

华丽曲霉 Z_{58} 有机磷农药降解酶的纯化和性质

刘玉焕 钟英长

(中山大学生命科学学院生物化学系 广州 510275)

摘 要 华丽曲霉(*Aspergillus ornatus*) Z_{58} 有机磷农药降解酶经硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤、DEAE-52 离子交换层析得到了分离纯化,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定为单一组分。凝胶过滤法测得分子量为 67 000,提纯倍数为 34.2,收率为 17.8%。该酶的最适反应温度 45℃,最适反应 pH 7.2,对热较稳定,并且能在 pH 6~10 范围保持活性。重金属 Cu^{2+} 对该酶具有明显的促进作用,而 SDS 对酶具有抑制作用。此酶对所试的有机磷农药都有较好降解作用。

关键词 有机磷农药降解酶,华丽曲霉,纯化和性质

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0430-34

有机磷农药是目前我国广泛使用的杀虫剂,长期大规模的生产使用对环境造成严重影响^[1]。常规化学去毒方法是利用强碱水解^[2,3],但效率低下,其水解产物也是环境的污染物,因此迫切需要一种在较温和条件下能进行彻底降解的方法。通过研究,人们分离到一批能降解或转化某种农药的微生物类群,研究了它们生物降解农药的主要作用方式。表明利用微生物及其产生的降解酶对环境中有有机磷农药的净化处理是行之有效的,并已显示出良好的应用前景^[4,5]。有关有机磷农药酶促降解目前主要集中在细菌方面,对真菌降解有机磷农药的酶解研究未见报道,本文主要报道华丽曲霉 Z_{58} 有机磷农药降解酶提取、纯化和性质研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

华丽曲霉 Z_{58} 为本课题组诱变筛选分离的高效降解乐果的菌种。

1.2 培养基

乐果 2.0 mL, NaNO_3 2.0 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, MnSO_4 0.02 g, CaCl_2 0.04 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH 6.8, 121℃ 灭菌 15 min, 需要时加入 2% 的琼脂配成固体培养基,待培养基灭菌冷却后加入农药乐果溶液。

1.3 培养方法

在固体培养基斜面于 30℃ 培养 5 d 的新鲜孢子接种到液体培养基中, 30℃ 摇床(转速 150 r/min) 培养 120 h, 离心收集菌体, 然后用蒸馏水洗涤菌体 2 次, 菌体用来提取酶。

作者简介: 刘玉焕(1964-), 男, 湖南澧县人, 中山大学生命科学学院讲师, 微生物学博士, 主要从事微生物学教学与研究工作

收稿日期: 1998-11-03, 修回日期: 1999-05-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.4 粗酶液的提取

把按上述培养方法收集的菌体进行冷却,然后加少量的 0.05mol/L Tris-HCl (pH7.2)缓冲液,采用电动匀浆器将菌丝体充分磨碎,在 0℃~4℃ 的条件下浸泡 24h,离心(12 000r/min)得上清液,即为粗酶液。

1.5 主要试剂

Sephadex G-100(Pharmacia),DEAE-5X(Whatman),标准蛋白、兰色葡聚糖(华美生物工程公司)。

1.6 蛋白质浓度测定

按 Lowry 法^[6]测定。

1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)^[7]

采用不连续垂直板电泳系统,分离胶的浓度为 7%,分离胶缓冲液为 1.5mol/L Tris-HCl pH8.9,浓缩胶浓度 3%,缓冲液为 1mol/L Tris-HCl pH6.7。

1.8 酶活力测定方法

取 0.1mL 2% 乐果溶液、0.8mL 0.05mol/L pH7.2 Tris-HCl 缓冲液、0.1mL 酶液,40℃ 条件下反应 30min 后,用二氯醋酸终止反应,测定底物乐果浓度的减少量,一个酶活单位(U)定义为每分钟降解 1mmol 乐果所需的酶量。

1.9 分子量的测定

用凝胶过滤法测定。将 Sephadex G-100 在蒸馏水中充分溶胀,漂洗出太细颗粒,然后用 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)平衡,按常规方法装柱,柱床 1.8×100cm,洗脱液为 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2,含 0.1mmol NaCl)。

2 结果和讨论

2.1 酶的分离纯化

酶的纯化操作都在 4℃ 下进行。

2.1.1 硫酸铵的分级沉淀 粗酶液中加固体硫酸铵至饱和度 90%,0℃~4℃ 条件下过夜,离心(12 000r/min)30min,弃去上清液,将沉淀溶于少量 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)的缓冲液中,在相同缓冲液中透析 24h,将酶液用聚乙二醇浓缩。

2.1.2 Sephadex G-100 凝胶过滤 将上述已浓缩的酶液组份上到事先已用 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)缓冲液平衡的 Sephadex G-100 柱(1.8×100cm)上过滤,用相同的缓冲液洗脱,流速为 16mL/min,部分收集器收集并测定蛋白含量和酶活,从图 1 可以看出,只有一个酶活峰,并且与蛋白峰相吻合,合并有降解活性的部分用聚乙二醇浓缩,电泳检测此时酶的纯度,发现只有部分提纯,需进一步处理。

2.1.3 DEAE-纤维素柱层析 将上述浓缩的酶液施于经 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)的缓冲液平衡的 DEAE-纤维素(DE-52)柱(2×40cm),酶蛋白先用 300mL 的 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)缓冲液洗脱至 OD_{280} 不变后,再用 250mL 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)的缓冲液和 250mL 含 1mol/L NaCl 的相同缓冲液中进行线性梯度洗脱,流速 24mL/h,洗脱曲线见图 2。将显示高活性的各管收集液合并,对 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)的缓冲液透析,然后用聚乙二醇浓缩后得有机磷农药乐果降解酶的纯品。

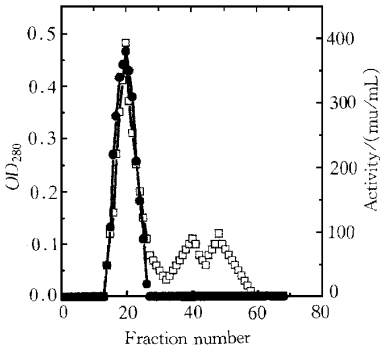


图 1 降解酶的 Sephadex G-100 层析

Fig.1 Chromatography of degrading enzyme on Sephadex G-100

— · — Degrading enzyme activity ;
— □ — OD₂₈₀.

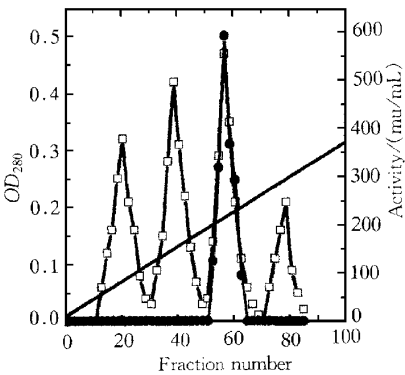


图 2 降解酶的 DEAE-纤维素层析曲线

Fig.2 Chromatography of degrading enzyme on DEAE-cellulose

— · — Degrading enzyme activity ;
— □ — OD₂₈₀ ;
— Concentration of NaCl.

2.1.4 纯化结果 :见表 1。

表 1 曲霉 Z₅₈的有机磷降解酶的分离纯化

Table 1 Purification of degrading enzyme of organophosphorus pesticides from *Aspergillus ornatus* Z₅₈

Purification step	Total Activity/u	Total protein/mg	Sp. act / (u / mg)	Recovery / %	Purification fold
Curde extract	3276	1469	2. 23	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2063	239. 4	8. 7	63	3. 9
Precipitation					
Sephadex G-100	1140	36. 1	31. 6	34. 8	14. 2
filtration					
DEAE-52	583. 1	7. 65	76. 2	17. 8	34. 2
chromatography					

2.2 酶的性质

2.1.4 酶的纯度及分子量 :将上述各提纯步骤的样品进行电泳检测(图 3),经离子交换柱层析后 ,表明该酶已达到电泳纯 ,进一步用 SDS-PAGE 电泳也只显示一条蛋白带 ,其大小约为 6.7×10⁵ ,与采用 Sephadex G-100 凝胶过滤法测得的酶分子量约为 6.63×10⁵ 相当 ,表明该酶不存在亚基单位。

2.2.2 酶作用最适温度 :在不同温度测定酶活力 ,结果见图 4 ,酶作用的最适温度为 45℃。

2.2.3 酶作用最适 pH :在不同 pH 环境下测定酶活力 ,结果见图 5 ,酶的最适 pH 为 7.2。

2.2.4 酶的热稳定性 :将酶液和 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.2)缓冲液在不同温度下保温不同时间 ,然后在 37℃ 测定酶活力 ,以未经保温的酶活力为 100% ,结果见图 6。该酶在 40℃ 以下稳定性良好 ,50℃ 以上酶活损失较大 ,60℃ 酶活 2h 全部消失。

2.2.5 酶的酸碱稳定性 :将已对无离子水透析的酶液稀释于 0.05mol/L 的如下缓冲液 : Na₂HPO₄-柠檬酸(pH2.2~8.0) Tris-HCl(pH7.5~8.9)和甘氨酸-NaOH(pH8.6~10.6) ,于 30℃ 处理 24h ,取出立即放置冰浴中 ,然后用 0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液调到 pH7.2 ,再

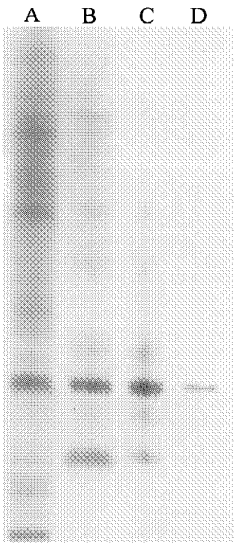


图 3 有机磷农药降解酶的各纯化阶段蛋白组分的聚丙烯酰胺电泳图

Fig.3 PAGE-pattern of purified degrading enzyme of organophosphorus pesticides.

lane A :Crude extract ; lane B :Pooled fraction after (NH₄)₂SO₄ precipitation ;

Lane C :Pooled fraction after Sephadex G-100 filtration ; Lane D :Pooled fraction after DEAE-52 chromatography.

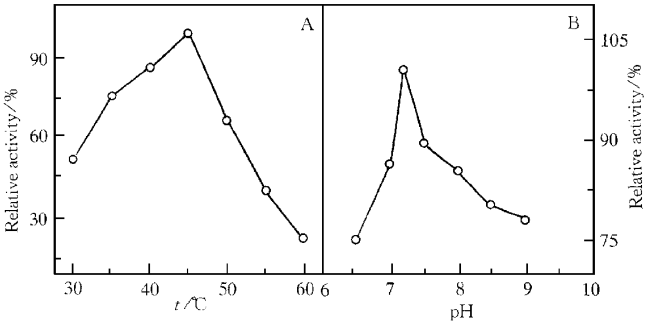


图 4 温度(A)和 pH(B)对酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature(A)and pH(B)on enzyme activity

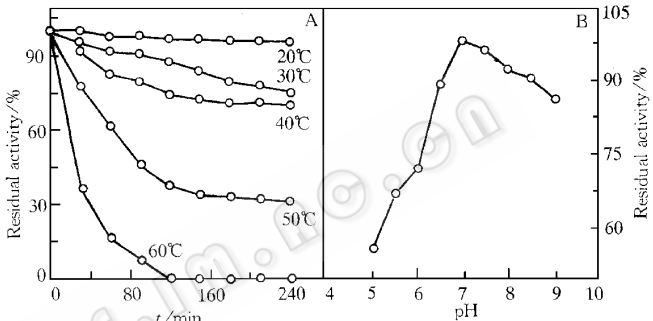


图 5 温度(A)和不同 pH(B)对酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature(A)and different pH values(B)on enzyme stability

测定酶活性 ,由图 7 可见该酶在 pH6.0~10.0 范围内较稳定。

2.2.6 各种化学试剂对酶活力的影响 :在测定酶活的反应体系中添加不同的金属离子到 0.2mmol/L ,每个实验重复两次。从表 2 可以看出 ,Cu²⁺ 对酶有激活作用 ,EDTA 对酶活无影响 ,说明该酶不需要金属离子维持其活性 ,SDS 及 Hg²⁺、Pb²⁺ 等对该酶有抑制作用。

表 2 各种化学试剂对降解酶活的影响

Table 2 Effect of various chemicals on the degrading enzyme activity

Chemicals *	Relative activity/%	Chemicals *	Relative activity/%
Control	100	Mn ²⁺	102.6
EDTA	99.3	Zn ²⁺	96.5
SDS	51	Fe ³⁺	81
Ca ²⁺	105.8	Pb ²⁺	76
Mg ²⁺	107.5	Ba ²⁺	47
Cu ²⁺	112.3	Hg ²⁺	32

2.2.7 酶的底物选择性 :取各种不同的 2% 有机磷农药溶液 0.1mL 于比色管中(内含 0.8mL 0.05mol/L pH7.2 Tris-HCl 缓冲液) ,然后加入酶液 0.1mL ,在 37℃ 反应 30min ,测定各自的降解率。有机磷降解酶对乐果、氧化乐果、甲胺磷和马拉硫磷的降解率分别为 83%、80%、85% 和 76%。进一步研究该酶的固定化 ,对消除环境中农药的污染具有广泛

的应用前景。

参 考 文 献

[1] 华小梅,单正军.环境科学进展,1996,2(4):33~45.
[2] Faust S D. *Environ Lett*,1972,3:171~201.
[3] Hsieh D P H,Archer T E,Munnecke D M,et al. *Environ Sci Technol*,1972,6:826~829.
[4] Munnecke D M. *Appl Environ Microbiol*,1976,32:7~13.
[5] Munnecke D M. *J Agric Food Chem*,1980,28:105~111.
[6] Lowry O H. *J Biol Chem*,1951,193:265~275.
[7] Chernoff A. *J Biol Chem*,1982,258:7852.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF DEGRADING ENZYME OF ORGA-
NOPHOSPHORUS PESTICIDES FROM *ASPERGILLUS ORNATUS* Z₅₈

Liu Yuhuan Zhong Yingchang

(Department of Biochemistry , School of Life Sciences , Zhongshan University , Guangzhou 510275)

Abstract :Degrading enzyme of organophosphorus pesticides was purified from *Aspergillus oryze* Z₅₈ by (NH₄)₂SO₄ precipitation , Sephadex G-100 gel filtration , DEAE-cellulose chromatography with 34.2-fold purification , 17.8% recovery and 76.2U/mg specific activity. The purified enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the enzyme estimated with Sephadex G-100 was 67000. The optimal conditions for activity were pH7.2 , temperature 45℃ . The enzyme was stable over the range of pH6~10 and below 40℃ , the activity was inhibited by SDS and stimulated by Cu²⁺ , the substrate ranges were nonspecific to organophosphorus pesticides.

Key words :Degrading enzyme of organophosphorus pesticides , *Aspergillus oryze* ,Purification and properties.

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自2000年40卷第1期开始扩版,双月刊,每册112面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。

欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部