

微生物降解邻苯二酚的动力学研究

李 钦 汪 宁 梅*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

提 要

以一株产邻苯二酚双加氧酶的假单胞菌 84103 为试验菌, 对其降解邻苯二酚的动力学进行了研究。结果表明, 该降解过程为酶催化反应, 测定了反应最适温度、最适 pH、饱和菌量、 K_m 值及诱导作用等。

邻苯二酚是重要的化工产品, 常被用作防腐、照像和化学分析试剂。近年来它又成为一些新型农药和医药的主要原料。随着生产和应用量的增加, 进入环境的邻苯二酚也相应增加。由于它对生物体有严重危害, 因此对邻苯二酚污染的治理已引起人们的广泛注意。1955 年 Mason 及其合作者^[1]证明邻苯二酚可以被邻苯二酚 1, 2-双加氧酶开环生成顺, 顺-己二烯二酸。此后有人进行了大量研究工作, 包括降解代谢过程^[2,3], 酶的提纯、性质和结构与功能等^[4-10]。这些研究结果表明, 通过酶催化作用, 微生物可将邻苯二酚逐级降解为二氧化碳和水。国内关于这方面研究刚刚开始。

本文报道的是, 以一株假单胞菌为试验菌对邻苯二酚降解的动力学进行研究的结果。

材 料 和 方 法

一、菌种

从本所提供的 100 余株细菌中筛选到一株假单胞菌 84103 菌株 (*Pseudomonas* sp. 84103) 做为试验菌。

二、培养方法

培养基包含苯甲酸钠 (0.15%)、琥珀酸钠 (0.27%)、硫酸铵 (0.1%)、磷酸缓冲液 (0.2%,

pH6.8) 和微量 Mg^{++} 、 Ca^{++} 、 Fe^{++} 和 Mn^{++} 。在 500ml 三角瓶中装 50ml 培养基, 灭菌后接种, 于 30℃ 在摇床上培养 72 小时, 做为试验菌液。

三、分析方法

邻苯二酚降解速度的测定, 是在所要求的实验条件下, 在邻苯二酚溶液中加入一定量试验菌液, 置 30℃ 培育 20 小时后, 离心去掉菌体, 用 UV-120-02 型紫外分光光度计在 277nm 波长下测定吸光度, 求出邻苯二酚降解速度。

用平皿计数法测定菌的浓度^[11]。

邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的提纯是采用垂直板型凝胶制备电泳方法^[12]。

邻苯二酚 1, 2-双加氧酶活力测定方法参照 Ornston^[9] 的报告适当加以改进, 在 UV-120-02 型紫外分光光度计上记录 260nm 的吸收值, 以测定产物的形成。在 25℃, 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被定义为一个酶活力单位。

蛋白质测定采用 Lowry 法^[13]。

四、仪器及试剂

UV-120-02 型紫外分光光度计为日本 Shimadzu 公司产品。邻苯二酚是北京化工厂

* 北京师范大学生物系 1984 届毕业生。

产品。所用试剂为分析纯。

结果与讨论

一、pH 对微生物降解邻苯二酚的影响

在邻苯二酚浓度为 0.1 mg/ml，接种菌量为 0.5 ml (菌浓度为 1.3×10^{10} 个/ml，下同)，温度为 30℃ 的条件下，该菌株降解邻苯二酚的最适 pH 为 6.8 (图 1)。此菌对碱性环境极其敏感，当 $\text{pH} > 7$ 时，降解速度急剧下降，迅速到零。

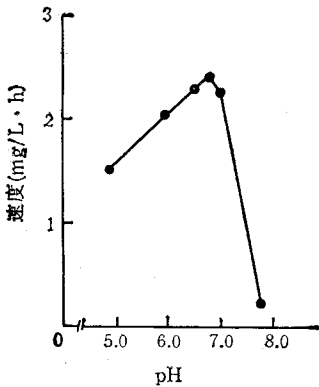


图 1 pH 对邻苯二酚降解速度的影响

二、温度对微生物降解邻苯二酚的影响

在邻苯二酚的浓度为 0.1 mg/ml，接种菌量 0.5 ml， $\text{pH} 6.8$ 时，该菌株降解邻苯二酚的最适温度为 30℃ (图 2)。从图 2 可见，在常温下菌株的降解活力是比较高的，这给实际应用提供了方便。

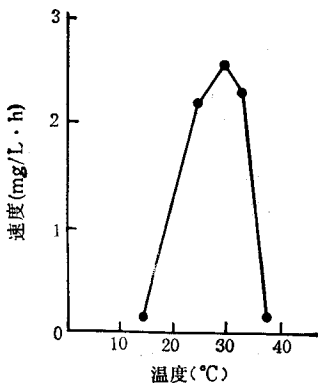


图 2 温度对邻苯二酚降解速度的影响

三、接种菌量对微生物降解邻苯二酚的影响

在邻苯二酚的浓度为 0.1 mg/ml， $\text{pH} 6.8$ ，温度为 30℃ 的条件下，向邻苯二酚溶液接入不同量的菌液，分别测定其降解速度。当反应液中菌浓度小于 7×10^7 个/ml 时，邻苯二酚的降解速度随接种菌量的增加而增高；而当大于 7×10^7 个/ml 时，降解速度基本不受接种菌量的影响 (图 3)。该菌降解邻苯二酚的饱和接种菌量为 7×10^7 个/ml。

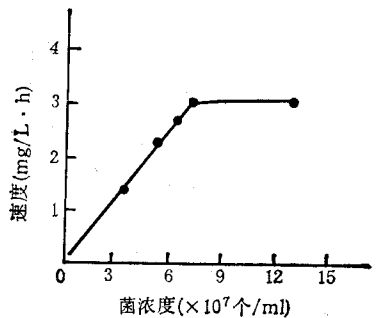


图 3 接种菌量对邻苯二酚降解速度的影响

四、诱导物对降解速度的影响

在邻苯二酚的浓度为 0.01—0.5 mg/ml， $\text{pH} 6.8$ ，温度为 30℃，接种菌量为 0.5 毫升的体

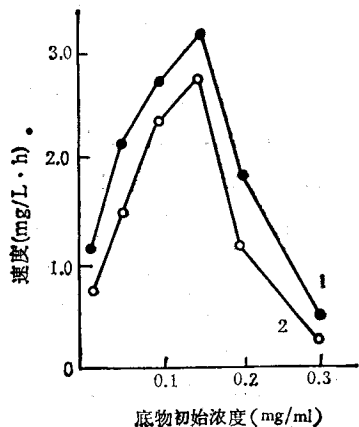


图 4 不同初始浓度下，琥珀酸钠对反应速度的影响。

1——加琥珀酸钠，2——不加琥珀酸钠

系中,加上不同诱导物,分别测定其反应速度。结果发现加入琥珀酸钠可明显提高降解速度(图4)。这说明微生物降解邻苯二酚的能力,不仅与菌体本身的特性有关,而且也受环境及营养物的影响。

五、米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max}
分别在30℃和25℃测定不同邻苯二酚初始浓度下的反应速度,再根据双倒数作图法^[14]作图,如图5。从图5可知,邻苯二酚的微生物降解反应为酶催化反应,反应速度符合 Michaelis-Menten 公式。从图求出在30℃和25℃下的 K_m 是同一个值,即 $4.35 \times 10^{-4}M$ 。但是降解的最大速度不同,分别是

$V_{30^\circ C} = 3.45 \times 10^{-5}M/h$
和 $V_{25^\circ C} = 3.13 \times 10^{-5}M/h$ 。从计算结果看, $V_{30^\circ C}$ 和 $V_{25^\circ C}$ 是很接近的,说明在最适温度附近,降解速度基本一致。这样,可在较宽的温度范围应用。

六、邻苯二酚1,2-双加氧酶的提纯及其动力学参数

表1 邻苯二酚1,2-双加氧酶的提纯结果

提纯步骤	总体积 (ml)	总活力 (μ)	比活力 (μ/mg)	提纯倍数	收率 (%)
酶的粗提液	27.5	4394.5	14.1	1	100
硫酸铵分级沉淀	9	2824.0	46.8	3.3	64
平板电泳提纯样品	6	266.4	105.7	7.5	7

我们用初步提纯的邻苯二酚1,2-双加氧酶在30℃测定不同邻苯二酚初始浓度下的降解邻苯二酚的反应速度,再根据双倒数作图法作图,如图6。从图6计算出邻苯二酚1,2-双加氧酶的 $K_m = 1.54 \times 10^{-4}M$,与菌体的 $K_m = 4.35 \times 10^{-4}M$ 相当接近,酶催化降解与用菌体降解邻苯二酚基本一致。初步判定,菌体降解邻苯二酚是由于邻苯二酚1,2-双加氧酶作用的结果。这与文献报道也是一致的^[15]。从图6求出酶的最大反应速度

$V_{30^\circ C} = 5.56 \times 10^{-5}M/h$,
比菌体的最大反应速度
 $V_{30^\circ C} = 3.45 \times 10^{-5}M/h$
大,这是因为菌体对底物的通透性差造成的。

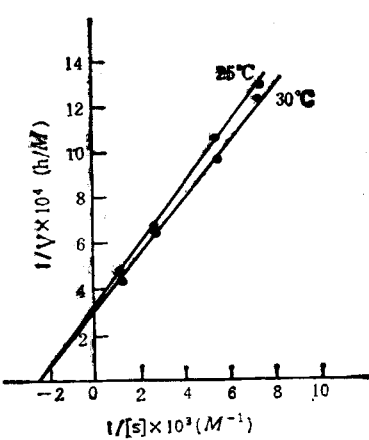


图5 邻苯二酚降解速度的倒数与初始浓度的倒数关系图

为了研究微生物降解邻苯二酚的机制,我们将上述菌液离心,测其上清液的邻苯二酚1,2-双加氧酶活力为零,说明该酶是胞内酶。然后将菌体悬浮于少量乙二胺二盐酸缓冲液中,用 Soniprep 150 型超声波发生器将菌体破碎,离心,得上清液。将上清液经硫酸铵分级沉淀(30—60% 饱和度),然后用垂直平板凝胶电泳仪分离纯化,提纯结果列于表1。

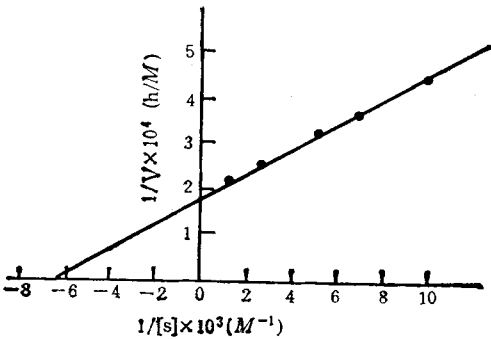


图6 用邻苯二酚1,2-双加氧酶催化时,邻苯二酚降解速度的倒数与初始浓度的倒数关系图

本文是在实验室条件下对一株假单胞菌降解邻苯二酚的动力学进行了一些研究。所得到的最适降解条件及反应速度数据,可供实际应

对-二甲氨基苯酚通透红细胞膜的研究

叶 玲 黄如衡

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京)

提 要

根据抗氰药对-二甲氨基苯酚 (DMAP) 穿透红细胞膜使 Hb 变成 MetHb 的反应特性及 DMAP 的荧光性质, 分别采用光密度法和荧光法对 MetHb 生成速度与血球外的 DMAP 浓度变化进行定量分析, 建立红细胞膜对 DMAP 的通透性研究方法, 计算出 DMAP 穿透速率常数为 0.153 min^{-1} , $t_{1/2}$ 等于 4.53 min, 推测 DMAP 的透过方式为易化扩散。

物质运送是生物膜的主要功能之一。认识物质通透细胞膜的速度规律, 对于揭示物质通透细胞膜的机理具有重要意义。生物膜通透性研究多采用同位素示踪技术观察 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等离子的通透特点。本文首次利用抗氰药对-二甲氨基苯酚^[1] (4-Dimethylaminophenol 简称 DMAP) 通过红细胞膜后形成的高铁血红蛋白 (MetHb) 的特征吸收, 用分光光度法监测通透速率并用荧光法测定 DMAP 浓度变化, 计

算 DMAP 通透小鼠红细胞膜的动力学参数, 研究药物浓度对通透速度的影响, 推测 DMAP 的穿透方式。

一、仪器与材料

DMAP 本所合成室提供, 用生理溶液配制成 0.1M, 置冰箱低温保存。

血标本 昆明种♂小鼠, 收集新鲜血液, 肝素抗凝。

用时参考。

本所菌种保藏室和周慧玲同志提供筛选菌种, 张树政教授提出宝贵意见, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Hayaishi, O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 5450.
- [2] Hayaishi, O.: *in Oxygenases*, Academic Press, New York, 1962.
- [3] Doelle, H. W.: *Bacterial Metabolism*, 2nd Edition, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975, 499—557.
- [4] Nakazawa, H. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 1963, 54, 65.
- [5] Ornston, L. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3776, 3787.
- [6] Ornston, L. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3800.
- [7] Patel, R. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 1976, 127, 536.
- [8] Dorn, E. et al.: *Biochem. J.*, 1978, 174, 73.
- [9] Nakai, C. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, 195, 12.
- [10] Lawrence, Q. Jr.: *Adv. Inorg. Biochem.*, 1983, 5, 167.
- [11] 钱存柔、董碧红:《微生物学基础知识与实验指导》, 科学出版社, 北京, 1979, 262—263.
- [12] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:《生物化学与生物物理进展》, 1976, (4), 36.
- [13] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [14] 沈同等编:《生物化学》, 人民教育出版社, 北京, 1980, 235—238.

[本文于 1987 年 2 月 9 日收到]