

萝卜溶菌酶抑菌效果的初步研究^{*}

高向阳¹ 袁四清² 穆虹¹ 藏富妍³ 徐凤彩¹

(1华南农业大学生物技术学院,广州,510642 2广东省农科院蔬菜所;3华南农业大学动物医学系)

摘要 研究了萝卜溶菌酶对白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌等3种革兰氏阳性菌和变形菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏杆菌、多杀巴斯德氏杆菌、雏白痢沙门氏菌、产气杆菌等6种革兰氏阴性菌及酿酒酵母、总状毛霉、黑根霉、黑曲霉、青霉等4种真菌的抑菌效果。同时还研究了萝卜溶菌酶对白菜软腐病菌、柑橘溃疡病菌、番茄青枯病菌、水稻细条病菌、水稻白叶枯病菌及烟草青枯病菌等6种植物病原细菌的抑菌效果。实验证明:萝卜溶菌酶对上述参试的菌种都有不同程度的抑菌作用,表明萝卜溶菌酶的抑菌谱较鸡蛋清溶菌酶更为广泛。

关键词 萝卜溶菌酶;细菌;真菌;植物病菌;抑菌效果

中图分类号 Q 556.2

植物溶菌酶现已得到了较广泛的研究,已分别从木瓜、无花果、三叶橡胶等植物中分离得到了溶菌酶,并对这些不同来源的植物溶菌酶的理化性质和酶学性质进行了研究,已发现植物溶菌酶与鸡蛋清溶菌酶(HEWL)有所不同,如:木瓜、无花果和橡胶溶菌酶的相对分子质量分别为28 29 36; pI值分别为10.5 9.0 9.0;最适pH分别为4.5 4.6 5.0(Howard et al, 1976; Glazer et al, 1969; Tata et al, 1983),而HEWL的相对分子质量、pI值和最适pH值分别为13.7 11.6和6.2(船津胜等,1982)。植物溶菌酶活性与HEWL也不相同:以溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 为底物时,HEWL的活性高而植物溶菌酶活性低;以N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)多聚体和甲壳质为底物时,植物溶菌酶活性高而HEWL低(船津胜等,1982)。

Audy等(1990)对116科的41种植物进行了普查,发现168种植物中含有溶菌酶。1991年,对我国华南地区的56科120种植物进行了普查,发现1科的2种植物含有溶菌酶,其中十字花科植物中,萝卜的溶菌酶含量最高(结果待发表)。研究表明,单独的HEWL对革兰氏阳性菌(G^+)起抑制作用,而对革兰氏阴性菌(G^-)、真菌多不起作用(船津胜等,1982)。至于植物溶菌酶的溶菌性质,尚未见报道。鉴此,采用萝卜溶菌酶对一些细菌(G^+ 和 G^-)、真菌以及植物病原菌的抑菌效果进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

革兰氏阳性菌3种:白色葡萄球菌 *Staphylococcus albus* 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 枯草杆菌 *Bacillus subtilis*;革兰氏阴性菌6种:普通变形菌 *Proteus vulgaris* 大肠杆菌 *Escherichia coli* 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 多杀巴斯德氏杆菌

1996-07-18收稿 高向阳,女,30岁,讲师,硕士

^{*} 中国绿色食品发展中心资助项目

Pasteurella multocida 雏白痢沙门氏菌 *Salmonella pollorum* 产气杆菌 *Bacterium aerogenes*; 真菌 5 种: 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 总状毛霉 *Mucor racemosus* 黑根霉 *Rhizopus niger* 黑曲霉 *Aspergillus niger* 青霉 *Penicillium glaucum* 上述微生物材料由华南农业大学动物医学系微生物教研室提供。

植物病原菌 5 种: 白菜软腐病菌 *Erwinia carotovora* var. *carotovora* 柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson 番茄青枯病菌 *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Dowson 水稻细条病菌 *Xanthomonas panici* Bergey 水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* 烟草青枯病菌 *Pseudomonas solanacearum*, 由广东省农科院植保所提供。

植物材料: 萝卜 *Raphanus sativus* 叶, 华南农业大学光合作用研究室土壤栽培。

1.2 方法

1.2.1 萝卜溶菌酶的制备 按卢顺舵等(1995)方法。酶经 SDS-PAGE 圆盘电泳检测显示单一蛋白带, 酶活力为 1.56×10^6 U/L, 每 g 蛋白质含 4.2×10^7 U, 活力回收为 63%。

1.2.2 萝卜溶菌酶活性的测定 采用 Sugar(1952)的方法, 以每 min 在 450 nm 波长下光密度下降 0.001 个单位的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.3 蛋白质含量测定 按 Bradford(1976)的方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 萝卜溶菌酶对细菌的抑菌作用 以金黄色葡萄球菌等 3 种 G⁺ 菌, 及大肠杆菌等 6 种 G⁻ 菌为抑菌对象, 分别取其 24 h 培养的悬浊液 1 个接种环, 接种到 5 mL 肉汤培养基中, 并各加入 1 mL 酶液 (1.56×10^6 U/L) 摇匀, 各以等量无菌蒸馏水代替酶液 (其它处理相同) 为对照, 于 37°C 培养 24 h 后观察各菌液的浊度变化, 并于 450 nm 波长下测定光密度值。重复 3 次。

1.2.5 萝卜溶菌酶对真菌的抑制作用 以酵母等 5 种真菌为抑菌对象, 分别取 0.1 mL 上述各真菌悬浊液, 加到无菌培养皿中, 倒入融化 (50~55°C) 的马铃薯-葡萄糖琼脂培养基, 并加入 1 mL 酶液 (1.56×10^6 U/L) 混匀, 迅速放平待凝固, 同时以 1 mL 无菌蒸馏水代替酶液 (其它处理相同) 的为对照, 于 37°C 培养 24 h 后观察各真菌的生长情况。重复 3 次。

1.2.6 萝卜溶菌酶对植物病原菌的抑制作用 以白菜软腐病菌等 6 种植物病原菌为抑菌对象, 在将细菌培养基冷却至 45~50°C 时, 分别加入上述病原菌至 0.5 mL/L, 混匀后倒入培养皿中, 冷却后用吸管在培养基上打洞, 在洞中加入溶菌酶 $25 \mu\text{L}$ (1.56×10^6 U/L), 以缓冲液为对照, 于 37°C 培养过夜, 观察抑菌圈发生, 并测直径。重复 3 次。

2 结果

2.1 萝卜溶菌酶对细菌的抑菌作用

从浊度 (A_{450} 表示) 的变化来看, 萝卜溶菌酶对白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌及枯草杆菌 3 种 G⁺ 的抑菌效果较好。在 6 种 G⁻ 菌中, 萝卜溶菌酶对大肠杆菌的抑菌效果最好, 对雏白痢沙门氏菌次之, 对变形杆菌和产气杆菌又次之, 而对鼠伤寒沙门氏杆菌和多杀巴斯德氏杆菌的抑菌效果相对较差 (表 1)。

2.2 萝卜溶菌酶对真菌的抑制作用

萝卜溶菌酶对酿酒酵母、总状毛霉的抑菌效果较好, 对黑曲霉和黑根霉次之, 对青霉的抑制效果相对较差 (表 2)。

表 1 萝卜溶菌酶对 3 种 G⁺ 菌和 6 种 G⁻ 菌的抑制作用

细菌	A ₄₅₀ (对照)	A ₄₅₀ (处理)	A ₄₅₀ 降低百分率 /(%)
白色葡萄球菌	0. 587	0. 103	82. 4
金黄色葡萄球菌	0. 401	0. 072	82. 1
枯草杆菌	0. 585	0. 082	86. 3
普通变形菌	0. 881	0. 512	41. 8
大肠杆菌	0. 770	0. 078	89. 8
产气杆菌	0. 976	0. 526	46. 1
多杀巴斯德氏杆菌	1. 224	0. 946	22. 5
鼠伤寒沙门氏杆菌	0. 788	0. 540	31. 5
雏白痢沙门氏菌	0. 589	0. 211	64. 2

2. 3 菌卜溶菌酶对植物病菌的抑制作用

萝卜溶菌酶作用于白菜软腐病菌等 6 种植物病菌 ,从抑菌圈的大小 (表 3)可看出: 萝卜溶菌酶对参试的植物病原菌都有一定的抑菌效果 ,其中对白菜软腐病菌、柑橘溃疡病菌较为有效 ,对烟草青枯病菌和水稻白叶枯病菌次之 ,对水稻细条病菌和蕃茄青枯病菌相对较差。

表 2 萝卜溶菌酶对真菌的抑菌效果¹⁾

菌名	对照	处理
酿酒酵母	-	++++
总状毛霉	-	++++
黑根霉	-	+++
黑曲霉	-	+++
青霉	-	+

1)- : 真菌生长没有被抑制;+ : 其数目代表真菌受抑制的程度

表 3 萝卜溶菌酶对植物病菌的抑制效果

菌名	抑菌圈 /cm
烟草青枯病菌	1. 50
番茄青枯病菌	1. 00
水稻白叶枯病菌	1. 40
水稻细条病菌	1. 10
柑橘溃疡病菌	1. 75
白菜软腐病菌	1. 79

3 讨论

不同来源的溶菌酶 ,其溶菌专一性不同 ,即使同是来自微生物的溶菌酶 ,其抑菌谱及抑菌能力也表现出很强的种属差异性 (船津胜等 , 1982; 张树政等 , 1984) ,目前国内外市场上销售最多、用途最广的溶菌酶制剂是鸡蛋清溶菌酶 (HEW L) 。 一般认为 HEW L 对革兰氏阴性菌、真菌等的杀菌能力较差 ,只有与其它物质 (如: 甘氨酸等)混合作用才表现一定的杀菌效果 (船津胜等 , 1982) 。 寻找杀菌更广谱的溶菌酶以满足不同应用的需求 ,乃是溶菌酶研究领域中的一个重要的课题。有关植物溶菌酶的溶菌性质的研究尚未见报道 ,作者对萝卜溶菌酶抑菌作用的初步研究 ,实验结果表明对参试的 3 种 G⁺ 菌、6 种 G⁻ 菌、5 种真菌以及 6 种植物菌都有一定的杀菌效果 ,这为萝卜溶菌酶将来在食品防腐保鲜、医药、生物工程及植物保护上的应用提供了一定的基础性资料。

参 考 文 献

船津胜,鹤大典编著. 1982. 溶菌酶. 李兴福,荆永志译校. 济南: 山东科技出版社, 39~ 78; 257~ 262
张树政,胡学智编著. 1984. 酶制剂工业: 下册. 北京: 科学出版社, 804~ 806

- 卢顺舵,徐凤彩,李明启. 1985.应用新和层析制备萝卜叶溶菌酶. 华南农业大学学报, 16(4): 78~ 82
- Audy P, Quere D L, Leclerc D, et al. 1990. Electrophoretic forms of lysozyme activity in various plant species. *Phytochemistry*, 29(4): 1143~ 1159
- Bradford M A. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem*, 72 248~ 254
- Glazer A N, Barel A O, Howard J B, et al. 1969. Isolation and characterization of fig lysozyme. *J Biol Chem*, 244(13): 3583~ 3589
- Howard J B, Glazer A N. 1967. Studies of the physicochemical and enzymatic properties of papaya lysozyme. *J Biol Chem*, 242(24): 5751~ 5723
- Sugar D. 1952. Determination of lysozyme. *Biochem Biophys Acta*, 8 302
- Tata S J, Bernstema J J, Balabaskaram S. 1983. The lysozyme of *Hevea brasiliensis* latex: isolation, purification, enzyme kinetics and a partial amino- acid sequence. *J Rubber Res Malaya*, 31(1): 35 ~ 48

PRIMARY STUDIES ON THE BACTERIOSTASIS AND FUNGISTASIS OF LYSOZYME FROM *Raphanus sativus*

Gao Xiangyang¹ Yuan Siqing² Mu Hong¹ Zang Fuyan Xu Fengcai¹

(1 College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Guang Dong Academy of Agr. Sciences, Vegetable Research Institute;

3 Dept. of Veterinary Medicine, South Chian Agr. Univ.)

Abstract

The inhibition effects of lysozyme from *Raphanus sativus* on three kinds of G⁺ bacteria (*Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), six kinds of G⁻ bacteria (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullora*, *Bacterium aerogenes*), five kinds of fungi (*Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus niger*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*) and six kinds of plant pathogenic bacteria (*Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Dowson, *Xanthomonas panici* Bergey, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Pseudomonas solanacearum*) were studied. It was found that the growth of bacteria and fungi mentioned above could be inhibited by lysozyme from *Raphanus sativus* in varying degrees. The results indicated that the lysozyme from *Raphanus sativus* had wider antibiotic spectrum than the lysozyme from eggwhite.

Key words *Raphanus sativus* lysozyme; bacteria; fungus; plant pathogenic bacteria; inhibition