

文章编号: 1674-7054(2015)01-0053-06

产碱假单胞菌产精氨酸脱亚胺酶的发酵条件优化

操凤¹, 刘雪冰¹, 曹献英²

(1. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 食品学院, 海南 海口 570228)

摘要: 对产碱假单胞菌产精氨酸脱亚胺酶的发酵条件进行了优化, 结果表明, 产碱假单胞菌产 ADI 的最佳发酵条件为: 10 g·L⁻¹蔗糖为碳源, 6 g·L⁻¹蛋白胨为氮源, 10 g·L⁻¹精氨酸诱导物, 4%的接种量和 30%的装液量, 发酵温度 29 °C, 发酵时间 24 h, 摇床转速为 150 r·min⁻¹, 发酵液的初始 pH8.5。在此条件下, 产碱假单胞菌产 ADI 的酶活最高。

关键词: 产碱假单胞菌; 精氨酸脱亚胺酶; 发酵; 酶活

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

精氨酸是人体非必需氨基酸, 精氨酸剥夺在动物模型和临床试验中已表现出抑制肿瘤细胞生长、抑制血管生成等作用^[1]。精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI)不可逆地将精氨酸转化为瓜氨酸和氨^[2-5], 是微生物精氨酸降解的第 1 步^[3, 5], 该酶拥有 Cys-His-Asp 结构单元的活性位点^[2, 5], 在高等真核生物中还未发现此酶^[3]。近年来, ADI 在抗肿瘤药物研究方面得到了广泛关注, 研究表明, ADI 可选择性抑制肝癌及黑色素瘤等精氨酸缺陷型肿瘤^[6-9], 同时可抑制白血病细胞的生长^[8-9], 含精氨酸和不含精氨酸的淀粉样肽均可抑制 ADI, 因此, ADI 是老年痴呆病因和发病机制的研究指标^[10], 还有报道认为, ADI 可抑制血管生成, 因此, 有望成为治疗乳腺癌的药物^[11]。同时, 精氨酸的降解产物瓜氨酸能广泛应用于医药、食品、保健^[12]等各个方面, 具有良好的药理作用。目前, 主要采用克隆支原体来源的 ADI 并表达于大肠杆菌来生产 ADI^[13-14], 但支原体是一种病原微生物, 存在安全性隐患。探索其他来源的精氨酸脱亚胺酶, 能提高其安全性。已有研究者利用粪肠球菌^[15-16]、铜绿假单胞菌^[17]、乳酸乳球菌^[18]和恶臭假单胞菌^[19]等发酵提取 ADI, 但成本高, 工艺不成熟^[19-20], 因此, 发酵条件的优化成了人们不断探索的课题。笔者从南海船舶铁锈中分离、鉴定出产 ADI 的产碱假单胞菌, 同时对其发酵条件进行了优化, 旨在为利用产碱假单胞菌生产 ADI 及其进一步利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基 产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)由海南大学细胞工程与基因分析实验室选育保藏。初始发酵培养基: 酵母膏 2 g·L⁻¹, 蛋白胨 2 g·L⁻¹, 葡萄糖 10 g·L⁻¹, NH₄Cl 1.5 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹, MnSO₄·H₂O 0.1 g·L⁻¹, NaCl 0.02 g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.005 g·L⁻¹, L-精氨酸 10 g·L⁻¹, pH7.0。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备 量取 20 mL 的初始发酵培养基加入 100 mL 的摇瓶中, 然后挑取一环活化菌种置于摇瓶中, 30 °C 恒温摇床(150 r·min⁻¹)培养 24 h, 作为种子液。

1.2.2 初始碳源及碳源质量浓度对 ADI 酶活的影响 取 8 支 100 mL 的洁净摇瓶备用, 基础培养基均

收稿日期: 2014-12-12

基金项目: 海南省教育厅项目(CXY20140012)

作者简介: 操凤(1986-), 女, 海南大学材料与化工学院 2011 级硕士研究生. E-mail: study_cf1986@163.com

通信作者: 曹献英(1962-), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事食品安全评价及天然活性物质抗肿瘤的研究. E-mail: cxying_02@163.com

为: 酵母膏 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。其中4支分别加入 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、蔗糖、山梨醇、果糖4种碳源, 接种量2%, 装液量20 mL, 于30℃下振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。选择酶活最高的碳源作为发酵用碳源, 分别加入一定量最佳碳源于另4支摇瓶, 使其质量浓度为5、10、15、20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种量2%, 装液量20 mL, 于30℃振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。

1.2.3 初始氮源及氮源质量浓度对ADI酶活的影响 取8支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。其中4支分别加入4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酵母膏、尿素、蛋白胨和牛肉膏4种氮源, 接种量2%, 装液量20 mL, 于30℃下振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。选择酶活最高的氮源作为发酵用氮源, 分别加入一定量最佳氮源于另4支摇瓶, 使其终质量浓度为2、4、6、8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种量2%, 装液量20 mL, 于30℃下振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。

1.2.4 诱导物精氨酸质量浓度对ADI酶活的影响 取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0; 分别向4支摇瓶中加入适量L-精氨酸, 使其终质量浓度为2.5、5、10、15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种量2%, 装液量20 mL, 于30℃下振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。

1.2.5 接种量和装液量对ADI酶活的影响 取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。接种量分别为1%、2%、4%、8%, 装液量20 mL, 于30℃振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。另取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。接种量为最佳接种量, 装液量分别为10、20、30、40 mL, 于30℃下振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。

1.2.6 发酵温度和起始pH对ADI酶活的影响 取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0。接种量4%, 装液量30 mL, 分别于25、29、33、37℃振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。另取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接种量4%, 装液量均为30 mL, 培养基pH分别为6.5、7.5、8.5、9.5, 于最佳培养温度振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h, 检测酶活。

1.2.7 发酵时间和摇床转速对ADI酶活的影响 取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.5。接种量4%, 装液量均为30 mL, 分别于29℃振荡培养($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 12、24、36、48 h, 检测酶活。另取4支100 mL的洁净摇瓶备用, 基础培养基均为: 蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, L-精氨酸 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.5。接种量4%, 装液量30 mL, 摇床转速分别为100、150、200、250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 于29℃下培养24 h, 检测酶活。

1.2.8 酶活测定 反应液的获取: 取2 mL发酵液, 于7 780 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 弃上清, 洗涤菌体, 加入2 mL的1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液, 混匀菌体, 37℃培养箱放置10 min, 7 780 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 弃上清 加入 2 mL 底物 置 37 °C 培养箱反应 梯度稀释一定倍数后检测。

酶活测定方法: 在试管内加入于 1.5 mL 的 Fe^{3+} 混酸溶液、0.25 mL 的二乙酰一肟 - 硫氨酸、1 mL 的反应液 沸水浴 10 min 冷却至室温后 在 OD_{530} 下测定吸光度 并按下列公式计算酶活(每个优化均由此法测定酶活)。

$$\text{酶活} = \frac{\text{瓜氨酸浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{反应液体积}}{\text{瓜氨酸分子量} \times \text{转化时间} \times \text{发酵液体积}}$$

式中 酶活单位为 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 瓜氨酸浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 反应液体积单位为 mL; 转化时间单位为 min; 发酵液体积单位为 mL。

1.2.9 统计分析 实验数据酶活用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计软件 通过成对样本 t 检验分析各组条件对 ADI 酶活的影响。检验水准 $\alpha = 0.05$ 所有实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 初始碳源及碳源质量浓度对 ADI 酶活的影响 从图 1A 可知 以葡萄糖、蔗糖、山梨醇、果糖为碳源的 ADI 的酶活分别为 0.08、1.49、0.15、0.09 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蔗糖是最好的碳源。从图 1B 可知 当蔗糖的质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 发酵液中 ADI 的酶活最高 为 $1.59 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。差异性分析表明 当蔗糖的质量浓度小于或大于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 发酵液中的 ADI 酶活均小于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的酶活 差异显著。因此 蔗糖的适宜质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

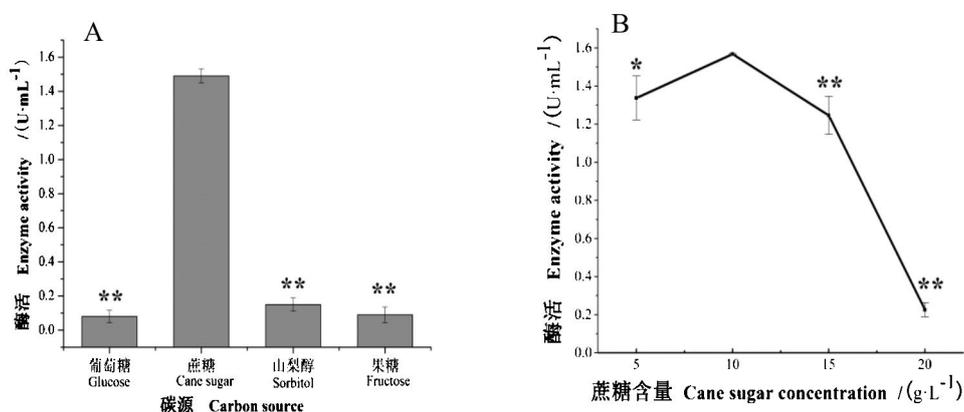


图 1 初始碳源及碳源质量浓度对 ADI 酶活的影响

与酶活最高组相比, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Effect of initial carbon source concentration on ADI activity

Compared with the initial carbon source with the highest ADI activity, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, similarly hereinafter

2.2 初始氮源及氮源质量浓度对 ADI 酶活的影响 从图 2A 可知 分别用蛋白胨和牛肉膏为氮源时 ADI 的酶活分别为 $1.48 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.52 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用酵母膏和尿素作为氮源时 ADI 的酶活只有 $0.15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.03 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 明显低于前两者。差异性分析结果表明 分别以蛋白胨和牛肉膏为氮源时 ADI 的酶活无明显差异 但蛋白胨的价格低于牛肉膏 因此 选择蛋白胨为氮源更经济。从图 2B 可知 当蛋白胨的质量浓度为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ADI 的酶活为 $1.71 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分别明显高于 2.4 、 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的酶活。因此 以 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白胨作为产碱假单胞菌的发酵氮源较好。

2.3 诱导物精氨酸质量浓度对 ADI 酶活的影响 从图 3 可知 当精氨酸质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ADI 的酶活为 $1.13 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分别明显高于 2.5 、 5 、 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的 ADI 酶活。因此 诱导物精氨酸的最佳质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 接种量和装液量对 ADI 酶活的影响 从图 4A 可知 接种量为 4% 时 ADI 的酶活最高 为 $1.49 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。从图 4B 可知 装液量为 $10 \sim 30 \text{ mL}$ 时(摇瓶体积为 100 mL) ADI 的酶活越来越高 但超过 30 mL 后 酶活开始降低。因此 最佳的装液量为 30 mL (30%)。

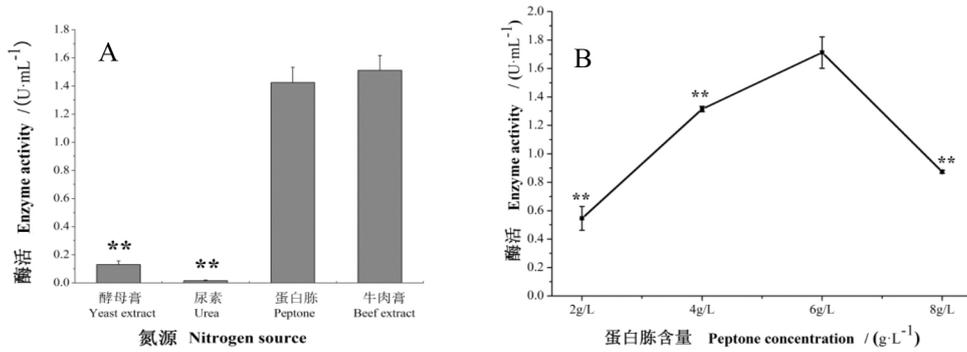


图2 初始氮源及蛋白胨质量浓度对 ADI 酶活的影响

Fig. 2 Effect of initial nitrogen source concentration on ADI activity

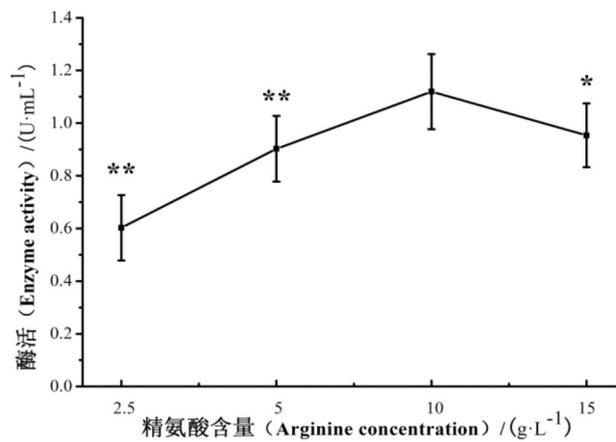


图3 精氨酸质量浓度对 ADI 酶活的影响

Fig. 3 Effect of arginine concentration on activity of ADI

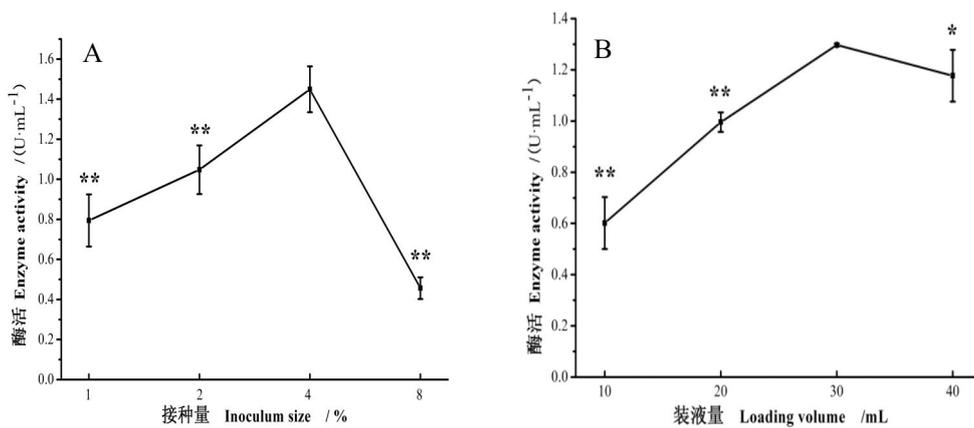


图4 接种量和装液量对 ADI 酶活的影响

Fig. 4 Effect of inoculum size and medium volume in flask on activity of ADI

2.5 发酵温度和起始 pH 对 ADI 酶活的影响 从图 5A 可知,发酵温度为 29 °C 时,酶活最高,低于 29 °C 酶活较低,温度高于 29 °C 酶活明显下降,因此,最佳的发酵温度为 29 °C。从图 5B 可知,当 pH8.5 时,ADI 的酶活最高(1.15 U·mL⁻¹)。

2.6 发酵时间和摇床转速对 ADI 酶活的影响 从图 6A 可知,在培养前期 ADI 的酶活上升,24 h 产酶量最高,为 1.35 U·mL⁻¹,24 h 后酶活开始下降,因此,最佳培养时间为 24 h。从图 6B 可知,转速为 150 r·min⁻¹ 时,ADI 的酶活达到最高,为 1.49 U·mL⁻¹;超过 150 r·min⁻¹ 时,ADI 的酶活下降较快,因此,确定

150 r · min⁻¹ 为最佳转速。

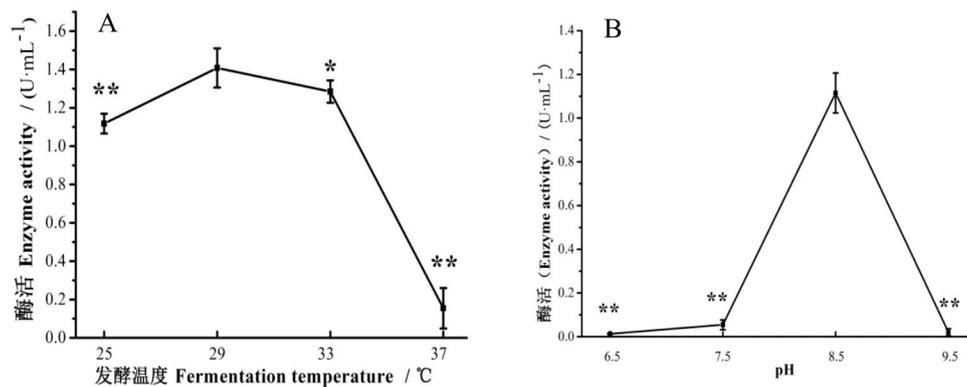


图 5 发酵温度和起始 pH 对 ADI 酶活的影响

Fig. 5 Effect of fermentation temperature and initial pH on activity of ADI

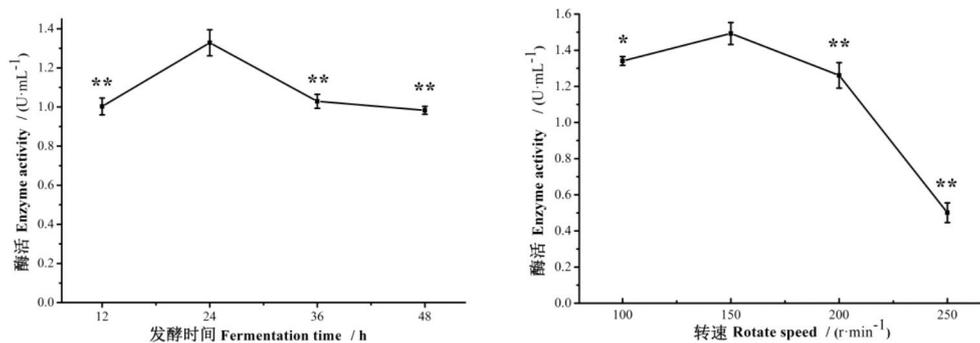


图 6 发酵时间和摇床转速对 ADI 酶活的影响

Fig. 6 Effect of fermentation time and shaker rotation speed on activity of ADI.

3 讨 论

以蔗糖为碳源时 ADI 的酶活最高,这可能因为葡萄糖、山梨醇、果糖中含有抑制 ADI 活性的成分,或是蔗糖中含有促进 ADI 活性的成分,也可能是因为假单胞菌中 3 种碳代谢抑制调控系统起的作用^[21],其作用机理还有待进一步探究。以蛋白胨或牛肉膏为氮源时 ADI 酶活较高,这可能与假单胞菌中 CbrA 与 CbrB 二元调控系统有关,该系统是与碳源和氮源利用有关的全局调控因子^[22]。许多分解代谢酶类属于诱导酶,加入诱导物前,菌体生长正常,但不产生所需的酶类,而加入诱导物后酶的表达才会开始,一般来说,酶的作用底物就是该酶表达的诱导物。

接种量会影响细菌的生长繁殖速度以及发酵周期,而酶的活力与细菌生长速度和发酵周期又是密切相关的^[23],实验结果表明,接种量为 4% 时,ADI 酶活最高,说明此时菌体生长繁殖达到最理想状态。装液量直接影响摇瓶中发酵液中的溶氧量,摇瓶体积为 100 mL,装液量为 30 mL 时 ADI 酶活最高,可能是因为此时的溶氧最佳。多数细菌的最适生长温度为 25 ~ 37 °C,但菌体生长的最适温度往往不是发酵的最适温度。笔者发现,温度低于 29 °C,酶活较低,可能由于温度低,菌体生长缓慢,造成产酶量下降;温度高于 29 °C,酶活明显下降,这可能是由于温度过高,菌体易衰老或部分失活,影响了酶的合成。发酵液的酸碱度不但改变基质代谢速率,甚至改变代谢途径和细胞结构,pH 8.5 时的酶活最高,可能是因为此时的酸碱度对基质代谢速率等的影响最小或是没有影响。

参考文献:

[1] WANG M, BASU A, PALM T, et al. Engineering an arginine catabolizing bioconjugate: Biochemical and pharmacological

- characterization of PEGylated derivatives of arginine deiminase from *Mycoplasma arthritis* [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17 (6): 1447 – 1459.
- [2] LU X F, LI L, WUR, et al. Kinetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* arginine deiminase mutants and alternate substrates provides insight into structural determinants of function [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(4): 1162 – 1172.
- [3] GALKIN A, KULAKOVA L, SARIKAYA E, et al. Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an anti-bacterial and parasite drug target [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (14): 14001 – 14008.
- [4] OUDJAMA Y, TRICOT C, STALON V, et al. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* L-arginine deiminase [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, 58(12): 2150 – 2152.
- [5] LU XF, GALKIN A, HERZBERG O, et al. Arginine deiminase uses an active-site cysteine in nucleophilic catalysis of L-arginine hydrolysis [J]. *JACS*, 2004, 126(17): 5374 – 5375.
- [6] DING HJ, LIU H, YIN Y, et al. Insights into the modulation of optimum pH by a single histidine residue in arginine deiminase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biol. Chem* 2012, 393(9): 1013 – 1024.
- [7] NI Y, LIU YM, SCHWANEBERG U, et al. Rapid evolution of arginine deiminase for improved anti-tumor activity [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(1): 193 – 201.
- [8] ZHU LL, VERMA R, ROCCATANO D, et al. A potential antitumor drug (arginine deiminase) reengineered for efficient operation under physiological conditions [J]. *Chembiochem*, 2010, 11(16): 2294 – 2301.
- [9] ZHU LL, TEE KL, ROCCATANO D, et al. Directed evolution of an antitumor drug (arginine deiminase PpAD I) for increased activity at physiological pH [J]. *Chembiochem*, 2010, 11(5): 691 – 697.
- [10] LOUW C, GORDON A, JOHNSTON N, et al. Arginine deiminases: therapeutic tools in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J. Enzyme Inhib Med Chem*, 2007, 22(1): 121 – 126.
- [11] ENSOR CM, HOLTSBERG FW, BOMALASKI JS, et al. Pegylated Arginine Deiminase (ADI-SS PEG20 000 mw) Inhibits Human Melanomas and Hepatocellular Carcinomas *In Vitro* and *In Vivo* [J]. *Cancer research*, 2002, 62: 5443 – 5450.
- [12] 李静. 氨基酸保健品最新应用进展初探 [J]. *天津科技* 2010, 37(1): 72 – 73.
- [13] Beloussow Karin, Li Wang, Jun Wu, et al. Recombinant arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent [J]. *Cancer Letters*, 2002, 183(2): 155 – 162.
- [14] 谭玲玲, 黄亮, 陈博. 重组精氨酸脱亚胺酶的表达纯化及其抗癌活性 [J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2010, 46(2): 60 – 65.
- [15] BURNE RA, PARSONS DT, MARQUIS RE. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the genes of the arginine deiminase system of *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 [J]. *Infect Immun*, 1989, 57(11): 3540 – 3543.
- [16] 李成付, 李凯, 李加友, 等. 粪肠球菌精氨酸脱亚胺酶酶学性质研究 [J]. *微生物学通报* 2008, 35(6): 846 – 850.
- [17] OUDJAMA Y, TRICOT C, STALON V, et al. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* L-arginine deiminase [J]. *Acta Cryst*, 2002(58): 2150 – 2152.
- [18] KIM JE, JEONG DW, LEE HJ. Expression, purification, and characterization of arginine deiminase from *Lactococcus lactis* ATCC 7962 in *Escherichia coli* BL21 [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007(53): 9 – 15.
- [19] 张媛媛, 刘晓蓉, 周爱芳. 恶臭假单胞菌产精氨酸脱亚胺酶发酵条件及特性的研究 [J]. *中国酿造*, 2011, 232(7): 54 – 56.
- [20] 李加友, 曹瑜, 钱绍松, 等. 精氨酸脱亚胺酶发酵条件研究 [J]. *化学反应工程与工艺* 2006, 22(1): 43 – 47.
- [21] 谷伟, 战崙华, 邓志平, 等. 假单胞菌中影响碳代谢的三种途径及其调控机制 [J]. *生物技术进展* 2014, 4(2): 96 – 101.
- [22] 代淑贤, 韩云蕾, 燕永亮, 等. 假单胞菌中 CbrA-CbrB 二元调控系统的研究进展 [J]. *生物技术进展* 2012, 2(2): 98 – 103.
- [23] 钱铭镛. 发酵工程最优化控制 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998: 156.

Isolation and Identification of Cassava Bacterial Blight Pathogen

REN Xiwang¹, LIANG Liwen¹, WANG Heming¹, LIAO Hualan¹, LIN Daozhe¹,
LI Xiuqiong¹, CHEN Yinhu^{1 2}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Cassava bacterial blight (CBB) is a destructive disease of cassava (*Manihot esculenta*) and is caused by *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* Xam. This disease had invoked a serious damage to cassava industry in other countries. The pathogen of the CBB was isolated from the infected leaves collected from cassava varieties SC8 and SC5 in Qiongzong County, Hainan, and then purified for morphological observation, pathogenicity assay and biochemical assay. This pathogen was also identified by using 16S rDNA gene sequence analysis. The results showed that the isolated pathogen was *Xanthomonas axonopodis*.

Key words: cassava; bacterial blight; pathogen identification; *Xanthomonas axonopodis*

(上接第 58 页)

Optimization of Fermentation Conditions for Production of Arginine Deiminase from *Pseudomonas alcaligenes*

CAO Feng¹, LIU Xuebing¹, CAO Xianying²

(1. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China

2. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: *Pseudomonas alcaligenes* was cultured on various media to optimize fermentation conditions to produce arginine deiminase (ADI). The fermentation conditions for *P. alcaligenes* to produce ADI were found optimum when $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose was used as the carbon source, $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ peptone as the optimal nitrogen source, $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ arginine as the inducer, inoculation amount was 4%, liquid volume was 30 mL per 100 mL, incubation temperature was $29\text{ }^{\circ}\text{C}$, initial pH was 8.5, shaker rotation speed was $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and fermentation time was 24 h. Under these fermentation conditions the arginine deiminase produced from *P. alcaligenes* had the highest activities.

Key words: *Pseudomonas alcaligenes*; arginine deiminase; fermentation; activity