

文章编号:1006-9941(2019)07-0550-08

球形红细菌降解 HMX 的途径及产酶特性

白红娟,赵婷婷,康鹏洲,高莉

(中北大学环境与安全工程学院,山西太原 030051)

摘要: 为了进一步研究球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H菌株对HMX生物转化过程及产酶特性,研究了不同碳源、氮源及金属离子对该菌株生物转化奥克托今(HMX)的效率及其生长的影响;采用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)分析了球形红细菌降解HMX的中间代谢产物,推测了可能的降解途径;测定了不同条件对菌株产酶比活力的影响,用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析了酶谱。结果表明,该菌株转化HMX的最适碳源、组合氮源和金属离子分别为苹果酸、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和酵母膏以及 Ca^{2+} ;当HMX的初始浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养96 h后,可以检测到三种物质:两种HMX亚硝基衍生物(单亚硝基mNs-HMX和二亚硝基dNs-HMX)及次甲基二硝胺(MEDINA),其母离子的质荷比分别为279、263和136。推测其可能的降解途径为两条,一条是利用还原酶,HMX被还原为mNs-HMX和dNs-HMX;另外一条,利用水解酶,HMX经转化并开环裂解为次甲基二硝胺。菌体细胞粗酶液酶比活力和聚丙烯酰胺凝胶电泳实验表明,HMX浓度在75,100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对菌株产酶比活力有明显的促进作用,而HMX浓度为125,150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对菌株产酶比活力有抑制作用。pH为7.0时,该菌株产生的酶比活力最高。

关键词: 奥克托今(HMX);球形红细菌;中间产物;降解途径;粗酶液分析

中图分类号:TJ55;X172

文献标志码:A

DOI: 10.11943/CJEM2018249

1 引言

奥克托今(HMX)是当前使用的能量水平最高、综合性能最好的炸药之一,并由于其良好的爆炸性能被广泛应用于武器系统的战斗部装药。但是HMX是一种有毒的含能化合物,生产使用HMX过程中的不恰当操作使工厂周围的环境受到严重污染,同时对哺乳动物的中枢神经系统有不良影响^[1]。美国环境保护署已经将其列为优先控制污染物名单^[2]。

近年来,国外很多学者已经对微生物降解HMX的产物及途径进行了研究。Hawari等^[3]研究了厌氧污泥转化HMX,然后通过开环裂解产生次甲基二硝胺(MEDINA)和双(羟甲基)-硝胺,最终降解为一氧化二氮(N_2O)、甲醛(HCHO)和 CO_2 ,导致环裂解的最初反应机理尚不清楚。Bhushan等^[4]报道利用黄嘌呤氧化酶

(XO)在厌氧条件下HMX脱氮,然后环裂解成MEDINA、4-硝基-2,4-重氮丁醛(NDAB)、HCHO和甲酸(HCOOH)。Fournier等^[5]利用黄孢原毛平革菌好氧生物降解HMX,首先,HMX被还原为1-NO-HMX,然后沿着不同的两条途径降解;第一条是1-NO-HMX经N-脱硝基后生成带有活性的亚胺键($-\text{C}=\text{N}-$)的中间产物,再与1分子水生成中间产物 α -羟基-烷基硝胺;第二条是1-NO-HMX经 α -羟基化作用生成二乙基亚硝胺;降解产生的中间产物不稳定,开环裂解成4-硝基-2,4-重氮丁醛(4-NDAB)、氧化二氮(N_2O)和甲醛(HCHO)。Van Aken^[6]利用甲氧杆菌降解HMX,该菌株以甲醇为唯一碳源和能源,从HMX转化过程中检测到的代谢产物包括一种单硝基HMX衍生物和一种初步鉴定为亚甲基硝胺的极性化合物。综上所述,不同的微生物降解HMX时所生成的中间产物及最终产物不同,因此,其降解途径也不同。国内学者对微生物降解HMX还处于对其降解特性的研究阶段,少见降解途径及产酶特性研究。

球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)是兼性细菌,也是益生菌。它既能在厌氧条件下利用光照进行生

收稿日期:2018-09-04;修回日期:2019-02-02

网络出版日期:2019-04-22

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(2016-084)

作者简介:白红娟(1969-),女,教授,硕士生导师,主要从事环境微生物技术研究。e-mail:bjh44871@163.com

引用本文:白红娟,赵婷婷,康鹏洲,等.球形红细菌降解HMX的途径及产酶特性[J].含能材料,2019,27(7):550-557.

BAI Hong-juan, ZHAO Ting-ting, KANG Peng-zhou, et al. Degradation Pathway of HMX and the Property of Crude Enzyme Produced by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2019, 27(7):550-557.

长,也能在好氧条件下利用有机物生长^[7]。前期研究表明^[8],球形红细菌能在 96 h 降解 HMX 达到 88.9%,但是对降解途径及产酶特性还需要进行深入研究。为此,本研究采用球形红细菌对 HMX 进行降解,并利用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)方法对球形红细菌降解 HMX 的中间产物进行初步鉴定,推测其可能的降解途径;同时研究了不同营养因素对球形红细菌降解 HMX 的影响,以及对菌株产生的粗酶液分析,为该菌株在杂氮化合物废水污染治理中的应用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

菌种:球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H 菌株系紫色非硫菌群红细菌属光合细菌,由山西大学光合细菌研究室分离、鉴定并保存^[9]。

基础培养基:酵母膏 1.0 g, MgSO₄ 0.2 g, CaCl₂ 0.07 g, (NH₄)₂SO₄ 1.25 g, 苹果酸 2.5 g, KH₂PO₄ 0.6 g, K₂HPO₄ 0.9 g, 蒸馏水 1000 mL, pH=7.0。

液体驯化培养基:基础培养基加适量 HMX。

试剂:奥克托今(HMX, 纯度 99%), 阿拉丁公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为二次去离子水。

2.2 方法

2.2.1 H 菌株的培养

将 10% 原始菌液接入 HMX 含量为 100 mg·L⁻¹ 的驯化培养基,在 30 °C、2500 lx 光照培养箱中厌氧驯化培养 10 d 作为驯化菌种。

2.2.2 不同营养因素对 H 菌株降解 HMX 的影响实验

不同营养因素分别为碳源、氮源和金属离子,碳源分别以 2.5 g·L⁻¹ 的乙酸钠、麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、柠檬酸和葡萄糖代替苹果酸。氮源分别以 0.45 g·L⁻¹ 的酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、KNO₃ 代替驯化培养基中的氮源(NH₄)₂SO₄+酵母膏,进一步以(NH₄NO₃+酵母膏)代替驯化培养基中的氮源(NH₄)₂SO₄+酵母膏,考察组合氮源对该菌株转化 HMX 的影响。金属离子分别以 0.07 g·L⁻¹ 的 FeSO₄、CoCl₂、ZnSO₄ 和 KCl 代替驯化培养基中的金属离子 CaCl₂。以上三组按照文献^[8]实验方法,在最适条件下接种 H 菌株,培养 96 h 后取 10 mL 样品,离心菌体 10 min (转速 10000 r·min⁻¹),用紫外可见分光光度计在 540 nm 测定上清液中残留的 HMX 浓度^[10],用等量蒸馏水制备的菌悬液,于波长 590 nm 处测定 OD 值,以表示其生物量。各设

3 个平行样,取平均值。

2.2.3 HMX 降解产物分离

将培养至对数期的 H 菌株接种到含 100 mg·L⁻¹ 的 HMX 培养基中,在 30 °C、2500 lx 光照培养箱中厌氧培养,分别在培养 48 h 和 96 h 后取样,样品在 10000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层清液 50 mL 于 200 mL 的干燥烧杯中,用 50 mL 的乙腈在 250 mL 干燥的分液漏斗中进行多次萃取。取萃取液于干燥的烧杯中,加入预先干燥过的无水硫酸钠,然后过滤,最后浓缩到 5 mL^[11],用 LC-MS 进行分析。

2.2.4 H 菌株产生的粗酶液性质分析

(1) 粗酶液的制备及蛋白质含量测定

参照文献^[12]制备粗酶液。以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用考马斯亮蓝比色法测定粗酶液中的蛋白质含量^[13]。

(2) 酶比活力测定

酶比活力的测定参考文献^[12],略作修改。反应体系中含有 110 μmol·L⁻¹ HMX、1.5 mmol·L⁻¹ NADH、50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.0)和 200 μL 粗酶液,终体积为 2 mL。反应从加入还原型辅酶 I (NADH) 后开始,在 30 °C 下反应 60 min,之后在 90 °C 下加热 10 min 终止反应。将样品在 8000 r·min⁻¹ 的离心力下离心 3 min,之后在 540 nm 处通过紫外可见分光光度计测定 HMX 的吸光度^[14]。

酶活力(U)定义为反应条件下每分钟催化生成 1 mmol 产物(或转化 1 mmol 底物)所需的酶量;酶比活力定义为每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数(U/mg)^[12]。

配制不同 HMX 质量浓度为 75, 100, 125, 150 mg·L⁻¹ 的液体驯化培养基,在 30 °C、pH 值为 7.0 和接种量为 15% 的条件下培养,取样,在 8000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,收集菌体细胞,制备粗酶液,分别测定酶活力,计算酶比活力。

将含 100 mg·L⁻¹ HMX 的液体驯化培养基,pH 值分别调为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,在 30 °C 和接种量为 15% 的条件下培养,取样,在 8000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,收集菌体细胞,制备粗酶液,分别测定酶活力,计算酶比活力。

(3) 酶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照文献^[13]的方法,稍加修改,对制备的粗酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),电泳在垂直电泳装置中进行,分离胶质量浓度为 12%,浓缩胶质量浓度为 4%,每点样孔加样量 30 μL(取 15 μL 的样品,加入等体

积的SDS上样缓冲液,煮沸2 min)。先恒压100 V,样品通过浓缩胶后恒压120 V。电泳结束后进行考马斯亮蓝G-250染色,染色1 h后,进行脱色,直到背景变清晰后进行拍照。

2.3 分析方法

(1) HMX的浓度测定

参照文献[14]的方法,用可见光分光光度法测定HMX的浓度。

(2) HMX降解产物结构初步鉴定

液相色谱/质谱(LC-MS)使用MI cromass平台台式单四级质量检测器,由休利特帕卡德1100系列高效液相色谱(HPLC)系统连接,SUPELCOSIL lc-cn柱(25 cm×4.6 mm×5 μm)。以1 μL·min⁻¹的流速使用甲醇/水梯度(10%~70%甲醇20 min,70%甲醇3 min,70%~10%甲醇2 min,10%甲醇10 min)。分析物电离主要是[M-H]⁻的负喷雾ES(-)电离模式中进行^[11]。

3 结果与分析

3.1 不同营养因素对H菌株降解HMX的影响

3.1.1 不同碳源对H菌株生长及降解HMX的影响

不同碳源对H菌株生长及降解HMX的影响的结果如图1所示。由图1可以看出,以苹果酸作碳源,菌体生物量OD值最高,为2.388;无碳源时菌体生物量OD值最低,仅为0.612。培养液中添加不同碳源时,影响菌体生物量OD值由大到小的碳源排列顺序为:苹果

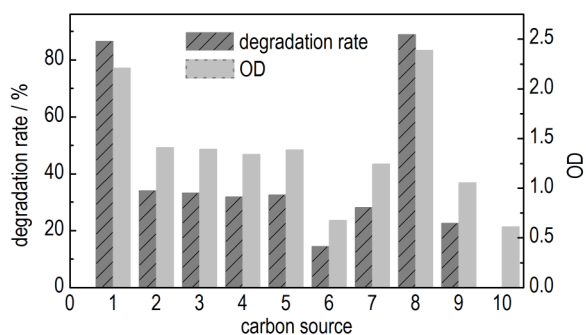


图1 不同碳源对H菌株生长及降解HMX的影响

1—葡萄糖,2—麦芽糖,3—乳糖,4—蔗糖,5—可溶性淀粉,6—乙酸钠,7—柠檬酸,8—苹果酸,9—HMX作为唯一碳源,10—无碳源

Fig.1 Effect of different carbon source on the growth of strain H and degradation of HMX

1—amylaceum, 2—malt dust, 3—milk sugar, 4—saccharose, 5—amylogen, 6—sodium acetate, 7—citric acid, 8—malic acid, 9—HMX as the sole carbon source, 10—no carbon source

酸、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、蔗糖、柠檬酸、乙酸钠。这表明H菌株容易利用的碳源是苹果酸,其次是葡萄糖、麦芽糖和乳糖;柠檬酸虽然也能作为生长基质被细菌利用,但是作用效果相对较差;而当HMX作为唯一碳源时,与无碳源的空白相比,菌体浓度有所增加,这说明HMX能被H菌株作为唯一碳源利用,但是利用率不高。

当苹果酸作为碳源时,菌体对HMX的降解率最高,为88.9%,其次是葡萄糖、麦芽糖和乳糖,菌体对HMX的降解率分别为86.5%、34%和33.2%。乙酸钠和HMX作为碳源时,HMX的降解率都较低,分别为28.1%和22.6%。由此可知,不同碳源种类对H菌株的生长和HMX的去除影响较大,使用容易被H菌株利用的碳源,HMX的降解率较高;HMX不是细菌生长的最佳碳源,当系统中没有可被细菌利用的其他碳源时,HMX作为唯一碳源时,菌体生长较差,降解效果也较低。分析其原因,碳源在微生物培养基或细胞培养基中有重要的作用,为微生物或细胞的正常生长和分裂提供物质基础。这可能是由于H菌株降解HMX是一种共代谢机制,它是在菌体对较好生长基质的代谢过程中完成对HMX这种较差基质降解^[15]。采用容易被H菌株利用的碳源,能够保证细菌更好的利用碳源,达到降解HMX的目的。

3.1.2 不同氮源对H菌株生长及降解HMX的影响

氮源对H菌株的生长和HMX的生物转化有着重要的影响。实验考察了有机氮源、无机氮源、复合氮源对H菌株生长及转化HMX的影响,不同氮源对H菌株生长及降解的影响如图2所示。由图2可看出,有机氮源包括蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、尿素对HMX的降解率分别为68.3%、77.4%、86.4%和24.6%,OD值分别为1.892、2.005、2.130和1.027,其效果表现为酵母膏>牛肉膏>蛋白胨>尿素。比较无机氮源(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃和KNO₃,其降解率分别为34%、24.8%和31.5%,OD值分别为1.418、1.126和1.319。因此,为了选择最佳氮源,实验进一步考察了复合氮源对H菌株生长及降解HMX的影响,由图2可看出,以酵母膏为有机氮源时,添加无机氮源(NH₄)₂SO₄时效果最佳,96 h降解率为88.9%;OD为最大2.338;而添加无机氮源NH₄NO₃时,其转化效果为34.5%,OD值为1.452。结果显示,添加复合氮源96 h的降解率在80%以上;添加有机氮源时降解率均达到60%左右;而添加无机氮源时,降解率仅有30%左右。因而有机氮源比无机氮源更有利于H菌株的生长及HMX的生物转化,但有机

氮源低于复合氮源对 H 菌株生长及降解 HMX 的影响。分析原因可能是,培养基中的氮源,能提供微生物生长所必须的核苷酸、维生素和矿物质元素等(以上物质的合成均需 N 元素)营养成分的合成原料^[16]。提供的氮源也分为有机氮源和无机氮源,不同微生物根据其自身特点,所需氮源种类也不同。

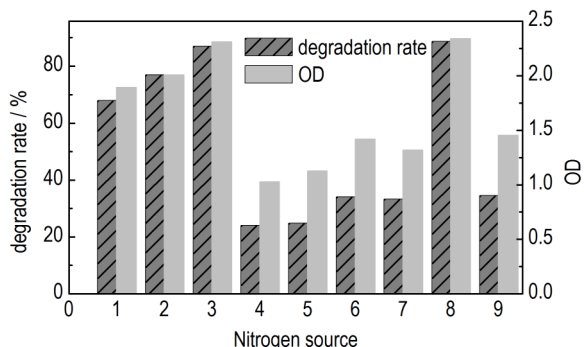


图2 不同氮源对 H 菌株生长及降解 HMX 的影响

1—蛋白胨, 2—牛肉膏, 3—酵母膏, 4—尿素, 5—KNO₃, 6—(NH₄)₂SO₄, 7—NH₄NO₃, 8—(NH₄)₂SO₄+酵母膏, 9—NH₄NO₃+酵母膏

Fig.2 Effect of different nitrogen source on the growth of strain H and degradation of HMX

1—peptone, 2—beef extract, 3—yeast extract, 4—urea, 5—KNO₃, 6—(NH₄)₂SO₄, 7—NH₄NO₃, 8—yeast extract and NH₄NO₃, 9—yeast extract and (NH₄)₂SO₄

3.1.3 不同金属离子对 H 菌株生长及降解 HMX 的影响

不同金属离子对 H 菌株生长及降解 HMX 影响如图 3 所示。由图 3 可知,不同金属离子对 H 菌株生长和降解 HMX 有一定的影响,比较 Fe²⁺、Co³⁺、Zn²⁺、K⁺和 Ca²⁺对 HMX 的去除率依次为 30%、71%、26.8%、78.1% 和 88.9%,OD 值分别为 1.304、1.936、1.093、2.056 和 2.238,可以发现当加入的金属离子为 Ca²⁺,降解率达到最大为 88.9%,OD 值为 2.338。加入不同的金属离子时,发现金属离子对 H 菌株降解 HMX 有一定的影响,微量的金属离子是微生物必需的营养因素,且在微生物生命活动中起重要作用。有的金属元素实质上是微生物酶的激活剂,微生物的营养和代谢需要酶的参与才能正常进行^[17]。加入适量的 Ca²⁺可以有助于菌的生长,同时高效降解 HMX。

3.2 H 菌株降解 HMX 的产物分析及途径推测

为了测定 H 菌株降解 HMX 的中间产物,在降解反应完成后采用 LC-MS 进行检测分析,结果如图 4 所示。

从图 4 中可以看出,在未降解时,可检测到物质 A,其出峰时间为 2.880 min;当被降解 48 h 后,物质 A 的峰

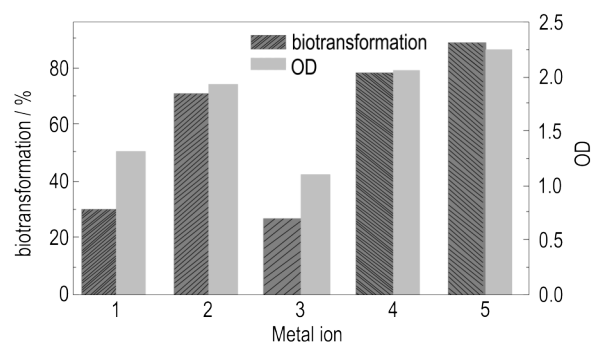


图3 不同金属离子对 H 菌株生长及降解 HMX 的影响

Fig.3 Effect of different metal ion on the growth of strain H and degradation of HMX

1—FeSO₄, 2—CoCl₃, 3—ZnSO₄, 4—KCl, 5—CaCl₂

逐渐减小,同时出现了 3 个较大的峰,得到了中间产物 B (出峰时间 3.028 min)、C (出峰时间 2.642 min) 和 D (出峰时间 3.737 min);HMX 被降解 96 h 后,物质 A 基本上被完全降解,物质 B、C 和 D 也逐渐减少。

通过与数据库谱图对比 A 及其中间代谢产物 B、C 和 D 的质谱图,其对应的相对分子质量、保留时间和质核比 (m/z) 如图 5 所示。在检测过程中出现的物质有 A (HMX)、B (mNs-HMX (八氢-1-亚硝基-3,5,7-三硝基-1,3,5,7-四氮辛烷))、C (dNs-HMX (八氢-1,5-二硝基-1,7-二硝基-1,3,5,7-四唑辛烷)) 和 D (次甲基二硝胺 (MEDINA))。与 Hawari^[2]所报道的部分一致,但没有检测到双羟甲基硝胺 (HO—CH₂—CNO₂—CH₂—OH)。

由测定结果初步推断,H 菌株降解 HMX 的主要途径分为两条,第一条 HMX 经过还原酶的作用生成 HMX 亚硝基衍生物为单硝基 mNs-HMX 及二亚硝基衍生物的两种异构体 dNs-HMX,后续反应产物尚未测出;第二条是 HMX 经过水解,开环裂解生成中间产物次甲基二硝胺 (MEDINA),如 Scheme 1 所示。

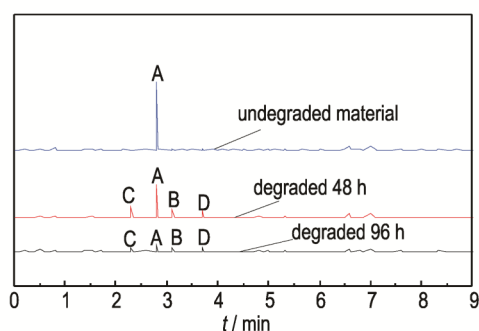


图4 H 菌株降解 HMX 代谢产物的 LC-MS 谱图

Fig.4 LC-MS spectra of metabolites during HMX degradation by strain H

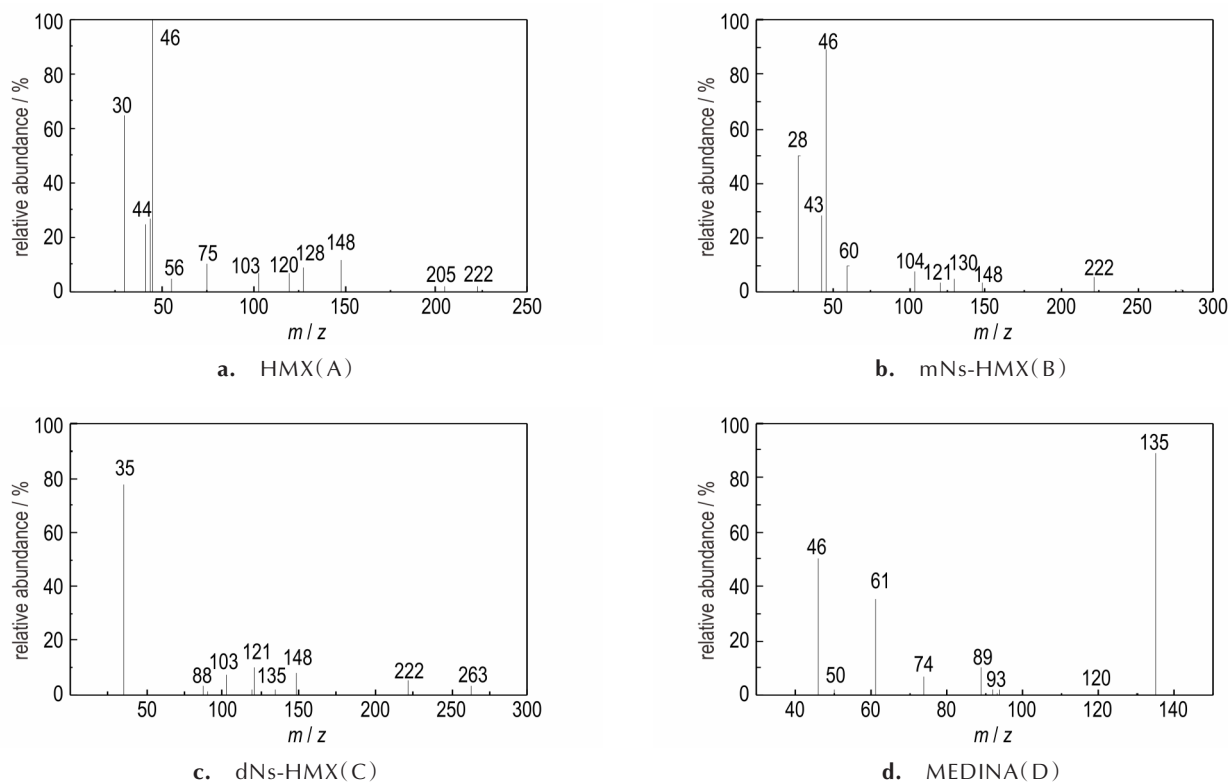
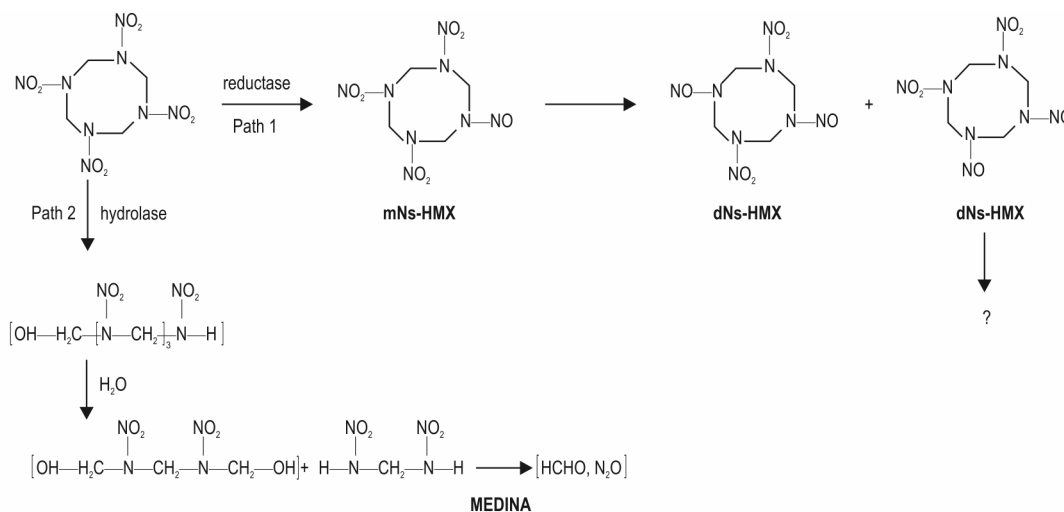


图5 H菌株降解HMX代谢产物的LC-MS谱图
Fig.5 LC-MS spectra of metabolites during HMX degradation by strain H



Scheme 1 Possible degradation pathway for the degradation of HMX by strain H (no substance detected in parentheses)

3.3 H菌株产生的粗酶液比活力分析

绝大多数微生物降解有机污染物都是依赖酶的作用完成的。由图6可知,H菌株降解HMX是在水解酶和还原酶的作用下,水解开环最后生成小分子。因此,分析H菌株产生酶的性质,有助于提高该菌株对HMX的降解效率。

不同培养条件对H菌株产生的粗酶液比活力有一定的影响,如表1所示。从表1中可以看出,培养基中不同HMX的初始浓度对菌株产生的粗酶液比活力有重要的影响,在75,100,125 mg·L⁻¹ HMX作用下,其比活力比对照组分别增加了114.7%,160.3%和108.3%。随着培养液中HMX浓度继续提高,其比活力受到抑制,当

培养液中 HMX 初始浓度达到 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 相比对照组, 其比活力下降了 19.23%, 当 HMX 初始浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株产生的粗酶液比活力达到最佳。分析原因可能当 HMX 的质量浓度较低时, 酶的活性中心未达到饱和, 酶的活力会随着 HMX 质量浓度的增加而增大。随着 HMX 质量浓度达到 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶的活性中心趋于饱和, 酶的活性达到一个极限^[18]; HMX 质量浓度过大时, 降低了分子的扩散性, 降低酶解反应速率, 酶的活力降低^[19]。表 2 是 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 对 H 菌株产生的粗酶液比活力影响。从表 2 中可以看出, 当 pH 值为 5.0~7.0 时, pH 值为 6.0 和 7.0 时相对于 pH 值为 5.0 时, 其比活力分别增加了 50.3%, 181.8%; 当 pH 值为 7.0~9.0 时, pH 为 8.0 和 9.0 时相对于 pH 值为 7.0 时, 其比活力分别减少了 22.1%, 35.2%; pH 值为 7.0 时, 菌株产生的粗酶液比活力达到最佳。由此可以得出, pH 值过高或过低都会影响 H 菌株产生粗酶液的酶比活力, 导致粗酶液的比活力降低或者失活。综上所述, 当 HMX 浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为 7 时, H 菌株产生的粗酶液比活力最大。

表 1 不同初始浓度 HMX 对 H 菌株产生的粗酶液比活力的影响
Table 1 Effects of different initial concentrations of HMX on the specific activity of the crude enzyme solution produced by strain H

concentration of HMX/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	total protein /mg	total enzyme activity / $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$	specific activity / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
0	8.81	1.37	0.156
75	8.06	2.70	0.335
100	7.15	2.90	0.406
125	7.33	2.38	0.325
150	8.13	1.02	0.126

表 2 不同 pH 值对 H 菌株产生的粗酶液比活力的影响

Table 2 Effects of different pH values on the specific activity of the crude enzyme solution produced by strain H

pH value	total protein /mg	total enzyme activity / $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$	specific activity / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
5.0	6.23	0.89	0.143
6.0	6.58	1.41	0.215
7.0	7.12	2.87	0.403
8.0	7.45	2.34	0.314
9.0	7.32	1.91	0.261

在不同培养条件下, H 菌株的全细胞蛋白电泳如图 6, 左侧数据为标准蛋白的分子质量, 利用软件

ImageJ 对各泳道条带进行分析。从图 7a 中各个泳道分别为 HMX 初始浓度 0, 75, 100, 125, $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 这 5 个泳道共有 14 条主蛋白带, 其分子质量主要密集在 26~120 kD 之间, 泳道 1 和 5 的蛋白条带颜色较浅, 说明其蛋白含量较低; 泳道 2 和 3 的蛋白含量较高, 且条带清晰; 泳道 4 颜色较深, 但其条带较密, 分辨率较差。从图 6b 中各个泳道分别为初始培养 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 分子质量主要分布在 26~120 kD, 从图 6b 可看出, pH 为 5.0 和 6.0 时, 其泳道 1 和 2 的颜色较浅, 蛋白含量较低; 在 pH 为 9.0 时, 泳道 5 的条带出现了的拖尾现象, 分辨率较差; 而泳道 3 和泳道 4 的蛋白含量高, 且分辨率较好。从上述结果可以看出, 不同反应条件下条带数量并无差异, 但是条带颜色深浅明显有所不同, 所以 HMX 初始浓度和初始 pH 值发生变化时, 会影响 H 菌株细胞的生长, 从而影响蛋白酶量变化^[20]。

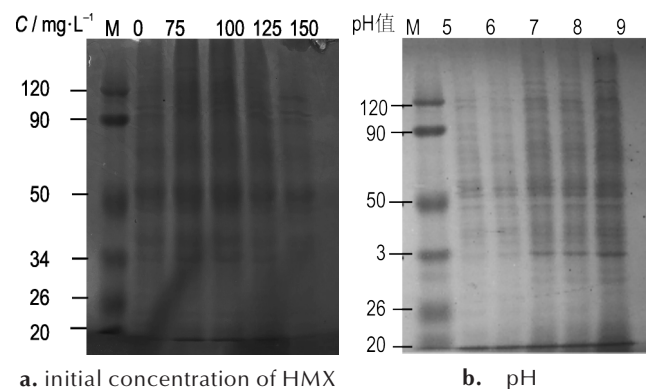


图 6 不同培养条件下 H 菌株全细胞蛋白电泳分析

Fig. 6 Electrophoresis analysis of whole cell extract of a culture H strain under various culture condition

4 结论

(1) 研究了不同营养因素包括碳源、氮源和金属离子对 H 菌株降解 HMX 效率的影响。结果表明, 最佳碳源、氮源和金属离子分别为苹果酸、复合氮源(酵母膏 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 和 Ca^{2+} 。

(2) 在 H 菌株降解 HMX 的过程中, 检测到 4 种中间物质, 分别为 HMX 的亚硝基衍生物单亚硝基 mNs-HMX 和二亚硝基衍生物两种异构体 dNs-HMX 及次甲基二硝胺。推测其降解途径可能为两条, 第一条是 HMX 经过还原酶作用降解为 mNs-HMX 和 dNs-HMX; 第二条是 HMX 经过水解开环裂解为 MEDINA。

(3)H菌株降解HMX过程中,对H菌株产生的粗酶液比活力和全细胞蛋白电泳进行了分析,实验结果表明,在HMX初始浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和pH值为7.0时,酶的比活力最大,蛋白含量最高。

参考文献:

- [1] Bedrov D, Smith G D, Sewell T D. Temperature-dependent shear viscosity coefficient of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX): A molecular dynamics simulation study[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2000, 112(16): 7203-7208.
- [2] 周宁一. 2,4-二硝基甲苯的生物降解[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1733-1733.
ZHOU Ning-yi. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(9): 1733-1733.
- [3] Hawari J, Halasz A, Beaudet S, et al. Biotransformation routes of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine by municipal anaerobic sludge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(1): 70.
- [4] Bhushan B, Paquet L, Halasz A, et al. Mechanism of xanthine oxidase catalyzed biotransformation of HMX under anaerobic conditions[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, 306(2): 509.
- [5] Fournier D, Halasz A, Thiboutot S, et al. Biodegradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) by *Phanerochaete chrysosporium*: new insight into the degradation pathway[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(15): 4130.
- [6] Van Aken B, Yoon J M, Schnoor J L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, an octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylo* bacterium sp associated with poplar tissues (*populus deltoides* × *nigra* DN34)[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004(70): 508-517.
- [7] 龙思思, 谢数涛, 段舜山, 等. 光合细菌及其应用现状[J]. 生态科学, 2002, 21(1): 91-94.
LONG Si-si, XIE Shu-tao, DUAN Shun-shan, et al. Photosynthetic bacteria and their application status[J]. *Ecological Science*, 2002, 21(1): 91-94.
- [8] 赵婷婷, 白红娟, 康鹏洲, 等. 光合细菌球形红细菌降解HMX[J]. 含能材料, 2018(4): 352-358.
ZHAO Ting-ting, BAI Hong-juan, KANG Peng-zhou, et al. Study on the degradation of HMX by photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials(Hanneng Cailiao)*, 2018(4): 352-358.
- [9] 姚竹云, 张肇铭. 几株光合细菌的表型特征及DNA-DNA同源性分析[J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(1): 84-89.
YAO Zhu-yun, ZHANG Zhao-ming. Phenotypic characteristics and DNA-DNA homology analysis of several photosynthetic bacteria[J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 1996, 2(1): 84-89.
- [10] Oh B T, Sarath G, Shea P J. TNT nitroreductase from a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(7): 875-881.
- [11] Monteil-Rivera F, Groom C, Hawari J. Sorption and degradation of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine in soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(17): 3878-3884.
- [12] 白红娟, 张肇铭, 杨官娥, 等. 球形红细菌转化去除重金属镉及其机理研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(11): 1809-1814
BAI Hong-juan, ZHANG Zhao-ming, YANG Guan-e, et al. Removal of heavy metal cadmium by globular red bacteria and its mechanism[J]. *Journal of Environmental Science*, 2006, 26(11): 1809-1814.
- [13] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 第6版. 北京: 科学出版社, 2006: 63-64.
CHEN Jun-hui, TAO Li, LI Jun, et al. *Biochemistry Experiment* [M]. Beijing: Science Press, 2006: 63-64.
- [14] Simpson R J. Proteins and proteomics: a laboratory manual[J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 3(4): 694-694.
- [15] 于海峰, 贾士儒, 董永胜, 等. 有机碳源对发状念珠藻单体细胞生长和光合作用的影响[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(2): 277-281.
YU Hai-feng, JIA Shi-ru, DONG Yong-sheng, et al. Effect of organic carbon source on growth and photosynthesis of monomer cells of *candida granulosa*[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2008, 22(2): 277-281.
- [16] 丁诗华, 杨志荣. 类产碱假单胞菌谷氨酸脱氢酶学性质的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1999(2): 354-358.
DING Shi-hua, YANG Zhi-rong. Study on enzymatic properties of glutamate dehydrogenase in *pseudomonas alkali-producing bacteria*[J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 1999(2): 354-358.
- [17] 白红娟, 张景林. 废水中微量残留炸药奥克托今、黑索今测定方法的研究[J]. 中国安全科学学报, 2003, 13(10): 38-40.
BAI Hong-juan, ZHANG Jing-lin. Study on the method of determining the determination of HMX, RDX in the wastewater[J]. *China Safety Science Journal*, 2003, 13(10): 38-40.
- [18] 寇明旭, 刘全阳. 金属离子对活性污泥微生物影响研究进展[J]. 山西建筑, 2007, 33(5): 176-177.
KOU Ming-xu, LIU Quan-yang. Progress in the study of the effects of Metal Ions on activated sludge microbes[J]. *Shanxi Architecture*, 2007, 33(5): 176-177.
- [19] 袁素霞, 苏荣欣, 齐威, 等. 魔芋葡甘聚糖酶解历程反应-扩散动力学[J]. 化工学报, 2008, 59(8): 2079-2082.
YUANG Su-xia, SU Rong-xin, QI Wei, et al. Reaction-diffusion kinetics of amorphophallus glucomannan enzymatic hydrolysis process[J]. *Journal of Chemical Engineering*, 2008, 59(8): 2079-2082.
- [20] 王静, 夏芳芳, 王闻伟, 等. 土壤甲烷单加氧酶活性测定的研究[J]. 土壤通报, 2011, 2(3): 589-592.
WANG Jing, XIA Fang-fang, WANG Wen-wei, et al. Study on determination of soil methane monooxygenase activity[J]. *Soil Notification*, 2011, 2(3): 589-592.

Degradation Pathway of HMX and the Property of Crude Enzyme Produced by *Rhodobacter sphaeroides*

BAI Hong-juan, ZHAO Ting-ting, KANG Peng-zhou, GAO Li

(School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: To further study the biotransformation process and producing enzyme properties of bacterial strain of *Rhodobacter sphaeroides* to HMX, the effects of different carbon sources, nitrogen sources and metal ions on the biotransformation efficiency of HMX of the strain and its growth were studied. The intermediate metabolites of HMX degraded by *Rhodobacter sphaeroides* were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and the possible degradation pathways were presumed. The effects of different conditions on the specific activity of the enzymes produced by the strain were determined. The zymograms were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The results show that the optimum carbon source, combined nitrogen source and metal ion for transforming HMX by the strain are malic acid, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract, Ca^{2+} , respectively. When the initial concentration of HMX is $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, after 96 h of culture, three substances can be detected: two HMX nitroso derivatives (mononitroso mNs-HMX and dinitroso dNs-HMX), methine dinitramine (MEDINA), and the mass-to-charge ratios of their mother ions are 279, 263 and 136, respectively. The possible degradation pathways presumed have two branches. One branch is that HMX is reduced to mNs-HMX and dNs-HMX by reductase, the other branch is that HMX is transformed and open-loop cleaved into methine dinitramine by hydrolase. The specific activity of enzyme and polyacrylamide gel electrophoresis experiments show that the specific activity of the enzyme produced by the strain is significantly promoted when the concentration of HMX is $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, while when the concentration of HMX is 125 and $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the specific activity of the enzyme produced by the strain has an inhibitory effect. When pH is 7, the specific activity of the enzyme produced by the strain is the highest.

Key words: octogen(HMX); *Rhodobacter sphaeroides*; intermediate product; degradation pathway; analysis of crude enzyme

CLC number: TJ55; X172

Document code: A

DOI: 10.11943/CJEM2018249

(责编:王艳秀)