

阿特拉津降解酶的提取及酶活性分析

高桂凤, 王俊玲, 楚海娇

(吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以阿特拉津降解菌株为试验材料,采用冰浴超声破壁水提法提取粗酶,用氯仿萃取培养液里残余的阿特拉津,用 HPLC 测定阿特拉津的残留量,在温度、pH、粗酶液含量不同、培养时间不同的条件下,研究了粗酶对阿特拉津降解率的影响,以期更好地利用阿特拉津降解酶。结果表明:阿特拉津降解酶最适宜的温度为 35℃ 左右,最适 pH 7.5;当粗酶液含量达到 50% 以上时,底物降解比较完全。

关键词:阿特拉津降解酶;HPLC;降解性

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)14-0094-03

阿特拉津,化学名称为 2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪,是一种在世界范围内应用极其广泛的除草剂,也是一种含氯有机物。这类含氯有机物化学性质稳定,能在环境中持久存在,且具有毒性,对人体和环境都具有极大的危害性,许多含氯有机物具有“三致效应”(致癌、致畸、致突变)或可疑“三致效应”,是各国优先控制的污染物^[1-2]。随着人们对含氯有机物危害性认识的进一步加深,对含氯有机污染物治理技术的研究引起了研究者的广泛关注。其治理方法有多种,其中,生物治理一直是关注的热点。该研究从长期喷洒阿特拉津除草剂的土壤中分离到阿特拉津降解菌,根据文献报道,阿特拉津降解酶产生的代谢酶都是胞内酶^[3],因此,现对菌株中的粗酶进行了提取,并对其活性进行分析,以期为阿特拉津生物治理提供理论性科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株从长期施用阿特拉津除草剂的土壤(采自吉林省东丰县)中分离得到。KH₂PO₄、K₂HPO₄、Mg₂SO₄、NaCl、酵母粉、蛋白胨、阿特拉津粉剂(90%)、盐酸、氢氧化钠、乙醇、甲醇等。

试验仪器:恒温振荡培养箱、超净工作台、细胞破碎

仪、低温冷冻高速离心机、过滤器、移液枪等。

1.2 试验方法

1.2.1 粗酶提取 挑取降解菌的单菌落,加入到含有阿特拉津的液体培养基的试管中活化培养 18 h,再转移到具有相同成分培养基的三角瓶中,在 30℃ 下振荡培养 24 h。取菌悬液离心(5 000 r·min⁻¹, 15 min),去上清液,用冷双蒸水洗涤 2 次,再用缓冲液重悬;然后冰浴超声破壁,每次 3 s,共 60 次,每次间隔 7 s,离心分离(10 000 r·min⁻¹),取上清液通过 0.45 μm 微孔滤膜,收集粗酶液。

1.2.2 添加回收率的测定 为了验证阿特拉津的萃取方法和色谱条件是否可靠,参照文献[4-6]的试验方法,将阿特拉津(90%)用甲醇配制成 10⁻¹ 的母液,然后,添加到缓冲液培养基里分别配制成 10、40、80 mg·L⁻¹ 3 种浓度,取样处理后利用最佳色谱条件测定阿特拉津的回收率。添加回收率(%)=(实测浓度/添加浓度)×100。每个样品平行做 5 次,处理后用 HPLC 检测,计算阿特拉津含量、回收率、各自的平均数(X)、标准差和变异系数(CV)。

1.2.3 摇瓶培养液中阿特拉津的萃取 取培养液 10 mL 置于分液漏斗,加入 CHCl₃ 上下振荡几次,静置分层,将有机相置于烧杯中,分 3 次加入少量 CHCl₃ 萃取,合并有机相,然后将有机相置于 60℃ 恒温水浴中蒸馏去除 CHCl₃。用甲醇定容至 50 mL 的容量瓶中,超声波振荡,过 0.22 μm 有机滤膜放置于离心管中放入 4℃ 冰箱第一时间检测。

1.2.4 酶活性的测定 测定温度对酶降解阿特拉津能力的影响:取粗酶液 2 mL 与 8 mL 缓冲液(pH 7.5,

第一作者简介:高桂凤(1971-),女,吉林吉林人,硕士,讲师,现主要从事微生物等研究工作。E-mail:791979258@qq.com.

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究资助项目(吉教科合字[2014]第 391 号);吉林农业科技学院微生物重点学科培育资助项目(吉农院合字[2013]第 X010 号)。

收稿日期:2016-02-14

20 mg · L⁻¹阿特拉津)混合,分别在 25、30、35、40、45 °C 条件下振荡培养 24 h 后,用氯仿萃取培养液中的阿特拉津,测定阿特拉津的含量。测定酶添加量的不同对阿特拉津降解能力的影响:在含有阿特拉津的终浓度为 20 mg · L⁻¹,含粗酶液分别为 10%、20%、30%、40%、50% 的缓冲液溶液里培养 24 h 后,用氯仿萃取阿特拉津,测定阿特拉津的含量。测定不同 pH 对酶降解阿特拉津能力的影响:首先配制 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲液培养基,然后取 2 mL 的粗酶液分别与 8 mL pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲液培养基 (20 mg · L⁻¹ 的阿特拉津)混合振荡培养,测定粗酶液 24 h 后对阿特拉津降解能力的影响。测定培养时间的不同对酶降解阿特拉津能力的影响:分别取 2 mL 粗酶液与 8 mL 含 20 mg · L⁻¹ 的阿特拉津的缓冲液 (pH 7.5) 混合振荡培养,在 8、24、48、72、96 h 分别取样,每次取 10 mL 样品,样品以 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,然后用缓冲液培养液清洗 2 次,上清液用 CHCl₃ 萃取培养液中的阿特拉津,然后在 60 °C 的恒温水浴中蒸去氯仿,用甲醇定容至刻度处。

2 结果与分析

2.1 阿特拉津的 HPLC 色谱条件的优化及标准曲线的绘制

该试验的 HPLC 最佳色谱条件如下:色谱柱 Inertsil ODS-3C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);进样量 10 μL;柱温 30 °C;检测波长 220 nm;流动相:甲醇:水 = 70:30;流

速 0.8 mL · min⁻¹。其最佳色谱条件下阿特拉津标准品的峰形如图 1 所示,阿特拉津的标准曲线的线性相关系数 $R^2 = 0.999\ 768$ 。

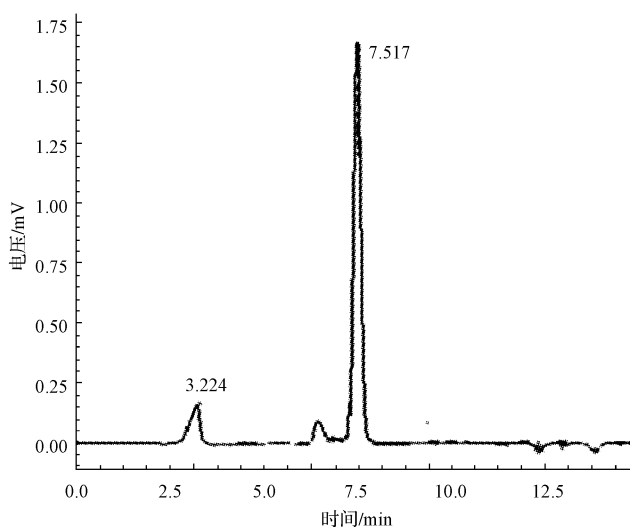


图 1 HPLC 最佳色谱条件下的阿特拉津标准品峰形图

2.2 添加回收率的测定及分析

3 种浓度阿特拉津添加到基础盐溶液后取样测定,并计算回收率及变异系数,结果如表 1 所示,3 种浓度的回收率分别为 89.31%~95.23%、93.18%~98.85%、93.74%~97.68%,回收率偏离不大,重复性也较好,其变异系数(CV)均小于 3%,说明通过该方法测定阿特拉津的残留量可行,具有一定准确度和精确度。

表 1 不同浓度阿特拉津添加回收率的测定

次数	理论	测定	回收率	理论	测定	回收率	理论	测定	回收率
	值	值	/ %		值	/ %	值	值	/ %
1	10	8.936	89.36	40	39.54	98.85	80	76.55	95.69
2	10	9.027	90.27	40	38.97	97.43	80	77.95	97.44
3	10	9.213	92.13	40	39.01	97.53	80	78.14	97.68
4	10	9.523	95.23	40	38.11	95.28	80	77.23	96.54
5	10	8.931	89.31	40	37.27	93.18	80	74.99	93.74
X		9.126	91.26		38.58	96.45		76.97	96.22
SD		0.250	2.50		0.894	2.233		1.274	1.59
CV/%		2.74	2.74		2.32	2.32		1.66	1.66

2.3 不同条件下酶降解阿特拉津能力影响的分析

2.3.1 温度对酶降解阿特拉津能力的影响 从图 2 可以看出,在阿特拉津浓度相同的条件下,降解酶对阿特拉津的降解率随着温度的升高而增大,当温度达到 35 °C 时,其降解率达到最高,当温度高于 35 °C 时,其降解率显著下降;当温度达到 45 °C 时,酶降解活性几乎完全丧失。

2.3.2 不同酶添加量对阿特拉津降解性的影响 从图 3 可以看出,在阿特拉津浓度相同的条件下,在同等时间内,随着粗酶液含量的增加,阿特拉津的降解率呈线性

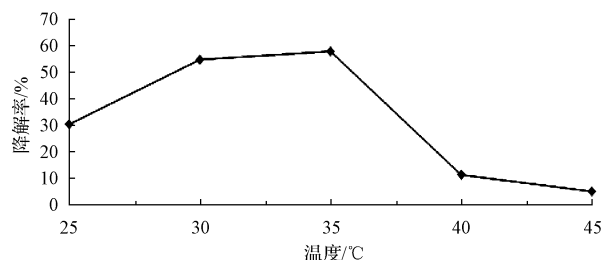


图 2 温度对酶降解阿特拉津能力的影响

上升,当粗酶液含量达到 50% 以上时,经过 24 h 的酶促反应,底物几乎完全降解。

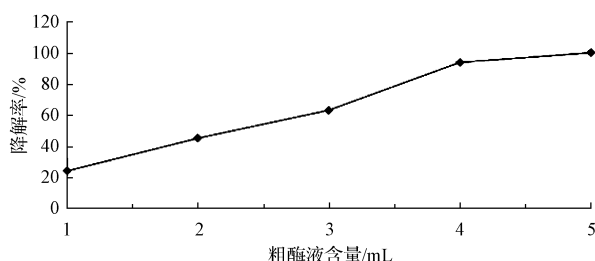


图 3 不同粗酶液含量对阿特拉津降解性的影响

2.3.3 缓冲液中不同 pH 对酶降解阿特拉津能力的影响 由图 4 可知,当缓冲液中酶浓度和阿特拉津浓度不变时,pH 在 7.0~8.0 范围内,适合酶降解阿特拉津,而降解阿特拉津最适宜 pH 在 7.5 左右。

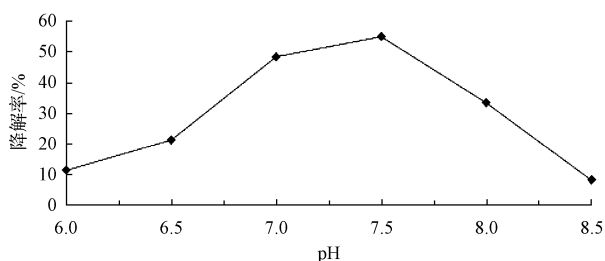


图 4 不同 pH 对酶降解阿特拉津能力的影响

2.3.4 不同培养时间对酶降解阿特拉津能力的影响

图 5 表明,当所有条件一致的条件下,测定不同的培养时间对酶降解阿特拉津能力的影响,发现酶对阿特拉津的降解率并不随着培养时间延长而增大,而当培养时间超过了 24 h 后,酶对阿特拉津的降解率会恒定在某一值不变。说明阿特拉津降解酶的酶促反应主要发生在 24 h 之内。

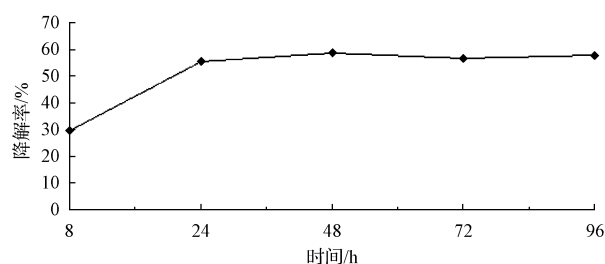


图 5 不同培养时间对酶降解阿特拉津能力的影响

3 结论

通过上述结果分析发现,在粗酶液含量添加为 20% 时,阿特拉津的最大降解率只为 57% 左右,经过分析有 2 种原因:一是粗酶液中降解酶的含量可能很低;二是粗酶液中酶活性可能一般;在最适宜降解条件为温度 35 ℃、pH 7.5。

参考文献

- [1] 刘菲,汤鸣皋,何小娟,等. 零价铁降解水中氯代烃的实验室研究[J]. 地球科学(中国地质大学学报),2000,27(2):186-188.
- [2] 全樊,刘会娟,杨凤林,等. 二元金属体系对水中多氯有机物的催化还原脱氯特性[J]. 中国环境科学,1998,18(4):333-336.
- [3] 刘爱菊. 阿特拉津高效降解细菌的筛选及降解特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学,2003:59-60.
- [4] 韦志明,黄平,廖艳芳,等. 莠灭净·阿特拉津混合物的高效液相色谱分析[J]. 农药,2008,47(3):186-187.
- [5] KATSUMATA H, KANEKO S, SUZUKI T, et al. Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth[J]. Analytica Acta,2006,577:214-219.
- [6] PANUWET P, RESTREPO P A, MAGSUMBO L M, et al. An improved high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to measure atrazine and its metabolites in human urine[J]. Journal of Chromatography B,2010,878:957-962.

Extraction of Atrazine-degrading Enzymes and Enzyme Activity Analysis

GAO Guifeng, WANG Junling, CHU Haijiao

(School of Bio-engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Taking atrazine degradation strains as experimental material. Crude enzyme was extracted by the ultrasonic wall-breaking water methods. Residual atrazine was extracted with chloroform in the culture medium. The residues of atrazine was measured by HPLC. Under different conditions of temperature, pH, crude enzyme fluid content, training time, crude enzyme was studied on the influence of atrazine degradation rate, in order to make better use of atrazine-degrading enzymes. The results showed that atrazine degradation enzyme of optimum temperature was about 35 ℃. The optimal pH was 7.5. When the crude enzyme liquid content was above 50%, the substrate degradation was complete.

Keywords: atrazine-degrading enzymes; HPLC; degradability