

蒽和菲的酶促降解条件及动力学特征^{*}

吴蔓莉 聂麦茜^{**} 王晓昌 王志盈 王 蕾 王 蕊

(西安建筑科技大学, 环境与市政工程学院, 西安, 710055)

摘 要 研究了蒽和菲酶促降解的最佳反应条件及其动力学特性. 结果表明, 利用黄杆菌 FCN2 产生的胞内酶降解蒽、菲时的最佳 pH 为 6, 而且在弱酸性介质中胞内酶的活性较高; 在 30—35 之间胞内酶能保持较好的降解活性, 32 时胞内酶活性最高. 对蒽和菲酶促降解的米氏常数分别为 $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相同实验条件下, 对蒽降解的最大反应速率为 $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 对菲的最大反应速率为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 酶促降解蒽的反应级数接近于 0.93, 表观速率常数的对数 $\lg k$ 为 -1.86, 而降解菲的反应级数接近于 0.76, 表观速率常数的对数 $\lg k$ 为 -2.05.

关键词 蒽, 菲, 酶促降解, 米氏常数, 动力学.

多环芳烃 (PAHs) 污染源多而分散, 不但成为土壤、水体和空气中广泛存在的一类污染物, 近年来在环境系统中的浓度有快速增加趋势^[1]. 微生物净化法被认为是解决多环芳烃污染问题最有效的途径^[2]. 微生物对多环芳烃的降解转化主要依赖于其酶系的催化作用. 目前, 有关多环芳烃酶促降解的研究主要集中在降解酶的鉴别方面^[3, 4]. 因此, 对酶促降解反应条件及其反应动力学特征的研究, 有助于揭示多环芳烃的生物转化规律.

本文利用黄杆菌 FCN2 产生的胞内酶对蒽、菲的酶促降解反应条件及动力学特性进行了更深入的研究.

1 实验部分

1.1 实验材料

黄杆菌 FCN2: 以焦化厂废水排水沟的底泥为优良菌源, 通过驯化筛选所得^[5].

菌悬液: 将保存在斜面上的菌株接种于经高压水蒸气灭菌的普通牛肉膏培养基上, 于 32 好氧培养 48h, 室温下 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离菌体 30min, 以磷酸盐缓冲液洗涤菌体 3 次, 收集菌体, 用同一缓冲液制成菌悬液, 备用.

胞内酶的提取^[6]: 将 50ml 光密度 (DO) 为 0.220 (620nm 处测定) 的 FCN2 菌悬液, 置于 0 的冰水混合水浴中, 用 JY88- 型超声波细胞破碎机间歇处理 20 次, 每次 1min. 破碎功率为 450W. 以 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离 20min, 除去细胞壁碎片, 上清液为胞内酶粗酶液.

1.2 降解实验

取 7 个反应瓶, 分别加入 19ml 蒸馏水, $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒽或菲的丙酮溶液 0.10ml, 曝气 20min 除去丙酮, 用 NaOH 和 HCl 依次调节溶液的 pH 值为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0. 向每个瓶中各加入 1.0ml 胞内粗酶液, 在温度为 32 的条件下, 反应 30min 后取出, 加浓 HCl 终止反应, 将样品用环己烷萃取 3 次, 合并萃取液, 脱水后定容, 以不加蒽、菲的粗酶水溶液的环己烷萃取液为参比, 分别在 254nm 和 252nm 处测定蒽、菲的吸光度. 同时设不加酶的对照组. 每种体系进行 3 个平行实验.

在 pH 值为 6 的条件下, 向反应瓶各加入 19ml 蒸馏水, $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒽和菲的丙酮液 0.10ml 和 1.0ml 胞内酶, 使反应瓶中蒽和菲的初始浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 曝气 20min 后, 加入 1.0ml 胞内粗酶液, 分别测定 18, 30, 35, 40 和 50 下, 蒽和菲的浓度 (萃取及测定方法同上). 同时设不加酶

2006 年 6 月 5 日收稿.

^{*} 陕西省教育厅资助的科研计划项目 (自然科学专项) (No. 04JK157) 和西安建筑科技大学科研处资助项目 (AJ03040).

^{**} 联系人, 联系电话: 029-82202554, 电子邮件: niemaiqian@xauat.edu.cn

的对照组，每种体系进行 3 个平行实验。

分别取 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 和 2.00ml 的 $100\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 蒽或菲的丙酮溶液置于 10ml 比色管中，曝气 20min 后，分别加入 1.0ml 胞内粗酶液，用水稀释至 10.0ml，在 pH 为 6，温度 32 的条件下，水浴中好氧反应 10min，测定反应瓶中蒽、菲的浓度。根据测定结果计算米氏常数和最大反应速率。每种体系进行 3 个平行实验。

将初始浓度分别为 $25\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ， $50\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ， $100\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ， $150\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $200\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的蒽、菲溶液曝气 20min，然后加入 1.5ml 胞内酶液，在 pH 值为 6，温度 32 的条件下，分别反应 15min，30min，60min 和 120min 后测定蒽、菲浓度的变化。根据实验结果，绘制 $\lg v = \lg k + n \lg c$ 动力学曲线。

2 结果与讨论

2.1 pH 值对蒽和菲酶促降解的影响

pH 值对蒽、菲酶促降解的影响如图 1 所示。胞内酶降解蒽、菲的最佳 pH 值为 6，在 pH4.0—10.0 之间均有降解活性。黄杆菌 FCN2 的粗酶液在弱酸性条件下，对蒽、菲的好氧降解活性最高。另外，在相同条件下，相同初始浓度的蒽和菲在粗酶降解体系中，同样浓度的胞内酶对蒽的降解效果要优于对菲的降解效果（蒽三次平行测定结果其标准偏差 $SE < 5\%$ ，菲三次平行测定结果其标准偏差 $SE \leq 7\%$ 。不加酶的对照组中，蒽和菲的浓度分别为 $24.1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $23.2\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ，对照组中加入的蒽和菲原始浓度均为 $25\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ；说明除酶促反应外，其它物理化学过程对蒽和菲的浓度影响不大）。

2.2 温度对蒽和菲的酶促降解

从图 2 可以看出，酶促反应最适宜的温度为 32，在 30—35 之间胞内酶能保持较高的降解活性。相同条件下，蒽和菲的初始浓度相同时，同浓度的胞内酶对蒽的降解转化率高于对菲的降解转化率（蒽的三次平行测定结果的标准偏差 $SE < 8\%$ ，菲的三次平行测定结果的标准偏差 $SE \leq 7\%$ 。不加酶的对照组中，测得蒽和菲的浓度分别为 $23.1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $23.5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ）。

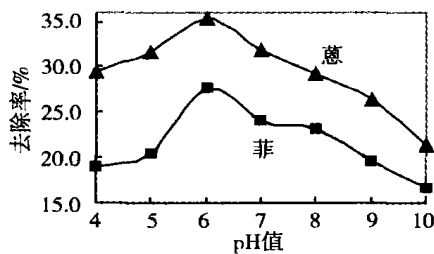


图 1 pH 值对蒽、菲的酶促降解转化率的影响
Fig. 1 The effects of pH on enzymatic catalysis degradation of phenanthrene and anthracene

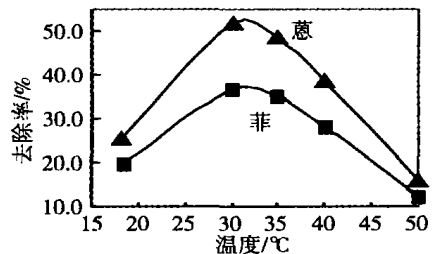


图 2 温度对蒽、菲的酶促降解转化率的影响
Fig. 2 The effects of temperature on enzymatic catalysis degradation of phenanthrene and anthracene

2.3 粗提酶的米氏常数和最大反应速率

根据方程 $v = -K_m v/[S] + V_{max}$ (将米氏方程两边分别乘以 $(K_m + [S])/[S]$ 即得到该方程；式中， v 为反应速率， K_m 为米氏常数， $[S]$ 为底物浓度， V_{max} 为最大反应速率) 做 Eadie-Hoffstee 图^[7]。结果如图 3 所示。通过计算获得粗提酶对蒽的酶促降解米氏常数为 $3 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，最大反应速率为 $2 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。粗提酶对菲的酶促降解米氏常数为 $4 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，最大反应速率为 $1 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。用 FCN2 的粗提酶降解蒽时的米氏常数为 $1 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，最大反应速率为 $2 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[6]。

米氏常数反映酶与底物的结合程度和酶-底物复合物的稳定性；米氏常数的大小能够反映酶与底物之间亲和力的大小，米氏常数的值愈小，则说明酶与底物的亲和力愈大。多数酶的米氏常数值在 $1 \times 10^{-1}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ — $1 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间^[6]。实验测得的粗提酶对蒽和菲的米氏常数分别为 $3 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $4 \times 10^{-4}\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 。在前期的研究工作中，用 FCN2 的粗提酶降解蒽时的米氏常数

为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1[6]}$. 结果表明, FCN2的粗提酶与蒽、菲、芘的亲和力大小顺序为芘 > 蒽 > 菲 .

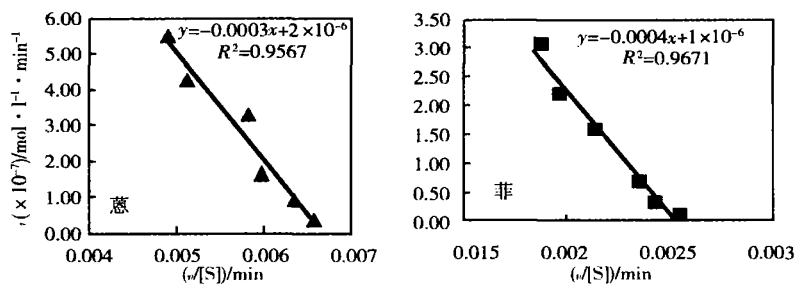


图 3 蒽和菲的米氏常数测定曲线
Fig. 3 The K_m detemination curve of anthracene and phenathrene

2.4 蒽和菲的酶促降解动力学特性

用一般化学反应动力学方程式 $u_0 = k_0^n$ 处理实验数据, 结果如表 1 所示 . 每一条 $\lg u$ 与 $\lg c$ 的关系曲线都近似直线 . 对于任意一条关系曲线来说, 斜率均为正, 明显看出反应物初始浓度愈大, 反应在一定时间范围内的平均初始速率愈大; 对于任意初始浓度来说, 反应在 15, 30, 60 和 120min 内的平均速率在依次减小; 表 1 中蒽和菲的每条关系曲线分别接近平行, 说明在不同的观察时间范围内, 表观反应级数基本相同, 对于蒽来说, 其值平均为 0.93, 对于菲来说, 其平均值为 0.76.

图 1—图 3 的结果有一个非常明显的反应趋势, 即相同条件下, 黄杆菌 FCN2 粗酶液对蒽的降解转化率始终高于对菲的转化率, 这一结果与利用黄杆菌 FCN2 的活菌体对蒽、菲的降解结果相一致^[5] . 对于活菌体来说, 如果活性酶为胞内酶, 降解转化率受到底物进入菌体细胞的传质、与活性酶的亲和力、生物氧化等过程的影响 . 对于粗酶液降解体系来说, 降解转化率仅受到后两个过程的的影响 . 粗酶液与活菌体对蒽 (线性结构)、菲 (角性结构) 的降解转化效率一致, 表明控制该株黄杆菌降解蒽、菲的主要因素是底物分子的结构特征 . 它通过影响酶与底物分子亲和力的大小而影响降解转化率 . 从图 3 结果看, 降解多环芳烃时, 黄杆菌 FCN2 的酶分子活性部位适合于与蒽产生更大的亲和力, 这是本研究中蒽和菲降解转化效率存在差别最根本的原因所在 .

表 1 中 k 为表观速率常数, 可理解为一定条件下, 蒽或菲含量为单位浓度时的反应速率, 表观动力学方程式中截距为 $\lg k$, 对于蒽来说其平均值为 - 1.86, 对于菲来说平均截距 - 2.05, 说明一定条件下, FCN2 胞内酶对蒽的降解速率明显大于对菲的降解速率 . 结合米氏常数测定结果可以看出, FCN2 胞内酶与蒽的亲和力大于其与菲的亲和力, 对蒽的降解转化速率也大于对菲的降解转化速率 . 所以, 蒽和菲在相同粗酶存在下, 降解转化速率明显不同, 主要是因为这两个分子与酶的亲和力不同 . 这些表观值能够反映蒽和菲在粗酶液存在下被降解转化的动力学特征 . 与米氏常数测定结果能够相互印证 .

表 1 蒽和菲降解过程的 u-c 关系方程
Table 1 The kinetic characteristics of anthracene and phenathrene

反应时间 /min	蒽		菲	
	$\lg v = n \lg c + \lg k$	相关系数 (r)	$\lg v = \lg k + n \lg c$	相关系数 (r)
15	$y_1 = 1.1183 \lg c - 1.8622$	0.984	$y_1 = 0.7623 \lg c - 1.7973$	0.990
30	$y_2 = 0.9125 \lg c - 1.6771$	0.981	$y_2 = 0.828 \lg c - 2.0595$	0.954
60	$y_3 = 0.8605 \lg c - 1.8272$	0.988	$y_3 = 0.7335 \lg c - 2.0651$	0.927
120	$y_4 = 0.8411 \lg c - 2.0733$	0.990	$y_4 = 0.7276 \lg c - 2.285$	0.909

从表 1 还可以看出, 在蒽和菲酶促降解过程中, 随反应时间范围的增加, 平均速率依次减小 . 出现这一实验结果的可能原因有二 . 其一, 一般反应物浓度愈大, 速率愈快, 随着观察时间的增加, 浓度不断降低, 所以其平均速率会降低, 其二, 由于反应过程中转化出的中间产物愈来愈多, 这些中间产物开始与原始底物蒽和菲进行竞争代谢, 从而使蒽和菲的降解转化速率随之降低 .

3 结论

黄杆菌 FCN2的粗酶液在弱酸性条件下，对蒽和菲的好氧降解活性最高，蒽和菲酶促降解的最佳 pH 值均为 6；该胞内酶在 30 —35 之间能保持较高的降解活性，对蒽和菲的酶促反应最适宜的温度均为 32 。酶促降解动力学特征表明，粗提酶对蒽的酶促降解米氏常数为 $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，最大反应速率为 $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ，对菲的酶促降解米氏常数为 $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，最大反应速率为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ；米氏常数测定结果说明蒽与胞内酶的亲和力大于菲与胞内酶的亲和力，这是相同条件下黄杆菌 FCN2的粗酶液对蒽降解转化率高于菲的最根本的原因；酶促降解蒽的反应级数接近于 0.93，lgk 为 - 1.86，而降解菲的反应级数接近于 0.76，lgk 为 - 2.05。

参 考 文 献

[1] Kuan-Foo Chang, Guor-Cheng Fang, Jhy-Cheng Chen et al., Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Asia: A Review from 1999 to 2004. *J. Environmental Pollution*, 2006, **142** (3) 388—396

[2] Stobel B W, Influence of Vegetation on Low-Molecular-weight Carboxylic Acids in Soil Solution——A Review. *J. Geodema*, 2001, **99** 169—198

[3] Andreoni V, Cavalca L, Rao M A et al., Bacterial Communities and Enzyme Activities of PAHs Polluted Soils. *J. Chemosphere*, 2004, **57** (5) 401—412

[4] Yong-Hak Kim, Karl-Heinrich Engesser, Carl E Cemiglia, Two Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o-Quinone Reductases from a Pyrene-Degrading *Mycobacterium*: *J. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, **416** (2) 209—217

[5] 聂麦茜, 张志杰, 孙先锋等, 特效黄杆菌对蒽、菲、芘降解性能研究 [J], 微生物学通报, 2001, **28** (5) 32—36

[6] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌等, 一株黄杆菌及其粗酶液对芘降解的动力学特征研究 [J], 环境科学学报, 2006, **26** (2) 181—185

[7] 施巧琴主编, 酶工程 [M], 北京: 科学出版社, 2005, 30—31

THE CONDITION AND KINETIC CHARACTERISTICS OF
ENZYMATIC CATALYSIS BIODEGRADATION OF
ANTHRACENE AND PHENANTHRENE

WU Man-li NIE Mai-qian WANG Xiao-chang WANG Zhi-ying WANG Lei WANG Rui
(Xi 'an Architecture and Technology University, Xi 'an, 710055, China)

ABSTRACT

The condition and kinetic characteristics of coarse enzymatic-catalysed degradation of anthracene and phenanthrene have been studied. The results show that the coarse endoenzyme of flavobacterium strains FCN2 has higher activity for degrading anthracene and phenanthrene in weak acid medium, and at pH 6, the endoenzyme is the most active. At a temperature is between 30 and 35 , the endoenzyme can keep a high activity, and the optimal temperature is 32 . The maximum degradation rates of anthracene and anthracene are 2×10^{-6} and $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively, and their Michaelis constants are 3.0×10^{-4} and $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively, indicating that the affinity of the endoenzyme to anthracene is bigger than that to phenanthrene. By kinetic analysis, it has been estimated that order of the enzymatic-catalysed degradation reaction is 0.93 for anthracene, and 0.76 for phenanthrene. The logarithm of apparent rate constant for anthracene is $\lg k = - 1.86$, and that for phenanthrene is $\lg k = - 2.05$.

Keywords: anthracene, phenanthrene, enzymatic-catalysed, Michaelis constants, kinetic