

臭味假单胞菌邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的制备 和一般性质

寇秀芬 李 钦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

邻苯二酚 1, 2-双加氧酶(EC 1.13.11.1)降解邻苯二酚为顺, 顺-己二烯二酸, 俗名粘康酸。它不仅用于合成热缩性树脂、感光性树脂及一些新功能树脂, 而且是昂贵的电子材料和药用材料, 由于它容易转化为己二酸, 所以它也是生产尼龙的原料^[1]。用化学法制造顺, 顺-己二烯二酸十分困难, 生物法却较简单。目前, 日本以苯甲酸为原料已大规模生产^[2]。本文报道臭味假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 84103 胞内酶的提取和一般性质的初步研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 化学试剂

顺, 顺-己二烯二酸为美国 Celanese 公司产品, 其他均为市售商品。

(二) 菌种

臭味假单胞菌 84103, 牛肉汁斜面培养 24 小时备用。

(三) 酶的制备

1. 菌体培养: 使用含苯甲酸钠、琥珀酸钠和其他金属离子的培养基^[3] (pH 7.0), 接种后于 30℃ 摇床培养 66 小时, 500r/min 离心 20min, 收集菌体。

2. 菌体按 1:4 的比例悬浮于 EDA-HCl 缓冲液中, 在冰浴中使用 Braun-Sonic 200 超声发生器破碎细胞, 冷冻离心 (10000r/min) 30min, 获得粗酶提取液。进一步用不同饱和度的硫酸铵分级沉淀, 取 45—50% 饱和度硫酸铵盐析组份供实验用。

(四) 酶活力的测定

取 0.1mmol/L 的邻苯二酚溶液 (pH 7.5) 3ml, 加适量的酶液, 在 25℃ 水浴中反应 10min, 立刻煮沸终止反应(以死酶同样反应做为对照), 离心, 在紫外 UV-120-02 分光光度计 260nm 测定

上清液的吸光度, 计算酶活力和相对酶活力。

在上述条件下, 每分钟形成一微克分子粘康酸所需的酶量被定义为一个酶活力单位。

(五) 产物分析

用纸色谱法和紫外分析仪 EP 554 (波长 300—200 nm) 扫描定性分析。

结 果

(一) 酶的硫酸铵分级沉淀

从图 1 可见, 蛋白及酶活力主要分布在硫酸铵饱和度 40—50% 之间, 在 45% 饱和度时酶活力最高。

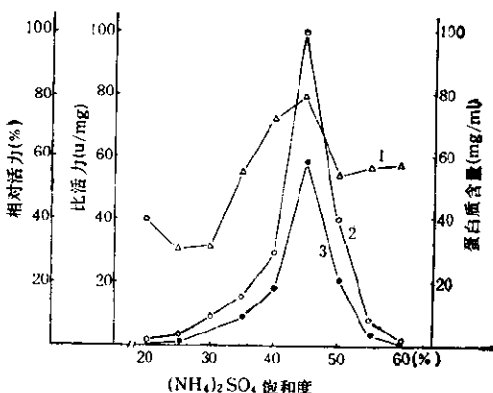


图 1 酶的硫酸铵分级沉淀

1. 蛋白含量; 2. 相对酶活力; 3. 比活力

(二) 酶的性质

1. 酶作用的最适 pH 为 7.5—8.0; 最适温度

本文于 1989 年 1 月 27 日收到。

杨开宇先生实验室提供紫外灯检测, 谭华荣同志帮助照相, 在此一并致谢。

为 25—30℃(图 2, 图 3)。

2. 该酶在 pH 7.5—9.0 之间和 27℃ 以下较稳定。

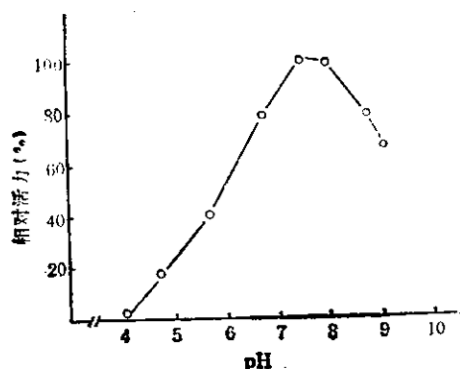


图2 pH对酶活力的影响

pH 4.0—8.0 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液;

pH 8.8—9.0 硼砂-氢氧化钠缓冲液

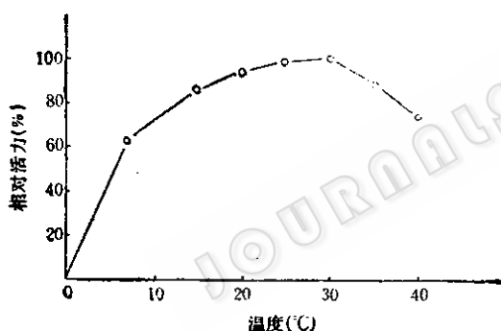


图3 温度对酶活力的影响

3. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 金属离子对该酶有强烈的抑制作用。

(三) 酶作用产物的分析

硫酸级分的酶催化转化 30mmol/L 的邻苯二酚溶液 (pH 7.5)，终止反应后离心，取上清液 40 μl ，点样于新华 3 号滤纸上，展开剂为乙醇:氨:水(20:1:4)，然后在紫外灯下观察到有与标准顺, 顺-己二烯二酸一致的层析点。将反应液进一步用有机溶剂提取，所得样品再进行纸层析，仅有一个与标准样品一致的层析点(图 4)。将样品在紫外分析仪上扫描，在 260nm 处有与标准一致的吸收峰(图 5)。

讨 论

来自 84103 菌的酶，酶系不纯，邻苯二酚 1,2



图4 反应产物的纸色谱

1. 标准顺, 顺-己二烯二酸; 2. 酶反应液; 3. 提取产物; 4. 邻苯二酚(底物)

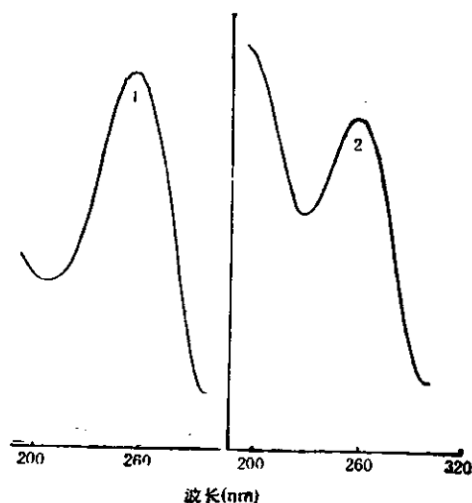


图5 紫外吸收光谱

1. 标准顺, 顺-己二烯二酸; 2. 酶反应产物

-双加氧酶的活力较低。据实验现象分析，可能含有酚氧化酶、内酯化酶等。从紫外吸收光谱可见，

产物与标准吸收峰其低谷二者不尽一致,可能是产物中含有另一种化合物,两种化合物吸收峰叠加作用所致。

参 考 文 献

[1] Nobuji Yoshikawa: Bioindustry, 4(8): 616

—621, 1987.

[2] 孟广震: 生物工程信息快报, 12: 7, 1989。

[3] 李 钦等: 生物化学与生物物理进展, 5: 44—47, 1987。

THE PREPARATION AND PROPERTIES OF CATECHOL-1,2-DIOXYGENASE FROM *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Kou Xiufen Li Qin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Catechol-1, 2-dioxygenase (EC 1.13.11.1) catalyzes the degradation of catechol to cis, cis-muconic acid. The biochemical properties of catechol-1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 84103 were investigated. The optimum pH and temperature is 7.5—8.0 and 25—30°C, respectively. Cu^{2+} , Zn^{2+} inhibit the enzyme activity. The paper chromatograph

and UV absorption spectrum of enzymatic reaction product are accordant with those of the standard muconic acid.

Key words

Catechol-1, 2-dioxygenase; cis, cis-muconic acid; *Pseudomonas putida*