

苯甲酸 1,2-双加氧酶高活力菌株的筛选和 发酵条件的研究

李 钦 刘 奔

(中国科学院微生物研究所,北京)

从 176 株细菌中,筛选出苯甲酸 1,2-双加氧酶的高活力菌株假单胞菌(*Pseudomonas*)137。进行了该菌产酶的发酵条件试验。产酶的最适温度为 32℃,最适起始 pH 为 6.5—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 0.1% 苯甲酸钠和 0.2% 琥珀酸钠培养基 (pH 6.5—7.0),于 32℃ 振荡培养 72 小时,可获得高活力的苯甲酸 1,2-双加氧酶,每克菌体酶活力可达 5—8 单位。

关键词 苯甲酸;双加氧酶

苯甲酸 1,2-双加氧酶 (EC1.13.99.2) 催化苯甲酸转化成邻苯二酚^[1]。在这个反应中,由于苯甲酸的 COOH 基必须转变成邻苯二酚的两个羟基,人们认为这个反应必定包含某些中间步骤。通过 [¹⁴C] 标记试验已初步研究清楚了这些中间步骤^[1-3]。

苯甲酸 1,2-双加氧酶是微生物降解芳香烃的一个关键酶,它催化氧化开环的第一步反应^[4,5],该酶在研究微生物的芳香烃代谢中占有重要位置。近年来,发现该酶可以用来合成邻苯二酚以及消除芳环化合物的污染,已引起人们的重视^[6,7]。邻苯二酚是多种农药和医药的原料,我国每年都要大量进口。因此,苯甲酸 1,2-双加氧酶的研究在理论上和应用上均有重要意义。国外对于微生物来源的苯甲酸 1,2-双加氧酶进行了许多研究,包括菌种的选育,酶的提纯、性质以及催化机制等^[8-10]。目前我国还没有关于这个酶的研究报导。本文着重报导苯甲酸 1,2-双加氧酶高活力菌株的筛选和发酵条件的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

供筛选的菌种有 176 株,包括 5 个和 45 株未定名的菌株。一部分由本所菌种保藏室提供,另一部分是从土样中分离得到的。

(二) 斜面培养基

细菌用牛肉汁琼脂培养基,假丝酵母用麦芽汁培养基,用于菌株保存和移种。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+} , pH 6.8, 250 ml 三角瓶中装 50 ml 培养基, 1.05 kg/cm² 灭菌 30 min 备用。

本文于 1989 年 3 月 9 日收到。

本工作为国家“七五”攻关项目。张树政教授担任本课题顾问,本所菌种保藏室提供一部分供筛选的菌种,特此一并致谢。

(四) 仪器及试剂

G-24 恒温摇床为美国 New Brunswick Scientific Co. INC. 产品。UV-120-20 型紫外分光光度计为日本 Shimadzu 公司产品。苯甲酸钠 (A. R.) 和邻苯二酚 (A. R.) 为北京化工厂产品。琥珀酸钠 (A. R.) 为上海试剂一厂产品。NADH, 为 Sigma 公司产品。

(五) 苯甲酸 1, 2-双加氧酶活力的测定

酶活力测定方法根据 Hagihara 等^[9,10]的报告, 在 UV-120-02 型紫外分光光度计上测定。酶反应在比色杯中进行, 记录在 340 nm 时光吸收的减少值。在 25℃, 每分钟转化 1 微克分子苯甲酸到邻苯二酚所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

(六) 生物量的测定

取 0.2 ml 发酵液加入 0.8 ml 水, 在 440 nm, 1 cm 光程, 测定光密度值。

结 果

(一) 初筛

参照文献报道, 选择有可能产生苯甲酸 1, 2-双加氧酶的 176 株细菌进行初筛。将保存的菌种先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。只当菌株含有苯甲酸 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 (+, ++, +++) 分别统计各个菌株的产酶能力, 结果列于表 1。初筛结果表明, 在 176 株细菌中, 生长情况为“+”的 29 株; “++”, 6 株; “+++”, 40 株。其它菌株均不能在苯甲酸钠合成培养基上生长。

(二) 复筛

在 100 ml 三角瓶中, 加 20 ml 筛选培养基, 1.05 kg/cm² 灭菌 30 min。将初筛中具有苯甲酸 1, 2-双加氧酶活力的菌株在

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.	85	16	6	35
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			
解脂假丝酵母 <i>Candida lipolytica</i>	8	2		
皱褶假丝酵母 <i>Candida rugosa</i>	6			
细菌(未定名) <i>Bacteria</i> (undefined name)	45	5		5
总计 Total	176	29	6	40

牛肉汁斜面上活化,然后分别接入三角瓶培养基中。在 30℃ 摇床上振荡培养 72 小时,测定发酵液的酶活力,其中有两株假单胞菌和一株未定名的细菌产酶活力在 0.01—0.03 u/ml。经再次复筛,得到一株产酶稳定、活力高的假单胞菌,编号为 137。我们对它的发酵条件进行了研究。采用 0.1% 苯甲酸钠和 0.2% 琥珀酸钠再配合基本培养基,可获得高活力的苯甲酸 1, 2-双加氧酶,其酶产率为 5—8 u/1g 菌体。

(三) 培养温度对产酶的影响

在 100 ml 三角瓶中加 20 ml 复筛培养基,在 25—35℃ 范围的五个不同温度,用 200 r/min 摇床振荡培养 72 小时,测定发酵液的酶活力和生物量,结果如表 2 所示。产酶的最适培养温度为 32℃。

表 2 培养温度对产酶的影响

Table 2 Effect of temperature on enzyme formation

温度(℃) Temperature	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
25	0.865	0.0007
28	0.780	0.0004
30	0.653	0.0026
32	0.645	0.0054
33	0.654	0.0054
35	0.833	0.0013

(四) 培养基的起始 pH 对产酶的影响

改变培养基中磷酸缓冲液的不同配比,得到不同的起始 pH。培养基装量及培养条件同上。在 32℃ 培养 72 小时后测发酵液的酶活力和生物量,结果如表 3。培养基的最适起始 pH 为 6.8,在 pH 6.5—7.0 之间产酶基本稳定。在表 3 中, pH 6.0 的生物量远高于其它 pH 时的生物量,这是由于此时未形成絮凝菌团,测定值偏高。

(五) 培养基装量对产酶的影响

在 100 ml 三角瓶内装不同量的培养

表 3 培养基的起始 pH 对产酶的影响

Table 3 Effect of initial pH on enzyme formation

pH	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
6.0	0.830	0.0007
6.5	0.122	0.0127
6.8	0.173	0.0130
7.0	0.119	0.0115
7.5	0.123	0.0065

表 4 培养基装量对产酶的影响

Table 4 Effect of medium volume on enzyme formation

培养基体积 (ml) Medium volume	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
5	0.119	0.0163
10	0.122	0.0126
15	0.129	0.0108
20	0.190	0.0101
25	0.263	0.0086
30	0.316	0.0068

基,在摇床上培养 72 小时后测酶活力,结果列于表 4。生物量随着培养基装量增加而增加;酶活力随着培养基装量增加而减少。这说明此菌产酶需要较大的通气量。

(六) 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% 的其它碳源进行试验,结果列于表 5。葡萄糖、麦芽糖和甘油对生长有利,而对产酶有抑制作用。可溶性淀粉对产酶有轻微促进作用。蔗糖对生长和产酶均无明显作用。

(七) 氮源对产酶的影响

在复筛培养基中加入各种不同氮源,在摇床上培养 72 小时后测定生物量和酶活力,结果列于表 6。有机氮源,例如,牛肉膏、鱼肝、蛋白胨(大豆)和酵母膏对产酶有抑制作用。 NH_4NO_3 有轻微促进作用。 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 有轻微抑制作用。总起来看,添加氨态氮作用不明显。这是因为在复筛

表 5 碳源对菌生长和产酶的影响

Table 5 Effect of carbon sources on cell growth and enzyme production

碳 源 Carbon source	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
葡萄糖 Glucose	1.490	0.0053
蔗糖 Sucrose	0.269	0.0376
麦芽糖 Maltose	1.270	0.0228
甘油 Glycerol	1.313	0.0058
可溶性淀粉 Soluble starch	0.270	0.0448
对照 Control	0.280	0.0361

表 6 各种氮源对菌生长和产酶的影响

Table 6 Effect of various nitrogen sources on cell growth and enzyme production

氮 源 Nitrogen source	浓度(%) Concentration	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
牛肉膏 Beef extract	1.0	0.96	0.0065
鱼肝 鱼肝肽 Fish peptone	1.0	1.390	0.0039
蛋白胨(大豆) Peptone (Soya)	1.0	1.538	0.0052
酵母膏 Yeast extract	1.0	0.721	0.0087
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	0.577	0.0542
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	0.728	0.0503
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.1	0.162	0.0108
NH_4NO_3	0.1	0.591	0.0704
NH_4Cl	0.1	0.552	0.0509
对照 Control		0.247	0.0511

表 7 诱导物对产酶的影响

Table 7 Effect of inducers on enzyme production

诱导物 Inducer	浓度(%) Concentration	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
琥珀酸钠 Sodium succinate	0.2	0.307	0.0571
α -酮戊二酸 α - Keto glutaric acid	0.2	0.952	0.0059
β -酮己二酸 β -Ketoadipic acid	0.2	0.354	0.0048
反,反-己二烯二酸 trans, trans-Muconic acid	0.2	0.653	0
己二酸 Adipic acid	0.2	0.610	0
邻苯二酚 Catechol	0.2	0	0
对照 Control		0.579	0.0052

培养基中已有足够的氨态氮,它是菌体生长和产酶的基本条件。

(八) 诱导物对产酶的影响

在不含琥珀酸钠的基本培养基中,分别加入各种可能的诱导物,振荡培养 72 小时,测定生物量和酶活力,结果列于表 7。反,反-己二烯二酸、己二酸和邻苯二酚对

产酶都有抑制作用。 α -酮戊二酸和 β -酮己二酸对产酶无明显作用。琥珀酸钠对产酶有明显诱导作用,可提高产酶率 10 倍以上。

(九) 苯甲酸钠对产酶的影响

苯甲酸钠既是培养基中的基本碳源,又是产酶的诱导剂。在基本培养基中加入

不同量的苯甲酸钠,在摇床上培养 72 小时,测定生物量和酶活力,结果如表 8。苯甲酸钠的浓度对产酶有明显的影响,最适浓度为 0.1%。

表 8 苯甲酸钠对产酶的影响

Table 8 Effect of sodium benzoate on enzyme formation

苯甲酸钠(%) Sodium benzoate	生物量 (A_{440}) Biomass	酶活力 (u/ml) Enzyme activity
0	0.144	0.0082
0.1	0.250	0.0433
0.15	0.275	0.0376
0.2	0.322	0.0246
0.3	0.694	0.0131
0.5	0.847	0.0139
0.6	1.019	0.0123

讨 论

我们从 176 株细菌中筛选到的产苯甲酸 1, 2-双加氧酶菌株是一株假单胞菌,编号为 137。通过发酵条件的研究,选择 0.1% 苯甲酸钠和 0.2% 琥珀酸钠再配合基本培养基,酶产率可达 5—8 u/g 菌体。经过三年来发酵及转化苯甲酸试验,证明该菌产酶稳定。但若生产应用,活力仍需提高。

苯甲酸 1, 2-双加氧酶在催化苯甲酸转化成邻苯二酚时,有一系列中间过程,一

般要加入还原型辅酶 I,我们在分析该酶活力时,发现其反应过程不要连续添加还原型辅酶 I,反应就可进行。说明此菌中除苯甲酸 1, 2-双加氧酶外,还同时存在辅酶再生系统。这就为应用该酶创造了条件。不添加还原型辅酶 I,既可降低成本,还使反应过程简化。关于利用该菌株从苯甲酸合成邻苯二酚的探索性研究,正在进行。

参 考 文 献

- [1] Doelle, H. W.: Bacterial Metabolism, 2nd Edition, p. 490—557, Academic Press, New York. San Francisco, London, 1975.
- [2] Reiner, A. M.: *J. Bacteriol.*, **108**: 89—94, 1971.
- [3] Reiner, A. M.: *J. Biol. Chem.*, **247**: 4965, 1972.
- [4] Stanier, R. Y. & Ornston, L. N.: *Advances in Microbial Physiology*, (Ed. Rose, A. H. & Tempest, D. W.), **9**: 89—151, Academic Press, London & New York, 1973.
- [5] Yeh, W. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 3794—3797, 1982.
- [6] 孟广震: 生物工程学报, **1**(2): 1, 1985.
- [7] 李 钦: 生物工程进展, **2**: 30, 1986.
- [8] Mutsuo, Y. & Hitoshi, F.: *J. Biol. Chem.*, **255** (13): 6783—6787, 1981.
- [9] Hagihara, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**: 134—142, 1961.
- [10] Mutsuo, Y. & Hitoshi, F.: *J. Biol. Chem.*, **255** (11): 5058—5063, 1980.

SCREENING OF BACTERIAL STRAINS FOR BENZOATE 1,2-DIOXYGENASE PRODUCTION AND FERMENTATION CONDITIONS

Li Qin Liu Ben

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Pseudomonas sp. 137, a high-yielding strain for producing benzoate 1,2-dioxygenase was screened from 176 bacterial strains. The conditions for enzyme production of the strains were examined. The optimal temperature and pH for enzyme formation were 32°C and pH 6.5—7.0 respectively. Enzyme formation was enhanced by sodium benzoate, and was markedly inhibited by glucose, maltose and glycerol. Ammonium nitrogen sources were essential for cell growth and enzyme production.

Sodium succinate was an effective inducer for enzyme formation. When the organism was grown in 0.1% sodium benzoate and 0.2% sodium succinate medium (pH 6.5—7.0) at 32°C for 72 h, about 5—8 units of benzoate 1,2-dioxygenase per gram cell was obtained.

Key words

Benzoate; Dioxygenase