

一种海生单细胞蓝藻的氢酶特点和功能探讨*

戴和平 张宪孔

(中国科学院水生生物研究所)

关键词 阿格门氏藻 BG-1, 氢酶放氢, 吸氢, 抑制剂

提要 海生单细胞蓝藻, 阿格门氏藻, (*Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1) BG-1 显示至少含有两种氢酶: 吸氢酶——只催化需氧的氢吸收; 可逆性氢酶——既催化需光的氢吸收, 又催化以还原甲基紫精为电子供体的氢释放, 但活性大不相同。后者为前者的 3—5 倍。两种氢酶的表达均依赖于藻细胞生长培养基中的镍离子的存在。放氢活性受 HgCl_2 的强烈抑制, 但不受 DCMU (敌草隆, 后同) 和 KCN 的影响, 表明氢酶的氢基团参与催化作用, 而该反应既不涉及光合作用的系统 II, 也不涉及呼吸作用的末端电子传递。 NaN_3 (叠氮钠, 后同) 强烈地促进整细胞蓝藻的放氢, 而对破碎细胞却无明显作用, 表明 NaN_3 有可能通过其它的酶间接作用于可逆性氢酶, 超氧离子歧化酶是其中之一。加入 NaN_3 到整细胞悬液后, 超氧离子歧化酶的活性受抑制, 并在细胞内积累, 反馈抑制还原甲基紫精的自氧化, 进而导致可逆性氢酶放氢的促进, 显示了超氧离子歧化酶与可逆性氢酶的关系。

迄今所研究的蓝藻中, 绝大多数具有代谢氢的酶。业已发现, 至少有三种酶直接参与蓝藻的氢代谢: 即固氮酶, 存在于所有能固氮的蓝藻种类中, 在催化固氮的同时, 放出氢气; 吸氢酶, 经常与固氮酶并存, 主要催化利用分子氢的反应; 第三种是存在于不同种类的蓝藻中的可逆性氢酶。根据条件, 可逆性氢酶既可催化放氢, 也可催化利用分子氢的反应。一般只有在厌氧条件下, 当适宜的人工电子供体存在时, 才能测到它催化放氢的活性。可逆性氢酶的最适生理电子供体是什么? 进而, 这种氢酶在蓝藻中存在的生理学意义及其与能量转化系统之间的关系仍不十分清楚^[1,2,9]。在讨论将蓝藻的放氢作为未来新能源的可能性之前, 这些均是需解决的基本问题。

本文报道了一种单细胞海生蓝藻, 阿格门氏藻 BG-1 中氢酶的存在和某些特点, 并对可

逆性氢酶的生理学功能进行了初步探讨。该种在 Texase 大学藻种中心定名, 编号为聚球藻 ATCC 29404。

一、材料和方法

1. 藻种及其培养 海生单细胞蓝藻阿格门氏藻 BG-1 来自 Texas 大学海洋研究所, 用 ASP₂ 培养基, 在 35°C 的水浴中以 50mL 培养管日光下无菌培养, 并连续通入含 1—2% 二氧化碳的过滤空气。培养物生长到对数期后, 取样测定或收获。

2. 氢的测定 用氢电极法^[2]和气相色谱法。气相色谱仪为上分 103 型, 5A 分子筛柱, 柱温 30°C, 热导池检测。反应器皿为具塞 6.5 mL 的密封玻璃瓶, 培养液 4mL, 抽真空、用氢

*中国科学院科学基金资助项目。

气洗涤并平衡使厌氧。测放氢时向反应液加 10 m mol/L 的连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 和 2.5 m mol/L 的甲基紫精 (methyl viologen); 测吸氢时, 向反应瓶气相中注入氢气使之约占 10%; 35°C, 3500Lx 光照下摇动保温 1—3 时, 用微量注射器取气样注入色谱仪, 检测放氢或吸氢活性。

3. 氧的测定 用氧电极法, 条件同电极法测氢。

超氧离子歧化酶 (SOD) 活性的测定采用李文杰等^[1]的方法, 以培养基 (pH 8.5) 为反应液, 直接加邻苯三酚 (2 m mol/L)。

4. 无细胞制剂的制备 取培养物, 加溶菌酶 (10 mg/L)、蔗糖 (40 m mol/L)、Hepes 缓冲剂 (50 m mol/L, pH 7.5), 在 35°C 的水浴中摇动保温 1 时, 离心, 并用含等量蔗糖和 Hspes 的新鲜缓冲液 (pH 7.5) 洗涤两次, 再将沉淀悬浮于含 5 m mol/L Hepes 的缓冲液 (pH 7.5) 中低渗胀破细胞, 低速离心 (4000 转/min) 5 分钟, 去除未完全破碎的细胞沉淀物后, 再于 4°C 320,000×g 离心 1 小时, 上清液即为可溶性部分, 沉淀为细胞膜片部分。

叶绿素测定按 Arnon 法进行^[3]。

二、结果和讨论

1. 阿格门氏藻 BG-1 中氢酶的存在及其对镍离子 (Ni^{+2}) 的依赖性

在已检查过的绝大多数蓝藻中, 都能发现存在于胞质中的可逆性氢酶和结合在膜上的吸氢酶。最近报道, 蓝藻中的这两类氢酶均强烈地受生长培养基中的镍离子的影响^[5,13]。从而, 镍的作用亦可以作为检测藻中氢酶存在的手段之一。阿格门氏藻 BG-1 亦同时含有至少两种氢酶, 它们的活性均明显地受生长培养基中镍离子的刺激 (表 1)。然而, 以氧分子作为电子受体的吸氢活性, 既使在有镍条件下生长的细胞中亦很微弱 ($\leq \mu \text{ mol/mg}$ 叶绿素·h)。相反, 在同样条件下, 该藻显示相当高的可逆性氢酶的放氢活性 (可高达 40 $\mu \text{ mol/mg}$ 叶绿素·h

以上) 和相对小得多的吸氢活性 (约为放氢活性的 1/3—1/5)。其放氢活性与光照与否无关, 但其在厌氧条件下的吸氢活性却是严格依赖于光的 (图 1)。无论在什么条件下, 不加人工电子供体, 则无任何放氢活性可以检出。一般认为, 可逆性氢酶在有分子氢存在的厌氧条件下, 分子氢可以做为细胞内一系列反应 (如二氧化碳固定, 硝酸盐及亚硝酸盐的还原等) 的电子供体, 而在有适宜的还原剂存在时 (如还原甲基紫精)。则催化质子还原为氢的反应, 其吸氢和放氢的活性既是可逆的, 又是相当的^[7,11]。本实验中, 放氢活性远比吸氢活性高, 显示了阿格门氏藻 BG-1 中可逆性氢酶的特点, 而其对镍离子的依赖性又是与以往报道相一致的。关于蓝藻的可逆性氢酶, 在不加外源电子供体的条件下, 能否催化放出分子氢的问题, 不同的研究者报道的结果常有矛盾, 迄今声称得到这种活性者的实验证据尚不能完全令人信服^[6,8]。本实验仍然显示, 在不加外源电子供体的正常生理条件下, 蓝藻的可逆性氢酶并不催化放出分子氢的反应。这个属性是与绿藻所含可逆性氢酶显然不同的。

表 1 阿格门氏藻 BG-1 的氢酶活性及其对镍离子的依赖性

Tab. 1 The activity of hydrogenase of *Amenellum quadruplicatum* strain BG-1 and its Ni^{+2} -dependence

生长条件	放氢活性	需氧吸氢	需光吸氢
+ Ni^{+2}	40±5	3±0.5	10±2
- Ni^{+2}	5±0.5	—	—

注: BG-1 生长于添加和不加 Ni^{+2} (100 n mol/L) 的 ASP₂ 培养基上, 35°C, 100 $\mu\text{E/m}^2\cdot\text{s}$ 的光照下培养两天; 细胞密度约 0.17 mg 干重/mL。活性单位: $\mu \text{ mol H}_2/\text{mg}$ 叶绿素×h。

2. 几种抑制剂对蓝藻 BG-1 可逆性氢酶的影响

HgCl_2 , KCN, DCMU 和 NaN_3 是呼吸作用和光合作用研究中的常用抑制剂, 这些抑制剂对蓝藻 BG-1 的可逆性氢酶活性亦有不同影响 (表 2)。其中, HgCl_2 对放氢作用有强烈的

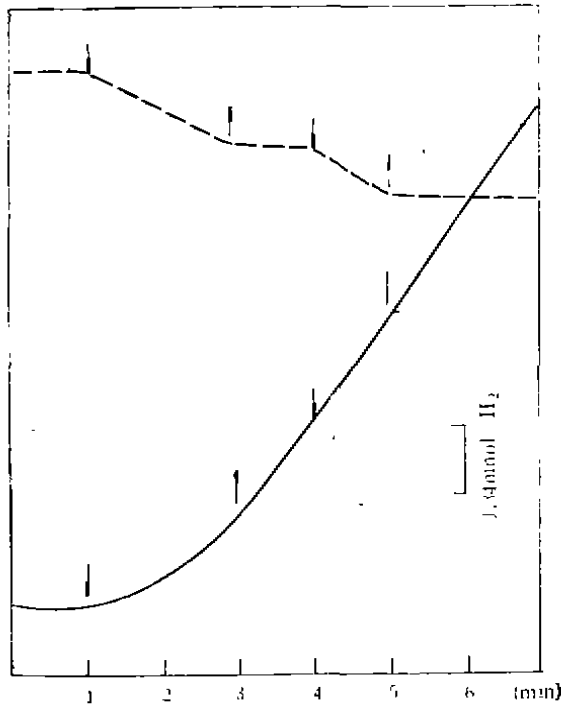


图 1 阿格门氏藻 BG-1 的放氢(——)和吸氢(----)电极记录图

Fig. 1 Tracings, reduced scale, of recordings of H₂ evolution (——) and uptake (----) at 35°C by *Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1

注：培养物直接转入电极槽后，吹氮气 3 分钟以去除氧，测吸氢时注入氢饱和的水 (20 μL)，测放氢时在记录 1 分后加入连二亚硫酸钠和甲基紫精；细胞密度为 0.16--0.18 mg 干重/mL。

↓ 示开灯照光反应；↑ 示关灯暗反应

抑制，这可能是由于 Hg⁺² 作用到可逆性氢酶的活性基团巯基 (-SH) 所致。据报道，HgCl₂ 可以与醋酸杆菌的氢酶活性基团 (-SH) 相复合，使之失去催化活性^[22]。KCN 和 DCMU 对其放氢活性无影响，显示蓝藻可逆性氢酶在人工电子供体存在时的放氢作用，既不涉及光合作用的系统 II，也不涉及呼吸作用的末端电子传递。有趣的是，在呼吸作用中与 KCN 有相同的抑制场所，对蓝藻生长有相当毒性的 NaN₃，却大大促进阿格门氏藻 BG-1 中可逆性氢酶的放氢活性，而这种促进作用又只出现在整细胞材料中。破碎细胞之可溶性部分中的可逆性氢酶的放氢活性，并不显示受 NaN₃ 的刺激(图

表 2 几种抑制剂对阿格门氏藻 BG-1 对放氢活性的影响

Tab. 2 The effect of several inhibitors on the activity of H₂-evolution by *Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1

抑制剂	放氢活性(%)
对照	100
HgCl ₂	0
KCN	100
NaN ₃	246
DCMU	100

注：BG-1 在 ASP₂ 培养基上生长两天，测定时分别加抑制剂 25 μ mol/L HgCl₂、2.5 mmol/L KCN、20 mmol/L NaN₃ 和 40 mmol/L 的 DCMU，并加入二亚硫酸钠和甲基紫精；用气相色谱测 H₂，对照为 100% = 33 μ mol H₂/mg 叶绿素 × h。

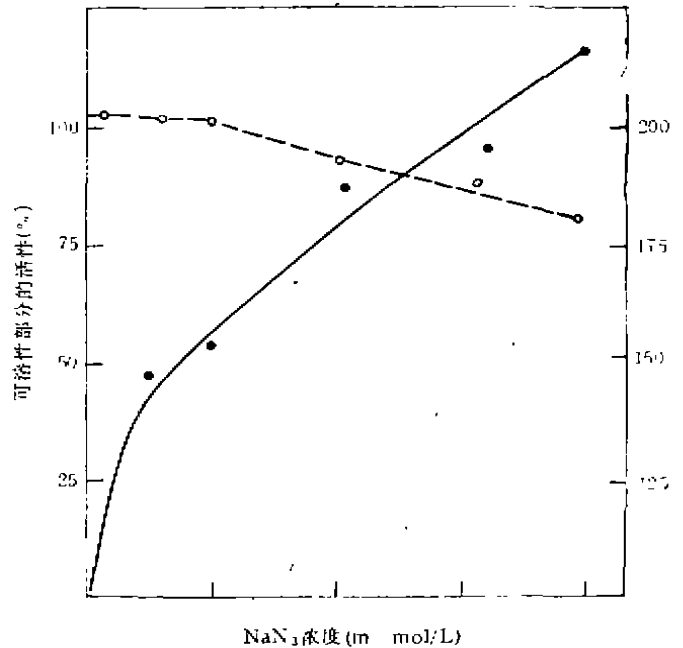


图 2 NaN₃ 对阿格门氏藻 BG-1 的整细胞(·——·)和破碎细胞可溶性部分(○——○)放氢活性的影响

Fig. 2 The effect of azide on the reduced methyl viologen dependent H₂ evolution of *Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1 intact cells (·——·) and soluble extracts (○——○)

注：100% (对照)对前者和后者分别为 31 和 7.2 μ mol H₂/mg 叶绿素 × h。

2)。看来，NaN₃ 对可溶性氢酶的影响与细胞的完整性有关，这种抑制剂不象是直接作用于酶本身，而是通过细胞中的其他有关反应，间

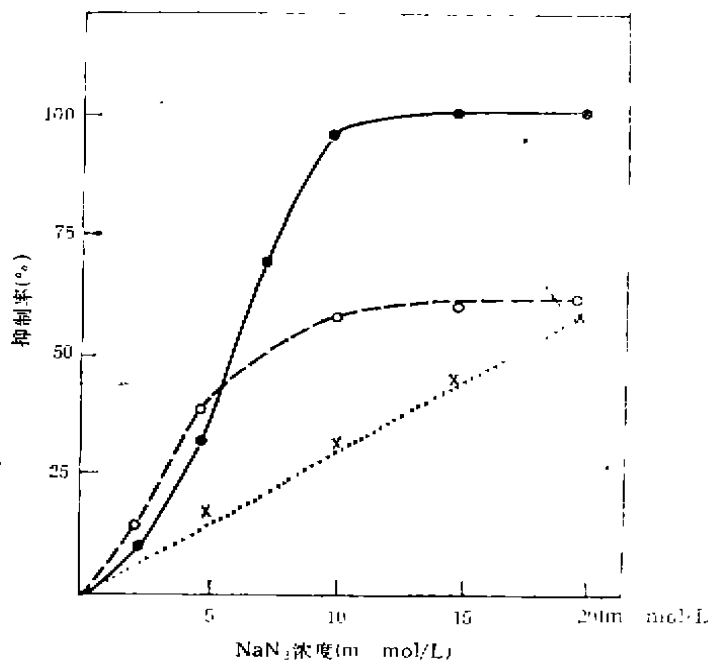


图3 NaN_3 对阿格门氏藻 BG-1 的光合作用 (·—·)、呼吸作用 (○—○) 和超氧离子歧化酶 (×····×) 的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of the photosynthesis (·—·) respiration (○—○) and SOD (×····×) of *Agmenicellum quadruplicatum* strain BG-1 by azide

注: 对照(100%), 光合放氧为 $1200 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 叶绿素 $\times\text{h}$; 呼吸作用为 $730 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 叶绿素 $\times\text{h}$; 酶的活性为 $350 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 叶绿素 $\times\text{h}$ 。

接作用于可逆性氢酶的。

3. 阿格门氏藻 BG-1 中的氢酶和超氧离子歧化酶的关系

为进一步探讨 NaN_3 对可逆性氢酶的作用机理, 我们测定了超氧离子歧化酶 (superoxide dismutase, 缩写 SOD) 的活性。 NaN_3 不仅抑制阿格门氏藻 BG-1 的光合作用, 呼吸作用, 也对 SOD 的活性有相当的抑制(图 3)。SOD 催化清除生物体内物质代谢过程中产生的, 对细胞有毒害作用的超氧离子 O_2^- 的反应^[20]。邻苯三酚 (pyrogallol) 在碱性条件下亦可以产生这种超氧离子自由基^[21]。当在厌氧条件下, 把蓝藻细胞破碎物在添加 10m mol/L 邻苯三酚的培养液中 (pH 8.5) 保温时, 甲基紫精被还原 (呈深蓝紫色), 可逆性氢酶显示光放氢活性。已知甲基紫精作为光合链中的人工电子受体, 在植物无细胞制剂中, 它可以从光合链上获得

电子而被还原, 进而为氧酶放氢提供电子, 但它本身又易自氧化, 产生超氧离子^[20]而失去支持放氢的能力。在同样条件下的整细胞实验中, 邻苯三酚在胞外产生的超氧离子, 可能受到胞壁的阻碍而难以进入胞内。同时, 完整的光合器又使甲基紫精不易截获电子, 故无上述反应发生。看来, NaN_3 对蓝藻整细胞可逆性氢酶放氢活性的促进, 可能是由于超氧离子歧化酶受 NaN_3 的抑制, 胞内自产的超氧离子积累, 反馈抑制外源还原甲基紫精的自氧化, 使之能够稳定地为放氢提供电子。这样, 蓝藻中氢酶的生理学功能则显示与超氧离子歧化酶有关, 间接参与降低或清除对细胞有害的超氧离子。

参 考 文 献

- [1] 李文杰等, 1986. 超氧化物歧化酶活性快速测定的新方法——极谱氧电极法。生物化学与生物物理学报 18 (2): 185—192.

- [2] 张宪孔等, 1986. 固氮蓝藻高放氢突变种的筛选和放氢特点. 水生生物学报 **10**(9): 217—223.
- [3] Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant physiol* **24**: 1—9.
- [4] Bothe, H., 1992. Hydrogen production by algae. *Experientia* **38**: 59—64.
- [5] Daday, A. and G. D. Smith, 1983. The effect of nickel on the hydrogen metabolism of the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *FEMS Microbiol Letter* **20**: 327—330.
- [6] Hall, D. O., et al., 1985. Photobiological production of fuels and chemical by immobilized algae. *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **26**: 161—185.
- [7] Houchins, J. P., 1984. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria, *Biochem. Biophys. Acta* **768**: 227—255.
- [8] Laczko, I. and K. Barabas, 1981. Hydrogen evolution by photobleached *Anabaena cylindrica*. *Planta* **153**: 312—316.
- [9] Lambert, G. R. and G. D. Smith, 1981. The hydrogen metabolism of cyanobacteria, *Biol. Rev.* **56**: 589—660.
- [10] Ort, D. and S. Izawa, 1974. Studies on the energy-coupling sites of photophosphorylation. *Plant physiol.* **53** (3): 370—376.
- [11] Papen, H. et al., 1986. Hydrogenase activities in cyanobacteria, *Biochemie* **68**: 121—131.
- [12] Schneider, K. and H. G. Schlegel, 1976. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem. Biophys. Acta* **452**: 66—80.
- [13] Zhang, X. K. (张宪孔) et al., 1984. Nickel control of hydrogen production and uptake in *Anabaena* spp. Strains CA and IF. *J. Gen. Microbiol* **130**: 1813—1818.

CHARACTERISTICS AND POSSIBLE FUNCTION OF HYDROGENASE IN A UNICELLULAR MARINE CYANOBACTERIUM

Dai Heping and Zhang Xiankong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Key words *Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1, Hydrogenase, Hydrogen evolution and uptake, Inhibitor

Abstract

The unicellular marine blue-green alga (cyanobacterium) *Agmenellum quadruplicatum* strain BG-1 (*Synechococcus* ATCC 29404) contained at least two different hydrogenases, the uptake hydrogenase catalyzing only the O_2 -dependent uptake of H_2 , the reversible one catalyzing both light-dependent hydrogen uptake and high H_2 -evolution with methyl viologen reduced by $Na_2S_2O_4$ as the electron donor. The expression of both hydrogenase was dependent on Ni^{2+} in the growth medium. The activity of H_2 -evolution was strongly inhibited by $HgCl_2$, but not by DCMU, KCN and NaN_3 , suggesting that SH-group in hydrogenase was functioning and neither photosystem II nor terminal electron chain of respiration was involved in the reaction. The hydrogen evolution by intact cells was greatly promoted by addition of azide. We supposed that NaN_3 would affect hydrogenase via other relative enzymes except through the permeability of the cell envelope. Superoxide dismutase (SOD) was measured. By addition of NaN_3 , the activity of SOD was repressed, O_2^- accumulated in the intact cells would be negative feedback to the autoxidation of reduced methyl viologen, resulting in the promotion of H_2 -evolution by reversible hydrogenase. Possibly, one of the physiological function of reversible hydrogenase is likely involved in decreation and/or scavenging of O_2 produced in the cell metabolism.