

## 一株侧孢芽孢杆菌产生的细菌溶解酶的研究

江慧修 李悦 徐浩

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从我所保藏的菌种中筛选并经紫外线处理获得一株产细菌溶解酶的侧孢芽孢杆菌。研究了产生溶解酶的最适条件; 培养基中葡萄糖的最适浓度为0.2%, 超过此浓度抑制此酶的产生; 在菌的稳定生长期, 酶的产量最高。

用 DEAE-纤维素柱层析提纯的酶制品, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现一条主带。培养滤液和酶制品能溶解全部供试溶菌谱的革兰氏阳性菌, 对个别几株铜绿色假单胞菌也有较低的溶解活性。溶菌的最适 pH 是7.5, 最适温度是45°C, Tris-HCl 缓冲液的浓度超过0.05M, 溶菌活性就突然下降。

我们在研究细菌细胞壁的生理功能时, 试图使用一些不同类型的细菌溶解酶作工具, 通过探讨细菌的细胞壁在酶解过程中的反应来了解壁生理现象的某些本质。为了解除除蛋清溶菌酶 (lysozyme) 以外的溶解酶的来源, 尤其希望能得到新的溶解酶品种, 我们进行了产溶解酶微生物的选育工作。

我们从我所保藏的芽孢杆菌中筛选到一株侧孢芽孢杆菌 *Bacillus laterosporus* AS 1.864, 其培养滤液能溶解包括金黄色葡萄球菌在内的一些革兰氏阳性菌, 对铜绿色假单胞菌的某些菌株也有较弱的溶解活性。我们以此菌株为原始株, 通过紫外线诱变获得了一株 U<sub>B</sub>, 产酶量较原始株提高25—40%, 溶菌谱不变。本文初步报道菌种的选育, 产酶条件、滤液和酶液的溶菌条件, 酶的初步提纯等方面的内容。

### 材料和方法

#### (一) 培养基

用做酶活性测定的底物细菌是在牛肉汁液体培养基中, 于37°C 摇床培养16小时的活菌体。

产酶菌株的培养基: 以日本村尾沢夫<sup>[1]</sup>的配方为基础, 经比较试验将其中葡萄糖含量改为0.2%, 即1000毫升水中含蛋白胨10克, 葡萄糖2克, 磷酸二氢钾2克, 硫酸镁(7H<sub>2</sub>O) 0.5克, 硫酸锰0.05克, 氯化钙0.1克, pH7.0。

#### (二) 产酶菌株的选育

初筛: 通过双层琼脂平板法, 选出其培养滤液在平板上能产生溶菌斑的菌株。进一步用液管比浊法测定酶活, 选出产酶量高的菌株作为原始株。

紫外线诱变方法: 经37°C 摇床培养16小时的原始株, 于5000转/分离心收集并洗涤菌体, 再把菌体悬浮于0.9%的氯化钠溶液, 置培养皿中, 用15瓦紫外灯管, 距离30厘米照射数分钟, 将菌液适当稀释涂牛肉汁平板, 计算致死率, 并将长出的单菌落转入牛肉汁斜面, 逐株测其产酶活性。

#### (三) 溶解酶的酶活性定性定量测定

双层琼脂平板法: 可作定性和粗略的定量比较测定。培养皿里先倒一层厚约2—3毫米的1.5%的不加任何营养品的水洗琼脂, 凝固后, 上边再倒一薄层含底物活菌体的上述琼脂, 把蘸有

本文于1979年8月6日收到。

本文中的摄影工作由我所技术室孙荣钦和苑兰翠同志完成。本所六室李钦同志帮助作电泳扫描。在此一并致谢。

培养滤液或酶液的滤纸片(直径 5 毫米)贴在琼脂板上, 置 37°C 保温, 6 小时以后可看出滤纸片周围的溶菌圈。为提高此方法的灵敏度, 我们采用双层滤纸, 并且使用较浓的底物菌, 以加强反差, 便于观察。贴以前把滤纸片上多余的滤液吸去, 则溶菌圈的大小也可大致反映溶解活性的高低, 如图 1。

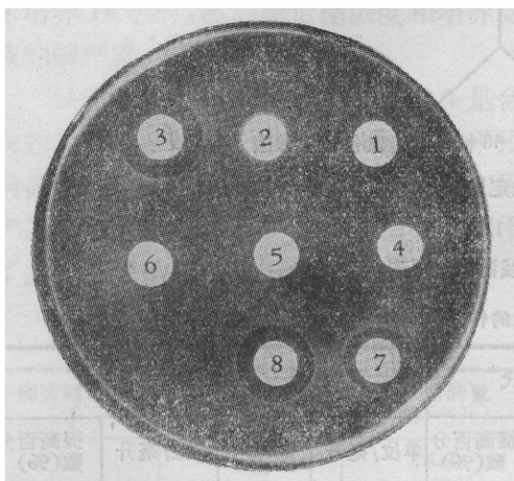


图 1 双层琼脂平板法测酶活性  
底物菌: 蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* AS 1.126

滤纸片号	样 品
1	U <sub>23</sub> 溶解酶
2	鸡蛋清溶菌酶
3	U <sub>23</sub> 滤液 1
4	071 滤液
5	076 滤液
6	069 滤液
7	AS1.864 滤液
8	U <sub>23</sub> 滤液 2

液管比浊测定法: 吸取适当浓度的培养滤液或酶液 1 毫升与等体积的 O.D.<sub>660 毫微米</sub> 为 0.6 左右的底物菌液相混合, 于 37°C 水浴保温一定时间, 测定反应前后的 O.D.<sub>660 毫微米</sub> 值, 参照文献的计算方法<sup>[2-4]</sup>, 按每分钟 O. D. 值下降 0.001 为一个酶活力单位。

关于底物菌, 前人的工作有用丙酮干菌粉、冷冻干燥菌粉、100°C 热处理的菌体、活菌体等。实际上, 同一株菌经不同处理, 对酶的溶菌反应是不同的<sup>[5]</sup>。从我们的试验中也看到了这种现象, 尤其是热处理还会导致错误的结论。因此, 本文所有的条件试验一律使用金黄色葡萄球菌 AS1.89 的

活菌体作为底物菌。参照每次试验的对照管, 证明用对数期的活菌体作底物并不存在明显的自溶现象。

#### (四) 酶的初步提纯

培养好的菌液离心去菌体, 往培养滤液中加入固体硫酸铵达 0.6 饱和度, 置冰箱过夜。离心收集蛋白部分, 溶于水, 在 4°C 对蒸馏水透析一天去硫酸铵, 然后用 0.01M pH8 的磷酸盐缓冲液透析平衡, 再上 DEAE-纤维素柱层析。由于大部份溶解酶的等电点是在碱性范围<sup>[6]</sup>, 比滤液中一般杂蛋白的等电点高, 可以利用等电点的差异在 pH 8.0 的条件下层析, 使带负电荷的杂蛋白被吸附, 带正电荷的溶解酶通过柱子, 从而达到基本上纯化的目的。DE-11 的层析柱体积是 2 × 28 厘米, 流速 0.5 毫升/分, 磷酸缓冲液浓度 0.01M, pH 8.0。

#### (五) 酶纯度的检验

经初步纯化的酶制品用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳在酸性和中性二种 pH 系统中检验其纯度。

#### (六) 蛋白质含量的测定

提纯过程中蛋白质含量用 Folin-酚法测定。

## 结果与讨论

### (一) 产溶解酶菌株的选育

经双层平板法和液管比浊法选出的菌株 AS 1.864, 其培养滤液溶金黄色葡萄球菌的活性是 6.0—9.6 单位/毫升。以此为原始株进行紫外诱变, 按图 2 的流程得到三株酶活超过原始株的菌, 但经过传代, 只有 U<sub>23</sub> 的溶菌性能稳定(见表 1)。

### (二) 产酶条件

#### 1. 菌体生长与产酶量的关系

用在 37°C 牛肉汁摇瓶培养 17 小时, O. D.<sub>660 毫微米</sub> 为 1.35 的菌液作种子液, 按 1% 的比例接到产酶培养基里, 起始 O. D. 为 0.02, 于 37°C 摇床培养, 每隔 1 小时取样测定菌液浓度和酶活, 然后以培养时间为横坐标, 以生长量和酶活为纵坐标作出生长曲线和酶活曲线图(图 3), (其中生长量用对数座标)。U<sub>23</sub> 在此条件下迟缓期达 6 小时。进入对数期以后 5 小时, 培养液中

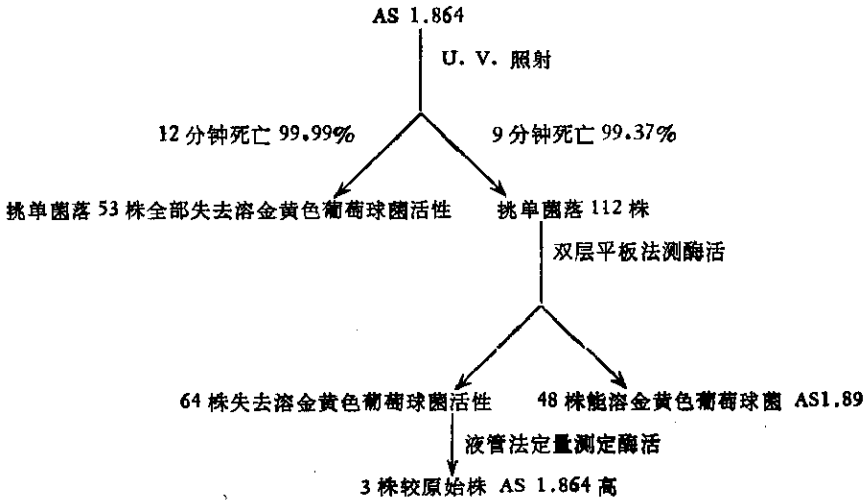


图2 AS1.864 紫外线诱变流程图

表 1 紫外线诱变菌株的传代稳定性

菌株	第二代		第三代		第四代		第五代	
	单位/毫升	提高百分数(%)	单位/毫升	提高百分数(%)	单位/毫升	提高百分数(%)	单位/毫升	提高百分数(%)
U <sub>03</sub>	3.34	0	12.8	33	7.5	0		
U <sub>13</sub>	12.08	25	12.8	33	11.6	21	13.5	40
U <sub>16</sub>	9.2	0	13.3	38	5.83	0		

注：原始株 AS 1.864 的产酶量按 9.6 单位/毫升计算。

开始有溶解酶活性检出，酶活高峰是在稳定期，随后就急剧下降。这可能是因为代谢产物及自溶产物中存在使溶解酶失活的因子。因此，收获时间要严格控制。关于酶活急剧下降的现象，据 Arvidson<sup>[6]</sup> 报道，在金黄色葡萄球菌 *S. aureus* M-18 产溶解酶的过程中，是由于生产菌自溶产生了溶解酶的抑制剂。而 Yokogawa<sup>[7]</sup> 发现，在灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* H4 的产溶解酶生产中，由于通气量大，同时产生了大量的蛋白酶将溶解酶破坏。

2. 培养基中葡萄糖含量对产酶的影响  
不同菌株，因菌本身生理特性的差异及所产溶解酶特性的不同，对培养基的要求也不一样。一般说来，在产生溶解酶方面，菌体对氮源的要求比较一致，蛋白胨一

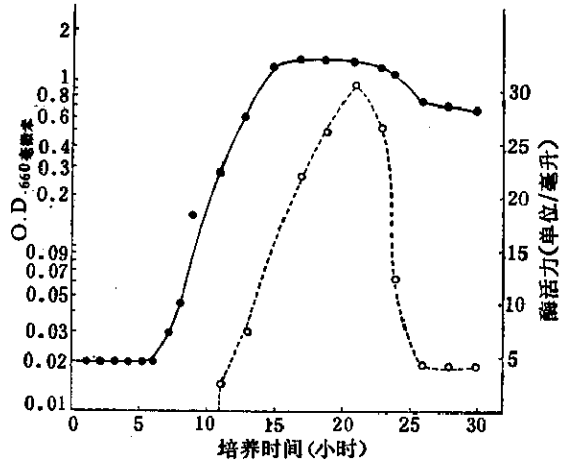


图3 U<sub>13</sub> 生长曲线和产酶曲线

●—● 生长曲线  
○—○ 产酶曲线

类的有机氮必不可少，而无机氮对酶的产生不利。但是，不同产酶菌株对碳源，特别

是对葡萄糖的反应差别很大。据报道,葡萄糖有抑制溶解酶产生<sup>[8,9]</sup>以及使酶活达到高峰后迅速下降的作用<sup>[6]</sup>。我们着重比较了葡萄糖的含量。于 500 毫升三角瓶中,分别装含不等量葡萄糖的前述之培养基 100 毫升,按 1% 的菌液量接种,37℃ 摇床培养 18 小时,然后测定菌浓度和培养滤液的酶产量,结果如表 2。

从表 2 看出,葡萄糖含量为 0.2% 是合适的,再浓就有明显的抑制作用。出乎预料的是完全不含葡萄糖,菌的生长量和酶产量也都不低,这说明此时该菌充分利用了蛋白胨里的碳源。

表 2 培养基中葡萄糖含量对产酶的影响

葡萄糖含量 (%)	菌浓度 (O.D. <sub>660</sub> 毫微米)	滤液含酶量 (单位/毫升)
0	1.12	16.7
0.2	1.2	17.1
0.5	1.28	13.3
1.0	1.22	11.2

### 3. 通气量试验

分别在 500 毫升三角瓶中装不等量的产酶培养基。接种量和培养条件均同上。结果列于表 3。说明通气量不可过大。

表 3 通气量对酶产量的影响

培养基 (毫升)	产酶量 (单位/毫升)	菌体浓度 (O.D. <sub>660</sub> 毫微米)
25	5.0	1.1
50	19.2	1.3
100	10.8	1.18
150	10.8	1.12

### (三) 溶菌条件

#### 1. 缓冲液 pH 的影响

图 4 比较了不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液和磷酸盐缓冲液对酶制品溶菌活性的影响。二种缓冲液的最适作用 pH 均在 7.5 左右,但曲线的陡度明显不同。

#### 2. 缓冲液浓度的影响

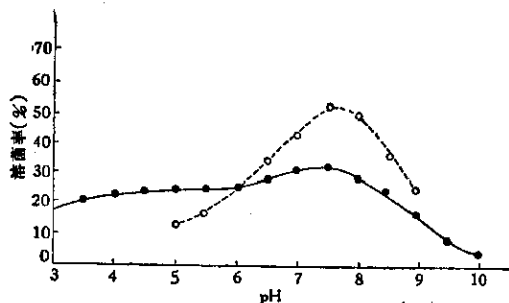


图 4 不同 pH 值的缓冲液对溶菌反应的影响

●——● 0.02M Tris-HCl 缓冲液  
○——○ 0.05M 磷酸盐缓冲液

图 5 比较了不同浓度的 pH7.5 的缓冲液对酶制品溶菌活性的影响。从图中可看出,磷酸盐缓冲液的最适作用浓度是 0.1 M,而 Tris-HCl 缓冲液的浓度稍大活性就明显下降,宜用低于 0.05M 的浓度。根据已发表的工作,大部分溶解酶都是在低浓度的缓冲液中溶菌效果好。如 *Streptomyces albus* G 的 F 酶、32 酶; *B. subtilis* YT-25 的 B 酶等都要求在 0.01M 以下,太浓有明显的抑制作用,而另外有些酶,像 lysozyme; *S. griseus* 的 F<sub>2</sub> 酶等则对此不敏感。当然,这与缓冲液的类型有关,图 5 的结果也表明了这一点。

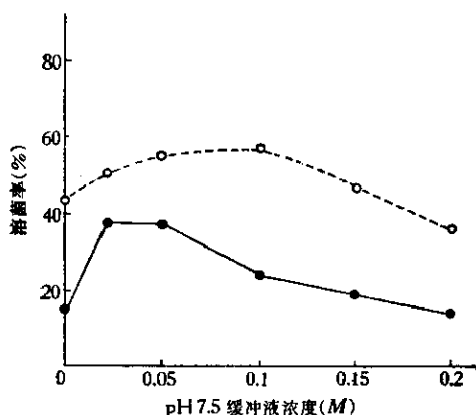


图 5 缓冲液浓度对酶制品溶菌活性的影响

●——● Tris-HCl 缓冲液  
○——○ 磷酸盐缓冲液

#### 3. 反应温度的影响

将经过适当稀释的酶液和滤液分别与

底物菌液混合,分别于30℃、37℃、45℃、50℃、55℃、60℃保温二小时,然后测定溶菌率。结果见图6。45℃为最适反应温度,50℃次之。

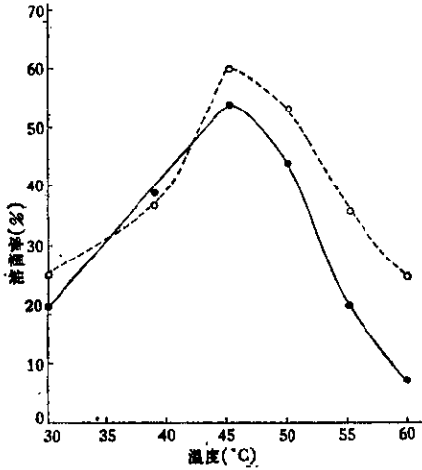


图6 温度对溶菌活性的影响

●——● 培养滤液  
○——○ U<sub>23</sub> 酶

**(四) 酶制品和滤液的热稳定性**

分别将酶制品和滤液置50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃处理30分钟,再测定对底物菌的溶菌活性。以未经热处理的溶菌活性为100%,计算其残余活性,结果见图7。此酶在70℃以下很稳定,超过70℃,则随温度的上升酶活下降,而且滤液的酶活下降速度较快。

**(五) 酶的初步提纯**

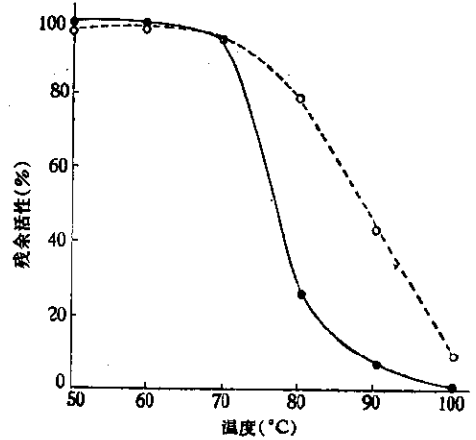


图7 酶制品和滤液的热稳定性

●——● 培养滤液  
○——○ U<sub>23</sub> 酶

表4列出提纯流程中样品的体积、酶活、比活、蛋白质含量等。

DEAE-纤维素柱层析这一步得率超过100%,多次试验结果都是如此,并非试验误差所致,推测此柱可能也吸附了对溶解酶活有抑制作用的因子。经过上述流程约提纯47倍。

**(六) 酶纯度的检验**

初步纯化的酶制品用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳在pH4.3和pH7.0系统<sup>[10]</sup>分别检验其纯度。在中性系统得到一条带,可见光扫描呈现一个峰。在酸性系统除有一条主带外,还隐约可见有二条很弱的带,经可见光扫描有一主峰和二个小坡,有待进一步

表4\* U<sub>23</sub> 酶提纯前后对照表

测定项目 \ 处理	硫酸铵盐析及透析脱盐		DEAE-纤维素柱层析	
	前	后	前	后
总体积(毫升)	1200	164	161	330
蛋白量(微克/毫升)	2425	1600	1600	162.5
酶活(单位/毫升)	179.93	1047.8	1047.8	562.5
比活(单位/毫克)	74.2	654.9	654.9	3461.5
提纯倍数		8.8		46.7
本工序酶活得率(%)		79.59		110
累计酶活得率(%)		79.59		87.57

\* 用 *B. subtilis* AS 1.831 菌体作为底物测定。

表 5 溶菌谱(平皿法测定)\*

底 物 菌	酶液或滤液	U <sub>23</sub> 溶解酶	U <sub>23</sub> 滤液	AS 1.864 滤液
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) AS 1.89		++	+++	+
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) AS 1.72		++	++	+
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) AS 1.363		++	++	+
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) AS 1.801		+	++	++
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) AS 1.879		++	++	+
白色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus albus</i> ) AS 1.184		+++	++	+
白色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus albus</i> ) AS 1.490		++	+++	+++
巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> ) AS 1.127		+++	++++	+++
巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> ) AS 1.234		++++	++++	++
巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> ) AS 1.151		+++	+++	+
地衣形芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) AS 1.269		++	+++	++
地衣形芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) AS 1.518		+++	+++	++
地衣形芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) AS 1.198		+++	++++	++
地衣形芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) AS 1.807		+++	+++	+
地衣形芽孢杆菌 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) AS 1.813		+++	+++	+
蜡状芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> ) AS 1.126		++++	++++	+++
蜡状芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> ) AS 1.196		+++	+++	++
溶表微球菌 ( <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ) AS 1.634		+	+++	+
铜绿色假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) AS 1.512		-	-	-
铜绿色假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) AS 1.650		+	-	-
铜绿色假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) AS 1.651		*	*	*
铜绿色假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) AS 1.922		+	*	*
铜绿色假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) AS 1.238		+	*	*
粘质赛氏杆菌 ( <i>Serratia marcescens</i> ) AS 1.203		+	+	+
粪链球菌 ( <i>Streptococcus faecalis</i> ) AS 1.767		-	-	-
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) AS 1.357		-	+	*
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) AS 1.506		-	+	-

\* 滤纸片直径 5 毫米 溶菌圈直径大小表示法:  
 + 7 毫米以下 ++ 8—9 毫米 +++ 10—11 毫米 ++++ 12—13 毫米 +++++ 14 毫米以上 \* 微溶

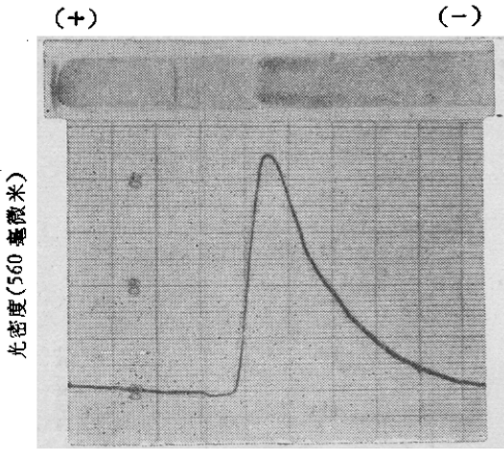


图8  $U_{23}$  酶在中性系统(pH7.0)中的圆盘电泳及其扫描图

电泳样品量: 100 微克  
 电泳温度: 4°C  
 电流: 3 毫安/管  
 凝胶浓度: 7.5%  
 电泳时间: 3 小时  
 染色: 1% 考马斯亮蓝染色 1 小时

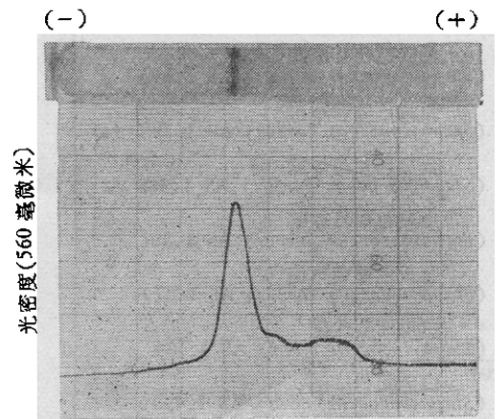


图9  $U_{23}$  酶在酸性系统(pH 4.3)的圆盘电泳及其扫描图  
 电泳条件同图8

有其独特之处。关于此酶的其他性质有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 村尾沢夫: “特许公报”, 2:121-125, 1974.
- [2] Hash J., H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 102: 379, 1963.
- [3] Richmond M. H.: *Biochem. Biophys. Acta.* 33: 78, 1959.
- [4] Forsberg C. W. and J. B. Ward: *J. Bact.*, 110: 878, 1972.
- [5] 船津胜、鹤大典: 《溶菌酵素》, 讲谈社, 1977, p. 70.
- [6] Arvidson S. et al.: *J. Bact.*, 104: 227, 1970.
- [7] Yokogawa K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 2055, 1972.
- [8] Murao S. and Y. Takahara: *Agr. Biol. Chem.*, 37: 2671, 1973.
- [9] Murao S. and Y. Takahara: *Agr. Biol. Chem.*, 38: 2305, 1974.
- [10] 莽克强等: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, 1975, p. 32.

纯化(见图8、9)。

### (七) 溶菌谱

从本所保藏的菌种中选用包括7个属的27株菌的活菌体作底物,测定培养滤液和酶制品的溶菌谱,结果见表5。

$U_{23}$  酶对革兰氏阳性菌具有较广的溶菌谱,包括一般较难溶的蜡状芽孢杆菌等。对阴性菌只溶解个别几个菌株,且溶菌活性低。

从侧孢芽孢杆菌产生溶解酶的工作尚未见过报道。同时,从此酶的溶菌谱、作用最适条件、较强的热稳定性等方面来看都

## STUDIES ON A BACTERIAL LYTIC ENZYME PRODUCED BY A STRAIN OF *BACILLUS LATEROSPORUS*

Jiang Hui-xiu Li Yue Xu Hao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A bacterial lytic enzyme producing strain of *B. laterosporus* was screened out from the collection of this Institute and further improved by U. V. treatment. A glucose concentration of 0.2% is most suitable for enzyme production and above this value has a repression effect. The production of the enzyme reaches its maximum at stationary growth phase.

The enzyme was purified by DEAE-

cellulose chromatography and showed one major band in polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme lyses the Gram positive bacteria tested and shows a detectable lytic activity toward several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The optimum pH is 7.5 and the optimum temperature is 45°C for lysis. The lytic activity decreases when the Tris-HCl buffer concentration exceeds 0.05M.