

研究简报

螺旋藻氢酶的制备及其特性的研究*

顾天青 张惠苗 吕京文 周佩珍

(中国科学院植物研究所, 北京)

氢是理想的不污染环境的能源,在世界能源日趋紧张的情况下,氢代谢这一研究课题受到了许多学者的重视。藻类中一些绿藻可以放氢已有不少研究;关于蓝藻的放氢,特别是不具有异形胞蓝藻的放氢研究目前报道得很少。螺旋藻是一种不能固氮的丝状蓝藻,但具有氢酶。顾天青等已进行了螺旋藻整体细胞放氢特性的研究^[1],证明了氢酶与硝酸还原酶之间存在还原能力的竞争。在此基础上,我们提取了螺旋藻的氢酶,在分子水平上对它的放氢特性进行了研究,并以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原的甲基紫精作为催化放氢的试验。

一、材料和方法

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 来源于非洲乍得湖,按文献[3]提供的方法培养。

取生长 15—20 天的藻,用过滤法进行收集,之后用不含有 NO_3^- 的无氮培养基以 3—5 倍的体积洗 2—3 次,以洗去藻体中的 NO_3^- ,并再悬浮于无氮培养基中。藻悬液置于 500ml 的血清瓶中,瓶口用血清塞塞好,用真空抽气泵抽去瓶内的空气并充以氮气,放在室温下暗中诱导时间 12—15h。诱导后的藻体滤去其培养液,取 40g 用 X-press 压榨机压榨破碎,并悬浮于 250ml 的 Hepes-HCl (0.02mol/L, pH = 8.0) 缓冲液中,分别同时用 3 000g, 5 000g, 10 000g, 40 000g, 140 000g 离心 40min, 去掉沉淀,上清液部分即为无细胞制剂。轻轻将上清液倒入血清瓶内,抽真空并充以氮气达到饱和。在光、暗条件下测放氢活性。取 40 000g 离心的上清液,用 DEAE-52 纤维素柱 (2.5cm × 30cm) 进行层析。纤维素柱事先用 Hepes-HCl (0.02mol/L, pH = 8.0) 缓冲液平衡。上样后分别用含 0.1mol/L, 0.2mol/L, 0.3mol/L KCl 的 Hepes-HCl 缓冲液洗脱。用 0.1mol/L KCl 缓冲液洗脱柱子收集的样品为组分 I; 0.2mol/L KCl 缓冲液洗脱柱子收集的样品为组分 II; 0.3mol/L KCl 缓冲液洗脱柱子收集的样品为组分 III。在 0.3mol/L KCl 缓冲液洗脱的氢酶部分为进一步纯化再行第二次 DEAE-52 柱层析。试验全部过程在无氧条件下进行,所用的缓冲液都经过抽气并以氮气饱和,缓冲液中加入连二亚硫酸钠 0.05—0.1g/L。

氢酶活性,按文献[2]方法用被连二亚硫酸钠还原的甲基紫精来测定,蛋白浓度按文

* 本工作是汤佩松先生指导的光合、固氮、放氢工作的一部分。

收稿日期: 1988年3月7日。

献[2]方法测定,用 BSA 作标准蛋白,活性单位为 $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{mg})$ 。

二、试验结果

1. pH 对螺旋藻无细胞制剂放氢活性的影响

在 0.02mol/L Hepes-HCl 缓冲液中,螺旋藻无细胞制剂放氢活性的最适 pH 为 8.0, pH 为 5.85 时无放氢活性。见图 1。

2. 温度对螺旋藻无细胞制剂放氢活性的影响

螺旋藻无细胞制剂放氢活性的最适温度约在 40°C 。见图 2。

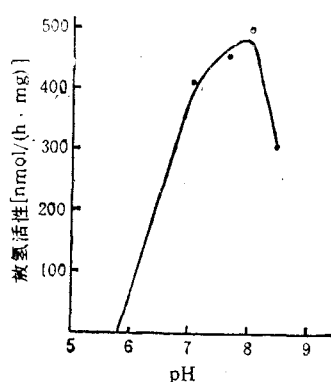


图 1 pH 对螺旋藻无细胞制剂放氢活性的影响

Fig. 1 The effect of pH on hydrogen-evolution activity of cell-free preparation of *Spirulina platensis*

(反应瓶内样品为 $40\ 000\text{g}$ 离心后的上清液; 光强为 $20\ 000\text{lx}$, 静止, 32°C 保温半小时)

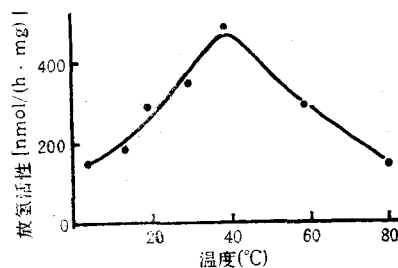


图 2 温度对螺旋藻无细胞制剂放氢活性的作用

Fig. 2 The effect of temperature on hydrogen-evolution activity of cell-free preparation of *Spirulina platensis*

(反应瓶内为 $40\ 000\text{g}$ 离心的上清液, 瓶内气相为 N_2 , 静止, 暗中, 反应半小时)

3. 用不同离心速度获得的螺旋藻的无细胞制剂的放氢活性

不同离心速度得到的螺旋藻无细胞制剂在光照和在暗中(其它反应条件相同)测得的

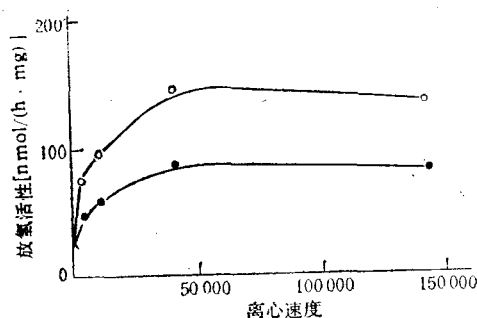


图 3 离心速度对螺旋藻无细胞制剂放氢活性的作用

Fig. 3 The effect of centrifugal speed on hydrogen-evolution activity of cell-free preparation of *Spirulina platensis*

○为光照下的放氢; ●为暗中的放氢。反应瓶内充氮气,在光、暗两种条件下反应 30 min, 30°C , 静止, 光强度为 $20\ 000\text{lx}$ 。

放氢活性随离心速度增大而明显升高,光照下活性增高,当离心速度上升到40 000g 时,放氢活性不再增加;离心速度直增大到 140 000g 时,放氢活性则略有下降趋势;这时在光照下测得的放氢活性比在暗中高出约 40%。结果见图 3。这个结果说明,在螺旋藻的无细胞制剂中确实存在着一个组分,这个组分在光照时可以促进螺旋藻的氢酶放氢而又不能用增加离心速度去除。

4. 螺旋藻氢酶的分离提取及放氢活性的测定

螺旋藻的无细胞制剂经过两次 DEAE-52 纤维素柱层析后得到了部分的纯化,用日立 356 双波长双光束分光光度计测得的吸收光谱见图 4。

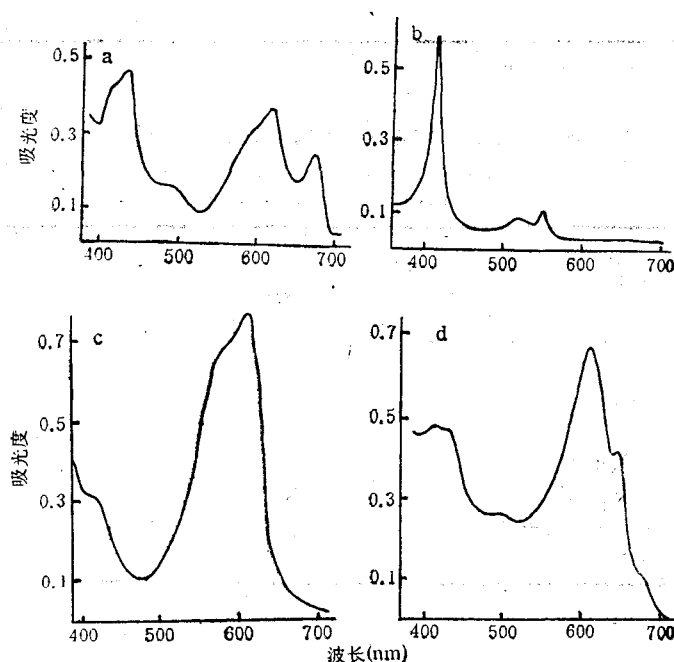


图 4 螺旋藻的无细胞制剂和从 DEAE-52 纤维素柱不同洗脱组分的吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectrum of cell-free preparations from *Spirulina platensis* and fractions eluted from DEAE-52

a. 40 000g 离心后的上清液,即无细胞制剂; b. 组分 I; c. 组分 II; d. 组分 III。

不同浓度的 KCl 缓冲液洗脱柱子的流出物对其所测得的放氢活性(表 1)结果表明,单独测定时,氢酶的主要活性部分都集中在组分 III 中,组分 I, II 都没有;在光照下测得的组分 III 的放氢活性比在暗中高出约 24%。如果将组分 I, II 分别与组分 III 进行活性互补再测定放氢活性,则发现组分 I 与组分 III 进行互补测得的放氢活性在光照下比在暗中高出 26%,而组分 II 与组分 III 进行互补测得的放氢活性在光照下比在暗中高出约 40%。这个结果表明,组分 II 更明显地促进光照下的氢酶的放氢活性。

5. 组分 II 对氢酶放氢活性的作用

螺旋藻的氢酶只有在连二亚硫酸钠和甲基紫精都存在的情况下才见放氢活性(见表

表 1 组分 I, II, III 放氢活性的测定

Tab. 1 Determination of hydrogen-evolution activity of fractions I, II, III

组 分	放 氢 活 性 nmol/(h·mg)	
	光	暗
对照	0	0
组分 I	0	0
组分 II	0	0
组分 III	990.06	754.63
组分 III + 组分 I	1 034.00	757.00
组分 III + 组分 II	1 247.00	753.00

注: 反应 30min, 28℃, 光强 20 000lx。

表 2 组分 II 对螺旋藻氢酶放氢活性的作用

Tab. 2 The effect of fraction II on hydrogen-evolution activity of hydrogenase of *Spirulina platensis*

反应系统	放 氢 活 性 nmol/(h·mg)	
	光	暗
组分 III + MV + Na ₂ S ₂ O ₄ (对照)	761.8	588.20
组分 III + Na ₂ S ₂ O ₄	0	0
组分 III + MV	0	0
组分 III + Na ₂ S ₂ O ₄ + 组分 II	0	0
组分 III + MV + 组分 II	189.20	171.70
组分 III + MV + Na ₂ S ₂ O ₄ + 组分 II	938.20	521.30
组分 II + MV + Na ₂ S ₂ O ₄	0	0

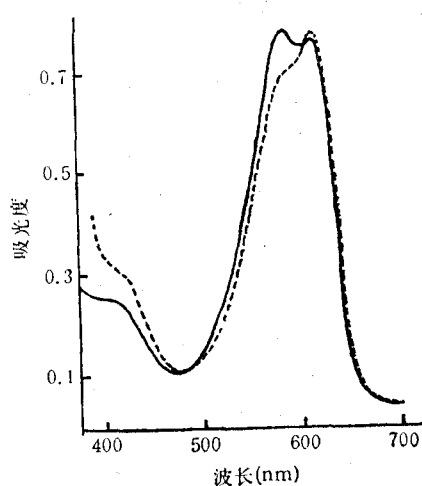


图 5 组分 II 在氧化态和还原态时的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectrum of fraction II in the oxidized state and reduced state

-----氧化态的吸收峰; ——还原态的吸收峰。

2), 用组分 II 代替甲基紫精加入反应系统中则无放氢活性, 说明组分 II 不能代替甲基紫精起作用; 而用组分 II 替代连二亚硫酸钠加入反应系统中, 则表现出明显地放氢活性(见表 2), 单独组分 II 无放氢活性, 这个结果表明组分 II 在反应系统中可以同连二亚硫酸钠一样作为电子供体。组分 II 氧化态的光谱吸收高峰在 590nm, 它的还原态光谱吸收高峰在 620nm (见图 5), 组分 II 对螺旋藻氢酶放氢活性的促进作用是在还原态。

三、讨论与小结

从本文的试验结果中看出, 螺旋藻的无细胞制剂的放氢活性(在其它条件都相同的情况下)在光照时比在暗中高出约 40% (见图 3)。这就提示我们, 在无细胞制剂中有一个与光有关并能促进放氢活性的组分存在。对样品进行分离提取得到 3 个具有不同吸收光谱特性的组分(见图 4b, c, d), 从图形上反映出各组分的纯度不够, 因此在具有氢酶活性的组分 III 中, 光照时的放氢活性仍比暗中高。在多次的重复试验中, 有时得到相对比较纯的氢酶组分, 这时测得的放氢活性在光照下与在暗中很接近, 但得到的氢酶活性偏低, 这有待分离技术的进一步改进。从列出的试验结果(表 2)中不难看出, 在测定氢酶放氢活性的反应系统中, 如不再加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (由于氢酶对氧的敏感性, 整个柱层析所用的洗脱液都加入一定量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 则表现不出放氢活性; 如在反应系统中加入一定量的组分 II, 则表现出明显地放氢活性, 表明组分 II 可以替代或部分替代 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 在反应系统中的作用, 这时组分 II 吸收光谱高峰在 590nm, 处在还原态。在光照下, 组分 II 对螺旋藻氢酶放氢活性的促进作用比对照组高出 22% (见表 2), 而对暗中的放氢活性作用不明显, 显然组分 II 的作用与光有关。对组分 II 的生理、生化特性及其作用机理, 还有待于更深入的探讨。

螺旋藻的无细胞制剂随着离心速度增加, 上清液部分不断得到纯化, 从图 3 中看出, 当离心速度增大到 140 000g 时, 这时测得的放氢活性略有下降趋势, 这可能是由于氢酶对氧的敏感性增加所致。同样经过纤维素柱层析后得到的纯化后的氢酶部分, 只要见氧就失活, 而它的无细胞制剂暴露于空气中时间达 20h, 仍有微量放氢活性(数据未列出), 这一结果表明在粗提物中存在有氢酶的保护系统。

参 考 文 献

- [1] 顾天青、王发珠, 1984。螺旋藻 *Spirulina platensis* 整体细胞放氢特性的研究。植物生理学报 10(1): 1—9。
- [2] Maria, J. L., J. L. serra and K. Krishna Rao, 1979. Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous of the cyanobacterium *Spirulina maxima*. FEBS. Lett. 98: 342—346.
- [3] Pinevitch, V. V., N. N. Verzillin & A. A. Mikhailov, 1970. *Spirulina platensis* a new object of intensive mass cultivation. Plant. Physiol. 17:1037—1045.

PREPARATION AND PROPERTIES OF HYDROGENASE FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

Gu Tianqing, Zhang Huimiao, Lü Jingwen and Zhou Peizhen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

. ABSTRACT

Hydrogenase exists in *Spirulina platensis*. This paper deals with the isolation and purification of hydrogenase from *Spirulina platensis*. Hydrogenase from *Spirulina platensis* can catalyze the evolution of hydrogen from methyl viologen reduced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. The optimum pH for hydrogen-evolution is about pH 8, and optimum temperature ranges from 35—45°C. Hydrogenase from *Spirulina platensis* is very sensitive to O_2 and its cell-free preparation by differential centrifugation has different hydrogen-evolution activity in light and in dark. The activity of hydrogen-evolution increased when light was given, and the factor which can promote hydrogen-evolution was isolated.