

黄曲霉毒素解毒酶的固定化及其性质的研究

刘大岭¹ 姚冬生^{1*} 黄炳贺² 谢春芳¹ 梁郁强¹ 马 林³

¹(暨南大学 生命科技学院 生物系, 广州 510632)

²(广东省技术开发中心, 广州 510070)

³(中山大学 化学与化学工程学院 有机所, 广州 510275)

摘 要 黄曲霉毒素是农作物常见的受污染的霉菌毒素, 毒性大, 稳定性高, 是潜在的肝癌致癌物, 对人的危害较大。该毒素的解毒与去毒一直是受到关注的问题。黄曲霉毒素解毒酶对黄曲霉毒素有特殊的去毒和降解作用, 但是该酶的稳定性离实际问题尚有一段距离。报道了对黄曲霉毒素解毒酶的固定化, 并对固定化处理后酶的稳定性、性质、催化活性、解毒活性进行了测定。结果表明, 通过固定化操作酶的解毒活性被保留下来, 酶的酸碱稳定性、热稳定性、放置稳定性等均得到显著的提高。

关键词 黄曲霉毒素, 解毒酶, 固定化

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2003)05-0603-05

黄曲霉毒素是强的致畸变霉菌毒素, 热稳定性高, 污染谱广泛, 对人类的危害性较大。在过去的研究中我们报道了, 真菌中存在着可以降解黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFT)毒性的酶^[1-3]。近几年, 我们对该菌对 AFT 的降解作用进行了进一步的研究。结果显示该菌的胞内酶表现出对 AFT 的去毒性作用^[3,4]。该酶命名为黄曲霉毒素解毒酶(Aflatoxin-de-toxiczyme, ADTZ)。酶离开自然环境在实际应用中常常表现出不稳定性, 而且 AFT 的脂溶性还要求黄曲霉毒素解毒酶的解毒作用最好能够在油相中进行。但使用有机溶剂的最大缺点, 是由于缺少水分而使得酶容易失活, 称之为脱饱和作用。固定化技术可以增强酶的稳定性, 可以使酶避免被脱饱和。此外, 固定化解决了酶在有机相中发生沉淀的问题。过去我们成功地用疏水吸附法分别对天冬氨酸酶和前列腺素合成酶进行了固定化^[5,6], 在本研究中采用类似的方法对黄曲霉毒素解毒酶进行固定化, 文中研究了通过疏水吸附作用固定化于固相载体上的解毒酶对黄曲霉毒素 B1 的反应性和解毒酶稳定性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

AFB1 购自 Sigma 公司; 其余均为分析纯试剂。菌种: 蜜环菌(*Armillariella* sp.)。真菌解毒酶按照过去介绍的方法提取^[3], 然后冻干保存。烷胺基琼脂糖由中山大学有机所合成。

1.2 方法

1.2.1 酶的固定化 解毒酶在载体(烷基或辛基-胺基琼脂糖珠)上于 4℃ 下进行吸附。干燥的载体于 4mL 磷酸-柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 4.5~0.7)中悬浮, 其中含有 10 mmol/L MgCl₂, 0.3 mol/L KCl 和 15 mg 的酶粉(含蛋白质 6.0 mg)。混合物缓缓地振荡 4h, 过滤除去原液, 固定化酶以 5 mL pH 6.0 磷酸-柠檬酸缓冲液洗涤, 随后溶液中蛋白质的含量和固定化酶的活性, 蛋白质含量用 Bradford 法, 以 BSA 为标准。

1.2.2 酶活力的测定: 采用过去报道的方法^[3]: 133.3 ng AFB1 溶解于预先 30℃ 下温浴 5min 的含有 0.2 u 的酶和 100 μL 2 mmol/L 的 BaCl₂ 的 1 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.6)中。30℃ 温浴 30

min 后,加入 3 mL 冷甲醇终止反应,3000 g -15℃离心 25min 除去蛋白质。解毒酶对 AFB1 的解毒起催化作用,使溶液中 AFB1 的吸收值减小。测定 OD_{360} 同时测定 AFB1 的标准曲线。酶的 1 个活力单位定义为每分钟减少 1 个 nmol 的 AFB1 所需的酶量。

1.2.3 固定化酶的测定:固定化酶(0.5 g)悬浮于预先 30℃下温浴 5 min 的 5 mL 0.05 mol/L, pH 6.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中,加入 500 μ L 的 AFB1。温育 60min 后离心,取上清,测量 360nm 的吸光度。

1.2.4 固定化酶 K_m 值的测定:分别加入 AFB1 0.5、1.25、2.5、5、10 μ g 于离心管中,65℃水浴中吹氮

气挥干;加入含 100 μ L 2 mmol/L 的 $BaCl_2$ 和 DMSO 50 μ L 的 1 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.6) 30℃温浴 5min 后加入固定化酶 0.5 g,于 30℃下反应 20min,离心,取上清,测量 360nm 的吸光度。同时测定 AFB1 的标准曲线。

2 结 果

2.1 不同的烷胺基琼脂糖的影响

不同的正烷基-胺基-琼脂糖对酶的固定会有影响。表 1 显示了不同的烷胺基琼脂糖对解毒酶的吸附作用。辛基-胺基-和苯基-胺基-琼脂糖表现出强的疏水作用,具有较高的活性和高的固定化酶容量。

表 1 在不同的亲水性载体上,固定黄曲霉素解毒酶(ADTZ)
Table 1 Immobilization of ADTZ on different hydrophobic carriers *

Hydrophobic group	Absorbed protein/mg	Yield of absorbed protein/%	Retention specific activity	Relative activity/%
Phenyl-	5.00	83.4	0.0239	55.7
Benzyl-	4.85	80.8	0.270	77.2
<i>n</i> -octyl-	5.23	87.2	0.317	90.5
α -naphthyl-	5.13	85.5	0.160	45.6
Diphenyl-	4.21	70.1	0.180	51.4
<i>n</i> -butyl-	3.98	66.4	0.263	75.1

* 0.5 g of *n*-alkyl or aryl amino-agar beads (suction-dried), 15mg of enzyme powder(2.1u), 4 mL of 0.5 mol/L KCl (pH 5.5), and 0.1 mol/L citric-phosphate buffer were shaken for 4 h at 4℃.

2.2 pH 值的影响

测定了 pH 值对解毒酶在辛基-胺基-琼脂糖珠上吸附的影响。所得的结果如图 1。结果表明:蛋白的吸附量、酶的活性在 pH 5.5 处达到最大值。该值与解毒酶的等电点相近。酶表面电荷的减少增强了酶与辛基-胺基-琼脂糖之间的疏水相互作用。不同的 pH 值表现出非常不同的蛋白吸附量和固定化酶的活性。不同的 pH 值下,酶具有不同的电荷,这对酶表面的疏水相互作用造成了影响。

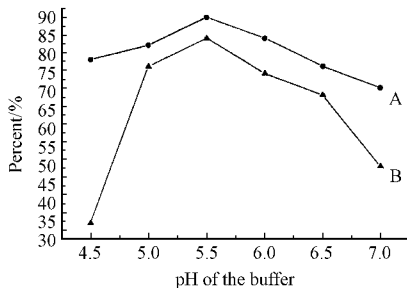


图 1 pH 值对 ADTZ 固定化的影响

Fig.1 Effects of pH on the ADTZ immobilization
N-octyl amino-agar (suction-dried gel 0.5 g), 4 mL of the different pH buffers (containing 0.5 mol/L KCl), and 15 mg of enzyme powder were shaken for 4 h at 4℃. (A) Yield of absorbed protein; (B) Relative activity of immobilized ADTZ

2.3 盐浓度的影响

通常高的盐浓度会加强疏水作用。图 2 表明了溶液中盐浓度对解毒酶吸附的影响。随着盐浓度的增加,烷胺基琼脂糖上配基的疏水性增强,蛋白质吸附的量增多,固定化酶在 0.5 mol/L 的 KCl 中表现出最大的相对活性。盐的加入会影响蛋白的立体结构,高浓度的 KCl 使固定化酶活性降低。

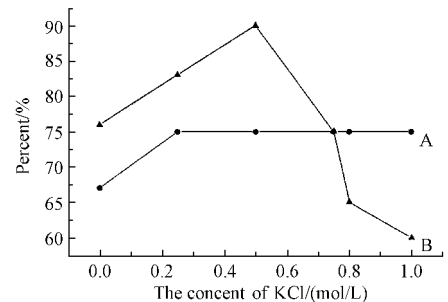


图 2 KCl 浓度对 ADTZ 固定化的影响

Fig.2 Effects of different KCl concentrations on ADTZ immobilization

The gel (0.5 g), 4 mL of the buffer (pH 5.5) containing different KCl concentrations, and 15 mg of enzyme powder were shaken for 4 h at 4℃. (A) Yield of absorbed protein; (B) Relative activity of immobilized ADTZ

2.4 有机相中水含量的影响

在进行本实验时,固定化酶先冻干并以正己烷为溶剂,水直接加入到固定化酶粉中。反应时间增加到 24h,离心后,酶的相对活性以 OD_{360} 的减小表示。结果如图 3 所示,活性随水含量(V/V)的增加而增加,提示催化反应有可能涉及有水化或水解作用。

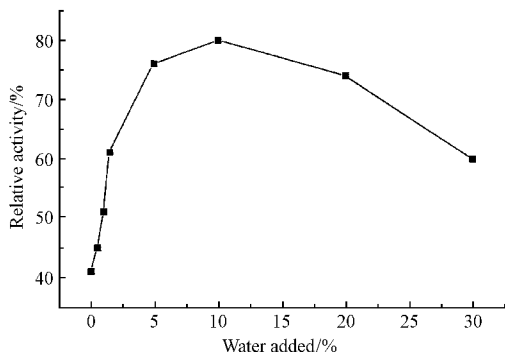


图 3 水含量对酶固定化的影响

Fig. 3 Effects of water concentration on dried immobilized enzyme powder

2.5 溶剂的影响

在有机相中的反应,直接以 AFB1 为底物进行。AFB1 的初始浓度为 200 ng/mL。反应时间延长至 24h。反应后混合液中残留的 AFB1 以 2 倍体积的氯仿经 3 次抽提后用国标 TLC 的方法进行测定。如表 2 所示,固定化酶在花生油中仍保持着较好的活性。以在有机相中反应效率较高的正己烷溶剂体系进行毒性和致畸变试验。将反应的正己烷溶剂收集后,如文献 2 的方法进行了鸡胚试验、大鼠急性试验和 Ames 试验。结果表明固定化酶表现出与游离酶一致的 AFB1 解毒活性。AFB1 处理后均未发现鸡胚毒性、大鼠毒性和致畸变活性。

表 2 固定化酶在有机溶剂中的活性

Table 2 Activities of immobilized enzyme in organic solvent *

Solvent	Activity/%
n-hexane	82
Peanut oil	77
Chloroform	64
Methanol	45
Water	100

* 25% (V/V) of buffer was added onto the immobilized enzyme powder directly.

3 固定化解毒酶的性质

3.1 最适 pH 值

pH 值对固定化酶与游离酶的影响如图 4 所示。

反应的最适 pH 值在 4.5 ~ 6.5 与固定化前相似。

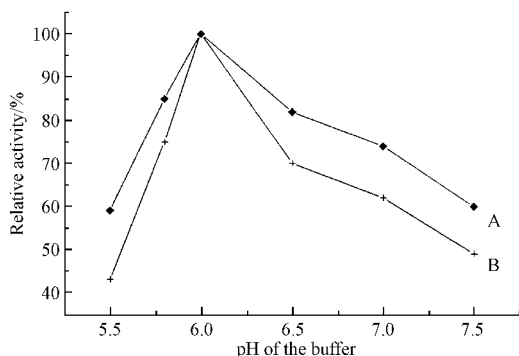


图 4 pH 对酶固定化前后活性的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of (A) immobilized enzyme and (B) free enzyme

3.2 最适温度

如图 5 所示,酶固定化后,最高的稳定温度从原来的 25 ~ 30°C 升高到 30 ~ 35°C。随着温度的升高,固定化酶发生不可逆的减少,可能是发生了酶从载体上解吸的缘故。

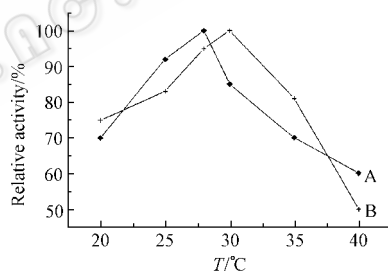


图 5 温度对酶固定化前后的影响情况

Fig. 5 Effects of temperature on the activity of (A) free enzyme and (B) immobilized enzyme

3.3 pH 稳定性

分别测定了固定化解毒酶与游离的解毒酶 pH 值的稳定性(图 6),该图显示了 pH 值对酶固定化前后的稳定性的影响规律。在测活前固定化酶与游离酶分别在 4°C 于不同的 pH 值缓冲液中保存 5h。结果表明固定化酶的稳定性在 pH 5.5 ~ 7.0 而游离的酶稳定性范围则落在 5.0 ~ 6.0 之内。固定化处理后,酶的稳定性向高的 pH 值移动。

3.4 热稳定性

固定化酶与游离的酶于 0.05 mol/L pH 6.0 的柠檬酸-磷酸缓冲液或含 0.5 ~ 0.05 mol/L KCl pH 6.0 的柠檬酸-磷酸缓冲液中,分别在 30°C 和 35°C 下温育,然后测定酶活。结果表明,与游离酶不同,固定化酶在 0.5 mol/L 的 KCl 中稳定性显著地增加了。

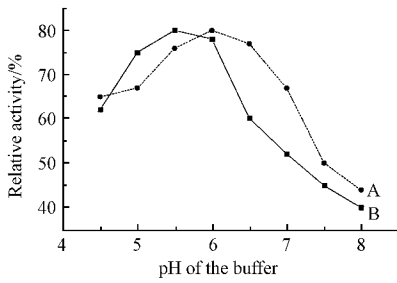


图6 酶固定化前后对 pH 值的稳定性
Fig.6 Effects of pH on the stability of (A) immobilized enzyme ;(B) free enzyme

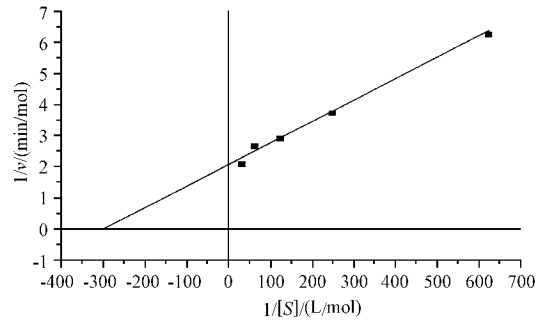


图8 双倒数作图法求固定化酶的 K_m 值
Fig.8 Schematic Lineweaver-Burk plot of $1/v$ against $1/[S]$ for immobilized enzyme

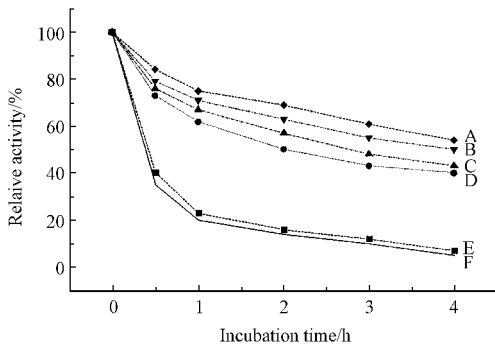


图7 酶固定化前后的热稳定性

Fig. 7 Thermostability of (A) immobilized enzyme at 30°C , (B) immobilized enzyme at 30°C with KCl , (C) immobilized enzyme at 35°C , (D) immobilized enzyme at 35°C with KCl , (E) free enzyme at 30°C , and (F) free enzyme at 35°C

3.5 固定化酶的 K_m 值

根据固定化酶催化黄曲霉毒素 B1 的 $[S]^{-1} \cdot v^{-1}$ 的关系(表3)。通过双倒数作图法得到固定化酶 $K_m = 3.308 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (图8)。经固定化处理后酶的亲和性有所下降(游离酶的 K_m 为 $2.16 \times 10^{-6} \text{ mol/L}^{[11]}$)。

表3 固定化酶 K_m 值的测定

Table 3 K_m values of the immobilized enzyme*

$[S]$ (mol/L)	$(1/[S])(\text{mol/L})^{-1}$	v (mol/min)	$(1/v)(\text{mol/min})^{-1}$
1.6×10^{-3}	625	1.600×10^{-3}	6.250×10^2
4.01×10^{-3}	249.4	2.687×10^{-3}	3.722×10^2
8.01×10^{-3}	124.8	3.452×10^{-3}	2.897×10^2
16.0×10^{-3}	62.5	3.775×10^{-3}	2.649×10^2
32.1×10^{-3}	31.15	4.840×10^{-3}	2.066×10^2

* The correlation coefficient of $1/[S] \cdot 1/v$: $\gamma = 0.9968$

4 讨论

在酶固定化中疏水的影响最重要的是保持生物大分子的立体结构和生理功能。水溶液中离子键、氢键以及水分子的强极性使得亲水作用成为维持生物大分子的主要因素。由于这个原因使用疏水固定化载体当然也要提供一个水溶液以适应上述的情况。本研究的结果表明经固定化处理,黄曲霉毒素解毒酶的稳定性显著增加,固定化酶的解毒活性被明显地保留下来。这为实际开发应用该酶提供了一个有用的理论依据。

黄曲霉毒素(AFT)为黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物,是农作物常见的霉菌毒素污染物。易被黄曲霉毒素污染的农作物包括花生、玉米、大米、棉籽、水果干品、坚果、调味料、无花果、植物原油、可可豆、干椰肉等,甚至牛奶和奶制品,如牛的饲料中污染了黄曲霉毒素时,奶中可以检出该毒素^[7]。通过食物和食物链而使人类染毒是目前一个尚未被阻断的途径。AFT对人类的危害是十分严重的。WHO(世界卫生组织)公布的流行病学的调查结果表明黄曲霉毒素与原发肝癌、肺癌有关^[8,10,11]。特种人群如乙肝病毒携带者、吸烟者等,对黄曲霉毒素的敏感程度远远高于正常人群,尤其是乙肝病毒携带者,或肝脏某些酶变异体患者,摄入黄曲霉毒素而引起肝癌的危险性大约高出30倍^[9]。因此,尽可能降低黄曲霉毒素在食品或调味品中的含量尤其是对于乙肝病毒高发地区依然不可忽视^[10]。

尽管关于黄曲霉毒素的解毒、去毒方法有众多的报道,但食品加工业采用的仅限于紫外线照射、碱洗、使用含氯的氧化剂等方法或小量情况下使用物理吸附的办法,这方法都不同程度存在局限性,探讨新的去毒方法,如生物技术方法等是寻找新出路一个可尝试的有效途径。

REFERENCES (参考文献)

- [1] LIU D L (刘大岭), YAO D S (姚冬生), CHEN M F (陈敏峰). Study on detoxification of aflatoxin B1 by the crude extract of fungi E-2. *Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy* (广东药学院报), 1995, **1**(2): 92 - 94
- [2] LIU D L, YAO D S, LIANG R *et al.* Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armill.* *Food and Chemical Toxicology*, 1998, **36**: 563 - 574
- [3] LIU D L, YAO D S, LIANG Y Q *et al.* Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armill* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*, 2001, **39**: 461 - 466
- [4] LIU D L (刘大岭), YAO D S (姚冬生), LIANG R (梁仁). Study on the cultural conditions affecting the aflatoxin B1 detoxification efficiency of fungus E-2. *Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy* (广东药学院报), 1996, **1**(3): 166 - 168
- [5] MA L, WANG X T, YOU D L *et al.* Immobilization of prostaglandin synthetase by hydrophobic adsorption. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **56**: 223 - 233
- [6] MA L, YU Z, CHENG Y H *et al.* Immobilization of aspartase by hydrophobic adsorption and the properties of immobilized aspartase. *Chin Biochem J*, 1991, **7**(6): 671 - 678
- [7] Wilson D M, Payne G A, Groopman J. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. San Diego: Academic Press, 1994, pp. 309 - 322
- [8] Massey T E, Smith G B J, Tam A S. Mechanisms of aflatoxin B1 lung tumorigenesis. *Experimental Lung Research*, 2000, **26**: 673 - 683
- [9] Henry S. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (WHO Food Additives Ser. 40). Geneva, Switzerland, 1998, pp. 359 - 468
- [10] Henry S H, Bosch F X, Troxell T C *et al.* Liver cancer-global control of aflatoxin. *Science*, 1999, **286**(12/24), Issue 5449, p2453, 2p
- [11] The evaluation of certain food additives and contaminants. *The report of the 49th Joint FAO/WHO Conference on Food Additives*, 2000, pp. 72 - 77

Characterization of Immobilized Aflatoxin-detoxzyme

LIU Da-Ling¹ YAO Dong-Sheng^{1*} HUANG Bing-He² XIE Chun-Fang¹ LIANG Yu-Qiang¹ MA Lin²

¹(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

²(Guangdong Technology Development Center, Guangzhou 510070, China)

³(Department of Applied Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Aflatoxins, found in contaminated food, are potent hepatocarcinogen. The aflatoxin-detoxzyme (ADTZ) isolated from the edible fungus *Armillariella* sp., detoxifies aflatoxin B1 (AFB1). This paper reports on the characterization of immobilized ADTZ using a hydrophobic adsorption method. The ADTZ was isolated from cryo-homogenated fungus, previously cultivated at 24 ~ 28 °C for 20 ~ 30 days, using *n*-alkyl amino-agar beads. Various adsorption conditions of the enzyme to *n*-alkyl or *n*-octyl amino-agar beads were carried out. The effects of enzyme immobilization on different alkyl amino-agar beads, at different pH values (5.5 ~ 7.5), at different temperature (20 ~ 40 °C) and at different salt concentrations were investigated. The enzyme activity was measured at OD₃₆₀ by reacting 133.3 ng/mL of AFB1 at 30 °C for 30 min with the immobilized ADTZ. The *K_m* value of the immobilized enzyme, determined using Schematic Lineweaver-Burk plot, is 3.308×10^{-3} mol/L, lower than that of free enzyme, which is 2.16×10^{-6} mol/L. This indicated the affinity of the detoxzyme to AFB1 decreased after immobilization. The immobilized enzyme activity in oil-phase (*n*-hexane) was also studied with different concentration of water. After the treatment of the immobilized ADTZ, the toxin no longer causes liver toxicity in the rat toxicity test, no longer causes mutagenicity in Ames test and is no longer toxic in the chicken embryo test. Results also indicated that the pH stability, the thermostability and the freezing stability of ADTZ were improved after the immobilization.

Key words aflatoxins, detoxification enzyme, immobilization

Received: 2003-03-08

This work was supported by a Grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30170808) and Guangdong Province Natural Science Foundation (The Key Projects: No. 010418).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85228422; Fax: 86-20-85228422; E-mail: tldl@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>