

曲霉脲酶的动力学研究 I

马 丽¹, 邱祖明², 邱业先³

(1 安徽工业大学教学质量监控与评价中心, 安徽 马鞍山 243002)

(2 荆州文物保护中心, 湖北 荆州 434020)

(3 苏州科技学院生物中心实验室, 江苏 苏州 215011)

[摘要] 以脲素为底物, 对曲霉脲酶的动力学特性进行了研究. 在不同 pH (5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0, 7.6, 8.0, 8.6, 9.0) 条件下测定脲酶的 K_m 值和 V_{max} . 结果表明, pH 对脲酶的 V_{max} 影响明显, 在 pH 5.5 至 pH 8.0 之间 V_{max} 呈钟形. 在 pH 7.0 的酶促反应速度最快, K_m 值不受 pH 值影响; 不同的 pH 值 (5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0, 7.6, 8.0, 8.6, 9.0) 下脲酶的 K_m 值和 V_{max} 显示, 在 pH 7.6 时对底物的亲和力最大, 为最佳 pH, 该脲酶在 pH 6.6 到 8.6 时的稳定性较好.

[关键词] 脲酶, 酶活力, 最适 pH

[中图分类号] Q 556+.9 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)03-0066-05

Kinetic Study of Urease

Ma Li¹, Qiu Zuming², Qiu Yexian³

(1. Supervision and Evaluation Centre of Teaching, Anhui University of Technology, Ma'anshan 243002, China)

(2. Jingzhou Cultural Relic Preservation Center, Jingzhou 434020, China)

(3. Central Laboratory of Biology Experiment, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215011, China)

Abstract The dynamic property of aspergillus urinary enzyme was investigated when urea was used as substrate. The value of K_m and V_{max} were tested under different pH conditions (5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0, 7.6, 8.0, 8.6, 9.0). The results showed that the value of pH clearly affected the V_{max} . V_{max} showed bell shape in the range of pH 5.5 to pH 8.0. The enzymic reaction rate reached maximum as pH = 7.0. The value of K_m was not influenced by pH value. The values of K_m and V_{max} under different pH (5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0, 7.6, 8.0, 8.6, 9.0) showed that the affinity to the substrate reached maximum when pH = 7.6 and thus became the optimum pH. This urinary enzyme exhibited good stability in the range of pH 5.5 to pH 8.0.

Key words urease, enzyme activity, optimal pH

脲酶是一种普遍存在的蛋白, 许多生物都能编码脲酶. 从支原体到细菌、真菌、放线菌, 再到高等植物, 曾报道了大量的产脲酶物种. 从文献上来看, 脲酶研究还是主要集中在细菌脲酶的研究上. 真菌脲酶虽然研究的较少些, 但已报道的产脲酶真菌也很多, 如木霉^[1]、曲霉^[2-4]、青霉、根霉^[5]、酵母^[6]等. 在 1903 年就已报道了黑曲霉产脲酶. 其产的酸性脲酶已在酿酒业中应用, 用于降低酒中的脲素水平, 防止致癌物氨基甲酸乙酯的形成, 并得到了纯化鉴定^[2].

邱业先等对红壤稻田脲酶进行了研究, 发现土壤中脲酶活性与微生物生物量呈正相关^[7], 认为对红壤稻田脲酶形成的贡献率为: 细菌 > 放线菌 > 真菌^[8]. 我们从土壤中筛选到一株高产脲酶的菌株, 将其纯化并鉴定后对其脲酶表达以及动力学特性进行了研究, 旨在为以后开展该菌株产脲酶的利用提供指导. 现将纯化的菌株形态及动力学特性部分的研究结果报告如下:

收稿日期: 2009-10-10

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (0030038).

通讯联系人: 马 丽, 讲师, 研究方向: 植物生物化学. E-mail: mal@ahut.edu.cn

1 菌株个体形态特征观察

按《微生物学实验》^[9]方法,将纯化菌株在常规光学显微镜、油镜观察菌株形态特征.

在显微镜下观察到的菌株形态如下图所示,该菌株菌丝上形成分生孢子梗,顶端膨大成为顶囊;在顶囊表面以辐射状生出小梗;在小梗上着生一串串分生孢子.以上特征初步确定该菌株为曲霉本试验用的产脲酶菌种是从土壤中分离得到的,在作者已筛选得到的几株真菌菌株中该菌株产的脲酶活性是最高的.在加有尿素和酚红的 PDA 的平板培养基上,该曲霉菌落周围的红晕圈最大,暗示该菌产脲酶量高,可能在土壤中对施用的尿素水解扮演了较为重要的角色.

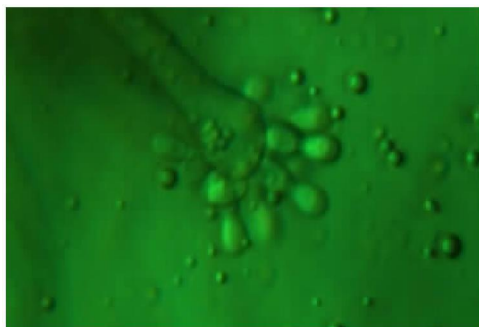


图 1 菌株的光学显微镜照片

Fig.1 Strain optical microscope picture



图 2 菌株的油镜照片

Fig.2 Strain oil immersion picture

2 动力学部分

2.1 材料与设备

PDA 培养基、菌种(曲霉)^[10]、提取液 A、提取液 B、底物(尿素)、显色剂(苯酚硝普钠和缓冲次氯酸钠).

722分光光度计、摇床、高速冷冻离心机、具塞试管.

2.2 方法

2.2.1 培养基的制备

种子培养基和发酵培养基均为 PDA 液体培养基,其制备过程为取 200 g 去皮马铃薯切成小块,加水约 800 mL 煮沸 30 min,用 4 层纱布过滤,加 20 g 葡萄糖溶解,加水定容至 1000 mL,分装到 100 mL 三角瓶中,于 121°C 高压灭菌 30 min.

2.2.2 曲霉的培养

种子培养:将斜面培养基上的曲霉孢子用无菌液体培养基洗下,倒入 PDA 液体培养基中,在 29°C、转速为 190 r/min 的摇床中培养约 10 h 左右,即为实验用的种子培养基.在 4°C 条件下保存待用.

发酵培养:在无菌状态下从种子培养基中取 1 mL 到发酵培养基上(接种量为 1%),在 29°C、转速为 190 r/min 的摇床中发酵培养 4 d.

2.2.3 显色剂的配制

A:称取 17.5 g 苯酚,和 85 mg 硝普钠,溶于 200 mL 水中,最后加水定容至 250 mL,于 4°C 保存待用.

B:缓冲的次氯酸钠试剂:称取 7.4 g NaOH 溶于 350 mL 水中,再加 74.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于其中,加上 41.5 mL 12% NaOCl,再加 0.2 M 的 NaOH 将 pH 调至 12 定容至 500 mL.

2.2.4 氨离子标准曲线

吸取 400 μM 的 NH_4Cl 溶液 0.25 0.50 1.00 1.50 mL 于具塞试管中,加蒸馏水至 10 mL,使试管中的 NH_4^+ 浓度分别为 0 10 20 40 60 μM ,再加 1 mL 显色剂 A 和 2 mL 的显色剂 B,在 37°C 的水浴锅中温育 20 min,在波长为 625 nm 处测其 O. D. 值.

2.2.5 脲酶活性的测定(采用酚靛酚法^[11,12])

K_m 值测定:0.5 mL 适当浓度的粗酶液,加 0.5 mL 的不同浓度的底物(脲素)在 40°C 水浴锅中反应约

1. 5 m in 加 9 mL 蒸馏水, 1 mL 苯酚硝普钠溶液和 2 mL 缓冲的次氯酸钠. 在 37℃ 的水浴锅中温育显色 20 m in 在波长 625 nm 处测其 O. D. 值.

其它情况下测酶活性: 用 0. 2 mL 适当浓度的粗酶液, 加 0. 8 mL 的 0. 6% 的脲素在 40℃ 水浴锅中反应 4. 5 m in 再加蒸馏水 9 mL 依次加入 1 mL 苯酚硝普钠溶液和 2 mL 的缓冲的次氯酸钠在 37℃ 显色 20 m in 在波长 625 nm 处测其 O. D. 值.

脲酶单位: 1 m in 释放 0. 01 μm o l 的铵离子为 1 个脲酶单位.

2. 2. 6 各种溶液的配制

提取液 A: 取 610 mL、50 mM 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 390 mL、50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 再称 2. 922 g NaCl 和 0. 372 2 g EDTA — 2Na 溶于其中.

提取液 B 称取 2. 922 g NaCl 和 0. 372 2 g EDTA — 2Na 用 900 mL 蒸馏水溶解, 再用 0. 2 M 的 NaOH 将其 pH 调至 7. 0

底物: 0. 6 g 的脲素溶于 100 mL 的提取液 A 或提取液 B 中.

不同浓度的 4 mM、5 mM、6 mM、10 mM、20 mM 和 40 mM 的脲素, 用提取液 A 或 B 配制. (测定 pH 对脲酶的作用时用提取液 B; 其它情况用提取液 A)

400 μM 的 NH_4Cl 吸取 1 mL 0. 04 M NH_4Cl 定容至 100 mL, 即得 400 μM 的 NH_4Cl

2. 2. 7 脲酶粗酶液的制备

把发酵培养了 4 d 的曲霉取出, 用滤纸过滤, 然后用蒸馏水洗去菌丝体上的培养基, 再用滤纸吸干, 称取 1 g 菌丝体用少量的提取液 A 或 B 研磨成匀浆, 倒入离心管, 12 000 r/m in 4℃ 下冷冻离心 30 m in 取上清液即为脲酶粗酶液. 在 4℃ 条件下保存待用. (注: 测定 pH 对脲酶的作用时, 用提取液 B; 其它情况用提取液 A)

3 结果与分析

3. 1 铵离子标准曲线

表 1 NH_4^+ 的标准曲线
Table 1 The standard curve of NH_4^+

NH_4^+ 浓度 /μM	0	10	20	40	60
O. D. _{625 nm}	0	0. 088	0. 180	0. 354	0. 527

通过回归分析, 得 NH_4^+ 浓度 Y 与 O. D. _{625 nm} X 的关系曲线的回归方程:

$$Y = 114. 13X - 0. 182 3$$
 相关系数为 0. 999 9

3. 2 脲酶的最适酶促反应 pH

从表 2 可知, 该曲霉产的脲酶在 pH 7. 6 时活性最高. 在 pH 6. 0 到 pH 8. 0 均有较高活性, 在 pH 低于 6. 0 时, 其活性迅速下降, 当降到 pH 5. 0 时活性仅为 pH 7. 6 时的 6. 78%. 在 pH 大于 8. 0 时, 脲酶活性也迅速下降, 在 pH 9. 0 时基本上测不出脲酶活性. 不同的 pH 可能影响脲酶活性中心的氨基酸解离, 从而与脲素的结合和构象的改变来影响脲酶活性. 在 pH 小于 5 和大于 9. 0 时, 可能由于 pH 变化过于剧烈, 从而整个酶分子的构象发生较大的改变, 活性中心也发生了较大的改变, 致使不能与底物结合.

表 2 不同 pH 处理与脲酶活性的关系

Table 2 The relation between the urease activity and the different system pH									
pH	5. 0	5. 6	6. 0	6. 6	7. 0	7. 6	8. 0	8. 6	9. 0
脲酶活力单位数 /U	2. 82	22. 76	31. 43	37. 88	40. 23	41. 89	39. 01	4. 31	0. 62

3. 3 脲酶的 pH 稳定性

从表 3 看, 不同 pH 处理 30 m in 后的脲酶活性图与表 2 大致相仿, 仍然是在 pH 7. 6 的条件下脲酶活性最高, 在 pH 5. 0 和 pH 8. 6 时脲酶活性很低. 但从数据综合比较可知, 与 pH 7. 6 相比, 在 pH 6. 6 pH 7. 0 pH 8. 0 及 pH 8. 6 时处理 30 m in 后的脲酶活性减少程度与即时测的活性减少程度大致一致, 因此, 尽管在 pH 8. 6 时的脲酶活性较低, 但在 pH 6. 6 至 pH 8. 6 之间脲酶的稳定性还是较好的. 但是在 pH 5. 6 pH 5. 0 条件下, 处理 30 m in 后测得的脲酶活性分别为最高活性的 10. 73% 和 3. 03%, 而即时处理所测得的脲酶活性

则分别为最高活性的 54. 33%和 6. 73% . 在 pH5. 6时下降了 43. 58个百分点, 在 pH5. 0时下降了 3. 70个百分点. 这就是脲酶在该 pH条件下处理 30m in过程中所丧失的酶活力.

表 3 不同 pH处理 30 m in后的酶活性

Table 3 The urease activity after the treatment of 30 m in under different system pH

pH	5. 0	5. 6	6. 0	6. 6	7. 0	7. 6	8. 0	8. 6
脲酶活力单位数 /U	2. 33	8. 26	46. 15	69. 32	73. 72	76. 80	71. 43	7. 86

3. 4 pH对脲酶 K_m 值及 V_{max} 的影响

从表 4可以看出, pH对脲酶的 V_{max} 影响明显, 在 pH7. 0的酶促反应速度最大, 为 39. 3 $\mu\text{M} / \text{m in} / \text{mL}$, 在 pH5. 6至 pH8. 0之间 pH对脲酶的 K_m 没有影响, 其间的差异甚小, 在 0. 2 mM之内, 可视为误差所致.

表 4 不同 pH下的脲酶最大酶促反应速度与米氏常数

Table 4 The V_{max} and the K_m of the urease under the different system pH

pH	8. 0	7. 6	7. 0	6. 6	6. 0	5. 6
$V_{max} / (\mu\text{M} / \text{m in} / \text{mL})$	17. 7	21. 9	39. 3	27. 4	23. 7	18. 5
K_m / mM	3. 0	3. 1	3. 1	3. 0	3. 0	3. 1

在已知的 pH对脲酶的 V_{max} 和 K_m 的影响中, 有的脲酶受 pH影响较大. 但也有些生物产的脲酶其 K_m 不受 pH的影响, K_m 因不同的测活体系而异. 本试验用的曲霉脲酶的 K_m 不受 pH的影响, 与已报道的克雷伯氏产气菌^[13]和奇异变形杆菌^[14]的脲酶一样, 是 pH独立型的.

4 小结

pH对脲酶的影响也跟其它的酶基本一致, 最适 pH为 pH7. 6 脲酶在 pH6. 0至 pH8. 0之间的活力较高, 其范围较窄, 说明脲酶对 pH较为敏感. pH5. 6时脲酶虽然仍有较高活性, 但其稳定性较差, 在处理 30 m in后活力下降了 43. 58%. 所以低于 6. 0和高于 8. 0的 pH不宜选择用来保存该脲酶. pH对该脲酶的 K_m 无影响, 但对其最大反应速度影响较大. 综合起来考虑, pH7. 0的缓冲液作为脲酶的提取和保存用的溶液较为合适.

对于脲酶的动力学研究, 所选择的缓冲体系对所测值也有很大的影响. 一般选择用的缓冲体系是 HEPES(4羟乙基哌嗪乙磺酸)缓冲液. 现在已知 PBS(磷酸缓冲液)和 TRIS(三羟甲基氨基甲烷缓冲液)均对脲酶有抑制作用. 但在中性条件下 PBS(磷酸缓冲液)对脲酶的抑制作用很小, 所以大部分研究者都是选择 PBS(磷酸缓冲液)缓冲体系来进行测定. 在比较各种脲酶的动力学时, 须注意测定时的体系条件.

在做脲酶的动力学时, 最好选用经去离子水, 以防止蒸馏水中的一些未知离子对所测的值造成影响.

该菌株的脲酶表达以及动力学特性的研究, 为以后开展该菌株产脲酶の利用工作提供指导. 脲酶在工业上用来除去反应器饮料及废水中的脲素, 在临床上用来除去人工肾血液中的脲素, 在分析化学上用于高选择性地测定血样和尿样中的脲素. 如果我们从该菌株来获取所需的脲酶, 可以通过改造该菌株来实现, 以便使其脲酶受脲素等的诱导而大量表达, 并且分泌到胞外. 如果不改造该菌株, 只能通过获得大量的菌体来获得大量的脲酶.

[参考文献]

[1] 王飞. 茶多酚抑制真菌产脲酶机理的初步研究[D]. 南昌: 江西农业大学林学院, 2003

[2] Patrick T, Sn ih A, King D J R, et al Isolation and chamaterization of urease from A spergillus n ige[J]. Journal of G eneral M icrobiology 1993 139(5): 957-962

[3] Zawada JW, Sutcliffe J F A possible role for urease as a storage protein in A spergillus tamari[J]. Ann Bot 1981, 48(6): 797-810

[4] Maclaren DM, Pateman J A. The regulation of urease in aspergillus nidulans[J]. Biochem Genet 1982, 20(7/8): 763-776

[5] Farley P C, Santosa S Regulation of expression of the Rhizopus oryzae uricase and urease enzymes[J]. Can JM icrobiology 2002, 48(12): 1104-1108

(下转第 75页)

- 1991, 295(1/2/3): 10-12
- [5] Mesta L, Rascle C, Durand R, et al Construction of a chimeric xylanase using multidomain enzymes from *Neocallimastix frontalis* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29: 456-463
- [6] Diamant S, Rosenthal D, Azan A, et al Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress[J]. *Molecular Microbiology* 2003, 49: 401-410
- [7] Barth S, Huhn M, Matthey B, et al Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1572-1579.
- [8] 任永明, 张明生, 何丹, 等. 相溶性溶质支持下重组免疫毒素的周质腔可溶性表达及葡萄糖对其表达的影响 [J]. *遗传*, 2003 25(1): 40-44
- [9] Picaud S, Olsson M E, Brodelius P E. Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51(1): 71-79
- [10] Hannig G, Makrides S C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Tib Tech*, 1998 16: 54-60
- [11] Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*[J]. *Tib Tech*, 1994, 12: 456-463.
- [12] Weickert M J, Doherty D H, Best E A, et al Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*[J]. *Curr Opin Bio Biotechnol* 1996 7: 494-499
- [13] 雒军, 宫晓燕, 魏炜, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II在大肠杆菌中的重组表达及重组酶性质测定 [J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2009 32(3): 92-98
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970 227: 680-685.

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 69页)

- [6] Lubbers M W, Rodriguez S B, Honey N K, et al Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Can J Microbiol* 1996 42(2): 132-140
- [7] 邱业先, 彭仁, 汪金莲. 红壤稻田脲酶与微生物生物量的变化规律及其相关性研究 [J]. *中国学术期刊文摘: 科技快报*, 1999, 5(10): 1307-1309
- [8] 邱业先, 彭仁, 汪金莲. 红壤稻田脲酶产生途径研究 [J]. *中国学术期刊文摘: 科技快报*, 2000 6(1): 97-100
- [9] 范秀容, 李广武, 等. *微生物学实验* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998
- [10] 邱祖明. 曲霉脲酶特性及其表达的初步研究 [D]. 南昌: 江西农业大学林学院, 2005
- [11] Weatherbum M W. Phenohypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. *Anal Chem*, 1967, 39: 971-974.
- [12] Witte C P, Escobar N M. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction[J]. *Anal Biochem*, 2001, 290: 102-107.
- [13] Breitenbach J M, Hausinger R P. *Proteus mirabilis* urease: Partial purification and inhibition by boric acid and boronic[J]. *Biochem*, 1988, 250(3): 917-920
- [14] Todd M J, Ausinger R P. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*[J]. *Biol Chem*, 1987, 262(13): 5963-5967.

[责任编辑: 顾晓天]