

假丝酵母尿酸酶形成条件

刘建国 黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

选出了一株产尿酸酶的产脲假丝酵母(*Candida utilis*) AS2.117。此菌株尿酸酶形成条件的研究表明: 尿酸、黄嘌呤和鸟嘌呤对酶形成起诱导作用; 玉米浆对菌株生长和酶形成起十分重要的作用; 蔗糖、葡萄糖、D-甘露糖和果糖是酶形成的适合碳源; 生物素对酶产生有促进作用; 在含有玉米浆培养基中加入无机氮源对产酶无作用, 添加有机氮略增加产酶量。尿酸酶形成最适培养基组成为(%): 蔗糖 5, 玉米浆 3, 尿酸 0.1, 蛋白胨 0.1, 生物素 0.05, KCl 0.1, NaCl 0.1。最适 pH 为 6.2。在 250ml 三角瓶中装 30ml 培养基为最适。在 200r/min 的旋转摇床上 25℃ 振荡培养 21h, 在此条件下最终酶活力可达 0.6u/ml。

关键词 尿酸酶; 产脲假丝酵母

尿酸酶 (EC1.7.3.3) 是一种以氧作为受体的氧化酶, 它能够催化尿酸氧化生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢。在尿酸临床诊断中, 此酶专一性强, 反应效率高, 是重要的诊断分析用酶。

Schittenhelm 首先发现此酶存在于牛肾中^[1]。以后, 从各种来源, 例如细菌^[2,3]、霉菌^[4]、假丝酵母^[5,6]等, 猪肝^[7]中也发现了尿酸酶, 并进行了酶的提纯及性质的研究。最近, 有人对尿酸酶产生菌进行了广泛的筛选比较, 其中以黑曲霉和假丝酵母产较高的尿酸酶活性^[8]。假丝酵母发酵可产生底物诱导性胞内酶 0.4u/ml 发酵液^[9]。

本文报道产脲假丝酵母 AS2.117 产尿酸酶的诱导和发酵条件的研究结果。

材料和方 法

(一) 菌种

产脲假丝酵母 (*Candida utilis*) AS 2.117

(二) 试剂

尿酸为 Aldrich 公司产品, 生物素为 Merck 公司产品, 次黄嘌呤为 Sigma 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯和化学纯。

(三) 培养基

1. 斜面培养基: 麦芽汁琼脂。

2. 基本培养基(%): 蔗糖 5, 玉米浆 3, 尿酸 0.04, MgSO₄·7H₂O 0.1, KCl 0.1。用 NaOH 调到 pH 6.2, 250ml 三角瓶装 40ml, 1.05kg/cm² 灭菌 30min。

(四) 菌体培养和酶液提取

AS 2.117 菌株在 28℃ 斜面培养基上培养 24—36h 后, 接入基本培养基, 30℃ 振荡 (200r/min) 培养 18h。发酵液经离心 (5000r/min) 20min 收集沉淀, 细胞用蒸馏水清洗两次, 悬浮在 0.1mol/L pH 8.5 的 Tris-盐酸-甘氨酸缓冲液中, 在 4℃ 下超声波破碎 (20KC/S 300W) 5min, 破碎液经离心 (16000r/min) 15min, 上清液即为酶液。

(五) 生物量测定

取 5ml 发酵液离心 (5000r/min) 20min, 沉淀的细胞中加入 2.5ml 生理盐水成悬浮液, 取 0.2ml 悬浮液加 3.8ml 生理盐水, 用光径 1cm 比色杯在 600nm 处比色, 以生理盐水为空白。生物量以吸光度值 (A_{600}) 表示。

(六) 酶活力测定

本文于 1987 年 4 月 21 日收到。

酶液经适当稀释后,取 0.5ml 加入到 2.5ml 尿酸液中(尿酸溶解在 0.1mol/l pH 8.5 硼酸-硼砂缓冲液中, $A_{293} = 0.5$) 混合后,用光径 1cm 比色杯在 25℃ 下 293nm 处连续检测吸光度 A 的变化,以不加酶液的尿酸液为空白。在上述条件下,每分钟转化 1 μ mol 尿酸为尿囊素所需的酶量为 1 个酶活力单位。

结 果

(一) 底物及其类似物对酶形成的诱导作用

在基本培养基中分别用几种类似物代替尿酸。经培养后测酶活力,结果见表 1。以尿酸作为诱导物时酶活力最高,黄嘌呤和鸟嘌呤等也有诱导作用。

表 1 底物及其类似物的诱导效果

Table 1 Effect of substrate and its analogs on enzyme induction

诱导物 Inducer	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无* None	0.505	0.095
腺嘌呤 Adenine	0.510	0.127
鸟嘌呤 Guanine	0.550	0.313
黄嘌呤 Xanthine	0.515	0.403
次黄嘌呤 Hypoxanthine	0.510	0.175
尿酸 Uric acid	0.540	0.832

*: 培养基中不加诱导物

Medium without inducer

(二) 碳源对酶形成的影响

在基本培养基中分别用数种糖代替蔗糖,其余成份不变。培养后测酶活力,结果如表 2。蔗糖、葡萄糖、D-甘露糖和果糖是本菌株尿酸酶形成较合适的碳源。

(三) 蔗糖量对酶形成的影响

在基本培养基中改变蔗糖含量,其余

表 2 碳源对酶形成的影响

Table 2 Effect of various carbon sources on enzyme formation

碳源 Carbohydrate	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
阿拉伯糖 L-Arabinose	0.220	0.006
果糖 D-Fructose	0.495	0.232
D-甘露糖 D-Mannose	0.540	0.238
麦芽糖 Maltose	0.480	0.039
木糖 Xylose	0.190	0.030
葡萄糖 Glucose	0.575	0.249
L-山梨糖 L-Sorbose	0.100	0.003
乳糖 Lactose	0.160	0.012
可溶性淀粉 Soluble starch	0.285	0.008
蔗糖 Sucrose	0.550	0.252

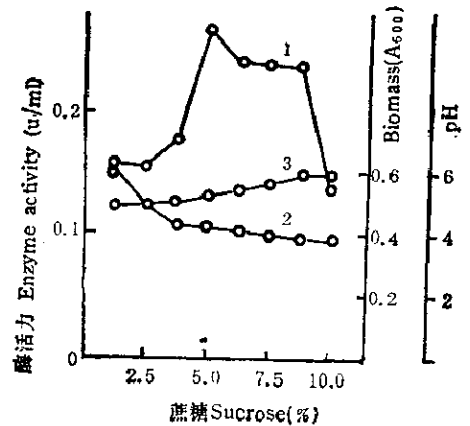


图 1 蔗糖含量对酶形成的影响

Fig. 1 Effect of Sucrose content on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity
2. 终 pH Final pH
3. 生物量 Biomass (A_{600})

成份不变,培养后测酶活力(图 1)。培养基中含 5% 的蔗糖时酶活力最高。

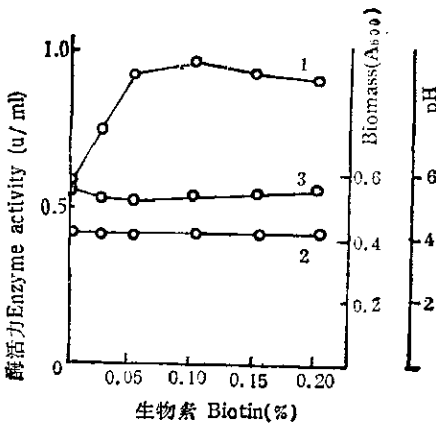


图2 生物素含量对酶形成的影响

Fig. 2 Effect of biotin content on enzyme formation

- 1.酶活力 Enzyme activity
- 2.终 pH Final pH
- 3.生物量 Biomass (A₆₀₀)

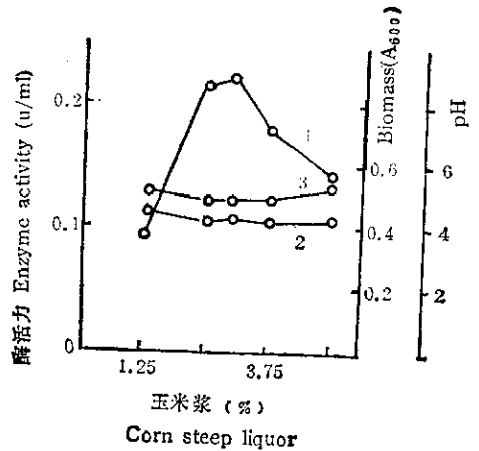


图4 玉米浆含量对酶形成的影响

Fig. 4 Effect of corn steep liquor content on enzyme formation

- 1.酶活力 Enzyme activity
- 2.终 pH Final pH
- 3.生物量 Biomass (A₆₀₀)

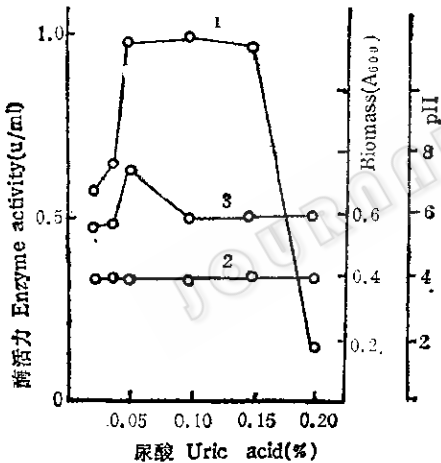


图3 尿酸量对酶形成的影响

Fig. 3 Effect of uric acid content on enzyme formation

- 1.酶活力 Enzyme activity
- 2.终 pH Final pH
- 3.生物量 Biomass (A₆₀₀)

(四) 生物素含量对酶形成的影响

在基本培养基中分别加入不同量的生物素，经培养后测酶活力(图2)。培养基中加入0.05—0.10%的生物素，可提高产酶量。

(五) 尿酸量对酶形成的影响

在加有生物素的基本培养基中，改变尿酸含量，培养后测酶活力(图3)。培养基中含0.05—0.15%的尿酸时，菌株产酶活力较高。

(六) 玉米浆量对酶形成的影响

在基本培养基中改变玉米浆含量，其余成份不变，培养后测酶活力(图4)。含3%的玉米浆时菌株产酶活力高。

(七) 氮源对酶形成的影响

基本培养基含0.1%尿酸，0.05%生物素，0.025%各种氮源，其余成份不变，培养后测酶活力(表3)。培养基中含3%的玉米浆已基本满足菌株对氮源的要求，有机氮源略提高酶活力。

(八) 不同金属离子对酶形成的影响

在含5%蔗糖、3%玉米浆、0.1%尿酸、0.05%生物素、0.1%蛋白胨的培养基中加入0.05%不同金属盐。培养后测酶活力(表4)。Mg²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺对酶形成不利。

表3 氮源对酶形成的影响

Table 3 Effect of various nitrogen sources on enzyme formation

氮源 Nitrogen source	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无* None	0.495	0.480
$(NH_4)_2SO_4$	0.490	0.343
$(NH_4)_2HPO_4$	0.500	0.290
NH_4Cl	0.480	0.297
NH_4NO_3	0.500	0.291
$NH_4H_2PO_4$	0.500	0.427
尿素 Urea	0.500	0.344
蛋白胨 Proteose-peptone	0.495	0.521
酵母膏 Yeast extract	0.515	0.534
干酪素 Casein	0.530	0.541

* 培养基中不外加氮源

No extra nitrogen source presented in the medium

(九) pH 对酶形成的影响

含 5% 蔗糖, 3% 玉米浆, 0.1% 尿酸, 0.05% 生物素, 0.1% KCl, 0.1% NaCl 和 0.1% 蛋白胨的培养基, 用 NaOH 调不同 pH。培养后测酶活力, 从图 5 可见, 培养基 pH5—6 时菌株形成酶活力高, 在 pH7 以上培养时, 酶活力降低。

(十) 通气量对酶形成的影响

培养基成份同(九)。在 250ml 三角瓶中分别装入不同体积的培养基, 相同条件下培养后测酶活力(图 6)。250ml 三角瓶中装 30ml 培养基培养时, 菌株产酶活力高。

(十一) 温度对酶形成的影响

培养基成份同(九), 250ml 三角瓶中

表4 不同金属离子对酶形成的影响

Table 4 Effect of various metallic salt on enzyme formation

金属盐 Metallic salt	生物量 Biomass (A_{600})	酶活力 Enzyme activity (u/ml)
无* None	0.590	0.319
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.550	0.153
KCl	0.570	0.343
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.640	0.123
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.570	0.298
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.555	0.298
NaCl	0.570	0.324
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.525	0.192

* 培养基中无金属盐

No metallic salt presented in the medium

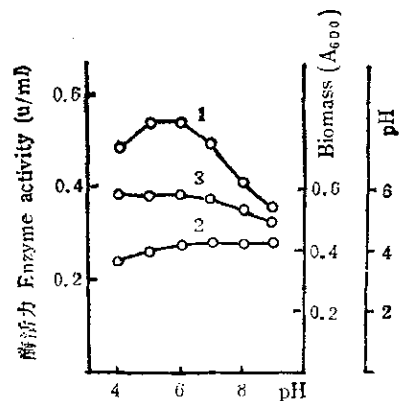


图5 pH 对酶形成的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on enzyme formation

1. 酶活力 Enzyme activity
2. 终 pH Final pH
3. 生物量 Biomass (A_{600})

装 30ml 培养基, 于不同温度下培养后测酶活力, 结果见图 7。在 25°C 培养, 菌株形成酶活力和生物量均最高。

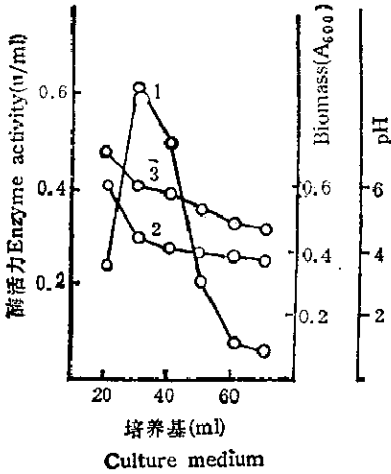


图 6 通气量对酶形成的影响

Fig. 6 Effect of aeration on enzyme formation

- 1. 酶活力 Enzyme activity
- 2. 终 pH Final pH
- 3. 生物量 Biomass (A_{600})

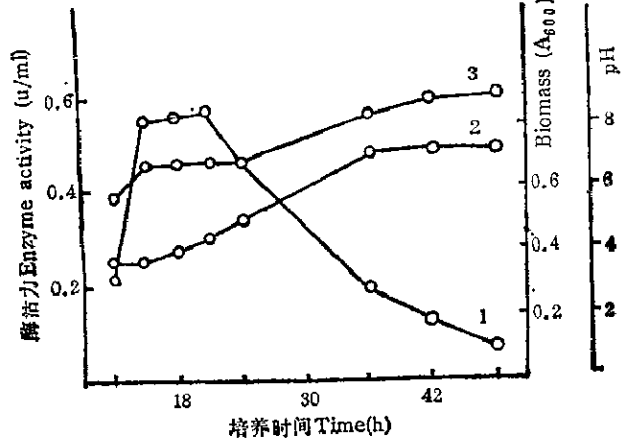


图 8 酶形成的时间过程

Fig. 8 The time course of enzyme formation

- 1. 酶活力 Enzyme activity
- 2. 终 pH Final pH
- 3. 生物量 Biomass (A_{600})

讨 论

微生物经底物及其类似物的诱导可提高尿酸酶产量^[7,10,11]。从表 1 可知,实验所用几种嘌呤对菌株产尿酸酶均有诱导作用,其中尿酸、黄嘌呤、鸟嘌呤诱导作用十分明显。嘌呤需进入细胞在相应酶作用下转化成尿酸后,才能诱导细胞形成尿酸酶^[11]。本菌株细胞中存在嘌呤代谢的酶类,所提取的酶液中是否存在这些酶类,尚待进一步证明。

据文献报道^[5,12]从假丝酵母中提取尿酸酶要经过两步培养,先培养菌株增殖细胞量,然后接入含有诱导物的培养基内诱导产酶。经实验比较,本菌株经两步培养和上述的一步培养所得的酶液在酶活力上无显著差异。

玉米浆对本菌株生长和酶形成是必要的。在培养基中其含量小于 3% 时,细胞生长和酶活力随玉米浆用量减少而减少,当培养基中不加玉米浆时,菌株细胞生长几乎完全停止。

由于尿酸酶氧化尿酸为尿囊素,专一

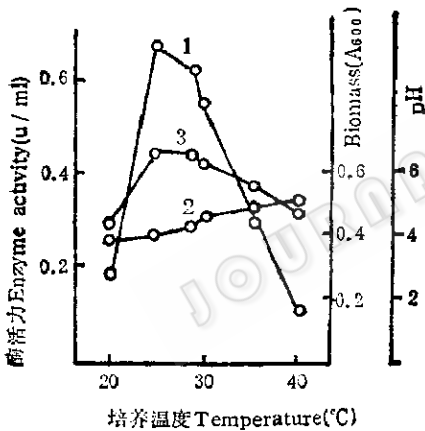


图 7 培养温度对酶形成的影响

Fig. 7 Effect of cultural temperature on enzyme formation

- 1. 酶活力 Enzyme activity
- 2. 终 pH Final pH
- 3. 生物量 Biomass (A_{600})

(十二) 培养时间对酶形成的影响

培养基成份同(九),250ml 三角瓶装 30ml 培养基,在 25°C 下振荡 (200r/min) 培养,于不同时间取样测定酶活力,结果见图 8。培养 21h 酶活力最高,超过 21h 酶活力显著下降。

性强,效率高,国外已生产用于临床的尿酸酶法诊断试剂盒,配合各种自动生化分析仪,进行微量快速分析。同时借助固定化酶技术,可做成各种类型的酶传感器,使尿酸临床诊断更加简单、方便、小型化。

参 考 文 献

- [1] Schittenhelm, A.: *Z. Physiol. Chem.*, **46**: 121—151, 1905.
- [2] Bongaerts, G. P. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **527**: 348—358, 1978.
- [3] Nose, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **151**: 63—69, 1968.
- [4] Conley, T. G. et al.: *Biochem. J.*, **187**: 727—732, 1980.
- [5] Itaya, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **31**: 1256—1264, 1967.
- [6] Nishimura, H. et al.: *J. Biochem.*, **91**: 41—48, 1982.
- [7] Mabler, H. R.: *The Enzymes* (ed. Boyer, P. D. et al.), Academic Press, New York, **8**: 285—296, 1963.
- [8] Lehejckova, R. et al.: *Biotechnol. Lett.*, **8**(5): 341—342, 1986.
- [9] Sadaji, Y. et al.: JPN Kokai Tokkyo Koho JP 6143, 986 (86 43,986) (CL C12N9/06) 03 Mar, 1986. Appl. 84/166,022, 08 Aug., 1984. 6pp.
- [10] Mahler, H. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **216**: 625, 1955.
- [11] Machida, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(12): 2811—2815, 1980.
- [12] Tanaka, A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**(4): 342—346, 1977.

CULTURE CONDITIONS FOR URICASE FORMATION OF *CANDIDA UTILIS*

Liu Jianguo Li Gaoxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A uricase producing strain, *Candida utilis* AS 2.117, was screened out and the uricase-forming conditions have been investigated. The results are obtained as follows: uric acid, xanthine and guanine were found to be effective inducers for enzyme formation. Corn steep liquor was essential for enzyme formation and cell growth. Sucrose, glucose, D-mannose and D-fructose were the suitable carbon sources for enzyme formation. To the medium containing corn steep liquor, addition of inorganic nitrogen sources was harmful to the enzyme formation, however, addition

of organic nitrogen sources enhanced enzyme activity slightly. The suitable medium for uricase formation was consisted of sucrose 5%, corn steep liquor 3%, uric acid 0.1%, proteose-peptone 0.1%, biotin 0.05%, KCl 0.1%, NaCl 0.1% at pH 6.2. When the yeast was grown in 250 ml conic flask containing 30 ml of the medium mentioned above on the rotary shaker (200 r/min) at 25°C for 21h, uricase with 0.6 u/ml activity was obtained.

Key words

Uricase; *Candida utilis*