

肝素酶产生菌的筛选及发酵条件

高宁国 程秀兰 杨 敬 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 从土壤中筛选到一株活性较高的肝素酶产生菌株 *Corynebacterium* sp.。培养及产酶最佳条件表明,最适培养基组成(g/L):胰蛋白胨 20,氯化钠 1,磷酸氢二钾 2.5,硫酸镁 0.5,麦芽糖 20,pH6.5。最适生长温度 27℃,最佳产酶温度 31℃。在 500mL 三角瓶中装 40mL 培养基,在 30℃ 200r/min 摇床上培养 24 h,每升发酵液可产酶 1700u。

关键词 肝素酶,棒杆菌,最佳培养条件

分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)01-0064-67

肝素酶(EC 2.2.2.7)是一类能降解肝素类物质的裂解酶。很长时间以来,肝素黄杆菌(*Flavobacterium heparinum*)一直是肝素酶的主要来源。目前已经从肝素黄杆菌中分离纯化出三种肝素酶:肝素酶 I^[1]、II^[2]和 III^[3],它们能特异性地断裂肝素链上具有特定修饰的不同的序列,从而产生不同的寡糖片段,分析研究这些寡糖片段将得到很多关于肝素的结构及结构与功能之间相互关系的信息^[4~7]。肝素酶具有多种重要用途,包括体外循环中肝素的消除^[8],肝素精确结构的确定^[9],肝素抗凝机理及肝素结构与功能的研究^[10,11],制备低分子量肝素^[11,12]及抗肿瘤药物^[13]。另外,肝素酶本身可抑制新血管生成及碱性成纤维细胞生长因子介导的血管内皮细胞的增殖^[14]。目前商品化的肝素酶均由肝素黄杆菌生产,价格非常昂贵,并且其生产受专利保护,而国内尚未有肝素酶的报道。我们从土壤中筛选到一株国内外均未见报道的肝素酶产生菌棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)并对其产酶条件作了初步研究。

1 材料和方法

1.1 培养基

1.1.1 分离培养基 在 100mL 0.02mol/L pH6.5 的磷酸缓冲液中,加入 0.2g 肝素(80 IU/mg,购自南京生化制药厂)0.1 g (NH₄)₂SO₄ 及 1.3 g 的琼脂,制成平板。

1.1.2 鉴定培养基(g/L):蛋白胨 10,NaCl 1,K₂HPO₄ 2.5,MgSO₄ 0.5,肝素 2,调 pH6.5。

1.2.3 基础培养基(g/L):NaCl 1,K₂HPO₄ 2.5,MgSO₄ 0.5,肝素 2,调 pH 至 6.5。

1.3 菌种的分离

取少许土样,用无菌水浸提,取上清液稀释涂平板,待菌落长出后挑到牛肉汁斜面上。平板上长出的菌落不一定能降解肝素,需破碎细胞测酶活作进一步鉴定。

1.4 培养方法及粗提液中肝素酶活的测定

1.4.1 培养方法 :将纯化的菌种从牛肉汁斜面上接入基础培养基(40 mL 培养基/500 mL 三角瓶) ,30℃ 200r/min 摇床上培养 12~14 h ,接入装有 40 mL 发酵培养基的 500 mL 的三角瓶中 ,相同条件下培养 24 h。

1.4.2 无细胞粗提液的提取 :将细菌培养液离心 (18000×g , 10min) ,用 pH6.8 , 0.025 mol/L 磷酸缓冲液洗涤菌体 2 次 ,按每毫升缓冲液 0.2 g 湿菌体的比例加入 0.025 mol/L pH6.8 的磷酸缓冲液 ,在冰浴内超声破碎 5 min(10 次 ,每次 30s)。离心 ,20000×g , 40min ,上清液即为无细胞粗提液。

1.4.3 酶活测定 :用天青 A 法^[5]。取 200 μL 上清 ,加入 50 μL4% 肝素(150 IU/mg) , 250μL0.2mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液 ,30℃ 水浴保温 1 h ,每隔 20 min 取出 5μL 反应液 ,加入 5 mL 20mg/L 的天青 A 液 ,测 OD₅₀₅。根据标准曲线确定反应液中未降解肝素的浓度从而得出肝素的降解量。酶活单位定义为在 30℃ pH 7.0 的条件下每小时降解 1 mg 肝素所需的酶量为一个单位。

1.5 菌体生物量的测定

取 0.1 mL 发酵液 ,加入 3.9 mL 水 ,测 OD₆₀₀。

1.6 仪器与试剂

分光光度计 :721 型。超声破碎仪 :B.Braun-Sonic 2000 型。天青 A :Sigma 公司产品。粗品肝素 :80 IU/mg ,购自南京生化制药厂 ,精品肝素 :150IU/mg ,来自上海生化制药厂。

2 结果和讨论

2.1 菌种筛选

从多株细菌中筛选得到一株肝素酶产生菌株 ,经本所细菌分类室初步鉴定为棒杆菌属(*Corynebacterium* sp.)。该细菌为 G⁺ ,在肝素平板上形成表面光滑的淡黄色菌落。

2.2 肝素酶的最佳产生条件

2.2.1 氮源对菌体生长及产酶的影响 :在基础培养基中分别加入 1% 的不同种类的氮源 ,培养 24 h 后 ,分别测菌体生物量及酶活。结果(表 1)表明 ,胰蛋白胨的效果最好。

表 1 氮源对菌体生长及产酶的影响

Table 1 Effects of nitrogen sources on the bacterium growth and heparinase production

氮 源	生物量	酶活力
Nitrogen source	Biomass/OD ₆₀₀	Enzyme activity/(u/L)
酪蛋白 Casein	0.175	340
酪蛋白水解物 Casein hydrolysate	0.218	246
胰蛋白胨 Trypticase	0.256	580
大豆胨 Soytone	0.240	486
玉米浆 Corn steep liquor	0.039	18
牛肉膏 Beef extract	0.196	250
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.053	14
硝酸钠 Sodium nitrate	0.068	112
尿素 Urea	0.054	340

2.2.2 碳源对菌体生长及产酶的影响 :在基础培养基中加入 1% 的胰蛋白胨及 1% 不同种类的碳源 ,培养 24 h 后 ,测菌体生物量及酶活 ,表 2 表明 ,麦芽糖的效果最好。

2.2.3 氮源、碳源浓度对产酶及菌体生长的影响 :在基

础培养基中加入不同浓度的胰蛋白胍及不同浓度的麦芽糖 相互交叉 共设制 16 组 培养 24 h 后收获 测菌体生物量及酶活 结果表明 以胰蛋白胍的浓度为 2 % 麦芽糖浓度为 2 % 时效果最好。

2.2.4 最适起始 pH : 分别以硫酸或氢氧化钠调培养基的起始 pH , 培养 24h 后收获 测菌体生物量及酶活 结果表明 起始 pH 为 6.5 时效果最好。

2.2.5 最适温度的确定 : 通过温度梯度摇床试验 如图 1 所示 生长的最适温度是 27℃ , 而产酶的最适温度是 31℃。

2.2.6 通气量对菌体生长及产酶的影响 在 500mL 三角瓶中分别装入不同量的培养基 , 在 30℃ 200r/min 的摇床上培养 24 h 后 结果表明 装 20 mL 培养基效果最好。

2.2.7 种龄及接种量对产酶及菌体生长的影响 按不同接种量将不同种龄的液体种子接入发酵培养基中 , 14 ~ 16 h 的种子产酶较高 而接种量的影响不大。

2.2.8 培养时间对菌体生长及产酶的影响 在最适培养基条件及 30℃ 发酵培养菌体 , 不同时间取样测定。图 2 的结果表明 菌体生长及酶活在 24 h 达最高 28 h 开始下降。

表 2 碳源对菌体生长及产酶的影响

Table 2 The effects of carbon sources on the bacterium growth and heparianse production

碳 源	生物量	酶活力
Carbon sources	Biomass /OD ₆₀₀	Enzyme activity /(u/L)
无糖 No sugar	0.212	563
葡萄糖 Glucose	0.360	926
麦芽糖 Maltose	0.425	1050
蔗糖 Sucrose	0.400	914
右旋糖酐 Dextran	0.251	260
柠檬酸 Citric acid	0.015	0
木糖 Xylose	0.231	640
D-半乳糖 D-galactose	0.396	860
乳糖 Lactose	0.300	640

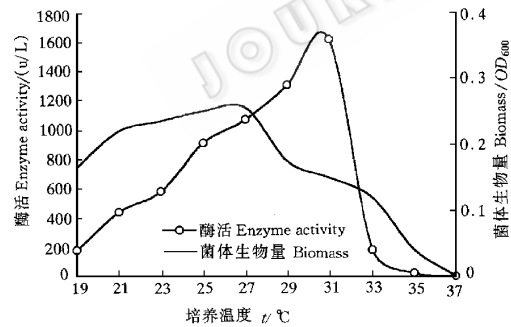


图 1 温度对菌体生长及产酶的影响
Fig.1 The effects of temperature on the growth and enzyme production

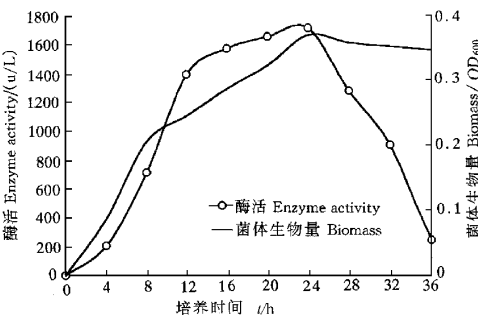


图 2 菌体生长及产酶曲线
Fig.2 The course of growth and heparinase production

3 讨论

筛选得到的肝素酶产生菌 *Corynebacterium* sp. 是国内外尚未报道的肝素酶产生菌株 , 产生的肝素酶是一种诱导的胞内酶 , 其生长条件与产酶条件都与国外常用的肝素黄杆菌不同。酶的纯化和性质的研究工作正在进之中。

参 考 文 献

- [1] Yang V C , Linhardt R J , Bernstein H *et al.* *J Biol Chem* , 1985 , **260**(3) :1849~1857.
- [2] Nader H B , Porcionatto M A , Ivarne L S *et al.* *J Biol Chem* , 1990 , **265**(28) :16807~16813.
- [3] Lohse D L , Linhardt R J. *J Biol Chem* , 1992 , **267**(4) :23347~23355.
- [4] Lindhardt R J , Fitzgerald G L , Cooney C L *et al.* *Biochim Biophys Acta* , 1982 , **702** :197~203.
- [5] Desai U R , Wang H M , Lindhardt R J. *Arch Biochem Biophys* , 1993 , **306** :461~468.
- [6] Lindhardt R J , Gakkiher P M , Cooney C L. *Appl Biochem Biotechnol* , 1986 , **12** :137~175.
- [7] Ernst S I. *Biochem J* , 1996 , **315** :589~597.
- [8] Langer R , Linhardt R J , Hoffberg S *et al.* *Science* , 1982 , **227** :680~685.
- [9] Silva M E , Dietrich C P. *J Biol Chem* , 1975 , **250**(17) :6841~6846.
- [10] Lindahl U. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1979 , **76** :3198~3202.
- [11] Lane D A , Lindahl U. Heparin and Related Polysaccharides. New York :Plenum Press , 1992. 205~220.
- [12] Linhardt R J , Fitzgerald G L , Cooney C L *et al.* *J Biol Chem* , 1982 , **257** :7310~7313.
- [13] Ootani N. *Carbohydr Res* , 1979 , **70** :295~306.
- [14] Sasisekharan R , Moses M A , Matthew A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 , **91** :1524~1528.
- [15] Galliher P M , Cooney C L. *Appl Environ Micro* , 1981 , **41** :360~365.

STRAIN SCREENING AND FERMENTATION CONDITIONS OF A NOVEL HEPARINASE-PRODUCING STRAIN

Gao Ningguo Cheng Xiulan Yang Jing Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract The novel heparinase-producing bacterial strain *Corynebacterium* sp. was screened and isolated from soil. The optimum medium composition is (g/L): Trypticase 20 , NaCl 1 , K_2HPO_4 2.5 , $MgSO_4$ 0.5 , Heparin 2 , maltose 20 , pH 6.5. The optimum growth temperature was 27℃ while maximum enzyme production was achieved at temperature 31℃ . When cultured at a rotating shaker at 30℃ for 24 hours , 200r/min , 40mL medium in 500mL flask , the Production of heparinase reached 1700u/L.

Key words Heparinase , *Corynebacterium* , Fermentation conditions