

胆红素氧化酶产酶菌株的分离及最佳产酶条件的研究

郭健 陶沙 莫培生

(卫生部临床检验中心, 北京)

梁锡娴 黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

胆红素是铁卟啉化合物在人体内的代谢产物之一, 主要来源于衰老红细胞崩解后的血红蛋白, 随胆汁排泄。凡能引起胆红素的生成过多或使肝细胞对胆红素的摄取、结合、排泄过程发生障碍的因素, 都可使血中胆红素浓度增高, 出现高胆红素血症。因此, 测定血中胆红素水平对临床诊断肝胆疾病, 溶血等有着重要的意义。

1981年, Murao 和 Tanaka 首次报告由疣孢漆斑菌 MT-1 产生的新型胞外酶——胆红素氧化酶 (Bilirubin oxidase, BOD, EC 1.3.3.5), 能催化胆红素生成胆绿素, 后者进一步氧化, 最终生成性质还不清楚的无色化合物^[1-3]。胆红素氧化酶的发现, 为临床测定胆红素开辟了一条新的途径。目前, 只有日本和美国正在进行这方面的工作。

为获得胆红素氧化酶, 我们对疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*) 的不同菌株进行筛选并对产酶条件进行研究。本工作填补了我国这方面的空白, 为临床采用酶法测定胆红素及进行有关胆红素氧化酶的基础理论研究提供可靠的酶源。

材料和方法

(一) 仪器设备

恒温培养箱为 PYX-DHS 型 (上海市跃进医疗器械一厂); 摇床为 G-24, New Brunswick Scientific Co., INC. EDISON, U. S. A.; 低温离心机为 HITACHI 20RP-52D; 分光光度计为 HITACHI 150-20。

(二) 试剂

胆红素贮存液: 取胆红素 (SIGMA 产品, MW: 584.7) 2.0mg, 加入 0.5ml 甲醇使混匀, 再逐渐加入 0.5ml 0.2mol/L Na_2CO_3 使完全溶解,

置棕色磨口瓶中, -12°C 两天有效。蛋白胨: 细菌学 F403 (上海东海制药厂)。

(三) 菌种和培养基

1. 菌种: 疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*) (中科院微生物研究所菌种室), 编号为 Mv 2.1089, Mv 2.0805, Mv 2.0830 和 Mv 2.0906。

2. 培养基: (1) 土豆汁斜面培养基。(2) 土豆汁培养基: 20% 土豆汁, 含 0.25% 葡萄糖和 0.25% 蛋白胨, pH = 6.0。在 250ml 三角瓶中加入 100ml 土豆汁培养基, $0.55\text{kg}/\text{cm}^2$ 30 分钟灭菌后待用。

(四) 菌的培养

将疣孢漆斑菌接种在土豆汁斜面上, 置 28°C 温箱孵育 4—5 天, 将菌体移入装有少量蒸馏水的试管中, 按 $1.5-1.8 \times 10^6$ 个孢子/瓶 (100ml) 接种菌体。三角瓶置 25°C 摇床, 150r/min 振荡培养 4 天。培养液在 4°C , 10000r/min 离心 10 分钟, 除去菌体, 上清液用于胆红素氧化酶的提取和鉴定。

(五) 胆红素氧化酶的提取

培养上清液经 DEAE-纤维素交换吸附 (柱: 2.5i.d. \times 30 cm; 用 0.1 mol/L pH9.2 碳酸缓冲液平衡; 0.2mol/L pH9.2 碳酸缓冲液洗脱) 和 Sephadex G-100 层析 (柱: 2.6i.d. \times 60cm; 用 0.02mol/L 碳酸缓冲液平衡, 流速为 $2.0\text{ml}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) 纯化, 加入甘油作保护剂, 置 -18°C 保存。

(六) 胆红素氧化酶活力测定

取 0.5ml 胆红素贮存液置棕色磨口瓶中, 加入 0.1mol/L pH8.1 Tris-HCl 缓冲液至 50ml 为底物液 (20mg/L)。在比色杯中加底物液 3.0ml,

本文于 1989 年 9 月 2 日收到。

(25℃ 保温) 和酶液 10μl, 立即混匀并在分光光度计上读出 $\Delta A_{440}/\text{min}$, 按下式计算酶活力单位:

$$\text{活力单位 (u/ml)} = \frac{\Delta A_{440}/\text{min} \times \text{反应总体积 (ml)}}{18 \times \text{加酶量 (ml)}}$$

(*在上述条件下, 比色杯光径为 1.0cm, 胆红素的 $\epsilon_{440} = 18000$)

1个酶活力单位为 1 分钟内降解 1μmol 胆红素所需的酶量。

结果和讨论

(一) 菌种的筛选

首先在同一培养条件下对疣孢漆斑菌的不同菌株 Mv 2.1089、Mv 2.0805、Mv 2.0830 和 2.0906 进行产酶比较, 发现 Mv 2.1089 株产酶能力最高。用稀释分离法作进一步分离纯化, 确定产酶量最高的单菌落为胆红素氧化酶产酶菌株。

(二) 辅助碳源对酶形成的影响

以 20% 土豆汁为基本培养基 (pH6.0), 分别在培养瓶中加入 0.25% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇、淀粉和柠檬酸作为辅助碳源, 对疣孢漆斑菌进行培养。结果表明, 在含葡萄糖的培养基中, 菌体生长良好, 酶产量最高 (表 1)。

表 1 辅助碳源对产酶的影响

辅助碳源	相对酶活力(%)
对 照	100
葡 萄 糖	156
麦 芽 糖	109
蔗 糖	93
果 糖	100
乳 糖	100
甘 露 糖	132.5
甘 露 醇	132.5
山 梨 醇	124
可溶性淀粉	93
柠 檬 酸	39.5

(三) 辅助氮源对酶形成的影响

在土豆汁培养基中, 分别加入 0.25% 的蛋白胨、酵母提取液、硝酸铵和硫酸铵, 菌培养结果表明, 蛋白胨和酵母提取液可促进菌生长和提高产酶量, 以前者效果更佳 (表 2)。不同来源的蛋白胨及蛋白胨浓度, 对酶的产量也有一定的影响。实

表 2 辅助氮源对产酶的影响

辅助氮源	相对酶活力(%)
对照	100
蛋白胨	250
酵母提取液	185
NH ₄ NO ₃	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	100

表 3 无机盐对产酶的影响

无 机 盐	相对酶活力(%)
对照	100
KH ₂ PO ₄	35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	35
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50

验结果表明, 小带鱼粉蛋白胨效果较好, 蛋白胨浓度在 0.25—1.5% 范围内对酶产量无明显影响。

(四) 无机盐对酶形成的影响

在 100ml 土豆汁培养基中分别加入 50mg 的 KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、Ca(NO₃)₂·4H₂O 和 CuSO₄·5H₂O, 观察菌的生长和产酶情况, 发现在此浓度下, 无机盐对产酶有不同程度的抑制作用 (表 3)。

(五) 摇床转速和温度对酶形成的影响

在不同摇床转速 (140、160、180 和 200r/min) 和温度 (22℃、25℃、28℃ 和 30℃) 条件下观察菌生长和产酶量, 结果表明, 摇床转速在 140—160 r/min, 温度为 25℃ 时, 菌体生长良好, 产酶量最高 (图 1)。

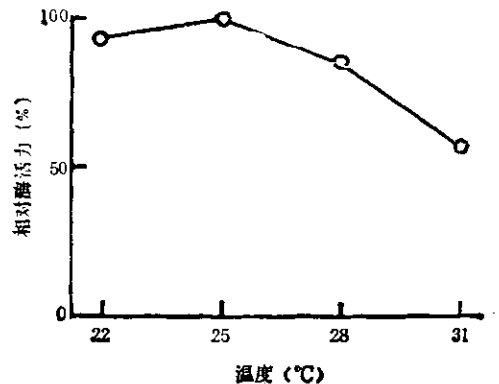


图 1 培养温度对酶形成的影响

表 4 胆红素氧化酶的纯化

步 骤	体 积 (ml)	酶 活 力 (u)	蛋 白 量 (mg)	比 活 (u/mg)	活 力 回 收 (%)
培 养 液	236	197.3	102.66	1.92	100
离 子 交 换	37.4	154.3	7.11	21.70	78.2
柱 层 析	76.7	136.8	3.83	34.13	69.3

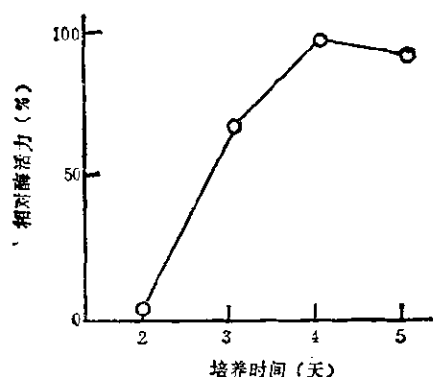


图 2 培养时间对酶形成的影响

(六) 其它影响因素

对影响产酶的因素,包括培养时间、培养基 pH、接种量和糖浓度作了研究。实验采用正交设计 ($L_4(4^1)$), 得出最佳产酶条件为: 培养时间 4 天, 培养基 pH = 6.0, 接种量为 $1.5-1.8 \times 10^6$ 个孢子/瓶, 糖浓度为 0.25% (图 2, 图 3)。

(七) 胆红素氧化酶的纯化和性质

培养液离心去除菌体, 经离子交换吸附和凝胶过滤, 得到纯化的胆红素氧化酶, 比活约为 34 u/mg (表 4), 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定呈均一区带。在 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 最适反应

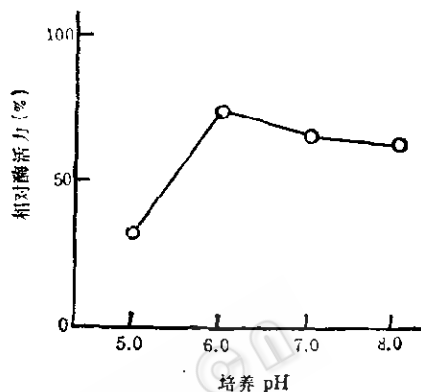


图 3 培养液 pH 对酶形成的影响

pH 为 8.0, 反应温度为 50℃; 在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 稳定 pH 范围为 9.0—9.5, 在 -18℃ 保存时 (含保护剂), 半衰期约为 6 个月。

参 考 文 献

- [1] Murao, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2383, 1981.
- [2] Tanaka, N. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2499, 1982.
- [3] Tanaka, N. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 49(3): 843, 1985.

ISOLATION OF BILIRUBIN OXIDASE FROM *MYROTHECIUM VERRUCARIA* AND THE OPTIMUM CONDITIONS OF ENZYME PRODUCTION

Guo Jian Tao Sha Mo Peisheng

(National Center for Clinical Laboratory, Beijing)

Liang Xixian Li Gaoxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A bilirubin oxidase (EC 1.3.3.5) producing strain, Mv 2.1089, was isolated from several strains of *Myrothecium verrucaria* by dilution method. The optimum conditions of enzyme production were investigated and the results were as follows: the suitable medium was cultured at 25°C on a rotating shaker glucose and peptone, at pH 6.0. The strain was cultured at 25°C on a rotating shaker

(150 r/min) for 96 h. Bilirubin oxidase with 0.5—1.5 u/ml was obtained in the culture medium.

Key words

Bilirubin oxidase; *Myrothecium verrucaria*