

细菌脱色酶 TpmD 对三苯基甲烷类染料脱色的酶学特性研究

任随周^{1,2,3} 郭俊¹ 王亚丽¹ 岑英华¹ 孙国萍^{1,*}

(¹ 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(² 中国科学院华南植物园 广州 510650)

(³ 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 从嗜水气单胞菌 DN322 中分离纯化出能够对三苯基甲烷类染料结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿进行有效脱色的脱色酶,命名为 TpmD。该酶的亚基分子量为 29.4kDa,等电点为 5.6。该酶催化上述 4 种三苯基甲烷类染料脱色反应的适合温度为 40~60℃,适合 pH 范围为 5.5~9.0。动力学参数测定结果显示 TpmD 对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的 K_m 值分别为 24.3、40.6、54.2、68.5 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max} 值分别为 19.6、74.1、82.8、115.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。结晶紫为该酶的最适反应底物。TpmD 催化的脱色反应依赖于 NADH/NADPH 及分子氧的存在,显示该酶属于 NADH/NADPH 依赖型的氧化酶类。这是国内外首次关于细菌中三苯基甲烷类染料脱色酶酶学性质的描述。

关键词 脱色酶;嗜水气单胞菌;三苯基甲烷类染料;酶学特性

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0385-05

据调查,目前全世界染料年产量约为 $8 \sim 9 \times 10^5$ 吨,染料种类多达 100000 多种,在染料的使用过程中大约有 10%~20% 被直接排放到污水处理系统或环境中,造成环境污染^[1]。三苯基甲烷染料是仅次于偶氮染料的一大类染料,在纺织印染、食品、医药、造纸、化妆品、制革等工业及生物组织染色中被广泛地应用。三苯基甲烷类染料具有毒害和致突变作用,是对人类健康具有潜在危害的环境污染物^[2]。生物方法是目前去除染料污染较为有效的方法,因此印染废水的处理绝大多数采用生物法。尽管已经发现包括细菌、放线菌和真菌在内的多种微生物都能够对三苯基甲烷类染料进行脱色^[3~16],但目前对三苯基甲烷类染料的微生物脱色与降解机理研究仍然很少^[3]。真菌中的 *Phanerochaete chrysosporium* 能够利用其木素过氧化物酶以逐步去甲基化的方式对结晶紫进行脱色与降解^[4]; *Cunninghamella elegans* 通过细胞中某种未知酶的作用以去甲基化的方式对孔雀绿进行脱色与降解,且有 P450 系统的参与^[5]。细菌中催化三苯基甲烷类染料脱色的关键酶(或酶系)到目前为止仍不清楚^[3]。研究细菌脱色酶并探讨其对染料脱色的酶学特性和机制,可以为工业废水的

生物处理工艺提供科学参考。同时将固定化脱色酶应用于废水的染料脱色及循环利用时,无需添加供菌体生长的底物,因而具有很好的应用潜力^[17]。

我们在用序批式厌氧折流板反应器(ABR)对印染废水进行处理的过程中,从厌氧 ABR 活性污泥中分离得到一株对三苯基甲烷类染料具有较高脱色活性的细菌,经鉴定为嗜水气单胞菌。并首次从该菌株中分离纯化出能够对三苯基甲烷类染料结晶紫进行脱色的脱色酶 TpmD。本文将对该脱色酶在结晶紫、孔雀绿、灿烂绿及碱性品红等多种三苯基甲烷类染料脱色中的酶学特性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* subsp.) 菌株 DN322,本实验室分离鉴定。保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称 CCTCC) (AB205001^T)及英国国家典型菌种保藏中心(National Collection of Type Culture, NCTC, London, United Kingdom) (13358)。

1.1.2 主要试剂和仪器 :结晶紫、孔雀绿、灿烂绿及

基金项目 国家 863 项目(2003AA214040);广东省自然科学基金团队项目(015017);广东省科技攻关重大项目(2004A3040 4002);广东省自然科学基金项目(032319)

* 通讯作者。Tel: 86-20-87684471; Fax: 86-20-87684587; E-mail: ebiotech@gd.ac.cn; guopingsun@163.com

作者简介 任随周(1974-)男,河南灵宝人,博士生,主要从事环境微生物研究。E-mail: rensz@163.com

收稿日期 2005-08-12;接受日期 2005-09-20;修回日期 2005-11-07

碱性品红染料均为 Sigma 产品,低分子量标准蛋白(LMW Kit Proteins, 华美生物工程公司),DYY-III-5 电泳仪(Hoefer Pharmacia Biotech Instruments),等电聚焦电泳仪(Model 111 Mini IEF Cell apparatus, BioRad),宽范围等电点标准(pH 3~10 Amersham Pharmacia Biotech),紫外、可见分光光度计(BECKMAN DV640),超声波破碎仪(SONICS VC-505, USA),溶氧电极(Dissolved Oxygen Probe Cellox 325, WTW, Germany)。

1.2 酶的纯化

酶的纯化采用 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换层析、超滤和 HiTrap Blue HP 亲和层析等分步分离、纯化步骤,得到具有脱色活性的一种酶蛋白 TpmD,该脱色酶的亚基分子量为 29.4kDa,等电点 pI 为 5.6。

1.3 酶活力的测定及活力单位定义

酶活测定在 30℃ 条件下进行,反应总体积为 100 μ L。77 μ L 的 50mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)与 15 μ L 的酶混合后,加入 5 μ L 5mmol/L 的染料(终浓度为 0.25mmol/L)。加入 3 μ L 25mmol/L 的 NADH(终浓度 0.75mmol/L)混匀后,立即于分光光度计上连续测定染料在最大吸收波长处 OD 值的减少,同时用秒表计时。结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的最大吸收波长分别为 590nm、545nm、630nm 和 617nm。以加入灭活(100℃,30min)酶液的反应混合液为对照,以 30℃ 条件下每分钟催化 1nmol 染料所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.4 蛋白质浓度的测定

参照 Bradford^[18]的方法。

1.5 脱色酶谱带检测

聚丙烯酰胺凝胶电泳完毕后,取下凝胶,用刀片沿泳道切取五部分:一部分用 Coomassie brilliant blue R-250 蛋白染色剂染色,检测蛋白质谱带。另外四部分先用蒸馏水冲洗,然后分别在 2mmol/L 的结晶紫、孔雀绿、灿烂绿及碱性品红溶液中放置 10min,随后转入含 2mmol/L NADH 的磷酸缓冲液(pH 7.0)中,室温放置 10min。反应结束后将几部分进行对照比较,凝胶背景中深颜色的染料被脱色的蛋白质带即为染料脱色酶带。

1.6 酶学性质研究

1.6.1 温度对酶活的影响和酶的热稳定性试验: 100 μ L 反应液中含 50mmol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.5)77 μ L,酶液 15 μ L,分别用 5mmol/L 结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿作为反应底物,各染料溶液的

用量均为 5 μ L,加入 25mmol/L 的 NADH 3 μ L 后,按 1.3 的方法分别在 10~70℃ 水浴条件下测定酶活。酶的热稳定性测定时,首先将脱色酶分别在 10~70℃ 水浴中放置 3h,冷却至 30℃ 后加入底物,测定脱色酶活力,以不保温的酶活力作为对照,计算剩余酶活力。

1.6.2 pH 对酶活的影响和酶的 pH 值稳定性试验: 30℃ 条件下,在不同 pH 的 50mmol/L 磷酸缓冲溶液及 50mmol/L 的碳酸缓冲溶液中,分别用结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿作为底物测定脱色酶活力。用上述不同 pH 缓冲液,在不同 pH 条件下 30℃ 水浴保温 4h,测定剩余酶活力。

1.7 脱色酶的底物特异性试验

1.7.1 脱色酶对不同三苯基甲烷类染料的动力学参数测定: 用 50mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲溶液分别配制不同浓度的结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6mmol/L,按 1.3 的方法测定酶活,计算反应速率,采用 Lineweaver-Burk 双倒数法求得米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} ^[19]。

1.7.2 脱色酶对 NADH 及 NADPH 的依赖性试验: 分别以结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿为反应底物,改变 1.3 中酶活测定反应体系中 NADH 或 NADPH 浓度依次为 0.00, 0.125, 0.25, 0.75, 1.25, 2.5, 3.75mmol/L,测定不同浓度的 NADH 或 NADPH 对 4 种不同染料脱色的影响。

1.7.3 脱色酶对氧的依赖性试验: 脱色反应总体积为 30mL,反应体系组成参照 1.3,将染料溶于 50mmol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.0)中,终浓度为 0.25mmol/L,酶的用量根据其他底物的量做相应调整。在 30℃ 条件下加入 NADH 后开始反应。随即用秒表记录脱色时间,用溶氧电极测定反应体系中溶解氧的浓度。为测定无氧气条件下的脱色情况,从容器的底部吹入氮气 15min,以赶出溶解氧。

2 结果和分析

2.1 脱色酶酶谱检测

用粗酶液电泳后分别用 Coomassie brilliant blue R-250 和 4 种染料染色(图 1)。由图可见 1 号胶用 R-250 染色后有多条蛋白质带出现,2,3,4,5 号胶分别经孔雀绿、碱性品红、灿烂绿及结晶紫溶液染色后均可观察到明显的酶谱,且酶谱在胶中的位置相同,表明在菌株 DN322 发酵粗酶液中仅存在一种脱色酶,该脱色酶负责对结晶紫、孔雀绿、灿烂绿及碱性

品红脱色。

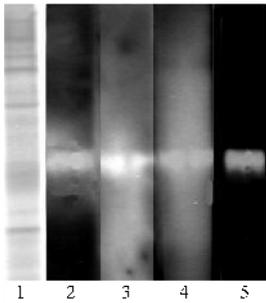


图1 脱色酶酶谱检测图

Fig.1 PAGE of the culture filtrate of *Aeromonas hydrophila* strain DN322.1. Proteins stained with Coomassie brilliant blue R-250 ; 2 ~ 5. Zymogram of decolorization enzyme stained with malachite green ; basic fuchsin ; brilliant green and crystal violet respectively.

2.2 脱色酶的酶学特性

2.2.1 温度对酶活的影响 :TpmD 对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的最适反应温度非常接近,在 50℃ ~ 55℃ 之间。温度在 40℃ ~ 60℃ 时, TpmD 对 4 种染料均有较高的酶活力,当温度大于 62℃ 时,酶活力降低 70% 以上。TpmD 在 35℃ 条件下相对稳定,剩余酶活在 90% 以上,至 60℃ 时剩余酶活力为 74.2%,当温度超过 60℃ 时, TpmD 的活性迅速下降,65℃ 时酶活力损失达 70% 以上。若以 3h 内剩余酶活力 50% 时的温度作为半失活温度,则 TpmD 的半失活温度为 62℃。

2.2.2 pH 对酶活的影响 :TpmD 对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的最适 pH 值在 7.4 ~ 8.0 之间。适合的 pH 在 5.5 ~ 9.0 之间,在此范围内, TpmD 相对酶活稳定在 70% 以上,低于 pH 5.0 或高于 pH 10.5 时脱色酶活力损失 80% 以上。酶的 pH 稳定性测定结果表明, TpmD 在 pH6.0 ~ 9.0 范围内比较稳定,30℃ 水浴保温 4h 后残余酶活保持在 85% 以上, pH 值高于 10.0 或低于 5.0 酶活损失较大。由此表明 TpmD 是在中性条件相对稳定的酶。

2.2.3 脱色酶对 4 种三苯基甲烷类染料的动力学参数 :Lineweaver-Burk 作图结果(图 2)表明, TpmD 对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的 K_m 值分别为 24.3、40.6、54.2、68.5 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$; V_{max} 值分别为 19.6、74.1、82.8、115.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由此可见 TpmD 与结晶紫的结合能力较强,结晶紫是该酶的最适反应底物。

2.2.4 脱色酶对 NADH 及 NADPH 的依赖性 :不同 NADH 浓度下结晶紫的脱色情况显示(图 3),当 NADH 浓度低于 2.5mmol/L 时, TpmD 的活性与

NADH 的浓度呈线性依赖关系,当高于这一浓度时,进一步增加 NADH 的浓度将不能明显增加 TpmD 脱色反应的速率。当反应体系中不加入 NADH (0.00mmol/L) 时, TpmD 则不显示脱色活性。当用 NADPH 代替 NADH 进行脱色试验时,得出相似的结果,显示 TpmD 是 NADH 或 NADPH 依赖型的酶类。用碱性品红、灿烂绿及孔雀绿进行脱色实验时, TpmD 同样显示出对 NADH 或 NADPH 的依赖性。

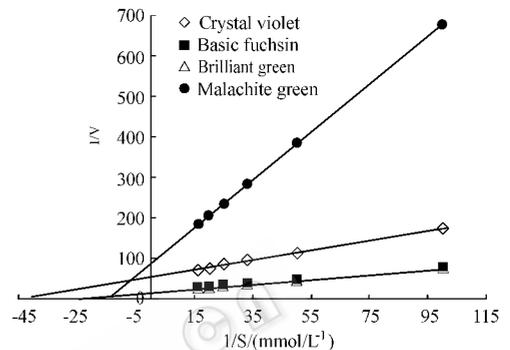


图2 脱色酶对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的动力学曲线

Fig.2 The Lineweaver-Burk dynamics curves of TpmD for crystal violet (◇), basic fuchsin (■), brilliant green (△) and malachite green (●).

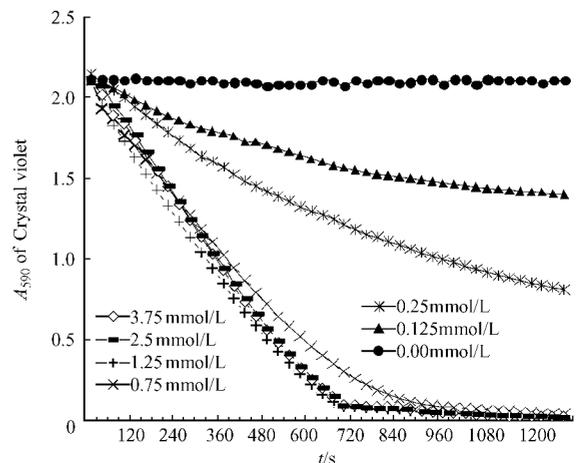


图3 不同浓度的 NADH 对结晶紫脱色的影响

Fig.3 Decolorization of the purified crystal violet decolorization enzyme at different concentrations of NADH.

2.2.5 脱色酶对氧的依赖性 :用 TpmD 对结晶紫进行脱色时,反应体系中溶解氧的浓度随着结晶紫的脱色而迅速降低(图 4),显示在脱色反应过程中有氧分子的消耗。当向脱色反应体系中吹入氮气排除其中的溶解氧后, TpmD 对结晶紫的脱色反应将不能发生。进一步证实分子氧在 TpmD 催化的结晶紫脱色反应中是必需的。用碱性品红、灿烂绿及孔雀

绿进行脱色实验时, TpmD 同样显示出对分子氧的依赖性。

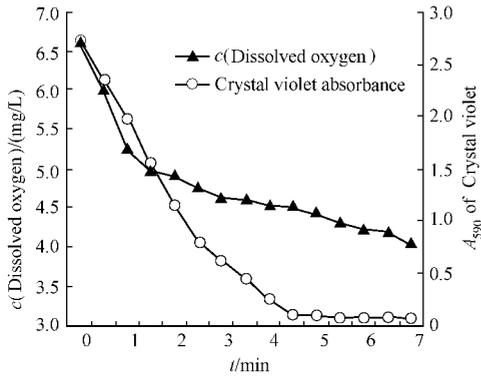


图4 脱色酶对氧的依赖性

Fig.4 Oxygen dependence of decolorization by the purified decolorization enzyme.

3 讨论

嗜水气单胞菌 DN322 脱色酶 TpmD 负责三苯基甲烷类染料结晶紫、孔雀绿、灿烂绿及碱性品红的脱色。酶谱显示在菌株 DN322 细胞裂解液中仅存在一种类型的 TpmD。该脱色酶的亚基分子量(M_r)为 29.4kDa, 等电点(pI)为 5.6, 适合作用温度是 40℃ ~ 60℃, 适合 pH 值为 5.5 ~ 9.0。在 pH 5.0 ~ 9.0 及温度 37℃ 条件下, TpmD 能稳定存在。TpmD 对结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿等 4 种三苯基甲烷类染料都具有较强的脱色能力, 结晶紫是该酶的最适反应底物。TpmD 所催化的脱色反应依赖于 NADH 或 NADPH 的存在, 且在反应过程中有氧的消耗, 说明 TpmD 是一种 NDAH 或 NADPH 依赖型的氧化酶。有关 TpmD 的催化反应机制尚在研究之中。

参 考 文 献

[1] Blümel S, Busse HJ, Stolz A, et al. *Xenophilus azovorans* gen. nov., sp. nov., a soil bacterium that is able to degrade azo dyes of the Orang II type. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 1831 - 1837.

[2] Au W, Pathak S, Collie CI, et al. Cytogenic toxicity of gentian violet (crystal violet) on mammalian cells *in vitro*. *Mutat Res*, 1978, **58**: 269 - 276.

[3] Azmi W, Sani RK, Banerjee UC. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **22**: 185 - 191.

[4] Bumpus JA, Brock BJ. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(5): 1143 - 1150.

[5] Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9): 4358 - 4360.

[6] Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, et al. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4099 - 4101.

[7] Kwasniewska K. Biodegradation of crystal violet (hexamethyl-parosaniline chloride) by oxidative red yeasts. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1985, **34**: 323 - 330.

[8] Jone JJ, Falkinham III JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 2323 - 2326.

[9] Gill PK, Arora DS, Chander M. Biodecolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp.. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, **28**: 201 - 203.

[10] Rajesh KS, Uttam CB. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**: 433 - 437.

[11] Sarnaik S, Kanekar P. Biodegradation of methyl violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 251 - 254.

[12] Vasdev K, Kuhard RC, Saxena RK. Decolorization of triphenylmethane dyes by the birds nest fungus *Cyathus bulleri*. *Curr Microbiol*, 1995, **30**: 269 - 272.

[13] Yatome C, Yamada S, Ogawa T, et al. Degradation of Crystal Violet by *Nocardia corollina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **38**: 565 - 569.

[14] Yatome C, Ogawa T, Matsui M. Degradation of Crystal Violet by *Bacillus subtilis*. *J Environ Sci Health*, 1991, **A26**: 75 - 87.

[15] Yesilada O. Decolorization of Crystal Violet by fungi. *World J Microbiol Biotechnol*, 1995, **11**: 601 - 602.

[16] Mo On-sun J, Yong-Mi L, Yong-Lark C, et al. Isolation of *Citrobacter* sp. mutants defective in decolorizing malachite green. *J Basic Microbiol*, 2004, **44**(4): 320 - 324.

[17] Abadulla E, Robra KH, Gubitza G, et al. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents. *Textile Res J*, 2000, **70**: 409 - 414.

[18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254.

[19] Wiseman A. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd ed. England, Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985.

Properties of a triphenylmethane dyes decolorization enzyme TpmD from *Aeromonas hydrophila* strain DN322

REN Sui-zhou^{1, 2, 3}, GUO Jun¹, WANG Ya-li, CEN Ying-hua¹, SUN Guo-ping^{1*}

(¹Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

(²South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

(³Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A novel bacterial decolorization enzyme for triphenylmethane dyes from *Aeromonas hydrophila* strain DN322 was purified, named TpmD. The purified enzyme catalyzes the decolorization of several triphenylmethane dyes, i. e., crystal violet, basic fuchsin, brilliant green and malachite green. The enzyme was identified by the clear transparent band development of zymogram stained with crystal violet, basic fuchsin, brilliant green and malachite green after polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) respectively. The decolorization enzyme was enzymologically characterized. The results showed that the molecular weight of TpmD is 29.4kDa and its isoelectric point (pI) is 5.6. The maximal activity of TpmD for above four triphenylmethane dyes was observed at 50°C ~ 55°C and pH 7.4 ~ 8.0. The temperature for losing half of the activity (t_{1/2}) within 4h is 62°C. The activities of decolorization enzyme are relatively stable at pH range of 5.5 ~ 9.0. The K_m and V_{max} of TpmD for decolorizing crystal violet, basic fuchsin, brilliant green and malachite green are 24.3, 40.6, 54.2, 68.5 μmol/L respectively, V_{max} are 19.6, 74.1, 82.8, 115.6 μmol · L⁻¹ · s⁻¹ respectively. Both NADH/NADPH and molecular oxygen are necessary for the enzyme to decolorize triphenylmethane dyes, indicate the enzyme is an NADH/NADPH-dependent oxygenase.

Keywords: Decolorization enzyme; *Aeromonas hydrophila*; Enzymological properties

Foundation item: National Programs for High Research and Development of China (2003AA214040); The Team Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (015017); The Program for the Development of Science and Technology of Guangdong Province (2004A30404002); The Provincial Natural Science Foundation Items of Guangdong Province (032319)

* Corresponding author. Tel: 86-20-87684471; Fax: 86-20-87684587; E-mail: ebiotech@gdas.ac.cn and guopingsun@163.com

Received: 12 August 2005/Accepted: 20 September 2005/Revised: 7 November 2005