

ARTP诱变法提高蜡状芽孢杆菌中壳聚糖酶的产量

张朝正, 李 意, 赵 华

ARTP Mutagenesis Improves the Production of Chitosanase in *Bacillus cereus*

ZHANG Chaozheng, LI Yi, and ZHAO Hua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040172>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高浓度壳聚糖溶液酶解条件优化

Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of high concentration solution of chitosan

食品工业科技. 2018, 39(7): 126-131

阿魏酸对大肠杆菌和蜡状芽孢杆菌产组胺的影响

Effect of ferulic acid on histamine-producing by *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*

食品工业科技. 2018, 39(8): 113-118

常压室温等离子体快速诱变选育高产单宁酶菌株

The rapid mutant strains of high tannase yield obtained by atmospheric and room temperature plasmas

食品工业科技. 2017(04): 225-230

微波强化壳聚糖固相酸降解研究

Study of Microwave Enhanced Solid-state Acid Degradation of Chitosan

食品工业科技. 2021, 42(2): 6-11

特定聚合度区间壳寡糖的膜分离制备技术

Separation of Chitooligosaccharides with Specific Degree of Polymerization by Membrane Separation Technology

食品工业科技. 2019, 40(22): 163-168,174

响应面法优化微波辅助果胶酶制备壳寡糖的工艺

Optimization of Microwave Assisted Enzymatic Preparation Process of Chitooligosaccharides by Response Surface Method

食品工业科技. 2018, 39(20): 146-150



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张朝正, 李意, 赵华. ARTP 诱变法提高蜡状芽孢杆菌中壳聚糖酶的产量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 141-146. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040172

ZHANG Chaozheng, LI Yi, ZHAO Hua. ARTP Mutagenesis Improves the Production of Chitosanase in *Bacillus cereus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 141-146. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040172

ARTP 诱变法提高蜡状芽孢杆菌中 壳聚糖酶的产量

张朝正, 李意, 赵华*

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 利用常温常压等离子体诱变 (Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP) 蜡状芽孢杆菌, 筛选获得酶活提升的菌株。结果表明, 蜡状芽孢杆菌在种子液中培养 6 h 可达到对数期中后期, 常温常压等离子体诱变时间为 60 s 时, 蜡状芽孢杆菌的致死率达到 85%, 筛选得到一株壳聚糖酶活性提高 13.19% 的突变株, 然后进行酶活稳定性验证, 经六代培养的平均酶活为 9.643367 U/mL, 波动在 5% 之内, 表明其产酶量高, 稳定性强, 可用于后续出发菌株。诱变后菌株经电镜观察, 发现菌落形态无明显变化, 但是菌株的个体形态发生了变化, 比原始菌株细长, 证明酶活提高是 ARTP 诱变起到的作用。

关键词: 壳寡糖, 壳聚糖酶, 常温常压等离子体诱变, 酶活, 蜡状芽孢杆菌

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)01-0141-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040172



本文网刊:

ARTP Mutagenesis Improves the Production of Chitosanase in *Bacillus cereus*

ZHANG Chaozheng, LI Yi, ZHAO Hua*

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) *Bacillus cereus* was used to screen the strains with increased enzyme activity. The results showed that culturing *Bacillus cereus* in the seed solution for 6 hours could reach the middle and late logarithmic phase. When the mutagenesis time of normal temperature and atmospheric pressure plasma was 60 s, the lethality of *Bacillus cereus* reached 85%. A mutant strain with a 13.19% increase in chitosanase activity was screened. Then the stability of the enzyme activity was verified. The average enzyme activity after six generations of culture was 9.643367 U/mL, and the fluctuation was within 5%, indicating that its enzyme production was high and the stability was strong, and it could be used for subsequent starting strains. After the mutagenesis, the strain was observed by electron microscope, and it was found that the morphology of the colony did not change significantly, but the individual morphology of the strain had changed, and it was slenderer than the original strain, which proved that the increase in enzyme activity was the effect of ARTP mutagenesis.

Key words: chitooligosaccharides; chitosanase; atmospheric and room temperature plasma; enzyme activity; *Bacillus cereus*

甲壳素 (Chitin) 是地球上仅次于纤维素, 第二丰富的生物聚合物。其来源非常广泛, 常存在于昆虫和无脊椎动物的外骨骼和甲壳动物的壳肥料中, 在食品、农业、废水处理、纺织工业、纳米技术、医疗材料等方面被广泛使用^[1-2]。但是, 甲壳素由于缺乏溶解度和高度有序的晶体结构等原因, 其应用受到限制。甲壳素解聚之后得到壳聚糖, 壳聚糖在医药、化妆

品、纺织印刷、食品等各个领域也都有广泛的应用^[3-4]。但是由于壳聚糖的分子量大, 溶解性差和溶液黏度大等问题, 限制了其在一些方面的应用, 壳聚糖和甲壳素均有溶解性差且不易被人体吸收的缺点, 不过壳寡糖却克服了这些缺点^[5-7], 因此开发一种成本低、可工业化和高效生产壳寡糖的工艺, 是当前研究的重点。

收稿日期: 2021-04-26

作者简介: 张朝正 (1977-), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向: 生物工程, E-mail: zhangchaozheng@tust.edu.cn。

* 通信作者: 赵华 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: zhaohua@tust.edu.cn。

如今,传统工艺制备壳寡糖均存在过程难以控制和无特异性等缺点,且会对环境造成一定程度的污染。利用酶降解法制备壳寡糖具有污染小^[8-9]、过程易控、反应条件温和、得率高等优点^[10],但由于目前壳聚糖酶的价格较高,因此得到一株高产壳聚糖酶的菌株是制备壳寡糖的首要任务。大量的研究已经筛选到很多可以产壳聚糖酶的菌株,但这些野生菌株的壳聚糖酶产量均偏低,难以实现工业生产^[11-12]。如今,大量研究利用基因工程技术对不同菌株的壳聚糖酶基因进行异源表达,宿主基本为大肠杆菌和酵母^[13-16]。

常温常压等离子体诱变(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)是一种在大气压条件下,利用非平衡放电等离子体源的技术^[17-18]。利用ARTP处理,DNA会被化学活性物质破坏,而非高温、紫外线、带电粒子或强电场^[19-20]。ARTP是一种新型物理诱变技术,具有比传统诱变更高的突变率^[21],多样性诱变体和无污染等特点^[18,21-24],同时还能保持较低的处理温度。因此,在微生物突变中的使用越来越广泛^[25-26]。

本文采用ARTP诱变野生型菌株蜡状芽孢杆菌提高壳聚糖酶酶活,较基因工程技术具有操作简便、突变率高、无污染等优点,是一种新型的物理诱变技术。本研究通过测其生长曲线先确定蜡状芽孢杆菌对数期中后期的时间,再测定ARTP的最佳致死率时间,对蜡状芽孢杆菌进行诱变,筛选酶活提高的菌株。经稳定性验证后,再通过电镜观察诱变菌株的形态变化,为以后的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

磷酸氢二钾、氯化钠、葡萄糖 分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;吐温-80 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;酵母浸粉 生物试剂,国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钾、硫酸镁 分析纯,天津市化学试剂一厂;蛋白胨 生物试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;酒石酸钾钠 分析纯,天津市百世化工有限公司;亚硫酸钠、3,5-二硝基水杨酸溶液 化学纯,国药集团化学试剂有限公司;苯酚 分析纯,天津市光复精细化工研究所。

ARTP-II 常压室温等离子体诱变系统 北京思清源生物科技有限公司;Bioscreen-C 全自动生长曲线分析仪 芬兰 OY Growth Curves;场发射扫描电子显微镜,FEI Apreo HIVac, Czech;ELX800 酶标仪 基因有限公司;ZWYR-D2401 恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 培养基和溶液

种子培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,NaCl 5 g/L,葡萄糖 10 g/L,pH 为 6.5,121 ℃ 灭菌 20 min。

发酵培养基:酵母浸粉 16 g/L,葡萄糖 11.5 g/L,吐温-80 1.2 g/L, K_2HPO_4 1.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1.2 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, NaCl 5 g/L, pH 为 6.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1% 胶体壳聚糖溶液:量取 1 g 壳聚糖粉末(脱乙酰度 $\geq 90\%$)于烧杯中,取 20 mL 蒸馏水倒入烧杯,室温静置 2 min 使其溶胀,然后倒入 30 mL 0.2 mol/L 的醋酸溶液中,搅拌至透明后,再加入 0.2 mol/L 的醋酸钠溶液,调节 pH 至 5.5,再用蒸馏水定容至 100 mL。

3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂:甲液:称取 6.9 g 结晶苯酚溶解于 15.2 mL 10% 的 NaOH 溶液中,稀释至 69 mL,在此溶液中加入 6.9 g 亚硫酸钠。乙液:称取 255.0 g 酒石酸钾钠,加到 300 mL 10% 的 NaOH 溶液中,再加入 1% 的 3,5-二硝基水杨酸溶液 880 mL。将甲乙溶液混合,棕色瓶中室温下暗处放置一周后使用。

1.3 实验方法

1.3.1 蜡状芽孢杆菌生长曲线的测定 为得到处于对数生长中后期的菌株种子发酵液,将保藏在天津科技大学微生物菌种保藏管理中心,编号为: TCCC 150018 的蜡状芽孢杆菌接种到 50 mL 种子培养基中,30 ℃、160 r/min 摇瓶培养,每隔 1 h,测定种子液的 $OD_{600\text{ nm}}$ 。

1.3.2 菌悬液的制备 将在 4 ℃ 冰箱平板上保存的菌株活化后,再接入 50 mL 种子培养基中,在 30 ℃、160 r/min 的摇床中培养 6 h,在 8000 r/min 条件下,离心 5 min,去除上清液,收集菌体,生理盐水清洗 2~3 次后,再用生理盐水稀释菌液浓度为 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL,用平板计数法测定菌液浓度。

1.3.3 菌株诱变 吸取 10 μ L 1.3.2 所制菌液,均匀涂于载片表面,利用无菌镊子将载片放于 ARTP 系统操作室的旋转台上的对应孔位,调整照射距离 2 mm,气流量 10 L/min,输出功率为 100 W,进行诱变,分别处理 0、10、20、30、40、50、60 和 70 s,诱变结束后,将载片放置于装有 1 mL 无菌生理盐水的 1 mL 离心管中,剧烈振荡,将菌液洗脱下来,稀释适当的倍数,分别取 200 μ L 涂布于种子液固体培养基上,每个梯度做三个平行,进行活菌计数,计算致死率,并获取致死曲线,致死率公式如下^[27]:

$$\text{致死率}(\%) = \frac{T-A}{T} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式(1)中: T 为 ARTP 处理 0 s 时的菌落数(未处理的总菌落数); A 为 ARTP 处理后存活的菌落数。

1.3.4 诱变菌株的筛选 根据致死率曲线选择最佳照射时间进行试验^[28],将诱变后的菌液载片置于 50 mL 发酵培养基中摇匀,接于两块 100 孔微孔板中,每孔接 200 μ L,将微孔板置于全自动生长曲线分析仪中^[29],培养 48 h,选择 $OD_{600\text{ nm}}$ 差值大的微孔,吸取 100 μ L,按照 1.3.5 所示的方法测量所选择微孔的酶活,得到酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$ 较高的孔。

将酶活较高的微孔中剩余的 100 μ L 菌液,均匀涂布于种子培养基的平板上,30 ℃ 培养 24 h,再根据

平板上菌落的形态大小, 挑选一些单个菌落保存, 然后对所挑选菌株, 再次进行酶活验证实验, 利用发酵培养基, 160 r/min, 30 ℃ 摇瓶培养 72 h, 得到高产酶活的菌株。

1.3.5 壳聚糖酶活力的测定方法 空白组: 将 0.9 mL 缓冲液和 0.1 mL 上清酶液混合在沸水浴中 10 min 进行灭酶处理, 然后加入 1 mL 1% 胶体壳聚糖放在 35 ℃ 水浴 15 min,

反应组: 将 0.9 mL 缓冲液、0.1 mL 上清酶液和 1 mL 1% 胶体壳聚糖放在 35 ℃ 水浴 15 min, 然后沸水浴中 10 min,

将空白组和反应组混合后室温离心 8000 r/min 5 min, 取 2 mL 离心液与 2 mL DNS 试剂反应, 沸水浴 5 min, 然后冷却, 最后定容至 25 mL, 以空白组为对照, 测反应组 $OD_{490\text{ nm}}$ [30]。

1.3.6 酶活标准曲线的绘制 蜡状芽孢杆菌发酵液以 8000 r/min 离心 5 min 去除菌体, 取上清液即发酵粗酶液, 按照 1.3.5 的方法, 取稀释后的 0.1 mL 发酵粗酶液测定发酵液的酶活力。测量反应组和空白组 $OD_{490\text{ nm}}$, 通过计算差值, 根据氨基葡萄糖标准曲线计算还原糖, 再根据酶活力定义 [31], 测定发酵粗酶液的酶活力, 从而绘制酶活的标准曲线 [32-33]。

1.3.7 稳定性验证实验 将筛选得到的高产菌株连续传代培养 6 代, 对该突变株进行遗传稳定性分析, 并将各代进行相应的种子培养和发酵培养, 通过比较每代壳聚糖酶酶活力变化, 测定菌株的遗传稳定性。

1.3.8 菌株电镜观察 为观察单个突变菌株和原始菌株在形态大小方面的差异, 需使用电镜观察其形态结构。操作方法如下: 将突变株和原始菌株在种子培养基中培养 6 h, 在 8000 r/min 下, 离心 5 min, 收集菌体, 使用无菌水清洗 3 次以上, 再使用 25% 的戊二醛固定菌体, 在 4 ℃ 冰箱中放置 4 h。再使用酒精进行梯度洗脱, 先使用 30%、50% 和 70% 的酒精各浸泡 10 min, 离心, 再使用 80% 和 90% 的酒精浸泡 8 min, 离心, 最后使用 100% 的酒精浸泡 5 min, 将菌悬液滴至盖玻片 (4~6 mm²) 上, 挥发干燥后, 最后喷金使用电镜观察。

1.4 数据处理

各实验设置三个平行, 数据以“平均值±标准偏差”表示, 试验数据采用 Microsoft Excel 2019 数据处理系统进行整理及分析。

2 结果与分析

2.1 酶活的标准曲线

根据上述 1.3.5 和 1.3.6 的方法以酶活 Act 为纵坐标, $OD_{490\text{ nm}}$ 值为横坐标, 绘制标准曲线, 并进行回归分析, 得到如图 1 所示的回归方程和 R^2 , $R^2=0.9994>0.999$, 所以此回归方程可用于测定溶液中的酶活。

2.2 蜡状芽孢杆菌生长曲线

蜡状芽孢杆菌的生长曲线如图 2 所示, 前 8 h

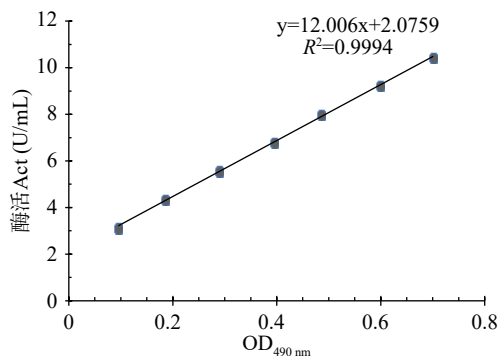


图 1 酶活的标准曲线

Fig.1 The standard curve of enzyme activity

是对数生长期, 8~12 h 是生长周期的稳定期, 其中 6~8 h 是对数生长的中后期, ARTP 诱变需要收集处于对数期中后期的菌液, 6~8 h 的菌液符合对数期中后期要求, 因此, 选择第 6 h 的菌液作为 ARTP 实验对象。

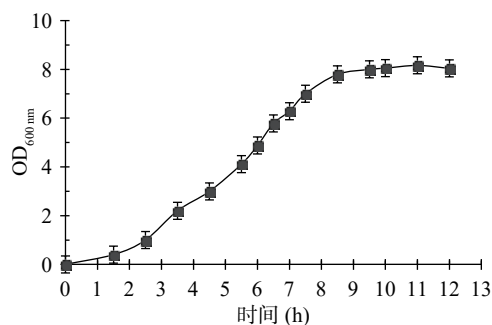


图 2 蜡状芽孢杆菌生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Bacillus cereus*

2.3 致死率曲线

利用 ARTP 诱变蜡状芽孢杆菌致死率曲线如图 3 所示, 随着诱变时间的增加, 菌株致死率逐渐上升。当菌株在照射时间为 30 s 和 50 s 时, 出现致死率下降的现象, 推断原因可能是菌体自身的修复机制作用, 使菌体修复了 ARTP 所造成的损伤 [34]。当照射时间为 60 s 时, 菌株的致死率达到 85% 左右, 70 s 时菌株存活率几乎为零, 有研究表明, 在一定的处理条件下, 孢子的致死率在 70%~85% 之间时 [35], 正突变率较高, 随着孢子致死率的增加, 正突变率逐渐降低而负突变率急剧上升, 无法达到筛选优良目

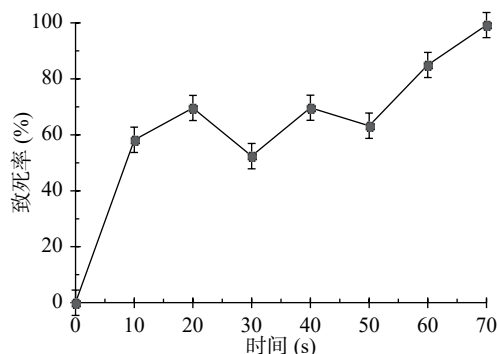


图 3 致死率曲线

Fig.3 Curve of lethality rate

的,故本实验重点选用致死率在70%~85%菌种为筛选菌种。且在此突变率下回复性更小^[36],所以选择60 s作为ARTP的照射时间。

2.4 诱变菌株的筛选

菌株发酵壳聚糖酶的产量与菌株的浓度有着密切联系,因此在进一步诱变处理后,根据高密度培养所得的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,选择了 $OD_{600\text{ nm}}$ 增加值较大的30个孔,吸取100 μL 发酵液测定酶活,计算出酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$,并根据酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$ 的大小降序排列,如表1所示。

根据表1所示,将这30个孔中酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$ 值最大的六个孔,即202、129、115、221、113和188六个微孔,涂布于种子培养基平板上培养,使孢子发芽、生长并且大量繁殖菌丝体,使诱变后的菌体长得更加粗壮,活力强^[37]。培养6 h后,在选择这六个孔中分别挑选菌落大小、与形态大小不同的菌株,进行酶活验证实验,结果如表2所示。0号菌株为原菌株,其他为所挑选的诱变之后的菌株,可以明确地看到仅有202-1一株菌株的酶活较原菌株高。经测定,ARTP诱变之前,原始菌株的酶活为8.3581 U/mL,诱变后,酶活提高到9.4606 U/mL,较原菌株酶活提

高了13.19%。有研究用紫外诱变菌株,在紫外照射100 s时生产壳聚糖酶,菌株的产酶活力最高为8.92 U/mL;用DES诱变菌株处理50 min生产壳聚糖酶,菌株壳聚糖酶活最高达到8.12 U/mL^[38]。可以发现ARTP诱变可以有效地改变菌株的酶活。还有研究利用ARTP诱变黑曲霉以提高产单宁酶的能力^[39],通过ARTP提高菌株葡萄糖氧化酶的产量^[40],这些研究可以发现,ARTP诱变技术还可以有效地改变不同酶的酶活。

2.5 突变株稳定性分析

以防此突变株在传代过程中发生菌株“衰退”的情况,所以进行突变稳定性的分析。对编号202-1菌株进行传代培养,用种子培养基斜面连续培养6代。将每代菌株制成种子液,接种到发酵培养基中摇瓶发酵,发酵培养之后,结果如图4所示。该菌株进行传代试验之后,测定其酶活力,传代1~6次的酶活分别为9.6345、9.2578、9.8158、9.7349、9.3157和10.1015 U/mL,这六代培养的平均酶活为9.643367 U/mL,波动在5%之内,由此可以看出该菌株能稳定产酶。

由图4可知,壳聚糖酶活力出现上下波动的趋

表1 突变菌株的筛选

Table 1 The mutant strains screening

孔	$OD_{600\text{ nm}}$	酶活(U/mL)	酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$	孔	$OD_{600\text{ nm}}$	酶活(U/mL)	酶活/ $OD_{600\text{ nm}}$
202	3.509±0.012	3.728676±0.0032	1.0626±0.012	142	3.500±0.011	3.320143±0.0033	0.9486±0.011
129	3.515±0.012	3.716221±0.0031	1.0572±0.012	196	3.514±0.012	3.330107±0.0032	0.9477±0.012
115	3.524±0.013	3.591668±0.0033	1.0192±0.013	189	3.506±0.011	3.311424±0.0030	0.9445±0.011
221	3.509±0.012	3.548074±0.0030	1.0111±0.012	109	3.498±0.012	3.105912±0.0032	0.8879±0.012
113	3.505±0.015	3.535619±0.0031	1.0087±0.015	182	3.558±0.013	3.037408±0.0033	0.8537±0.013
188	3.517±0.011	3.492026±0.0035	0.9929±0.011	116	3.523±0.011	2.975131±0.0032	0.8445±0.011
126	3.515±0.012	3.485798±0.0031	0.9917±0.012	295	3.675±0.012	3.093456±0.0031	0.8418±0.012
121	3.538±0.011	3.485798±0.0032	0.9852±0.011	284	3.516±0.014	2.956448±0.0032	0.8409±0.014
207	3.505±0.015	3.435977±0.0032	0.9803±0.015	275	3.599±0.012	2.975131±0.0031	0.8267±0.012
131	3.505±0.015	3.429749±0.0033	0.9785±0.015	122	3.504±0.015	2.881717±0.0034	0.8224±0.015
242	3.557±0.012	3.454660±0.0031	0.9712±0.012	233	3.547±0.011	2.906627±0.0030	0.8195±0.011
138	3.503±0.013	3.392383±0.0033	0.9684±0.013	246	3.531±0.011	2.887944±0.0031	0.8179±0.011
276	3.531±0.012	3.398611±0.0032	0.9625±0.012	245	3.526±0.013	2.869261±0.0033	0.8137±0.013
212	3.500±0.010	3.342562±0.0033	0.955±0.010	104	3.503±0.012	2.844351±0.0030	0.8120±0.012
117	3.505±0.012	3.342562±0.0031	0.9537±0.012	193	3.510±0.014	2.638838±0.0035	0.7518±0.014

表2 突变株摇瓶发酵复筛

Table 2 The mutants strains in shake flask screening

编号	$OD_{600\text{ nm}}$	酶活(U/mL)	编号	$OD_{600\text{ nm}}$	酶活(U/mL)
0	3.368±0.014	8.3581±0.0031	129-3	3.426±0.013	3.3655±0.0031
113-1	3.356±0.013	5.2745±0.0033	129-4	3.424±0.011	4.1878±0.0032
113-2	3.635±0.013	6.6940±0.0032	202-1	3.465±0.010	9.4606±0.0032
113-3	3.914±0.011	4.3249±0.0033	202-2	3.449±0.012	3.3459±0.0033
113-4	3.976±0.012	7.2521±0.0032	202-3	3.433±0.011	5.8913±0.0032
113-5	3.708±0.013	5.9011±0.0031	202-4	3.408±0.013	3.2578±0.0033
113-6	3.556±0.011	5.0200±0.0031	188-1	3.506±0.012	6.7626±0.0031
115-1	3.428±0.014	3.0326±0.0030	188-2	3.574±0.010	6.7528±0.0033
115-2	3.438±0.011	4.2368±0.0030	221-1	3.428±0.011	4.0997±0.0031
129-1	3.411±0.012	3.0228±0.0032	221-2	3.847±0.013	2.1417±0.0034
129-2	3.444±0.011	4.3640±0.0032	221-3	3.429±0.014	5.0591±0.0032

注:每个孔的菌株数量不一样,所以将其其中的各个菌株进行编号。113孔有六个菌株,故113-1是113孔的第一个菌株,113-2是113孔的第二株菌株……113-6是113孔的第六株菌株。

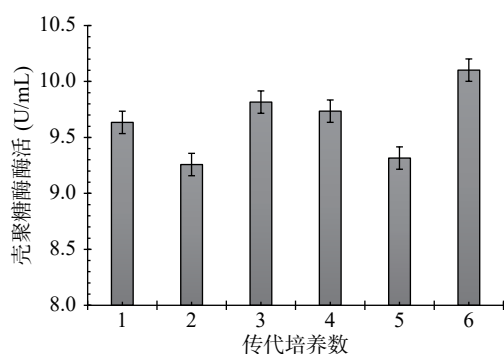


图 4 突变株遗传稳定性

Fig.4 Genetic stability of mutant strains

势,在第 2 代、第 5 代下降较为明显,而在第 3 代、第 6 代明显提高,可能是由于菌体自身的正负调控基因的修复机制^[34]。筛选的编号 202-1 菌株,在连续传代 6 次的酶活较稳定。说明该菌株在传代的过程中具有良好的遗传稳定性,从工业化生产的角度分析,该菌株可保证在生产过程中壳聚糖酶产量的稳定性,即在相同条件下该菌株产酶性能不变。因此,编号 202-1 具有产酶量高,稳定性强的特点,可用于后续的出发菌株。也有研究利用 ARTP 诱变对番茄枯萎病有拮抗作用的枯草芽孢杆菌,经过 6 次传代,获得番茄枯萎病高效拮抗突变株,证实该突变株具有良好的遗传稳定性^[26]。因此用 ARTP 诱变技术对培育突变菌株具有遗传稳定性。

2.6 菌株电镜观察

微生物的突变株往往伴随菌落形态的变化^[41],图 5(a)为菌株的菌落划线图,图 5(b)、图 5(c)分别为原始菌株和突变菌株单个菌体的电镜扫描图。突变株和原始菌株的菌落形态均为图 5(a)所示,菌落形态呈白色圆形状,表面光滑具有粘性。图 5(b)、图 5(c)所示分别为原始菌株和突变菌株的电镜扫描图,两张电镜扫描图进行比较,单个原始菌株长

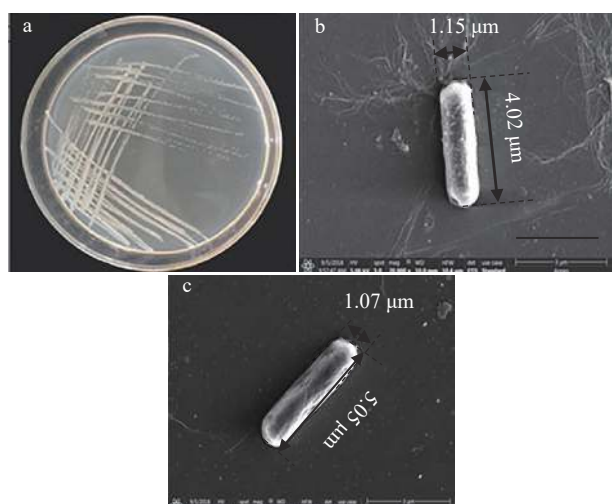


图 5 蜡状芽孢杆菌菌株形态

Fig.5 *Bacillus cereus* strain morphology

注: a 菌落形态; b 原始菌株电镜扫描; c 突变株电镜扫描。

4.02 μm , 宽 1.15 μm , 单个突变菌株长 5.05 μm , 宽 1.07 μm , 突变菌株的单个菌株较原始菌株更加细长。虽然从菌落形态没有发现明显变化,但是从电镜扫描图可看出 ARTP 对菌体的个体形态造成了明显变化。研究表明,大多数的突变菌株比原始出发菌株偏大,而菌株的大小说明了突变株的生长速度^[41],突变菌株比原始菌株偏大,生长速度也较快。

3 结论

本研究采用 ARTP 诱变野生型菌株蜡状芽孢杆菌提高壳聚糖酶酶活,较基因工程技术具有操作简便,突变率高和无污染等优点,是一种新型的物理诱变技术。本研究以生长 6 h 的蜡状芽孢杆菌为基础菌株,在 ARTP 诱变 60 s 时,其致死率可达到 85%,诱变得一株酶活提高了 13.19% 的菌株。然后进行酶活稳定性验证,经六代培养的平均酶活为 9.643367 U/mL,波动在 5% 之内,表明其产酶量高,稳定性强。最后对菌株进行电镜观察,发现诱变菌株的个体形态发生变化,较初始菌株细长,证明菌株的生长速度变快,同时也表明酶活提高是 ARTP 诱变起到的作用。

参考文献

- [1] BROEK L A M, BOERIU C G. Chitin and chitosan: Properties and applications[M]. John Wiley & Sons, Ltd: 2019-12-31.
- [2] ZHANG W B, CHEN S. New progress in chitin/chitosan extraction and its application[J]. Journal of Fuqing Branch of Fujian Normal University, 2008(2): 18-25.
- [3] EL A, GHAOUTH, A J, et al. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits[J]. Journal of Food Processing & Preservation, 1991, 15(5): 359-368.
- [4] HE W Y, TIAN L, FANG F et al. Limited hydrolysis and conjugation of zein with chitosan oligosaccharide by enzymatic reaction to improve functional properties[J]. Food Chemistry, 2021, 348(prepublish): 129035-129035.
- [5] ZHAO Q, XIE Q X, XU H Y, et al. Research on the antibacterial properties of oligochitosan[J]. China Brewing, 2021, 40(3): 44-47.
- [6] FERNANDEZ D C L, MENGIBAR M, et al. Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2016, 73: 368-374.
- [7] XIONG A J, ZHANG Z Y, ZOU X H, et al. The biological functions of oligochitosan and its application in livestock production[J]. Animal Husbandry and Veterinary Today, 2020, 36(11): 64-66.
- [8] SUN C S, WANG S, WANG Y D, et al. Research progress on the functional properties of chitoooligosaccharides[J/OL]. Food Industry Science and Technology: 1-15 [2021-04-09]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090280>.
- [9] KIM, SE K. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives; biological activities and applications[M]. Continuous Production of Chitoooligosaccharides by Enzymatic Hydrolysis, 2010.
- [10] YU Y, LIU X F, MIAO J K, et al. Preparation and quality

- identification of Antarctic krill chitosan and chitosan oligosaccharide[J/OL]. Food Industry Science and Technology: 1–15 [2021-04-09]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100096>.
- [11] HU Y L, HONG W, TAN G X. Screening and identification of chitosanase-producing strains[J]. Journal of South-Central University for Nationalities(Natural Science Edition), 2016, 35(2): 42–45.
- [12] LIU Y, ZHAO H, ZHENG Y Y, et al. Screening, identification and fermentation conditions optimization of chitosanase-producing strains[J]. China Food Additives, 2017(2): 106–111.
- [13] YUAN J Q, LIANG S, SUN Y X, et al. Progress in the preparation and biological activity of chitosan oligosaccharides[J]. Chemistry of Life, 2019, 39(4): 759–765.
- [14] CHEN X, CHAO Z, KANG L, et al. High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*[J]. 2012, 34(4): 689–694.
- [15] CHENG G, JIAO S M, FENG C, et al. *Pichia pastoris* expression of *Bacillus amyloliquefaciens* chitosanase and its hydrolysis to prepare controllable chito-oligosaccharides[J]. Food Science, 2019, 40(8): 73–78.
- [16] DOAN C T, THI N T, VAN B N, et al. Production of a thermostable chitosanase from shrimp heads via *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032 conversion and its application in the preparation of bioactive chitosan oligosaccharides[J]. Marine Drugs, 2019, 17(4): 217.
- [17] LI H P, SUN W T, WANG H B, et al. Electrical features of radio-frequency, atmospheric-pressure, bare-metallic-electrode glow discharges[J]. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2007, 27(5): 529–545.
- [18] ZHANG X, ZHANG X F, LI H P, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [19] LI G, LI H P, WANG L Y, et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(22): 221504.
- [20] WANG L Y, HUANG Z L, LI G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851–858.
- [21] GAO Y D, LIU Y, GUO R, et al. The effect of ARTP mutagenesis on the enzymatic properties of chitosanase produced by *Bacillus cereus*[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(3): 1–7.
- [22] REN S X. ARTP mutagenesis and gene-directed modification to select strains with high stable adenosine production[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2017.
- [23] ZHANG X, ZHANG C, ZHOU Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma(ARTP) and conventional mutagenesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5639–5646.
- [24] LAROUCSI M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects[J]. Ieee Transactions on Plasma Science, 2002, 30(4): 1409–1415.
- [25] LAROUCSI M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art[J]. Plasma Processes and Polymers, 2005, 2(5): 391–400.
- [26] ZHANG X Q, ZHANG X X, YANG C L, et al. ARTP mutagenesis and screening of a *Bacillus subtilis* antagonistic to tomato fusarium wilt[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(26): 44–49.
- [27] CHRISTOPH O, MARGARETE N, JIN C W. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): The latest development[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 1–14.
- [28] DUAN S F, HUANG Y N, WANG J B, et al. Atmospheric pressure and room temperature plasma mutagenesis and breeding of high nitrogenase activity *Azotobacter chroococcus*[J]. China Agricultural Science and Technology Review, 2021, 23(5): 194–201.
- [29] ZHU Y L. Research on the experimental method for determination of bacterial growth curve[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(5): 108–112.
- [30] ZHANG Y Q, ZHANG J, CHANG H Y, et al. A new method for high-sensitivity determination of chitosanase activity and its comparative study[J]. Food Science, 2013, 34(9): 277–281.
- [31] ZHANG H F. On the definition of enzyme activity unit[J]. Research on Scientific Terminology, 2005(1): 38.
- [32] GAO L Y. A rapid glucose oxidase activity determination method and application effect research[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2017.
- [33] LI P W, LIU Y, LI R R, et al. Comparison of two methods for determination of glucose oxidase activity[J]. Food Industry Science and Technology, 2013, 34(12): 71–75,80.
- [34] JANION C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Sciences, 2008, 4(6): 338–344.
- [35] SHAO S J. Study on the mutation and breeding of rennet-producing mold and its enzymatic properties[D]. Changchun: Jilin University, 2011.
- [36] LIN Y, BRIGEN K, SUN J, et al. Screening of lactic acid bacteria and ARTP mutagenesis of high acid-producing strains[J/OL]. Food and Fermentation Industry: 1–8 [2021-06 -19]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026545>.
- [37] CHANG X C, HAN Y D, CHEN C, et al. Optimization of new fermentation technology for *Bacillus subtilis*[J]. Feed Research, 2019, 42(2): 48–50.
- [38] WANG H B, LI Y Q, WU K, et al. Screening and mutation breeding of high-producing chitosanase strains[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(14): 8212–8214.
- [39] XIONG J, WU X Y, QIU S Y, et al. Rapid mutagenesis and breeding of high-yield tanninase strains by normal pressure and room temperature plasma[J]. Food Industry Science and Technology, 2017, 38(4): 225–230.
- [40] FAN X L, XIAO C J, GU Q Y, et al. ARTP mutagenesis to select high-yield glucose oxidase strains and optimization of fermentation conditions[J]. Industrial Microorganisms, 2015, 45(1): 15–19.
- [41] LIANG J G, GU Q Y, QIN X D, et al. Breeding of high-yield nuclease P1 strain using atmospheric pressure room temperature plasma(ARTP) mutagenesis[J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(21): 183–186.