

文章编号:1673-1689(2007)06-0081-05

氮离子束诱变提高黄嘌呤氧化酶产生菌产酶能力

夏小花¹, 李忠琴¹, 秦广雍², 王武¹

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 通过氮离子束诱变节杆菌(*Arthrobacter* sp. g-1984)筛选到黄嘌呤氧化酶高产菌株 X7, 产酶活力为 24.49 U/g, 是出发株产酶活力(8.81 U/g)的 2.78 倍, 经发酵条件优化后, 产酶活力达到 36.67 U/g, 是出发菌株产酶活力的 4.16 倍, 产酶高峰缩短了 21 h。对细菌黄嘌呤氧化酶酶学性质进行了初步研究, 其最适反应条件为: 37 ℃、pH 6.5、Fe²⁺ 对酶活力有较强的抑制作用, EDTA 对酶活力有明显的激活作用。

关键词: 黄嘌呤氧化酶; 节杆菌; N⁺ 诱变; 酶学性质

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Mutagenesis of *Arthrobacter* sp. g-1984 for Raising the Production of Xanthine Oxidase

XIA Xiao-hua¹, LI Zhong-qin¹, QIN Guang-yong², WANG Wu¹

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Xanthine oxidase (XOD) producer *Arthrobacter* sp. g-1984 was mutagenized by N⁺ beam. A mutant strain X7 was screened, and produced XOD activity of 24.49 U/g, 2.78 times as the that of the parent strain (8.81 U/g). After optimizing the fermentation conditions, the XOD yield reached at 36.67 U/g, 4.16 times as that of the parent strain, and the fermentation time of XOD was shortened by 21 h. Furthermore, its enzymatic properties were studied, and the results showed that the optimal temperature and pH for XOD reaction were 37 ℃ and pH 6.5 respectively. It was found that XOD activity was inhibited by Fe²⁺ but stimulated by EDTA.

Key words: xanthine oxidase; *Arthrobacter*; N⁺ ion beam mutagenesis; enzymatic properties

黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD, EC 1.2.3.2)是一种氧化还原酶^[1], 参与机体内核酸的分解代谢, 促进铁的吸收与转运^[4]。近年来痛风和

痛风的发生导致的高尿酸血症的发病率不断上升, 现在唯一上市的抑制尿酸生成的药物为别嘌呤醇, 但常伴有副作用, 因此抑制 XOD 活力的新药物研

收稿日期: 2006-11-08.

基金项目: 工业微生物技术教育部重点实验室基金项目(KLIB-KF200502).

作者简介: 夏小花(1981-), 女, 河南武陟人, 酶工程硕士研究生. Email: xxhwz81@yahoo.com.cn

通讯作者: 王武(1952-), 女, 福建福州人, 教授, 博导, 主要从事酶工程与分子生物学方面的研究. Email: wangwu@jiangnan.edu.cn

发已越来越引起人们的重视^[5]。另外,XOD作用产物还具有抗菌作用,XOD可用于肝病检测^[6]、测定血清无机磷的含量、提高病毒唑的转化率、测定动物源食品的新鲜度^[4]等。

节杆菌 XOD 属于含钼脱氢酶黄素蛋白家族成员,由两个亚基构成,每个亚基均含 1 个 Mo,1 个 FAD 和 2 个 Fe₂S₂ 族。细菌 XOD 是一种诱导酶^[2],需要通过黄嘌呤及其类似物的诱导而获得,把次黄嘌呤、黄嘌呤氧化成尿酸。国外报道假单胞菌、节杆菌等产 XOD^[2],C A Woolfolk 等对细菌 XOD 进行了初步分离纯化,测得该酶为二聚体^[3],两个亚基相对分子质量分别为 146 000 和 79 000,国内只有易福明^[9]曾对节杆菌 XOD 有过报道。

作者采用 N⁺ 离子诱变技术处理黄嘌呤氧化酶产生菌 *Arthrobacter* sp. g-1984,以提高其 XOD 产率。对正突变株产酶发酵条件进行了优化,并对 XOD 的酶性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 作者所在实验室保藏菌株 *Arthrobacter* sp. g-1984。

1.1.2 培养基

1) 种子培养基(g/L): NaCl 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 5; pH 7.2。

2) 发酵培养基(g/L): NaCl 5, (NH₄)₂SO₄ 2, 质量分数 1% 的 CaCl₂ 1 mL, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, 葡萄糖 10, 酵母提取液 1, 黄嘌呤(0.702 mol/L) 2.5 mL; 调 pH 至 8.0。

3) 初筛培养基(g/L): KH₂PO₄ 6.8, K₂HPO₄ 8.7, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.01; 调 pH 至 7.2; 再加入酵母提取液 0.1, 黄嘌呤 1, 琼脂 15。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 接一环斜面培养基上的菌体于种子培养基中, 32 ℃、200 r/min 培养 24 h, 再以 5% 接种量接于发酵培养基, 32 ℃、200 r/min 摇瓶液体发酵。

1.2.2 黄嘌呤氧化酶活力测定 参照文献^[7]。

1.2.3 菌体量测定 取 1 mL 发酵液, 用蒸馏水稀释至 5 mL, 以蒸馏水为空白, 600 nm 下测其吸光度。对照菌浓标准曲线求得菌体干重。菌浓标准曲线 $y = 2.3144x + 0.001$ ($R = 0.9991$), 其中 $x = OD_{600}$, y 的单位为 g 干菌体/L。

1.2.4 残糖测定 3,5-二硝基水杨酸比色法^[8]。

1.2.5 黄嘌呤测定 通过紫外扫描仪全波长扫描一定浓度的黄嘌呤(Xan)溶液, 发现其在 270 nm 波长下有最大吸收峰, 因此在 270 nm 用 HPLC 法测得黄嘌呤的浓度和相应吸收峰面积的标准曲线。色谱条件: Agilent Hp1100 色谱仪, C₁₈ 色谱柱(250 mm × 5 mm); 3.2 g/L、pH 7.5 的 NH₄H₂PO₄ 为流动相, 波长 270 nm, 测得黄嘌呤浓度和相应吸收峰面积的标准曲线为: $y = 3\ 658x + 82.028$ ($R = 0.999\ 2$), 其中 y 的单位为吸收峰面积 mAU * s, x 的单位为 mmol/L Xan, 线性范围 0.2~1.2 mmol/L Xan。将发酵液在 8 000 r/min 离心 10 min, 检测上清液在 270 nm 的吸收峰面积, 根据标准曲线求出上清液中黄嘌呤含量。

1.2.6 *Arthrobacter* sp. g-1984 最佳产酶时间测定

取 *Arthrobacter* sp. g-1984 发酵不同时间菌悬液, 处理方法同文献^[7]。

1.2.7 离子束诱变

离子注入实验在郑州大学生物物理研究所 Titan 离子束生物工程装置上进行。

菌体在液体种子培养基中培养 24 h → 取 1 mL 菌悬液 → 梯度稀释至原来的 10⁻³ 倍 → 取 0.1 mL 的菌悬液, 涂布于灭过菌的培养皿中, 于无菌超净台上吹干 → N⁺ 注入(能量 30 000 eV, 频率 25 Hz) → 2 mL 无菌水洗涤 → 转入种子培养基后培养 → 涂于筛选培养基培养一周 → 挑出透明圈较大的菌株 → 接入种子培养基培养 24 h → 5% 接种量接入发酵培养基 → 离心破碎菌体, 测定酶活力。

2 结果与分析

2.1 诱变出发株 *Arthrobacter* sp. g-1984 产 XOD 曲线

Arthrobacter sp. g-1984 产 XOD, 但其产酶高峰时间没有确定, 因此在不同发酵时间测该菌发酵液菌体量、产酶活力、黄嘌呤和葡萄糖含量, 45 h 时菌体量和产酶活力最高, 分别为 2.7 g/L 和 8.81 U/g, 黄嘌呤和葡萄糖质量浓度分别为 0 g/L 和 0.46 g/L, 结果见图 1。确定产酶发酵终止时间为 45 h。

2.2 N⁺ 离子束诱变与筛选

在 30 000 eV, 25 Hz 的处理条件下, 分别选择 9 种不同的氮离子注入剂量, 对出发株 *Arthrobacter* sp. g-1984 进行诱变处理, 考察不同剂量时的致死率和正突变率, 结果见表 1。

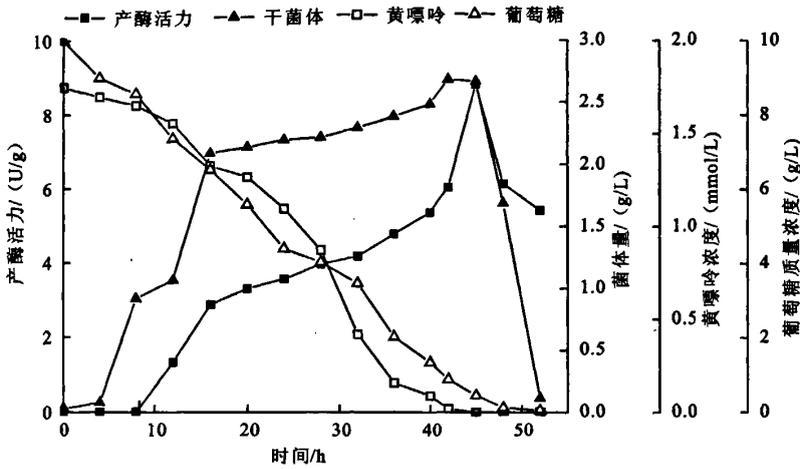


图 1 *Arthrobacter* sp. g-1984 产酶曲线

Fig. 1 XOD Production curve of *Arthrobacter* sp. g-1984

表 1 N^+ 剂量处理出发株的致死率和正突变率

Tab. 1 Lethal and positive mutation ratio after mutagenesis of wild strain

注入剂量/ ($\times 10^{15} N^+ / cm^2$)	注入 时间/s	致死 率/%	正突 变率/%
0.1	6	70	0
0.3	18	73	5
0.5	32	76	11
0.7	44	79	13
1.0	64	82	17
3.0	192	86	19
5.0	320	90	26
7.0	448	100	0
10.0	636	100	0

从表 1 可知, $5.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 致死率和正突变率较高, 所以选择 $5.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 作为该菌诱变注入剂量。注入剂量为 $5.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 诱变

条件下筛选出 2 株正突变株 X4 和 X7, 结果见表 2。

表 2 正突变株产酶活力比较

Tab. 2 XOD yield of the positive mutants after N^+ mutation

菌株	发酵 时间/h	生物量/ (g/L)	产酶活力/ (U/g)	产酶活力比较 (突变株/出发株)
出发株	45	2.7	8.81	—
X4	45	2.8	13.85	1.57 倍
X7	45	2.6	18.75	2.13 倍

2.3 突变株 X7 产 XOD 过程分析

在相同发酵条件下, 突变株 X7 产酶高峰时间相对于出发菌株提前 21 h, 产酶活力为出发菌株 2.78 倍, 结果见图 2。24 h 时 X7 产酶活力最高, 为 24.49 U/g, 菌体量为 2.2 g/L, 黄嘌呤和葡萄糖质量浓度分别为 0 g/L 和 4.09 g/L, 因此确定 X7 产酶发酵终止时间为 24 h。

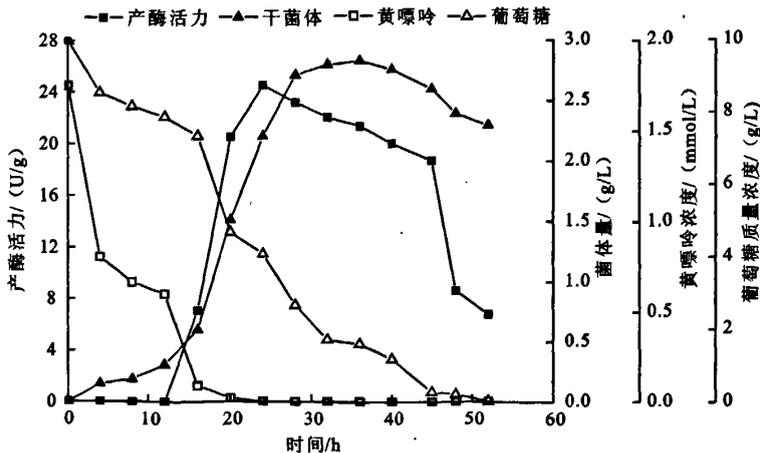


图 2 突变株 X7 产酶曲线

Fig. 2 XOD Production curve of X7

2.4 发酵条件初步优化

依次考察不同培养温度、不同初始 pH 值、不同接种量对产酶的影响,结果见表 3。确定最佳发酵条件为 30 °C, 初始 pH 值为 9.0, 接种量为 8%。此条件下产酶活力为 36.67 U/g, 是出发菌产酶活力的 4.16 倍。

表 3 发酵条件优化结果

Tab. 3 The results of fermentation optimization

温度/°C	产酶活力/(U/g)	初始 pH 值	产酶活力/(U/g)	接种体积分数/%	产酶活力/(U/g)
26	3.91	7	18.56	5	32.16
28	10.63	8	27.37	8	36.67
30	27.37	9	32.16	10	33.75
32	24.49	10	25.69	13	31.27
34	4.25	11	10.08	15	30.75

2.5 XOD 酶学性质

2.5.1 温度对酶活力和稳定性的影响 将酶液分别在 25~55 °C 不同温度下测定酶反应活力(图 3)。图 3 表明,酶作用的适宜温度范围为 30~40 °C, 最适反应温度为 37 °C。将酶液在不同温度下保存一定时间,测定残余酶活力(图 4),以最适反应温度时酶活力为 100%, 25~35 °C 该酶酶活比较稳定,高于 35 °C 酶活下降幅度增大,但 45 °C 保温 2 h 酶活仍保持 50% 左右,总体来说酶活比较稳定。

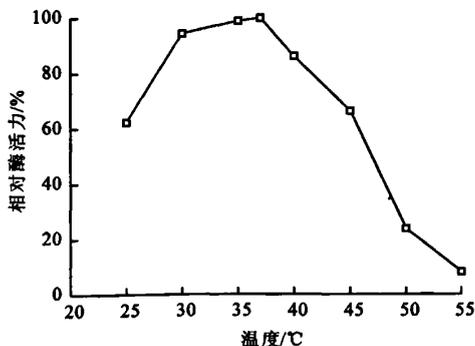


图 3 温度对 XOD 酶活力的影响

Fig. 3 The effects of temperature on XOD activity

2.5.2 pH 值对酶活力和稳定性的影响 在不同 pH 条件下测定酶反应活力(图 5)。图 5 表明,酶作用最适 pH 值范围为 6.0~7.0, 最适反应 pH 值为 6.5。将酶液在不同 pH 值的 50 mmol 的 Tris-HCl 缓冲液中室温保存 2 h 后,测定残余酶活力。pH 6.5~7.0 时酶活力没有损失,该酶在中性偏酸条件下酶活力保持稳定,在碱性条件下酶活力下降幅度大于酸性条件下。

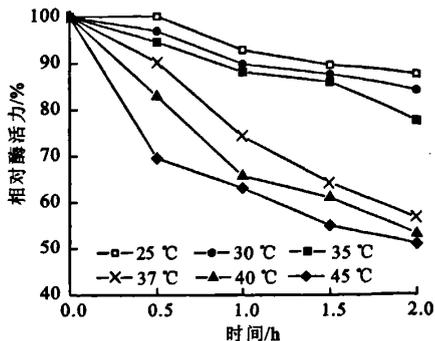


图 4 温度对 XOD 稳定性的影响

Fig. 4 The effects of temperature on XOD stability

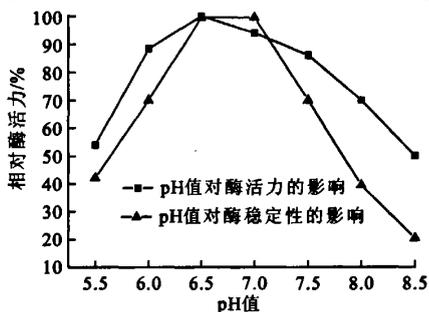


图 5 pH 值对 XOD 活力和稳定性的影响

Fig. 5 The effects of pH on XOD activity and XOD stability

2.5.3 金属离子对酶活力的影响 将金属离子与酶液混合,使金属离子终浓度为 2 mmol/L, 25 °C 保温 2 h 后,测定酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100% (见图 6)。由图 6 可见,EDTA 对酶活力有明显的激活作用,Fe²⁺ 对酶活力有明显的抑制作用, K⁺、Na⁺、Mg²⁺ 对酶活力有一定的抑制作用,但残余酶活力均在 60% 以上, Ca²⁺ 对酶活力影响不大。

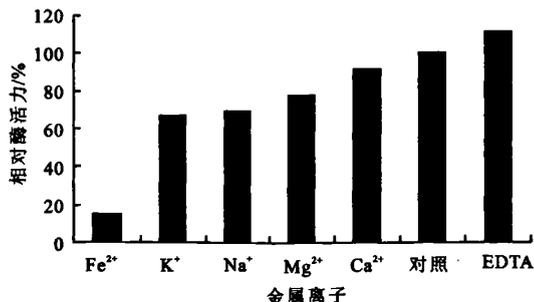


图 6 金属离子对 XOD 活力的影响

Fig. 6 The effects of metal ions on XOD activity

国外曾报道 Mg²⁺ 是细菌 XOD 的稳定剂^[3], 由图 6 可知, EDTA 对酶活力有较好的稳定作用, 在细菌 XOD 的分离纯化过程中, 如加入 EDTA 可对酶液有一定的保护作用, 减少酶活力的损失。

3 结 语

常规的诱变处理涉及紫外线照射、NTG 诱变等,已被广泛应用于提高微生物的各项性能指标。目前,低能离子注入技术开始引入微生物育种领域。低能离子注入生物体的作用机制并非单一,可能涉及与遗传物质之间发生了动量传递和电荷交换等作用^[10],造成 DNA 碱基发生变异。作者用氦离子束诱变节杆菌 *Arthrobacter* sp. g-1984,在 $5.0 \times 10^{15} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 筛选到产 XOD 正突变菌株 X7,产酶活力提高了 1.78 倍,周期缩短了 21 h,经优化发酵条件后,X7 产酶活力提高了 3.16 倍,其最适发酵条件为 30 ℃,初始 pH 9.0,接种体积分数 8%,

该条件下产酶活力达到 36.67 U/g,每消耗 1 g 黄嘌呤得到 370 单位 XOD。实践表明,节杆菌对离子束的诱变十分敏感,在为数不多的处理批次中,就能得到正突变株,且 XOD 酶产率得到较大的提高。

对细菌 XOD 酶学性质进行了初步研究,结果表明,XOD 最适反应温度为 37 ℃,在 25~35 ℃ 酶活较稳定;最适反应 pH 值为 6.5,在 pH 6.5~7.0 酶活力稳定,与文献[4]报道的牛奶 XOD 最适 pH 值和 pH 值稳定性有较大差异。 Fe^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 对酶有一定的抑制作用,深入研究其机理有利于开发 XOD 抑制剂药物。EDTA 对酶有明显的激活作用,激活机理可能为 EDTA 解除了粗酶液中的 Fe^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 等常见金属离子对 XOD 的抑制作用。

参考文献(References):

- [1] 张尔贤,林文华,俞丽君,等.牛奶黄嘌呤氧化酶的纯化及性质研究[J].汕头大学学报,1998,13(1):26-31.
ZHANG Er-xian, LIN Wen-hua, YU Li-jun, et al. Milk xanthine oxidase: purification and properties[J]. *Journal of Shantou University(Natural Science)*, 1998,13(1):26-31. (in Chinese)
- [2] Woolfolk C A, Downard J S. Distribution of xanthine oxidase and xanthine[J]. *Dehydrogenase Specificity types Among Bacteriology*, 1977, 7:1175-1191.
- [3] Woolfolk C A, Downard J S. Bacterial xanthine oxidase from *Athrobacter* S-2[J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 8:422-428.
- [4] 方北曙,李翠莲,黄中培.牛乳中黄嘌呤氧化酶研究综述[J].食品与机械,2006,22(1):93-96.
FANG Bei-shu, LI Cui-lian, HUANG Zhong-pei. Introduction to the xanthine oxidase of cow milk[J]. *Food & Machinery*, 2006,22(1):93-96. (in Chinese)
- [5] 朱深银,周远大,杜冠华.防治痛风药物的研究进展[J].医药导报,2006,25(8):803-806.
ZHU Shen-yin, ZHOU Yuan-da, DU Guan-hua. Research Progresses in medicine for gout prevention[J]. *Herald of Medicine*, 2006,25(8):803-806. (in Chinese)
- [6] 赵远红,邵凤珍.黄嘌呤氧化酶与肝病关系探讨[J].中西医结合肝病杂志,2005,15(3):188-190.
ZHAO Yuan-hong, SHAO Feng-zhen. Study on the relation between xanthine oxidase and liver diseases[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2005, 15(3):188-190. (in Chinese)
- [7] 李忠琴,许小平,王武.辣根过氧化物酶分光光度法测定黄嘌呤氧化酶的活性[J].分析化学,2006,34(6):821-824.
LI Zhong-qin, XU Xiao-ping, WANG Wu, et al. Spectrophotometric determination of xanthine oxidase by horseradish peroxidase[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(6):821-824. (in Chinese)
- [8] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1989:9-10.
- [9] 易福明,吴显辉,冯盛彦,等.黄嘌呤氧化酶产生菌的离子注入诱变及其第二步发酵的研究[J].激光生物学报,2002,11(2):138-141.
YI Fu-ming, WU Xian-hui, FENG Shen-yan, et al. Ion implantation mutation breeding of xanthine oxidase producing strain and its two-step fermentation technology[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2002,11(2):138-141. (in Chinese)
- [10] 余增亮.离子束生物技术引论[M].合肥:安徽科学技术出版社,1998:84-90,178-180,247-249.

(责任编辑:李春丽)