

海带中 PEP 羧激酶性质的研究

徐志明

(大连市甘井子水产科学研究所, 大连 115000)

姚南瑜 李建之

(辽宁师范大学生物系, 大连 116022)

收稿日期 1989年12月25日

关键词 海带的 PEP 羧激酶, CO₂ 暗固定

提要 实验结果表明: PEP 羧激酶在海带体内有较高的羧化活性。PEP 羧化酶和苹果酸酶等与 CO₂ 暗固定有关的酶活性很低或几乎没有活性。PEP 羧激酶在海带体内的纵向分布规律是, 叶片的基部酶活性最高, 越靠近叶片顶端, 酶活性越低; 海带幼苗期的酶活性最高, 越接近成熟, 酶活性越低; NaCl 会使酶活性提高; 绿光或蓝光下的酶活性比红光下相对要高; 低温下的酶活性比高温下的要高。

PEP 羧激酶在藻体中的性质已有许多研究, 如网地藻 (*Dictyota dichotoma*), 褐舌藻 (*Spatoglossum pacificum*), 墨角藻 (*Fucus Vesiculosus*) 等, 而此酶在海带 (*Laminaria japonica*) 中的存在情况及其活性的变化, 还未见有研究报告。

I. 材料和方法

I. 1. 材料

大连黑石礁养殖场和凌水养殖四场人工养殖的新鲜海带。

I. 2. 方法

I.2.1. 海带不同叶片部位的酶活性测定

取大致等长的海带幼苗 (10~20cm), 从顶端、中部、基部分别取样进行酶提取及活性测定。

I.2.2. 海带不同发育阶段酶活性测定

在海带的幼苗期、凹凸期、薄嫩期及厚成期, 分别取其生长部位(基部)的酶, 进行酶活性测定。

I.2.3. 不同环境条件处理

光质 取3份数量相同的海带幼苗(10~20cm)浸于3个装有海水的白瓷盘中,分别用不同颜色的滤光板(厚约3mm)——红光、绿光和蓝光覆盖,在10℃情况下利用同一光源(日光灯)照射24h。

温度 取3份数量相同的海带幼苗(10~20cm),浸于盛有海水的白瓷盘中,分别放在3种不同温度下,即20℃~25℃,10℃~15℃,1℃~7℃,处理24h。

1.2.4. 酶的提取方法

粗酶液制备 称取新鲜海带(基部)100g,先用过滤海水冲洗,再由蒸馏水冲洗干净,吸干表面水份,剪成小碎块放于研钵中。倒入适量的液氮,将其研成匀浆,加入PVPP(聚乙烯吡咯烷酮)泥25mL(PVPP泥组成:50g PVPP,500mmol tris-乙酸300mL,pH8.0,巯基乙醇1μL,Tween-80 1滴,CaCl₂ 0.3g,EDTA0.1117g,Vcl.25g),搅拌均匀后放于4℃的冷藏柜中约0.5h,然后通过4层纱布挤出汁液、离心20min(2℃,15000×g),取上清液,在4℃下透析8h(透析液组成:tris-乙酸5mmol、巯基乙醇0.1mmol、pH8.0),得到粗酶液。

酶的部分纯化 在粗酶液中加入硫酸铵达25%,搅动30min,离心去沉淀(2℃,15000×g),上清液中加入硫酸铵达82%,搅拌30min,于-20℃的冰箱中冷冻过夜。冷冻的酶液取出融解后离心(2℃,15000×g,20min),弃去上清液,将沉淀溶于20mL冷50mmol tris-乙酸缓冲液中(pH8.0),不溶物质离心去除。重复上述过程一次,得到的上清液为“部分纯化酶”。

1.2.5. 酶活性测定

PEP 羧激酶活性测定 测定的标准反应体系3mL,含有下述成分:TES-KOH·100μmol,PEP5μmol,NaHCO₃ 10μmol,ADP5μmol,MnCl₂10μmol,NADH₂0.15μmol,苹果酸脱氢酶25个单位,0.5mL“部分纯化酶”。

取1cm光径的石英比色杯1只,按上述成分加入杯中(不加PEP),将比色杯在25℃下保温5min。利用751型分光光度计在340nm波长下把指针调至透光率为50%处。在比色杯中加入PEP,使反应开始,并立刻计时,每隔1min记录一次光密度的变化,连续记录5min。

PEP 羧化酶及苹果酸酶活性测定方法同上,只是辅助因子和反应底物有所差别,如MgCl₂代替MnCl₂,苹果酸代替PEP。

1.2.6. 酶活性计算

以每分钟OD值变化0.01作为一个酶活性单位,计算酶的活性:

$$\text{酶活性单位数/g 鲜重} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min}}{0.01} \times \frac{\text{酶提取液总体积}}{0.5} \times \frac{1}{\text{材料鲜重}}$$

II. 结果

II.1. 海带PEP羧激酶具有较高的活性,而PEP羧化酶的活性很低,苹果酸酶几乎没有活性(表1)。

II.2. 海带PEP羧激酶的活性在叶片基部较高,越靠近叶片的顶端,酶的活性越低(表2)。

II.3. 海带处于不同发育时期,其PEPck表现不同的活性,幼苗期的海带PEPck活性最高,随着海带的生长,酶的活性有所下降,到成熟期降至最低(如图1)。

II.4. 在酶活性测定时,向反应液中加入定量NaCl,使反应体系NaCl浓度为0.22mol,结果使PEPck活性提高(表3)。

在波长不同的光下,海带PEP羧激酶表现出不同的活性,绿光或蓝光下的酶活性比红光下

表1 海带 PEP 羧激酶与其它酶的活性比较

Tab. 1 Activity comparison between the PEPck and others in *L. japonica*

CO ₂ 暗固定酶	反应 pH	ΔOD/min	酶活性单位/g 鲜重	相对活性 (%)
PEPck	7.0	0.024	1.87	100
PEPc	7.5	0.006	0.51	27
苹果酸酶	7.5	0	0	0

表2 海带叶片不同部位 PEPck 活性比较

Tab. 2 Activity comparison PEPck in every part of laminaria

叶片部位	ΔOD/min	酶活性单位/g 鲜重	相对活性 (%)
基部	0.024	1.01	100
中部	0.008	0.41	40
顶部	0.004	0.18	18

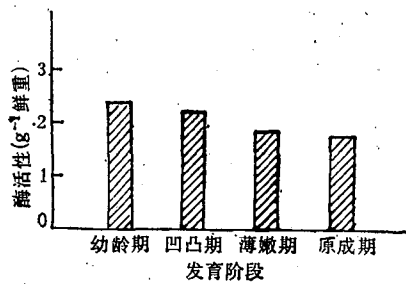


图1 海带不同发育阶段 PEPck 活性比较

Fig. 1 Activity comparison of PEPck in every developmental stages

表3 NaCl 对 PEPck 活性的影响

Tab. 3 Effects of NaCl on PEPck activity

苗长 (cm)	反应液 NaCl 浓度 (mol)	ΔOD/min	酶活性单位/g 鲜重	相对活性 (%)
10	0	0.0214	1.28	100
	0.22	0.031	1.86	150
20	0	0.016	0.99	100
	0.22	0.026	1.59	160
40	0	0.003	0.18	100
	0.22	0.011	0.68	380

表4 不同光质对酶活性的影响

Tab. 4 Effects of every lights on enzyme activity

光质	ΔOD/min	酶活性单位/g 鲜重	相对活性 (%)
红光	0.0044	0.44	45
绿光	0.0098	0.98	100
蓝光	0.0082	0.82	84

的相对要高(表 4)。

温度对酶活性的影响表现在低温情况下酶的活性较高,温度越高,酶活性越低(表 5)。

表 5 温度对酶活性的影响

Tab. 5 Effects of temperature on enzyme activity

温 度 (°C)	ΔOD/min	酶活性单位/g 鲜重	相对活性 (%)
25~20	0.0064	0.32	15
15~10	0.0272	1.36	64
7~1	0.0428	2.14	100

III. 结论

PEP 羧激酶是海带体内 CO₂ 暗固定的唯一重要酶,它对海带的生理代谢,生长发育及环境适应都具有重要意义。

参考文献

- [1] 姚南瑜,1987。藻类生理。大连工学院出版社,192~197。
- [2] 北京医学院,1978。生物化学。人民卫生出版社,128~129。
- [3] 浙江水产学院,1983。海洋学。农业出版社,42~45。
- [4] 斯蒂曼-尼耳森,1979。海洋光合作用。科学出版社,36~48。
- [5] Holdsworth, E.S., Bruck, K., 1977. Enzymes concerned with carboxylation in marine phytoplankton— purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase, *Arch. Biol. Chem. Biophys.* 182:87-94.
- [6] Kerby, H.V., 1983. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) *J. Phycol.* 19:1-3.
- [7] Kremer, B.P., 1981. Metabolic implications of nonphotosynthetic carbon fixation in brown macroalgae, *Phycol.* 20:242-250.
- [8] Akagawa, H., et al., 1972. Initial pathway of dark CO₂-fixation in brown algae, *Botanica Marina* 15:119-125.
- [9] Akagawa, H., Ikawa, T., and Nisizawa, K., 1972. The enzyme system for the entrance of CO₂ in the dark CO₂-fixation of brown algae, *Plant & cellphysiol* 13:999-1016.
- [10] J. Willenbrink, B.P. Kremer, 1979. Photosynthetic and light-independent carbon fixation in Macroscopic, Nereocystis and some selected pacific Laminariales, *Can. J. Bot.* 57:890-897.
- [11] B.P. Kremer and U. Koppers, 1977. Carboxylating enzymes and pathway of photosynthetic carbon assimilation in different Marine Algae—Evidence for the C₄-pathway? *Planta* 133:191-196.
- [12] B.P. Kremer and J.W. Markham, 1979. Carbon assimilation by different developmental stages of laminarine, *Planta* 144:497-501.
- [13] U. Koppers and B.P. Kremer, 1978. Longitudinal profiles of carbon dioxide fixation capacities in marine macroalgae, *Plant physiol.* 62:49-53.
- [14] B.P. Kremer, 1981. Metabolic implications of nonphotosynthetic carbon fixation in brown macroalgae, *Phycological* 20(3):242-250.
- [15] H. Akagawa, T. Ikawa and K. Nisizawa, 1972. CO₂-fixation in marine algae with special reference to the dark-fixation in brown algae, *Botanica Marina* 15:126-132.
- [16] Mazelis, M., B. Vennesland, 1957. Carbon dioxide fixation into oxalacetate in higher plants, *Plants physiol.* 32:591-600.
- [17] Schmitz, K., Luning, K., & Willenbrink, J., 1972. CO₂-fixation and Stoff transport in benthic marine algae, *Z. plant physiol.* 67:418-429.
- [18] W. Marshall Darley, 1982. *Algae Biology*. Blackwell scientific publications, pp.97-98.
- [19] U. Koppers and M. Weidner, 1980. Seasonal Variation of enzyme activity in *Laminaria hyperborea*, *Planta* 148:222-230.
- [20] Ruffner, H.P., Kliever, W.M., 1975. phospho-enolpyruvate carboxykinase activity in grape Berries, *plant physiol.* 56:67-71.
- [21] Tchen, T.T., B. Vennesland, 1955. Enzymatic carbon fixation into oxalacetate in wheat germ, *J. Biol. Chem.* 213:533-546.

- [22] Seubert, W., U. Remberger, 1961. Purification and mode of action of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellais*, *Biolchem.* 334:401-414.

STUDIES ON THE ACTIVITY OF PEPck IN *L. JAPONICA*

Xu Zhiming

(*Dalian Ganjingzhi Fishery Institute*, 115000)

Yao Nanyu and Li Jianzhi

(*Department of Biology, Liaoning normal University, Dalian* 116022)

Received: Dec. 25, 1989

Key Words: Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Dark CO₂-fixation

Abstract

Activity of PEPck in *L. japonica* has been studied. The results of the study show that the enzyme activity varies with longitudinal thallus profile, developmental stages and different environmental conditions. The activity is higher in basal part than in top part of laminaria plants. It is higher in the young fronds than in the old ones. The activity is higher under blue or green light than red one and suitable temperature range is 1-7°C. The activity is also stimulated by sodium chloride.

This paper discussed the meaning of the change regularities of the enzyme, and revealed the ecological significance of this enzyme for *L. japonica*.