

豆豉溶栓酶产生菌 *Bacillus subtilis* LD-8547 的诱变选育

袁 军, 李国良, 沈榕强, 庄振宏, 杨燕凌

(福建农林大学 生命科学学院 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福建 福州 350002)

摘要: 为了通过诱变筛选获得豆豉溶栓酶高酶活菌株。研究以豆豉溶栓酶产生菌株 *Bacillus subtilis* LD-8547 为出发菌株, 分别通过紫外线诱变和硫酸二乙酯的复合诱变, 根据奶粉平板和血粉平板上菌落透明圈的大小进行初筛和复筛。并采用四肽底物测定法进行了溶栓酶的酶活力测定。结果表明, 通过实验获得了产豆豉溶栓酶活力达 18 228 U/mL 的 LD-8547-25 菌株, 比诱变出发菌株的酶活力提高了 107%。为豆豉溶栓酶高酶活菌株的诱变筛选提供了有益的试验数据。

关键词: 溶栓酶; 紫外诱变; 硫酸二乙酯; 诱变育种

中图分类号: Q939.123; TS201 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1251-05

Mutation of *Douchi* Fibrinolytic Enzyme Producing Strain *Bacillus subtilis* LD-8547

YUAN Jun, LI Guo-liang, SHEN Rong-qiang,
ZHUANG Zhen-hong, YANG Yan-ling

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to obtain the strain producing *Douchi* fibrinolytic enzyme with higher activity. *Douchi* fibrinolytic enzyme producing strain *Bacillus subtilis* LD-8547 was treated by ultraviolet radiation and DES. After screening, a strain with high fibrinolytic enzyme activity was obtained. After five generations of the mutant, its ability to produce the enzyme was still stable. And the catalytic activity of the mutation was 18 228 U/mL approximately all the time, 1.07 times higher than that of the wild strain.

Key words: fibrinolytic enzyme; ultraviolet mutation; ethyl sulfate mutation; mutation breeding

近年来, 心血管疾病, 包括高血压、冠心病、动脉粥样硬化和急性心肌梗死已经发展成为了威胁人类健康的头号敌人^[1]。其中, 血栓的形成是心血管疾病的重要诱发因素之一。

当前, 在实际预防和治疗血栓疾病上采用的药物主要有溶栓类药物^[2]、抗血小板类药物^[3]以及抗凝血类药物^[4]。鉴于药品安全问题, 食品来源的溶栓酶成为了目前溶栓类药物研究的热点, 豆豉溶栓酶就是其中的一枝独秀。

豆豉是一种中国古代流传下来的传统食品, 经大豆或黄豆发酵制得, 历史悠久。根据中国药典上的记载, 豆豉具有健脾开胃、消食化痰、去除伤寒以及预防血栓形成等功效^[5]。自 1987 年日本科研人员 Sumi H

收稿日期: 2012-07-25 修回日期: 2012-10-19

基金项目: 福建省科学技术厅自然科学基金资助项目(2011J05049)和福建省教育厅科技计划项目(JA10101)

作者简介: 袁军(1979—), 女, 讲师, 博士, 主要从事蛋白质工程和微生物分子生物学研究 E-mail: yjmail2008@126.com。

从纳豆中分离培养出第一株产纳豆激酶(Nattokinase)的枯草芽孢杆菌开始,溶栓酶资源的开发、利用逐渐受到了我国广大学者的关注,陆续从豆豉中分离筛选出多株豆豉溶栓酶(Douchi fibrinolytic Enzyme, DFE)产生菌,并且对其发酵液提取物的溶栓性能进行了初步的研究^[6-7],发现其具有较高纤溶活性,并且在酶学特性和生物学功能上与日本的纳豆激酶有很大的相似之处^[8],具有很大的研究和应用价值。

在前期工作中,本实验室从豆豉中筛选获得了一株溶栓酶的产生菌^[9],为了提高其产酶能力,本研究利用紫外线照射和硫酸二乙酯处理的复合诱变技术对产溶栓酶的 *Bacillus subtilis* LD-8547 的诱变效应进行了初步研究。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株 本研究采用本实验室前期从豆豉中筛选获得的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* LD-8547)作为诱变的出发菌株。

2.1.2 试剂 底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 为 NEB 公司产品;胰蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司;硫酸二乙酯及实验中使用的其他试剂均为国产分析纯。

2.1.3 主要设备、仪器 TH2-C 台式恒温振荡器购自江苏省太仓市华美生化仪器厂;高速冷冻离心机(Centrifuge 5804 R)为德国 eppendorf 公司产品;自动多功能酶标仪(KHB ST-360)购自上海智华医学精密仪器有限公司;电热恒温水槽(DK-8D 型)购自上海森信实验仪器有限公司;GNP-9160 型隔水式恒温培养箱为上海精宏实验设备有限公司生产;恒温磁力加热搅拌器(85-2 型)为江苏荣华仪器制造有限公司产品。

2.1.4 培养基 LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,加超纯水定容至 1 L。固体 LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉 10 g,加超纯水定容至 1 L。发酵培养基:大米粉 2%,豆粕粉 4%,CaCl₂ 0.04%,K₂HPO₄ 0.4%,KH₂PO₄ 0.2%,MgSO₄ 0.07%,pH 调至 7.5~7.6。初筛培养基:LB 培养基+牛奶粉 10%。复筛培养基:LB 培养基+猪血粉 0.2%。

2.2 方法

2.2.1 猪血粉的制备 取新鲜猪血,自然凝结成块,将其打碎,放入 50℃ 烘箱烘干,用研钵研碎,过 100 目筛,制成猪血粉。

2.2.2 豆豉溶栓酶的活性测定 本实验中采用四肽底物法测定豆豉溶栓酶的活性。

(1) 豆豉溶栓酶标准曲线的制作。将对硝基苯胺标准品配制成为不同的 10 个浓度梯度(0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 mol/L),并从每个浓度中各取 100 μL 检测其 OD 值,然后计算获得该体系中对硝基苯胺的物质的量,并推算出在 1 mL 的酶液中所产生的对硝基苯胺的物质的量,将其按照酶活的定义折算成酶活力,绘制出酶活力作为纵坐标,OD 值作为横坐标的溶栓酶活性检测的标准曲线,见图 1。

(2) 酶活测定。将提取的 1 μL 豆豉溶栓酶酶液加入 50 μL 的 1 mmol/L 四肽底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 溶液中,再补加反应缓冲液使终体积达 100 μL,放置于 37℃ 孵育 1 min,然后测定在单位时间内 405 nm 处光吸收值的变化。将 1 min 内转化该四肽底物生成 1 μmol 对硝基苯胺的豆豉溶栓酶量定为 1 U。

2.2.3 诱变处理方法 (1) 菌悬液的制备。用接种环取斜面种子接种到 LB 液体培养基中,在 37℃,180 r/min 条件下培养 12 h。由预实验获得的该菌的生长曲线可知,在 12 h 时该菌开始进入对数生长

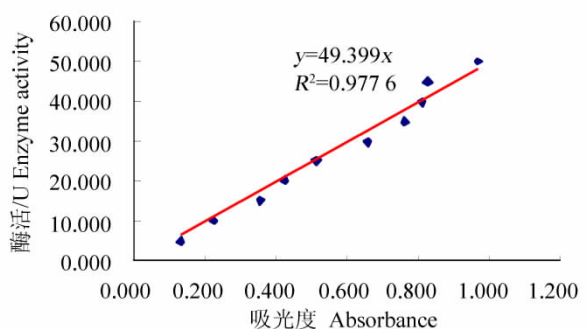


图 1 溶栓酶活性测定标准曲线

Fig. 1 The standard curve of the activity of fibrinolytic enzyme

期,收集此时生长旺盛的菌体制备菌悬液。将摇床培养过的 LB 液体培养基放入 4 ℃ 冰箱中进行同步培养 1 h。将同步培养后的菌液 3 000 r/min,离心 15 min 后去上清,用无菌的生理盐水将菌体洗涤 2 ~ 3 遍,制成诱变所需的菌悬液。并采用显微镜直接计数法计数,将细胞浓度调整为 10⁸/mL。

(2) 紫外诱变处理。取 10 mL 上述菌悬液置于无菌培养皿中,并加入无菌的磁力搅拌棒,将培养皿放在磁力搅拌器上,利用紫外灯进行直接照射处理(30 W,距离 30 cm,预热 30 min),处理时间分别为 1、3、5、7、9、11、15 min,然后在红灯下分别取经紫外处理和未经紫外处理(对照)的菌悬液各 100 μL 进行梯度稀释后涂布于初筛平板上,每个梯度分别设 3 个重复。用黑布包裹培养皿,于 37 ℃ 培养 24 h,观察、记录菌落的生长状况。

(3) 硫酸二乙酯(DES)诱变处理。取 DES 原液 0.4 mL 于灭菌试管中,加入少量乙醇使其溶解,再加入 pH7.2 的磷酸缓冲液 19.6 mL,配成体积分数为 2% 的溶液。取以上 DES 溶液和紫外诱变后获得的高产菌株菌悬液等量(V:V=5:5)加入到无菌试管内混合,最后处理溶液为 1%,在一定温度下,分别振荡处理 20、40、60 min。诱变处理结束后加入 2% Na₂S₂O₃ 0.5 mL 终止反应。取处理后的菌悬液各 0.1 mL 进行梯度稀释后涂布于初筛培养基平板上。

(4) 致死率计算。致死率 = $\frac{(\text{活菌数对照组}/1 \text{ mL 菌液} - \text{活菌数诱变组}/1 \text{ mL 菌液})}{\text{活菌数对照组}/1 \text{ mL 菌液}} \times 100\%$

(5) 初筛。把经过诱变的菌株涂布于初筛培养基上,将菌落周围能够产生透明圈的菌株筛出,作为后续复筛使用菌株。

(6) 复筛。将初筛培养基上能产生透明圈的菌株接到复筛平板上,每皿接种 4 ~ 6 株,放置 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,观察、记录菌落生长状况和菌落周围透明圈的变化。

2.2.4 摇瓶发酵方法 将在初筛、复筛培养基上筛选出来的可产生透明圈的单菌落分别转接到 LB 液体培养基中,置于恒温振荡培养箱中,37 ℃,180 r/min 条件下扩大培养约 12 h。再按 6% ~ 8% 的接种量将培养好的菌液转接到液体发酵培养基中,32 ℃,180 r/min,振荡培养 72 h。摇瓶发酵后,按参考文献所述方法进行溶栓酶的提取^[10]。

2.2.5 遗传稳定性试验 对所筛选到的高产菌株连续传代培养 5 代,测定其产酶能力的稳定性情况。传代培养选择用固体 LB 培养基平板划线。最后挑取菌株摇瓶发酵,测定其酶活。

3 结果与分析

3.1 紫外诱变

在自然界中,微生物也会发生自然突变,但频率较低。采用诱变剂能够有很好的效果,但要注意考虑其致死剂量。实验结果表明,紫外线诱变对该菌诱变时,该菌株对紫外线并不特别敏感,处理

3 min 仍有 39.74% 的存活率。但随着诱变时间的增长致死率逐渐增高,11 min 已经有 90% 以上的致死率,15 min 达到 99% 致死率(表 1)。根据诱变育种致死率在 90% ~ 99.9% 有利于正突变产生的原则,同时为保证较高的筛选几率,确定最佳照射时间为 9 min(图 2)。最后从初筛培养基中挑取透明圈面积与菌落面积之比较大的 10 株菌株,进行复筛。

表 1 紫外线诱变对菌株的影响

Tab.1 Effect of UV treatment on the strain

照射时间/min Time	菌株存活率/% Livability	致死率/% Lethality
3	39.74	60.26
5	23.08	76.92
7	17.95	82.05
9	10.26	89.74
11	6.59	93.41
15	0.17	99.83

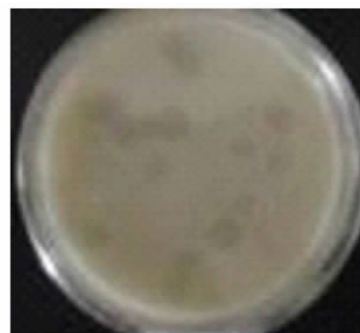


图 2 紫外诱变初筛平板

Fig.2 Preliminary screening after UV mutation

表 2 紫外诱变复筛菌株发酵液粗酶液酶活

Tab.2 The enzyme activity of mutant after UV mutation

菌株编号 Strain	吸收值 OD_{405nm}	酶活/(U · mL ⁻¹) Enzyme activity	相对出发菌株的酶活力/% Relative activity compared to original strain
LD-8547(CK)	0.178	8 793.02	100
LD-8547-1	0.167	8 249.63	93.82
LD-8547-2	0.226	11 164.17	126.97
LD-8547-3	0.196	9 682.2	110.11
LD-8547-4	0.183	9 040.02	102.81
LD-8547-5	0.169	8 348.43	94.94
LD-8547-6	0.194	9 583.41	108.99
LD-8547-7	0.107	5 285.69	60.11
LD-8547-8	0.148	7 311.05	83.15
LD-8547-9	0.177	8 743.62	99.44
LD-8547-10	0.188	9 287.01	105.61

通过复筛平板,发现其中一株 2 号菌透明圈面积与菌落面积的比值最大,为 2.56。通过摇瓶发酵,测定其粗酶液的酶活后发现 2 号菌株(LD-8547-2)酶活最高,达 11 164.17 U/mL(表 2),为出发菌株 *B. subtilis* LD-8547 的 1.26 倍。一般认为菌株酶活提高或降低 10% 可以认为其发生了突变,所以该菌株被选为复合诱变的菌株,继续诱变。

3.2 硫酸二乙酯诱变

硫酸二乙酯诱变实验结果表明,随着诱变时间的延长,菌株的致死率越来越高(表 3)。由于硫酸二乙酯本身是不稳定的烷化剂,据文献报道其 30 °C 时半衰期为 1 h^[11],所以诱变时间有一个临界值,一般不超过 1 h 的诱变时间。本实验最后确定硫酸二乙酯合适的诱变条件为 2% ,处理 1 h。菌株 LD-8547-2 经硫酸二乙酯诱变后平均透明圈面积与

菌落面积的比值有所增大(图 3),从其中筛选出 10 株比值较大的菌株,进一步进行摇瓶发酵,最后测定粗酶液的酶活。从表 4 可以看出,经过硫酸二乙酯诱变后,5 号菌株(LD-8547-25)酶活最高,达到 18 228.23 U/mL,为出发菌株 *B. subtilis* LD-8547-2 的 1.63 倍,是原始菌株 *B. subtilis* LD-8547 酶活力的 2.07 倍。

3.3 遗传稳定性试验

对该高产菌株连续传代发酵培养 5 代,测定其产酶能力的稳定性情况发现,其每代产酶能力均保持 94.6% 以上。证明该菌株性状比较稳定,可稳定遗传。

4 小结与讨论

采用诱变育种是选育高产突变株行之有效的方法。本实验选用紫外线诱变和硫酸二乙酯复合诱变

表 3 硫酸二乙酯诱变结果

Tab.3 Effect of DES treatment on the strain

处理时间/min Time	菌株存活率/% Livability	致死率/% Lethality
20	46.99	53.01
40	36.15	73.85
60	28.92	81.08

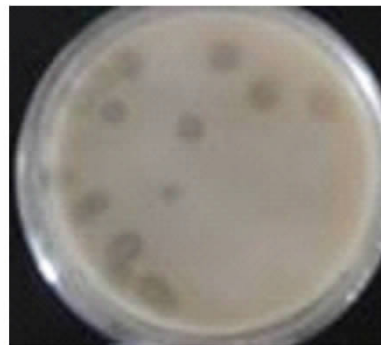


图 3 硫酸二乙酯诱变的初筛结果

Fig.3 Preliminary screening after DES mutation

表 4 硫酸二乙酯诱变复筛菌株发酵液粗酶液酶活
 Tab. 4 The enzyme activity of mutant after DES mutation

菌株编号 Strain	吸光值 OD_{405nm}	酶活/($U \cdot mL^{-1}$) Enzyme activity	与出发菌株的相对酶活力/% Relative activity compared to original strain	与紫外诱变菌株相对酶活力/% Relative activity compared to UV induced strain
出发菌株 D-8547 CK1	0.178	8 793.02	100	78.76
紫外诱变菌株 LD-8547-2(CK2)	0.226	11164.17	126.97	100
LD-8547-20	0.353	17 437.85	198.31	156.19
LD-8547-21	0.276	13 634.12	155.06	122.12
LD-8547-22	0.262	12 942.54	147.19	115.93
LD-8547-23	0.216	10 670.18	121.35	95.58
LD-8547-24	0.358	17 684.84	201.12	158.41
LD-8547-25	0.369	18 228.23	207.30	163.27
LD-8547-26	0.273	13 485.93	153.37	153.37
LD-8547-27	0.253	12 497.95	142.13	111.95
LD-8547-28	0.231	11 411.17	129.78	102.21
LD-8547-29	0.218	10 768.98	122.47	96.46

进行高产溶栓酶菌株的选育。其中紫外诱变主要是利用紫外线照射形成嘧啶二聚体而造成生物 DNA 的损伤,从而产生基因突变^[12]。而硫酸二乙酯是一种化学诱变剂,可以使 DNA 中部分碱基发生烷基化,改变 DNA 分子结构,用于高产优质菌株的筛选效果显著^[13-14]。突变有正向和反向之分,初筛能够将那些完全不产生透明圈的明显负突变菌株去除。复筛中采用猪血粉培养基,其好处主要在于有颜色的区别,产溶栓酶的菌株能够分解血块,产生透明圈,利于筛选。从报道的研究结果来看,传统的诱变方法在微生物育种中依然有很好的效果^[15]。但诱变时,单因素诱变有诱变局限,微生物能够产生相应的对抗诱变剂的机制,适应环境。因此,本实验采用复合诱变法,经紫外线作用 9 min,2% 的硫酸二乙酯诱变处理 60 min 后,最终筛选出一株豆豉溶栓酶高产菌株,是出发菌株产酶活力的 2.07 倍。此诱变方法可使该菌株遗传特性发生改变,提高产酶活性,为溶栓酶的开发奠定了基础。此外,从测定酶活的数据可以看出,经过复合诱变的菌株的酶活也有可能低于单因素诱变的菌株产酶的酶活,甚至低于出发菌株的酶活。所以无论物理、化学诱变都是不定向的,更为合适的筛选方法还有待进一步探索。

参考文献:

- [1]Cheng T W, Bao P J, Bo L, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33: 750 - 753.
- [2]万林峰. 溶栓类药物对人类血管的影响研究[J]. *医学信息*, 2011, 7: 3295 - 3296.
- [3]冯芳, 李静, 李希, 等. 中国缺血性脑卒中患者抗血小板药物的应用现状[J]. *临床神经病学杂志*, 2012, 25(3): 161 - 164.
- [4]张立夏. 抗血栓药物概况[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(15): 454 - 456.
- [5]中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1995: 289.
- [6]姜琼, 陆云华, 熊曼萍. 豆豉纤溶酶研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(17): 5075 - 5114.
- [7]阎家麒, 童岩. 豆豉纤溶酶的纯化及其性质研究[J]. *药物生物技术*, 2000, 7(3): 149 - 152.
- [8]张新. 豆豉纤溶酶的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(20): 6008 - 6010.
- [9]Wang S H, Zhang C, Yang Y L. Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24: 475 - 482.
- [10]杨菁. 枯草芽孢杆菌 LD-8547 溶栓酶溶栓效果初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [11]施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 139 - 142.
- [12]豆孝伟, 陈桂光, 张云开, 等. 豆豉溶栓酶产生菌株的诱变育种[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(3): 33 - 38.
- [13]温拥军, 冯刚利, 鄢东. 紫外线与硫酸二乙酯复合诱变选育酸性蛋白酶高产菌株[J]. *酿酒科技*, 2011, 5: 50 - 52.
- [14]由田, 宋刚, 凌红志, 等. 果胶酶高产菌株的紫外线及硫酸二乙酯的诱变育种[J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(5): 69 - 72.
- [15]刘少斌, 卢育新, 韩莉莉. 硫酸二乙酯对纤维堆囊菌的诱变育种[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(1): 61 - 62.