

海带磷酸烯醇式丙酮酸-羧激酶的研究*

陈敏资 侯和胜 姚南瑜 徐志明 李建之

(辽宁师范大学生物系, 大连 116022)

提要 于 1986—1990 年, 在大连凌水养殖四场采集海带, 对磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶在海带不同部位、不同发育时期及不同外界条件下活性的变化予以研究。结果表明, 该酶是海带体内唯一重要的催化 CO_2 暗固定的酶; 此酶活性由海带基部、中部至顶端逐渐减弱; 酶活性在用正常水温预处理藻体时最高; 正常盐度时酶的活性高于非正常盐度的酶活性; 增加 NH_4^+ 浓度可提高酶的活性。

关键词 海带 磷酸烯醇式丙酮酸-羧激酶 CO_2 暗固定 活性

磷酸烯醇式丙酮酸-羧激酶 (PEP-CK EC 4.1.1.32) 广泛存在于植物体内, 在酵母、眼虫、硅藻、褐藻及一些高等陆生植物中都有此酶 (Akagawa et al., 1972; Kremer, 1981), 它在藻体内催化碳的暗固定, 在藻类代谢中占重要地位。本文为海带的 PEP-CK 的研究探索。

1 材料和方法

1.1 材料 于 1986—1990 年在大连凌水养殖四场采集海带 (*Laminaria japonica*)。除取不同部位测定酶活性外, 其它均采用新鲜叶状体生长部位, 即柄部以上约 10cm 长的一段, 用来提取酶。

1.2 方法 取薄嫩期海带, 由基部、中部及顶端分别量等长样品, 提取并测定酶活性。在海带的幼苗期、凹凸期、薄嫩期及厚成期, 分别测定不同发育阶段的酶活性。

1.2.1 不同条件预处理 (1) 不同盐度处理, 取薄嫩期海带分别浸于正常海水、0.5 倍及 2 倍海水中, 在 10°C 下处理 15h。(2) 不同温度处理, 取厚成期海带浸于海水中, 分别在 $0-5^\circ\text{C}$, $14-18^\circ\text{C}$ 及 $24-28^\circ\text{C}$ 下处理 15h。(3) 不同 NH_4^+ 浓度海水处理, 制备 0.5, 2 及 4mol/L 的人工海水, 将厚成期海带分别浸于其中, 在 10°C 下处理 15h。

1.2.2 酶提取方法 (1) 粗酶液制备, 取新鲜藻体 100g, 用过滤海水及蒸馏水洗净吸干, 放于研钵中加适量液氮并研成匀浆; 再加入聚乙烯吡咯烷酮泥 25ml, 搅匀后于 4°C 下提取 0.5h; 经四层纱布挤出汁液, 离心 20min (2°C , $12\ 000\ \text{r/min}$)。按上清液: 透析液为 1:100, 每 2h 换一次透析液的方式, 在 4°C 下透析 6h 即得粗酶液。(2) 部分纯化酶制备, 向粗酶液中加入硫酸铵, 使达 25% 饱和; 离心 20min, 取上清液再加硫酸铵, 使达 82% 饱和, 搅拌 30min, 于 -20°C 冷冻过夜; 经融解后离心 20min, 取沉淀溶于 20ml 冷

* 国家自然科学基金资助, 386072 号。

收稿日期: 1990 年 3 月 16 日, 接受日期: 1994 年 3 月 6 日。

0.05mol/L Tris-乙酸缓冲液中重复一次硫酸铵分级和冻融过程,即得部分纯化酶。

1.2.3 酶活性测定 (1) PEP-CK 活性测定,取酶活性测定反应体系,即 TES-KOH 为 100 μ mol, pH = 7.0; PEP 为 5 μ mol; NaHCO₃ 为 10 μ mol; ADP 为 5 μ mol; MnCl₂ 为 10 μ mol; NADH + H⁺ 为 0.5 μ mol; MDH 为 25 单位,部分纯化酶,0.5ml 的体系,3ml (先不加 PEP); 将其加入 1cm 光径石英比色皿中,于 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴预温 5min 后,放入 751G 型分光光度计中;加入 PEP 使反应开始,迅速在 340nm 下调透光率至 50% 并立即计时,每 0.5min 记录一次透光率的变化,连续记录 5min。(2) 磷酸烯醇式丙酮酸-羧化酶 (PEP-C) 活性测定,取酶活性反应体系,即 TES-KOH 为 100 μ mol, pH = 7.5; MgCl₂ 为 10 μ mol; NaHCO₃ 为 10 μ mol; PEP 为 5 μ mol; NADH + H⁺ 为 0.15 μ mol; MDH 为 25 单位;部分纯化酶 0.5ml 的体系,除 PEP 外的各种成分均为 3ml; 将其加入石英比色皿中,在 25 $^{\circ}$ C 水浴中预温 5min 后,放入 751G 型分光光度计中;加入 PEP 使反应开始,在 340nm 下迅速调透光率至 50% 并计时,每 0.5min 记录一次透光率的变化,连续记录 5min。(3) 苹果酸酶 (MAE) 活性测定,取酶活性测定反应体系,即 Tris-乙酸为 100 μ mol, pH = 7.5; 苹果酸为 6 μ mol; NADP 为 0.15 μ mol; MgCl₂ 为 5 μ mol; MnCl₂ 为 5 μ mol; EDTA 为 3 μ mol; 部分纯化酶 0.5ml 的体系,3ml; 将其加入比色皿中在 25 $^{\circ}$ C 水浴中预温 5min,加入酶液 0.5ml,以不加 NADP 的反应体系为空白调透光率 100%,在 340nm 下每 0.5min 测一次透光率的变化,连续记录 5min。

1.2.4 酶活性计算 以每分钟催化底物转变 1 μ mol 为一个活性单位。分别以每公斤鲜重 (kg, FW, 全天同)、干重 (DW, 全天同) 及蛋白 (Pro) 的酶活性单位来表示该酶的活性。

2 结果与讨论

2.1 海带中 3 种酶活性的比较 以海带为试材测定 PEP-CK, PEP-C 及 MAE 3 种酶的活性,发现 PEP-CK 具有较高的活性,而 PEP-C 及 MAE 几乎没有活性(表 1)。可见,PEP-CK 在海带的 CO₂ 暗固定中占有重要地位。

表 1 海带中 3 种酶活性的测定结果

Tab. 1 The three enzyme activities in *Laminaria japonica*

酶	反应体系中 pH	酶活性单位/kg	活性比较 (以 PEP-CK 为 100%)
PEP-CK	7.0	3.72	100
PEP-C	7.5	0.09	2
MAE	7.5	0.21	6

2.2 海带叶状体不同部位与不同发育时期 PEP-CK 活性的测定 测定结果表明,该酶的活性在叶状体的生长部位高于顶端已分化的部位;随着海带的发育酶活性逐渐下降,其中幼苗期活性最高,成熟期最低;以鲜重为单位计其差别较小,厚成期约占幼苗期的 3/4;以干重和蛋白质含量为单位计,则差别很大,厚成期酶活性约占幼苗期的 1/2 (表 2)。说明,PEP-CK 在海带体内的纵向分布具有规律。

据 Kremer (1981) 用 *Saccharina* 等所做的 ¹⁴C 标记实验,在暗中,PEP-CK 的作用底物 PEP 来源于甘露醇。甘露醇是褐藻体内有机物质运输的主要形式,经常由老叶

表 2 海带叶状体不同部位与不同发育时期 PEP-CK 活性测定结果

Tab. 2 The PEP-CK activity in different parts and different developmental periods of the thallus in *Laminaria japonica*

部位与发育期		酶活性单位			酶活性比较		
		kg FW	kg DW	kg Pro	kg FW	kg DW	kg Pro
部 位	基 部	4.02	40.02	144.24	100	100	100
	中 部	1.62	14.34	46.26	40	36	32
	顶 端	0.72	6.24	19.92	18	16	14
发 育 期	幼苗期	4.38	45.54	157.14	100	100	100
	凹凸期	4.20	41.94	142.80	96	92	91
	薄嫩期	3.60	35.88	128.28	82	79	82
	厚成期	3.36	17.46	87.42	77	38	56

状体运到新叶状体和生长中心,通过 PEP-CK 催化的羧化作用,可把由甘露醇转化而来的 PEP 转变成四碳化合物,进而形成氨基酸等原生质的重要成分,促进藻体生长部位的旺盛生长。Schmitz 等(1972)的研究表明,底栖海藻,在其有甘露醇不断输入的幼嫩叶状体或生长区,有高的呼吸速率。PEP-CK 催化的羧化反应可以补偿由于生长部位旺盛的呼吸作用引起的 CO_2 损失,即捕获呼吸中释放的 CO_2 ,使之重新固定到有用的四碳化合物中。在此过程中产生的三磷酸腺苷,也可为旺盛生长的细胞提供能量。可见 PEP-CK 在海带体内的纵向分布的特点,对海带生长具有重要的生理意义。

对海带不同部位蛋白质含量的分析证明,基部以干重为基础的蛋白质含量略高于中部及顶端;海带幼苗期蛋白质含量占干重的百分数,也高于成熟时期的(表 3)。根据细胞内含氮量高则酶活性高的结论(Küppers et al., 1980),海带幼苗期及其生长部位 PEP-CK 活性高就不难理解了。

表 3 海带不同部位蛋白质的含量

Tab. 3 The protein contents in different parts of the thallus of *Laminaria japonica*

发育期	部 位	干重占鲜重的 百分比	蛋白质占鲜重的 百分比	蛋白质占干重的 百分比
幼 苗 期	基 部	9.61	2.79	29.00
	中 部	9.68	2.75	28.40
	顶 部	9.66	2.76	28.60
凹 凸 期	基 部	10.04	2.95	29.37
	中 部	11.28	2.10	27.50
	顶 部	11.52	3.14	27.30
薄 嫩 期	基 部	15.02	4.00	27.02
厚 成 期	基 部	19.20	3.84	20.00

2.3 不同外界条件对 PEP-CK 活性的影响 用不同温度、盐度(以新采海带为对照)、 NH_4^+ 浓度(以海水浸泡者为对照)处理海带后,提取酶测定其活性,结果见表 4。表明,(1)于海水正常温度下预处理的海带,其 PEP-CK 活性较高,水温过高或过低均有降低

表 4 在不同环境条件下海带 PEP-CK 的活性

Tab. 4 The PEP-CK activities of the thallus of *Laminari japonica* in different environmental conditions

测定项目		酶活性单位/kg,FW	酶活性比较
温 度 (°C)	0—5	1.14	53
	14—18	2.16	100
	24—28	0.60	28
	对 照	2.40	110
盐 度 (海水)	正 常	2.22	100
	0.5 倍	1.74	78
	2.0 倍	0.96	43
	对 照	3.54	159
NH ₄ ⁺ 浓度 (μmlo/L)	0.5	1.50	83
	2.0	1.98	110
	4.0	1.92	107
	对 照	1.80	100

酶活性的趋势。海带幼小时的光合速率比成长后的高(姚南瑜等,1981),海带幼苗期海水温度合适,光照较强,有利于光合作用进行,可形成充足的 PEP,此时海带的 PEP-CK 活性高,可以多形成作为原生质成分基础的碳骨架,有利于幼苗的生长。(2) 盐度过高或过低都会降低 PEP-CK 活性,高盐度的这种影响则更严重。这可能与其对细胞的毒害作用及影响细胞内正常的生理进程有关 (3) 在增加海水中 NH₄⁺ 浓度时 PEP-CK 表现出高的活性。NH₄⁺ 是海藻的主要氮素来源,而氮是酶蛋白及原生质的构成成分,因而推测 NH₄⁺ 的增加会促进细胞的代谢,提高酶的数量,从而加速 PEP 的羧化反应。Chapman 等(1977)在加拿大 Margaret 湾用 *L. longicuris* 所做试验也已证实: 海藻生长的最旺季节是同海水及组织中的含氮量相平行的。海带发育后期的 PEP-CK 的活性虽较苗期降低,但仍维持在一定水平,此时阳光虽弱但水中含氮量增加,藻体可利用储存的甘露醇生成 PEP,通过 PEP-CK 的作用来固定 CO₂,以补偿光合固碳的不足,利用含氮化合物多的优势保证同化作用得以充分进行。Wu Chaoyuan 等曾报道(1984),中国北方沿海表层海水中含氮量有时可低到 5μg/L,青岛市海带养殖场为促海藻生长所施氮肥,总氮量可达 80μg/L,在多氮海水中,海带、紫菜快速生长。增施氮肥使海带等迅速生长的效果,其作用是多方面的。联系本研究结果可看出,氮促进 PEP-CK 活性,从而提高碳的固定量,可能也是一个原因。

总之,不同的外界条件对 PEP-CK 活性有不同的影响,这种影响是直接的还是通过对细胞的生理生化方面的影响来间接起作用,这有待进一步研究。

参 考 文 献

- 姚南瑜、李建之,1981,海带光合特性研究,植物生理学通讯,4: 18—20。
 Akagawa, H. et al., 1972, Initial pathway of dark CO₂-fixation in brown algae, *Bot. Mar.*, 15: 119—125。
 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 & Cell physiol.*, 13: 999—1016。

- Chapman, R. O. and Craigie, J. S., 1977, Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen, *Mar. Biol.*, **40**: 197—205.
- Kremer, B. P., 1981, Metabolic implications of nonphotosynthetic carbon fixation in brown macroalgae, *Phycologia*, **20**(3): 242—250.
- Küppers, U. et al., 1980, Seasonal variation of enzyme activity in *Laminaria hyperborea*, *Planta*, **148**: 222—230.
- Schmitz, K. Lüning, K. & Willenbrink, J., 1972, CO₂-fixation and stofftransport in benthische marine algae, *Z. Plant Physiol.*, **67**: 418—429.
- Wu Chaoyuan et al., 1984, Utilization of ammonium nitrogen by *Porphyra pejoensis* and *Gracilaria vermiculosa*, 11th International Seaweed Symposium, Dr. W. Junk Publishers, pp. 475—477.

STUDIES ON THE PHOSPHOENOLPYRURATE CARBOXYKINASE OF *LAMINARIA JAPONICA*

Chen Minzi, Hou Hesheng, Yao Nanyu, Xu Zhiming, Li Jianzhi

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116022)

ABSTRACT

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEP-CK) activities of different parts, developmental periods, and conditions of marine brown algae *Laminaria japonica* collected from the Ling Shui breeding station were studied from 1986 to 1990. The results showed that PEP-CK is the sole important enzyme which catalyzed light independent fixation of carbon dioxide in *L. japonica*. PEP-CK activity in basal part of the thallus was high, and decreased gradually toward the apical part. The enzymic activity in the young developmental period was higher than that in the mature period.

There were some tendencies that some environmental factors might affect the PEP-CK activity, that is, the activities at/in normal seawater temperature and salinity were higher than that at/in abnormal ones. Increasing the content of NH₄⁺ in medium could also promote PEP-CK activity.

Key words *Laminaria japonica* Phosphoenolpyruvate carboxykinase Light independent fixation of CO₂ Activity