 MCR 更稳定,20 小时左右未见 MCR 失活(图 6)。

## 3 结论与讨论

建立一种有效活化 MCR 的方法对研究甲烷天然合成机

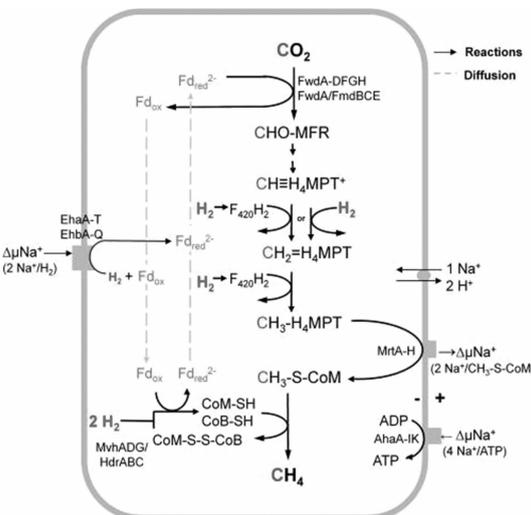


图3 甲烷合成途径及其内在的能量耦合反应

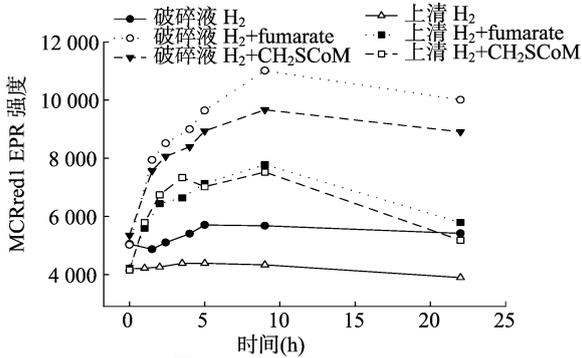
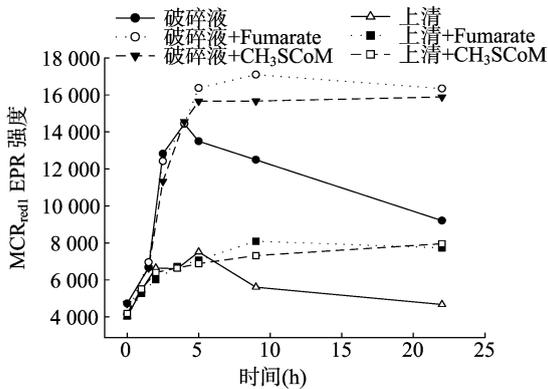
图5 H<sub>2</sub>体外活化MCR

图6 CO体外活化MCR

理相当关键,因为MCR催化甲烷是天然合成途径中速率限制的一步<sup>[8]</sup>。目前为止,MCR的活化只能通过体内H<sub>2</sub>或CO活化完成,因为CO/CO<sub>2</sub>有着更低的氧化还原电势,其活化效果优于H<sub>2</sub>。然而理论上来说,H<sub>2</sub>和CO都不能活化MCR,因为两者的标准氧化还原电势都高于MCR辅酶F430中心的Ni(I)的标准氧化还原电势。

本研究发现,在培养基添加钨和硒可以加快H<sub>2</sub>活化MCR的速度8倍,提高H<sub>2</sub>活化MCR的效率约65%。经过分析发现,钨和硒的加入很有可能提高了甲酰基甲基呋喃脱氢酶活性,因而提高了以氢化酶为媒介的由甲酰基甲基呋喃脱氢酶催化的吸能反应和由异二硫还原酶催化的放能反应之间的能量耦合反应,证实了能量耦合反应存在于H<sub>2</sub>活化MCR的吸能过程中。

产甲烷菌可以还原CO<sub>2</sub>合成甲烷,然而人们发现其细胞破碎液只有在添加CH<sub>3</sub>-SCoM、CoBS-SCoM、fumarate等小分子时才能还原CO<sub>2</sub>合成甲烷,这一现象在当地被称为RPG效应<sup>[23-24]</sup>。后来人们发现这种RPG效应是因为CH<sub>3</sub>-SCoM、CoBS-SCoM、fumarate等小分子的加入使得甲酰基甲基呋喃脱氢酶催化的吸能反应和由异二硫还原酶催化的放能反应之间的能量耦合反应成为可能,才使得甲烷合成途径得以进行<sup>[19,25-26]</sup>。这种RPG效应与H<sub>2</sub>活化MCR非常相似,H<sub>2</sub>可以在体内活化MCR,而不能再体外活化MCR。为了证实RPG效应的这种能量耦合是否也存在于H<sub>2</sub>或CO活化MCR的过程中,本研究在体外活化MCR时添加了CH<sub>3</sub>-SoM或fumarate,结果发现体外活化MCR时添加了CH<sub>3</sub>-SoM或fumarate使H<sub>2</sub>能够在体外活化MCR(为体内活化MCR的30%~40%),让CO体外活化的MCR更稳定。这说明H<sub>2</sub>

和CO活化MCR的过程中存在能量耦合反应,正是这种能量耦合反应使得氧化还原电势较高的H<sub>2</sub>(-420 mV)和CO(-520 mV)能还原氧化还原电势较低的MCR的活性中心F430(<-600 mV)。

## 参考文献:

- [1]李煜珊,李耀明,欧阳志云. 产甲烷微生物研究概况[J]. 环境科学,2014,35(5):2025-2030.
- [2]王宝玉,刘建民,韩作颖,等. 产甲烷菌的分类及研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(2):418-425.
- [3]Thauer R K. Biochemistry of methanogenesis; a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture [J]. Microbiology,1998,144(9):2377-2406.
- [4]Deppenmeier U. The unique biochemistry of methanogenesis [J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology,2002,71:223-283.
- [5]Dimarco A A, Bobik T A, Wolfe R S. Unusual coenzymes of methanogenesis [J]. Annual Review of Biochemistry,1990,59:355-394.
- [6]张万钦,吴树彪,彭乾乾,等. 微量元素对沼气厌氧发酵的影响 [J]. 农业工程学报,2013(10):1-11.
- [7]Dey M, Li X H, Kunz R C, et al. Detection of organometallic and radical intermediates in the catalytic mechanism of methyl-coenzyme M reductase using the natural substrate methyl-coenzyme M and a coenzyme B substrate analogue [J]. Biochemistry,2010,49(51):10902-10911.
- [8]Kunz R C, Horng Y C, Ragsdale S W. Spectroscopic and kinetic studies of the reaction of bromopropanesulfonate with methyl-coenzyme M reductase [J]. Journal of Biological Chemistry,2006,281(45):34663-34676.
- [9]Zhou Y Z, Dorchak A E, Ragsdale S W. *In vivo* activation of methyl-coenzyme M reductase by carbon monoxide [J]. Frontiers in Microbiology,2013,4:69-77.
- [10]Diekert G, Klee B, Thauer R K. Nickel, a component of factor F430 from *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. Archives of Microbiology,1980,124(1):103-106.
- [11]Whitman W B, Wolfe R S. Presence of Nickel in factor F430 from *Methanobacterium bryantii* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,1980,92(4):1196-1201.
- [12]Gunsalus R P, Wolfe R S. Methyl coenzyme M reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* resolution and properties of the components [J]. Journal of Biological Chemistry,1980,255(5):1891-1895.
- [13]Rospert S, Bocher R, Albracht S P, et al. Methyl-coenzyme M reductase preparations with high specific activity from H<sub>2</sub>-preincubated cells of *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. FEBS Letters,1991,291(2):371-375.
- [14]Bobik T A, Wolfe R S. Physiological importance of the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in the reduction of carbon dioxide to methane in *Methanobacterium* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1988,85(1):60-63.
- [15]Bobik T A, Wolfe R S. An unusual thiol-driven fumarate reductase in *Methanobacterium* with the production of the heterodisulfide of coenzyme M and N-(7-mercaptoheptanoyl)threonine-O<sub>3</sub>-phosphate [J]. Journal of Biological Chemistry,1989,264(31):

文冰洁,李晓霞,柯欣,等. 家禽羽毛降解菌 WYM39 的分离鉴定及其产酶特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):333-337.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.083

# 家禽羽毛降解菌 WYM39 的分离鉴定及其产酶特性

文冰洁,李晓霞,柯欣,兰新慧,贾良辉,颜华

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**为了丰富角蛋白降解的菌株资源,获得生长快速、产酶量高、具应用潜力的菌株,以鸡羽毛角蛋白为唯一碳氮源配制分离培养基,从1处鸡圈采集土样,经过初筛和复筛获得1株能高效降解羽毛的优势菌株,经形态观察、生理生化试验及16S rDNA分析,确定该菌株属于链霉菌属(*Streptomyces*)。菌株粗酶液的酶学特性试验结果表明,当反应体系中的Ca<sup>2+</sup>浓度达到50 μmol/mL或蛋白酶抑制剂PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)为1 mmol/mL时,粗酶液的活性被明显抑制,表明该酶属于丝氨酸蛋白酶。该酶的最适反应温度为60℃,且经60℃处理30 min后仍有89%的残留活性,表明其有在高温下应用的潜力。

**关键词:**家禽;羽毛;降解菌;链霉菌;分离鉴定;产酶角蛋白酶;残留活性

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0333-05

随着现代社会家禽消费量的不断增加,家禽加工厂的副产品——羽毛也在快速积累<sup>[1]</sup>。羽毛占成熟家禽活体质量的5%~7%<sup>[2]</sup>。一般家禽羽毛会被倾倒,被填埋或焚烧,造成土壤、水和空气的巨大污染,羽毛的积累不仅导致环境污染,也是羽毛资源的浪费<sup>[3]</sup>。羽毛的主要成分是角蛋白<sup>[4]</sup>,角蛋白富含二硫键<sup>[5]</sup>和疏水侧链,使羽毛坚韧而耐化学腐

蚀<sup>[6]</sup>。传统的降解羽毛的方法,如碱水解法和蒸汽高温高压水解法,不仅会破坏产物中的氨基酸<sup>[7]</sup>,同时消耗大量能量、造成成本高等问题<sup>[8]</sup>。由于环保意识的增强,生物降解羽毛的方法越来越受到人们的关注<sup>[9]</sup>。角蛋白不能被常见的蛋白水解酶如胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等降解,但很容易被微生物产生的角蛋白酶水解<sup>[10]</sup>。细菌、放线菌、真菌等都可以产生角蛋白酶<sup>[11]</sup>,以丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶为主,在较宽的温度范围和pH值范围内具有活性<sup>[12]</sup>。角蛋白酶作为特殊的酶,不仅可以用于饲料和肥料产业,还可扩展到洗涤剂产业、皮革工业和医药行业<sup>[4]</sup>。此外,角蛋白酶能灭活朊病毒,在此方面有应用潜力<sup>[13]</sup>。为了丰富角蛋白降解的菌株资源,提供生长快速、产酶量高、具应用潜力的菌株,同时拓展角蛋白酶的获得来源,为发现更高效的角蛋白酶奠定基

收稿日期:2018-03-16

基金项目:陕西省农业科技创新与攻关项目(编号:2015NY066)。

作者简介:文冰洁(1994—),女,湖南桑植人,硕士,主要从事微生物分离鉴定及微生物分子遗传研究。E-mail:wbjxfsh@foxmail.com。

通信作者:颜华,博士,副教授,主要从事微生物资源开发与利用方面的研究。E-mail:yanh99@gmail.com。

18714-18718.

[16] Crossnoe C R, Germanas J P, Lemagueres P, et al. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation[J]. *Journal of Molecular Biology*,2002,318(2):503-518.

[17] Lockerby D L, Rabin H R, Bryan L E, et al. Ferredoxin-linked reduction of metronidazole in *Clostridium pasteurianum* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,1984,26(5):665-669.

[18] Thauer R K, Kaster A K, Seedorf H A, et al. *Methanogenic archaea*: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. *Nature Reviews Microbiology*,2008,6(8):579-591.

[19] Kaster A K, Moll J, Parey K, et al. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2011,108(7):2981-2986.

[20] Costa K C, Wong P M, Wang T S, et al. Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2010,107(24):11050-11055.

[21] Li X H, Telsler J, Kunz R C, et al. Observation of organometallic and radical intermediates formed during the reaction of methyl-coenzyme M reductase with bromoethanesulfonate[J]. *Biochemistry*,2010,49(32):6866-6876.

[22] Rospert S, Bocher R, Albracht S P, et al. Methyl-coenzyme M reductase preparations with high specific activity from H<sub>2</sub>-preincubated cells of *Methanobacterium thermoautotrophicum* [J]. *FEBS Letters*,1991,291(2):371-375.

[23] Gunsalus R P, Wolfe R S. Stimulation of CO<sub>2</sub> reduction to methane by methylcoenzyme M in extracts *Methanobacterium*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,1977,76(3):790-795.

[24] Rouviere P E, Wolfe R S. Novel biochemistry of methanogenesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*,1988,263(17):7913-7916.

[25] Herrmann G, Jayamani E, Mai G, et al. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*,2008,190(3):784-791.

[26] Li F L, Hinderberger J, Seedorf H, et al. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme a (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri* [J]. *Journal of Bacteriology*,2008,190(3):843-850.