

海洋侧孢短芽孢杆菌 S-12-86 溶菌酶的分离纯化与冻干技术研究

纪存朋^{1,2}孙谧² 于建生¹郑媛²

- (1. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)
(2. 中国水产科学院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要 海洋微生物溶菌酶发酵液经低温离心、超滤浓缩、乙醇提取、Superdex 75 10/300 凝胶层析、反相高效液相色谱层析纯化得电泳纯海洋溶菌酶, 分子量为 17.1 kD, 比活达到 3987.7 U/mg, 纯度提高 41.98 倍, 活力回收率为 21.7%。对该酶冷冻干燥过程的研究, 结果表明海藻糖、蔗糖、麦芽糖对该酶均有一定的冻干保护作用, 其中以海藻糖的保护效果最佳。0.5 mol/L 海藻糖与 20 mg/ml 吐温 80 复合作为冻干保护剂, 使冻干后的溶菌酶活性维持在 95%以上, 为该酶进一步研究和应用提供了稳定的酶制剂。

关键词: 海洋微生物, 溶菌酶, 分离纯化, 冷冻干燥

中图分类号: Q55, Q814 **文献标识码**: A **文章编号**:

Purification and lyophilization of Lysozyme produced by marine microorganism

Ji Cun-peng^{1,2} SUN Mi^{2*} YU Jian-sheng¹ ZHENG Yuan²

(¹ College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, 266042)

(² Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Cell-free supernatant with marine microorganism lysozyme was prepared by centrifugation of culture broth, ultrafiltration and concentration. The crude lysozyme was purified 41.98 fold to electrophoretic homogeneity with a recovery of 21.7% and a specific activity of 3,987.7 U/mg by extracting with ethanol, Superdex 75 10/300 chromatography and reversed phase HPLC. The relative molecular weight of this lysozyme was 17.1 kD determined by SDS-PAGE electrophoresis. Preparations of lysozyme from native marine microorganism were formulated with different additives for lyophilization. The studied additives, including trehalose, sucrose and maltose, showed good protecting effect with trehalose showing the best performance for freeze-drying stabilization. Comparing with the native lysozyme in the

国家 863 计划项目 (2006AA10Z349, 2007AA091602) 支持

通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: ; 接受日期:

作者简介: 纪存朋 (1983 -), 男, 硕士, 研究方向: 生物化工。E-mail: jicunpeng@163.com Tel: 13791949615

absence of protective agents, the activity of the freeze-dried lysozyme treated by trehalose (0.5 mol/L) and Tween 80 (20 mg/L) as protective agents retained more than 95% of the original activity.

KEY WORDS Marine microorganism Lysozyme Purification Lyophilization

随着生物技术的发展,寻找具有全新性质的酶已成为酶制剂研究的热点^[1]。目前,商品溶菌酶多由鸡蛋清中提取,仅对革兰氏阳性菌有作用,限制了其应用范围,近年来国内外已对多种来源的溶菌酶进行了广泛的研究^[2-4],海洋生物由于生长环境的独特性,使海洋微生物溶菌酶具有更为独特的酶学性质,因此有着更为广阔的应用前景和开发潜力。

本实验室从东海海域海底淤泥中筛选得到一株产溶菌酶菌株侧孢短芽孢杆菌 S-12-86,并对其进行了诱变选育和产酶条件的研究^[5],本文的主要工作是分离纯化得到电泳纯的海洋溶菌酶;研究保护剂对海洋溶菌酶的冻干保护作用,并建立一个完善的冷冻干燥工艺。为海洋微生物溶菌酶的工业化研究奠定了基础。

1. 材料与方法

1.1 菌种

产海洋微生物溶菌酶菌株 S-12-86 为从东海海域底泥中分离得到的侧孢短芽孢杆菌,由本实验室分离保存。标准溶壁微球菌购自 Sigma 公司。

1.2 试剂及主要仪器

试剂: Superdex 75 10/300 层析介质、牛血清白蛋白、低分子量蛋白 Marker、乙腈、海藻糖、蔗糖、麦芽糖、Tween80 等

仪器: HITACHI 20PR-52D 高速冷冻离心机、SCM 杯式超滤系统、LKB2021 恒温层析冷柜、LGJ 0.5 冷冻干燥机、Bio-Rad Mini 蛋白电泳仪、752 紫外可见分光光度计、FPLC(Amersham); Waters 2690 高效液相色谱系统等。

1.3 方法

1.3.1 菌种和培养

将活化的菌株接种于产酶培养基(蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%)中,置于 28℃ 恒温摇床(200r/min)上培养 24hr, 发酵液离心(4000 r/min, 40min), 除去菌体得含海洋溶菌酶的上清液。

1.3.2 乙醇提取

海洋溶菌酶发酵液离心后,用 SCM 杯式超滤系统过滤浓缩。向浓缩液中逐步加入-20℃ 预冷的乙醇。4℃ 下混匀,静置后低温离心得海洋溶菌酶上清液。蒸干乙醇,二次水复溶。

1.3.3 Superdex 75 10/300 凝胶层析

取过滤后复溶液 0.3 mL 上样于充分平衡的 Superdex 75 10/300 凝胶层析柱(1.0

cm×30 cm), 二次水洗脱, 流速 0.4 ml/min, 280 nm 下检测, 收集活性峰。

1.3.4 反相高效液相色谱层析

采用 C-18 反相色谱柱(4.6 mm×150 mm) 流动相乙腈 : 水为 60 : 40 流速 0.6 mL/min ; 荧光检测器激发波长 280 nm , 收集活性峰浓缩后测活。

1.3.5 海洋溶菌酶纯度检测和分子量测定

采用 SDS-PAGE 方法测定, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12.5%, 用 0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.3.6 3 种二糖冻干保护效果的比较

将 3 种二糖 (麦芽糖、蔗糖、海藻糖) 以不同浓度分别加入纯化得到的溶菌酶溶液 (50 mg/ml) 中, 混匀, -80 °C 预冻 3h 后转移至冷冻干燥机中冻干, 复溶后测定残余酶活性。

1.3.7 复合保护剂的冻干保护效果

以筛选得到保护效果最佳的二糖为基质, 混以不同浓度的吐温 80 作为冻干保护剂, 与 50 mg/ml 溶菌酶溶液 1 : 1 混匀后冻干, 复溶后测定残余酶活性。

1.3.8 冷冻干燥过程

样品在冻干室经过两步干燥过程。初级干燥中, 冻干室以 5 °C/min 的降温速率降至 -45 °C, 维持室内真空度为 13.0 pa, 使样品中水分直接升华, 30 h 待水分基本完全升华后转入次级冻干; 次级冻干过程中, 温度在 6 h 内以 0.2 °C/min 的加热速度由 -45 °C 逐步升至 20 °C, 压力保持不变, 直至二次干燥过程结束。

1.3.9 溶菌酶活性的测定

用 60 mmol/L、pH 6.2 的磷酸缓冲液配制一定浊度($A_{450} = 0.6-0.7$)的溶壁微球菌悬浮液作为底物, 取 0.5 ml 酶液加入 2.5 ml 底物中, 迅速混合, 在波长 450 nm 处读取反应体系 5 min 内每隔 30 s 的吸光度。以 A_{450}/min 变化 0.001 个吸光度值为一个活性单位。溶菌酶活性的计算如下式:

$$\text{每mg酶的活力单位} = \frac{[OD_{450}(0\text{s时}) - OD'_{450}(60\text{s时})] \times 1000}{\text{样品毫克数}}$$

1.3.10 蛋白质浓度的测定

Brandford 考马斯亮蓝染色法^[6], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2. 结果与分析

2.1 乙醇提取

由下图 2-1 可知, 溶菌酶的提取率在粗酶液 : 乙醇为 1 : 5 时其提取率达到最大值 75%。之后, 随乙醇浓度的增加溶菌酶的提取率趋于平衡 (乙醇浓度 550% 以后数据未给出)。故确定乙醇提取条件为: 溶菌酶浓缩液 : 乙醇为 1 : 5 (V/V)。

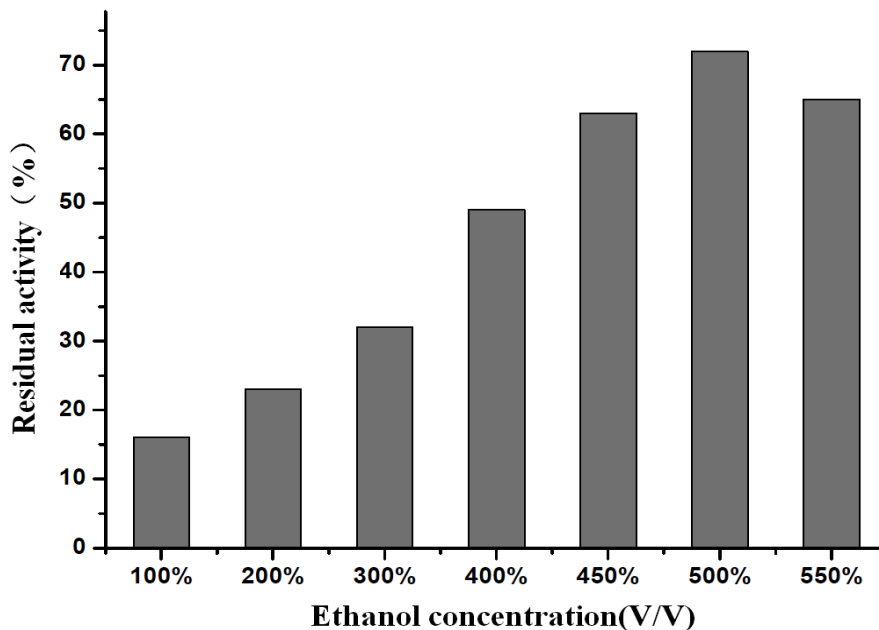


图 2-1 乙醇浓度对溶菌酶提取的影响

Fig 2-1 Effects of ethanol concentration on extraction of lysozyme

2.2 Superdex 75 10/300 凝胶层析

Superdex 75 10/300 凝胶层析后，收集各峰，浓缩并测定比活。结果如下图 2-2 所示：活性峰 1 位于 17.6 ml-19 ml 之间，为一单峰。本步纯化回收得到的溶菌酶比活达到 3280.3 U/mg，回收率高达 33.4%，纯化倍数为 34.52 倍。

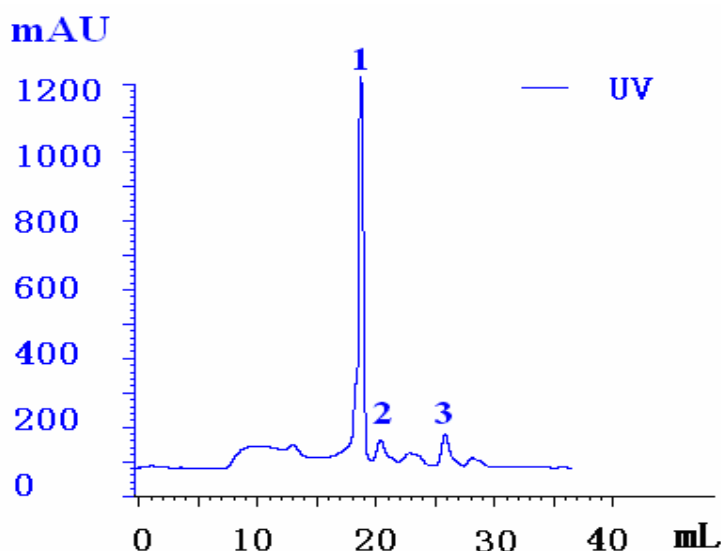


图 2-2 海洋微生物溶菌酶 Superdex 75 凝胶层析图谱

Fig 2-2 Superdex 75 gel column chromatography of marine microorganism lysozyme

2.3 C-18 反相高效液相色谱层析

如高效液相色谱层析谱图 2-3 所示，活性峰 2 的保留时间为 27.42 min。且经多次试验证明，活性峰的保留时间、峰面积重现性良好。

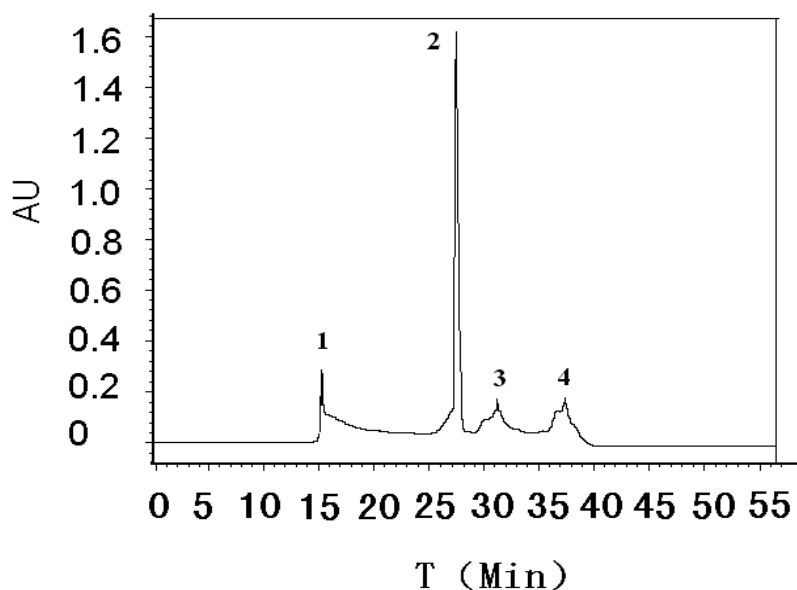


图 2-3 海洋微生物溶菌酶 C-18 反相高效液相层析谱图

Fig 2-3 C-18 reversed phase HPLC of marine microorganism lysozyme

整个分离过程的纯化结果见表 2-1。结果可知：纯化过程中乙醇提取纯化效果最为明显，去除了大部分杂蛋白，海洋溶菌酶发酵液经纯化最后比活达到 3987.7 U/mg，纯度提高了 41.98 倍，活力回收为 21.7%。

表 2-1 海洋溶菌酶的纯化结果

Table 2-1 Purification results of marine lysozyme

纯化步骤 Purification step	总酶活(U) Total activity	总蛋白(mg) Total enzyme	比活(U/mg) Specific activity	收率(%) Recovery	纯化倍数 Purification fold
发酵液 Culture broth	3.0×10^5	3160	95	100.0	1.0
超滤浓缩液 Ultrafiltration	2.42×10^5	900.1	268.7	80.7	2.83
乙醇提取液 Ethanol extration	1.86×10^5	123.0	1512.2	62.0	15.92
Superdex peptide Superdex 肽	1.03×10^5	31.4	3280.3	33.4	34.52
高效液相色谱 HPLC	0.65×10^5	16.3	3987.7	21.7	41.98

2.4 海洋溶菌酶纯度及分子量测定

将纯化得到的海洋溶菌酶以 SDS - PAGE 进行分析，结果见图 2-4，纯化的海洋溶菌酶为单一条带，相对纯度较高；同时，由标准蛋白可知其分子量为 17.1 kD。

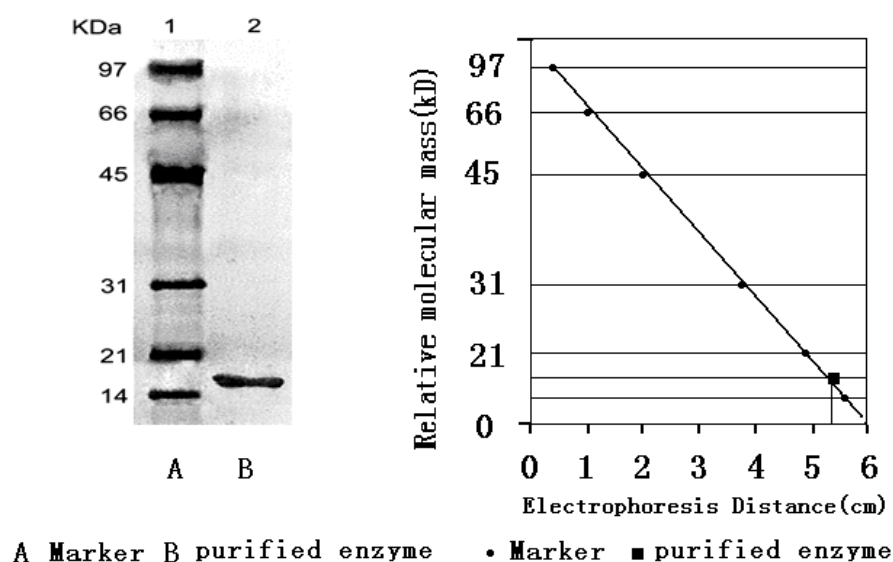


图 2-4 纯化海洋溶菌酶电泳分析

Fig 2-4 SDS-PAGE assay of purified marine lysozyme

2.5 3 种二糖冷冻保护效果的比较

溶菌酶的冻干复水过程证明了冷冻保护剂对于维持溶菌酶的活性起到显著的作用^[7]。三种糖对溶菌酶的冷冻保护效果比较如下图 2-5 所示，其中[]为不添加保护剂的溶菌酶对照组，mean±SD, 每组试验次数n = 4

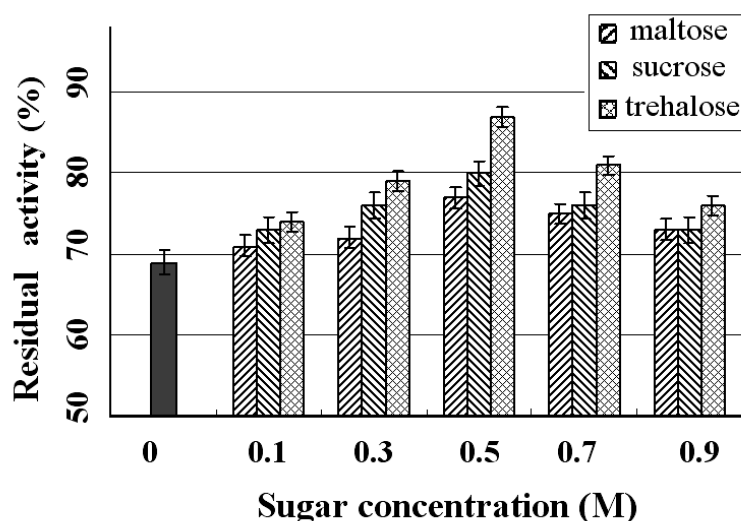


图 2-5 不同浓度的二糖对溶菌酶冻干、复水过程的保护效果

Fig.2-5. Protective effects of three sugars at different concentrations on lysozyme (50 mg/ml) during

可见，三种糖对溶菌酶都有良好的冷冻保护效果，其中以海藻糖的效果最为显著，当海藻糖浓度为 0.5 mol/L 时，冷冻干燥后的溶菌酶残余活性最高，维持在 88% 以上。

2.6 最佳冷冻保护剂配方的确定

以 0.5 mol/L 海藻糖作为基质液，配以不同浓度吐温 80 作为冷冻保护剂，冻干后测得冻干样的残余活性，如下图 2-6 所示

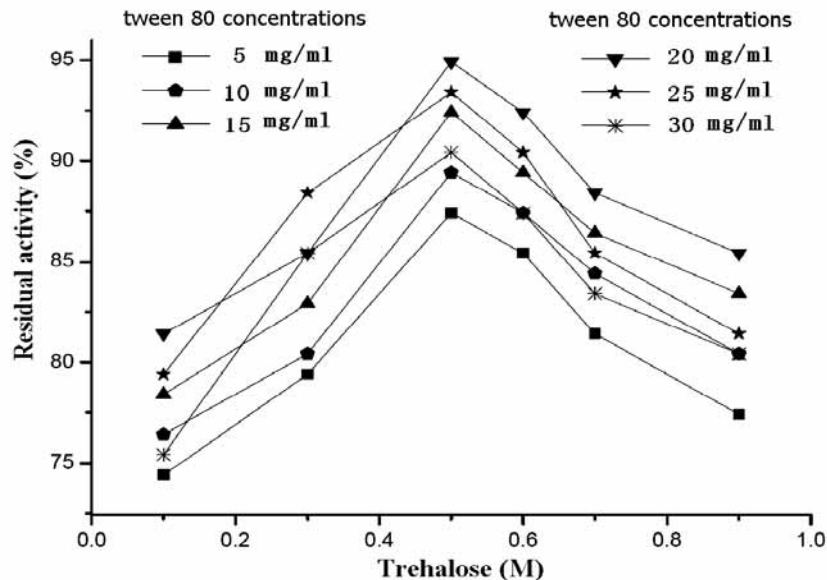


图 2-6 不同浓度的吐温 80 与海藻糖对溶菌酶冷冻干燥的保护效果

Fig.2-6. Effects of Tween 80 with different trehalose concentrations on lyophilization of lysozyme.

当海藻糖浓度为 0.5 mol/L，吐温 80 浓度达到 20 mg/ml 时，冷冻保护效果最佳，活性维持达到 95%，比单独使用海藻糖（图 2-5）提高了 7%。由此确定海洋微生物溶菌酶最佳冻干保护剂为 20 mg/ml 吐温 80 + 0.5 mol/L 海藻糖。

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，海洋微生物所产生的酶较陆生动、植物和微生物产生的酶具有一些更为独特的生理、药理及生化活性，如：海洋溶菌酶热稳定性较好，且具有低温酶的特点；海洋溶菌酶抑菌谱广，对多种革兰氏阴性、阳性菌和真菌都有明显的抑制作用，对多种鸡蛋清溶菌酶不能直接作用的微生物如大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌等都有溶菌作用；另外，海洋溶菌酶对多种临床致病菌有明显的抑制作用^[8]。因此一个稳定的酶制剂对于医药、食品和酶工业的发展具有极大的推动作用。文中成功纯化出一种新型的海洋微生物溶菌酶，SDS-PAGE电泳验证为单一条带，比活达到 3987.7U/mg，纯度提高了 41.98 倍，活力回收率为 21.7%，纯化效果非常明显。对此新型溶菌酶的理化性质、催化机理及高级结构的解析研究意义重大。

在生物药品领域，冷冻干燥技术是一项极为重要的制剂工艺^[9]，对欲冻干产品最后

的生理活性和结构形态起着至关重要的作用^[10]。非特异性的二糖和表面活性剂是常用的冷冻保护剂^[11]。海藻糖近年来广受关注，对生物大分子活性物质具有良好的保护作用，主要通过“水替代”和“玻璃化”机理在冷冻干燥时发挥保护作用^[12-13]。吐温 80 是一个典型的非离子型表面活性剂，其特有疏水片段使其与蛋白表面的疏水区域特异结合，从而避免冻干过程引起的蛋白聚合。本文验证了以上保护剂对海洋溶菌酶的冻干保护作用，并成功筛选出 0.5mol/L 海藻糖与 20mg/ml 吐温 80 作为冻干保护剂，使冻干后海洋微生物溶菌酶的活性维持在 95% 左右，为今后的工业化生产和应用研究奠定了基础。

参考文献

- [1] M Chandrasekaran, 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. *Journal of Marine Biotechnology*. 23(5): 86-89
- [2] 赵昕, 任光文, 屠晓平等. 2003. 灰色链霉菌RX-17溶菌酶R1的纯化及性质研究. *微生物学报*. 43(6): 758-763
- [3] Kyung Hyun Yu, Kyu Nam Kim, Joon Ha Lee, et al. 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteron larvae *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 707-713
- [4] Bachali S, Bailly X, et al. 2004. The lysozyme of the starfish *Asteria rubens*. A paradigmatic type I lysozyme. *European Journal of Biochemistry* 271: 237-24
- [5] 冯学珍, 郑媛, 孙谧等. 2008. 海洋溶菌酶高产菌株发酵条件探讨及培养基优化. *食品工业科技*. 29(11): 57-60
- [6] 杨安钢, 毛积芳, 药立波主编. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 高等教育出版社, 2001
- [7] Giulio B De, Orlando P, Barba G. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J. Microbiol. Biotechnology* 21: 739-746
- [8] 王跃军, 孙谧, 张云波等. 2000. 海洋低温溶菌酶的制备及酶学性质研究[J]. *海洋水产研究*, 21(4), 54-63
- [9] May J C, Rey L. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products[M]. New York: Marcel Dekker, 1999
- [10] Schoug Å, Olsson J, et al. 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology* 53: 119-127
- [11] Satpathy G R, Dwyre D M, Little E, et al. 2004. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. *Cryobiology*, 49: 123-136

[12]Wei Wang. 2000. Lyophilization and development of solid Protein pharmaceuticals [J]. International Journal of Pharmaceutics 203 : 1-60

[13]Soufflac P O , Middaugh C R , Rytting J H.2002.Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state.2.Diffuse reflectance FTIR studies[J] International Journal of Pharmaceutics 235 (1-2):207-218