

# 枯草芽孢杆菌突变株 $U_{244}$ 产生的溶菌酶

许艳萍 苏巧梅 贺玉成 吴芷萍

(山西省生物研究所,太原)

溶菌酶不仅是重要的破壁酶<sup>[1,2]</sup>,而且还可用于治疗某些疾病<sup>[3,4]</sup>。近年来亦有关于溶菌酶作为食品防腐剂的研究报道<sup>[5]</sup>。本文报道溶菌酶产生菌  $U_{244}$  的选育,摇瓶发酵和酶的性质。

## 材料与 方法

### (一) 培养基

1. 分离培养基(%)：糊精 1.0, 聚脲 2.0,  $KH_2PO_4$  0.1,  $NaNO_3$  0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05, 自然 pH。

2. 产酶培养基(%)：依据文献<sup>[6]</sup>略加修改为：糊精 3.0、聚脲 4.5、 $KH_2PO_4$  0.1,  $NaNO_3$  0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05, 自然 pH。

3. 底物菌培养基：根霉用土豆培养基；细菌用一般细菌培养基。

### (二) 产酶菌株的选育

1. 平皿筛选：以常规方法从土壤中分离出芽孢杆菌,再用双层琼脂平板法<sup>[7]</sup>,选出培养滤液在平板上有溶菌圈的菌株,复筛后选出  $B_{96}$  为原始菌株。

2. 紫外线诱变：用常规方法以紫外线照射  $B_{96}$  菌悬液数分钟,黑暗放置 24 小时,进行单菌分离并逐株测其活性。

### (三) 酶活性的测定方法

1. 根霉为底物的酶活性测定方法：用滤纸片浸沾培养滤液及酶液,然后贴在双层琼脂平板上,置 35℃ 保温 2—6 小时,以溶菌圈直径表示酶活。

2. 酶活性的定量测定方法：参照文献<sup>[6]</sup>吸取培养滤液 1ml,与  $A_{660nm}$  为 0.5 左右的 4ml 底物菌悬液混合,于 35℃ 水浴保温一定时间,测定反应前后的 A 值,以每分钟 A 值降低 0.001 为一个酶活力单位。

### (四) 粗酶的提取

取 31℃ 振荡培养 30—40 小时的发酵液,以 5000 rpm 离心 40 分钟,取其上清液,在冰浴及缓慢搅拌下,加固体硫酸铵至 0.6 的饱和度,冰箱放置过夜,收集沉淀即为粗酶。

## 结 果

### (一) $U_{244}$ 菌的选育

由土壤样品分离到 197 株芽孢杆菌,从中筛选到  $B_{96}$  菌株[该菌对根霉属的某些种：荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescence*)、麝香石竹极毛杆菌 (*Ps. caryophylli*) 的个别菌株有溶菌活性],以此为出发株,进行紫外诱变,选育到突变株  $U_{244}$ 。以麝香石竹假单胞菌 (*Pseudomonas coryophylli*) 的冷冻干粉为底物,做产酶条件及测定酶的性质等试验。

### (二) 产酶条件

1. 培养温度对产酶的影响：将  $U_{244}$  菌斜面,用无菌水洗下菌苔,按 1% 接入产酶培养基中,于不同温度下振荡培养,40 小时取样测酶活,结果见表 1。培养温度在 25℃—37℃ 的范围内,对产酶无大的影响。

表 1 培养温度对产酶的影响

培养温度(℃)	25	28	31	34	37
酶活(单位/ml)	85.5	89.5	94.5	92.5	89.5
产酶量(%)	90.5	94.7	100	97.7	94.7
发酵液 pH	7.2	7.5	7.7	7.7	8.0

2. 不同配比培养基对产酶的影响：以原产酶培养基为对照,采用三种碳氮比和两种磷酸盐浓度,进行摇瓶试验,结果表明(表 2),碳氮比为 1:5 磷酸盐浓度为 0.2% 的配方比对照配

菌株由中国科学院微生物研究所鉴定,照片由本所 杜大志、王保康同志摄制,一并致谢。

表 2 不同配比培养基对产酶的影响

配 方	碳氮比 (C/N)	培 养 基 成 分 (%)					酶活力 (单位/ml)	产酶量 (%)
		糊精	聚脲	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaNO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		
CK	1:1.5	3.0	4.5	0.1	0.1	0.05	80.0	100
1	1:1	1.0	1.0	0.2	0.1	0.05	63.0	79.3
2	1:3	0.5	1.5	0.2	0.1	0.05	71.5	89.3
3	1:3	0.5	1.5	0.4	0.1	0.05	67.0	77.5
4	1:5	0.5	2.5	0.2	0.1	0.05	81.0	101.2
5	1:5	0.5	2.5	0.4	0.1	0.05	68.0	85.0

表 3 培养滤液和粗酶的溶菌谱

试 物 菌	培养滤液的 溶菌率(%)	底 物 菌	粗酶的溶菌 圈直径 (mm)		
荧光极毛杆菌		黑根霉 ( <i>Rhizopus nigricans</i> )	3.35	15	
( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	1.644	60	黑根霉 ( <i>Rhizopus nigricans</i> )	3.900	15
( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	1.646	90	中华根霉 ( <i>R. chinensis</i> )	3.947	12
( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	1.651	28	中华根霉 ( <i>R. chinensis</i> )	3.817	15
( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	1.648	15	台湾根霉 ( <i>R. formosensis</i> )	3.235	17
( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	1.55	14	米根霉 ( <i>R. oryzae</i> )	3.866	17
麝香石竹极毛杆菌			日本根霉 ( <i>R. japonicus</i> )	3.868	15
( <i>Ps. caryophylli</i> )	186	25			
恶臭假单胞菌					
( <i>Ps. putida</i> )		21			

方节料,其产酶量为其它配方中最高者。

### (三) 酶的性质

1. 反应温度的影响: 将培养滤液与底物菌悬液混合,在不同温度下,反应 1 小时测其溶菌率。结果表明,反应温度在 35—45℃ 为好,55℃ 以上酶迅速失活。

2. 酶的热稳定性: 将培养滤液及酶液分别

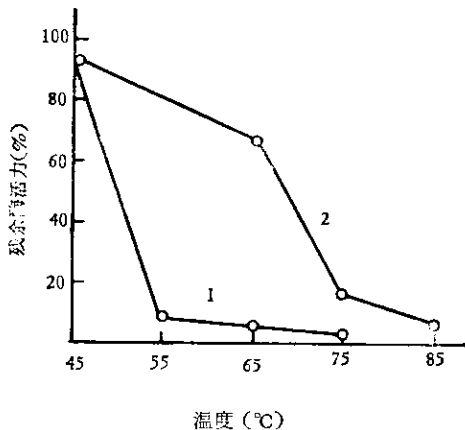


图 1 培养滤液及酶液的热稳定性  
1. 培养滤液 2. 酶液

置 45℃、55℃、65℃、75℃ 和 85℃ 下,保温 30 分钟,以未保温处理的为 100%,测其残余活性,当温度高于 45℃ 时,培养滤液的酶活急剧下降,温度在 75℃ 时则完全失活。而酶液在相同条件下,失活较慢(图 1)。

3. pH 值的影响: 用 0.025M 的 Tris-HCl 缓冲液,配成不同 pH 值的反应体系,于 35℃ 下反应 10 分钟测其溶菌率,结果表明,溶菌较好的 pH 范围在 8—10 (图 2)。

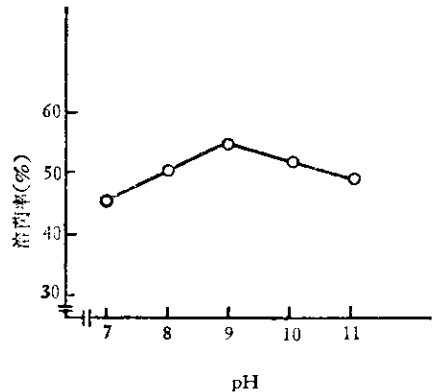


图 2 不同 pH 值缓冲液对溶菌活性的影响

#### (四) 粗酶的溶菌谱 (见表 3)

表 3 表明, 粗酶对供试的 7 株 5 个种的根霉均有不同程度的溶菌活性, 培养滤液对供试的假单孢菌多属微溶, 仅对其中的 1.646 有较好的溶菌活性。

## 讨 论

1. 据报道<sup>[7]</sup>, 底物菌用活菌体或用冷冻干粉、丙酮干粉以致加热杀死的菌体, 对酶的反应不同, 因此我们进行筛选时用活菌体为底物。为方便起见, 条件试验用 186 的冷冻干粉做底物。

2. 在制备根霉为底物的双层琼脂平板时,

根霉的培养, 要在其孢子已形成芽管还未分枝的时候收集菌体, 因为幼小的菌丝体便于制备较均一的底物菌-琼脂层。

## 参 考 文 献

- [1] Bachman, B. J. and D. M. Bonner: *J. Bacteriol.*, **78**: 550—556, 1959.
- [2] Shahin, M. M.: *J. Bacteriol.*, **110**: 769—771, 1972.
- [3] 陈俊民等: 微生物学报, **19**(1): 114—116, 1979.
- [4] 崔福绵: 药学通报, **1**: 32, 1982.
- [5] 林青: 发酵工学会誌, **59**(4): 401—420, 1981.
- [6] Yoshio, Thajisaka et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**(1): 2517—2525, 1973.
- [7] 江慧修等: 微生物学报, **20**(4): 390—397, 1980.