

螺旋藻乙醇酸氧化酶 (GO) 的研究*

王志忠 巩东辉 刘 华 乔 辰**

(内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019)

摘要: 采用比色法对鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 (S_1) 与国外引进的钝顶螺旋藻 (S_2) 和极大螺旋藻 (S_3) 的乙醇酸氧化酶 (GO) 进行了比较研究。结果表明: 在 25℃、pH 8.0 条件下, S_1 、 S_2 和 S_3 的 GO 活性分别为 70.9 U/gFW、59.6 U/gFW 和 80.9 U/gFW; 最适温度均为 30℃; 在 0℃ ~ 35℃ (30℃) 范围内比较稳定; 最适 pH 值分别为 8.6、8.2 和 8.4; pH 值稳定范围, S_1 为 7.6 ~ 10.0、 S_2 为 8.0 ~ 9.0; S_3 为 8.0 ~ 8.6。 S_1 的 GO 对温度和 pH 适应范围最宽, 且在低温、高温、强酸和强碱下的活性均比引进种的高。

关键词: 螺旋藻, 乙醇酸氧化酶, 酶动力学, 鄂尔多斯高原碱湖

中图分类号: Q554.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0068-04

Study on Glycolic Acid Oxidase (GO) of *Spirulina* (*Arthrospira*) *

WANG Zhi-Zhong GONG Dong-Hui LIU Hua QIAO Chen**

(Department of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehaote 010019)

Abstract: A comparative study on the glycolic acid oxidase (GO) of the domestic *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (S_1) from alkaline lake in Erdos Plateau and the imported *S. (A.) platensis* (S_2) and *S. (A.) maxima* (S_3) as well is made with colorimetric method. The results show that activity of GO (25℃, pH 8.0) of S_1 , S_2 and S_3 is 70.9 U/gFW, 59.6 U/gFW and 80.9 U/gFW respectively; the GO's optimum temperature of S_1 , S_2 and S_3 is 30℃; the GO's optimum pH value of S_1 is 8.6, while that of S_2 8.2 and that of S_3 8.4; the GO of S_1 is stable from 0℃ to 35℃ and from pH 7.6 to pH 10.0, while that of S_2 from 0℃ to 30℃ and from pH 8.0 to pH 9.0 and that of S_3 from 0℃ to 35℃ and from pH 8.0 to pH 8.6. Adaptive range of S_1 GO for temperature and pH is wider, and activity at low and high temperature and under strong acid and alkali conditions is higher than that of the imported species.

Key words: *Spirulina* (*Arthrospira*), Glycolic acid oxidase (GO), Enzyme kinetics, Alkaline lake in Erdos plateau

乙醇酸氧化酶 (Glycolic acid oxidase, 简写 GO) (EC 1.1.3.15) 广泛存在于光合生物中, 是光呼吸代谢中的关键酶^[1], 其活性高低与光呼吸强弱呈正相关。研究证明光呼吸释放的 CO₂ 约占 C₃ 植物净光合速率所同化 CO₂ 的 20 % ~ 50 %^[2], 这对植物的生长和干物质积累都有很大的影响。因此, 研究乙醇酸氧化酶无论是筛选低光呼吸品种, 还是调控光呼吸代谢均具有重要意义。

螺旋藻是一类光合放氧的丝状蓝藻, 属于 C₃ 植物。其富含优质蛋白 (60 % ~ 70 %) 和多种生物活性物质, 是人们广泛接受的功能性食品之一^[3]。目前, 有关螺旋藻生长和光合作用等研究较多, 但酶的研究相对较少, 特别是有关 GO 的研究未见报

* 国家自然科学基金项目 (No. 30460104)

内蒙古自然科学基金项目 (No. 990303-4)

** 通讯作者 Tel: 0471-6946216, E-mail: qiao-chen@sohu.com

收稿日期: 2004-10-13, 修回日期: 2004-12-01

道。本文以鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻与国外引进种为材料, 对其乙醇酸氧化酶进行了比较研究, 一则丰富该地区螺旋藻种质资源的基础研究; 二则为已初具规模的鄂尔多斯高原螺旋藻产业筛选低光呼吸品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料见表 1。

表 1 实验材料一览表

样品	物种	产地 (来源)
S ₁	钝顶螺旋藻	鄂尔多斯高原巴彦淖尔碱湖
	<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	(内蒙古农业大学)
S ₂	钝顶螺旋藻	非洲 Chad 湖
	<i>S. (A.) platensis</i>	(南京大学生物科学与技术系)
S ₃	极大螺旋藻	墨西哥 Sosa Texcoco 湖
	<i>S. (A.) maxima</i>	(南京大学生物科学与技术系)

注: 下文对应样品以此表为准

1.2 方法

1.2.1 藻的培养: 采用 Zarrouk 培养液^[4]在室温自然光照下通气培养。

1.2.2 粗酶液制备: 准确称取处于对数生长期新鲜藻 3 g, 置于预冷研钵中, 加入少许 pH 8.0 的磷酸缓冲液及石英砂, 在冰浴中研磨成匀浆, 离心 5 min (3,500 r/min), 取上清液定容至 20 mL 备用。

1.2.3 GO 活性测定: 采用比色法^[5], 略有改动。以 $\Delta 0.01 A_{620}/\text{min}$ 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

1.2.4 温度对 GO 影响: 在 0℃ ~ 96℃ 和 pH 8.0 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液条件下分别测定酶活性, 绘制酶活性 - 温度曲线; 将酶液在上述各温度条件下保温 15 min, 后在 25℃ 下测定酶活性, 绘制酶稳定性 - 温度曲线。每个处理重复 3 次。

1.2.5 pH 值对 GO 影响: 在 pH 2.6 ~ 12.0 范围内分别测定酶活性, pH 2.6 ~ 7.0 用柠檬酸-磷酸缓冲液, pH 7.6 ~ 9.0 用硼酸-硼砂缓冲液, pH 10.0 ~ 12.0 用磷酸氢二钠和 NaOH 调配成的, 绘制酶活性 - pH 值曲线。将酶液在各相应的 pH 条件下保温 15 min, 在 25℃ 时测定酶活性, 绘制酶稳定性 - pH 曲线。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻 GO 活性

在 25℃、pH 8.0 时, Sosa Texcoco 湖的极大螺旋藻 (S₃) GO 活性 (80.9 U/gFW) 最高, 鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 (S₁) 活性 (70.9 U/gFW) 居中, Chad 湖的钝顶螺旋藻 (S₂) 活性 (59.6 U/gFW) 最低, 且钝顶螺旋藻 (S₁、S₂) GO 活性均低于极大螺旋藻。

2.2 温度对螺旋藻 GO 的影响

温度对螺旋藻 GO 活性的影响见图 1。螺旋藻 GO 活性呈钟形曲线, 最适温度为

30℃, 此时 S_1 、 S_2 和 S_3 的 GO 活性分别为 81.5 U/gFW、67.5 U/gFW 和 98.5 U/gFW。在 0℃ 和 96℃ 下, 鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 S_1 的 GO 活性均高于引进种, 说明其对低温和高温的忍受能力最强 (表 2)。

温度对螺旋藻 GO 稳定性的影响见图 2。鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 S_1 和 Sosa Texcoco 湖的极大螺旋藻 S_3 的 GO 在 0℃ ~ 35℃ 范围内比较稳定, Chad 湖的钝顶螺旋藻 S_2 的 GO 在 0℃ ~ 30℃ 比较稳定, S_1 和 S_3 的 GO 热稳定范围比 S_2 宽 5℃。在温度稳定性范围内, GO 活性高低排列顺序为 $S_3 > S_1 > S_2$; 当温度超过 35℃ (或 30℃) 以后, GO 稳定性均明显下降, 在 3 个样品中 S_2 的 GO 稳定性最差。在 96℃ 下, 3 个样品 GO 稳定性均下降至最低, 但 S_1 比引进种的略好。

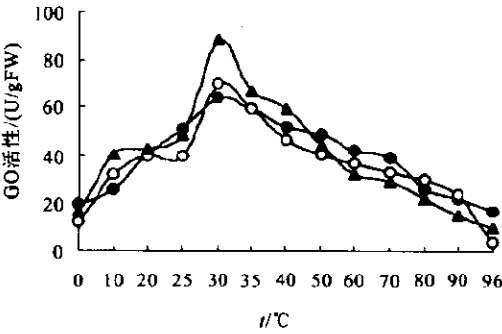


图 1 螺旋藻 GO 温度曲线

● S_1 , ○ S_2 , ▲ S_3

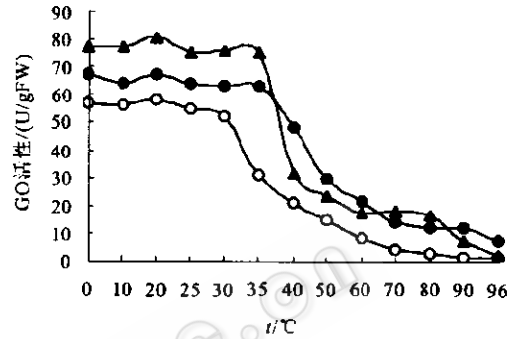


图 2 螺旋藻 GO 热稳定性曲线

● S_1 , ○ S_2 , ▲ S_3

表 2 在极端和最适的温度、pH 值下螺旋藻 GO 活性的比较

		S_1		S_2		S_3		S_1/S_2	S_1/S_3
		活性 (U/gFW)	最大 活性%	活性 (U/gFW)	最大 活性%	活性 (U/gFW)	最大 活性%		
温度 (°C)	0	20.0	31.2	16.6	18.8	12.0	17.1	1.2	1.1
	30	64.0	-	88.5	-	70	-	0.7	0.9
	96	17.0	26.6	10.0	11.3	4.0	5.7	1.7	4.3
pH	2.6	5.0	7.1	1.2	2.0	3.5	4.3	4.2	1.4
	最适	70.9	-	60.0	-	80.6	-	1.2	0.9
	11.0	11.1	15.7	5.4	9.0	9.9	12.3	2.1	1.1

注: S_1/S_2 和 S_1/S_3 是指酶活性之比

2.3 pH 值对 GO 活性的影响

螺旋藻 GO 活性随 pH 值的变化见图 3。3 个样品 GO 的最适 pH 值在 8.2 ~ 8.6 之间, 其中 S_1 为 8.6, 活性为 70.9 U/gFW; S_2 为 8.2, 活性为 60.2 U/gFW; S_3 为 8.4, 活性为 80.6 U/gFW。当 $pH \geq 9.0$ 时, S_1 的 GO 活性均比引进种的高 (表 2), 说明鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 GO 比引进种有较强耐碱性。在 pH 2.6 和 pH 12.0 时, 螺旋藻 GO 活性均很低, 甚至有的已失活。

螺旋藻 GO 的 pH 值稳定性见图 4。3 个样品的 pH 值稳定性曲线均呈不等腰梯形, 稳定范围不尽相同, S_1 在 pH 7.6 ~ 10.0; S_2 在 pH 8.0 ~ 9.0; S_3 在 pH 8.0 ~ 8.6。鄂

鄂尔多斯高原钝顶螺旋藻 S_1 GO 的 pH 稳定范围最宽, Chad 湖的钝顶螺旋藻 S_2 次之, Sosa Texcoco 湖的极大螺旋藻 S_3 最窄。在稳定范围内, GO 活性强弱排列为 $S_3 > S_1 > S_2$ 。

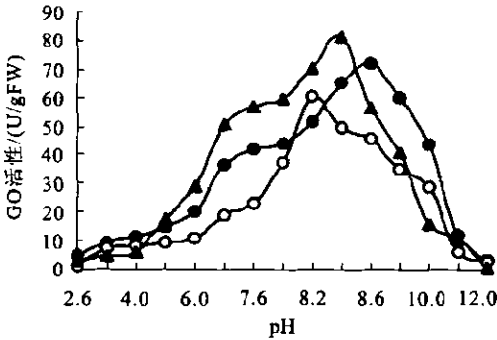


图3 螺旋藻 GO 活性 pH 曲线

● S_1 , ○ S_2 , ▲ S_3

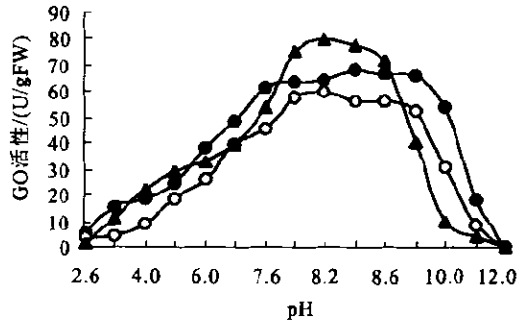


图4 螺旋藻 GO 活性 pH 稳定性曲线

● S_1 , ○ S_2 , ▲ S_3

3 讨论

从总体上看, Chad 湖的钝顶螺旋藻 GO 的活性最低, 鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻居中, Sosa Texcoco 湖的极大螺旋藻最高。我们在培养液温度 $22.8^{\circ}\text{C} \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、光强 $31 \sim 233 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 下, Chad 湖的钝顶螺旋藻净光合速率最高, 鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻次之, Sosa Texcoco 湖的极大螺旋藻最低(待发表)。由此看出, 螺旋藻 GO 活性与净光合速率存在负相关。但 GO 活性对螺旋藻光呼吸、净光合速率及产量的影响程度仍有待于进一步研究。

鄂尔多斯高原碱湖的钝顶螺旋藻 GO 对 pH 值适应范围较引进种的宽; 在强碱下的活性也较高, 这与其所处环境有关。鄂尔多斯高原位于世界盐碱湖带上, 其盐碱湖面积小, 湖表卤水的水位、矿化度和化学成分受地质条件、大气降水、风力和蒸发作用等自然因素的影响^[6]。该地区年降水量为 $250 \sim 360 \text{ mm}$; 年蒸发量为 $2470 \text{ mm} \sim 2691 \text{ mm}$, 蒸发量是降水量的 $7 \sim 11$ 倍; 风多风大, 年平均风速 3.5 m/s , 最大风速 28 m/s , 扬沙日数 $40 \sim 50 \text{ d/a}$, 沙暴日数 $12 \sim 16 \text{ d/a}$ ^[7]。碱湖多数年份有湖表卤水, 但当气候连续干旱时, 也会出现干涸。所以受当地地质和气候条件的影响, 湖水的 pH 值高且波动比较大。在这样碱湖中生存的螺旋藻经过长期的自然选择, 表现出对 pH 值变化范围宽和高 pH 环境的适应性。

致谢 引进的钝顶螺旋藻和极大螺旋藻由曾昭琪教授惠赠, 特此致谢。

参考文献

- [1] 王炜军, 彭新湘, 李明启. 华南农业大学学报, 1999, 20 (3): 117 ~ 122.
- [2] 孟繁静, 刘道宏, 苏业瑜. 植物生理生化. 北京: 中国农业出版社, 1999. 171.
- [3] 汪志平, 钱凯先. 微生物学通报, 2000, 27 (4): 288 ~ 291.
- [4] Zarrouk C. PhD Thesis University of Paris France, 1966, 74.
- [5] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990. 126 ~ 129.
- [6] 郑喜玉, 张明刚, 董继和, 等. 内蒙古盐湖. 北京: 科学出版社, 1992. 137.
- [7] 《伊克昭盟农业区划》编辑委员会. 伊克昭盟农业区划. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1990. 9 ~ 105.