

产细菌溶解酶芽孢杆菌的筛选和摇瓶试验

陈俊民 王作祥 于建伟

陈德英 郭深泉 王文义

(中山大学生物系微生物组, 广州)

细菌溶解酶能分解微生物细胞壁的主要组份肽葡聚糖, 使微生物得不到细胞壁的保护而死亡^[1]。这类酶中的鸡蛋白溶菌酶已应用于一些传染病的治疗^[2]。它还可用来提取细菌细胞内的 DNA^[3]、酶和其它物质^[4], 并可提高细菌的遗传转化率^[5], 因此也是微生物学、生物化学和遗传学研究的一种重要工具酶。

细菌溶解酶参与细菌细胞壁的代谢^[1,6,7], 因而是细菌细胞正常生命活动的产物。自从 Nonura 和 Hosoda^[8] 从枯草芽孢杆菌自溶液中分离到能溶解枯草芽孢杆菌的酶以来, 已从一些微生物发酵液中分离到能分解细菌^[9-11]、霉菌^[12]和酵母菌^[13]细胞壁的各种细菌溶解酶。细菌溶解酶的研究已引起微生物学家的广泛注意。

本文报道细菌溶解酶产生菌的筛选和摇瓶发酵试验。

材料与方 法

主要试剂

鸡蛋白溶菌酶(上海禽蛋二厂)。

菌 株

用原保藏的和土壤中分离到的芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 进行平皿初筛。

平皿初筛方法

土壤悬液先经 90℃ 处理 15 分钟。在含 1.5% 琼脂的营养液中加入 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 和溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 丙酮干粉 0.02%, 灭菌后倒平皿进行单菌分离, 34℃ 培养 1—2 天后选取菌落周围出现溶菌圈的菌株进行摇瓶试验。产细菌溶解酶活力较强的菌株经诱变后也同样进行分离初筛。

溶壁微球菌丙酮干粉的制备

溶壁微球菌 AS1.634 接种在营养琼脂茄子瓶斜面上, 32℃ 培养 24 小时, 用无菌水洗下菌苔, 先后用无菌水、50% 丙酮和无水丙酮各洗涤和离心 2 次, 得到的沉淀于 45℃ 以下烘干备用。

细菌溶解酶活力的测定

称取溶壁微球菌干粉约 10 毫克, 在玻璃匀浆器中加入含 EDTA 0.0372% 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.2) 约 2 毫升, 研磨 15 分钟以上, 制成菌体悬液。用缓冲液稀至 450 毫微米, 光密度约为 0.5。现配现用, 并经常校正浓度。在 22—24℃ 恒温室中取菌悬液 4.0 毫升, 加入稀释 A 倍的酶液或发酵上清液 1.0 毫升混匀。加入酶液后 30 秒和 5 分 30 秒分别在 540 毫微米测光密度, 以平均每分钟光密度降低 0.001 为 1 个酶活力单位。如果最后光密度降至原来的一半以下则用更大稀释度的酶液重测。

$$\begin{aligned}\text{发酵液酶活力} &= (\text{光密度}_{30\text{秒}} - \text{光密度}_{5\text{分}30\text{秒}}) \\ &\quad \times 1000 \times A \times 5/5 \text{ 单位/毫升} \\ &= (\text{光密度}_{30\text{秒}} - \text{光密度}_{5\text{分}30\text{秒}}) \\ &\quad \times 1000A \text{ 单位/毫升}\end{aligned}$$

摇瓶发酵试验

待测菌株先在菌种斜面活化培养 12 小时, 然后接种到各种发酵培养基中, 500 毫升三角瓶装培养液 30 毫升, 在 85 转/分、偏心半径 5 厘米的旋转式摇床上 34℃ 培养 24 小时。离心取上清液测酶活力。按照多因素正交优选法进行最优发酵条件试验。

结 果

(一) 细菌溶解酶产生菌的筛选

本文于 1977 年 9 月 7 日收到。

在 156 株芽孢杆菌中有 50 株出现溶菌圈。经摇瓶发酵试验溶菌活力较高的有 3 株, 其中一株对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 有溶菌作用, 另两株 (07, K1) 对溶壁微球菌有溶菌作用。用后两株菌进行下列试验。

(二) 摇瓶发酵条件试验

先用含 (%) 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.5, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, pH 7.0 的培养基 A^[11] 进行发酵试验。结果发现, 07 菌株的酶活力只有 190 单位/毫升。在实验中观察到培养结束时发酵液 pH 微酸性者酶活力最高, 因此在培养基中加入 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.7), 并将葡萄糖含量提高至 1% (培养基 B), 结果发酵液的酶活力升至 620 单位/毫升。

为了找出最优发酵条件, 提高缓冲液浓度并使其中 Na^+ 和 K^+ 的量各占一半, 选用正交表 $L_{11}(3^4)$ 进行第一次正交优选试验, 结果见表 1。

再以第一次得到的最优条件为基础, 选择一些较有决定意义的因素进行第二次正交优选试验, 选用表 $L_{11}(2^1 \times 3^3)$, 并把发酵周期缩短为 24 小时, 装瓶量定为 30 毫升。把第一次试验中酶活力最高组的配方 (培养基 C) 和稍加修改的最优配方 (培养基 D) 作为对照。试验结果最高酶活力达 8,800 单位/毫升 (培养基 E), 而培养基 C 和 D 的酶活力只分别为 5,700 单位/毫升和 8,000 单位/毫升。结果见表 2。第二次优选出的最优配方定为培养基 F。

将 K1 菌株经亚硝基胍-紫外线复合诱变处理得到的 B4 菌株用各种培养基进行发酵试验, 每组 6 瓶, 混合后测定。结果仍以用培养基 F 时酶

活力最高。结果见表 3。这一菌株再经一次单菌落分离得到的 B4-3 菌株, 在培养基 F 中酶活力 (10 瓶混合) 达 15,200 单位/毫升。

讨 论

当用培养基 A^[11] 进行摇瓶发酵时, 培养 24 小时后 pH 多数升至 8 以上, 并且出现芽孢, 酶活力很低。当加入磷酸缓冲液维持微酸性并加大碳源时, 培养 36 小时仍不出现芽孢, 并且酶活力显著提高。看来磷酸缓冲液除了维持发酵液 pH 外, 还有延长生长期并促进细菌溶解酶大量生成和分泌的作用。据报道^[12], 当米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 培养在含最低量磷酸盐的培养基中时, α -淀粉酶几乎全部留在菌丝中, 证明磷酸盐浓度和酶的分泌有密切关系。当我们将磷酸缓冲液浓度降低 1/4 和 1/2 时, 发酵单位也分别降低 1/4 和 1/2。此外, 钾离子浓度也是不容忽视的。看来高浓度的磷酸缓冲液和钾离子是发酵单位大幅度提高的关键。

细菌溶解酶虽能直接溶解活的溶壁微球菌, 但在酶活力测定时, 使用该菌干粉制成的悬液作为底物较为方便。虽然测定时都以每分钟光密度降低 0.001 为 1 单位, 但各作者采用的底物制备方法, 底物与酶体积的比例, 反应温度与时间, 测定时所用的波长, 计算方法等往往不一致。按照我们的测定条件, 以鸡蛋白溶菌酶为标准酶液时, 5 分钟的平均光密度降低值和酶浓度恰好成正比, 因此我们把反应时间定为 5 分钟, 并以酶和底物混和后半分钟作为计算光密度变化的起点。按照此测定方法, 上海溶菌酶粉的活力为 26,000 单位/毫克, 而 B4-3 发酵液酶活力 (10

表 1 第一次正交优选试验结果

酶活力	装瓶 体积 (毫升)	总氮源 (%)	牛肉膏 占总氮 源量 (%)	酵母膏 占总氮 源量 (%)	碳氮比	淀粉占 总碳源 量(%)	磷酸缓 冲液 pH	缓冲液 浓度 (M)	硫酸镁 (%)	硫酸锰 (%)	氯化钠 (%)	氯化钙 (%)	发酵周期 (小时)
最高	30	1.0	40	0	0.8	50	6.6	0.20	0.025	0	0	0.01	30
中等	40	2.0	20*	40*	1.2*	25*	6.8	0.25	0.05*	0.05	0.3*	0	24
最低	50	1.5	0*	20*	1.0	0	6.4	0.15	0.1	0.1	0.5	0.02	36*

* 和酶活力较高的一级相差不大。

表 2 第二次正交优选试验结果

酶 活 力	蛋白胨 (%)	总碳源 (%)	淀粉占总 碳源(%)	氯化钠 (%)	氯化钙 (%)	硫酸镁 (%)	磷酸缓冲液 浓度(M)	缓冲液中的 K ⁺ (N)
最 高	1.25	1.0	25	0.3	0	0.025	0.2	0.2
中 等	1.0*	1.2	50		0.1*	0.05	0.18	0.27
最 低	1.5	0.8	37.5	0	0.05*	0	0.22	0

* 和酶活力较高一级相差不大。

表 3 不同培养基对 B4 菌株细菌溶解酶产率的影响

培 养 基 号	蛋白胨 (%)	牛肉膏 (%)	酵母膏 (%)	淀粉 (%)	葡萄糖 (%)	硫酸镁 (%)	氯化钠 (%)	氯化钙 (%)	磷酸缓 冲液 pH	缓冲液 浓度 (M)	缓冲液 中的 K ⁺ (N)	酶 活 力 (单位/毫升)
C	0.6	0.3	0.6	0.6	0.6	0.025	0.3		6.6	0.2	0.27	8,400
D	1.0			0.5	0.5	0.05	0.3	0.01	6.6	0.2	0.27	9,200
E	1.25			0.5	0.5	0.025	0.3	0.01	6.6	0.22	0.2	10,000
F	1.25			0.25	0.75	0.025	0.3		6.6	0.2	0.2	12,000

瓶混合)达 15,200 单位/毫升,相当于溶菌酶粉约 0.6 毫克/毫升。

参 考 文 献

- [1] Ghuyssen, J. M.: *Bacteriol. Rev.*, **32**: 425—464, 1968.
- [2] Blacow, N. W. (ed.): *Martindale-The Extra Pharmacopoeia*, 26th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1973, p. 686.
- [3] Marmur, J.: *Methods in Enzymology*, Vol. 6: 1963, p. 726—738.
- [4] Fogarty, W. M. et al.: *Process Biochem.*, **9** (7): 27—35, 1974.
- [5] 薛禹谷、董可宁、韩文珍: 微生物学报, **17** (2): 108—133, 1977.
- [6] Forsberg, C. W. and Rogers, H. J.: *Nature* (London), **229**: 272—273, 1971.
- [7] Fan, D. P.: *J. Bacteriol.*, **103** (2): 494—499, 1970.
- [8] Nomura, M. and Hosoda, J.: *J. Bacteriol.*,

72 (5): 573—581, 1956.

- [9] Herbold, D. R. and Glaser, L.: *J. Biol. Chem.*, **250** (5): 1676—1682, 1975.
- [10] Okada, S. and Kitahata, S.: *J. Ferm. Technol.*, **51**(10): 705—712, 1973.
- [11] Murao, S. and Takahara, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **38** (12): 2305—2316, 1974.
- [12] Asknes, L. et al.: *Acta. Chem. Scand., Ser. B*, **28** (2): 193—200, 1974.
- [13] Афанашева, Т. И. и др.: *Антибиотики*, **20** (10): 907—911, 1975.
- [14] Mori, K. et al.: 日本农业化学会誌, **50** (7): 303—309, 1976.
- [15] Tsujisaka, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37** (11): 2517—2525, 1973.
- [16] Flect, G. H. and Phaff, H. J.: *J. Bacteriol.*, **119** (1): 207—219, 1974.
- [17] Murao, S. and Takahara, Y.: 特许公报, 昭-28,993, 1974.
- [18] Tonomura, K., et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **26** (1): 10, 1962.