

谷氨酸生产菌 S_{9114} 中的谷氨酸脱氢酶的研究

王 燕^{1,2} 宋 香¹ 杨平平¹ 段作营¹ 毛忠贵^{1*}

¹(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

²(山东轻工业学院 食品工程系,济南 250100)

摘 要 谷氨酸脱氢酶(GDH)是谷氨酸生物合成的关键酶,谷氨酸棒杆菌 S_{9114} 是目前我国味精工业应用最广泛的生产菌种,其谷氨酸脱氢酶的研究尚未见报道。分离纯化该菌中的谷氨酸脱氢酶,研究其辅酶组成,对揭示谷氨酸脱氢酶的分子结构和性质,提高谷氨酸产率很有必要。将培养至对数期中期的细胞离心收集并用含适量 DTT、EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)洗涤,用 French pressure cell press 破碎,离心去除菌体碎片得无细胞抽提液。然后使用 ÄKTA-100 快速纯化系统经 DEAE-纤维素柱、疏水柱(HIC)、G-200 凝胶过滤柱层析得到纯化大约 70 倍的以 NADPH 为辅酶的 GDH 和部分纯化的以 NADH 为辅酶的 GDH。这两个酶分别对 NADPH、NADH 高度专一,不能相互代替。经 HPLC 和 SDS-PAGE 测得前一种酶的分子量和亚基分子量分别为 188kD 和 32kD,表明该酶为具有相同亚基的六聚体。酶活性测定使用 HITACHI U-3000 分光光度计利用 NAD(P)H 在 340nm 氧化的初速度进行。蛋白质含量测定利用 Bradford 方法进行,并以牛血清白蛋白为标准蛋白。纯化结果表明 S_{9114} 中确实存在两种 GDH,其中以 NADH 为辅酶的 GDH 尚未见报道。和某些具有两种 GDH 的微生物一样, S_{9114} 可能也是以 NADPH 为辅酶的 GDH 参与谷氨酸的合成代谢,以 NADH 为辅酶的 GDH 参与谷氨酸的分解代谢。同时发现以 NADPH 为辅酶的 GDH 在 280nm 吸收很弱,在 215nm 吸收很强。说明此酶中酪氨酸、苯丙氨酸含量较低。

关键词 谷氨酸脱氢酶,提纯,谷氨酸棒杆菌, NADH, NADPH

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0725-05

谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)是一种依赖辅酶的脱氢酶,它分为 NADH 依赖型(EC. 1.4.1.2)、NAD(P)H 依赖型(EC. 1.4.1.3)和 NADPH 依赖型(EC. 1.4.1.4)。它广泛存在于动物、植物和微生物中,在氮代谢中具有重要作用。近年来已有不同来源的 GDH 得到纯化和研究,并已证明 GDH 主要以六聚体和四聚体两种形式存在,大多数 GDH 为六聚体。但采用谷氨酸生产菌对该酶进行类似研究的报道较少。

谷氨酸发酵是利用微生物体内的谷氨酸脱氢酶将 α -酮戊二酸转变为谷氨酸。在谷氨酸生产菌中,谷氨酸脱氢酶是谷氨酸合成的关键酶。近年来,不同谷氨酸生产菌中依赖于 NADPH 的 GDH 已被发现,并对其性质做了一定的研究。张克旭、黄程芳、苏正定等对谷氨酸生产菌种(谷氨酸短杆菌、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) T₆₋₁₃、AS1.299 等粗酶液中依赖于 NADPH 的 GDH 的性质进行了研究,陆卫平等对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glu-*

tamicum) FM84-415 中依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶进行了分离纯化和性质的研究,Shiio 等对黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC14067 中依赖于 NADPH 的 GDH 进行了部分纯化和性质的研究。本文研究的谷氨酸生产菌种 S_{9114} 是目前我国味精工业应用最广泛的生产菌种,其谷氨酸脱氢酶的研究尚未见报道。对该菌中谷氨酸脱氢酶进行分离纯化及其特性研究,将为揭示该酶与其它来源的 GDH 之间是否存在差异,研究其催化机理、空间结构、谷氨酸合成调节机制、提高谷氨酸产酸率、降低成本和建立合理规范的工艺提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种为谷氨酸生产菌 S_{9114} , DEAE-纤维素层析柱、疏水柱、凝胶过滤层析柱分别为瑞典安发玛西亚公司的 HiPrepTM 16/10 DEAE、HiPrep 16/10 phenyl (high sub) 和 HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade,牛

血清白蛋白购自上海华美试剂公司,SDS-PAGE 低分子量标准蛋白从上海西巴斯生物技术开发有限公司购得。NADPH、NADH 购于 Sigma 公司,其余试剂为国产生化试剂或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养方法：

保藏斜面培养(g/100mL):牛肉膏 1 % ,蛋白胨 1 % ,NaCl 0.5 % ,pH 7.0 ~ 7.2 ,32 ℃ 培养 36 h。

活化斜面培养(g/100mL):牛肉膏 1 % ,蛋白胨 1 % ,NaCl 0.5 % ,葡萄糖 1 % ,pH 7.0 ~ 7.2 培养条件同上。

液体培养培养基(g/100mL):葡萄糖 $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ 2.5 , K_2HPO_4 0.15 , $MgSO_4$ 0.06 , $FeSO_4$ 0.0005 , $MnSO_4$ 0.0005 ,玉米浆 2.5 ,尿素 0.25(单独灭菌加入) ,pH 7.0 ~ 7.2。0.1 MPa 灭菌 20 min、接种 32℃ 摇瓶振荡培养 10 ~ 12 h 后作种子接种于德国板浪 C10-3 全自动发酵罐培养 8 ~ 10 h。

1.2.2 酶活力测定 :3mL 测定液内含 1.33×10^{-2} mol/L α -酮戊二酸 , 0.15×10^{-1} mol/L NH_4Cl , 1.67×10^{-3} mol/L NAD(P)H ,及适量酶液混合后不同温度下进行反应 ,在 HITACHI U-3000 紫外分光光度计上用石英比色皿(光程为 1cm)在 340 nm 测定反应开始 1min 内的光吸收变化值。NAD(P)H 的微摩尔消光系数以 6.22 计。酶单位定义 :一个单位是指每分钟产生 1 微摩尔 NAD(P)H 变化所需的酶量 ,以 NAD(P)H μ mol/min 表示。

1.2.3 蛋白质含量的测定 :粗酶液按 Bradford 方法测定 ,分离过程中的酶液按紫外吸收法测定 ,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 酶的分离纯化 :谷氨酸棒杆菌 S_{9114} 中谷氨酸脱氢酶为胞内酶 ,菌体培养后收集菌体。所有纯化步骤都在室温下进行并加入 0.02%(W/W)叠氮化钠以防杂菌污染。纯化设备使用瑞典安发玛西亚 ÄKTA explorer 100 快速纯化工艺开拓系统。

粗提液的制备 :取培养至对数期的菌液 ,1 800

r/min 离心 10min 去除沉淀 ,再经 8 000 r/min 离心 10min ,收集菌体。用 pH 7.5、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(内含适量 DTT ,EDTA 等)于 4 ℃洗涤菌体 2 次后 ,置 - 70 ℃冰箱保存备用。菌悬液(约 60 mg 菌体蛋白/mL)置冰浴 ,用 French pressure cell press 18 000 Pa 处理 2 次。处理液在 4℃ 经 10000 r/min 离心 20 min ,上清液即为粗酶液。

GDH 的分离纯化 :将无细胞粗提液经 DEAE-纤维素阴离子交换柱层析、疏水柱层析(Hydrophobic Interaction Chromatography ,简称 HIC)、凝胶过滤柱层析 ,得到纯化的 GDH。用凝胶浓度 8 % 的 PAGE 对上述酶液进行纯度鉴定。

1.2.5 酶的性质分析方法：

分子量的测定 :GDH-NADPH 利用 HPLC 方法进行分子量测定 ,色谱条件为 :色谱柱 :TSK-3000 ,流动相 :10 mmol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液 ,柱温 30 ℃ ;流速 0.5 mL/min ;进样量 20 μ L。

亚基分子量的测定 :纯酶的分子量用凝胶浓度 12 % 的 SDS-PAGE 在 110 V 电压下电泳测定 ,以低分子量标准蛋白为对照。

2 结果与讨论

2.1 粗酶的辅酶专一性

用粗酶液催化谷氨酸生物合成的正反应 , α -酮戊二酸、 NH_4^+ 、辅酶都存在时才发生反应 ,该酶不仅依赖于 NADPH 为辅酶 ,而且能依赖于 NADH 为辅酶。以 NADPH 为辅酶测得酶活为 11.14 u/mL ;以 NADH 为辅酶测得酶活为 2.72 u/mL。

经 DEAE-纤维素层析柱分离纯化 ,分步收集 ,紫外在线检测酶蛋白分离图谱见图 1。用 NADH 和 NADPH 作辅酶分别测定各收集管的酶活 ,结果在收集管 2、3 号管测得以 NADH 为专一性辅酶的 GDH ,在 20 ~ 26 号管测得酶活为以 NADPH 为专一性辅酶的 GDH ,酶活结果见表 1 ,将酶活结果作图见图 2。

表 1 DEAE 洗脱液中 GDH 的酶活分布
Table 1 GDH activities in DEAE-cellulose eluents

Tube number	2	3	20	21	22	23	24	25	26
GDH-NADH(u/mL)	0.712	1.163	-	-	-	-	-	-	-
GDH-NADPH(u/mL)	-	-	0.909	1.939	2.819	2.934	1.690	0.822	0.3125

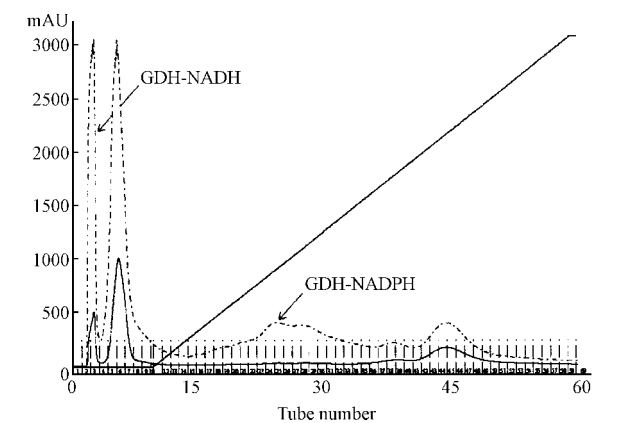


图 1 GDH 经 DEAE-纤维素柱的洗脱图

Fig.1 Elution pattern of GDH from DEAE-cellulose column
——280nm ; - - - - -215nm

图 1 可以看出依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶在 280 nm 吸收很弱,而在 215 nm 吸收很强,这说明该酶的氨基酸组成中芳香族氨基酸(苯丙氨酸和酪氨酸)含量较低。由图 2、表 1 可知,谷氨酸生产菌 *S₉₁₁₄* 具有两种 GDH,一种以 NADH 为专一性辅酶,另一种以 NADPH 为专一性辅酶。目前文献报道的谷氨酸生产菌中只含有一种以 NADPH 为辅酶的 GDH^[3-6]。但有研究发现在其它微生物中也有存在两种 GDH 的情况,两种 GDH 可能存在两种代谢途径,以 NADPH 为辅酶的 GDH 参与谷氨酸的生物合成,而以 NADH 为辅酶的 GDH 参与谷氨酸的分解代谢^[1,2]。谷氨酸生产菌 *S₉₁₁₄* 细胞内存在两种 GDH,其中也可能存在上述两种代谢途径。

2.2 依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶的进一步分离纯化

将 DEAE 洗脱液 20 ~ 26 号管合并,用 PEG 20 000 浓缩至 5mL 左右,上样于事先平衡的疏水柱分离纯化,分布收集,紫外在线检测酶蛋白分离图谱。结果在收集管 37 ~ 43 号管测得酶活,将酶活结

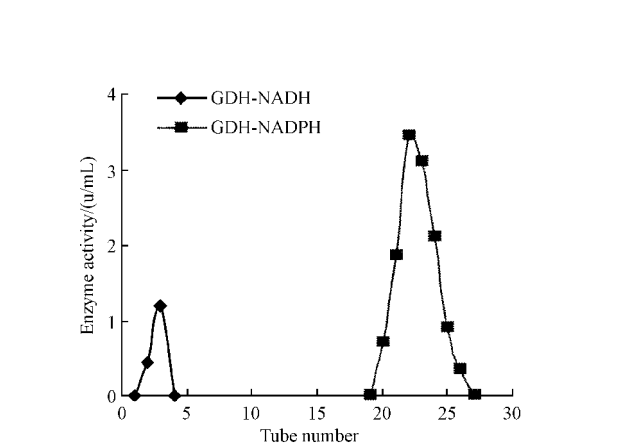


图 2 GDH 经 DEAE-纤维素柱洗脱对应酶活图

Fig.2 GDH activities of eluent from DEAE-cellulose column
—◆— GDH-NADH ; —■— GDH-NADPH

果作图得图 3。随后将疏水柱 HIC 洗脱液收集管 37 ~ 43 号合并,合并液经透析并浓缩至 2mL 左右,上样于事先平衡的凝胶过滤层析柱 G-200 分离,分布收集,紫外在线检测酶蛋白分离图谱。在收集管 12 ~ 17 号管测得酶活,将酶活结果作图得图 4。将 12 ~ 16 号管合并超滤得超滤液。各步纯化结果见表 1。

将 DEAE-纤维素柱洗脱液、HIC 柱洗脱液 Superdax G-200 凝胶柱洗脱液并以粗酶为对照,进行 PAGE 结果表明经上述分离步骤该酶基本上达到了电泳纯。

2.4 依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶的分子量和亚基分子量

经 HPLC 测定该酶分子量并收集蛋白峰测定洗脱液酶活确定分子量为 188kD,见图 5,用 SDS-PAGE 凝胶电泳测得酶的亚基分子量为 32kD,见图 6。据此可以断定该酶由 6 个相似的亚基构成,属六聚体。这与文献报道的 GDH 主要以六聚体和四聚体两种形式存在,具有相同亚基的结果一致^[3]。

表 1 GDH-NADPH 的纯化

Table 1 Purification of GDH-NADPH from <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>S₉₁₁₄</i>					
Step	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity (u/mg)	Purification (fold)	Recovery / %
Cell-free extract	253.4	880	3.47	1	100
DEAE-cellulose	18.8	483	25.71	7.41	54.9
HIC	1.7	225	129.33	37.27	25.6
G-200	0.45	112.5	248.16	71.52	12.8

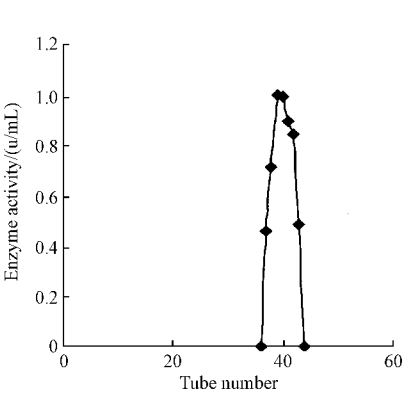


图 3 GDH 经疏水柱洗脱对应酶活图
Fig.3 GDH activities of eluent from HIC column

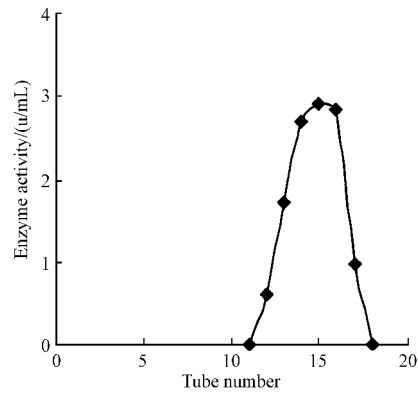


图 4 GDH 经 G-200 凝胶柱洗脱对应酶活图
Fig.4 GDH activities of eluent from G-200 column

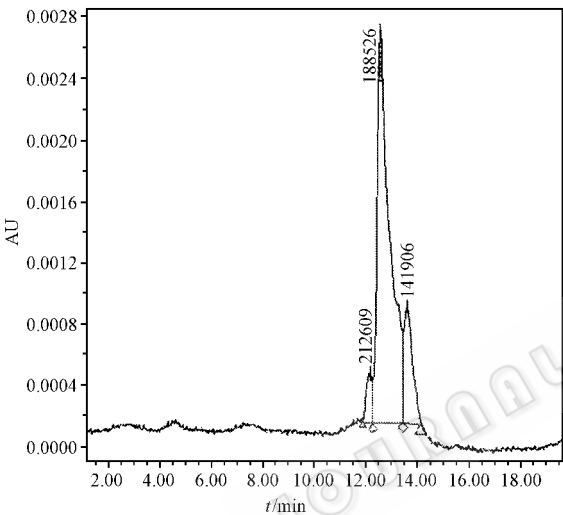


图 5 GDH-NADPH 的 HPLC 分离图谱
Fig.5 HPLC analysis of eluted GDH-NADPH from TSK-3000

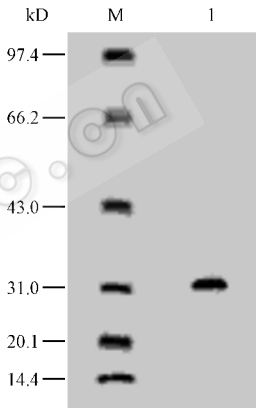


图 6 SDS-PAGE 电泳图 (M.SDS-PAGE 低分子量标准蛋白 ;1.纯化的 GDH-NADPH)
Fig.6 SDS-PAGE of purified GDH-NADPH (M.Low molecular weight standard ;1.Purified GDH-NADPH)

2.5 依赖于 NADPH 的谷氨酸脱氢酶的辅酶专一性

在纯化的 GDH 酶液催化的反应中 ,NADPH 不能用 NADH 代替 ,可见该酶对 NADPH 具有高度的专一性。

以 NADH 为辅酶的 GDH 的分离纯化及其性质正在研究中。

REFERENCES(参考文献)

[1] WEN Z Z , Morrison M. The NAD(P)H-Dependent glutamate dehydrogenase activities of *Prevotella ruminicola* B14 can be attributed to one enzyme(GdhA) , and gdhA expression is regulated in response to the nitrogen source available for growth. *Applied and Environmental Microbiology* , 1996 , 62 3826 – 3833

[2] SHEN T (沈同) , WANG J Y (王镜岩). *Biochemistry (Second Half)*. Beijing : High Education Press. 1991 , pp.220 – 221

[3] DING S H (丁诗华) , YANG Z H (杨志荣) , TANG Y X (唐亚雄)

et al. Purification , identification and some properties of glutamate dehydrogenase from *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* . *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学和分子生物学报) ,1999 , 15 (6) 968 – 973

[4] ZHANG K X (张克旭) , LIU Y S (刘永生). Studies on glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium Tianjinense* T₆₋₁₃. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 1991 , 31 (4) 281 – 286

[5] HUANG C H (黄程芳) , ZHAO Z J (赵宗健) , CHENG Y H (程玉华). Studies on glutamate dehydrogenase in glutamate-produced bacteria AS₁₂₉₉ . *J of Jilin Univ (Natural Science)* (吉林大学学报) , 1984 , 4 :103 – 106

[6] SU Z D (苏正定) , GUO Y (郭勇) , PENG Z Y (彭志英). The study of glutamate dehydrogenase from glutamate-produced bacteria T₆₋₁₃ . *J of South China Univ of Technol (Natural Science)* (华南理工大学学报) , 1991 , 19 (4) 83 – 85

[7] LU W H (陆卫平) , ZHANG J (张剑) , WANG H (王浩). Purification and characterization of glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium Tianjinense* T₆₋₁₃ . *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 1991 , 11 (4) 383 – 388

© 中国科学微生物研究所编辑出版 (Natural science) (复旦大学学报) .cn

1988 **27**(4) 395 – 401

[8] Marshake D R ,Kadonaga J K ,Burgess R R *et al.* Translated by ZHU H (朱厚础) *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual . Beijing : Science Press . 1999 , pp.20 – 39

[9] Adachi K ,Suzuki I. Purification and properties of glutamate synthase from *Thiobacillus thioparus* . *J Bacteriol* , 1977 , **129**(3) : 1173 – 1182

[10] Misono H ,Goto N ,Nagasaki S. Purification , crystallization and properties of NADP⁺ -specific glutamate dehydrogenase from *Actobacillus fermentum* . *Agric Biol Chem* , 1985 , **49**(1) : 117 – 123

[11] Bellion E ,Tan F. NADP-depedent glutamate dehydrogenase from a facultative methylotroph , *Pseudomonas* sp. Strain AM1 . *J Bacteriol* , 1984 , **157**(2) : 435 ~ 439

[12] Shiio I ,Ozaki H. Regulation of nicotinamide dinucleotide phophate-specific glutamate dehydrogenase from *Brebacterium flavum* , a glutamate-producing bacterium . *J Biochem* , 1970 , **68** 633 – 647

[13] Britton K I ,Baker P J ,Rice D W *et al.* Structrural relationships between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenaes . *Eur J Biochem* , 1992 , **209** 851 – 859

Purification and Characterization of Glutamate Dehydrogenase
from *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄

WANG Yan^{1 2} SONG Xiang¹ YANG Ping-Ping¹ DUAN Zuo-Ying¹ MAO Zhong-Gui^{1 *}

¹(School of Biotechnology , Southern Yangtze University ; the Key Laboratory of Industry Biotechnology , Ministry of Education , Wuxi 214036 , China)

²(Department of Food Engineering , the Light-industry Institute of Shandong , Jinan 250100 ,China)

Abstract Glutamate dehydrogenase (GDH) is a key enzyme in the biosynthesis of glutamate . The GDHs from *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ , the most commonly used strain in glutamate fermentation , were purified and their molecular structures and properties characterized . The coenzymes were also studied in the hope to increase glutamate production . Cells were harvested at mid-exponential phase by centrifugation and washed with Tris-HCl buffer containing DTT and EDTA (pH 7.5). The cells were then disrupted using a French pressure cell press and the supernatant was collected by centrifugation . The extract was concentrated by 70-fold using the AKTA-100 FPLC system employing a DEAE-cellulose ion exchange column , a hydrophobic interaction chromatography (HIC) and Sephadex G-200 gel filtration . The purified extracts contained NADPH-dependent GDH and NADH-dependent GDH . Both of the enzymes were highly specific for the coenzymes . The molecular masses of the NADPH-dependent GDH and its subunit were 188kD and 32kD respectively , suggesting the enzyme is a homo-hexamer . Our data reported for the first time the presence of NADH- dependent GDH in *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ , similar to other microorganisms containing both GDHs . The NADPH-dependent and NADH-dependent GDH in *Corynebacterium glutamicum* S₉₁₁₄ may participate in the assimilation and dissimilation of ammonia respectively . The absorptions of NADPH-dependent GDH was very weak at 280nm but very high at 215nm , suggesting a low phenylalanine and tyrosine content in the enzyme .

Key words Glutamate dehydrogenase (GDH) , *Corynebacterium glutamicum* , enzyme purification , NADPH , NADH

Received : 05-14-2003

* Corresponding author . Tel 86-510-5802870 ; Fax 86-510-5802870 ; E-mail :maozg@vip.163.com

《生物工程学报》加入“ 万方数据——数字化期刊群 ”的声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化 ,推进科技信息交流的网络化进程 ,我刊现已入网“ 万方数据——数字化期刊群 ” ,所以 ,向本刊投稿并录用的稿件文章 ,将一律由编辑部统一纳入“ 万方数据——数字化期刊群 ” ,进入因特网提供信息服务 .有不同意者 ,请事先声明 . 本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬 ,不再另付 .

本刊全文内容按照统一格式制作 ,读者可上网查询浏览 ,并订阅本刊 . (Http ://swgxcb.periodicals.com.cn)

《生物工程学报》编辑部