

研究简报

邻苯二酚 2,3-双加氧酶在恶臭假单胞杆菌 整细胞催化中的酶活检测方法

张建峰^{1,2}, 苏凤宜¹, 邢新会¹

(¹清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084; ²吉林农业大学生命科学院, 吉林 长春 130118)

关键词: 邻苯二酚 2,3-双加氧酶; 整细胞催化; 十二烷基三甲基溴化铵; 环境修复

中图分类号: TQ 033; X 172

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 02-0450-06

A simple assay of catechol 2,3-dioxygenase activity in whole-cell catalysis of *Pseudomonas putida* mt-2

ZHANG Jianfeng^{1,2}, SU Fengyi¹, XING Xinhui¹

(¹Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ²School of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: Catechol 2,3-dioxygenase (C23O) is the key enzyme of aromatic substance degradation by *Pseudomonas* sp. In order to establish a simple assay of C23O activity during the whole-cell catalysis of *Pseudomonas putida* mt-2, C23O was induced by utilizing sodium benzoate acid as the sole carbon source, and its activity was determined in whole cells by the amended protocol of pure enzyme assay. After suspending the cells with potassium phosphate buffer, the substrate was added and the accumulation of 2-hydroxymuconic semialdehyde was measured by a UV757CRT spectrophotometer at 375 nm. The activity of C23O was evaluated by the climbing slope of time course curve of the UV absorption. By this means, the K_m for catechol and C23O in whole cells was $34.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, while V_{\max} was $0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg dry cell})^{-1}$, both of which differed from those for pure enzyme by 2—3 orders of magnitude. To eliminate the cell wall barrier for substrate permeation, a cationic surfactant, *n*-dodecyltrimethylammonium bromide, was used to pre-treat the cells. With $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB) treated for 30 min, the maximum C23O activity could be achieved, which was consistent with the result of treated cells by beads milling. In the present study, a feasible and simple method was put forward for the apparent enzyme activity assay intracellularly which could be conveniently applied to the whole-cell biocatalysis or to environmental bioremediation.

Key words: catechol 2,3-dioxygenase; whole-cell catalysis; DTAB; environmental bioremediation

引 言

假单胞菌 (*Pseudomonas*) 是一类革兰阴性的

杆菌或球杆菌, 广泛存在于自然界, 是土壤和水体微生态系统的重要组成部分, 参与自然界的碳、氮循环, 而且具有广谱的有机物降解能力, 是环境生

2007-07-17 收到初稿, 2007-08-24 收到修改稿。

联系人: 邢新会。第一作者: 张建峰 (1973—), 男, 硕士, 讲师。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20676071, 20336010)。

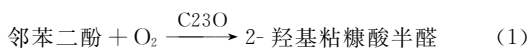
Received date: 2007-07-17.

Corresponding author: Prof. XING Xinhui. E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20676071, 20336010).

物技术的重要微生物^[1]。假单胞菌能够被用于有机废物的降解^[2]、农药的生物降解^[2]、重金属废水处理^[2]和富营养化控制^[3]等。该菌属具有复杂的酶系统,大都按功能成套组合在一些天然的质粒上^[4],酶系统的表达随环境条件的变化而变化。其中,熟知的恶臭假单胞菌(*P. putida*)含有编码降解芳香族化合物的酶系统 TOL 质粒,能降解多种芳香族化合物,在环境污染治理和生物催化方面具有重要的应用价值^[1]。该菌对芳香族化合物的降解途径及 TOL 质粒的特性已有大量的研究^[4-5]。TOL 质粒大小为 120 kb,具有可移动性。

整细胞催化是拓展恶臭假单胞杆菌应用的有效途径,为此需要建立其关键酶活的快速简易检测方法。由 TOL 质粒编码的酶中,邻苯二酚 2,3-双加氧酶(catechol 2,3-dioxygenase, C23O)将芳香环双加氧开环裂解^[5],反应式见式(1)。该催化反应是芳香族化合物代谢途径的关键及限速步骤^[5]。据报道,C23O(EC: 1.13.11.2)的相对分子质量为 140000,最适温度为 30℃,最适 pH 7.5,纯酶的比酶活 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, K_m 值为 1.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。目前关于 C23O 酶活的测定均是采用细胞破碎液进行的^[7],主要步骤包括:(1)细胞破碎;(2)细胞提取液的分离纯化:(NH_4)₂SO₄ 分级沉淀,然后在 4℃,pH 7.5,100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl 缓冲液条件下进行 Sephadex G-200 凝胶层析(粗酶液的酶活测定则不需要该纯化操作);(3)C23O 酶活测定。C23O 酶活用紫外可见分光光度计进行测定,30℃下测量 375 nm 处(2-羟基粘糠酸半醛的特征吸收峰)的吸光度增加值。测试体积 3 ml,250 μmol 磷酸缓冲液,pH 8.0,0.2 μmol 邻苯二酚及适量的细胞提取液。后续报道的 C23O 测量方法大都是基于此操作稍加改动而成的^[8-9]。此类方法操作烦琐、耗时,过程中难以避免酶活的损失,迄今还没有关于整细胞检测 C23O 酶活方法的研究报道。



本研究的目的是利用恶臭假单胞杆菌整细胞建立测定胞内 C23O 酶活的简便方法,为表征整细胞酶反应的基本特性提供基础。通常整细胞的酶活往往只是表观酶活,这是由于整细胞的复杂性,特别是细胞膜的空间位阻等造成的传质阻力。为了获得细胞内的 C23O 最大酶活,需要采用一定手段改变细胞膜的通透性,以消除细胞膜对底物及产物进出

细胞的空间位阻,从而达到原位检测酶活的目的。目前用于改变细胞膜通透性的常用方法有极端温度波动法、表面活性剂法、有机溶剂法、螯合剂法和基因工程法等^[10]。本论文采用安全温和的表面活性剂方法来尝试改变 *P. putida* mt-2 细胞膜的通透性,并探讨提高 C23O 酶活的可能性。

1 实验

1.1 菌种及其来源

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* mt-2,由清华大学化学工程系生物化工研究所环境微生物实验室保藏。

1.2 苯甲酸(BA)培养基及菌体培养条件

BA 培养基的组成为(1000 ml): 苯甲酸钠 2.0 g; (NH_4)₂SO₄ 0.472 g; Na₂HPO₄ 1.42 g; KH₂PO₄ 1.36 g; MgCl₂ · 6H₂O 0.284 g; CaCl₂ · 2H₂O 0.066 g; 微量元素溶液 20 ml; 用 HCl 和 NaOH 调节到 pH 6.2。121℃灭菌 20 min,备用。

微量元素溶液(1000 ml): FeSO₄ · 7H₂O 350 mg; MnSO₄ · H₂O 80 mg; ZnCl₂ 100 mg; CuCl₂ 20 mg; CoCl₂ · 6H₂O 20 mg; Na₂MoO₄ · 2H₂O 12 mg; H₃BO₃ 5 mg; H₂SO₄ (96%) 1 ml。

培养条件: 30℃, 170 r · min⁻¹ 摇床培养。从保藏菌种的甘油管接种到 15 ml 离心管(液体培养基 4 ml),活化 24 h 后转接到 500 ml 三角瓶(液体培养基 100 ml),接种量 2%;培养到对数生长中后期(12 h)备用,使用之前放于 4℃ 冰箱保存。

1.3 细胞悬液的制备

获取的菌液在 4℃ 下,10000 r · min⁻¹ 离心 10 min,回收菌体,用 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸钾缓冲液(pH 7.5)洗涤 2 次,然后用该缓冲液重悬,细菌悬浮液于 4℃ 保存,备用。

1.4 细胞破碎及 C23O 酶活测定

1.4.1 细胞破碎 7 ml 离心管装玻璃珠(SIG-MA)半管,加入菌悬液高出玻璃珠 1 cm,旋涡混合器(TDX-1,北京通达科技有限公司)振荡破碎 30 s^[11]。

1.4.2 C23O 酶活测定 用 UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海棱光公司)进行测定^[7]。30℃ 下将适量的细胞破碎液加入到 pH7.5 的碳酸钾缓冲液中,迅速加入终浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 的邻苯二酚,在 375 nm 处(2-羟基粘糠酸半醛的特征吸收

峰) 进行时间扫描, 得到吸光度的变化率 A'_{375} , 按式 (2) 计算 C23O 酶反应速度

$$\nu = \frac{60A'_{375}}{\epsilon_{375}b} \times 10^6 \quad (2)$$

式中 ν 是酶反应速度, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; b 是比色皿内腔厚度, cm ; $\epsilon_{375} = 3.3 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [5]。

1.5 整细胞条件下 C23O 酶活的测定

采用分光光度法 [7] 测定酶活, 具体操作如下: 用磷酸钾缓冲液稀释菌体使其浓度在 OD_{660} 0.1 左右, 测定时比色皿内加 2 ml 菌悬液, 保持 35°C , 迅速加入终浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚混匀, 使用 UV757CRT 紫外可见分光光度计 (上海棱光公司) 在 375 nm 处时间扫描 30 s, 得到吸光度的变化率 A'_{375} , 按式 (2) 计算 C23O 酶反应速度。

1.6 整细胞条件下酶的基本性质

1.6.1 最适温度和温度稳定性 最适温度实验是在 $10 \sim 60^\circ\text{C}$ 范围内, 每隔 5°C , 分别测定酶活。以 35°C 条件下酶活为 100%, 计算相对酶活。热稳定性实验是在 $10 \sim 60^\circ\text{C}$ 范围内, 每隔 5°C , 分别将细胞重悬液保温 60 min, 以保温初始零时刻的酶活为 100%, 计算相对酶活。

1.6.2 最适 pH 及 pH 稳定性 用不同 pH 值的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液来重悬细胞, 12 h 以内每隔 1 h 左右测定酶活。以 pH 7.5 条件下第一次测量的酶活数值为 100%, 计算相对酶活。观察在不同 pH 条件下酶的稳定性及最佳 pH 条件。pH 用 520A 台式酸度计 (Thermo Orion) 测定。

1.6.3 米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{\max} 以邻苯二酚为底物, 改变底物的初始浓度, 得到相应的反应初速度, 按 Lineweaver-Burk 作图法 [12] 计算 K_m 及 V_{\max} 。一个酶活单位 (U) 定义为在该反应条件下, 1 min 内催化生成 $1 \mu\text{mol}$ 2-羟基粘糠酸半醛所需要的细胞干重。

1.7 整细胞条件下 C23O 与 OD_{660} 之间关系的建立

用缓冲溶液制备不同浓度的细胞悬液, 分别测定酶活, 绘制 OD_{660} 和酶活的关系图。

1.8 添加表面活性剂以改变细胞膜的通透性

利用十二烷基三甲基溴化铵 (*n*-dodecyltrimethylammonium bromide, DTAB; ACROS ORGANICS, USA) 改变细胞膜的通透性, 去除细胞膜对底物及产物的空间位阻 [11, 13]。在细胞悬液中

按比例加入一定浓度的 DTAB, 作用一段时间后按 1.5 节的方法测定酶活。以没有加入 DTAB 的细胞悬液的酶活为 100%, 计算相对酶活。

1.8.1 DTAB 作用时间的优化 在细胞悬液中分别加入 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTAB, 检测 200 min 内 C23O 的酶活变化, 以确定 DTAB 的适宜作用时间。

1.8.2 DTAB 作用浓度的优化 在细胞悬液中分别加入各种浓度的 DTAB, 作用 30 min, 然后测定 C23O 的酶活, 以确定最适宜的 DTAB 作用浓度。

2 结果与讨论

2.1 BA 培养基确定及其优化

恶臭假单胞菌 (*P. putida* mt-2) 的 TOL 质粒具有可以利用芳香族化合物的一套酶系统的编码基因, 其翻译产生的一系列酶可以将芳香族化合物降解, 最终生成丙酮酸和乙醛, 并进入 TCA 循环 [5]。选择低毒性的芳香化合物苯甲酸钠为唯一碳源, 结合文献 [13-14] 中培养基的氮源、大量元素及微量元素, 通过相关参数的优化, 确定了 BA 培养基的基本组成 (具体组成见 1.2 节)。通过优化实验首先确定了培养基苯甲酸钠的浓度为 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 超过该浓度时菌种生长的迟滞期延长, 但后期的菌浓却能提高。进而优化得到了氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 $0.472 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养温度 30°C , pH 6.2, 接种量 2%, 装液量每 500 ml 三角瓶 100 ml, 摇床转速 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。由于 TOL 质粒上的基因簇是需要芳香族化合物进行诱导表达的, 因此 BA 培养基同时实现了细胞增殖和酶的诱导表达双重任务。在上述优化条件下, 恶臭假单胞菌 mt-2 在 BA 培养基中的生长曲线见图 1, 在 12 h 基本到达平台期, pH 值和 C23O 的酶活 (以培养 12 h 菌的酶活为 100%, 计算相对酶活) 都随着生长曲线的变化而变化, pH 值单调升高, 而 C23O 酶活开始不断上升, 在平台期后开始下降。因此, 后续的实验选用培养到对数增长中后期 (12 h) 的菌液, 以得到较高的 C23O 酶活。另外, 由于 C23O 是 Fe^{2+} 依赖型的酶, 培养基中 Fe^{2+} 对恶臭假单胞菌 mt-2 的酶活和代谢影响很大, 所以培养基要新鲜配制, 如果放置时间超过一周, 在接种的时候需要补充新鲜的 Fe^{2+} , 否则恶臭假单胞菌会因缺少 Fe^{2+} 而分泌一种荧光物质 (脓菌素 [15])。

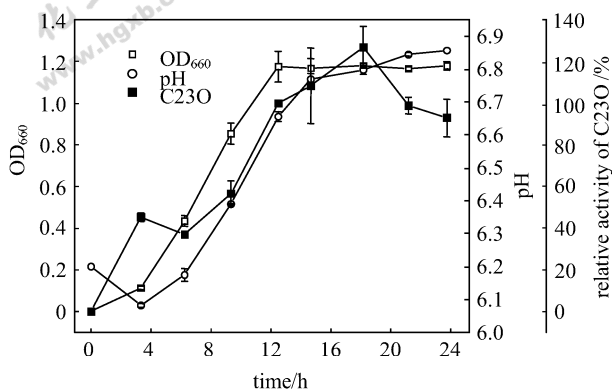


图 1 恶臭假单胞菌 mt-2 在 BA 培养基中的生长曲线以及 pH 值和 C23O 酶活的变化
Fig. 1 Changes in OD₆₆₀, pH and C23O activity of *Pseudomonas putida* mt-2 during cultivation in BA medium

2.2 整细胞条件下温度对 C23O 酶活及稳定性的影响

为了建立整细胞条件下测定表观酶活的方法，需要确定影响酶活测定的一些关键参数，例如温度、pH 值、 K_m 、 V_{max} 等，但这些参数与细胞提取液中的酶活测定参数可能存在差别。因此，首先通过实验确定了整细胞 C23O 的最适温度和热稳定性。如图 2 所示，整细胞 C23O 的最适温度在 35℃ 左右，这与该酶在细胞提取液中的最适温度 30℃^[6] 相比略高，而整细胞 C23O 在温度 50℃ 以下热稳定性较好，55℃ 以后酶活显著下降。

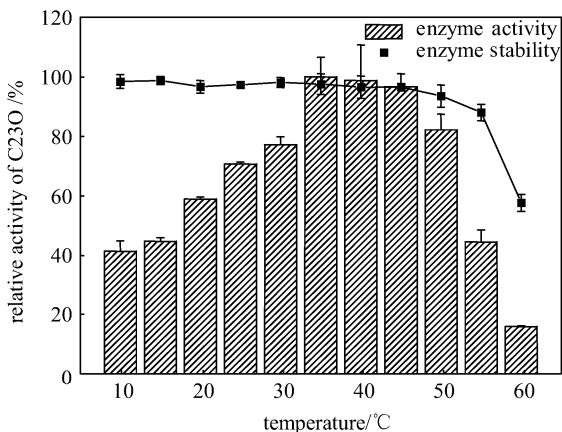


图 2 温度对酶活及稳定性的影响
Fig. 2 Effect of temperature on whole-cell enzyme activity and its stability

2.3 整细胞条件下 pH 值对 C23O 酶活及稳定性的影响

溶液的 pH 值对酶的活性和稳定性通常有较大

的影响，本文根据 C23O 的特性选定 pH 6.5~8.0 的范围进行实验。监测不同 pH 条件下 12 h 之内细胞浓度 (OD₆₆₀) 和 C23O 酶活的变化关系 (图 3)。结果表明用磷酸缓冲溶液 pH 7.0 和 7.5 重悬后，在 12 h 内细菌的 OD₆₆₀ 比较稳定，而在 pH 7.5 C23O 酶活较高稳定性较好，因此后续的实验都选定最适 pH 为 7.5。

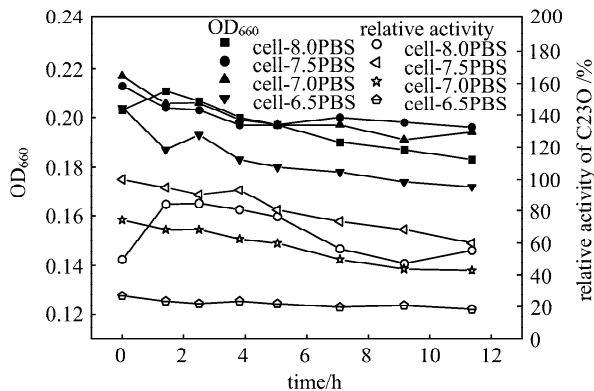


图 3 pH 对酶的活性及稳定性的影响
Fig. 3 Effect of pH on whole-cell enzyme activity and its stability

2.4 整细胞 C23O 的 K_m 及 V_{max} 的测定

K_m 和 V_{max} 是判定酶反应动力学的重要参数，根据 Lineweaver-Burk 作图法设计实验，得到整细胞条件下的酶反应动力学，结果如图 4 所示，具有较好的线性关系 ($R^2 > 0.98$)。分别取两轴截距获得 $K_m = 34.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $V_{max} = 0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg 干细胞})^{-1}$ ，这些与酶库^[6]报道的纯酶数据 (C23O 的 $K_m = 1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $V_{max} = 320 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) 有较大差别， K_m 值增大，说明酶与底物的结合受到了细胞空间位阻的影响。

2.5 整细胞条件下 OD₆₆₀ 与 C23O 酶活的关系

纯酶浓度和酶活之间具有良好的线性关系，相类似的也需要确定整细胞催化过程中关键酶的活性与细胞浓度之间的关系。图 5 表明在低菌浓下，二者有较好的线性关系，相关系数达到 0.99，表明在整细胞酶活检测中，反应条件和底物浓度能够完全满足不同浓度细胞的催化反应。本文阐述的 C23O 测定方法是利用分光光度计测定产物的特征吸收的速率变化，由于该酶的反应速度非常快，只需要 OD₆₆₀ = 0.1 左右就可以准确测量，而且吸光度的变化很快，说明实验检测酶活的灵敏度很高。由于对高浓度的菌体稀释后可以得到与图 5 相同的

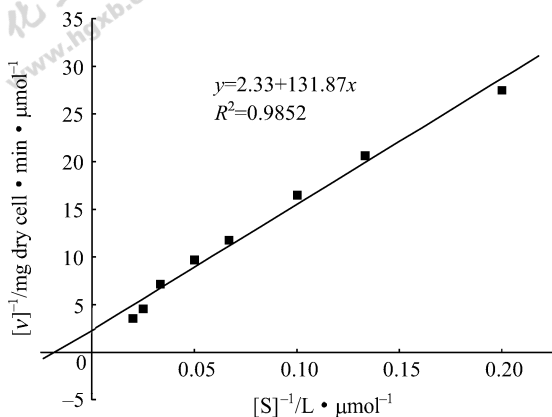


图 4 整细胞条件下 C23O 的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of C23O in whole cells

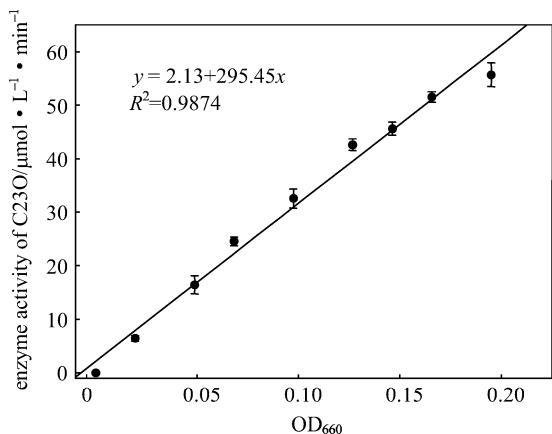


图 5 OD₆₆₀ 与 C23O 酶活关系

Fig. 5 Relation between OD₆₆₀ and enzyme activity

曲线,说明不但在低菌浓区,在高菌浓区该方法也能对整细胞的酶活进行准确测量。同时这一结果也暗示有可能通过监测环境污染修复体系中混合菌群中的 C23O 活性来定量恶臭假单胞菌的浓度,但详细的影响因素需要进一步的实验探讨。

2.6 DTAB 改变细胞膜通透性及其作用条件的影响

通过以上的实验确定了恶臭假单胞菌 mt-2 整细胞的表观酶活测定方法。但是在上述条件下测定的整细胞酶活并不是细胞内酶的最大催化活性,还不能完全准确地了解细胞内关键酶的真实表达情况,所以探讨通过改变细胞膜通透性提高整细胞酶活测量准确性的可能。根据文献报道^[10,13],阳离子表面活性剂可以有效改变细菌的细胞膜,本研究采用十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)来探讨其对整细胞 C23O 酶活的影响。首先研究 DTAB 作用时间对 C23O 酶活的影响,实验结果(图 6)表明 DTAB 作用 20 min 后酶活基本稳定,后续实验均

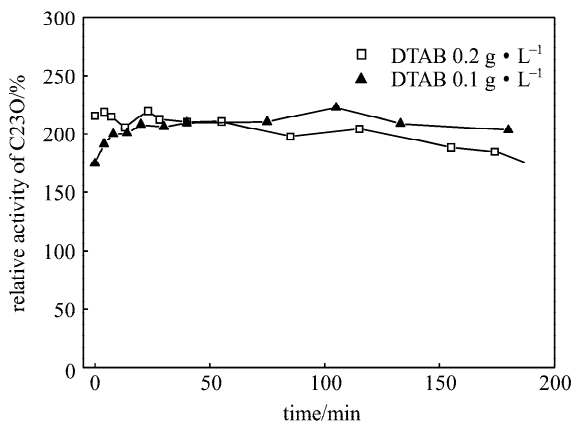


图 6 DTAB 作用时间对整细胞酶活的影响

Fig. 6 Effect of DTAB treatment time on enzyme activity in whole cells

取 30 min 为标准。而且,DTAB 0.1 g · L⁻¹ 处理 20 min 后的酶活比处理前提高 1 倍以上。

DTAB 浓度对整细胞 C23O 酶活的影响结果表明,DTAB 在 0.05~0.3 g · L⁻¹ 的范围内得到的酶活最高且稳定,数值比未处理前提高 1 倍多(具体数据未给出),后续实验均采用 0.1 g · L⁻¹ DTAB 的处理量进行。为了验证 DTAB 作用后是否能测得 C23O 的最大酶活,对同样测定条件下的细胞破碎液的酶活进行了检测。采用玻璃珠破碎的方法,以破碎前的整细胞的酶活为 100%,计算相对酶活。细胞破碎时间为 30 s 时测得的细胞破碎液的最大酶活为 207%,此数值与最适的 DTAB 处理条件下的整细胞的相对酶活近似,表明在该条件下已经完全消除细胞膜通透性对底物传递的影响。另外,研究表明,采用 0.1 g · L⁻¹ DTAB 处理细胞 30 min 仅仅改变了细胞膜对小分子的通透性,使小分子物质能自由进出,而并不能释放胞内酶到胞外(具体数据未给出)。这些都说明用 DTAB 处理的整细胞可以原位进行胞内最大酶活的测定。

3 结 论

(1) 恶臭假单胞菌 mt-2 的 TOL 质粒上带有可以利用芳香族化合物的一套酶系统的编码基因,由于该质粒的表达需要芳香族化合物的诱导,建立了以苯甲酸钠(BA)为唯一碳源的培养基,并优化了培养条件,在该条件下细胞通过表达 TOL 质粒利用苯甲酸钠进行生长。

(2) 建立了利用整细胞测定 C23O 活性的方法,对整细胞酶活的特性进行了研究,得到了最佳

的温度、pH 及相应的酶的稳定范围。整细胞条件下 C23O 的 $K_m = 34.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 0.29 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg 干细胞})^{-1}$, 与细胞破碎液的动力学参数有较大的差异。

(3) 利用 DTAB 可以改变细胞膜的通透性, 从而影响整细胞的 C23O 酶活测量。DTAB 合适的浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 作用时间为 30 min, 在该条件下得到的整细胞表观酶活接近细胞的胞内最大酶活。

本文建立的整细胞 C23O 酶活的检测方法, 为整细胞催化及环境修复过程中酶活的评价提供了基础。

References

- [1] Ma Zhan (马展), Zhang Dechun (张德纯). Development and prospects of genetical engineered *Pseudomonas* application. *Chinese Journal of Microecology* (中国微生态学杂志), 2003, **15** (3): 186-187
- [2] Weng Suying (翁酥颖). *Environmental Microbiology* (环境微生物学). Beijing: Science Press, 1987; 115-176
- [3] Atkinson B W, Mudaly D D, Bux F. Contribution of *Pseudomonas* sp. to phosphorus uptake in the anoxic zone of an anaerobic anoxic-aerobic continuous activated sludge system. *Water Science and Technology*, 2001, **43** (1): 139-146
- [4] Wackett L P. *Pseudomonas putida*—a versatile biocatalyst. *Nature Biotechnology*, 2003, **21** (2): 136-138
- [5] Sheridan R, Jackson G A, Regan L, Ward J, Dunnill P. Rational engineering of the TOL meta-cleavage pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **58** (2/3): 240-249
- [6] Brenda. Entry of catechol 2,3-dioxygenase (EC-Number 1.13.11.2) [EB/DL]. <http://www.cubic.uni-koeln.de/>
- [7] Sala-Trepat J M, Evans W C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* Species 4-oxalocrotonate pathway. *Eur. J. Biochem.*, 1971, **20** (3): 400-413
- [8] Park D W, Chae J C, Kim Y, Iida T, Kudo T, Kim C K. Chloroplast-type ferredoxin involved in reactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp S-47. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **35** (4): 432-436
- [9] Spain J C, Nishino S F. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53** (5): 1010-1019
- [10] Ni Y, Mao Z C, Chen R R. Outer membrane mutation effects on UDP-glucose permeability and whole-cell catalysis rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **73** (2): 384-393
- [11] Ren Y L, Xing X H, Zhang C, Gou Z X. A simplified method for assay of hydrogenase activities of H_2 evolution and uptake in *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, 2005, **27** (14): 1029-1033
- [12] Wang Xicheng (王希成). *Biochemistry* (生物化学). Beijing: Tsinghua University Press, 2001; 67-71
- [13] Tanaka T, Xing X H, Matsumoto K, Unno H. Preparation and characteristics of resting cells of bioluminescent *Pseudomonas putida* BLU. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **12** (1): 29-36
- [14] Smets B S, Rittmann B E, Stahl D A. The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59** (10): 3430-3437
- [15] Bultreys A, Gheysen I, Wathelet B, Maraite H, de Hoffmann E. High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69** (2): 1143-1153