

# 硫酸软骨素酶产生菌的筛选及酶的分离纯化

阎浩林<sup>1</sup> 何汉洲<sup>1</sup> 蔡苏兰<sup>1</sup> 王 琦<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 沈阳药科大学制药工程学院 沈阳 110016)

(<sup>2</sup> 辽宁电力中心医院微生物室 沈阳 110015)

**摘 要** 利用平板快速筛选法,从鱼腹中筛选到一株产生硫酸软骨素酶的细菌 YH311,通过生物特性和生化反应试验考察,初步鉴定为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)。培养至 36h 时,该菌株产酶达到高峰期,培养液的酶活力达 0.9U/mL。利用超声波破碎菌体细胞,分别测定培养液和菌体细胞的酶活力,发现培养液的酶活力要远远大于菌体细胞的酶活力,显示该酶为分泌型表达,属于胞外酶。发酵液经离心后,上清液用硫酸铵分级沉淀,再分别经过 CM-Cellulose、QAE-sephadex A50 和 Sephadex G-150 层析柱进行逐级分纯,并跟踪酶活,最后获得硫酸软骨素酶。SDS-PAGE 检测为单一条带,其分子量约为 80kD。

**关键词** 硫酸软骨素,硫酸软骨素酶,温和气单胞菌,胞外酶

中图分类号:Q55 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)01-0079-04

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, ChS)是一种酸性粘多糖类生物大分子,其分子量为 20~50kD,根据其结构中糖醛酸种类和氨基己糖上硫酸脂位置的差异,可分为多种类型,常见的有 3 种构型:ChS-A、ChS-B 和 ChS-C。由于具有较强的降血脂作用和缓冲抗凝血作用,临床上主要用于防止冠心病和动脉粥样硬化。最新的研究发现,当将硫酸软骨素的分子量降低至 2~10kD 时,其药效更为明显,对防止动脉粥样硬化、风湿性炎症和伤口愈合有更好的疗效。目前对低分子量硫酸软骨素的制备常采用酸水解法、离子交换法和酶解法。前两种方法需要较复杂的实验设备并且会污染环境,比较而言,酶解法需要的条件不高且容易控制,因而具备较大的优势。酶解法的关键在于获得大量的硫酸软骨素裂解酶,这也是本研究的主要目的。不仅如此,近年来的研究发现该酶本身就具有一定的药理活性,特别对治疗腰间盘突出<sup>[1]</sup>、降解囊性纤维变性部位的粘液物<sup>[2]</sup>有很好的作用,可用于开发新的药物。

自然界中有许多能产生硫酸软骨素酶(Chondroitinase 或 Chondroitin sulfate lyase, ChSase)的微生物,从微生物中筛选此酶是人们研究的一个主要方向,国外在这方面已有很多报道。早在 1968 年, Yamagata<sup>[3]</sup>、Makarem<sup>[4]</sup>和 Smith<sup>[5]</sup>等分别从普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)NCTC 4636、肝素黄杆菌(*Fla-*

*vobacterium heparinum*)ATCC 13125、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)和痤疮棒状杆菌(*Corynebacterium acnes*)等菌株中提取到了硫酸软骨素酶,后来 Kennan<sup>[6]</sup>、Féthière<sup>[7]</sup>等对酶的分离纯化和酶学性质做了进一步考察,而 Tkalec 等<sup>[8]</sup>在 *E. coli* 中表达了 Chsase 基因,并分离纯化到酶活性蛋白。目前国内还没有这方面的报道。本研究室从鱼腹中分离到一株产酶活性很高的温和气单胞菌 YH311,并对该菌株的产酶方式、酶的分离纯化方法等进行了初步的研究,这为利用此酶开发低分子量的硫酸软骨素奠定了基础。

## 1 材料和试剂

### 1.1 样品来源

从土壤、江河水、动物粪便、鱼腹等环境中采集样品 10 份,供产酶菌株的筛选。

### 1.2 培养基

营养肉汤培养基:中国药品生物制品检定所提供;菌体生长斜面培养基:营养肉汤培养基 + 2% 琼脂粉;菌体发酵培养基:营养肉汤培养基 + 0.3% 硫酸软骨素;平板筛选培养基:营养肉汤培养基 + 2% 琼脂粉 + 1% Albumin Bovine Fraction V。

### 1.3 试剂和材料

硫酸软骨素(A、C 的混合物)由苏州中药厂提

供;QAE-sephadex A50、CM-cellulose、Sephadex G-150 由中国医药集团上海医药站进口分装;次分子量标准蛋白购自上海生物化学研究所;Albumin Bovine Fraction V、Millipore 超滤杯(截留分子量 50kD)购自华美生物工程公司。

## 2 实验方法

### 2.1 硫酸软骨素酶产生菌的筛选

**2.1.1 原始菌株的获得** :从土壤、江河水、动物粪便、鱼肠等不同来源的样品中初步分离得到 10 个标本,对每个标本利用平板稀释法进行分离培养共获得 1324 个菌株,将他们分别接种于斜面培养基上,32℃培养 48h,冰箱保存,以做进一步的筛选。

**2.1.2 产酶菌株的获得** :采用平板快速筛选法。按文献[5]中的方法进行。

### 2.2 产酶菌株的鉴定

进行形态、革兰染色等常规检查,并利用法国 BioMérieux sa france ATB Expression 自动细菌鉴定仪,进一步做生化反应试验,用 32 个标准同化实验鉴定该菌株,进行综合判断。

### 2.3 酶活力的测定

参照 Saito H<sup>[9]</sup> 的方法进行酶活力的测定。由于硫酸软骨素在其裂解酶催化下形成不饱和双糖结构,导致在 232nm 处有最大光吸收。酶的活力单位(U)定义为 37℃条件下,每分钟催化形成 1 $\mu$ mol 不饱和双糖的酶量。

本试验取发酵液经 8000r/min 离心 15min,于 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)缓冲液中透析过夜,取 1mL 透析液和 1mL 0.2% 硫酸软骨素溶液在 37℃反应 20min,然后经 100℃水浴作用 2min 终止反应。在 232nm 波长下测定其紫外吸收。蛋白质含量的测定采用 Lowry 法。

### 2.4 酶表达方式的确定<sup>[10]</sup>

为了确定酶的表达方式,分别测定发酵上清液和菌体细胞破碎后的酶活。菌体细胞酶活力的测定方法:发酵液经 8000r/min 离心 20min 后,将菌体溶于 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)缓冲液中,在冰浴条件置于宁波新芝 JY92-11 超声波细胞破碎仪上,以 80w、120w、160w、250w 等不同功率破碎菌体细胞,每次 15s,作用 3 次,然后分别经 8000r/min 离心 10min,收集上清液,酶活测定方法同上。

### 2.5 酶的分离纯化

菌株经斜面培养 48h 后,接种至 30mL 发酵培养基中,34℃震荡培养 48h,取发酵液,6000r/min 离心

10min,收集上清液。在 4℃条件下,将所得上清液用 30%的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,弃去沉淀,再用 75%的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,经 5000r/min 离心 10min 收集沉淀。沉淀用 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)缓冲液溶解,并用 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)缓冲液透析过夜。将透析液上样于 CM-cellulose 层析柱(26mm × 400mm),以 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)作为洗脱液进行洗脱,跟踪并收集有酶活性的组分,再上样于 QAE-sephadex A-50 层析柱(26mm × 400mm),以 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)作为平衡液平衡 2 倍柱床的体积,然后以含有 0.0 ~ 0.6mol/L NaCl 盐浓度的 Tris-HCl(pH7.0)洗脱液进行梯度洗脱,收集活性组分,测定酶活。活性组分经合并后,用 Millipore 超滤离心管(截留分子量 50kD)浓缩至 2mL,再上样于 Sephadex G-150 层析柱(10mm × 900mm),以 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.0)进行洗脱,控制流速,收集活性组分并测定酶活。

### 2.6 SDS-PAGE 分析

收集活性组分,再经 Millipore 超滤离心管浓缩至 1mL,供电泳检查。配制 7.5% 胶联度的 SDS-PAGE 凝胶,以次分子量标准蛋白作对照,进行恒流电泳,当溴酚兰前沿在浓缩胶内时,控制电流为 10mA,当前沿进入分离胶后,控制电流为 20mA,整个过程约 3h。

## 3 实验结果

### 3.1 硫酸软骨素酶产生菌的筛选

通过大量筛选,从不同来源的样品中共分离出 1324 株微生物,其中细菌为 775 株,放线菌为 126 株,其余为真菌。将这些微生物分别接种至平板筛选培养基表面,培养 1 ~ 6d,结果见图 1。没有被酶解的大分子硫酸软骨素能与 Albumin Bovine Fraction V 结合并形成白色沉淀,而被菌体分泌的酶所降解的小分子硫酸软骨素不能与 Albumin Bovine Fraction V 结合,导致菌落周围能形成透明斑。根据透明斑直径大小,从中挑取 30 个阳性菌株传斜面,然后分别测定其酶活力,最终筛选到一株产酶活性很高的菌株 YH311,其发酵液酶活力达 0.9U/mL。本实验以 YH311 为产酶菌株进行酶的分离纯化。

### 3.2 YH311 菌株的鉴定

YH311 菌株的革兰染色结果为阳性,具有周生鞭毛,氧化酶试验结果为阳性;利用葡萄糖发酵产酸、产气。利用细菌鉴定仪(API 鉴定系统)测定的生化反应结果见表 1。综合上述鉴定结果,根据菌种检索确定 YH311 为温和气单胞菌(*Aeromonas so-*

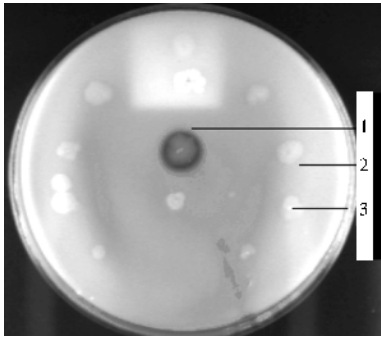


图 1 平板法筛选硫酸软骨素酶产生菌

Fig.1 The screening plate for chondroitinase-producing strains

1. Chondroitinase-positive strains ;

2 3. Chondroitinase-negative strains.

bria )

表 1 YH311 的生化谱( API 鉴定系统 ID32GN V3.0 )

Table 1 Biochemical reaction of the YH311

( API identification system ID32GN V3.0 )

Text items	Result	Text items	Result	Text items	Result	Text items	Result
RHI	-	RIB	+	SAC	+	ITA	-
MNT	-	LAT	-	MAN	+	SAL	-
FUC	-	ARA	-	CAP	-	CIT	+
5KG	-	Mobe	-	3013u	-	Ser	+
NAG	+	INO	-	MAL	+	SUB	-
ACE	+	ALA	+	GLU	+	MEL	-
SOR	-	PROP	-	VALT	-	HIS	+
GlyG	+	2KG	-	Pobe	-	Pro	+

+ :Positive ; - :Negative.

### 3.3 YH311 产酶的研究

取 20mL YH311 菌株培养液 ,离心后测定其上清液的酶活力 ,菌体沉淀经不同功率超声波破碎后分别测定其酶活力 ,结果表明 :不同功率超声波破碎菌体细胞后其酶活力基本一致 ,该酶活力远远低于不含菌细胞的上清液的酶活力 ,两者的酶活力相差 37 倍。因此 ,可以判定 YH.311 在产酶过程中 ,能将酶分泌到细胞外 ,该酶属于胞外酶。

分别考察在不同培养时间内 ,YH311 菌株培养液的酶活力变化情况 ,结果表明在菌体培养的前 36h 内 ,酶活力随培养时间的增加逐渐升高 ,在 36h 达到最高峰 ,酶活力为 0.9U/mL。与 Yamagata<sup>[3]</sup>所报道的 *Flavobacterium heparinum*(酶活力为 0.026U/mL)和 *Proteus vulgaris*(酶活力为 0.061U/mL)菌株的产酶活性相比 ,YH311 菌株的产酶能力强 ,并且酶活力稳定。培养 40h 后 ,酶活力趋于下降。

### 3.4 酶的分离纯化

按实验方法 2.5 中的步骤 ,逐步对 YH311 培养液中的硫酸软骨素酶进行分离纯化。样品经过 QAE-sephadex 层析柱和 Sephadex G-150 层析柱分离纯化后的酶活力测定结果见表 2 ;样品经过各步分离纯化后的 SDS-PAGE 检测结果见图 2。根据图 2 ,样品通过上述分离纯化后 ,经电泳检测可获得硫酸软骨素酶的单一一条带 ,其分子量约 80kD。

表 2 Chondroitinase 的分离纯化

Table 2 Purification of Chondroitinase

Purification step	Total activity/U	Total protein/mg	Special activity( U/mg )	Purification fold
Crude culture	500	2600	0.192	1
Ammonium sulfate precipitation	350	220	1.59	8
QAE-sephadex A50	290	85.36	3.39	18
Sephadex G-150	105	2.76	38	193

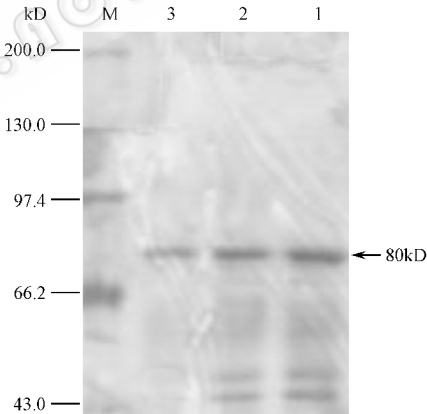


图 2 SDS-PAGE 比较分析

Fig.2 Comparison on a SDS-PAGE gel

1. CM-cellulose 2. QAE-sephadex 3. Sephadex G-150 ;M. Marker.

## 4 讨论

本实验室经过广泛、大量的筛选 ,从鱼腹中分离到一株硫酸软骨素酶产生菌 YH311 ,经鉴定确定为温和气单孢菌。该菌属于兼性厌氧菌 ,其生长所需的营养物质简单 ,容易培养 ,且产酶活性高于文献报道。值得一提的是 YH311 以分泌型表达方式将酶释放于培养液中 ,菌株在利用高分子硫酸软骨素时 ,在细胞外先将其分解成低分子量硫酸软骨素 ,进而被菌体吸收并利用。只有 Katamikado<sup>[11]</sup>报道的菌株其产酶方式与 YH311 有相似之处 ,而 Linn Stephen 等<sup>[12]</sup>报道的 *Bacteroides thetaiotaomicron* 和 Salyer<sup>[13]</sup>、Walter<sup>[14]</sup>报道的 *Bacteroides* 菌株 ,不仅都是革兰氏

性厌氧菌,而且产酶方式均胞内表达,这些都给菌体的培养及后期酶的分离纯化带来一定困难。Yamagata<sup>[3]</sup>报道的 *Proteus vulgaris* 和 *Flavobacterium heparinum* 虽不必进行厌氧培养,但产酶方式为胞内表达,并且酶活性较差。比较而言,YH311 菌株产酶活性高,并且分离纯化相对简单,因此极具开发潜力。

## 参考文献

- [ 1 ] Henderson N , Stanescu V , Cauchoix J . Nucleolysis of the rabbit intervertebral disc using chondroitinase ABC . *Spine* ,1991 ,**16** ( 2 ) :203 - 208 .
- [ 2 ] Jamal Rehab A , Roughley Pertter J , Ludwig Mara S . Effect of glycosaminoglycan on lung tissue viscoelasticity . *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ,2000 ,**280** ( 2 ) :306 - 315 .
- [ 3 ] Yamagata T H , Saito O , Habuchi S , et al . Purification and properties of bacterial chondroitinase and chondroitine-sulfatases . *J Biol Chem* , 1968 ,**243** :1523 - 1535 .
- [ 4 ] Makatem E H , Berk R S . Partial purification and characterization of chondroitinase from *Proteus mirabilis* . *J Infect Dis* ,1968 ,**118** :427 - 435 .
- [ 5 ] Smith R F , Willitt N P . Rapid method for screening hyaluronidase and chondroitine sulfate producing microorganisms . *Appl Microbio* , 1968 ,**16** :1434 - 1436 .
- [ 6 ] Kenan G U , Robert J , Linhardt M , et al . Purification , characteriza-

tion and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum* . *J Biochem* ,1995 ,**312** :569 - 577 .

- [ 7 ] James F , Bernhard E , Miroslaw C . Crystal structure of Chondroitinase AC lyase , a representative of a family of glycosaminoglycan degrading enzyme . *J Mol Biol* ,1999 ,**288** :635 - 647 .
- [ 8 ] Tkalec L A , Fink D , Blain F . Isolation and expression in *Escherichia coli* of cslA and cslB genes coding for the chondroitin sulfate-degrading enzymes chondroitinase AC and chondroitinase B , respectively from *Flavobacterium heparinum* . *Applied and Environment Microbiology* ,2000 ,**66** ( 1 ) :29 - 35 .
- [ 9 ] Saito H , Yamagata T , Suzuki S . Enzymatic methods for the determination of small quantities of isometric chondroitin sulfates . *J Bio Chem* ,1968 ,**243** ( 7 ) :1535 - 1542 .
- [ 10 ] Salyers A A , MO 'Brien . Cellular location of enzymes involved in chondroitin sulfate breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* . *J Bacteriol* ,1980 ,**143** :772 - 780 .
- [ 11 ] Kitamikado M , Young Zoo Lee . Chondroitinase-producing bacteria in natural habitats . *Appl Microbiology* ,1975 ,**29** :414 - 421 .
- [ 12 ] Linn S , Terence C , Lauren L , et al . Isolation and characterization of two chondroitin lyases from *Bacteroides thetaiotaomicron* . *J Bacteriol* ,1983 ,**156** :859 - 866 .
- [ 13 ] Salyers A A , Susan F K . Induction of chondroitin sulfate lyase activity in *Bacteroides thetaiotaomicron* . *J Bacteriol* ,1980 ,**143** :783 - 788 .
- [ 14 ] Walter R , Haque Riaz-ul . Purification of a mucopolysaccharidase from *Bacteroides distasonis* . *J General Microbio* ,1980 ,**119** :211 - 215 .

## Screening and Purification of Chondroitinase from Chondroitinase-producing Strains

YAN Hao-Lin<sup>1\*</sup> HE Han-Zhou<sup>1</sup> CAI Su-Lan<sup>1</sup> WANG Qi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> The School of Pharmaceutical Engineering , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China )

(<sup>2</sup> Department of Microbiology , Liaoning Electric Power Central Hospital , Shenyang 110015 , China )

**Abstract** : Strain YH311 , with a high level of chondroitinase productivity , was obtained from the intestinal contents of the fish by rapid plate screening . It was identified to be *Aeromonas sobria* according to the biological characteristics and biochemical reaction tests . It produced highest amount of enzyme at 36 hours' incubation , which reached to 0.9U/mL . By comparing the extracellular and intracellular chondroitinase activity of the strain disrupted by sonication , it was found the former was much higher than the latter , which showed that YH311 secretorily expressed the chondroitinase and the chondroitinase was extracellular-enzyme . Chondroitinase was prepared from the culture fluid by fractional precipitation with ammonium sulfate , chromatography on CM-cellulose and QAE-sephadex A50 , and finally gel filtration on Sephadex G-150 . SDS-PAGE of the preparation gave a single band which show its molecular weight was about 80kD .

**Key words** : Chondroitin sulfate , Chondroitinase , *Aeromonas sobria* , Extracellular-enzyme

\* Corresponding author . Tel : 86-24-23843711 Exe 3513 ; Fax : 86-24-23843711 Exe 3522 ; E-mail : haolin-yan@163.com

Received date 05-20-2003