

# 产朊假丝酵母尿酸酶的快速提取法及产酶最适条件

张惠文 张淑贤 王显明 王竺

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳)

刘学成 董洪杰 罗军 苏跃新

(沈阳军区总医院检验科, 沈阳)

**摘要** 利用表面活性剂及还原剂处理产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 细胞, 在培养液 pH7—11 范围内, 可使 *C. utilis* 产生的尿酸酶快速地释放到胞外。当 Triton X-100 及巯基乙醇浓度为 0.1%, 培养液 pH 为 8 时, 获得的最高酶活性为 4.78u/g 湿菌体, 最适 pH 值为 8—9, 处理时间为 4 小时。利用该方法获得的最高酶活性高于一般常规处理方法, 即超声波法及透析法, 它们的酶活性分别为 1.9u/g 湿菌体及 0.76u/g 湿菌体。

**关键词** 产朊假丝酵母 Y92; 尿酸酶; 表面活性剂; 还原剂

尿酸酶 (EC 1.7.3.3) 是一种重要的临床诊断用酶。以其特有的高特异性和高灵敏度而被广泛地应用到尿酸的临床测定及其他疾病治疗中。

尿酸酶广泛存在于细菌、霉菌、假丝酵母菌等微生物中<sup>[1]</sup>。前人曾经对尿酸酶的提取方法, 精制条件及其特性进行了广泛深入的研究。Kralova 等人对六种不同的提取方法进行了比较研究, 其结果是以超声波法所得到的酶的活性为最高<sup>[2]</sup>。然而这些方法不适宜大规模工业化生产。Sadaji Yokayama 等人利用表面活性剂 Triton N-101 及还原剂 2-巯基乙醇进行了酶提取方法的研究, 他们得到的酶活性高于常用的超声波法及细胞自溶法<sup>[3]</sup>。

本文报道利用表面活性剂 Triton X-100 及还原剂巯基乙醇进行尿酸酶提取的方法及其最适条件研究的结果。

## 材料与 方法

### (一) 菌种

产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) Y92, 来源于中国科学院沈阳应用生态研究所菌种资源组。

### (二) 培养基

1. 麦芽汁斜面培养基。

2. 发酵培养基 (g/dL): 蔗糖 5, 玉米浸提液 3, 尿素 0.84,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  0.15,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.15, KCl 0.1, pH 为 6.2。500 毫升三角瓶盛入 100 毫升培养基, 0.6kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟。

3. 诱导培养基 (g/dL): 蔗糖 5,  $Na_2HPO_4$  0.1, KCl 0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05, 尿酸 0.05, pH 为 7.2, 0.6kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟。

### (三) 菌体培养

Y92 菌株在斜面培养基上 28℃ 培养 24 小时, 然后接入发酵培养基中, 28℃ 振荡培养 16 小时, 得到的菌体为二级种子。将二级种按 10% 比例接入发酵培养基中, 28℃, 200r/min 旋转摇床上培养 22 小时, 最终发酵液 pH 为 4.5—5, 菌体收率约为 5g 湿菌体/100mL。发酵得到的菌体经三次离心洗涤 (离心机: SCR 20BA HITACHI)。5000r/min, 离心 10 分钟, 将上述得到的菌体按 5g/dL 接种量接入诱导培养基中, 28℃, 200r/min 旋转摇床培养 3 小时, 最终 pH 为 5—5.5, 得到诱导后的细胞悬浮液。

### (四) 粗酶提取

将诱导后的细胞悬浮液用 1N NaOH 调节

pH 到 8.0, 然后加入 Triton X-100 及巯基乙醇, 在 25℃, 100r/min 条件下处理 2 小时。最后将处理的细胞悬浮液在 5000r/min 条件下冷冻离心 20 分钟, 上清液为粗酶提取液, 进行酶活测定。

(五) 一般尿酸酶的常用提取方法

1. 超声波破碎法: 将诱导后的细胞悬浮在一倍体积的 pH 为 8.5, 50mmol/L 的硼酸-硼砂缓冲液中, 在 50Hz, 600W 条件下破碎 15 分钟 (CSS-200 型超声波粉碎机), 得到的悬浮液于 14000r/min 4℃ 离心 20 分钟, 上清液为粗酶提取液。

2. 透析法<sup>[4]</sup>。

(六) 酶活性的测定

应用 pH8.5, 50mmol/L 的硼酸-硼砂缓冲液配制 30μmol/L 尿酸底物液, 在 30℃ 条件下测定加入酶液后 A<sub>293nm</sub> 的降值。以蒸馏水作空白, 按下列公式计算酶活性:

$$U/L = \frac{\Delta A_{293} \cdot \text{反应液总量} (\mu l)}{\mu mol \epsilon_{293} \cdot \Delta t \cdot \text{酶量} (\mu l)}$$
$$mol \epsilon_{293} = 0.126$$

结 果

(一) Triton X-100 浓度对酶活性的影响

固定巯基乙醇的浓度为 0.1% (V/V), 取不同浓度的 Triton X-100, 酶活性测定结果见图 1。当 Triton X-100 浓度为 0 时, 酶活性

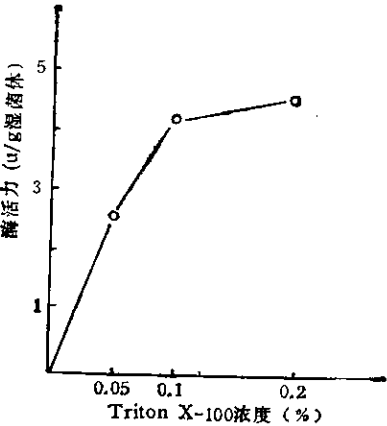


图 1 Triton X-100 浓度对酶活性影响

为 0; 而当 Triton X-100 浓度达到 0.1% 或大于 0.1% 时, 酶活性有很大的提高并趋于稳定。

培养时间为 22 小时, 诱导时间 3 小时, 处理时间 2 小时。

(二) 巯基乙醇浓度对酶活性影响

固定 Triton X-100 浓度为 0.1%, 取不同浓度的巯基乙醇, 酶活性测定结果见图 2。当巯基乙醇浓度为 0.1% 或者大于 0.1% 时, 酶活性趋于稳定, 酶活性有明显的增加。

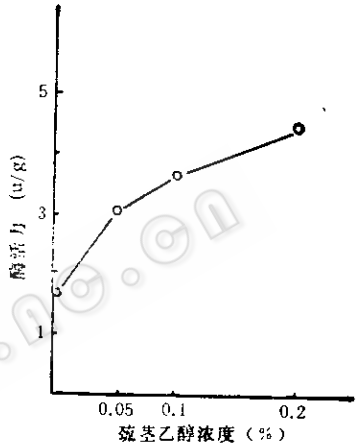


图 2 巯基乙醇浓度对酶活性影响

培养时间为 22 小时, 诱导时间为 3 小时, 处理时间 2 小时。

(三) 不同 pH 对酶活性的影响

将诱导后的细胞经 3 次冷蒸馏水洗涤, 离心 (5000r/min) 20 分钟, 得到的细胞分别悬浮于不同 pH 值的硼酸-硼砂 50mmol/L 缓冲液中 (按 5g 菌体/100ml 接种量)。Triton X-100 及巯基乙醇浓度分别为 0.1% (V/V), 测定结果表明, 最适 pH 值为 9, 酶在 pH 值 7—11 范围内能保持一定的活性 (表 1)。

表 1 不同 pH 值对酶活性影响

pH 值	酶活 (u/g 湿菌体)
7	1.28
8	2.27
9	3.14
10	2.39
11	0.96

#### (四) 不同处理时间对酶活性的影响

取 Triton X-100 及巯基乙醇的浓度分别为 0.1%, (V/V), 不同时间进行采样, 离心后测定酶活性的变化情况, 结果见表 2。处理时间在 1—4 小时之间酶活性呈上升的趋势, 到 4 小时时酶活性达到最高为 2.86u/g 湿菌体, 5 小时时酶活性急剧下降。

表 2 不同处理时间对酶活性影响

处理时间(h)	酶活 (u/g 湿菌体)
1	1.20
2	1.91
3	2.38
4	2.86
5	0.96

#### (五) 不同通气量对酶活性影响

用 500ml 三角瓶分别盛入 50ml、100ml、150ml、200ml 的诱导培养基, 并保持 Triton X-100 及巯基乙醇浓度分别为 0.1%, 按 5g/100ml 接种量接种, 处理时间为 2 小时。结果 150ml 时酶活性达到最高为 3.58u/g 湿菌体。

#### (六) 不同处理方法对酶活性影响

诱导以后经洗涤的细胞分别采取以下四种不同的处理方法进行处理:

1. Triton X-100 及巯基乙醇直接加入到诱导以后的 pH 为 8 的菌悬液中进行处理。

2. Triton X-100 及巯基乙醇加入到 pH 为 8.5 的 50mmol/L 硼酸-硼砂缓冲液中进行处理; 菌体经离心洗涤后按 5g 湿菌体/100ml 接入该缓冲液中。

3. 超声波法。

表 3 不同处理方法对尿酸酶活性影响

处 理 方 法	酶活 (u/g 湿菌体)
Triton X-100 巯基乙醇 培养基法	2.98
Triton X-100 巯基乙醇 缓冲液法	4.78
超声波法	1.9
透析法	0.76

4. 透析法。

不同处理方法获得的结果列于表 3。从表 3 可以看出: 第 2 种方法获得的尿酸酶的活性为最高, 酶活性可达 4.78u/g 湿菌体。

## 讨 论

Triton X-100 是一种非离子型的表面活性剂, 它主要应用于化工、食品、医药等行业。将它用来处理微生物细胞进行酶提取, 国内尚未见报道。Sadaji Yokayama 等人曾经对 Triton N-101 及 2-巯基乙醇进行了研究, 结果表明: Triton N-101 及 2-巯基乙醇对于酵母菌细胞内尿酸酶的快速提取是十分有效的。同时他们还利用电子显微镜对处理后的细胞进行了观察, 发现细胞形状略有变小, 没有发现细胞破裂现象。从以上分析可知, 表面活性剂主要是作用于细胞的表面结构, 使细胞的通透性发生了改变, 细胞内的一部分物质包括尿酸酶释放到胞外。而还原剂则主要起一种保护作用, 它保护释放到胞外的尿酸酶免于失活。从我们的实验结果也可以看到, 当 Triton X-100 浓度为 0 时, 酶活性也为 0, 标志着没有酶的释放。而当不加入巯基乙醇时, 只要 Triton X-100 存在, 就有酶活性存在, 并且随着 Triton X-100 浓度的增加酶活性增高, 这就证明了 Triton X-100 对于酶的释放是必需的。

目前, 制取尿酸酶主要是采用超声波法、细胞自溶法及透析法等。实验结果表明, 利用这些方法费时, 设备复杂, 条件要求严格, 得到的粗酶提取液杂蛋白含量高, 不利于进一步精制, 而且得到的酶活性较低, 而利用表面活性剂及还原剂提取尿酸酶是一种十分有效的方法。

## 参 考 文 献

1. Lehejckova R et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8(5): 314, 1986.
2. Kralova B et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8(2): 99—102, 1986.
3. Sadji Yokayama et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 10, January, 1988.
4. Fukumoto J et al.: Japan Patent under Application, 41-6346, 1966.