

# 食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株降解苯胺代谢途径的研究

刘志培 杨惠芳 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*) AN3 菌株中降解苯胺的酶类均为诱导酶,在以苯胺为唯一碳、氮源和能源生长的细胞中,含有苯胺双加氧酶、邻苯二酚 2,3-双加氧酶、2-羟基己二烯半醛酸脱氢酶、4-草酰巴豆酸脱羧酶和 4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶等。苯胺双加氧酶作用于苯胺的  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为  $292 \mu\text{mol/L}$  和  $3.57 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 邻苯二酚 2,3-双加氧酶作用于邻苯二酚的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $16.4 \text{ mol/L}$  和  $15.2 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。根据实验结果,推测了该菌株降解苯胺的代谢途径。

**关键词** 食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株 苯胺 降解酶 代谢途径

**分类号** Q935 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0448-53

苯胺是农药、染料、塑料和医药工业的重要原料<sup>[1,2]</sup>,在自然环境中硝基芳香化合物和苯胺类农药的微生物转化也可形成苯胺<sup>[3,4]</sup>,此外,在印染废水的生物脱色处理中也有苯胺的形成<sup>[5]</sup>。苯胺是严重污染环境和危害人体健康的有害物质,生物降解是消除环境中苯胺的重要方式之一<sup>[6]</sup>。

Schnell S. 等<sup>[7]</sup>报道,在厌氧条件下苯胺脱硫杆菌(*Desulfobacterium anilini*)首先使苯胺羧基化形成对氨基苯甲酸,然后进行还原脱氨作用。在好氧条件下的情形与此不同,Bachofer 等<sup>[8]</sup>证明了诺卡氏菌(*Nocardia*)首先通过双加氧酶的催化使苯胺形成邻苯二酚,进而通过邻苯二酚 1,2-双加氧酶<sup>[9,10]</sup>或邻苯二酚 2,3-双加氧酶<sup>[11,12]</sup>的作用开环,形成可作为微生物碳、能源的化合物,不同微生物降解苯胺的途径不同,表明苯胺微生物降解代谢的多样性,生物细胞中所有的反应都是由酶催化进行的,因此可以通过测定细胞中所含的酶类来确定苯胺的降解代谢途径。本文对具有高活性降解苯胺的食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株降解苯胺的酶类进行了活性测定和研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与培养基

食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*) AN3 菌株(以下简称 AN3 菌株)和培养基见文献<sup>[13]</sup>。

### 1.2 AN3 菌株完整细胞悬液的制备

将 AN3 菌株接种于上述培养基中,30℃ 摇床培养 3d,5 000 × g 离心 10min 收集细胞,以磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH7.0)洗涤细胞两次,悬浮在相同缓冲液中,制成一定细胞浓度的悬液。

1.3 粗酶液的制备

细胞悬浮液在 -20℃ 冷冻后 ,经过两次 X-Press 细胞破碎器破碎 ,再经 19 000 × g 离心 30min ,取其上清液为粗酶液。

1.4 苯胺的测定

采用高压液相色谱法( HPLC )测定 C-18 反向柱 ,测定波长为 230nm ,流动相为甲醇 :水 = 75:25 ,流速为 1.5mL/min ,苯胺的停留时间约为 3.25min。

1.5 酶活力测定

苯胺双加氧酶、邻苯二酚双加氧酶和其他降解酶类的测定分别按文献 [ 14 ] [ 15 ] 和 [ 16 ] 所述方法进行。

1.6 氨的测定

按文献 [ 17 ] 所述方法进行。

1.7 化学试剂

试验所用化学试剂购自北京化学试剂商店或按文献 [ 18 ] 所述方法合成。

2 结果

2.1 苯胺双加氧酶及氨的释放

2.1.1 苯胺双加氧酶活性的测定 :在好氧条件下 ,苯胺的加氧脱氨是其微生物降解代谢的第一个步骤 ,也是最关键的步骤 ,催化该反应的酶是苯胺双加氧酶。为此测定了食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株在不同基质中生长制备的完整细胞苯胺双加氧酶的活性。表 1 的结果表明 ,AN3 菌株在以苯胺为唯一碳、氮源生长的情况下 ,其完整细胞具有很高的苯胺双加氧酶活性( 1094u/mg ) ,而在其他基质中生长的细胞未测出该酶活性 ,此结果还说明 ,该菌株中的苯胺双加氧酶为诱导酶。

2.1.2 氨的释放 :为了检验 AN3 菌株降解苯胺是否有氨的放出 ,以苯胺为唯一碳、氮和能源生长制备的完整细胞对不同浓度的苯胺进行一定时间的降解反应 ,然后测定反应液中的氨含量。表 2 的结果表明 ,所测出的氨含量完全对应于苯胺浓度 ,说明反应液中的氨是来源于苯胺的微生物降解 ,苯胺在经过 AN3 完整细胞作用之后 ,确实有氨释放 ,可作用该菌株细胞生长所需的氮源。

表 1 AN3 菌株在不同基质培养的细胞之苯胺双加氧酶活性 \*

Table 1 Activities of aniline dioxygenases of intact cells of *C. acidovorans* AN3 growing on different substrates

生长底物 Growth substrate	苯胺 Aniline	乳酸盐 Lactate	培养基 LB
苯胺双加氧酶 Aniline dioxygenase ( <i>u</i> /mg cell)	1094	0	0

\* 1 unit of enzyme was defined as the cells needed to  
oxide 1 nmol aniline per minute among 10 min.

表 2 苯胺在经过 AN3 菌株完整细胞作用后氨的释放 \*

Table 2 Release of ammonia from aniline catalyzed by aniline dioxygenase

苯胺 Aniline( <i>mmol</i> /L)	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( <i>mmol</i> /L)	0	0.0889	0.194	0.50	1.005	1.994

\* 10mg cell/wet 1mL pH7.0 ,30℃ ,shaking for 1h.

2.1.3 苯胺双加氧酶的反应动力学 :在不同苯胺浓度下对该酶进行了降解苯胺的反应速度测定 ,通过双倒数作图 ,求得该酶降解苯胺的米氏常数 *K<sub>m</sub>* 值和最大反应速度 *V<sub>max</sub>* 。

别为  $292\mu\text{mol/L}$  和  $3.57\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (图 1),说明苯胺是该酶良好的底物。

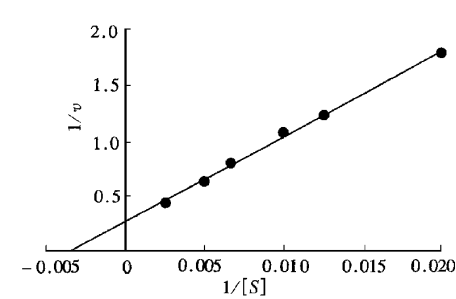


图 1 AN3 菌株的苯胺双加氧酶的动力学

Fig.1 Kinetics of aniline dioxygenase from  
*C. acidovarans* AN3  
 $v$   $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $[S]$   $\mu\text{mol/L}$ .

的活性则很低 ( $68\text{u/mg}$ ),因而可以认为 AN3 菌株主要通过邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化邻苯二酚的开环反应,亦即该菌株主要通过间位裂解(*meta-cleavage*)降解邻苯二酚;而在其他基质中生长制备的粗酶液,不含邻苯二酚双加氧酶的活性。该结果说明在 AN3 菌株降解苯胺的过程中形成了邻苯二酚作为中间产物,进而被细胞中所含的邻苯二酚 2,3-双加氧酶氧化开环形成 2-羟基乙二烯半醛酸。此外,该结果还表明,AN3 菌株的邻苯二酚 2,3-双加氧酶与苯胺双加氧酶一样,也是诱导酶。

表 3 AN3 菌株在不同基质生长制备的粗酶液的邻苯二酚双加氧酶活性\*  
Table 3 Activities of catechol dioxygenases of crude extracts made from  
cells of *C. acidovarans* AN3 growing on different substrates

生长底物 Growth substrate	酶试底物 Assay substrate	邻苯二酚-1,2-双加氧酶 Catechol-1,2-dioxygenase/u	邻苯二酚-2,3-双加氧酶 Catechol-2,3-dioxygenase/u
苯胺 Aniline	邻苯二酚 Catechol	68	5226
乳酸盐 Lactate	邻苯二酚 Catechol	0	0
培养基 LB	邻苯二酚 Catechol	0	0

\* 1 unit of enzyme was defined as the amount which will oxide 1 nmol catechol pre minute at 22℃ under the conditions just described in material and methods.

2.2.2 邻苯二酚-2,3-双加氧酶的反应动力学:在总体积为 3.0mL 的反应液中,含有 0.1mL 的粗酶液和不同浓度的邻苯二酚。双倒数作图法(图 2)求得该酶作用于邻苯二酚  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为  $16.4\mu\text{mol/L}$  和  $15.2\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,说明邻苯二酚是该酶非常好的底物。图 1 和图 2 中两种酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  的结果表明,苯胺的加氧脱氨是 AN3 菌株苯胺降解代谢过程中的限速步骤,与检测不到邻苯二酚的积累相一致。

2.3 2-羟基乙二烯半醛酸脱氢酶

在 AN3 菌株中,邻苯二酚通过邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化开环,形成 2-羟基乙二烯半醛酸(最大吸收在 375nm)。该产物在细胞中,或是通过以  $\text{NAD}^+$  为辅酶的脱氢反应形成 4-草酰巴豆酸,或是通过水合反应形成 2-酮-4-烯戊酸<sup>[17]</sup>。可以通过测定 AN3 菌株

竟含有哪种酶来确定降解代谢途径的走向,以上两个反应的特点是,一个需要  $\text{NAD}^+$  作为辅酶,另一个不需要  $\text{NAD}^+$ ,因此很容易区分这两个反应。表 4 的结果表明,在加有  $\text{NAD}^+$  的反应液,其  $\text{OD}_{375}$ (底物 2-羟基己二烯半醛酸的最大吸收峰)很快降低,而不加  $\text{NAD}^+$  的反应液,其  $\text{OD}_{375}$  不变。该结果说明,在 AN3 菌株的粗酶液中含 2-羟基己二烯半醛酸脱氢酶,而不含有 2-羟基己二烯半醛酸水合酶,亦即在该菌株中 2-羟基己二烯半醛酸是通过脱氢酶的脱氢反应形成 4-草酰巴豆酸,而不是通过水合反应进行降解代谢的。

表 4 食酸丛毛单胞菌粗酶液的 2-羟基己二烯半醛酸脱氢酶活性\*

Table 4 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase in crude extract of <i>C. acidovorans</i> AN3 growing on aniline								
时间 $t/\text{min}$	0	1	2	3	4	5	6	比活 Specific activity
$\text{OD}_{375}(\text{NAD}^+)$	1.5	1.2	1.0	0.82	0.69	0.55	0.44	4266
$\text{OD}_{375}(\text{no NAD}^+)$	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0

\* 1 unit of enzyme was defined as the amount needed to oxidize 1 nmol 2-hydroxymuconic semialdehyde per minute among 10 min

2.4 4-草酰巴豆酸脱羧酶

4-草酰巴豆酸脱羧酶可以催化 4-草酰巴豆酸脱羧反应形成 2-酮-4-烯戊酸(最大吸收峰在 265nm 处)。因此,该酶可以通过测定 265nm 处吸收的增加来测定。以粗酶液对 4-草酰巴豆酸为底物进行脱羧反应,随着反应的进行,265nm 处的吸收很快增加,表明粗酶液中含有 4-草酰巴豆酸脱羧酶,即在该菌株中 4-草酰巴豆酸是通过脱羧酶的催化反应形成 2-酮-4-烯戊酸进行降解代谢的。

2.5 4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶

4-草酰巴豆酸经 4-草酰巴豆酸脱羧酶作用之后形成了 2-酮-4-烯戊酸,该产物经过一步水合反应形成了 4-羟基-2-酮戊酸。在  $\text{NADH}$  存在的条件下,4-羟基-2-酮戊酸可以被 4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶催化裂解形成乙醛和丙酮酸,然后进入三羧酸循环,合成细胞物质和能量代谢。在此情形下,4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶活性可以通过测定  $\text{NADH}$  的氧化(340nm 处吸收的下降)来测定。实验结果表明,随着反应的进行,340nm 处的吸收下降很快,而没有底物的对照则下降很少,说明在食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株的粗酶液中含有 4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶活性。

3 讨论

苯胺的微生物降解代谢可以在不同的条件下发生,不同的微生物代谢途径也各不相同,使苯胺的微生物降解代谢特性和代谢途径呈现多样性。生物细胞中的所有生化反应

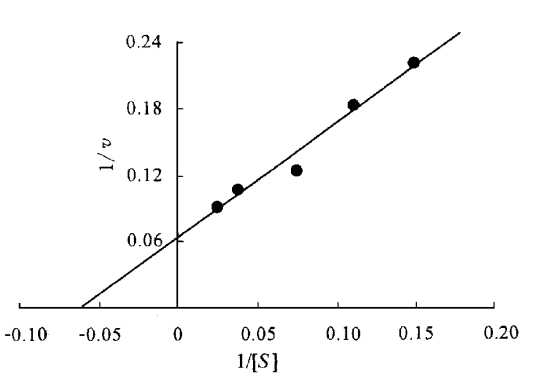


图 2 粗酶液的邻苯二酚-2,3-双加氧酶动力学

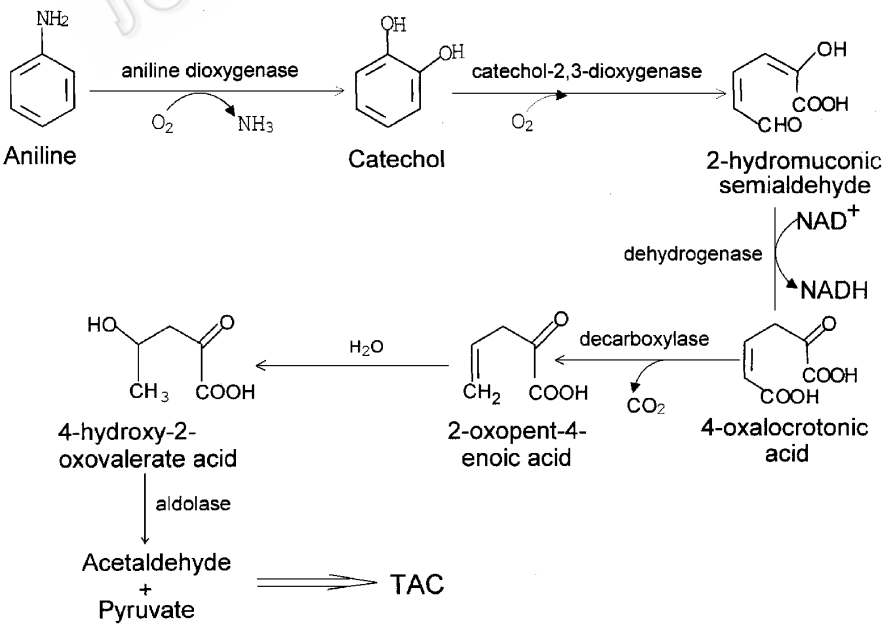
Fig.2 Kinetics of crude enzyme for catechol  
 $v: \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}; [S]: \mu\text{mol/L}$ .

都是由酶催化完成的,因此可以通过测定细胞中所含的酶类来确定某种有机物的代谢途径。上述试验结果表明,AN3 菌株含有与苯胺降解代谢有关的一系列酶类,且均为诱导酶。据文献<sup>[14]</sup>报道,苯胺双加氧酶是一个多亚基酶,催化苯胺加氧脱氨反应时,还要求有氨基转移蛋白的参与,在细胞破碎后,破坏了该酶亚基之间以及亚基与氨基转移蛋白之间的有机结构,因此用粗酶液无法测定该酶活性。AN3 菌株与此一样,只能用完整细胞进行该酶活性的测定, $K_m$  值和  $V_{max}$  分别  $292\mu\text{mol/L}$  和  $3.57\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,分别比诺卡氏菌<sup>[8]</sup>、食酸假单胞菌<sup>[9]</sup>和恶臭假单胞菌<sup>[14]</sup>降解苯胺的  $K_m$  值和  $V_{max}$  为低和高,进一步说明了 AN3 菌株是目前已报道的降解苯胺能力最高的菌株。

据报道<sup>[16]</sup>,邻苯二酚-2,3-双加氧酶对氧非常敏感,因此只用粗酶液对该酶的动力学等特性进行了初步的研究。该酶作用于邻苯二酚的  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为  $16.4\mu\text{mol/L}$  和  $15.2\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,说明邻苯二酚是该酶非常好的底物。该酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别比文献<sup>[12]</sup>报道的其他菌株的邻苯二酚 2,3-双加氧酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  低和高。从该菌株的苯胺双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  可以看出,苯胺的加氧脱氨是该菌株降解苯胺的限速步骤,与检测不出邻苯二酚的积累的结果是相一致的。

其他酶类活性测定结果表明,AN3 菌株除了含有上述两个酶外,还含有 2-羟基己二烯半醛脱氢酶、4-草酰巴豆酸脱羧酶和 4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶等,且它们的活性都很高。可以认为在 AN3 菌株中苯胺是通过苯胺双加氧酶催化,形成邻苯二酚,再由邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化形成 2-羟基己二烯半醛,然后由脱氢酶催化形成 4-草酰巴豆酸,再经脱羧酶催化形成 4-羟基-2-酮戊酸,该产物经水合作用形成 4-羟基-2-酮戊酸,最后经醛缩酶催化形成乙醛和丙酮酸,从而进入三羧酸循环。

根据上述结果,推测的食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株降解苯胺的代谢途径如下图:



## 参 考 文 献

- [1] Kearney P C, Kaufman D D. *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1975.
- [2] Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: T Leisinger *et al.* Ed. *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*, London: Academic Press, 1981. 371~385.
- [3] Hallas L E, Alexander M. *Appl Environ microbiol*, 1983 **45**: 1234~1241.
- [4] McCormick N G, Feeherry F E, Levinson H S. *Appl Environ microbiol*, 1976 **31**: 949~958.
- [5] 刘志培 杨惠芳. 微生物学报, 1989 **29**(6): 418~426.
- [6] Lyons C D, Katz S, Bartha R. *Appl Environ microbiol*, 1984 **48**: 491~496.
- [7] Schnell S, Schink B. *Arch Microbiol*, 1991 **153**: 183~190.
- [8] Bachofer r, Lingens F, Schater W. *FEBS Lett*, 1975 **50**: 288~290.
- [9] Loidl M, Hinteregger C, Ditzelmuller G *et al.* *Arch Microbiol*, 1990 **155**: 56~61.
- [10] Kaminski U, Janke D, Prauser H *et al.* *Z Allg Mikrobiol*, 1983 **23**: 235~246.
- [11] Konopka A, Knight D, Turco R F. *Appl Environ microbiol*, 1989 **55**: 385~389.
- [12] Aoki K, Nakanishi Y, Murakami S *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990 **54**: 205~206.
- [13] 刘志培 杨惠芳 周培瑾. 环境科学学报, 1999. **19**(2): 174~179.
- [14] Fumiyasu F, Christopher P S. *J Bacteriol*, 1997 **179**(2): 399~408.
- [15] Hayaishi O, Katagiri M, Christopher P S. *J biol Chem*, 1957 **229**: 905~920.
- [16] Sala-Trepat J M, Rothberg S. *Eur J Chem*, 1971 **20**: 400~413.
- [17] 北京市环境保护科学研究院(编). 水质物理化学分析基本知识. 北京: 中国建筑工业出版社, 1973. 180~182.
- [18] Lehninger A L, Witzemann E J. *J Amer Chem Soc*, 1942 **64**: 874.

## STUDIES ON THE METABOLISM PATHWAY OF ANILINE DEGRADATION BY COMAMONAS ACIDOVORANS AN3

Liu Zhipei Yang Huifang Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** All of the enzymes relating to aniline degradation in *C. acidovorans* AN3 were inducible ones. When growing on aniline as sole carbon, nitrogen and energy sources, the cells of *C. acidovorans* AN3 contained aniline dioxygenase, catechol-2,3-dioxygenase, 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase, 4-oxalocrotonic acid decarboxylase and 4-hydroxy-2-oxovalerate acid aldolase. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of aniline dioxygenase were  $292\mu\text{mol/L}$  and  $3.57\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of catechol-2,3-dioxygenase were  $16.4\mu\text{mol/L}$  and  $15.2\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. According to these results, the degradation metabolism pathway of aniline by *C. acidovorans* AN3 was hypothesised.

**Key words** *Comamonas acidovorans* AN3, Aniline, Degrading enzymes, Metabolism pathway