

产胞外邻苯二酚 1,2-双加氧酶的菌种筛选和发酵条件的研究

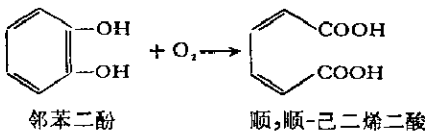
李 钦 李 丽 寇秀芬 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

从 112 株细菌中筛选出两株产胞外邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。进行了该菌产酶的发酵条件试验。产酶的最适温度为 30℃, 最适起始 pH 为 6.8—7.0。葡萄糖、麦芽糖和甘油对产酶有明显的抑制作用, 苯甲酸钠对产酶有促进作用。氨态氮对菌体生长和产酶是必需的。琥珀酸钠是酶形成的有效诱导物。采用 0.15% 苯甲酸钠培养基 (pH6.8—7.0), 于 30℃ 振荡培养 72h, 每毫升发酵液酶活力可达 10 单位。

关键词 邻苯二酚 1, 2-双加氧酶

1955 年, 两种类型的加氧酶, 即单加氧酶和双加氧酶, 分别由两个研究组发现。Mason 及其合作者^[1]发现在 3, 4-二甲基苯酚氧化成 4, 5-二甲基邻苯二酚时, 结合到底物中的一个氧原子唯一地是从分子氧而来, 进行催化的酶是一种单加氧酶。Hayaishi 及其同工作者^[2]证明, 酶法断裂邻苯二酚的苯环, 进而生成顺, 顺-己二烯二酸是由于底物直接结合了分子氧的两个氧原子的结果。进行催化的酶是一种双加氧酶, 称做邻苯二酚 1, 2-双加氧酶 (EC 1.13.11.1), 其催化反应是:



自从发现邻苯二酚 1, 2-双加氧酶以来, 许多其它加氧酶相继发现。这些酶有重要的生理功能, 参与生物体的许多代谢过程^[3,4]。由于邻苯二酚 1,2-双加氧酶可以催化苯环的邻位环裂解, 所以又称为开环酶。近年来, 发现该酶可以用来进行有机物质的合成和转化以及在消除芳环化合物污染上的独特作用, 已引起人们的重视^[5,6]。国外对于微生物来源的邻苯二酚 1, 2-双

加氧酶进行了许多研究, 包括酶的提纯及性质、结构与功能和催化动力学等^[7-13]。国外报道该酶都是胞内酶, 国内尚无有关报道。我们在研究工作中, 除筛选到胞内邻苯二酚 1, 2-双加氧酶外, 还筛选到了产胞外酶的菌株。本文报道产胞外邻苯二酚 1,2-双加氧酶的菌种筛选和发酵条件的研究结果。

材料和方法

(一) 菌株

供筛选的菌种包括 5 个属共计 112 株, 大部分由本所菌种保藏室和周慧玲同志提供。

(二) 斜面培养基

牛肉汁琼脂培养基, 用于菌株的保存和移种。含有苯甲酸钠的合成培养基用于菌株的初筛。

(三) 筛选培养基组成(%)

苯甲酸钠 0.15, 琥珀酸钠 0.27, KH_2PO_4 0.2, Na_2HPO_4 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 微量 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} 和 Mn^{2+} , pH6.8, 250ml 三角瓶中装 50 ml 培养基, 1.05kg/cm² 灭菌 30min 备用。

(四) 仪器及试剂

本文于 1987 年 3 月 6 日收到。

中国科学院合同局和中国石油化工总公司发展部为本项研究提供经济资助; 本所菌种保藏室和周慧玲同志提供筛选菌种, 特此一并致谢。

G-24 恒温摇床为美国 New Brunswick Scientific Co. INC. 产品, UV-120-02 型紫外分光光度计为日本 Shimadzu 公司产品。苯甲酸钠 (A. R.), 北京化工厂产品。琥珀酸钠 (A. R.), 上海试剂一厂产品。邻苯二酚 (A. R.), 北京化工厂产品。顺, 顺-己二烯二酸系美国 Celanese 公司产品。

(五) 邻苯二酚 1, 2-双加氧酶活力的测定

测定方法参照 Ornston^[1] 的报道, 适当加以改进。在 UV-120-02 型紫外分光光度计上测定。分析系统包含 20 μ mol/L 邻苯二酚, 33 μ mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.5, 取发酵液和离心后的上清液 100—150 μ l 分别测定。酶反应在比色杯中进行。当加入酶时反应开始。记录最初 3min 的在 260 nm 光吸收增加值。上述条件下, 在 25 $^{\circ}$ C, 每分钟转化 1 微克分子邻苯二酚到顺, 顺-己二烯二酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

(六) 生物量测定

取 0.2ml 发酵液加入 0.8ml 水, 在 440nm, 1cm 光程, 测定吸光度值。

结 果

(一) 初筛

选择 5 个属的 112 株细菌, 重点是假单胞菌。将冻干菌株在牛肉汁斜面上活化, 然后转接到含苯甲酸钠的合成培养基

斜面上。只当菌株含有邻苯二酚 1, 2-双加氧酶时, 才能在这种培养基上生长。根据生长情况分三个等级(+, ++, +++) 来记录, 结果列于表 1。生长情况为+, 19 株; ++, 6 株; +++, 33 株。

(二) 复筛

在 50ml 试管中, 加 5ml 筛选培养基, 1.05kg/cm² 杀菌 30min。将初筛得到的菌株分别接入试管培养基中。在 30 $^{\circ}$ C 摇床上培养 24h, 此为种子液。

将种子液 5ml, 接入装筛选培养基的三角瓶中, 在 30 $^{\circ}$ C 摇床上培养 72h。分别测发酵液和离心后的上清液酶活力。重复筛选三次, 在初筛菌种中得到两株产胞外邻苯二酚 1, 2-双加氧酶较高的菌株, 它们都是假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 其编号为 85037 和 85105。两株菌的产酶条件试验是同时进行的, 结果基本一致。

(三) 培养条件对邻苯二酚 1, 2-双加氧酶形成的影响

1. 培养时间对产酶的影响: 在 100ml 三角瓶中加入 20ml 复筛培养基, 于 30 $^{\circ}$ C 200r/min 摇床上培养, 定时取样测发酵液酶活力 (图 1)。该菌在培养 48 至 72h 期间大量产酶, 最适培养时间为 72h。延长

表 1 初筛结果

Table 1 Result of preliminary screening

菌种名称 Name of bacteria	株 数 Number of strain	具有酶活力的菌株数 Number of active strain		
		+	++	+++
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	80	13	6	33
醋杆菌 <i>Acetobacter</i> sp.	17	3		
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	8	2		
黄色短杆菌 <i>Brevibacterium flavum</i>	5	1		
偶然分枝杆菌 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	2			
总 计 Total	112	19	6	33

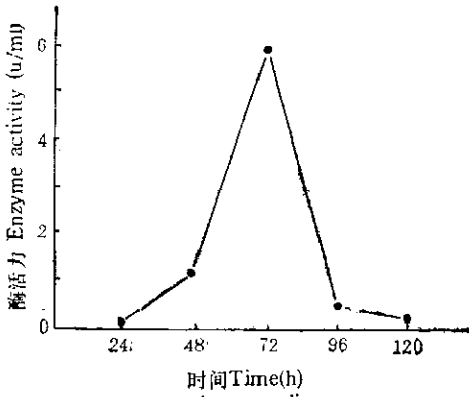


图 1 培养时间与产酶的关系

Fig. 1 Time course of enzyme formation

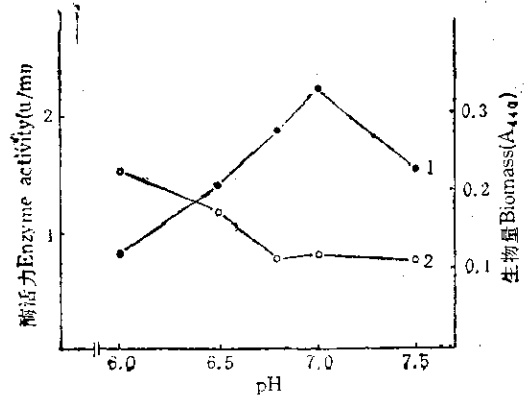
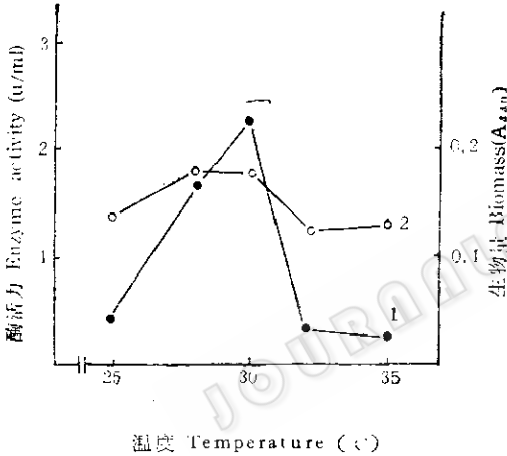


图 3 培养基的起始 pH 对产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass



温度 Temperature (°C)

图 2 培养温度对产酶的影响

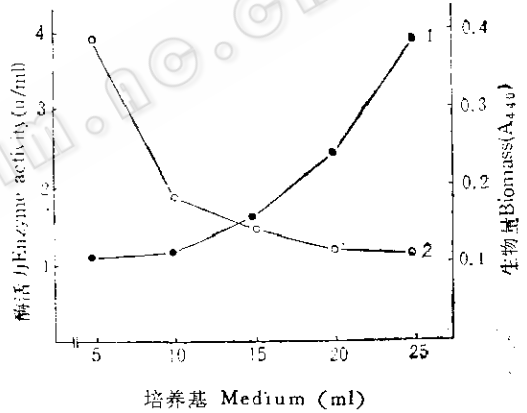
Fig. 2 Effect of temperature on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass

培养时间,酶活力急剧下降。

2. 培养温度对产酶的影响: 在 100ml 三角瓶中加 20 ml 复筛培养基, 在 25—35℃之间五个不同温度, 用 200r/min 摇床培养 72h, 测定发酵液酶活力和生物量(图 2)。产酶的最适培养温度为 30℃。

3. 培养基的起始 pH 对产酶的影响: 改变磷酸氢二钠和磷酸二氢钾的配比, 调节培养基起始 pH。培养基装量及培养条件同上。培养 72h 后测发酵液的酶活力和



培养基 Medium (ml)

图 4 培养基装量对产酶的影响

Fig. 4. Effect of medium volume on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity 2. 生物量 Biomass

生物量(图 3)。培养基的最适起始 pH 为 7.0, 在 pH 6.8—7.0 之间产酶基本稳定。

4. 培养基装量对产酶的影响: 在 100 ml 三角瓶内盛装不同量的培养基接种培养, 在 72h 取样分析。从图 4 可以看出, 加大培养基装量, 酶活力也随着增加。因培养基装量太大会污染瓶口, 所以最多只装 25ml, 酶活力未出现下降趋势。

5. 碳源对产酶的影响: 以复筛培养基作为基础培养基, 另外加入 0.5% 的各种不

同碳源进行试验,结果如表 2。葡萄糖、麦芽糖和甘油对菌的生长有利,而对产酶有抑制作用。可溶性淀粉对产酶有轻微促进作用。蔗糖对产酶无明显作用。

表 2 碳源对菌的生长和产酶的影响

Table 2 Effect of carbon sources on cell growth and enzyme production

碳源 Carbon source	生物量 Biomass (A_{440})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
葡萄糖 Glucose	0.52	0
蔗糖 Sucrose	0.10	0.62
麦芽糖 Maltose	0.21	0
甘油 Glycerol	0.90	0
可溶性淀粉 Soluble starch	0.10	0.77
对照 Control	0.19	0.65

6. 氮源对产酶的影响: 以复筛培养基作为基础培养基, 另外加入各种不同氮源进行试验, 结果列于表 3。有机氮源, 例如, 牛肉膏、鱼脍、蛋白脍(大豆)和酵母膏对产酶都有抑制作用。氨态氮源, 例如, $(NH_4)_2SO_4$ 、 $(NH_4)_2CO_3$ 、 NH_4NO_3 和 NH_4Cl ,

表 3 各种氮源对菌生长和产酶的影响

Table 3 Effect of various nitrogen sources on cell growth and enzyme production

氮源 Nitrogen sources	浓度 Concentration	生物量 Biomass (A_{440})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
牛肉膏 Beef extract	1.0	0.34	0.43
鱼脍 Fish peptone	1.0	0.30	0.80
蛋白脍(大豆) Peptone(soya)	1.0	0.11	1.00
酵母膏 Yeast extract	1.0	0.29	1.10
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	0.14	17.11
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	0.20	6.75
$(NH_4)_2CO_3$	0.1	0.14	29.84
NH_4NO_3	0.1	0.16	19.30
NH_4Cl	0.1	0.24	17.76
对照 Control		0.12	3.14

当用量为 1% 时, 对产酶都有明显促进作用, 尤以 $(NH_4)_2CO_3$ 更突出。

7. 诱导物对产酶的影响: 在不含琥珀酸钠的基本培养基中, 分别加入各种诱导物, 接种培养 72h 后, 测定生物量和酶活, 结果列于表 4。邻苯二酚、己二酸、顺, 顺-己二烯二酸、 β -酮基己二酸和 α -酮戊二酸对产酶都有抑制作用。琥珀酸钠对产酶有

表 4 诱导物对产酶的影响

Table 4 Effect of inducers on enzyme production

诱导物 Inducer	浓度 Concentration	生物量 Biomass (A_{440})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
邻苯二酚 Catechol	0.2	0.16	0
己二酸 Adipic acid	0.2	0.02	0
顺, 顺-己二烯二酸 cis, cis-muconic acid	0.2	0.21	0
β -酮基己二酸 β -keto adipic acid	0.2	0.14	0
α -酮戊二酸 α -keto glutaric acid	0.2	0.02	0
琥珀酸钠 Sodium succinate	0.2	0.10	3.29
对照 Control		0.18	0.24

明显诱导作用,可提高酶产率 10 倍以上。

8. 苯甲酸钠对产酶的影响: 苯甲酸钠是培养基中的基本碳源。在培养基中加入不同量的苯甲酸钠,振荡培养 72h,测定生物量和酶活。图 5 表明,苯甲酸钠的浓度对酶产率影响很大,最适用量为 0.15%。

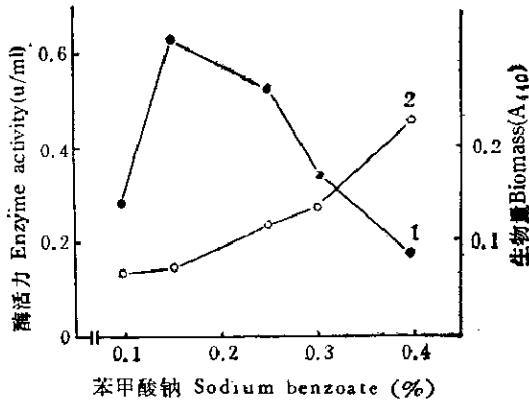


图 5 苯甲酸钠对产酶的影响

Fig. 5 Effect of sodium benzoate on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity
2. 生物量 Biomass

讨 论

我们从 112 株细菌中筛选得到假单胞菌 85037 和 85105 两株产胞外邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的菌株,其发酵液酶活力为 10u/ml 以上。国外只报道过胞内邻苯二酚 1, 2-双加氧酶,菌体破碎后,得到无细胞提取液,再折算成发酵液酶活力,一般为 0.2—0.7u/ml^[9,10,12]。可见 *Pseudomonas* sp. 85037 和 85105 的产酶量比以上报道均高。由于苯环很难穿过细胞壁,使用胞内邻苯二酚 1, 2-双加氧酶时,一般要把细胞破碎,将酶提取出来才能应用,这个过程相当复杂。而获得产高活力胞外双加氧酶的菌种为实际应用创造了有利的条件。

一般报道形成邻苯二酚 1, 2-双加氧酶过程中,底物和产物起诱导作用^[4]。我们的实验表明,琥珀酸钠对该酶形成具有

强烈诱导作用,可提高产酶率 10 倍以上。苯甲酸钠是该胞外酶形成的必需碳源。氨态氮源能大大提高该胞外酶的产率,而有机氮源作用不明显。从发酵时间上看,产胞外酶的时间是在培养 48 至 72h 之间。

邻苯二酚 1, 2-双加氧酶活力测定选择在 260 nm 测定 3 分钟内的吸收增加值的方法。这样做是为了可专一性地测定酶催化反应产物顺,顺-己二烯二酸的形成。因为它在 260nm 波长的吸收很强,而反应底物邻苯二酚的吸收则极弱。在 25℃ 进行测定,一个样品只需 5min,也可避免邻苯二酚氧化作用的干扰。我们用发酵液的上清液催化邻苯二酚开环,对反应液进行纸色谱分析,在短波紫外灯下观察层析斑点,证明反应产物确是顺,顺-己二烯二酸(图 6)。

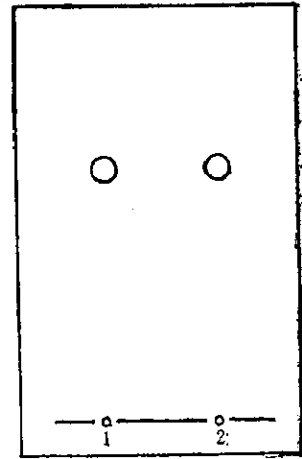


图 6 胞外邻苯二酚 1, 2-双加氧酶反应产物的纸色谱图

Fig. 6 Paper chromatograph of reaction product of extracellular catechol 1, 2-dioxygenase

1. 标准样品(顺,顺-己二烯二酸) Standard (cis, cis-muconic acid)
2. 反应产物 Reaction product 展开剂——乙醇:氨水:水=80:4:16
Development Solvent——alcohol:ammonium hydroxide:water = 80:4:16

参 考 文 献

- [1] Mason, H. S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 2914, 1955.
- [2] Hayaishi, O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 5450, 1955.
- [3] Hayaishi, O.: *Oxygenases* (ed. Hayaishi, O.), New York, Academic Press, p. 1, 1962.
- [4] Doelle, H. W.: *Bacterial Metabolism*, 2nd Edition, Academic Press, New York, San Francisco, London, p. 499—557, 1975.
- [5] 孟广震: 生物工程学报, **1**(2): 1, 1985.
- [6] 李 钦: 生物工程进展, **2**: 30, 1986.
- [7] Nakazawa, H. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **54**: 65, 1963.
- [8] Nakai, C. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**: 12, 1979.
- [9] Patel, R. N. et al.: *J. Bacteriol.*, **127**: 536, 1976.
- [10] Dorn, E. et al.: *Biochem. J.*, **174**: 73, 1978.
- [11] Ornston, L. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, **241**: 3776; 3787, 1966.
- [12] Ornston, L. N.: *J. Biol. Chem.*, **241**: 3800, 1966.
- [13] Lawrence, Q. Jr.: *Adv. Inorg. Biochem.*, **5**: 167, 1983.

SCREENING OF STRAINS PRODUCING EXTRACELLULAR CATECHOL 1,2-DIOXYGENASE AND FERMENTATION CONDITIONS

Li Qin Li Li Kou Xiufen Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Two strains of *Pseudomonas* sp. having the extracellular catechol 1, 2-dioxygenase activity were selected from 112 bacterial strains. The conditions for enzyme production of the strains were examined. The optimal temperature and pH for enzyme formation were 30°C and pH 6.8—7.0 respectively. Enzyme formation was enhanced by sodium benzoate, and was markedly inhibited by glucose, maltose and glycerol. Ammoniacal nitrogen so-

urces were essential for cell growth and enzyme production. Sodium succinate was an effective inducer for enzyme formation. When the organism was grown in 0.15% sodium benzoate medium (pH 6.8—7.0) at 30°C for 72 hours, about 10 units of catechol 1,2-dioxygenase per ml was obtained.

Key word

Catechol 1,2-dioxygenase