

海洋微生物溶菌酶的纯化与性质研究

Purification and Characterization of a Lysozyme from a Marine Microorganism

邹艳丽², 孙 谧^{1*}, 王跃军¹ZOU Yan-Li², SUN Mi^{1*} and WANG Yue-Jun¹

1. 中国水产科学院黄海水产研究所海洋酶与酶工程实验室, 青岛 266071

2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090

1. Laboratory of Marine Enzyme and Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, 266071, China

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China

摘 要 海洋微生物溶菌酶发酵上清液经超滤、CM-Sepharose FF 阳离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析纯化得到电泳纯的溶菌酶, 纯化倍数为 34.7, 活力回收为 24.1%。对纯化溶菌酶性质研究表明, 该酶分子量约为 39kD, 对溶壁微球菌的最适作用温度为 35℃, 最适作用 pH 为 8.0, 在 50℃ 以下和 pH 5.0~10.0 之间都有较好的稳定性, 与常见金属离子和化学试剂有良好的配伍性, 广谱杀菌, 对多种致病菌也有较强的溶菌作用。

关键词 海洋微生物, 溶菌酶, 分离纯化, 理化性质

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0420-05

Abstract A novel lysozyme was purified from a marine microorganism and its major characteristics were studied. Cell-free supernatant was prepared by centrifugation of culture broth, ultrafiltration using a hollow fiber (molecular weight cut off, 50kD) and concentration using a hollow fiber (molecular weight cut off, 10kD). The crude lysozyme was purified 34.7 fold to electrophoretic homogeneity with a recovery of 24.1% by CM-Sepharose FF cationic-exchange and Sephadex G-100 gel chromatography. The relative molecular weight of this lysozyme was determined as about 39 kD. The optimum pH and temperature towards *Micrococcus lysodeikticus* were pH 8.0 and 35℃ respectively, and the enzyme was stable at temperature below 50℃ and pH 5.0~10.0. The lysozyme activity was slightly enhanced by Zn²⁺ and Cu²⁺ and slightly inhibited by Mn²⁺ and Ag⁺. The lysozyme showed good compatibility to many common chemical agents such as EDTA (0.1%) and KH₂PO₄ (1.0%). The lysozyme had broad-spectrum against many bacteria, including a number of pathogens, which were resistant to egg-white lysozyme.

Key words marine microorganism, lysozyme, purifications, characterization

溶菌酶, 又称细胞壁水解酶, 专门作用于细菌细胞壁的骨架物质-肽聚糖, 广泛存在于高等动植物组织及分泌物、原生动物、昆虫和各种微生物中^[1]。溶

菌酶本身是一种蛋白质, 安全性能高, 在食品、医药、生物学中得到了广泛的应用。

商品溶菌酶多由蛋清中提取, 仅对革兰氏阳性

Received: December 6, 2004; Accepted: February 3, 2005.

This work was supported by a grant from the National High Technology R&D Program of China(No. 2003AA625070).

* Corresponding author. Tel: 86-532-5819525; E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

国家高技术研究发展计划资助项目(No. 2003AA625070)。

菌有作用,限制了其应用范围^[2],近年来国内外对多种来源的溶菌酶进行了广泛的研究^[3-6],但有关海洋微生物溶菌酶的研究报道较少。本文对一种新型海洋微生物溶菌酶的分离纯化及理化性质进行了研究,为海洋微生物溶菌酶的进一步研究和应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

产溶菌酶菌株 S-12-86 为从东海海泥中分离得到的海洋杆菌,由本实验室保存。

CM-Sepharose FF、Sephadex G-100 层析介质购自瑞典 Pharmacia 公司,丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司,其他分析测试用化学试剂均为国产分析纯。仪器主要有 HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机(日本日立公司);SCM 杯式超滤系统(中科院上海应用物理研究所);LKB2021 恒温层析冷柜(瑞典 LKB 公司);Bio-Rad Mini II 垂直蛋白电泳仪(美国伯乐公司);752 紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 产酶菌株的培养:将活化的菌株接种于产酶培养基(蛋白胨 1.0%,牛肉膏 0.5%,NaCl 0.5%)中,置于 28℃ 恒温摇床(200r/min)上培养 24h,将发酵液离心(4000 r/min,40min),除去菌体收集上清液。

1.2.2 超滤浓缩:上清液经截留分子量为 50 kD 的膜超滤,再以截留分子量为 10 kD 的膜浓缩。

1.2.3 CM-Sepharose FF 柱层析:将超滤浓缩液上样于经 pH3.8 10mmol/L 柠檬酸-1mmol/L Na₂HPO₄ 缓冲液充分平衡的 CM-Sepharose FF 层析柱(2.5cm × 10cm),用 200mL 含 0~1.0mol/L NaCl 的溶液进行线性梯度洗脱,流速 1.0mL/min,收集活性峰并脱盐浓缩。

1.2.4 Sephadex G-100 柱层析:将 CM-Sepharose FF 层析柱所得活性组分上样于以 pH 6.5 10mmol/L PBS 缓冲液充分平衡的 Sephadex G-100 层析柱(1.6cm × 60cm),用平衡液进行洗脱,流速 0.1mL/min,收集活性峰脱盐浓缩后于 -20℃ 保存备用。

以上纯化操作均在 4℃ 进行。

1.2.5 溶菌酶纯度和分子量测定^[7]:采用 SDS-PAGE 方法测定,分离胶浓度为 12%,用 0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.6 蛋白质浓度的测定:采用 Lowry 法^[8]进行测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.7 溶菌酶活性的测定^[1]:用 60mmol/L、pH6.2 的磷酸缓冲液配制一定浊度 ($A_{450} = 0.6 \sim 0.7$) 的溶壁微球菌为底物,取 0.5mL 酶液加入 2.5mL 底物(20℃)中,迅速混合,在波长 450nm 处读取反应体系 5min 内每隔 15s 的吸光度。以 $\Delta A_{450}/\text{min}$ 变化 0.001 个吸光度值为一个活性单位。

2 结果

2.1 溶菌酶的分离纯化

超滤浓缩溶菌酶经 CM-Sepharose FF 阳离子交换柱层析分离后,盐洗脱峰为活性峰,洗脱曲线见图 1,收集活性峰脱盐浓缩后上样于 Sephadex G-100 凝胶过滤层析柱,洗脱曲线见图 2,第二个峰为活性峰,收集活性峰透析浓缩后作为纯化样品使用。整个分离过程的纯化结果见表 1。由表 1 可知,纯化过程中阳离子交换柱层析纯化效果最为明显,纯度提高了 21.9 倍,去除了大部分杂蛋白,最终溶菌酶发酵液经纯化比活达到 3279.5u/mg,纯度提高了 34.7 倍,活力回收为 24.1%。

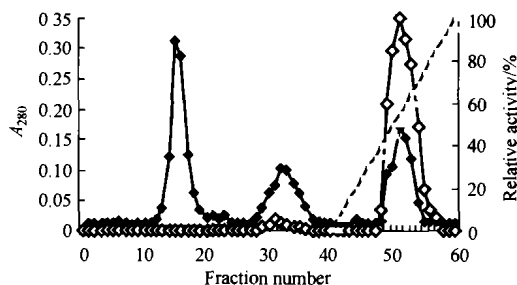


图 1 溶菌酶 CM-Sepharose FF 柱层析曲线

Fig.1 Elution profile of lysozyme on CM-Sepharose FF column

—◆— A_{280} ; —◇—relative activity; - - NaCl gradient.

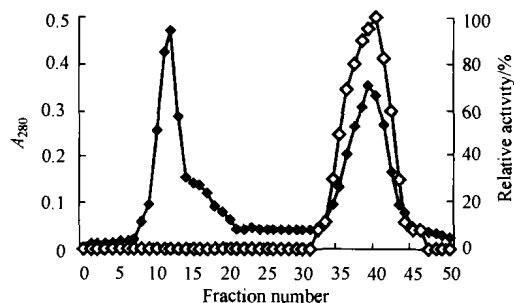


图 2 溶菌酶 Sephadex G-100 层析曲线

Fig.2 Elution profile of lysozyme on Sephadex G-100 column

—◆— A_{280} ; —◇—relative activity.

2.2 溶菌酶分子量测定

将纯化得到的溶菌酶以 SDS-PAGE 进行分析,结果见图 3,纯化样品为单一条带。由标准蛋白可知该酶分子量约为 39kD。

表 1 溶菌酶纯化结果

Table 1 Purification of marine lysozyme

Procedure	Total activity/u	Total protein/mg	Specific activity/(u/mg)	Yield/%	Purification (fold)
Crude extract	2.61×10^5	2.76×10^3	94.6	100.0	1.0
Ultrafiltration	2.02×10^5	7.04×10^2	286.9	77.4	3.0
CM-Sepharose	1.01×10^5	48.60	2078.2	38.7	21.9
Sephadex G-100	0.63×10^5	19.21	3279.5	24.1	34.7

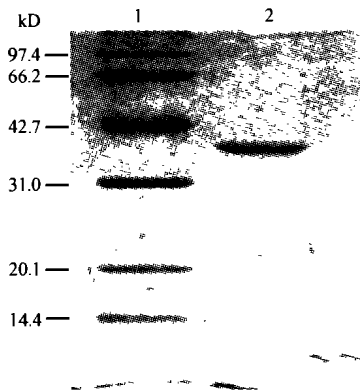


图 3 纯化溶菌酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE of purified lysozyme

1: marker; 2: purified lysozyme.

2.3 溶菌酶的理化性质研究

2.3.1 溶菌酶最适作用 pH 和温度的测定:在不同 pH 缓冲溶液中和不同温度下测定相对酶活,结果见图 4。由图 4 可知该溶菌酶最适作用条件为: pH 8.0, 温度 35℃, 在高于和低于 35℃ 时该溶菌酶酶活下降都比较缓慢, 5℃ 时仍保持一定活性, 相对酶活为 25%。根据 Margsin 等 1991 年的定义, 通常把最适催化温度在 30℃ 左右, 在 0℃ 左右仍有一定催化效率的酶称为低温酶, 因此该溶菌酶为低温碱性酶^[9,10]。

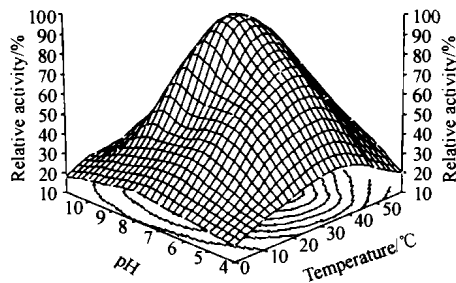


图 4 温度和 pH 对酶活的影响

Fig.4 Effects of temperature and pH on lysozyme activity

2.3.2 溶菌酶的 pH 稳定性和热稳定性: 采用不同 pH 和温度测定溶菌酶的稳定性, 结果见图 5 和图 6。由图 5 可知该溶菌酶(20℃)在 pH 6.5 时最稳定, pH 5.0~10.0 之间稳定性均较好, 相对酶活在 80% 以上。图 6 结果表明溶菌酶(pH 6.0)在小于 50℃ 时有较好的热稳定性, 50℃ 保温 6h 后剩余酶活为 81%,

70℃ 保温 6h 后剩余酶活仍为 72%。

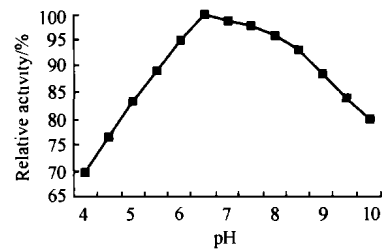


图 5 溶菌酶的 pH 稳定性(20℃)

Fig.5 Effects of pH on stability of lysozyme activity(20℃)

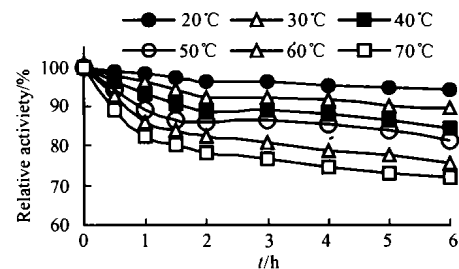


图 6 溶菌酶的热稳定性(pH6.0)

Fig.6 Effects of temperature on stability of lysozyme activity(pH6.0)

2.3.3 常见金属离子对溶菌酶活性的影响: 在溶菌酶中加入各种金属离子并保持离子浓度为 0.01 mol/L, 同时以不加金属离子的酶液作为对照, 测定溶菌酶活性, 结果见表 2。由表 2 可知, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对溶菌酶具有一定的激活作用, Mn^{2+} 和 Ag^+ 对溶菌酶略有抑制作用, 其他一些金属离子如 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 等对溶菌酶活性没有显著影响, 说明溶菌酶与大部分金属离子都有良好的配伍性能。

表 2 常见金属离子对酶活的影响

Table 2 Effects of metal ions on lysozyme activity

Metal ions (0.01mol/L)	Relative activity/%	Metal ions (0.01mol/L)	Relative activity/%
Control	100	KCl	104
BaCl ₂	100	CuSO ₄	128
Li ₂ SO ₄	98	AgNO ₃	93
CaCl ₂	102	FeCl ₃	102
NaCl	105	MgSO ₄	96
MnSO ₄	85	ZnSO ₄	135

2.3.4 常见化学试剂对溶菌酶活性的影响: 按表 3

所示浓度将各试剂加入酶液中,以蒸馏水作空白,测定溶菌酶活性,结果见表3。由表3可知,常见化学试剂与溶菌酶具有良好的配伍性,对溶菌酶活性没有显著影响。

表3 常见化学试剂对酶活的影响

Table 3 Effects of chemical agents on lysozyme activity

Chemical agents	Relative activity/ %	Chemical agents	Relative activity/ %
Control	100	Borax (1.0%)	109
KH ₂ PO ₄ (1.0%)	109	NaCl (1.0%)	102
EDTA (0.1%)	109	Citric acid (1.0%)	109
Tween 80 ((0.1%)	115	Na ₂ HPO ₄ (1.0%)	109
Tween 40 (0.1%)	115	Ethylene glycol (1.0%)	112
Ethanol (1.0%)	99	Tartaric acid (1.0%)	98
Emulgent OP(1.0%)	112	Glycerol (1.0%)	109

2.3.5 溶菌酶抑菌谱:用液体培养基将溶菌酶稀释浓度为 1.4%、0.7%、0.35%、0.175%、0.088%、0.044%、0.022%、0.011% 的溶液,取对数生长期的各菌株分别加入到含溶菌酶的培养基中,使每毫升培养基含菌体 10⁵个,将各试管放入摇床中培养,肉眼观察阳性对照管有菌生长(混浊),阴性对照管无菌生长(透明),试验组无菌生长的最高稀释度所对应的溶菌酶的浓度,为最小抑菌浓度(MIC)^[11]。

表4 溶菌酶的抑菌谱

Table 4 Inhibition spectra of lysozyme

Strains	MIC/ %	Strains	MIC/ %
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.088
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.175	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.35
<i>Staphylococcus albus</i>	0.175	<i>Micrococcus luteus</i>	0.35
<i>Streptococcus mutans</i>	0.088	<i>Bacillus subtilis</i>	0.175
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.044	<i>Bacillus cereus</i>	0.088
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.175	<i>Bacillus pumilus</i>	0.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.175	<i>Aspergillus niger</i>	0.35
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.35	<i>Escherichia coli</i>	0.175
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.35	<i>Candida albicans</i>	0.35

MIC法测定抑菌作用结果见表4,由表4可知该溶菌酶溶菌谱广泛,对多种革兰氏阳性及阴性菌均有活性,尤其是对肺炎链球菌、变形链球菌、肺炎克雷伯氏菌、化脓性链球菌、生孢梭菌等致病菌有较强的作用。

3 讨论

海洋极端微生物作为产酶资源正成为一个新的研究热点,由于海洋的特殊环境使海洋微生物所产生的酶具有一些较之相应的陆生动植物及微生物产

生的酶更为独特的性质,如在低温条件下具有相对高的活力,最适 pH 和反应温度适中,作用 pH 范围宽,在碱性环境下稳定等,这些结构和功能新颖的酶类具有独特的生理、药理及生化活性,在医药、食品、酶工业等领域中有着广阔的应用前景和开发潜力^[12]。

蛋清溶菌酶最适作用温度为 50℃,在室温下活性较低,本实验所得溶菌酶最适作用温度为 35℃,是一种低温酶,由于低温酶的低温催化能力,生产应用过程中无需加热和冷却,可以降低成本节约能源且不会影响产品的品质等,为其应用提供了许多优势。

蛋清溶菌酶仅对革兰氏阳性菌有作用,本实验所得溶菌酶溶菌谱广泛,对多种蛋清溶菌酶不能直接作用的微生物如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(蛋清溶菌酶需添加 EDTA 等试剂或其他酶辅助才能对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等有一定的溶菌作用^[2])等都有溶菌作用,对多种致病菌也有较强的溶菌作用,而且在该溶菌酶 50℃ 以下和 pH 5.0 ~ 10.0 之间都有较好的稳定性,受金属离子和化学试剂影响较小,在医药和食品工业中具有独特的发展前景,有关此方面的工作正在开展之中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang SZ (张树政). Enzyme Preparation Industry (酶制剂工业). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1998, pp. 804 - 815
- [2] Chuan JS (船津胜), He DD (鹤大典). Lysozyme (溶菌酶). Jinan (济南): Shandong Science and Technology Press (山东科学技术出版社), 1982
- [3] Hawiger J. Purification and properties of lysozyme produced by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 1968, **95**(1): 376 - 384
- [4] Yu KH, Kim KH, Lee JH et al. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, **26**: 707 - 713
- [5] Spencer A, Ludmilla A, Morozov-Roche NW et al. Expression, purification, and characterization of the recombinant calcium-binding equine lysozyme secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niger*: Comparison with the production of hen and human lysozymes. *Protein Expression and Purification*, 1999, **16**: 171 - 180
- [6] Gao XY (高向阳), Yuan SQ (袁四清), Mu H (穆虹) et al. Primary studies on the bacteriostasis and fungistasis of lysozyme from *Raphanus sativus*. *Journal of South China Agricultural University* (华南农业大学学报), 1997, **18**(2): 72 - 75

- [7] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**:680 - 685
- [8] Li JW (李建武), Yu RY (余瑞元), Yuan MX (袁明秀) *et al.* Principles and Methods of Biochemical Experiment (生物化学实验原理和方法). Beijing: Beijing University Press (北京大学出版社), 1994, pp. 168 - 170
- [9] Lin XZ (林学政), Hou XG (侯旭光), Li GY (李光友). Advances in research of cold-adapted enzymes from antarctic bacteria. *Marine Sciences*, 2002, **26**(10): 38 - 42
- [10] Shi XJ (史贤俊), Lin Y (林影). Psychrophilic enzyme and industrial application. *Chemistry of Life*, 2001, **21**(3):248 - 249
- [11] Department of Health Law Enforcement and Supervision (卫生部卫生法制与监督司). Disinfection Technique Standard (消毒技术规范). Beijing: Ministry of Health People's Republic of China (中华人民共和国卫生部), 2002, pp. 83 - 94
- [12] Sun M (孙谧), Hong YG (洪义国), Li BS (李勃生) *et al.* Characteristic of low-temperature enzyme from marine bacteria and its potential use on the industry. *Marine Fisheries Research*, 2002, **23**(3):44 - 49

(上接 369 页 征稿简则)

3.4 中英文摘要

中文摘要应简洁明确,而英文摘要则可比中文摘要详尽些,内容上不必完全对应。本刊非常重视英文摘要的写作,具体要求如下:

3.4.1 字数:综述性文章要求不少于 200 words,学术性文章要求 200 ~ 400 words。

3.4.2 内容:综述性文章的文摘主要应对所述的研究课题或技术在某时期的发展情况进行简要概述;包括该技术在目前的发展水平、自己的评论及未来展望等。研究报告的文摘应主要从目的、过程与方法、结果等几方面来写(不用单列标题书写)。目的主要是说明作者写此文章的目的,或说明该研究要解决的问题;过程与方法应重点说明作者的主要工作过程及使用的方法,引用他人的方法勿在文摘中提出;结果和结论部分,应写明本文的创新之处,及作者在讨论部分表述的观点。对于应用性的文章,如果需要也可在文摘中适当提及实验条件、使用的主要设备和仪器,结论部分应尽可能提及本结果和结论的应用范围、应用情况或应用前景。

3.4.3 写法:

1) 最好用重要的事实开头,避免用第一人称或辅助从句开头。2) 用过去时态叙述作者工作,用现在时态叙述作者结论。3) 关键词应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不要用,如基因、表达……

英文摘要完成后的最终效果应是,国外同行根据英文摘要及图表,就可以大致了解论文的全貌。文摘写完后,应请英文较好的专家审阅定稿后再寄至编辑部。

4 特别说明

4.1 关于综述

综述类稿件一定要结合自己的工作,应具备文献新,观点明,有评论,有展望,切忌资料堆砌。

4.2 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文,请先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)

或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投来。

4.3 关于版权

4.3.1 本刊只接受未公开发表的文章,请勿一稿两投。

4.3.2 凡在本刊通过审稿,同意刊出的文章,所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议,敬请事先声明。

4.3.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工,但如涉及内容的大量改动,将请作者过目同意。

4.3.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性,因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果,由作者自负。

4.4 审稿程序及提前发表

4.4.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知,对不录用的稿件,一般在收到来稿 3 个月之内致函说明原因。打印及复印稿不退,请自留底稿及原图,特殊情况请在来稿时注明。

4.4.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量是唯一标准,对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表,请在投稿的同时提出书面报告,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性,经过本刊的严格审查并通过后,可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用,将在发表前根据版面收取一定的发表费,并酌付稿酬,寄送样刊及单行本。发表费 200 元/面,彩版每面另加 800 元(发表费如有调整,以本刊所发通知为准)。

6 编辑部地址

(100080) 北京市海淀区中关村 中国科学院微生物研究所《生物工程学报》编辑部

电话/传真:(010)62554303

E-mail: cjb@sun.im.ac.cn; shwu@china.journal.net.cn