

产气气杆菌甘油脱氢酶诱导形成的培养条件

梁锡娟 黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

筛选出一株产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) AS1.490, 经甘油诱导培养能在细胞内形成 NAD-甘油脱氢酶, 每毫升培养液菌体含 1—1.4 单位酶活力。酶形成的最适发酵条件研究表明: 培养基中含 3% 甘油时酶形成量最高。添加少量葡萄糖或果糖对酶形成有促进作用。无机氮源——铵盐对酶形成是必需的, 以硫酸铵最佳, 加入 0.2% 硫酸铵酶活力最高, 添加硫酸铵到 0.3% 或 0.4% 时, 不再增加生物量, 酶量略有下降。其他铵盐效能依次为氯化铵、硝酸铵、磷酸氢二铵等。单加有机氮源不利产酶。酶形成的培养基最适起始 pH 为 7.0, 生物量亦最高。酶形成的最适温度为 30℃, 但在 20—40℃ 范围内, 生物量随温度的升高而增加。用 250ml 三角瓶以 35ml 装液量最适。在上述最适条件下, 发酵培养 18 小时后, 细胞生长不再增加。培养至 26 小时, 培养基中甘油基本上完全消耗, 这时酶形成量达到最高峰, 以后随时间延长酶形成量迅速下降, 在 42 小时后几乎完全消失。

关键词 NAD-甘油脱氢酶; 产气气杆菌

甘油脱氢酶是一种需辅酶参与催化反应的氧化还原酶, 已发现存在于哺乳动物、细菌和霉菌中^[1]。根据催化形成产物和电子受体的不同可以将不同来源的酶分为三种。第一种甘油脱氢酶 (EC 1.1.1.6) 以 NAD^+ 为电子受体催化甘油氧化为二羟丙酮。第二种 (EC 1.1.1.72) 以 NADP^+ 为电子受体催化甘油氧化为甘油醛。第三种 (EC 1.1.1.156) 在 NADP^+ 存在下催化甘油氧化为二羟丙酮。

1953 年以来, 相继发现这酶存在于兔肌^[2]、肝^[3]、黑曲霉^[4]、爪哇毛霉^[5]、粗糙链孢霉^[6]、大肠杆菌^[7]、软腐病欧文氏菌^[8]、产气气杆菌^[9-11]和纤维单胞菌^[12]等。一般地动物脏器和霉菌来源的酶以 NADP^+ 作为电子受体, 细菌来源酶则以 NAD^+ 作为电子受体。但这酶的研究只限于少数细菌和霉菌属, 研究最多的是产气气杆菌的 NAD-甘油脱氢酶。

有人使用此酶诊断分析血清中甘油三

脂、转化产生二羟丙酮^[13]以及甘油代谢酶系的探究^[14]。本文报道产气气杆菌 AS1.490 甘油脱氢酶的诱导形成和最适发酵条件的研究结果, 以期能使用这酶及脂蛋白脂肪酶进行临床分析甘油三脂。

材料和方法

(一) 菌种

产气气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) AS1.490。

(二) 试剂

NAD 为 Boehringer mannheim 产品, 纯度为 98%; 鸟嘌呤为 Baker Co. 产品。甘油及其他试剂均为分析纯。

(三) 培养基

1. 斜面培养基: 牛肉汁琼脂。

2. 基本培养基 (%): 甘油 3, 葡萄糖 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 1.26, K_2HPO_4

本文于 1989 年 4 月 20 日收到。

0.54, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCl_2 0.01, 用自来水配制, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 250ml 三角瓶装液量为 35 ml, 1.05 kg/cm^2 灭菌 30 min。

(四) 菌体培养和酶液的提取

1. 菌体培养: 将 AS 1.490 菌株在牛肉汁琼脂斜面培养基上 37°C 培养 24 小时后, 接种到装有 35 ml 基本培养液瓶中, 30°C 旋转摇床 (250 r/min) 培养 26 小时。

2. 无细胞酶液的提取: 每瓶菌体培养液以 12000r/min 离心 20min, 收集菌体沉淀用生理盐水洗一次, 同上离心收集菌体, 并悬浮在 25—30ml 的生理盐水中, 在 4°C 下超声破碎 (20kc/s, 300W) 4min, 细胞破碎液经离心 (13000r/min) 20min, 收集上清液。

(五) 生物量的测定

用比浊法。取 5ml 发酵菌液, 12000r/min 离心 10 min, 收集细菌沉淀, 并加入 2.5ml 生理盐水调成悬浮液, 取 0.2ml 悬浮液加到 3.8ml 生理盐水中, 用 1cm 光径比色杯在 600nm 波长处比浊, 以生理盐水为空白, 生物量以光吸收值表示。

(六) 酶活力的测定

酶活力测定参考文献[10], 取适当稀释的酶液 0.2 ml 加入到 2.3ml pH8.0 的 NAD 液中(含 1% 焦磷酸钠 2.1ml 及 0.01 mol/L NAD 0.2ml), 1—2 min 后, 加入 0.5ml 4% 甘油, 总体积为 3ml, 迅速混合, 立即用光径 1 cm 石英比色杯在 25°C 下用日立双光束分光光度计在 340 nm 波长处每间隔 30 秒连续检测光吸收值 A 的改变, 测定数分钟。用水作对照。在测定条件下, 每分钟转化 $1 \mu\text{mol}$ 甘油所需的酶量为一个酶活力单位。

(七) 蛋白质测定

用 Lowry 法^[15], 以牛血清清蛋白为标准。

(八) 甘油测定

根据 Lambert 等的方法^[16], 用过碘酸-变色酸比色法测定甘油含量。

结 果

(一) 菌种的筛选

选择了气杆菌属、肠杆菌属进行 NAD-甘油脱氢酶优良菌种的选育, 发酵后无细胞提取液酶活力测定的结果表明, 在这些菌属中, 以产气气杆菌 AS1.490 菌株比其他菌株酶活力高。因而选择这菌株作为研究菌株。

(二) 甘油量对酶形成的影响

在基本培养基中用不同甘油量进行诱导菌体形成甘油脱氢酶的培养, 结果表明, 以培养基中加入 3% 甘油量时酶生成量最高, 但生物量以 1.5% 甘油量较好, 但酶形成量较少(图 1)。加入甘油量高于 3%, 酶形成量逐渐下降。

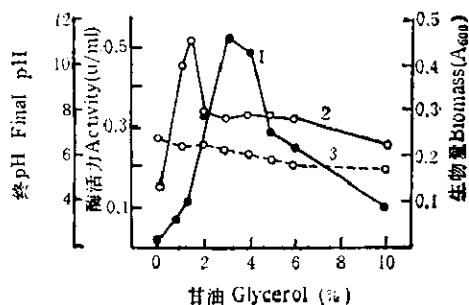


图 1 甘油浓度对酶诱导形成的影响

Fig. 1 Effect of glycerol concentration on glycerol dehydrogenase formation

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 生物量 Biomass; 3. 终 pH Final pH

(三) 不同碳源对酶形成的影响

在基本培养基中, 以不同的糖 (0.1%) 配合 3% 甘油作为碳源进行菌体培养。表 1 结果表明, 其中以葡萄糖加甘油的培养菌体和总酶活力最高。果糖加甘油的产酶量也较单加甘油的高。添加蔗糖或麦芽糖

表 1 不同碳源对甘油脱氢酶形成的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on glycerol dehydrogenase formation

碳源* Carbon source	发酵终 pH** Final pH	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity(u/ml)
D-葡萄糖+甘油 D-Glucose + Glycerol	6.15	0.43	0.44
果糖+甘油 D-Fructose + Glycerol	6.03	0.40	0.43
麦芽糖+甘油 Maltose + Glycerol	6.06	0.37	0.39
蔗糖+甘油 Sucrose + Glycerol	5.96	0.41	0.36
甘油 Glycerol	6.04	0.43	0.38
葡萄糖 D-Glucose	7.14	0.10	0.003

* 甘油 Glycerol 3%,各种糖 various sugars 0.1%

** 起始 pH Initial pH 7.0

表 2 不同铵盐对甘油脱氢酶形成的影响

Table Effect of ammonium salts on glycerol dehydrogenase formation

铵盐* Ammonium salt	终 pH Final pH	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity(u/ml)
硫酸铵 Ammonium sulfate	6.4	0.33	0.90
氯化铵 Ammonium chloride	6.3	0.37	0.80
硝酸铵 Ammonium nitrate	6.9	0.44	0.71
磷酸氢二铵 Ammonium dibasic phosphate	6.4	0.33	0.59
硫氰酸铵 Ammonium thiocyanate	6.2	0.28	0.22
磷酸二氢铵 Ammonium dihydrogen phosphate	5.9	0.27	0.02
无铵盐 None	6.9	0.07	0.01

* 铵盐浓度 Concentration of ammonium salts 0.2%

起始 pH Initial pH 7.0

对酶形成没有影响。以葡萄糖代替甘油进行培养,几乎没有酶形成,菌体量也少。所有添加糖培养对生物量没有多大差别。

(四) 铵盐对酶形成的影响

铵盐对菌体中酶的形成有很大影响,从表 2 结果可见,加入硫酸铵培养酶形成量最高,其次是氯化铵,硝酸铵、磷酸氢二铵等。所实验的铵盐对酶形成有不同程度的促进作用。

(五) 不同硫酸铵量对酶形成的影响

在基本培养基中,加入不同浓度硫酸铵进行菌体培养。图 2 表明,以 0.2% 硫酸铵量总酶活力最高,添加到 0.3% 或

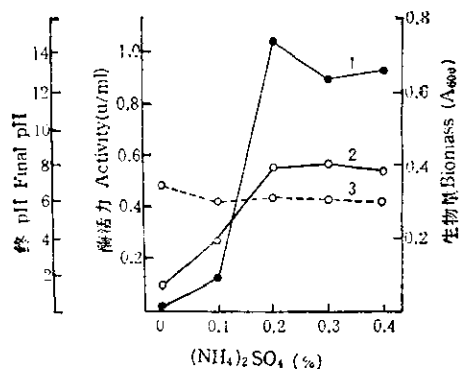


图 2 不同硫酸铵浓度对甘油脱氢酶形成的影响

Fig. 2 Effect of ammonium sulfate concentration on glycerol dehydrogenase formation

1.酶活力 Enzyme activity; 2.生物量 Biomass; 3.终 pH Final pH

表 3 有机氮源对甘油脱氢酶形成的影响

Table 3 Effect of organic nitrogen sources on glycerol dehydrogenase formation

氮源* Nitrogen sources	终 pH** Final pH	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
蛋白胨 Peptone	6.02	0.17	0.002
玉米浆 Corn steep liquor	6.46	0.44	0.027
酵母汁 Yeast extract	5.96	0.53	0.014
硫酸铵 Ammonium sulfate	6.06	0.43	0.242
蛋白胨、硫酸铵 Peptone, Ammonium sulfate	6.02	0.44	0.257

* 有机氮源浓度 Concentration of organic nitrogen sources 0.2%.

硫酸铵浓度 Concentration of ammonium sulfate 0.2%

** 起始 pH Initial pH 7.0

0.4% 浓度时, 不再增加总酶活力和生物量, 相反有下降的趋势。

(六) 有机氮源对酶形成的影响

从表 3 可见, 在基本培养基中, 无硫酸铵存在下单独加入蛋白胨或玉米浆、或酵母汁时酶形成下降, 不能代替硫酸铵作氮源。

(七) 培养基 pH 对酶形成的影响

以不同 pH 的基本培养基发酵培养 22 小时后, 测定菌体无细胞提取液的酶活力。结果表明, 以 pH 7.0 培养的生物量及总酶活力均最高, 对酶形成有利。(图 3)

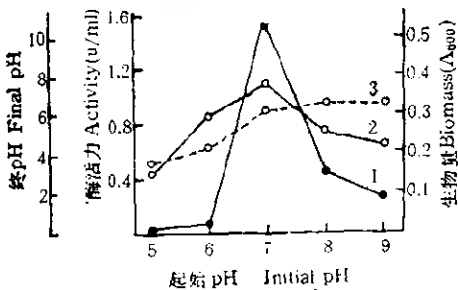


图 3 培养基起始 pH 对甘油脱氢酶形成的影响

Fig. 3 Effect of medium initial pH on glycerol dehydrogenase formation

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 生物量 Biomass;
3. 终 pH Final pH

(八) 不同培养温度对酶形成的影响

图 4 表明, 在不同温度下进行摇床发

酵培养, 生物量随温度的升高而增加, 而酶形成量以 30℃ 培养最佳, 在 35℃ 或 40℃ 时, 发酵培养的酶形成量急剧下降。

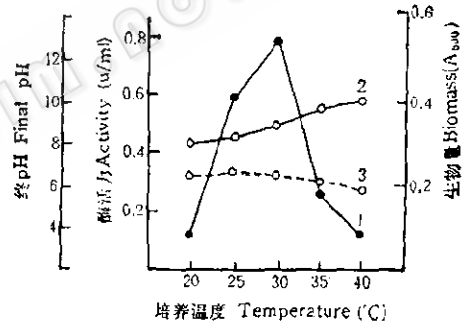


图 4 不同培养温度对甘油脱氢酶形成的影响

Fig. 4 Effect of cultural temperature on glycerol dehydrogenase formation

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 生物量 Biomass; 3. 终 pH Final pH

(九) 通气量对酶形成的影响

在 250ml 三角瓶中分别装入不同体积的基本培养基, 在相同转速下摇床培养后测定菌体无细胞提取液的总酶活力。图 5 结果表明, 随装液量增加, 菌体量下降, 酶形成量以 35ml 装液量最高。

(十) 培养时间

产气气杆菌在上述最适条件下进行培养, 在不同时间测定培养液中甘油的消耗, 细胞生长及酶形成量。图 6 表明, 细胞生

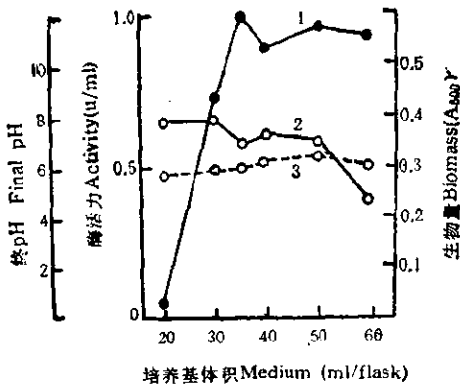


图5 通气量对甘油脱氢酶形成的影响

Fig. 5 Effect of aeration on glycerol dehydrogenase formation

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 生物量 Biomass; 3. 终 pH Final pH

长在 18 小时后不再增加。26 小时培养酶活力最高, 这时培养基中甘油基本上完全消耗。26 小时后酶形成量迅速下降。40 小时酶活力接近零。

讨 论

产气气杆菌 1033 株能利用甘油作为碳源^[17], 及以甘油诱导形成 NAD-甘油脱氢酶^[18], 在另一株产气气杆菌中亦发现了这酶^[9]。我们选育出的产气气杆菌菌株的 NAD-甘油脱氢酶, 每毫升培养液菌体含 1—1.4 单位酶活力。较以前所报道的纤维单胞菌酶活力 (0.6u/ml)^[12] 及产气气杆菌酶活力 (0.516 u/ml)^[13] 均高。这酶与 *E. coli* 的甘油脱氢酶相似^[7]。

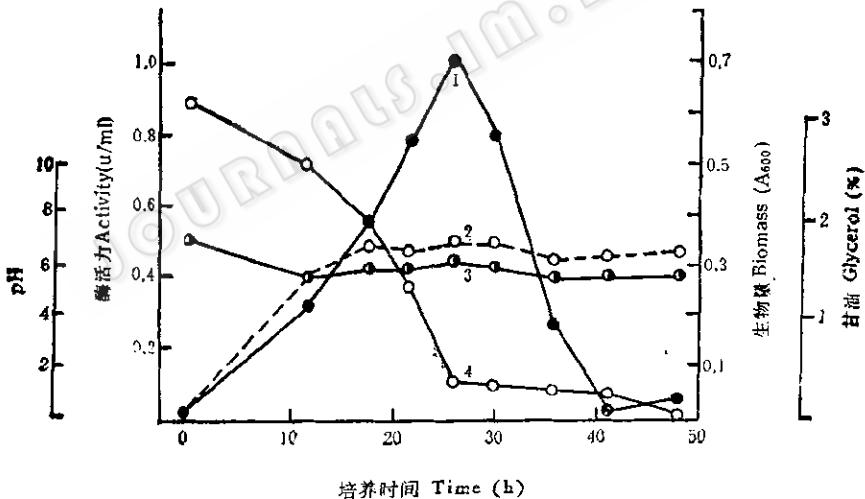


图6 甘油脱氢酶形成的时间过程

Fig. 6 The time course of glycerol dehydrogenase formation

1. 酶活力 Enzyme activity; 2. 生物量 Biomass; 3. pH; 4. 甘油 glycerol

铵盐对酶形成有直接关系, 在有机氮源-如蛋白胨等存在时, 无硫酸铵进行培养, 虽然菌体生长良好, 但酶形成量甚少, 可能是铵盐存在与否影响到甘油最初的代谢途径和酶体系。

通气量对酶形成有较大影响, 装液量

少, 即通气量大时对这酶形成不利。以装液量为 35—50ml 时较好。Lin 认为^[20]该菌在好气培养及厌氧培养时甘油代谢途径不同, 有氧时菌体通过甘油激酶及磷酸甘油脱氢酶将甘油转化为磷酸甘油及磷酸二羟丙酮进行最初代谢。而在厌氧培养时, 菌体

则先后通过甘油脱氢酶及二羟丙酮磷酸化酶转化甘油为二羟丙酮及磷酸二羟丙酮进行代谢。我们实验结果与这种推论吻合,但氧影响酶形成的机制仍含糊不清,通气量对酶选择性形成还需要进一步作深入探究,以期提高酶形成量及控制代谢途径。

参 考 文 献

- [1] Lin, E. C. C.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**: 535, 1976.
- [2] Kormann, A. W. et al.: *Biochim et Biophys. Acta*, **40**: 258, 1972.
- [3] Moore, B. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**: 5837, 1959.
- [4] Baliga, B. S. et al.: *Biochim. et Biophys. Acta*, **58**: 384, 1962.
- [5] Dulter, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **75**: 423, 1977.
- [6] Viswanath-Reddy, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **107**: 289, 1978.
- [7] Asnis, R. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **203**: 153, 1953.
- [8] Sugiura, M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**: 716, 1978.
- [9] Burton, R. M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: 1005, 1953.
- [10] Lin, E. C. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **235**: 1820, 1960.
- [11] Strickland, I. E. et al.: *Biochim et Biophys. Acta*, **159**: 221, 1968.
- [12] Yamada, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(9): 2333—2339, 1982.
- [13] Yamada, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **57**: 215, 1979.
- [14] Martin, E. J. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **131**: 1026, 1977.
- [15] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [16] Lambert, M. et al.: *Canad. J. Res.*, **28**: 83, 1950.
- [17] Majasanik, B. et al.: *J. Bacteriol.*, **66**: 611, 1953.
- [18] Rush, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **226**: 891, 1957.
- [19] Burton, R. M.: *Methods in Enzymol.*, (ed. Colowick, S. P. et al.), Academic Press, New York, **1**: 397, 1955.
- [20] Lin, E. C. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **235**: 1824, 1960.

CULTURAL CONDITIONS OF *AEROBACTER AEROGENES* FOR INDUCED FORMATION OF GLYCEROL DEHYDROGENASE

Liang Xixian Li Gaoxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

An *Aerobacter aerogenes* strain AS 1.490 producing glycerol dehydrogenase was obtained. It was found that the formation of glycerol dehydrogenase *in vivo* was induced in medium containing glycerol. The formation conditions of glycerol dehydrogenase have been investigated. The result obtained showed that the enzyme formation in a medium containing 3% glycerol reached the maximum. The enzyme activity was enhanced by addition of small quantity of glucose or fructose into the medium. However, addition of glucose instead of glycerol into the medium, almost no activity of glycerol dehydrogenase was detected. Inorganic nitrogen sources, ammonium salts are necessary to the formation of glycerol dehydrogenase. The activity of glycerol dehydrogenase reached the highest whenever 0.2% ammonium sulfate be added.

Addition of organic nitrogen sources instead of inorganic nitrogen sources was harmful to the enzyme formation. The suitable medium for glycerol dehydrogenase formation consisted of glycerol 3%, glucose 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 1.26%, K_2HPO_4 0.54%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% and CaCl_2 0.01% at pH 7.0. When the bacteria was cultured in 250 ml conic flask with 35 ml of the medium on the rotary shaker at 30°C for 26 h. The culture medium with 1—1.4 units of endocellular glycerol dehydrogenase activity per ml of liquid culture was obtained.

Key words

NAD-glycerol dehydrogenase; *Aerobacter aerogenes*