

氮源对钝齿棒杆菌谷氨酰胺合成酶的调节 作用及溶菌酶对破壁作用的研究

刘 扬 孔德刚 高培基

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

摘要 钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) 6282 谷氨酰胺合成酶(GS)的合成显著受氮源性质的影响,以 50mmol/L 谷氨酸钠为唯一氮源时,谷氨酰胺合成酶活力最高; NH_4^+ 对谷氨酰胺合成酶的合成有阻遏作用,谷氨酸钠则具有解阻遏作用。蛋清溶菌酶对于菌株 6282 的细胞超声波破碎具有良好的辅助作用,适宜的细胞破碎条件为 0.8mg/ml 溶菌酶,37℃保温 4~5h,超声波 120W 处理 12min。

关键词 钝齿棒杆菌,谷氨酰胺合成酶,溶菌酶

谷氨酰胺合成酶(GS)是生物体氮代谢的中心酶之一,它催化生物合成途径中氮的同化,使之成为各种含氮物质如蛋白质、核酸及各种辅酶的氨基供体,因此它在生物体内的活性受到机体的严格控制。目前,对大肠杆菌等革兰氏阴性菌中的谷氨酰胺合成酶研究已相当透彻,包括其分子结构、氨基酸顺序及调控机制

等^[1]。但不同生物来源之谷氨酰胺合成酶同源性小^[2],调控机制也各异。关于氨基酸生产菌尤其是钝齿棒杆菌谷氨酰胺合成酶的研究报道非常少^[3],本文研究了氮源对钝齿棒杆菌的谷氨酰胺合成酶的调节作用;由于革兰氏阳性菌

1995-07-11收稿。

特别是杆菌的细胞壁结构牢固,破壁困难,本文又研究了溶菌酶对钝齿杆菌细胞超声波破碎的辅助作用,为进一步研究酶的分离、纯化和性质提供了高浓度的酶液。

1 材料和方法

1.1 菌种

钝齿杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) 6282, 本所保存。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基 (%): 蛋白胨 1.0, 酵母粉 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH7.0, 1×10^5 Pa, 灭菌 15min。

1.2.2 种子培养基 (%): 葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 玉米浆 1.0, pH7.0, 0.70×10^5 Pa, 灭菌 30min。

1.2.3 产酶培养基 (%) [4]: 葡萄糖 1.0, 谷氨酸钠 1.0, KH_2PO_4 0.05, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 酵母粉 0.03, pH7.0, 0.70×10^5 Pa, 灭菌 30min。

1.2.4 培养方法: 菌体在所有培养基中的培养条件均为 30℃, 24h, 液体摇床培养速度为 180r/min。

1.3 粗酶制备

1.3.1 菌体收集: 菌体在产酶培养基中培养 24h 后, 5000r/min, 离心 20min, 以 1% 氯化钾溶液洗涤两次, 得湿菌体, 置于 -20℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.3.2 超声波破碎: 冻存的菌体融化后, 加入 4 倍体积的 0.02mmol/L 咪唑盐酸缓冲液 (pH7.0), 制成菌悬液, 用超声波破碎器于冰浴中处理 10min, 然后于 8000r/min 离心 30min, 上清液即为粗酶液。

1.4 酶活的测定方法

按 Spario [5] 方法测定谷氨酰胺合成酶的 γ -谷氨酰基转移活性。反应总体积为 1ml, 内含 30mmol/L L-谷氨酰胺, 40mmol/L 咪唑盐酸缓冲液 (pH7.0), 0.4mmol/L ADP, 20mmol/L 磷酸盐, 60mmol/L 羟胺,

3mmol/L MnCl_2 以及适量的酶液 (以反应终止时, 产生约 $1\mu\text{mol/L}$ 的 γ -谷氨酰羟肟酸为适宜)。反应物在 37℃ 保温 15min, 加入 2ml 终止液以终止反应并显色, 于 540nm 比色测定反应生成的 γ -谷氨酰羟肟酸。终止液包含 3.3% FeCl_3 (g/v), 2% 三氯醋酸 (g/v) 及 2.5% 的浓 HCl (v/v)。在上述条件下, 1min 催化形成 $1\mu\text{mol/L}$ γ -谷氨酰羟肟酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

测定完整菌体的酶活时, 需在菌悬液中加入 1/10 体积的 1mg/ml 的十六烷基三甲基溴铵 (CTAB) [6]。

1.5 蛋白质的测定方法

采用 Follin-酚法测定蛋白质的含量 [7]。

2 结果

2.1 钝齿杆菌的产酶曲线 (图 1)

对菌体生长而言, 从 3h 后开始进入指数生长期, 18h 后开始稳定期; 而谷氨酰胺合成酶在此时进入高峰期, 到 24h 达到最高, 27h 后菌体自溶, 比浊下降, 谷氨酰胺合成酶的合成速率成为负值, 开始降解。

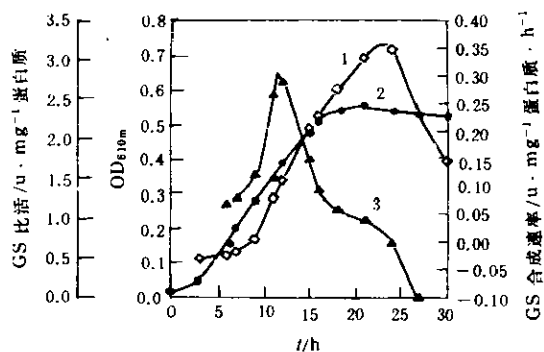


图 1 *C. crenatum* 的生长及产酶曲线

1. 产酶曲线 2. 菌体生长 3. 产酶速率曲线

2.2 氮源对谷氨酰胺合成酶的调节作用

2.2.1 不同氮源对谷氨酰胺合成酶活力的影响: 以各种氮源替代产酶培养基中的氮源, 测定完整菌体的谷氨酰胺合成酶转移活性, 结果如表 1 所示。

表 1 不同氮源对谷氨酰胺合成酶的影响

氮 源	生长 (OD _{610nm})	比活 (u / mg 蛋白质)
60mmol / L glutamate	0.498	0.83
60mmol / L glutamate+20mmol / L NH ₄ Cl	0.515	0.48
0.5% peptone	0.500	0.70
0.5% peptone+20mmol / L NH ₄ Cl	0.424	0.17
0.5% yeast extracts	0.521	0.66
0.5% yeast extracts+20mmol / L NH ₄ Cl	0.511	0.13
60mmol / L NH ₄ Cl	0.112	0.07
30mmol / L urea	0.520	0.11

由表 1 可看出,当以谷氨酸钠为唯一氮源时,谷氨酰胺合成酶比活最高,生长量也较高;而以复杂酵母膏或蛋白胨为氮源时,生长略有提高,酶的比活却有所下降;添加少量 NH₄Cl (20mmol / L),酶的比活就明显降低,说明 NH₄⁺能阻遏谷氨酰胺合成酶的合成。酵母膏或蛋白胨为氮源时,酶比活的降低可能源于其中含有的某些特殊代谢物或含氮化合物被降解时所放出的 NH₄⁺ [8]。

在产酶培养基中添加的 0.03% 的酵母粉是为了满足细胞生长所需要的微量元素和生长因子。

表 2 不同浓度的谷氨酸钠对谷氨酰胺合成酶活性的影响

谷氨酸钠 (mmol / L)	生长 (OD _{610nm})	比活 (u / mg 蛋白质)	相对活力 / %
10	0.285	1.145	100
20	0.354	1.44	126
30	0.352	1.53	134
40	0.355	1.58	138
50	0.471	1.64	143
60	0.500	1.62	141
70	0.500	0.73	64

2.2.2 不同浓度的谷氨酸钠对谷氨酰胺合成酶活力的影响:改变产酶培养基中的谷氨酸钠的浓度,菌体生长及谷氨酰胺合成酶活力列于表 2。当谷氨酸的浓度为 50mmol / L 时,菌体生长好,酶的比活也最高;大于 70mmol / L,酶

的比活即明显降低。

2.2.3 NH₄Cl 浓度对谷氨酰胺合成酶活力的影响:在产酶培养基中添加不同浓度的 NH₄Cl,菌体生长及谷氨酰胺合成酶活性列于表 3。

表 3 不同浓度的 NH₄Cl 对谷氨酰胺合成酶活性的影响

NH ₄ Cl (mmol / L)	生长 (OD _{610nm})	比活 (u / mg 蛋白质)	相对活力 / %
0	0.161	1.92	100
1	0.276	1.55	81
2	0.558	1.33	69
5	0.575	1.23	64
10	0.448	1.04	54
20	0.428	0.75	39
30	0.240	0.06	3

从表中可以看出氨离子 (NH₄⁺) 能明显阻遏谷氨酰胺合成酶的合成,添加 1mmol / L 的氨离子 (NH₄⁺),酶的比活有所降低,随着氨离子 (NH₄⁺) 浓度的增高,其阻遏也越来越强,在 30mmol / L 时其比活只有当初的 3%。而且 NH₄Cl 对菌体的生长的影响也不尽相同,低浓度的 NH₄Cl 能促进菌体的生长,浓度过高,则对生长有抑制作用。

2.3 溶菌酶对超声波破碎细胞的辅助作用

2.3.1 溶菌酶的添加与否对细胞破碎效果的影响:细胞解冻制成菌悬液后,分成两份,一份

不加溶菌酶,另一份加入 1mg/ml 的蛋清溶菌酶,37℃ 放置 4h,然后用超声波破碎,每隔 2min 取样测蛋白含量及谷氨酰胺合成酶的活力。实验结果如图 2 所示。

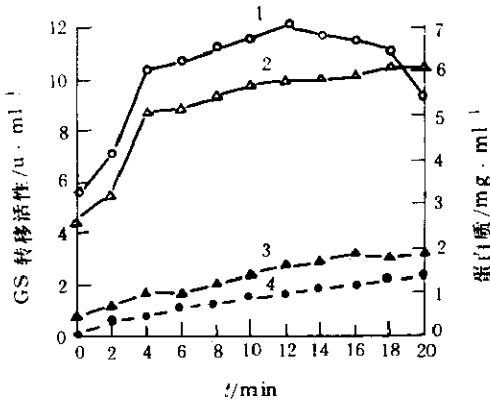


图 2 溶菌酶对细胞破碎的作用

1.溶菌酶处理后的酶活力 2.溶菌酶处理后的蛋白 3.未经溶菌酶处理的蛋白 4.未经溶菌酶处理的酶活力

从图 2 可以看出,溶菌酶对于细胞的破碎和谷氨酰胺合成酶的释放作用是相当明显的,溶菌酶的作用在于破坏细胞壁的肽聚糖层,使细胞壁疏松,通透性增强,这对于细胞壁结构简单却很厚的革兰氏阳性菌来说,作用尤为明显,溶菌酶作用之后细胞破碎率要比溶菌酶处理前高,而且有利于谷氨酰胺合成酶的释放,从比活的提高可以得出这个结论。另外从实验中发现镁离子(Mg^{2+})的加入明显降低细胞的破碎和谷氨酰胺合成酶的释放,同时可以从该实验中找到一个最好的破碎时间为 12min,时间再长,谷氨酰胺合成酶被破坏失活,造成比活的降低。

2.3.2 溶菌酶的作用方式对酶活及蛋白释放的影响:菌悬液加入溶菌酶后,采用两种作用条件,即振荡(70r/min)和静止,温度皆为 37℃,1h,结果如表 4 所示。

表 4 溶菌酶的作用方式对酶活及蛋白释放的影响

作用条件	静止	振荡
酶活(u/ml)	1.607	0.987
蛋白质(mg/ml)	4.8	4.0

显然,从酶活及蛋白两方面来看,静止方式

要比振荡方式好的多。

2.3.3 不同浓度的溶菌酶及不同的保温时间对细胞破碎的作用:

结果见表 5 和表 6。

表 5 不同浓度的溶菌酶对细胞破碎的作用

溶菌酶浓度(mg/ml)	0.4	0.8	1.0	1.4	1.8	2.0
酶活(u/ml)	5.67	7.67	7.90	7.81	8.05	8.24
蛋白质(mg/ml)	7.5	8.2	8.0	7.5	8.1	7.7

表 6 不同的保温时间对细胞破碎的作用

保温时间(h)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
酶活(u/ml)	3.45	5.23	5.79	6.65	9.02	8.90
蛋白质(mg/ml)	6.8	8.1	8.2	8.5	9.5	9.66

根据以上实验结果,我们确定了细胞破碎的条件,即在细胞悬液中加入 0.8mg/ml 的溶菌酶,37℃ 保温 4~5h,超声波 120W 处理 12min。细胞破碎率可达 70%左右。

3 讨论

3.1 谷氨酰胺合成酶的活性有两种测定方法,即生物合成活性酶测定及酰胺基转移活性,前者通过测定反应过程中消耗 ATP 产生的无机磷酸的量间接表示;后者则是以谷氨酰胺和羟胺为底物,测定产生的 γ -谷氨酰羟肟酸数量,该反应是谷氨酰胺合成酶的特征反应。我们在进行酶的分离纯化中发现,粗酶液中还含有其它能水解 ATP 产生无机磷酸的酶,因此,在本文中只用谷氨酰基转移活性来表示酶活力。

3.2 在外源易利用氨基缺乏时,机体需经过谷氨酰胺合成酶途径同化氨基,所以谷氨酰胺合成酶有高水平合成和表达。当培养基中存在 NH_4^+ 时,即便是少量存在,机体也会直接利用这些 NH_4^+ ,谷氨酰胺合成酶的合成被阻遏。而在以谷氨酸钠为唯一氮源的培养基中有高水平的谷氨酰胺合成酶是由于缺乏易利用的氮源而产生的解阻遏。

3.3 谷氨酸棒杆菌破壁非常困难,难以用镜检来观察破壁的效果,因此用蛋白质及酶的释放来表示破壁的程度。

参 考 文 献

- [1] B Ytler. Ann Rev Biochem, 1978, 47: 1127~1162.
- [2] Lewis V Wray Jr., Susan H Fisher. Gene, 1988, 71:247~256.
- [3] 孟广震, 郝凤兮, 钱世钧. 微生物学报, 1986, 28: 238~241.
- [4] T Tachiki, S Wakisaka, H Kumagai, *et al.* Agric Biol Chem, 1981, 45(6): 1487~1492.
- [5] B M Spario, E. R. Stadtnan. Methods in Enzymology, 1970, 17(A): 910~922.
- [6] R. A. Bender, K A Janssen, A D Resnick, *et al.* J Bacteriol, 1977, 129(2): 1001~1009.
- [7] 北京大学生物系生化教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1979, 73.
- [8] C A Woolfolk, B Shapiro, E R Stadtman. Arch Biochem Biophys, 1966, 116: 177~192.

REGULATION OF NITROGEN SOURCES ON *CORYNEBACTERIUM CRENATUM* GLUTAMINE SYNTHETASE AND EFFECT OF LYSOZYME TREATMENT ON CELL DISRUPTION

Liu Yang Kong Degang Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The level of glutamine synthetase in *Corynebacterium crenatum* 6282 varied in response to the nitrogen sources in culture medium. It was much higher in glutamate-grown cells than in ammoniagrown cells. Ammonia can repress the formation of GS, and glutamate have the derepression effect. Cell disruption of *C. crenatum* 6282 became much easier when lysozyme, extracted from egg white, was added to the cell suspension. The suitable treatment conditions was: added 0.8mg / ml lysozyme, incubated at 37℃ for 4~5h, then disrupted in a sonicator for 12 min at 120W.

Key words *Corynebacterium crenatum*, Glutamine synthetase, Lysozyme