

从普通变形杆菌生产脲酶的研究

倪星忠 黄 晓 黄飞雪 卢惠卿

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

本文提出了以普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 发酵生产脲酶的方法。文中对发酵条件进行了系统的研究, 使发酵得率达到每毫升培养基 8.4u, 时间仅需8h。同时还建立了提取和纯化的工艺, 使能达到工业化生产水平。临床应用证明该脲酶可代替巨豆脲酶, 为脲酶的生产开辟了一条新的途径。

关键词 普通变形杆菌; 脲酶; 发酵

脲酶在医学和生化方面有广泛的用途, 一般均从巨豆等豆科植物中提取。在许多微生物中也存在着脲酶^[1-4]。但其含量极低, 不能用作生产。本文作者经筛选菌种及发酵工艺的摸索, 建立了一套从变形杆菌发酵生产脲酶的工艺方法。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌种: 普通变形杆菌 [*Proteus vulgaris*(MCCCB)49102]由本所检定处提供。

2. 斜面种子培养基(半综合琼脂斜面培养基): 乳酪胰酶消化液(6h), 总氮250mg, 酵母透析液5ml, NaCl 0.5g, 味精0.1g, 琼脂2.2g或适量, 交换水加至100ml。

3. Todd-Hewitt 培养基: 该培养基组成如下: 牛心浸汁 500ml, 蛋白胨 20g, 葡萄糖2g, NaCl 2g, Na₂HPO₄ 0.4g, Na₂CO₃2.5g, 蒸馏水 500ml。此培养基的pH为7.8。

4. pH8.0 缓冲液: 1.26g EDTA Na₂ 和 5.77g K₂HPO₄ 用无氨水溶解至1L, 此缓冲液pH为8.0±0.1。

(二) 方法

1. 基本培养方法: 从斜面将菌接种至培养液中, 37℃静置过夜。在发酵培养开始时按 4:100 的比例将它接种至 5L 或 30L 发酵罐中进行发酵培养, 以尿素作诱导剂, 定时取出菌液, 离心分离得菌体, 用 pH8.0 缓冲液复溶, 再用超声等粉碎菌体, 高速离心 (14000g × 60min) 去除细胞碎片, 得粗制酶液, 取样测定酶活力。

2. 酶活力测定: 25℃时每分钟催化尿素水解得 1μmol (NH₄⁺) 所需的酶量定为一个酶活力单位。具体测定方法见文献^[5]。

3. 蛋白测定方法: 采用改良 Lowry 方法^[6]。

结 果

(一) 培养条件的选择

1. 培养基成分的研究: 对多种培养基的预实验, 发现 Todd-Hewitt 培养基较

本文于1987年11月17日收到。

本工作属国家“七五”重点攻关项目, 已通过鉴定。

上海市第六人民医院、华山医院、中山医院、纺织医院、纺三医院、儿童医院、徐汇区中心医院为本脲酶试剂盒进行了全面的考核, 特此致谢。

好,然后再以Todd-Heutt培养基为基础,改变其中牛心浸汁、碳源及氮源的含量,配成以下6组培养基:(1) Todd-Heutt培养基 (2) 牛心浸汁含量增加50% (3) 牛心浸汁含量减少30% (4) 葡萄糖、蛋白胨组分含量均增加 100% (5) 尿素量增加50%,使其最终浓度为 3 % (6) 尿素量减少50%,使其最终浓度为 1 %。每组配制 3 瓶,每瓶 100ml,进行摇瓶培养,所得结果列于表 1。

表 1 培养基配方的选择
Table 1 Choice of medium formula

	1	2	3	4	5	6
各组酶液总活力均值 The mean activity of each group(u)	542.3	642.4	245.8	427.2	266.4	275.0

上述结果说明牛心浸汁增加50%对结果无影响,而其他成分的改变均使结果降低,故仍取Todd-Heutt培养基。

2. 培养温度对产酶率的影响: 由图 1 可见培养的最适温度是 25℃。在偏离 25℃时,温度稍有变化,酶的产率即急骤下降。因此,培养温度必须严格控制在25 ± 0.5℃之内。

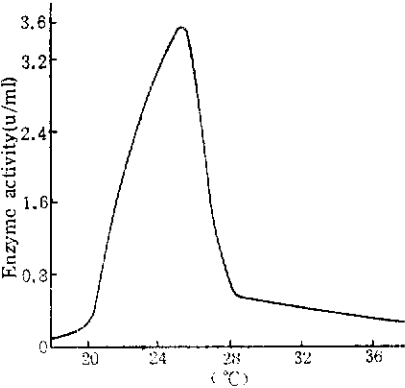


图 1 培养温度对产酶的影响

Fig.1 Effect of Temperature on activity

3. pH 对 培养结果的影响: 培养过程中培养液pH的变化见图 2。当加入尿素后,由于产生大量NH₄⁺,培养基的 pH 迅速升高。因此,加入尿素后应对培养基的 pH 进行控制。图 3 为加入尿素后调节、控制培养液的 pH 为不同值时所得酶的产率,由图可见最适 pH 为 7.4。为此在加入尿素后应该用 2mol/L HCl 调节培养基的 pH,使之维持 7.4。

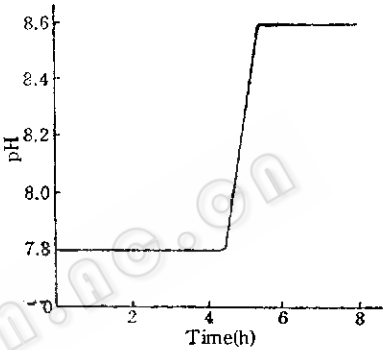


图 2 培养过程中pH变化

Fig.2 The pH change during fermentation

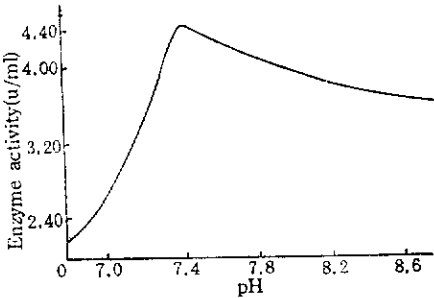


图 3 加尿素后4h内控制不同pH值对产酶的影响

Fig.3 The effect of pH after adding urea on enzyme yield

4. 培养及加尿素的时间对培养结果的影响: 作以下 4 组实验: 加尿素前培养时间分别为 2、4、6、8h, 加入尿素后取样, 测定时间也分别取 2、4、6、8h 4 组时间, 测得结果见图 4。由图 4 可见最佳的培养时间是先培养 4h, 再加入尿素, 然后再培养 4h 结束。

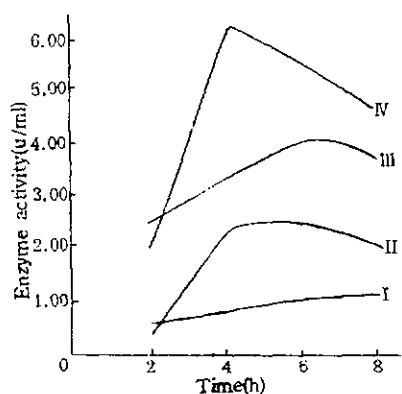


图 4 加入尿素后继续培养时间对产酶的影响

Fig.4 The effect of fermentation time after adding urea on enzyme activity

I、II、III、IV 分别代表加尿素前培养 8、2、6、4h

I、II、III、IV represent

before adding urea cultivation time 8, 2, 6, 4h respectively

5. 小型发酵罐中通气量与转速的选择：设计正交试验，其中通气量取 1:0.5 及 1:0.25 两组数据，转速为 200 及 300rpm 两组，选用正交表 $L_4(2^2)$ ，所得结果见表 2。方差分析的结果为： $F_{(1,4)} =$

表 2 正交试验表

Table 2 Orthogonal operations

转 速 Stirring (rpm)	通气量 V(culture) Aeration V(aeration per min)	酶 活 力 Activity (u/ml)
200	1:0.25	3.8, 5.2
200	1:0.5	3.1, 3.05
300	1:0.25	3.4, 1.5
300	1:0.5	1.7, 1.9

7.71, $F_{\text{转速}} = 8.56 > 7.71$, $P < 0.05$;
 $F_{\text{通气量}} = 2.38 < 7.71$, $P > 0.05$; $F_{\text{交互}} =$
 $0.22 < 7.71$, $P > 0.05$ 。结果表明通气
 量为 1:0.5 与 1:0.25 无显著差别，转速以
 200rpm 为好，且在此条件下转速与通气
 量无交互影响。

6. 培养基的除菌处理对结果的影响：根据常规，牛心浸汁和培养基都要进行高压灭菌，但这将破坏有效的营养成分，为此，将高压灭菌处理的牛心浸汁和培养基与除菌过滤的牛心浸汁和培养基进行比较，所得结果列于表 3。

表 3 不同除菌方法对产酶影响

Table 3 The effect of sterilizing methods on activity

除 菌 方 式 Sterilizing method		酶 得 率 Activity(u/ml)
除菌过滤 Filter	1	6.31
	2	6.22
	3	8.09
高压灭菌 Autoclaving sterilization	1	3.56
	2	3.98
	3	3.56

表 3 的结果表明当牛心浸汁液和培养基不采用高压灭菌处理而进行除菌过滤时，酶的得率会提高一倍左右，($P < 0.02$)。实验中还发现：牛心的新鲜程度对得率也有影响。因此应尽可能采用新鲜牛心配制培养基。

根据以上的结果，我们确定普通变形杆菌 49102 生产脲酶的培养条件为：

培养基：Todd-Heuitt 培养基，应采用除菌过滤的方法，而不能用高压灭菌法。

根据以上的条件，我们重复培养了多批。培养的体积为 3L 及 20L，所得结果列于表 4，可见工艺极为稳定。

(二) 酶液的提取和纯化

发酵结束后离心收集菌体，并用无氨水洗涤二次，再用体积为原培养液十分之一的 pH8.0 缓冲液复溶菌体，经高压匀浆破碎，再经高速离心 ($14000g \times 60\text{min}$ 或 $20000g \times 30\text{min}$) 除去细胞碎片，所得酶液对 pH8.0 缓冲液透析除去 NH_4^+ ，再经除菌过滤，所得酶液即可用于配制脲酶——

表 4 各批培养结果
Table 4 Culture results

培养体积 Culture volume	酶 活 力 Activity (u/ml)	比 活 Specific activity (activity per mg protein)
3	7.93	10.4
3	8.43	10.6
3	6.70	10.7
3	7.26	10.4
3	6.88	10.7
20	8.12	11.2

Berthelot法试剂盒。

纯化方法为：将上述酶液经Sephadex-G200柱（1:30），回收率为53%，所得酶比活为18u/mg，峰值部份再过DEAE-SephadexA-50柱（2:15），用加NaCl的

上述缓冲液进行梯度洗脱，NaCl浓度为0.2—0.6mol/L。总回收率为28%，所得酶比活为40u/mg。收集峰值部分进行性质的分析，测得最适pH为8.0，最适温度为55℃，在上述缓冲液中，37℃时对尿素的 $k_m = 1 \times 10^{-2}$ mol/L， $Q_{10} = 1.1$ ， $E = 1.82$ kc/mol。

（三）酶的稳定性

在酶液中加入稳定剂进行冻干，然后观察其稳定性。观察方法为：将酶分二组，第一组置37℃3周后再置4℃，第二组直接放置4℃，逐月测定活力，结果列于表5。从结果可见其稳定性在一年以上。

表 5 冻干酶的稳定性
Table 5 The stability of lyophilized urease

	时 间 (月) Time(month)										
	Primary	1	2	3	4	5	6	7	10	12	15
酶活力 I	30	32	34	31	34	30	33	32	32	30	32
Activity II (u)	30	33	33	33	35	30	30	30	30	31	30

讨 论

1. 脲酶的主要用途是用于血和尿中尿素氮测定。国外有的公司试剂规格中规定酶制品中L-精氨酸酶和L-天冬酰胺酶的含量不得超过0.1%。因为这两种酶会分别分解样品中L-精氨酸和L-天冬酰胺产生 NH_4^+ ，从而影响测定。在血清中分别加入10mg/100ml的L-精氨酸及5mg/100ml的L-天冬酰胺（为正常生理值的十倍），再用本粗制酶进行测定，发现加入前后的测定结果一样。可见本粗制酶制剂中这两种杂酶的含量已达要求。此外，将比活仅为1.8u/mg的粗酶绘制标准曲线及测定定值质控血清，所得结果均符合要求。这证明利用本粗制酶液已可配制尿素

氮测定试剂盒。

2. 将上述未经纯化的脲酶配制成脲酶——Berthelot法尿素氮测定试剂盒（酶浓度为2u/ml）在血清中平均回收率为99.8%，与Boehringer出品的巨豆脲酶作对照107例，样品中尿素氮含量为8.8—101.7mg/100ml，测得相关系数 $\gamma = 0.9975$ ，回归方程为 $y = 0.9932x - 0.3812$ [7]。同时上海市七家医院将该试剂盒与进口自动分析仪（采用进口试剂）进行比较，得到同样的结果。可见，变形杆菌脲酶完全可代替巨豆脲酶进行临床生化测定。

3. 近年来，国外曾有人提出用微生物发酵生产脲酶的方法。其中也包括变形杆菌，并申请了专利 [8]。但因其中变形杆菌脲酶得率极低（0.3u/ml），不实

用,故在该专利批准书中未予承认^[9]。采用本文提出的方法,从普通变形杆菌提取脲酶,则发酵时间短、得率高、工艺简单,成本极低,适于大量生产。且实验证

明完全可取代巨豆脲酶,这就为脲酶的生产开辟了一个新的来源和新的途径,也为在我国普遍采用脲酶分析法创造了有利条件。

参 考 文 献

- [1] Larson A.D. et al., *J. Bact.*, 68:67, 1954.
- [2] Magana-Plaza et al., *Biochemica et Biophysica Acta*, 242:230, 1971.
- [3] 杨正时等, *微生物学报*, 21 (3): 318, 1981.
- [4] Seneca, H. et al., *Nature*, 193:1106, 1962.
- [5] Peterson, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 175:1, 1948.
- [6] Wang C.S. et al., *Anal Biochem*, 63:314, 1975.
- [7] 公开特许公报, 昭58-86081.
- [8] 特许公愿公告, 昭60-55119.

PRODUCTION OF UREASE BY FERMENTATION OF *PROTEUS VULGARIS*

Ni Xingzhong Huang Xiao Huang Feixue Lu Huiqin

(Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Public Health, Shanghai)

The present paper reports a process for production of urease by fermentation of *Proteus vulgaris*. The fermentation conditions, including formula of culture medium and its sterilization, temperature, pH, aeration, stirring rate etc. have been systematically studied. The yield reaches 8.4u per milliliter culture medium in 8h. The procedure of extraction and purification has been established, so it can be produced industrially. Urease produced by this method have been proved by clinical use that it may be able to replace the urease from Jack bean. This method proved a new approach for the production of urease.

Key words

Proteus vulgaris; urease; fermentation