

一种产血纤维蛋白溶酶菌株的筛选及液体发酵条件的选择*

魏 香^{1,2} 刘晨光¹ 刘万顺¹

(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(² 清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

提要 主要进行了产生纤维蛋白溶酶菌株的筛选培养和液体发酵条件的优化等方面的研究工作。结果表明,该菌为一种短杆状菌,革兰氏染色为阴性,具有对血纤维蛋白的产酶依赖性。用此菌作为菌种进行发酵产酶的最适条件为:碳源,木糖 1.5%;氮源,血纤维蛋白 1.75%;发酵液初始 pH 7.4;接种量 5%;发酵时间 24 h。

关键词 血纤维蛋白溶酶,海洋细菌,液体发酵条件

随着血管栓塞类疾病患者的不断增加,各种溶栓药物也相继被研制、应用。但从这些溶栓剂的临床效果来看,均不同程度地出现各种毒副作用,尽管不少学者运用蛋白质工程、基因工程对原有溶栓剂进行了各种结构和功能上的改造,但这些问题仍未得到很好的解决。从已有溶栓剂的来源看,它们都来源于陆地。我国拥有辽阔的海岸线和丰富的海洋资源。但到目前为止,国内外从海洋生物中提取溶栓剂的报道还不多。作者筛选到一种产血纤维蛋白溶解酶的细菌,研究其生产和最佳产酶条件。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 YXQG01 型蒸汽消毒器(山东医疗器械厂), WMZK 恒温振荡器(中国深圳), 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), 202-1 型干燥箱(上海市实验仪器厂), GL-20 型冷冻离心机(TOMY SEIKO CO., LTD. Tokyo, Japan), HH-56 型电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器厂)。

1.1.2 试剂 血纤维蛋白:本室自制。培养基碳源为:麦芽糖、甘油、蔗糖、山梨糖、乳糖、甘露糖、葡萄糖、木糖、半乳糖。培养基氮源为:牛肉浸膏、鱼蛋白胨、血纤维蛋白。固体基础培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。固体选择培养基 1: 肉浸膏 0.15%, 鱼蛋白胨 0.5%, 猪血纤维蛋白 0.65%, NaCl 0.9%, 琼脂 1.5%, 0.05 mol/L pH 7.4 磷酸盐(Na₂HPO₄·KH₂PO₄) 缓冲液(PBS) 100 ml。固体选择培养基 2: 猪血纤维蛋白 1.5%, NaCl 0.9%, 琼脂 1.5%, 0.05 mol/L pH 7.4

磷酸盐缓冲液(PBS) 100 ml。试剂均为国产商品试剂,分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离与纯化培养^[2,3] 用稀释涂布平板法和平板划线法。

1.2.2 产酶菌株的筛选与保存^[2,3] 用平板划线法,斜面保存。液体发酵培养:用 500 ml 三角瓶,装液体培养基 150 ml, 30 °C 恒温振荡培养。菌种保存:用斜面放 4 °C 下保藏。

1.2.3 菌体生长量的测定 采用光电比浊计数法^[2,3]。

1.2.4 酶活力测定 采用改良的 Folin 酚试剂法^[1]。以 Tyr 微克数为横坐标,相应光密度为纵坐标绘制 Tyr OD₆₈₀ 标准曲线,如图 1。一个酶活力单位规定为:37 °C 下每分钟水解蛋白产生 1 μg Tyr 为 1 个活力单位,记为 1 IU。

1.2.5 菌株生长曲线和产酶曲线的测定 以液体基础培养基进行发酵培养,每隔 12 h 取样 1 次,连续发酵 5 d,用分光光度法测定发酵液 OD₅₄₀ 和离心上清液的酶活性。

1.2.6 不同碳源对产酶的影响^[3] 在基础培养基中加入不同的碳源,配制各种不同的液体培养基。取菌 FE 92-8 一环在液体培养基中进行预发酵 48 h 后,按 2% 接种量分别接入各培养基中,发酵 24 h,测定各发酵液的酶活性。

1.2.7 不同氮源对产酶的影响^[3] 以木糖为碳

* 国家“863”青年基金 819-Q10 资助项目。

收稿日期:2000-07-24;修回日期:2000-12-18

源,氮源分别为:(1)牛肉浸膏、鱼蛋白胨 1.5%,(2)牛肉浸膏、鱼蛋白胨 0.75%,血纤维蛋白 0.75%,(3)血纤维蛋白 1.5%。

1.2.8 不同血纤维蛋白量对产酶的影响 根据上述实验条件,分别配制氮源血纤维蛋白含量为 0.25%,0.50%,0.75%,1.00%,1.25%,1.75%,2.00% 的液体发酵培养基进行发酵。

1.2.9 接种量对菌株产酶的影响 按 0%,0.5%,1.0%,2.0%,3.0%,4.0%,5.0%,6.0%,7.0%,8.0% 不同的接种量将种子培养液接入培养基中进行发酵培养,测定发酵液的酶活性。

1.2.10 发酵培养基初始 pH 对产酶的影响 用 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4$ 配成初始 pH 分别为 6.0,6.5,7.0,7.4,8.0,8.7 的液体培养基进行发酵,测定发酵液酶活性。

2 结果与讨论

待筛选菌在固体基础培养基上培养 2 d 后,转接

于固体选择培养基 1 上,48 h 后观察发现:菌株基本不能生长,而接于含有血纤维蛋白作为营养源的固体选择培养基 2 中的菌体生长良好,经过多次纯化培养,得到菌株 FE 92-8,其菌落为乳白色半透明状,圆形,边缘较清晰,中央凸起,底部深入培养基内部。经细菌革兰氏染色,该菌为革兰氏阴性(G^-)菌,显微镜观察,菌体为短杆状。有关菌种鉴定工作尚在进行中。将此菌作为产酶菌种进行液体发酵条件的研究和酶的提取分离纯化。

菌株 FE 92-8 生长情况如图 2 所示,产酶情况如图 3。

不同碳源对产酶的影响如图 4 所示。

不同氮源对产酶的影响结果由图 5 表示。

不同血纤维蛋白含量对发酵产酶的影响如图 6 所示。

接种量对菌株产酶的影响由图 7 表示。

发酵培养基初始 pH 对产酶的影响如图 8 所示。

本文主要进行了产生纤维蛋白溶酶菌株的筛选

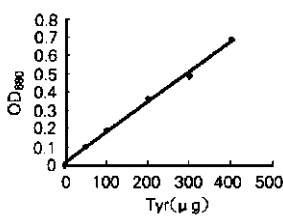


图 1 酶活测定标准曲线

Fig.1 Standard curve of enzyme activity

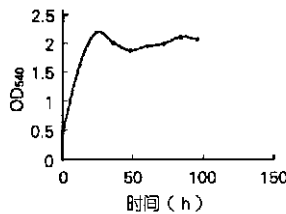


图 2 FE92-8 生长曲线

Fig.2 Growth curve of FE 92-8

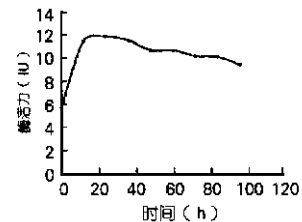


图 3 FE92-8 产酶曲线

Fig.3 FE92-8 curve of plasmin secreting

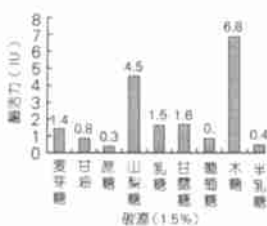


图 4 不同碳源对产酶的影响
Fig.4 Effect of different carbon source on plasmin secreting

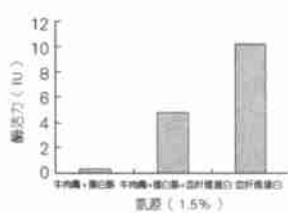


图 5 不同氮源对菌株产酶的影响
Fig.5 Effect of different nitrogen source on plasmin secreting

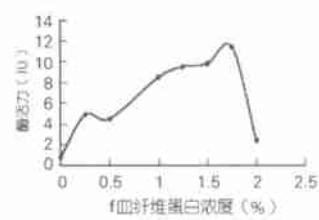


图 6 不同血纤维蛋白浓度对产酶的影响
Fig.6 Effect of different fibrin density on plasmin secreting

培养和液体发酵条件的优化等方面的研究工作。结果表明,该菌为一种短杆状菌,革兰氏染色为阴性,具有对血纤维蛋白的产酶依赖性。图 2、图 3 表明,在发酵培养 24 h 以前,随着时间的延长菌量逐渐增加,到 24 h 时达到最大值,菌体密度达 1.5×10^6 个/ml,24 h 以

后,逐渐趋于平衡,直到发酵 5 d 仍无下降趋势,酶活力变化与菌体生长情况呈现一定的相关性,在 24 h 以前,随着时间的延长酶活力逐渐升高,到 24 h 时达到最大值,尔后随发酵时间的延长酶活变化不大。从菌体生长和酶活情况来看,24 h 为该菌的最佳液体发

酵时间。由图 2~4 可以看出碳源与产酶量的顺序为：木糖、山梨糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖、甘油、葡萄糖、半乳糖、蔗糖。以木糖为碳源的培养基中生长的菌所产酶活力最高，山梨糖中次之，蔗糖为最低。这一结果与傅俐等^[6,7]所叙述的枯草杆菌产生枯激酶所需碳源相同，从而选择木糖作为该菌发酵产酶的最佳碳源。图 5 表明，不同氮源对产酶量影响较大，适合该菌发酵的氮源依次为：1.5% 血纤维蛋白、0.75% 血纤维蛋白加 0.75% 牛肉浸膏和鱼蛋白胨、1.5% 牛肉浸膏和鱼蛋白胨。由此可以看出，血纤维蛋白是菌体产酶的最佳碳源，而牛肉浸膏、鱼蛋白胨则不能为菌体产酶提供必需的营养，表现出该菌对血纤维蛋白作为氮源的产酶依赖性，这也是该菌不同于其他细菌如枯草杆菌^[6]（产生枯激酶最佳氮源为大豆胰蛋白胨）的特异性。图 6 表示不同血纤维蛋白含量对菌株产酶的影响，结果表明，随着血纤维蛋白含量的增加，发酵液菌体浓度明显增加，酶活呈现上升趋势，当血纤维蛋白含量达到 1.75% 时，菌体浓度最大，产酶活力达到最高值，由此确定液体发酵培养加入血纤维蛋白 1.75% 为最适用量。图 7 表明接种量对产酶的影响为：开始时随接种量增加酶活逐渐上升，接种量为 5.0% 时，产酶活力最高，之后又表现为下降趋势。因此，接种量 5.0% 最适于菌体发酵产酶。由图 8 可以看出，在初始 pH 为 7.4 时产酶活力最高，在低于或高于此 pH 时均呈现一定的下降趋势。因此，pH 7.4 左右为菌体发酵的最适初始 pH。对该菌的诱变、性质等方

面的研究工作还有待于进一步深入开展。

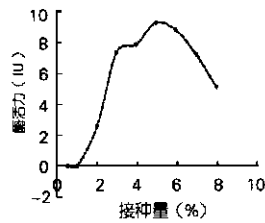


图 7 接种量对产酶的影响

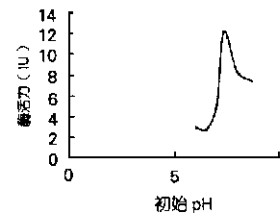


图 8 发酵液初始 pH 对产酶的影响

Fig. 7 Effect of inoculation amount on plasmin secreting Fig. 8 Effect of different initial pH of medium on plasmin secreting

参考文献

- 1 张树政主编. 酶制剂工业(下册). 北京: 科学出版社, 1984. 387~455
- 2 范秀容等. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1994.
- 3 祖若夫等. 微生物学实验教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993. 140~146; 111~114; 207~210
- 4 张承圭等. 生物化学仪器分析及技术. 北京: 高等教育出版社, 1990. 172~214
- 5 李建武等. 生化实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 43~57
- 6 傅俐, 李荣萍. 生物工程进展, 1997, 17(3): 31~33

SELECTION OF FERMENT MEDIUM FOR THE SECRETION OF PLASMIN FROM A MARINE BACTERIA

WEI Xiang^{1,2} LIU Chengguang¹ LIU Wanshun¹

(¹ College of Marine Life, Ocean University of Qingdao, 266003)

(² Biological Science and Technology Department of Tsinghua University, Beijing, 100084)

Received: Jul 24, 2000

Key Words: Plasmin, Marine bacteria, Ferment medium

Abstract

This paper reports for the optimum growth medium for the secretion of plasmin from a marine bacteria named FE 92-8. This bacteria is shortly bacillary, gram negative, dependant on the existence of fibrin. The quantity of this bacteria and the activity of plasmin secreted by the bacteria is the highest at below culture condition: carbon source, 1.5 percent xylose; nitrogen source, 1.75 percent fibrin; initial pH 7.4; inoculative quantity, 5.0 percent, ferment temperature, 30 centigrade degree, ferment time, 24 hours.

(本文编辑: 刘珊珊)