

# R - 工程菌表达产物酯酶 B1 的固定化及其降解特性

薛庆节<sup>1</sup>, 闫艳春<sup>1</sup>, 张 杰<sup>2</sup>

(1. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018; 2. 泰安市公安局 DNA 鉴定室, 山东 泰安 271000)

**摘要:** 将抗性库蚊的解毒酶基因克隆到大肠杆菌中, 得到 R - 工程菌, 该工程菌的表达产物酯酶 B1 能高效降解有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、菊酯等 4 大类农药。本研究将重组质粒 pRL - B1 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 以 5% 的接种量转接到 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 13 h。超声波破碎工程菌, 20% ~ 80% 的硫酸铵沉淀粗提后, 采用海藻酸钙将 R - 工程菌表达产物酯酶 B1 进行固定化, 并测定了固定化酶对其特异性底物  $\alpha$  - 乙酸萘酯的降解特性。结果表明, 酶的最佳固定化浓度为 0.15 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 最佳固定化时间为 12 h, 固定化酶最佳反应 pH 为 7.0 ~ 7.5, 最适温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ , 固定化酶显示出很高的热稳定性和重复使用稳定性, 在常温下其半衰期为 12 d, 利用双倒数法确定固定化酶的  $K_m$  为 1.8  $\times$  10<sup>-3</sup> mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,  $V_{max}$  为 1.45  $\times$  10<sup>4</sup> U  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, 固定化酶的  $K_m$  是液态酶 (1.35  $\times$  10<sup>-3</sup> mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的 1.33 倍,  $V_{max}$  只有液态酶 (2.7  $\times$  10<sup>4</sup> U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 的近 1/2。利用气相色谱测得其对有机磷农药对硫磷 (1605) 的降解率在 30 min 内达 53.8%。

**关键词:** 酯酶 B1; 固定化酶; 降解

**中图分类号:** X17      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672 - 2043(2005)02 - 0299 - 05

## Immobilization and Degradative Characteristics of Esterase B1 in Engineered Bacteria

XUE Qing-jie<sup>1</sup>, YAN Yan-chun<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Shangdong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. DNA Authentic Laboratory of Taian Municipal Police Department, Taian 271000, China)

**Abstract:** Recombinant plasmid pRL - B1 was constructed from detoxifying gene B1 of pesticide resistant *Culex pipiens quinquefasciatus* and from plasmid pRL - 439 containing strong promoter PpsbA. We have found that the R - engineered bacteria can degrade organo - phosphorous, organo - chlorine insecticides and several other pesticides. The engineered strain *E. Coli* DH5 $\alpha$ /pRL - B1 was cultured in LB medium at 37  $^{\circ}\text{C}$ , 180 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 16 h with 5% inoculation. The bacterial pellet was sonificated and centrifuged at 10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> for 20 minutes at 4  $^{\circ}\text{C}$  in buffer A. The soluble protein was purified with 20% ~ 80% ammonium sulphate for precipitation. The optimum factors of immobilized enzymatic reaction and the degradation of parathion by immobilized esterase B1 were studied for the immobilizing conditions of esterase B1. The results indicated that the optimum immobilizing conditions for esterase B1 were 0.15 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> and 12 h with Ca - alginate under conditions of 30 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> alginate. Degradative nature of the immobilized enzyme was determined with special substrate. It has been found that the optimal conditions for degradation of  $\alpha$  - NA were pH7.0 ~ 7.5, opt at 40 $^{\circ}\text{C}$  and half life of 12 days. Thermal stability of immobilization for esterase B1 was higher than soluble esterase B1, and the immobilized esterase B1 can be reused several times with high degradative ability.  $K_m$  and  $V_{max}$  were obtained by Lineweaver - Burk plots of the immobilized and soluble esterase for degradation of  $\alpha$  - NA. The  $K_m$  and  $V_{max}$  for the immobilized esterase B1 were 1.8  $\times$  10<sup>-3</sup> mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> and 1.45  $\times$  10<sup>4</sup> U  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, respectively, while  $K_m$  and  $V_{max}$  of the soluble esterase B1 were 1.35  $\times$  10<sup>-3</sup> mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> and 2.7  $\times$  10<sup>4</sup> U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, respectively. Degradation of parathion by immobilized esterase B1 was found to be 53.8% in just 30 minutes.

**Keywords:** esterase B1; immobilized enzyme; degradation

收稿日期: 2004 - 07 - 04

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y98D16064)

作者简介: 薛庆节 (1973 - ), 男, 山东农业大学在读硕士研究生, 主要从事环境分子微生物学研究。

联系人: 闫艳春, E - mail: yanyan@sdau.edu.cn

昆虫解毒酶是昆虫在农药的长期选择压力下产生的可代谢农药的一类酶,该酶在消除农药的环境污染方面有良好的应用前景。抗性尖音库蚊五带亚种(*Culex pipiens quinquefasciatus*)的酯酶 B1 基因至少扩增 250 倍,抗性倍数达 500 倍<sup>[1]</sup>,利用该酯酶基因的表达产物酯酶 B1 可将农药降解而使其失去毒杀作用,将该基因克隆到质粒 pRL-439,然后转入大肠杆菌,可高效表达酯酶基因。该工程菌表达的酯酶具有高效降解酯酶的特异性底物  $\alpha$ -乙酸萘酯能力,经对重组菌固定化后降解三氯杀虫酯、溴氰菊酯、毒死蜱,降解率在 1 h 内分别为 56.2%、51.2% 和 43.3%<sup>[2]</sup>。本文报道了 R-工程菌表达产物酯酶 B1 的固定化方法,并对其降解  $\alpha$ -乙酸萘酯及有机磷农药对硫磷(1605)特性进行了研究,旨在为研究生物反应器用于净化被农药污染的水,为经济安全快速地治理环境提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细菌与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为转化受体菌;质粒 pRL-B1, Amp<sup>r</sup> 标记,为本实验室构建。

### 1.2 培养基

LB 液体培养基 (pH7.0, 含 150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Amp<sup>+</sup>),按文献[3]配制。

### 1.3 主要试剂

99% 对硫磷标准品,购于成都化学试剂厂。

DBLS 溶液:1% 固蓝 B 溶液加入 5% SDS 溶液 (1% 固蓝 B/5% SDS = 2/5)混合均匀。

Buffer A: 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸氢钠缓冲液 (pH7.0),含 10 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Triton X-100, 5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\beta$ -巯基乙醇, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 0.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PMSF。

Buffer B: 同 Buffer A,但不含 Triton X-100。

### 1.4 降解酶的提取

以 5% 的接种量将活化好的 R-工程菌转接到 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 13 h。5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min 收集菌体,用 Buffer A 洗涤 2~3 次,将菌体悬浮于同一缓冲液中,比例为 1 g 湿菌体对 2.5 mL 缓冲液,于冰浴中用超声波细胞粉碎机探头处理 7.5 min,离心 (10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) 除去细胞碎片,即得无细胞粗酶液。破碎后的无细胞粗酶液边搅拌边加入碾细的硫酸铵至 20% 饱和度,于 4  $^{\circ}\text{C}$  盐析 2~3 h,离心取上清液,加入硫酸铵至 80% 的饱和度,4  $^{\circ}\text{C}$  盐析过夜,离心收集蛋白沉淀,Buffer B 溶解后用同一缓冲液透析

至无  $\text{SO}_4^{2-}$  检出,得初步提纯的粗酶液。

### 1.5 蛋白质含量的测定

按 Bradford 方法 (Bradford, 1970):以 BSA 作为标准,考马斯亮蓝 G-250 为显色剂,用 752 紫外光栅分光光度计测定溶液在 595 nm 的光吸收值。

### 1.6 降解酶的固定化

参考相关研究成果<sup>[4]</sup>,将海藻酸钠溶液与降解酶均匀混合,使海藻酸钠的质量浓度为 3%,用内径 3 mm 的注射器将混合液注入 2% 的  $\text{CaCl}_2$  (pH7.0) 溶液,滴加时不断搅拌,成球后静置 1 h。用蒸馏水洗涤固定球 2~3 次,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.7 固定化酶的活力测定

向试管中加  $d = 3$  mm 的固定化酶粒 2 g 及 5 mL 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液,然后加入 1 mL  $\alpha$ -乙酸萘酯,振荡反应 20 min,加入 1 mL DBLS,室温静置 15 min,测定  $A_{600}$ ,根据标准曲线计算固定化酶的活力。每一试验重复 4 次,同时设转空载体菌株提取酶固定化后为对照。

酶活力定义:30  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min 水解  $\alpha$ -乙酸萘酯产生 1.0  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -萘酚所需的酶量为 1 个酶活单位数。

固定化酶的活力是指每克固定化酶所具备的酶活力。

### 1.8 固定化酯酶 B1 对有机磷农药对硫磷(1605)的降解

将固定化时间 12 h,浓度为 0.15 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的酶粒小球转入 50 mL 三角瓶中,加入 8 mL 的 Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液,及 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的对硫磷标准溶液 2 mL,置于 25  $^{\circ}\text{C}$  的摇床上振荡反应 30 min,每隔 10 min 取出 1 mL 的处理液置于 5 mL 试管中,1 mL 样品中加入 1 mL 的重蒸正己烷,在混旋器上振荡 3 min,6 500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液留作检测用,取出上清液后的剩余部分再加入 1 mL 重蒸正己烷振荡 3 min 混匀,同样离心 15 min,取上清液与上次取出的合并后作为检测样品;转空载体菌株提取酶固定化后为对照。气相色谱检测器,岛津 GC-14B 气相色谱 (GC) 条件:载气为高纯  $\text{N}_2$ , 210 kPa,载气总压力 300 kPa;色谱柱,OV+OF-1.2 m;氢气 70 kPa;空气 90 kPa;氮磷检测器 (NPD);柱温 220  $^{\circ}\text{C}$ ,气化温 250  $^{\circ}\text{C}$ ,检测温 250  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶活力测定的标准曲线

向各试管中分别加入 5 mL 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的

Tris-HCl(pH7.2) 缓冲液和 1mL 不同浓度的  $\alpha$ -萘酚标准乙醇溶液, 30℃ 振荡反应 20 min, 加入 1 mL DBLS, 室温静置 20 min, 测定  $A_{600}$ 。固定化酶活力测定的标准曲线见图 1。

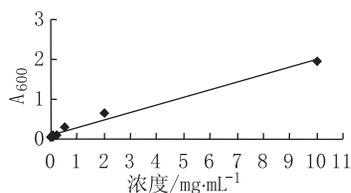


图 1 固定化酶活力测定的标准曲线

Figure 1 Standard curve of immobilized enzyme activity

标准曲线的解析式  $A_{600} = 0.191C + 0.1$ , 测定酶活力时, 根据此解析式可由  $A_{600}$  计算产物的生成量。

## 2.2 酯酶 B1 的固定化

### 2.2.1 固定化时间对乙酸萘酯降解率的影响

分别取 2 g 直径 3 mm 的不同固定化时间的固定化酶粒, 放于 5 mL 内含  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\alpha$ -乙酸萘酯  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl(pH7.2) 缓冲液中, 振荡 20 min, 测定  $A_{600}$ 。结果表明, 在固定化时间为 1~16 h 内, 固定酶对乙酸萘酯的降解率下降缓慢, 当超过 16 h, 乙酸萘酯的降解率下降较快, 见图 2。可能固定化时间较长, 所得的固定化酶的机械强度高, 固定化酶小球内部结构更为致密, 不利于  $\alpha$ -乙酸萘酯的传递, 导致降解率的下降, 如果固定化时间小于 10 h, 则固定酶易出现裂口, 当振荡时易出现破碎现象, 可见固定化时间以 12 h 为佳。

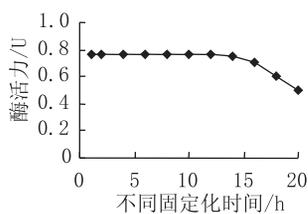


图 2 不同固定化时间对酶降解活性的影响

Figure 2 Effects of immobilization time on degradation activity

### 2.2.2 不同酶量固定化酶对乙酸萘酯的降解作用

取固定化时间为 12 h, 含不同质量浓度酶的固定化酶, 在内含  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\alpha$ -乙酸萘酯的  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液中振荡反应 20 min, 测定  $A_{600}$ 。结果表明, 蛋白质浓度在  $0.05 \sim 0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, 蛋白量增加, 固定化酶的降解活力增加, 见图 3。当蛋白质量浓度超过  $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 增加蛋白量, 固定化酶的降解活力反而下降, 这可能是由于蛋白量的增加, 使降解酶在凝胶颗粒内部以聚集状态存在,

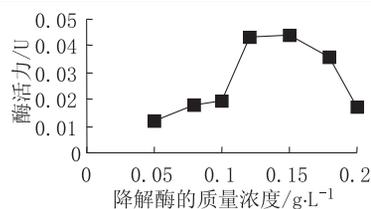


图 3 不同蛋白质量浓度对酶降解活性的影响

Figure 3 Effects of protein mass concentration on degradation of enzyme

从而降低降解酶与底物结合反应的机率, 最终导致相对降解活力的下降。酯酶 B1 降解酶固定化时, 蛋白质质量浓度以  $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  左右为宜。

## 2.3 固定化酶的降解特性

### 2.3.1 固定化酶反应的最佳 pH 值和温度

分别在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0 和 9.0 的缓冲液中测定固定化酯酶 B1 的酶活力。pH 为 4.0、5.0 的缓冲液为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的醋酸盐缓冲液, pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5 的缓冲液为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$  的缓冲液, pH 为 8.0、9.0 的缓冲液为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 缓冲液, 反应温度为 30℃。结果如图 4, 酶反应的最适 pH 为 7.0~7.5。

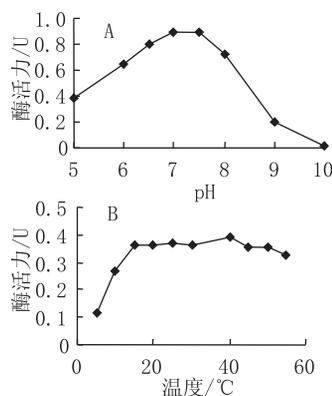


图 4 不同 pH 及不同温度对固定化酯酶活性的影响

Figure 4 Effect of different pH and temperature on the enzyme activity of immobilized esterase B1

在  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH7.2) 缓冲液中, 于不同温度下测定固定化酯酶 B1 降解活力, 如图 5, 最适温度为 40℃。

### 2.3.2 固定化酶的热稳定性

在不加底物的情况下, 将固定化酯酶 B1 分别于不同温度下热处理相同时间, 然后在冰浴中迅速冷却至 4℃, 再于 30℃ 下, 分别测定酶活力, 以未热处理的酶活力作为 100%。研究表明, 固定化酶在 50℃ 是很稳定的, 在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、85℃ 条件下, 水浴保温 10 min, 剩余相对活性分别为 100%、

96%、45%、38.5%、12.8%、8.9%，与溶液酶的热稳定性相比<sup>[5]</sup>，固定化酶的热稳定性增加，说明固定化后酶结构的刚性增加，见图5。

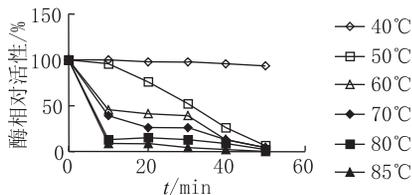


图5 固定化酯酶B1的热稳定性

Figure 5 Thermal stability of immobilized esterase B1

### 2.3.3 重复使用对固定化酶活力的影响

取2g固定化酶，在30℃下振荡反应20min，测定重复使用对固定化酯酶活力的影响，以初次使用下固定化酶的活力为100%。如图6所示，固定化酶重复使用了8次，每次反应后，用Tris-HCl(pH7.2)缓冲液将固定化酶冲洗干净，然后冷却至4℃，以备下一次使用。固定化显示出很高的重复使用稳定性，在重复使用2~5次时，固定化酶的活力均高于首次使用的酶的活力，重复使用6次以后，固定化酶的活力仍保持在80%。

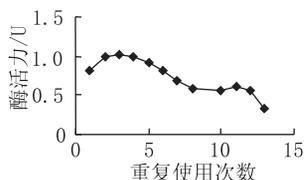


图6 重复使用对固定化酯酶活力的影响

Figure 6 Effects of number of assay cycles on the activity of immobilized esterase B1

### 2.3.4 固定化酯酶B1的半衰期

将固定化酯酶B1存放于25℃的恒温箱内，每隔24h测定一次其在0.05 mol·L<sup>-1</sup>的Tris-HCl(pH7.2)缓冲液中的酶活力，以0时刻的酯酶活力为100%，常温(25℃)下，酯酶B1的半衰期为12d，见图7。

### 2.3.5 酶促反应动力学

采用双倒数法<sup>[6]</sup>，确定固定化酯酶B1的最大反应

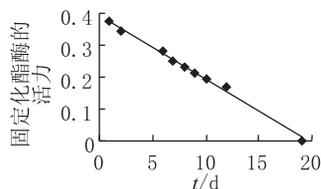


图7 固定化酯酶的半衰期

Figure 7 Half-life of immobilized esterase B1

速度和米氏常数，见图8及表1。如图8，酯酶B1最大反应速度为 $1.45 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ，米氏常数为 $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

从表1中可以看出，固定化酶的 $K_m$ 是液态酶的1.33倍， $V_{max}$ 只有液态酶的近1/2。

### 2.3.6 固定化酯酶B1对有机磷农药对硫磷(1605)的降解

由图9可知，固定化酯酶B1对1605快速降解，转空载体菌株提取酶固定化后对1605很少降解，而在经过30min后，固定化酯酶B1的降解率亦趋于平缓。试验重复4次，反应趋势一致。

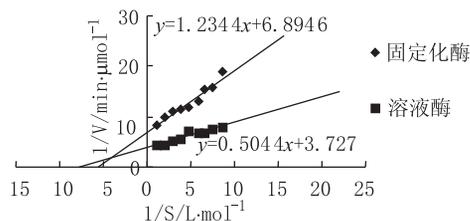


图8 固定化酯酶和溶液酶的Lineweaver-Burk曲线

Figure 8 Lineweaver-Burk plots of the immobilized and the soluble esterase

表1 固定化酯酶和液态酶的动力学数据

Table 1 Kinetic Data of Soluble and Immobilized B1

参数	液态酶	固定化酯酶
$K_m(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$1.35 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-3}$
$V_{max}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}, \text{U} \cdot \text{g}^{-1}, \text{湿量})$	$2.7 \times 10^4$	$1.45 \times 10^4$

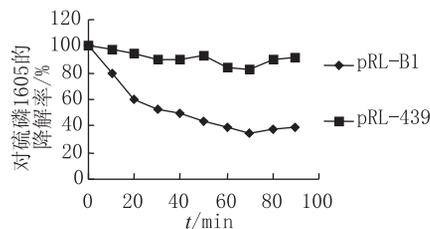


图9 固定化酯酶B1对农药1605的降解

Figure 9 Degradation of parathion by immobilized esterase B1

## 3 讨论

从R-工程菌中提取的游离酶降解的最适pH和温度分别为7.0和37℃<sup>[5]</sup>，固定化酶的最适pH和温度分别为7.0~7.5和40℃，说明固定化酶对pH的响应不如游离酶敏感，对温度变化的响应也发生了改变。导致这种变化的主要原因在于，酶经固定化后，酶与底物之间存在海藻酸钙凝胶，底物通过吸附与扩散过程才能结合发生酶促反应，在同样条件下由于该作用的存在，减缓了表观反应速率，从而使最适pH范围变宽，最适酶促反应温度升高，稳定性得到提高。

固定化酶与游离酶相比,固定化酶的  $K_m$  是液态酶的 1.33 倍,  $V_{max}$  只有液态酶的近一半,即固定化处理降低了酶与底物的亲和力,酶促反应的速度也相应地有所下降。 $K_m$  是降解速率达到最大反应一半时的底物浓度,固定化酶的  $K_m$  高于游离酶,表明固定化酶对底物浓度的应答范围大于游离酶。造成这种差异的根源在于经固定化后酶分子处于海藻酸钙凝胶内部,底物到达降解酶部位要通过海藻酸钙凝胶的吸附与扩散,海藻酸钙凝胶内外的浓度差直接影到底物到达降解酶的速率进而影响到底物酶促降解的速率。在实验中我们还发现,底物浓度逐渐升高时,反应速度增大,但当底物浓度超过一定值,固定化酶的反应速度反而下降,而液态酶没有这一现象。这说明固态酶显示出高底物抑制,而液态酶没有底物浓度抑制,这可能是固定化反应导致催化反应体系中有扩散限制的存在。

游离酶固定化后,酶不会流失,固定化酶经过滤或离心后,可以长期重复使用,而且酶的稳定性也得到提高。在农药污染的酶学去毒与净化应用方面,为提高效率,通常也将农药降解酶固定化,如对硫磷水解酶即是通过固定化而得以应用<sup>[7,8]</sup>。

该基因工程菌已应用于实验室农药污水的处理,

并取得很好的效果。本研究将它的表达产物酯酶 B1 固定化,拟开辟新的应用领域,如可应用于工农业生产大规模农药污水的处理,为基因工程菌真正走向应用打下坚实的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Qiao C L, Raymond M. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide-resistant mosquitoes of the culex pipiens complex from the Americas and China[J]. *Heredity*, 1995, 74: 339 - 345.
- [2] 闫艳春, 乔传令, 周晓涛. 一种工程菌的高酶活及其固定化细胞对农药的降解[J]. *中国环境科学*, 1999, 19(5): 461 - 465.
- [3] Sambrook, Fritsch E F, Maniatis. T *Molecular Cloning*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 908.
- [4] 闫艳春, 姚良同, 宋晓妍, 贾乐. 工程菌及其固定化细胞对有机磷农药的降解[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(5): 412 - 416.
- [5] 孙中涛, 闫艳春, 姚良同. R-工程菌表达产物酯酶 B1 的纯化及其特性[J]. *安全与环境学报*, 2003, 3(6): 31 - 35.
- [6] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002, 355 - 363.
- [7] Munnecke DM. Detoxification of pesticide using soluble or immobilized enzyme[J]. *Pro Biochem*, 1978, 13(1): 14 - 17.
- [8] Caldwell SR, Raushel FM. Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from pseudomonas diminuta[J]. *Biotech Bioeng*, 1991, 37(1)103 - 109.