第61卷第2期
2021年3月

大连理工大学学报
Journal of Dalian University of Technology

Vol. 61, No. 2
Mar. 2021

文章编号：1000-8608(2021)02-0136-07

联氨氧化酶初步纯化及醌类化合物对其活性影响

李竺芯，张寿通，李　阳，阎　松*

（大连交通大学 环境与化学工程学院，辽宁 大连　116021）

摘要： 厌氧氨氧化菌是一种化能自养菌，它具有独特的生理生化特性及生物脱氮机理. 对厌氧氨氧化菌进行实验室扩大培养，对其主要代谢酶联氨氧化酶性质进行研究，对联氨氧化酶进行初步纯化，并探究醌类化合物对联氨氧化酶活性的影响. 最终得出联氨氧化酶活性最适温度为 35 ℃，最适 pH 为 7.5. 酶纯化结果表明超滤相对分子质量在 50～100 kDa. 投加辅酶 Q 对提高酶活性效果最好，2-羟基-1,4-萘醌对酶活性提高效果稍差，蒽醌-2-磺酸钠盐对酶活性基本无影响.

关键词： 厌氧氨氧化菌；联氨氧化酶；纯化；醌类化合物；酶活性

中图分类号： X172　　**文献标识码：** A　　**doi：** 10.7511/dllgxb202102004

0 引　言

传统的生物脱氮过程以硝化-反硝化理论占主导地位[1]. 直至 20 世纪 90 年代，Mulder 等[2]发现了一类完全厌氧的微生物种群，这类微生物能独立完成生物脱氮的代谢过程，并将其命名为厌氧氨氧化菌（anammox bacteria，AnAOB）[3]. 厌氧氨氧化（anaerobic ammonium oxidation，anammox）是指在厌氧条件下，以亚硝酸氮（NO_2^--N）为电子受体，氨氮（NH_4^+-N）为电子供体，以联氨（N_2H_4）为催化中间体的微生物反应，最终产物为氮气和水的过程[4-5]. 厌氧氨氧化技术与传统硝化-反硝化生物脱氮技术相比，理论上可以节约 62.5% 的曝气量，无须外加碳源，污泥产量很少[6]，还可以减少温室气体的排放. 厌氧氨氧化是一种节能降耗的新型生物脱氮技术，因此在废水脱氮研究与应用中具有明显的优势[7].

目前已知的厌氧氨氧化菌主要包括 5 个属，即 *Candidatus Brocadia*、*Candidatus Kuenenia*、*Candidatus Scalindua*、*Candidatus Jettenia* 和 *Candidatus Anammoxoglobus*[6,8]，均属于浮霉菌门（Planctomycetes）. 厌氧氨氧化反应过程中发挥核心作用的是厌氧氨氧化菌，由于这种菌生长世代长，致使其难以培养，目前仅能获得其富集培养物，人们对这种菌适宜分离与生长生态条件的研究还很有限[9-10]. 2007 年，Shimamura 等从富集有菌株 KSU-1 的生物反应器中分离纯化出一种具有联氨（N_2H_4）氧化活性但不具备 NH_2OH 氧化能力的酶，将其正式命名为联氨氧化酶（hydrazine oxidizing enzyme，HZO）[11-14]. 联氨氧化酶是厌氧氨氧化菌的特征代谢酶，它可为厌氧氨氧化菌的多样性研究提供依据[15-16]. 厌氧氨氧化菌的代谢途径并没有准确的定论，这主要是由于对厌氧氨氧化菌的关键代谢酶缺乏深入研究，缺乏对联氨氧化酶纯化的研究，对联氨氧化酶相关性质的研究也很欠缺. 若能根据提取纯化的厌氧氨氧化菌关键代谢酶来分析其活性和具体功能，将有助于对其代谢模式的确定[17].

本文对厌氧氨氧化菌进行实验室扩大培养，制备厌氧氨氧化菌的无细胞抽提液，采用超滤、DEAE 阴离子层析等方法纯化厌氧氨氧化菌的特征代谢酶联氨氧化酶，检测酶活性. 并研究适宜温度、pH 下厌氧氨氧化菌联氨氧化酶的性质及外

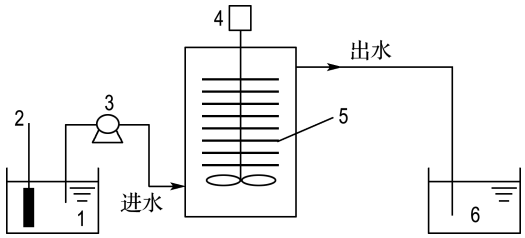
收稿日期： 2020-04-28；　**修回日期：** 2020-12-05.
基金项目： 国家自然科学基金资助项目(51408094).
作者简介： 李竺芯（1995-），女，硕士生，E-mail：837938980@qq.com；阎　松*（1974-），女，博士，副教授，E-mail：yansong209@aliyun.com.

源醌类化合物是否会对厌氧氨氧化反应进行催化，参与到厌氧氨氧化过程. 这对确保工艺的长期高效稳定运行具有重要意义.

1　粗酶液的提取测定

1.1　实验室扩培反应器

实验采用底面外直径 35 cm、内直径 30 cm、反应器总高度 40 cm、内容积高度 33 cm 的圆柱形有机玻璃反应器，反应器内装有纤维质无纺布[18]，反应器装置如图 1 所示. 反应器由蠕动泵控制自动运行，根据厌氧氨氧化菌所需进水配水，加热器控制进水温度，对菌种进行反应器培养.



1 进水水箱；2 加热器；3 蠕动泵；4 搅拌器；5 无纺布填料；6 出水水箱

图 1　反应器装置

Fig. 1　Reactor device

1.2　实验用水

实验研究以动态连续实验室小试为主，本实验采用人工配制的模拟污水[19]，以硫酸铵试剂配制所需的 NH_4^+-N 浓度，模拟污水的主要成分见表 1，微量元素溶液配方见表 2. 试剂纯度均为分析纯(AR).

表 1　模拟污水的主要成分

Tab. 1　The main component of mimic wastewater

成分	浓度/(mg · L^{-1})
$KHCO_3$	1 250
KH_2PO_4	25
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	300
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200
$FeSO_4$	6.25
EDTA	6.25

表 2　微量元素溶液配方(1.25 mL/L)

Tab. 2　The solution formulation of trace element (1.25 mL/L)

成分	浓度/(mg · L^{-1})	成分	浓度/(mg · L^{-1})
EDTA	15 000	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	220
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	430	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	190
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	240	$Na_2SeO_4 \cdot 10H_2O$	210
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	990	H_3BO_4	14
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	250	$NaWO_4 \cdot 2H_2O$	50

1.3　粗酶液的提取

取菌样于离心管中，离心 20 min 后倒去上清液，留下沉淀，将沉淀加入配制好的配方(Tris 缓冲液，0.1 mmol/L 二硫苏糖醇，1% 胆酸钠，0.5%脱氧胆酸钠)溶解混合，将混合液倒入烧杯中，放入磁力转子，于 0 ℃下 500 r/min 的速度搅拌 1.5 h，目的是将菌细胞破碎，形成菌悬；搅拌后再次离心 20 min，离心后取得的上清液即为粗酶液，舍去沉淀.

1.4　细胞色素 C 标准曲线的绘制

分别加入细胞色素 C(10 mmol/L)4、8、12、16、20、24 μL，用磷酸盐缓冲液补充至 4 000 μL. 此时细胞色素 C 浓度为 10、20、30、40、50、60 μmol/L. 加入保险粉至颜色变成粉红色，得到还原态细胞色素 C. 测得其吸光度，用得到的吸光度作标准曲线.

1.5　联氨氧化酶活性测定

酶活性强弱表征为 550 nm 波长下还原态细胞色素 C 的生成速率. 酶促反应体系包含 20 mmol/L磷酸盐缓冲溶液、50 μmol/L 细胞色素 C(氧化态)、50 μmol/L 肼和 200 μL 粗酶液，反应温度为(35±1) ℃. 联氨氧化酶活性的单位为 μmol/(g · min).

1.6　蛋白浓度测定

BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司. 在碱性条件下，蛋白将铜离子(Cu^{2+})还原为亚铜离子(Cu^+)，Cu^+与 BCA 试剂形成紫蓝色的络合物，测定其在 562 nm 处的吸光度，并与标准曲线做对比，即可计算待测蛋白的浓度.

2 联氨氧化酶的初步纯化

2.1 层 析

(1)DEAE-Sepharose FF 凝胶的处理:凝胶用纯净水反复冲洗直到形成较大颗粒胶体,用 Tris 缓冲液平衡.

(2)装柱:将层析柱固定于滴定架上,柱底垫圆形尼龙纱,出口接细塑料管并关闭出水.将浸泡于 20 mmol/L、pH8.0 Tris 缓冲液中的凝胶沿玻璃棒缓慢倒入柱中(注意不要有气泡),待凝胶自然沉降将上层盖子缓慢放入并拧紧.

(3)平衡:松开出水口螺旋夹,以 20 mmol/L、pH8.0 Tris 缓冲液平衡,控制流速为 2.0 mL/min,待流出液的紫外吸光度稳定时,停止平衡.

(4)加样、洗脱与收集:采用恒流泵以 2.0 mL/min的流速加入样品,待液体进入柱床后,用初始缓冲液洗脱大约两个柱体积,再分别用 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、2.0 mol/L 的 NaCl(平衡缓冲液配制)进行线性洗脱,控制流速为 2.0 mL/min.紫外蛋白监测,收集洗脱蛋白.

2.2 透析冻干

将 0.2 mol/L NaCl 洗脱下来的蛋白质液体进行透析脱盐,然后进行冻干,冻干的步骤如下:首先按制冷键,预冷 30 min 左右;预冷后将干燥物品放置于干燥盘中,将有机玻璃罩罩上,按下快速充气阀上的不锈钢片,将接嘴管拔出,最后按真空泵键,显示 999,直到 1 000 Pa 以下方可显示实际真空度.

2.3 超 滤

冻干后得到的酶蛋白用 Tris 缓冲液进行溶解,然后进行超滤过滤,超滤膜的截留相对分子质量分别为 50 kDa 和 100 kDa.经此步骤可得到相对分子质量小于 50 kDa、50～100 kDa 和大于 100 kDa 3 部分酶蛋白,超滤后用 20 mmol/L Tris 缓冲液洗膜,测各部分酶蛋白活性,最后将具有最高比活性的溶液挑选出来,4 ℃保存,备用.

3 醌类化合物对联氨氧化酶的影响探究

3.1 萃取醌类化合物对联氨氧化酶活性的影响

以乙醇为溶剂,因此设置乙醇为对照组,通过萃取,将厌氧氨氧化菌联氨氧化酶粗酶液中的辅酶 Q 萃取出来,此时测量萃取后联氨氧化酶的酶活性,并通过分光光度计测量酶活性变化的 OD 值.再将辅酶 Q 重新加入联氨氧化酶粗酶液中,探究此时联氨氧化酶的酶活性和 OD 值,对萃取前后的酶活性变化进行比较.

3.2 其他醌类化合物对联氨氧化酶活性的影响

先分别加入 0.03 和 0.06 mmol/L 辅酶 Q,测其联氨氧化酶活性及 OD 值.再探究 2-羟基-1,4-萘醌对联氨氧化酶活性的影响,分别加入0.03、0.06、0.3 和 0.6 mmol/L 的 2-羟基-1,4-萘醌,测量并比较加入不同量的 2-羟基-1,4-萘醌后联氨氧化酶活性及 OD 值的变化,并对加入量与加入辅酶 Q 的酶活性变化进行比较.最后探究蒽醌-2-磺酸钠盐对联氨氧化酶活性的影响,分别加入 0.03、0.06、0.3 和 0.6 mmol/L 的蒽醌-2-磺酸钠盐,同理测量并比较加入不同量的蒽醌-2-磺酸钠盐后联氨氧化酶活性及 OD 值的变化,并对加入量与加入辅酶 Q 及加入 2-羟基-1,4-萘醌的酶活性变化进行比较.

4 结果与讨论

4.1 粗酶液的制备与酶活性探究相关结果

4.1.1 还原态细胞色素 C 标准曲线的绘制 还原态细胞色素 C 标准曲线的绘制如图 2 所示(波长 550 nm).

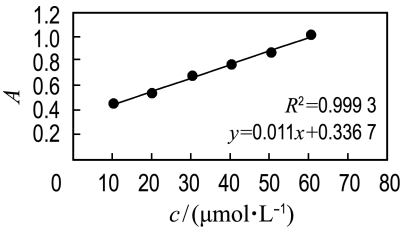


图 2 细胞色素 C 标准曲线

Fig. 2 CytC standard curve

4.1.2 BCA 标准曲线的绘制 BCA 标准曲线的绘制如图 3 所示(波长 562 nm).

经测量得到粗酶液吸光度为 0.477,通过图 3 中公式计算得到粗酶液蛋白含量为 0.347 mg/mL.

4.1.3 联氨氧化酶活性的测定计算 对联氨氧化酶活性进行测定,其不同时间下对应的吸光度

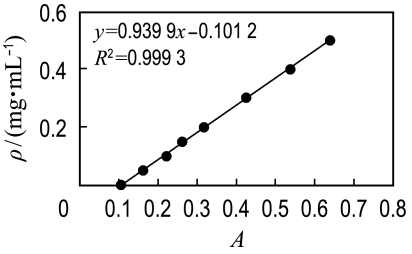


图 3　BCA 标准曲线

Fig. 3　BCA standard curve

及计算所得的细胞色素 C 浓度如表 3 所示.

表 3　联氨氧化酶活性的测定

Tab. 3　Determination of activity of HZO

时间/min	粗酶液吸光度 A	细胞色素 C 浓度/(μmol·L^{-1})
2	0.754	37.93
4	0.822	44.12
6	0.899	51.12
8	0.959	56.57
10	0.997	60.03
12	1.037	63.66
14	1.069	66.57
16	1.077	67.30
18	1.093	68.75
20	1.084	67.94

联氨氧化酶活性 a 计算公式如下：

$$a=(c-c_0)/(\tau\times\rho)$$

其中 c 为稳定后细胞色素 C 浓度，c_0 为初始细胞色素 C 浓度，τ 为达到稳定间隔时间，ρ 为粗酶液蛋白含量.

根据以上公式计算联氨氧化酶活性 $a=(68.75-37.93)/[(18-2)\times0.347]$ μmol/(g·min)=5.55 μmol/(g·min)，得出联氨氧化酶粗酶液的酶活性为 5.55 μmol/(g·min).

4.1.4　*温度对联氨氧化酶活性的影响*　图 4 实验数据表明吸光度随着温度的升高先升高后降低，也就是说联氨氧化酶活性随着温度的升高先升高后降低，可以看到 35 ℃时联氨氧化酶活性最高.

4.1.5　*pH 对联氨氧化酶活性的影响*　图 5 实验数据表明不同反应时间下吸光度都是先升高后降低，也就是说联氨氧化酶活性随着 pH 的升高先升高后降低，分析可以得到不同反应时间下

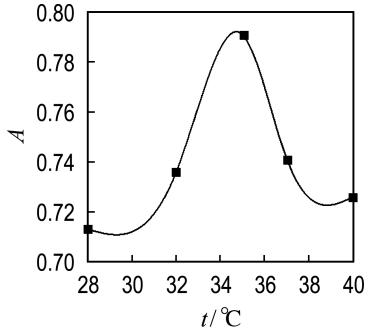


图 4　温度对联氨氧化酶活性的影响

Fig. 4　Effect of temperature on activity of HZO

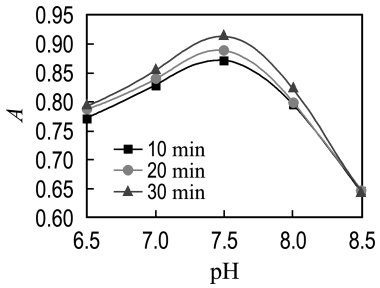


图 5　pH 对联氨氧化酶活性的影响

Fig. 5　Effect of pH on activity of HZO

pH=7.5 时联氨氧化酶活性最高.

4.2　联氨氧化酶的初步纯化结果

4.2.1　*DEAE 阴离子交换层析结果*　由表 4 和图 6 结果，通过计算可得经 DEAE 阴离子交换层析后，联氨氧化酶集中在 0.2 mol/L NaCl 洗脱液中，其他浓度的 NaCl 洗脱液中虽然也有蛋白含量，但是蛋白含量都不高，而且从层析图谱可以看出其他洗脱液中所含蛋白应该不是联氨氧化酶蛋白，0.2 mol/L NaCl 洗脱液中蛋白酶活性是粗酶液的 2.3 倍.

4.2.2　*超滤结果*　通过表 5 可以看出 DEAE 阴离子交换层析和超滤的方法都能使联氨氧化酶得到纯化，DEAE 阴离子交换层析将联氨氧化酶活性增加到原来的 2.3 倍，层析后取 0.2 mol/L NaCl 洗脱下来的蛋白再进行超滤后，将联氨氧化酶活性增加到原来的 6.1 倍. 表 6 计算结果表明 0.2 mol/L NaCl 洗脱下来的联氨氧化酶活性集中在超滤 50～100 kDa 的液体中，纯化蛋白相对分子质量在 50～100 kDa.

4.3　醌类化合物对联氨氧化酶活性的影响结果

由图 7 可知以乙醇为溶剂会使酶活性降低，

表 4 不同浓度 NaCl 洗脱的联氨氧化酶活性

Tab. 4 The activity of HZO at different concentrations of NaCl eluent

名称	蛋白含量/(mg·mL^{-1})	细胞色素 C 增长浓度/(μmol·L^{-1}·min^{-1})	联氨氧化酶活性/(μmol·g^{-1}·min^{-1})
粗酶液	0.347	1.926	5.55
0.1 mol/L NaCl 洗脱	0.083	0.525	6.51
0.2 mol/L NaCl 洗脱	0.048	0.614	12.79
0.3 mol/L NaCl 洗脱	0.046	0.315	6.85
0.4 mol/L NaCl 洗脱	0.056	0.298	5.32
1.0 mol/L NaCl 洗脱	0.074	0.341	4.61

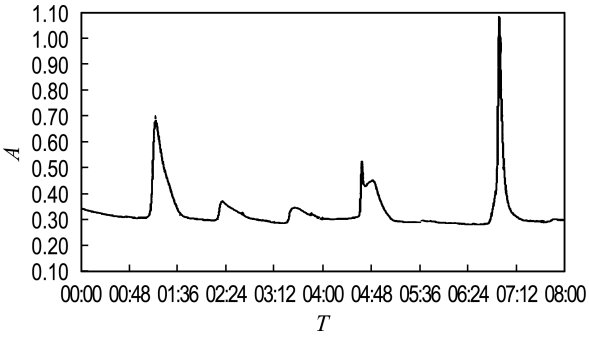


图 6 层析谱图

Fig. 6 Tomographic spectrum

由 5.688 μmol/(g·min)降低到 3.886 μmol/(g·min);萃取出辅酶 Q,酶活性降低至原来的 1/3,重新加入辅酶 Q,对提高酶活性效果最好.

由图 8 可知,与乙醇对照相比加 0.06 mmol/L 辅酶 Q 的酶活性是 9.264 mol/(g·min),是乙醇

表 5 联氨氧化酶初步纯化总结

Tab. 5 Summary of preliminary purification of HZO

纯化步骤	酶活性/(μmol·g^{-1}·min^{-1})	纯化倍数
粗酶液	5.55	1
DEAE 阴离子交换层析	12.79	2.3
超滤	33.75	6.1

表 6 超滤后细胞色素 C 吸光度测定

Tab. 6 Determination of CytC absorbance after ultrafiltration

相对分子质量	蛋白含量/(mg·mL^{-1})	细胞色素 C 增长浓度/(μmol·L^{-1}·min^{-1})	联氨氧化酶活性/(μmol·g^{-1}·min^{-1})
小于 50 kDa	0.256	0.009	0.04
50～100 kDa	0.136	4.590	33.75
大于 100 kDa	0.880	0	0

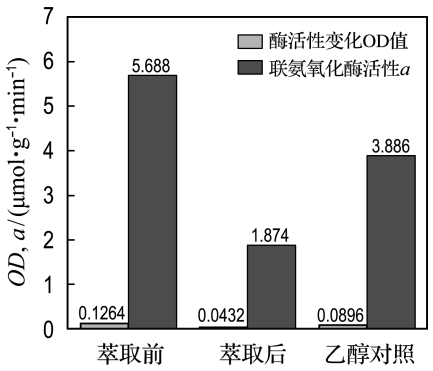


图 7 萃取醌类化合物对联氨氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effect of extraction of quinones on the activity of HZO

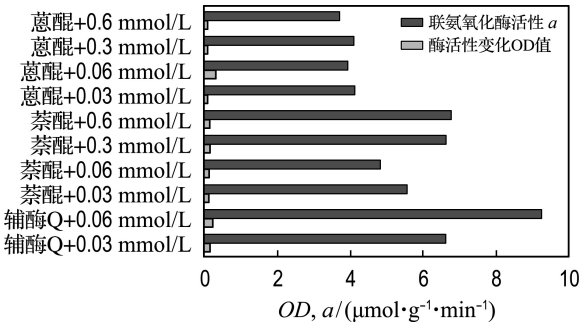


图 8 加入醌类化合物联氨氧化酶活性测定对比图

Fig. 8 Comparative diagram for the determination of HZO activity with quinones

对照的 2.38 倍；2-羟基-1,4-萘醌对酶活性提高效果稍差，与乙醇对照相比加 0.6 mmol/L 2-羟基-1,4-萘醌酶活性是其 1.74 倍；蒽醌-2-磺酸钠盐对酶活性提高基本无影响，与乙醇对照相比加入 0.6 mmol/L 蒽醌-2-磺酸钠盐的酶活性是其活性的 0.96.

5　结　论

(1)联氨氧化酶活性最适温度为 35 ℃，最适 pH 为 7.5.

(2)通过 DEAE 阴离子交换层析可知联氨氧化酶集中在 0.2 mol/L NaCl 洗脱液中，酶活性是粗酶液的 2.3 倍，因此层析法可以进一步纯化联氨氧化酶.

(3)超滤结果表明，纯化的联氨氧化酶蛋白相对分子质量在 50～100 kDa，联氨氧化酶活性提高到原来的 6.1 倍.

(4)通过正庚烷萃取辅酶 Q，粗酶液酶活性降低，投加辅酶 Q 对提高酶活性效果最好，2-羟基-1,4-萘醌对酶活性提高效果稍差，蒽醌-2-磺酸钠盐对酶活性基本无影响.

参考文献：

[1] 陈子爱，陈会娟，魏本平，等. $n(NO_3^-\text{-}N)/n(NO_2^-\text{-}N)$对混培养菌与纯培养菌同步脱氮除硫的影响[J]. 环境科学，2014，**35**(2)：746-752.
CHEN Ziai，CHEN Huijuan，WEI Benping，*et al*. Effects of the ratio of NO_3^--N to NO_2^--N on the removal of sulfide and nitrogen by mixed culture and pure culture [J]. **Environmental Science**，2014，**35**(2)：746-752. (in Chinese)

[2] MULDER A，VAN DE GRAAF A A，ROBERTSON L A，*et al*. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. **FEMS Microbiology Ecology**，1995，**16**(3)：177-183.

[3] LI Jianwei，LI Jialin，GAO Ruitao，*et al*. A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater：Optimization strategies based on key functional microorganisms [J]. **Bioresource Technology**，2018，**265**：498-505.

[4] BURGIN A J，HAMILTON S K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways [J]. **Frontiers in Ecology and the Environment**，2007，**5**(2)：89-96.

[5] ZHOU Zhichao，WEI Qiaoyan，YANG Yuchun，*et al*. Practical applications of PCR primers in detection of anammox bacteria effectively from different types of samples [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2018，**102**(14)：5859-5871.

[6] VAN NIFTRIK L A，FUERST J A，SINNINGHE DAMSTÉ J S，*et al*. The anammoxosome：an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. **FEMS Microbiology Letters**，2004，**233**(1)：7-13.

[7] 郭　星，赵　光，孙　婷，等. 厌氧氨氧化微生物学机制及其在污水脱氮工艺中的应用进展[J]. 世界科技研究与发展，2017，**39**(1)：45-50.
GUO Xing，ZHAO Guang，SUN Ting，*et al*. Anaerobic ammonia oxidation mechanism of microbiology and its application in sewage denitrification process [J]. **World Sci-Tech R & D**，2017，**39**(1)：45-50. (in Chinese)

[8] DALSGAARD T，CANFIELD D E，PETERSEN J，*et al*. N_2 production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce，Costa Rica [J]. **Nature**，2003，**422**(6932)：606-608.

[9] TROJANOWICZ K，PLAZA E，TRELA J. Pilot scale studies on nitritation-anammox process for mainstream wastewater at low temperature [J]. **Water Science and Technology**，2016，**73**(4)：761-768.

[10] REGMI P，HOLGATE B，FREDERICKS D，*et al*. Optimization of a mainstream nitritation-denitritation process and anammox polishing [J]. **Water Science and Technology**，2015，**72**(4)：632-642.

[11] SHIMAMURA M，NISHIYAMA T，SHIGETOMO H，*et al*. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture [J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2007，**73**(4)：1065-1072.

[12] VAN DE GRAAF A A，DE BRUIJN P，ROBERTSON L A，*et al*. Metabolic pathway of

anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor [J]. **Microbiology**, 1997, **143**(7): 2415-2421.

[13] SCHALK J, OUSTAD H, KUENEN J G, *et al*. The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1998, **158**(1): 61-67.

[14] SCHALK J, DE VRIES S, KUENEN J G, *et al*. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation [J]. **Biochemistry**, 2000, **39**(18): 5405-5412.

[15] QUAN Zhexue, RHEE S K, ZUO Jian′e, *et al*. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor [J]. **Environmental Microbiology**, 2008, **10**(11): 3130-3139.

[16] LI Xiaoran, DU Bing, FU Haixia, *et al*. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community [J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2009, **32**(4): 278-289.

[17] 周英杰，王淑梅，张兆基，等. 厌氧氨氧化菌的代谢途径及其关键酶的研究进展 [J]. 生态学杂志，2012，**31**(3)：738-744.
ZHOU Yingjie, WANG Shumei, ZHANG Zhaoji, *et al*. Metabolic pathways of anammox bacteria and related key enzymes: A review [J]. **Chinese Journal of Ecology**, 2012, **31**(3): 738-744. (in Chinese)

[18] 邢家丽，梁 甘，孟凡刚. 无纺布-生物反应器快速启动厌氧氨氧化脱氮工艺 [J]. 环境科学与技术，2019，**42**(7)：105-110.
XING Jiali, LIANG Gan, MENG Fangang. Rapid start-up of anammox denitrification process in a novel nonwoven bioreactor [J]. **Environmental Science & Technology**, 2019, **42**(7): 105-110. (in Chinese)

[19] THIRD K A, SLIEKERS A O, KUENEN J G, *et al*. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria [J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2001, **24**(4): 588-596.

Preliminary purification of hydrazine oxidizing enzyme and effect of quinones on its activity

LI Zhuxin, ZHANG Shoutong, LI Yang, YAN Song*

(School of Environment and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116021, China)

Abstract: AnAOB is a kind of chemoautotrophic bacteria, which has unique physiological and biochemical characteristics and biological denitrification mechanism. The laboratory expanding culture of AnAOB is conducted, the property of its main metabolic enzyme-hydrazine oxidizing enzyme (HZO) is studied, the preliminary purification of HZO is carried out, and the effect of quinones on the activity of HZO is discussed. It is found that the optimum enzyme activity temperature of HZO is 35 ℃, the optimum pH is 7.5. Enzyme purification result shows that the relative molecular mass of ultrafiltration is 50-100 kDa. Coenzyme Q has the best effect on improving enzyme activity, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone has a less effect on enzyme activity improvement, and anthraquinone-2-sulfonate has no effect on enzyme activity.

Key words: AnAOB; hydrazine oxidizing enzyme (HZO); purification; quinones; enzyme activity