

钝顶螺旋藻的硝酸还原酶与 氢酶之间的电子竞争^{*}

张慧苗 顾天青

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

提要 于1994年6—11月, 运用生物化学方法以钝顶螺旋藻为材料制备整体细胞和无细胞提取物。测定表明, 整体细胞硝酸还原酶与氢酶活性的相互关系和无细胞提取物氢酶与硝酸还原酶的(对还原甲基紫精)K_m值, 分别为 2.299×10^{-7} mol/L和 1.098×10^{-7} mol/L; 证实在硝酸还原酶与氢酶之间存在着电子竞争。

关键词 钝顶螺旋藻 硝酸还原酶 氢酶 电子竞争

作者(Gu et al., 1984)报道了在钝顶螺旋藻硝酸还原酶和氢酶之间存在着能量竞争的观点, 本文实验结果为这一观点提供了一个新的证据。

1 材料和方法

1.1 藻种和培养方法 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻株由北京营养源研究所提供。按Pinevitch等(1970)的方法培养。

1.2 藻种的收集与处理 将生长10—15d的藻用布氏漏斗抽滤去掉培养液, 得到糊状藻体再用新鲜培养液洗2—3次, 并悬浮于其中备用。取部分悬浮在新鲜培养液中的藻, 仍用抽滤法去培养液, 得到的藻糊用不含硝酸盐的无氮培养液洗2—3次, 以去掉培养液中的硝酸盐, 然后再悬浮于其中。藻悬浮液分别用于测定整体细胞的硝酸还原酶活性与氢酶活性。

1.3 测定方法 整体细胞硝酸还原酶活性测定按Herrero等(1981, 1984)的方法。整体细胞氢酶活性的测定按Gu等(1984)的方法。

钝顶螺旋藻无细胞提取物的制备及放氢活性的测定按Gu等(1987)的方法。钝顶螺旋藻无细胞提取物的硝酸还原酶活性测定: 首先抽滤悬浮有新鲜藻的硝酸盐培养液, 去掉培养液, 然后将之悬浮于Hepes缓冲液中(pH=8.0, 0.02mol/L), 呈糊状; 用X-press压榨破碎细胞, 以40 000 g离心40min, 上清液部分用于测定硝酸还原酶活性, 具体方法见Herrero(1984), 并略作修改。无细胞提取物的硝酸还原酶与氢酶K_m(米氏常数)的测定按Ho等(1973)的方法。

硝酸盐含量测定按Cawse等(1967)的方法。培养液滤出液中亚硝酸盐含量测定按Herrero等(1984)。蛋白浓度测定以牛血清白蛋白作为标准, 见Herrero等(1981)的方

* 国家自然科学基金资助项目, 3880189号。张慧苗, 女, 出生于1950年3月, 助研。

收稿日期: 1994年2月18日, 接受日期: 1994年5月16日。

法。

2 结果与讨论

2.1 钝顶螺旋藻对硝酸盐的利用及蛋白质合成 结果见图1。表明，钝顶螺旋藻在 Pinevitch 培养条件下，培养液中的硝酸盐不断被利用，亚硝酸盐含量不断增加，蛋白质也不断合成。随着藻生物量的不断增加，在硝酸还原酶作用下，藻将硝酸盐转化为亚硝酸盐，并将部分亚硝酸盐释入到培养液中，从而可以通过测定培养液中的亚硝酸盐的含量来估测硝酸还原酶活性。亚硝酸盐含量增加越多，硝酸还原酶活性越高，藻生物量随

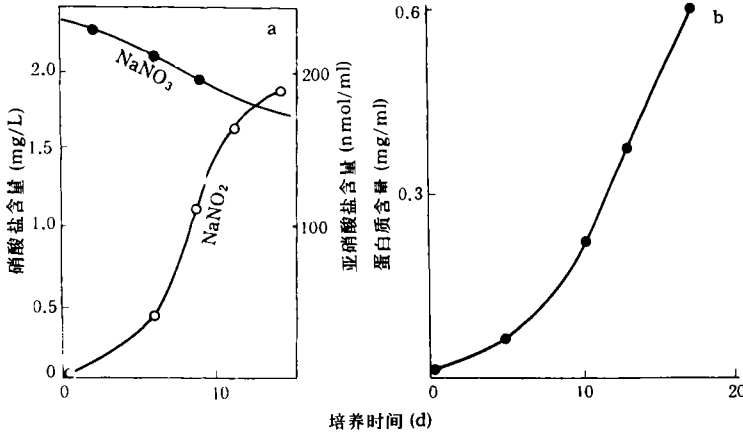


图1 钝顶螺旋藻对硝酸盐的利用及其与亚硝酸盐的关系 (a)，以及蛋白质的含量(b)

Fig.1 The utilization of NaNO₃ by *S. platensis*, and the changeable relation between it and NaNO₂ (a) and its protein content (b)

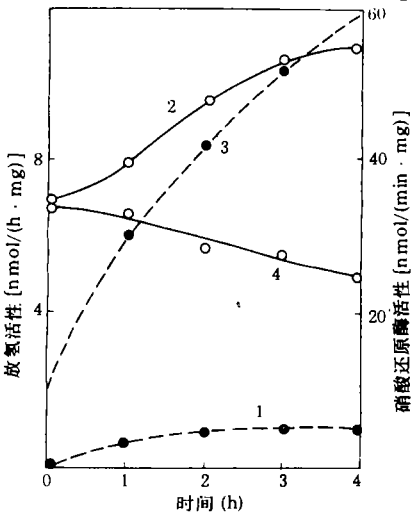


图2 钝顶螺旋藻放氢活性与硝酸还原的关系

Fig.2 Correlation between H₂ evolution and nitrate reductase activities in *S. platensis*

1, 2. 生长在以 NO₃⁻ 作为氮源的培养液中的钝顶螺旋藻：
1. 放氢活性；2. 硝酸还原酶活性。3,4. 转移到无氮培养液中之后的钝顶螺旋藻：3. 放氢活性；4. 硝酸还原酶活性。

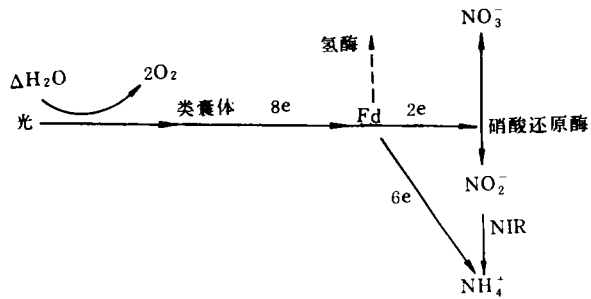


图3 光合作用与硝酸还原酶、氢酶电子传递途径

Fig.3 The electric transmission way between photosynthesis and nitrate reductase and hydrogenase

之也增加。硝酸还原酶活性水平同硝酸盐的利用和蛋白质合成之间有明显的正相关关系。

2.2 钝顶螺旋藻的硝酸还原酶与氢酶活性之间的关系 钝顶螺旋藻整体细胞硝酸还原酶与氢酶活性测定结果见图2。表明生长在硝酸盐中的藻细胞尽管在暗中厌氧诱导4h,也只有微量氢放出,而硝酸还原酶活性逐渐增高;如把培养基中的硝酸盐去掉,硝酸还原酶活性便逐渐下降,氢酶活性却逐渐升高。在蓝藻中,硝酸还原酶结合于类囊体膜上,光合作用产生还原Fd作为生理电子供体;氢酶也从还原型Fd得到电子,电子传递途径可归纳为图3。因此生长在硝酸盐培养液中,硝酸还原酶活性高于氢酶活性,从还原Fd来的电子只提供硝酸还原酶用于硝酸盐的还原。当去掉培养液中硝酸盐后,氢酶活性高于硝酸还原酶活性,从还原的Fd来的电子提供给氢酶,因而有氢的形成。以上说明,在它们之间存在着能量(还原力)的竞争,并说明生长在硝酸盐中的藻细胞放氢受到硝酸还原酶的抑制。

2.3 钝顶螺旋藻硝酸还原酶与氢酶的Km值 钝顶螺旋藻硝酸还原酶与氢酶对甲基紫精的Km值见图4。结果表明,硝酸还原酶Km值为 $1.098 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$;氢酶Km值为 $2.99 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。在体外测定硝酸还原酶与氢酶Km值时,氢酶与硝酸还原酶均可利用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原的甲基紫精作为还原剂,Km值越小则表示酶与底物的反应越趋于完全。这说明,硝酸还原酶Km值小于氢酶Km值;硝酸还原酶和氢酶对还原力的竞争,前者大于后者。这可以进一步说明,生长在硝酸盐中的藻细胞为什么没有氢的释放这一观点。本实验结果为这一观点提供了一个新的论据。

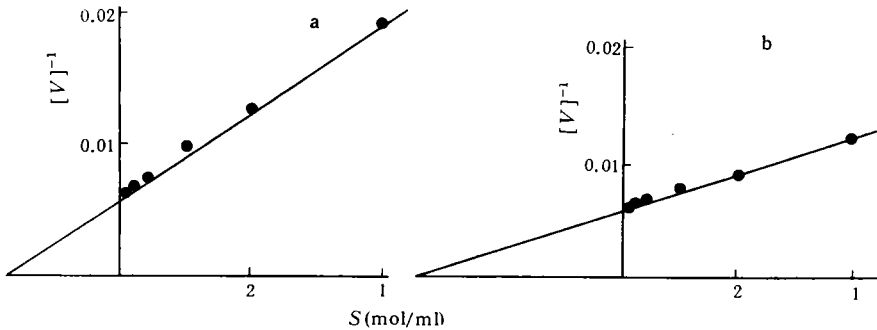


图4 钝顶螺旋藻氢酶(a)和硝酸还原酶(b)对甲基紫精的Km值(S 为还原甲基紫精, mol/ml)

Fig.4 The Km value of hydrogenase (a) and nitrate reductase (b) in *S. platensis* to methylviologen (S =reduced methylviologen, mol/ml)

3 结论

上述结果表明,当钝顶螺旋藻在适当条件下快速生长时,硝酸还原酶活性水平与硝酸盐的利用和蛋白质的合成有一种正相关关系;在硝酸还原酶与氢酶活性关系上存在着能量竞争,通过硝酸还原酶与氢酶的Km值说明能量竞争中前者大于后者。

参 考 文 献

- Cawse, P. A. et al., 1967, *Analyst.*, **92**: 311—315.
Gu, T.Q. and Wang, F.Z., 1984, *Hydrobiologia*, **116/117**: 467—470.

- Gu, T.Q. and Zhou, P.Z., 1987, *Hydrobiologia*, **151 / 152**: 557— 561.
Herrero, A. et al., 1981, *Bacteriol.*, **145** (1): 175— 180.
Herrero, A. et al., 1984, *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**: 454— 459.
Ho, C. et al., 1973, *Agr. Biol. Chem.*, **37** (1): 37— 44.
Pinevitch, V.V. et al., 1970, *Plant Physiol.*, **17**: 1 037— 1 045.

THE ELECTRON COMPETITION BETWEEN NITRATE REDUCTASE AND HYDROGENASE IN *SPIRULINA PLATENSIS*

Zhang Huimiao, Gu Tianqing

(*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044*)

Abstract The intact cell and cell-free extracts of *Spirulina platensis* for this June to November, 1994 were crushed in this study showing that nitrate reductase and hydrogenase activities were 1.0 nmol/(h · mg) and 55.0 nmol/(h · mg) in NO₃⁻ culture medium, respectively and that Km of cell-free nitrate reductase and hydrogenase (methylviologen in reduced state) were 1.098 × 10⁻⁷ mol/L and 2.299 × 10⁻⁷ mol/L, respectively. The results above confirm electron competition exists between nitrate reductase and hydrogenase in *Spirulina platensis*.

Key words *Spirulina platensis* Nitrate reductase Hydrogenase Electron competition