

高溶纤酶活性枯草芽孢杆菌的分离筛选与鉴定

梁思宇 陆兆新* 邹晓葵 张晓东

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘要: 从多个枯草样品中分离纯化得到 20 株芽孢杆菌, 并进行了鉴定。通过对固体发酵所产生的溶纤酶的研究, 发现均能不同程度地产生溶纤酶, 其中菌株 FM-S1、FM-S2、FM-S8、FM-S6、FM-S11 产生的溶纤酶活性均高于日本的纳豆杆菌。同时对筛选的菌株的形态和菌落形态、生理生化特性进行鉴定, 确认所筛选到产酶菌株均属于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。另外, 对 FM-S2 作固体发酵确定在熟大豆上枯草杆菌溶纤酶生物合成的模式为同步合成型。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 溶纤酶, 高产菌株

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0025-04

THE ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS PRODUCING HIGH-ACTIVITY FIBRONOLYSIN

LIANG Si-Yu LU Zhao-Xin ZHOU Xiao-Kui ZHANG Xiao-Dong

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: The results of isolation, screening and identification of *Bacillus subtilis* strains which produced fibronolysin were reported in this paper. 20 *Bacillus subtilis* strains were screened from different withered straw samples. Among them, FM-S1, FM-S2, FM-S6, FM-S8 and FM-S11 produce fibronolysin with higher activity. According to morphological, physiological and biochemical characters, the screened strains were confirmed to be *Bacillus subtilis*. For FM-S2, the production of fibronolysin type in solid fermentation was considered to be synchronous with growth.

Key words: *Bacillus Subtilis*, Fibronolysin, High-yield strain

目前, 心脑血管栓塞疾病日益严重危害人们的身体健康。尽管这种情况早已引起医药卫生界的极大关注及重视, 但至今所开发的具有令人满意疗效、副作用小的药物为数不多。现在常用的及一些还在开发的同类药物如链激酶 (SK)、尿激酶 (UK)、蚓激酶 (EPA)、组织溶酶原激活剂 (TPA) 均在不同程度上存在着一定缺陷, 或者是毒性较强, 副作用较大; 或者在人体内半衰期短, 药效难以发挥; 或者来源紧缺, 造价高, 价格昂贵难以成为一种大众药物。近年来日本从纳豆杆菌 (*B. subtilis* var Natto) 发酵大豆制成的传统食品纳豆中发现具有溶纤活性的蛋白酶, 并证明有治疗与预防血栓病的作用, 同时可激活体内纤维蛋白溶酶原, 从而增加溶解血纤维蛋白的效果^[1]。本实验旨在从不同样品中分离获得 20 株芽孢杆菌的基础上筛选溶纤酶活性较高的产酶菌株, 并对能分泌溶纤酶的菌株进行了菌细胞、菌落形态和生理生化特性鉴定, 同时, 研究枯草芽孢杆菌在固体培养时的产酶动力学。

* 通讯联系人

收稿日期: 2000-08-18, 修回日期: 2000-11-25

1 材料与方 法

1.1 菌种分离与纯化

供分离样品分别从西藏、新疆、江苏、山东、广东、河南、海南和日本收集。

将适量待分离样品放入灭菌带塞试管中,加入5mL灭菌生理盐水,振荡。取0.2mL含菌液涂布于营养琼脂平板上。同时在另一平板上划线接种枯草芽孢杆菌参考菌(资环院提供)作对照。

37℃培养24h后,挑取菌落形态与参考菌相似的单菌落进行革兰氏染色及镜检。将初步分离到的目标菌继续进行平板划线培养,得到菌落形态及菌细胞形态特性与参考菌基本相似的纯培养菌株。将分离纯化所得的芽孢杆菌接种于熟大豆上进行固体发酵,同时接种纳豆杆菌作对比。37℃培养24h观察发酵大豆是否有白色拉丝物质生成。选择能产生与典型纳豆杆菌相似的拉丝物质的菌株接种营养琼脂斜面保存备用。

1.2 菌种的鉴定

按照文献[5]中芽孢杆菌属(*Bacillus*)典型的形态、特征和生化特性,对获得的菌株进行了菌种的鉴定。

1.3 溶纤酶活性的测定

溶纤酶的活性用琼脂糖-纤维平板法^[6,7]测定。取琼脂糖(1%)溶液16.2mL,纤维蛋白原液16.2mL,凝血酶1.3mL混匀,倒入直径9cm的平皿,室温放置0.5h,即成琼脂糖-纤维平板。将10 μ L样品液点样在琼脂糖-纤维平板表面上,然后移放37℃温箱中18h,观察溶圈测量并记录样品圈的垂直直径,并点样标准品尿激酶20、40、60、80、100单位。以尿激酶溶圈的垂直直径的乘积的对数为横坐标,浓度对数为纵坐标,作出标准品尿激酶的标准曲线,用于测定枯草杆菌溶纤酶的活性。溶纤酶的单位以相当于尿激酶的单位来表示(uk. U)。

1.4 菌产酶特征的鉴定

产酶菌株筛选采用固体发酵法^[8,9]。发酵成熟大豆样品用生理盐水按1:9(W/V)浸提30min,5000r/min离心30min,上清即为溶纤酶粗提液。按上述方法测定各菌株产生的溶纤酶活性高低。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离和鉴定

从七省、自治区多个枯草样品中筛选出菌落及菌细胞形态与枯草芽孢杆菌标准菌株相似,并能产生与典型纳豆杆菌相似白色丝状物质的20株菌株,并对这20株进行形态特征和生理生化特性的鉴定,以确定是否为枯草芽孢杆菌。鉴定结果如下。

2.1.1 菌落形态:普通琼脂营养平板划线接种,37℃培养24h,单菌落为乳白色或微黄色,圆形,不透明,表面粗糙,有皱褶,无光泽,边缘不整齐呈裂叶状,中央颜色深于边缘部分,菌落直径为2mm~5mm(图1)。

2.1.2 液体培养特征:普通肉汁培养基37℃静置培养24h,培养液较清,液面上形成一层白色菌膜,没有气泡。

2.1.3 个体形态:挑取单菌落染色后镜检,初筛菌株均为革兰氏阳性短杆菌,有鞭毛,能运动,具芽孢,芽孢呈椭圆或柱状,不明显膨大,芽孢中生或次中生(图2),多为

两端均匀染色。

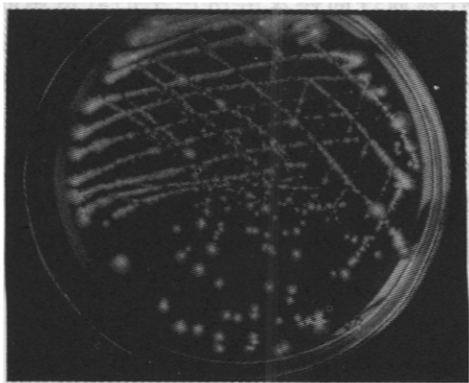


图1 分离菌 FM-S2 的菌落形状

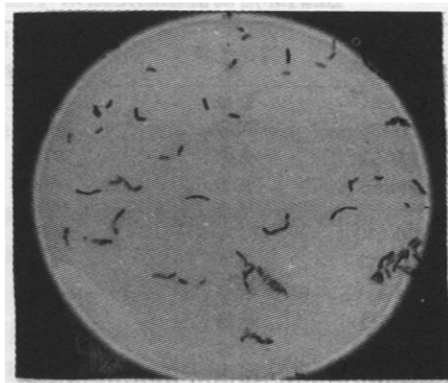


图2 分离菌株 FM-S2 的形态和孢子(X1000)

2.1.4 生理生化特性：对上述菌株进一步作了生理生化试验。现以 FM-S1、FM-S2、FM-S8、FM-S6、FM-S11、标准枯草杆菌（对照菌）为例将结果列于表1中。

从上述细胞形态、菌落特征和生化鉴定的结果可以看出所有鉴定性状均同枯草芽孢杆菌一样。因此，可以认为20株分离菌均属于枯草芽孢杆菌。

表1 芽孢杆菌属生理生化鉴定结果

生理生化特性	菌株编号					<i>B. subtilis</i>
	FM-S1	FM-S2	FM-S8	FM-S11	FM-S6	
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
厌氧生长	-	-	-	-	-	-
葡萄糖发酵 ^{*1}	+	+	+	+	+	+
NO ⁻³ →NO ⁻²	+	+	+	+	+	+
NaCl 7% 生长	+	+	+	+	+	+
PH 5.7 生长	+	+	+	+	+	+
水解淀粉	+	+	+	+	+	+
水解酪蛋白	+	+	+	+	+	+
V-P	+	+	+	+	+	+
甲基红	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶 ^{*2}	-	-	凝固不变色*	-	-	-

注：+ 表示产酸不产气；- 表示石蕊牛奶不变色不发生凝固，无冻化或出现乳清层；

* 石蕊牛奶凝固不变色是由于菌株产生凝乳酶所致

2.2 高产酶菌株的筛选

将分离并鉴定的20株菌分别进行固体发酵，发酵大豆样品用生理盐水溶出酶，离心后收集上清液，点样，37℃放置18h后测量。各样液的溶圈直径积及溶纤酶酶活的结果列入表2中。

表2 20株枯草杆菌发酵大豆的纤溶酶活性测定结果

菌株编号	样品来源	湿纳豆溶酶活性 (uk. U/g)
FM-S1	西藏	384.12
FM-S8	西藏	219.78
FM-S2	日本	237.42
FM-S6	日本	215.11
FM-S18	日本	66.15
FM-S10	日本	65.79
FM-S13	日本	46.08
FM-S14	日本	40.41
FM-S11	新疆	210.78
FM-S4	新疆	179.55
FM-S12	海南	143.28
FM-S3	河北	134.19
FM-S9	河南	91.26
FM-S5	江苏	88.02
FM-S7	江苏	72.36
FM-S15	江苏	53.46
FM-S16	江苏	48.60
FM-S19	江苏	36.54
FM-S17	广东	68.22
FM-S20	广东	32.40
<i>B. subtilis</i> (CK)	---	---

从表2的结果可以发现, 20株枯草芽孢杆菌通过固体发酵所产生的纤溶酶的纤溶活性具有明显的差异性, 其中FM-S1, FM-S2, FM-S8, FM-S6, FM-S11粗酶提取液的溶圈面积较大, 活性较高。其中从西藏样品中分离的枯草杆菌溶纤酶活性接近385U/g湿纳豆。由于这5株菌株发酵制成的纳豆溶纤酶活性均在200uk. U/g以上, 可以作为诱变育种的出发菌株, 以筛选出溶纤酶活性更高的菌株用于生产。

2.3 培养时间对产酶的影响

将培养18h, 含菌量 10^7 个/ML的FM-S2的种子液按2% (V/W)接种量接种于蒸熟大豆中进行固体发酵, 定时取样测定酶活及用平板直接计数法测定固体培养物的活菌总数, 结果见图3。

从图3可以发现, 发酵6h后溶纤酶的合成开始, 此时在固体发酵物中丝状物质开始产生, 随后酶的合成迅速增加, 在38h达到最高值, 随后略有下降。而枯草杆菌在4h开始进入对数生长期, 24h后增殖速度缓慢, 36h后菌数略有下降。因此, 认为在大豆固体培养基上溶纤酶生物合成的模式为同步合成型。

在此实验中我们共获得了6株溶纤酶活性较高的菌株, 但是, 用FM-S2进行固体发酵培养, 溶纤酶的合成时间比较短, 有待于今后在酶发酵工艺上进行研究, 使溶纤酶的合成时间增加从而增加发酵大豆的溶纤功能。

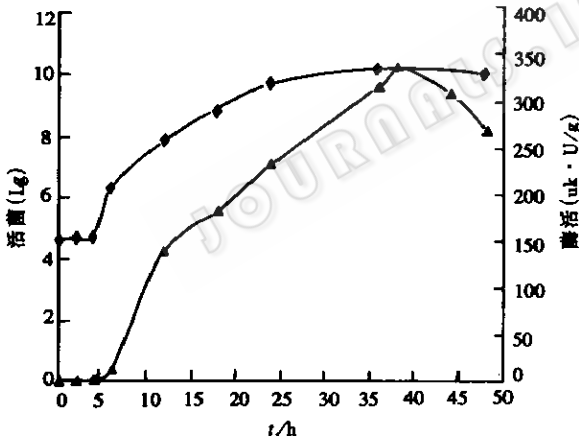


图3 产酶的时间过程
—◆— 活菌, -▲- 酶活性

参考文献

- [1] 须见洋行. 化学と生物, 1991, 29 (2): 119~123.
- [2] 须见洋行. Bioindustry, 1990, 7 (1): 12~18.
- [3] 付利, 杨志兴. 生物工程进展, 1995, 17 (5): 46~49.
- [4] 李宁. 微生物学杂志, 1996, 16 (2): 43~47.
- [5] 张纪忠主编. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 62~70.
- [6] 徐仲, 赵晓东, 郑雅莺, 等. 生物技术, 1997, 7 (4): 16~18.
- [7] 王金英, 刘宇峰. 生物技术, 1997, 7 (5): 18~20.
- [8] 李荣萍, 李晶, 赵晓祥, 等. 生物技术, 1996, 6 (3): 21~23.
- [9] 杨明, 金玉芝. 生物技术, 1994, 4 (4): 42~46.