

# 一株太平洋深海环己酮降解菌的筛选与功能研究

李 华<sup>1,2</sup> 邵宗泽<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 厦门大学生命科学院 厦门 361005)

(<sup>2</sup> 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

**摘 要:** 从太平洋深海菌株中筛选到一株能以环己酮为唯一碳源生长的微球菌(CN1),其最适生长温度为 25℃ ~ 37℃,最适生长 pH8,最适生长盐度 6%。该菌可耐受高浓度环己酮(>44% V/V),并且在 16.7%(V/V)的环己酮中生长最好。CN1 可转化环己醇成环己酮,环己酮又可被快速降解、矿化。这表明该菌含有环己醇脱氢酶并且很可能还含有环己酮单加氧酶。通过兼并 PCR 克隆到 450bp 环己酮单加氧酶基因片段,其编码的氨基酸序列不仅具有 Baeyer-Villiger 单加氧酶家族的保守序列,而且与节杆菌(*Arthrobacter* BP2)的环己酮单加氧酶同源性最高(80%),而与研究较深入的不动杆菌(*Acinetobacter* sp. NCIMB 9871)单加氧酶的同源性仅为 53%。由于目前报道的环己醇和环己酮的降解都是通过环己酮单加氧酶进行的,所以 CN1 的环己酮单加氧酶应该负责环己酮的降解。目前报道的环己酮降解菌都可以降解环戊酮,而 CN1 不可降解环戊酮,暗示了 CN1 的环己酮单加氧酶比较特别。另外,我们还首次发现在 CN1 中环己醇对环己酮的降解有一定的抑制作用。

**关键词:** 环己酮;环己醇;微球菌;环己酮单加氧酶

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)05-0828-06

Baeyer-Villiger 氧化反应是有机合成的重要反应,它将酮加氧转变为相应的酯。多年来,众多化学研究致力于其不对称催化的化学催化剂研究,取得了一定的成果,但其产率较低(32% ~ 45%),光学纯度也不是很高(60% ~ 70%),另外,这些反应不仅所需条件较苛刻,而且与环境不友好<sup>[1]</sup>。1975 年有报道称,不动杆菌(*Acinetobacter* sp. NCIMB 9871)的环己酮单加氧酶(cyclohexanone monooxygenase, CHMO)不仅可催化 Baeyer-villiger 反应,而且环己酮反应产物手性纯度可达 98%<sup>[2]</sup>。对 100 多种类似底物(包括各种环酮、二环酮、醛)进行测试,发现它们都可被该酶催化,其产物光学纯度达 75% ~ 98%<sup>[3,4]</sup>。所以这种生物转化很快就在非手性酮的立体选择性氧化方面得到了广泛应用,并且也成为外消旋物消旋的唯一高效方法<sup>[5]</sup>。最近研究还表明,该酶不仅可以催化富含电子的杂原子,如硫化物<sup>[6]</sup>、亚硫酸盐<sup>[7]</sup>、硒化物<sup>[8]</sup>、叔胺<sup>[9]</sup>、磷化氢<sup>[10]</sup>,而且还可以环氧化电子较少的烯烃<sup>[11]</sup>,而这些反应的产物也具有很高的光学纯度。这暗示了 *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 的 CHMO 将具有更广泛的应用。

*Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 为二级致病菌,一

定程度上限制了其直接作为工程菌的广泛应用,虽然 *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 的 CHMO 研究的比较详尽,但涉及 *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 的环己酮诱导调控机理的研究几乎没有。另外,其他环己酮降解菌的报道也不多。本文从太平洋深海菌株中筛选到一株环己酮降解菌。初步研究表明,它不仅具有独特的降解特性,而且有望发展成为优良工程菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** 环己烷(cyclohexane)、环己酮(cyclohexanone)购自汕头达濠公司,环己醇(cyclohexanol)、环戊酮(cyclopentanone)购自汕头西陇公司,各种限制性内切酶、T4 连接酶、PCR 所用 DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司。QP2010 型 GC-MS 购自日本岛津公司。

**1.1.2 菌株来源:** 环己酮降解菌 CN1,从深太平洋沉积物中分离,由海洋微生物菌种保藏中心保藏。

**1.1.3 培养基:** ① MMC 培养基:每升水含 NaCl 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.0g, NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> 1g, KCl 0.7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

基金项目:国家 973 项目(2004CB719601)

\* 通讯作者:Tel/Fax: 86-592-2195321/86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介:李 华(1980-),男,河南三门峡人,硕士研究生,研究方向微生物学。E-mail: lh101001000@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-01-23,接受日期:2007-04-17,修回日期:2007-07-11

2.0 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.0g pH 调为 7.4,另加微量元素母液 1mL。微量元素母液成分有  $\text{CaCl}_2$  0.02mg/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5mg/L,  $\text{GuSO}_4$  0.005mg/L,  $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0.005mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1mg/L。②选择性培养基:在 MMC 培养基中添加终浓度为 5‰的环己酮作为碳源。③HLB 培养基:每 100mL 水中含  $\text{NaCl}$  3g, 蛋白胨 1g, 酵母提取物 0.5g pH 调为 7.6。

## 1.2 环己酮降解菌的筛选

将海洋微生物菌种保藏中心库藏菌株分别接种到 50mL 以 5‰的环己酮为唯一碳源的 MMC 培养基,在 25℃、180r/min 的条件下进行培养,对有生长迹象的菌转接至含有相同培养基中以再次验证其环己酮降解能力。

## 1.3 菌株 CN1 的最适生长条件测定

**1.3.1 最适初始 pH 值测定:**从平板上挑取单菌落于 HLB 液体培养基中,25℃培养至指数生长期,然后以 2%接种量接种于 50mL HLB 培养基中,分别在 pH 为 4、5、6、7、8、9、10 和 11 下培养 48h,测  $OD_{600}$  值。

**1.3.2 最适盐度测定:**从平板上挑取单菌落于 HLB 液体培养基中,25℃培养至指数生长期,分别以 2%接种于  $\text{NaCl}$  浓度为 0%、3%、6%、9%、12%、15%、18% 和 21% 的 LB 中培养 48h 测  $OD_{600}$  值。

**1.3.3 最适生长温度的确定:**从平板上挑取单菌落于 HLB 液体培养基中,25℃培养至指数生长期,然后以 2%接种于 50mL HLB 培养基中,分别在 4℃、18℃、25℃、30℃、37℃、45℃ 和 65℃ 温度下培养 48h,测  $OD_{600}$  值。

**1.3.4 CN1 对高浓度环己酮的抗性:**从平板上挑取单菌落于 HLB 液体培养基中,25℃培养至指数生长期,然后分别接种于 5mL HLB 培养基大号试管中,再依次加入 0mL、0.5mL、1mL、1.5mL、2mL、2.5mL、3mL、3.5mL 和 4mL 环己酮,25℃ 150r/min 的条件下培养 48h,测菌体浓度  $OD_{600}$  值。

**1.3.5 CN1 对 30 种抗菌药物的抗性情况:**通过纸片法测定 CN1 对以下 30 种抗菌药物的抗性范围:Fortum、Cefuroxime、Cephadrin、Cefazolin、Cefalexin、Piperacillin、Carbencillin、Ampicillin、Oxacillin、Penicillin、Erythromycin、Mimomycin、Vibramycin、Tetracycline、Neomycin、Kanamycin、Centamycin、Amicacin、Cefobid、Rocephin、Vanoomycin、Bpolymyxin B、Ofloxacin、Midecamycin、Ciprofloxacin、Norfloxacin、Furazolidone、Co-trimoxazole、Chloromycetin、clindamycin。

**1.3.6 CN1 碳源利用情况:**采取两种方法相结合来研究 CN1 对碳源利用情况,一种是从平板上挑取 CN1 重悬于灭菌的 PBS 溶液中( $\text{NaCl}$  8g/L,  $\text{KCl}$  0.2g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g/L, pH 7.4),再接种于含 5‰的不同碳源的 MMC 中,测定生长情况。这些碳源包括:甘露醇、乙酸钠、乙酸乙酯、甲酸钠、蔗糖、葡萄糖、柠檬酸钠、可溶性淀粉、乙醇、丙三醇、环己烷、环己醇、环己酮、环戊酮。培养 24h,测  $OD_{600}$  值。第二种方法是利用 Biolog 微生物自动鉴定仪,直接鉴定 CN1 对 95 种碳源的利用能力。

## 1.4 CN1 降解环己醇、环己酮、环戊酮的 GC-MS 分析

从平板上挑取单菌落于 HLB 液体培养基中,25℃培养至指数生长期,取 15mL 平分到 3 个灭菌试管中,再分别加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的环己醇、环己酮、环戊酮(另取 3 支不接菌的装有 5mL HLB 试管,也分别加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的环己醇、环己酮、环戊酮,作为对照) 6 支试管在 25℃培养到 4h 和 48h,取出 1mL,用乙酸乙酯抽提,无水硫酸钠干燥后进样,使用 QP2010 型 GC-MS (SHIMADZU),分析环己醇、环己酮、环戊酮残留量。仪器使用条件:柱流量为 1.1mL/min,进样口温度为 260℃,气质接口温度为 250℃,柱温 60℃,以 5℃/min 升温至 280℃,并保持 6min。质谱条件:电离源为 EI,电离能量为 70eV,离子源温度为 200℃,进样量为 1 $\mu\text{L}$ ,分流比为 5:1。

## 1.5 CN1 环己酮单加氧酶基因的分析

根据已经报道的 CHMO 基因,设计了一对简并引物。引物 1:5'-CGSMGGYTGGYACTGGAACCG-3'; 引物 2:5'-WCCGGBSCSGTRAYVACCTG-3'。PCR 程序如下:94℃ 4min,94℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 1min,循环 32 次,72℃ 8min。将该基因片段克隆、测序、比对分析。

## 2 结果

### 2.1 环己酮降解菌的筛选

从本海洋微生物菌种保藏中心库藏菌种中通过以环己酮为唯一碳源筛选到一株能够降解环己酮的细菌,该菌 16S 序列与藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* AJ409096)同源性最高(相似度为 99%),库藏编号为:JCMCC 1A01202。

### 2.2 pH、盐度、温度及环己酮浓度对 CN1 生长影响

以 HLB 为培养基,25℃培养条件下,CN1 的 pH 耐受范围为 5-10,最适 pH 为 8(图 1-A)。25℃、pH 7.6 条件下,CN1 可耐受 0-18% 的  $\text{NaCl}$  浓度(在

18%的 NaCl 的条件下有微弱生长),其最适盐浓度为 6%(图 1-B)。以 HLB 为培养基,其生长的温度范围为 4℃~45℃,最适温度 37℃,但温度为 45℃时,CN1 生长能力急剧下降(图 1-C)。

同样,以含不同浓度环己酮的 HLB 为培养基,

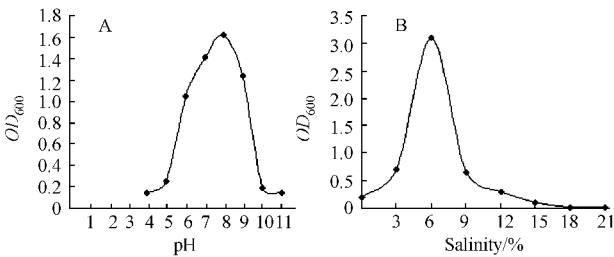


图 1 培养基起始 pH (A)、氯化钠浓度(B)、温度(C)和环己酮浓度(D)对 CN1 生长的影响

Fig. 1 The effect on CN1 growth by initial pH of medium (A), salinity (B), temperature (C) and cyclohexanone concentration (D).

$OD_{600}$  value was determined by four times dilution for (C) and (D), five times dilution for (A), six times dilution for (B)

### 2.3 抗生素抗性范围

CN1 对 Furazolidone、Bopolymyxin B、Norfloxacin、Oxacillin、Centamycin、Fortum、Kanamycin 有极强抗性,尤其是 Kanamycin,没有出现任何抑菌圈。对其余 22 种抗生素没有抗性。它们是:Cefuroxime、Cephadrin、Cefazolin、Cefalexin、Piperacillin、Carbenicillin、Ampicillin、Penicillin、Erythromycin、Mimomycin、Vibramycin、Tetracycline、Neomycin、Amicacin、Cefobid、Rocephin、Vanoomycin、Ofloxacin、Midecamycin、Ciprofloxacin、Co-trimoxazole、Chloromycetin 和 Clindamycin。因此,Tetracycline、Ampicillin、Erythromycin、Neomycin、Vanoomycin、Chloromycetin 等抗性基因可用作 CN1 遗传改造的抗生素抗性标记。

### 2.4 CN1 的碳源利用范围

在 25℃下,在以不同化合物为唯一碳源的 MMC 培养基中,检测菌体生长情况。结果发现,CN1 对乙

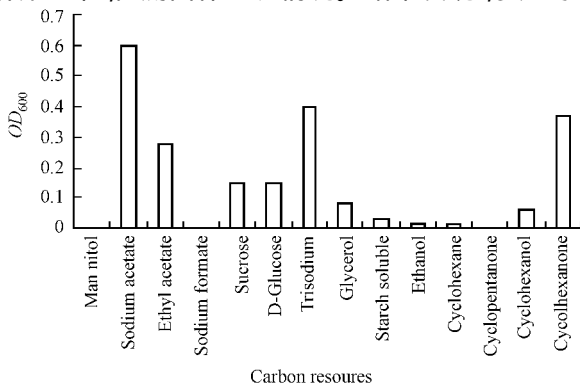
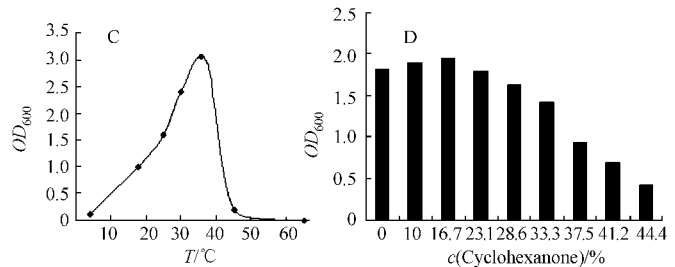


图 2 CN1 对不同碳源的利用情况

Fig. 2 The utilization of some carbon resources by CN1. The bacterium was cultivated in MMC medium supplied with different chemicals as the sole carbon sources.

25℃条件下培养。菌体浓度分析表明,CN1 可以耐受高浓度的有机溶剂(环己酮),在 44%的环己酮中仍能生长(5mL 的培养基中加入 4mL 的环己酮),在环己酮与 HLB 培养基体积比 1:5,即环己酮浓度在 16.7%左右反而使菌体浓度最大(图 1-D)。



酸钠、乙酸乙酯、柠檬酸钠、环己酮的利用效果较好,其中乙酸钠为最佳碳源,但菌体的长势相比于高盐 LB,差了很多。对蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、丙三醇、环己醇也有一定的利用。CN1 不能利用环戊酮、甘露醇和甲酸钠,基本也不利用环己烷和乙醇。相比环己酮、环己醇的利用效率很低(图 2)。

经 Biolog 鉴定,CN1 对吐温 40、吐温 80、 $\alpha$ -D-葡萄糖、D-洛酮糖、D-核糖、蔗糖、D-木糖、 $\beta$ -羟基丁酸、 $\gamma$ -羟基丁酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、L-苹果酸、琥珀酸甲酯、丙酮酸、丙三醇,利用效果较好。

不可利用或有极微弱利用的碳源有: $\alpha$ -环糊精, $\beta$ -环糊精,糊精,淀粉,菊糖,甘露聚糖,N-乙酰基-D-半乳糖,N-乙酰基-D-葡萄糖胺,苦杏仁苷,L-树胶醛糖,D-阿拉伯糖,熊果苷,D-纤维二糖,D-果糖,L-海藻糖,D-半乳糖,D-半乳糖醛酸,龙胆二糖,D-葡萄糖酸,m-肌醇, $\alpha$ -D-乳糖,乳果糖,麦芽糖,麦芽三糖,D-甘露醇,D-甘露糖,D-松三糖,D-蜜二糖, $\alpha$ -甲基-D-半乳糖, $\beta$ -甲基-D-半乳糖, $\beta$ -甲基-D-半乳糖, $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷, $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷, $\alpha$ -甲基-D-甘露糖,6-O-D-吡喃葡萄糖酰-D-呋喃果糖,D-蜜三糖,L-鼠李糖,水杨酸,景天庚酮聚糖,D-山梨醇,水苏糖,D-塔格糖,D-海藻糖,松二糖,木糖醇,醋酸, $\alpha$ -羟基丁酸, $\rho$ -羟基苯乙酸, $\alpha$ -酮戊酸,乳酰胺,D-乳酸甲酯,L-乳酸,D-苹果酸,丙酮酸甲酯,丙酸,琥珀酰胺酸,琥珀酸,N-乙酰基-L-乳酸胺谷氨酸,L-丙氨酸胺,D-丙氨酸,L-丙氨酸,L-丙氨酸甘氨酸,L-天冬酰胺酸,L-谷氨酸,甘氨酸-L-谷氨酸,L-焦谷氨酸,L-丝氨酸,丁二胺,2,3-丁二醇,腺苷,2'-脱氧腺苷,肌苷,胸苷,尿苷,5'-单磷酸腺苷,5'-单磷酸胸苷,5'-单磷酸尿

苷 6-磷酸-D-果糖 ,1-磷酸- $\alpha$ -D-葡萄糖 ,6-磷酸-D-葡萄糖 ,D-L- $\alpha$ -磷酸甘油。

将 96 孔板测定结果与 Biolog 细菌数据库比对,发现 CN1 与 *Micrococcus luteus* 相似度最 93% )。

## 2.5 CN1 对环己醇 环己酮 环戊酮的生物转化

将 CN1 在 HLB 上培养到对数生长期,然后平均分配到 3 个试管中,再分别添加 10ppm 的环己醇、环己酮和环戊酮。培养到 4h 和 48h 时,经有机溶剂抽提、GC-MS 检测这 3 种物质的残留量。结果表明,环戊酮不会被该菌降解(图 3-A, B, C)。环己醇在 4h 时会部分转化成中间产物环己酮,到 48h 时,环己醇及环己酮都全部消失(图 3-D, E, F)。对于环己酮,10ppm 的环己酮在 4h 时,就全部被降解掉,其降解速率远远大于环己醇(图 3-G, H, I)。

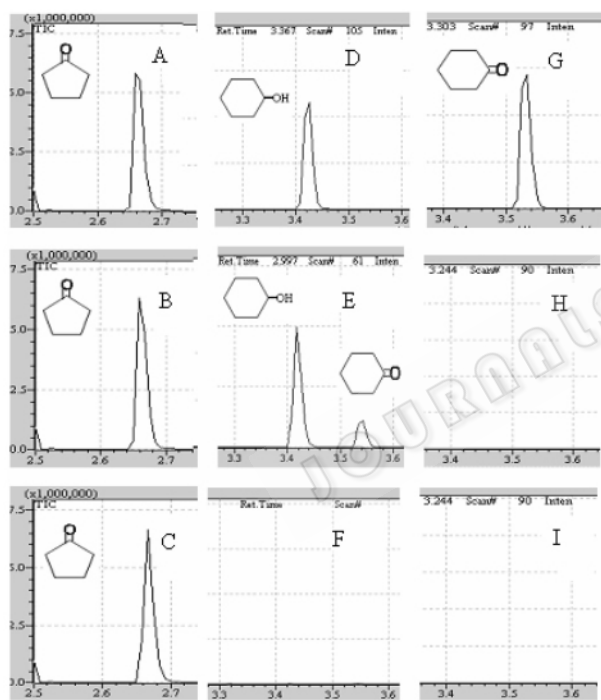


图 3 GC-MS 分析 CN1 对环戊酮 环己醇 环己酮的利用情况

Fig.3 Utilization of cyclopentanone, cyclohexanol, cyclohexanone by CN1 analyzed by GC-MS. A, B, C, the utilization of CN1 on cyclopentanone(10ppm);D, E, F, the utilization of CN1 on cyclohexanol (10ppm); G, H, I, the utilization of CN1 on cyclohexanone(10ppm); A, D, G, HLB without CN1 as control; B, E, H, HLB inoculated by CN1 cultured for 4h; C, F, I, HLB inoculated by CN1 cultured for 48h.

GC-MS 结果表明, CN1 中也含有使环己醇转变为环己酮的醇脱氢酶,很可能还含有转环己酮的 CHMO,但此酶不作用于环戊酮;此外,环己醇的加入会导致环己酮的积累,说明在这一阶段,环己醇转变为环己酮的速度大于环己酮的降解速度。没有环己醇时,环己酮降解很快,环己醇存在时,环己酮降

解速度变慢,说明两者之间有着某种调控。至于具体的调控机理,有待进一步研究。

## 2.6 CN1 环己酮单加氧酶基因的克隆

根据 CHMO 基因保守区设计兼并引物,PCR 得到 450bp 的片段,利用 BLASTX 程序,网上比对确证为 CHMO 基因,与 *Arthrobacter* sp. BP2 的 CHMO 相似度最高,相似度为 80%;与 *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 的 CHMO 相似度仅为 53%(图 4)。Arthrobacter sp. BP2 的 CHMO 基因是 2003 年通过 mRNA 差异显示技术得到的,并实现了这一 CHMO 的异源表达和对环己酮及其类似物的功能验证,但其在手性合成效果方面还未深入研究<sup>[16]</sup>。另外,我们得到的 150 个氨基酸序列,在其接近一端的位置上,存在氨基酸序列 FXGXXXHXXXW(P/D),此序列被认为是催化 Baeyer-villiger 反应的所有单加氧酶的特征序列<sup>[17]</sup>。

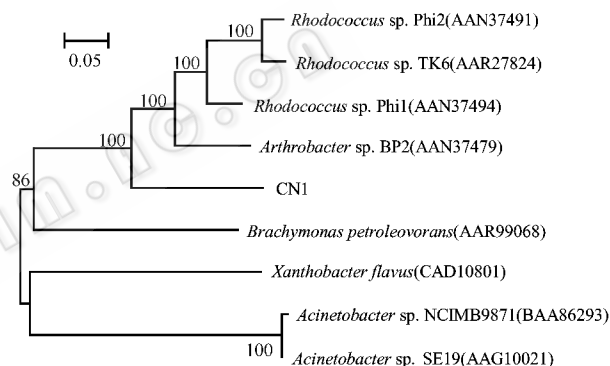


图 4 CN1 环己酮单加氧酶的系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of partial sequence of cyclohexanone monooxygenase from different bacteria including CN1. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) are shown at branch points. The numbers in parentheses are accession number of sequences. Scale bar correspond to a 5% difference in amino acid sequence.

## 3 讨论

*M. luteus* 为非致病性菌。该论文筛选的 *M. luteus* CN1 具有良好的生长性能,能达到较高的菌体密度。它不仅能以环己酮为唯一碳源生长,而且对较高浓度的有机溶剂环己酮有很好的抗性。研究还表明,该菌所编码的环己酮单加氧酶具有特殊的底物范围。因此,CN1 有可能改造成为两相催化的优良工程菌。

据我们所知,目前研究的所有的环己酮的降解,都首先要通过加氧酶,将其转变为己内酯,之后酯键断裂,最终以脂肪酸的形式进入  $\beta$ -氧化途径。GC-MS 分析表明:CN1 可降解环己酮,说明 CN1 很可能含有 CHMO,我们没有检测到中间产物己内酯,很可

能是作用于己内酯的酯水合酶,活性远远高于环己酮加氧酶。D. B. Norris 和 Martin Griffin 分别对两种菌检测,也没有检测到中间产物,后经研究表明,在这两株菌中,酯水合酶活性分别为酮加氧酶活性的 30 倍和 60 倍<sup>[18,19]</sup>。通过 PCR 手段,我们得到了 450bp 的片段,根据网上比对结果和它具有的特征序列,可以断定此片段就是 CHMO 的基因片段。通过 Southern 杂交,我们还证实 CN1 基因组的 CHMO 基因为单拷贝(未发表)。所以,GC-MS 检测到的环己酮的转化,很可能就是我们 PCR 得到的这个 CHMO 所为的。然而,此酶又不同于以前报道的酶。据我们所知,已报道的 CHMO 都可以作用于环戊酮<sup>[16,20,21,22,23]</sup>;而拥有 CHMO 的 CN1 却不能降解环戊酮,因此该酶的底物范围有别于已报道的酶。

GC-MS 分析表明,环己醇可被转化为环己酮,并使得环己酮有一定的积累,这说明环己醇的转化为环己酮的速度高于环己酮转化为己内酯的速度。这样看来,在单碳利用实验中,CN1 对环己醇和环己酮的利用效率应基本持平,而我们却发现 CN1 对环己醇的利用效率远远低于 CN1 对环己酮的利用。GC-MS 分析还表明,CN1 单独降解环己酮的速度很快,但是当环己醇存在时,环己酮降解速度明显变慢。这极大的暗示了环己醇对环己酮降解有抑制作用。在 *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 的环己酮降解基因簇中,存在一个转录激活子(Chn R)的基因,在它表达的情况下,CHMO(Chn B)的表达量可提高 22 倍<sup>[24]</sup>。Hiroaki iwaki 发现,Chn R 的第 32-56 氨基酸残基与 Chn B 的 67-91 氨基酸残基一致度很高,推测这两个位点很可能是环己酮与两者结合的位点<sup>[21]</sup>。在 CN1 中,是不是因为环己酮与环己醇结构相似,所以它们都可以与上述预测的转录激活子(Chn R)的环己酮结合位点结合,而环己酮与(Chn R)的结合起到了对 Chn B 转录激活作用,而环己醇与(Chn R)的结合却抑制了 Chn B 的转录。另外一种可能,环己醇被转变为某种物质,这种生成物进而在转录水平,或者翻译水平,或者直接对 CHMO 作用,从而达到阻碍自身通过环己酮途径降解。在 CN1 中环己醇阻碍了自身通过环己酮途径降解,暗示着环己醇要通过其他途径发挥某种生物学意义。一般的研究表明环己醇都是通过转化为环己酮降解的,但是在 *Xanthobacter* sp 中曾发现,环己醇不仅可转化为环己酮,还可转变为 1,2-环己二醇,1,3-环己二醇,1,4-环己二醇<sup>[25]</sup>,而这些物质功能及代谢目前还不是很清楚。然而由于某些原因,我们利用 GC-

MS 还没有检测到这些及类似物质。

目前,我们正致力于获得完整的环己酮降解基因及其基因簇,以便进一步了解环己酮降解相关基因的表达调控和环己酮单加氧酶的性质。

## 参 考 文 献

- [1] Renz M, Meunier B. 100 Years of Baeyer-Villiger oxidation of ketones. *Eur J Org Chem*, 1999, **1**: 737-750.
- [2] Donoghue NA, Trudgill PW. The metabolism of cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur J Biochem*, 1975, **60**: 1-7.
- [3] Stanley M, Robert P, Wan WH. Enzyme-catalysed Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of Molecular catalysis b: enzymatic*, 1998, **4**: 111-136.
- [4] Stewart JD. Cyclohexanone monooxygenase: A useful reagent for asymmetric Baeyer-Villiger reaction. *Curr Org Chem*, 1998, **2**: 195-216.
- [5] Alphand V, Furstoss R. *Asymmetric Oxidation Reactions: A Practical Approach in Chemistry*. Oxford: Oxford Chemistry Press, 2001.
- [6] Colonna S, Gaggero N, Pasta P, et al. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides catalysed by bacterial cyclohexanone monooxygenase. *Chem Soc Chem Commun*, 1996, **20**: 2303-2307.
- [7] Colonna S, Gaggero N, Carrea G, et al. Oxidation of organic cyclic sulfites to sulfates: A new reaction catalyzed by cyclohexanone monooxygenase. *Chem Soc Chem Commun*, 1998, **42**: 415-416.
- [8] Branchaud BP, Walsh CT. Functional-group diversity in enzymatic oxygenation reactions catalyzed by bacterial flavin-containing cyclohexanone oxygenase. *Journal Of The American Chemical Society*, 1985, **107**: 2153-2161.
- [9] Ottolina G, Bianchi S, Belloni B, et al. First asymmetric oxidation of tertiary amines by cyclohexanone monooxygenase. *Tetrahedron Lett*, 1999, **40**: 8483-8486.
- [10] Alphand V, Archelas A, Furstoss R, et al. One-step synthesis of a pivotal prostaglandin chiral synthon via a highly enantioselective microbiological Baeyer-Villiger type reaction. *Tetrahedron Lett*, 1989, **30**: 3663-3664.
- [11] Colonna SN, Gaggero G, Carrea G, et al. First asymmetric epoxidation catalysed by cyclohexanone monooxygenase. *Tetrahedron Lett*, 2002, **43**: 1797-1799.
- [12] Doig SD. Characterisation of a recombinant *Escherichia coli* TOP10 [pQR239] whole cell biocatalyst for stereoselective Baeyer-Villiger oxidations. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **32**: 347-355.
- [13] Doig SD. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme Microb Technol*, 2001, **28**: 265-274.
- [14] Willetts A. Structural studies and synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *TIBTECH*, 1997, **15**: 55-62.
- [15] Trudgill PW. Cyclohexanone 1,2-monooxygenase from *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871. *Meth Enzymol*, 1990, **188**: 70-77.
- [16] Patricia C, Brzostowicz, Dana M, et al. mRNA differential display in a microbial enrichment culture: Simultaneous identification of three cyclohexanone monooxygenases from three species. *Appl*

- [ 17 ] Fraaije MW , Kamerbeek NM , Berkel WJH , *et al.* Identification of a baeyer-villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters* , 2002 , **518** :43 – 47.
- [ 18 ] Norris DB , Trudgill PW. The metabolism of cyclohexanol by *Nocardia globerulea* CL1. *Biochem* ,1971 , **121** 363 – 370.
- [ 19 ] Martin G , Trudgill DW. The metabolism of cyclopentanol by *Pseudomonas* NCIMB 9872. *Biochemistry of Journal* , 1972 , **129** : 595 – 603.
- [ 20 ] Brzostowicz PC , Gibson KL , Thoms SM , *et al.* Simultaneous identification of two cyclohexanone oxidation genes from an environmental *Brevibacterium* isolate using mRNA differential display. *Journal of Bacteriology* , 2000 , **21** :4241 – 4248.
- [ 21 ] Michael K , Trower R , Buckland M , *et al.* Characterization of an FMN-containing cyclohexanone monooxygenase from a cyclohexane-grown *Xanthobacter* sp. . *Eur J Biochem* , 1989 , **181** :199 – 206.
- [ 22 ] Iwaki HY , Hasegawa S , Wang M , *et al.* Cloning and characterization of a gene cluster involved in cyclohexanol metabolism in *Comamonas* sp. strain NCIMB 9872 and biotransformations effected by *Escherichia coli*-expressed cyclopentanone 1  $\beta$ -monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** 5671 – 5684.
- [ 23 ] Cheng QSM , Thomas K , Kostichka J , *et al.* Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by in vitro transposition. *J Bacteriol* , 2000 , **182** :4744 – 4751.
- [ 24 ] Iwaki H , Hasegawa Y , Teraoka M , *et al.* Identification of a transcriptional activator ( ChnR ) and a 6-oxo- hexanoate dehydrogenase ( ChnE ) in the cyclohexanol catabolic pathway in *Acinetobacter* sp. strain NCIMB 9871 and localization of the genes that encode them. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** :5158 – 5162.
- [ 25 ] Trower MK , Buckland M , Higgins R , *et al.* Isolation and characterization of cyclohexane-metabolizing *Xanthobacter* sp. . *Appl Environ Microbiol* , 1985 , **49** :1282 – 1289.

## Screening and function analysis of a cyclohexanone-degrading bacterium CN1 from deep sea sediment

LI Hua<sup>1,2</sup> , SHAO Zong-ze<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Life Colledge , Xiamen University , Xiamen 361005 , China )

(<sup>2</sup> The Third Institute of Oceanography , State of Oceanic Administration , SOA , Xiamen 361005 , China )

**Abstract** : *Micrococcu luteus* CN1 was found to be able to utilize cyclohexanone well from the strains originally isolated from Pacific Ocean sediment. The optimum conditions for its growth were determined as 25°C-37°C , pH 8 , salinity 6% . It could survive in the medium with high concentration of cyclohexanone ( > 44% V/V ) , and grew most vigorously in medium with 16.7%( V/V ) cyclohexanone. CN1 could transform cyclohexanol to cyclohexanone which could be further degraded and mineralized quickly. This indicated the presence of cyclohexanol dehydrogenase and probable presence of cyclohexanone monooxygenase. With degenerate PCR for cloning part of cyclohexanone monooxygenase gene ,the DNA fragment of 450bp was gotten. Amino acid sequence analysis showed that it owned the conserved sequence of the Baeyer-Villiger monooxygenase family and had the highest homology of 80% with cyclohexanone monooxygenase from *Arthrobacter* sp. BP2 , only 53% with that from *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 which had been the most deeply investigated. So far as we know , both cyclohexanol and cyclohexanone degradation resorted to cyclohexanone monooxygenase. So this gene should be responsible for cyclohexanone degradation in CN1. All the cyclohexanone-degraders previously reported could degrade cyclopentanone , but , CN1 did not degrade cyclopentanone. This indicated that cyclohexanone monooxygenase in CN1 was special. Additionally , it was found for the first time that cyclohexanol could inhibit cyclohexanone degradation to certain degree in CN1.

**Keywords** : cyclohexanone ; cyclohexanol ; *Micrococcu luteus* ; cyclohexanone monooxygenase