

文章编号:1009-038X(2004)03-0089-03

稀土元素对谷氨酸棒杆菌生长及酶活性的影响

宋 香, 王 燕, 段作营, 毛忠贵

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了单一稀土氯化亚铈(CeCl_3)对谷氨酸棒杆菌的生长及谷氨酸脱氢酶(GDH)和乳酸脱氢酶(LDH)酶活的影响. 结果表明:稀土元素在低剂量下能促进谷氨酸棒杆菌的生长;达到一定剂量会抑制菌体的生长;对酶活性的影响也是在低剂量下激活,在高剂量下抑制.

关键词: 稀土元素;氯化亚铈;谷氨酸棒杆菌;谷氨酸脱氢酶;乳酸脱氢酶

中图分类号:Q 55

文献标识码: A

The Effect of Rare Earth on the Growth and Enzymatic Activities of *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄

SONG Xiang, WANG Yan, DUAN Zuo-ying, MAO Zhong-gui

(The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to observe the biological effect of rare earth (RE) on *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄, the effects of single compound CeCl_3 on the growth of *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ and the enzymatic activities of glutamate dehydrogenase (GDH) and lactate dehydrogenase (LDH) were studied. The results showed that CeCl_3 accelerated the growth of *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ at low dosage range, but inhibited the growth when the dosage increased to certain content. The same effect was also observed for the enzymatic activities of GDH and LDH.

Key words: rare earth; CeCl_3 ; *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄; glutamate dehydrogenase; lactate dehydrogenase

我国稀土资源丰富,占世界贮量的 80% 左右^[1],随着稀土矿藏的开发,目前稀土应用领域已扩展到有色冶金、石油化工、轻工纺织和农林医药等各个行业. 稀土作为微肥正被大面积施用,稀土制品和稀土药物已进入人们的生活. 稀土农用是我国首创,我国于 1972 年开始稀土农用研究,1979 年起进行了大面积的稀土农用技术推广,现在应用越来越广泛,涉及粮食作物、蔬菜和畜牧业^[1,2]. 有关

稀土元素对动植物生长及其酶活的影响的研究较多,而有关微生物生长及其酶活的影响研究较少. 刘庆都等研究了镧对软腐细菌生长及胞外酶活性的影响^[3];王怡平等研究了稀土元素镧 La^{3+} 、铈 Ce^{3+} 和钕 Nd^{3+} 对红酵母的生长、类胡萝卜素合成及菌体氨基酸组成的影响^[4];陆维新等研究了稀土元素对嗜酸链霉菌的生物效应^[5];张传慧研究了硝酸稀土对酵母菌生长的影响^[6]. 有关稀土对谷氨酸

收稿日期:2003-07-16; 修回日期:2003-10-10.

作者简介:宋香(1978-),女,山东青岛人,发酵工程硕士研究生.

棒杆菌生长及其酶活性影响的研究尚未见报道.因此,作者选取稀土元素氯化亚铈,研究了其对谷氨酸棒杆菌生长及谷氨酸脱氢酶(GDH)、乳酸脱氢酶(LDH)酶活的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 谷氨酸棒杆菌 *S₉₁₁₄* (*Corynebacterium glutamicum S₉₁₁₄*).

1.1.2 稀土 单一稀土氯化亚铈,购于中国医药集团上海化学试剂公司.

1.1.3 培养基

1) 固体平板培养基:牛肉膏 1 g/dL,蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL,葡萄糖 1 g/dL,琼脂 2 g/dL, pH 7.0~7.2.

2) 液体培养基:牛肉膏 1 g/dL,蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL,葡萄糖 1 g/dL, pH 7.0~7.2.

1.2 实验方法

1.2.1 固体平板培养 使用牛肉膏蛋白胨培养基,加入一定量稀土贮备液,使其质量浓度为 5~400 mg/L,以不加稀土的培养基为对照,每个处理设 3 个重复.用活化斜面划线,32 °C 下培养 84 h.待单菌落直径长至约 0.5 mm 以上时,每隔 12 h 随机测量每块平板上的单菌落直径(20 个以上),计算出不同质量浓度下的平均值并进行比较.

1.2.2 液体培养 使用牛肉膏蛋白胨培养基,加入一定量稀土贮备液,使其质量浓度为 5~400 mg/L,以不加稀土的培养基为对照,每个处理设 3 个重复.将摇瓶培养 10 h 的种子液以 1% 的接种量接入 50 mL 的培养基中,32 °C, 200 r/min 摇瓶培养,间隔一定时间取样测定菌液的光密度值(OD_{620}).

1.2.3 GDH 和 LDH 酶活的测定

1) 粗酶液制备:使用牛肉膏蛋白胨培养基,加入一定量稀土贮备液,使其质量浓度分别为 10 mg/L 和 400 mg/L,以不加稀土的培养基为对照,每个处理设 3 个重复.将摇瓶培养 10 h 的种子液以 1% 的接种量接入 50 mL 的培养基中,于 32 °C, 200 r/min 摇瓶培养,间隔一定时间取样,5 500 g 离心 15 min,用 pH 7.5 的 0.25 mmol Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,超声波破碎 10 min,10 000 g 离心 15 min,得上清液为粗酶抽提液.

2) 谷氨酸脱氢酶活性测定:3 mL 测定液内含 13.3 mmol/L α -酮戊二酸, 15.0 mmol/L NH_4Cl , 1.67 mmol/L NADH(或 NADPH),以及

适量酶液,混合后在 37 °C 下进行反应,在 HITACHI U-3000 上用石英比色皿(光程为 1 cm)在 340 nm 测定反应开始 1 min 内的光吸收变化值.

酶活单位定义:每分钟反应 1 μ mol NAD(P)H 所需要的酶量,以 μ mol NAD(P)H /min 表示.

3) 乳酸脱氢酶活性的测定:3 mL 测定液内含 0.757 mol/L 的丙酮酸钠, 1.67 mmol/L NADH,以及适量酶液混合后在 37 °C 下进行反应,在 HITACHI U-3000 上用石英杯(光程为 1 cm)在 340 nm 处测定反应开始 1 min 内的光吸收变化值.

酶活单位定义:每分钟反应 1 μ mol NADH 所需要的酶量定义为 1 个酶单位.以 μ mol NADH /min 表示.

2 结果与讨论

2.1 稀土对谷氨酸棒杆菌生长的影响

2.1.1 固体培养基中稀土对谷氨酸棒杆菌生长的影响 使用牛肉膏蛋白胨培养基,加入一定量稀土贮备液,使其质量浓度分别为 5, 10, 50, 100, 200, 400 mg/L,以不加稀土的培养基为对照,每个处理设 3 个重复.用活化斜面划线,32 °C 下培养 84 h.待单菌落直径长至约 0.5 mm 以上时,每隔 12 h 随机测量每块平板上的单菌落直径(20 个以上),计算出不同质量浓度下的平均值并进行比较,结果见图 1.

结果表明,稀土质量浓度在 5~10 mg/L 时,明显地促进菌体生长;50~100 mg/L 左右对菌体生长的作用不明显;大于 200 mg/L 时明显抑制菌体生长,菌落初生时间延迟并且稀土质量浓度越高抑制作用越明显.

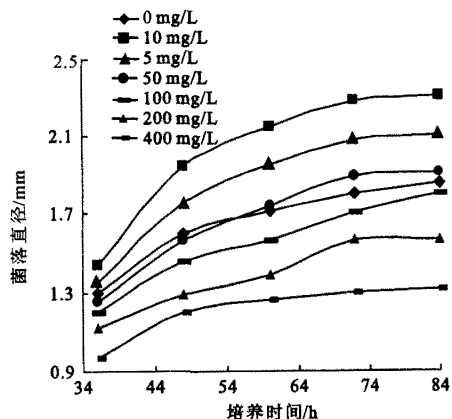


图1 固体培养基中稀土元素对谷氨酸棒杆菌生长的影响

Fig.1 Effect of RE on the growth of *Corynebacterium glutamicum S₉₁₁₄* in solid medium

2.1.2 液体培养基中稀土元素对谷氨酸棒杆菌生长的影响 使用牛肉膏蛋白胨培养基,加入一定量稀土贮备液,使其质量浓度为 5,10,50,100,200,400 mg/L,以不加稀土的培养基为对照,每个处理设 3 个重复.将摇瓶培养 10 h 的种子液以 1% 的接种量接入 50 mL 的培养基中,于 32 ℃,200 r/min 摇瓶培养,每隔一定时间取样,测定菌液的光密度值(OD_{620}),计算其平均值,结果见图 2.

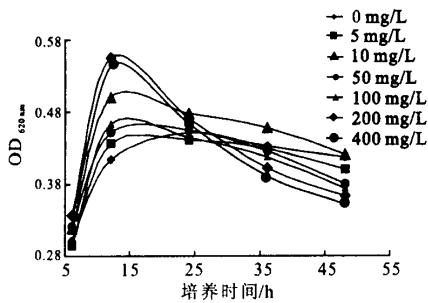


图 2 液体培养基中稀土元素对谷氨酸棒杆菌生长的影响
Fig. 2 Effect of RE on the growth of *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ in liquid culture

从图 2 可以看出,当菌体生长处于对数期以及前期时,不同稀土质量浓度有不同程度的激活作用.当菌体生长进入平衡期后,稀土质量浓度在 5~10 mg/L 时,菌体生长速度与对照基本一致.随着稀土质量浓度的增加,菌体生长速度明显地受抑制,平衡期逐步缩短.

2.2 稀土元素对 GDH 和 LDH 酶活性的影响

谷氨酸棒杆菌经稀土处理后,其谷氨酸脱氢酶、乳酸脱氢酶酶活性均有一定变化,结果见图 3~5.

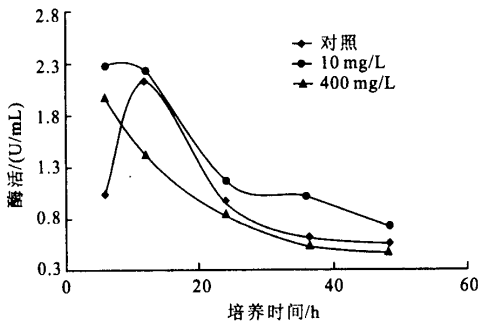


图 3 稀土元素对谷氨酸棒杆菌 GDH-NADPH 酶活性的影响
Fig. 3 Effect of RE on the enzyme activities of GDH-NADPH from *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄

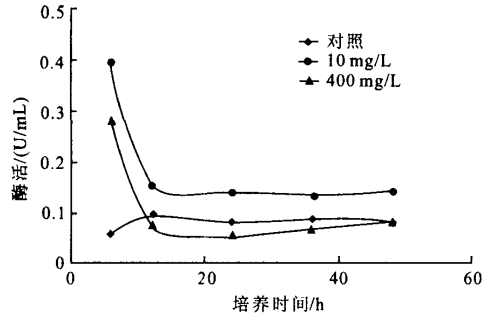


图 4 稀土元素对谷氨酸棒杆菌 GDH-NADH 酶活性的影响
Fig. 4 Effect of RE on the enzyme activities of GDH-NADH from *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄

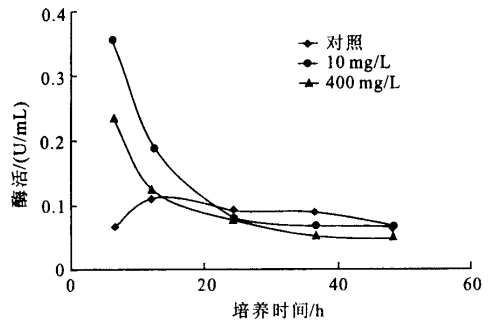


图 5 稀土元素对 LDH 酶活性的影响
Fig. 5 Effect of RE on the enzyme activities of LDH from *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄

在菌体对数生长期时,不同质量浓度的稀土元素对其依赖于 NADPH、NADH 的谷氨酸脱氢酶、乳酸脱氢酶的活力具有显著地激活作用.当菌体生长进入平衡期后,稀土质量浓度为 10 mg/L 时,对其依赖于 NADPH、NADH 的谷氨酸脱氢酶的活力有一定的促进作用,而对乳酸脱氢酶的活力有一定的抑制作用;稀土质量浓度为 400 mg/L 时,对其依赖于 NADPH、NADH 的谷氨酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的活力均有一定的抑制作用.

3 结 论

结果表明,低质量浓度稀土元素在生长前期对谷氨酸棒杆菌 S₉₁₁₄ 的生长有促进作用,对 3 种酶的活力也有促进作用.但随着质量浓度的提高和时间的延长,菌体的生长繁殖受到抑制,3 种酶的活力也受到抑制.

(下转第 110 页)

- [17] Bellmann A, Vrljic M, Patek M, *et al.* Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Microbiology**, 2001, 147: 1765—1774.
- [18] Simic P, Sahm H, Eggeling L. L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Bacteriol**, 2001, 183: 5317—5324.
- [19] Tauch A, Hermann T, Burkovski A, *et al.* Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene[J]. **Arch Microbiol**, 1998, 169: 303—312.
- [20] Eggeling L, Morbach S, Sahm H. The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Biotechnol**, 1997, 56: 167—182.
- [21] Wehrmann A, Morakkabati S, Kramer R, *et al.* Functional analysis of sequences adjacent to *adpE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes the aromatic amino acid transporter[J]. **J Bacteriol**, 1995, 177: 5991—5993.
- [22] Ikeda M, Katsumata M. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Biosci Biotechnol biochem**, 1995, 59: 1600—1602.
- [23] Kruse D, Six S, Kramer R, *et al.* Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production strains[J]. **Biotechnol Lett**, 2001, 23: 401—404.
- [24] Broer S, Eggeling L, Kramer R. Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion system[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1991, 59: 316—321.
- [25] Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, *et al.* The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux[J]. **FEBS Lett**, 1999, 452: 228—232.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 91 页)

参考文献:

- [1] 纪云晶, 栗建林. 我国稀土某些生物学效应的研究概况[J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14(3): 23—28.
- [2] 石锡林, 杨普, 李逸秋, 等. 稀土对茶树不同部位叶片中酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(6): 794—795.
- [3] 刘庆都, 章健, 承河元. 镧对软腐细菌生长及胞外酶活性的影响[J]. 中国稀土学报, 1998, 16(3): 262—266.
- [4] 王怡平, 肖亚中, 丁毅, 等. 稀土元素对红酵母的生长及类胡萝卜素合成的影响[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2): 117—119.
- [5] 陆维新, 靳庆生, 王晓东. 稀土元素对嗜酸链霉菌的生物效应初探[J]. 河北省科学院学报, 1992, (1): 53—56.
- [6] 张传慧, 谢惠安, 孙家美. 硝酸稀土对酵母菌生长的影响[J]. 稀土, 1990, (2): 57—58.

(责任编辑:李春丽)