

## 嗜碱性利用一碳的莫拉氏菌的研究

赵孝先

(山东大学微生物学系 济南 250100)

加藤美雪 五十岚泰夫 儿玉彻

(东京大学 日本东京)

利用不同营养类型的微生物进行  $\text{CO}_2$  固定的研究在世界上很受重视<sup>[1]</sup>。对光能自养菌和化能自养菌; 好氧菌和厌氧菌等多种类型的一碳微生物的比较生物化学分析能使人们更好地认识它们潜在的应用价值。近年来, 分离自极端环境微生物的  $\text{CO}_2$  固定研究已引起人们的极大兴趣<sup>[2~4]</sup>。在 pH9 ~ 10 的偏碱性条件下, 根据反应式(1)、(2)、(3), 绝大部分  $\text{CO}_2$  以  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  的形式存在。  $\text{CO}_2$ 、 $\text{H}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  的总量多于中性环境的相应量。因此, 认为分离嗜碱性菌株是获得一碳利用



菌或自养菌的一种有效方式。  $\text{CO}_2$  的生物固定途径在原核生物中具有多样性, 至今还未完全阐明<sup>[5]</sup>, 但卡尔文循环仍是最普遍的形式。目前, 尚无嗜碱性菌固定  $\text{CO}_2$  的报道。现对分离的嗜碱性莫拉氏菌 (*Moraxella*) M-z 菌株及其一碳代谢研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

## 1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种: 莫拉氏菌 (*Moraxella*) 菌株 M-z 分离自日本。

1.1.2 培养基(g/L): 基本培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1; 酵母膏 0.1;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  1.0 mg;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 mg;  $\text{CaCl}_2$  1.0 mg; 微量元素母液 0.5 ml, 分别用甲酸钠 6.8 g 或甲醇 1.5 g 作为唯一碳源。 始起 pH 用过滤除菌的 3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调至 9 ~ 10。

LB 培养基成分见文献[6]。

## 1.2 培养条件

在 5L 摇瓶中, 装入 1L 基本培养基, 接种后 37℃ 振荡培养约 18h, 后接入装有 15L 相同培养基的 30L 自控罐中 (Marubishi Bioeng. Co. Japan), 起始转速和通气量分别为 200 r/min 和 5L 空气/min, 随培养液浊度的增加分别逐渐增至 300 r/min 和 10L 空气/min。

## 1.3 无细胞抽提液的制备及酶活性分析

从以甲酸钠或甲醇作为唯一碳源的培养物和 LB 培养物中, 收集对数生长后期的莫拉氏菌 M-z 细胞 (10000 g, 5 min), 用缓冲液 A (100 mmol/L bicine-NaOH pH8.0, 含 20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,

本文于 1996 年 5 月 1 日收到。

2 mmol/L EDTA 和 2 mmol/L 二硫苏糖醇) 洗一次, 重新悬浮于缓冲液 A 的细胞液经 French 压榨机(Aminco USA)于 110 Mpa 处理两次, 离心去除细胞碎片(12000 g, 15 min, 4℃), 上清液作为无细胞抽提液。以  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  测定 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(RubisCO)的活性<sup>[7]</sup>。一个酶活性单位定义为每分钟催化 1  $\mu\text{mol}$  1,5-二磷酸核酮糖羧化的酶量。蛋白质含量由 Bio-Rad 染料结合分析测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶和甲醇脱氢酶的测定参照文献[8]。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株 M-z 的基本特性

分离到 13 株嗜碱性一碳利用菌, 通过比较它们的生长速率及细胞抽提液中 RubisCO 的稳定性, 莫拉氏菌 M-z 菌株用作进一步研究。

菌株 M-z 细胞呈短杆状或近似球状; 细胞大小在  $0.9 \sim 1.1 \times 1.2 \sim 1.3 \mu\text{m}$ ; 革兰氏染色呈负反应; 不运动; 氧化酶、过氧化氢酶及硝酸盐还原均为正反应; 利用葡萄糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、甘露糖、乳糖的产酸试验均为负反应。菌株 M-z 最适生长温度: 37℃; 最适生长 pH 范围: 8~10; DNA 中 G+C 含量为 42 mol%。

### 2.2 菌株 M-z 的培养特性

莫拉氏菌 M-z 菌株可利用甲酸钠或甲醇作为唯一碳源生长, 从它们的氧化中获取能量, 也可以利用普通肉汤培养基生长, 是一兼性一碳化合物利用菌。在以甲酸钠或甲醇作为唯一碳源的培养基中添加 0.01% 的酵母粉能明显提高其生长速率(图 1~3 为 30L 丸菱自控罐中培养结果)。

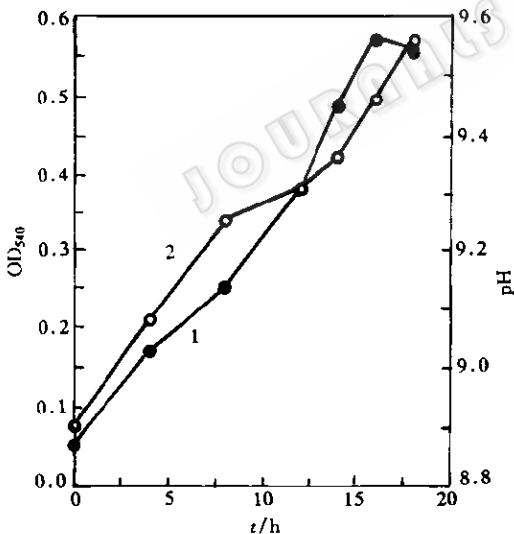


图 1 莫拉氏菌 M-z 菌株在甲酸培养基(含 0.01% 酵母粉)中的生长曲线  
1. OD; 2. pH.

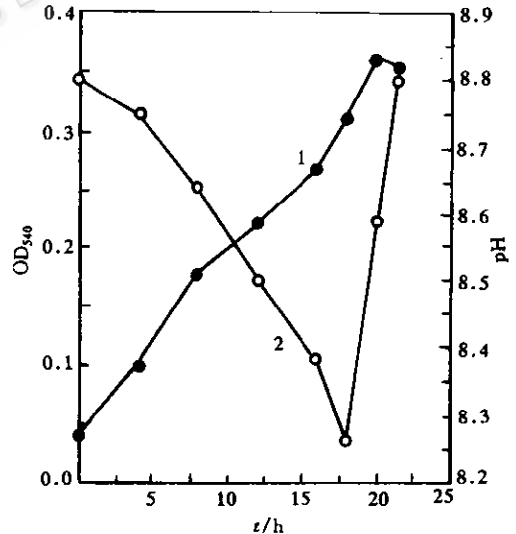


图 2 莫拉氏菌 M-z 菌株在甲醇培养基(含 0.01% 酵母粉)中的生长曲线  
1. OD; 2. pH.

莫拉氏菌 M-z 这类具有代谢类型多样化的菌株, 它们根据环境营养状况的不同可自我调节菌体自身自养或异养生活的代谢“开关”, 并兼有混合营养类型。这种代谢的灵活性被认为是以通过基因转录

水平的控制来调节代谢所需酶类的合成为基础的,这是一值得深入探讨的问题。莫拉氏菌 M-z 菌株是第一个有关一碳化合物代谢及其 RubisCO 活性分析的嗜碱性细菌菌株。

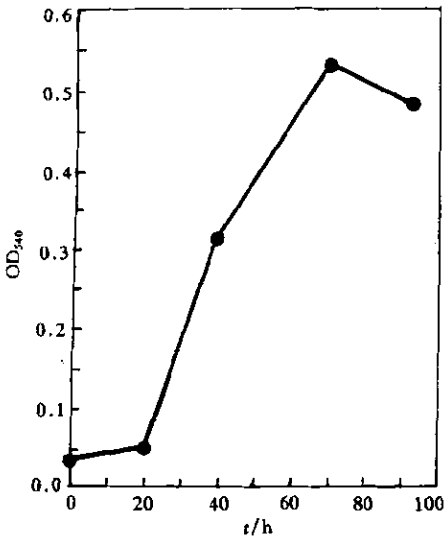


图3 莫拉氏菌 M-z 菌株在甲酸培养基中的生长曲线

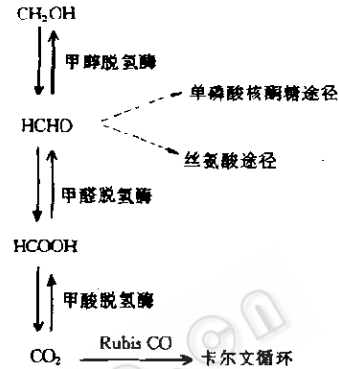


图4 一碳化合物代谢途径

由图 1、2 可知,培养的起始 pH 都在 8.8~8.9,但随着菌体生长, pH 的变化趋势不同,认为代谢的中间物是影响 pH 的关键因素。结合图 4 结果,推测 M-z 菌株在利用甲醇作为唯一碳源时,碳的代谢流向有从甲醇至甲酸的过程,即以甲醇作为唯一碳源时,卡尔文循环仍起重要作用。这一推论由表 1 的结果得到进一步证实。值得一提的是较高浓度的甲醇(5g/L)能强烈抑制该菌的生长。为获取一定的生物量,作者采用了低浓度甲醇的流加培养方法。

### 2.3 与一碳化合物代谢有关的酶活性分析

从三种培养液中制备了莫拉氏菌 M-z 菌株的无细胞抽提液,测定了它们的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(RubisCO)、甲酸脱氢酶(FDHE)、甲醛脱氢酶(FADHE)和甲醇脱氢酶(MDHE)的比活性(表 1)。

表 1 与一碳化合物代谢有关的酶活性分析

无细胞抽提液来源	酶的比活性(U/mg 蛋白)			
	RubisCO	FDHE	FADHE	MDHE
甲酸培养物	0.14	0.53	0.11	0.09
甲醇培养物	0.13	0.13	0.08	0.30
LB 培养物		0	0	

由表 1 结果可确信,莫拉氏菌 M-z 菌株可以利用卡尔文循环同化甲酸或甲醇。目前公认的一碳化合物被微生物同化吸收的途径包括<sup>[9]</sup> CO<sub>2</sub> 固定的二磷酸核酮糖途径(卡尔文循环)、甲醛同化吸收的单磷酸核酮糖途径和丝氨酸途径(图 4)。现尚无莫拉氏菌 M-z 菌株同时具有运转两种一碳化合物同化途径的直接证据,但可以认为它有可能以某一途径为主固定碳源,同时辅助于其它途径。因为在以甲酸钠为唯一碳源培养的菌体中,仍能检测到甲醛脱氢酶活性。从 LB 培养物制备的无细胞提取液中,几乎测不到上述四种酶活性,这说明它们结构基因的表达在异养状态下被阻遏。单磷酸核酮糖途径和丝氨酸途径关键酶活性的分析将有益于进一步阐明莫拉氏菌 M-z 菌株的一碳代谢规律。

## 参 考 文 献

- [1] Tabita F R. *Microbiol Rev*, 1988, 52 (2): 155 ~ 189.
- [2] Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41 (1): 130 ~ 133.
- [3] Yaguchi T, Chung S Y, Igarashi Y et al. *J Ferment Bioeng*, 1993, 75 (1): 1 ~ 8.
- [4] Yokoyama K, Hayashi N R, Arai H et al. *Gene*, 1995, 153 (1): 75 ~ 79.
- [5] 五十岚泰夫. 化学と生物. 1992, 30 (6): 394 ~ 400.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. A. 1
- [7] Yaguchi T, Chung S Y, Igarashi Y et al. *J Ferment Bioeng*, 1992, 73 (5): 348 ~ 351.
- [8] Lidstrom M E. *Methods in Enzymology*. London: Academic Press, 1990. 223 ~ 226, 318 ~ 321, 331 ~ 334.
- [9] 卫扬保. 微生物生理学. 北京: 高等教育出版社, 1989. 167 ~ 176.

## STUDIES OF AN ALKALOPHILIC C-1 COMPOUND ASSIMILATING BACTERIUM, *MORAXELLA* SP. M-z

Zhao Xiaoxian

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Kato B. Igarashi Y. Kodama T.

(The University of Tokyo, Japan)

**Abstract** An alkalophilic C-1 compound assimilating bacterium, *Moraxella* sp. M-z, was used in this study. The optimum pH range of its growth is 8 ~ 10. Results showed this strain is a facultative C-1 utilizer, its growth rate could be raised by adding 0.01% yeast extract to the medium while formate or methanol was the sole carbon source, respectively. The specific activity of RubisCO were 0.14 U/mg · pr, 0.13 U/mg · pr and trace with those cell-free extract prepared from formate medium, methanol medium and LB medium. Formate dehydrogenase (DHE), formaldehyde DHE and methanol DHE which related with C-1 compound assimilation were also assayed.

**Key words** Alkalophilic bacterium; C-1 assimilation; RubisCO.