

溶菌酶的生物测定方法研究

冯惠勇 徐亲民 孙国志

(河北科技大学生物科学与生物技术学院,石家庄 050018)

摘 要 论述了以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)为试验菌检测溶菌酶活性的2种生物测定方法,即传统的细胞悬浮液比浊法和纸片琼脂平板扩散法。实验结果表明,2种方法检测数据的 t 检验在 $\alpha=0.05$ 显著性水平上无显著性差异,但同一样品用琼脂平板扩散法重复测定数据的标准方差均小于比浊法,平均变异率分别为3.4%和5.6%,说明琼脂平板扩散法测定数据的离散程度小,重现性好,准确度高。而且,平板法操作简单,1次可检测样品数量大,是现行比浊法检测溶菌酶活性的1种有价值的替代方法。

关键词 溶菌酶,生物测定,纸片琼脂平板法,比浊法,溶壁微球菌

溶菌酶(lysozyme)又称胞壁质酶(muramidase),它能够水解构成细菌细胞壁成分的多糖胞壁质中N-乙酰葡萄糖胺与N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4糖苷键,在作用时可观察到溶菌现象,故因此而得名^[1]。它存在于人体组织及其分泌物中(如泪水、唾液和尿),动物组织和植物组织中也都有,尤以鸡蛋的蛋清中含量最多^[2]。溶菌酶具有抗菌、抗病毒和消炎作用,与抗生素复合应用能增强抗生素疗效。它还是人体内的非特异性免疫因子,可提高机体的免疫力,并且与其他阳离子抗菌肽类天然防御因子有很好的协同作用^[3]。另外,它本身是1种天然蛋白质,能在胃肠道作为营养物质消化、吸收,无毒性,也不在体内残留,是1种安全性很高的食品保鲜剂、营养保健品和药品^[2]。溶菌酶常用于各种加工食品和饮料中,集药理、保健和防腐3种功能于一体。

目前测定溶菌酶活力主要采用试验菌悬浮液比浊法,这种方法虽然对单个样品测定速度比较快,但操作复杂,一般人难以掌握,而且准确率低、误差大。为此,我们借鉴抗生素的纸片琼脂平板扩散法测定生物效价的原理^[4],建立了1种新的简便易行的溶菌酶活力测定方法,即把酶样定量滴在一定规格的

圆形小纸片上,置于混有试验菌的琼脂平板上,样品在平板上以浓度为推动力的扩散产生相应大小的抑菌圈,通过测量抑菌圈的直径可以定量溶菌酶活力。本文比较了这2种方法所得数据的离散程度、变异率和准确度。

1 实验材料

1.1 试验菌

溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*(中国科学院微生物研究所提供,菌种编号1.634)。

1.2 试验菌斜面培养基(g/L)^[5]

葡萄糖5,蛋白胨5,牛肉膏3,NaCl 5,琼脂粉12,去离子水配制,pH 7.0~7.2,121℃蒸汽灭菌20 min。

1.3 平板检测培养基(g/L)

葡萄糖5,蛋白胨5,牛肉膏3,NaCl 5,琼脂粉8,去离子水配制,pH 7.0~7.2℃,121℃蒸汽灭菌20 min。

1.4 pH 6.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液

称取NaH₂PO₄ 11.70 g,Na₂HPO₄ 7.86 g及EDTA 0.392 g,溶于去离子水中,定容至1000 mL,用pH计校正,121℃蒸汽灭菌20 min。

1.5 标准溶菌酶

中国科学院上海生物化学研究所制品,

标示酶活力为 20 100 u/mg。

1.6 样品溶菌酶

自制蛋清溶菌酶。

2 实验方法

2.1 比浊法测定溶菌酶活力^[6]

2.1.1 试验菌悬浮液的制备

将冷冻干燥保藏的溶壁微球菌接种于试验菌斜面培养基上, 28℃ 恒温培养 48 h。用灭菌蒸馏水将菌体洗下, 离心(4 000 r/min, 10 min)后收集菌体, 再用灭菌蒸馏水洗涤 3 次。最后用少量水调制成 OD_{450} 为 0.8 左右的试验菌悬浮液冷藏备用。

2.1.2 标准酶液的配制

准确称取 16 mg 溶菌酶粉, 用 pH 6.2 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 配成浓度为 4 mg/mL 的酶溶液, 再用同样缓冲液将此酶液依次稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125 和 0.062 5 mg/mL。

2.1.3 比浊测量

取试验菌悬浮液 3.0 mL, 置于比色皿中测定 450 nm 下的 OD_{450} 值, 然后加入酶液 0.2 mL, 迅速摇匀。从加入酶液起计时, 每隔 30 s 记录 1 次 OD_{450} 。

2.1.4 溶菌酶酶活力的计算

酶活力单位定义: 在 25℃ 和 pH 6.2 条件下, OD_{450} 每分钟下降 0.001 为 1 个酶活力单位 (1 u)^[6]。由此得酶活力计算公式为

$$\text{每 mg 酶的活力单位} = \frac{[OD_{450}(\text{零时}) - OD_{450}(\text{60s 时})] \times 1000}{\text{样品毫克数}}$$

2.2 琼脂平板扩散法测定溶菌酶活力

2.2.1 标准曲线制作

(1) 标准酶液的配制: 同 2.1.2。

(2) 试验菌悬浮液的制备: 用一定量(如 10 mL)灭过菌的去离子水将试验菌斜面培养的溶壁微球菌的菌苔洗下, 冷藏备用。

(3) 琼脂平板的制备: 将一定量平板检测培养基加热融化后, 冷却至 50℃, 按 1% 体积比加入试验菌悬浮液, 迅速摇匀, 倒入事先灭

过菌并置于水平台面上的玻璃盘内, 使其均匀摊布, 凝固为琼脂厚度约为 1 mm 的试验菌平板。

(4) 点样: 在 49 片直径 6 mm, 厚度约 1 mm 的小纸片上, 准确注入 1 μ L 不同浓度的标准溶菌酶溶液, 每个浓度各 7 片小纸片, 按 7×7 正交拉丁方排列置于测定平板上, 纸片与纸片间的距离约 30 mm, 盖上玻璃盘盖, 放置 30℃ 于恒温室培养 16 h 左右。

(5) 抑菌圈测量: 用卡尺或投影放大仪测量每个纸片周围的抑菌圈直径, 分别计算各浓度 7 个测量数据的平均值。

(6) 标准曲线绘制: 以抑菌圈直径平均值为横坐标, 酶浓度(或换算成酶活力)对数为纵坐标, 用 Excel 程序进行一元线性回归, 绘出直线型标准曲线, 求出相应的截距 a 、斜率 b 和相关系数 R 。

(7) 统计检验: 计算统计量 F , 进行 F 检验, 确定所得回归方程的显著性^[7]。同时, 依据相关系数临界值表, 进行相关系数检验。

2.2.2 样品的检测

(1) 待测样品溶液的制备: 精确称取溶菌酶样品, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配成适宜浓度的酶溶液, 使其在测定平板上出现的抑菌圈落在标准曲线中段。

(2) 测定: 将每个待测酶溶液和 0.5 mg/mL 标准酶溶液分别滴于 3~4 和 3 n ~4 n 片纸片上(n 为待测样品数量), 每个纸片的点样量均为 1 μ L, 按 3×3 或 4×4 正交拉丁方排列至试验菌平板上, 放置恒温室培养 16 h 左右, 用卡尺或投影放大仪测量各抑菌圈直径, 计算每个样品的平均值, 并用同一个拉丁方上的 0.5 mg/mL 质量浓度标准酶液的平均抑菌圈直径校正, 由标准曲线计算出各样品中的酶浓度或活力。

2.3 测定数据的统计分析

2.3.1 试验数据的 t 检验^[7]

计算比浊法和纸片平板法所得数据的统计量 t 值, 分析它们之间的差异显著性。

2.3.2 计算变异系数

按下式计算变异系数

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

式中: CV ——变异系数;

S ——标准差;

\bar{X} ——平均值。

3 实验结果与讨论

3.1 纸片琼脂平板法的标准曲线

表 1 纸片琼脂平板法测定不同浓度标准酶液所得抑菌圈数据

酶质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	抑菌圈直径/mm							平均/mm
0.0625	15.8	15.4	15.7	16.0	15.0	15.9	15.1	15.55
0.125	17.5	17.2	17.4	16.8	16.9	16.8	17.1	17.10
0.25	18.1	18.0	18.4	18.2	18.3	18.0	18.3	18.18
0.5	20.2	20.0	19.9	19.8	20.0	20.0	19.0	19.84
1	21.0	21.5	21.0	22.0	21.1	21.5	22.0	21.44
2	21.5	22.4	23.3	23.1	23.4	23.7	23.0	22.92
4	24.0	24.3	24.1	24.0	24.0	24.6	24.5	24.21

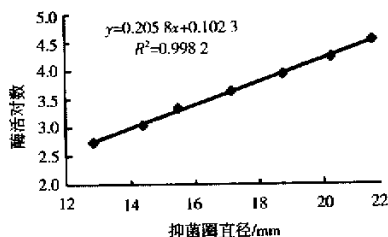


图 1 溶菌酶活力的琼脂平板法测定标准曲线

方差分析结果如表 2 所示。

表 2 F 检验方差分析表

变异来源	SS	自由度	F	r
总变异	9080562771	6		
回 归	6530921748	1	12.80	0.999 1
剩 余	2549641023	5		

所得回归方程的显著性 F 检验:

$H_0: \beta = 0$ 抑菌圈直径与酶活的对数之间无直线关系。

$H_1: \beta \neq 0$ 抑菌圈直径与酶活的对数之间有直线关系。

$\alpha = 0.05$

查《分析化学手册(第 1 分册)》(第 2 版)表 15-8 中的 F 临界值表,得 $0.01 < p <$

浓度梯度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL 的 7 个标准酶样用纸片琼脂平板法测定所得抑菌圈数据及由此绘出的标准曲线分别如表 1 和图 1 所示。

以上标准曲线方程为 $y = 0.2058x + 0.1023$ 相关系数 $R = 0.9991$ 。标准曲线覆盖范围为 0.0625 ~ 4 mg/mL (500 ~ 30000 u/mL), 也就是说 最低检出限为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

0.05,说明在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平上拒绝 H_0 ,故可认为抑菌圈直径与酶活的对数之间有直线关系。

查《分析化学手册(第 1 分册)》(第 2 版)表 18-1 依据相关系数临界值表,得 $p < 0.01$,说明在 $\alpha = 0.01$ 的显著性水平上,抑菌圈直径与酶活的对数之间有直线相关关系。

3.2 比浊法与琼脂平板法测定结果的 t 检验

分别从 2 个方法测量得到数据中抽取样本,作 2 样本均数比较。目的是推断 2 总体均数有无差别。

5 个不同稀释浓度的酶样分别用 2 种方法测定酶活力(u/mL)结果如表 3 所列。

$H_0: \mu_d = 0$ (H_0 为检验假设)

$H_1: \mu_d \neq 0$ (H_1 为备择假设)

$\alpha = 0.05$ (α 为显著性水平)

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - (\sum d)^2/n}{n-1}} = 94.2194$$

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S_{\bar{X}}} = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}} = 2.1919$$

表 3 比浊法与琼脂平板法测定不同标准酶浓度酶活的结果比较

酶质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.125	0.25	0.5	1	2
纸片平板法/ $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$	1 739.191	3 540.359	6 920.019	13 254.01	26 259.55
比浊法/ $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$	1 789.6	3 539.8	6 845.5	13 456.8	26 543.2
差值 d	- 50.49	0.559	74.519	- 202.79	- 283.65

查《分析化学手册(第 1 分册)》(第 2 版)表 15-6(2)中的 t 临界值表,得 $0.10 > p > 0.05$,说明在 $\alpha = 0.05$ 显著性水平上不拒绝 H_0 ,故认为 2 种方法测得结果没有显著性差异。

3.3 琼脂平板法与比浊法测定酶活力的离散度分析

取待测酶样配制成 2、1、0.5、0.25 和 0.125 mg/mL 5 个浓度的酶溶液,用纸片琼脂平板法进行酶活力测定,根据上述标准曲线计算其酶活力(u/mL)。同样的酶溶液,再用

比浊法进行测定。2 种测定法都重复测定 5 次,对得到的 2 组数据进行统计学分析,计算出均值、标准差和变异系数。结果如表 4、表 5 所列。

实验结果表明,采用琼脂平板法测定溶菌酶活力,5 种酶质量浓度的测量值的变异系数均 $< 5\%$,且标准差和变异系数都小于比浊法,说明采用琼脂平板法更稳定、准确,误差更小。这是由于纸片琼脂法是标准品与样品同时测定,从而排除了比浊法在温度和时间控制方面的微小差别以及仪器本身随时偏

表 4 琼脂平板法测定酶活的统计学数据

酶质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	实验次数(酶活单位 u/mL)					均值	标准差	变异系数 /%
	1	2	3	4	5			
0.125	1052.81	1142.26	1072.07	1091.67	1142.26	1100.21	36.47	3.31
0.25	2077.19	2213.77	2039.89	2101.24	2279.59	2142.33	89.85	4.19
0.5	4106.37	4313.99	4366.63	4527.79	4594.90	4381.93	171.71	3.92
1	8615.31	8920.99	8615.31	8860.60	9469.52	8896.35	312.53	3.51
2	17947.58	18987.47	18275.79	17308.77	18950.30	18293.98	632.87	3.46

表 5 比浊法测定酶活的统计学数据

酶质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	实验次数(酶活单位 u/mL)					均值	标准差	变异系数 /%
	1	2	3	4	5			
0.125	1252.67	1042.65	1072.85	1091.13	1142.23	1120.31	73.67	6.58
0.25	2267.39	2313.95	2139.59	1981.44	2379.05	2216.28	141.19	6.37
0.5	4024.43	4313.78	4566.67	4127.38	4624.90	4331.43	235.65	5.44
1	8515.12	9020.76	8565.31	8970.03	9532.53	8920.75	368.12	4.13
2	16947.48	19743.76	19280.34	19308.47	17950.97	18646.20	1040.61	5.58

差所造成的测定误差。

以上实验说明,琼脂平板法测定溶菌酶酶活的新方法与经典的比浊法的实验结果基本一致,说明它是切实可行的。而且与比浊法相比具有以下优点:(1)重复测定数据离散程度小、变异率低、准确度高。(2)1 次可检测样品数量大,减少了样品之间由于批次检测造成的系统误差。(3)在标准曲线范围内,可测酶浓度跨度大从 500 ~ 30 000 u/mL ,而用

比浊法还需将酶液稀释到合适的倍数,不好把握。第 1 点和第 2 点与文献^[10]所提出的结论基本一致。

参 考 文 献

- Holler E, Rupley J, Hess G. Biochem. ,1975,14,1088
- 朱奇,陈彦.生物学通报,1998,33(10):9~10

- 3 Robert E W Hancock ,Monisha G Scott. Proc. Natl. Acad. Sci. ,USA 2000 97(16) 8 856 ~ 8 861 (第 1 分册)(第 2 版). 北京 :化学工业出版社 , 1997
- 4 马绪荣 ,苏德模主编.药品微生物学检验手册. 北京 :科学出版社 2000
- 5 杜连祥主编.工业微生物实验技术.天津 :天津科学技术出版社 ,1981
- 6 Ugar D. Biochim. Biophys. Acta ,1952 8 302
- 7 杭州大学化学分析教研室主编.分析化学手册 1997
- 8 袁玉荪 ,朱婉华 ,陈钧辉编.生物化学实验.北京 :人民教育出版社 ,1982
- 9 徐秉玖编著.药物统计学.北京 :北京医科大学出版社 ,1999
- 10 俞小忠 ,马 勇 ,刘健虎.中华医学检验杂志 , 1998 21(1) 33 ~ 34

Study on Bioassay Methods of Detecting Lysozyme Activity

Feng Huiyong Xu Qinmin Sun Guozhi

(Hebei University of Science and Technology , Shijiazhuang , 050018)

ABSTRACT This article discussed two bioassay methods ,the turbidimetry and the paper-agar plate , which detecting lysozyme activity used *Micrococcus lysodeikticus*(1.634)as indication organism. The two methods were not significant variation by the student 's *t* -test at significance level $\alpha = 0.05$. However ,the standard deviation of the repeated detecting data of same sample with paper-agar plate was smaller than with turbidimetry ,and the average variability was 3.4% and 5.6% respectively. The results indicated that the bioassay with paper-agar plate not only manipulate was more simple and larger numbers of samples can be detected at a time but also the tendency of dispersion of data was smaller and the detecting data was more accurate. The bioassay with paper-agar plate was an available and valuable method of detecting lysozyme activity that can be used instead of the turbidimetry.

Key words lysozyme ,bioassay ,paper agar plate ,turbidimetry ,*Micrococcus lysodeikticus*

芬兰顶级乳品公司“探马”进入中国市场

有着近百年历史的芬兰最大的跨国乳制品企业维利奥公司在涉足中国市场十几年之后 ,终于在中国加入 WTO 前夕 ,在中国上海设立了公司办事处 ,这一举动预示着他们将加快中国市场开发的速度。

维利奥有限公司目前在美国、俄罗斯、瑞典等国家均设有子公司 ,公司每年有大量乳制品销往全球的 70 多个国家 ,主要出口产品有各种脱盐乳清粉、奶粉、奶油、奶酪及功能性食品配料等 ,其产品在婴儿食品、糖果、焙烤、冰淇淋、乳制品等食品行业中得到了广泛的应用。目前维利奥有限公司的脱盐乳清粉系列产品已在中国占据一定的市场份额 ,并且公司正在将他们的奶粉、奶油、奶酪、功能性配料等其他产品推荐给中国客户。

维利奥公司认为 ,技术创新实力和严格的质量保证体系为公司长期以来的发展壮大提供了有力的支撑。据该公司上海办事处人士介绍 ,目前该公司所有的加工厂全部通过了 ISO9002 资格认证 ,并都已获得 ISO14001 环保证书。该公司开发中国市场的最大优势在于 :一是生产所有产品的原料奶十分纯净和优质 ,这与芬兰纯净的大自然、天然来源的饲料以及对奶牛的精心饲养有很大关系 ;二是公司拥有先进的研发中心。维利奥有限公司的研发中心是欧洲食品行业著名的研发中心之一 ,该中心长期致力于乳酸菌、牛奶加工工艺以及营养等方面的研究 ,积累了丰富的经验 ,在新产品尤其是功能性产品开发方面不断取得创新 ,如益生菌 LGG、降压产品 Evolus 以及 HYLE 低乳糖系列产品等均具有一定的科技含量。