

# 假单胞菌株 K9510 产肌酐酰氨基水解酶的条件\*

刘建国\*\* 柯纪元 王晋芳 黎高翔

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要:**肌酐酰氨基水解酶是酶法分析血清肌酐浓度的关键酶。本实验室从空气中分离到能分解肌酐的菌株 K9510、K9511 和 K9512, 其中 K9510 菌株初步分类鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 菌株产酶条件优化研究结果表明: 菌株在底物或底物类似物的诱导下产酶; 混合金属离子溶液对菌株产酶有促进作用。菌株产肌酐酰氨基水解酶最适培养基组成为: 肌酐 9g、酵母提取物 1.5g、麦芽汁 0.9g、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5g、定容 1L。适量混合金属离子溶液, 用 0.1mol/L pH5.5 磷酸缓冲液配制。在 250mL 三角瓶中装 50mL 培养基, 在 250r/min 的旋转摇床上 35°C 振荡培养 33h, 在此条件下菌株产酶量可达 1.0u/mL 发酵液。

**关键词:**肌酐酰氨基水解酶, 假单胞菌, 产酶条件

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0007-05

---

\* 国家“9.5”攻关计划资助项目(No. 96-C02-01-18)

\*\* 通讯作者

收稿日期:2000-02-24, 修回日期:2000-04-30

## CULTURE CONDITIONS FOR CREATININASE FORMATION BY *PSEUDOMONAS* SP. K9510

LIU Jian-Guo KE Ji-Yuan WANG Jin-Fang LI Gao-Xiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract:** From air bacteria capable of decomposing creatinine, three single independent strains K9510, K9511 and K9512 have been isolated. The highest creatinine amidohydrolase (EC 3.5.2.10; creatininase) producing strain K9510 was screened out. The strain K9510 was identified as *Pseudomonas* sp. The results of culture condition for creatininase formation by strain K9510 were obtained as follows: creatinine and creatine were found to be the effective inducers for enzyme formation; the solution of mixed metallic salts could stimulate cell growth and enzyme formation. The suitable medium for creatininase formation was consisted of 0.9% creatinine, 0.15% yeast extract, 0.09% malt extract, 0.05%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and some amount of the solution of mixed metallic salts at pH5.5. When the bacterium was grown in 250mL conic flask containing 50mL of the medium mentioned above on the rotary shaker (250r/min) at 35°C for 33 h, about 50 u creatininase was obtained.

**Key words:** Creatinine amidohydrolase (creatininase), *Pseudomonas* sp., Culture conditions for enzyme formation

几十年来,临床测定血清肌酐浓度最常用的方法是建立在 Jaff's 反应<sup>[1]</sup>基础上的碱性苦味酸显色法。虽然该法操作简单,但特异性差、干扰因素多、结果准确性差。八十年代发展起来的依赖于肌酐酰氨基水解酶的测定方法,除具有特异性高、抗干扰、准确、灵敏等特点外,特别适宜于自动化分析。现在国外临床诊断上已普遍采用,是个很有前途的方法。

肌酐酰氨基水解酶 (EC 3.5.2.10) 又称肌酐酶能特异性地水解肌酐为肌酸,是微生物代谢肌酐类化合物的重要酶。1937 年首次由 Dubos 和 Miller<sup>[2]</sup>在属于 *Corynebacterium* 分解肌酐的菌中发现,随后在 *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[3~5]</sup>, *P. Ovalis*<sup>[6,7]</sup> 和 *Arthrobacter ureafaerens*<sup>[8,9]</sup> 都发现此酶的存在。1979 年由 Kaorn Rikitake<sup>[10]</sup>从土壤分离得到的假单胞菌中分离纯化了该酶,随后用于肌酐含量的检测。近来,此酶的基因已在 *Pseudomonas* sp. PS-7 中克隆<sup>[11]</sup>。同时在 *Arthrobacter* sp. TE1826 中定位了整个肌酐分解代谢途径的多酶基因簇<sup>[12]</sup>。本实验室开展了血清肌酐浓度测定酶试剂盒的研究。从自然界分离得到能分解肌酐的 3 株菌株 K9510、K9511 和 K9512。本文报道产肌酐酰氨基水解酶活力较高菌株 K9510 的分类鉴定及产酶发酵条件的研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

肌酐, Sigma 公司产品 (C-4255); 肌酸, Sigma 公司产品 (C-3630); 酵母提取物, Oxoid 公司产品; 苦味酸, 广东台山化工厂产品, 分析纯; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 培养基

1.2.1 限制性斜面培养基: 肌酐 5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6g,  $\text{NaCl}$  6g, 琼脂 15g, pH7.0, 定容 1L。

1.2.2 种子培养基: 肌酐 5g, 酵母提取物 1.5g, 麦芽汁 0.9g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 用 0.1mol/L, pH5.5

磷酸缓冲液配制,定容 1L。

1.2.3 发酵培养基:肌酐 9g,酵母提取物 1.5g,麦芽汁 0.9g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5g,用 0.1mol/L pH5.5 磷酸缓冲液配制,定容 1L。

上述 3 种培养基均用  $0.55 \times 10^5 \text{Pa}$  灭菌 30min 待用。

### 1.3 菌体培养及粗酶液的制备

K9510 菌株在限制性斜面培养基上  $30^\circ\text{C}$  培养 48h,转接至种子液体培养基上,  $35^\circ\text{C}$ 、250r/min 摇床培养 48h,再扩大到发酵培养基上,相同条件培养 48h。然后发酵液在 8000r/min 离心 10min 收集菌体。生理盐水洗菌体 1~2 次,菌体悬浮在 50mmol/L pH7.5 磷酸缓冲液中,在  $4^\circ\text{C}$  下超声波破碎(20KC/S300W)3min,破碎液在 10000r/min 离心 20min,弃沉淀后上清液即为粗酶液。

### 1.4 菌体量测定

取 1mL 发酵液用蒸馏水稀释至 5mL,以相同稀释度的培养基为对照测定 600nm 处(1cm 光径比色杯)的光吸收值。菌体量以  $A_{600}$  表示。

### 1.5 酶活力测定

肌酐酰胺基水解酶催化肌酸生成肌酐,肌酐在碱性条件下与苦味酸反应生成橘红色物质,测定橘红色物质的生成量( $A_{520}$ )来确定肌酐酰胺基水解酶活力的大小。

在  $37^\circ\text{C}$  预温的 0.9mL 肌酸溶液(0.1mol/L)中加入 0.1mL 酶液并混匀,  $37^\circ\text{C}$  反应 10min。迅速移取 0.1mL 反应液至 1.9mL NaOH 溶液(0.5N)中,并加入 1mL 苦味酸(1%),在  $25^\circ\text{C}$  保温 20min,以水作空白测定 520nm 处的光吸收值( $A_{\text{test}}$ )。同时,以 0.1mL 酶液加入到冰浴的 0.9mL 肌酸溶液(0.1mol/L)中,同样随即取 0.1mL 加入到 1.9mL NaOH(0.5N)中,再与 1mL 苦味酸(1%)反应( $25^\circ\text{C}$ 、20min)后,以水作空白测定 520nm 处的光吸收值为  $A_{\text{blank}}$ 。按下式计算酶活力:

$$\text{酶活力(u/mL)} = \frac{(A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}) \times V_t \times B}{4.65 \times D \times T \times V_e}$$

式中: $V_t$  显色反应液总体积(3mL); $B$  酶反应液体积(1mL)/显色样品液(0.1mL);4.65 橘红色物质的微摩尔消光系数; $D$  比色杯光径(1cm); $T$  酶反应时间(10min); $V_e$  酶液体积(0.1mL)。

酶活力定义: $37^\circ\text{C}$ 、pH7.5,每分钟催化生成  $1\mu\text{mol}$  肌酐所需酶量为一个酶活力单位(u)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产酶菌株的分离

从空气中分离得到菌株 K9510(白色菌落)、K9511(白色菌落)和 K9512(黄色菌落)。3 株菌分别在发酵培养基上培养 48h,细胞破碎提取粗酶液,产酶量如表 1。K9512 菌株虽然生长旺盛,但产酶量低;K9510 和 K9511 是两个相似的菌株,产酶量相当。

表 1 产酶菌株分离结果

菌株	K9510	K9511	K9512
菌落形态	白色,生长缓慢	白色,生长缓慢	黄色,生长旺盛
产酶量(u/mL)	0.28	0.25	0.07

## 2.2 K9510 菌株初步鉴定

该菌株为革兰氏阴性杆菌,大小为  $0.4 \sim 0.6 \times 0.7 \sim 1.8 \mu\text{m}$ ,氧化酶阳性,接触酶阳性,O/F 为氧化型产酸,以端生丛毛运动。按 N. R. Krieg 1984 年提出的分类方法<sup>[13]</sup>,由本所蔡妙英研究员初步鉴定为假单胞菌属菌(*Pseudomonas* sp.)。

## 2.3 底物及其类似物对 K9510 菌株产酶的影响

分别观察了底物(肌酐)和底物类似物(肌酸)对 K9510 菌株产酶的影响(表 2)。结果表明肌酸诱导菌株产酶量比肌酐诱导的产酶量高。但考虑到本酶的使用目的,仍采用肌酐作为菌株产酶的诱导物。

表 2 底物及其类似物对菌株产酶的诱导

诱导物	无	肌酐	肌酸
浓度(%)	0	0.5	0.5
产酶量(u/mL)	0	0.162	0.240

## 2.4 培养基成分对 K9510 菌株产酶的影响

实验观察了肌酐、酵母提取物、麦芽汁和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  4 种培养基成分对 K9510 菌株产酶的影响。在发酵培养基中分别改动某种成分的浓度进行单因素试验。结果说明:当这 4 种培养基成分在培养基中的浓度为:肌酐 0.9%、酵母提取物 0.15%、麦芽汁 0.09%、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.05% 时,菌株发酵产酶量较高。图 1 表示肌酐浓度对菌株 K9510 产酶的影响。

## 2.5 发酵条件对 K9510 菌株产酶的影响

经数次实验发现发酵温度、培养基始 pH、接种量和通气量 4 个因素对菌株产酶影响较大。在发酵培养时分别进行单因素实验。结果表明:K9510 菌株在发酵温度  $35^\circ\text{C}$ 、培养起始 pH 5.5、接种量 5%、250mL 三角瓶装 50mL 培养基的条件下,发酵产酶量高。图 2 表示发酵温度对菌株 K9510 产酶的影响。

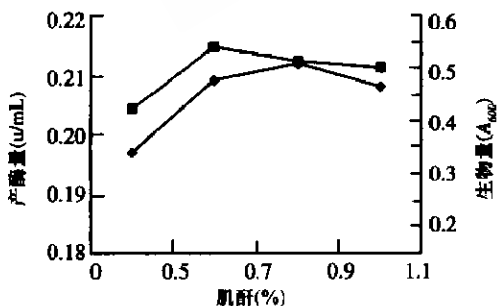


图 1 培养基成分对 K9510 菌株产酶的影响

◆-产酶量(u/mL), -■-生物量( $A_{600}$ )

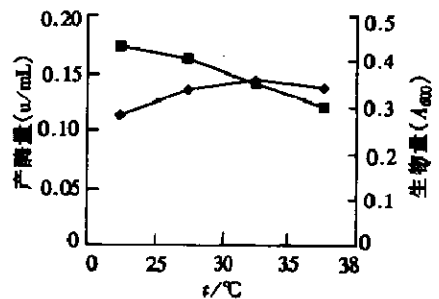


图 2 发酵条件对 K9510 菌株产酶的影响

◆-产酶量(u/mL), -■-生物量( $A_{600}$ )

## 2.6 金属离子对 K9510 菌株产酶的影响

金属离子对 K9510 菌株产酶活力的影响见表 3。结果表明实验所试几种金属离子单个使用时对菌株产酶的影响不大; $\text{Zn}^{+2}$  和  $\text{Cu}^{+2}$  离子有利于产酶, $\text{Mg}^{+2}$  和  $\text{Co}^{+2}$  离子不利于菌株产酶。而当在培养基中加入数种金属离子的混合溶液时,则大大地促进菌株生长和产酶。

表3 不同金属离子对菌株产酶的影响

金属离子	无	ZnCl <sub>2</sub> (200μg/dL)	CuCl <sub>2</sub> (200μg/dL)	MgCl <sub>2</sub> (200μg/dL)	CoCl <sub>2</sub> (200μg/dL)	混合离子*
菌体量(A <sub>600</sub> )	0.355	0.366	0.398	0.322	0.372	0.45
产酶量(u/mL)	0.152	0.208	0.179	0.142	0.134	0.508

\* 微量多种金属离子的混合溶液

## 2.7 K9510 菌株发酵产酶的时间过程

经上述实验,优化后的发酵培养基组成为:肌酐 9g,酵母提取物 1.5g,NH<sub>4</sub>Cl 0.5g,麦芽汁 0.9g,少量混合金属离子溶液(100μL/100mL),用 0.1mol/L pH5.5 磷酸缓冲液配制定容 1L。K9510 菌株在该培养基中,于 35℃、250r/min 摇床转速、接种量为 5%,发酵生长和产酶如图 3 所示。从 3h 到 21h 是菌株对数生长期,然后生长进入平衡阶段。菌株产酶量在 21h 左右达到一个小高峰,随后略有下降,在 33 h 左右菌株进入产酶旺盛期(每毫升发酵液产酶量可达 1u),再随着发酵时间的延长菌株产酶量下降。

## 2.8 讨论

从空气中分离的假单胞菌菌株 K9510 在肌酐或肌酸存在下,可诱导产生肌酐酰氨基水解酶。其产酶能力与金属离子关系很大,这与 Rikitake K 等报道的结果相符<sup>[10]</sup>。产酶条件优化后,K9510 菌株发酵产酶每毫升发酵液可达 1 个酶活力单位。进一步分离纯化后得到的肌酐酰氨基水解酶可用于临床分析血清肌酐浓度(结果另文报道)。

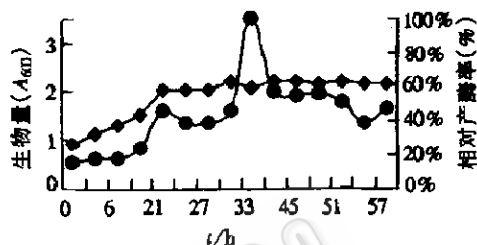


图3 K9510 菌株发酵产酶的时间曲线

◆-生物量(A<sub>600</sub>),●-相对产酶率(%)

## 参 考 文 献

- [1] Jaff M, Über den Niederschlag. Z Physiol Chem, 1886, 391~400.
- [2] Dubos R, Miller B F. J Biol Chem, 1937, 121:429.
- [3] Kopper P H. J Bacteriol, 1947, 54:359.
- [4] Kopper P H, Beard H H. Arch Biochem, 1947, 15:195.
- [5] Kopper P H, Robin L. Arch Biochem, 1950, 26:458.
- [6] Roche J, Lacombe G. Biochim Biophys Acta, 1950, 6:210.
- [7] Appleyard G, Woods D D. J Gen Microbiol, 1956, 14:351.
- [8] Kaplan A, Naugle D. Mol & Cell Biochem, 1974, 3:9.
- [9] Kaplan A, Szabo L L. Mol & Cell Biochem, 1974, 3:17.
- [10] Rikitake K, Oka I, Ando M, et al. J Biochem, 1979, 86:1109~1117.
- [11] Yamamoto K, Oka M, Kikuchi T, et al. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59:1331~1332.
- [12] Nishiya Y, Toda A, Imanaka T. Mol Gen Genet, 1998, 257:581~586.
- [13] Palleroni N J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1 Williams & Wilkins Baltimore/London, 1984, 41~199.