

赭曲霉产生的脲酶抑制剂的提纯与动力学*

林新坚 陈济琛 郑时利 刘中柱

(福建省农业科学院土壤肥料研究所 福州 350013)

Freney J R

(Division of plant industry CSIRO, G. P. O Box1600 Canberra ACT2601, Australia)

摘要 对赭曲霉(*Aspergillus ochraeus*)产生的脲酶抑制剂进行了纯化,经硅胶薄层层析和高效液相色谱鉴定达到均一,晶体呈白色针状。质谱及元素分析表明,该物质含C、H、O三元素,分子量为184,分子式是 $C_9H_{12}O_4$,熔点 $105\sim 110^\circ\text{C}$,其抑制作用随抑制剂浓度而增强,抑制类型为非竞争性。 K_i 为 $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。抑制剂未改变酶的Hill系数, $n=1$ 。
关键词 赭曲霉,脲酶抑制剂, $C_9H_{12}O_4$,动力学

尿素氮肥是我国农作物的主要氮源之一^[1~2],但农作物通常对尿素氮肥的利用率很低,在稻田中其损失可达施氮量的一半左右^[3~5]。造成氮素损失的原因,一部分是通过氨挥发损失^[6~8];另一部分通过消化与反硝化途径以 N_2O 、 N 等形式损失。因此,提高尿素利用率很重要的途径之一是利用脲酶抑制剂抑制土壤中的脲酶活性,减缓尿素的分解速率。对脲酶抑制剂的研究^[9~11],70年代Bremner等从上百种的化合物中筛选出对脲酶抑制效果较好的酞类和氢酞类有机化合物。有的学者提出用扩展青霉(*Pen. expansum*)产生的抗菌素抑制脲酶^[12],但并未做过深入研究。

本文继脲酶抑制剂产生菌的分离和培养条件研究之后,从赭曲霉培养液中提取到一种小分子物质,将这种物质作为脲酶抑制剂尚未见到报道。作者对赭曲霉产生的脲酶抑制剂的提纯、动力学和分子量测定以及抑酶作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 脲酶

脲酶[EC.3.5.1.5]分离自刀豆,冷冻干燥,每毫克5个单位(5u/mg)配成5mg/ml脲酶溶液。

1.2 赭曲霉的培养和抑制剂的提取

1.2.1 赭曲霉的培养:福建省农业科学院从灰泥田土中分离到一株代号为I₃ (Inhibitor, No.36)霉菌,经中国科学院微生物研究所鉴定为赭曲霉。培养基用10%土豆,2%葡萄糖,自然pH,28℃静置暗培养12~14d后,用42#滤纸过滤,滤液为原液。

1.2.2 原液浓缩:原液用旋转蒸发器,在减压 $-0.09\text{MPa} \sim -0.098\text{MPa}$,温度 $50\sim$

* 澳大利亚农业发展中心和福建省农业科学院基金资助。

谢新东参加其中部分工作。

本文于1995年10月17日收到,1997年3月24日定稿。

58℃条件下,浓缩50倍为浓缩液。浓缩液真空干燥,粗粉剂为 $I_{36}N$ 。

1.2.3 脲酶抑制剂的提取和结晶^[13~14]:将浓缩液250ml用等量的乙酸乙酯萃取15次,将脂相合并浓缩后用140~200目硅胶柱层析(柱体积 $3.2 \times 136\text{cm}$),加样量占柱体积的10%,洗脱液用乙酸乙酯:石油醚=4:1,流速3ml/min,分部收集400ml/瓶,测定各部分抑制率。然后将对脲酶活性有抑制的部分收集浓缩,进行二次硅胶柱($2.4 \times 80\text{cm}$)层析,洗脱液用石油醚:乙酸乙酯=5:1,流速2ml/min,收集量200ml/瓶,减压浓缩成20ml,室温下自然结晶,通过分级结晶法获得白色针状晶体。

1.3 脲酶活性测定

1.3.1 刀豆脲酶活性测定:采用Orion氨电极法测定^[15]。0.1mol/L pH7.0 Tris- H_2SO_4 缓冲液2.9ml,尿素0.05mol/L 1ml,原液1ml(含2.0mg $I_{36}N$),或浓缩液稀释10倍后吸取1ml,脲酶0.1ml,30℃水浴20min,加 $60 \times 10^{-3}\text{g/ml}$ PMA 1ml终止反应,取0.5ml用氨电极测($NH_4^+-NH_3$)。

1.3.2 土壤脲酶活性测定:采用Orion氨电极法和Mulvancy和Bremner方法^[16]。

1.4 脲酶抑制剂纯度测定

用硅胶薄层层析法和日本岛津Lc-4A型高效液相色谱仪。薄层层析溶剂系统为乙酸乙酯:石油醚(1:5),碘缸显色。高效液相色谱条件:柱Zorbax ODS($4.6\text{ID} \times 250\text{mm}$),流动相为100%甲醇,流速1ml/min,检测波长254nm,280nm。

1.5 元素分析

用英国PE-240型元素分析仪测定S、C、H、N和O。

1.6 光谱分析

质谱测量在Finnigan MAT-95 GC/MS/DS联用仪上进行。质谱操作条件为:电子轰击源70ev,离子源温度 $T=50^\circ\text{C}$;红外光谱测定用Nicolet 170SXFT-IR红外光谱仪,扫描方式12,狭缝,时间常数 $\times 4$ 。

1.7 熔点测定

用X₄显微熔点测定仪。

2 结果和讨论

2.1 脲酶抑制剂的提取、纯化、结晶及纯度鉴定

2.1.1 抑制剂的提取、纯化:赭曲霉培养液经过滤和浓缩,测定其浓缩液每毫升对脲酶活性的抑制率为76%。浓缩液用等量的乙酸乙酯萃取,分别收集萃取后水相和脂相两溶液,脂相经减压浓缩除去有机溶剂,定容至两相溶液体积相等,测定它们对脲酶的抑制效果。结果表明,每毫升水溶相和脂溶性溶液对脲酶的抑制率分别为44.0%和57.0%。鉴于后者较前者抑制率高且易于纯化,将脂溶性溶液进一步提纯,经G140~200目硅胶柱层析,分部收集并测定其对脲酶活性的抑制效果(图1-a)。结果表明,峰III对脲酶活性的抑制率最高,其次是峰II。然而,从收集样5和6的硅胶薄层层析表明,这两个收集样都含三个斑点,说明不是单一组份的物质。因此,将峰III样品合并,减压浓缩后二次硅胶过柱,分部收集见图1-b,测定表明,收集样3对脲酶的抑制率最高。

2.1.2 抑制剂的结晶及纯度鉴定:二次柱层析收集样3和2经自然结晶和分级结晶,获

得白色针状或长方形状晶体。在 XPB-01 偏光显微镜下观察, 该晶体具偏光性。

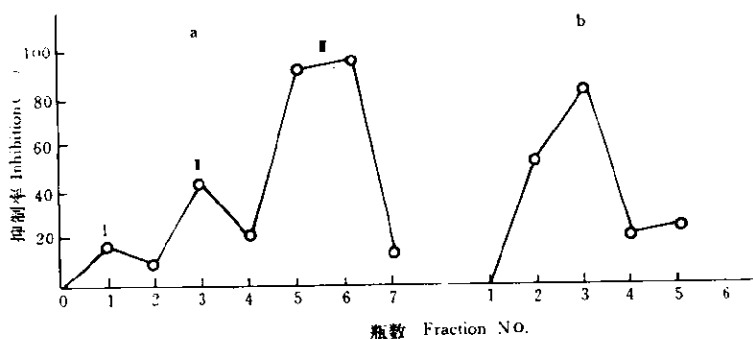


图 1 硅胶柱层析

Fig.1 Silicagel column chromatography of urease inhibitor on G-200

(a): First on silicagel column chromatography; (b): Second on silicagel column chromatography.

二次柱层析收集样 3 和 2 用硅胶薄层层析和高效液相色谱鉴定其纯度。在硅胶板上, 都仅显示一个斑点, 斑点大小一致, 迁移的位置相同。高效液相色谱分析只显示单一峰。结果说明两者是均一的单组份物质, 是同一种物质。

2.2 抑制剂对脲酶活性的抑制

2.2.1 抑制剂作用类型: 将不同浓度的抑制剂加到一定浓度的酶液中, 以不同底物浓度为参数, 测定残留酶活力。结果表明, 抑制率随抑制剂浓度而增加。在不同的底物浓度下, 测定抑制剂对酶催化反应的抑制作用, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 结果证明该物质为非竞争性抑制剂, 见图 2-a。不同于化学抑制剂 NBPT[N-(n-butyl) thiophosphoric triamide], NBPT 对脲酶的抑制为竞争性抑制, 见图 2-b。

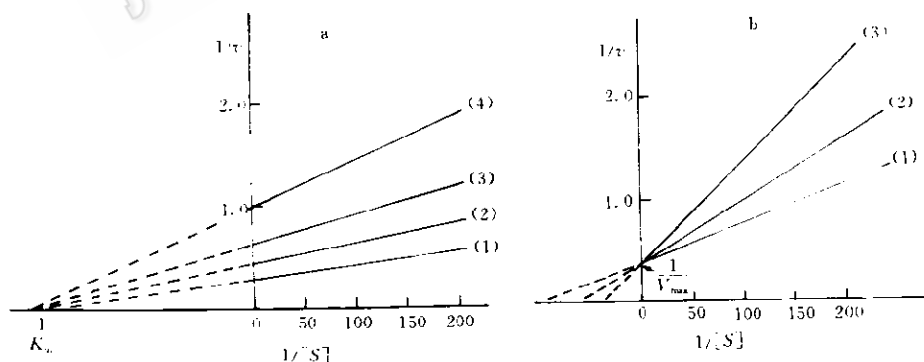


图 2 NBPT 和 $C_9H_{12}O_4$ 抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig.2 The Lineweaver-Burk plot of NBPT and $C_9H_{12}O_4$

(a): (1) $I = 0$; (2) $I = 1 \text{ mmol/L}$; (3) $I = 2 \text{ mmol/L}$; (4) $I = 4 \text{ mmol/L}$. $K_m = 4.9 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

(b): (1) $I = 20 \mu\text{mol/L}$; (2) $I = 40 \mu\text{mol/L}$; (3) $I = 80 \mu\text{mol/L}$; $V_{\max} = 3.30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.2.2 抑制常数: 在不同的抑制剂浓度下, 以不同的底物浓度为参数, 求出酶的反应速

度, 用 Dixon 作图法, 根据诸线直线簇的交点, 可以从横轴上求得抑制常数 K_i 为 $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (图 3)。

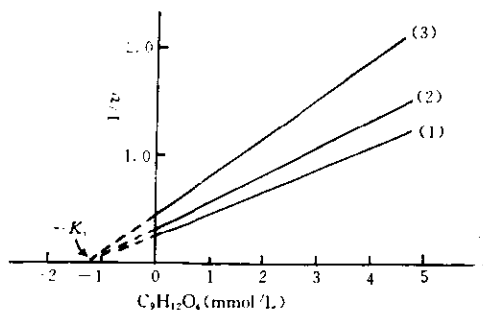


图 3 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 抑制作用的 Dixon 图

Fig.3 Dixon plot of $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$

(1) $[S] = 0.005 \text{ mol/L}$; (2) $[S] = 0.01 \text{ mol/L}$;

(3) $[S] = 0.02 \text{ mol/L}$.

$K_i = 1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

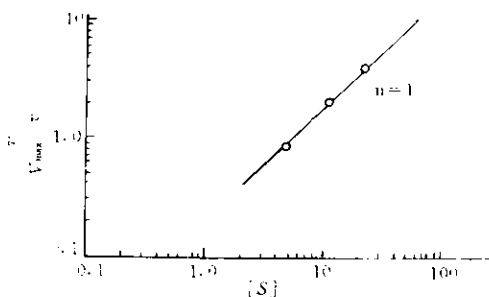


图 4 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 抑制作用的 Hill 图

Fig.4 Inhibition Hill of $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$

Urease $50 \mu\text{g}$, $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 2.4 mg .

2.2.3 抑制剂对酶构象的影响: 用图 3 的实验结果, 通过 Hill 方程计算, 酶的 Hill 系数不变, $n = 1$ (图 4)。

2.3 脲酶抑制剂的理化性质

该脲酶抑制剂晶体无色, mp 为 $105 \sim 110^\circ\text{C}$, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。元素分析数据计算值(%): C: 58.68; H: 6.57; 实测值(%)C: 59.43; H: 6.75。不含 N、P 和 S。红外光谱峰值, $V_{\text{max}}(\text{KBr})_{\text{cm}^{-1}}$: 3475($-\text{OH}$), 2980, 2930, 1710($\gamma\text{-CO-2}$), 1670($\text{C}=\text{C}$), 1380, 1260, 1155, 1060($-\text{O}-$)。EI-MS 质谱测定, 分子量为 184 m/e 。在 EI-MS 谱上主要观察到下列碎片离子: m/e (%): 184(1.6), 182(6), 140(100), 125(28), 123(38), 122(18), 95(28)。晶体易溶于水和乙酸乙酯。

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 在 80°C 保持 1h, 对脲酶的抑制效果仍没受影响, 可见它在 80°C 条件下尚稳定。浓度为 $5.43 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 抑制剂对灰泥土脲酶的抑制率, 在开始两天与 $1.36 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 浓度的 NBPT 抑制剂相当, 到第四天, NBPT 对脲酶的抑制率接近零, 而 $5.43 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 和 $10.86 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 浓度的 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 抑制率仍达 12.93% 和 37.0%。由于它对脲酶的抑制不受尿素影响, 抑制时间也长, 因而这种抑制剂可能更有实用意义。

参 考 文 献

- [1] De Datta S K, Buresh R J, Samson M I. *Soil Science Society of American Journal*, 1991, 55: 543~548.
- [2] Velk P L G, Byrnes B H. *Fertilizer Research*, 1986, 9: 131~147.
- [3] 朱兆良, 蔡贵信. 土壤学报, 1985, 11(11): 320~325.
- [4] 陈荣业, 朱兆良. 土壤学报, 1982, 19(2): 122~129.
- [5] Cai G X, Zhu Z L, Terrett A C F et al. *Fertilizer Research*, 1986, 10: 203~215.
- [6] 朱兆良. 土壤学进展, 1979, 2: 1~16.

- [7] Craswell E T, De Datta S K, Obcemea W N. *Fertilizer Research*, 1982, 2: 247~259.
- [8] De datta S K. Advances in soil fertility research and fertilizers for rice. International Rice Research Institute: Los Banos, 1987. 22~41.
- [9] 周礼恺. 土壤学进展, 1984, 1: 1~9.
- [10] Buresh R J, De Datta S K, Padilla J L. *Agronomy Journal*, 1988, 80: 947~952.
- [11] Bremner J M, Douglas L A. *Soil Boil Biochem*, 1971, 3: 297~307.
- [12] Reip J. *Naturwiss en shafte*, 1977, 64(2): 97~99.
- [13] Jach H, Moore, Thomas P J. *Agric Food Chem*, 1974, 22(4): 697~698.
- [14] Wm Rosenbrook Jr, Carney R E. *Tetrahedron Letters*, 1970, 22: 1867~1870.
- [15] Orien. Instruction manual for Ammonia electrode model U.S.A, 1983, 5~12.
- [16] Mulvaney R L, Bremner J M. *Communication in soil science and plant Analysis*, 1979, 10(8): 1163~1170.

PURIFICATIONS AND KINETICS OF UREASE INHIBITOR FROM *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

Lin Xinjian Chen Jichen Zheng Shili Liu Zhongzhu

(Institute of Soils and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013)

Freney J R

(Divison of plant Industry CSIRO, G.P.O Box1600, Canberra ACT 2601, Australia)

Abstract Urease inhibitor from *Aspergillus ochraceus* was purified to homogeneity through the analysis of TLC and HPLC. It was white needleshaped crystal, which contained C, H and O elements. It, $C_9H_{12}O_4$ (m / e184, mp105~110°C) was estimated by analysis of EI and element. Inhibition on urease activity was increased with its concentration. It was found to be a noncompetitive inhibitor. The inhibitory constant (K_i) was $4 \times 10^{-3} \text{ mol / L}$. The inhibitor did not affect the Hill coefficient, $n = 1$.

Key words *Aspergillus ochraceus*, Urease inhibitor, $C_9H_{12}O_4$, Kinetics