

文章编号:1673-1689(2006)04-0093-04

产纤溶酶米曲霉的筛选及诱变育种

高占争, 赵允麟

(江南大学 教育部工业微生物重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 利用自己设计的筛选方法,从不同的酿造曲样中筛选出 1 株产纤溶酶酶活较高的米曲霉菌株 SA-6,其产纤溶酶酶活为 25 U/mL。SA-6 经过紫外线、 ^{60}Co 和亚硝基胍诱变,筛选得到突变株 NA-25,其产酶酶活为 63 U/mL,是出发菌株 SA-6 的 2.52 倍。突变株 NA-25 的发酵性状改变,其产纤溶酶的高峰比出发菌株迟了约 10 h。

关键词: 纤溶酶; 米曲霉; 筛选; 诱变

中图分类号: Q 812

文献标识码: A

Screening and Mutagenesis of the Fibrinolytic Enzyme Producing Strain *Asperillus oryzae*

GAO Zhan-zheng, ZHAO Yun-lin

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A *Asperillus Oryzae* strain, SA-6 was isolated with different screening methods and the fibrinolytic enzyme activity was 25 U/mL. A mutant was then isolated after SA-6 was treated with UV, ^{60}Co and NTG and the relevant firbrinolytic enzyme activity was enhanced to 63 U/mL which was 1.52 times higher than that of SA-6. Comparing with the starting strain, the appearance time of the maximum fibrinolytic enzyme production of the mutant was delayed 10 hours.

Key words: fibrinolytic enzyme; *Asperillus Oryzae*; screening; mutagenesis

血栓病是严重危害人类健康的常见病、多发病,是死亡威胁最大的疾病之一,而且血栓病的发病率呈逐年增加的趋势。溶栓疗法是治疗血栓病的一种有效疗法,但是目前临床使用的溶栓剂存在特异性差,作用时间短,副作用大,价格昂贵等缺点^[1],因此寻找高效溶栓剂是国内外医学界重点攻关的内容之一。而目前发现的几种微生物来源的纤溶酶安全无毒副作用,易工业化等优点^[2],因此自从 1987 年日本学者从纳豆中发现纳豆激酶以

来,在研究人员寻找新的溶栓剂时,微生物来源纤溶酶一直是国内外学者研究的热点,到现在已经有很多研究者分别从枯草芽孢杆菌^[3]、根霉^[4]、黄青霉菌^[5]、脉胞霉^[6]中发现了纤溶酶。

米曲霉在食品工业及相关行业中应用广泛,而且其产物安全无毒,曾有人提出米曲霉能产生溶栓物质^[7],但是国内外尚未见到文献报道。本研究针对目前溶栓剂存在的不足,试图从几种酿造用的大曲中筛选出对人类有益的产新型纤溶酶的米曲霉,

收稿日期:2005-06-22; 修回日期:2005-09-23.

作者简介:高占争(1979-),山东济宁人,发酵工程专业硕士研究生.

万方数据

为开发新的纤溶酶提供理论基础。因此研究米曲霉生产纤溶酶,具有重要的学术和社会意义。

1 材料与方法

1.1 试剂

冻干牛血纤维蛋白原:购自上海莱士血制品有限公司;尿激酶、凝血酶:均购自珠海经济特区生物化学制药厂;牛血纤维蛋白:购自中国医药集团上海化学试剂公司;其他试剂均为国产分析纯或进口分装。

1.2 培养基

斜面培养基为:豆汁培养基(黄豆 10 g,浸泡过夜,煮沸 2 h,豆汁 100 mL,然后加入:蔗糖 3 g/dL,琼脂 1.5 g/dL, $MgSO_4$ 0.05%, K_2HPO_4 0.035%)。

平板初筛选培养基:在查氏培养基中加入 0.5%纤维蛋白。

发酵复筛培养基:麸皮 4 g/dL,豆饼粉 2 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,水 50 mL,pH 5.5。

1.3 样品中产纤溶酶米曲霉的分离与鉴定

将分离曲样放入灭过菌的三角瓶中,加入 25 mL 灭菌的生理盐水,震荡摇晃。然后稀释一定的梯度,取 0.2 mL 涂布在含有青霉素和脱氧胆酸钠的初筛培养基上,培养 3 d。对分离到的曲霉的进行鉴定^[8]。

1.4 筛选方法

初筛:米曲霉所产纤溶酶会使纤维蛋白溶解,在平板上会出现透明圈。在初筛平板上挑取透明圈直径与菌落直径之比(K)较大的米曲霉菌株。可以根据透明圈与菌落直径之比的大小,初步筛选高产菌株。

复筛:把初筛得到的菌株进行摇瓶发酵,温度为 30 ℃,摇床转速为 200 r/min,发酵 72 h,然后测定发酵液纤溶酶酶活。

1.5 纤溶酶酶活测定方法

1.5.1 纤维蛋白原平板法(方法Ⅰ) 酶活测定方法参照文献^[9-10],用凝血酶和纤维蛋白原做成纤维蛋白原平板,以尿激酶为标准品做标准曲线。然后把发酵液点于同样的纤维蛋白原平板上,反应完成后测量透明圈的面积。最后根据尿激酶标准曲线,计算出发酵液的酶活。测得的结果为相当于尿激酶的单位数。

1.5.2 纤维蛋白平板法(方法Ⅱ) 用同样量的纤维蛋白代替纤维蛋白原和凝血酶,做成纤维蛋白平板。把发酵液点于纤维蛋白平板上,反应完成后测

量透明圈面积。

1.6 诱变方法

1.6.1 紫外诱变 首先制备浓度约为 10^6 个/mL 的单孢子悬液,然后用紫外灯照射。紫外灯功率为 15 W,距离为 20 cm,时间为 2~15 min,并计算其致死率。

1.6.2 ^{60}Co 诱变 浓度为 10^6 个/mL 的单孢子悬液,照射剂量为 6×10^4 R、 8×10^4 R、 10×10^4 R、 12×10^4 R、 14×10^4 R,并计算其致死率。

1.6.3 亚硝基胍诱变 浓度为 10^6 个/mL 的孢子悬液 1 mL 与质量浓度为 1 mg/mL 亚硝基胍溶液 1mL 混合,作用 45 min。

2 结 果

2.1 产纤溶酶米曲霉的筛选与鉴定

2.1.1 产纤溶酶米曲霉的筛选与鉴定 先从初筛平板中挑取透明圈与菌落直径之比大的曲霉菌株,然后利用摇瓶复筛获得高产菌株。对筛选到的菌株进行培养观察和镜检。菌落形态:菌落初为白色,黄色,继而变为黄褐色,淡黄绿色。镜检:分生孢子头呈放射形,少有疏松柱状,分生孢子梗多为单层,少有双层,分生孢子洋梨形。根据菌落形态和镜检,初步鉴定分离到的菌株为米曲霉。

2.1.2 筛选结果 从样品中筛选出产纤溶酶的米曲霉菌株如表 1。从表 1 中可看出透明圈与菌落直径之比(K)大的菌株,其产纤溶酶活性较高。从酱油大曲中筛选出一株产酶活性最高的米曲霉菌株为 SA-6,其纤溶酶酶活为 25.0 U/mL。所以选择 SA-6 为出发菌株,进一步进行菌种改造。利用米曲霉所产纤溶酶会使纤维蛋白溶解,在平板上会出现透明圈的方法作为初筛方法,大大减少了工作量,增加了筛选的目的性和确定性。

表 1 筛选结果

Tab. 1 The result of screening

样品	菌株编号	K	纤溶酶酶活/(U/mL)
黄酒曲	SA-1	1.1	3.2
酱油大曲	SA-6	1.6	25.0
饲料	SA-1	31.2	8.5
面酱曲	SA-20	1.5	20.4
白酒米曲	SA-32	0	0

2.2 酶活测定方法

用方法Ⅰ测定出不同发酵液在纤维蛋白原平板上的透明圈面积,计算出酶活。同时用方法Ⅱ测

定出不同发酵液在纤维蛋白平板上的透明圈面积,如表 2。从表中可看出方法Ⅱ的透明圈面积随着酶活的增大而增大,透明圈面积的增大基本能反应出酶活增加的趋势,因此可以用方法Ⅱ中的透明圈面积大小来表示发酵液酶活的高低。虽然方法Ⅱ的准确性不如方法Ⅰ但是纤维蛋白比纤维蛋白原价格便宜很多,而且方法Ⅱ操作相对简单。

在诱变育种筛选菌株时,需要通过大量测定发酵液酶活,来筛选高产菌株,如果用价格很便宜纤维蛋白代替价格昂贵的纤维蛋白原和凝血酶,进行初筛,就可以大大减少纤维蛋白原的使用,节省很多试验经费。因此在菌株的大通量筛选过程中用方法Ⅱ测定酶活,具有很重要的意义。

表 2 方法Ⅰ和方法Ⅱ的比较

Tab. 2 The comparision between methodⅠ andⅡ

发酵液 编号	酶活/ (U/mL) (方法Ⅰ)	透明圈面积/ (mm ²) (方法Ⅰ)	透明圈 面积/(mm ²) (方法Ⅱ)
1	6.1	64	55
2	25.0	144	112
3	42.6	196	146
4	54.0	225	168
5	64.5	232	182
6	83.4	289	210

2.3 诱变育种

2.3.1 诱变的致死率的确定 计算不同照射时间下紫外线对米曲霉孢子的致死率,如图 1。从图 1 中看出紫外线照射 8 min 的米曲霉孢子的致死率约为 80%。在试验中发现致死率为 80%时正突变率为 42.7%,最高,所以选择紫外线照射时间为 8 min。

不同剂量下,⁶⁰Co 诱变的致死率曲线如图 2。⁶⁰Co 诱变照射剂量为 10×10⁴ R 时的致死率为 85%。此时正突变率最高,为 36.8%,所以选择⁶⁰Co 照射剂量为 10×10⁴ R。

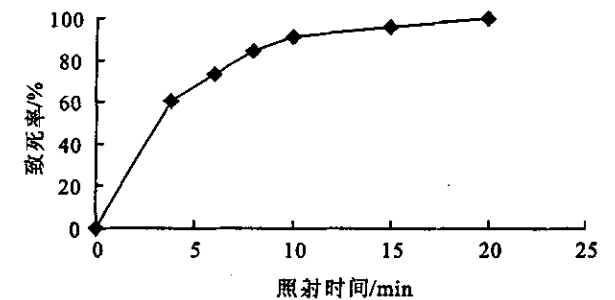


图 1 紫外线辐照时间对孢子致死率的影响

Fig. 1 The effect of UV radiation time on the death of spores

万方数据

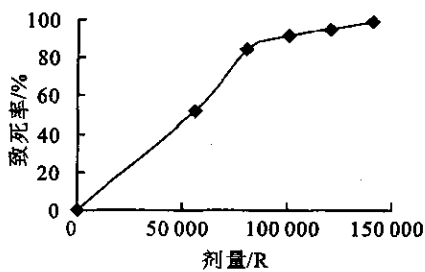


图 2 ⁶⁰Co 辐照时间对孢子致死率的影响

Fig. 2 The effect of ⁶⁰Co radiation time on the death of spores

2.3.2 紫外线诱变结果 菌株 SA-6 经过紫外线反复诱变后得到 4 株突变株,如表 3。从表中可看出突变株 UA-11 和出发株相比酶活提高幅度最大,为 64.8%。

表 3 紫外线诱变结果

Tab. 3 The screening result of UV mutation

菌株	纤溶酶酶活/(U/mL)	提高幅度/%
SA-6	25.0	
UA-8	32.8	31.2
UA-11	41.2	64.8
UA-25	28.3	13.2
UA-27	36.4	45.6

2.3.3 ⁶⁰Co 诱变结果 为了获得酶活更高的突变株,用⁶⁰Co 作为诱变剂,在剂量为 10×10⁴ R 条件下,对菌株 UA-11 诱变,部分结果如表 4。从表中看出突变株 GA-3 的酶活最高,比 UA-11 提高了 31.2%,是菌株 SA-6 的 2.16 倍。

表 4 ⁶⁰Co 诱变结果

Tab. 4 The screening result of ⁶⁰Co mutation

菌株	纤溶酶酶活/(U/mL)	提高幅度/%
UA-11	41.2	
GA-3	54.0	31.2
GA-9	52.7	27.9
GA-35	49.3	19.7

2.3.4 亚硝基胍诱变结果 用化学诱变剂亚硝基胍,对菌株 GA-3 诱变。从突变株筛选得到菌株 NA-25,其纤溶酶酶活为 63 U/mL,和菌株 GA-3 相比酶活提高 16.7%,是菌株 SA-6 的 2.52 倍。

2.4 NA-25 的遗传稳定性

NA-25 连续传接 6 次,然后同批发酵后,测酶活,结果如图 3。突变株 NA-25 遗传性状稳定。

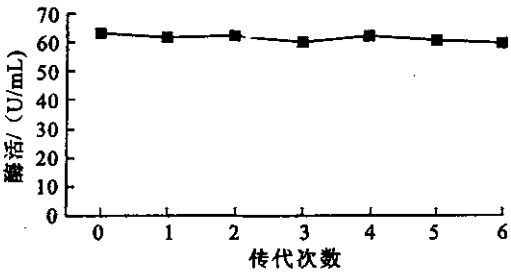


图 3 NA-25 菌株的传代试验

Fig. 3 The genetic stability of strain NA-25

2.5 NA-25 和 SA-6 发酵性状的比较

NA-25 和 SA-6 在发酵过程中 pH 值的变化和纤溶酶酶活的变化如图 4。

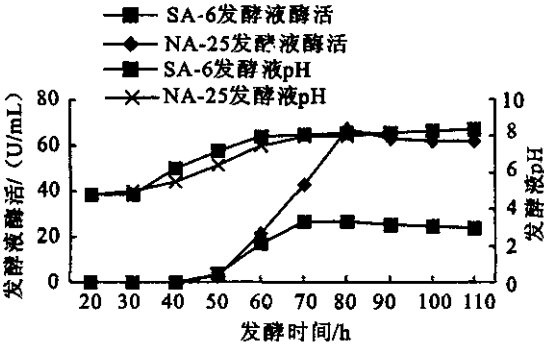


图 4 菌株 SA-6 和菌株 NA-25 发酵性状的比较

Fig. 4 The comparison of fermentation performance of strains SA-6 and NA-25

从图 4 中看到突变株 NA-25 的开始产纤溶酶

的时间与出发株 SA-6 基本一致,都是在发酵 40h 后开始的,而 NA-25 产酶高峰比 SA-6 迟了约 10 h。

SA-6 在 30 h 之后发酵液的 pH 开始升高, 60 h 后趋于平缓,到发酵后期 pH 基本不再变化。NA-25 在 30 h 之前发酵液的 pH 开始升高,到 70 h 后趋于平缓,从整个 pH 上升过程中来看 pH 的升高速度比出发株慢。这可能是突变株在产酶过程中氮源消耗比出发株慢。这会更利于发酵过程中发酵条件的控制。

3 结 论

利用米曲霉所产纤溶酶能溶解纤维蛋白,在平板培养基上出现透明圈作为初筛方法,从酱油大曲中筛选出产纤溶酶活性较高的米曲霉菌株 SA-6,纤溶酶酶活为 25 U/mL。SA-6 经紫外线反复诱变、⁶⁰Co 诱变和亚硝基胍诱变得到突变株 NA-25,其酶活为 63 U/mL 是出发株的 2.52 倍。突变株的发酵性状发生改变,其发酵产酶时间比出发株延长了 10 h,在产酶过程中 pH 升高速度变慢。

在诱变菌株筛选过程中用纤维蛋白代替纤维蛋白原和凝血酶测定发酵液酶活,用纤维蛋白的透明圈面积的大小显示酶活的高低,减少了价格昂贵的纤维蛋白原的使用,节省了试验费用。

参考文献:

[1] 应蓓文. 血栓溶解药研究进展[J]. 国外医学,1999,22(1):19-23.
[2] 齐海萍. 豆豉纤溶酶的酶学特性及功能性质研究[D]. 无锡:江南大学,2004:5-7.
[3] 焦洁,霍烽. 源于枯草溶栓酶得研究进展杆菌[J]. 科研动态,2003,(4):43-45.
[4] 路福平,杜连祥,杜冰,等. 微生物发酵生产纤溶酶的研究[J]. 天津轻工业学院报,1999,(1):5-9.
[5] EI-Aassar S A, EI-Bdry H M, Adel-Fattah A F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum*[J]. Appl microbial Botechnol, 1990,33(1):26-30.
[6] 许爱清,刘晓兰. 高产纤溶酶的脉胞霉的育种研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2003,19(4):5-7.
[7] 檀耀辉,陶文沂. 微生物学[M]. 北京:轻工业出版社,1988. 148-149.
[8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979. 496-497.
[9] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952,40:346-351.
[10] 郑延斌,路福平,杜连祥. 根霉纤溶酶 12# 纤溶酶活力单位的测定[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(1):45-47.

(责任编辑:杨 萌)