

固定化假单胞菌 CTP-01 细胞分解 对硫磷的研究

谭渝云 孙美娟 张甬元

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

用明胶-戊二醛 (GGA) 和聚丙烯酰胺 (PAA) 包埋的固定化 *Pseudomonas* sp. CTP-01 细胞具有降解对硫磷的特性。GGA 固定化细胞水解对硫磷的活力比 PAA 固定化细胞高 5.8 倍。当保存在 4℃ 时 GGA 和 PAA 固定化细胞分别可以保持活力 31.3 和 70%。GGA 和 PAA 包埋的细胞最适反应温度分别为 50℃ 到 70℃ 和 60℃ 到 70℃, 然而整细胞在温度超过 65℃ 时活力很快下降。GGA 和 PAA 两种固定化细胞最适 pH 为 8.0, 当 pH 低于 7.0 时活力开始下降, pH 4 时则完全失活。

在酶学研究中固定化酶技术从 60 年代以来发展十分迅速。固定化酶是通过物理或化学方法将酶束缚在一定区间内, 当反应物通过这个区间即产生酶促反应, 并获得相应的产物, 而酶不致流失, 可以反复使用。固定化酶的发展是酶学工艺上的一个重大改革。整细胞固定化的应用又将固定化酶法向前推进了一步。特点是将活菌体细胞固定化, 直接利用细胞内酶系统进行反应, 从而避免了破碎细胞和提取酶的步骤。酶在细胞内环境稳定性较高, 这样就将微生物发酵和固定化酶两种技术相结合, 展现出更大的工业应用潜力。

在医药工业和食品工业中固定化细菌的整细胞已经获得较大规模的应用^[5,7]。此外在环境样品分析方面, 将固定化微生物作成电极, 已用于连续测定 BOD^[4]。另外有的研究者利用固定化酶降解某些有毒物质, 达到工业去毒的目的, Munnecke 将能水解 9 种有机磷杀虫剂的细菌的酶共价结合在多孔玻璃载体上, 得到了水解对硫磷的活力^[6]。这些工作尚停留在实验室阶段, 但为应用酶学工程方法处理工业废水提供了依据。

我们从鸭儿湖氧化塘中驯化分离出高效对硫磷分解菌 *Pseudomonas* sp. CTP-01 制备了无细胞酶制剂, 并对酶的性质进行了研究^[1-3]。在此基础上将活菌体包埋制备成固定化细菌, 并研究了固定化菌的有关性质。

1985年6月13日收到。

材 料 和 方 法

(一) 菌 体 培 养

菌种为本实验室分离的水解对硫磷细菌 *Pseudomonas* sp. CTP-01, 培养器为 10 升玻璃缸, 温度恒定在 30℃, 在搅拌、通气条件下连续培养。培养基为改良的 Burk 培养液, (K_2HPO_4 , 0.8 克; KH_2PO_4 , 0.2 克; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 克; $MgSO_4$, 0.2 克; $CaCl_2$, 0.05 克; $NaMO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0033 克; $FeSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.005 克; 1 升蒸馏水), 并以对硫磷作为唯一的碳源。培养过程中在对硫磷耗尽、对硝基酚形成的黄色消失后再加入一定量对硫磷, 并用 14% NaOH 调节培养液 pH 至 7.2 左右。培养 5—7 天后, 离心收集细菌细胞, 并用新鲜培养液洗涤一次, 收集的湿菌体称重后置于冰箱中保存。

(二) 明胶-戊二醛包埋细胞

将 1 克明胶加 10 毫升蒸馏水浸泡半小时以后, 在水浴中加热至明胶完全溶化, 当明胶溶液冷却至 40℃ 时加到 10 克湿菌体中, 在均匀搅拌的条件下加入 1 毫升 25% 戊二醛, 待形成胶块状后置于 -5℃ 冰箱保存 12 小时。

将冻成海绵状的固定化细胞切成薄片, 挤压通过 20 目铜筛, 得直径 1 毫米的小颗粒。颗粒状的固化菌置入烧杯中, 加入 1% 戊二醛 100 毫升浸泡 2 小时。然后用 2% NaCl、蒸馏水、培养基分别洗涤两次, 最后用真空泵抽滤除掉水份, 称其重量。

(三) 聚丙烯酰胺包埋方法

将 10 克湿菌体悬浮于 20 毫升培养基中, 搅拌均匀。另取丙烯酰胺 7.5 克; N.N. 甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 0.4 克, 溶解在 25 毫升蒸馏水中, 冷却至 8℃。将聚丙烯酰胺单体与菌糊混合, 在均匀搅拌下加入浓度为 50 毫克/毫升的过硫酸铵 4 毫升, N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 0.4 毫升。反应混合物在 20—25℃ 放置 5 分钟, 随聚合作用进行, 混合物温度升高, 应立即置于冰浴中迅速冷却。大约 15—20 分钟完成聚合反应凝结成胶状。

取出凝胶块切成薄片状, 挤压通过 20 目铜筛得直径为 1 毫米的颗粒。用上述明胶-戊二醛作包埋剂的方法进行洗涤, 称重后放入蒸馏水中于 4℃ 下保存。

(四) 对硫磷降解速率的测定

反应系统为含对硫磷 24 微克/毫升的 0.25 摩 Tris-HCl 缓冲液, pH8.0。

1. 未经包埋的整细胞降解对硫磷活力的测定

称取 0.2 克湿菌体加培养基稀释至 50 毫升容量瓶中, 摇匀置于 4℃ 保存, 作为对比试验的整细胞原液。取一定量稀释的整细胞悬液加入含 10 毫升反应液的玻璃管中, 在 30℃ 下反应 10 分钟, 于国产 721 型分光光度计上、波长 410 毫微米处读取光密度值。对硫磷降解时化学计量地形成对硝基酚钠, 根据对硝基酚钠的含量计算对硫磷被分解的数量。

整细胞比活以每毫克湿菌体每小时分解对硫磷的微摩数表示。

2. 固定化细胞降解对硫磷活力的测定

取 40 毫升反应液加入带有磁力搅拌和恒温装置的反应器中, 待反应液温度达到 30℃ 再放入一定数量的固定化细菌立即开始反应, 10 分钟后测定溶液中对硫磷的含量。测定方法同上所述。

固定化细胞的比活以每克固定菌每小时分解对硫磷的微摩数表示。

结 果 和 讨 论

(一) 固定化细菌的活力和对时间的稳定性

将同一批培养的 *Pseudomonas* sp. CTP-01 湿菌体分别用明胶-戊二醛和聚丙烯酰胺作包埋剂, 得到的固定化细菌都具有分解对硫磷的活力(表 1)。

表 1 固定化细菌降解对硫磷的活力

Tab. 1 The activity of immobilized *Pseudomonas* sp. CTP-01 in Parathion degradation

包埋剂 entrapped reagent	细胞湿重(克) wet weight of cells (g)	固定细胞总量(克) total weight of immobi- lized cells (g)	固定细胞比活(微摩/克/小时) Specific activity of immobi- lized cells ($\mu\text{g mol/g/hour}$)
明胶-戊二醛 (GGA)	10.4	18.79	168.48
聚丙烯酰胺 (PAA)	9	66.30	28.78

比较两种包埋剂固定菌降解对硫磷的活力, 明胶-戊二醛包埋的效果比较好, 它比聚丙烯酰胺包埋的固定菌比活高 5.8 倍, 回收活力高 1.7 倍。

比较了固定菌和活菌体的活力, 结果表明固定化后 98% 以上的降解对硫磷活力消失。为了探讨失活的原因, 从每一步清洗液液中测定水解对硫磷的活力。结果仅有 10% 在清洗时流失。考虑到 *Pseudomonas* sp. CTP-01 细菌个体小, 活细胞与底物接触面大, 表现出很强的分解对硫磷的活力, 而固定化时湿菌体细胞粘连成团状, 与底物接触的相对面积变小。为此, 采用同一批聚丙烯酰胺包埋的固定化细菌通过不同型号铜筛挤压, 形成直径不同的颗粒, 并分别测定其分解对硫磷的速率(表 2)。从表 2 可看出固定化菌分解对硫磷的活力是随颗粒直径的减小而提高的。

表 2 固定化菌粒度对降解活力的影响

Tab. 2 Effect of particle size of immobilized cells on the degradation activity

颗粒大小(毫米) Particle size (mm)	比活 微摩/克/小时 specific activity ($\mu\text{g mol/g/hour}$)	提高倍数 increase in specific activity (times)
1.0	25.69	1
0.42	45.63	1.77
0.21	87.75	3.42

另外, 在同一批培养的菌体中, 取不同数量的湿菌体用等量的聚丙烯酰胺作包埋剂, 观察各种类型的固定菌分解对硫磷的速率(表 3)。

从表 3 可以看到包埋菌体的数量 0.5 克比 7 克减少 14 倍, 而固定化以后的活力以每

表 3 细菌数量与降解对硫磷活性之间的关系

Tab. 3 Relationship between the amount of bacteria and the activity of parathion degradation

细胞湿重(克) wet weight of cells (g)	固定化细胞重(克) weight of immo- bilized cells (g)	比活(微摩/克/小时) Specific activity ($\mu\text{g mol/g/hour}$)	每克细胞固定化后的比活 (微摩/克/小时) Specific activity after immobilized per gram whole ($\mu\text{g mol/g/hour}$)	活力回收(%) recovery activity (%)
0.5	36.28	6.45	468.00	3.15
1	37.28	7.72	287.80	1.86
3	38.73	12.11	156.34	1.01
7	38.39	15.33	84.08	0.54

克菌体计算提高到 5.57 倍。然而,菌体用量少表现出比活较低,活力回收高;菌体用量多则固定化菌比活高,活力回收低。可见进一步改进包埋剂和固定化方法,使之既能有效地固定细胞,又具有尽可能大的表面积,这是固定化菌实用中需要进一步研究的课题。

通过批量反应器测定了固定化菌对时间的稳定性。在每次反应结束后,除去反应液,加上新鲜反应液继续反应,反复连续测试,观察在一定时间内固定化细菌活力的变化。明胶-戊二醛固定化菌和聚丙烯酰胺固定化菌分别反应 2.5 小时和 8 小时活力都没有下降。4℃ 下保存 45 天以后明胶-戊二醛包埋的细菌可保存活力 31.25%,聚丙烯酰胺包埋的细菌保持活力 70%,但是延长保存时间明胶会发生解体,聚丙烯酰胺保存半年以上机械强度仍很高。固定化细菌的特点就是要达到长期反复使用,并保持比较高的活力。这两种包埋剂各有不同的特点,因此选择恰当的包埋剂是十分重要的。

(二) 最适反应温度和对热的稳定性

最适反应温度试验是将两种固定化细菌和完整细菌细胞置于温度 30—85℃ 的条件

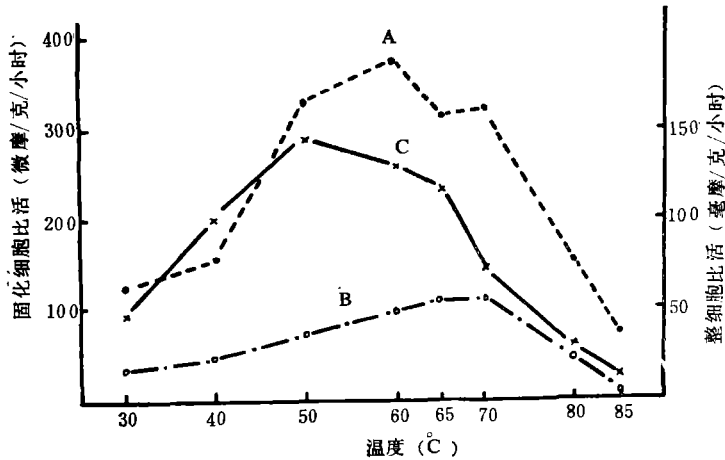


图 1 固定化细胞和整细胞悬液最适反应温度的比较

Fig. 1 Comparison of the optimum temperatures of immobilized cells and suspended whole cells in degradation of parathion

A 明胶-戊二醛固定化细菌; B 聚丙烯酰胺固定化细菌; C 完整细胞
GGA immobilized cells; PAA immobilized cells; Whole cells

下反应,每间隔 10℃ 或 5℃ 作为一组处理,观察并比较它们的反应最适温度(图 1)。

图 1 显示了整细胞最适反应温度为 45—65℃;明胶-戊二醛包埋的固定化细菌在 50—70℃;聚丙烯酰胺包埋的固定化细菌在 60—70℃。从温度曲线可见聚丙烯酰胺作包埋剂的固定化菌对温度变化最稳定,而整细胞当温度超过 65℃ 时反应速率就急骤下降。

热稳定性试验是将两种固定化细菌和整细胞从 30℃ 至 90℃,每升高 10℃ 为一组试验,热处理 20 分钟后立即降温至 30℃,并保持在 30℃ 测定分解对硫磷的活力(图 2)。

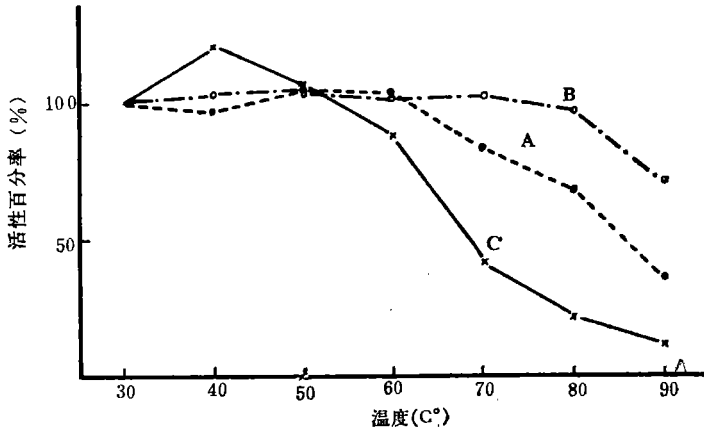


图 2 固定细菌和整细胞对热的稳定性

Fig. 2 Heat stability of suspended whole cells and immobilized cells

A 明胶-戊二醛固定化细菌; B 聚丙烯酰胺固定化细菌; C 整细胞

GGA immobilized cells; PAA immobilized cells; Whole cells

图 2 显示了细菌经过固定化以后,提高了对高温的忍受能力,采用聚丙烯酰胺包埋的固定化细菌对热的稳定性更高。

酶反应对温度的变化是十分敏感的,当温度升高到 80℃ 时许多酶蛋白都变性了,失去了酶的特异性,而 *Pseudomonas* sp. CTP-01 的对硫磷水解酶对此高温有很强的耐性,仍然保持活力的 23%。经过固定化以后,对热的稳定性有进一步提高,相当于最高活力的 68.5—74.34%。

(三) 最适反应 pH 和对 pH 的适应性

反应液的 pH 从 4 到 10,共分为 7 个梯度。在不同的 pH 条件下反应,比较整细胞和两种固定化细胞分解对硫磷的活力,三组处理的最适反应 pH 值都是 8(图 3)。当反应液的 pH 值为 4 时,各组分解对硫磷的活力都急骤下降以至丧失。当反应液的 pH 值高于 8 时,反应速度逐步下降,但下降速率比 pH 低于 8 时缓慢得多。可见, *Pseudomonas* sp. CTP-01 耐碱力大于耐酸性;细菌被固定化以后提高了耐酸性,采用聚丙烯酰胺作包埋剂效果更显著。

将整细胞和两种固定化细菌放于不同 pH (4—10) 的缓冲液中处理 20 分钟以后,立即调整反应液的 pH 值至 8,比较分解对硫磷的速率(图 4)。

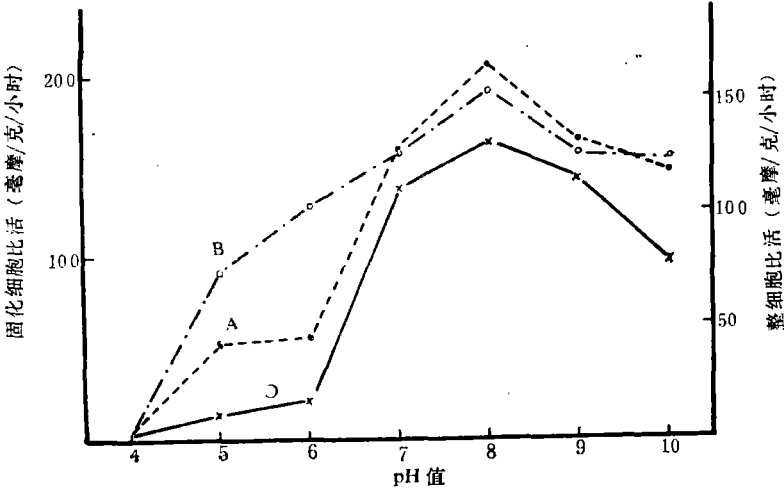


图 3 固定化细胞和整细胞悬液降解对硫磷的最适 pH
(图中“C”应为“C”)

Fig. 3 The optimum pH in degradation of parathion by immobilized cells and suspended whole cells

A 明胶-戊二醛固定化细菌; B 聚丙烯酰胺固定化细菌; C 整细胞
GGA immobilized cells; PAA immobilized cells; Whole cells

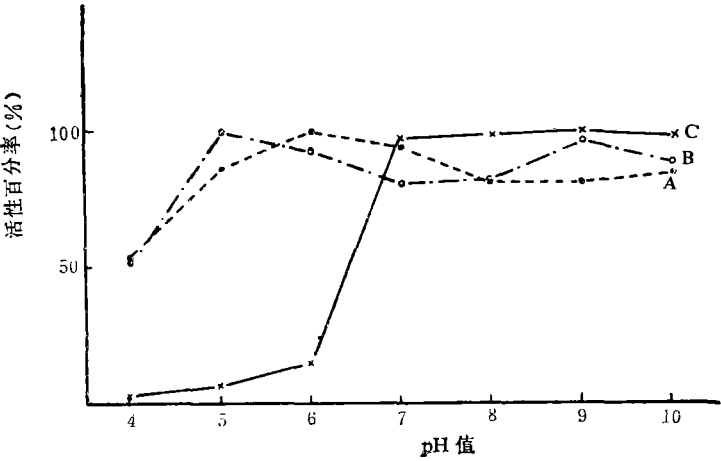


图 4 固定化细胞和整细胞悬液降解对硫磷对 pH 的稳定性

Fig. 4 pH stability of immobilized cells and suspended whole cells in degradation of parathion

A 明胶-戊二醛固定化细菌; B 聚丙烯酰胺固定化细菌; C 整细胞
GGA immobilized cells; PAA immobilized cells; Whole cells

结果表明,经包埋后的固定化细菌在 pH4 处理时,活性显著受到抑制,在 pH5—10 的范围内基本稳定,而未经固定化的细胞则在 7—10 范围内稳定。

参 考 文 献

- [1] 张甬元等, 1981. 水生生态系中有机磷农药生物净化机理研究. 环境科学学报, 1(2): 115—125.
- [2] 张甬元等, 1982. 有机磷农药在水生生态系中生物净化机理研究, 1. 对硫磷的酶解. 水生生物学集刊, 7(4): 499—506.
- [3] 谭渝云等, 1982. 有机磷农药在水生生态系中生物净化机理研究, 4. *Pseudomonas* sp. CTP-01 的对硫磷水解酶诱导合成性质. 水生生物学集刊, 7(4): 521—526.
- [4] Hikuma, M. and H. Suzuki, et al., 1979. Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8(4): 289—297.
- [5] Ichiro Chibata, Tetsuya Tosa, and Tadashi Sato, 1976. Production of L-Aspartic acid by microbial cells entrapped in polyacrylamide gels. *Methods in Enzymology*, 44: 739—746.
- [6] Munnecke, D. M., 1977. Properties of an immobilized pesticide hydrolyzing enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(3): 503—507.
- [7] Per-Olof Larsson and Klaus Mosbach, 1976. Immobilization of steroid-transforming microorganisms in polyacrylamide. *Methods in Enzymology*, 44: 183—190.

THE CHARACTER OF IMMOBILIZED *PSEUDOMONAS* SP. CTP-01 IN DEGRADATION OF PARATHION

Tan Yuyun, Sun Meijuan and Zhang Yongyuan

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

The paper deals with the character of immobilized *Pseudomonas* sp. CTP-01, which was entrapped in gelatin-glutaraldehyde (GGA) and polyacrylamide (PAA), for degrading of parathion. The activity of hydrolyzing parathion for GGA-immobilized cells was 5.8 times higher than that of PAA-immobilized cells. When stored under 4°C, the activity of the GGA and PAA-immobilized cells could retain 31.3% and 70%, respectively. Optimum temperature for GGA and PAA trapping cell ranged from 50 to 70°C and 60 to 70°C. The intact cells, however, decreased the activity rapidly when the temperature exceeded 65°C. The experiment of pH adaptation showed that the optimum value was 8.0 for both GGA and PAA immobilization. The activity began to decrease when pH was lower than 7.0 and lost completely at pH 4.0.

Key words immobilized cells degradation, parathion