

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0077-05

有机磷农药 (乐果) 的酶促降解研究^{*}

刘玉焕, 钟英长

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘 要: 从高效降解真菌 Z_{58} 培养物中通过硫酸铵分级沉淀和 Sephadex G-100 分子筛层析提取和纯化降解酶, 研究了该降解酶对乐果的降解特性, Z_{58} 菌株的乐果降解酶为胞内酶, 主要分布于细胞膜组分, 该酶对乐果酶促降解最适 pH 为 7.5, 最适温度为 40 °C, 其米氏常数 K_m 为 0.59%.

关键词: 乐果; 真菌; 酶促降解; 米氏常数

中图分类号: X 592 **文献标识码:** A

随着现代农业的发展和有机氯农药的完全停止生产和使用, 有机磷农药在杀虫剂中起到更加重要的作用. 但是长期大规模的生产和使用这种人工合成的生物外源性物质—有机磷农药, 对环境已经造成了相当程度的污染^[1]. 然而, 由于环境本身的复杂性和环境微生物的多样性, 人们通过研究已经表明微生物对有机磷农药降解起到重要作用^[2,3]. 但是采用微生物的酶来降解有机磷农药比微生物本身更能忍受环境条件变化, 水解的速度和效果比化学方法要快和好, 并且不存在二次污染^[4,5]. 以前人们对有机磷农药降解酶的研究主要集中在对细菌的研究, 对真菌降解酶的研究未见报道^[6]. 本文旨在研究本实验室通过富集和诱变处理筛选出一株高效降解有机磷农药的曲霉 Z_{58} 菌株的降解酶性能.

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

菌种 Z_{58} 来源于本实验室从农药废水流经地分离所得.

查氏 (Czapek) 培养基.

乐果选择培养基: 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 1 000 mL, pH 6.8. 121 °C 灭菌 15 min. 需要时加入 $\rho=2\%$ 的琼脂配成固体培养基, 乐果待培养基灭菌完毕冷却后加入.

1.2 菌株 Z_{58} 的培养

将菌株 Z_{58} 接种于乐果选择培养基中于 30 °C、150 r/min 条件下培养 5 d.

1.3 降解酶的抽提和酶活性的测定

将培养好的菌株以 6 000 r/min 进行离心, 去除上清培养基, 得菌丝球. 将菌体用 20

^{*} 收稿日期: 1998-09-10 作者简介: 刘玉焕, 男, 1965 年生, 讲师.

倍菌体体积的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次, 然后再以 6 000 r/min 离心收集菌体, 把菌体中的水份挤干后放冰箱中冷冻, 加少量缓冲液用微型电动搅拌机破碎菌体后以 12 000 r/min 离心, 分别收集细胞碎片和上清液, 在规定条件下与乐果反应, 测定乐果降解酶活性.

1.4 酶的初步纯化分离

(1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀. 将上述粗酶液用已磨细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行盐析处理, 加至饱和度到 80%, 4 °C 过夜, 离心收集沉淀, 用 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 溶解沉淀后进行下一步操作.

(2) 凝胶过滤. 通过反复实验, 采用 Sephadex G-100 进行层析分离, 控制流速为 18 mL/h, 每管 4.5 mL, 收集活性峰在 17~20 管, 然后通过聚乙二醇 20 000 浓缩收集液, 这样得到较纯的酶进行下面的实验.

1.5 有机磷农药的酶解反应

取 0.1 mL $\varphi=2\%$ 乐果溶液、0.8 mL 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液和 0.1 mL 粗酶液于比色管中, 30 °C 条件下反应 10 min 后用 0.5 mL 的 0.5 mol/L 三氯醋酸终止反应, 在 770 nm 波长处测定其吸光度 (A_{770}). 酶活力单位定义: 每 1 min 增加 1 μmol 无机磷所需的酶量为 1 个酶活单位 (U).

1.6 温度对酶活的影响

取 0.1 mL $\varphi=2\%$ 乐果溶液和 0.8 mL 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液于比色管中, 置于 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 和 70 °C 等不同温度的水浴中预热 30 min, 然后加入 0.1 mL 酶液反应 10 min, 同时以加入 0.1 mL 已灭活的酶液作为空白对照. 按上述的酶活测定法得到相同的酶液在不同的反应温度下所具有的酶活力单位. 以最高酶活力为 100%, 其他条件下的酶活力与之相比得各自的相对酶活力.

1.7 pH 对酶活的影响

首先配制如下 0.05 mol/L 不同 pH 缓冲液: Na_2HPO_4 -柠檬酸 (pH 2.2~8.0); Tris-HCl (pH 7.5~8.9); 甘氨酸-NaOH (pH 8.6~10.6), 并分别用 pH 计进行校正, 以保证溶液的 pH 值. 在比色管中加入 0.1 mL $\varphi=2\%$ 乐果溶液和 0.8 mL 0.05 mol/L 上述不同的缓冲液 30 °C 预热 5 min 后加入 0.1 mL 酶液, 混和后在 30 °C 反应 10 min (以加入灭活的酶作空白对照), 立即用三氯醋酸终止反应, 分别各自测定酶活力, 以最高酶活力为 100%, 其他条件下的酶活力与之相比得相对酶活力.

1.8 无机磷和蛋白质含量

无机磷的测定见文献 [7].

蛋白质含量的测定. 柱层析时, 洗脱液的蛋白含量以其在 280 nm 的 A_{280} 衡量. 样品中的实际含量按 Bradford^[8] 法进行测定, 以牛血清白蛋白为标准, 在 595 nm 进行比色测量.

2 结 果

2.1 乐果降解酶的形成

将菌株 Z₅₈ 分别接种乐果选择培养基和查氏培养基中于 30 °C 时培养 5 d, 即在诱导和非诱导条件下生长, 之后离心收集菌体与有机磷农药乐果反应, 并测定其 A_{770} , 结果表明, 菌体经用乐果诱导或未经诱导, 乐果中的有机磷转化为无机磷的效果明显差异, 未经

诱导的菌体对乐果的降解效果很差，然后将菌体连续在查氏培养基中转接 10 次后测定菌体的乐果降解活性，此时菌体的酶活完全消失。由此可见，菌株 Z₅₈ 的乐果降解酶不是组成酶，而是诱导酶，因组成酶通常被认为是胞内的固有酶类，其活性形成受外界条件影响较少^[9]。

2.2 乐果降解酶的定位

乐果降解酶活性组分的定位是通过处理完整细胞、破碎细胞、培养液的上清液，分别测定 A₇₇₀ 后予以确定的。由表 1 可见，菌株 Z₅₈ 的完整细胞因未受到外界处理，胞内具有完整的降解酶系统，故降解酶活性最高。培养液的上清液无降解酶活检出，表明该菌降解酶不是胞外酶。进一步将菌体用电动搅拌机破碎菌体放置一段时间后，离心所得菌体碎片和上清液分别测定 A₇₇₀，此时两者都有酶活。进一步用 Triton X-100 处理破碎菌体一段时间，离心所得菌体碎片和上清液测定 A₇₇₀，上清液中酶活明显增加，菌体碎片中酶活显著减少，表明经 Triton X-100 处理，存在于细胞膜上的酶都释放到溶液中。进一步确证该酶为胞内酶。

表 1 乐果降解酶活性的胞内分布
Tab 1 Distribution of dimethoate-degrading enzyme in the strain Z₅₈

组分	A ₇₇₀	组分	A ₇₇₀
菌液离心后上清液	0	细胞碎片后上清液	0.31
完整细胞	0.789	Triton 处理后细胞碎片	0.1
细胞碎片	0.38	Triton 处理后的无细胞上清液	0.72

2.3 酶的分离纯化

将培养好的菌体经离心、洗涤、冷冻后，用电动搅拌机磨碎，加适量的 Triton X-100 处理 1 h 后，离心得上清液，加 (NH₄)₂SO₄ 沉淀蛋白，将沉淀蛋白用适量的缓冲液溶解后，用 Sephadex G-100 凝胶过滤，收集有活性的蛋白分离液（17~20）管，见图 1。

2.4 pH 对乐果酶促降解的影响

在 pH = 5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0, 7.6 的二甲基戊二酸-NaOH 缓冲液和 pH = 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 Tris-HCl 缓冲液中乐果降解酶的活性见图 2 所示，该酶的最适 pH 为 7.5，在 pH 6.6~9.0 之间都有较高的活性，说明该酶对 pH 的耐受能力较强。

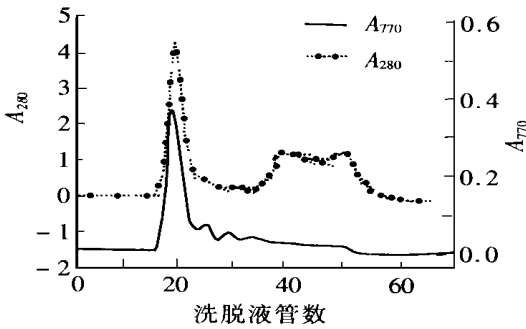


图 1 降解酶在 Sephadex G-100 凝胶柱上的洗脱曲线

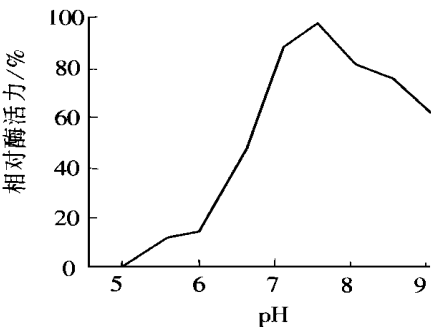


图 2 pH 对乐果酶促降解的影响

Fig 1 Gel filtration of degradative enzyme on Sephadex G-100

Fig 2 Effect of pH on enzymative degradation of Dimethoate

2.5 温度对乐果酶促降解的影响

在 pH 7.5 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液中测定不同温度条件下对乐果酶促降解的影响（图 3），图 3 表明，酶的最适温度是 40 ℃，并且该酶在 30 ~ 50 ℃之间都能保持较高的酶活，说明该酶对温度的敏感性不强。

2.6 酶的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max}

在 10 mL 比色管中，加入不同量的 $\varphi=2\%$ 的乐果溶液和不同体积的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.2），体积最终达 0.9 mL，最终底物浓度分别为 0.05%，0.1%，0.2%，0.25%，0.4%，0.5%，在 30 ℃水浴中预热 10 min，然后加入酶液 0.1 mL，使最终的体积达 1 mL，反应 10 min；另加 0.1 mL 蒸馏水于不同底物浓度的溶液中作为各自的对照，同时进行反应后测定 A_{770} ，然后换算成生成物 PO_4^{3-} 的含量，以每分钟生成的 PO_4^{3-} 微摩尔数来表示，这样根据底物乐果的浓度和测得的反应速率作 Lineweaver-Burk 曲线（图 4），求得该降解乐果酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 0.59% 和 15 U/mL。

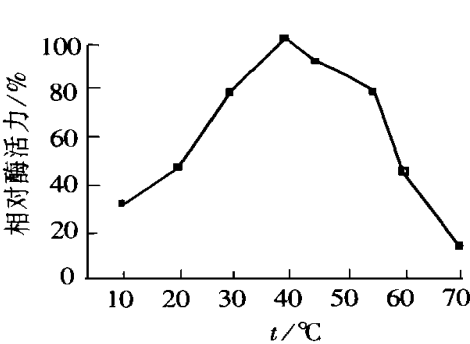


图 3 温度对乐果酶促降解的影响
Fig. 3 Effect of temperature on enzymative degradation of dimethoate

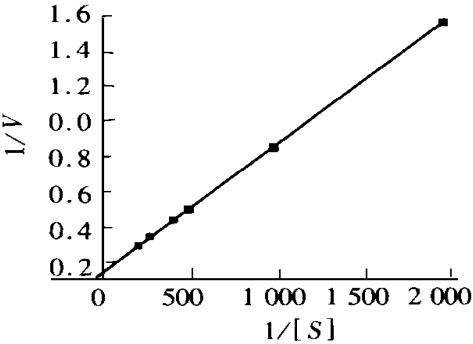


图 4 乐果降解酶的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver Burk plots of dimethoate degrading enzyme

3 讨 论

有关有机磷农药乐果的降解目前仅有一篇分离降解乐果高效细菌的研究工作^[19]，乐果作为有机磷农药的典型代表，属二硫代磷酸酯，是有机磷中较难降解的农药之一。而对有机磷农药的酶解研究现在仅局限于从细菌中提取，这方面国内外已有大量的报道，无须过多重复。但是从真菌中提取酶来降解有机磷农药未见报道，真菌作为微生物的一个庞大分支体系，有着极其丰富的酶资源，并且在某些方面表现出比细菌更强大的生命力。本文主要研究了高效真菌 Z₅₈ 的降解酶形成及定位，属诱导酶，主要存在于细胞膜上。初步研究酶的分离条件以及酶促反应的最适温度为 40 ℃和最适 pH 7.5。通过与化学水解（0.1 mol/L NaOH，30 ℃）比较，用蛋白含量为 0.35 ng/mL 的酶液于相同条件下与乐果反应，其水解速度比化学法快 1 327 倍。显示该酶具有较高的活力。

参考文献:

- [1] 汪建沃, 潘柳青, 文益民. 农药与生态 [M] . 长沙: 中南工业大学出版社, 1992. 13 ~ 46.
- [2] MUNNECKE D M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides a possible pesticide disposal method [J] . Appl Environ Microbiol, 1976 32: 7 ~ 13.
- [3] LAL R. Insecticide microbiology [M] . Springer Berling, 1984. 147 ~ 168.
- [4] MUNNECKE D M. Enzymatic detoxification of waste organophosphate insecticides [J] . J Agric Food Chem, 1980 28: 105 ~ 111.
- [5] MUNNECKE D M. Hydrolysis of organophosphate insecticides by an immobilized enzyme system [J] . Biotechnol Biochem, 1982, 14: 257 ~ 263.
- [6] 冯化成译. 土壤细菌和农药分解. 农药译丛, 1994, 16 (4): 47 ~ 50.
- [7] 美国公共卫生协会等. 水与废水标准检验法 (第 15 版) [M] . 宋仁元译. 北京: 中国建筑工业出版社, 1983.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J] . Anal Biochem, 1976 72: 248 ~ 254.
- [9] 沈同. 生物化学 (上册) [M] . 北京: 人民教育出版社, 1980. 306 ~ 307.
- [10] 张本兰, 周毅. 一株降解乐果的高效菌株的分离和鉴定 [J] , 中国环境科学, 1990 (5): 69 ~ 73.

Study of Dimethoate-Degrading Enzyme

LIU Yu-huan^{*}, ZHONG Ying-chang

Abstract: Degradative enzyme of Dimethoate was extracted and purified by ammonium sulfate fraction, Sephadex G-100 from fungus Z58. Properties of the dimethoate-degrading enzyme were studied, the enzyme was an intracellular one, mainly located in the cell membrane, the optimum pH was 7.5, the optimum temperature was 40 °C. Michaelis-Menten's constant of the enzyme for degrading dimethoate was 0.59%.

Keywords: fungus; enzymatic degradation; dimethoate; Michaelis-Menten's constant

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China