

# TTC-脱氢酶活性测定法的改进

牛志卿 刘建荣 吴国庆

(太原工业大学市政与环境工程系、太原 030024)

**摘要** 以紫色非硫光合细菌、枯草芽孢杆菌为材料,改进了 TTC-脱氢酶活性的测定方法。在该法中样品不需处理,在常温下用三氯甲烷代替丙酮萃取,液-液分层效果好,显色稳定但不褪色。对测定中的诸多影响因素也作了研究,确定了改进后的脱氢酶活性测定的最佳条件。

**关键词** 脱氢酶,脱氢酶活性,紫色非硫光合细菌,枯草芽孢杆菌

废水生物处理及活性污泥消化的实质,是经微生物所产生的多种酶催化一系列的生物氧化还原反应。其中,脱氢酶能使被氧化有机物的氢原子活化并传递给特定的受氢体。因而,脱氢酶的活性可以反映处理体系内活性微生物量及其对有机物的降解活性,以评价降解性能。也可应用该酶活性做为检测金属对活性污泥的毒性指标。因此,脱氢酶活性的检测在废水生物处理中甚为重要。

测定脱氢酶的方法很多<sup>[1-3]</sup>,目前应用较多的是氯化三苯基四氮唑(TTC)法<sup>[4]</sup>。该法主要选用无色的 TTC 做为人为受氢体,受氢后生成深浅不同的红色三苯基甲腈(TF)。原法用

丙酮作为 TF 的萃取剂,溶液显色不稳定,易褪色。采用三氯甲烷代替丙酮在常温下进行萃取,操作条件简单,易掌握,经济实用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**紫色非硫光合细菌(Purple nonsulfur photosynthetic Bacteria 简称 PSB)由本组分离筛选。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 简称 B. S)由山西医学院提供。

**1.1.2 培养基:**YP 培养剂<sup>[5]</sup>或修改后的 Van

Niel 液体培养基<sup>[6]</sup>。

1.1.3 菌液:取培养好的新鲜菌液,5000r/min 离心 40 分钟。弃去上清液,称菌体湿重,用蒸馏水配成浓度为 30g/L 的待用菌液。

1.2 主要试剂

氯化三苯基四氮唑 (TTC)-葡萄糖标准溶液: TTC0.1g 与葡萄糖 1g 共溶于 100ml 蒸馏水中,棕色试剂瓶保存,一周更换一次。

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-HCl 缓冲溶液。pH8.4。

三氯甲烷 (分析纯)。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制:在分液漏斗中,分别加入不同量的 TTC-葡萄糖标准溶液, Tris-HCl 缓冲溶液 2ml 及足量的连二亚硫酸钠,摇匀;待溶液充分显色后,准确加入三氯甲烷溶液 5ml 进行萃取,放置片刻;待溶液分层后,移至 1cm 比色皿中。以试剂空白作对照,用 721 分光光度计在波长 485nm 处测对应的吸光度 (A) 值,对脱氢酶活性作图,绘制标准曲线。

1.3.2 脱氢酶活性的测定:分别准确取定量的实验待用菌液,各加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2ml 和 TTC-葡萄糖标准溶液 2ml,置于 37±1℃ 恒温培养箱中,反应 2 小时显色后,准确加入三氯甲烷溶液 5ml,在常温下进行萃取。其余步骤同标准曲线绘制。在上述条件下,将 1 小时产生 1μgTF 的量定义为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 萃取剂的选择

脱氢酶与 TTC 反应生成 TF。TF 颜色越深说明脱氢酶的活性越高。因而 TF 的萃取是关键所在。首先对文献中已报道的丙酮、乙醇、正丁醇三种萃取剂及本实验新选用的三氯甲烷萃取剂进行了筛选。按照标准实验方法,反应完毕后,在常温下进行萃取。实验结果表明(表 1)。

表 1 不同萃取剂的吸光度 (A) 值

萃取剂 菌种	三氯甲烷	丙酮	乙醇	正丁醇
PSB	0.475	溶液混浊	不分层	0.251

在同等条件下,丙酮作萃取剂溶液发生混浊,显色不稳定。三氯甲烷作萃取剂,液-液分层好,显色稳定,吸光度 (A) 值最大;萃取完毕,只须在分液漏斗下口放少许脱脂棉,萃取液直接放入比色皿中即可测定。所以三氯甲烷是一种较理想的萃取剂。

萃取时间的比较结果表明,当萃取 1、2、3、4、5 分钟时以 3 分钟最适宜。操作时要连续不断振摇,注意放气,否则会影响 (A) 值。

2.2 缓冲液的选择

将不同种类的缓冲液都调至 pH8.4,分别加入反应液中。实验结果表明(表 2),从反应液的 (A) 值及溶液反应后的 pH 值变化情况来看,选用 Tris-HCl 缓冲液较好,因为该缓冲溶液有较大的缓冲能量。

表 2 不同缓冲溶液的吸光度 (A) 值

缓冲溶液 菌种	Tris-HCl		巴比妥钠		磷酸盐		硼酸盐	
	A	反应后 pH	A	反应后 pH	A	反应后 pH	A	反应后 pH
B.S	0.058	8.4	0.044	7.0	0.054	7.0	0.055	7.5
PSB	0.175	8.4	0.167	7.0	0.140	7.0	0.100	7.5

### 2.3 pH 值对酶活性的影响

在不同 pH 值条件下进行反应, 测其相对应的酶活力。结果表明, 两种菌株脱氢酶反应的 pH 值适应范围为 7—9, 最适 pH 值为 8—8.4。

### 2.4 温度对酶活性的影响

分别于不同温度条件下进行反应, 测不同温度时相对应的酶活力。结果表明, 枯草芽孢杆菌耐热性强, 脱氢酶的活性在 35—45℃ 最高; 而光合细菌酶活性的适应范围较广, 为 25—40℃, 最适反应温度在 30—40℃。

### 2.5 显色时间对酶活性的影响

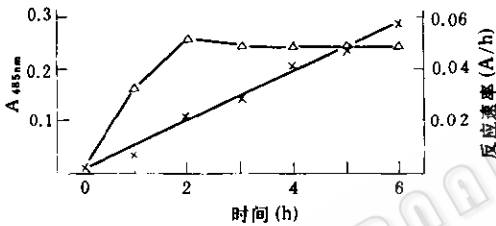


图1 B.S 脱氢酶反应时间与反应速率

× 反应时间    △ 反应速率

### 2.6 终止剂的选择

文献报道的终止剂有多种, 如硫酸、乙醇等。本实验采用反应完毕后立即萃取测定, 并与从培养箱中取出在室温下放置 10 分钟后萃取相比较。二者酶活性误差 < 0.5%, 因此, 可不使用终止剂。

在标准实验条件下进行反应, 每隔 1 小时取样测其酶活性。结果表明 (图 1, 图 2), B.S 在一定时间内, 反应时间越长, 反应液的 TF 颜色越深, 吸光度 (A) 值越大; 但随着时间的延长, 反应速率 (A/h) 趋于平缓, 反应到 2 小时最佳。此时显色达到高峰, 反应速率最大。PSB 在 4 小时后脱氢酶的活性逐渐降低, TF 色度变浅。这可能是由于 PSB 在氧化还原作用下破坏了 TF 的共轭体系, 有待进一步研究检验。对不同菌龄的 PSB 及枯草芽孢杆菌作了显色时间的比较。结果表明, 幼龄菌体反应较快, 老龄菌体反应较慢。因此, 显色时间与菌龄有关。

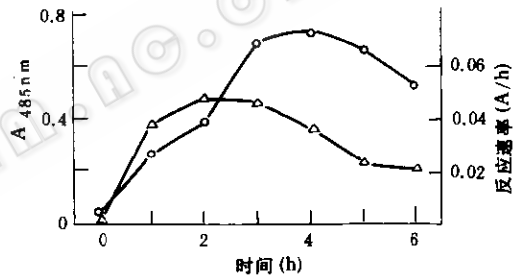


图2 PSB 脱氢酶反应时间与反应速率

× 反应时间    △ 反应速率

### 参 考 文 献

- [1] Lenhard G *et al.* *Water Pollution Res.* 1965, 2: 105—109.
- [2] Hirayama. *Water Res.* 1986, 20 (4): 491—492.
- [3] Klapwijk A *et al.* *Water Res.* 1974, 8 (2): 121.
- [4] 俞毓馨等. *环境工程微生物检验手册*. 北京: 中国环境科学出版社, 1990, 163—165.
- [5] 吴永强等. *微生物学通报*. 1984, 11 (1): 17.
- [6] 郑士民等. *自养微生物*. 北京: 科学出版社, 1983, 192—193.