

# 烟草节杆菌肌酐酶发酵培养基优化

梁剑光\* 贾佳红 吴俊伟 朱 洁

(常熟理工学院 生物与食品工程学院 常熟 215500)

**摘要** 对烟草节杆菌发酵产酶培养基进行了优化。在烟草节杆菌的初始发酵培养基条件下,肌酐酶初始酶活仅为 9.2 U/g 湿菌。首先,通过肌酸诱导、金属离子筛选实验发现肌酸和金属离子对烟草节杆菌产肌酐酶酶活有重要影响;然后再通过碳源和氮源优化,以玉米浆和酵母膏作为复合氮源,可溶性淀粉为碳源,肌酐酶产量可达到 108.5 U/g 湿菌;在以上基础上,最后通过两次正交试验优化初始发酵培养基,最优培养基组成为:肌酸 0.3%,玉米浆 0.3%,可溶性淀粉 0.4%,酵母膏 0.7%, $\text{Fe}^{2+}$  0.003%, $\text{Mn}^{2+}$  0.006%, $\text{Mg}^{2+}$  0.005%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%, $\text{KCl}$  0.5%。在优化后的发酵培养基条件下,烟草节杆菌肌酐酶酶活达到 182.82 U/g 湿菌,为初始发酵培养基酶活的 19.87 倍。

**关键词** 烟草节杆菌 肌酐酶 培养基优化

**中图分类号** Q93-335

肌酐酶又称肌酐酰胺水解酶(EC 3.5.2.10),能特异性催化肌酐水解为肌酸,是烟草节杆菌代谢产生的一种重要酶类<sup>[1]</sup>。肌酐酶在棒状杆菌、假单胞菌、节杆菌等微生物代谢产物中均有发现<sup>[2-3]</sup>。肌酐酶的医用价值大,应用性强,对于很多疾病主要是肾脏类疾病的诊断有着重要作用<sup>[4]</sup>。有关烟草节杆菌肌酐酶的研究主要集中在基因克隆,菌株筛选等方面<sup>[5]</sup>,对烟草节杆菌肌酐酶的发酵培养基优化鲜有报道。国内外虽对肌酐酶的研究和应用取得了较大进展,在医疗上的应用也已初步成熟,但其仍有进一步深入研究的必要,尤其是在国内,用于原酶的生产技术仍不成熟,对进口依赖性较强,应用成本相对较高<sup>[6-7]</sup>。本文以烟草节枝杆菌为产酶菌株,通过确定产酶诱导物、金属离子、碳源、氮源等培养基成分,最终通过正交实验确定最佳产酶培养基,从而提高烟草节枝杆菌肌酐酶的产酶能力,为开发更加廉价、效果更好的肌酐酶制剂提供科学依据,对肌酐酶试剂盒的国产化应用亦具有重要的现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与培养基

#### 1.1.1 试剂 肌酸(国药集团化学试剂有限公司);苦

味酸(西陇化工股份有限公司);胰蛋白胨(上海楷洋生物技术有限公司);酵母膏(上海奥宇生物科技有限公司)。

1.1.2 培养基 斜面培养基(g/L):胰蛋白胨 1,酵母粉 0.5,氯化钠 1,琼脂粉 20, pH7.0。

液体种子培养基(g/L):胰蛋白胨 1,酵母粉 0.5,氯化钠 1, pH7.0。

发酵初始培养基(g/L):肌酐 0.5,胰蛋白胨 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1, $\text{KCl}$  0.5, pH 7.0。

### 1.2 方法

1.2.1 种子培养 挑取斜面上菌体一环,于 250ml 三角瓶(装液量 40ml,8 层纱布包扎)的种子培养基中,于 28℃,200r/min 摇床培养 24h。

1.2.2 发酵培养 按接种量 1% 吸取一定的液体种子于 250ml 三角瓶(装液量 30ml,八层纱布包扎)的发酵培养基中,于 28℃,200r/min 摇床培养 24h。

1.2.3 菌体收集 发酵液 5 000 r/min,4℃ 冷冻离心 10 min,弃上清,将菌泥用冷生理盐水清洗 2 次,每次用混匀器搅散菌块,离心,再用 0.1mol/L pH7.5 的冷磷酸缓冲液洗 1 次,然后搅散菌块,离心,称细菌湿重(准确到 mg)。

1.2.4 肌酐酶粗制备 用每 1g 湿菌加入 10 ml 冷磷酸缓冲液,溶菌酶(4 万 U/mg)3 mg,室温下不时搅动,

收稿日期:2015-03-23 修回日期:2015-04-29

\* 电子信箱:liang4523@126.com

作用 20 min,放置 3 ~ 5min,用超声细胞粉碎机裂菌(作用 10 s,间隔 10 s,25% 功率,共 12min)。低温(4℃)离心(10 000r/min)收集上清液即为肌酐酶粗提物。

1.2.5 肌酐酶活的测定<sup>[6,7]</sup> (1)反应原理:肌酐酶能将肌酸催化生成肌酐,在碱性条件下肌酐与苦味酸反应生成的复合物是橙色的,并且该肌酐酶活性越高,该复合物越多。在 520 nm 波长下测定复合物的吸光度从而可以测定肌酐酶的活力。

(2)酶活力定义:当温度 37℃、pH7.5,每分钟催化 1μmol 肌酐转变成产物所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

(3)测定方法:吸取 0.9ml 肌酸溶液在 37℃ 条件下保温,然后再向该肌酸溶液中加入提取的粗酶 0.1ml,摇匀后 37℃ 准确反应 10min。吸取 1.9ml 新鲜配制的 NaOH 溶液于试管中,加入 0.1ml 反应液,再加入 1ml 苦味酸溶液。在 25℃ 水浴锅水浴 20min,再在 520nm 下,测定吸光度。

空白管制备:0.9ml 肌酸溶液于冰上冷却一段时间,再加入 0.1ml 酶液,充分摇匀后,立即吸取 0.1ml 加入到 NaOH 溶液,再加入 1ml 苦味酸溶液。在 25℃ 水浴锅水浴 20min,再在 520nm 下,测定吸光度。

酶活测定计算公式:

$$\text{酶活(U)} = \frac{(A_{520} - A_{\text{空白}}) \times 3 \times 1000}{1000 \times 3.21 \times 10}$$

2 结果与分析

2.1 肌酸诱导物对产酶的影响

肌酐酶是一种诱导酶,当向培养基中加入肌酸诱导物后肌酐酶含量会有所提高,本试验向培养基中添加不同含量的诱导物—肌酸,以初始发酵培养基产酶为对照组(CK),结果见表 1。从表 1 结果可知,当培养基中不添加肌酸时,发酵液酶活力很低,仅为 2.4 U/g 湿菌;当添加 0.1% 肌酸时,发酵液酶活力为 9.4 U/g 湿菌,是不加诱导物酶活的近 4 倍。随着添加的肌酸含量逐渐增多,发酵酶活也逐渐升高,当添加 0.4% 肌酸时,酶活有下降趋势,因此,0.3% 肌酸添加量最佳。同时,从表 1 试验结果得出,在初始发酵培养基中添加 0.5% 肌酐(CK)的发酵酶活与本实验添加 0.1% 肌酸的发酵产酶基本相当,因此,本实验说明肌酸对肌酐酶的发酵生产有促进作用,当在发酵培养基中的浓度为 0.3% 时酶活最高,为 13.5 U/g 湿菌。

表 1 肌酸含量对肌酐酶产量的影响

Table 1 Effect of creatine content on creatininase production

肌酸含量(%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	CK
酶活(U/g 湿菌)	2.4 ± 0.11	9.4 ± 0.11	11.2 ± 0.13	13.5 ± 0.17	13.1 ± 0.14	9.2 ± 0.12

2.2 几种金属离子对产酶的影响

金属离子在微生物生长过程中扮演重要的角色,是一类不可缺少的微量营养元素,某些金属离子对细胞代谢中的一些酶可以起到激活作用,从而大大提高酶活。在本实验中,选用 4 种金属离子(Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>)添加量均为 0.002% (质量体积比)添加到初始发酵培养基中,试验结果如表 2 所示。从结果可

知,本次试验共选用 4 种金属离子,但是试验过程中发现当向初始发酵培养基中添加 Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 时,酶活几乎没有,而且得到的湿菌很少,几乎可以忽略,由此我们推断可能是这两种离子对菌体生长有抑制作用。从试验得到的数据来看,Fe<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 都能促进肌酐酶的产生,酶活相差无几,说明 Fe<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 对烟草节杆菌肌酐酶酶活都有促进作用。

表 2 添加不同金属离子对酶产量的影响

Table 2 Effect of different metal ion on creatininase production

金属离子种类	CK	Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
酶活(U/g 湿菌)	9.0 ± 0.12	23.7 ± 0.20	24.3 ± 0.22	0.33 ± 0.06	0.24 ± 0.08

为了进一步研究 Fe<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 添加量对发酵产酶的影响,实验过程中在初始发酵培养基中分别添加 Fe<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 的浓度为 0.002、0.004、0.006、0.008% 进行试验,结果见图 1。从图 1 可知,随着 Fe<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 添

加量的提高(从 0.002% 到 0.004%),发酵产酶也有所提高,其中 Fe<sup>2+</sup> 提高明显,从 23.7 U/g 湿菌提高到 30.2U/g湿菌。当培养基 Fe<sup>2+</sup> 添加量为 0.004%,发酵产酶最高达到 30.2U/g 湿菌;而当在初始发酵培养基

添加 0.006%  $\text{Mn}^{2+}$  时,发酵产酶酶活可达 25.1 U/g 湿菌。因此, $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  最适添加浓度分别为 0.004% 和 0.006%。

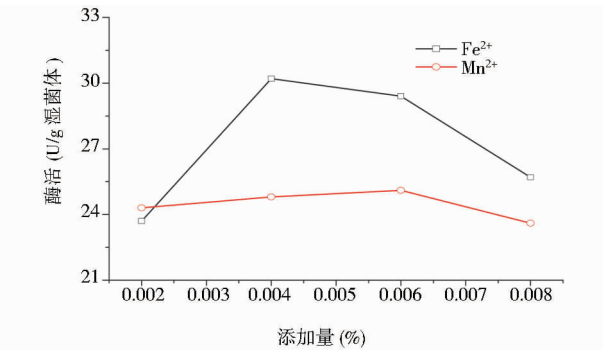


图 1  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  添加量对烟草节杆菌肌酐酶产量影响

Fig.1 Effect of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ion on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

2.3 金属离子正交试验

金属离子  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  单因素试验初步表明  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  能促进烟草节杆菌的肌酐酶发酵产量,而  $\text{Mg}^{2+}$  在初始发酵培养基中已经存在(见 1.1.2)。为了进一步研究  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  几种金属离子的组合对烟草节杆菌肌酐酶发酵产酶的影响,进行了该三种金属离子的正交试验。试验按照  $\text{L}_9(3^4)$  设计,正交试验的因素与水平如表 3 所示,实验结果见表 4。通过极差分析表明,该三种金属离子对酶活影响的主次顺序为  $\text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ ,优化后最佳组合为  $\text{Fe}^{2+}$  含量为 0.003%、 $\text{Mn}^{2+}$  含量为 0.006%、 $\text{Mg}^{2+}$  含量为 0.005%,在最佳条件下,试验验证酶活为 137.9 U/g 湿菌,与培养基主成分优化实验酶活基本相当(见 2.7)。

表 3 金属离子正交试验因素水平

Table.3 Factors and levels of metal ion in the orthogonal experiment

水平	因素及水平		
	$\text{Fe}^{2+}$ (%)	$\text{Mn}^{2+}$ (%)	$\text{Mg}^{2+}$ (%)
1	0.003%	0.005%	0.004%
2	0.004%	0.006%	0.005%
3	0.005%	0.007%	0.006%

表 4 金属离子正交试验结果

Table 4 The results of metal ion orthogonal experiment

试验号	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	酶活 (U/g 湿菌)
试验 1	1	1	1	106.7
试验 2	1	2	2	137.9
试验 3	1	3	3	113.2
试验 4	2	1	2	105.9
试验 5	2	2	3	102.1
试验 6	2	3	1	114.8
试验 7	3	1	3	110.1
试验 8	3	2	1	121.7
试验 9	3	3	2	109.0
均值 1	119.27	107.57	114.40	
均值 2	107.60	120.57	117.60	
均值 3	113.60	112.33	108.47	
极差	11.67	13.00	9.13	

2.4 几种碳源对酶产量的影响

在诱导物、金属离子实验的基础上,由于初始发酵培养基中肌酐作为唯一碳源(见 1.1.2),实验选取了花生油、可溶性淀粉、乳糖、葡萄糖作为碳源,研究了几种碳源对肌酐酶产量的影响。试验结果如图 2、图 3、图 4 所示。结果表明,葡萄糖作为碳源对肌酐酶产量没有促进作用,烟草节杆菌对花生油的代谢利用也较差,但以 0.4% 可溶性淀粉作碳源时,肌酐酶的酶活大幅提高(图 3),由此可见可溶性淀粉为肌酐酶发酵最佳碳源。

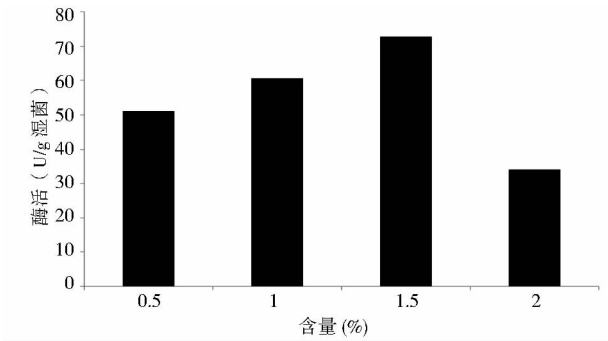


图 2 花生油含量对酶活的影响

Fig.2 Effect of peanut oil content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

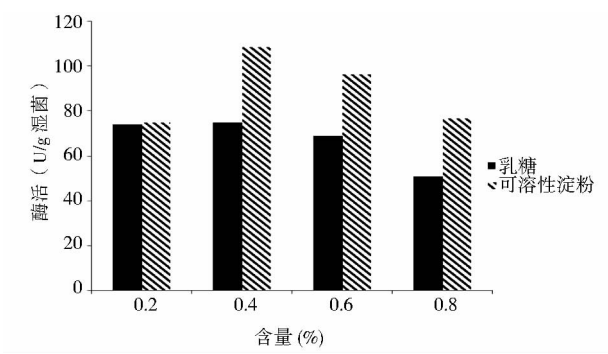


图3 可溶性淀粉含量和乳糖含量对酶活的影响

Fig.3 Effect of soluble starch and lactose content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

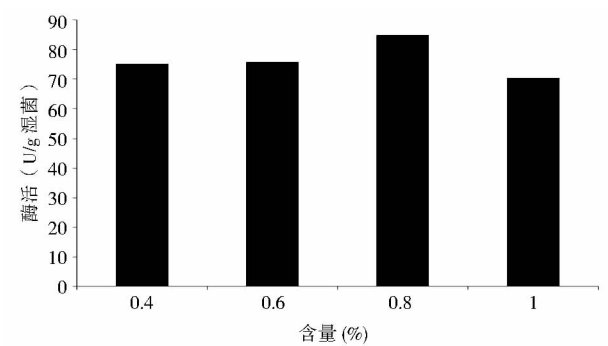


图4 葡萄糖含量对酶活的影响

Fig.4 Effect of glucose content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

2.5 几种氮源对烟草节杆菌产肌酐酶影响

培养基中的氮源对微生物的生长至关重要,氮源为微生物的生长提供氨基酸,生长因子以及维生素,本试验选取大豆蛋白胨、酵母膏、鱼粉蛋白胨,玉米浆代替初始发酵培养基中胰蛋白胨,其中大豆蛋白胨和酵母膏的浓度梯度为0.2、0.4、0.6、0.8%;鱼粉蛋白胨浓度梯度为0.5、1.0、1.5、2%;玉米浆浓度梯度为0.1、0.2、0.3、0.4%。试验结果见图5、图6、图7所示。结果表明,用大豆蛋白胨,酵母膏作为氮源也都对产酶量的提升有一定的促进作用,但是效果都没有玉米浆好,当以玉米浆替代胰蛋白胨时发酵培养基中有较高的产酶量,玉米浆添加量为0.2%时,产酶量达到最高。而以鱼粉蛋白胨为氮源,细菌生长不良,对产酶有一定的抑制作用。

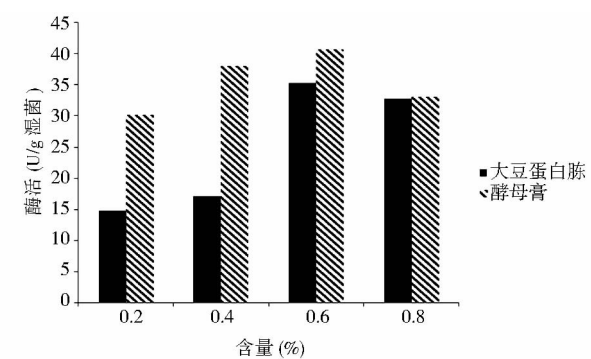


图5 大豆蛋白胨和酵母膏含量对酶活的影响

Fig.5 Effect of soy peptone and yeast extract content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

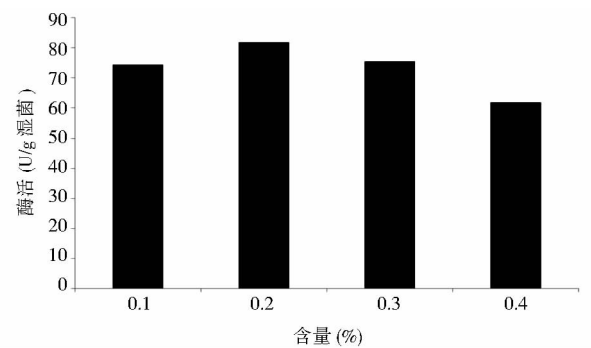


图6 玉米浆含量对酶活的影响

Fig.6 Effect of corn steep liquor content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

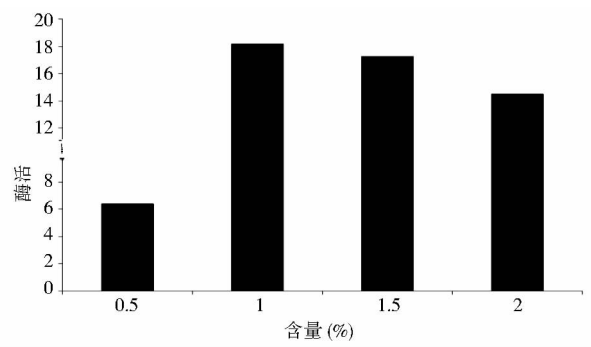


图7 鱼粉蛋白胨含量对酶活的影响

Fig.7 Effect of peptone content on creatininase production by *Arthrobacter nicotiana*

2.6 玉米浆和酵母膏对烟草节杆菌产肌酐酶的协同效应

上述氮源均为单一替代胰蛋白胨的影响,实验过程中考虑到复合氮源的协同作用,在上述单一氮源的

基础上再向培养基中添加0.2%的玉米浆。结果见表5和表6,当0.2%玉米浆和另一种氮源(主要为酵母膏或大豆蛋白胨)同时存在时,对产酶的影响较大。当在含0.2%玉米浆的发酵培养基中加入一定量的酵母膏或大豆蛋白胨时,发酵产酶量有了进一步提高,其原因

可能是复合氮源中的生长因子和微量元素起到了互补的作用,对烟草节杆菌的发酵产肌酐酶具有协同效应。因此玉米浆和酵母膏,或玉米浆和大豆蛋白胨同时添加于烟草节杆菌肌酐酶发酵培养基中,使两者发挥协同作用。

表 5 酵母膏和玉米浆复合氮源对酶活的影响

Table 5 Effect of compound nitrogen source of yeast extract and corn steep liquor on creatininase production

复合氮源	0.4% 酵母膏 + 0.2% 玉米浆	0.6% 酵母膏 + 0.2% 玉米浆	0.8% 酵母膏 + 0.2% 玉米浆	1% 酵母膏 + 0.2% 玉米浆
酶活 (U/g 湿菌)	65.1 ± 0.11	76.1 ± 0.13	89.7 ± 0.15	81.6 ± 0.17

表 6 大豆蛋白胨和玉米浆复合氮源对酶活的影响

Table 6 Effect of soy peptone and corn steep liquor on creatininase production

复合氮源	0.2% 大豆蛋白胨 + 0.2% 玉米浆	0.4% 大豆蛋白胨 + 0.2% 玉米浆	0.6% 大豆蛋白胨 + 0.2% 玉米浆	0.8% 大豆蛋白胨 + 0.2% 玉米浆
酶活 (U/g 湿菌)	75.2 ± 0.19	78.5 ± 0.27	69.5 ± 0.18	66.6 ± 0.26

2.7 培养基主成份正交试验优化

经过单因素试验,确定了培养基主要成份种类及其浓度,按照  $L_9(3^4)$  设计正交试验,进一步优化发酵培养基的各种成份正交试验因素与水平如表7所示。

表 7 培养基主要成份正交试验因素水平

Table 7 Factors and levels of medium main ingredient in the orthogonal experiment

水平	因素及其水平			
	肌酸 (%)	玉米浆 (%)	可溶性淀粉 (%)	酵母膏 (%)
1	0.1	0.1	0.3	0.7
2	0.2	0.2	0.4	0.8
3	0.3	0.3	0.5	0.9

从表8可见影响酶活的主次顺序为肌酸 > 玉米浆 > 可溶性淀粉 > 酵母膏。根据各试验因子的均值可以看出,培养基最佳组合为肌酸含量为0.3%,玉米浆含量为0.3%,可溶性淀粉含量为0.4%,酵母膏含量为0.7%,酶活为138.2U/g湿菌。

2.8 金属离子添加到优化培养基中的验证实验

在优化培养基主成分后,考虑金属离子的添加作用效果,按照金属离子正交试验结果,添加金属离子  $Fe^{2+}$  0.003%、 $Mn^{2+}$  0.006% 和  $Mg^{2+}$  0.005%,经过酶活测定,添加几种金属离子后,肌酐酶酶活进一步提高,达到182.8 U/g湿菌。

表 8 培养基主要成份正交实验结果

Table 8 The results of medium main ingredient in the orthogonal experiment

因素	肌酸	玉米浆	可溶性淀粉	酵母膏	酶活 (U/g 湿菌)
实验1	1	1	1	1	98.7
实验2	1	2	2	2	96.8
实验3	1	3	3	3	111.6
实验4	2	1	2	3	86.5
实验5	2	2	3	1	87.9
实验6	2	3	1	2	85.7
实验7	3	1	3	2	118.5
实验8	3	2	1	3	97.5
实验9	3	3	2	1	138.2
均值1	102.37	101.23	93.97	108.27	
均值2	86.70	94.07	107.17	100.33	
均值3	118.07	111.83	106.00	98.53	
极差	31.37	17.76	13.20	9.74	

3 结 论

本实验从培养基中的诱导物、金属离子、碳源、氮源发酵培养基成分优化入手,得出以下结论:(1)肌酸对烟草节杆菌发酵产肌酐酶有较好促进作用,当初始发酵培养基中肌酸浓度为0.3%时,肌酐酶酶活最高为13.5 U/g湿菌;(2)金属离子正交试验结果为初始发酵培养基中添加  $Fe^{2+}$  0.003%、 $Mn^{2+}$  0.006%、 $Mg^{2+}$

0.005%为最佳条件,此时酶活为137.9U/g湿菌;(3)在以上基础上,通过对碳源和氮源的筛选,得出烟草节杆菌发酵产肌酐酶的最佳发酵产酶配方为:肌酸0.3%,玉米浆0.3%,可溶性淀粉0.4%,酵母膏0.7%, $\text{Fe}^{2+}$  0.003%, $\text{Mn}^{2+}$  0.006%, $\text{Mg}^{2+}$  0.005%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,KCl 0.5%,在此最佳发酵培养基条件下,烟草节杆菌产肌酐酶酶活为182.8 U/g湿菌,为优化前初始发酵培养基酶活9.2U/g的19.87倍。

**致谢** 本文文感谢苏州市应用基础研究计划(SYN201218)的资助。

### 参考文献

- [1] 崔有宏, 罗侃, 郑强, 等. 肌酐测定工具酶产生菌烟草节杆菌02181的筛选及其产酶条件. 甘肃科学学报, 2005, 17(2): 49-53.
- Cui Y H, Luo K, Zheng Q, et al. *Arthrobacter nicotianae* 02181 which produces enzymes for diagnostic measurement of creatinine and its selected conditions for producing enzymes. Journal of GanSu Science, 2005, 17(2): 49-53.
- [2] Yamamoto K, Oka M, Kikuchi T, et al. Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from *Pseudomonas* sp PSJ. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(7): 1331-1332.
- [3] Koyama Y, Yamamoto Otake, Suzuki M, et al. Cloning and expression of the sarcosine oxidase gene from *Bacillus* S-19 in *Escherichia coli*. J Agric Biol Chem, 1991, 55(5): 1259-1263.
- [4] 李萍, 赵莹, 余霆. 肌酐在肾小球滤过功能损伤诊断中的价值的系统评价. 中国循证医学杂志, 2004, 4(11): 752-758.
- Li P, Zhao Y, Yu T. Diagnostic value of creatinine for indicating glomerular filtration function injury: a systematic review. Chinese Journal of Evidence-based Medicine, 2004, 4(11): 752-758.
- [5] 智强, 李淑慧, 高利宏, 等. 利用简并PCR克隆烟草节杆菌02181肌酐酶基因. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1221-1223.
- Zhi Q, Li S H, Gao L H, et al. Gene cloning of creatinase from *Arthrobacter nicotianae* 02181 using degenerate PCR. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2007, 29(12): 1221-1223.
- [6] 崔有宏, 罗侃, 郑强, 等. 肌酐测定的酶学方法. 西北国防医学杂志, 2003, 24(2): 129-131.
- Cui Y H, Luo K, Zheng Q, et al. Enzymatic method for the determination of creatinine. Medical Journal of National Defense Forces in Northwest China, 2003, 24(2): 129-131.
- [7] Paurekh A C, Cook S, Sims C, et al. A new method for the determination of serum creatinine based on reaction with 3, 5-dinitrobenzoylchloride in an organic medium. Clin Chim Acta, 1976, 73(2): 221-231.

## Optimization of Fermentation Medium for Creatininase Production by *Arthrobacter nicotiana*

LIANG Jiang-guang JIA Jia-hong WU Jun-wei ZHU Jie

(School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

**Abstract** The optimal culture medium of creatininase production on the *Arthrobacter nicotiana* were carried out. Firstly, using creatine as inductor and metal ions experiment, it was found that creatine and metal ions have a great influence upon the creatininase production. Secondly, single factor experiment showed the optimization carbon and nitrogen sources was soluble starch and corn steep liquor, but compound nitrogen source of yeast extract and corn steep liquor was much better(creatininase production reached 108.5 U/g wet mycelium). At last, creatininase production reached 182.5 U/g wet mycelium under the optimization of fermentation medium, which was about 19.87 times as high as the initial fermentation enzyme activity.

**Key words** *Arthrobacter nicotiana* Creatininase Optimization of production medium