

# 浑球红假单胞菌在暗处发酵生长时的固氮酶、吸氢酶以及放氢机制的研究

吴永强 陈秉俭 仇哲

(中国科学院上海植物生理研究所)

**摘要** 光合细菌浑球红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) 能在黑暗厌氧条件下生长。首次发现发酵生长的浑球红假单胞菌有固氮酶和吸氢酶的活性。试验比较了在光营养、黑暗厌氧呼吸和好氧呼吸生长方式下该菌的放氢作用,认为黑暗厌氧呼吸过程中的放氢是氢酶催化的放氢。

**关键词** 浑球红假单胞菌;固氮酶;吸氢酶;放氢

浑球红假单胞菌是一种革兰氏阴性紫色非硫光合细菌。过去对其固氮和氢代谢的研究几乎都采用光照厌氧(光营养)条件下的培养物。因为光合细菌的生态环境是多种多样的,对于该菌在暗处厌氧条件下固氮和氢代谢的研究,不仅具有一定的生态意义而且可为研究能源交替时固氮酶和氢酶基因表达的调控提供线索。

荚膜红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas capsulatus*) 是另一种典型的光合细菌。自1977年以来对它在暗处厌氧生长进行了一些研究<sup>[1-3]</sup>,发现它可以利用果糖发酵生长。以前认为光合细菌固氮是需光的,但 Madigan 于1979年首次发现荚膜红假单胞菌在发酵时也能固氮。迄今对光合细菌发酵时吸氢酶的活性

尚未见报道。深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 发酵放氢现象早有报道<sup>[4]</sup>。Gest 等人推测, 光合细菌发酵放氢的机制与兼性厌氧菌不同, 而与严格厌氧菌相似。Gorrell 等认为, 在深红螺菌和沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 中甲酸氢解酶催化甲酸分解产氢<sup>[5]</sup>。但参与发酵放氢的酶至今尚未被分离纯化。

本文研究了浑球红假单胞菌在暗处厌氧条件下的生长、固氮和吸氢。较充分地论证了该菌发酵放氢与光合放氢的机制。

## 材料和方法

### (一) 菌株

浑球红假单胞菌野生型 601 和固氮变种 (*Nif<sup>-</sup>*) 6308 由澳大利亚 J. M. Pemberton 博士惠赠。浑球红假单胞菌野生型 D 和谷氨酸合成酶与固氮无效变种 (*GOGAT<sup>-</sup>*, *Nif<sup>-</sup>*) 204 由本实验室分离获得。

### (二) 培养基和培养条件

光照厌氧培养时, 采用 RCVBN 培养基<sup>[6]</sup>。30℃ 静置培养, 光照强度约 3000LX。暗处好氧培养(好氧呼吸)时, 也采用 RCVBN 培养基, 于 30℃ 摇瓶机上振荡, 旋转频率为 202 r/min。暗处厌氧培养(发酵)时, 采用 RCVBN, 但省去苹果酸, 补充 4% 葡萄糖和 80 mmol/L 二甲亚砷, 抽气充氩或氮气后在 30℃ 暗处静置培养。

### (三) 休止细胞的制备

4℃ 离心收集对数生长期末期或平稳期初期的菌体, 用 pH 7.2 磷酸缓冲液 (17.5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5.5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 洗涤菌体一次, 重新悬浮于磷酸缓冲液中, 置冰浴备用。

### (四) 放氢活性的测定

8 ml 血清瓶内装 2 ml 菌体悬浮液和 0.1 ml 200 mmol/L (pH 7.2) 苹果酸, 加反口橡皮塞后抽气充氩, 按试验需要照光或放置暗处, 30℃ 恒温震荡 4.5 小时, 用 103 型气相层析仪测定产生的氢。

### (五) 吸氢酶活性的测定

8 ml 血清瓶内加 2 ml 休止细胞和 0.2 ml 200 mmol/L 铁氰化钾。加塞抽气充氩后, 注入 200  $\mu\text{l}$  氢气, 于 30℃ 暗处震荡 1 小时, 用 103 型气相层析仪测定反应前后氢体积的减少。

### (六) 固氮酶活性的测定

参照文献[7]的方法。用 102G 型气相层析仪测乙炔与乙炔的峰高比。

### (七) 蛋白质的测定

菌体蛋白用 Lowry<sup>[8]</sup> 法测定。用牛血清蛋白作标准。

## 结 果

### (一) 浑球红假单胞菌在黑暗厌氧条件下的生长

以葡萄糖或丙酮酸为碳源和能源, 以铵、谷氨酸或氮气为氮源, 补充二甲亚砷作氧化剂, 浑球红假单胞菌能够在暗处厌氧条件下生长(见图 1)。以葡萄糖为碳源时, 菌体生长旺盛; 用丙酮酸作碳源生长为其次; 以苹果酸为碳源生长很差。采用葡萄糖为碳源时, 该菌发酵生长的速率因氮源种类不同而异: 以铵为碳源, 世代时间为 7 小时; 以谷氨酸为氮源, 世代时间为 17 小时; 以氮气为氮源, 世代时间为 22 小时。当用氩气代替氮气时, 菌体不长。这表明该菌在发酵条件下有固氮作用。

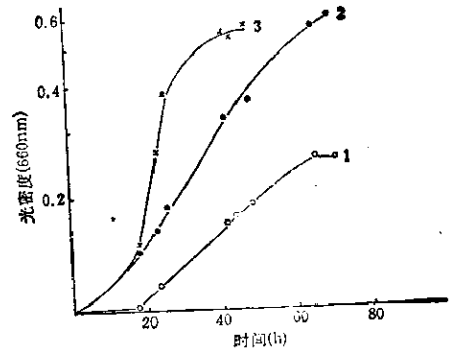


图 1 浑球红假单胞菌 601 菌株的生长曲线

1. 氮气为氮源, 2. 谷氨酸为氮源, 3. 铵为氮源

### (二) 发酵时浑球红假单胞菌的固氮酶和吸氢酶

该菌有三种能量来源。光营养生长时经过光合磷酸化驱动 ATP 的合成。该菌也能好氧

表 1 在不同能量来源条件下浑球红假单胞菌固氮酶和吸氢酶活性比较

菌株	酶活性 能量来源	固氮酶活性 (m mol 乙炔/mg 蛋白 · h)			吸氢酶活性 (m mol 氢/mg 蛋白 · h)		
		发酵	光能	好氧呼吸	发酵	光能	好氧呼吸
		601	995	750	0	1.65	2.25
D	1440	749	0	1.34	1.70	0	

呼吸,通过氧化磷酸化获得能量。试验表明,浑球红假单胞菌还有暗处厌氧呼吸功能,利用发酵产生能量。

表 1 列举了在不同能量来源条件下浑球红假单胞菌的固氮酶和吸氢酶的活性。结果令人信服地表明,该菌发酵时具有固氮酶和吸氢酶,它们的比活都较高。光营养时此两酶的比活也很高。然而好氧呼吸时则没有固氮酶和吸氢酶的活性。可能氧阻遏和钝化这两种酶。

(三) 铵盐和氮气对放氢的影响

试验分析了光营养条件下的放氢和发酵条件下的放氢,发现不同氮源对野生型和 Nif<sup>-</sup> 突变株的这两类放氢的影响有所不同(表 2)。在

光营养生长时,若以谷氨酸为氮源,野生型 601 和 D 菌都放氢,而 Nif<sup>-</sup> 变种 6308 和 204 都不放氢;当以铵为氮源时,由于铵阻遏固氮酶的形成,野生型 601 和 D 几乎都不能放氢;当以氮气为氮源时,放氢总量减少 90% 左右,可能因为氮气作为固氮酶的反应基质抑制了固氮酶催化质子的还原。但是,发酵生长时,野生型 601 和 D 菌以及变种 6308 和 204 无论用谷氨酸、铵或者氮气作氮源都能够放氢。在以铵为氮源时放氢量有所下降。

(四) 铵对休止细胞酶活性的调节

铵可对休止细胞在酶的活性水平上进行调节。当 0.6 m mol/L 以上的氯化铵存在时,光营

表 2 发酵或光营养生长过程中浑球红假单胞菌野生型和 Nif<sup>-</sup> 变种在以各种基质作氮源时放氢量的比较

菌株	表型	放 氢 (n mol 氢/mg 蛋白 · h)					
		发 酵 生 长			光 营 养 生 长		
		谷氨酸	铵	氮气	谷氨酸	铵	氮气
601	野生型	1.05	0.57	1.33	2.34	0.02	0.20
D	野生型	1.12	0.62	1.20	2.83	0.01	0.28
6308	Nif <sup>-</sup>	1.06	0.51	1.22	0.00	0.00	—
204	GOGAT-Nif <sup>-</sup>	1.51	0.60	1.24	0.00	—	—

“—”表示不生长

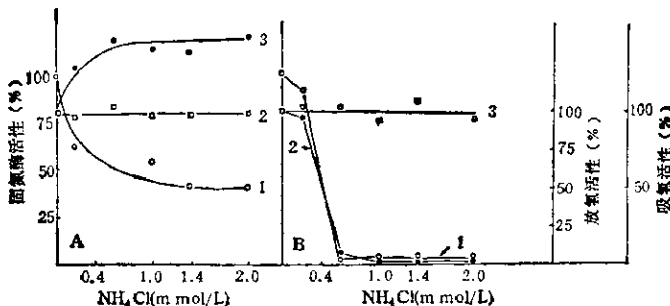


图 2 铵对浑球红假单胞菌 D 菌株固氮酶、吸氢酶和放氢活性的影响

(A) 发酵休止细胞, (B) 光营养休止细胞。1. 固氮酶活性, 2. 放氢活性, 3. 吸氢酶活性

表3 光对光营养和发酵休止细胞放氢的影响

反应条件	光照 24000Lx		黑暗 <200Lx	
	放氢活性 (n mol/min.mg protein)	百分数 %	放氢活性 (n mol/min.mg protein)	百分数 %
光营养休止细胞	822	100	21	2
发酵休止细胞	515	74	702	100

养休止细胞的固氮酶活性以及放氢活性几乎同时被全部抑制，而吸氢酶活性不受影响(图2B)。0.6 mmol/L以上的氯化铵只能部分地抑制发酵休止细胞的固氮酶活性，其原因有待进一步作分析，但是完全不抑制放氢活性。对于发酵休止细胞的吸氢酶活性不但没有抑制作用反而有所促进(图2A)。

**(五) 光照和一氧化碳对休止细胞放氢的影响**

光营养休止细胞只有在光照时才放氢，在暗处反应时放氢活性只有光照时的2%(表3)。而发酵休止细胞在暗处反而有较高的放氢活性，光照时放氢活性下降25%左右。

CO是氢酶的抑制剂。发酵休止细胞的放氢受CO抑制(图3)。20%的CO几乎完全抑制发酵休止细胞放氢，而CO对光营养休止细胞放氢无抑制作用。

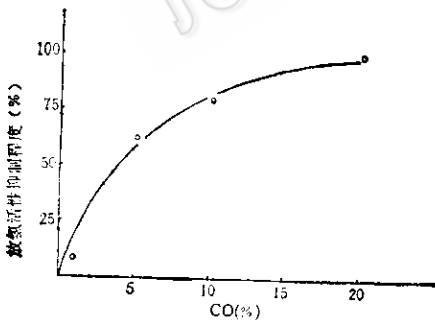


图3 CO对发酵休止细胞放氢活性的抑制作用

**讨 论**

在生物技术领域里，光合细菌具有很大的潜力。它们的代谢变通性和较快的生长速度使它们能在多种生态环境中存活与繁衍。光合固氮和光合放氢早已引起人们的注意<sup>[9]</sup>。光合细菌在黑暗处的固氮还是 Madigan 等人于1979

年首先在荚膜红假单胞菌中发现的<sup>[2]</sup>。本文首次发现浑球红假单胞菌利用葡萄糖作碳源和能源在暗处厌氧发酵时的固氮活性，同时还发现它在暗处厌氧条件下有吸氢酶的活性。这表明，浑球红假单胞菌不仅在光照的生态环境中可以固氮，而且在黑暗环境中也能固氮，同时可以通过吸氢回收能量。

Gest 等人曾证明荚膜红假单胞菌在光营养条件下的放氢是由固氮酶催化的<sup>[10]</sup>。本文以浑球红假单胞菌为材料提出更多的证据支持这一结论：1. 固氮无效变种(Nif<sup>-</sup>)同时也是光合放氢的无效菌株；2. 与固氮酶活性受铵盐阻遏与抑制一样，光合放氢的活性亦受铵盐的阻遏与抑制；3. 氮气抑制光合放氢，这表明固氮酶的电子在氮气还原与质子还原的分配上存在竞争；4. 只有在光照条件下光营养休止细胞才能放氢，在黑暗处基本上不放氢，这与只有在光照时有固氮活性在暗处无固氮活性相类似。以上结果表明，光合放氢是一种与光合磷酸化偶联的依赖固氮酶催化的放氢作用。

在暗处厌氧条件下浑球红假单胞菌发酵放氢的机制与光合放氢的机制不同。试验表明：1. 固氮无效变种照常发酵放氢；2. 当铵盐存在时发酵休止细胞仍然放氢。放氢总量的减少可能与铵盐对吸氢活性的促进有关，吸氢回收了较多的因放氢而释放的氢气；3. 氮气不抑制发酵放氢；4. 发酵放氢不需要光照，发酵休止细胞在暗处也能放氢；5. 氢酶的专一性抑制剂CO完全抑制发酵放氢。从以上分析不难看出，浑球红假单胞菌的氢酶参与催化发酵放氢。

**参 考 文 献**

1. Yen HC et al: *Arch. Biochem. Biophys.*, 181:411-418, 1977. (下转第110页)

(上接第74页)

2. Madigan MT et al: *Science*, **204**:1429—1430, 1979.
3. Madigan MT et al: *Bacteriol.*, **142**:908—915, 1980.
4. Uffen RL et al: *Bacteriol.*, **116**:874—884, 1973.
5. Gorrell TE et al: *Bacteriol.*, **131**:533—543, 1977.
6. Weaver PF et al: *Arch. Microbiol.*, **105**:207—216, 1975.
7. 宋鸿遇等: *植物生理学报*, **5**: 141—150, 1979。
8. Lowry OH et al: *J. Biol. Chem.*, **193**:265—275, 1951.
9. Watanabe KI et al: *Agr. Biol. Chem.*, **45**:217—222, 1981.
10. Gest H et al: *Advances in Microbiol. Physiol.*, **7**: 243, 1972.