

L-谷氨酸氧化酶产生菌的筛选与产酶条件

徐水清* 李友荣

(华东化工学院生化工程研究所, 上海 200237)

L-氨基酸氧化酶早就从鼠肾^[1]、蛇毒液^[2]、无脊椎动物^[3,4]和微生物^[5,6]等不同来源中分离得到, 能够使多种氨基酸氧化脱氨却几乎不作用于L-谷氨酸。最近从微生物中发现了一种新酶——L-谷氨酸氧化酶(E. C. 1. 4. 3. 11)^[7-9], 能专一地催化下述反应: $L\text{-谷氨酸} + O_2 + H_2O \rightarrow \alpha\text{-酮戊二酸} + NH_3 + H_2O_2$ 。虽然还不清楚有较高底物专一性的L-氨基酸氧化酶的生物学意义, 但该酶是一种有价值的工具酶, 可以用于分析L-谷氨酸及与之偶联的许多化合物, 因而受到重视。在临床上可用于测定血液中谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)和 γ -谷氨酰转移酶(γ -GTP)等^[10-14]。此外还可用于评价食品的质量、监测谷氨酸发酵等生产过程。本文报道了从土样中筛选到L-谷氨酸氧化酶产生菌和诱导产酶条件的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

从上海城区与郊区采集的16个土样中分离的125株放线菌。

(二) 培养基与培养条件

1 斜面培养基: 5% 麸皮浸汁, 2% 琼脂, pH7.0。

2 平板培养基: 在斜面培养基中补充0.1% L-谷氨酸。

3 三角瓶(250ml)培养基: 10g 麸皮, 8ml 水溶液(内含0.2% L-谷氨酸, 0.5% 碳酸钠), $1kg/cm^2$ 灭菌45分钟。培养温度28℃、相对湿度90%以上。

(三) 粗酶液的制备

培养后每三角瓶加入50ml 0.05mol/L(pH7.0)磷酸钾盐缓冲液于28℃间歇振荡抽提1小时, 用纱布压滤, 于0℃、5000r/min离心收集淡黄色透明上清液。

(四) 酶活力测定^[15]

1. 测定液: 用水配制并调至pH6.0的11mg/ml L-谷氨酸溶液0.5ml, 用0.1mol/L pH6.0的磷酸钾盐缓冲液配制的 $121.5\mu g/ml$ 的4-氨基安替比林溶液1.0ml、 $0.261\mu l/ml$ 的N, N-二甲苯胺溶液1.4ml, 60u/ml过氧化物酶溶液0.1ml。临用时混匀, 共3.0ml。

2. 测定方法: 上述3.0ml测定液于37℃恒温水浴预热3分钟, 加入合适浓度的粗酶液0.1ml, 准确反应10分钟, 置沸水浴中煮沸30秒钟终止反应, 冷却后测定550nm吸光度。

3. 酶活力单位定义及酶活力计算: 在上述反应条件下每分钟释放 $1\mu mol$ 过氧化氢所需酶量为1个单位。

本文于1991年12月9日收到。

* 现在地址: 中国科学院上海植物生理研究所。

$$L\text{-谷氨酸氧化酶活力 (u/g)} = \frac{A_{550}}{14.3 \times 1} \times \frac{1}{10} \times \frac{3.1}{0.1} \times \text{稀释倍数} \times \frac{50}{10}$$

结 果 和 讨 论

(一) 菌种筛选

1. 初筛：将来源于不同生境的放线菌点种在平板上培养适当时间，加入酶活力测定液于 37 °C 保温，如围绕某菌落形成紫红色即初步认为该菌株具有 L-谷氨酸氧化酶产生能力。由此筛选到 P-26 与 B-111 两个菌株。

2. 复筛：由于在 5% 麸皮液体培养基中基本上检测不到 L-谷氨酸氧化酶胞外酶活性，故改用固态麸皮培养基复筛。结果表明 P-26 菌株产酶能力远高于 B-111 菌株。因此将 P-26 菌作进一步研究。

3. 酶的底物特异性：测试了丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、羟脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸等 20 种氨基酸，该酶均不作用。可见 P-26 菌产生的 L-谷氨酸氧化酶具有很高的底物专一性。

(二) 产酶条件试验

1. 谷氨酸量对产酶的影响：用不同 L-谷氨酸量诱导菌体形成 L-谷氨酸氧化酶，以培养基中加入 0.2% (占固形物量 W/W, 下同) 谷氨酸时酶生成量最高 (图 1)。

2. 含水量对产酶的影响：改变三角瓶培养基中添加的水量，当含水量为 100% 时最有利于产酶 (图 2)。

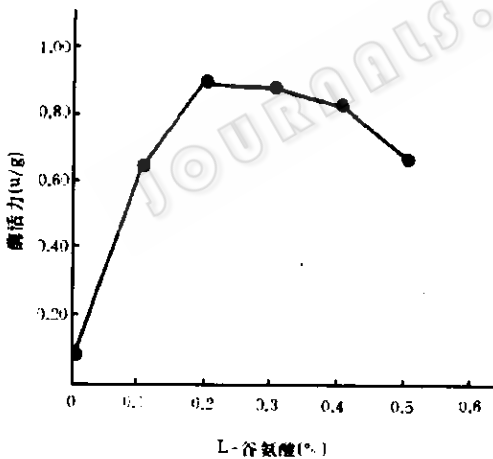


图 1 L-谷氨酸对产酶的影响

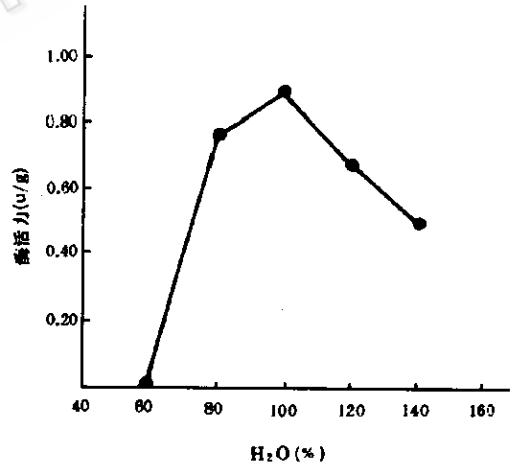


图 2 含水量对产酶的影响

3. 培养温度对产酶的影响：分别在 24 °C、28 °C、32 °C 培养表明，24 °C 时菌体生长相当缓慢，32 °C 时虽然菌体生长很快，但产酶明显低于 28 °C。因此选用 28 °C 为培养温度。

4. 培养时间对产酶的影响：在相同条件下培养不同时间，取样测定酶活力，结果 (图 3) 表明，培养到第 2 天开始产酶，第 6 天酶活力最高，继续培养到第 8 天酶活力显著下降。

5. 碳酸钠量对产酶的影响：改变加入培养基溶液中 Na₂CO₃ 量，培养后测酶活，当 Na₂CO₃ 量为 0.5% 时对产酶最有利 (图 4)。Na₂CO₃ 含量实际上表征了起始 pH 对产酶的影响。

6. 补充碳源对产酶的影响：在以麸皮为基础的培养基中分别补加 0.5% 的不同碳源，由表 1 可见，补充碳源对产酶没有显著效果。

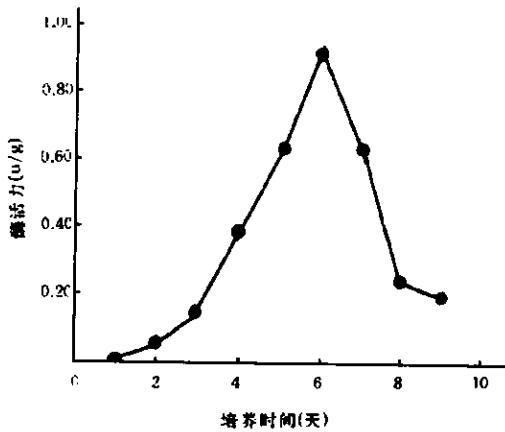
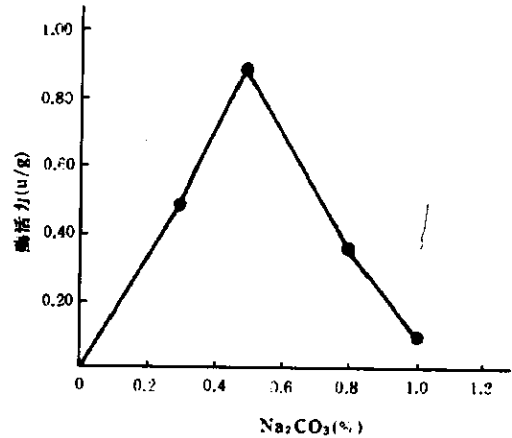


图3 培养时间对产酶的影响

图4 Na₂CO₃对产酶的影响

7. 补充氮源对产酶的影响: 添加 1% 的不同氮源对产酶也无明显积极作用。相反, 尿素、KNO₃ 由于抑制了菌体生长因而产酶很低(表 2)。

8. 无机盐对产酶的影响: 加入 0.1% 不同无机盐, 由表 3 可见, 金属离子对产酶有明显的促进作用。其中 Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 能使酶活力比对照增加约 30%。

表 1 补充碳源对产酶的影响

碳源	对照	蔗糖	乳糖	麦芽糖	淀粉	葡萄糖
酶活力(U/g)	0.83	0.88	0.87	0.84	0.80	0.76

表 2 补充氮源对产酶的影响

氮源	对照	牛肉膏	酵母膏	蛋白胨	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	尿素
酶活力(u/g)	0.87	0.90	0.89	0.88	0.87	0.68	0.21

表 3 无机盐对产酶的影响

无机盐	对照	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂	FeSO ₄ ·7H ₂ O	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	NaCl	CaCO ₃
酶活力(u/g)	0.87	1.14	1.12	1.08	1.00	0.88	0.87

参 考 文 献

- [1] Nakano, M. et al.: *Methods in Enzymology*, 17ed., p.601, (ed. Tabor, H. et al.), Academic Press Inc., New York and London, 1971.
- [2] Wellner, D.: *ibid.*, p. 597, 1971.
- [3] Blaschko, H. et al.: *Biochem. J.*, **62**: 335—339, 1956.
- [4] Roche, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **35**: 111—122, 1959.
- [5] Stumpf, P.K et al.: *J. Biol. Chem.*, **153**: 387—399, 1944.
- [6] Knight, S. G.: *J. Bacteriol.*, **55**: 401—409, 1948.
- [7] Kamei, T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(4): 1307—1314, 1983.
- [8] Kusakabe, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**(1): 179—182, 1983.
- [9] Bochmer, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **182**(2): 327—332, 1989.
- [10] Kusakabe, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(1): 181—184, 1984.
- [11] Kusakabe, H. et al.: *ibid.*, **48**(5): 1357—1358, 1984.
- [12] Kamei, T. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**(1): 401—412, 1986.
- [13] Romette, J. L. et al.: *Ansl. Lett.*, **20**(7): 1069—1081, 1987.

- [14] Wollenberger, U. et al.: *Biosensors*, 4(6): 381—391, 1989.
[15] Hirano, K. et al.: The 3rd Symposium on Analytical Biochemistry, p.73, Tokyo, 1977.

SCREENING OF L-GLUTAMATE OXIDASE FORMING STRAINS AND CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION

Xu Shuiqing Li Yourong

(*Institute of Biochemical Engineering, East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237*)

A strain P-26 producing extracellular L-glutamate oxidase was screened out from 125 *Actinomyces*. The formation of enzyme was induced by L-glutamate, it reached maximum when the microorganism was grown in wheat bran medium containing 0.2% L-glutamate, 0.5% Na_2CO_3 and 100% H_2O at 28 °C for 6 days. The enzyme activity could be moderately enhanced by extra supplement of inorganic salts such as $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and CaCl_2 .

Key words L-glutamate oxidase; *Actinomyces*