

## 天津短杆菌 $T_{6-13}$ 谷氨酸脱氢酶的研究

张克旭 刘永生

(天津轻工业学院食品工程系, 天津)

本文研究了天津短杆菌 (*Brevibacterium tianjinense*)  $T_{6-13}$  谷氨酸脱氢酶 (GDH) [EC 1.4. 1.4] 的纯化和性质。该酶以辅酶 II (NADP) 为其专一性辅酶, 正、逆反应酶活力最适 pH 分别为 7.5 和 8.9—9.9, 对热较敏感。

该酶对还原型辅酶 II (NADPH)、 $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG)、 $NH_4^+$ 、NADP 和 L-谷氨酸 (GA) 的  $K_m$  值分别为 0.076、3.23、4.0、0.02 和 120.48 mmol/L。该酶受反应产物的抑制, 逆反应受 NADPH、 $\alpha$ -KG 和  $NH_4^+$  的抑制, 正反应受 NADP 和谷氨酸的抑制, 但该酶所催化的逆反应既不受三羧酸循环代谢中间产物的抑制, 也不受氨基酸的抑制和氨基酸的积累抑制。

对发酵过程中谷氨酸脱氢酶活力变化的研究表明, 前期酶活力逐渐上升, 当发酵至 16 小时左右酶活力最高, 其后酶活力逐渐下降; 二级种子的酶活力与发酵过程中酶活力最高时相当。

**关键词** 天津短杆菌  $T_{6-13}$ ; 谷氨酸; 谷氨酸脱氢酶

谷氨酸发酵是氮素同化的过程, 氮的同化是关键步骤。实验证明, 在谷氨酸产生菌中, 谷氨酸脱氢酶的活力很强, 氮的同化主要是以谷氨酸脱氢酶催化的<sup>[1-3]</sup>。谷氨酸脱氢酶催化的反应是可逆的。自 60 年代开始, 国外就开始对该酶进行研究<sup>[4-6]</sup>, 但大多数采用非谷氨酸产生菌所产生的酶。天津短杆菌  $T_{6-13}$  是国内重要生产谷氨酸菌种之一, 但其代谢途径未见报道。本文目的是通过研究谷氨酸脱氢酶的理化性质、调节特性以及正常发酵条件下酶水平的变化规律, 深入了解各种因素对  $\alpha$ -酮戊二酸还原氨基化反应的影响, 为代谢控制过程、提高产酸、降低成本和建立合理的工艺规范提供依据。

### 材料与方 法

#### (一) 菌株

本实验所用的二级种子及发酵至 16—

20 小时的发酵液均由天津味精厂提供, 生产所用菌种为天津短杆菌  $T_{6-13}$ <sup>[7-8]</sup>。

#### (二) 测定方法

1. 谷氨酸脱氢酶活力的测定方法<sup>[9-11]</sup>:

(1) 谷氨酸脱氢酶催化逆反应的活力测定: 在 340 nm 波长的紫外分光光度计中, 测其开始反应 1 分钟时光吸收的增加值 (用  $\Delta E_{340}$  表示)。反应混合液中含有: 0.1 mol/L pH 8.9 Tris-HCl 缓冲液、0.1 mol/L 的 L-谷氨酸、0.1 mmol/L NADP 和一定量的酶液。

一个酶活力单位定义为: 在一定条件下, 每分钟形成 NADPH 的微克分子数。

比活力的单位定义为: 在一定条件下, 每分钟每毫克蛋白质形成 NADPH 的微克分子数。

本文于 1989 年 7 月 14 日收到。

(2) 谷氨酸脱氢酶催化正反应的活力测定: 在紫外分光光度计上测其在 340nm 波长下开始反应 1 分钟时光吸收减少值 (用  $-\Delta E_{340}$  表示)。反应混合液中含有: 0.1 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液、10 mmol/L  $\alpha$ -酮戊二酸、20 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.1 mmol/L NADPH 和一定量酶液; 反应在室温进行。

一个酶活力单位定义为: 在一定条件下, 每分钟由 NADPH 生成 NADP 的微克分子数。

2. 蛋白质的测定: 按 Lowry 等方法<sup>[12-13]</sup>。

3. 谷氨酸含量的测定: 华勃氏测定法<sup>[14]</sup>。

4. 残糖的测定: 采用斐林氏液滴定法。

5. pH 测定: 采用 pH S-29A 型酸度计。

## 结果与讨论

### (一) 谷氨酸脱氢酶的纯化

收集发酵至 16—20 小时的发酵液, 用 HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机、RPR 10-2-429 转头, 8000 r/min 离心 20 分钟, 用 0.2% KCl 洗涤, 重复离心洗涤二次, 湿菌体可现用, 或  $-20^\circ\text{C}$  长期保存。纯化过程在  $8^\circ\text{C}$  以下进行, 凡离心均用 RPR 20-2-1219 转头, 18000 r/min, 30 分钟。

取湿菌体 30g, 加 pH 7.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 150 ml, 菌体悬液在  $4^\circ\text{C}$  用 MODEL W 超声波细胞破碎器 (1000 Hz, 200W 76%) 处理 20 分钟, 离心去除细胞碎片, 得无细胞抽出液 170 ml。向上清液中加入 45% 饱和度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 离心去除沉淀, 再加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  成 50% 的饱和度, 离心去除沉淀; 向上清液中再加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  成 60% 的饱和度, 离心弃去上清液; 用 pH 7.5 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 25 ml 将沉淀充分溶解, 透析过液的酶液直接上 DEAE-纤维素层析柱 ( $2.5 \times$

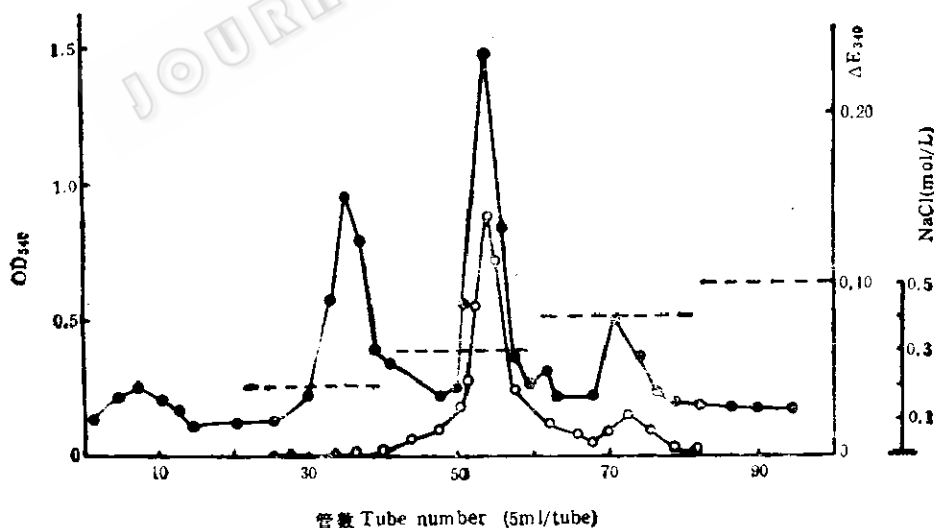


图 1 谷氨酸脱氢酶经 DEAE-纤维素柱的洗脱图形

Fig. 1 DEAE-cellulose chromatography of glutamate dehydrogenase from *Acetivibacterium tianjinense* T<sub>6-15</sub>

—○— GDH 活力 Enzyme activity of GDH; —●— 蛋白质含量 Protein content; ——— NaCl 浓度 Concentration of NaCl

表 1  $T_{4-13}$  谷氨酸脱氢酶的纯化

Table 1 Purification of glutamate dehydrogenase from  $T_{4-13}$

| 纯化步骤<br>Purification step  | 总活力<br>Total activity<br>(u) | 蛋白质浓度<br>Total protein<br>(mg/ml) | 比活力<br>Specific activity<br>(u/mg) | 纯化倍数<br>Purification fold | 得率<br>Recovery (%) |
|--|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 无细胞抽提液<br>Crude extract  | 6740                         | 11.10                             | 4.4                                | 1                         | 100                |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50—60% Ammonium sulfate (50—60% saturation) | 2549                         | 7.35                              | 1.51                               | 3.4                       | 37.8               |
| DEAE-纤维素柱层析<br>DEAE-cellulose  | 1849                         | 0.88                              | 84.2                               | 19.1                      | 27.4               |

35cm), 进行阶段洗脱, 流速 36 ml/h, 每 5ml 一管(图 1)。

由图 1 看出, 第 52—56 管的洗脱液中谷氨酸脱氢酶活力较高, 收集备用。

经以上步骤, 谷氨酸脱氢酶的比活力提高约 19 倍, 酶的回收率为 27.4%(表1)。

(二) 谷氨酸脱氢酶的一般性质

1. 酶的专一性: 实验证明, 谷氨酸脱氢酶催化的正反应和逆反应都必须所有底物存在下发生, 该酶不以 NADH 和 NAD 为其专一性辅酶, 而分别以 NADPH 和 NADP 为其正反应和逆反应的专一性辅酶; 该酶对 L-谷氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸具有严格的专一性。

2. 酶的热稳定性: 在不同温度下, 将一定酶液保温 10 分钟后, 谷氨酸脱氢酶的稳定性情况如图 2。

谷氨酸脱氢酶对热比较敏感, 随着温度的升高或保温时间的延长, 酶蛋白的热变性增加, 从而使酶活力逐渐下降; 于 60℃ 保温 10 分钟, 仍保留活力 81.8%, 而在 65℃ 仅保留活力 8.5%。

3. pH 对酶反应速度的影响: 从图 3 看出, 谷氨酸脱氢酶催化正反应的最适 pH 比较狭窄, 在 pH7.5 左右, 而催化逆反应的 pH 则较宽, 在 pH 8.9—9.9 之间, 说明 NADP 还原的逆反应不能在中性条件下进行。

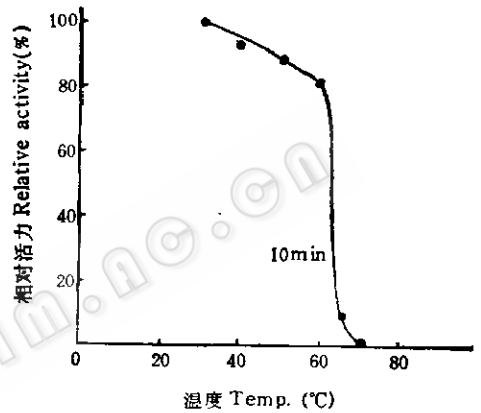


图 2 不同温度对谷氨酸脱氢酶活性的影响  
Fig. 2 Effect of different temperature on GDH activity from  $T_{4-13}$

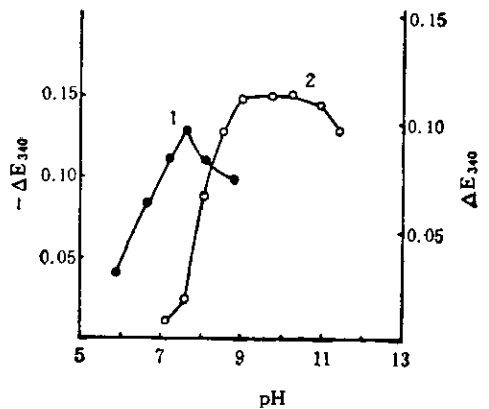


图 3 pH 对谷氨酸脱氢酶反应速度的影响  
Fig. 3 Effect of pH on reaction velocity of glutamate dehydrogenase from  $T_{4-13}$   
1. 正反应 Forward reaction;  
2. 逆反应 Reverse reaction

4. 无机离子对谷氨酸脱氢酶活性的影响: 在所测定的无机盐中, 无机盐对谷氨酸脱氢酶催化的逆反应, 除  $\text{KNO}_3$  外, 无明显的激活和抑制作用。

### (三) 谷氨酸脱氢酶的动力学参数

利用 Lineweaver-Burk 作图法分别测定了 GDH 催化正反应和逆反应的五个底物的米氏常数, 测每个底物时, 其余底物浓度过量。(L-GA 0.15 mmol/L, NADP 0.05 mmol/L, NADPH 0.06 mmol/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mmol/L,  $\alpha$ -KG 10 mmol/L)\* 结果见表 2。

表 2 谷氨酸脱氢酶的动力学参数

Table 2 Kinetic constants for NADP-specific glutamate dehydrogenase from  $T_{4-11}$

| 底物 Substrate    | $K_m$ (mmol/L) |
|-----------------|----------------|
| NADP            | 0.02           |
| L-GA            | 120.48         |
| $\alpha$ -KG    | 3.23           |
| $\text{NH}_4^+$ | 4.0            |
| NADPH           | 0.076          |

在正反应中, 谷氨酸脱氢酶对 NADPH 的亲合力最高; 在逆反应中, 该酶对 NADP 的亲合力远远大于对 L-谷氨酸的亲合力。

### (四) 氨基酸及其它代谢产物对谷氨酸脱氢酶活力的影响

1. 氨基酸对谷氨酸脱氢酶活力的影响: 试验了十多种氨基酸对谷氨酸脱氢酶催化逆反应的抑制作用(表 3)。

在所测定的氨基酸中, 对谷氨酸脱氢酶催化的逆反应都没有明显的抑制和激活作用; 同样该酶也不受这几种氨基酸的积累抑制。

2. 与三羧酸循环有关的有机酸对谷氨酸脱氢酶活力的影响: 表 4 列出了七种有机酸对谷氨酸脱氢酶催化逆反应的影响实验数据。

在所测定的有机酸中, 对谷氨酸脱氢

表 3 氨基酸对谷氨酸脱氢酶活力的影响\*\*

Table 3 Effect of amino acids on activity of glutamate dehydrogenase from  $T_{4-11}$

| 氨基酸<br>Amino acid                          | 酶活力抑制<br>inhibition (%) |
|--|-------------------------|
| Alanine                                    | -7.1                    |
| Threonine                                  | -2.4                    |
| Proline                                    | -2.4                    |
| Isoleucine                                 | 2.4                     |
| Arginine                                   | 0                       |
| Citrulline                                 | 8.7                     |
| Serine                                     | 10.9                    |
| Lysine                                     | 0                       |
| Hydroxyproline                             | 0                       |
| Phenylalanine                              | -2.5                    |
| Homoserine                                 | 5.0                     |
| Histidine                                  | 7.5                     |
| Valine                                     | 0                       |
| Tryptophan                                 | 7.5                     |
| L-glutamine                                | 0                       |
| Alanine + Threonine                        | 0                       |
| Alanine + Threonine + proline              | 0                       |
| Alanine + Threonine + proline + Isoleucine | 4.8                     |

\*\* 氨基酸终浓度 Final concentration: 10 mmol/L

表 4 各种有机酸对谷氨酸脱氢酶活力的影响

Table 4 Effect of organic acids on activity of glutamate dehydrogenase from  $T_{4-11}$

| 有机酸<br>Organic acid | 终浓度<br>(mmol/L)<br>Final<br>concentration | 相对活力<br>(%)<br>Relative<br>activity |
|---------------------|---|-------------------------------------|
| 琥珀酸 Succinate       | 10  | 98.3                                |
| 柠檬酸 Citrate         | 10  | 93.8                                |
| 异柠檬酸 Isocitrate     | 5   | 95.2                                |
| 草酰乙酸 Oxalacetate    | 5   | 98.8                                |
| 顺乌头酸 Aconitate      | 5   | 88.9                                |
| 反丁烯二酸 Fumarate      | 5   | 90.0                                |
| 苹果酸 L-malate        | 5   | 94.3                                |

酶催化的逆反应均没有明显的抑制作用。

3. 终产物的抑制作用: 实验证明, 谷氨酸脱氢酶催化的可逆反应存在着典型的反应产物抑制作用。正反应被反应产物 NADP 和谷氨酸所抑制, 逆反应受反应产物 NADPH、 $\alpha$ -KG 和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  所抑制, 并

\* L-GA: L-谷氨酸; L-KG:  $\alpha$ -酮戊二酸

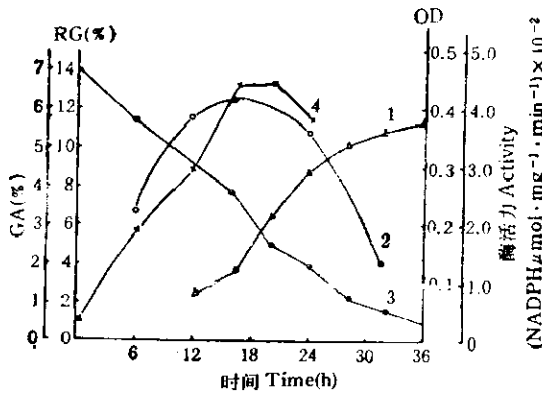


图 4 *T<sub>4-11</sub>* 菌发酵过程曲线及谷氨酸脱氢酶的动态变化

Fig. 4 Curve of fermentation course of *Brevibacterium tianjinense* *T<sub>4-11</sub>*, and dynamic change of glutamate dehydrogenase

1.谷氨酸 Glutamate (GA); 2.酶活性 Enzymatic activity;  
3.残糖 Remaining glucose (RG); 4.光密度 OD

表 5 二级种子与发酵菌体谷氨酸脱氢酶活力比较

Table 5 Comparison of glutamate dehydrogenase activity between secondary seeds and fermentative bacteria

| 菌 体<br>Strain   | 二级种子<br>Secondary seed | 发酵(小时) Fermentation (h) |     |     |
|---|------------------------|-------------------------|-----|-----|
|   |                        | 16                      | 24  | 32  |
| GDH 比活力<br>Specific activity of GDH<br>( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | 4.4                    | 4.2                     | 3.6 | 1.4 |

且随着反应产物浓度的增加对正、逆反应的抑制程度也逐渐升高。

4. 正常发酵条件下的发酵过程曲线及谷氨酸脱氢酶的动态变化：从图 4 看出，发酵开始菌体迅速增殖，光密度(OD)增加很快，此时谷氨酸脱氢酶活力逐渐上升；当发酵至 16 小时时，菌体生长停止，酶活力达最高值；16 小时以后，酶活力逐渐下降；此时，菌体内谷氨酸的合成量也随之减少，特别在发酵后期，谷氨酸的积累速率非常低，只有少量谷氨酸的合成。显然，谷氨酸的合成与谷氨酸脱氢酶有密切关系。

5. 二级种子和发酵菌体的谷氨酸脱氢酶活力的比较：从表 5 看出，二级种子和发酵菌体的谷氨酸脱氢酶活力均相当显著；二级种子酶活力水平与发酵前期相当，但

明显大于发酵中后期的酶活力。

参 考 文 献

[1] Donald, R. G. K. et al.: *J. Bacteriology*, 158 (3): 1144—1151 1984.  
[2] 徐定帮：江苏食品与发酵，3: 16, 1982。  
[3] 云逢霖：微生物通讯，3: 22, 1981。  
[4] Beanard, J. et al.: *Physiol. Veg.*, 17(3): 535, 1979.  
[5] Fishor, H. F. et al.: *Biochem.*, (Wash), 18 (26): 5924, 1979.  
[6] Glass, T. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 143 (3): 1320, 1980.  
[7] 天津工业微生物研究所：天津应用微生物通讯，5: 1—4, 1974。  
[8] 天津工业微生物研究所：天津微生物，2: 1, 1974。  
[9] Shio, I. et al.: *J. Biochem.*, 68: 633—647, 1970.  
[10] Adachi, K. et al.: *J. Bacteriol.*, 129 (3): 1173—1182, 1977.  
[11] 蔡武城等：生物物质常用化学分析法，科学出版

- 社,北京,1982年。
- [12] Lowry, O. H. et al.: *Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.

- [13] Folin, O. et al.: *Biol. Chem.*, **73**: 627, 1972.
- [14] 冯客保等: *工业微生物*, **1**: 30—34, 1981。

## STUDIES ON GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM *BREVIBACTERIUM TIANJINENSE* T<sub>6-13</sub>

Zhang Kexu    Liu Yongsheng

(Department of Food Engineering, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin)

Glutamate dehydrogenase (EC1.4.1.4) from *Brevibacterium tianjinense* T<sub>6-13</sub>, a glutamate-producing bacterium, was partially purified. The result of study shows: the enzyme was specific for NADP. The optimum pH for the forward and reverse reactions were 7.5 and 8.9—9.9 respectively. The enzyme was thermolabile.

The Michaelis constants for NADP,  $\alpha$ -ketoglutarate, NH<sub>4</sub>, NADP and L-glutamate were 0.076, 3.23, 4.0, 0.02 and 120.48 mmol/L, respectively. The enzyme was inhibited by the reaction products, NADP, L-glutamate in the forward reaction and NADPH,  $\alpha$ -ketoglutarate and ammonium ion in the reverse reaction, but not by other tricarboxylic acid

(TCA)-cycle intermediates and single amino acid or several combined amino acids.

The activity change of glutamate dehydrogenase during fermentation was studied. It was shown that the enzymatic activity raised gradually during initial fermentation, it reached the maximum in about 16 hours and then decreased. The enzymatic activity of secondary seeds was similar to the enzymatic activity during fermentation.

### Key words

*Brevibacterium tianjinense* T<sub>6-13</sub>; Glutamic acid (glutamate); Glutamate dehydrogenase