

## 弗氏柠檬酸细菌完整细胞 TNT 降解酶的性质

李文忠 尹萍 杨彦希

(中国科学院微生物研究所, 北京)

弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 在好氧和兼性好氧条件下具有很强的降解 2, 4, 6-三硝基甲苯 ( $\alpha$ -TNT) 的能力。该菌在牛肉汁培养基中 30℃ 摇床培养 10 小时, 其完整细胞 TNT 降解酶活力最高。酶反应最适 pH 为 7.2, 最适温度为 30℃, 酶的 pH 和温度稳定性较佳, 在 pH 6.0—8.0 时, 30℃ 保温 12 小时, 保留活力 90% 以上, 30 小时仍有 76% 剩余活力。作用于  $\alpha$ -TNT 的米氏常数 ( $K_m$ ) 为 50  $\mu$ M, 最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 为 0.22  $\mu$ M/mg 蛋白/小时。金属离子  $Ag^+$ 、 $Hg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  对酶活力有强烈抑制作用, EDTA 无明显抑制。底物类似物间-二硝基苯、2, 4-二硝基苯酚和对硝基酚 (0.3 mM) 对酶活力也有一定程度的抑制作用。

**关键词** 弗氏柠檬酸细菌; TNT 降解酶

2, 4, 6-三硝基甲苯 ( $\alpha$ -TNT) 是军事工业中一种毒性很大的炸药, 主要损伤人体造血系统, 当浓度大于 2mg/L 时, 会使某些鱼类中毒致死<sup>[1-2]</sup>。含 TNT 工业废水的排放, 严重污染环境, 破坏区域性生态平衡, 此问题已引起国内外极大关注。在四十年代, 国外已开始探索用微生物处理 TNT 废水的可能性。研究结果认为, TNT 在自然界中难以生物降解和自净<sup>[3]</sup>。Osmon 等<sup>[4]</sup>报道假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 在含葡萄糖和酵母膏的培养基中能降解 TNT。McCormick 等<sup>[5]</sup>报道了韦荣氏球菌 (*Veillonella alkaliescens*) 的无细胞提取液能还原 TNT 及其它硝基芳香族化合物。

我们从长期被 TNT 污染的土壤中, 分离到在好氧或兼性好氧条件下能高效降解 TNT 的菌株, 它们分属于柠檬酸菌属 (*Citrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*)、埃希氏杆菌属 (*Escherichia*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。其中柠檬酸菌属细菌具有很强降解 TNT 的能力, 系属国

内外首次报道<sup>[6]</sup>, 并将该菌成功地应用于 TNT 工业废水的生化处理中<sup>[7]</sup>。

至今国内外未见有关研究 TNT 降解酶系及其性质的报道。为了探索和阐明微生物降解 TNT 的酶学机理, 本文先就柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 完整细胞 TNT 降解酶的性质进行了研究。

### 材料和方 法

#### (一) 材料

1. 菌种: 弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*), 本研究组分离并鉴定。

2. 培养基: 种菌培养基为牛肉汁琼脂斜面 (pH 7.0); 菌体收集用牛肉汁液体培养基 (pH 7.0)。

3. 试剂:  $\alpha$ -TNT 由兵器工业部 342 厂提供, 经 50% 乙醇水溶液重结晶, 其余均为分析纯试剂。

#### (二) 方法

1. 菌体培养和收集: 将在 28℃ 培养 21—23 小时的斜面种菌用无菌水制成菌悬液, 接入牛肉

本文于 1986 年 5 月 21 日收到。

本课题得到国家自然科学基金委员会资助。

汁液体培养基中,于 30°C 在 170rpm/min 旋转摇床培养 10 小时,在 0°C 5000rpm/min 离心 40 分钟 (K70D 冷冻离心机),用无菌水洗涤、离心,重复两次。将菌体配成 100mg 湿菌体/ml 的生理盐水细胞悬液,冰箱保存备用。

2. 酶活力测定: 在 250ml 三角瓶中加入 12.5ml (200mg/L) 的 TNT 溶液,4.0ml pH7.2 的磷酸缓冲液(终浓度 0.066M),用蒸馏水稀释至 24.0ml。在 30°C 水浴中保温 5 分钟后,加入 1.0ml 细胞悬液,摇匀,继续保温两小时(标准条件),迅速冷却,取 1.5ml 反应液离心(14,000rpm/min, TGL-16 型离心机)5 分钟,除去菌体,取 1.0ml 上清液于 25.0ml 比色管中,按乙醇-氢氧化钠分光光度法<sup>[6]</sup>在 DU-7 分光光度计 (Beckman) 450nm 测定 TNT 剩余浓度。

以 TNT 去除率  $S_0 - S/S_0 \times 100\%$  表示酶活力 ( $S_0$  为 TNT 初始浓度,  $S$  为剩余浓度)。以每毫克菌体每小时降解 0.1 微克分子 TNT 为一个酶活力单位 (u)。

3. 菌体蛋白量按 Lowry 法<sup>[6]</sup>测定。

## 结果和讨论

### (一) 柠檬酸细菌生长量、TNT 降解活力与培养时间的关系

将种菌接入牛肉汁液体培养基中,30°C 摇床培养,不同时间取样,分别测定菌

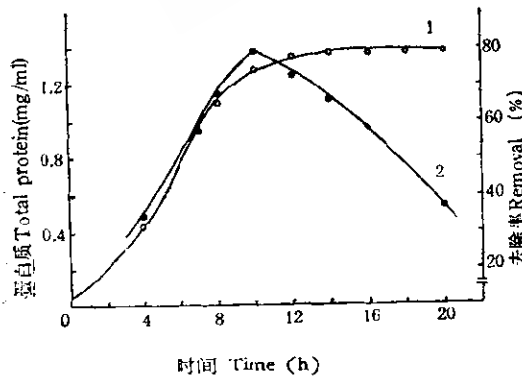


图 1 菌量、酶活力与培养时间的关系

Fig. 1 The relationship between biomass, enzyme activity and incubating time

1. 蛋白量 Protein 2. 酶活力 Enzyme activity

体蛋白量和 TNT 降解酶活力(图 1)。培

养 10 小时(对数生长期)内)菌体蛋白增长量接近最大值,酶活力最高。延长培养时间,菌体蛋白虽有部分增加,但由于菌体老化而使酶活力迅速降低。

### (二) 柠檬酸细菌 TNT 降解酶 的分布

将培养液冷冻离心,配成菌悬液,上清液用 90% 饱和度的硫酸铵沉淀,离心,对蒸馏水透析脱盐,配成相当于原液 100 倍的浓溶液,分别测定相应酶活力。菌悬液对 TNT 的去除率达 84.6%,而后者不表现酶活力。说明柠檬酸细菌 TNT 降解酶为胞内酶。

### (三) 酶作用的最适 pH

以 TNT 为底物,测定不同 pH 下反应的酶活力。酶的最适 pH 为 7.2(图 2)。

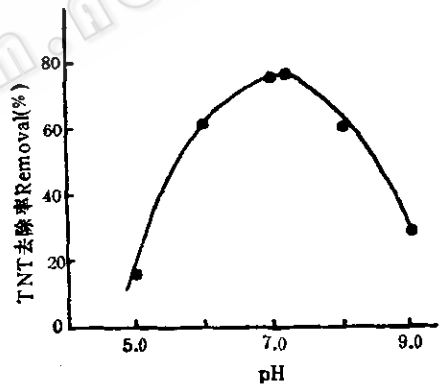


图 2 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity

### (四) 酶反应的最适温度

测定结果见图 3。酶反应的最适温度为 30°C。

### (五) pH 和温度对完整细胞 TNT 降解酶稳定性的影响

#### 1. pH 对酶稳定性的影响

(1) 将细胞悬浮在不同 pH 的缓冲液中,30°C 保温 3 小时,调回 pH7.2,测定酶活力(以未经保温的酶活力为 100% 计),结果见图 4。

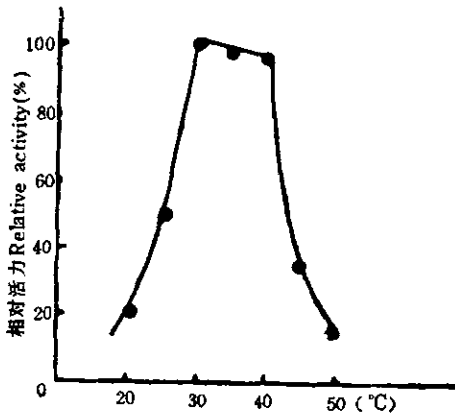


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

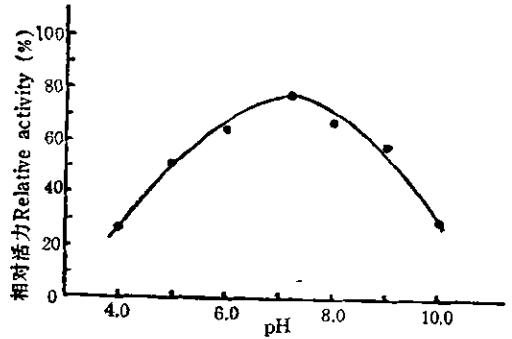


图 4 在不同 pH 下保温 3 小时，酶活力的变化  
Fig. 4 The change of enzyme activity in the cells incubated at different pH for 3h

(2) 将细胞分别悬浮于 pH6.0、7.2、8.0 和 9.0 的缓冲液中，30℃保温，不同时间取样，测定相应的酶活力(图 5)。保温后，酶活力均有一定程度增加。但达到峰值的时间不同，pH 为 6.0、8.0 和 9.0 时仅需 2 小时；而 pH7.2 时需 3 小时才能达到最大值。这种现象不像是酶本身的变化引起的，可能是在弱酸或弱碱条件下，在一定温度下保温使细胞膜的性质发生变化，改

善了底物的通透性，并非由于酶从胞内释放所致。随着时间的延长，在中性范围内 (pH6.0—7.2)，酶活力变化较其它为小。

### 2. 温度对酶稳定性的影响

将细胞悬浮于 pH7.2 的缓冲液中，不同温度下保温，酶活力变化的时间过程如图 6。在 30℃保温 30 小时，酶活力变化不大，45℃保温 12 小时，剩余活力为 40%，保温 30 小时，活力几乎完全丧失。

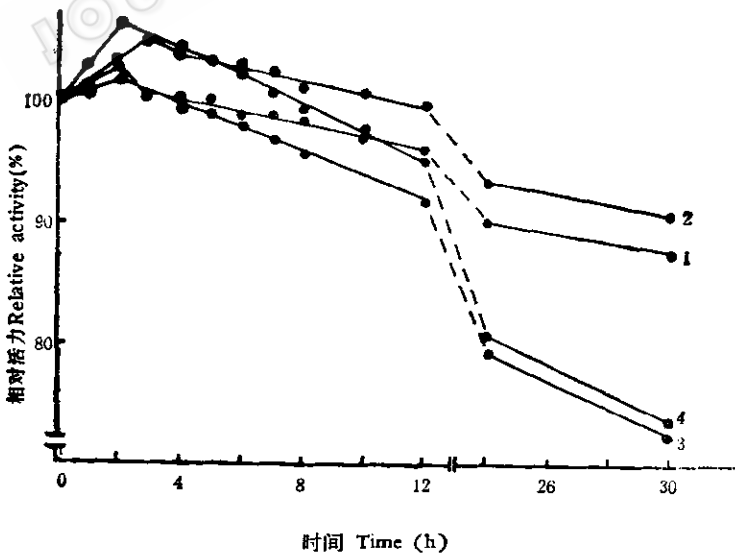


图 5 在不同 pH 下保温过程中酶活力的变化

Fig. 5 The change of enzyme activity during the incubation at  
1. pH 6.0; 2. pH 7.2; 3. pH 8.0; 4. pH 9.0

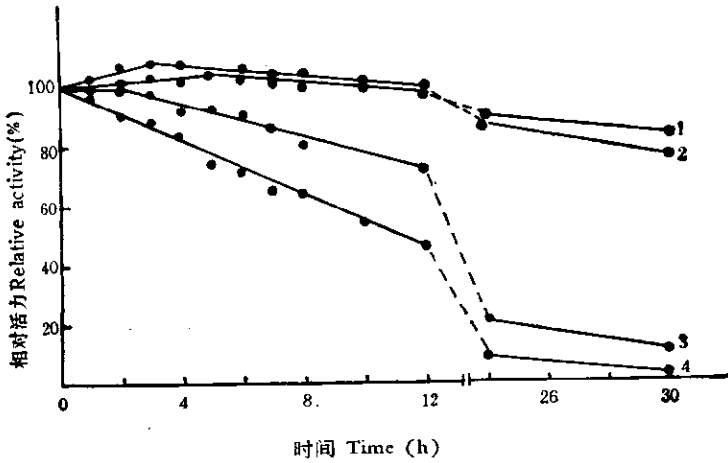


图 6 在不同温度下保温,酶活力变化的时间过程  
 Fig. 6 The time course of enzyme activity changed at 1.25°C; 2.30°C; 3.40°C; 4.45°C

(六) 不同缓冲液对酶活力的影响

将细胞分别悬浮在生理盐水及不同的缓冲系统 (pH8.0) 中, 30°C保温两小时,

调回 pH7.2。一份测定酶活力, 另一份离心, 测定上清液的酶活力(表 1)。缓冲液对活力无影响,在保温过程中,无酶释放。

表 1 不同缓冲液对酶活力的影响  
 Table 1 Effect of different buffer on enzyme activity

缓冲系统 Buffer system	酶活力 Enzyme activity (u)	
	细胞悬液 In suspension	上清液 In supernatant
生理盐水 Normal saline	0.55	0
Tetraborate buffer	0.56	0
Tris buffer	0.54	0
Barbituric acid buffer	0.56	0
Phosphate buffer	0.53	0
Phosphate-citrate buffer	0.56	0
原细胞悬液 Native cell	0.55	0

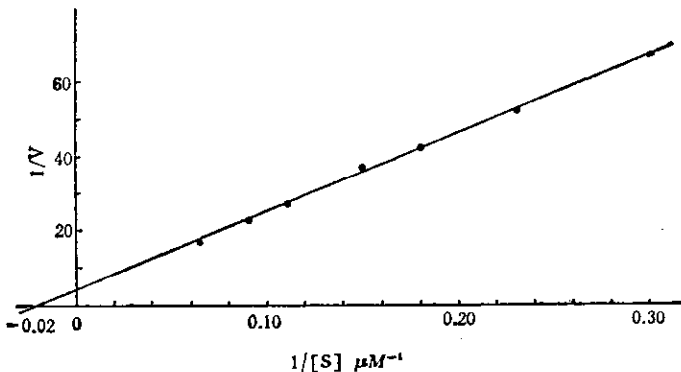


图 7 TNT 降解酶的 Lineweaver-Burk 图  
 Fig. 7 Lineweaver-Burk plot for TNT-degrading enzyme of intact cells

### (七) 米氏常数( $K_m$ )和最大反应速度( $V_{max}$ )的测定

以 TNT 为底物, 使反应液中底物的最终浓度分别为 3.3、4.4、5.5、6.6、7.7、8.8、11.0 和 15.4  $\mu M$ , 分别测定酶活力。按 Lineweaver-Burk 法作图, 求得此酶作用于 TNT 的米氏常数  $K_m$  为 50  $\mu M$ , 最大反应速度  $V_{max}$  为 0.22  $\mu M/mg$  菌体蛋白/小时。

### (八) 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响

在反应体系中分别加入 0.01M 金属离子或 EDTA, 测定酶活力(表 2), 以不加金属离子的酶活力为 100%。 $Hg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Ag^+$  对酶活力有较强的抑制作用。

将细胞悬浮于 0.05M 的 EDTA 溶液中, 30℃保温 1 小时; 离心, 用无离子水洗涂细胞, 再离心, 重复三次, 配成 100mg/ml 细胞悬液, 加入金属离子, 测定酶活力(表 2)。从测定结果看出, 此酶受 EDTA 影响不大。

### (九) 氧对酶活力的影响

按表 3 所列方法进行反应, 测定相应的酶活力(标准反应条件下的酶活力为

表 2 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响  
Table 2 Effect of metal ions and EDTA on enzyme activity

金属离子 Metal ion	相对活力(%)Relative activity	
	原细胞 Native cell	用 EDTA 处理 Cells treated by EDTA
None	100	100
$Ag^+$	26.8	0
$Hg^{2+}$	28.4	0.8
$Cu^{2+}$	40.9	32.6
$Fe^{3+}$	88.6	92.8
$Ni^{2+}$	91.8	91.7
$Zn^{2+}$	92.4	97.9
$Fe^{2+}$	97.3	100.9
$Mg^{2+}$	99.0	100.2
$Co^{2+}$	99.7	100.0
$Al^{3+}$	100.0	91.0
EDTA	88.3	

100%)。结果表明, 酶反应时充氧方式不同, 酶活力表现差异。酶反应时充氧(振荡反应)、底物溶液预先充氧和细胞悬液预先充氧, 均能使酶活力比在试管中静止反应有不同程度的增加。在试管中反应(兼性好氧状态), 氧的供应减少, 酶活力降低, 这可能是由于 TNT 降解过程中有加氧反应的结果。

表 3 氧对酶活力的影响  
Table 3 Effect of oxygen on enzyme activity

处理方法 Method of treatment		相对活力(%) Relative activity
酶反应时充氧(振荡) Reaction mixture + $O_2$ (shaking)		104.3
静止反应 Static reaction	底物预先充氧(在烧瓶中) substrate solution + $O_2$ (in flask)	100.7
	细胞悬液预先充氧(在烧瓶中) cell suspension + $O_2$ (in flask)	100.7
	标准条件下反应 under standard conditions	100.0
	在 50ml 试管中反应 in 50ml test tube	73.3
	在 25ml 试管中反应 in 25 ml test tube	70.8
	反应前真空排氧 expelling $O_2$ before reaction	68.7

表 4 底物类似物对酶活力的影响

Table 4 Effect of the TNT analogues on enzyme activity

底物类似物 Analogue	浓度 ( $M \times 10^{-4}$ ) Concentration	相对活力(%) Relative activity
2,4,6-三硝基甲苯 TNT	3.5	100.0
2,4-二硝基甲苯 DNT	3.5	89.4
间硝基苯甲酸 <i>m</i> -nitrobenzoic acid	4.4	100.0
间二硝基苯 <i>m</i> -dinitrobenzene	3.0	50.9
对二硝基苯 <i>p</i> -dinitrobenzene	3.0	67.2
2,4-二硝基苯酚 2,4-dinitrophenol	3.0	44.6
对硝基苯酚 <i>p</i> -nitrophenol	3.0	44.4
2,4,6-三硝基苯酚 Picric acid	3.0	72.7

#### (十) 底物类似物对酶活力的影响

将表 4 中所列的几种化合物分别加到反应液中,测定这些化合物对酶活力的影响。结果表明,间二硝基苯、2,4-二硝基苯酚和对硝基苯酚对此酶有较明显的抑制作用。可能是由于结构类似,产生了底物竞争之故。

#### 参 考 文 献

[1] Bridge, J. E. et al.: *Proc. R. Soc. Med.*, **35**:

553—560, 1942.

[2] Won, W. D. et al.: *Appl. Microbiol.*, **27**: 513—516, 1974.

[3] Ruchhoft, C. C.: *Ind. Eng. Chem.*, **37**: 937—943, 1945.

[4] Osmon, J. L. et al.: *Dev. Ind. Microbiol.*, **14**: 247—252, 1972.

[5] McCormick, N. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 949—958, 1976.

[6] 杨彦希等:微生物学报, **19**(4):408—415, 1979.

[7] TNT 污水生化处理试验组: 环境科学学报, **1**(3): 258—264, 1981.

[8] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.

## PROPERTIES OF TNT-DEGRADING ENZYMES IN INTACT CELLS OF *CITROBACTER FREUNDII*

Li Wenzhong Yin Ping Yang Yanxi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

*Citrobacter freundii* degraded 2,4,6-trinitrotoluene ( $\alpha$ -TNT) rapidly under aerobic and microaerophilic conditions. When the bacteria grew in broth culture at 30°C for 10 h, TNT-degrading activity of intact cells was high. The optimum pH was 7.2, optimum temperature was 30°C. Both pH- and temperature-stability of the enzyme were good. Its residual activity was 90% of the original activity when incubated at pH 6.0—8.0 30°C for 12 h; while at pH 7.2 30°C for 12 h, the residual activity was 98%. The  $K_m$  for  $\alpha$ -TNT was

50  $\mu M$ ,  $V_{max}$  was 0.22  $\mu M/mg/h$ . Metal ions such as  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  showed 60—76% inhibition. The  $\alpha$ -TNT analogues *m*-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenol and *p*-nitrobenzene (0.3 mM) showed 50—60% inhibition on the activity.

### Key words

*Citrobacter freundii*; TNT-degrading enzyme