

氢氧化细菌胞内糖原的生成和作用

徐 岩

儿玉澈

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036) (东京大学农学部, 日本)

摘要 *Hydrogenovibrio marinus* 胞内糖原随其细胞的高密度培养而积累。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二次培养法, 观察海洋专性能自养氢氧化细菌胞内糖原和胞内葡萄糖磷酸酶的活性变化, 发现这株自养细菌胞内的糖原起能量储存物质的作用。最大的糖原降解发生在碳源和能源饥饿的有氧状态下, 降解量为 76.5%。

关键词 糖原; 二氧化碳; 海洋微生物

中图分类号 Q939.9

0 前 言

随着全球经济的发展, 大气中二氧化碳的积累日益加剧, 这不仅影响到自然界碳源和能源的平衡, 而且破坏了人类生存环境。自然界中的二氧化碳主要依靠自养生物 (autotrophs) 来固定。其中有高级的光能自养生物, 如植物、绿藻和褐藻, 还有一些光能和化能自养微生物。后者由于可以生长在较广的温度、pH 范围和盐溶液的环境中, 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, 可能对解决环境中的二氧化碳问题有所作为。另外, 自养生物固定二氧化碳能够转化成有用的生物物质, 如各种农林业产品和微生物细胞、各种细胞物质等等。因此, 近年来对固定二氧化碳微生物, 尤其是对氢细菌和蓝藻细菌的研究, 吸引了许多研究者的兴趣^[1]。

Hydrogenovibrio marinus 菌株 MH-110 是一株从海洋中分离到的专性能自养的氢氧化细菌^[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地生长, 比生长速率为 $0.5 \sim 0.6 \text{ h}^{-1}$ 。30h 培养后, 菌体最大生长量 (干) 为 18.84 mg/ml 。并且, 在碳源和氮源充足的条件下, 从对数后期开始, 在进入静止期后, 胞内积累糖原达 5.7 g/L , 占细胞干重的 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藻细菌可以积累糖原^[4]。对专性能自养菌糖原的生理作用及其代谢调控的研究较少。尽管 MH-110 不能利用胞外糖原, 但研究其胞内糖原的生理作用十分有意义。

1 材料与方法

1.1 菌种

Hydrogenovibrio marinus M H-110 东京大学农学部微生物利用研究室提供

1.2 培养基 (g/L)

K_2HPO_4 2.0; $KHPO_4$ 4.0; $(NH)_2SO_4$ 5.0; NaCl 29.3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2; $CaCl_2$ 0.01; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01; $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0006; 微量元素混合液^[3] 2 ml/L, pH 6.5

1.3 培养方法及条件

1.3.1 种子培养 10 ml培养基在 100 ml具塞烧瓶中,用 H_2 , O_2 , CO_2 以 7:1:1混合充气后,于 37℃条件下培养 24 h. 取 1 ml接入内装 50 ml培养基的烧瓶中,同样充 H_2 , O_2 , CO_2 混合气体并于 37℃培养 12 h.

1.3.2 2.0 L台式发酵罐培养 2.0 L发酵罐(东京 Labotech公司)内装 1.0 L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 H_2 , O_2 , CO_2 混合气体,pH值用蠕动泵自动流加 $(NH)_2O$ 来控制. 发酵装置见[3]

1.3.3 洗涤细胞培养 当菌体生长进入静止期,糖原量达到 2.5 g/L以后,离心收集,洗涤从 800 ml培养液中得到的细胞菌体,重新悬浮在 400 ml的新鲜培养基中,用均质器将菌体均质后分别移入 4个 500 ml的烧瓶,每瓶装盛 100 ml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℃ 120 r/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 540 nm下进行测定. 干细胞质量用一个验证过的公式来计算,即 $OD_{540} = 0.471 \text{ mg/ml}$.

1.4.2 溶液氧的测定 用带探头的溶液氧分析仪测定

1.4.3 糖原的测定 收集细胞,在 100℃条件下用 2 mol HCl水解 6 h后,12000 r/min离心 5 min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 2 mol NaCl中和,加入等量磷酸溶液(pH 7.0),最后用 GOD(葡萄糖氧化酶法) Kit测定葡萄糖含量.

1.4.4 酶的纯化 细胞悬浮液用超声波细胞破碎仪(Branson Sonifier Cell Disruptor 2000)处理 1 min后,离心除去细胞及碎片,用醋酸纤维素微孔膜(0.2 μm)过滤上清液,再用 Sephadex G-25(PD-10 Pharmacia)处理后得到用于分析蛋白质和酶活的样品.

1.4.5 糖原磷酸酶活性测定^[5] 一个酶活单位定义为 30℃条件下,20 min释放出 1 μmol 磷酸的酶量.

1.4.6 蛋白质分析 Bio-Rad方法^[5].

2 实验结果

2.1 MH-110培养过程中细胞内糖原的产生和消失

在培养 18 h菌体生长到对数后期,在碳源充足的条件下,MH-110细胞内开始生成糖原并增长迅速. 培养 28 h(图 2箭头处),当糖原量增至 2.8 g/L时,停止提供碳源 CO_2 ,在氮源丰富并只有能源 H_2 的好氧呼吸条件下,从图 1中可见: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. 说明这株化能自养菌能够在没有碳源情况

下利用自身的糖原维持生长。

为了进一步证实这一结果,同时检测分解糖原的酶——糖原磷酸酶的活性。图 2是在停止提供 CO₂ 前后胞内糖原磷酸酶活性的变化状况 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,糖原磷酸酶活性趋降。

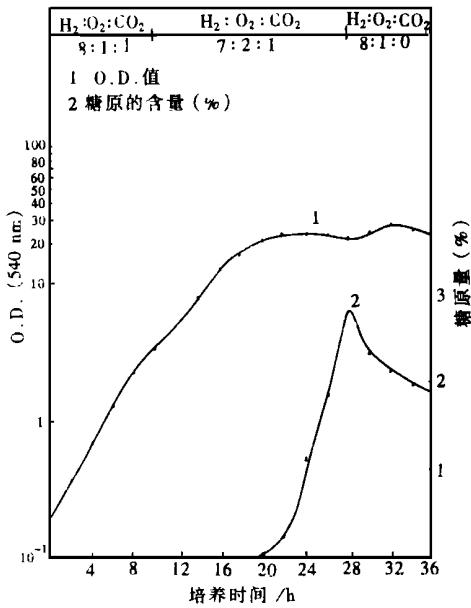


图 1 在 2.0 L 发酵罐内 MH-110 高密度培养中的糖原积累与消失

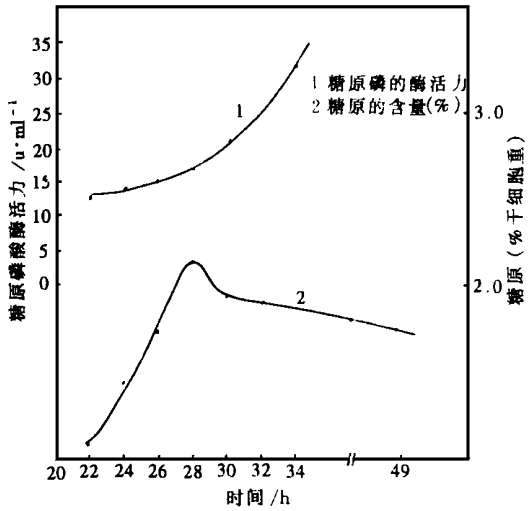


图 2 培养过程中糖原和糖原磷酸酶活力的变化情况
箭头处表示 28 h 时停止 CO₂ 的供给

2.2 不同生理条件中胞内糖原的变化

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的生理作用。在一次培养后,用新鲜培养基对 MH-110 进行第二次培养(简称二次培养)。采用洗涤细胞培养法,通过改变 H₂, O₂, CO₂ 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 是在二次培养中的不同气体组成。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 中用惰性的 N₂ 代替 CO₂,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。条件 C 和 D 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。

表 1 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, 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)

洗涤细胞培养胞内糖原代谢结果见表 2

从图 3,图 4 和表 2 二次培养代谢结果可知:

1) 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 14 h 后,菌体量有所下降,26 h 时 28.99% 的糖原被消耗,说明它可以利用胞内糖原来维持生长。

2) 条件 B 下,菌体较快地利用糖原生长,8 h 时的消耗量达到条件 A 中 20 h 的量。26

h后干重增至 38.29 mg/ml。在能源限制,碳源缺乏环境里,20 h时 43.48% 的糖原被消耗。利用的糖原要比碳源限制时快且多。

表 2 洗涤细胞培养胞内糖原利用情况

条件	培养时间 /h	消耗掉糖原的量(%)	条件	培养时间 /h	消耗掉糖原的量(%)
A	0		C	0	
	8	2.72		8	54.48
	14	9.00		14	64.22
	20	21.01		20	71.74
	26	28.99		26	76.67
B	0		D	0	
	8	21.01		8	16.53
	14	87.68		8	24.53
	20	43.48		20	36.63
	26	42.03		26	45.65

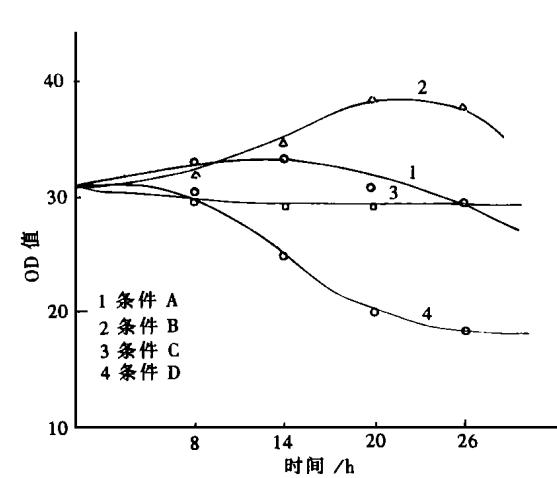


图 3 洗涤细胞培养中菌体量的变化

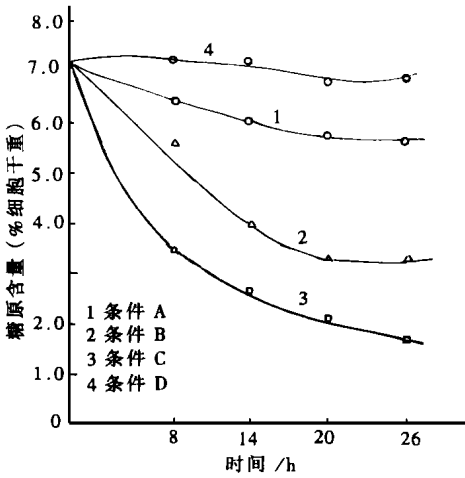


图 4 MH-110在洗涤细胞培养中胞内糖原量的比较

3) 在没有碳源和能源的好氧环境中,糖原利用极快,8 h时 54% 的糖原被消耗。26 h时,76% 的糖原消耗量是所有各种条件下最大的。菌体几乎没有降低,表明碳源和能源缺乏时,积累的糖原可用来维持其生存。

4) 由于没有氧气,好氧的 MH-110在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。

按 Wilkinson提出的胞内作为能量储存物质的条件^[6],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的生长,MH-110可以用糖原来支持生长所需的能源,并可用来维持其生存。这株专性自养氢

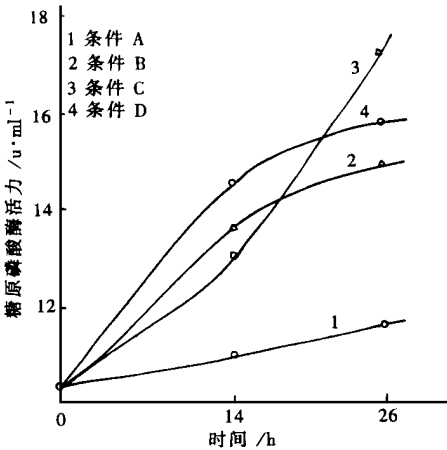


图 5 洗涤细胞培养中糖原磷酸酶活力的变化

氧化菌的体内糖原生理作用是起能量储存物质的作为。图 5 中表明了 4 种条件下糖原磷酸

酶活性的变化情况

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作者的结论

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^[4,7]于 1968 年发现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(13): 1~ 8
- 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. Sci. Trans. 1975, 3: 1074~ 1076
- 5 Stettin 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. 1968, 164~ 186

On Occurrence and Role of Intracellular Glycogen in an Hydrogen Oxidizing Hydrogenovibrio Marinus

Xu Yan

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

Tohru Kodama

(The University of Tokyo, Japan)

Abstract The intracellular glycogen of a marine hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus* was accumulated with its high cell density cultivation. By the way of suspending supply of carbon source during high cell density cultivation and washed-cell cultivation under different environmental conditions, the investigation on intracellular glycogen and glycogen phosphorylase activity of a marine hydrogen-oxidizing bacterial MH-110 shows its physiological function as energy resource. The maximum degradation of glycogen was 76.3% under an aerobic condition with energy and carbon dioxide starvation.

Key-words glycogen; carbon dioxide; marine bacterium

(责任编辑: 秦和平)