

有机溶剂和抑制剂对毕赤酵母表达 TpmD 酶活性影响

张培培^{1,2,3,4}, 任随周^{1a,2,3*}, 许玫英^{1a,2,3}, 孙国萍^{1a,2,3}

(^{1a}广东省微生物研究所, 广州 510070)

(^{1b}中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

(²广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

(³广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

(⁴中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 【目的】本文在利用毕赤酵母成功分泌表达高活性三苯基甲烷类染料降解酶 TpmD 的基础上, 研究不同有机溶剂和常见酶抑制剂对纯化后的重组脱色酶 TpmD 活性的影响。【方法】将毕赤酵母分泌表达的重组酶 TpmD 经超滤浓缩及镍离子亲和层析柱纯化后得到纯化的重组 TpmD 酶。利用分光光度计测定其对孔雀石绿脱色活性, 并研究了各种有机溶剂和抑制剂对 TpmD 酶脱色活性的影响。通过脱色过程溶氧测定和全波长扫描分析反映了 DTT 与 NADH 作为 TpmD 辅因子时对孔雀石绿脱色反应的表现区别。【结果】甲醇对酶活性抑制作用较弱, 重组酶在甲醇中能维持约 90% 的活性, 乙醇和丙酮则使重组酶活性则迅速丧失。低浓度二甲基亚砷有利于重组酶活性的维持, 30% 的二甲基亚砷可抑制一半以上酶活性。L-半胱氨酸、叠氮化钠及低浓度的 EDTA 对重组酶活性影响较小, 较高浓度的 EDTA 才显示较强抑制作用; 表面活性剂 SDS 有强烈的抑制作用, 极低的浓度也能完全抑制重组酶活性。抗氧化剂二硫苏糖醇(DTT)对重组脱色酶的作用十分独特, 它可替代 NADH 辅助脱色反应并增加脱色速率, 但在反应终点脱色总效率约为 NADH 作为辅酶时的 92%。DTT 辅助 TpmD 脱色孔雀石绿过程中的耗氧情况及脱色产物与 NADH 作为辅酶时明显不相同。【结论】发现不同有机溶剂和常见抑制剂对重组酶活性的影响存在较大差异, 首次证实 DTT 能辅助 TpmD 脱色反应, 这一脱色反应过程的作用机理与 NADH 为辅酶催化的反应原理完全不同。

关键词: 三苯基甲烷类染料; 脱色酶 TpmD; 有机溶剂; 抑制剂; 二硫苏糖醇

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)09-1190-06

三苯基甲烷类染料被广泛地应用于纺织印染、食品、医药、造纸、化妆品、制革等工业及生物组织染色和水产养殖业中^[1]。由于其具有毒害和致突变作用, 对人类健康具有潜在危害^[2], 因此三苯基甲烷类染料的脱色降解已引起人们的广泛关注。生物方法因其成本低、无二次污染而成为染料脱色降解的研

究重点。迄今为止已发现多种细菌、真菌和放线菌^[1,3-8]等对三苯基甲烷类染料有一定程度的脱色能力, 并已从真菌和细菌中分离纯化出木质素酶系^[9], 还原酶 TMR^[10]等多种可降解三苯基甲烷类染料的脱色酶。

三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD 是由任随周

基金项目: 国家自然科学基金(30800031); 国家“863”计划(2006AA06Z322); 广东省科技计划项目(2007A020903001); 广东省自然科学基金项目(9351007002000001, 9251007002000003); 广东省科学院人才基金项目(200601)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87684471; E-mail: rensz@163.com

作者简介: 张培培(1983-), 女, 山东省烟台市人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: daisy19831024@163.com

收稿日期: 2009-03-09; 修回日期: 2009-04-24

等^[11-12]从嗜水气单胞菌 DN322 中分离纯化出的一种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高效脱色的 NADH/NADPH 依赖型氧化酶。由于该酶对三苯基甲烷类染料具有高效脱色能力,可应用于染料污染环境的生物修复,但在印染工业中往往要添加染料助剂,有些染料助剂会抑制酶的脱色活性^[13]。研究有机溶剂对 TpmD 酶活性的影响可为进一步研究该酶对三苯基甲烷类染料的脱色机理提供依据。本文在前期克隆 TpmD 酶基因、并利用毕赤氏酵母成功异源表达 tpmD 基因的基础上,重点研究了有机溶剂和常见抑制剂对纯化的重组脱色酶 TpmD 活性的抑制情况。首次发现作为抗氧化剂的二硫苏糖醇(DTT)在 TpmD 对孔雀绿脱色过程中以一种全新的作用方式取代辅酶 NADH,脱色过程溶氧监测及脱色产物的光谱扫描结果均显示出与 NADH 作为辅酶时的催化行为不同。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:重组毕赤酵母菌株(含三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD 基因)由本实验室构建,保存于广东省微生物研究所菌种保藏重点实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器:试剂及耗材有:孔雀石绿购自广州市威佳生物科技有限公司, Puribest-NTA (1 ml) 纯化柱为上海纯泰公司产品, Amicon Ultra-15 超滤离心管(截留 10 kDa)为 Millipore 公司产品,其它试剂均为分析纯。主要仪器有:UltraSPec 紫外可见分光光度计(GE-034-TY9802) 购自美国 GE 公司;溶氧仪 Oxi330i 购自德国 WTW 公司。

1.1.3 培养基:YPD、BMGY 和 BMMY 培养基同参考文献 [14]。

1.2 TpmD 酶活力测定

以孔雀石绿为底物测定 617 nm 下吸光值的降低。100 μ L 反应体系含 10 倍稀释后的 TpmD 酶溶液 90 μ L, 25 mmol/L NADH 5 μ L, 5 mmol/L 孔雀石绿 5 μ L。以 1 min 内催化脱色 1 μ mol 孔雀石绿所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.3 粗酶液的制备

将保存于斜面上的重组毕赤酵母菌落接种于含 5 mL YPD 培养基的试管中, 30 $^{\circ}$ C 180 r/min 过夜培养活化, 将菌液以 1% 接种量接种于含 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C 180 r/min 培养。当 OD_{600} 达到 2.0 ~ 6.0 时, 1500 \times g 离心 5 min 收集菌体接入含 100 mL BMMY 培养基中, 使其 OD_{600} 为 1.0

左右, 30 $^{\circ}$ C 180 r/min 培养, 每隔 12 h 补加甲醇, 使其终浓度为 0.5% (V/V), 诱导 72 h 后将发酵液 1500 \times g 离心 5 min 收集上清液, 即为粗酶液。

1.4 TpmD 的纯化

将粗酶液用 Amicon Ultra-15 超滤离心管(截留 10 kDa)超滤浓缩, 然后将浓缩液调至 pH8.0 后加样到平衡好的 Puribest-NTA (1 mL) 纯化柱上, 用 20 mmol/L 及 250 mmol/L 咪唑缓冲液先后洗脱, 收集两次洗脱所得的液体再进行超滤浓缩。

1.5 孔雀石绿染料脱色

100 μ L 反应体系中含纯化后的 10 倍稀释的 TpmD 酶液 90 μ L (0.8 U/ml), 孔雀石绿 5 μ L (终浓度 250 μ mol/L), 25 mmol/L NADH 5 μ L。反应在常温下进行, 在 UltraSPec 紫外可见分光光度计中每隔 10 s 测定 617 nm 处吸光值的变化, 所得吸光值为 A; 在相同反应体系中以无菌水代替酶液所得的吸光值为 A_0 , 脱色率为 $(A_0 - A) / A_0 \times 100\%$ 。

1.6 有机溶剂对 TpmD 酶活性影响

在各个 100 μ L 脱色反应体系中含有纯化后稀释 10 倍的 TpmD 酶液 65 μ L, 25 mmol/L NADH 5 μ L, 分别加入 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L 不同有机溶剂, 不足 100 μ L 者加无菌水补足, 对照中仅加入 30 μ L ddH₂O 代替酶液, 然后按照上述方法测定各处理的酶的脱色活力变化。

1.7 抑制剂对 TpmD 酶活性影响

在各个 100 μ L 脱色反应体系中含有纯化后稀释 10 倍的 TpmD 酶液 65 μ L, 25 mmol/L NADH 5 μ L, 分别加入不同浓度的不同抑制剂, 再加 ddH₂O 补足 100 μ L, 然后按照上述方法测定酶活力变化。

1.8 不同浓度 DTT 作为辅酶对孔雀石绿的脱色

在 100 μ L 反应体系中, 加入 75 μ L 稀释 100 倍的酶液(0.08 U/mL), 5 mmol/L 孔雀石绿 5 μ L, 加入不同量的 100 mmol/L DTT 母液使其终浓度分别为 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L, 2.5 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L, 分别加入 ddH₂O 补足 100 μ L 后, 在 UltraSPec 紫外可见分光光度计中测定 617 nm 处吸光度的变化。脱色率按照 1.6 方法计算。

1.9 溶氧浓度测定

在 50 mL 脱色体系中, 包含重组 TpmD 纯酶 (8 U/mL) 500 μ L, DTT 或 NADH 的终浓度均为 1.25 mmol/L, 5 mmol/L 孔雀石绿染料 2.5 mL, 其余用 ddH₂O 补足。在反应过程中用溶氧仪 Oxi330i 测

定反应溶液中溶解氧的浓度(mg/L)。

1.10 全波长扫描

将需要扫描的溶液稀释至适当浓度之后,置于 UltraSPec 紫外可见分光光度计中,设置扫描波长范围(230 nm ~ 700 nm)进行自动扫描。

2 结果

2.1 重组酶 TpmD 的分离纯化

重组毕赤酵母经甲醇诱导培养 72 h 后的粗酶液(100 mL)首先经 Amicon Ultra-15 超滤离心管(截留 10 kDa)超滤,再通过 Puribest-NTA(1 mL)Ni+ 纯化柱纯化,得到纯 TpmD 酶溶液,经电泳后软件分析可知其纯度已达 99.9%。酵母表达载体构建和酶的分离纯化过程及结果将另文报道。

2.2 纯化的 TpmD 酶对孔雀石绿的脱色

纯化后的 TpmD 酶在 NADH 作为辅酶时可对三苯基甲烷类染料孔雀石绿高效脱色,如图 1 所示,酶液稀释 10 倍后(0.8 U/mL)在 10 s 内脱色率即达到 98.8%,在 1min 内最高脱色率可达 99.4%,已基本将孔雀石绿完全脱色。

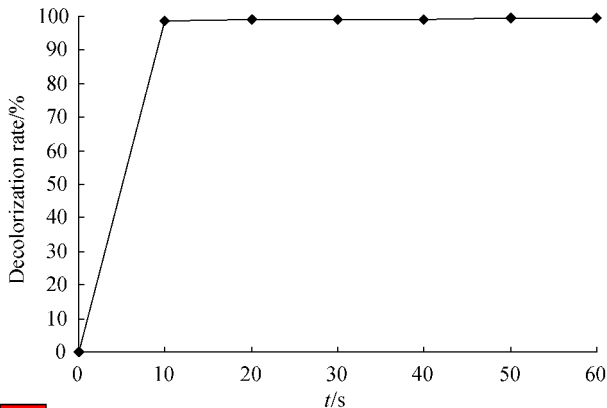


图 1 纯化 TpmD 酶对孔雀石绿的脱色

Fig. 1 Decolorization of Malachite Green by the purified TpmD.

2.3 有机溶剂对 TpmD 酶活性的影响

有机溶剂对脱色酶 TpmD 的活性影响如表 1 所示,不同有机溶剂对 TpmD 酶活性均有不同程度的抑制作用,其中甲醇的抑制作用较弱,重组酶在甲醇中能维持约 90% 的活性,乙醇和丙酮则使重组酶活性则迅速损失。10% 的二甲基亚砷对酶活的抑制程度较小,当浓度增加至 30% 时,酶活性只剩余 40% 左右,但相对丙酮和乙醇的抑制程度稍小。

2.4 常见抑制剂对 TpmD 酶活性的影响

几种常见的酶抑制剂对重组酶的活性影响如表 2 所示。L-半胱氨酸、叠氮化钠及低浓度的 EDTA 对

重组酶活性影响较小,较高浓度的 EDTA 则显示较强抑制作用,SDS 显示出强烈的抑制作用,极低的浓度也能完全抑制重组酶的活性。二硫苏糖醇(DTT)对重组酶的活性略有抑制,且高浓度的 DTT 对酶活性的抑制程度反而减小。

表 1 有机溶剂对 TpmD 酶活性影响

Table 1 Effects of organic solvents on TpmD enzyme activity

Organic solutions	Concentration/%	Remain activity/%
Control	—	100
Methanol	10	99.59 ± 0.2
	20	92.97 ± 0.8
	30	88.55 ± 1.5
Acetone	10	70.26 ± 1.3
	20	37.38 ± 1.5
	30	0.85 ± 0.035
Dimethylsulfoxide	10	94.62 ± 2.0
	20	71.24 ± 1.8
	30	40.17 ± 2.1
Ethanol	10	77.31 ± 1.4
	20	48.74 ± 2.0
	30	3.32 ± 0.2

表 2 抑制剂对 TpmD 酶活性影响

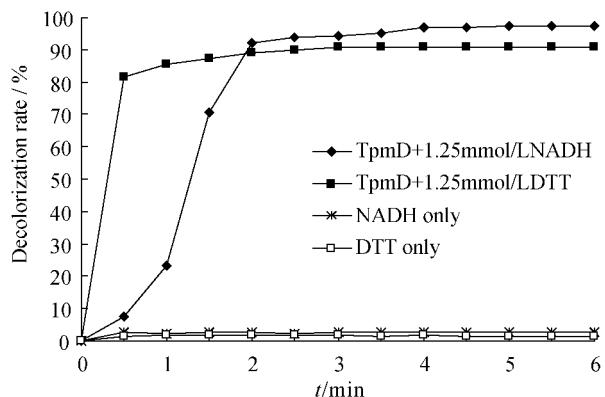
Table 2 Effects of inhibitor on TpmD enzyme activity

Inhibitor	Concentration/(mmol/L)	Remain activity/%
Control	—	100
EDTA	10	95.15 ± 2.0
	25	54.84 ± 2.8
L-Cysteine	0.1	97.64 ± 1.1
	1	95.35 ± 1.8
NaN ₃	0.1	97.50 ± 0.7
	1	92.38 ± 2.7
SDS	3.5	0
	35	0
DTT	0.1	90.14 ± 1.7
	1	92.30 ± 1.5

2.5 DTT 辅助 TpmD 脱色的研究

2.5.1 DTT 与 NADH 辅助 TpmD 脱色的比较 进一步研究发现,DTT 对重组酶的影响十分特殊。在将酶液稀释 100 倍(0.08 U/mL)的脱色体系中不加辅酶 NADH,仅仅加入 1.25 mmol/L 的 DTT,使其终浓度与 NADH 作辅酶时相同,TpmD 酶仍可以对孔雀石绿进行高效的脱色,且脱色速率比仅加 NADH 的反应体系更快,只是最终的脱色总量略低,约为 NADH 作辅酶时的 90% 左右。反应体系中不加重重组酶 TpmD,只加 NADH 或 DTT 孔雀石绿都不会被脱色,表明 DTT 在很大程度上能代替 NADH 推动 TpmD 对孔雀石绿的脱色,该过程不是 DTT 与染料间的简单化学反应,在此

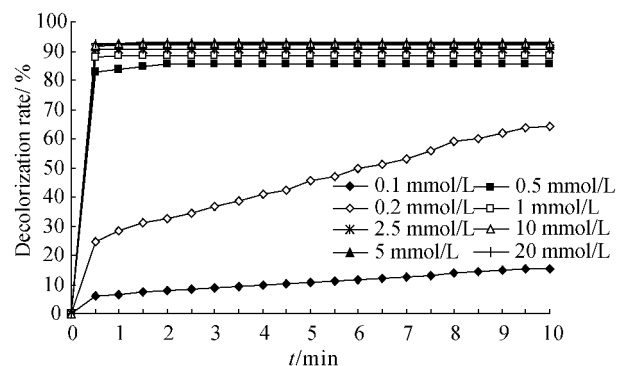
过程脱色酶 TpmD 和 DTT 缺一不可(图 2)。



2 DTT 与 NADH 对孔雀石绿脱色的影响

Fig.2 Effects of DTT and NADH on malachite green decolorization.

2.5.2 DTT 浓度对 TpmD 酶脱色活性的影响:进一步研究了不同浓度 DTT 作为辅酶时 TpmD (0.08 U/mL)对孔雀石绿的脱色情况(图 3),结果表明随着 DTT 浓度的增加,TpmD 酶对孔雀石绿的脱色率也随之增大。在 DTT 浓度为 0.5 mmol/L 时,最大脱色率已达到 85% 左右;当 DTT 浓度高于 2.5 mmol/L 时,250 μ mol/L 的孔雀石绿在 30 s 之内脱色率就可达 90% 以上。

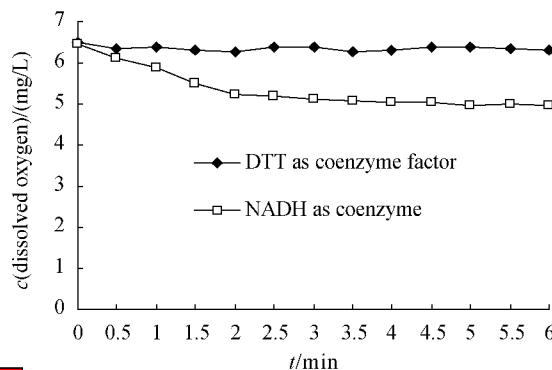


3 不同浓度的 DTT 对孔雀石绿脱色的影响

Fig.3 Effects of different concentration of DTT on malachite green decolorization.

2.5.3 孔雀石绿脱色过程中溶氧浓度的测定:前期研究表明,脱色酶 TpmD 利用 NADH 作为辅酶对三苯基甲烷染料进行脱色时,反应体系中的溶氧浓度会迅速降低^[11]。为了进一步探讨 DTT 和 NADH 分别作为辅酶脱色孔雀石绿过程中溶氧浓度的变化趋向是否一样,利用溶氧仪对整个脱色过程中氧的浓度进行了监测,在 5 min 内二者都脱色完全。结果发现,在 DTT 作为辅酶的脱色反应过程中,溶氧浓度一直维持在 6.28 ~ 6.49 mg/L 的范围内,而以 NADH 作为辅酶时溶氧浓度从 6.45 mg/L 降至

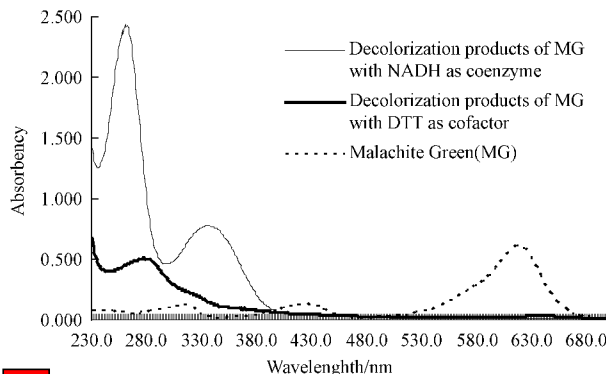
4.98 mg/L(如图 4),说明 DTT 作为辅酶的脱色过程并没有出现溶氧浓度的降低的现象,这与 NADH 作为辅酶时依赖于氧的脱色过程存在明显不同。



4 孔雀石绿脱色过程中溶氧浓度的变化

Fig.4 The change of dissolved oxygen in malachite green decolorization.

2.5.4 DTT 辅助 TpmD 脱色产物的全波长扫描分析:由于 DTT 可代替辅酶 NADH 使 TpmD 显示高效脱色活性,为探讨二者的辅助催化机理是否相同,分别对以 DTT 和 NADH 作为辅酶时对染料孔雀石绿脱色反应的产物进行了 230 ~ 700 nm 全波长扫描,结果如图 5 所示。以 NADH 作为辅酶的脱色产物在 260 nm 及 340 nm 附近出现吸收峰(图 5);而以 DTT 作为辅酶的脱色产物则在波长处(280 nm 附近)出现吸收峰,可能是脱色反应中形成新的物质,有待于进一步鉴定。而染料孔雀石绿在 617 nm 处的吸收峰在两种脱色产物中均消失,说明两种脱色过程都使孔雀石绿结构发生改变。以 NADH 和 DTT 分别作为辅酶的脱色产物扫描曲线完全不同,结合上述脱色过程中溶解氧的测定结果,说明 DTT 作为辅酶所催化的反应与 NADH 作为辅酶是完全不同的两个降解过程,表观看来二者的脱色机理明显不同,有待进行进一步研究。



5 脱色产物与孔雀石绿的全波长扫描(230 nm ~ 700 nm)

Fig.5 Full wave-scan of decolorization products and malachite green (230 nm ~ 700 nm)

3 讨论

本文在从染色体中整合有脱色酶 TpmD 基因的毕赤酵母基因工程菌发酵液中经亲和层析纯化得到重组脱色酶 TpmD 的基础上,为了进一步研究该酶对三苯基甲烷类染料的脱色机理及在染料污染环境治理中进一步的应用,开展了包括亲水极性有机溶剂的和常见酶抑制剂在内的不同种类物质对重组酶 TpmD 活性的影响研究。

研究结果显示低浓度甲醇对脱色酶 TpmD 酶活性几乎无抑制效应,可以保证甲醇诱导发酵过程中产生的酶活性不受影响。其它几种有机溶剂在浓度较高时会对 TpmD 的酶活性产生较强的抑制作用,这结果与高浓度有机溶剂对其他脱色氧化酶如漆酶的负面影响较为相似^[15],可能同样是由于酶催化过程中需要水分子,而高浓度的亲水极性有机溶剂大大影响了的水分子的活化。

各种常见酶抑制剂对 TpmD 酶活性的影响很不一致。低浓度 EDTA 对酶活几乎无抑制,高浓度 EDTA 则明显抑制酶活,说明该酶的活性中心可能有金属离子存在。EDTA 对木质素过氧化物酶的脱色活性也具有抑制作用,研究表明这种抑制为非竞争性抑制,Zn²⁺ 等许多金属离子可以解除这种抑制^[16]。叠氮化钠和半胱氨酸对酶活性抑制程度较弱 SDS 则完全抑制 TpmD 酶活,这与曾报道的几种抑制剂对漆酶活性的影响几乎完全不同。Ben Younes S 等^[17]的研究表明浓度仅为 0.1 mmol/L 的叠氮化钠和 EDTA 就几乎完全抑制漆酶活性;而即使高达 100 mmol/L 的 SDS 对漆酶活性仍无任何抑制作用。

作为一种抗氧化剂,二硫苏糖醇 DTT 对 TpmD 酶活性的影响较为特殊。本文发现 DTT 可以取代辅酶 NADH 并加快 TpmD 对染料的脱色速率,但通过对溶氧浓度的测定及对脱色产物的全波长光谱扫描的结果说明二者辅助 TpmD 脱色的机理完全不同。与 DTT 同样是抗氧化剂的 Vc 对 TpmD 酶活性的影响则完全不同。浓度超过 7.5 mmol/L 的 Vc 对 TpmD 酶活就具有显著的抑制作用^[12],而 DTT 作为辅助因子时,对染料的脱色率及脱色效率则随着浓度的增大而增大。在浓度高达 20 mmol/L 时,DTT 对 TpmD 酶活性仍具有促进作用而无抑制。就目前所知,国内外尚无报道依赖 NADH 的酶促反应可由 DTT 代替昂贵的 NADH。关于 TpmD 脱色酶可以利用两种不同物质作为辅因子进行脱色反应,且由耗氧行为与产物光谱的差异反映出此两种辅因子协助

的酶促反应机制迥异,很值得进一步探究。

由于三苯基甲烷类脱色酶 TpmD 对染料脱色的催化机理还未彻底阐明,因此通过酵母异源表达得到大量的纯酶及研究有机溶剂和抑制剂对酶活性的影响有利于更深入研究酶的催化反应机理,也为其广泛应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Azmi W, Sani RK, Banerjer UC. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998 22 :185 - 191.
- [2] Au W, Pathak S, Collie CI, et al. Cytogenic toxicity of gentian violet (crystal violet) on mammalian cells in vitro. *Mutation Research*, 1978 58 269 - 276.
- [3] AN SY, Min SK, Cha IH, et al. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp.. *Biotechnology Letters* 2002 24 :1037 - 1040.
- [4] Sharma DK, Saini HS, Singh M, et al. Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology* 2004 44(1) 59 - 65.
- [5] Ren S, Guo J, Zeng G, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006 72 :1316 - 1321.
- [6] Deng D, Guo J, Zeng G, et al. Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008 62 263 - 269.
- [7] Chen CH, Chang CF, Ho CH, et al. Biodegradation of crystal violet by a *Shewanella* sp. NT0U1. *Chemosphere*, 2008, 72 :1712 - 1720.
- [8] Eichlerova I, Homolka L, Nerud F. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology* 2006 97 2153 - 2159.
- [9] Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 2004 94 :169 - 176.
- [10] Jang MS, Lee YM, Kim CH, et al. Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning, and overexpression of a functional protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7955 - 7960.
- [11] 任随周,郭俊,王亚丽,等.细菌脱色酶 TpmD 对三苯基甲烷类染料脱色的酶学特性研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2006 46(3) 385 - 389.

- [12] 任随周,郭俊,王亚丽,等.细菌脱色酶 TpmD 的酶学特性研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2006,46(5):823-826.
- [13] Abadulla E, Silva L. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents [J]. *Textile Research*, 2000, 70(5):409-414.
- [14] Wang J, Yan F, Wang D, et al. Expression and purification of active recombinant human bikunin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 2008, 60:127-131.
- [15] Rodakiewicz-Nowak J, Kasture S, Dudek B, et al. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2000, 11:1-11.
- [16] 鲁时瑛,李华钟,陈坚. EDTA 对木质素过氧化物酶在染料脱色中的影响,无锡轻工业大学学报(*Journal of Wuxi University of Light Industry*) 2002, 22(4):393-396.
- [17] Ben Younes S, Mechichi T, Sayadi S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolorization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology* 2006, 102(4):1033-1042.

Effects of organic solvents and inhibitors on the decolorization activity of TpmD expressed in *Pichia Pastoris*

Peipei Zhang^{1,2,3,4}, Suizhou Ren^{1a,2,3*}, Meiyong Xu^{1a,2,3}, Guoping Sun^{1a,2,3}

(^{1a} Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(^{1b} South China Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(² Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

(³ Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(⁴ Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract [Objective] We studied the effects of different organic solvents and inhibitors on the decolorization of recombinant triphenylmethane dyes decolorization enzyme (TpmD), expressed extracellularly from *Pichia pastoris*. **[Methods]** The recombinant TpmD was purified by ultrafiltration and Ni²⁺ affinity chromatography. The decolorization activity for malachite green was determined by UV-visible spectrophotometer. We studied the effects of some organic solvents and inhibitors on TpmD activity through the rate of decolorization decreased using malachite green as the substance. We also compared the difference between dithiothreitol (DTT) and NADH as the cofactor in assisting the decolorization by monitoring the dissolved oxygen consumption and the end products. **[Results]** The effect of methanol on the enzymatic activity was weak since TpmD still retained its high activity in the reaction environment containing 10% ~ 20% methanols. The ethanol and acetone made the enzymatic activity fade away quickly. Dimethylsulfoxide in low concentration was propitious to keep the TpmD activity, although 30% dimethylsulfoxide inhibited the enzymatic activity lost in a half. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) of low concentration, L-cysteine and NaN₃ all exhibited only weakly inhibitory effects; higher concentrated (25 mmol/L) EDTA could strongly inhibit enzymatic activity and sodium dodecylsulfonate (SDS) inhibited the activity completely. The effect of DTT on TpmD activity was beyond the expectation. It could substitute of coenzyme NADH to assist and accelerate the enzyme in decolorizing reaction. We found that the dissolved oxygen consumption behaviors and reaction end products measuring by UV-Visible full wave-scan were completely different between the reactions assisted with DTT or NADH. This is the first report about DTT which can act as a cofactor for a decolorization enzyme. **[Conclusion]** The effects of different organic solvents and inhibitors on the enzymatic activity of TpmD are very different. By the dissolved oxygen assay and the end products analysis, we concluded that the decolorizing reaction assisted with DTT was a novel reaction process. The mechanism of reaction with DTT as cofactor is completely different from that with NADH as coenzyme.

Keywords: triphenylmethane dyes; triphenylmethane dyes decolorization enzyme (TpmD); organic solvents; inhibitors; dithiothreitol (DTT)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800031), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA06Z322), the Provincial Natural Science Foundation of Guangdong (2007A020903001), the Guangdong Provincial Natural Science Foundation (9351007002000001, 9251007002000003) and the Science Foundation of Guangdong Academy of Sciences Provincial for Fostering Talents (200601)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-20-87684471; E-mail: rsz@163.com

Received 9 March 2009/ Revised 24 April 2009