

## 弗氏柠檬酸细菌 TNT 降解酶及其调节

李文忠 杨彦希 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) TNT 降解酶中, 同时检出需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶和需 NAD(P)<sup>+</sup> 的 TNT 脱氢酶。

研究了酶形成的时间过程和辅酶在 TNT 酶促降解反应中的行为。

不同种类和不同浓度的碳、氮源对酶形成的调节作用不同。当 NH<sub>4</sub>Cl 和尿素浓度小于 0.1 mol/L 时, 能促进 TNT 还原酶和 TNT 脱氢酶的产生。KNO<sub>3</sub> 严重阻遏这两种酶的形成。葡萄糖对 TNT 还原酶和 TNT 脱氢酶的形成均有促进作用。柠檬酸钠有助于 TNT 脱氢酶的生成, 当其浓度小于 0.5%, 使 TNT 还原酶活力提高, 当大于此浓度时, 使该酶活力迅速下降。

**关键词** 弗氏柠檬酸细菌; 需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶; 需 NAD(P)<sup>+</sup> 的 TNT 脱氢酶; 酶调节

1976 年 McCormick 等<sup>[1]</sup>报道了韦荣氏球菌 (*Veillonella oloalescens*) 无细胞提取液能还原三硝基甲苯 (TNT) 及某些硝基化合物。同年, Klausmeier 等<sup>[2]</sup>对枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的无细胞提取液降解 TNT 的能力进行了试验, 认为该菌的无细胞提取液中存在需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶。

我们于 1979 年报道了一株能以 TNT 做为生长的碳、氮源, 对 TNT 具有高效降解能力的弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*)<sup>[3]</sup>, 并成功地应用于含 TNT 工业废水的微生物处理中<sup>[4]</sup>。为阐明该菌降解 TNT 的机理, 对完整细胞降解 TNT 的活性及性质进行了研究<sup>[5]</sup>。本文对弗氏柠檬酸细菌无细胞提取液中的 TNT 降解酶系进行了研究, 在以 TNT 为底物的酶反应中, 不仅存在着需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶 [NAD(P)H-linked TNT reductase, 简称 TNT-Red], 同时还存在着

需 NAD(P)<sup>+</sup> 的 TNT 脱氢酶 [NAD(P)<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase, 简称 TNT-Deh]。并且研究了碳、氮源对酶系形成的调节作用。

## 材料和方法

### (一) 菌种

弗氏柠檬酸细菌 (*Citrobacter freundii*) 为本研究组分离鉴定<sup>[3]</sup>。

### (二) 培养基

1. 种子培养基: 肉汁琼脂斜面细菌培养基。
2. 菌体生长用合成培养基 (%): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 1.0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, NaCl 0.025, 酵母浸膏 0.02, 葡萄糖 2.0, 尿素 0.1 mol/L, pH 7.2。

### (三) 菌体收集和无细胞提取液的制备

用不同种类、不同浓度的碳、氮源, 添加或代替合成培养基中的碳、氮源。接种弗氏柠檬酸细菌, 于 30℃, 170 r/min 摇床培养 11h。4500 × g 离心 40 min 收集菌体。用 pH 7.2 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤二次, 并用此缓冲

本文于 1987 年 4 月 21 日收到。

液配成菌悬液,在冰盐浴中 19KHz 200W 超声破碎 5'×2 (Labsonic 2000, B. Braun, USA)。16000×g 离心 60 min。取上清液,用上述缓冲液配成 10 mg/ml 的粗酶液,备用。

#### (四) 酶活力测定方法

1. 在 TNT 存在下, NADH 的氧化: 在反应体系中,底物 TNT 和 NADH 共存时, TNT-Red 催化 TNT 还原而将 NADH 氧化为 NAD<sup>+</sup>, 使其在 340 nm 处的吸光度 A 下降。在一定时间内, A<sub>340</sub> 的下降速率可表示 TNT-Red 催化 TNT 还原的活力。在比色杯内加入 0.6 ml 0.2 mol/L (pH 7.2) Tris-HCl 缓冲液、1.0 ml 0.4 mmol/L TNT 溶液及 1.0 ml 2.0 mmol/L NADH 溶液, 于紫外分光光度计 (BECKMAN DU-7) 测定室内 30℃ 保温 5 min 后, 加入 0.4 ml 粗酶液, 立即在 340 nm 处对酶促反应的时间过程进行扫描。同法对无底物内源氧化反应进行时间过程扫描。以二者在 A<sub>340</sub> 下降值之差, 按 NADH 在该波长处的克分子吸光度计算 NADH 的氧化量。在上述条件下, 每分钟氧化 1.0 μmol 的 NADH 所需的酶量定义为一个 TNT-Red 酶活力单位。

2. 在 TNT 存在下, NAD<sup>+</sup> 的还原: 除用 1.0 ml 2.0 mmol/L 的 NAD<sup>+</sup> 溶液代替 NADH 溶液以及用酶促反应与内源反应 A<sub>340</sub> 增加值之差计算 NAD<sup>+</sup> 还原量外, 其余均与方法 1 相同。规定在该条件下, 每分钟还原 1.0 nmol NAD<sup>+</sup> 所需的酶量定义为一个 TNT-Dch 酶活力单位。

3. 在 NADH 或 NAD<sup>+</sup> 存在下, TNT 的减少: 用 HPLC 法<sup>[6]</sup>分别测定 TNT-Red 催化还原 TNT 和 TNT-Dch 催化氧化 TNT 的量来计算两种酶活力(反应液同方法 1 和 2)。在上述反应条件下, 规定每分钟催化还原(或氧化)1.0 mmol TNT 所需的酶量为一个 TNT-Red (或 TNT-Dch) 酶活力单位。

#### (五) 蛋白质测定用 Lowry 法<sup>[7]</sup>

#### (六) 试剂

TNT 经乙醇-水 (1:1) 重结晶纯化。NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>、NADH、NADPH 均为 Sigma 产品, 其余均为市售 AR 级试剂。

## 结果和讨论

### (一) 无细胞提取液中 TNT 降解酶系的检出

1. 需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶的检出: 在含缓冲液、TNT 和 NAD(P)H 的反应体系中, 加入适量粗酶液 (方法 1), 立即在 DU-7 紫外分光光度计 340 nm 处对酶反应液进行反应时间过程扫描。同时也对内源反应液扫描 (图 1)。在 TNT 存在时, A<sub>340</sub> 随反应时间的延长而迅速降低。显示在酶催化下 TNT 还原, 而 NAD(P)H 被氧化为 NAD(P)<sup>+</sup>, 致使 A<sub>340</sub> 减小。在内源反应中 A<sub>340</sub> 也有所下降, 这可能是粗酶液中存在微量氧化性物质所致。酶促反应与内源反应 A<sub>340</sub> 下降之差显示了需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶的存在。

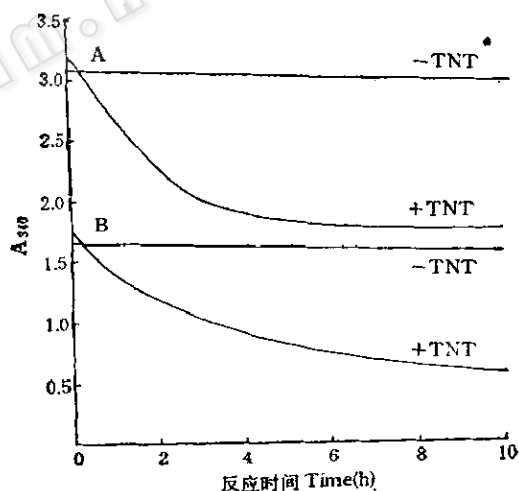


图 1 需 NAD(P)H 的 TNT 还原酶的检出  
Fig. 1 The detection of NAD(P)H-linked TNT reductase

A: 需 NADH TNT 还原酶 NADH-linked TNT reductase; B: 需 NADPH TNT 还原酶 NADPH-linked TNT reductase

对 TNT 酶促还原反应中的 A<sub>340</sub> 进行等时间间隔扫描 (RepScan) (图 2)。在 NADH 特征吸收波长 340 nm 处的吸光度 A 依次下降, 且下降速率递减, 说明在

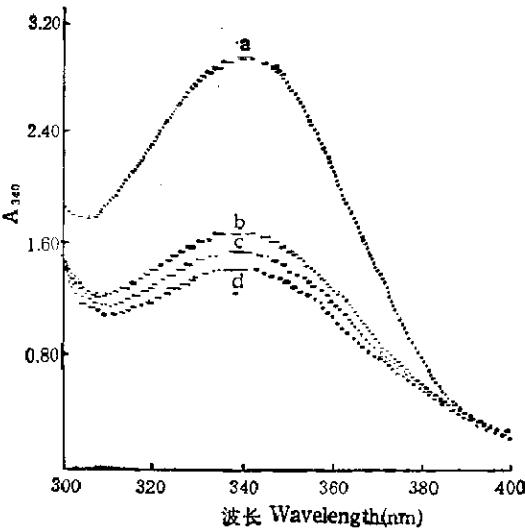


图 2 TNT 酶促还原反应中 NADH 吸光度的改变  
Fig. 2 The change of NADH absorbancy in the presence of TNT  
扫描 Scan: From a to d

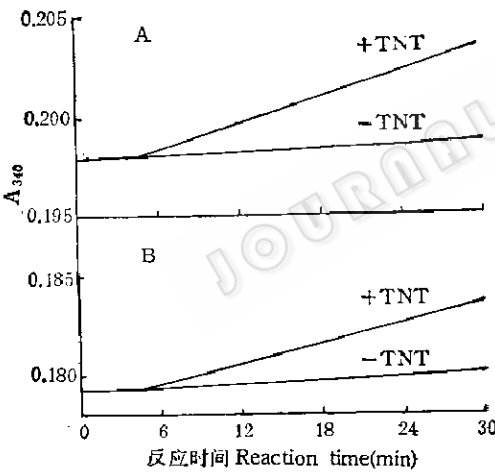


图 3 需 NAD(P)<sup>+</sup> TNT 脱氢酶的检出  
Fig. 3 Detection of NAD(P)<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase  
A: 需 NAD<sup>+</sup>+TNT 脱氢酶 NAD<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase; B: 需 NADP<sup>+</sup> TNT 脱氢酶 NADP<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase

TNT 存在下的酶促反应中 NADH 被氧化。

2. 需 NAD(P)<sup>+</sup> 的 TNT 脱氢酶的检出: 除用 NAD(P)<sup>+</sup> 代替 NAD(P)H 外,其它操作同上。图 3 表明, NAD(P)<sup>+</sup>

做为受氢体,在 TNT 存在下的酶促反应中被还原为 NAD(P)H,致使 A<sub>340</sub> 逐渐增大。在无 TNT 的内源反应中,吸光度未显示明显变化。以上结果表明,在无细胞提取液中也存在着需 NAD(P)<sup>+</sup> 的 TNT 脱氢酶。

3. 酶活力与菌体培养时间的关系: 在细菌的摇床培养过程中,间隔不同时间取样,分别测定菌体蛋白量及其无细胞提取液中两种酶的活性(下述实验均用 NADH 和 NAD<sup>+</sup> 做为辅酶)。结果(图 4-A,B)表明,培养 16h,菌量达到稳定,而 TNT-Red 和 TNT-Deh 活力分别在 10h 和 12h 达到最大,延长培养时间,酶活力迅速降低。

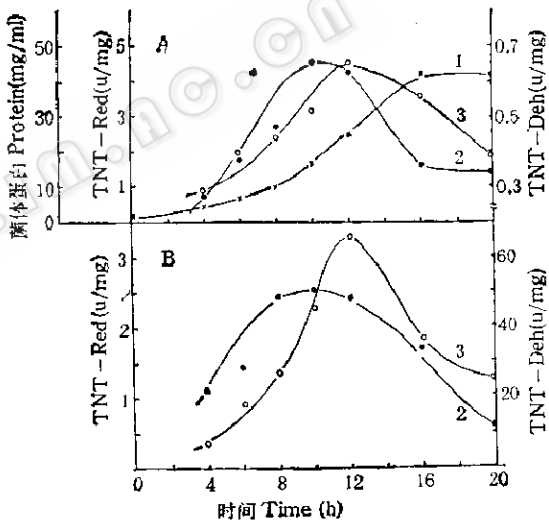


图 4 TNT-Red 和 TNT-Deh 形成的时间过程  
Fig. 4 The time course of TNT-Red and TNT-Deh formation

A: 用 A<sub>340</sub> 表示酶活性 Enzyme activity showed by A<sub>340</sub>; B: 用 TNT 的减少表示酶活性 Enzyme activity showed by decrease of TNT  
1. 菌体蛋白 Protein (mg/ml); 2. TNT-Red; 3. TNT-Deh

上述实验结果证明,柠檬酸细菌的无细胞提取液中不仅存在 TNT-还原酶,同时也存在 TNT-脱氢酶。

(二) 氮源对酶形成的调节

1. 不同氮源对 TNT-Red 和 TNT-

表 1 不同氮源对酶形成的影响

Table 1 The effect of nitrogen sources on the formation of enzymes

氮源 Nitrogen source		TNT	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	KNO <sub>3</sub>	尿素 Urea
相对活力(%) Relative activity	TNT-Red	100	82.4	166.0	82.1	144.4
	TNT-Deh	100	158.7	190.7	56.6	173.8
菌体蛋白 (mg/ml) Protein		0.097	0.32	0.40	0.50	0.48

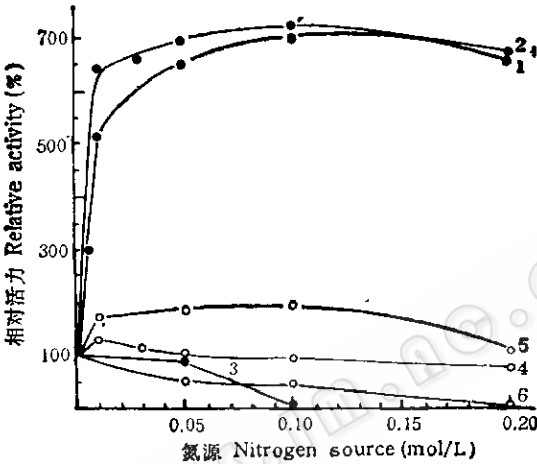


图 5 氮源浓度对酶形成的影响

Fig. 5 The effect of nitrogen sources concentration on the formation of enzymes

●—● TNT-Red activity; ○—○ TNT-Deh activity  
氮源 Nitrogen sources:  
1, 4: NH<sub>4</sub>Cl; 2, 5: 尿素 Urea; 3, 6: KNO<sub>3</sub>

Deh 形成的影响: 用 0.1 mol/L 的不同含氮化合物代替合成培养基中的氮源, 调 pH 为 7.2 分别收集 11h 的培养物, 测定其菌体蛋白量及无细胞提取液中 TNT-Red 和 TNT-Deh 的活力(表 1)。NH<sub>4</sub>Cl 和尿素对上述两种酶有明显的促进作用, KNO<sub>3</sub> 的存在不利于酶的形成, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 能促进 TNT-Deh, 而影响 TNT-Red 的形成。

2. 氮源浓度对酶形成的影响: 用不同浓度的 NH<sub>4</sub>Cl、KNO<sub>3</sub> 和尿素做氮源, 调整 pH 为 7.2, 其它成分不变, 在此培养基中培养细菌, 分别测定两种酶的活力(图

5)。加入 NH<sub>4</sub>Cl 和尿素使菌体蛋白量增加, 并使 TNT-Red 活力显著提高, 当这两种氮源的浓度达 0.1 mol/L 时, TNT-Red 的比活力最大; 但这两种氮源浓度的改变对 TNT-Deh 活力影响不明显。KNO<sub>3</sub> 的加入虽能提高菌体蛋白量, 但明显阻遏了这两种酶的形成, 其阻遏程度与 KNO<sub>3</sub> 浓度的增加呈正相关。

### (三) 碳源对酶形成的调节

1. 不同碳源对酶形成的影响: 用浓度为 2% 的不同含碳化合物代替合成培养基中的碳源, 收集生长 11h 的培养物, 分别测定菌体蛋白量及无细胞提取液中两种酶活

表 2 不同碳源对酶活力的影响

Table 2 The effect of carbon sources on enzyme activity

碳 源 Carbon source	菌体蛋白 (mg/ml) Protein	相对比活力(%) Relative specific activity	
		TNT-Red	TNT-Deh
TNT	0.058	100	100
葡萄糖 Glucose	0.453	547	140
木糖 Xylose	0.693	591	184
乳糖 Lactose	0.060	448	144
蔗糖 sucrose	0.184	560	140
甘露醇 Mannitol	0.165	574	63
山梨糖 Soubose	0.011	377	40
柠檬酸钠 Sodium citrate	0.050	121	132
丙二酸钠 Sodium malonate	0.067	92	92
乙醇 Ethanol	0.156	44	12
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.063	4	69

力(表 2)。除柠檬酸钠、乳糖和山梨糖外，所试碳源不同程度地促进了菌体生长。葡萄糖、木糖和蔗糖明显促进 TNT-Red 和 TNT-Deh 的形成。乙醇和乙酸乙酯严重抑制酶的形成。甘露醇和山梨糖能促进 TNT-Red，而阻遏 TNT-Deh 的形成。

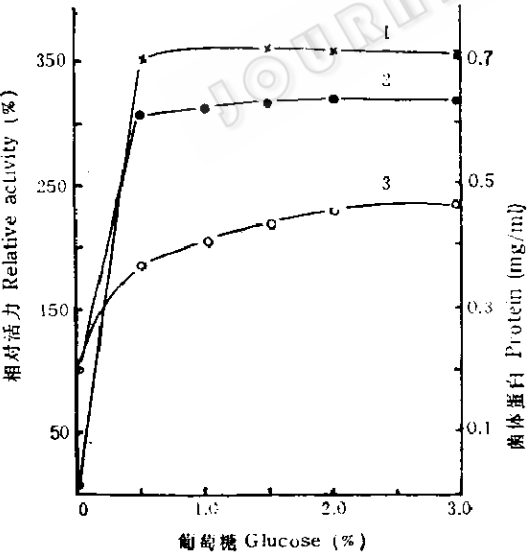


图 6 葡萄糖浓度对酶活力的影响

Fig. 6 The effect of glucose concentration on activity

1. 菌体蛋白 Protein (mg/ml); 2. TNT Red; 3. TNT-Deh

2. 碳源浓度对 TNT-Red 和 TNT-Deh 形成的影响：当加入到合成培养基中葡萄糖浓度为 0.5% 时，菌体蛋白量达到最大，TNT-Red 的活力最大。当葡萄糖浓度为 2% 时，TNT-Deh 的活力最大(图 6)。当柠檬酸钠为 0.5% 时，对菌体生长和两种酶的形成有较明显的促进作用，但超过 0.5% 时，其调节行为发生了改变。

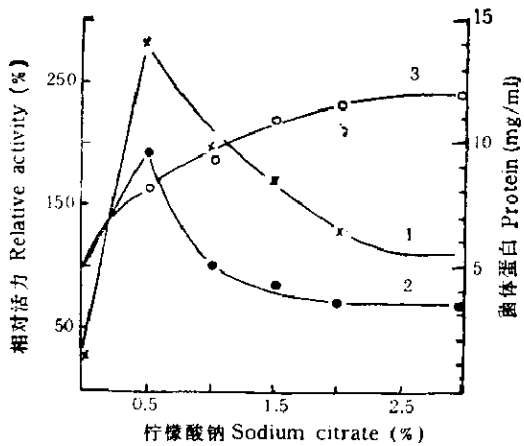


图 7 不同浓度柠檬酸钠对酶活力的影响

Fig. 7 The effect of sodium citrate concentration on activity

1. 菌体蛋白 Protein (mg/ml); 2. TNT-Red; 3. TNT-Deh

随柠檬酸钠浓度的提高, TNT-Deh 活力也随之增大, 当浓度为 2% 时, 比活力最大; 而此过程中, 细胞生长以及 TNT-Red 的形成受到了严重抑制, 其抑制作用随柠檬酸钠浓度的提高而增大(图 7)。

用洗涤细胞进行实验, 进一步证明了葡萄糖对酶形成的调节作用。收集在合成

培养基中生长 11h 的细胞, 用生理盐水洗涤两次, 将该菌体转接到剥夺碳源的合成培养基中, 培养 4h 后, 补加 2% 葡萄糖继续培养, 每隔 2h 取样, 分别测定菌体蛋白量及无细胞提取液中 TNT-Red 和 TNT-Deh 的活力(图 8)。在无碳源的培养基中生长时, 菌体蛋白量和 TNT-Red 活力, 特别是 TNT-Deh 活力迅速下降, 当补回碳源后, 菌体生长立即恢复, TNT-Red 活力回升缓慢, TNT-Deh 活力迅速上升。

本文初步揭示了 TNT 降解酶系中存在着两种酶, 并研究了该酶活力调节的某些规律。关于此酶系的进一步研究及其代谢产物的分析正在进行中。

### 参考文献

- [1] McCormick, N. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 949—958, 1976.
- [2] Klausmeier, R. E. et al.: *Proceedings of the third international biodegradation symposium*, p. 799—805, 1976.
- [3] 杨彦希等: *微生物学报*, **19**(4): 408—415, 1979.
- [4] TNT 污水生化处理组: *环境科学学报*, **1**(3): 258—264, 1981.
- [5] 李文忠等: *微生物学报*, **27**(3): 257—263, 1987.
- [6] 李文忠等: *微生物学杂志*, **7**(3): 50—52, 1987.
- [7] Lowry, P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.

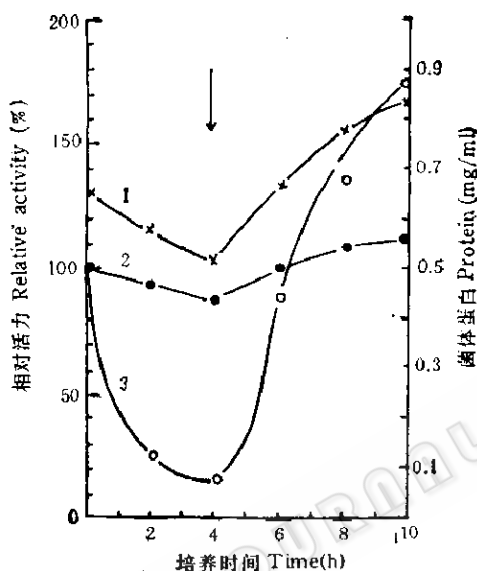


图 8 培养基中葡萄糖对酶活力的影响

Fig. 8 The effect of glucose in culture medium on activity

箭头示补加葡萄糖 The arrow indicates the addition of glucose

1. 菌体蛋白 Protein (mg/ml);
2. TNT-Red;
3. TNT-Deh

## TNT-DEGRADING ENZYME OF *CITROBACTER FREUNDII* AND ITS REGULATION BY CARBON AND NITROGEN SOURCE

Li Wenzhong Yang Yanxi Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

It was detected that both NAD(P)H-linked reductase (TNT-Red) and NAD(P)<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase (TNT-Deh) were present in TNT-degrading enzymes of *Citrobacter freundii* simultaneously. The time course of formation for the enzymes and the actions of coenzymes in enzymatic reaction of TNT have been studied. The effects of varied carbon and nitrogen sources on the regulation of the enzymes were different clearly. When the concentration of NH<sub>4</sub>Cl or urea in culture medium was more than 0.1 mol/L, the formation of both TNT reductase and TNT dehydrogenase was promoted. However, the formation of these enzymes was inhibited by

KNO<sub>3</sub> in culture. The production of both reductase and dehydrogenase was promoted by glucose. The sodium citrate was able to help the formation of the TNT dehydrogenase. The activity of the TNT reductase was increased when the concentration of sodium citrate was less than 0.5%, but when it was more than 0.5%, the activity of this enzyme was decreased rapidly.

### Key words

*Citrobacter freundii*; NAD (p)H-linked TNT reductase; NAD(P)<sup>+</sup>-linked TNT dehydrogenase; Enzyme regulation