

土壤中具有蛋白酶活性的酶-腐殖质复合物的提取及其性质的研究

郑洪元 张德生 郑莲娣

(中国科学院林业土壤研究所)

摘 要

用中性 0.1M 焦磷酸钠提取,经硫酸铵分段,丙酮沉淀,从土壤中获得了具有蛋白酶活性的酶-腐殖质复合物,其特性:反应最适 pH 为 9.0,反映最适温度为 50°—60°C,温度系数 Q_{10} (17°—40°C) 为 1.93, K_m 值为 0.97—1.00 毫克酪素/毫升, V_{max} 值为 74.91—75.35 毫克酪氨酸/克·24 小时,与原位土壤蛋白酶相比,反应最适 pH 往碱性偏移,反应最适温度及 K_m 值变小,热稳性降低, Q_{10} 和 V_{max} 值增大。

土壤经超声波分散后,可以用各种盐缓冲液将其中具有蛋白酶活性的酶-腐殖质复合物提取出来,其收率依次为水 < 0.1M 磷酸盐-0.3M KCl-0.01MEDTA < 三羟甲基氨基甲烷 (pH 7) < 0.2M 碳酸氢钠 < 0.05 M 磷酸盐-柠檬酸 < 0.1 M 焦磷酸钠溶液。

土壤中所有生物化学过程都是依赖于酶来实现的,土壤中酶活性的变化在一定程度上反映了土壤肥力状况,物质转化状况,以及土壤环境状况的变化。

土壤中的酶类以游离状态存在于土壤溶液中,或以络合状态与土壤有机质结合形成酶-腐殖质复合物。为了深入了解酶在土壤中存在的状态,以及它的作用机理,一般采用下述两种途径进行研究。第一种途径是把土壤作为酶的天然载体,通过人工模拟合成与土壤条件相似的固相酶体系进行比较研究^[5,6]。第二种途径是直接提取土壤酶,然后进行它的性质研究。近年来学者们对土壤酶提取的研究极为重视,由于采用了近代生物化学技术,目前用缓冲液,超声波处理以及凝胶分段等方法从土壤中提取出具有酶活性制品的有脲酶^[5-8]、尿酸盐氧化酶^[9]、过氧化物酶^[10]、色氨酸脱羧酶^[11]、二酚氧化酶^[12]、 β -葡萄糖苷酶^[13]、蛋白酶^[14,15]。在某些情况下,有些酶曾给予部分提纯,并且认为所提出的酶制品,是以酶-腐殖质复合物的形式存在的^[6,16,17]。

蛋白酶是广泛存在于土壤中的一大酶类,它能水解各种蛋白质和肽类等化合物为氨基酸,因此土壤中蛋白酶的活性与土壤中氮素营养的转化状况存在着极为重要的关系。前文^[1,2],我们报道了土壤中蛋白酶的测定方法及其某些基本性质,发现不同土壤中蛋白酶的活性存在一定差异,土壤中蛋白酶活性的变化,与土壤中腐殖氮量明显相关。本文目的在于将土壤中蛋白酶提取出来,以便与原位 (in situ) 土壤蛋白酶活性进行比较,借以了解土壤蛋白酶在土壤中的作用方式与功能。

一、材料与方 法

土壤样品采自吉林省长白山自然保护区, 针阔混交林下白浆化暗棕色森林土, 全氮 0.774%, 腐殖质 0.146%, 腐殖碳 1.585%, pH 6.1。土壤采回后立即风干, 挑除草根, 过 2 毫米筛, 贮于磨口瓶中备用。

本试验选用以下五种缓冲溶液及水作为提取剂进行比较: 0.1 M 焦磷酸钠 (pH 7.0); 0.05 M 磷酸-柠檬酸 (pH 7.0); 0.3 M KCl 和 0.01 M EDTA 的 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0); 0.2 M 碳酸氢钠溶液; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液 (pH 7.0); 水。

腐殖质-蛋白酶的提取步骤



蛋白酶活性测定方法: 取 2 克土壤(抽提液取 10 毫升, 酶-腐殖质复合物取 0.05 克), 加入 1% 酪素溶液 10 毫升(用 pH 8.0 三羟甲基氨基甲烷配制)、甲苯 0.5 毫升, 于 37°C 恒温箱中反应 24 小时后, 加入 15% 三氯醋酸 10 毫升终止反应, 立即过滤, 取滤液, 用 Folin-ciocalten 比色法, 求其释放的酪氨酸量。与此同时, 取不经培养和不加土壤的基质按上述同样条件操作为对照, 用二者释放酪氨酸量之差计算酶活性。

* 按配制作为提取剂的缓冲溶液所需要的盐类量加入。

二、结 果

(一) 不同提取剂提取蛋白酶收率的比较

土壤蛋白酶提取试验表明,土壤经超声波分散处理后,可以用各种缓冲液将蛋白酶从土壤中提取出来,其中以焦磷酸钠溶液提取收率为最高,可达 41.1%;其余依次为磷酸-柠檬酸溶液、碳酸氢钠溶液、三羟甲基氨基甲烷溶液、磷酸-KCl-EDTA 溶液,其收率分别为 27.9%, 27.6%, 19.5%, 15.8%;同时还证明水也有一定的提取效果,其收率可达 5.2% (表 1)。

表 1 不同提取剂提取蛋白酶收率的比较

Table 1 A comparison of the percentage recoveries of protease extracted from soil by different extractants

项 目 Items	总 量 Total amount	总酶活 (毫克酪氨酸/24小时) Total enzyme activity (mg tyrosine/24h)	收 率 (%) Recovery
土壤	320 克	686.08	100
水	1600 毫升	35.68	5.2
磷酸-KCl-EDTA	1600 毫升	108.40	15.8
三羟甲基氨基甲烷	1600 毫升	133.79	19.5
碳酸氢钠	1600 毫升	189.36	27.6
磷酸-柠檬酸	1600 毫升	191.42	27.9
焦磷酸钠	1600 毫升	281.83	41.1

试验中我们还发现,如果以焦磷酸钠溶液加入土壤后再用超声波分散,可以提高蛋白酶的收率,可达 62.7%。为此在进一步试验中,直接在焦磷酸钠溶液中进行超声波分散,然后按提取流程图,经硫酸铵分段、透析和丙酮分段等操作制成丙酮干粉,即为具有蛋白酶活性的酶-腐殖质复合物。在本试验中,1600 毫升提取液相当于 320 克土壤量,制得丙酮干粉 2.605 克。土壤蛋白酶分段提取收率见表 2。

表 2 土壤腐殖质-蛋白复合酶分段提取收率

Table 2 the recovery of fractionation purification of soil protease

项 目 Items	总 量 Total amount	总氮量 (mg) Total nitrogen	总酶活 (毫克酪氨酸/ 24小时) Total enzyme activity (mg tyrosine/24h)	比活力 (毫克酪氨酸/ 毫克 N·24小时) Specific activity ($\frac{\text{mg tyrosine}}{\text{mgN} \cdot 24\text{h}}$)	收 率 (%) Recovery
土 壤	320 克	2476.82	686.08	0.277	100
提 取 液	1600 毫升	1102.64	430.07	0.39	62.68
酶-腐殖质- 复合物	2.605 克	83.01	125.21	1.51	18.25

由表 2 可见,采用前述的分段流程,获得的丙酮干粉,其比活比土壤大 5.45 倍,但其总酶活收率仅为 18.27%。

0.1 M 焦磷酸钠溶液在土壤腐殖质研究中是缓和条件下提取土壤腐殖质所常用的提取剂^[18]。Nannipieri 等^[17]用 0.1M 焦磷酸钠溶液 (pH7.0) 已成功地从土壤中提取出脲酶-复合物。由于土壤酶主要与土壤腐殖质形成复合物的形式而稳定地在土壤中累积,因此,要把这部分酶提取出来进行研究,必须在与提取土壤腐殖质最好的相似的条件下进行。

硫酸铵和丙酮是酶学研究中常用的蛋白质分段沉淀剂,也是用于土壤腐殖质分段的沉淀剂^[12],并且也已成功地用于某些土壤酶的分段^[4,8,12,15]。因此,可以认为,采用我们所拟定的提取剂 (0.1 M 焦磷酸钠 pH7.0),然后用硫酸铵分段 (60% 硫酸盐析)操作,提取出具有蛋白酶活性的制品 (丙酮干粉)是与腐殖质复合的酶-腐殖质复合物。另一方面,从制品的红外光谱分析也证明了这一点,它在 3400cm^{-1} , 2900cm^{-1} , 1630cm^{-1} , 1400cm^{-1} , 1075cm^{-1} , 有明显的吸收峰,它与土壤腐殖酸盐的红外光谱极为相似。

(二) 具有蛋白酶活性的酶-腐殖质复合物的性质

为了证实所获得的丙酮干粉 (酶-腐殖质复合物) 蛋白酶活性的存在,我们测定了不同酶-腐殖质复合物的量与蛋白酶活性的变化,以及不同反应时间与蛋白酶活性变化的关系。从测定结果看 (图 1 和图 2),它们之间存在着明显的线性关系,这证明酪素的水解反应是丙酮干粉引起的酶促过程。

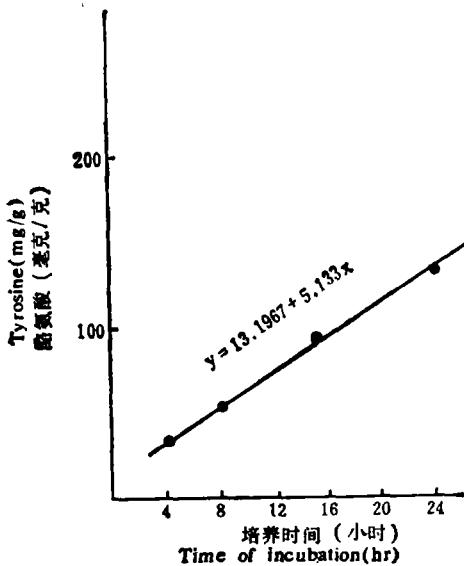


图 1 不同培养时间对土壤提取的酶-腐殖质复合物酪素水解的影响

Fig. 1 Effect of time of incubation on casein hydrolysis of enzyme-humus complexes extracted from soil

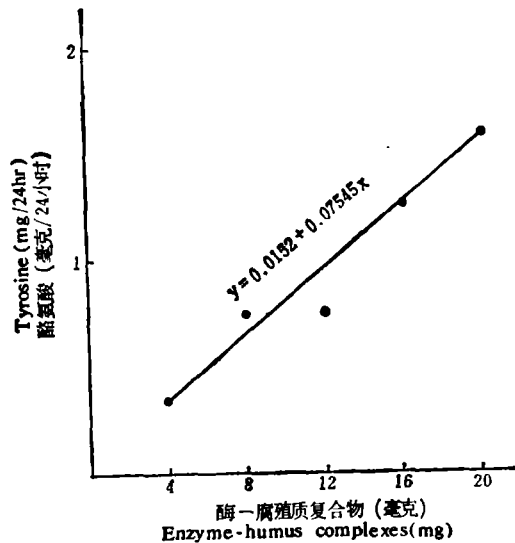
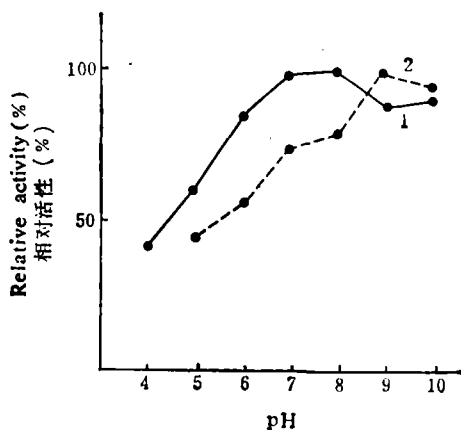


图 2 土壤提取的酶-腐殖质复合物的量对酪素水解的影响

Fig. 2 Effect of amount of enzyme-humus complexes extracted from soil on casein hydrolysis

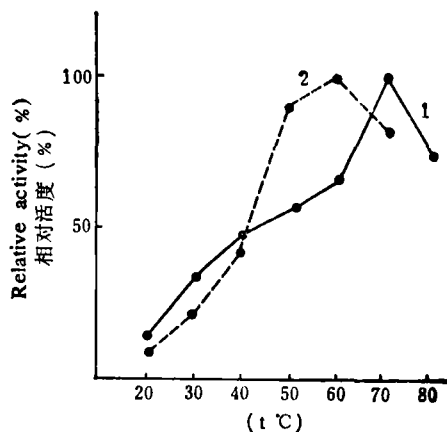
1. 反应最适 pH: 从图 3 可以看出, 原位土壤蛋白酶的最适 pH 在 7.0—8.0 之间, 而从土壤提取出的蛋白酶(酶-腐殖质复合物)其最适 pH 为 9.0。另一方面, 从 pH 曲线变化来看, 从土壤中提取出的蛋白酶在 pH 7.0—8.0 之间尚有一最适值, 是否如此, 还有待进一步证实。



1. 原位土壤 2. 酶-腐殖质复合物

图 3 土壤提取的酶-腐殖质复合物中蛋白酶活性的最适 pH

Fig. 3 Optimum pH of protease activity in enzyme-humus complexes extracted from soil



1. 原位土壤 2. 酶-腐殖质复合物

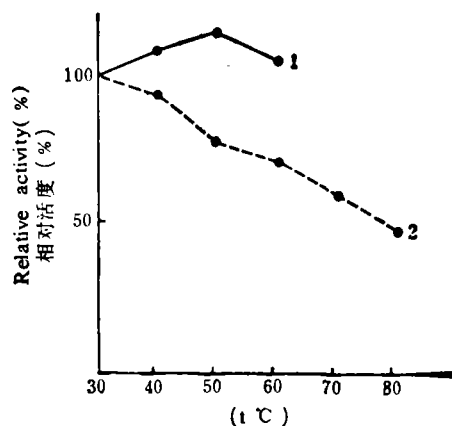
图 4 土壤提取的酶-腐殖质复合物中蛋白酶活性的最适温度

Fig. 4 Optimum temperature of protease activity in enzyme-humus complexes extracted from soil

2. 反应最适温度: 从图 4 可以看出, 原位土壤蛋白酶反应最适温度在 60—70°C 之间, 而从土壤中提取出的蛋白酶反应最适温度在 50—60°C 之间。通过计算表明, 二者温度系数 Q_{10} (17—40°C) 也存在差异, 原位土壤为 1.3, 而提取出的蛋白酶为 1.93。

3. 热稳性: 从图 5 可以看出, 原位土壤蛋白酶的热稳性要高于从土壤中提取出的蛋白酶。原位土壤蛋白酶在 50°C 加热 30 分钟, 不仅保持活性, 而且还有所提高, 至于从土壤中提取出的蛋白酶, 超过 40°C 以后蛋白酶活性逐渐下降, 当温度在 80°C 以上时, 酶的活性要减少一半以上。

4. 动力常数 K_m , 最大反应速度 V_{max} 值: 取 0.1 克丙酮干粉, 加至用 pH 8.0 三羟甲基氨基甲烷缓冲液配制的酪素溶液中, 酪素的浓度 (S) 按土壤溶液(反应时溶液体积) 计算分别为 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 毫克酪素/毫升, 于 37°C 培养 24 小时, 测定其反应速度 (V), 然后



1. 原位土壤 2. 酶-腐殖质复合物

图 5 土壤提取出的酶-腐殖质复合物中蛋白酶的热稳性

Fig. 5 stability of protease activity in enzyme-humus complexes extracted from soil preincubated at different temperatures

根据 Michaelis-Menten 酶促反应动力学方程: $V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$, 分别按 Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee 和 Hanes-Woolf 三种作图法求解 K_m 及 V_{\max} 值^[20], 结果见表 3。

表 3 原位土壤与从土壤中提取出的蛋白酶动力学常数的比较

Table 3 A comparison of K_m and V_{\max} of protease between the soil in situ and enzyme-humus complexes extracted from soil

项 目 Items	K_m (毫克酪素/毫升) K_m (mg casein/ml)		V_{\max} (毫克酪氨酸/克·24小时) V_{\max} (mg tyrosine/g·24h)	
	原位土壤 Soil in situ	酶-腐殖质复合物 Enzyme-humus complexes	原位土壤 In soil situ	酶-腐殖质复合物 Enzyme-humus complexes
Lineweaver-Burk 作图法	1.53	0.97	3.286	74.91
Eadie-Hofstee 作图法	1.61	0.98	3.284	75.06
Hanes-Woolf 作图法	1.83	1.00	3.397	75.35

由表 3 可以看出, 从土壤中提取出的蛋白酶的 V_{\max} 值大大高于原位土壤的蛋白酶, 而 K_m 值则相反, 原位土壤的 K_m 值高于从土壤中提取出的腐殖质-蛋白酶。三种作图方式还表明, 它们之间有明显的线性关系, 这说明不论是原位土壤蛋白酶, 或者是从土壤提取出的蛋白酶, 其酶促反应均从属于 Michaelis-Menten 动力学方程。

5. 其他酶活性的共存: Mayaudon 等^[21]用 0.2M 磷酸盐缓冲液 (pH8.0) 在存在 0.2 M EDTA 情况下提取的蛋白酶制品具有二酚氧化酶活性, 随后 Batistic 等^[21]用同样方法从土壤中提取出同时具有纤维素酶、转化酶、蛋白酶、酸性和碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶活性的复合酶制品, 最近 Щербакова 等^[22]也从土壤中提取出同时具有淀粉酶、转化酶、蛋白酶、多酚氧化酶、接触酶活性的复合酶制品。这些作者曾试图用凝胶层析法将这些酶单一的分开, 但并未获得成功。

表 4 酶-腐殖质复合物中的酶活性

Table 4 Enzymes activity of enzyme-humus complexes extracted from soil

项 目 Items	酶 活 性 Enzyme activity	
	原位土壤 Soil in situ	酶-腐殖质复合物 Enzyme-humus complexes
蛋白酶 (毫克酪氨酸/克·24小时)	2.14	48.44
脲 酶 (毫克 $\text{NH}_3\text{-N}$ /克·24小时)	未测	10.03
转 化 酶 (毫克葡萄糖/克·24小时)	16.04	65.52
β -葡萄糖苷酶 (毫克酚/克·24小时)	未测	0.24

用焦磷酸钠从土壤中提取出的具有蛋白酶活性的腐殖质复合物,也是多种酶结合在一起的,它同时含有脲酶、转化酶、 β -葡萄糖苷酶活性(表4)。至于如何把这些酶单一的分开,尚待进一步研究。

酶在土壤中累积而稳定存在的原因极为复杂,酶-腐殖质复合物的形成是其主要原因之一。因此,对于所提取出的酶-腐殖质复合物的酶学基本性质的了解,将有助于酶在土壤中的作用方式和机理的研究,遗憾的是在这面积累的资料还不多,有待我们进行大量的工作。

参 考 文 献

- [1] 郑洪元、张德生, 1980: 不同生态条件下森林土壤酶的活性。森林生态系统研究 1., 161—165 页。
- [2] 郑洪元、张德生, 1981: 土壤蛋白酶的测定及其性质。土壤通报, 第 3 期, 32—34 页。
- [3] McLaren, A. D., 1975: Soil as system of humus and clay immobilized enzymes. *Chemia Scripta*, 8, 97—99.
- [4] Ladd, J. N., Butler, J. M. A., 1975: Humus-enzyme systems and synthetic organic polymer-analogs. In: *Soil Biochemistry*. Vol. 4, (E, A. Paul, A. D. McLaren, Eds) 143—149.
- [5] Briggs, N. H., Segal, L., 1963: Preparation and properties of a free soil enzyme. *Life Sci*, 1, 69—72.
- [6] Burns, R. G., El-Sayed, M. H., McLaren, A. D., 1972: Extraction of a urease active organo-complex from soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 107—108.
- [7] Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Sequi, P., 1974: Use of 0.1M pyrophosphate to extract urease from a podsol. *Soil Biol. Biochem.* 6, 359—362.
- [8] Nannipieri, P., Cervelli, S., Sequi, P., 1978: Fractional of humus-urease complexes. *Soil Biol. Biochem.* 10, 39—45.
- [9] Martin-Smith, M., 1963: Ureolytic enzymes in soil. *Nature*, 197, 361—362.
- [10] Bartha, P., Bordeleau, L. M., 1969: Cell-free peroxidases in soil. *Soil Biol. Biochem.* 1, 139—149.
- [11] Chalvignac, M. A., Mayaudon, J., 1971: Extraction and study of soil enzyme metabolizing tryptophan. *Pl. Soil*, 34, 25—31.
- [12] Mayaudon, J., El-Halfoni, M., Chalvignac, M. A., 1973: Properties of diphenol oxidases extracted from soil. *Soil Biol. Biochem.* 5, 369—383.
- [13] Hayano, K., Katami, A., 1977: Extraction of β -glucosidase activity from pea field soil. *Soil Biol. Biochem.* 9, 349—351.
- [14] Ladd, J. N., 1972: Properties of proteolytic enzymes extracted from soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 227—233.
- [15] Mayaudon, J., Batistic, L., Sarkar, J. M., 1975: Properties of proteolytically active extract from fresh soils. *Soil Biol. Biochem.* 7, 281—286.
- [16] McLaren, A. D., Pukite, A. H., Barshadi, 1975: Isolation of humus with enzymatic activity from soil. *Soil Sci.* 119, 175—180.
- [17] Nannipieri, P., Cervelli, S., Pedrazzini, F., 1975: Concerning the extraction of enzymatically active organic matter from soil. *Experientia* 31, 513—515.
- [18] Bremner, J. M., Lees, H., 1949: Studies on soil organic matter 4, The extraction of organic matter from soil by neutral reagents. *J. Agric. Sci.* 39, 274—279.
- [19] Theng, B. K. G., Wake, J. R. H., Posner, A. M., 1968: The fractional precipitation of soil humic acid by ammonium sulphate. *Plant soil* 29, 345—361.
- [20] Engel, P. C., 1977: Enzyme kinetics.
- [21] Batistic, L., Sarkar, J. M., Mayaudon, J., 1980: Extraction purification and properties of soil hydrolases. *Soil Biol. Biochem.* 12, 59—61.
- [22] Щербакова Т. А., Масвко, А. А., Голушко Н. А., 1981: Выделение из Почвы органо-минеральных комплексов обладающих Ферментативной активностью. *Почвоведение*, №4, 71—78.

EXTRACTION AND PROPERTIES OF ENZYME-HUMUS COMPLEXES WITH PROTEASE ACTIVITY IN SOIL

Zheng Hongyuan, Zhang Desheng and Zheng Liandi
(*Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica, Shenyang*)

Summary

The extraction of the enzyme-humus complexes with protease activity from soil using a series buffered extractants was studied. It was shown that the extraction of 0.1 M pyrophosphate (pH 7.0) was most efficient. Some characteristics of the extracted enzyme were different from those of the enzyme measured in soil. The results also showed that the K_m value (0.97—1.0 mg casein/ml) and optimum temperature (50—60°C) for the extracted enzyme were lower than those of the enzyme in soil and the V_{max} value (74.91—75.35 mg tyrosine/g·24hr.) optimum pH(9) and temperature coefficient (1.93) were higher than those of the enzyme in soil.

The effectiveness of the extractants was in order of distilled water < 0.1 M phosphate (pH 7.0) — 0.3 M KCl — 0.01 M EDTA < Tris (pH 7.0) < 0.2 M NaHCO₃ < 0.05 M phosphate-citrate (pH 7.0) < 0.1 M Na-Pyrophosphate (pH 7.0).