

# 大肠杆菌 (*Escherichia coli* A S 1.357)

## L-天门冬酰胺酶的研究

### I. L-天门冬酰胺酶高产菌株的筛选

邱秀宝 郝凤兮 钱世钧 陈嘉懿 孟广震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从 87 株细菌中筛选取得 L-天门冬酰胺酶的高产菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli* A S 1.357)。采用 7.5—10% 玉米浆培养基 (pH 7.0—7.5), 于 37°C 振荡培养 8 小时, 可获得高活力的 L-天门冬酰胺酶 (4.6 单位/毫升)。在我们的实验条件下, 葡萄糖不利于 L-天门冬酰胺酶的形成。

1953 年基德 (Kidd)<sup>[1]</sup> 发现豚鼠血清有抗肿瘤作用。1961—1963 年布鲁姆 (Broome)<sup>[2,3]</sup> 证实豚鼠血清的抗肿瘤因子是血清中的 L-天门冬酰胺酶。1964 年马什本 (Mashburn)<sup>[4]</sup> 等从大肠杆菌中分离取得 L-天门冬酰胺酶, 并具有抗肿瘤作用, 从而为该酶制剂的大规模生产和临床试验提供了可能性。随后又有报道从粘质赛氏杆菌 (*Serratia marcescens*)<sup>[5]</sup>、软腐病欧氏杆菌 (*Erwinia aroideae*)<sup>[6]</sup>、胡萝卜软腐病欧氏杆菌 (*Erwinia carotovora*)<sup>[7]</sup>、铜绿色极毛杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[8]</sup> 和荚膜红色极毛杆菌 (*Rhodospseudomonas capsulatus*)<sup>[9]</sup> 等菌的培养物中也可分离取得具抗癌作用的 L-天门冬酰胺酶。1967 年希尔 (Hill)<sup>[10]</sup>、奥特根 (Oettgen)<sup>[11]</sup> 首先将大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶用于临床试验。后来许多临床资料表明, L-天门冬酰胺酶对急性淋巴细胞性白血病, 急性粒细胞性白血病, 急性变的慢性白血病以及若干实质性肿瘤有肯定的治疗作用<sup>[12,13,14]</sup>。本文报道 87 株细菌的筛选结果和大肠杆

菌 A S 1.357 产生 L-天门冬酰胺酶培养条件的研究工作。

## 材料和方法

### 一、菌株

甲组 21 株大肠杆菌, 从本所保藏组取得; 乙组 66 株, 未定名, 从腐败蔬菜中分离取得。共计 87 株。

### 二、斜面培养基

牛肉汁琼脂培养基用于甲组菌株的保存和移种; 土豆汁琼脂培养基用于乙组菌株的保存和移种。

### 三、液体摇瓶培养

先后选用三种主要培养基: A、葡萄糖 0.1%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.1%, pH 7.0; B、葡萄糖 1%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 2.0%,  $K_2HPO_4$  1.1%,  $KH_2PO_4$  0.85%, pH 7.5; C、玉米浆 5%, pH 7.2—7.5, 煮沸后过滤。分别取上述培养基 35 毫升分装于 200 毫升三角瓶中。培养一般在 220 次/分旋转摇床上进行。

### 四、L-天门冬酰胺酶活力的测定

L-天门冬酰胺酶为细胞内酶, 故采用完整细胞进行酶活力测定。测定方法参照彼得森 (Peter-

本文 1973 年 1 月 20 日收到。

son)<sup>[6]</sup> 的报告制定。取 1 毫升 0.04M L-天门冬酰胺, 0.5 毫升 0.1 M pH 8.4 硼酸-硼酸钠缓冲液, 0.5 毫升细胞悬浮液, 于 37°C 水浴中保温 15 分钟后, 加 0.5 毫升 15% 三氯乙酸终止反应并沉淀细胞, 离心后取上清液 1 毫升, 加 2 毫升奈斯勒 (Nessler) 试剂和 7 毫升蒸馏水, 15 分钟后于 500 毫微米波长比色测定生成的氨。在上述条件下, 每分钟催化 L-天门冬酰胺释放 1 微克分子氨的酶量定义为一个酶活力单位。

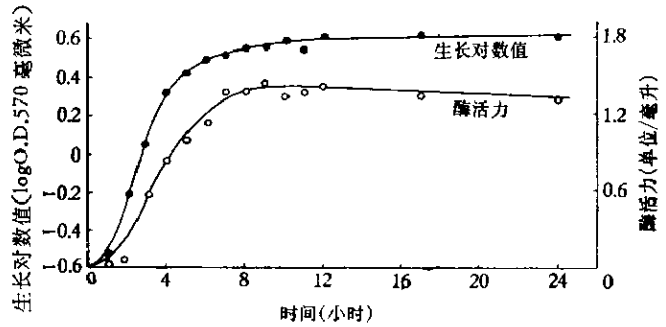


图 E. coli A S 1.357 在培养过程中生长和酶活力的变化

### 筛选结果

甲组菌株于 37°C 振荡培养 16 小时, 乙组菌株于 28°C 振荡培养 16 小时。酶活力测定结果表明: 受试的 87 株菌大部分表现 L-天门冬酰胺酶活力, 但产量大有区别, 甲组高活力的百分率较高(表 1)。大肠杆菌 A S 1.357 在 5% 玉米浆培养基中活力最高, 为 1.35 单位/毫升(表 2)。

表 1 87 株细菌在培养基 A 中的 L-天门冬酰胺酶的活力比较

组别	试验菌株数	酶活力结果					
		0—0.12 单位/毫升		0.13—0.28 单位/毫升		0.29—0.46 单位/毫升	
		菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
甲	21	15	71.5	4	19	2*	9.5
乙	66	59	89.4	7	10.6	0	0
总计	87	74	85.0	11	12.7	2	2.3

\* 表 2 的两株菌。

表 2 E. coli A S 1.357、1.355 两菌株在三种培养基中的 L-天门冬酰胺酶活力比较

菌株	酶活力(单位/毫升)		
	培养基 A	培养基 B	培养基 C
E. coli 1.357	0.40	0.97	1.35
E. coli 1.355	0.29	0.61	0.87

## 培养条件对 L-天门冬酰胺酶形成的影响

### 一、培养时间对酶形成的影响

用 5% 玉米浆培养基, 于 37°C 振荡培养不同时间, 测定酶活力和细胞生长(培养物在 570 毫微米波长处的光密度)。结果表明细胞生长和酶的活力基本平行, 对数生长期酶活力也呈直线上升, 7—9 小时达到高峰, 生长迟缓后酶活力虽略有下降, 但变化幅度不大, 较为稳定(见上图)。

### 二、玉米浆浓度对酶形成的影响

用不同浓度玉米浆培养基, 于 37°C 振荡培养 8 小时后测定酶活力和细胞生长。结果表明, 采用较高浓度的玉米浆时, 细胞繁殖旺盛, 酶活力升高。从表 3 看出, 玉米浆浓度为 7.5—10% 较为适宜。

表 3 玉米浆浓度对酶形成的影响

玉米浆浓度(%)	生长(O. D. 570 毫微米)	酶活力(单位/毫升)
2.5	0.371	0.57
5.0	0.520	1.24
7.5	0.648	1.49
10.0	0.622	1.51

### 三、葡萄糖对酶形成的影响

为增加培养基的碳源, 在 7.5% 玉米浆培养基中添加不同量葡萄糖振荡培养 8 小时。结果表明, 随葡萄糖的加入, 培养液的 pH、细胞生长和酶活力均明显下降(表 4)。

表 4 在无缓冲液的培养基中葡萄糖对酶形成的影响

葡萄糖含量 (%)	pH	生长 (O. D. <sub>570</sub> 毫微米)*	酶活力 (单位/毫升)
0	8.0	0.78	3.1
0.5	5.8	0.38	0.32
1.0	5.8	0.35	0.29
1.5	5.8	0.45	0.37
2.0	5.8	0.37	0.35

\* 稀释 2 倍后测定。

为减少培养基酸度对生长的影响, 在相同培养基中加入 pH 7.5 磷酸缓冲液使达 0.2M 浓度。结果表明, pH 下降幅度变小, 细胞生长明显改善, 但酶活力仍有下降趋势, 只是下降的幅度较小(表 5)。

表 5 在加有缓冲液的培养基中葡萄糖对酶形成的影响

葡萄糖含量 (%)	pH	生长 (O. D. <sub>570</sub> 毫微米)*	酶活力 (单位/毫升)
0	7.5	0.56	1.10
0.5	6.9	0.69	1.00
1.0	6.7	0.62	0.77
1.5	6.5	0.59	0.40
2.0	6.4	0.65	0.32

\* 稀释 2 倍后测定。

#### 四、培养基 pH 对酶形成的影响

采用 7.5% 玉米浆培养基, 分别调成不同 pH, 于 37℃ 振荡培养 8 小时测定酶活力。结果表明, 培养基的初始 pH 调至 7.0—7.5, 对酶的形成有利(表 6)。

表 6 培养基 pH 对酶形成的影响

初始 pH	终止 pH	生长 (O. D. <sub>570</sub> 毫微米)	酶活力 (单位/毫升)
6.0	6.7	0.592	2.27
6.5	7.0	0.575	4.10
7.0	7.8	0.650	4.15
7.5	8.0	0.505	4.15

#### 五、氮源对酶形成的影响

试验采用玉米浆、蛋白胨两种氮源物

质, 按不同比例配成总浓度为 10% 的培养基 (pH 7.0), 于 37℃ 振荡培养 16 小时后, 分别测定 pH, 细胞生长和酶活力。结果表明, 酶的活力随玉米浆含量下降而降低(表 7)。

表 7 氮源对酶形成的影响

培养基组成 (%)		结 果		
玉米浆	蛋白胨	终止 pH	生长 (O. D. <sub>570</sub> 毫微米)*	酶活力 (单位/毫升)
10	0	8.0	0.19	4.60
8	2	7.4	0.145	3.60
6	4	7.8	0.11	2.75
4	6	8.4	0.115	2.75
2	8	8.5	0.035	0.95

\* 稀释 10 倍后测定。

## 讨 论

我们从 87 株细菌中筛选取得 *E. coli* A S 1.357, 其 L-天门冬酰胺酶的产量为 4.6 单位/毫升。据报道大肠杆菌 B 的产酶量为 1.77—2.6 单位/毫升<sup>[15,16]</sup>; 粘质赛氏杆菌的产酶量为 3.8 单位/毫升<sup>[17]</sup>; 软腐病欧氏杆菌的产酶量为 3.66 单位/毫升<sup>[18]</sup>。可见大肠杆菌 (*E. coli*) A S 1.357 的产酶量比以上报道均高。

在大肠杆菌 A S 1.357 培养中, 玉米浆不能用蛋白胨取代, 这可能和玉米浆中含有丰富的自由氨基酸相关。卡迪纳尔 (Cardinal)<sup>[19]</sup> 曾测定玉米浆中氨基酸含量, 证实其中含有丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸、天门冬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸、谷氨酸、苏氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸等十多种氨基酸。罗伯茨 (Roberts)<sup>[20]</sup> 指出 L-天门冬酰胺酶的产量与培养基中谷氨酸、蛋氨酸的含量有关, 塞达 (Cedar) 等<sup>[21]</sup> 认为多种氨基酸的混合物可促进酶的生成, 而某种单个的氨基酸只能作为一般氮源被消耗。

许多报道指出葡萄糖对 L-天门冬酰胺酶的生物合成有抑制作用<sup>[20-22]</sup>。此外葡萄糖也能抑制  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[23]</sup>、磷酸甘油酶<sup>[24]</sup>、色氨酸酶<sup>[25]</sup>、精氨酸酶<sup>[26]</sup>等的形成, 似乎葡萄糖对可诱导的一些酶的抑制作用是相当普遍的现象。我们的试验同样证明, 葡萄糖不利于大肠杆菌 (*E. coli* A S 1.357) 形成 L-天门冬酰胺酶, 其实质除葡萄糖本身的作用外, 也不排除由于葡萄糖这一生理酸性物质在培养过程中降低了培养基的 pH, 而间接地影响酶形成的可能性。

### 参 考 资 料

[1] Kidd, J. G.: *J. Exp. Med.*, **98**:565—582, 1953.  
 [2] Broome, J. D.: *Nature*, **191**:1114—1115, 1961.  
 [3] Broome, J. D.: *J. Exp. Med.*, **118**:99—120, 1963.  
 [4] Mashburn, L. T. and Wriston, J. C., Jr.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**:451—452, 1964.  
 [5] Rowley, B. and Wriston, J. C., Jr.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**(2): 160—165, 1967.  
 [6] Peterson, R. E. and Ciegler, A.: *Appl. Microbiol.*, **17**(6):929—930, 1967.  
 [7] Wade, H. E.: *Lancet*, **2**(7571):776, 1968.  
 [8] Day, D. F. and Ingram, J. M.: *Can. J. Microbiol.*, **17**:1025—1028, 1971.  
 [9] Tchan, Y. T., Asano, J. and Kobayashi, M.: *J. Ferment. Technol.*, **49**(9):733—

739, 1971.  
 [10] Hill, J. M. et al.: *J. Amer. Med. Ass.*, **202**:882—388, 1967.  
 [11] Oettgen, H. F., Old, L. T. et al.: *Cancer Res.*, **27**:2619—2631, 1967.  
 [12] Adamson, R. M., Fabro, S.: *Cancer Chemotherapy Rep.*, **52**(6):(part 1), 617—626, 1968.  
 [13] 山田一正等: 最新医学, **25** (5): 1064—1074, 1970.  
 [14] Grundmann, E., Oettgen, H. E.: *Recent results in Cancer Recerch*, **33**:204—354, 1970.  
 [15] Robison, R. S. and Berk, B. B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**(6):1211—1225, 1969.  
 [16] Boeck, L. D., Squires, R. W., Wilson, M. W. and Ho, P. P. K.: *Appl. Microbiol.*, **20**(6):964—969, 1970.  
 [17] Heinemann, B., Howard, A. J. and Palocz, H. J.: *Appl. Microbiol.*, **19**(5):800—804, 1970.  
 [18] Lin, F. S. and Zajic, J. E.: *Appl. Microbiol.*, **23**(3):667—668, 1972.  
 [19] Cardinal, E. V., Hedrick, L. R.: *J. Biol. Chem.*, **172**:609—612, 1948.  
 [20] Roberts, J., Burson, G. and Hill, J. M.: *J. Bacteriol.*, **95**(6):2117—2123, 1968.  
 [21] Cedar, H., Schwartz, J. H.: *J. Bacteriol.*, **96**:2043—2048, 1968.  
 [22] Heinemann, B. and Howard, A. J.: *Appl. Microbiol.*, **18**:550—554, 1969.  
 [23] Beggs, W. H. and Rogers, P.: *J. Bacteriol.*, **91**:1869—1874, 1966.  
 [24] Mindich, L.: *J. Bacteriol.*, **96**:565—566, 1968.  
 [25] Beggs, W. H. and Lichstein, H. C.: *J. Bacteriol.*, **89**:996—1004, 1965.  
 [26] Laishley, E. J. and Bernlohr, R. W.: *J. Bacteriol.*, **96**:322—329, 1968.

## STUDIES ON THE L-ASPARAGINASE OF *ESCHERICHIA COLI* A S 1.357

### I. SCREENING OF BACTERIAL STRAINS FOR L-ASPARAGINASE PRODUCTION

QIU XIU-BAU HAO FONG-XI QIAN SHI-JUN CHEN JIA-YI

AND MONG GUANG-ZHEN

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

*Escherichia coli* A S 1.357, a high-yielding strain for producing L-asparaginase is screened from 87 bacterial strains. The highest yields of L-asparaginase were obtained when *E. coli* A S 1.357 was grown aerobically for 8 hours at 37°C

in 7.5—10% corn steep liquor medium (pH 7.0—7.5). Glucose is unfavorable to the formation of L-asparaginase under our experimental conditions.