

含硫芳香族化合物降解酶的定域及胞内产物的鉴定

张承东, 张爱茜, 韩朔睽, 王连生 (南京大学环境科学与工程系污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 为研究含硫芳香族化合物的生物降解途径, 采用静息细胞技术提取假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.) 不同部位的酶. 结果表明, 对硝基苯磺基乙酸异丁酯降解酶主要定域在细胞膜周及膜内. 被试化合物在膜内酶的作用下, 发生碳硫键断裂, 降解产物是对硝基苯磺酸. 在膜周酶的作用下, 发生碳硫键和酯的烷氧键 2 种方式的断裂, 生成对硝基苯磺酸和对硝基苯磺基乙酸.

关键词: 苯磺基乙酸异丁酯; 静息细胞技术; 降解酶的定域; 胞内产物

中图分类号: X131 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)04-0090-04

Localization of Degradation Enzyme in *Pseudomonas* sp. for an Aromatic Sulfur-Containing Compound and Identification of Products in Cells

Zhang Chengdong, Zhang Aiqian, Han Shuokui, Wang Liansheng (State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse Research, Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract In order to study the biodegradation way of an aromatic sulfur-containing compound, the resting cell technique was used to get different enzyme. The experimental results show that the degradation enzyme for 4-NO₂-Ph-SO₂-CH₂-CO-OC₄H₉-i mainly locates in cell and on the membrane. The enzyme in cells converts the tested compound to 4-NO₂-Ph-SO₃H with bond cleavage between carbon and sulfur. By the enzyme located on the membrane the compound is degraded as 4-NO₂-Ph-SO₃H and 4-NO₂-Ph-SO₂-CH₂-COOH. The later is yielded with the bond cleavage between carbonyl and alkoxy group.

Key words: p-nitro-phenylsulfonyl isobutyl acetate; resting cell technique; localization of degradation enzyme; products in cells

苯磺基化合物因其具有独特的生物活性, 被广泛应用于制造杀虫剂, 杀菌剂和药物, 它对环境的影响已日益受到重视. 有关这类化合物的生物活性^[1], 环境参数^[2]的研究已有很多报道, 但很少涉及微生物降解机制的研究.

本文在研究对硝基苯磺基乙酸异丁酯的微生物降解性时, 对假单胞杆菌中降解酶的定域, 以及发生在细胞内的降解反应进行了初步探索, 通过对产物的鉴定, 推测可能存在的降解途径.

1 实验部分

1.1 材料和设备

仪器: Varian 5000 型高效液相色谱仪 (HPLC), 配有长 15cm, 内径 0.4cm 的 RP-18 色谱柱, 粒径 5μm; RC-5C 冷冻高速离心机; Bruker Vector22 傅立叶红外光谱仪.

试剂: 被试化合物对硝基苯磺基乙酸异丁酯 (4-NO₂-Ph-SO₂-CH₂-CO-OC₄H₉-i), 甲醇 (色谱纯), Tris-HCl 缓冲液, PBS 缓冲液, 25% 蔗糖溶液, CHCl₃ (分析纯).

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29877102)

作者简介: 张承东 (1976~), 女, 江苏武进人, 硕士生, 主要研究方向为含硫芳香族化合物的微生物降解.

收稿日期: 1999-10-08

降解菌种: 假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.), 经本实验室驯化。

基础培养基与代谢培养基的组成和配制参见文献[3]。

1.2 菌种的活化和培养

从斜面挑取降解菌的单菌落, 加入到 2 个装有 200 ml 代谢培养基的三角瓶中(被试化合物的浓度约为 30 mg/L), 在最适降解菌生长的温度 30℃ 下, 以 60 r/min 恒温振荡培养至对数生长期。

1.3 降解酶的分步提取^[4]

应用静息细胞技术, 分步提取降解酶: 先取菌液离心分离(6000 r/min, 10 min), 取上清液 S_1 冷冻保存。沉淀(P_1)用冷双蒸水洗涤 2 次, 再用 10 ml 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH = 8.0) 重悬, 离心分离(6000 r/min, 10 min), 上清液 S_2 冷冻保存。沉淀(P_2)以 10 ml 25% 蔗糖溶液重悬, 于 25℃ 振荡 10 min, 离心分离(10000 r/min, 10 min), 上清液 S_3 冷冻保存。沉淀(P_3)用冷双蒸水洗涤 2 次, 加 10 ml 冷双蒸水重悬, 在冰水浴中振荡 10 min, 离心分离(13000 r/min, 10 min), 上清液 S_4 均匀分装在若干试管中冻存。沉淀(P_4)重悬于 10 ml 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5) 中, 冰浴超声破壁, 每次 1 min 共 5 次, 每次间隔 1 min, 离心分离(15000 r/min, 20 min), 上清液 S_5 均匀分装冷冻保存, 沉淀(P_5)弃去。合并 S_1 , S_2 和 S_3 为胞外提取液, S_4 为膜周提取液, S_5 为膜内提取液。

1.4 测定酶提取液的降解能力^[5,6]

分别取 2 ml 胞外, 膜周, 膜内提取液与 10 ml 含 30 mg/L 被试化合物的 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 混合, 以不加酶提取液的被试化合物的 PBS 缓冲液为对照, 于 30℃, 60 r/min 恒温振荡培养。每隔一定时间取样, 样品经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 用 HPLC 测定滤液中被试化合物含量随时间的变化, 比较胞外, 膜周, 膜内提取液的降解能力。

1.5 降解产物的 HPLC 分析

分别取 2 ml 膜周和膜内提取液与 10 ml 含 30 mg/L 被试化合物的 PBS 缓冲液混匀后, 立

即取样 2 ml。样品用 1 ml CHCl_3 萃取 2 min, 离心分层。水相和 CHCl_3 相分别用 HPLC 分析。为了确定是否有酸性物质, CHCl_3 萃取后的水相用 0.1 mol/L HCl 调至 pH 2, 用 1 ml CHCl_3 萃取, 离心分层, 取 CHCl_3 相进行 HPLC 分析。萃取后的水相再用 NaOH 调回至 pH 7, 用 HPLC 分析, 以确定是否有在 pH 2 条件下不能被 CHCl_3 萃取的强酸性物质。以上所有 HPLC 谱图反映了降解反应的零时状态。零时取样后的混合液于 30℃, 以 60 r/min 恒温振荡培养, 待反应完全后按以上相同步骤取样分析, 其谱图与被试化合物降解零时状态谱图作对照, 确定降解产物。色谱条件为: 柱温: 30℃; 流动相: 甲醇/水 = 80/20 (V/V); 流速: 1 ml/min。

1.6 酸性降解产物的分离与红外分析

对膜周提取液的降解反应进行放大试验, 以获取足够量的酸性产物进行红外分析。用 CHCl_3 萃取分离膜周提取液降解反应中可能存在的中性物质, 然后用 0.1 mol/L HCl 调至 pH 2, 再用 CHCl_3 萃取酸性产物, 萃取过程中的每一步用 HPLC 进行监测, 以观察产物是否分离完全。 CHCl_3 萃取的酸性产物用无水 Na_2SO_4 干燥, 将干燥后的 CHCl_3 萃取液旋转蒸发, 得到粘稠的油状物质, 经 KBr 压片进行红外分析。

2 结果与讨论

2.1 降解酶的定域

1.4 试验结果表明, 被试化合物在胞外提取液中 24 h 未有任何变化, 在膜周提取液中 7 h 内降解率达到 100% (见图 1), 而在膜内提取液中 3 h 内降解率就达到了 100% (见图 2)。由此可见不同部位的酶对化合物的降解能力不同。研究表明胞外提取液对被试化合物无降解作用, 假单胞杆菌降解酶主要定域于膜周和膜内, 属于胞内酶。

2.2 主要降解产物的分析

根据 1.5 的试验结果, 在膜内酶的作用下, 只在水相中检出一个在 HPLC 有响应并且出峰很早的主产物 A, 该产物在中性及酸性条件

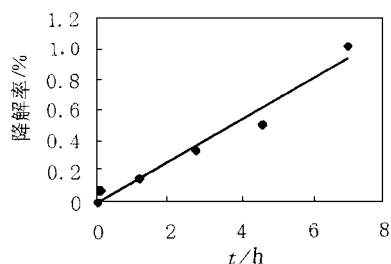


图1 膜周酶降解被试化合物的能力

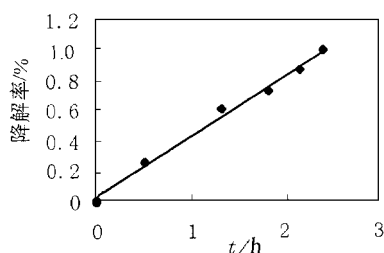


图2 膜内酶降解被试化合物的能力

下均不被 CHCl_3 所萃取, 表明该产物是一个强酸性物质。根据对假单胞杆菌降解该化合物的细胞外产物鉴定的另一项研究^{*}, 产物 A 与已通过色谱保留、红外分析和核磁共振等综合手段鉴定的细胞外主产物的保留时间完全一致, 并经添加标样验证, 产物 A 就是对硝基苯磺酸。由此推测被试化合物在膜内酶的作用下发生了碳硫键断裂。在膜周酶的作用下, 化合物有 2 个降解产物, 一个是产物 A, 另一个是在 pH 2 的条件下可用 CHCl_3 萃取的酸性产物 B, 该产物在 HPLC 上的出峰时间晚于产物 A。

2.3 产物 B 的结构鉴定

图 3 是 CHCl_3 萃取的酸性产物 B 的红外光谱图。由于培养液成分复杂, 红外光谱图上杂峰较多, 但仍能获得有用的信息。

(1) 在 $3000 \sim 2500 \text{ cm}^{-1}$ 处有缔合羧酸和芳香羧酸中 O-H 伸缩振动谱带; 在 $955 \sim$

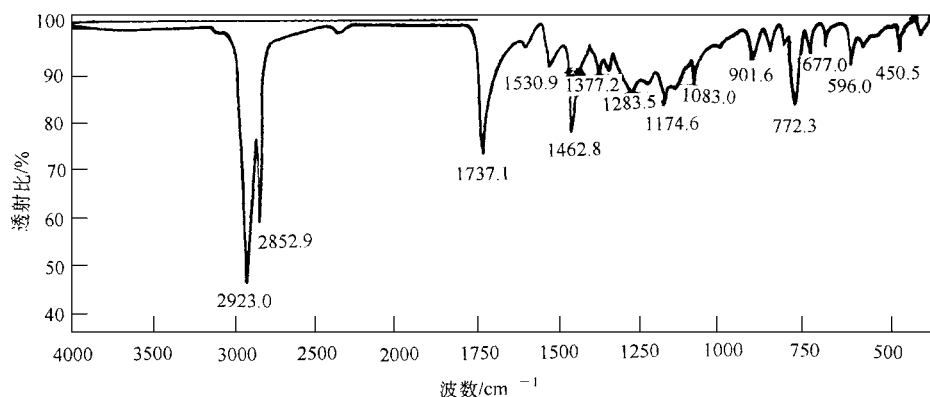


图3 酸性产物 B 的红外光谱图

915 cm^{-1} 处是羧酸二聚体 O-H 面外变形振动谱带, 在 1737 cm^{-1} 处有 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 故可认为产物中有羧基- COOH 存在。

(2) 在 $1174, 1146 \text{ cm}^{-1}$ 附近有砷基的 $\text{S}=\text{O}$ 两个对称伸缩振动带, 在 1283 cm^{-1} 附近有 $\text{S}=\text{O}$ 的不对称伸缩振动。在 2850 cm^{-1} 处有亚甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 对称伸缩振动, 说明分子中亚甲基- CH_2- 仍与硫原子相连, 没有发生碳硫键的断裂。

(3) 在 1530 cm^{-1} 附近有苯环上- NO_2 的不

对称伸缩振动, 在 1377 cm^{-1} 附近有苯环上- NO_2 的对称伸缩振动, $901 \sim 677 \text{ cm}^{-1}$ 之间有苯环 C-H 面外变形振动, 表明苯环的结构未变化。

由此可以推出可被 CHCl_3 萃取的酸性物质为对硝基苯砷基乙酸, $4\text{-NO}_2\text{-Ph-SO}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, 断裂发生在酯的羰基与烷氧基处。

* 张爱茜. 含硫芳香族化合物定量结构-生物降解性关系研究 1988, 南京大学博士学位论文。

2.4 降解途径推测

据文献报道^[7], 较大分子的酯类化合物进入微生物细胞时, 一般会先由水解酶催化水解转变为比较小的分子, 再进入细胞膜内进一步代谢. 结合所确定的主产物 A 和 B, 推测假单胞杆菌对被试化合物的可能降解途径如图 4 所示.

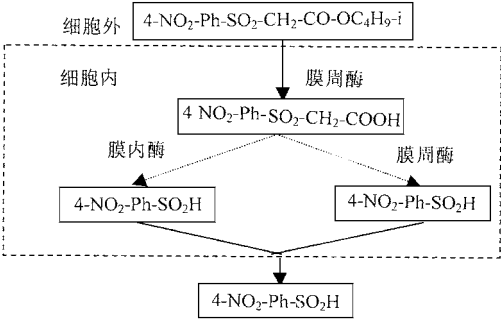


图 4 推测的降解途径

3 结论

(1) 降解苯磺基乙酸异丁酯的酶主要定域在假单胞杆菌的膜周及膜内, 属于胞内酶.

(2) 膜内酶作用产物为对硝基苯磺酸(盐); 膜周酶作用产物为对硝基苯磺酸(盐)和对硝基苯磺基乙酸(盐).

(3) 结合对细胞外产物的鉴定, 推测被试化合物在膜周酶作用下发生碳硫键和烷氧键断裂. 后者产生的羧酸(盐)未被释放出胞外, 而是输送至胞内进一步降解为苯磺酸(盐)后, 再释放出胞外.

致谢 南京大学张正教授和马文漪副教授为本研究提供了被试化合物和假单胞杆菌菌种, 在此一并感谢.

参考文献:

- 1 Pandeya S N et al. Biological Activity of Sulphones. J. Sci. ent. Ind. Res. , 1985, 44: 150~ 162.
- 2 何艺兵等. 苯磺基化合物溶解度和分配系数的测定与估算. 环境化学, 1995, 14(2): 134~ 139.
- 3 张爱茜等. 含硫化合物的好氧微生物降解. 环境化学, 1997, 16(2): 156~ 158.
- 4 夏东翔等. 邻苯二酚 2, 3-双加氧酶在大肠杆菌的表达与定域. 遗传学报, 1992, 19(2): 177~ 185.
- 5 Harold C Neu Leon et al. Release of Enzymes from Escherichia Coli by Osmotic Shock and During the Formation of Spheroplast. J. Biol Chem. , 1965, 240(9): 3685.
- 6 Kirk T Semple et al. Biodegradation of Phenols by Alga Ochromonas danica. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1265~ 1273.
- 7 M. J 小佩尔扎等. 微生物学. 北京: 自然科学出版社, 1987. 126.