

副球菌 WB1 菌株肌酸酶的研究

王园园 马晓航* 贾小明 赵更峰

(浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

摘 要: 从恒化富集培养物中分离到一株产肌酸酶的菌株 WB1, 通过对该菌的形态学、生理生化特性、G + C mol% 及 16S rDNA 序列分析, 表明该菌为一株副球菌(*Paracoccus* sp.). 对菌株 WB1 产酶发酵条件的研究表明, 该菌除了产生肌酸酶外还产生肌氨酸脱氢酶, 但不产生肌酸酐酶, 也不能利用肌酸酐。肌酸酶可以被诱导物, 如肌氨酸、肌酸、和氯化胆碱诱导产生。葡萄糖等易用碳源的存在对肌酸酶的合成无代谢产物阻遏作用。该酶的分子量为 48kD, 最适反应 pH 为 7.0~8.5, pH 稳定范围在 6.0~9.5 之间; 其最适反应温度在 35℃~40℃之间, 在 45℃ 以下是热稳定的; 37℃ 时以肌酸为底物, 酶的 K_m 值为 24.6mmol/L; Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^+ 对酶活性有强烈的抑制作用。

关键词: 肌酸酶, 发酵条件, 副球菌属

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)01-0083-05

人类血清中的肌酸酐浓度是反应肾脏功能的重要指标之一。目前常用的肌酸酐测定方法是以 Jaffe 反应为基础的。该测定方法专一性不强, 血清中的许多物质都会干扰测定结果。为克服此缺点, 人们提出了用酶法代替化学测定。由于酶促反应专一性强, 能大大提高测定结果的可靠性, 是肌酸酐测定的发展方向。酶促检测方法的原理是利用肌酸酐酶(Creatininase, EC 3.5.2.10) 肌酸酶(Creatinase, EC 3.5.3.3) 和肌氨酸氧化酶(Sarcosine oxidase, EC 1.5.3.1) 等对肌酸酐进行一系列转化, 使其生成甲醛、甘氨酸、尿素与 H_2O_2 。通过测定所产生的 H_2O_2 的含量可确定样品中肌酸酐的浓度^[1]。肌酸酶能够水解肌酸生成肌氨酸和尿素, 在酶法测定中起着极重要的作用。

本研究分离到了一株能产生肌酸酶的 *Paracoccus* sp. WB1 菌株, 并对其发酵产酶条件及酶的主要特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种的富集和分离

菌种的富集采用恒化培养的方法, 将土壤样品接种到含有 1% 肌酸的发酵培养基中, 培养 3d, 从中取 1mL 加入 50mL 的恒化器中培养, 连续向恒化器中流加含有 0.1% 肌酸的培养基, 每天测定肌酸的降解情况, 至恒化器中的肌酸浓度趋近为零后, 进行

平板划线分离。

1.2 分离菌株 WB1 的分类鉴定

1.2.1 生理生化反应: 采用常规测定方法^[2]。

1.2.2 16S rDNA 的 PCR 和测序: 用于 16S rDNA 扩增反应的引物为一对通用引物(<http://silk.uic.ac.be/primer/database.html>)。正向引物 BSF8/20 : 5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 BSR1541/20 : 5'-AAGGAGGTGA TCCAGCCGCA-3'。测序由上海申友生物技术有限责任公司完成, 测序用引物为 BSF8/20 和 BSR1541/20。

1.2.3 系统发育分析: 获得的菌株部分长度的 16S rDNA 序列(1378bp), 将其序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 利用系统发育分析软件 PHYLIP 3.6 构建进化树^[3]。用于系统发育树构建的相关菌株列于表 1。

1.3 肌酸酶活力测定

酶活测定时, 将含有 100mmol/L 肌酸的磷酸缓冲液(50mmol/L, pH 7.5) 0.9mL 于 37℃ 保温数分钟, 加入 0.1mL 酶液, 反应 10min, 再加入含有 2% 对二甲苯甲醛和 1mol/L HCl 的二甲基亚砷 2.0mL 终止反应并显色。在室温下反应 20min 后, 测定 435nm 的吸光值。将在此测定条件下每分钟催化产生 1 μ mol 尿素所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。

基金项目: 浙江省科技厅项目(001110233-01)

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971962; E-mail: maxiaohong@zju.edu.cn

作者简介: 王园园(1977-) 女, 山东人, 浙江大学在职硕士研究生, 研究方向为应用微生物学。

收稿日期: 2003-04-24, 修回日期: 2003-09-15

表 1 用于系统发育树构建分离菌株 WB1 和副球菌属细菌的菌名、菌株编号和序列登录号

Table 1 Strain number and GenBank accession number of sequences of the bacteria used for construction of unrooted phylogenetic tree			
Bacteria	Strain number	Accession number	Reference
<i>Paracoccus alkenifer</i>	DSM 11593 ^T	Y13827	[4]
<i>Paracoccus solventivorans</i>		Y13826	[4]
<i>Paracoccus kocurii</i>	JCM 7684 ^T	D32241	[5]
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>		AB006899	[6]
<i>Paracoccus marcusii</i>		Y12703	[7]
<i>Paracoccus aminophilus</i>	JCM 7686 ^T	D32239	[5]
<i>Paracoccus alcaliphilus</i>	JCM 7364 ^T	D32238	[5]
<i>Paracoccus thiocyanatus</i>	IAM 12816 ^T	D32242	[5]
<i>Paracoccus aminovorans</i>	JCM 7685 ^T	D32240	[5]
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	ATCC 35512 ^T	Y16933	[8]
<i>Paracoccus denitrificans</i>	LMG 4218 ^T	X69159	[9]
<i>Paracoccus versutus</i>	DSM 582	Y16932	[8]
<i>Paracoccus</i> sp.	WB1	AF526892	This study

1.4 产酶发酵条件试验

接种 1% 的菌种于装有 10mL 培养基的 100mL 三角瓶中 ,于 30℃ 振荡培养 ,摇床转速为 100r/min。培养过程中定期测定酶活性。所研究的氮源有酵母膏、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、明胶、干酪素、氯化铵、硝酸钠、尿素、甘氨酸及谷氨酸 ;碳源有葡萄糖、果糖、乳糖、乙酸、柠檬酸 ;诱导物为肌酸、肌氨酸、氯化胆碱、尿素。

1.5 肌酸酶性质研究

提纯后的酶于不同的温度和 pH 条件下测定其活性 ,以确定其最佳反应条件 ;在 pH 不同的缓冲溶液中于 25℃ 保温 22h 后 ,于 pH7.5 的条件下测定酶剩余活力 ,确定酶的 pH 稳定范围 ;于不同温度下处理 10min 后于 37℃ 测定剩余酶活力 ,以研究酶的热稳定性^[5]。分别在酶液中加入 1.0mmol/L 的金属盐 20mmol/L 的螯合剂 ,20mmol/L 的 NaN₃ ,0.1% 的 Tween 20 和 Tween 80 ,0.5% 的 SDS ,于 25℃ 处理 30min ,再于含有相同浓度化学物质的反应体系中测定酶活力 ,以确定各种化学物质对酶活力的影响。

2 结果

2.1 分离菌株的特性

菌株 WB1 的革兰氏染色反应为阴性 ;在 LB 和肌酸加富的培养基上生长时 ,菌落都呈圆形 ,隆起 ,表面光滑 ,湿润 ,边缘整齐 ,无色 ,不产生荧光色素 ;菌体不运动 ,常成对存在 ;在生长过程中从球状变成杆状 ,电镜观察表明该菌无鞭毛 ,无芽孢 ,杆状 ,没有其它特殊结构。

菌株 WB1 在无氧条件下不能生长 ;不能利用分子态氮 ,可利用氨态氮 ,能还原硝酸盐 ;不能以甲烷为碳源生长 ;氯化钠对其生长没有促进作用 ,不需要生长因子 ;过氧化氢酶反应和氧化酶反应都为阳性 ;能利用有机物如葡萄糖、蔗糖、D-果糖、甘露醇、D-半乳糖、L(+)鼠李糖、D-甘露、D-木糖 ,肌酸 ,肌氨酸 ,不能利用 L-山梨糖和棉子糖 ;不水解淀粉 ,明胶 ,精氨酸。DNA G + C mol% 为 68.8(T_m)。

2.2 16S rDNA 的序列分析

序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比分析得出菌株 WB1 与 *Paracoccus* 属中的许多种菌的 16 rRNA 有 98% 的同源性 ,从系统进化树可看出(图 1) ,菌株 WB1 和 *Paracoccus aminovorans* JCM 7685T、*Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512T、*Paracoccus denitrificans* LMG 4218T 和 *Paracoccus versutus* DSM 582 归于同一簇群。该菌株在系统发育地位上属于副球菌属(*Paracoccus*)。

2.3 菌株的发酵产酶条件

2.3.1 产酶培养基的组成 :氮源试验结果表明酵母膏和玉米浆对该菌株产酶有较大的促进作用。通过优化确定酵母膏与玉米浆的比例为 3 :2 ,浓度为 1.6%。而供试的各种碳源 ,如葡萄糖和果糖对菌株产酶活性的提高无显著影响 ,因此在培养基中不再加入其它碳源。对各种诱导物的试验结果表明 ,最有效的诱导物为肌酸 ,肌氨酸和氯化胆碱有微弱的诱导作用 ,而肌酸酐和尿素则无任何诱导能力。对诱导物浓度的研究表明肌酸的浓度在 0.75% 时有较强的诱导作用。

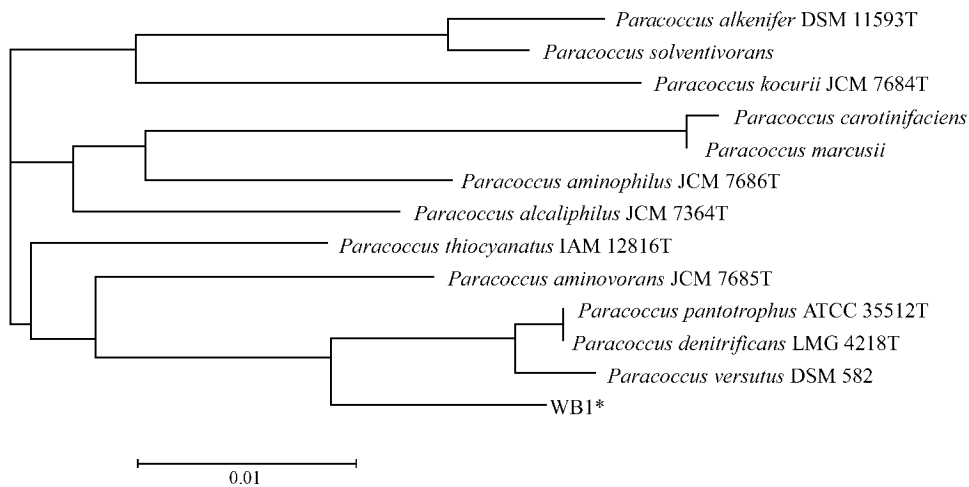


图 1 根据 WB1 及 *Paracoccus* 属的菌株 16S rDNA 序列所绘制的无根系统树

Fig.1 Urooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain WB1 and sequences of related species belong to *Paracoccus*

Scale bar indicates evolutionary distance.

根据以上结果确定基础培养基组成为 :酵母膏 9.6g ;玉米浆 6.4g ;磷酸二氢钾 0.5g ;磷酸氢二钾 2.0g ;硫酸镁 0.01g ;水 1000mL ,pH 7.0 ,产酶诱导物为肌酸 ,加量为 0.75 %。

2.3.2 通气量对产酶能力的影响 :在 100mL 三角瓶中分别加入 5、10、15、20、25 mL 培养基 ,接种后培养 24h 测定菌体生长量与酶活力。结果显示 ,虽然细菌的生长量随着通气量的增加而增加 ,但太高的通气量对酶生成反而不利。酶活力在装液量为 15mL 时最高。

2.3.3 肌酸加入时间对菌株发酵产酶的影响 :在最佳产酶条件下 ,以 1 %的接种量接种 ,分别在 0h、3h、6h、9h、12h 加入 1 %的肌酸 ,从 3 ~ 30h 之内 ,每隔 3h 取样 ,测定酶活力。肌酸的加入时间对菌株产酶的影响较大 ,随着肌酸加入时间的延后 ,菌株产生酶的活力逐渐提高 ,12h 加入时 ,酶活力最高。

2.4 肌酸酶的主要性质

2.4.1 酶的纯化 :发酵液离心收集菌体 ,用超声波破壁 ,离心除去细胞碎片。上清用硫酸铵进行分级沉淀 ,收集 40 % ~ 70 % 沉淀部分。之后上用 10mmol/L ,pH7.0 的磷酸缓冲液平衡的 DEAE-cellulose 柱 ,用含有 0 ~ 1.0mol/L KCl 的相同缓冲液进行梯度洗脱 ,收集酶比活力高的部分。合并后上用含有 38 % 饱和度硫酸铵的 10mmol/L ,pH7.0 的磷酸缓冲液平衡过的 Toyopearl HW-65 柱 ,然后用含有 38 % ~ 0 % 饱和度硫酸铵的相同缓冲液进行梯度洗脱 ,合并比活力高的部分 ,浓缩后上用含有 0.1mol/L KCl 的同缓冲液平衡过的 Sephadex G-200 柱 ,之后用同缓冲液洗脱。

肌酸酶的提纯总结如表 2。提纯后的酶经过 12 % 的 PAGE 检测显示为一条带 ,12 % 的 SDS-PAGE 测定分子量为 48 kD (图 2)。

表 2 肌酸酶的提纯总结

Table 2 Summary of purification of the creatinase from *Paracoccus* sp. WB1

Purification step	Total activity /U	Total protein /mg	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield/%
Crude extract	14780	24558	0.60	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ classified precipitation	11345	17411	0.65	1.08	76.7
DEAE-cellulose	8259	8862	0.93	1.55	55.8
Toyopeal HW-65	5170	1299	3.98	6.63	34.9
Sephadex G-200	2578	422	6.10	10.17	17.4

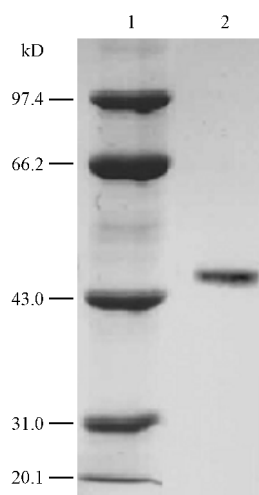


图2 SDS-PAGE 测定肌酸水解酶分子量结果

Fig.2 The molecular weight of creatinase measured by SDS-PAGE

1.Marker; 2.Purified creatinase.

2.4.2 肌酸水解的酶学性质 纯化后酶的最佳反应 pH 为 7.5 ~ 8.5, 最适反应温度为 35℃ ~ 40℃, pH 稳定范围为 5.5 ~ 9.5, 酶在 45℃ 以下稳定。纯酶对肌酸的 K_m 值为 24.6 mmol/L。不同化学物质对酶活力影响的研究结果表明金属离子 Ag^+ 、 Hg^+ 、 Cu^{2+} 对酶活性有强抑制作用, 而螯合剂 EDTA 与 1,10-phenanthroline 对酶的活性无不利影响。

3 讨论

目前为止, 已报道过的产肌酸酶的菌株有节杆菌属 (*Arthrobacter*)^[10]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[11]、梭菌属 (*Clostridium*)^[12]、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)^[13]、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[14]、产碱菌属 (*Alcaligenes*)^[15] 和微球菌属 (*Micrococcus*)^[16] 七个属的细菌, 本研究分离到的产肌酸酶菌株 WB1 归属于副球菌属, 在此之前尚未见到有关副球菌产生肌酸酶的报导。虽然根据生理生化及 16S rRNA 的分析结果表明 WB1 菌株因属于 *Paracoccus* 属, 但是对其系统发育树的分析显示该菌株的 16S rRNA 序列与 *Paracoccus* 属中现存的各种的 16S rRNA 均有一定的差异。因此该菌株有可能是 *Paracoccus* 属中的一个新种。当然, 对它的定种还需要做进一步的研究。

研究表明, 菌株 WB1 除了能产生肌酸酶外还产生肌氨酸脱氢酶。但与报导的其它菌株不同, 该菌株不产生肌酸酐酶, 也不能利用肌酸酐。由于在肌酸酐的测定过程中肌酸酐酶与肌酸酶是分别加入的, 在肌酸酶中不能有肌酸酐酶活性。因此, 该菌这一特点将使酶的提纯过程更为容易。除肌酸之外, 肌氨酸及氯化胆碱也能诱导 WB1 菌株产生肌酸酶,

由于肌氨酸(肌氨酸脱氢酶的底物)是肌酸酶的产物而不是底物, 而胆碱则是肌氨酸的结构类似物, 从这一现象可以推测在该菌中肌酸酶与肌氨酸脱氢酶的基因很可能是同属于一个操纵子中的。副球菌与假单胞菌有较近的亲缘关系。但是 WB1 菌株与产肌酸酶的恶臭假单胞菌在分解肌酸的酶系上有较大的差异。其主要区别为假单胞菌除了能产生肌酸酶和肌氨酸脱氢酶外, 还能产生肌酸酐酶, 其肌酸酶可以被肌酸酐所诱导生成。但是 WB1 菌株只能产生肌酸酶和肌氨酸脱氢酶, 而且肌酸酐的存在并不能对肌酸酶的产生起诱导作用。

现已报道的微生物所产生的肌酸酶种类较多, 其单体的分子量在 28 ~ 47 kD 之间, 本实验 SDS-PAGE 结果显示该酶单体的分子量为 48 kD, 其大小与 *P. putida* 所产的肌酸酶较为接近。但是其 pH 稳定范围要较 *P. putida* 的宽。此外该酶底物 K_m 值为 24.6 mmol/L, 与目前已知的其它肌酸酶的 K_m 有较大差异。该酶的活性不能被螯合剂所抑制, 也不能被金属离子所激活, 表明其不是金属酶。酶活性抑制试验表明该酶能被 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 及 Ag^+ 所抑制, 这一结果说明在酶的活性中心或附近可能存在有 SH 基团。这一现象在其它一些水解酶中也有报道。

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**: 284 - 292.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 349 - 412.
- [3] Felsenstein J, Churchill G A. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **13**: 93 - 104.
- [4] Lipski A, Reichert K, Reuter B, et al. Identification of bacterial isolates from biofilters as *Paracoccus alkenifer* sp. nov. and *Paracoccus solventivorans* with emended description of *Paracoccus solventivorans*. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**: 2529 - 2536.
- [5] Katayama Y, Hiraishi A, Kuraishi H. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology*, 1995, **141**: 1469 - 1477.
- [6] Tsubokura A, Yoneda H, Mizuta H. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 1277 - 1282.
- [7] Harker M, Hirschberg J, Oren A. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**: 2543 - 2548.
- [8] Raineve F A, Kelly D P, Stockerbrandt F, et al. A re-evaluation of

- the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 645 – 651.
- [9] Ludwig W, Mittenhuber G, Friedrich C G. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, **43**: 363 – 367.
- [10] Nishiya Y, Todaand A, Imanaka T. Gene cluster for creatinine degradation in *Arthrobacter* sp. TE1826. *Mol Genet*, 1998, **257**: 581 – 586.
- [11] Hong M C, Chang J C, Wu M, et al. Expression and export of *Pseudomonas putida* NTU-8 creatinase by *Escherichia coli* using the chitinase signal sequence of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem Genet*, 1998, **36**: 407 – 415.
- [12] Hermann M, Knerr H, Mai N, et al. Creatinine and N-methylhydantoin degradation in two newly isolated *Clostridium species*. *Arch Microbiol*, 1992, **157**: 39 – 401.
- [13] Koyama Y, Kitao S, Yamamoto-Otake H, et al. Cloning and expression of the creatinase gene from *Flavobacterium* sp. U-188 in *Escherichia coli*. *Biol Chem*, 1990, **54**: 1453 – 1457.
- [14] Suzuki K, Sagai H, Imamura S, et al. Molecular cloning and high expression of the *Bacillus* creatinase gene in *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77**: 231 – 238.
- [15] Matsuda Y, Wakamatsu N, Inouye Y, et al. Purification and characterization of cratine amidinohydrolase of *Alcaligenes* origin. *Chem Pharm Bull*, 1986, **34**: 2155 – 2160.
- [16] Chang M C, Chang C, Chang J C. Cloning of a creatinase gene from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* by using an indicator plate. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 3437 – 3440.

Study on the Creatinase Produced by *Paracoccus* sp. Strain WB1

WANG Yuan-Yuan MA Xiao-Hang* JIA Xiao-Ming ZHAO Geng-Feng

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

Abstract :A creatinase producing bacterium was isolated from soil with chemostat enrichment. Based on its morphological , physiological characteristics , G + C mol % of DNA and 16S rDNA sequence , it was identified as a strain of *Paracoccus* sp. . The results of study on the fermentation conditions of strain WB1 showed that beside of creatinase , the strain also produced sarcosine dehydrogenase. However , it did not produce creatininase , and was unable to utilize creatinine. The creatinase was an inducible enzyme and could be induced by sarcosine , creatine , and choline chloride. The easily used carbon sources such as glucose had no catabolic repression effect on the creatinase production. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 48kD by SDS-PAGE. The enzyme was showed the maximum activity at pH 7.0 ~ 8.5 and was stable at pH 5.5 ~ 9.5. It was showed most activity at 35℃ ~ 40℃ and was stable under 45℃ . The *K_m* of the enzyme was 24.6 mmol/L with creatine as substrate at 37℃ . The metal ions such as Cu²⁺ , Hg²⁺ and Ag⁺ had strong inhibiting effect on the activity of the enzyme.

Key words :Creatinase , Fermentation condition , *Paracoccus* sp.