

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0053 - 05

L68 菌株邻苯二酚 2,3-双加氧酶纯化及性质

刘涛, 张长铠, 薛勇, 刘正学

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要: L68 菌株中的邻苯二酚 2,3-双加氧酶经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析、Hydroxyapatite 柱层析、Sephadex-G150 凝胶过滤分离, 并经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 达到了电泳纯。提纯倍数为 234.1 倍, 收率为 20.2%。酶相对分子质量为 (132 ± 10) kDa, 由 4 个相对分子质量相同的亚基组成。最适反应温度 35 °C, 且酶活力在 15 ~ 65 °C 比较稳定; 最适 pH 为 8.0, 在 pH 7.0 ~ 10.5 酶活力较高且比较稳定。某些金属离子尤其是 Fe^{3+} 对酶活力有强烈的抑制作用。以邻苯二酚为底物, K_m 为 20.63 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 2.82 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

关键词: 邻苯二酚 2,3-双加氧酶, 假单胞菌, 纯化及性质

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Purification and Properties of Catechol 2,3-Dioxygenase from Strain L68

LIU Tao, ZHANG Chang-kai, XUE Yong, LIU Zheng-xue

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Catechol 2,3-Dioxygenase was purified from strain L68 by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography, Hydroxyapatite chromatography, Sephadex G-150 gel filtration with 234.1-fold purification, and a recovery of 20.2%. The purified enzyme was homogeneous on SDS-PAGE. The enzyme with a molecular mass of (132 ± 10) kDa contained four same subunits. The optimal conditions for activity of enzyme were pH 8.0, temperature 35 °C. The enzyme was stable over the range of pH 7.0 ~ 10.5 and below 65 °C. The activity was greatly inhibited by Fe^{3+} etc. The K_m for catechol of the enzyme was 20.63 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} was 2.82 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$.

Key words: Catechol 2,3-Dioxygenase; pseudomonas; purification and properties

日益发展的工业化使芳香族化合物污染加剧, 利用微生物降解法处理这些物质是消除其危害的重要途径。自然界中, 许多微生物可将芳香族化合物转化为邻苯二酚这一中间产物, 继而通过间位或者邻位裂解的三氧己二酸途径等生化过程将其彻底降解。邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (Catechol 2,3-Dioxygenase, C23D, EC 1.13.11.2) 是芳香族化合物代谢

途径中的关键酶。C23D 可将邻苯二酚间位裂解为 2-羟粘糠酸半醛 (α -hydroxy-muconic semialdehyde, HMS)^[1,2]。L68 菌株是从济南炼油厂废水中分离到的一株苯酚降解菌, 经初步鉴定为假单胞菌。在苯酚质量浓度为 0.5 g/L 的培养液中接种一定量的该菌, 培养 24 h, 用 4-氨基安替比啉法不能检测到酚。对该菌株产生的 C23D 的纯化及性质研究, 可为进

收稿日期 2001 - 12 - 20; 修订日期 2001 - 12 - 29.

作者简介: 刘涛 (1978 -) 男, 山东潍坊人, 微生物学硕士研究生。

万方数据

一步基因克隆及环保工程菌的构建奠定基础,具有较好的应用前景和研究价值。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

假单胞菌 L68 菌株,山东大学生命科学学院保藏。

1.2 培养基的配制

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, Na_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 酵母粉 0.5 g, H_2O 1 L, pH 7.5, 121 °C 灭菌 15 min, 待冷却后加入过滤除菌的 10% 苯酚溶液 5 mL。配制固体培养基时,加入 2% 的琼脂。

1.3 缓冲液的配制

见文献 [3, 4]。

1.4 菌种扩大培养

保藏菌种转接试管斜面, 37 °C 活化 24 h, 然后转接至 500 mL 的三角瓶(液体培养基装量 100 mL), 37 °C、150 r/min 摇床培养 48 h, 备用。

1.5 细胞抽提液的制备

培养液 11 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 10 mmol/L pH 7.5 的丙酮磷酸钾缓冲液洗涤 2 次, 然后用同样缓冲液悬浮。细菌悬浮液于 0 ~ 15 °C 用超声波破碎仪(Sonics & Masteriars, Inc.) 破碎细胞, 其最小功率 1 kW, 探头振幅 40%。11 000 r/min 离心 10 min 得上清液, 即细胞抽提液。-20 °C 保存备用。

1.6 酶活力测定

采用分光光度法^[5]。测定系统总体积 3 mL, 内含 1 μmol 邻苯二酚、130 μmol pH 7.5 磷酸钾缓冲液和 0.2 mL 酶液。30 °C 反应 1 min, 在 375 nm 处测定光吸收的增加值。一个酶单位(U)定义为在该反应条件下, 1 min 内催化产生 1 μmol 2-羟粘糠酸半醛(HMS)所需要的酶量。

1.7 蛋白质浓度测定

按 Lowry 法^[6]进行测定。

1.8 酶的分离纯化

酶的纯化操作均在 4 °C 下进行, 所得酶液均在 -20 °C 保存。

1.8.1 硫酸铵的分级沉淀 细胞抽提液加固体硫酸铵至饱和度 40%, 4 °C 静置过夜, 11 000 r/min 离心 10 min。取上清液加硫酸铵至饱和度 55%, 4 °C 静置过夜, 11 000 r/min 离心 10 min。取沉淀溶于少量的 0.01 mol/L pH 7.5 丙酮磷酸钾缓冲液, 在相同缓冲液中透析过夜, 得粗酶液 A。

1.8.2 DEAE-Sephrose Fast Flow(Pharmacia)柱层析

粗酶液 A 经 DEAE Sepharose Fast Flow, 用 0 ~ 600 mmol/L NaCl 的缓冲液梯度洗脱。合并具有酶活的洗脱液, 用 1 mmol/L pH 7.5 的丙酮磷酸钾缓冲液透析过夜, 得粗酶液 B。

1.8.3 Hydroxyapatite(Sigma)柱层析 粗酶液 B 经 Hydroxyapatite, 以 0 ~ 600 mmol/L, pH 7.5 的丙酮磷酸钾缓冲液梯度洗脱。合并具有酶活的洗脱液, 用 80% 饱和度的硫酸铵盐析, 沉淀溶于少量含有 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L pH 7.5 的丙酮磷酸钾缓冲液中, 用相同缓冲液透析过夜, 得粗酶液 C。详见文献 [7]。

1.8.4 Sephadex G-150(Pharmacia)柱层析 粗酶液 C 经 Sephadex G-150 柱, 以含有 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L pH 7.5 的丙酮磷酸钾缓冲液洗脱。合并具有酶活的洗脱液, 用 Centrplus Centrifugal Filter Devices YM-10(MILIPORE)浓缩并除盐, 得纯酶液。以 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度。

1.9 酶的性质测定

1.9.1 相对分子质量 全酶的相对分子质量用 Nondenatured Protein Molecular Weight Marker Kit(Sigma)测定。亚基相对分子质量用 SDS-PAGE 检测。

1.9.2 最适温度 在 10 ~ 60 °C 范围内, 每隔 5 °C, 分别测定酶活力。以 30 °C 条件下酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.9.3 最适 pH 在不同的 pH 条件下分别测定酶活力。以 pH 7.5 条件下酶活力为 100%, 计算相对酶活力。pH 用 Orion 868 pH 计(Orion Research, Inc.)测定。

1.9.4 热稳定性 在 15 ~ 75 °C 范围内, 每隔 5 °C, 分别保温 30 min, 测定酶活力。以未经保温的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.9.5 pH 稳定性 纯酶液浓缩, 分别用 0.05 mol/L 的不同缓冲液稀释。4 °C 静置过夜, 分别测定酶活力。以 pH 7.5 条件下酶活力为 100%, 计算相对酶活力。所用缓冲液有 NaH_2PO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 2.6 ~ 7.6)、硼砂-硼酸缓冲液(pH 7.4 ~ 8.0)和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.6 ~ 10.6)。

1.9.6 金属离子对酶活力的影响 配成一定浓度的各种金属离子溶液, 分别与酶在 30 °C 保温 30 min, 按常规方法测定酶活力。以未添加金属离子的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。金属离子的终浓度均为 5 mmol/L。

1.9.7 米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max} 的测定 以邻苯二酚为底物, 按 Lineweaver-Burk 作图法^[8]计算 K_m 及 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

2.1.1 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱层析 洗脱结果 (图 1) 显示有 4 个蛋白质峰, 只有峰 IV 有酶活性, SDS-PAGE 显示有较多杂蛋白质.

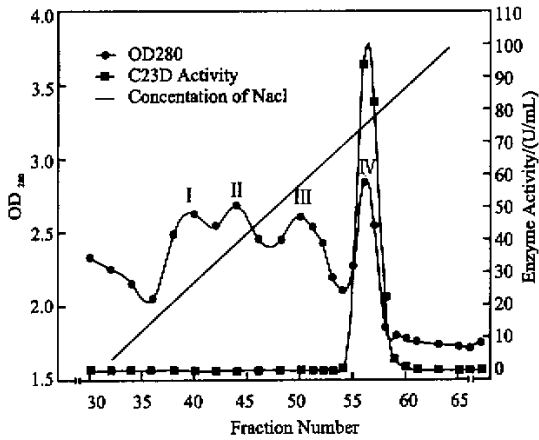


图 1 DEAE-Sepharose fast flow 层析

Fig.1 Chromatography of C23D on DEAE-Sepharose fast flow

2.1.2 Hydroxyapatite 柱层析 共分离到 7 个蛋白质峰 (图 2), 只有峰 III 有酶活性, 电泳检测有少量杂蛋白质.

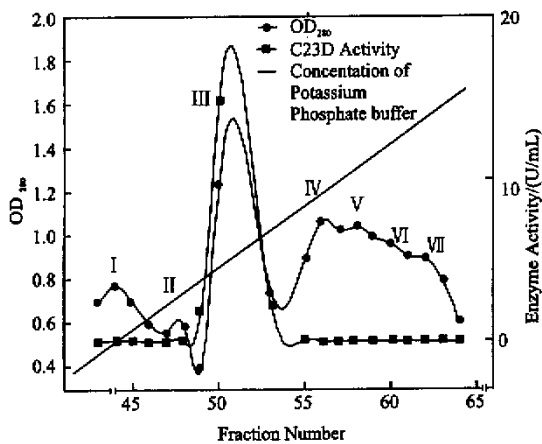


图 2 Hydroxyapatite 层析

Fig.2 Chromatography of C23D on Hydroxyapatite

2.1.3 Sephadex G-150 柱层析 洗脱结果 (图 3) 表明在 3 个蛋白质峰中, 只有峰 II 有酶活性, SDS-PAGE 检测 (图 4) 为单一条带, 达到了电泳纯. 各步纯化结果见表 1, 提纯倍数为 234.1 倍, 收率为 20.2%.

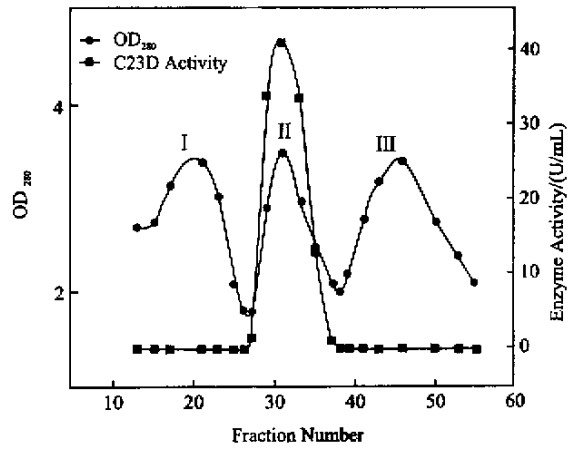


图 3 Sephadex G-150 层析

Fig.3 Chromatography of C23D on Sephadex G-150

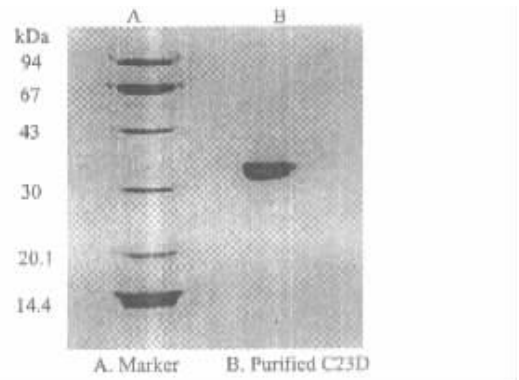


图 4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE of purified C23D

表 1 邻苯二酚 2,3-双加氧酶的纯化结果

Tab.1 Purification of Catechol 2,3-Dioxygenase

步骤	总蛋白 质/mg	比活力/ (U/mg)	总酶活 力/U	回收率/ %	提纯 倍数
粗酶液	324.2	1.1	352.5	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级沉淀	138.7	2.3	325.7	92.4	2.2
DEAE Sepharose Fast Flow 层析	42.4	7.4	314.1	89.0	6.8
Hydroxyapatite 层析	6.34	15.8	100.0	28.4	14.5
Sephadex G-150 层析	0.28	254.5	71.26	20.2	234.1

2.2 酶的性质

2.2.1 相对分子质量 测得全酶相对分子质量为 (132 ± 10) kDa, 亚基相对分子质量 (图 4) 为 (34 ± 1) kDa. 同时表明, 该酶由 4 个相对分子质量相同的亚基组成.

2.2.2 温度对酶活力及热稳定性的影响 结果 (图 5、图 6) 表明 酶的最适反应温度为 35 °C 左右, 酶活

力在 15 ~ 65 °C 比较稳定 65 °C 以上急剧下降.

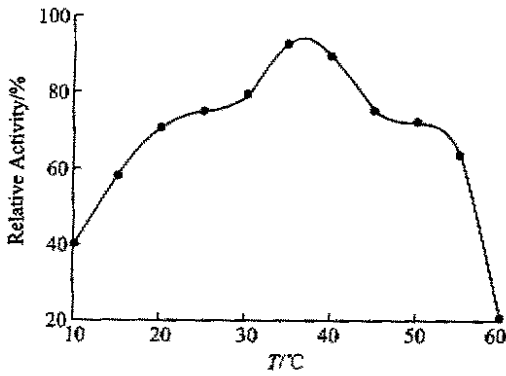


图5 温度对酶活力的影响

Fig.5 Effect of temperature on enzyme activity

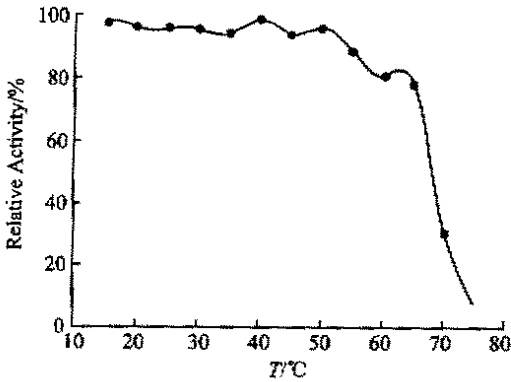


图6 温度对酶稳定性的影响

Fig.6 Effect of temperature on enzyme stability

2.2.3 pH 对酶活力及稳定性的影响 酶的最适 pH 为 8.0 左右(图 7). pH 对酶稳定性的实验结果(图 8)显示,酶活力在 pH 7.0 ~ 10.5 比较稳定. pH 低于 7.0 曲线急剧下降,至 pH 6.0 酶活力几乎为零; pH 9.0 ~ 10.5 曲线下降平缓,酶活力仍较高.提示 酶在碱性条件下有较高的稳定性,而在酸性条件下不稳定.

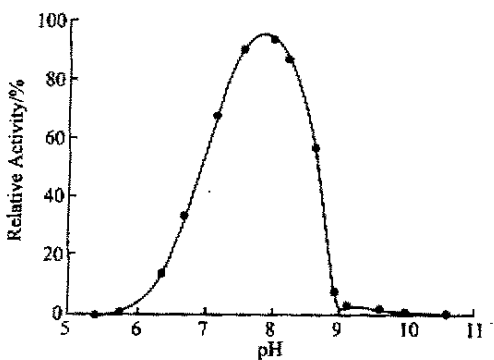


图7 pH 对酶活力的影响

Effect of pH on enzyme activity

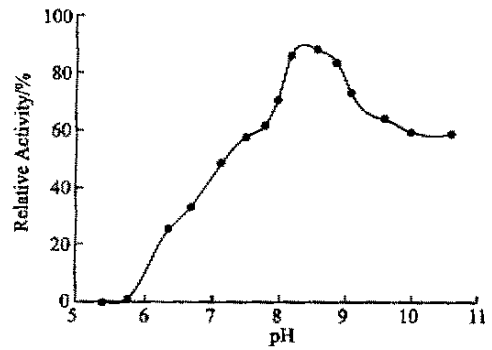


图8 pH 对酶稳定性的影响

Fig.8 Effect of pH on enzyme stability

2.2.4 金属离子对酶活力的影响 从表 2 可以看出, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Li^+ 对酶有激活作用, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 有一定的抑制作用,而 Hg^+ 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 有强烈的抑制作用.

表2 金属离子对酶活力的影响

Tab.2 Effect of irons on enzyme activity

Irons	Relative Activity/%	Irons	Relative Activity/%
Control	100	Fe^{3+}	0
Ca^{2+}	84	Li^+	142
Zn^{2+}	10	Cr^{3+}	0
Al^{3+}	0	Mg^{2+}	172
Mn^{2+}	119	Hg^+	0.2
Cu^{2+}	16	Ag^+	0
Fe^{2+}	15	Pb^{2+}	0

2.2.5 K_m 及 V_{max} 测得酶的 K_m 为 $20.63 \mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 $2.82 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 见图 9.

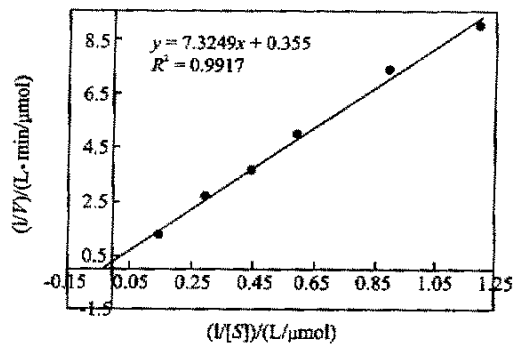


图9 酶的 Lineweaver-Burk 作图

Fig.9 Lineweaver-Burk plot of C23D

3 讨论

从菌株 L68 中分离纯化的 C23D 相对分子质量为 $(132 \pm 10) \text{ kDa}$, 由 4 个相对分子质量相同的亚基

组成与 Yoko 等^[1,3,4]的报道一致,但其它性质表现出一定的差异,主要表现在:

1) L68 C23D 适应温度和 pH 范围更广,最适反应温度 35 °C,且酶活力在 15~65 °C 比较稳定,最适 pH 为 8.0,在 pH 7.0~10.5 酶活力较高且比较稳定。

2) 某些金属离子尤其是 Fe^{3+} 对 L68 C23D 酶活力有强烈的抑制作用,这些差别可能与该酶的来源不同、分离纯化方法不同有关,其具体原因尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王银善,庞学军,赵永芳.解酞假单胞菌邻苯二酚-2,3-双加氧酶的纯化和某些性质[J].生物化学与生物物理进展,1983(1):44-48.
- [2] 张炜,殷长传,郑佐华等.耐热邻苯二酚 2,3-双加氧酶的表达、纯化及性质[J].生物化学与生物物理学报,1998(6):579-584.
- [3] TAKEHIRO K, TETSUO I, KIHACHIRO H, *et al.* Overexpression of *Pseudomonas putida* Catechol 2,3-Dioxygenase with High Specific Activity by Genetically Engineered *Escherichia coli*[J]. **J Biochem**, 1995, 117: 614-622.
- [4] YOKO N, SHUICHIRO M, RIU S, *et al.* Induction, Purification, and Characterization of Catechol 2,3-dioxygenase from Aniline-assimilating *Pseudomonas* sp FK-8-2[J]. **J Bio Chem**, 1991, 55(5):1281-128.
- [5] YUTAKA K, NOBUTOMO I, OSAMU H. Metapyrocatechase: a New Catechol-cleaving Enzyme[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1961(8):2223-2228.
- [6] LLWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, *et al.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent[J]. **J Biol Chem**, 1951, 193(1):265-275.
- [7] STEFAN R K, THOMAS K, DAGMAR M, *et al.* Degradation of Chloroaromatics: Purification and Characterization of a Novel Type of Chlorocatechol 2,3-Dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ3[J]. **Journal of Bacteriology**, 1998(2):296-302.
- [8] LINEWEAVER H, BURK D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. **J Am Chem Soc**, 1934, 56: 658-666.

(责任编辑:秦和平)

(上接第 37 页)

3 结 论

1) 8 种鱼糜基本上都在 40 °C 加热表现出具有较强的凝胶特性,60~70 °C 为凝胶劣化温度段,80~90 °C 加热可使凝胶快速通过凝胶劣化温度段而

提高凝胶的硬度、弹性和凝胶强度。

2) 二段加热的凝胶强度优于一段加热,宜采用 40 °C 加热 20 min 和 90 °C 加热 40 min 的加热方式。

3) 马鲛鱼、竹荚鱼和花鲷具有较强的抗蛋白质冷冻变性的能力和较高的凝胶强度,其中,马鲛鱼和花鲷的色泽较白,是加工鱼糜制品的理想原料。

参考文献:

- [1] 西竈平.底ダラ类的冷冻すり身化の試み[J].水产ねり制品技术研究会志,1981(3):125-130.
- [2] 西竈平,中村金良,野吴洋等.深海性鱼类の冷冻すり身に关する試験[J].北水试月报,1984,41:380-402.
- [3] 福田裕,挂端甲一,新井健一.冷冻および贮藏中における深海性鱼类の肌原纤维タンパク质的変性[J].日本水产学会志,1981,47:663-672.
- [4] 汪之和.漂洗工艺和抗冻剂对几种西非鱼糜凝胶特性和色泽的影响[J].中国水产科学,2001,28(8):80-84.
- [5] 天津轻工业学院食品工业教研室编.食品添加剂[M].北京:轻工业出版社,1978.331-332,486-496.
- [6] 山内寿一,村井裕一,福田裕等.サバすり身の加热温度と时间によるゲル形成能特性について[R].青森县水产物加工研究所试验研究报告,1980,13-30.
- [7] 志水宽.鱼肉ねり制品ゲル形成能[M].东京:恒星社厚生阁,1981.42-65.
- [8] 孙朝陈.鱼浆加工技术[M].台北:华香园出版社,1992,283-291,291-297.
- [9] OGAWA, KANAMARU, MIYASHITA. Alpha-Helical structure of fish actomyosin: Changes during setting[J]. **January of Food Science**, 1995, 60: 297-298.
- [10] 汪之和.利用西非渔业资源开发冷冻鱼糜生产的可行性研究[J].水产科技情报,1998,25(25):153-157.

(责任编辑:杨萌,朱明)