

普通脱硫弧菌产氢化酶条件及提取贮存因素研究

李 栋 吕人豪

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 普通脱硫弧菌 D-2 氢化酶在培养基 N 上产量较高。金属螯合剂 EDTA 能增加菌体酶含量, 其最适浓度为 0.02g/L。碱性缓冲液 (含有 EDTA) 在 30 ℃、15 分钟内能抽提约 90% 的周质氢化酶。该酶在低温、充氮条件下能保持很高的起始酶活, 且牛血清白蛋白 (BSA) 能明显增加酶在空气中的稳定性, 但还原的氢化酶纯品氧失活比较明显。

关键词 硫酸盐还原菌; 氢化酶; 牛血清白蛋白 (BSA)

硫酸盐还原菌 (简称 SRB) 是土壤中最常见的厌氧腐蚀菌, 该类菌在形态、生理特征上具有多样性, 其中普通脱硫弧菌则是最常见、最典型的菌株。它们主要通过阴极去极化作用导致材料腐蚀, 其中氢化酶占有重要地位。该酶主要催化 H₂ 的可逆反应, 它广泛地分布在细菌、藻类及一些真核生物中^[1]。Stephensen^[2] 于 1931 年在 SRB 中首次发现氢化酶。多年来, 国外对该酶的提取及纯化的研究有许多报道^[3-5,9,11], 但在提取方法及酶稳定性方面存在不少争论。本文着重研究影响该酶产量、抽提及贮存因素, 为其大量提取和进一步开展其腐蚀作用的研究提供依据和便利。

材 料 与 方 法

(一) 实验菌株

分离自全国土壤腐蚀网长辛店站钢铁埋件, 经鉴定为普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) D-2。

(二) 培养基 (g)

1. 培养基 N: MgCl₂ · 6H₂O 0.06, CaCl₂ · 2H₂O 0.06, KH₂PO₄ 0.5, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 7.0, 柠檬酸钠 0.3, 酵母膏 (Difco) 1.0, Sodium lactate 6.0, 蒸馏水 1000ml, pH 7.2 - 7.5, 1Kg/cm² 灭菌。0.01g FeSO₄ · (NH₄)₂SO₄ · 6H₂O 及 1m mol/L Na₂S 过滤灭菌。

2. 培养基 B: KH₂PO₄ 0.5, CaSO₄ 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 2.0, NH₄Cl 1.0, Sodium lac-

tate 3.5, 酵母膏 1.0, 蒸馏水 1000ml, pH 7.2, 1Kg/cm² 灭菌。V_c、FeSO₄ · 7H₂O 及巯基乙酸均为 0.1g, 过滤灭菌。

(三) 氢化酶纯化及活力测定^[6]

(四) 蛋白测定^[7]

结 果 与 讨 论

(一) 不同培养基对菌生长及产酶量的影响

影响菌体生长及酶含量的因素很多, 其中最为重要的是产酶培养基的选择。将 D-2 菌培养在培养基 N 和 B 上, 定期测定其生长和产酶活性。

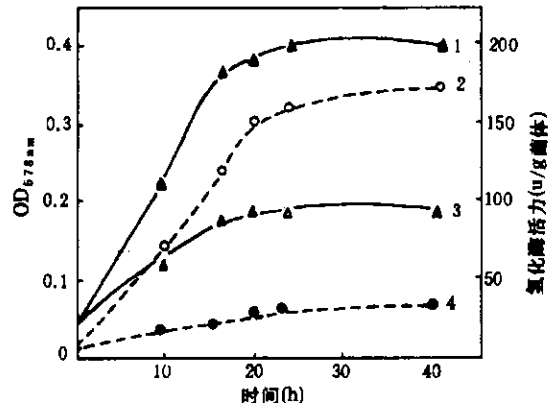


图 1 不同培养基对菌生长及产酶量的影响

1. 培养基 N 的生长, 2. 培养基 N 上产酶量,

图 1 所示, D-2 菌在培养基 N 上的生长及产酶量均明显优于培养基 B。主要是前者中碳、氮含量均较高。此外硫化钠的氧化还原电位比巯基乙酸低, 这样更有利于菌的生长及酶的形成。

(二) 金属螯合剂对菌体酶含量的影响

表 1 金属螯合剂对氢化酶含量的影响

金属螯合剂 (g/L 培养基)	生长 (g/L)	氢化酶	
		总活力 (u/g 菌体)	上清活力 (%)
none	0.60	160	6
Na ₂ -citrate·2H ₂ O 3	0.65	175	/
K-Na-tartrate·2H ₂ O 3	0.62	166	/
Na ₂ -EDTA 0.01	0.66	194	5
Na ₂ -EDTA 0.02	0.67	235	6.5
Na ₂ -EDTA 0.05	0.59	214	9
Na ₂ -EDTA 0.1	0.61	196	16

从表 1 可以看出, 加入的几种螯合剂对菌体生长没有多少影响。但 EDTA 量对氢化酶的产量却有明显影响, 且实验重复性较好。其最适浓度为 0.02g/L (0.054mmol/L), 相当于培养基中每摩尔 Fe²⁺ 对应于 2 摩尔 EDTA。此外, 从表中还可看到随着 EDTA 浓度增加导致氢化酶渗透到培养液中的量也增加, 可能高浓度的 EDTA 会改变细胞壁的通透性。

(三) 菌生长期与酶的胞外分泌

在该菌的生长过程中, 发现有少量氢化酶释放到培养液中, 且在菌生长到稳定期后更加明显 (图 2)。

经过 60 小时的培养, 有近 8% 的氢化酶分泌到培养液中, 且培养基的 pH 升高 (7.2 → 8.5)。而据报道高 pH 或高离子强度会促使革兰氏阴性菌的周质空间蛋白的解离^[8]。该菌的氢化酶主要位于周质空间^[6], 故提取该酶时应在 40 小时左右收集菌体为宜。

(四) 氢化酶的抽提条件

Costerton^[10] 曾报道过革兰氏阴性菌外部蛋白的抽提条件, 我们采用 pH 9.0, 50mmol/L Tris-HCl (内含 50mmol/L EDTA) 在不同温度下, 抽提 45 分钟 (系列 A), 分别测定酶活力和

SRB 在其生长过程中会产生大量的硫化氢, 造成培养基中金属离子沉淀, 且这种沉淀往往是黑色的, 说明 Fe²⁺ 是其中重要的金属离子。因此, 加入 EDTA 和其它金属螯合剂对菌体生长及酶含量影响变得很重要。

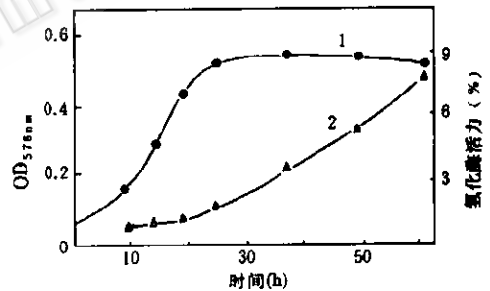


图 2 生长期与菌体氢化酶的分泌

1. 菌体生长, 2. 氢化酶活力

细胞色素 (A_{410nm})。同时选择相同时间, 不同温度 (系列 B) 和 30 °C 下不同时间 (系列 C) 的提取效果, 以求其最佳抽提条件。

表 2 结果表明, 采用以上抽提缓冲液能收集绝大部分氢化酶及细胞色素 (为该酶辅基), 抽提的总酶活力百分数及酶比活力取决于温度、时间及是否加入 EDTA。30 °C、15 分钟能抽提到 89% 的总酶活力, 且酶比活达到最高。随着抽提时间延长, 酶比活逐渐降低, 这表明有其它一些蛋白逐渐被抽提出来。此外, 实验还表明缓冲液及 EDTA 的浓度降低或采用其它缓冲液, 其抽提效果均不理想。

表 2 周质氢化酶的抽提条件

系列	抽提条件			抽提的氢化酶		
				总活力 (%)	酶活 (u/mg)	A _{410nm} (%)
A	4 °C	45min	-EDTA	3	/	3
	4 °C	45min	+EDTA	4	/	100
	37 °C	45min	-EDTA	5	/	2
	37 °C	45min	+EDTA	88	/	100
B	10 °C	45min		20	36	92
	22 °C	45min		76	102	94
	30 °C	45min		90	121	95
C	30 °C	0min		4	22	/
	30 °C	5min		48	190	/
	30 °C	15min		89	205	/
	30 °C	30min		90	184	/
	30 °C	45min		90	137	/

(五) 贮存条件对酶稳定性的影响

关于氢化酶在空气中的稳定性有过不少报道^[3,4,9,11]。一般来讲,该酶对氧气是比较敏感的,其失活程度主要取决于酶所处的状态。

表 3 粗酶及纯酶的失活

时间 (min)	剩余酶活 (%)		纯酶
	粗酶液 培养基 N	培养基 B	
0	100	100	100
2	/	/	41
4	/	43	29
8	/	/	15
15	/	29	11
20	91	19	8
30	/	12	4
45	89	10	3

注: Thunberg 管中加入 BSA(浓度为 0.1mg BSA/每 ml 缓冲液)。

将酶的粗提液和纯酶溶于 pH7.5, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, 浓度为 0.1mg 蛋白/ml 缓冲液, 置于 Thunberg 管中抽除空气。通入氢气保温 30 分钟, 去除 H₂ 后, Thunberg 管暴露于空气轻轻摇动, 然后测定不同时间的剩余酶活。

表 3 所示, 还原态的氢化酶失活速率和程度取决于酶的纯度。粗酶液比纯酶样品失活较少。产于培养基 N 上的氢化酶比培养基 B 稳定性要好得多。与氧化态的氢化酶相比^[3], 还原态的纯酶样品稳定性未受到 BSA 的保护, 空气

中暴露 15 分钟, 有近 90% 的酶活丧失。这表明还原态的氢化酶在空气中很不稳定。

由于该酶在空气中很不稳定, 为此, 对其贮存条件进行探索, 以选择最佳的保存方法。纯酶样品用 pH7.5, 50mmol/L 的磷酸钾缓冲液进行稀释, 浓度为 25μg 蛋白/ml。加入 BSA 的浓度为 0.1mg/ml。

表 4 贮存条件对酶稳定性影响

贮存	时间 (d)	剩余酶活 (%)		
		-20 °C	4 °C	25 °C
空气	14	91	39	10
	35	/	25	/
	56	/	18	/
氮气	14	90	63	55
空气 + BSA	14	95	81	36
氮气 + BSA	14	93	84	64

如表 4 所示, 低温保存时, 酶活丧失很少。-20 °C 保存 14 天, 在空气及氮气中均保持 90% 以上的起始酶活; 4 °C 时, 则分别有 60% 和 40% 的酶活丧失。但相比之下, 厌氧时则酶活丧失较少。此外, 贮存时加入 BSA 则能大大增加酶的稳定性, 这与 Van der Westen^[9] 报道的结果一致。

参 考 文 献

1. Adams M W W et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 371:283 - 298, 1981.

2. Stephenson M & L H Stickland: *Biochem. J.*, **25**:205 — 214, 1931.
3. Van der Westen et al.: *FEBS Lett.*, **86**:122 — 126, 1978.
4. Martin S M et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**:1209 — 1213, 1980.
5. Phakania I P et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**:1 — 4, 1986.
6. 李 栋等: 微生物学报, **30**:267 — 272, 1990 .
7. Bradford M M: *Anal. Biochem.*, **72**:248 — 254, 1976.
8. Costerton J W: *J. Bacteriol.*, **114**:1281 — 1293, 1973.
9. Van der Westen et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **7**:35 — 39, 1980.
10. Costerton J W: *Bacteriol. Rev.*, **38**:87 — 110, 1974.
11. Glick B R et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**:1214 — 1223, 1980.

(1992-4-7 收稿)

FACTORS AFFECTING PRODUCTION, EXTRACT AND STORAGE OF HYDROGENASE FROM *DESULFOVIBRIO VULGARIS*

Li Dong Lü Renhao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

An examination of conditions for the extract and storage of hydrogenase from *D. vulgaris* D-2, with the aim of optimizing hydrogenase production, was reported. The medium N gave 6-7 times as much hydrogenase activity as the medium B. The metal-chelating agents gave a reproducible increasing in hydrogenase activity. The optimum concentration was about 0.02g/l. Nearly 90% of hydrogenase activity was extracted by using the slightly alkaline buffer(containing 50m mol/L EDTA) within 15 min at 30 °C. The enzyme could be stored frozen in air for two weeks with only small losses in activity. The oxidized form of the enzyme was more stable than the reduced form and the addition of bovine serum albumin(BSA) conferred even greater stability than the use of a nitrogen gas phase.

Key words Sulfate reducing bacteria; Hydrogenase; Bovine serum albumin(BSA)