

厌氧条件下扁藻破碎方法及其对氢酶活性的影响

彦飞^{1,2}, 陈兆安¹, 陆洪斌¹, 虞星炬¹, 金美芳¹, 张卫¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 116023, 大连; 2. 中国科学院研究生院, 100039, 北京)

摘要: 为了分离纯化亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)体内的可溶性氢酶,研究了在厌氧环境下藻细胞的破碎方法,以及各种破碎条件对氢酶活性的影响.实验结果表明,使用超声法在输出功率为400 W、超声为5 s、间歇为10 s、工作20次的条件下,破碎细胞后溶液中总蛋白含量最高,可达2.73 g/L.珠磨法和体积分数为0.2%的Triton X-100法破碎的鲜细胞的氢酶提取效率较高,分别为1.44 U/g和1.27 U/g,其中使用Triton X-100法破碎后的粗提液所含其他蛋白的种类较少.实验的最终目的是获得足够量的氢酶进行下一步纯化,因此Triton X-100法是最合适的方法.

关键词: 亚心型扁藻;细胞破碎;总蛋白浓度;氢酶活性

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2008)04-0497-04

Fragmentation of *Platymonas Subcordiformis* in Anaerobic Environment and Effect on Hydrogenase Activity

YAN Fei^{1,2}, CHEN Zhao'an¹, LU Hongbin¹, YU Xingju¹, JIN Meifang¹, ZHANG Wei¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: To isolate and purify dissolvable hydrogenase in *Platymonas subcordiformis* cells, the scheme for alga cell fragmentation is designed in anaerobic environment, and the effects of experimental conditions on the hydrogenase activity are investigated. By means of ultrasonication, the concentration of total protein approaches to 2.73 g/L under the condition of 400 W output power, 5 s crushing time, 10 s interval for 20 times. The efficiency of hydrogenase isolation gets higher in case of glass beads or 0.2% (volume fraction) Triton X-100 to break up fresh cells to obtain 1.44 U/g and 1.27 U/g respectively, while the other proteins get less in crude extract by Triton X-100 method, which is suggested to gain enough purified hydrogenase.

Keywords: *Platymonas subcordiformis*; cell fragmentation; total protein concentration; hydrogenase activity

随着能源与环境问题日趋严重,氢能的研究和利用也日益受到重视^[1-2].生物制氢是世界各国氢能发展计划中的一个重要组成部分,尽管离实际应用还有很大的距离,然而生物制氢具有常温常压操作、低能耗以及环境友好等特点,是符合氢能经济战略目标的理想的制氢技术,因此世界各国均将其视为氢能制备的关键课题^[3-4].

微藻制氢一直是生物制氢研究的一个重点.绿

藻光解水制氢利用了绿藻体内的可逆产氢酶,催化效率较高,能量消耗较小,生产过程清洁无污染,被认为是目前最有潜力的利用太阳能制氢的方法之一^[5].亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)是本课题组在大连周边海域筛选到的产氢海洋单细胞绿藻,经过调控可实现一定时间持续产氢,其产氢能力与国际上目前研究最深入的淡水莱茵衣藻的水平相当^[6-7].为了提取亚心形扁藻内的可溶性氢酶,奠

定氢酶催化机理及氢酶蛋白结构等方面的研究基础,本实验考察了厌氧条件下亚心形扁藻细胞的破碎方法及其对氢酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 藻种的培养

亚心型扁藻由辽宁省海洋水产研究所提供,在实验室纯化培养。海水取自大连周边海域,砂滤后以 115 °C 高温灭菌,冷却到室温后,每升海水加入 2 mL 康维方营养盐,每升海水中各种盐含量分别为 NaNO_3 100 mg/L, NaHCO_3 168 mg/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, EDTA - Na 45 mg/L, H_3BO_3 33.6 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.36 mg/L, $\text{ZnCl}_2 \cdot 0.021$ mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.009 mg/L^[8]。扁藻置于 3 L 的三角烧瓶中,放在 25 °C、日光灯光源、表面光照度为 4 500 lx、光暗比为 14 h : 10 h 的条件下培养到对数生长期。

1.2 氢酶的诱导

取生长对数后期,细胞浓度为 2×10^6 个/mL 藻液 3 L, 1 500 r/min 离心浓缩 2 min, 倒掉海水后,取鲜藻细胞 10 g, 重新悬浮于 100 mL 灭菌海水中,置于密闭容器中,通氮气 15 min, 排除容器中氧气后,在黑暗中诱导 4 h。

1.3 重悬

在氮气环境中,将藻液平分为 10 份,装于密封离心管中。在 4 000 r/min 下离心 3 min, 到掉海水后,各重悬于 10 mL、50 mmol、pH7.9 的 Tris-Hcl 缓冲液(含 20 mmol 连二亚硫酸钠)中。如不做特殊说明,以后的实验步骤均在氮气环境下进行。

1.4 细胞破碎方法

(1)超声法。将藻液置于 50 mL 离心管中,冰浴内以不同输出功率超声破碎。每次超声时间 5 s, 超声次数 20 次,随功率的增加减小占空比(超声与间歇在定时间内的比值)。具体实验方法见表 1。

(2)反复冻融法。将待处理藻液在 -70 °C 冷冻 0.5 h 后,在 37 °C 水中溶解 5 min, 反复 2~10 次。

(3)化学渗透法。在 3 份藻液中分别加入体积分数为 0.2% 的 Triton X-100、Tween20、司班 80, 另 3 份藻液分别加入质量分数为 0.1% 的乙二胺四乙酸(EDTA)、十二烷基硫酸钠(SDS)和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 用振荡器混旋后,冰浴中孵育 60 min。

表 1 超声法破碎细胞实验方案

方案	占空比/%	输出功率/W	超声次数
1	100	200	20
2	100	300	20
3	50	400	20
4	50	500	20
5	50	600	20

(4)珠磨法。在藻液中加入 3 g 预冷的小玻璃珠,用混旋搅拌器最大强度混旋 3~5 次,每次 1 min, 两次之间置冰上冷却 1 min。

1.5 氢酶活性检测方法

氢酶活性的测定在 6 mL 密闭容器中进行。以 50 mmol 磷酸(pH6.8) 作为反应缓冲液,以被连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 还原的甲基紫精(Methyl viologen, 简称 MV) 作电子供体。反应系统包括终浓度为 10 mmol 的 MV 和 100 mmol 的连二亚硫酸钠及 0.5 mL 破碎后的上清液^[9]。在 37 °C 水浴中振荡孵育 1 h 后,用气相色谱检测氢气组分含量。

1.6 厌氧环境的构建

用超声法、化学渗透法和珠磨法,在 50 L 手套袋中进行细胞破碎。先将需要的试剂、仪器放入手套袋内,抽出袋内空气,通入高纯氮气,重复 3 次,确保袋内为氮气环境,最后进行破碎步骤。反复冻融时将藻液置于离心管内,管盖上加橡胶垫,以保证其密闭性,维持管内厌氧状态。此外,在所有试剂中均加入 20 mmol 连二亚硫酸钠,除去溶液内溶氧。

1.7 上清中总蛋白含量的测定

使用 Bradford 法测定总蛋白含量^[10]。取 200 μL 上清,加入 2 mL 显色液(体积分数为 95% 的乙醇 25 mL, 体积分数为 85% 的磷酸 50 mL, 考马斯亮蓝 G250 35 mg, 加水至 500 mL), 室温下反应 5 min 后,测定 595 nm 处的光吸收值。以 2 mL 显色液加入 200 μL 50 mmol/L Tris-Hcl 缓冲液(pH7.9) 的处理作为空白对照,用牛血清白蛋白做标准蛋白,本步骤在空气环境中进行。

1.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳

为了考察使用不同方法破碎细胞时其他蛋白的释放情况,在收集粗提液后,进行了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,丙烯酰胺质量分数为 12%,用考马斯亮蓝染色。本步骤在空气环境中进行。

2 结果与分析

2.1 化学渗透法破碎效果

采用不同化学试剂对扁藻细胞进行破碎,结果

如图1所示,使用CTAB法和Triton X-100法破碎细胞,可以获得较高的总蛋白浓度.由于各种方法中缓冲液体积都是10 mL,因此这两种方法获得的总蛋白量也最高,分别为18.35 mg和15.01 mg,使用其他方法得到的总蛋白量则相对较少.

从氢酶活性方面来看,Triton X-100法的效果优于CTAB法,分别为0.127 U/mL和0.089 U/mL,其他方法得到的氢酶活性都非常低.

通过总蛋白浓度和氢酶活性可以计算出破碎后上清的比酶活.从图1可以看出,比酶活最高的是EDTA法,其次是Triton X-100法和CTAB法.由于使用EDTA法得到的总蛋白量很少,获得的氢酶量也很低,而Triton X-100法和CTAB法则可以获得较多的氢酶.

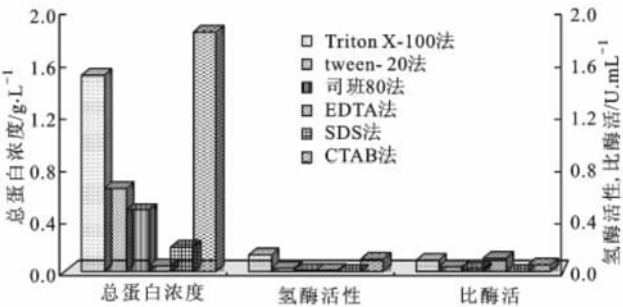


图1 化学渗透法破碎扁藻细胞对总蛋白浓度、氢酶活性和比酶活的影响

2.2 反复冻融法破碎效果

分别考察了反复冻融2次、4次、6次、8次和10次对扁藻细胞的破碎效果和对氢酶活性的影响情况,结果如图2所示.冻融4次时,溶液中总蛋白浓度最高,为0.055 g/L.随着破碎次数的增加,总蛋白浓度下降,这可能是由于反复冻融导致溶液中蛋白变性.

氢酶活性则随着破碎次数的增加一直下降.这是由于氢酶本身稳定性较差,在细胞冻融时失活所致.

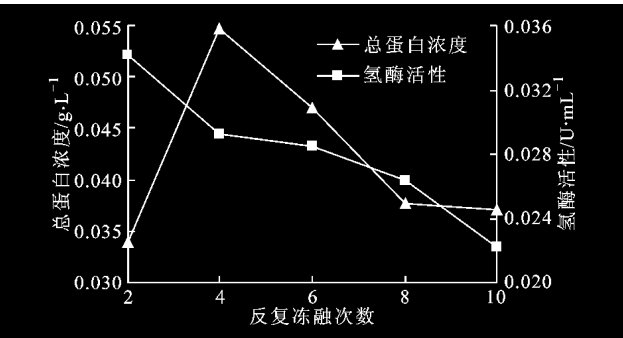


图2 不同冻融次数破碎细胞对总蛋白浓度和氢酶活性的影响

2.3 珠磨法破碎效果

从表2中可以看出,用珠磨法破碎扁藻细胞,破

碎5 min的效果好于3 min,溶液中总蛋白浓度可达1.03 g/L,氢酶活性为0.144 U/mL,比酶活为0.14 U/mg.

2.4 超声法破碎效果

采用不同超声输出功率对扁藻细胞进行破碎.起初,随着超声功率的增加,溶液中总蛋白浓度逐渐增大,在400 W时,蛋白浓度达到2.73 g/L,功率从400 W增加到600 W的过程中,蛋白浓度开始下降,其原因可能是超声强度过高,引起蛋白变性.

表2 珠磨法破碎时间对总蛋白浓度、氢酶活性和比酶活的影响

破碎时间 /min	总蛋白浓度 /g·L ⁻¹	氢酶活性 /U·mL ⁻¹	比酶活 /U·mg ⁻¹
3	0.84	0.11	0.13
5	1.03	0.144	0.14

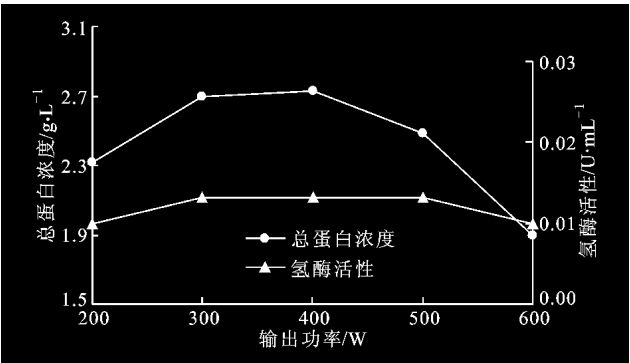
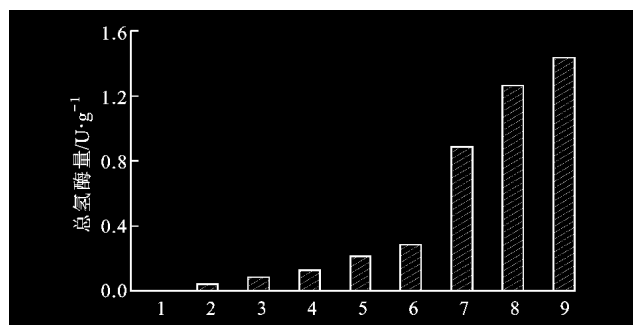


图3 超声输出功率对总蛋白浓度和氢酶活性的影响

使用超声法破碎细胞(鲜细胞)后,上清中的氢酶活性都处于非常低的水平,最高时才达到0.013 U/mL,且不同功率破碎对活性没有明显影响.这可能是由于超声破碎方法本身能导致氢酶的失活,也可能是由于破碎体系中没有严格厌氧,存在少量空气,超声过程使空气中的氧与溶液中的氢酶充分接触,从而导致氢酶失活.

综合以上4种破碎方法,可以看出它们各有特点:化学渗透法中Triton X-100法和CTAB法能获得很高的总蛋白浓度,并且氢酶活性也较高;珠磨法破碎细胞的能力一般,获得总蛋白的比酶活很高;反复冻融法获得总蛋白的量最少,但比酶活最高;超声法破碎细胞效果很好,能将胞内可溶性蛋白充分释放到溶液中,但该方法易导致氢酶失活.

本实验的最终目的是将氢酶进一步纯化出来,获得较纯氢酶,这需要很大酶量.因此,我们着重考察了使用各方法破碎鲜细胞后,最后获得氢酶的总量,分析结果如图4所示.由图中可以清楚地看出,采用珠磨法可达到最高氢酶提取效率,为1.44 U/

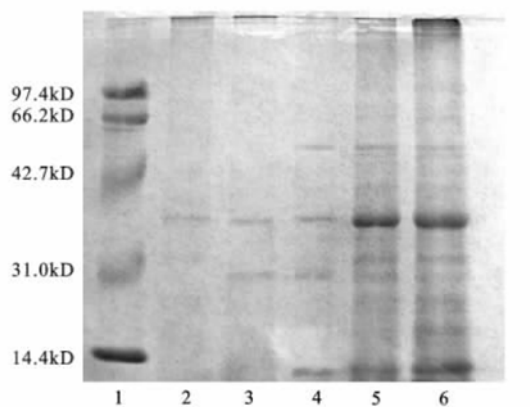


1: SDS法; 2: EDTA法; 3: 司班80法; 4: 超声法; 5: tween20法;
6: 反复冻融法; 7: CTAB法; 8: Triton X-100法; 9: 珠磨法

图4 不同细胞破碎方法获得的氢酶总量对比
g, 其次为采用化学渗透法中的 Triton X-100 法, 为 1.27U/g.

最后, 通过鲜重细胞 SDS-PAGE 考察了不同破碎方法中蛋白的释放情况, 但由于有些粗提液的总蛋白浓度很低, 其中许多微量蛋白未能显色. 从图5可以看出, 反复冻融法的粗提液只显示了一个条带, Triton X-100 法和 CTAB 法粗提液中分别有 2 个和 4 个条带, 珠磨法和超声法破碎细胞释放的蛋白种类最多, 约有十几种.

综上所述, 相对于其他方法, Triton X-100 法能获得较多的氢酶, 同时粗提液中所含其他蛋白种类较少, 利于后续的分离纯化. 因此, 应使用 Triton X-100 法破碎扁藻细胞, 来获得氢酶.



1: 低相对分子质量标准蛋白; 2: 反复冻融法; 3: Triton X-100法; 4: CTAB法; 5: 珠磨法; 6: 超声法

图5 不同方法破碎粗提液 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

另外, 虽然反复冻融法获得总蛋白量很少, 且对氢酶活性有一定影响, 但是破碎后溶液中的氢酶比酶活最高, 为 0.7 U/mg, 远高于珠磨法的 0.14 U/mg, 说明总蛋白中氢酶含量很高. 如果能对该方法进行优化, 增加细胞破碎效率, 有可能会获得大量的氢酶.

3 结 论

本文考察了不同方法破碎亚心形扁藻细胞的效

果及其对氢酶活性的影响, 使用珠磨法和表面活性剂 Triton X-100 法破碎扁藻细胞, 可以获得较多的氢酶来进行下一步的纯化工作, 其中用 Triton X-100 法破碎后的粗提液中所含其他蛋白种类较少, 利于后续分离纯化工作的进行, 是应首选的方法. 用超声法破碎细胞可以获得最多的总蛋白量, 反复冻融法获得的粗提液比酶活最高, 可以做进一步优化.

参考文献:

- [1] 张卫, 管英富, 虞星炬, 等. 一种海洋绿藻两步法生物光解水制氢方法: 中国, 03110981.0 [P]. 2003-01-29.
- [2] BENEMANN J. Hydrogen biotechnology: progress and prospects[J]. Nature Biotechnol, 1996, 14: 1101-1103.
- [3] de VALLADARES M R. IEA agreement on the production and utilization of hydrogen[R]. Bethesda, USA: [s. n.], 2003.
- [4] 管英富, 邓麦村, 金美芳, 等. 微藻光生物水解制氢技术[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 8-13.
GUAN Yingfu, DENG Maicun, JIN Meifang, et al. Advance in photo-biological hydrogen production by microalgae[J]. Progress in Biotechnology, 2003, 23(4): 8-13.
- [5] CAROLYN E. IEA agreement on the production and utilization of hydrogen[R]. Golden, USA: [s. n.], 1998.
- [6] GUAN Y F, ZHANG W, DENG M C, et al. Significant enhancement of photobiological H₂ evolution by carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazine in the marine green alga *Platymonas subcordiformis* [J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(13): 1031-1035.
- [7] RAN C Q, YU X J, MEI F J, et al. Role of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazine in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis* [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(2): 1-6.
- [8] 管英富. 绿藻间接光解水制氢过程的研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2003.
- [9] ADAMS M W, HALL D O. Purification of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli* [J]. J Biochem, 1979, 183: 11-22.
- [10] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 194: 265-275.

(编辑 杜秀杰 赵大良)