

解酚假单胞菌邻苯二酚-2, 3-双加氧酶的纯化和某些特性

王 银 善 庞 学 军

(中国科学院武汉病毒研究所环境微生物室)

赵 永 芳

(武汉大学生物系)

某些芳香族化合物是污染环境的重要来源。利用微生物降解法处理这些物质是消除其危害的主要途径^[1]。微生物降解本质是酶作用的结果。一般酶降解这类物质的过程包括羟化和开环两个阶段^[2,3]。以苯酚为例,首先是在羟化酶的作用下将苯酚羟化形成开环的中间产物邻苯二酚^[4],尔后邻苯二酚在不同开环酶的作用下,通过邻位或间位开环方式分别产生顺、顺-粘康酸或 α -羟基粘康酸半醛。前一产物经一系列反应生成琥珀酸,后一产物则生成丙酮酸^[5]。

国外对微生物酶降解芳香族化合物的报道很多^[6],普遍认为研究这类氧化酶的困难在于其对氧非常不稳定^[7],而邻苯二酚-2, 3-双加氧酶则尤其明显^[8]。笔者在分离鉴定邻苯二酚-2, 3-双加氧酶的催化产物 α -羟基粘康酸半醛时也证实此酶的活性颇易丧失^[9]。本文参考 Mitsuhiro Nozaki 等^[10]方法对解酚假单胞菌的邻苯二酚-2, 3-双加氧酶的纯化和某些特性进行描述。

材 料 和 方 法

材料 供试菌种解酚假单胞菌 (*Pseudomonas phenolicum*) 系简浩然等分离鉴定^[11]。

化学药品 除 DEAE-纤维素 22、丙烯酰胺和聚丙烯酰胺药品系进口外,其它均为国产的。本试验配制溶液所用的水均为玻璃蒸馏水。

方法 酶测定方法参考 Kojima 等^[8]方法用国产 751 或 XG-125 分光光度计在 375nm 观

察吸收值的增加以测定邻苯二酚-2, 3-双加氧酶的活性。测定系统总体积 3 毫升,内含 $1\mu\text{mol}$ 邻苯二酚, $50\mu\text{mol}$ 巯基乙醇、 $300\mu\text{mol}$ 磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 和适量的酶液,比色杯光径 0.5cm, 30℃ 反应,观察 4 分钟。一个酶单位规定为 375nm 30℃ 每分钟使光密度增加 0.1 所需的酶量。

蛋白质测定 记录 280nm 光密度,以牛血清白蛋白作对照。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 用 Davis 圆盘电泳法^[12] 5% 胶浓度,电流 3mA/管,电泳 1 小时左右,剥离的胶柱用考马斯亮兰染色。

光谱研究 此酶的吸收光谱系用日本岛津双光束/差示/二波长自动记录分光光度计测定。酶溶液 E 部分对着 0.05M 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 透析,用相应的透析液作对照。

结 果

一、邻苯二酚-2,3-双加氧酶的纯化

菌体的培养和收集 将解酚假单胞菌接种在含 0.15% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , 0.5% NH_4Cl , 0.1% 酵母汁和 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的培养液中,以 0.05% 苯酚为唯一碳源。pH7.5, 30℃,振荡诱导培养 24 小时,离心收集菌体,每升培养液可得湿菌体 1.5 克左右,菌体呈微红色,用 0.85% KCl 溶液洗两次,获得的供试菌体如不立即使用可冰冻贮存,一月内酶活力丧失不多。由于该酶对氧非常敏感容易失活,所以在提纯过程要尽可能在低温下进行。本试验的所有操作除注明者外是在 6℃ 以下完成。

粗酶液 10 克贮存的冰冻细胞悬浮在 40 毫升 0.05M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 中,用超声波仪 15KC 处理 16 分钟以破碎细胞。6500 转/分 0℃ 离心 20 分钟(后面的离心均为 6000 转/分 0℃),其沉淀物用相同缓冲液洗一次,离心弃沉淀,合并两次上清液即为粗酶液(A 部分)。

脱氧核糖核酸酶处理和第一次丙酮分级 44 毫升 A 部分,在 28℃ 搅拌下加入 30 微升脱氧核糖核酸酶(2mg/ml),15 分钟后加入等体积的冷丙酮,静置 15 分钟后,离心弃沉淀,上清液为 B 部分。

第二次丙酮分级 67 毫升 B 部分加入 35 毫升冷丙酮(最后浓度 66%),15 分钟后,离心收集沉淀,在上清液中再加入 25 毫升冷丙酮,离心收集沉淀,合并两次沉淀物,加入 10% 丙酮—0.05M 磷酸缓冲液 15 毫升溶解。溶液对着相同缓冲液透析,透析液离心去沉淀得上清液 14 毫升,此为 C 部分。因为低浓度的有机溶剂例如丙酮存在可阻止空气引起的酶失活,所以在后面的提纯过程所用的缓冲液中都加入 10% 丙酮(简称丙酮缓冲液)。

DEAE-纤维素 22 柱层析 14 毫升 C 部分加在预先用丙酮缓冲液平衡的 DEAE-纤维素 22 柱 (2.0 × 14cm) 上。在用丙酮缓冲液洗涤后,酶用丙酮缓冲液硫酸铵线性梯度洗脱。此酶在硫酸铵浓度 0.5—0.9% 之间洗脱出来(见图 1)。合并 59—73 管有酶活的洗脱液为 D 部分。

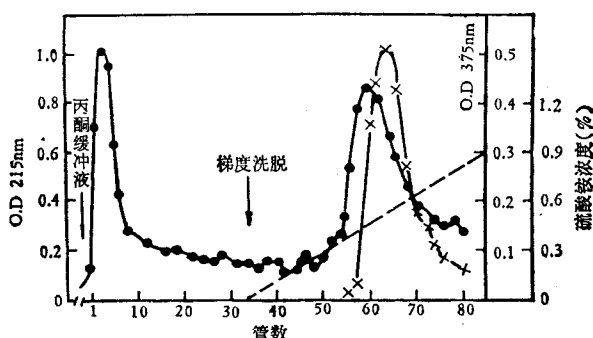


图 1 邻苯二酚-2,3-双加氧酶在 DEAE-纤维素柱的层析图

●-●蛋白质 ×-×酶活力 —硫酸铵浓度
此酶用混合瓶盛 250ml 丙酮缓冲液,贮藏瓶盛 250ml 内含 5%硫酸铵的丙酮缓冲液建立的线性梯度洗脱,流速 20ml/小时,每管收集 5ml

第三次丙酮分级 51 毫升 D 部分,加入双倍冷丙酮,离心收集沉淀,加 16 毫升丙酮缓冲液溶解,离心除去不溶物,上清液为 E 部分。此时如加入一定量的粉状硫酸铵置零度会产生结晶。纯化过程每步酶产量和比活性见表 1。

二、邻苯二酚-2,3-双加氧酶的某些特性

1. 酶解邻苯二酚试验 加粗酶液(A 部分)至邻苯二酚溶液后,邻苯二酚的紫外吸收值发生变化:邻苯二酚在 275nm 有最大吸收峰,但是在粗酶液催化下迅速氧化形成黄色的 α -羟基粘康酸半醛,该物质在 375nm 有最大吸收峰(见图 2),进一步保温黄色逐渐退去,375nm 光吸收峰消失。如果用纯化酶液(D 部分)重复上面的试验时,形成的 α -羟基粘康酸半醛避免了被细菌中存在的 α -羟基粘康酸半醛酶的降解。

表 1 邻苯二酚-2,3-双加氧酶的纯化

步 骤	体积 (ml)	酶单位 (u)	蛋白质 (mg/ml)	酶活力 (u/ml)	比活力 (u/蛋白 mg/ml)	纯化倍数	得率
A. 粗抽提	44	3300	21.2	7.5	3.5	1	100
B. 脱氧核糖核酸酶处理与第一次丙酮分级	67	2814	3.7	42	11.4	3.25	88.3
C. 第二次丙酮分级	14	1792	9.7	128	13.2	3.77	54.3
D. DEAE-纤维素 22 柱层析	58.5	684.5	0.33	11.7	35.44	10.1	20.7
E. 第三次丙酮分级	25	253.8	0.11	9.0	81.8	23.3	7.7

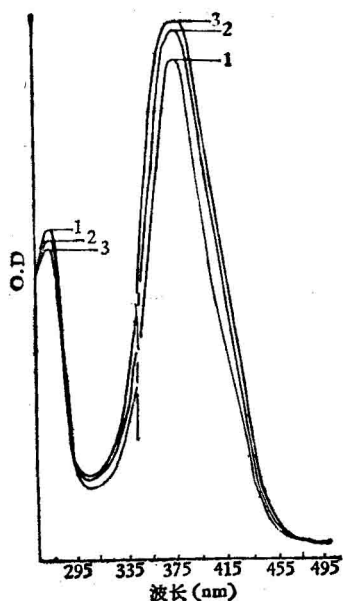


图2 酶解过程邻苯二酚和 α -羟基粘康酸半醛吸收光谱变化曲线图

275nm为邻苯二酚吸收峰 375nm为 α -羟基粘康酸半醛吸收峰 曲线1 反应时间2分钟 曲线2 反应时间3分钟 曲线3 反应时间4分钟, 反应混合物总体积 3ml 其比例见酶测定方法

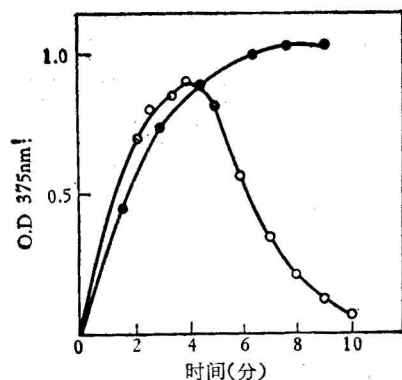


图3 粗酶和纯酶降解邻苯二酚的产物与时间的关系

○—○粗酶 ●—●纯酶

因此进一步保温 375nm 吸收值并不降低(见图3)。

2. 纯酶的均一性 纯酶(E 部分)在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时出现一条色带(见图4)。

3. 纯酶的吸收光谱 如图5所示纯酶(E 部分)对着 0.05 M 磷酸缓冲液透析后的吸收

光谱在可见区段没有明显吸收峰, 仅在 280nm 偏左紫外区段有一吸收峰。

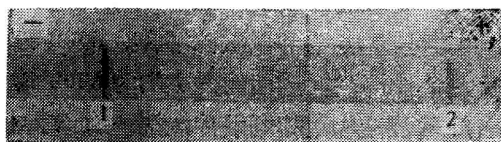


图4 纯化酶的凝胶电泳图

1.酶带 2.溴酚兰蛋白复合带

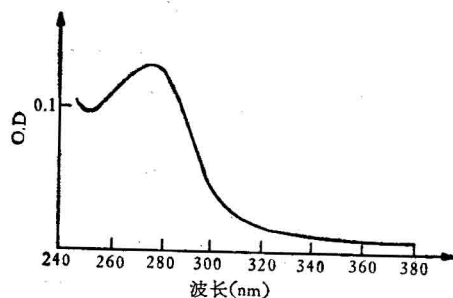


图5 纯化邻苯二酚-2,3-双加氧酶的吸收光谱图

用岛津双光束/差示/二波长自动记录分光光度计测定, 透析液作对照

4. 稳定性 邻苯二酚-2,3-双加氧酶不论粗酶还是纯酶都是不稳定的, 特别是氧存在时, 贮存于 4℃ 48 小时丧失原始活力约 34%(见图6), 即使贮存于 -10℃, 一星期后也丧失活力约 27%。此酶不稳定的根本原因是氧的存在。曾在室温下用过氧化氢和充氮气作试验: 酶液混合物加 0.33 μ M 过氧化氢作用 10 分钟, 丧失原始活力约 87%, 而酶液混合物置充氮气的干燥器中 48 小时仅丧失约 19%。当缓冲液中含有 10% 的丙酮等有机溶剂时酶活力丧失较

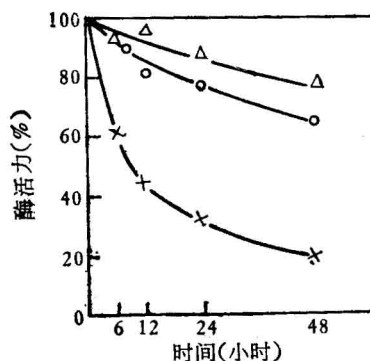


图6 邻苯二酚-2,3-双加氧酶贮存于不同温度的失活曲线

Δ — Δ < 0℃ ○—○ 4℃ ×—× 24℃ (室温)

少,在此情况下,即使是用 $0.66\mu M$ 过氧化氢作用 30 分钟,其酶活力仍有 45% 以上。酶溶液中分别加入一定量的巯基乙醇和还原谷胱甘肽也不能阻止活力的丧失。如果加入硼氢化钠 ($1mg/ml$) 可使失活酶在一定程度内恢复活性 (见图 7)。该酶在 $pH7.5$ 左右较稳定。

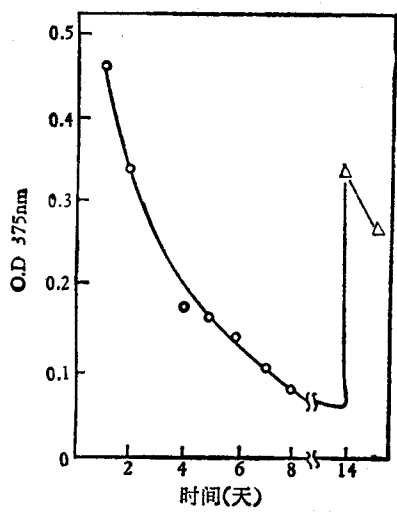


图 7 硼氢化钠活化邻苯二酚-2,3-双加氧酶曲线
待测酶液每毫升加 1 毫克 $NaBH_4$, $30^{\circ}C$ 保温半小时,以后按酶测定方法进行。
○—○ 开始酶活力 △—△ 加 $NaBH_4$ 后酶活力

5. pH 和底物浓度的影响 该酶最大活性是在 $pH 7.5$ (见图 8)。因为邻苯二酚-2, 3-双加氧酶对邻苯二酚有高度亲和性,所以用常规方法精确测定米氏常数是困难的,用日本进口的自动记录分光光度计测定其对邻苯二酚的

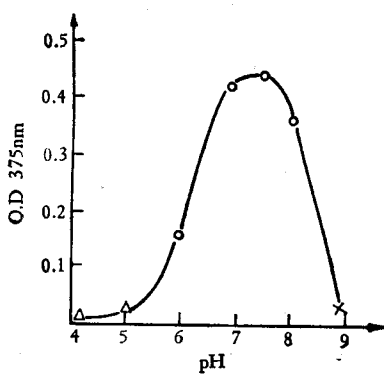


图 8 邻苯二酚-2,3-双加氧酶适宜 pH
△—△ 柠檬酸缓冲液 ○—○ 磷酸缓冲液
×—× Tris-HCl 缓冲液

K_m 值,以 S/U 对 S 作图^[4]测得米氏常数约为 $0.18 \times 10^{-6}M$ 。

6. 对温度的适应性 将酶液置不同温度下作用 10 分钟,然后迅速恢复到室温 ($24^{\circ}C$),按酶测定方法测活力,以观察酶对温度的适应性 (见图 9)。结果表明温度超过 $30^{\circ}C$ 酶活力开始下降, $60^{\circ}C$ 时几乎全部丧失。

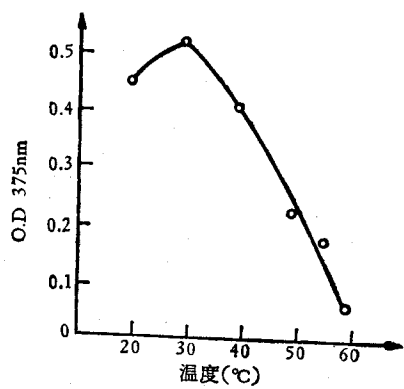


图 9 邻苯二酚-2,3-双加氧酶对温度的适应性

7. 抑制剂和金属离子的影响 抑制剂试验结果见表 2。束缚金属的试剂包括不同浓度的氰化钠、邻菲罗啉、联吡啶和 EDTA 并不表现抑制作用。此酶受金属离子 Cu^{++} ($10^{-5}M$), Hg^{++} ($10^{-4}M$) 的抑制分别为 9%、84%。该酶 (B 部分) $4^{\circ}C$ 时对水透析 1.5 小时和 5 小时后,分别保留原始活力的 80% 和 37%,即使加亚铁

表 2 抑制剂试验

抑 制 剂	浓 度 (M)	抑制作用 (%)
联 吡 啶	10^{-4}	0
邻菲罗啉	10^{-4}	0
叠 氮 钠	10^{-4}	0
氰 化 钠	10^{-5}	0
EDTA	10^{-4}	0
氯化汞	10^{-4}	84.3
硫酸铜	10^{-5}	9
三氯化铁	10^{-4}	0

测定系统 3ml: 抑制剂浓度如表所示, $300\mu mol$ 磷酸缓冲液 ($pH7.5$), $1.36mg$ 酶, $30^{\circ}C$ 作用 5 分钟,加入 $1\mu mol$ 邻苯二酚, $375nm$ 测光吸收值。

离子和钙离子到外部透析液中也不能阻止酶活力的丧失。

讨 论

1. 通常氧化酶是很不稳定的,而邻苯二酚-2,3-双加氧酶则尤其突出,不论粗酶还是纯酶制品都是容易失活的。但是,如将含有该诱导酶的菌体在冰冻状态贮存三个月则仍保存一定的酶活力。这表明邻苯二酚-2,3-双加氧酶在离开菌体后,欲阻止空气对其酶活力的破坏是很困难的。鉴于这种情况,加之一般羟化酶和开环酶是共居于同一细胞体中^[15],并且邻苯二酚是很多芳香环化合物降解的中间产物,因此,如想将此酶在降解环境污染物中应用,采用固定化细胞的方法可能较为经济有效。

2. 在纯化生物大分子物质的过程中要提高蛋白质(包括酶)的得率,应尽可能避免在有机溶剂如丙酮、乙醇等中长期存放。因为大多数蛋白质遇到这些溶剂都很不稳定,特别是在室温下极易变性失活。但是,我们在提纯此酶时,为了防止空气对酶的破坏,除三次用大量丙酮分级处理外,在纯化的后两步都加入了10%丙酮,虽然这样可使提纯得以进行,(在纯化酶中加入10%丙酮保护剂冰冻贮存45天活力尚存一半,在同样情况下未加丙酮者,贮存仅7天而活力丧失约99%),可是最终得率较低。相反,在另外一次提纯时始终未用丙酮溶剂,结果酶含量是高的,可惜酶活力难于保持。看来得率高低也许和有机溶剂的使用有关。另外在丙酮存在的情况下,用紫外280nm测定蛋白质含量时,必须将丙酮透析除尽,否则干扰严重。

3. 我们的试验结果和文献[13]报道都表明,有低浓度有机溶剂如乙醇、丙酮和丁醇等存

在时邻苯二酚-2,3-双加氧酶不易失活或对其有保护作用。这一特性对于用此酶制品进行生化方法处理工业污水是有益的。因为不少化工厂的污水中常含有低浓度的这类物质,它们不仅不会抑制或杀死酶活力,反而会使酶活力不致很快丧失。笔者曾用武汉石油化工厂废水作为此酶的透析液,其结果与蒸馏水透析液相比,前者酶活力丧失缓慢。废水中溶解氧较少,也即BOD较高,可能是阻止酶活迅速丧失的原因之一。

本文承浩然教授、方慈祺副研究员审阅,紫外扫描由武汉大学生物系周云珍同志测定,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Ralph Mitchell, Introduction to Environmental Microbiology, 153, 1974.
- [2] Anthony, F. Gaudy, Jr & Elizabeth T. Gaudy, Microbiology For Environmental Scientists & Engineers, 431, 1980.
- [3] Halina, Y. Neugahr: "Ferment. Technol. Today", 321, 1972.
- [4] Daviol T. Gibson: Science, 161, 1093, 1968.
- [5] Carol F. Feist & G. D. Hegeman, J. Bacteriol., 100, 869, 1969.
- [6] Evans, W. C. J. Gen. Microbiol., 32, 177, 1961.
- [7] Hirashi Taniuchi et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 97, 1962.
- [8] Yutaka Kogima et al.: J. Biol. Chem., 236, 2223, 1961.
- [9] 方慈祺、王银善,《海洋湖沼环境污染学术讨论会论文摘要汇编》,科学出版社,1981。
- [10] Mitsuhiro Nozaki et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 65, 1963.
- [11] 简浩然、黄福音,微生物学通讯,1, 106, 1959。
- [12] Baruch J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404, 1964.
- [13] Miesuhiro Nozaki et al.: J. Biol. Chem., 243, 2682, 1968.
- [14] W. 费迪南德著、王志美等译,“酶分子”,科学出版社,44, 1980。
- [15] Halina Y. Neujahr & Janas M Uarga. Eur. J. Biochem., 13, 37, 1970.

[本文于1983年1月15日收到]

(上接第32页)

开始部分基线稍有弯曲,时间持续约3分钟后,基线即趋稳定,虚实二线全部重叠。而在分析开始后的最初几分钟(一般为9分钟,视第一个有效出峰时间而定)是安置的切割时间(即该时间内无需要组份出现,仪器不作检测),因此,该

段基线的弯曲对分析无影响,对样品的12次重复分析结果检查证明了这一点。

采用新的程序后,茚三酮试剂可节省三分之一,即原来可分析100个样品的茚三酮试剂,现可分析150个样品,可以收到明显的经济效益。

[本文于1983年2月8日收到]