

固定化原生质体产谷氨酸脱氢酶的研究

苏正定 郭勇 彭志英

(华南理工大学生物工程研究所, 广州 510641)

本文报道了用海藻酸钙凝胶包埋法制备固定化谷氨酸棒杆菌T6-13原生质体及其用于生产谷氨酸脱氢酶(GDH, E.C. 1.4.1.4)的研究。在一定条件下游离细胞和固定化细胞胞内可积累谷氨酸脱氢酶,但并不分泌到胞外。对数生长前期的细胞经蛋白酶处理14h后分离得到原生质体,游离原生质体和固定化原生质体可产胞外GDH。用3%海藻酸钙凝胶包埋10%的原生质体制备的固定化原生质体具有较高的产酶性,分批培养72h后发酵液中GDH活力可达到 1.64×10^{-2} u/ml,为游离细胞胞内产酶的205%。固定化原生质体可用溶菌酶处理固定化细胞而制得,与直接固定化原生质体制备的固定化原生质体具有同样的产酶能力,且制备方便。固定化原生质体可重复使用6批次(约18天),且具有良好的贮藏稳定性。

关键词 原生质体; 固定化; 谷氨酸棒杆菌; 脱氢酶

固定化原生质体是在固定化细胞技术上发展起来的一门新技术,近几年来已有一些这方面的研究报道^[1-9]。谷氨酸棒杆菌T6-13(*Corynebacterium glutamicum* T6-13)中谷氨酸脱氢酶(GDH, E.C. 1.4.1.4)是以Co II为专一性辅酶的胞内酶,具有较好的热稳定性^[10]。GDH在临床上可直接或间接测定NH₄⁺、尿素氮、5'-核苷酸酶及食品和发酵液中谷氨酸的含量。本文报道海藻酸钙凝胶包埋谷氨酸棒杆菌T6-13原生质体生产谷氨酸脱氢酶的基本条件,分批发酵产酶特性、半连续产酶及贮藏稳定性等方面的研究结果。

材料与 方法

(一) 菌种

谷氨酸棒杆菌T6-13(*Corynebacterium glutamicum* T6-13),系本所保藏菌种。

(二) 培养基

1. 斜面培养基:系肉汁斜面培养基, pH6.8—7.0。

2. 液体培养基(%):葡萄糖2, 尿素0.5, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.04, Mn²⁺, Fe²⁺各2ppm, 玉米浆0.5, pH6.8—7.0。

3. 产酶培养基(%):葡萄糖5, L-谷氨酸1.5, K₂HPO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.04, Fe²⁺ 8ppm, 生物素50μg/L, 0.3mol/L NaCl, CaCl₂ 1, pH7.0。

(三) 细胞破碎

采用超声波破碎方法^[10]。细胞悬浮液置冰浴中用超声波间歇处理20min (20 kHz, 150W)。

(四) 原生质体的制备

斜面菌种接入液体培养基在31℃振荡培养12h,再转接到新鲜培养基中继续培养至对数生长前期(约2.5h左右),加入青霉素G(0.5u/ml)处理3h,然后离心收集细胞,以过量0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤两次。称取一定量的细胞悬浮于0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(含0.5mol/L NaCl, 0.01mol/L MgCl₂·6H₂O, pH

本文于1991年9月16日收到。

*国家自然科学基金委资助项目。

7.0)中, 加入1mg/L 蛋清溶菌酶在30℃作用14h, 分离得到原生质体。

(五) 固定化原生质体的制备

固定化原生质体的制备采用两种不同的方法。

方法 I: 将由 1g 细胞制备的原生质体配制成20%的悬浮液, 与等体积的 6% 海藻酸钠溶液混合均匀后, 用注射器滴入 0.5mol/L CaCl_2 溶液中, 制得直径为 4 mm 的球状颗粒, 用 0.5mol/L CaCl_2 溶液洗涤, 浸泡过夜(4℃), 即制得固定化原生质体。

方法 II: 先采用同方法 I 的步骤将 1g 细胞固定化制得固定化细胞, 再用蛋清溶菌酶处理固定化细胞 14h, 充分洗涤后即得固定化原生质体。

(六) 产酶试验

10g 固定化原生质体、10g 固定化细胞、1g 游离细胞或1g游离原生质体分别加到25ml产酶培养基中, 在31℃振荡培养, 依时吸取0.5ml发酵液经高速冷冻离心5min($10\ 000\times g$)去沉淀物, 上清液用于测定GDH酶活力。

(七) 酶活力测定

参考 Adachi 的方法^[11]。用分光光度法在340nm处测定NADP⁺的还原反应, 一个酶活力单位定义为在测定条件下每分钟催化生成1 μmol NADPH的酶量。

结果与讨论

(一) 溶菌酶处理时间对产酶的影响

溶菌酶处理时间对细胞壁水解程度有很大的影响, 因而也影响产酶能力。谷氨酸棒杆菌T6-13 经溶菌酶处理不同时间后制得的原生质体再经固定化后, 其固定化原生质体产酶能力有所不同(图1), 随着处理时间的增加, 产酶能力逐渐增加, 在

14h 左右达到最高, 进一步增加酶处理时间, 产酶能力则下降。

(二) 载体浓度对产酶的影响

用不同浓度的海藻酸钠溶液分别包埋10%的原生质体, 在产酶培养基中培养72h后测定酶活力(图2), 可见用3%的海藻酸钙包埋时较好, 且低浓度的胶粒不稳定。

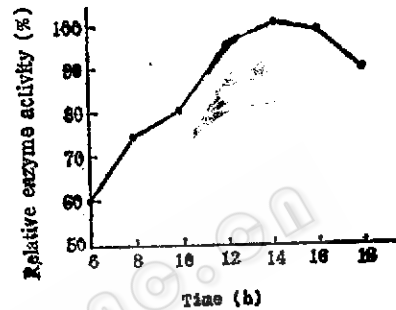


图1 溶菌酶处理时间对产酶的影响

Fig.1 The effect of lysozyme treatment time on the GDH productivity

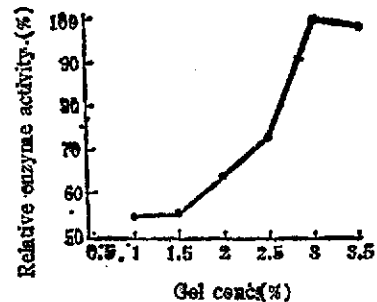


图2 凝胶浓度的影响

Fig.2 Effect of gel concentration

(三) 原生质体包埋量对产酶的影响

用3%的海藻酸钙分别包埋不同量的原生质体制备固定化原生质体, 在产酶培养基中培养72h后测定酶活力(图3), 随着原生质体包埋量的增加, 产酶能力逐渐增加, 但高过10%的包埋量以后酶活力提高幅度不大, 而且胶粒变得比较脆弱, 故以下的试验均选择10%的包埋量。

(四) 固定化原生质体制备方法的比较

72h。

(五) 产酶性能的比较

从原理上说, 如果用蛋清溶菌酶直接处理固定化细胞也可制得固定化原生质体。对“材料与方 法”中两种方法制备的固定化原生质体进行产酶实验研究, 如图 4 所示, 两种方法制备的固定化原生质体产酶能力非常接近, 方法 II 比方法 I 要简便, 故对进一步的实验研究, 均采用方法 II 制备的固定化原生质体, 培养时间定为

分别考察固定化原生质体、固定化细胞、游离细胞和游离原生质体的产酶性能(图 5), 如图所示, 在 24h 后, 固定化原生质体的产酶能力为游离细胞胞内产酶能力的 62%, 在 72h 后, 固定化原生质体的生产能力为游离细胞胞内产酶能力的 205%, 而游离原生质体的产酶能力仅为游离细胞胞内产酶的 37%, 另一方面, 游离细胞、固定化细胞产生的 GDH 仅存在于细胞内, 而不分泌到介质中, 游离原生质体具有较低的产酶性且不能反复使用。这些说明固定化原生质体用于生产某些胞内酶是一种有潜力的方法。

(六) 半连续产酶

固定化原生质体在产酶培养基中培养 72h 后, 测定 GDH 活力, 再取出胶粒用 0.5mol/L CaCl₂ 溶液洗涤干净后移入新鲜培养基中, 在同样条件下重新培养 72h 后取样测定酶活力, 依此重复下去, 考察固定化原生质体半连续发酵(图 6), 随着重复使用次数的增加, 起初产酶能力有所

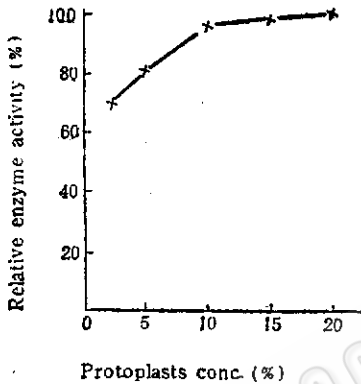


图 3 原生质体包埋量的影响

Fig.3 Effect of protoplast content

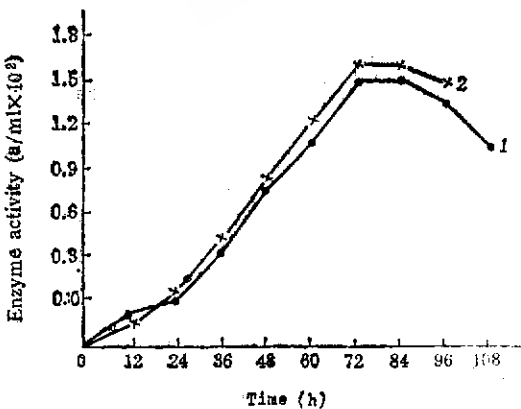


图 4 固定化原生质体制备方法的比较

Fig.4 Comparison of methods preparing immobilized protoplasts

- 1. Immobilized protoplasts by method I
- 2. Immobilized protoplasts by method II

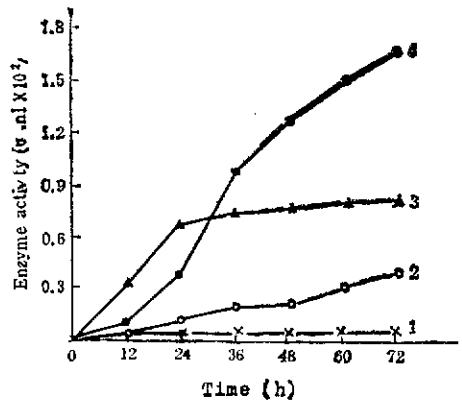


图 5 产酶性能的比较

Fig.5 Comparison of enzyme productivity

- 1. Immobilized cells, 2. Free protoplasts,
- 3. Free cells (intracellular), 4. Immobilized protoplasts

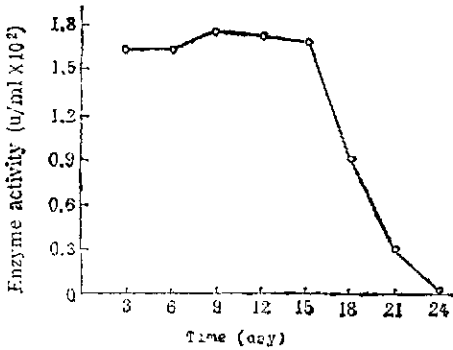


图 6 半连续产酶

Fig.6 Semi-continuous production of GDH

增加, 然后产酶能力逐渐下降, 使用 6 批后

产酶能力降为开始的一半, 即产酶半衰期为 18 天。

(七) 贮藏稳定性

培养 72h 后的固定化原生质体取出后用 0.5mol/L CaCl₂ 溶液洗净, 置于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.5mol/L NaCl, pH7.0) 中在 4℃ 下保藏 30 天, 然后取出后重新置于产酶培养基中发酵, 测定酶活力, 考察贮藏前后产酶情况的变化, 实验表明经短时间适应后, 产酶能力可恢复到原来的水平, 说明固定化原生质体具有良好的贮藏稳定性。

参 考 文 献

- [1] Karube, I. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21:270-272, 1985.
- [2] Karube, I. et al., *J. Biotechnol.*, 6:1-7, 1987.
- [3] 郭 勇: 广东生化通讯, 5:16-19, 1988.
- [4] 张 毅、郭勇等: 广东生化通讯, 6:95-97, 1989.
- [5] 刁惠敏、郭勇等: 微生物学通报, 18(6):326-328, 1991.
- [6] Deshpanda, M.V. et al., *Biotechnol. Lett.*, 9:49-52, 1987.
- [7] Kame, R. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23:106-109, 1985.
- [8] Dlugonski, J. et al., *Acta Microbiol. Pol.*, 37:53-60, 1988.
- [9] Guo, Y. et al., 10th Symposium of FAOB, Hong Kong, p.59, 1991.
- [10] 苏正定、郭 勇等: 华南理工大学学报, 19:83-88, 1991
- [11] Adachi, K. et al., *J. Bacteriol.*, 129:1173-1182, 1977.

Study on the Production of Glutamate Dehydrogenase with Immobilized Protoplasts

Su Zhengding Guo Yong Peng Zhiying

(Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

In this paper the preparation of immobilized *Corynebacterium glutamicum* T6-13 protoplasts and their use in producing glutamate dehydrogenase (GDH, E.C.1.4.1.4) were reported. Under optimal condition, the free cells and immobilized cells of *Corynebacterium glutamicum* T6-13 could intracellularly accumulate GDH which could not be secreted. Protoplasts were prepared by treating cells at mid-exponential phase with lysozyme for 14h and then by separating them. Free protoplasts and immobilized protoplasts could extracellularly secrete GDH when cultured in the enzyme producing medium. It was found that GDH activity in broth could

reach 1.64×10^{-2} u/ml when the immobilized protoplasts prepared with 3% Ca-alginate gel and 10% protoplasts were cultured in the enzyme-producing medium. Their enzyme productivity was 205% of that of free cells accumulating intracellular GDH. Immobilized protoplasts could be also prepared by treating immobilized whole cells with lysozyme and this method was more convenient than directive immobilization of protoplasts. The immobilized protoplasts could be repeatedly used for at least six batches (about 18 days) and had good storage stability.

Key words Protoplasts; immobilization; *Corynebacterium glutamicum*; dehydrogenase

JOURNALS.IM.AC.CN