

海洋氢弧菌胞内糖原生理功能的研究

徐 岩*

石井正治 五十岚泰夫 儿玉徹

(无锡轻工业大学生物工程学院, 无锡 214036)

(东京大学农业及农业生命科学院生物技术系)

摘 要 在细胞高密度培养后的各种不同条件下,通过停止提供碳源和洗涤细胞培养法来观察专性化能自养海洋氢弧菌(*Hydrogenovibrio marinus*)胞内糖原和胞内葡萄糖碳酶活性变化发现:这株自养细菌胞内的糖原起能量储存的作用。最大的糖原降解为 76.5%,是发生在碳源和能源饥饿的有氧状态下。

关键词 海洋微生物,二氧化碳,糖原

中图分类号 Q939.9

自然界中的二氧化碳主要依靠自养生物来固定。还有一些光能和化能自养微生物。由于可以生长在范围很广的温度、pH、盐溶液的环境中,甚至海水之中,并具有很强的二氧化碳固定能力而格外引人注目,可能成为解决环境中二氧化碳问题的途径之一。另外,自养生物固定二氧化碳能够转化成有用的生物物质。因此,近年来对固定二氧化碳微生物,尤其是对氢细菌和蓝细菌的研究引人注目^[1]。

Hydrogenovibrio marinus 菌株 MH-110 是一株从海洋中分离到的专性化能自养的氢弧菌^[2]。它嗜温,嗜盐,属于革兰氏阴性菌。它利用氢气为能源,有效地固定二氧化碳而迅速生长,比生长速率为 0.5~0.6h⁻¹。30h 后,菌体最大生长量为 18.84mg(干重)/ml。并且,在碳源和氮源充足条件下,在进入静止期后,胞内积累糖原达 5.7g/l,占细胞干重达 30.26%^[3]。许多异养菌能够积累糖原并利用它,而专性自养菌中,据报道只有光能自养的蓝细菌可以积累糖原^[4]。对专性化能自养菌其糖原的生理作用及其代谢调控研究就更少。尽管 MH-110 不能利用胞外糖原,研究其胞内糖原的生理作用就变得十分有意义。

1 材料与方 法

1.1 菌种

Hydrogenovibrio marinus MH-110 由东京大学农学部微生物利用研究室从海水中分离。

1.2 培养基(g/l)

K₂HPO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.0, (NH₄)₂SO₄ 5.0, NaCl 29.3, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.01 FeSO₄ · 7H₂O 0.01, NiSO₄ · 7H₂O 0.0006, 微量元素混合液^[3]2ml, pH6.5

1.3 培养方法及条件

1.3.1 种子培养: 10ml 培养基在 100ml 具塞烧瓶中,用 H₂、O₂、CO₂ 以 7:1:1 的混合气体充气后,37℃ 条件下培养 24h 后,取 1ml 接入内装 50ml 培养基的烧瓶中,同样充 H₂、O₂、CO₂ 混合气体,37℃ 培养 12h。

1.3.2 2.0L 台式发酵罐培养: 2.0L 发酵罐(东京 Labotech 公司)内装 1.0L 培养液,10% 接种量,搅拌转速 1000r/min,用带热质流量计的台式气体混合器(Ueshima 公司)控制产生 H₂、O₂、CO₂ 混合气体,pH 用蠕动泵自动流加 NH₄OH 来控制。发酵装置见文献 [3]。

1.3.3 洗涤细胞培养: 在 800ml 培养液中,当菌体生长进入静止期,糖原量达到 2.5g/l 以后,离心收集并洗涤细菌菌体,重新悬浮在 400ml 的新鲜培养基中,用均质器将菌体均质后分别移入 4 个 500ml 的烧瓶,每瓶装 100ml 培养物。以上过程均在 4℃ 条件下操作。之后,充以不同的混合气体,37℃,120r/min 水浴振荡培养。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞生长的测定: 用浓度法在 540nm 下

进行测定。干细胞重量用公式计算^[3]。

1.4.2 溶氧的测定:用带探头的溶氧分析仪测定。

1.4.3 糖原的测定:收集细胞,在100℃条件下用2mol/L HCl水解6h后,12000r/min离心5min去除碎片,取上清液用玻璃纤维膜过滤去除一些细小的颗粒,再用2mol/L NaCl中和,加入等量磷酸缓冲液(pH7.0),最后用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量^[3]。

1.4.4 酶的纯化:细胞悬浮液用超声波细胞破碎仪处理1min后,离心除去细胞及碎片,用醋酸纤维素微孔膜(0.2μm)过滤上清液,再用Sephadex G-25(PD-10, Pharmacia)处理后得到用于蛋白质和酶活分析样品。

1.4.5 糖原磷酸酶活性测定^[5]:酶活定义为30℃条件下,20min释放出1μmol磷酸的酶量。

1.4.6 蛋白质分析:Bio-Rad方法^[5]。

2 结果

2.1 MH-110培养过程中细胞内糖原的产生和消失

培养18h菌体生长到对数期后期,在碳原充足的条件下,MH-110细胞内开始生成糖原

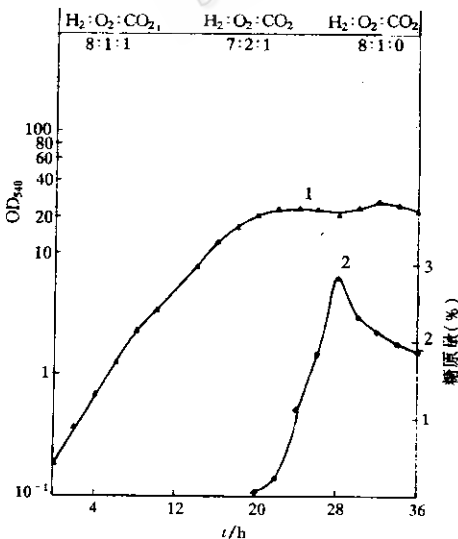


图1 在2.0L发酵罐中MH-110高密度培养和糖原积累和消失
1. OD, 2. 糖原含量

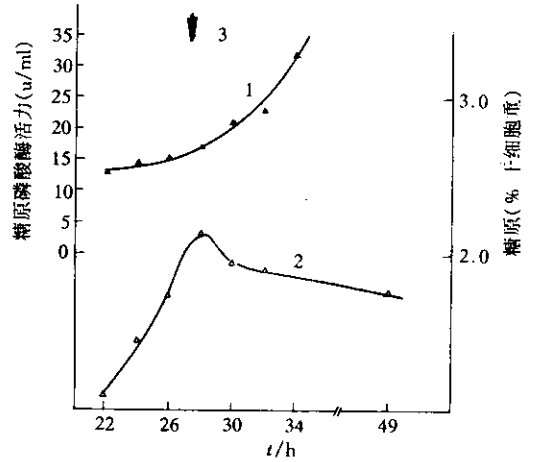


图2 培养过程中糖原和糖原磷酸酶活力的变化

1. 糖原磷酸酶活力, 2. 糖原含量,
3. 28h时停止CO₂供给

并增长迅速。培养28h,当糖原量增至2.8g/l时,停止提供二氧化碳,在氮源丰富并只有能源H₂的好氧呼吸条件下,从图1可见:糖原很快地消失,菌体又有所增长。随着糖原含量的降低,菌体密度又开始下降。说明该菌能够在没有碳源情况下利用自身的糖原来维持生长。

为了进一步证实这一结果,同时检测分解糖原的酶——糖原磷酸酶活性。图2是在停止提供二氧化碳前后胞内糖原磷酸酶活性变化状况。随着酶活性急剧上升,糖原快速降低,以后糖原消耗趋于平缓,糖原磷酸酶活性趋于降低。

2.2 不同生理条件中胞内糖原变化

为了消除代谢产物对菌体生理表现的影响,准确地了解胞内糖原生理作用。在一次培养后,用新鲜培养基对MH-110进行第二次培

表1 用于洗涤细胞培养的环境条件

条件	混合气体组成	环境条件说明
A	H ₂ :O ₂ :CO ₂ =7:2:1	能源和碳源限制条件
B	H ₂ :O ₂ :N ₂ =7:2:1	能源限制和CO ₂ 缺乏条件
C	N ₂ :O ₂ =8:2	能源和CO ₂ 缺乏条件(好氧)
D	N ₂	能源和CO ₂ 缺乏条件(厌氧)

养。具体是采用洗涤细胞培养法,通过改变氢气,氧气,二氧化碳的混合气体组成和比例来观察在二次培养过程中所形成的糖原的变化。表1为在二次培养中不同气体组成。由于是细胞高密度培养,环境条件A为能源与碳源限制条件。在环境条件B中用惰性氮气代替碳源二氧化碳,此环境称为能源限制,碳源缺乏条件。环境条件A和B都是在好氧条件中。在环境条件C和D中都是缺乏能源和碳源的环境,不同的是条件C是好氧培养,条件D是厌氧培养。

洗涤细胞培养胞内糖原代谢结果见表2。从图3、表2二次培养代谢结果来看:第一,在碳源和能源限制的环境A中,初期菌体生长缓慢,糖原分解速度也相对较慢。14h后,菌体量有所下降,26h时28.99%的糖原被消耗,说明可以利用胞内糖原来维持生长。第二,条件B下,菌体利用糖原生长较快,8h时的消耗量达到条件A中20h的量。26h后增至38.29mg/ml(干重)。在能源限制,碳源缺乏环境里,20h时43.48%的糖原被消耗。利用糖原要比碳源限制时快且多。第三,在没有碳源和能源的好氧环境中,糖原利用极快,8h时54%的糖原被消耗。26h时,76%糖原被消耗,是所有各种条件下最大的。菌体量几乎没有降低,表明碳源和能源缺乏时,积累的糖原可用来维持其生存。第四,由于没有氧气,好氧的MH-110在

表2 洗涤细胞培养胞内糖原利用情况

条件	培养时间(h)	消耗糖原量(%)
A	0	
	8	2.72
	14	9.00
	20	21.01
	26	28.99
B	0	
	8	21.01
	14	37.68
	20	43.48
	26	42.03
C	0	
	8	54.48
	14	64.22
	20	71.74
	26	76.67
D	0	
	8	16.53
	14	24.63
	20	36.63
	26	45.65

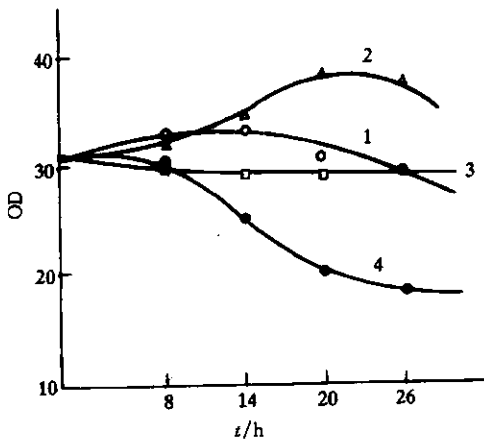


图3 洗涤细胞培养中菌体量的变化

1. 条件A, 2. 条件B, 3. 条件C, 4. 条件D

碳源和能源缺乏环境里无法存活,胞内糖原几乎无消耗,因此,菌体量也迅速下降。

Wilkinson^[6]提出:当外来能源的提供超过MH-110生长所需时,糖原可以积累;当外来能源的提供不足以维持细胞生长,MH-110可以用来支持生长所需的能源,并以可用来维持其生存。这株专性自养氢弧菌菌体内糖原的生理作用是起能量储存物质的作用。

3 讨论

(1) 在二次培养过程的研究中,除了用OD值的变化表示菌体生长外,在OD值增长时用电子显微镜观察到了细胞的分裂繁殖。这从另一方面证实了我们的结论。

(2) 分解糖原的糖原磷酸酶的活性随着糖原含量的降低而下降是否存在着某些物质的抑制调节,如Chen和Segel^[7,8]于1968年发现的在

大肠杆菌的糖原分解代谢中存在产物 ADP-磷酸对糖原磷酸酶的抑制作用,这还需要进一步研究。另外,关于分解糖原的酶也有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kodama T. Applied Environment Microbiology, 1991, 11: 131~138.
 [2] Nishihara H, Igarashi Y, Kodama T. Int J Syst Bacteriol, 1991, 43: 130~133.
 [3] Xu Y, Ishii M, Igarashi Y, Kodama T. J of Wuxi

- University of Light Industry, 1996, 1: 39~43.
 [4] Lehmann M, Wober G. Adv Biochem So Trans, 1975, 3: 1074~1076.
 [5] Stellwagen E. Methods in Enzymology, Academic Press, 1990, 182: 317~328.
 [6] Preiss J, Romeo T. Adv Microbiol, 1989, 30: 184~218.
 [7] Chen G S, Segel I H. Arch Biochem Biophys, 1968a, 164~174.
 [8] Chen G S, Segel I H. Arch Biochem Biophys, 1968b, 175~186.

PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF INTRACELLULAR GLYCOGEN IN A MARINE HYDROGEN-OXIDING BACTERIA

Xu Yan

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, China 214036)

Masahara Ishii Yasuo Igarashi Tohru Kodama

(Department of Biotechnology, Division of Agriculture and Agricultural Life Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan)

Abstract By suspending supply of carbon source during high cell density cultivation and washed-cell cultivation under various environment, the observations on intracellular glycogen and glycogen phosphorylase activity of *Hydrogenovibrio marinus*, a marine obligately chemolithotroph hydrogen-oxidizing bacteria, showed us its physiological function as energy resource. The maximum degradation of glycogen was 76.5% under an aerobic condition with energy and carbon dioxide starvation.

Key words Marine bacterium, Carbon dioxide, Glycogen