
Octroiraad



[10] A **Terinzagelegging** [11] **7801517**

Nederland

[19] NL

- [54] **Hydrogenase en werkwijze ter bereiding daarvan.**
- [51] Int.Cl².: C12D13/10.
- [71] Aanvrager: De Rijkslandbouwhogeschool te Wageningen.
- [74] Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

-
- [21] Aanvraag Nr. 7801517.
- [22] Ingediend 9 februari 1978.
- [32] --
- [33] --
- [31] --
- [23] --
- [61] --
- [62] --

-
- [43] Ter inzage gelegd 13 augustus 1979.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

De
Rijkslandbouwhogeschool, te Wageningen.

- Hydrogenase en werkwijze ter bereiding daarvan. -

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een hydrogenase uit Desulfovibrio vulgaris, die wat betreft samenstelling en eigenschappen verschilt van alle tot nu toe uit dit micro-organisme geïsoleerde hydrogenasen.

De hydrogenase volgens de uitvinding is gekenmerkt door een molecuulmassa van ongeveer 50.000, een ijzergehalte van ongeveer 11 tot ongeveer 20 atomen ijzer per molecuul, een gehalte aan ten opzichte van zuur labiele zwavel van ongeveer 12 atomen per molecuul, een K_m -waarde voor methylviologeen in de waterstofproductieproef met natriumdithioniet van 0,20 mM en een V_m -waarde van 4600 eenheden per mg, een K_m -waarde voor benzylviologeen in de waterstofopnameproef van 3,0 mM met een V_m van 50.000 eenheden per mg en een geringe gevoeligheid voor zuurstof.

De onderhavige uitvinding heeft eveneens betrekking op een werkwijze ter bereiding van een hydrogenase uit bacteriën van de species Desulfovibrio vulgaris.

Een dergelijke werkwijze is bekend uit Biochim. Biophys. Acta 50 (1961), 153-163, 234 (1971), 525-530 en J. Bacteriol. 105 (1971), 249-258, waarbij uitgegaan wordt van de stam Hildenborough, alsmede uit J. Biochem. 68 (1970), 649-657 en 79 (1976), 661-671, waarin de isolering van een hydrogenase uit de stam Miyazaki is beschreven. Bij deze bekende werkwijzen worden de bacteriecellen mechanisch verbroken, terwijl in het geval van de Miyazaki-stam tevens een behandeling met pancreatine of trypsine nodig blijkt te zijn om het enzym te solubiliseren. De opbrengst aan enzym na de zuivering

7801517

is bij de bekende werkwijzen laag (0,4 - 2,8 %), terwijl de gezuiverde enzympreparaten die door verschillende onderzoekers uit een zelfde bacteriestam (Hildenborough) zijn verkregen, wat betreft de molecuulmassa, samenstelling van de subeenheden en ijzergehalte van elkaar verschillen. 5

Gevonden werd nu, dat men in grote opbrengst een sterk actieve hydrogenase verkrijgt, wanneer men de hydrogenase uit de intacte bacteriecellen van een stam van Desulfovibrio vulgaris isoleert. Er is namelijk gebleken, dat alle in dit micro-organisme aanwezige hydrogenase-activiteit zich aan de buitenzijde van de celwand bevindt en dat deze gemakkelijk kan worden verwijderd door de intacte bacteriecellen te onderwerpen aan een eenvoudig extractieproces. 10 15

Bij voorkeur extraheert men de bacteriecellen met een waterige oplossing van een cheleringsmiddel met een pH van tenminste 8. De toepassing van een dergelijke extractievloeistof is in principe bekend uit Bacteriol. Rev. 38 (1974), 87-110, waarin de verwijdering van proteïnen van de buitenste laag van gram-negatieve bacteriën is beschreven. Het cheleringsmiddel dient daarbij voor de verwijdering van tweewaardige metaal- ionen, die in het algemeen het buitenste membraan van de celwand stabiliseren. 20 25

De waterige extractievloeistof is bij voorkeur een bufferoplossing met een pH van 8-10, in het bijzonder een pH van 9. Een Tris-HCl-buffer kan voor dit doel met voordeel worden toegepast.

Het cheleringsmiddel is bij voorkeur ethyleendiamine-tetra-azijnzuur (EDTA). Er moet voldoende cheleringsmiddel in het extractiemedium aanwezig zijn om het enzym van de buitenlaag van de bacteriën vrij te maken. Goede resultaten zijn bereikt met 10 ml extractiemedium per gram vochtige bacteriën, waarbij de EDTA-concentratie in het 30 35

7801517

medium 50 mmolair is.

De extractie dient uitgevoerd te worden bij een temperatuur van tenminste 15°C, daar bij lagere temperaturen de hydrogenase in het geheel niet of slechts gedeeltelijk wordt vrijgemaakt. De optimale extractietemperatuur ligt in het gebied van 25-40°C. Bij hogere temperaturen neemt de activiteit van het enzym af. Bij 0°C wordt alleen cytochroom en geen hydrogenase vrijgemaakt.

De extractie kan worden uitgevoerd door de vochtige, vers geoogste bacteriecellen in het medium te suspenderen en de suspensie zachtjes te roeren. Het roeren wordt voortgezet totdat uit proeven blijkt dat de hydrogenase-activiteit in het extract niet meer toeneemt. In de eerste 15 minuten bij 30°C wordt in het algemeen meer dan 90% van de aanwezige hydrogenase vrijgemaakt, terwijl nagenoeg al het enzym in 45 minuten is geëxtraheerd. De specifieke activiteit van het geïsoleerde enzym neemt echter af naarmate men de extractie langer voortzet.

Gebleken is, dat de geëxtraheerde hoeveelheid hydrogenase-activiteit niet wordt verminderd door de aanwezigheid van zuurstof tijdens de extractie. Men kan de extractie dus aan de lucht uitvoeren.

Met behulp van de eenvoudige werkwijze volgens de uitvinding verkrijgt men hoge opbrengsten aan oplosbaar enzym, hetgeen niet het geval is, wanneer men hetzelfde extractiemiddel toepast op bacteriën, waarvan de celwanden tevoren zijn verbroken door behandeling met ultra-geluid of in een celhomogenisator volgens Manton-Gaulin. Gebleken is, dat hierbij slechts 20-40% van de hydrogenase-activiteit in oplossing kan worden gebracht.

De hydrogenase kan op bekende wijze uit het volgens de uitvinding verkregen extract worden geïsoleerd en gezuiverd. Het geklaarde extract kan bijvoorbeeld worden gedialyseerd tegen 10 mM Tris-HCl buffer van pH 8, die tevens 20 millimolair aan NaCl en 5 millimolair aan EDTA is.

7801517

Een verdere zuivering van de gedialyseerde oplossing kan worden bereikt met behulp van chromatografische technieken, waarbij men, afhankelijk van de gewenste zuiverheid, de bewerkingen enige malen kan herhalen en het adsorptiemiddel en/of elueermiddel desgewenst kan wijzigen. Goede resultaten zijn bereikt met chromatografie op een kolom van DEAE-cellulose, ontwikkeld met een lineaire gradient van NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 8, gevolgd door chromatografie op een Sephadex G-150 kolom, geëquilibreerd met een 20 mM oplossing van NaCl in 25 mM fosfaatbuffer, pH 7,5, met welke oplossing ook geëluëerd wordt. Tenslotte kunnen de meest actieve fracties nog worden gechromatografeerd op een kolom van hydroxylapatiet, die geëluëerd kan worden met een lineaire fosfaatgradient.

Uit de verkregen gezuiverde oplossing kan het enzym bijvoorbeeld door droogvriezen in zuivere toestand worden verkregen.

De gezuiverde hydrogenase volgens de uitvinding heeft de volgende eigenschappen. De molecuulmassa van het proteïne bedraagt bij benadering 52.000, zoals kan worden afgeleid uit het elutievolume bij gelfiltratie in een gecalibreerde kolom van Sephadex G-150 [Biochem. J. 91 (1964), 222-233]. Een soortgelijke waarde (49.000) kan worden bepaald door middel van electroforese in polyacrylamidegel bij aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat en 2-mercaptoethanol [Nature 227 (1970), 680-685], waaruit blijkt dat het molecuul uit een enkele polypeptideketen bestaat. Het proteïne bevat tot ongeveer 20 atomen ijzer per molecuul, maar een groot deel van dit ijzer kan worden verwijderd door dialyse van het proteïne tegen een oplossing van 1 mM tiron (4.5-dihydroxybenzeen 1.3-disulfonaat) en 1 mM o-fenantroline per liter gedurende 24 uur. Deze dialyse doet slechts 7% van de katalytische werking van het proteïne verloren gaan, zodat het verwijderde ijzer niet essentieel is voor de activiteit.

7801517

Na deze dialyse bevat het proteïne 12,5 atomen niet-heem-ijzer [J. Biol. Chem. 229 (1957), 763-770] en 11,5 atomen ten opzichte van zuur labiele zwavel [Anal. Chem. 21 (1949), 732-737 en Biochim. Biophys. Acta 336 (1974), 309-317] per molecuul met een molecuulmassa van 50.000. 5
Hieruit zou blijken, dat het gehalte aan ijzer en ten opzichte van zuur labiele zwavel van het enzympreparaat hoger is dan dat van bekende preparaten van hydrogenase uit D. vulgaris, maar soortgelijk aan de gehalten die in Biochim. Biophys. Acta 371 (1974), 283-298 voor hydrogenase 10 uit Clostridium pasteurianum zijn vermeld.

Het preparaat is bruin, absorbeert licht in het gehele zichtbare gebied van het spectrum en heeft een absorptiemaximum bij 280 nm en een brede schouder in de buurt van 400 nm, hetgeen kenmerkend is voor andere proteïnen die Fe-S centra als enige redoxchromoforen bevatten. 15
De verhouding A_{400}/A_{280} bedraagt 0,36. De extinctiecoëfficiënt bij 400 nm ($46 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bedraagt $3,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per Fe, en is daarom soortgelijk aan die van 8Fe-ferredoxine uit Clostridium acidi urici ($3,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per Fe 20 bij 390 nm [J. Biol. Chem. 245 (1970), 4982-7]. De zichtbare absorptie van het proteïne wordt niet beïnvloed door de bovenbeschreven dialyse tegen ijzer chelerende middelen, waaruit blijkt dat het door deze behandeling verwijderde ijzer niet geassocieerd is met de zichtbare chromofoor. 25
De bruine kleur verdwijnt echter door denaturering van het enzym met zuur. De absorptie bij 400 nm vermindert met 23% door behandeling van het proteïne met een overmaat natriumdithioniet.

De K_m -waarde voor methylviologeen in de waterstofproductieproef met natriumdithioniet bedraagt 0,20 mM 30 met een V_m van 4600 eenheden per mg. De K_m -waarde voor benzylviologeen in de waterstofconsumptieproef bedraagt 3,0 mM met een V_m van 50.000 eenheden per mg. Hoewel deze gegevens niet geheel vergelijkbaar zijn met de in de 35

7801517

literatuur voor vroegere hydrogenase-preparaten uit Desulfovibrio vermelde waarden, omdat de proeven niet geheel gelijk zijn, kan toch op goede gronden worden aangenomen, dat de activiteit van het preparaat volgens de uitvinding in de waterstofconsumptie-proef ongeveer 5 400 maal zo groot is als die van het preparaat, dat in Biochim. Biophys. Acta 234 (1971), 525-530 is beschreven en ongeveer 3 maal zo groot als het in Biochim. Biophys. Acta 50 (1961), 153-163 en J. Bacteriol. 105 (1971), 249-258 beschreven preparaat. Van het in laatstgenoemd 10 artikel beschreven preparaat is vermeld, dat het slechts 1 atoom ijzer en 1 atoom ten opzichte van zuur labiele zwavel per molecuul proteïne bevat. Verder kan worden aangenomen, dat het onderhavige preparaat ongeveer 50 maal zo actief is in de waterstofproductie-proef als de hydro- 15 genase, die uit de stam Miyazaki van D. vulgaris is geïsoleerd [J. Biochem. 79 (1976), 661-671]. De moleculaire en katalytische eigenschappen gelijken het meest op de hydrogenase uit C. pasteurianum [Biochim. Biophys. Acta 371 (1974), 283-298], welk bekend preparaat 12 atomen 20 ijzer en 12 atomen ten opzichte van zuur labiele zwavel per molecuul met een molecuulmassa van 60.000 bevat en een V_m van 4500 eenheden per mg in de waterstofproductie-proef vertoont. In tegenstelling tot de hydrogenase uit C. pasteurianum en eveneens in tegenstelling tot een 25 bekend preparaat uit D. vulgaris [Biochim. Biophys. Acta 234, 525-530] is het enzym volgens de uitvinding nagenoeg niet gevoelig voor zuurstof, noch gedurende de zuivering, die in lucht kan worden uitgevoerd, noch gedurende opslag (zie tabel C). Het enzym kan verscheidene werken in 30 bevroren toestand in lucht worden bewaard, waarbij slechts geringe verliezen aan activiteit optreden. Wanneer een verdunde oplossing in lucht bij 4°C gedurende twee weken wordt bewaard, verliest het preparaat ongeveer de helft van zijn activiteit. Na nog 21 weken bewaren onder 35

7801517

dezelfde omstandigheden is echter nog 16% van de oorspronkelijke activiteit behouden. Wanneer het preparaat bij afwezigheid van zuurstof wordt opgeslagen treedt een geringer verlies van activiteit op, doch bij 4°C bewerkstelligt de toevoeging van runderserumalbumine een nog grotere stabiliteit dan opslag onder stikstof. 5

In de volgende voorbeelden wordt uitgegaan van een bacteriesuspensie verkregen door Desulfovibrio vulgaris, stam Hildenborough, NCIB 8303 bij 35°C te kweken in 1,5 liter (voorbeeld I) of 20 liter (voorbeeld II) Saunders medium N [zie J. Bact. 87 (1964), 1073-1078]. 10
Aan het einde van de actieve groeifase (0,8 - 1 g vochtige cellen per liter) worden de culturen tot 4°C afgekoeld en worden de bacteriën geoogst.

De meting van het proteïnegehalte wordt uitgevoerd met behulp van de methode van Lowry et al. [J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275] na neerslaan met een 5-procents trichloorazijnzuuroplossing. 15

De hydrogenaseactiviteit wordt bij 30°C bepaald door manometrische meting van ofwel de ontwikkeling van waterstof uit dithioniet met 1 mM methylviologeën als electro-nendrager [Biochim. Biophys. Acta 371 (1974), 283-298] of van de waterstofopname met benzylviologeën als electro-nenacceptor. Daarbij wordt een eenheid hydrogenase gedefinieerd als de hoeveelheid, die de produktie of consumptie van 1 $\mu\text{mol H}_2/\text{min.}$ katalyseert. Bij de gasontwikkelingsproef bevatten de Warburg-manometers in een eindvolume van 2 ml in het hoofdcompartiment: Tris-HCl buffer, pH 8, 100 μmol ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 30 μmol ; methylviologeën, 2 μmol ; en runderserumalbumine, 1 mg; de zijarm bevat enzym 30
(0,1 - 1,5 eenheden) verdund in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, plus runderserumalbumine, 0,1 mg/ml, teneinde de adsorptie van het enzym aan het glas gedurende de verdunning tegen te gaan; het centrale deel bevat 0,2 ml 10-procents (gew/vol) NaOH; de gasfase bestaat uit stikstof. 35

7801517

De waterstofproduktie is lineair met de tijd. Bij de gasconsumptieproef bevatten de manometers in een eind-volume van 2 ml in het hoofdcompartiment: Tris-HCl buffer, pH 8, 200 μ mol; benzylviologeen, 20 μ mol; EDTA, 2 μ mol; runderserumalbumine, 1 mg; de zijarm bevat enzym (0,5 - 1,5 eenheden) als bovenbeschreven verdund; het centrale deel bevat 0,2 ml 10-procents NaOH. De gasfase bestaat uit waterstof, die gezuiverd is door het gas bij ongeveer 120°C over BASF-katalysator R3-11 te leiden. De manometers worden afzonderlijk bedreven en elke halve minuut afgelezen omdat de opnamereactie slechts gedurende ongeveer 3 minuten lineair is.

De hydrogenase volgens de uitvinding kan worden gebruikt voor de produktie van waterstofgas door het enzym te koppelen aan fotosynthetische systemen, die de fotolyse van water tot protonen, reductie-equivalenten en zuurstof katalyseren, door het enzym te koppelen aan fotochemische systemen die de oxidatie van organische verbindingen katalyseren, of door het enzym te koppelen aan biochemische of chemische systemen die organische stoffen oxideren. Verder kan het enzym worden gebruikt door oxidatie van waterstofgas aan (bio)chemische redoxsystemen te koppelen.

Voorbeeld I.

Men suspendeert vers geoogste cellen uit culturen van 1,5 liter in 10 ml extractiemedium per gram vochtige cellen. Het standaardextractiemedium is een 50 mM oplossing van EDTA in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9. De mengsels worden zachtjes gedurende 45 min. bij 30°C geroerd, en daarna gedurende 10 minuten bij 4°C gecentrifugeerd met 7.000 g.

In tabel A zijn de waterstofproduktie-activiteit en de adsorptie bij 410 nm tengevolge van cytochroom in de gecentrifugeerde vloeistof vermeld als percentages van de waarden, die in een suspensie van verbroken cellen

7801517

worden gemeten. Bij experiment 1 zijn de temperatuur en de samenstelling van het extractiemiddel gewijzigd, bij experiment 2 alleen de temperatuur en bij experiment 3 alleen de tijdsduur van de extractie.

Het extract bevat geen desulfovirdine, daar er geen absorptie bij 630 nm kan worden gemeten [J. Bacteriol. 120 (1974), 994-7]. Ook uit microscopische waarneming blijkt dat bij de gevolgde extractiemethode geen of nage-
noeg geen bacteriecellen worden verbroken.

Het hydrogenasegehalte van verschillende culturen varieert tussen 240 en 3.000 produktieeenheden per gram vochtige cellen. De totale absorptie bij 410 nm tenge-
volge van cytochroom varieert tussen 1,0 en 1,3 in suspensies van 1 gram vochtige cellen per 10 ml.

- Tabel A -

7801517

TABEL A.

| Proef | Verandering t.o.v. standaard extractie-omstandigheden | Geëxtraheerde hydro- genase | | A _{410nm} (% totaal) |
|-------|---|--------------------------------|--|----------------------------------|
| | | eenheden (% totaal) | specifieke activiteit (eenh./mg) | |
| 1 | 0°, -EDTA | 2 | | 2 |
| | 0° | 3 | | 103 |
| | 39°, -EDTA | 2 | | 1 |
| | 39° | 98 | | 100 |
| | 39°, -EDTA, +20% sucrose | 8 | | 47 |
| | 39°, -EDTA, +0,2M MgCl ₂ | 1 | | 4 |
| | 2 | 10° | 25 | 73 |
| | 20° | 97 | 126 | 95 |
| | 30° | 98 | 138 | 94 |
| | 39° | 92 | 120 | 98 |
| 3 | 0 min. | 3 | 18 | |
| | 5 min. | 50 | 385 | |
| | 15 min. | 93 | 385 | |
| | 25 min. | 93 | 306 | |
| | 35 min. | 90 | 289 | |
| | 45 min. | 98 | 228 | |

Voorbeeld II.

Men suspendeert een celpasta van vers geogste bacteriën, verkregen uit een cultuur van 20 liter, bij 0°C in water (5 ml/g), verhoogt de temperatuur van het mengsel snel tot 30°C en voegt langzaam een gelijk volume van een 0,1 M oplossing van EDTA in 0,1 M Tris-HCl buffer pH 9 toe. Men roert het mengsel zachtjes gedurende 15 min. bij 30°C en centrifugeert (7.000 x g, 10 min. bij 4°C). Men verlaagt de pH van de roodbruine bovenstaande vloeistof van 9 tot 8 door toevoeging van 1 M Tris-HCl buffer, pH 6. De vloeistof

5

10

7801517

stof bevat enig zwart colloidaal materiaal, dat verwijderd moet worden omdat het bij de chromatografie stoort. Dit zwarte materiaal, dat waarschijnlijk metaalsulfiden bevat, wordt verwijderd door het mengsel gedurende 30 min. bij 30°C te roeren en zonodig te centrifugeren (15.000 x g, 10 min., 4°C). De verkregen heldere oplossing wordt gedurende 16 uren gedialyseerd tegen 10 millimolair Tris-HCl buffer pH 8, plus 20 millimolair NaCl en 5 millimolair EDTA, met cellofaan als membraan. 5

De gedialyseerde oplossing wordt op een kolom van DEAE-cellulose (Whatman DE 32, 20 x 2,5 cm) gebracht. Een rode fractie, die cytochroom bevat, loopt direct door de kolom heen. De kolom wordt geëluëerd met een lineaire gradient van NaCl (20-200 millimolair NaCl in 10 millimolair Tris-HCl-buffer, pH 8), waarbij de hydrogenase-activiteit in een goudbruine band wordt verwijderd met 10 mM Tris-HCl pH 8, plus 90 mM NaCl. De actiefste fracties worden gecombineerd en geconcentreerd tot 5 ml door adsorptie aan en eluering uit een kleine kolom van DEAE-cellulose (4 x 1,5 cm) met 0,4 molair NaCl in 25 millimolair fosfaatbuffer, pH 7,5, waarna het eluaat wordt behandeld op een kolom van Sephadex G-150 (100 x 2,5 cm), die tevoren geëquilibreerd is met 20 millimolair NaCl in 25 millimolair fosfaatbuffer, pH 7,5. De hydrogenase-activiteit wordt met hetzelfde elueermiddel geëluëerd in een symmetrische band. De meest actieve fracties daarvan worden samengevoegd en op een kolom van hydroxylapatiet (Bio-Rad biogel HTP; 10 x 1,5 cm) gebracht. Deze kolom wordt geëluëerd met een lineaire fosfaatgradiënt (25-300 millimolair fosfaat); de hydrogenase wordt verwijderd bij ongeveer 0,15 M fosfaat, pH 7,5. 10 15 20 25 30

Het enzym uit de hydroxylapatietkolom geeft een enkele band van proteïne na elektroforese in polyacrylamide-gel (Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964), 321-349 en 404-427) en de plaats van de band komt overeen met die van de enkelvoudige paarse band, die wordt gevormd wanneer men de- 35

7801517

zelfde elektroforese uitvoert onder waterstof bij aanwezigheid van benzylviologeen. Er kan dus worden aangenomen dat het preparaat zuiver is.

In de volgende tabel B zijn de gegevens van de zuivering van de dehydrogenase volgens dit voorbeeld vermeld. Het uitgangsmateriaal is 23 g vochtige celpasta. De katalytische activiteiten worden gemeten met de waterstofproductieproef (P) en de waterstofconsumptieproef (C). Alle zuiveringsbewerkingen worden in lucht bij 4°C uitgevoerd.

5

10

TABEL B

Zuivering van hydrogenase uit D.vulgaris

| Zuiverings-trap | Volume (ml) | Totale hoeveelheid proteïne (mg) | Totaal aantal eenheden | | Specifieke activiteit (eenheden/mg prot.) | |
|-----------------|-------------|----------------------------------|------------------------|--------|---|-------|
| | | | P | C | P | C |
| Celsuspensie | 37 | 3310 | 28600 | 345000 | 8,6 | 104 |
| Extract | 210 | 189 | 24600 | 303000 | 130 | 1600 |
| DEAE-cellulose | 64 | 15,9 | 15300 | 158000 | 960 | 9900 |
| Sephadex G-150 | 42 | 4,3 | 10300 | 112000 | 2400 | 26000 |
| Hydroxylapatiet | 23 | 2,1 | 7700 | 79900 | 3800 | 38000 |

Uit de gegevens van tabel B blijkt, dat de hydrogenase ongeveer 0,2 gew.% van het celproteïne van D.vulgaris uitmaakt. Het totale aantal activiteitseenheden in het extract, het relatieve aantal activiteitseenheden in het zuivere preparaat (27%, resp. 23% bij de waterstofproductie- en -consumptieproef) alsmede de uiteindelijke specifieke activiteit zijn hoog in vergelijking met de vroeger voor hydrogenase uit dit organisme vermelde waarden. De verhouding van specifieke activiteit bij de waterstofconsumptieproef tot die in de waterstofproductieproef is constant na

15

20

7801517

behandeling met DEAE-cellulose, waaruit blijkt dat zowel de waterstofproductie als de waterstofconsumptie door hetzelfde enzym wordt gekatalyseerd.

Ter bepaling van de stabiliteit bij opslag van de gezuiverde hydrogenase worden monsters daarvan in 50 mM fosfaatbuffer, pH 7,5 en 0,01 gew.% natriumazide onder de in de volgende tabel C aangegeven omstandigheden bewaard. De activiteiten worden gemeten met de waterstofproductieproef. De proteïne-concentratie bij de proeven 1 en 2 bedraagt 21 μ g/ml respectievelijk 42 μ g/ml. Indien toegepast, wordt het runderserumalbumine (BSA) toegevoegd tot een concentratie van 0,1 mg/ml.

TABEL C

Stabiliteit van D.vulgaris hydrogenase onder verschillende omstandigheden.

| Proef | Omstandigheden bij opslag | Opslagtijd (weken) | Rest-activiteit (% van oorspronkelijke waarde) na opslag bij: | | |
|-------|---------------------------|--------------------|---|-----|------|
| | | | -20°C | 4°C | 22°C |
| 1 | lucht | 2 | 94 | 44 | 13 |
| | stikstof | 2 | 92 | 69 | 54 |
| | lucht, + BSA | 2 | 98 | 93 | 42 |
| | stikstof, + BSA | 2 | 93 | 89 | 62 |
| 2 | lucht | 1 | | 69 | |
| | | 2 | | 45 | |
| | | 5 | | 29 | |
| | | 8 | | 24 | |
| | | 23 | | 16 | |

C O N C L U S I E S

1. Hydrogenase uit Desulfovibrio vulgaris, g e -
 k e n m e r k t door een molecuulmassa van ongeveer
 50.000, een ijzergehalte van ongeveer 11 tot ongeveer 20
 atomen ijzer per molecuul, een gehalte aan ten opzichte 5
 van zuur labiele zwavel van ongeveer 12 atomen per mole-
 cuul, een K_m -waarde voor methylviologeen in de waterstof-
 productieproef met natriumdithioniet van 0,20 mM en een
 V_m -waarde van 4600 eenheden per mg, een K_m -waarde voor
 benzylviologeen in de waterstofopnameproef van 3,0 mM met 10
 een V_m van 50.000 eenheden per mg en een geringe gevoelig-
 heid voor zuurstof.

2. Hydrogenase uit Desulfovibrio vulgaris, in hoofd-
 zaak als beschreven in de beschrijving en de voorbeelden.

3. Werkwijze ter bereiding van een hydrogenase uit 15
 bacteriën van de species Desulfovibrio vulgaris, m e t
 h e t k e n m e r k , dat men de hydrogenase uit de in-
 tacte bacteriecellen isoleert.

4. Werkwijze volgens conclusie 3, m e t h e t 20
 k e n m e r k , dat men de isolering van de hydrogenase
 uit de intacte bacteriecellen uitvoert door extractie
 daarvan met een waterige oplossing van een cheleringsmid-
 del met een pH van ten minste 8.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, m e t h e t 25
 k e n m e r k , dat de waterige extractievloeistof een
 bufferoplossing is met een pH van 8-10.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, m e t h e t
 k e n m e r k , dat de buffer Tris-HCl-buffer met een pH
 van 9 is.

7801517

7. Werkwijze volgens conclusies 4-6, met het
k e n m e r k , dat het cheleringsmiddel EDTA is.

8. Werkwijze volgens conclusies 3-7, met het
k e n m e r k , dat men de extractie uitvoert bij 25-45°C.

9. Werkwijze volgens conclusies 3-8, met het
k e n m e r k , dat men de extractie uitvoert door de
vers geogste, vochtige bacteriecellen bij 30°C gedurende
15 min. te roeren met een 50 mM oplossing van EDTA in
Tris-HCl-buffer, pH 9.

5

7801517