

产肌氨酸氧化酶菌株的分离及发酵条件研究^{*}

赵更峰 马晓航^{**} 贾小明 王园园

(浙江大学生命科学院 杭州 310029)

摘 要 在本研究工作中分别从 42℃ 的恒化富集培养物和 30℃ 的分批富集培养物中分离到 4 株产肌氨酸氧化酶(SOX)的节杆菌。对所产 SOX 的特性分析表明,从 42℃ 恒化培养物中分离得到的菌株 42-1 所产的酶比分批培养法分离得到菌株的酶具有高的热稳定性和低的 K_m 值。对菌株 42-1 产酶发酵条件的研究表明,SOX 可以被诱导物如肌氨酸、肌酸、肌酐和氯化胆碱诱导产生。在发酵过程中适当减少通气量对 SOX 的产生有显著的促进作用。葡萄糖等容易利用的碳源的存在对 SOX 的合成不产生降解代谢产物抑制作用,而尿素的存在则对 SOX 的生成有强的抑制作用。因而菌株 42-1 分解肌酸的主要作用是为细胞提供生长所需的氮源。

关键词 肌氨酸氧化酶 降解代谢产物抑制 节杆菌

中图分类号:Q554 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)02-0235-06

在临床测定中,血清中的肌酐浓度是一项判断肾功能的重要指标。目前肌酐的测定一般是用 Jaffe 法进行测定的。由于该方法是基于化学反应基础上的,因此特异性差,血清中许多化学物质都能干扰测定结果,给疾病的正确诊断造成了困难。

由于酶促的催化反应比一般化学反应具有更高的专一性,因而近年来人们寄希望于研究开发出酶促肌酐的测定方法^[1,2]。在酶法肌酐测定中,肌酐在一系列的酶促催化过程中生成肌氨酸,所生成的肌氨酸可以在肌氨酸氧化酶(SOX)的作用下分解成甘氨酸、甲醛和 H_2O_2 。之后既可以用甲醛脱氢酶测定甲醛的方法,也可以用过氧化物酶测定 H_2O_2 的方法确定样品中肌酐的浓度。因此 SOX 是测定的关键酶之一^[3]。

在本研究工作中我们分离到了 4 株产 SOX 的细菌,并对其中一株 42-1 菌株,研究了影响其产酶的主要因素。

1 材料和方法

1.1 产 SOX 菌株的分离及培养条件

1.1.1 富集培养基 肌酸 10g,酵母膏 2.2g,磷酸二氢钾 0.5g,磷酸氢二钾 2.0g,硫酸镁 0.1g,三氯化铁 0.005g,加水定容到 1L, pH 7.0。

1.1.2 恒化器富集分离 采集本校区周围土样 15 份,合并后,取 10g 接种于 100mL 产酶

^{*} 浙江省科技厅资助项目(001110233-01)

^{**} 通讯作者。E-mail: mxiaohong@zjuem.zju.edu.cn

作者简介 赵更峰(1975-)女,河南南阳人,浙江大学在读硕士研究生,研究方向为应用微生物学。

收稿日期 2002-06-24,修回日期 2002-11-04

微生物富集培养基中于 42℃ 进行振荡培养 ,每天测定肌酸降解情况 ,待肌酸完全降解后 ,取出培养液上清 10mL ,接种于一小型恒化培养器(恒化器容积为 50mL)中 ,恒化器温度控制为 42℃。用蠕动泵连续加入新鲜的富集培养基进行恒化培养。开始时每天加样量为 50mL ,并测定恒化器中肌酸浓度 ,当肌酸浓度趋近于零时 ,逐步加大流量至每天 200mL 左右。在此条件继续培养 7d 后取样进行划线分离。

1.1.3 分批培养富集 :富集培养基同上 ,但采用常规的分批培养方法 ,培养温度为 30℃。

1.2 SOX 的测定 :

将待测的菌体细胞用超声波进行破壁 ,离心后取上清酶液 0.1mL 加入到 0.9mL ,含有 0.01mol/L 肌氨酸的焦磷酸钠缓冲液(pH8.0 ,0.1mol/L)中 ,于 37℃ 反应 10min 后加入 0.25mL ,1.0mol/L 的醋酸终止反应 ,并加入 1.5mL 含有 0.04% 乙酰丙酮的 20% 乙酸铵溶液 ,于 37℃ 保温 40min 后在 410nm 处测定 OD 值 ,酶活的定义为 37℃ 每分钟分解 1 μ mol 肌氨酸的酶量为一个酶活单位。

2 结果和分析

2.1 产 SOX 菌株的分离

通过富集培养 ,在恒化器富集物中分离到一株产 SOX 的菌株 42-1。在 10 个分批富集培养物中分离到 3 株产 SOX 的菌株 I、S、C。对这 4 株菌的生理生化和形态学特性及 16S rRNA 分析表明 ,这 4 株菌都属于节杆菌属。之后对所产生酶的特性分析发现 ,42-1 菌株所产生的 SOX 有较高的热稳定性 ,而用分批培养法分离到的 3 株菌所产生的 SOX 只能在 25℃ 以下保持稳定 ,且其酶对肌氨酸的 K_m 值也比 42-1 菌株的高(见表 1)。因而在以后的研究工作中选择 42-1 菌株作进一步的研究。

表 1 不同富集方法对分离菌株产 SOX 性能的影响

Table 1 The effect of enrichment methods on the properties of SOX from isolated strains

Strain	Enrichment method	SOX Thermal stability/℃	K_m (mmol/L)
42-1	42℃ chemostatic culture	35	2.7
C	30℃ batch culture	25	11.5
S	30℃ batch culture	25	14.0
I	30℃ batch culture	25	7.3

2.2 菌株 42-1 的培养条件

虽然菌株 42-1 是在 42℃ 分离得到的 ,但实验表明(未列出) ,该菌株在 30℃ 培养时表现较高的 SOX 酶活性。故以下试验的培养温度选择为 30℃ ,转速 120r/min ,接种量为 1%。

2.3 各种不同氮源对 42-1 菌株产酶的影响

在实验中我们选取了酵母膏、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、明胶、干酪素、甘氨酸及谷氨酸钠作为微生物的补充氮源进行发酵培养 ,代替原富集培养基中的酵母膏 ,各种补充氮素营养物质的加量为 1%。接种后培养 36h 取样测定 SOX 酶活性 ,结果见图 1。在所测定的氮源中 ,酵母膏和玉米浆对该菌株产 SOX 有较大的促进作用 ,而简单氮源如甘氨酸与谷氨

酸钠则完全不能作为该菌产酶的氮源。

酵母膏和玉米浆虽然都是较好的氮源,但是两者中含有的氨基酸、维生素及其它生长因子的种类及含量都是不同的,因此选择了酵母膏和玉米浆作为该菌产酶的氮源,研究了二者以不同比例添加到培养基中对菌株产酶性能的影响。结果表明酵母膏和玉米浆以4:1的比例添加到培养基中,能较大地促进产酶。进一步的研究表明,该混合氮源浓度为2%时菌株表现出较高的酶活性。

2.4 不同碳源对菌株 42-1 产酶能力的影响

在确定氮源后的培养基中加入1%的各种不同碳源进行发酵培养,于36h取样并测定酶活性。结果(图2)表明,各种糖类如葡萄糖和果糖对菌株产酶活性的提高无显著影响,而乙醇和乙酸钠对该菌产酶有明显的促进作用。加入1%的乙酸钠后,SOX活性比对照提高了50%。

根据以上结果确定基础培养基组成为:乙酸钠 10g,酵母膏 16g,玉米浆 4g,磷酸二氢钾 0.5g,磷酸氢二钾 2.0g,硫酸镁 0.1g,三氯化铁 0.005g,加水定容至 1L,pH 7.0。

2.5 培养过程中通气量对产酶能力的影响

在 100mL 三角瓶中分别加入 10mL、20mL、40mL、60mL 培养基,接种后培养 36h 测定酶活。结果表明,该菌产 SOX 的能力在通气量适当减少的情况会有显著提高。如图 3 所示,当培养基装液量由 10mL 增加到 40mL,产酶能力增加了 5 倍以上,但如继续提高装液量则产酶能力迅速降低。这主要是因为 42-1 菌株为好氧菌,虽然较少的通气量有利于菌株产酶,但当氧气供应太少时会严重影响菌体的生长,而最终影响酶的产生。考察菌体生长量与通气量的关系可以发现(如图 3 所示)随着培养基装液量的增加,菌体的生长量总是减少的。

2.6 各种诱导物对 42-1 菌株产 SOX 的诱导

该菌株所产的 SOX 是一种诱导酶,因此在进行 SOX 发酵培养时必须加入一定量的诱导物。在本实验中考查了各种不同的物质对该菌产酶能力的诱导作用。在基础培养基中分别加入 0.5% 的肌氨酸、肌酸、肌酐和氯化胆碱,接种后培养 36h 取样测定酶活性,结果列于表 2。结果表明,供试的四种物质对该菌产 SOX 都有诱导作用,但相对来说肌酸对酶的诱导作用较强。且分析表明肌酸除了能诱导产生 SOX 外还能诱导出较高水平的肌酐水解酶和肌酸水解酶(本文中未列出),而肌氨酸和氯化胆碱仅能诱导产生 SOX 和少量

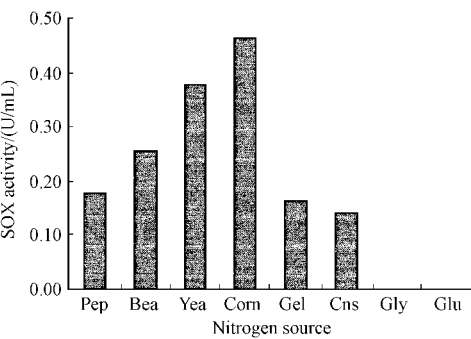


图1 各种不同的氮源对 42-1 菌株产 SOX 的作用

Fig.1 The effect of nitrogen sources on the SOX production of strain 42-1

Abbreviations: pept, peptone; bea, beef extract; yea, yeast extract; corn, corn-steep liquor; gel, gelatin; cas, casein; gly, glycine; glu, sodium glutamate.

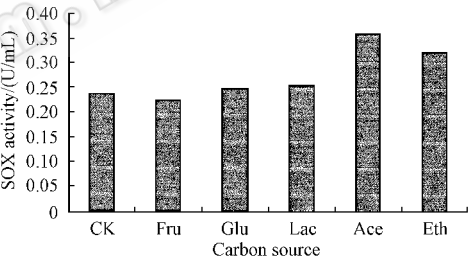


图2 不同碳源对 42-1 菌株产酶能力的影响

Fig.2 The effect of carbon sources on the SOX production of strain 42-1

Abbreviations: Fru, Fructose; Glu, Glucose; Lac, Lactose; Ace, sodium acetate; Eth, Ethanol.

肌酐水解酶。对氯化胆碱的进一步分析表明它虽然可诱导 42-1 菌株合成 SOX,但并不是 SOX 的底物,不能被 SOX 分解。

2.7 培养基中肌酸加入量对菌株 42-1 产酶能力的影响

根据以上结果,综合考虑各影响因素,选择了肌酸作为诱导物,并研究了不同肌酸浓度对发酵产酶能力的影响,结果见图 4。肌酸在低浓度时对产酶有明显的诱导作用。当肌酸浓度在 0%~0.5% 之间时,产酶能力随着肌酸加入量的增加而急剧增加。当肌酸浓度高于 0.5% 后,提高肌酸浓度对菌株产酶能力的提高并不显著。而当肌酸浓度高于 0.8% 后,提高肌酸浓度反而对产酶有明显的抑制作用。根据以上结果,选择 0.5% 的肌酸浓度为以后实验的加入量。

2.8 肌酸加入时间对 42-1 菌株产酶性能的影响

一般来说微生物在合成诱导酶时,需要在诱导物加入后再培养一段时间诱导酶才能生成,诱导时间的长短因微生物及酶的种类而定。为此我们考查了 SOX 的诱导过程。在培养的不同阶段向培养基中加入肌酸,并定期取样测定 SOX 活性。结果(图 5)表明,只有当肌酸存在时菌株 42-1 才能产生 SOX,且诱导物在培养的早期加入比在培养的中后期加入对产酶的促进作用更强。

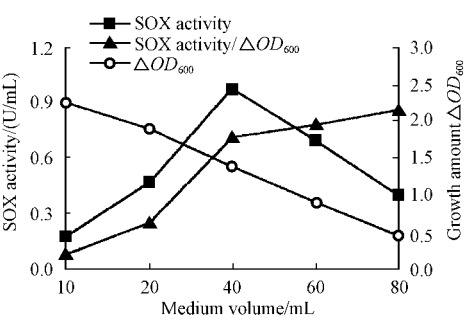


图 3 通气量对 42-1 菌株产酶能力及细胞生长量的影响

Fig.3 The effect of aeration on the growth and SOX production of strain 42-1

表 2 各种诱导物对菌株 42-1 产 SOX 的影响

Table 2 The effect of the inducers on SOX production of strain 42-1

Inducers	SOX/(U/mL)	Relative activity/%
CK	0	0
Choline chloride	0.501	93
Sarcosine	0.390	72
Creatine	0.542	100
Creatinine	0.511	95

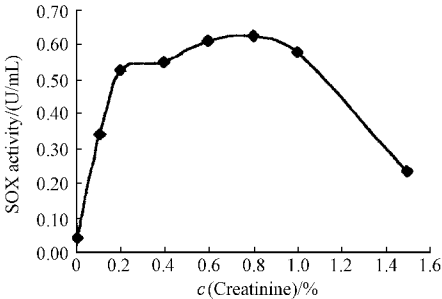


图 4 肌酸加入量对菌株 42-1 产酶能力的影响

Fig.4 The effect of creatine concentration on the SOX production of strain 42-1

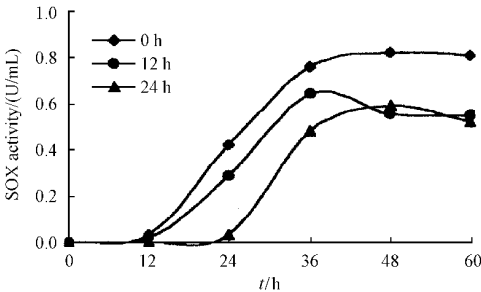


图 5 肌酸加入时间对 42-1 菌株产酶性能的影响

Fig.5 The effect of time for adding creatine on the SOX production of strain 42-1

2.9 肌酸代谢产物对 SOX 合成的影响

肌酸经菌株 42-1 降解后生成尿素、甘氨酸、甲醛和过氧化氢。其中甲醛和尿素可能分别参与细胞中一碳化合物和氮素的代谢。为了研究肌酸分解酶系在菌株 42-1 生长代谢中的作用,考查了各代谢产物对 SOX 合成的影响。在产酶培养基中分别加入 0.5% 的尿素、甘氨酸和甲醇(为了避免甲醛的毒性,以其前体甲醇代替),培养 36h 后测定酶活性,结果列于表 3。

表 3 肌酸分解产物对 SOX 合成的影响

Table 3 The effect of creatine-decomposing products on the production of SOX

	CK	Urea	Methanol	Glycine
SOX(U/mL)	0.436	0.166	0.469	0.424
Relative activity/%	100.0	38.1	107.6	97.3

从表 3 的结果可以看出尿素对酶的合成有强烈的抑制作用,而甲醇和甘氨酸的存在对菌株产酶的影响不大(虽然对细胞浓度的测定表明甲醇的加入对菌体的生长有明显的促进作用)。这一现象表明,菌株 42-1 对肌酸的降解主要是为了满足细胞生长时对氮素营养的需求,因而当产生(或加入)的氮素营养物浓度过高时就会激活该菌的肌酐降解酶系的调节系统,通过代谢物反馈作用抑制 SOX 等肌酐降解酶的生成。

3 讨 论

作为测定用酶,一般希望能具有较高的热稳定性和较小的 K_m 值^[4]。在本研究的初期曾采用分批培养的方法对产 SOX 的菌株进行了富集培养及分离。结果分离到的 3 株菌所产的 SOX 热稳定性都在 25℃ 以下,且其 K_m 值分别为 7.3mmol/L、11.5mmol/L 和 14mmol/L 相对来说比较大。之后我们提高富集培养的温度为 42℃,并采用恒化培养的方法进行富集,分离到的菌株所产的酶热稳定性提高了 10℃,其 K_m 值也仅为 2.7mmol/L。这是因为在较高的温度下进行恒化培养(以保持培养基中低底物浓度)时,只有产生热稳定性好、 K_m 值低的酶的菌才有可能占有竞争优势的缘故。

在碳源的试验中加入各种容易利用的碳源如葡萄糖等对 SOX 的产生没有抑制作用,这一现象和许多酶的发酵过程观察到的代谢产物抑制作用不同^[5,6]。而且加入乙酸盐后,对酶的产生有明显的促进作用。产生这一现象的可能原因是该菌株分解肌氨酸时,主要是将其作为细胞代谢的一种氮源,而不是作为能源或碳源。在实验中观察到尿素对 SOX 合成的抑制作用的现象也与这一推测相符。因而即使加入容易利用的碳源(如葡萄糖等)也不会影响 SOX 的代谢调节系统而抑制酶的产生。而如果补充碳源的种类适当的话(如乙酸盐),还有可能提高菌株的产酶能力。

在实验中发现通气量的大小对菌体的生长和酶的产生有显著影响,在通气量比较高的条件下,随着通气量的增加产酶能力迅速降低。如果用酶活性与细胞浓度的指标之比 (U/mL)/ OD_{600} 进行衡量的话,其差值可达 11 倍左右。而且在本实验中该值总是随着通气量的减少而增加。虽然在其它一些酶的发酵过程中也观察到随着通气量的增加产物活性降低的现象,但一般没有如此显著^[7]。产生这一现象的原因可能有两个:A. 氧浓度的变化可通过影响细胞内辅酶 I 的氧化还原状态而调节酶的合成^[8],B. 由于氧是 SOX 的底物之一,当缺少氧的供给时,酶的反应活性就会降低。为了克服这种不利影响,细胞在低浓度

氧的条件下生长时就必须产生过量的 SOX 以补偿酶活力的不足。

参 考 文 献

- [1] Erlenkotter A , Fobker M , Chemnitz C. Biosensors and flow-through system for the determination of creatinine in hemodialysate. *Anal Bioanal Chem* , 2002 , **372** (2) : 284 ~ 292.
- [2] Tombach B , Schneider J , Matzkies F , et al . Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients. *Clin Chim Acta* , 2001 , **312** (1 - 2) : 129 ~ 134.
- [3] Okumiyama T , Jiao Y , Saibara T , et al . Sensitive enzymatic assay for erythrocyte creatine with production of methylene blue. *Clin Chem* , 1998 , **44** (7) : 1489 ~ 1496.
- [4] Arrizubieta M J . Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a β - glucosidase by random mutagenesis in vitro recombination. *J Biol Chem* , 2000 , **275** (37) : 28843 ~ 28848.
- [5] Secades P , Guijarro J A . Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Envir Microbiol* , 1999 , **65** : 3969 ~ 3975.
- [6] Mahr K , Hillen W , Titgemeyer F . Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus* : Analysis of the ccpA region. *Appl Envir Microbiol* , 2000 , **66** : 277 ~ 283.
- [7] Calik P , Calik G , Ozdamar T H . Oxygen - transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* . *Biotechnol Bioeng* , 2000 , **69** (3) : 301 ~ 311.
- [8] San K Y , Bennett G N , Berrios - Rivera S J , et al . Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli* . *Metab Eng* , 2002 , **4** (2) : 182 ~ 192

Isolation of Sarcosine Oxidase Producing Bacteria and Study on the Conditions for the Enzyme Production^{*}

Zhao Gengfeng Ma Xiaohang^{* *} Jia Xiaoming Wang Yuanyuan

(College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : Four sarcosine oxidase (SOX) producing *Athrobacter* spp. were isolated from the batch cultural enrichment at 30℃ and chemostat enrichment at 42℃ . Compared with the SOX produced by the strains isolated from batch cultural enrichment , the SOX from strain isolated from chemostat enrichment had the properties of higher thermal stability and lower Km value for substrate . Studying on the conditions for fermentation showed that SOX was an induced enzyme and could be induced by the reagents such as sarcosine , creatine , creatinine and choline chloride . When aeration was reduced suitably , the activity of SOX could be remarkably increased during the process of fermentation . The easily used carbon sources such as glucose had no catabolic repression effect on the SOX production , but urea could repress the production of SOX dramatically . Therefore , the main function of strain 42 - 1 decomposing creatine was to provide nitrogen source to the cell .

Key words : Sarcosine oxidase , Catabolic repression , *Arthrobacter*

^{*} Project granted by the Science and Technology Department of Zhejiang Province (001110233 - 01)

^{* *} Corresponding author. E-mail : maxiaohong@zjuem.zju.edu.cn