

一株芽孢杆菌产生脲酶条件及脲酶提取研究

谢新东 陈济琛 林新坚 郑时利 刘中柱

(福建省农业科学院土肥所,福州 350013)

摘要 研究了一株芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 产生脲酶的条件及脲酶的提取。结果表明,芽孢杆菌适宜的生长及产酶温度为 35~37℃,产酶受底物——尿素的诱导。静止培养有利于产酶, Ni²⁺对产酶没有影响。脲酶粗提物经硫酸铵盐析、热处理、Sephadex G-200 及 DEAE-纤维素柱层析等提取步骤脲酶比活力提高了近 70 倍,回收率 15.5%。

关键词 芽孢杆菌,脲酶,培养,提取

脲酶 (EC3.5.1.5) 是一种很重要的酶,它在临床上血和尿液中脲的测定、畜牧业牛羊瘤胃中脲酶活性的变化、细菌鉴定分类指标以及农业生产中尿素利用状况及尿素利用率等方面的应用有着重要的意义。脲酶结晶首次是由 Sumner 用刀豆粉提取得到的^[1],关于刀豆脲酶已有许多报道^[2,3]。微生物是脲酶的主要来源,大多数细菌、放线菌、真菌等均能产生脲酶,已报道的细菌就有 200 多种^[4]。Larson 和 Kallio 首先对细菌 *Bacillus pasteurii* 产生的脲酶进行了纯化研究^[5],而 Plarza 等则从细菌 *Proteus rettgeri* 中获得与磷酸复合的酶结晶。对这些微生物脲酶的研究主要侧重在营养和分类学方面,而对酶的性质和应用研究较少^[6]。为了今后脲酶的大量提取、比较土壤脲酶与刀豆脲酶的异同、推动土壤脲酶发生演化及脲酶抑制剂的研究,本文就脲酶产生菌的培养和提取作了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

1.1.1 从土壤中分离到的脲酶活性较高的一

株芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

1.1.2 引自福州味精厂的谷氨酸生产菌(具有脲酶活性,作为对照菌株)。

1.2 培养基

纯化和保存用培养基 A(%):蛋白胨 0.5,牛肉膏 0.3, NaCl 0.5,琼脂 1.8, pH7.0;液体发酵用培养基 B(%):蛋白胨 0.3,葡萄糖 1.0, KH₂PO₄ 0.05, Na₂HPO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.005,尿素 0.5, pH7.0(1 × 10⁵Pa 灭菌 30min),其中葡萄糖和尿素混合溶解定容至 100ml,过滤灭菌后加入。

1.3 脲酶活性测定

采用改进的 Hoffman 与 Pomeřko 光电比色法^[7]。

1.4 尿素转化率

$$\text{转化率} (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A 为对照基质中尿素含量

B 为试验组基质中尿素含量

1.5 缓冲液

1995-04-03收稿

C: KH_2PO_4 0.0285 mol/L, Na_2HPO_4 0.035 mol/L, EDTA 0.0005 mol/L, β -Mercaptoethanol 0.088 mol/L, pH6.5.

D: KH_2PO_4 0.0282 mol/L, Na_2HPO_4 0.0718 mol/L, EDTA 0.001 mol/L, β -Mercaptoethanol 0.04 mol/L, 用 NH_4OH 调 pH7.2.

1.6 蛋白质测定

用 751 型分光光度计测定。

2 结果与讨论

2.1 芽孢杆菌产生脲酶的条件

2.1.1 温度对菌株尿素转化率的影响: 从图 1 可见, 尿素转化率受培养温度、时间的影响。不

同的菌株对温度的耐受力也不相同。随着温度的升高, 尿素转化率逐渐上升。培养基质中 pH 值也逐渐升高。当温度达到一定范围, 尿素转化率迅速降低, 芽孢杆菌在 30~35°C 条件下培养 48h 尿素转化率最高, 之后尿素转化率明显降低。45°C 培养 48h 尿素转化率仍达 75%。相比之下, 谷氨酸产生菌无论培养 24h 还是 48h, 当温度达 37°C 时尿素转化率下降, 到 45°C 时转化率趋于 0, 而且保持较高尿素转化率的温度范围也不如芽孢杆菌。通过尿素转化率与温度的关系说明温度影响菌体的生长、酶的分泌, 从而影响转化率。此外说明芽孢杆菌较耐高温, 适宜生长温度在 35~37°C, 谷氨酸产生菌则低于 35°C。

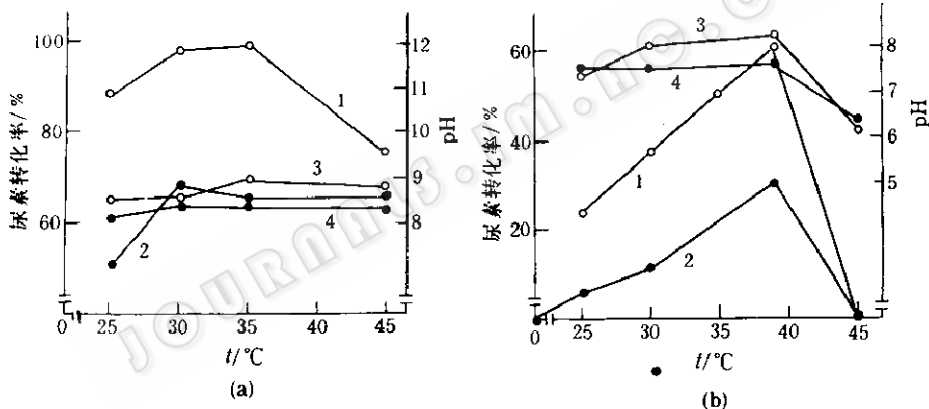


图 1 温度对两菌株尿素转化率的影响

(a) 芽孢杆菌, (b) 谷氨酸产生菌

1. 48h 转化率, 2. 24h 转化率, 3. 48h pH, 4. 24h pH

2.1.2 尿素(底物)浓度与酶活关系: 试验结果表明, 脲酶活性的高低受底物浓度和培养时间的影响。在 2%、4%、6% 的底物浓度时, 培养 4h 酶活最高, 而后下降。8% 和 10% 底物浓度时, 酶活最高分别在 8h 和 12h, 而后下降。在 2%、4% 和 6% 底物浓度时培养 8h, 尿素转化率分别为 72%、84% 和 78%, 培养 12h 转化率达 100%。10% 底物浓度时培养 24h, 转化率只 50%, 48h 后才全部分解。由此可见, 不同底物浓度, 随培养时间延长, 胞内酶活性下降, 菌体脲酶受底物的诱导, 而且酶活的高低受底物量的影响, 尿素转化率最高值总是较菌体

脲酶活性最高值滞后 8~36h 不等。因此芽孢杆菌所产生的脲酶是一种诱导酶, 底物被分解后的产物——氨的积累对酶起着反馈作用, 并影响产生菌的生长, 从而影响酶活和尿素转化率。

2.1.3 不同镍浓度与尿素转化率: 二价镍离子是脲酶的重要辅助因子。在我们的试验范围(镍离子浓度为 0~0.001%)内, 脲酶活性与尿素转化率均不受影响。但这并不排除高浓度镍及其它二价金属离子对酶的影响, 如 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} , 高浓度的 Mn^{2+} 不但不抑制脲酶, 反而对酶有激活作用。

2.1.4 培养方式对两菌株脲酶活性的影响:

芽孢杆菌在静止培养时,培养 48h 较培养 24h 尿素转化率高,而摇床振荡培养脲酶活性总体偏低。以好氧的谷氨酸产生菌作对照,其结果与前者正好相反。可见芽孢杆菌采用静止培养有利于产酶,提高尿素转化率。

2.1.5 培养时间与菌数、酶活的关系: 菌数随培养时间延长而不断增加,24h 菌数最多为 8.6×10^{13} 个/ml,随后菌数下降。结合上述尿素浓度与酶活关系的结果不难看出,菌体数量与脲酶活性、尿素转化率有一定的联系,随着产物氨的积累,一方面对脲酶起反馈抑制作用,另一方面培养基中 pH 达到一定值,影响产生菌的生长繁殖甚至存活。

2.2 脲酶的提取、纯化

2.2.1 菌体的培养制备: 菌体培养采用培养基 B,装量 100ml/500ml 三角瓶, 1×10^5 Pa 灭菌 30min,接种二环,30~32℃ 静止培养 24h 后菌液经 7000r/min 离心 20min,收集菌体,经无离子水洗涤两次,缓冲液 D 洗涤一次,离心收集菌体,反复直至氨浓度最小为止,培养三批共收集湿细胞 32g。

2.2.2 脲酶粗提物制备: 32g 湿细胞加缓冲液 D 45ml(1:1.5)于 4℃ 预冷,以 14A 频率超声波破碎处理 2min,间歇处理 3 次,破碎液于 1300r/min,4℃ 下离心,沉淀物加 40ml 缓冲液 D 再次依上述方法破碎、离心、收集合并两次所获上清液,即为脲酶粗提物。

2.2.3 脲酶的提取纯化: 粗提物用 60% 的硫酸铵盐析、静置过夜、离心、弃上清液,沉淀物于缓冲液 C 中透析过夜至无铵为止。55℃ 热处理 10min,冷却后离心,弃沉淀物,所得上清液用 Sephadex G-200 进行柱层析,酶液占柱体积 10%~15%,缓冲液 D 洗脱,流速每 min 5~6 滴,约每 5ml 收集一管进行连续分部收集,测定每一部分的脲酶活性及蛋白含量。将上述含脲酶活性的管数集中,进行 DEAE-纤维素 DE-52 柱层析,以 0~1.0mol/L NaCl 缓冲液 C 进行线性梯度洗脱,流速每 min 约 0.5ml。图 2(a)表明经交联葡聚糖凝胶柱层析

表 1 脲酶的提取纯化过程

提取步骤	总活力单位 (U)	总蛋白 (mg)	比活力 (U/mg)	回收率 (%)
粗提物	2144.94	4168.25	0.51	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	1405.32	550.00	2.56	65.50
55℃ 热处理 10min	1375.76	389.76	3.53	64.10
Sephadex G-200 柱层析	1148.28	201.12	5.71	53.50
DEAE-纤维素柱层析	333.33	4.80	69.37	15.50

U: 脲酶活性单位,1 酶活力单位定义为 25℃ 标准分析条件下每 min 水解 1μmol 尿素所需的酶量

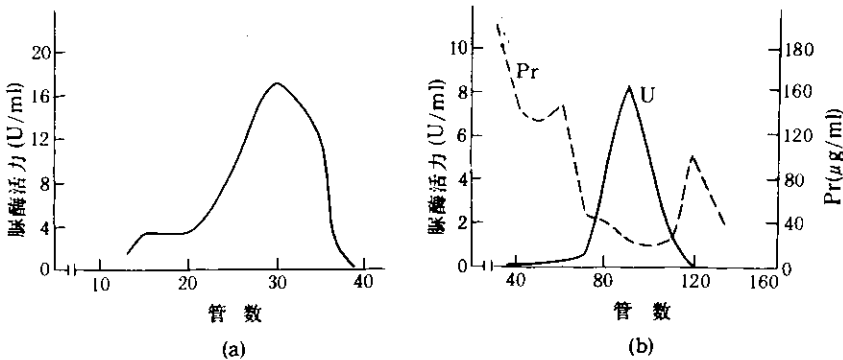


图 2 Sephadex G-200 和 DEAE-纤维素柱层析

(a) Sephadex G-200 柱层析, (b) DEAE-纤维素 DE-52 柱层析

脲酶活性 (U/ml), Pr: 蛋白质含量 (μg/ml)

(30×0.9)后,流出的脲酶分布在第23~36管之间,酶活高峰在第30管。图2(b)表明经过DEAE-纤维素柱层析(30×0.8)分离后,脲酶活性主要分布在第80~110管,且蛋白含量低,比活性高。其它几个杂蛋白峰无脲酶活性。通过上述步骤所得脲酶比活力较粗提物提高了近70倍,但回收率仅15.5%,见表1。

参 考 文 献

[1] Sumner J B. J Biol Chem, 1926, 69: 435~438.

- [2] Reithel F J. The Enzymes, edited by Boyer P D, Academic press, New York, 1971, 4: 1~21.
- [3] Dixon N E, Cazzola C, Blakeley R L, Zerner B. J Am Chem Soc, 1975, 14: 4131~4133.
- [4] Sumner J B, Somers G F. Chemistry and methods of enzymes. Academic Press, Inc., New York, 1947.
- [5] Larson A D, Kallio R E. J Bacteriol, 1954, 68: 67~69.
- [6] Hirofumi Nakano, Shigeyuki Takenishi, Yasuto Watarabe. Agric Biol Chem, 1984, 48(6): 1495~1502.
- [7] 关松荫,张德生,张志明. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社. 1986, 294~297.

STUDIES ON PRODUCTION AND EXTRACTION OF UREASE FROM *BACILLUS* SP

Xie Xindong Chen Jichen Lin Xinjian Zheng Shili Liu Zhongzhu

(Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract The paper describes the experimental results of production and extraction of urease from *Bacillus* sp.. The results showed that the strain was suitable for temperature of growth and urease production at 35~37°C, the enzyme production was induced by its substrate—urea, static culture does good to enzyme yield, but Ni²⁺ addition has no effect on it. After some extraction steps such as ammonium sulfate fractionation, heat treatment and column chromatography on Sephadex G-200 and DEAE-cellulose, enzyme specific activity was increased about 70 times compared with initial product, the rate of recovery was 15.5%.

Key words *Bacillus* sp. Urease, Culture, Extraction