

原生质体诱变选育分解 x 光胶片的菌株

陈碧娥 王丽娜

(化工与生化工程系)

摘要 从厦门福达感光胶片厂的污水中分离到207株芽孢杆菌,其中一株显示了较强的分解明胶的能力.该菌经鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* 207).用溶菌酶制备207菌的原生质体,经紫外线诱变获得一变异株(207-A5),产蛋白酶活力由830u/ml提高到4731u/ml.

关键词 原生质体,诱变,蛋白酶

0 引言

x 光胶片是由感光乳剂(明胶和卤化银)涂布在聚酯片基上而制成的.由于 x 射线的穿透力强,x 光胶片比照相胶卷、电影胶片具有较高的含银量,而且所含的银的颗粒较大⁽¹⁾.用过的 x 光片可以用焚烧法除去聚酯回收银,但焚烧法污染环境,且不能回收片基.而建造焚烧炉的成本也很高.日本用微生物的方法回收 x 光胶片中的银及片基取得良好的效果⁽²⁾.用微生物法回收的关键是菌种,利用菌种产生的蛋白酶使明胶分解,从而使银从片基上脱落.为获得对底物明胶特异性强的菌株,我们用明胶平板进行初筛,用明胶法测定发酵液中蛋白酶的活力.为提高蛋白酶的发酵水平,用溶菌酶制备207菌原生质体,然后用 U. V 处理原生质体.选育到207-A5菌株,其产蛋白酶水平是出发菌株的5倍多,对 x 光胶片的脱胶效果良好.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 样品来源:从厦门福达感光胶片厂的污水中采取水样.(2) 培养基(i)斜面培养基:牛肉膏1%;蛋白胨1%;NaCl0.5%;PH7.2.(ii)Frazier 氏明胶平板.(iii)摇瓶发酵培养基:玉米粉6%;豆饼粉4%;KH₂PO₄0.03%;Na₂CO₃0.1%;Na₂HPO₄·12H₂O0.4%;自然 PH.(iv)高渗培养基:牛肉膏1%;蛋白胨1%;NaCl0.5%;0.5mol 蔗糖;0.02mol MgCl₂;PH7.2.(3) 酸性汞试剂.(4) 原生质体稳定液(≤MM):0.5mol 蔗糖;0.02molMgCl₂;0.02mol 顺丁烯二酸;PH6.8—7.0.

• 本文1990-07-05收到.

(5) 溶菌酶(E·Merck 产品). (6) 紫外灯(30W).

1.2 方法

1.2.1 初筛的测定方法 将待测菌株点种在 Frazier 平板上, 37℃ 培养 24h. 菌落长出之后, 取出平板, 滴加酸性汞试剂在菌落周围. 如菌落周围出现透明圈说明该菌具有蛋白酶, 能分解明胶. 以透明圈的直径与菌落直径的比值 D/d 的大小, 初步表示酶活力的相对大小.

1.2.2 蛋白酶活力的测定 明胶法^[3].

1.2.3 原生质体的制备和再生 将 207 菌接入含有 50ml 肉汤培养基的 500ml 三角瓶中, 旋转式摇床 180 转/min 培养 10h, 按 2% 接种量转接于新鲜肉汤培养基. 培养至对数生长期 (16—18h). 经 3500 转/min 离心, 收集菌体. 先用 SMM 液将菌体洗涤 2 次, 然后悬于 SMM 液中, 加溶菌酶至终浓度为 100 μ g/ml. 于 37℃ 恒温水浴保温, 计算其原生质体的形成率和再生率.

1.2.4 原生质体形成率和再生率的计算

$$\begin{aligned} \text{原生质体的形成率} &= \frac{\text{原生质体数}}{\text{未经溶菌酶处理的总菌数}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{未经溶菌酶处理的总菌数} - \text{经酶处理后的剩余菌数}}{\text{未经溶菌酶处理的总菌数}} \times 100\%, \end{aligned}$$

$$\text{原生质体的再生率} = \frac{\text{再生培养基上总菌数} - \text{经酶处理后的剩余菌数}}{\text{原生质体数}} \times 100\%.$$

1.2.5 诱变及筛选^[4] 原生质体悬液置于 30W 紫外灯下 (距离 30cm), 照射 1min, 将照射后的原生质体和未经照射的原生质体用高渗液体培养基稀释后, 分别取样置于高渗平板上, 37℃ 培养 24—36h, 计算紫外线对原生质体的致死率. 挑取诱变后的原生质体单菌, 移接到斜面上并测定其摇瓶发酵的酶活力.

2 结果与讨论

2.1 菌种分离和选育程序

水样 → 营养肉汤富集 → 100℃ 水浴处理 10min → 稀释 → 做混菌平板 → 挑 207 个单菌落移入斜面 → 用 Frazier 氏平板初筛 → 摇瓶发酵复筛 → 得 207 个菌株 → 自然分离 → 原生质体诱变 → 摇瓶发酵筛选 → 207—A5 菌株.

2.2 初筛及复筛的结果

逐个测定从水样中分离出的 207 个菌株的水解圈, 选 D/d 值较大的 20 株 (表 1). 挑取单菌落移接在斜面上, 37℃ 培养 24h, 再接入摇瓶发酵培养基, 在旋转式摇床上, 210 转/min, 37℃ 培养 48h 后测定其蛋白酶活力. 其中 10 株产酶在 130—830 μ /ml (表 2). 酶活为 830 μ /ml 的 207 号菌, 不仅酶活高, 而且发酵液离心后较清, 故选其进行原生质体诱变.

表 1 20 个菌株的 D/d 值

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D/d		4.69		4.67		4.58		4.61		4.95		5.71		5.97		4.72		5.53		5.00
	5.78		5.18		4.79		7.93		4.01		4.62		5.29		4.61		4.67		4.81	

表2 复筛菌株的蛋白酶活力

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
活力(μ /ml)	399	140	159	131	298	146	830	298	400	294

2.3 207菌株的特性

207菌细胞呈杆状 $2 \times 5 \mu\text{m}$ 。革兰氏染色为阳性。芽孢呈椭圆形,中生,芽孢囊不膨大。在葡萄糖肉胨斜面上,幼龄细胞用蕃红染色不均匀。菌落为圆形、中凸、光滑。根据分类检索鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

207菌发酵液,分别用PH7.5与9.18的缓冲液测定其蛋白酶活力。在碱性条件下,其蛋白酶的活力大大高于中性条件下的蛋白酶活力,因此207菌产生的蛋白酶为碱性蛋白酶。

2.4 原生质体的形成率和再生率与溶菌酶作用时间的关系

在溶菌酶浓度同是 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的条件下,把悬于SMM液的菌液分别在 37°C 恒温水浴中保温10、20、30min。从表3可以看出,随着溶菌酶作用时间的增加,虽然原生质体的形成率有所提高,但再生率显然降低。因此取溶菌酶作用10min制备原生质体。

表3 原生质体的形成率和再生率与溶菌酶作用时间的关系

溶菌酶处理 时间(min)	未经溶菌酶 处理的总菌数	溶菌酶处理后 剩余菌数	再生培养基 上总菌数	原生质体 形成率	原生质体 再生率
10	3.2×10^5	7×10^3	1.15×10^5	99.78%	3.4%
20	3.2×10^5	2×10^3	3.2×10^3	99.94%	0.04%
30	3.2×10^5	2×10^2	2.8×10^2	99.99%	0.0025%

2.5 明胶法测定酶活力

蛋白酶活力的测定方法,最常用的是福林(Folin)法。但在x光胶片分解菌的筛选中,如果用福林法测定,则难以获得分解力强的菌株。因为福林法是以酪蛋白经蛋白酶作用后产生的酪氨酸与酚试剂反应的原理来测定酶活的。明胶是一种蛋白质,但是明胶中所含的酪氨酸极少^[5],对酪蛋白分解力强的蛋白酶,并不适用于明胶的分解。用明胶法测定,具有底物特异性强的优点,适用于筛选分解废胶片的产蛋白酶的菌株。

2.6 紫外线对原生质体诱变的效果

原生质体经U·V诱变处理1min后,致死率达92%。测定再生菌的产酶水平。表4列出其中10个突变体的酶活。

表4 诱变后10个突变体的酶活

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活(u/ml)	176	2883	1354	81	1141	131	160	44	910	4731

出发菌株207产酶水平是 $830 \text{ u}/\text{ml}$ 。其突变体中,酶活高于 $830 \text{ u}/\text{ml}$ 的正突变菌株不多,仅占50%左右。但有的突变菌株酶活提高的幅度较大。突变株207-A5酶活高达 $4731 \text{ u}/\text{ml}$,是出发菌株的5倍多。可以认为用U·V直接处理剥除细胞壁后裸露的原生质体是一种有效的育种方法。

参 考 文 献

- [1] 关树茂,感光材料生产基本知识,轻工业出版社,(1985),127—128.
- [2] 起飞,从陈胶片中完全回收银,应用微生物,2(1987),55.
- [3] 上海酿造科学研究所等,发酵调味品生产技术(上册),轻工业出版社,(1981),215—218.
- [4] Bainbridge, B. W., *The Genetics of Microbes*, Glasgow, Blackie, (1980), 130—131.
- [5] 沃德, A·G·等主编(李文渊等译),明胶的科学工艺学,轻工业出版社,(1982).

Selective Breeding of a Bacterial Strain Capable of Decomposing X-Ray Film by Mutagenizing the Protoplast

Chen Bie Wang Lina

(Department of Chemical and Biochemical Engineering)

Abstract 207 strains of bacilli were isolated from the sewage samples of Fuda Film Factory in Xiamen. One of these strains showed a higher capability of decomposing gelatin. The strain was identified as *Bacillus Megaterium* 207. A mutant, namely 207—A5, can be obtained by preparing the protoplast of *B. Megaterium* 207 with lysozyme and mutagenizing it with UV light. 207-A5 is capable of rising the activity of producing protease from 830 u/ml to 4,731 u/ml.

Key Word Protoplast, mutagenize, Protease