

一种产生纤溶酶的链霉菌 C-3662 的鉴定及发酵研究

武临专 陈 昉 王以光*

(中国医学科学院中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

黄 英 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 对一株从土壤中分离的纤溶酶产生菌链霉菌 C-3662 的形态、培养、生理生化和化学分类特征进行了研究,发现其与泛温链霉菌(*Streptomyces eurhythmus* Corbaz *et al.* 1968)的特征很相符。通过对链霉菌 C-3662 的 16S rDNA 序列进行测定与比对,发现它与泛温链霉菌的 16S rDNA 序列也有高达 98.19% 的同源性。根据多相分类原则,认为链霉菌 C-3662 属于泛温链霉菌。对链霉菌 C-3662 的发酵培养基组成等的研究表明,合适的发酵培养基中应含有氮源黄豆饼粉 2.0%、碳源淀粉 1.0% 和葡萄糖 2.5% 以及少量的无机盐类如硫酸镁。链霉菌 C-3662 的发酵过程研究表明,纤溶酶是在菌丝体生长停止之后才大量产生。

关键词 泛温链霉菌,链霉菌 C-3662,链霉菌纤溶酶,发酵

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)05-0600-07

纤维蛋白降解酶,简称纤溶酶,是治疗和预防心脑血管血栓栓塞性疾病的药物,具有溶解血栓、疏通血管的作用。纤溶酶是一类蛋白酶,对血栓中的纤维蛋白具有一定的降解特异性。已知许多微生物具有分泌蛋白酶的能力,对产生大量蛋白酶的微生物尤其是非致病微生物进行筛选,期望获得产生新型纤溶酶的微生物,具有实际意义。例如 Fujita M 等人对一种来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的纳豆激酶(nattokinase)进行了溶栓方面的研究,希望将其开发为新的溶栓药物^[1,2]。

链霉菌是一类在自然界尤其是在土壤中广泛存在的微生物,而且绝大多数链霉菌对人体无害。链霉菌属 G⁺ 细菌,大部分链霉菌分泌多种蛋白质(包括各种酶,如蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶等),尤其是蛋白酶于胞外。链霉菌还是大多数抗生素的产生菌,已广泛地应用于抗生素制药工业。但是,到目前为止,对产生纤溶酶的链霉菌进行深入的研究报道,尚不多见。最近,我们从一株链霉菌 C-3662 的发酵液中分离纯化出一种纤溶酶,并对其药化学进行了初步研究^[3,4]。本文报道链霉菌 C-3662 的特征和分类以及该菌株发酵产生纤溶酶的条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

链霉菌 C-3662,系本所从土壤中分离。

* 通讯联系人

作者简介:武临专(1965—),男,河南安阳人,助研,主要研究方向为微生物药理学。电话:010-83157099

收稿日期:2001-11-29,修回日期:2002-03-04

1.2 链霉菌 C-3662 培养特征及分类鉴定

1.2.1 形态特征:于高氏 1 号琼脂和葡萄糖天冬素琼脂上 28℃ 培养 7d。观察孢子丝和基内菌丝形态。

1.2.2 培养特征 选择链霉菌的八种常用的不同营养培养基(表 1),在 28℃ 培养 7~15d,观察菌丝体在各种不同培养基中的表现特征。

1.2.3 生理生化特征:参照“伯杰氏细菌系统鉴定手册第四卷”,对链霉菌 C-3662 进行了生理生化特征鉴定。

1.2.4 化学分类 (1)细胞壁化学组分分析按照 Hasegawa T 等的快速薄板层析法,进行全细胞水解液的氨基酸及糖型分析^[5] (2)按文献[6]进行磷酸类脂分析。

1.2.5 16S rDNA 序列测定^[7]:按常规方法^[8]提取菌株 C-3662 的总 DNA,采用通用引物进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,PCR 产物经纯化后直接用 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit 测序,电泳及数据分析由 Applied Biosystems DNA Sequence(model 377)自动进行。然后,将所测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行比对。

1.3 链霉菌 C-3662 的发酵

分别固定碳源变换氮源、固定氮源变换碳源以及变换无机盐,进行发酵培养基组成研究,通过测定 132h 内发酵过程的相对纤溶酶活性、菌丝浓度、pH 以及还原糖的含量等参数,对链霉菌 C-3662 产生纤溶酶的过程进行研究。

1.4 纤溶酶活性测定

纤维蛋白平板法^[9]。

1.5 菌丝浓度测定

取 10mL 发酵液,置于刻度离心管,在 2 500r/min 离心 10min,菌丝所占体积百分比即为菌丝浓度。

1.6 还原糖测定

蒽酮比色定糖法^[10]。

2 结果和讨论

2.1 链霉菌 C-3662 培养特征及分类鉴定

2.1.1 形态特征:菌株 C-3662 的基内菌丝无横隔、不断裂,孢子丝波曲至螺旋形,孢子椭圆形,表面光滑(图 1、2)。

2.1.2 链霉菌 C-3662 的菌丝体在各种不同培养基中的表现特征:结果见表 1。

2.1.3 生理生化特征:链霉菌 C-3662 的生理生化特征鉴定结果见表 2。

2.1.4 化学分类:链霉菌 C-3662 含 LL-二氨基庚二酸及甘氨酸,无特征性糖(糖型 C)。细胞壁化学组分属于 I 型;菌株 C-3662 含磷脂酰乙醇胺,磷酸类脂属于 II 型。

2.1.5 16S rDNA 序列测定与比对结果:链霉菌 C-3662 的 16S rDNA 全序列见图 3。其与帕奈链霉菌(*Streptomyces panayensis*)、黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)、泛温链霉菌(*Streptomyces eurythermus*)、灰色链霉菌灰色亚种(*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*)和桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*)的 16S rDNA 序列同源性非常高,核苷酸序列的同一性分别为 98.82%、98.75%、98.19%、98.05%和 98.00%。

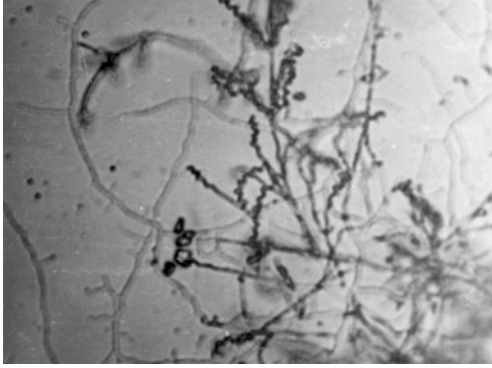


图 1 链霉菌 C-3662 菌丝体及孢子丝形态(×750)

Fig.1 Light micrograph of *Streptomyces*

C-3662 showing the morphology of mycelium and the spiral spore-bearing filaments

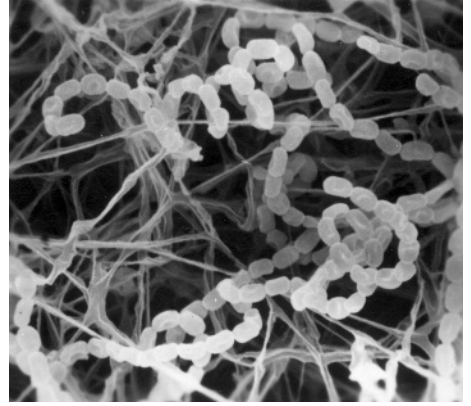


图 2 链霉菌 C-3662 孢子的表面特征(×6000)

Fig.2 Scanning electron micrograph of

Streptomyces C-3662 showing the smooth surface of spores

表 1 链霉菌 C-3662 的培养特征

Table 1 The cultural characteristics of *Streptomyces* C-3662 in eight different media

Media	Aerial hyphae	Substrate mycelium	Soluble pigment
Gause's No. 1 synthetic medium agar	Dark olive-gray	Light cinnamon	None
Glucose asparagine agar	Neutral gray	None	None
Glycerol nitrate agar	Brown gray	Mustard brown	None
Starch ammonium agar	Light gray	Brownish	None
Malate calcium agar	Gray white	Light yellowish brown	None
Nutrient agar	Brown gray	Dirty brown	Light brown
Oat powder agar	Ash gray	Light yellowish brown	None
Potato infusion agar	Brown gray	Light brown	Light brown

表 2 链霉菌 C-3662 的生理生化特征

Table 2 The physiological characteristics of *Streptomyces* C-3662

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Sugar utilization		Gelatin liquefaction	+
D-glucose	+	Milk solidification	-
L-arabinose	-	Milk peptonization	+
D-xylose	+	Starch hydrolysis	+
D-fructose	+	Nitrate reduction	-
L-rhamnose	-	Growth in cellulose	-
D-mannose	+	H ₂ S production	+
Sucrose	+	Melanin-like substance production	+
Raffinose	+	Tyrosinase production	+
L-inositol			

```

1  TTGACGAAGC TGC GGCGTGC TTAACACATG CAAGTCGAAC GATGAACCAC TTCGGTGGGG
61  ATTAGTGGCG AACGGGTGAG TAACACGTGG GCAATCTGCC CTGCACTCTG GGACAAGCCC
121 TGGAAACGGG GTCTAATACC GGATACGAGC CTCTCCCGCA TGGTGGGGGT TGGAAAGCTC
181 CGGCGGTGCA GGATGAGCCC GCGGCCTATC AGCTTGTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAC
241 GCGACGACGG GTAGCCGGCC TGAGAGGGCG ACCGGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC
301 AGACTCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATCAGC
361 GACGCCGGCT GAGGGATGAA GGCCTTCGGG TTGTAACCT CTTCAGCAG GGAAGAAGCG
421 AAAGTGACGG TACCTGCAGA AGAAGCGCCG GCTAACTACG TGCCAGCACC GCGGTAATAC
481 GTAGGGCGCA AGCCTTGTCC GGAATTATTG GCGGTAAGA GCTCGTAGGC GGTGTGTCG
541 GTCGGTTGTG AAAGCCGGGG GCTTAACCCC GGGTCTGCAG TCGATACGGG CAGGCTAGAG
601 TTCGGTAGGG GAGATCGGAA TTCCTGGTGT AGCGGTGAAA TGCCGAGATA TCAGGAGGAA
661 CACCGTGGCG GAAGGGCGAT CTCTGGGCGC ATACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG
721 AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGGTGGGCAC TAGGTGTGGG
781 CGACATTCCA CGTGGTCCGT GCCGCAGCTA ACGCATTAAG TGCCCGCCTC GGGGAGTACG
841 GCCCAAGGCG TAAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGCGC GAGCATGTGG
901 CTTAATTGCA CGCAACCGCA AGAACCTTAC CAAGGCTTGA CATACACCGG AAAGCTCTGG
961 AGACAGAGCC CCCCTTGTGG TCGGTGTACA GGTGTGCAT GGTCTGCTGC AGCTCGTGTG
1021 GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCT GTCCCGTGTG GCCAGCAGCC
1081 CCTTGTGGTG CTGGGACTC ACGGGAGACC GCGGGGTCA ACTCGGAGGA AGTGGGGAC
1141 GACGTCAAGT CATCATGCCC CTTATGTCTT GGGCTGCACA CGTGCTACAA TGGCCGGTAC
1201 AATGAGCTGC GATACCGTGA GGTGGAGCGA ATCTCAAAAA GCCGGTCTCA GTTCGGATTG
1261 GGGTCTGCAA CTCGACCCCA TGAAGTCGGA GTCGCTAGTA ATCGCAGATC AGCATTGTCT
1321 CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CGTCACGAAA GTCGGTAACA
1381 CCCGAAGCGG GTGGCCCAAC CCTTGTGGAG GGAGCTGTGC AAGTGGGAC TGCCGATTGG
1441 GACGAAAGGG

```

图 3 链霉菌 C-3662 的 16S rDNA 序列

Fig. 3 The 16S rDNA sequence of *Streptomyces* C-3662

根据多相分类定种原则,综合考虑菌株 C-3662 的培养、生理生化和化学分类特征以及 16S rDNA 序列比对结果,认为链霉菌 C-3662 与泛温链霉菌更接近,所以将其定名为泛温链霉菌 C-3662 (*Streptomyces eurythermus* C-3662)。

2.2 链霉菌 C-3662 发酵产生纤溶酶的研究

2.2.1 发酵培养基组成的研究:将在合成 5 号培养基上 28℃ 培养 7d 的链霉菌 C-3662 的新鲜斜面,挖块接种于含葡萄糖 2.5%、淀粉 1.0%、黄豆饼粉 2.0%、 KH_2PO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 CaCO_3 0.3% 的发酵培养基(100mL 培养基/500mL 三角瓶)中振荡培养 48 h,然后按 5%~8% 的接种量,转种于相同组成的发酵培养基(装量同上)中振荡培养 96 h,离心除去菌丝体,将如此得到的发酵上清液的纤溶酶活性定为 100%。在上述发酵培养基基础上,分别固定氮源变换碳源、固定碳源变换氮源,结果见表 3。发酵培养基的氮源以黄豆饼粉为宜,碳源以葡萄糖和淀粉组合为宜,黄豆饼粉的浓度为 2.0%、葡萄糖和淀粉的浓度分别为 2.5% 和 1.0% 时,发酵液中的纤溶酶活性较高。

在固定培养基组成为葡萄糖 2.5%、淀粉 1.0%、黄豆饼粉 2.0%、 KH_2PO_4 0.05%、 CaCO_3 0.3% 的条件下,变换无机离子发酵的结果见表 4。从表 4 可以看出,一定量的无机离子(Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})对纤溶酶的产生有利,并且不依赖于菌体量,过量的无机离子对纤溶酶的发酵有抑制作用; Mg^{2+} 对纤溶酶发酵的促进作用限于一定的浓度范围(0.05%~0.08%)内。

表 3 不同氮、碳源培养基对链霉菌 C-3662 发酵产生纤溶酶活性的影响

Table 3 The effects of different nitrogen and carbon sources on the fermentation of fibrinolytic enzyme of *Streptomyces* C-3662

Nitrogen and carbon sources/%	Relative fibrinolytic activity/%	Nitrogen and carbon sources/%	Relative fibrinolytic activity/%
Nitrogen		Carbon	
Soybean meal 2.0	100	Dextrin 2.5	50
Corn steep liquor 2.0	65	Glycerol 2.5	< 30
Yeast extract 2.0	38	Glucose 2.5 + Starch 1.0	100
Peptone F403 2.0	< 30	Glucose 2.5 + Dextrin 1.0	69
		Glucose 2.5 + Corn powder 1.0	69
Carbon			
Glucose 2.5	43	Glucose 2.5 + Sucrose 1.0	61
Starch 2.5	64	Glucose 2.5 + Lactose 1.0	71
Corn powder 2.5	< 30	Glucose 2.5 + Maltose 1.0	61
Lactose 2.5	61	Glucose 2.5 + Glycerol 1.0	70
Sucrose 2.5	< 30		

表 4 无机离子对链霉菌 C-3662 发酵产生纤溶酶的影响

Table 4 The effects of different inorganic ions on the fermentation of fibrinolytic enzyme of *Streptomyces* C-3662

Inorganic ions	Mycelium concentrations/%		Relative fibrinolytic activity/%
FeSO ₄ /%	0.001	65	110
	0.005	64	100
	0.010	65	85
	0.020	60	73
CuSO ₄ (μ g/mL)	1	50	110
	5	73	43
	10	63	86
	50	59	57
ZnCl ₂ (μ g/mL)	1	65	117
	5	65	51
	10	59	< 30
	50	39	none
MnCl ₂ (μ g/mL)	1	70	95
	5	72	95
	10	63	95
	50	61	90
LiCl ₂ (μ g/mL)	1	65	86
	5	60	95
	10	61	90
	50	61	80
MgSO ₄ /%	0.000	61	46
	0.010	75	48
	0.050	76	100
	0.080	61	100
	0.100	57	< 30
	0.200	53	< 30

另外,我们还发现在不加无机盐情况下,链霉菌 C-3662 的发酵上清液只有 50% 的

纤溶酶活性,说明一定种类及数量的无机盐确是发酵大量纤溶酶所必需的,但无机离子影响链霉菌 C-3662 产生纤溶酶的机制还有待进一步研究。

2.2.2 链霉菌 C-3662 发酵产生纤溶酶的过程 图 4 是采用发酵培养基葡萄糖 2.5%、淀粉 1.0%、黄豆饼粉 2.0%、 KH_2PO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 CaCO_3 0.3% 发酵的过程参数。在链霉菌 C-3662 的发酵过程中,菌丝的生长高峰在 48~72h,而此时基本没有纤溶酶的产生,当菌丝生长基本停止之后,纤溶酶的产生达到了高峰(96~132h),这时培养基中的还原糖已利用殆尽。已知链霉菌是多种抗生素的产生菌,并且多数链霉菌是在对数生长后期产生抗生素。Chater KF^[11] 的研究表明,链霉菌在分批培养时,其分泌蛋白酶与产生抗生素在时间上具有一致性;Kim I S 等^[12,13] 的研究表明,链霉菌分泌产生的蛋白酶在链霉菌菌丝的发育与分化中具有重要作用。链霉菌 C-3662 发酵过程参数的测定结果表明,纤溶酶大量产生的时间是在菌丝体生长基本停止后,与 Chater KF 的结论基本相符。但是链霉菌 C-3662 分泌纤溶酶的生理作用还有待进一步研究。

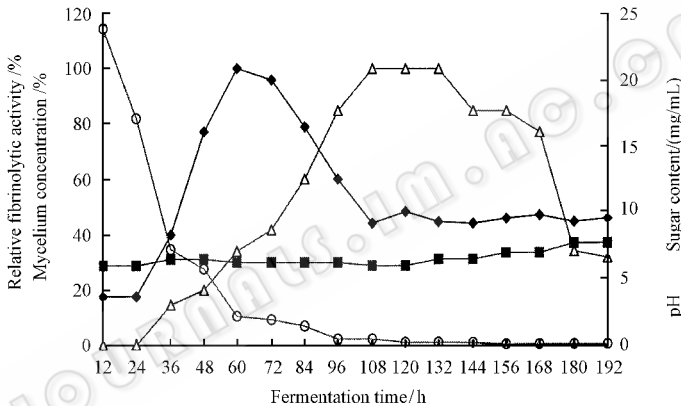


图 4 链霉菌 C-3662 的发酵过程

Fig.4 The fermentation course of *Streptomyces* C-3662

—◆—Mycelium concentration; —△—Relative fibrinolytic activity;
—■—pH; —○—Sugar content.

参 考 文 献

- [1] Fujita M, Nomura K, Ito Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **197**(3):1340~1346.
- [2] Fujita M, Ito Y, Hong K. *Bio Pharm Bull*, 1995, **18**:1387~1391.
- [3] 武临专,王以光. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**(1):85~90
- [4] 武临专,龚勇,陈昉,等. *北京大学学报(医学版)*, 2001, **33**(3):285~286.
- [5] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. *J Gen App Microbio*, 1983, **29**:319~322.
- [6] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等. *放线菌研究及应用*. 北京:科学出版社, 1990.96~111.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*. 北京:科学出版社, 2001.409~412.
- [8] Hopwood D A(邓子新,唐纪良译). *链霉菌遗传操作实验手册*. 长沙:湖南科学技术出版社, 1988.51~54.
- [9] Astrup T, Kok P. *Methods in Enzymology*, 1970, **19**:821~834.
- [10] 北京大学生物系. *生物化学实验指导*. 第一版,北京:高等教育出版社, 1983.30~31.
- [11] Chater K F. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In: Losick R, Shapiro L, ed. *Microbial Develop-*

ment. New York :Cold spring Harbor Laboratory ,1984. 89 ~ 115.

[12] Kim I S , Lee K J. *Microbiology* ,1995 ,**141** :1017 ~ 1025.

[13] Kim I S ,Lee K J. *Microbiology* , 1996 ,**142** :1797 ~ 1806.

The Identification and Fermentation of a *Streptomyces* Strain Producing a Fibrinolytic Enzyme

Wu Linzhan¹ Chen Fang¹ Huang Ying² Liu Zhiheng² Wang Yiguang^{1*}

(¹ Institute of Medicinal Biotechnology , Chinese Academy of Medical
Sciences , Peking Union Medical College , Beijing , 100050 , China)

(² Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing , 100080 , China)

Abstract : The morphological , cultural , physiological and chemotaxonomical characteristics of *Streptomyces* C-3662 , a soil isolate which produces a fibrinolytic enzyme , were studied. Most of these characteristics are the same or very similar to those of *Streptomyces eurythermus* . The 16S rDNA sequence of the strain was also determined and compared with those in the Genbank , resulting a nucleotide sequence identity of 98.19% with 16S rDNA of *Streptomyces eurythermus* . From the polyphasic taxonomical view , *Streptomyces* C-3662 belongs to *Streptomyces eurythermus* . Suitable medium for optimal fermentation of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* C-3662 comprises 2.5% glucose and 1.0% starch as carbon sources , 2% soybean meal as nitrogen source and some inorganic salts such as MgSO₄ . The fermentation course of *Streptomyces* C-3662 was investigated which showed that fibrinolytic enzyme was produced after the growth of *Streptomyces* C-3662 nearly ceased.

Key words : *Streptomyces eurythermus* , *Streptomyces* C-3662 , Fibrinolytic enzyme , Fermentation

* To whom correspondence should be addressed

中国科学院微生物研究所被列为国家卫生部 认定的菌种鉴定机构

根据卫法监发[2002]第4号文件,各单位各企业凡申报生产真菌、益生菌保健食品时,必须出具生产菌种检测鉴定报告。中国科学院微生物研究所被列为国家卫生部认定的菌种鉴定机构,该所资深研究人员将为您提供可靠、优质的服务,同时也提供其他菌种的鉴定服务。

联系地址 北京市海淀区中关村北一条13号

邮政编 100080

联系电话 (010) 62553059 62564697

联系人 戴秀玉