

排硫硫杆菌 D6 中硫化氢脱氢酶的纯化及性质

李咏兰* 邱广亮 吕桂芬 王忠魁 张明斗 李斌

(内蒙古师范大学 生物工程研究中心 内蒙古 呼和浩特 010022)

摘要: 从烟气生物脱硫系统的好氧产硫磁性稳态流化床反应器中, 经反复纯化分离出脱硫优势菌排硫硫杆菌菌株 D6, 采用四步工艺纯化出膜结合型硫化氢脱氢酶。SDS-PAGE 测定显示其由 $\alpha_1\beta_1$ 亚基组成, 光谱分析表明含有 1 mol FAD/mol 酶, 血红素染色揭示小亚基上结合有 1 mol 血红素 c/mol 酶, 该酶属于氧化蛋白家族。该酶的最适 pH 为 8.6, 对马心细胞色素 c 和硫化物的表现 K_m 分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 6.1 $\mu\text{mol/L}$, 反应计量实验表明其氧化产物为元素硫。硫化氢脱氢酶受到硫和亚硫酸盐的抑制, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的氰化钾对该酶抑制率达 72%。

关键词: 硫化氢脱氢酶, 排硫硫杆菌, 硫化氢氧化, 硫代谢, 烟气生物脱硫

Purification and characterization of hydrogen sulfide dehydrogenase from *Thiobacillus thioparus* D6

LI Yong-Lan* QIU Guang-Liang LV Gui-Fen WANG Zhong-Kui
ZHANG Ming-Dou LI Bin

(Center of Biotechnology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot, Inner Mongolia 010022, China)

Abstract: A novel membrane-bound hydrogen sulfide dehydrogenase was purified to homogeneity by a four-step procedure from *Thiobacillus thioparus* D6, an neutrophilic, obligately chemolithoautotrophic bacteria obtained from aerobic magnetic stabilized fluidized bed reactor of flue gas biodesulfurization system. The natural hydrogen sulfide dehydrogenase had a molecular mass of 95 kD and comprised two subunits named α and β with molecular masses of 42.6 kD and 51.3 kD determined by exclusion chromatography and SDS-PAGE. Spectral and pyridine hemochrome analysis revealed that the enzyme contained 1 mol flavin and 1 mol haem c per mol $\alpha\beta$ hydrogen sulfide dehydrogenase, assumed a characteristics of the member of redox proteins. Biochemical determination and nonlinear regression analysis showed that the sulfide dehydrogenase catalyzed sulfide-dependent horse heart cytochrome c reduction at the optimum pH of 8.6 with a k_{cat} of 32.4 s^{-1} , a K_m of 6.1 $\mu\text{mol/L}$ for sulfide, and a K_m of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ for cytochrome c. The yield of 1.9 mol of cytochrome c reduction per mole of sulfide suggested that the product was sul-

fur or polysulfide. The activity of the sulfide dehydrogenase was inhibited by sulfur and sulfite like that cyanide (100 $\mu\text{mol/L}$) inhibited sulfide dehydrogenase activity at pH 6.0 by 72%.

Keywords: Sulfide dehydrogenase, *Thiobacillus thioeparus*, Sulfide oxidation, Sulfur metabolism, Flue gas biodesulfurization

硫化氢能被好氧化能自养菌和厌养光能硫细菌氧化, 氧化反应由不同的酶催化^[1-4]。黄素细胞色素 c 硫化氢脱氢酶(FCSDs)在体外可从硫化氢分子上转移 2 个电子到马心细胞色素 c^[5-6], FCSD 是一个含有细胞色素 c 的黄素蛋白复合体, FCSD 最早从光养型紫色硫细菌 *Allochrochromatium vinosum* 分离得到^[5], 随后相继从其它光养型紫色和绿色硫细菌以及化能自养型硫氧化菌 *Thiobacillus* W5 中分离得到^[1-4,7-10]。不同来源的 FCSD 的催化特点、光谱、电化学、结构性质及存在的细胞部位各具特点, *A. vinosum* 中的可溶性 FCSD 是由黄素蛋白 FccB 和二血红素细胞色素 FccA 组成, 其分子量为 21 kD^[10-14]。绿色硫细菌 *Chlorobium limicola* 的 FCSD 也是一种可溶性黄素蛋白复合物 SoxF1, SoxF1 是分子量为 11 kD 的单血红素细胞色素 c^[15-16], 光养型绿色硫细菌 *Ectothiorhodospira vacuolata* 的 FCSD 是分子量为 9 kD 的单血红素细胞色素 c 复合物, 且存在于膜上^[17], 化能自养型硫氧化菌 *Thiobacillus* W5 与此类似^[18]。*A. vinosum* 和 *Chlorobium* species 的基因组数据均支持 FCSD 是细胞质型的^[18], 因此, 不同来源的 FCSDs 其细胞定位、细胞色素类型均有差异^[17-18], 体外 FCSD 的硫化氢脱氢酶活性可以反映其体内功能, 但是, *A. vinosum* 的 FCSD 细胞色素的失活并未影响硫化氢的光养型生长^[19]。同样, *Paracoccus pantotrophus* 的 SoxF 的失活并未阻止菌株 GBsoxF Δ 营氧化硫代硫酸盐生长^[20], 而光养型和化能自养型细菌的其它 sox 基因的突变所致影响却并非如此。涉及硫氧化过程的这些黄素蛋白显然是由硫代硫酸盐或硫化氢诱导产生的^[11,17,20], 但这些菌的 sox 基因簇上的各个基因的位置、依赖于硫的能量代谢还不清楚。*P. pantotrophus* 的 sox 簇编码 4 种细胞质蛋白, 并组成硫氧化(Sox)酶系统。这种酶系统在体外将硫化氢、硫、硫代硫酸盐、亚硫酸盐的电子转移到马心

细胞色素 c 分子上。SoxF 也位于细胞质中, 但并非该系统组分, 其菌体内功能还不清楚^[17]。*P. pantotrophus* 的 SoxF 的一级结构与 *A. vinosum* 的 FccB 具有 37%的同源性^[17], 与 *C. limicola* 和 *Chlorobium tepidum* 有 46%的同源性^[20], 而且 *P. pantotrophus* 与 *E. vacuolata* 的 FCSD 黄素蛋白具有顺序相似性^[9], *P. pantotrophus* 的 SoxF 一级结构与其它黄素蛋白非常相似, 天然梯度凝胶电泳说明 SoxF 是单体蛋白, 但未报道其酶活性。因此, SoxF 的结构和生物化学性质需要复查。

本文从烟气生物脱硫系统中的好氧产硫磁性稳态流化床反应器(aMSFBR)中经反复分离得到优势分离菌 *Thiobacillus thioeparus* D6。对其培养物经破碎、粗提、纯化, 得到膜结合型的依赖于马心 cyt c 的硫化氢脱氢酶, 并对该酶的催化特性及电化学性质进行了表征。为排硫硫杆菌的硫化物氧化途径的阐明提供理论依据, 进而为烟气 SO₂ 生物脱硫系统的高效优化运行提供理论和实践指导。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和培养条件

从烟气生物脱硫系统的好氧产硫磁性稳态流化床反应器中收集磁珠固定化菌样, 经反复纯化分离出脱硫优势菌排硫硫杆菌菌株 D6。将菌株 D6 接入含有 250 mL 培养基的锥形瓶中, 在 pH 8.0、30 °C 进行好氧种子培养^[13]。培养基成分(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 3.03, (NH₄)₂SO₄ 1.98, Na₂CO₃ 1.00, MgCl₂·6H₂O 0.09, FeCl₃·6H₂O 0.03, KH₂PO₄ 1.80, CaCl₂ 0.03, MnCl₂·4H₂O 0.032, Na₂S₂O₃·5H₂O 15.69。采用 300 L 的发酵罐(Bioengineering, Wald, Switzerland)进行扩大培养, 磷酸缓冲液 1×10⁵ Pa 加热灭菌 60 min, 矿物盐溶液煮沸后过滤灭菌, 起始硫代硫酸盐浓度为 20 mmol/L, 发酵罐中接入 2 L 种子培养液, 通气速率为 0.38 L 空气, 3 mol/L 碳酸钠溶液调

节 pH 恒定在 8.0, 当硫代硫酸盐耗尽时补加硫代硫酸盐浓度至 20 mmol/L。当细胞生长至平台期且耗氧率为 2.9–3.8 mmol/L O₂ 时收集菌液, 菌液迅速冷却至 10 °C, 5 200×g 离心 10 min, -20 °C 下贮存备用。

1.2 硫化氢脱氢酶的纯化

所有过程均在 pH 8.5、4 °C 下进行, 层析过程均在 LKB 工作站中完成。取上述收集的分离菌体(湿重) 20 g 悬浮于 400 mL 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 超声破碎仪(USA, NUAIR)破碎 20 min, 再加入 DNA 酶消化, 然后 10 000×g 离心 30 min, 除去细胞碎片。上清液置于超速离心机(8 M, Beckman)下, 200 000×g 离心 4 h, 沉淀为膜部分。膜沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 冲洗, 然后悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 中, 4 °C 下加入 1% Triton X-100, 作用 1 h, 使膜沉淀完全溶解。在 200 000×g 离心 6 h, 然后, 上清液加入到预先用 50 mmol/L 的内含 0.05% Triton X-100 的 Tris-HCl (pH 7.5) 平衡过的 DEAE-52 纤维素柱中(5 cm×40 cm; LKB), 用 1 000 mL 的 KCl 线性浓度梯度溶液(0–0.5 mol/L KCl)进行洗脱, 流速为 2 mL/min。收集活性部分并采用冷冻真空干燥仪(FTS, USA)浓缩。浓缩液加入预先用 0.1 mol/L 的内含 0.2 mol/L KCl 和 0.1% Triton X-100 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 平衡过的 Sephadex G-150 层析柱中(5 cm×40 cm; LKB), 控制流速 0.5 mL/min, 采用含 0.1% Triton X-100 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 进行洗脱, 控制流速 0.5 mL/min, 收集活性峰部分, 用于硫化物脱氢酶纯度鉴定及性质研究。

1.3 酶活力分析

硫化氢脱氢酶活力测定^[14]采用如下标准反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 25 μmol/L 马心细胞色素 c (Sigma), 10 μmol/L Na₂S 和酶。反应总体积 1 mL, 活力测定在 25 °C 下进行, 以加入硫化物为反应开始。使用紫外-可见分光光度计(Lab Tech, Germany)在 550 nm 下测定马心细胞色素 c 被还原后的光密度值[消光系数 $\epsilon=19.6 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$]。一个酶活力单位定义为: 每分钟还原 1 μmol 马心细胞色素 c 所需的酶量。

1.4 性质表征

1.4.1 分子量: 采用 PAGE (12%) 和 SDS-PAGE (12%) 进行电泳, 以改进的银染法进行染色, 计算分子量。硫浓度采用 Cyanolysis 法^[16]测定。蛋白浓度采用考马斯亮蓝法^[17]进行测定。

1.4.2 光谱性质: 纯化后的酶溶于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 采用紫外/可见分光光度计进行光谱扫描分析。光谱带宽 1 nm, 扫描速率 2 nm/s。酶溶液中加入硫化物并使其终浓度为 10 μmol/L, 然后进行全波长扫描得到酶还原后的光谱图。采用嘧啶血色素法^[15]测定血红素含量。

1.4.3 底物和抑制剂: 分别以硫代硫酸钠(1 mmol/L)、连四硫酸钾(1 mmol/L)、连三硫酸钾(1 mmol/L)、连五硫酸钾(1 mmol/L)、亚硫酸钠(1 mmol/L)、硫(10 mmol/L)和聚硫(10–25 μmol/L)作为底物测活。一定浓度的聚硫溶液采用如下方法制备: 含 10 mmol/L Na₂S 和 100 mmol/L 元素硫的混合液置于 110 °C 加热 10 min。含酶混合物加入不同抑制剂后在 25 °C 预培养 5 min, 然后使用上述酶活测定方法对该酶的抑制剂进行研究。所用抑制剂如下: 叠氮化钠(1 mmol/L), EDTA (1 mmol/L), N-乙基马来酰亚胺(1 mmol/L), 氰化钾(0.025–1 mmol/L), 亚硫酸钠(0.05–2 mmol/L)和硫代硫酸钠(0.05–2 mmol/L)。

1.4.4 动力学常数测定: 酶动力学常数采用 Windows version 2.01 (Micro-Math Research, St. Louis, MO) 软件通过线形回归进行分析。

2 结果与分析

2.1 硫化氢脱氢酶的性质

从 MSFBR 磁性固定化菌群中分离到优势分离菌 *Thiobacillus thioparus* D6, 菌株 D6 在发酵罐中经硫代硫酸盐和硫化钠限制性基质于 pH 8.0 下扩大培养, 细胞耗氧率达 3.0–3.5 μmol/L, 高效氧化硫化氢和硫代硫酸盐。菌液超声破碎后, 破碎液未检测到耗氧率, 也未检测到硫代硫酸盐、铁氰化钾氧化还原酶和硫代硫酸盐; cyt c 氧化还原酶的活性, 含有 cyt c 的膜部分也未检测到上述 2 种酶的活性, 但硫化钠、马心细胞色素 c 氧化酶在 pH 9.0 时的活力为

270–320 nmol/(L·mg protein·min)。超离心后,膜部分硫化钠、马心细胞色素 c 氧化酶的活性很高,上清液活性很低,采用非离子型表面活性剂 Triton X-100 溶解膜上的酶,由于 Triton X-100 的抑制作用,酶活力有一定损失,因此后续的纯化选择

0.05%的 Triton X-100 缓冲液进行洗脱。粗提液过 DEAE-52 离子交换层析柱,收集活性峰部分,并经 Sephadex G-150 凝胶过滤,合并活性峰部分,最终得到浓度为 8.0 g/L 的均质酶溶液。纯化过程见表 1。

表 1 从排硫硫杆菌菌株 D6 中纯化出结合型硫化氢脱氢酶过程
Table 1 Purification of a membrane-bound sulfide dehydrogenase from *Thiobacillus thiooparus* D6

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Recovery (%)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)
Crude extracts	465.6	118.6	100	0.26	1.0
Membranes	119.0	72.3	61.0	0.61	2.4
Triton X-extraction	69.4	45.6	38.5	0.66	2.5
DEAE-52	8.8	14.7	12.4	1.67	6.4
Gel filtration	1.3	7.8	6.6	6.0	23.1

纯化分子的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定(图 1)。

图 1A 为 PAGE 凝胶电泳,单一条带表示纯化分子纯度很高。纯化后的酶经 SDS-PAGE,显示 2 条蛋白带(图 1B),计算出两条带的分子量分别为 51.3 kD 和 42.6 kD。采用凝胶过滤法测定的纯化的硫化氢脱氢酶分子量为 95 kD,说明硫化氢脱氢酶由大小 2 个亚基组成,小亚基分子量为 42.6 kD,大亚基分子量为 51.3 kD,属于异二聚体。该酶的紫外/可见光谱数据与文献[18]中的那些从光能自养微生物中分离出来的酶比较,进一步证明本试验分离得到的酶是一种异型二聚体。SDS-PAGE 的血红素染色表明小亚基上共价结合了血红素 c,通过测定血红素复合物的最大吸收确定 1 mol 的硫化物脱氢酶含有 1.09 ± 0.4 mol 的血红素 c,这说明血红素 c 与酶的摩尔比为 1:1。

纯化分子的光谱特征见图 2。硫化氢脱氢酶经空气氧化后的吸收光谱为 377 nm、448 nm 和 482 nm,377 nm 和 448 nm 是核黄素的特征吸收光谱(图 2A)。经硫化物还原后的酶的紫外、可见吸收光谱在 416 nm (γ 带)、521 nm (β 带)和 551 nm (α 带)下显示特征最大吸收(图 2B),这说明存在 c_{552} 血红素。连二硫酸钠不增加该酶的还原水平,说明硫化物能完全还原该酶。

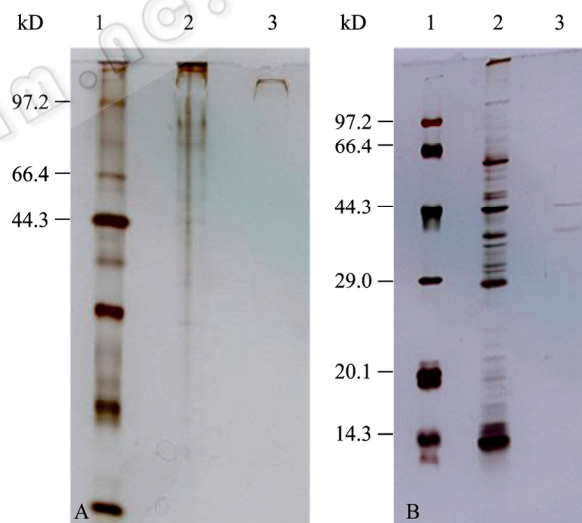


图 1 硫化氢脱氢酶电泳后经银染的 PAGE 和 SDS-PAGE

Fig. 1 Polyacrylamide gel and silver-stained SDS-polyacrylamide gel after electrophoresis of the sulfide dehydrogenase

注: A: PAGE: 1: 银染后的标准蛋白; 2: 粗提液蛋白; 3: 银染后的 3 μ g 纯化蛋白。 B: SDS-PAGE: 1: 银染后的标准蛋白; 2: 过 DE-52 柱层析蛋白; 3: 银染后的 3 μ g 纯化蛋白。

Note: A: PAGE: 1: Standard protein after silver-stained; 2: Crude extracting solution protein; 3: 3 μ g purified protein after silver-stained. B: SDS-PAGE: 1: Standard protein after silver-stained; 2: Column chromatograph protein by DE-52; 3: 3 μ g purified protein after silver-stained.

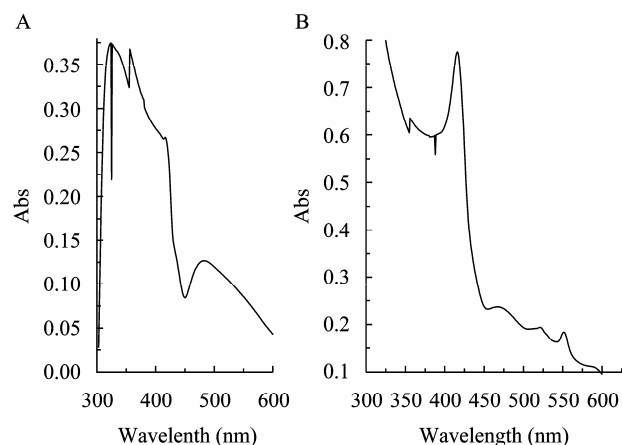


图 2 纯化的硫化氢脱氢酶的吸收光谱

Fig. 2 UV/visible absorption spectrum of purified sulfide dehydrogenase (1.8 $\mu\text{mol/L}$)

注: 光谱扫描范围(300–600 nm). 室温下采用 LAB 仪进行分析.

A: 空气氧化后的光谱图; B: 硫化物还原后的光谱图.

Note: The scope of optical scanning (300–600 nm). Analyzed by LAB at room temperature. A: The spectrogram after atmosphere oxidized; B: The spectrogram after sulfide recovered.

从 MSFBR 中分离得到的优势分离菌 *Thiobacillus thioeparus* D6 中纯化获得的硫化氢脱氢酶与文献中的 *Thiobacillus* sp. W₅ 以及 2 种光能自养菌中分离到的黄素细胞色素 c 的光谱特征和结构

特点进行比较(表 2)。光谱性质表明该酶与氧化还原蛋白家族有关, 属于黄素细胞色素 c 类。到目前仅报道 2 种黄素细胞色素 c 具有硫化物氧化活性, 这 2 种黄素细胞色素 c 最初作为一种功能不清的血红蛋白被分离出来, 来源于光能自养紫色硫细菌 *Chromatium vinosum*^[21] 和光能自养绿色硫细菌 *Chlorobium thiosulfatophilum*^[20]。但是, 直到 1973 年才认识到这些黄素细胞色素 c 是氧化硫化物的酶^[22]。这组酶由于他们的功能是硫化氢脱氢^[23], 因此被命名为黄素细胞色素 c 硫化氢脱氢酶 (FSDH)。吸收比是两类黄素细胞色素 c 的重要特征。表观 $A_{280\text{ OX}}/A_{410\text{ OX}}$ 比值通常被用于确定酶的纯度。本实验分离到的纯酶的 $A_{280\text{ OX}}/A_{410\text{ OX}}=0.90$, $A_{475\text{ OX}}/A_{525\text{ OX}}=1.2$, 表明该酶处于未修饰的核黄素型式^[24], 且 1 mol 的该酶含有 1 mol 的核黄素。用三氯乙酸处理该酶, 上清液未检测到核黄素的吸收峰, 说明核黄素和酶蛋白亚基是通过共价键结合的。*Thiobacillus thioeparus* D6 中分离到的酶结构上似乎更接近于文献中的 *Thiobacillus* sp. W₅ 中的酶, 因为两者均具有一个单血红素细胞色素亚基, 无细胞提取物的硫氧化活性表明该酶属于膜结合型酶^[25]。

表 2 从 *Thiobacillus thioeparus* D6 中纯化获得的硫化氢脱氢酶与从 *Thiobacillus* sp. W₅、*Chlorobium limicola* 和 *Chromatium vinosum* 中分离到的黄素细胞色素 c 的光谱特征和结构特点比较

Table 2 Spectral and structural properties of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from *Thiobacillus thioeparus* D6, *Thiobacillus* sp. W₅, *Chlorobium limicola* and *Chromatium vinosum*

项目 Items	<i>T. thioeparus</i> D6	<i>Thi.</i> ^[23]	Reference	
			<i>Chl.</i> ^[20]	<i>Chr.</i> ^[19]
A_{max} (oxidized, nm)	410, 448, 482	410, 450, 480	410, 450, 480	410, 450, 480
A_{max} (reduced, nm)	416, 521, 551	416, 523, 552	417, 523, 553	416, 523, 552
$A_{280\text{ OX}}/A_{410\text{ OX}}$	0.90	0.95	0.85	0.54
$A_{475\text{ OX}}/A_{525\text{ OX}}$	1.2	1.5	1.5	1.5
MW (Flavocytc, kD)	93.9	51	58	57
MW (FP subunit, kD)	51.3	40	47	46
MW (Cyt c subunit, kD)	42.6	11	11	21
Localisation	Membrane	Membrane	Soluble	Soluble
Haem c (mol/mol)	1	1	1	2
Flavin (mol/mol)	1	1	1 (FAD)	1 (FAD)

Note: *Thi.*: *Thiobacillus* sp. W₅; *Chl.*: *Chl. limicola*; *Chr.*: *Chr. vinosum*.

2.2 催化特性

2.2.1 酶催化反应计量关系的确定: 从 *Thiobacillus thio-parus* D6 中分离到的 FSDH 催化硫化氢还原马心 cyt c 的反应, cyt c 的还原速率是非线性的。为了最大程度地减小硫化物自发化学氧化的影响, 在无氧条件下通过酶活力的测定确定该酶促反应的电子转移化学计量关系。实验结果表明: 1 mol 的硫化物被完全氧化可导致 1.90 ± 0.1 mol 的马心细胞色素 c 还原。这说明在酶的作用下, 大约每个硫化物分子, 失去 2 个电子, 转移给电子受体。因此, 硫化物经该酶催化后, 其氧化产物为零价硫, 可能的反应式为: $\text{HS}^- \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$ 。类似的反应计量关系已在光合硫细菌中被证实, 因为光合硫细菌可产生细胞内或细胞外元素硫。1974 年, Suzuki 提出^[25], 对于大多数硫杆菌, 零价硫是硫化物氧化的中间物。本研究分离到的硫化物脱氢酶也支持了这一结论。

2.2.2 最适 pH: 图 3 表明, 分离到的黄素细胞色素 c 硫化物脱氢酶(FSDH)的最适 pH 为 8.6。在 pH 7.4 和 pH 10.0 时, FSDH 的活性分别比最适 pH 处的活性低 2 倍和 2.8 倍。而且, 马心细胞色素 c 的自发化

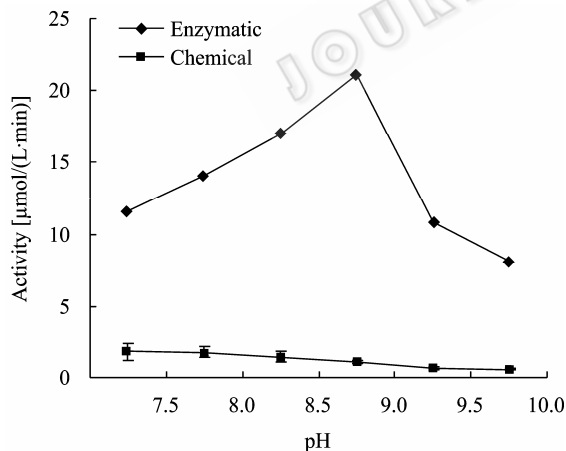


图 3 pH 对马心细胞色素 c 化学还原速率和酶催还原速率的影响

Fig. 3 Effect of pH on the the chemical and enzymatic reduction of horse-cytochrome c

注: 反应体系加酶量为 2 μg . 缓冲液的 pH 通过滴加 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L KOH 来调节。

Note: Enzyme dose was 2 μg in reaction system. The pH of balanced by dropping 0.1 mol/L HCl or 0.1 mol/L KOH.

学还原速率随着 pH 的升高急剧下降, pH 7.4 处的自发化学还原速率是 pH 9.0 处的 9.5 倍, 这些结果说明要精确测定酶的活性, 需要将反应体系的 pH 调节至 pH 8.6, 因为在此 pH 条件下, 马心细胞色素 c 的酶促还原速率最大, 而自发化学还原速率最小, 两者相差 21 倍。

2.2.3 最适温度: 图 4 表明, 随着温度的升高, 分离到的 FSDH 的酶活性增大, 当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活性最高, 以后随温度升高酶活性降低。说明 FSDH 的最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

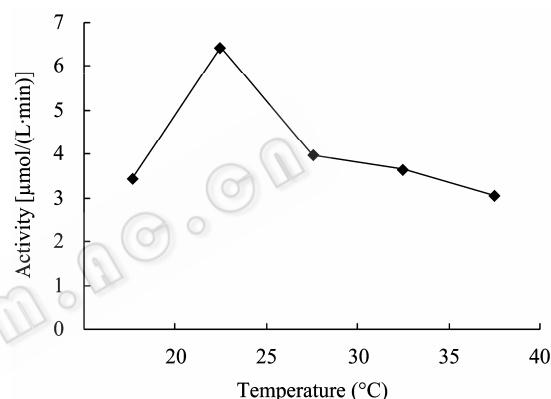


图 4 温度对硫化氢脱氢酶活性的影响

Fig. 4 Effect of the temperature on the activity of sulfide dehydrogenase

2.2.4 动力学常数: 纯化后的 FSDH 的动力学性质通过改变底物浓度, 然后在 pH 8.6 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下分别测定酶促反应速度, 以 $1/S$ 对 $1/V$ 做图, 结果见图 5A 和图 5B。显然, 硫化物的氧化和细胞色素 c 的还原遵循 Michaelis-Menten 动力学。从双倒数图可计算出, 马心细胞色素 c 和硫化物的表观 K_m 分别为 2.5 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 6.1 ± 0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

该酶的最大反应速度等于 469.5 mol cyt c/(mol 黄素细胞色素 c·min)。其催化活力大于 *Chl. limicola* 的 FSDH 最大反应速度 [$V_{\text{max}}=304$ mol cyt c/(mol 黄素细胞色素 c·min)] 和 *Chr. vinosum* 的 FSDH 最大反应速度 [$V_{\text{max}}=7$ mol cyt c/(mol 黄素细胞色素 c·min)]^[24]。即 FSDH 的表观硫化物转换数(摩尔催化活性)为 1943.7 min^{-1} 或 32.4 s^{-1} 。

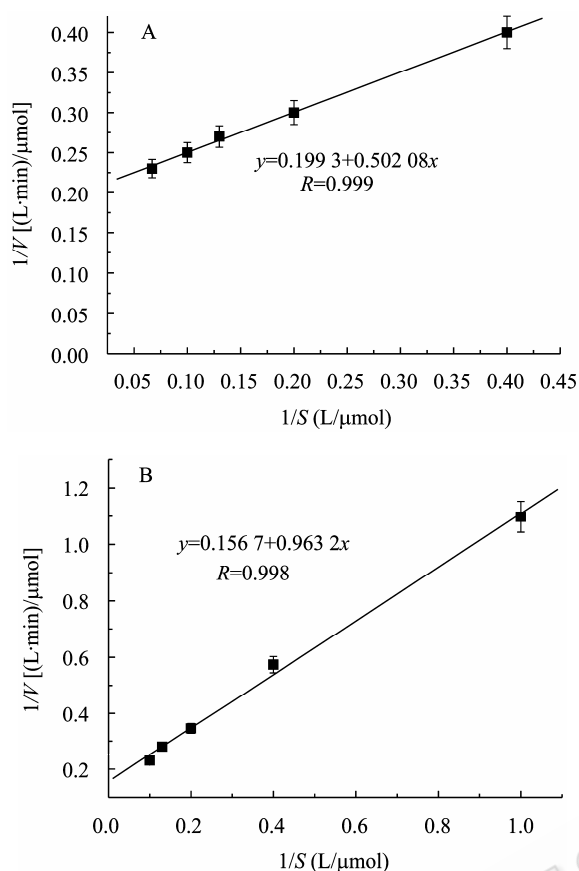


图5 纯化的 FSDH 与底物浓度的相关关系

Fig. 5 Substrate concentration dependence of the purified FSDH

注: A: 马心细胞色素 c 的影响, 硫化物保持 20 $\mu\text{mol/L}$ 不变; B: 硫化物的影响; 马心细胞色素 c 保持 50 $\mu\text{mol/L}$ 不变。

Note: A: Influence of cytochrome c, sulfide remained 20 $\mu\text{mol/L}$ invariably. B: Influence of sulfide, cytochrome c remained 50 $\mu\text{mol/L}$ invariably.

2.2.5 底物和抑制剂: 在纯化的 FSDH 酶活力分析中, 分别用硫代硫酸钠(1 mmol/L)、连四硫酸钾(1 mmol/L)、连三硫酸钾(1 mmol/L)、连五硫酸钾(1 mmol/L)、亚硫酸钠(1 mmol/L)、硫(10 mmol/L)代替硫化物作为底物测活, 发现没有马心细胞色素 c 的还原。而加入聚硫仅有一半 S^{2-} 被还原, 而且 1 mol 聚硫的氧化仅导致 0.04 mol 细胞色素 c 的还原, 这可能是由于聚硫溶液中硫化物的含量极低所致。MSFBR 的好氧培养可快速氧化聚硫。纯化的 FSDH 不能将聚硫氧化成等量的硫, 说明聚硫的氧化除了 FSDH 外还需其它蛋白质参加, 或者由另外一种完全不同的酶催化。因此, 硫化物是该酶的唯一底物。

一底物。

抑制实验表明, 叠氮化钠、硫结合剂(N-乙基马来酰亚胺)、EDTA 金属螯合剂对该酶无抑制作用。该酶 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min 完全失活。2 μg 的该酶分别加入 25、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 的氰化钾后, 酶活性分别被抑制达到 6%、72%、94%。已报道氰化钾可抑制光合硫细菌的酶活性, 因为氰化钾能不可逆地结合到黄素分子上^[26]。试验表明: SO_3^{2-} (2 mmol/L) 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (2 mmol/L) 可以使酶的活力分别降低到 48% 和 32%, 这可能是由于 SO_3^{2-} 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与黄素细胞色素 c 结合所致。

参考文献

- [1] Lane DJ, Harrison AP, Stahl D, et al. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria[J]. J Bacteriol, 1992, 174(1): 269-278.
- [2] Lyric RM, Suzuki I. Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. 3. Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation[J]. Can J Biochem, 1970, 48(3): 355-363.
- [3] Schedel M, Trüper HG. Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of molecular and catalytic properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1979, 568(2): 454-466.
- [4] Toghrol F, Souhland WM. Purification of *Thiobacillus novellas* sulfite oxidase[J]. J Biol Chem, 1983, 258: 6762-6766.
- [5] Meulenberg R, Pronk JT, Hazew W. Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139: 2033-2039.
- [6] Tano T, Kitacughi H, Harada M. Purification and some properties of a tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 60: 224-227.
- [7] Oh JK, Suzuki I. Resolution of a membrane-associated thiosulfate-oxidizing complex of *Thiobacillus novellus*[J]. J Gen Microbiol, 1977, 99(2): 413-423.
- [8] Lu WP, Kelly DP. Partial purification of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus A2*[J]. J Gen Microbiol, 1983, 129: 3549-3564.
- [9] Chen KY, Morris JC. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O_2 [J]. Environ Sci Technol, 1972, 6(6): 529-537.

- [10] Schneider A, Fredrich C. Sulfide dehydrogenase is identical with the SoxB protein of the thiosulfate-oxidizing enzyme system of *Paracoccus denitrificans* GB17[J]. FEBS Letters, 1994, 350(1): 61–65.
- [11] Hazeu W, Batenburg-van der Vegte WH, Bos P, et al. The production and utilization of intermediary sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Arch Microbiol, 1988, 150(6): 574–579.
- [12] Chan CW, Suzuki I. Quantitative extraction and determination of elemental sulfur and stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Can J Microbiol, 1993, 39(12): 1166–1168.
- [13] van den Ende FP, van Gernerden H. Sulfide oxidation under oxygen limitation by a *Thiobacillus thioparus* isolated from a marine microbial mat[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1993, 13(1): 69–77.
- [14] Stefess GC, Torremans RAM, de Schrijver R, et al. Quantitative measurement of sulfur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 45(1/2): 169–175.
- [15] Bartsch RG, Kamen MD. Isolation and properties of two soluble heme proteins in extracts of the photoanaerobe *Chromatium*[J]. J Biol Chem, 1960, 235(3): 825–831.
- [16] Meyer TE, Bartsh RG. The reaction of flavocytochromes c of the phototrophic sulfur bacteria with thiosulfate, sulfite, cyanide and mercaptans[J]. Elsevier, 1968: 312–317.
- [17] Kusai A, Yamanaka T. Cytochrome c is a sulfide-cytochrome c reductase[J]. FEBS Letters, 1973, 34: 235–237.
- [18] Yamanka T, Fukumori Y. A biochemical comparison between *Chlorobium* and *Chromatium* flavocytochromes c//Yagi K, Yamano T. Flavins and Flavoproteins. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1980: 631–639.
- [19] Yamanka T, Kusai A. The function and some molecular features of cytochrome c-553 derived from chlorobium thiosulfatophilum[J]. Elsevier, 1976: 292–301.
- [20] Yamanaka T, Fukumori Y, Okunuki K. Preparation of subunits of flavocytochromes c derived from *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* and *Chromatium vinosum*[J]. Anal Biochem, 1979, 95(1): 209–213.
- [21] Shahak Y, Arieli B, Padan E, et al. Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*[J]. FEBS Lett, 1992, 299(2): 127–130.
- [22] Arieli B, Shahak Y, Taglicht D, et al. Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*[J]. J Biol Chem, 1994, 269(8): 5705–5711.
- [23] Visser JM, de Jong GAH, Robertson LA, et al. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp.[J]. W5 Arch Microbiol, 1996, 166: 372–378.
- [24] Shahak Y, Arieli B, Padan E, et al. Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*[J]. FEBS Lett, 1992, 299(2): 127–130.
- [25] Suzuki I. Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling[J]. Annu Rev Microbiol, 1974, 28: 85–101.
- [26] Meyer TE, Bartsch RG, Cusanovich MA, et al. The cytochromes of *Chlorobium thiosulfatophilum*[J]. Biochim Biophys Acta, 1968, 153(4): 854–861.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名：菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写，其余小写，属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体，首字母大写。

限制性内切酶：前3个字母用斜体，后面的字母和编码正体平排，例如：*Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I等。

氨基酸和碱基的缩写：氨基酸缩写用3个字母表示时，仅第一个字母大写，其余小写，正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体，蛋白质符号首字母大写，用正体。