

几种海洋微藻的碱性磷酸酶性质初步研究

唐洪杰^{1,2}, 杨茹君^{1,2}, 张传松^{1,2}, 李雁宾^{1,2,3}, 祝陈坚^{1,2}, 王修林^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海洋污染生态化学实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 3. 中国海洋大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:对 5 种海洋微藻产生的碱性磷酸酶的性质进行了初步研究并确定了碱性磷酸酶的测定条件。结果表明,在 pH 8.2 的环境中,各藻产生的碱性磷酸酶最佳反应温度在 40 ~ 50 内,且存在一定差异;40 °C 下酶促反应恒速时间及米氏常数也有所不同,酶活恒速时间顺序为东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) < 强壮前沟藻 (*Amphidinium carterae*) < 旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*) < 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) < 塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*);米氏常数大小顺序为塔玛亚历山大藻 < 东海原甲藻 < 中肋骨条藻 < 强壮前沟藻 < 旋链角毛藻。碱性磷酸酶测定条件为:温度 40 °C,反应时间 90 min,底物浓度 260 μmol/L。

关键词: 海洋微藻;碱性磷酸酶;恒速时间;最适温度;米氏常数

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)10-0061-04

磷是海洋中的常量元素之一,在海洋环境中磷对初级生产力有重要的调控作用,是许多海区中浮游植物生长的限制因子。有文献报道,在磷限制海区,藻类和细菌是依靠碱性磷酸酶水解产生的营养物质(包括碳和磷)而存在的^[1]。

碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, APase, EC 3.1.3.1) 是一种最佳活性出现在碱性条件下的正磷酸单酯水解酶,对磷酸单酯键具有高特异性,而对分子中有机部分缺乏选择性,可催化包括初级生产与次级生产所产生的各种醇类、糖类、环醇、酚及胺的磷酸单酯化物的水解反应,释放正磷酸根。视研究海域的不同,磷酸单酯在有机溶解磷 (DOP) 中所占比例由 0 ~ 70 % 不等^[2~4],并且较海水中其它种类的 DOP 更易于再矿化^[5],表明磷酸单酯酶如 APase 在 DOP 的循环中作用重大^[6]。已有的研究表明,碱性磷酸酶在浮游植物吸收利用 DOP 的过程中起重要作用^[7~9],并与维持一定的细胞磷及 N/P 比值有关^[10],因此受到普遍关注,水体中碱性磷酸酶活性 (Alkaline phosphatase activity, APA) 作为磷限制参数正逐步得到应用^[11]。与大多数酶相似,APA 的测定也受到底物浓度、温度、pH 等因素的影响,在进行多藻种 APA 比较前,必须先确定各藻 APase 特性上的区别。作者对几种常见海洋微藻产生的 APase 的部分性质进行了初步研究,以期确立进行藻 APA 测定所需的具体条件。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

所用藻种塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*)、强壮前沟藻 (*Amphidinium carterae*)、中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*) 均为中国海洋大学海洋污染生态化学实验室保存种。浮游植物的培养除磷浓度为 3.2 μmol/L 外,其余各营养成分均采用 f/2 营养液配方,培养条件为温度 20 ± 1 °C,明暗周期 12 h / 12 h,光源为白色日光灯,光照强度约为 2 000 lx。在整个培养过程中,各操作步骤均进行灭菌处理。

1.2 温度对酶反应速度的影响

取藻液 3 mL,加入 Tris-HCl 缓冲液 0.2 mL (pH

收稿日期:2006-03-10;修回日期:2006-05-10

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2001CB409703);国家自然科学基金项目(40376033)

作者简介:唐洪杰(1975-),女,黑龙江克山人,工程师,在职博士生,主要从事海洋污染生态化学研究,E-mail: thjie@ouc.edu.cn;王修林,通讯作者,教授,主要从事海洋污染生态化学研究,E-mail: xlwang@ouc.edu.cn

8.2),以对硝基苯磷酸二钠盐(p-NPP)为底物,在不同温度下反应 30 min,于波长 410 nm 测定吸光度并计算对硝基苯酚(p-NP)的生成量,酶活力以单位时间内对硝基苯酚的生成量来表征。各藻种的每个温度设平行实验 3 组。

1.3 酶促反应的时间效应

取适量藻液,参考 1.2 所确立的酶促反应温度按 1.2 中方法进行酶促反应,不同时间后测定 p-NP 生成量,考察 APA 与酶促反应时间的关系,以确定进行 APA 测定时所需的最佳时间。每个藻种设平行实验 3 组。

1.4 碱性磷酸酶米氏常数(K_m)的测定

取适量藻液,加入底物 p-NPP,使其浓度变化范围为 0~100 $\mu\text{mol/L}$,分别参考 1.2 和 1.3 中所确立的酶促反应温度和酶促反应时间按 1.2 中方法测定 APA,采用 Origin 7.0 软件进行米氏方程拟合得到 K_m ,各藻种的每个浓度设平行实验 5 组。

2 结果与讨论

2.1 温度对酶反应速度的影响

温度对 5 种常见海洋微藻产生的 APA 的影响见图 1。由图 1 可知,在 pH 8.2 的环境中,各藻 APA 随温度的变化趋势相似,均呈钟形曲线,但不同海洋微藻产生的 APase 最适反应温度(T_m)和温度系数(Q_{10})有所不同。各藻 APase 具体的 T_m 和 Q_{10} 见表 1。从表 1 中可以看出,各藻 APA 的 T_m 均较自然海洋环境温度为高,这与 Hernandez 等^[12]对底栖藻 APase 的研究结果相同;实验测得的各藻 T_m 在 40~50 之间,在一般植物酶的 T_m 之内。此外,各藻 APA 在不同温度区间内 Q_{10} 不同,表明在不同的温度范围内,升高温度引起的酶促反应速度增大的程度不同,除中肋骨条藻外,其余各藻在较低温度下(20~30) Q_{10} 较大,即低温下 APA 更易于受到温度的影响。

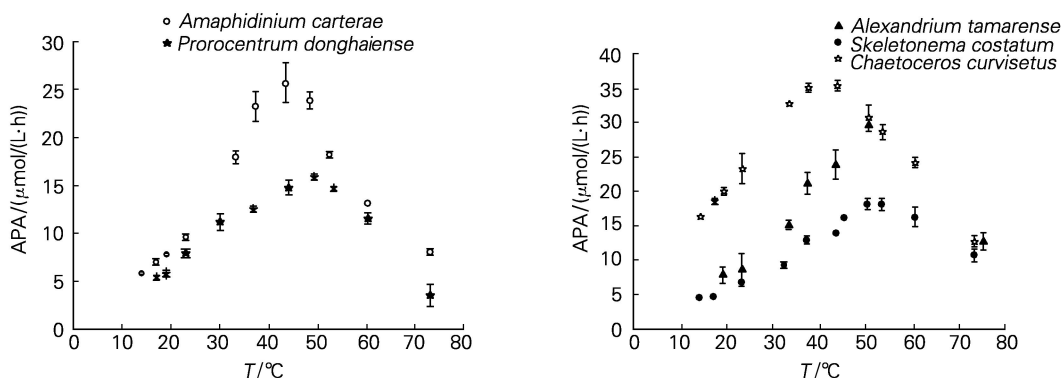


图 1 温度对碱性磷酸酶活性的影响

Fig. 1 The effect of temperature on APA

表 1 各藻 APase 的 T_m 和 Q_{10}

Tab. 1 The optimum reaction temperature and Q_{10} of APase in various marine phytoplanktons

浮游植物种类	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Q_{10}	
		20~30	30~40
强壮前沟藻	43 \pm 1	1.87	1.43
东海原甲藻	50 \pm 1	1.92	1.27
中肋骨条藻	50 \pm 1	1.38	1.51
旋链角毛藻	40 \pm 1	1.40	1.08
塔玛亚历山大藻	50 \pm 1	1.77	1.57

壮前沟藻、旋链角毛藻均达到了最大活性,中肋骨条藻、东海原甲藻及塔玛亚历山大藻分别达到最大活性的 87%、86% 和 80%。

2.2 酶促反应的时间效应

图 2 表明了 p-NP 生成量与酶促反应时间的关系。如图 2 所示,在 pH 8.2,温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 的反应条件下,各藻 APase 的酶促反应速度曲线有所不同,即:初速度保持恒定的时间不同。这表明,在实验环境下,各藻 APase 的失活程度不同,底物浓度的降低、产物对酶的抑制及由于产物浓度增加而导致的逆反应加速的程度也存在区别。其中,东海原甲藻保持时间最短(90 min),塔玛亚历山大藻保持时间最长(在实验设定时间范围内:323 min),其余各藻初速度恒

为了方便进行各藻 APA 的比较,后续实验中,选择酶促反应温度在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。在此温度下,强

定时间在两者之内,分别为:强壮前沟藻 120 min,旋链角毛藻 180 min,中肋骨条藻 210 min。若确定实验所用 5 种微藻 APA 测定时通用的酶促反应时间,需选择各藻酶促反应初速度均恒定的时间即:90 min 为宜。

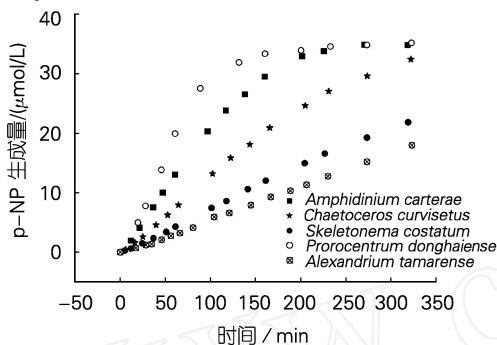


图 2 APase 酶促反应时间效应

Fig. 2 The effect of time on APase-catalyzed reaction

2.3 各藻碱性磷酸酶的米氏常数 (K_m)

在 pH 8.2, 温度 40 的反应条件下,中肋骨条藻碱性磷酸酶活性(APA_{sk})与底物浓度(S)的关系如图 3 所示。从图 3 可以看出,对于一定浓度的酶而言,当底物浓度较低时, APA_{sk} 随底物浓度的增加而升高,并在一定的浓度范围表现出线性关系。但当底物浓度增加到一定程度时, APA_{sk} 却不再随底物浓度的增加而上升,趋于一个极值,此时浓度为酶的底物饱和浓度。其它各藻 APA 与底物浓度的关系与中肋骨条藻类似。将 APA 与底物浓度关系以米氏方程拟合,可以得到各藻 APase 的特征动力学常数——米氏常数 (K_m) 及拟合结果的相关系数(表 2)。

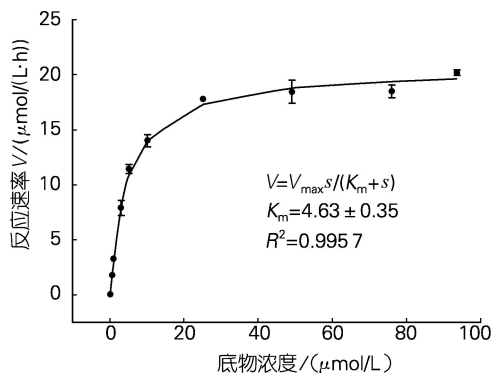


图 3 APA_{sk} 与底物浓度的关系

Fig. 3 The relationship between APA_{sk} and substrate concentration

表 2 各藻碱性磷酸酶 K_m

Tab. 2 The K_m of APase in various marine phytoplanktons

浮游植物种类	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	R^2
强壮前沟藻	10.98 \pm 1.34	0.991 7
东海原甲藻	3.17 \pm 0.28	0.989 2
中肋骨条藻	4.63 \pm 0.35	0.995 7
旋链角毛藻	25.51 \pm 3.68	0.992 2
塔玛亚历山大藻	1.39 \pm 0.16	0.989 3

注: pH = 8.2, $T = 40$

K_m 值是当酶促反应速度达到最大反应速度 1/2 时的底物浓度,其倒数 ($1/K_m$) 可近似地表示酶对底物亲和力的大小, $1/K_m$ 愈大,亲和力愈大。由表 2 可知,对于 5 种海洋微藻的 APase,在试验条件下,其 K_m 值存在一定的差异,表明各藻 APase 对底物对硝基苯磷酸二钠盐的亲和力及饱和底物浓度有所不同。比较各藻的 K_m 值可以发现:塔玛亚历山大藻 < 东海原甲藻 < 中肋骨条藻 < 强壮前沟藻 < 旋链角毛藻,揭示在磷限制情况下,塔玛亚历山大藻更易于分解利用 DOP,东海原甲藻、中肋骨条藻次之,旋链角毛藻利用 DOP 的能力最差。此外,若确定实验所用 5 种微藻 APase 测定时通用的底物浓度,需选择令各藻 APA 均可饱和的浓度,即至少为 10 倍旋链角毛藻的 K_m : 260 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 结论

作者在接近天然海水环境的 pH (8.2) 下,以对硝基苯磷酸二钠盐为底物,对 5 种常见海洋微藻在磷胁迫下产生的碱性磷酸酶的性质进行了初步研究。结果表明各藻种 APase 在最适酶促反应温度、活性保持时间及米氏常数等特性都有所不同,揭示各海洋微藻产生的 APase 存在着种属差异。通过性质实验,确立了酶促反应温度为 40,酶促反应时间为 90 min,底物浓度为 260 $\mu\text{mol/L}$ 的 APA 测定条件,为进行本实验中选用的 5 种微藻 APA 的进一步研究提供了方法基础。

参考文献:

[1] Hoppe H-G. Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: phenomena of phosphatase activity in the meso-pelagic zone [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1999, 19: 139-148.

[2] Shan Y, Mc Kelxie I D, Hart B T. Determination of alkaline phosphatase-hydrolyzable phosphorus in natural water systems by enzymatic flow injection [J]. *Limnol Oceanogr*, 1994, 39:1 993-2 000.

- [3] Karl D M, Yanagi K. Partial characterization of dissolved organic phosphorus pool in the oligotrophic North Pacific Ocean[J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42:1 398-1 405.
- [4] Hernández I, Pérez-Pastor A, Pérez-Lloréns J L. Ecological significance of phosphomonoesters and phosphomonoesterase activity in a small Mediterranean river and its estuary [J]. *Aquat Ecol*, 2000, 34:107-117.
- [5] Clark L L, Ingall E D, Brenner R. Maine phosphorus is selectively remineralized [J]. *Nature*, 1998, 393: 426.
- [6] Dyhrman S. Ectoenzymes in *Prorocentrum minimum* [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4: 619-627.
- [7] Conter J J, Wetzer R G. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by photoplankton and bacterioplankton[J]. *Limnol Oceanogr*, 1992, 37 (2):232-243.
- [8] Van Bockel W H M. Ability of *Phaeocytis* sp. to grow on organic phosphorus: direct measurement and prediction with the use of an inhibition constant [J]. *J Plankton Res*, 1991, 13: 959-970.
- [9] 王海黎, 洪华生, 黄邦钦. 海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探[J]. 厦门大学学报(自然版), 1995, 34 (3):415-420.
- [10] Waiser M J, Roberts R D. Microbial nutrient limitation in prairie saline lakes with high sulfate concentration [J]. *Limnol Oceanogr*, 1995, 40 (3):566-574.
- [11] Smith R E H, Kalff J. The effect of phosphorus limitation on algal growth rate: evidence from alkaline phosphatase[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1981, 38: 1 421-1 427.
- [12] Hernández I, Niell F X, Fernández J A. Alkaline phosphatase activity of the red alga *Corallina elongata* Ellis et Solander [J]. *Sci Mar*, 1996, 60: 297-306.

Characterization of alkaline phosphatase in several marine microalgae

TANG Hong-jie^{1,2}, YANG Ru-jun^{1,2}, ZHANG Chuan-song^{1,2}, LI Yan-bin^{1,2,3}, ZHU Chen-jian^{1,2}, WANG Xiu-lin^{1,2}

(1. Marine Polluted Eco-chemistry Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. College of Environment Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar. 10, 2006

Key words: marine microalgae; alkaline phosphatase; constant velocity time; optimum reaction temperature; Michaelis constant

Abstract: The alkaline phosphatase (APase) characteristics of five marine microalgae were investigated. The results showed that the optimum enzyme-catalyzed reaction temperature was between 40 and 50 degree, which was various among different species. There also appeared species-specific difference in the constant velocity time and K_m under 40 degree. The sequence of constant velocity time was as follows: *Prorocentrum donghaiense* < *Amphidinium carterae* < *Chaetoceros curvisetus* < *Skeletonema costatum* < *Alexandrium tamarense* and the sequence of Michaelis constant was as follows: *A. tamarense* < *P. donghaiense* < *S. costatum* < *A. carterae* < *C. curvisetus*.

(本文编辑:张培新)