

原生质体紫外诱变选育纳豆激酶高产菌株

刘新梅², 高 宇¹, 董明盛^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095;

2.南京市产品质量监督检验所, 江苏 南京 210028)

摘 要: 以纳豆菌 B.N.K 为出发菌株, 在适宜条件下制备和再生原生质体, 并结合紫外线诱变筛选纳豆激酶高产菌株。经过原生质体紫外诱变的重复处理、摇瓶复筛和遗传稳定性试验, 最终得出 5 株高产菌株即 DU104、DU115、DU120、DU212、DU223, 酶活分别为 383.65、400.74、327.15、347.16、378.98 IU/ml, 比出发菌株 B.N.K 分别提高了 67.1%、74.5%、42.5%、51.2% 和 65.0%。

关键词: 原生质体; 诱变; 再生; 纳豆激酶

Screening High-yield Nattokinase Producing Strain by Protoplast Mutagenesis with UV

LIU Xin-mei², GAO Yu¹, DONG Ming-sheng^{1,*}

(1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2.Nanjing Inspection and Testing Institute of Products Quality, Nanjing 210028, China)

Abstract: Taking *Bacillus subtilis* natto B.N.K as initial strain, under the optimum conditions of formation and regeneration, the protoplast of the strain was prepared. The regenerative mutants from the protoplasts with UV mutagenic treatment were screened for strains of high nattokinase activity. After repetition of UV mutation, screening and gene stability assay of mutants, five strains, DU115, DU120, DU212 and DU223 were finally obtained. Their enzyme activity were 383.65, 400.74, 327.15, 347.16, 378.98 IU/ml respectively, separately increased by 67.1%, 74.5%, 42.5%, 51.2% and 65.0% respectively.

Key words: protoplasts; mutagenesis; regeneration; nattokinase

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)11-0069-04

去除了细胞壁的原生质体对外界环境非常敏感, 经物理、化学处理后极易发生突变, 利用原生质体作为出发材料进行诱变育种, 是一种行之有效的育种新技术^[1], 其已在抗生素、酶制剂、有机酸及维生素等高产菌株的选育中得到日益广泛的应用^{[2][7]}。

纳豆激酶(Nattokinase)是纳豆菌发酵产生的一种具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶。国内外研究表明, 在纤维蛋白平板试验、动物血栓模型试验和临床试验中, 纳豆激酶都表现了明显的溶栓作用。其通过食品发酵而来, 在胃肠环境中不会失活, 可通过消化道吸收, 不仅溶栓效率高、疗效时间长, 且安全可靠。将纳豆激酶开发成口服型溶栓药物及保健食品的前景广阔^[8]。本文对纳豆菌 B.N.K 菌株的原生质体进行紫外线诱变处理, 筛选出纳豆激酶产量明显提高的变异株, 并经多次传代证明其遗传稳定性, 可作为发酵的优良菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

纳豆菌 B.N.K 南京农业大学微生物实验室保藏菌种, 分离自日本纳豆样品。

1.1.2 主要培养基及溶液

肉汤培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, pH7.0~7.2;

PYG 培养基^[9]: 水解酪蛋白 5g, 酵母浸出汁 10g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 盐溶液 40ml (无水 CaCl₂ 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.48g, K₂HPO₄ 1.0g, KH₂PO₄ 1.0g, NaHCO₃ 10.0g, NaCl 2.0g, 蒸馏水 1000ml);

再生培养基: 于 PYG 培养基中加入 0.5mol/L 甘露醇, 0.5% 淀粉;

收稿日期: 2004-11-17

*通讯作者

基金项目: 国家 863 计划 (2002AA248041); 江苏高新技术研究项目 (BG2002322)

作者简介: 刘新梅 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。

高渗透压稳定剂(HM)^[10]: 葡萄糖 2.0g, 蔗糖 171.17g, NaCl 0.058g, MgCl₂·6H₂O 4.57g, NH₄Cl 1.0g, Tris 12g, KCl 0.035g, Na₂SO₄·10H₂O 0.3g, 蒸馏水 1000ml, pH7.5。

1.1.3 主要试剂

溶菌酶 南京生工进口分装 凝血酶 中国药品生物制品检定所; 纤维蛋白原 中国药品生物制品检定所 尿激酶 中国药品生物制品检定所 琼脂糖 南京生工进口分装。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备与再生^[10]

收集 37℃, 摇瓶培养 9h 的菌株, 分别用无菌蒸馏水和高渗液洗离一次后, 用 0.8mg/ml 溶菌酶, 30℃酶解 40min 制备原生质体, 将原生质体直接涂布于再生 PYG 培养基中再生, 原生质体制备率可达 98.2%, 再生率为 28.4%。

1.2.2 原生质体紫外诱变^{[7][10]}

将制备好的原生质体溶液, 调整浓度至 10⁶ 个/ml, 置于 6cm 培养皿中, 距 15W 紫外灯 20cm, 将紫外灯稳定 30min 后照射, 将照射后的原生质体适当稀释涂布再生平板, 用黑布包裹, 于 37℃ 恒温培养 48h, 计数再生菌落(B), 同时做不经紫外线处理的再生菌落计数(A), 计算诱变致死率。

$$\text{原生质体死亡率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

A

1.2.3 筛选

初筛: 从原生质体紫外诱变后的再生菌落中随机挑取生长旺盛的菌落于斜面 4℃ 保存。摇瓶培养基 37℃ 活化 24h(30ml/100ml 三角瓶)后, 按 2% 接种量接入发酵培养基中(30ml/100ml 三角瓶), 30℃ 摇瓶培养 72h, 测定发酵液中纳豆激酶纤溶活性。

复筛: 选取初筛中酶活较高的菌株, 斜面保存, 活化一次后, 以 2% 接种量, 接入发酵摇瓶中, 每种重复三瓶, 30℃, 摇瓶培养 72h, 测定发酵液中的酶活。

1.2.4 纳豆激酶纤溶活性测定^[11] 采用纤维蛋白平板法, 图 1 为纳豆激酶的标准曲线。

2 结果与分析

2.1 B.N.K 原生质体紫外诱变再生菌株的产酶性状

2.1.1 紫外线诱变剂量的确定

紫外线照射不同时间原生质体的致死曲线如图 2 所示; 紫外线照射不同剂量下原生质体的诱变情况如图 3 所示, 可知, 随着照射时间的延长, 负变率逐渐增大,

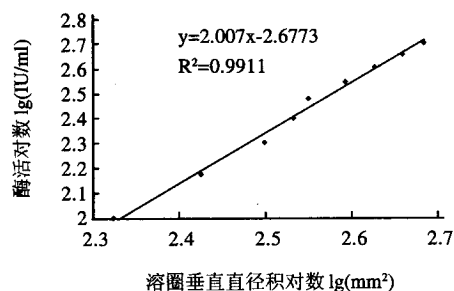


图 1 纳豆激酶标准曲线

Fig.1 Standard curve of nattokinase activity

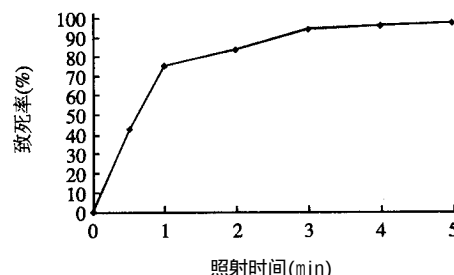


图 2 原生质体紫外诱变的致死曲线

Fig.2 Lethal curve of ultraviolet radiation for protoplast

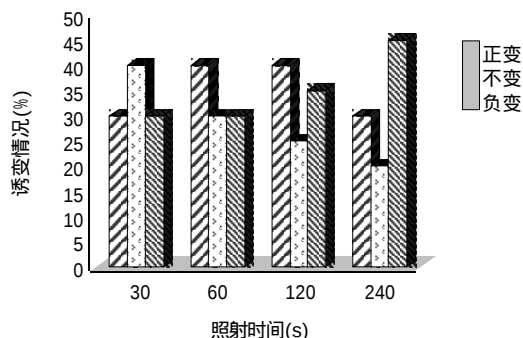


图 3 紫外照射剂量对原生质体的诱变效果

Fig.3 Effect of time of UV treatment on protoplasts

不变率逐渐降低。照射时间为 60s 和 120s 时正变率最高, 为 40%。虽然 120s 负变率比 60s 略升高, 但从产酶提高幅度考虑, 120s 获得高产菌株的可能性增大, 故综合考虑确定紫外照射 2min 为原生质体最佳诱变剂量, 此时致死率达 85%。

2.1.2 B.N.K 原生质体紫外诱变产酶结果

随机挑取紫外照射 30、60、120、240s 的再生菌落各 20 株, 共 80 株进行初筛, 发现菌株 UV103 和 UV212 酶活较高, 较出发菌株 B.N.K 分别提高了 44.1% 和 46.6%, 确定这两株菌为进一步诱变的出发菌株。

2.2 UV103、UV212 原生质体紫外诱变的产酶性状

将菌株 UV103、UV212 的原生质体液用紫外线分别照射 2min, 涂布再生平板, 各自挑取再生菌落 30 株,

以两出发菌株为对照检测产酶情况,选取产酶提高幅度在10%以上的18株菌,进行重复摇瓶复筛,以原始菌株B.N.K为对照,酶活测定结果如表1,发现DU101、DU104等10株菌的产酶能力明显提高。

表1 UV103、UV212 原生质体紫外诱变的产酶结果
Table 1 Nattokinase activity of regenerative mutants from UV treated prtoplasts of UV103 and UV212

编号	溶圈大小(mm ²)	酶活(IU/ml)	变化幅度(%)
CK--B.N.K	323.88	229.63	100
DU101	392.4	337.53	147.0
DU102	156.7	53.48	23.3
DU104	424.57	395.36	172.2
DU108	363.91	290.14	126.4
DU109	335.44	246.38	107.3
DU115	431.57	408.55	177.9
DU120	387.22	328.65	143.1
DU123	297.55	193.7	84.3
DU206	349.45	267.46	116.5
DU208	394.12	340.51	148.3
DU212	403.94	357.75	155.8
DU213	402.22	354.7	154.5
DU215	344.065	259.26	112.9
DU219	165.24	59.49	25.9
DU220	433.96	413.11	179.9
DU221	367.44	295.82	128.8
DU223	418.33	383.79	167.1
DU227	444.64	433.76	188.9

2.3 遗传稳定性分析

将DU101、DU104等10株菌连续传代7次,在相同的条件下发酵,测定每一代产酶活力,结果如表2所示,可见DU115、DU104、DU120、DU212、DU223的产酶活力基本稳定,说明此5株菌遗传性状稳定,可用于进一步的发酵实验。至此,通过原生质体诱变处理获得了五株高产菌株即DU104、DU115、DU120、DU212、DU223,酶活分别为383.65、400.74、327.15、347.16、378.98IU/ml,与出发菌株B.N.K相比酶活分别提高了67.1%、74.5%、42.5%、51.2%、65.0%。纤维蛋白平板测定结果如图4所示。

表2 传代结果比较
Table 2 Result of stability experiment

编号	1代	2代	3代	4代	5代	6代	7代
DU101	337.53	322.3	330.62	299.27	187.03	—	—
DU104	395.36	—	373.92	381.85	387.07	390.68	383.65
DU115	408.55	394.84	404.92	399.20	406.54	398.76	400.74
DU120	328.65	323.28	349.2	311.52	324.68	325.66	327.15
DU208	340.51	—	—	—	82.20	—	—
DU212	357.75	361.6	349.21	328.65	345.11	351.36	—
DU213	354.7	—	—	—	42.12	—	—
DU220	413.11	405.26	296.34	422.71	321.45	417.57	384.79
DU223	383.79	387.35	377.27	391.00	368.523	371.96	378.98
DU227	433.75	193.81	—	—	—	—	—

表中“—”表示未测定。



图4 变异株酶活测定

Fig.4 Nattokinase activity of mutants

3 讨论

本实验为筛选出纳豆激酶高产菌株,对B.N.K的原生质体同时采用了再生育种和紫外诱变育种,比较直接再生和紫外诱变后菌株的变异情况(见图5),发现直接再生菌株的不变率明显高于各经紫外诱变的菌株,而正变率低于紫外诱变的菌株,说明直接再生的菌株大部分为非变异菌株,仅少数发生了正变,表明直接再生虽可产生变异,但变异幅度较经紫外诱变的要小。故实验中采用经紫外诱变而得的变异幅度较高的菌株UV103、UV212作为进一步诱变的出发菌株。

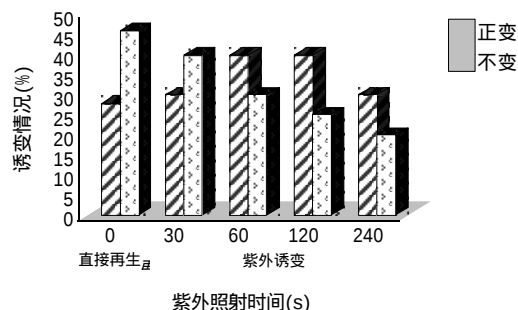


图5 直接再生株及紫外处理后原生质体再生株的变异情况

Fig.5 Difference of regenerative mutants with and without UV radiation

本实验采用了同一种诱变剂连续重复使用的诱变方法,比较两次紫外诱变结果发现,第二次诱变的正变率明显低于同样照射时间下的第一次的诱变结果,可能的原因是一种诱变剂本身对基因的诱变作用位点是有限的,且可能只作用于单一的位置,这样单一诱变剂的连续使用就极可能造成诱变效果的“钝化”,而使正变率下降^[1]。因此可考虑采用不同诱变机制的诱变剂交替处理,以动摇多种基因的稳定性,提高变异率。本实验只采用了单一紫外诱变的重复使用,可增加化学诱变剂的处理,产酶量有待于进一步提高。

荔浦芋淀粉的理化性质研究

沈钟苏¹, 陈全斌², 湛志华²

(1. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004;

2. 广西师范大学资源与环境学院, 广西 桂林 541004)

摘 要 本文从荔浦芋淀粉颗粒的形态大小及淀粉中直链与支链淀粉的比例, 淀粉的粘度和糊化温度等方面研究了荔浦芋淀粉的理化性质。从而得到一系列荔浦芋淀粉性质的参数: 淀粉颗粒形状为不规则多边形, 横径范围为 5.5~11.2 μm, 平均为 8.60 μm, 纵径范围 4.6~9.8 μm, 平均为 7.63 μm, 淀粉是由单一葡萄糖组成, 其直链淀粉含量约为总淀粉的 10.5%。其糊化温度为 92℃。

关键词: 荔浦芋淀粉; 淀粉; 理化性质

Study on the Physicochemical Characteristics of LiPu Taro Amylum

SHEN Zhong-su¹, CHEN Quan-bin², ZHAN Zhi-hua²

(1. Department of Chemistry and Chemical Industry, Guilin 541004, China

2. Department of Resources and Environmentology, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The physicochemical characteristics of LiPu Taro amyllum were studied from these respects: particle shape, particle size, the ratio of amylose to amylopectin, viscosity, dextrinizing temperature, and so on. Then, A set of parameters of LiPu Taro amyllum were got. The particle shape was unregular and polygon. The range of the lateral diameter was 5.50~11.20 μm with the average 8.60 μm; and the longitudinal diameter 4.60~9.80 μm with the average 7.63 μm. The amyllum was constituted by single glucose and the ratio of the amylose to amyllum was 10.5%. The dextrinizing temperature was 92℃.

Key words: LiPu Taro amyllum; physicochemical characteristic

中图分类号 TS235.5 Q539.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0072-04

收稿日期: 2004-11-30

作者简介: 沈钟苏(1952-), 男, 研究方向为天然有机化学。

参考文献:

- [1] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学(第二版)[M]. 科学出版社, 2003. 289-341.
- [2] 崔大鹏, 石莲英. 原生质体再生与诱变在硫霉素产生菌选育中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(4): 265-268.
- [3] 薛林贵, 冯清平. 紫外诱变原生质体选育碱性蛋白酶高产菌株的研究[J]. 兰州大学学报, 1997, 33(2): 72-78.
- [4] 王跃军, 等. 产低温碱性蛋白酶黄杆菌YS-9412-130的复合诱变原生质体选育[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(4): 20-25.
- [5] 张国政, 等. 紫外线诱变原生质体己酸高产菌株的选育[J]. 天津轻工业学院学报, 1999, (3): 16-19.
- [6] 程鲁榕, 等. 紫外线诱变原生质体选育核黄素高产菌株[J]. 微生物学通报, 1993, 20(1): 19-21.
- [7] 王弘, 等. 紫外诱变原生质体选育赖氨酸高产菌株[J]. 生物工程学报, 1990, 6(1): 32-38.
- [8] 段智变. 纳豆的功能及纳豆激酶肠道吸收免疫组织化学定位研究[D]. 南京农业大学博士论文, 2003.
- [9] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 中国轻工业出版社, 1998.
- [10] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合(第一版)[M]. 黑龙江科学技术出版社, 1990.
- [11] 刘诚. 纳豆激酶液体发酵条件及其酶学稳定性研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2000.