

产维生素 K₂ 黄杆菌复合诱变及发酵优化

檀沐 赵根海 刘会 李哲敏 孙小雯 郑之明

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室 合肥 230031)

摘要 利用亚硝基胍(NTG)和低能氮离子束(N⁺)注入复合诱变方法,获得产维生素 K₂ 黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)菌株,并对突变菌株发酵条件进行优化,进一步提高黄杆菌产维生素 K₂ 的能力。确定最佳诱变条件为:NTG 处理浓度 0.8 mg/mL,处理时间 20 min; N⁺离子注入能量 15 keV, 80 (2.6×10¹³ cm⁻²),突变菌维生素 K₂ 产量为 6.12 mg/L,较原始菌株提高了 159%。突变菌传代 6 次,维生素 K₂ 产量稳定。进一步优化突变菌发酵条件,确定最优发酵条件为:温度 37 °C、起始 pH=7.0,装液量 30 mL/250 mL,接种量 2%、摇床转速 120 r/min,发酵后 72 h 添加 3 mg/mL 花生衣(*Arachis hypogaea*)作为诱导物,优化后的菌株维生素 K₂ 产量较优化前提高 31%。

关键词 黄杆菌,亚硝基胍,氮离子注入,维生素 K₂

中图分类号 TQ924, TL99, Q68

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.040401

自然界中的维生素 K 包括 VK₁(Phylloquinone, 叶绿醌)和 VK₂(Menaquinone, 甲萘醌类)两种形式, VK₁ 主要由植物产生, VK₂ 主要由微生物产生^[1]。VK₂ 是一类具有相同 2-甲基-1,4-萘醌环不同长度侧链的系列衍生物^[2],由于异戊二烯侧链在 C-3 上的长度不同, VK₂ 可以分为 14 种,分别以 MK-*n* 表示(其中 *n* 表示侧链异戊二烯单位数)。在细菌中, VK₂ 参与电子传递、氧化磷酸化等代谢途径。研究表明, VK₂ 对人体凝血、骨骼代谢与心血管疾病治疗有一定的功效^[3-4]。此外,其对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制作用^[5]。近期研究发现,作为电子载体, VK₂ 还可能用于治疗线粒体类病理如帕金森症和侧向肌肉萎缩等^[6]。

VK₂ 生产以化学合成法为主,微生物发酵法生产 VK₂ 仍处于起步阶段^[7]。常规的微生物菌种选育诱变手段包括亚硝基胍(NTG)诱变、空气等离子体诱变、γ 射线诱变等。低能 N⁺离子注入是 20 世纪末在我国兴起的一种人工诱变育种方式,它具有突变率高、对损伤程度较小、突变谱广,并且有一定的方向性等特点^[8]。通过对生物体注入低能离子,会产生能量交换、沉积、电荷交换和质量沉积 4 大效应,诱变后出现典型的“马鞍形”曲线^[9-10]。国内

外对微生物法产维生素 K₂ 的研究主要对象是大肠杆菌和纳豆芽孢杆菌^[11-13],对产维生素 K₂ 黄杆菌的研究甚少,在国内尚未见有课题组以黄杆菌为对象研究维生素 K₂ 的代谢。黄杆菌中, VK₂ 主要以 MK4 和 MK6 两种形式存在。早期学者通过 NTG 和紫外诱变得得到抗 1-羟基-2-萘甲酸、高产 MK6 的黄杆菌 HNA 250-15,再通过松萝酸等物质的筛选,得到高产 MK4 和 MK6 的突变菌 K3-15^[14]。田口久贵等^[15]以 K3-15 为亲株,进行磺胺类药物(对维生素 K₂ 合成途径中芳香族化合物的合成产生抑制作用)的抗性诱变,得到的诱变菌株 SP0736 产维生素 K₂ 的能力又进一步提高,包括产量的提高及脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸酶等酶活的提高,该菌株生理活性较强。Yoshiki 等^[16]通过对脑膜炎败血性黄杆菌进行 1-羟基-2-萘甲酸抗性诱变,得到一株除了产 MK6 以外还产 MK5 的菌株 HNA 12-D。除了诱变,在产维生素 K₂ 黄杆菌发酵过程中,非离子型去垢剂被添加到培养基中^[17],目的是为了使胞内大量积累的 MK4 渗漏到细胞外,但这种促进剂添加的方法不太利于后期产物的分离与提纯,对工业化生产造成一定的工作量,因此诱变和发酵水平的优化是目前改善黄杆菌产维生素 K₂ 的主要手段。而对于任何

基金资助: 863 国家高技术研究发展计划(2014AA021704)和安徽省自然科学基金(1308085MA07)资助

第一作者: 檀沐, 女, 1991 年 2 月出生, 目前为中国科学院合肥物质研究院技术生物与农业工程研究所 2012 级硕士研究生, 生物物理学, E-mail: dmt_wiko01@163.com

通讯作者: 郑之明, 研究员, E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn

收稿日期: 初稿 2015-04-20; 修回 2015-05-06

菌种而言,长时期采用某种单一诱变会导致其产生“疲劳效应”,还会因为多轮处理使得菌株的生长代谢速率降低、产物含量减少等^[18],因此,需要研究多种方式复合诱变以提高诱变效果和产量。本研究采用 NTG 和低能氮离子束注入方法对黄杆菌进行复合诱变,经过筛选处理,得到产维生素 K₂ 能力有所提高的突变菌株,并对突变菌株发酵条件进行优化进一步提高产量,为实现发酵法生产维生素 K₂ 打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器

黄杆菌(*Flavobacterium* sp.),由本实验室保存,命名 SP-1。斜面及平板培养基(g/L):Lab-Lemco Powder 1,酵母提取物 2,蛋白胨 5,NaCl 5,pH=7.4±0.2;种子培养基(g/L):Lab-Lemco Powder 1,酵母提取物 2,蛋白胨 5,NaCl 5,琼脂 15,pH=7.4±0.2;初筛培养基:在平板培养基中加入 1-羟基-2-萘甲酸(HNA) 200 mg/L;摇瓶发酵培养基(g/L):甘油 20,鱼粉蛋白胨 10,酵母提取物 1.5,K₂HPO₄ 4.5,NaCl 3,MgSO₄·7H₂O 0.3,pH=7.0。

离子束注入机,中科院合肥物质研究院;P270 普通摇床,中国科学院武汉科学仪器厂;恒温摇床,武汉瑞华仪器设备有限公司;高效液相色谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌种培养

种子悬液培养:从提供的保存斜面上取一环黄杆菌接种于摇瓶种子培养基,在 37℃、200 r/min 振荡培养 24 h。发酵培养:往 250 mL 的三角瓶内加入发酵培养基 50 mL,接种量体积分数为 5%,在 37℃、120 r/min 振荡培养 6 d。

1.2.2 亚硝基胍诱变

取适量培养好的黄杆菌种子悬液,加入适量质量浓度 1 mg/mL 的 NTG 溶液,分别配成不同终浓度,在 37℃ 下保温。30 min 后转移到低温离心,弃上清后用 0.2 mol/L pH=6.5 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤离心细胞 3 次,终止诱变。将得到的细胞移入新鲜的液体培养基中,37℃ 继续振荡 1 h 以活化。用无菌水将最终得到的菌液按十倍稀释法稀释成 10⁻⁷-10⁻² 浓度涂入初筛平板培养基,37℃ 倒置培养 4-5 d,待挑取单菌落,摇瓶检测。本实验探究不同

条件下的 NTG 诱变效应,选取诱变时间(min)分别为 0、10、20、30、40、50(该实验中固定 NTG 终浓度为 0.2 mg/mL),NTG 终浓度(mg/mL)为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2(该实验中固定 NTG 处理时间为 20 min)。

1.2.3 N⁺离子注入诱变

将筛选出的 NTG 诱变突变菌株进行 N⁺离子注入诱变。将培养好的黄杆菌种子悬液按 10 倍稀释法稀释至细胞数为 10⁷/mL,取菌液 0.1 mL 均匀涂于无菌的空平板中,风干 30 min 后进行 N⁺离子注入辐照。辐照结束后用 1 mL 无菌水洗涤细胞,按 10 倍稀释法稀释后涂入初筛平板培养基,37℃ 倒置培养 4-5 d,待挑取单菌落,摇瓶检测。本实验探究不同注量下的诱变效应,选取注量(×2.6×10¹³ cm⁻²)分别为 0、20、40、60、80、100、120、140、160(该实验中固定能量为 15 keV)。

1.2.4 筛选方法

初筛采用平板筛选法,即在平板培养基中加入 200 mg/L 的 VK₂ 结构类似物 1-羟基-2-萘甲酸(HNA);复筛采用摇瓶发酵法。

1.2.5 VK₂ 提取与测定

由于 VK₂ 是脂溶性维生素,在细胞内积累较多,故本实验采用有机溶剂萃取法提取黄杆菌菌体中的 VK₂。取 25 mL 发酵液在 15 000 r/min 下离心 5 min,弃上清液,加入 10 mL 蒸馏水反复吹打清洗,15 000 r/min 下离心 5 min,弃上清。将得到的菌体-20℃ 冷冻 30 min 后真空干燥 12 h,加入 5 mL 甲醇充分研磨,静置 12 h 后取 1 mL 上层萃取液于 1.5 mL 离心管中,在 15 000 r/min 条件下离心 5 min 后经有机滤膜抽提 900 mL 上清得到最终提取样品。利用高效液相色谱仪在 248 nm 处制备标准曲线并检测样品中的 MK4 和 MK6 吸收峰,换算成最终产值,流动相为 V_{甲醇}:V_{二氯甲烷}=4:1。

1.2.6 存活率与突变率

诱变平板菌落数与未诱变对照平板菌落数的比值即为存活率。分别对每个诱变处理后挑取的单菌落发酵测 VK₂ 产量,高出或者低于原始对照菌株 VK₂ 产量 10% 以上的为正突变株或负突变株,这部分菌株数与该条件处理下所有菌株数的比值即为正负突变率。

1.2.7 传代稳定性测定

将筛选出来的高产黄杆菌菌株斜面传递 6 代,摇瓶发酵后检测 VK₂ 产量。每组实验共计 3 组平行

对照，取平均值为最终结果。

1.2.8 发酵条件优化方法

为了进一步提高诱变菌株 VK₂ 产量，对发酵时的温度、起始 pH 值、装液量、接种量和摇床转速进行单因素优化。选取的温度(°C)为 25、28、33、37、40，起始 pH 值为 6、6.5、7、7.5、8、8.5，装液量(mL)为 30、50、75、100，接种量(%)为 2、5、10、15，摇床转速(r/min)为 0、60、120、280、240、300。实验结果采用相对值表示，设定原始培养条件(37 °C、pH=7.0、50 mL、10%、120 r/min)为 100%。每组实验共计 3 组平行对照，取平均值为最终结果。

1.2.9 花生衣对黄杆菌产 VK₂ 的影响

通过花生衣(*Arachis hypogaea*)不同浓度和添加时间的处理，考察其对黄杆菌产 VK₂ 的影响。选取的添加浓度(mg/mL)为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、1、1.2、1.5、2、2.5、3、4、20 (此时固定添加时间为发酵起始)。选取的添加时间(h)为 0、8、12、24、48、72、96 (此时固定添加浓度为 3 mg/mL)。实验

结果采用相对值表示，设定 0 h 添加花生衣时的 VK₂ 产量为 100%。为了最大程度减少实验误差，每组实验共计 3 组平行对照，取平均值为最终结果。

2 结果与讨论

2.1 NTG 对黄杆菌的诱变效应

不同 NTG 处理浓度与时间对黄杆菌存活率和突变率的影响如图 1 和图 2 所示。由图 1-1 可知，NTG 处理浓度从 0 mg/mL 至 0.6 mg/mL，黄杆菌存活率快速下降，随后从 0.6 mg/mL 至 0.8 mg/mL 时存活率持续上升，并在 0.8 mg/mL 浓度时达到最大存活率 75.4%，这之后浓度越大存活率越低，1.2 mg/mL 时几乎无菌落生成，这种影响趋势为典型的“马鞍形”曲线^[19]。图 1-2 看出，正突变率随着 NTG 浓度上升先升高后降低，并且同样在 0.8 mg/mL 时达到最大值 55.3%。

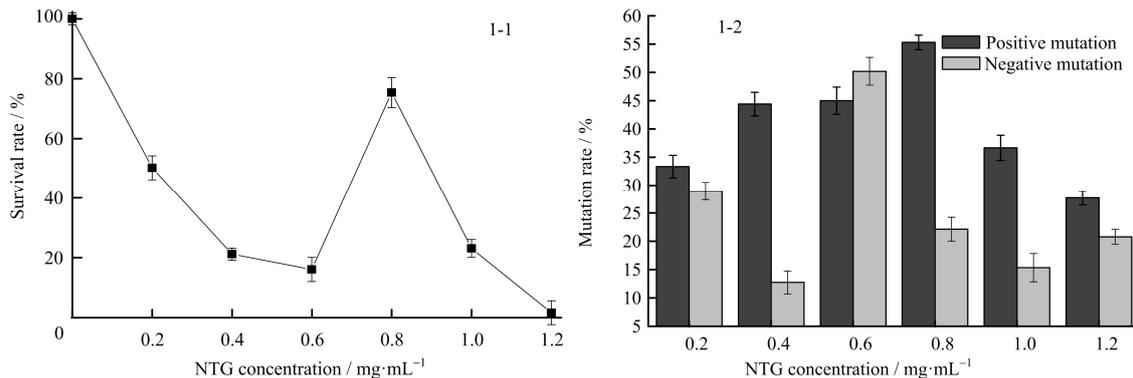


图 1 亚硝基胍不同处理浓度对存活率和突变率的影响
Fig.1 The survival rate and mutation rate at different NTG concentrations

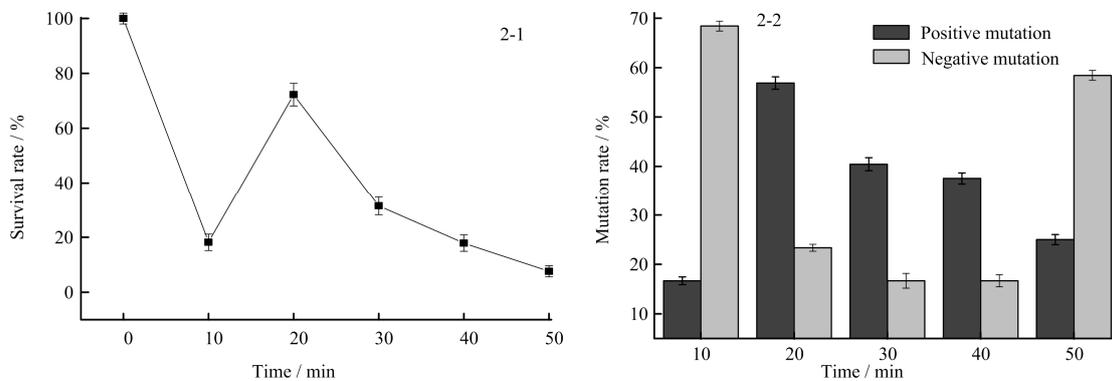


图 2 亚硝基胍不同处理时间对存活率和突变率的影响
Fig.2 The survival rate and mutation rate at different reaction time points of NTG

图 2-1 表明, 不同处理时间诱变对存活率的影响与图 1-1 相仿, 均是先降低后升高至最大再持续降低的“马鞍形”曲线。当处理时间为 20 min 时, 黄杆菌存活率达到最大值 72.3%。同样地, 在该处理时间下, 图 2-2 的正突变率也达到最大值 56.9%。用于诱变的亚硝基胍是一类相当有效的烷化剂, 这种烷化剂往往具有一个或者多个活性烷基, 它们具有取代 DNA 分子中 H 的能力, DNA 由于被烷基化失去正常复制中碱基配对的能力, 因此发生突变。通过图 1 和图 2 得到最佳 NTG 诱变条件为: 处理浓度为 0.8 mg/mL, 处理时间为 20 min。

2.2 N⁺离子注入对黄杆菌的诱变效应

不同注量的 N⁺离子注入对黄杆菌的存活率与正负突变率的影响如图 3 所示。由图 3-1 可知, 注量对存活率的影响曲线出现了两次“马鞍形”现象。第一个鞍点出现在注量为 40 (2.6×10¹³ cm⁻²)时, 存活率 32.7%; 第二个鞍点出现在注量为 100 (2.6×10¹³ cm⁻²)时, 存活率 40%。相比存活率, 正突变率在注量 80(2.6×10¹³ cm⁻²)时达到最高, 为 42.7 %, 而图 3-2 在上述鞍点处的正突变率仅为 25%和 37.4%。

导致这种现象的原因可能为: 它是损伤效应和刺激保护的双重结果, 通过 N⁺离子注入后, 能量与动量、质量与电荷均在黄杆菌中产生综合效应^[9]。当注量为 0-20 (2.6×10¹³ cm⁻²)时, 离子到达菌体细胞膜后, 在能量和质量的作用下发生沉积现象, 生物膜等生物大分子发生断裂, 从而破坏细胞骨架, 造成 DNA 的缺陷, 也诱发了核仁的损伤^[20-22], 程度严重时直接导致细胞死亡, 使得存活率在一开始就直线下落。然而, 细胞在接受到损伤信号后, 会在第一时间内及时做出反应, 激活相对应的修复系统^[23-24], 在菌体被注入的细胞上形成由正负电荷构成的电场保护屏障, 起到暂时的保护作用, 故在注量为 20-40 (2.6×10¹³ cm⁻²)和 60-100 (2.6×10¹³ cm⁻²)时, 存活率随之上升。然而, 在 100 (2.6×10¹³ cm⁻²)大注量之后, 大量堆积的电荷诱发库仑力爆炸, 电场消失, 由于质量沉积与电荷交换会引起生物分子在电子传递中大量受损, 大部分菌体胞内自由基间接损伤严重、染色体重复等, 细胞修复失活, 导致菌体直接死亡。通过图 3 得到最佳 N⁺离子注入诱变条件: 能量为 15 keV, 注量为 80 (2.6×10¹³ cm⁻²)。

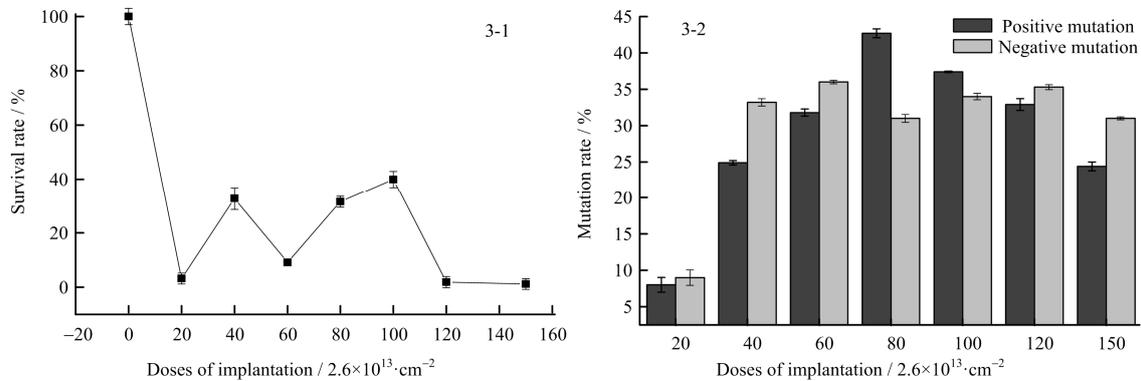


图 3 N⁺注入注量对存活率和突变率的影响
Fig.3 The survival rate and mutation rate at different doses of N⁺ implantation

2.3 突变株的传代稳定性

如表 1 所示, 经 NTG 诱变后得到突变菌株 SP-N3-1, 其维生素 K₂ 产量比原始菌 SP-1 提高了 50%; 再次对 SP-N3-1 进行 N⁺离子注入诱变后得到突变菌株 SP-L-01, 其 VK₂ 产量比诱变菌 SP-N3-1 提高 73 %, 比原始菌 SP-1 提高 159 %。对 SP-L-01 进行斜面传代 6 次, 结果如图 4 所示, 最终得到一

支 VK₂ 提高且产量稳定的黄杆菌诱变菌株。

表 1 菌株筛选结果
Table 1 Screening of strains

菌株 Strain	维生素 K ₂ 产量/mg·L ⁻¹ Production of VK ₂	提高幅度 / % Increased range
SP-1	2.36	-
SP-N3-1	3.54	50
SP-L-01	6.12	159

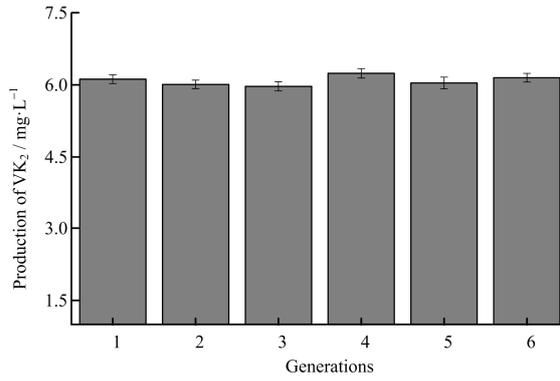


图4 突变株 SP-L-01 的遗传稳定性
Fig.4 The genetic stability of mutant strain SP-L-01

2.4 发酵优化

2.4.1 发酵条件优化

如图 5 所示，分别对温度、起始 pH 值、装液量、接种量和摇床转速开展优化。图 5-1 表明，随着温度的上升，MK4 和 MK6 的变化趋势保持一致，均在 37 °C 时积累最多。我们发现，高温环境似乎更适合 MK6 的积累，而 MK4 对温度的敏感性也更大一些。图 5-2 显示了起始 pH 值对 VK₂ 产量的影响，偏酸或偏碱均不利于黄杆菌体内合成 VK₂，大量的酸性物质会抑制黄杆菌的正常生长^[25]。

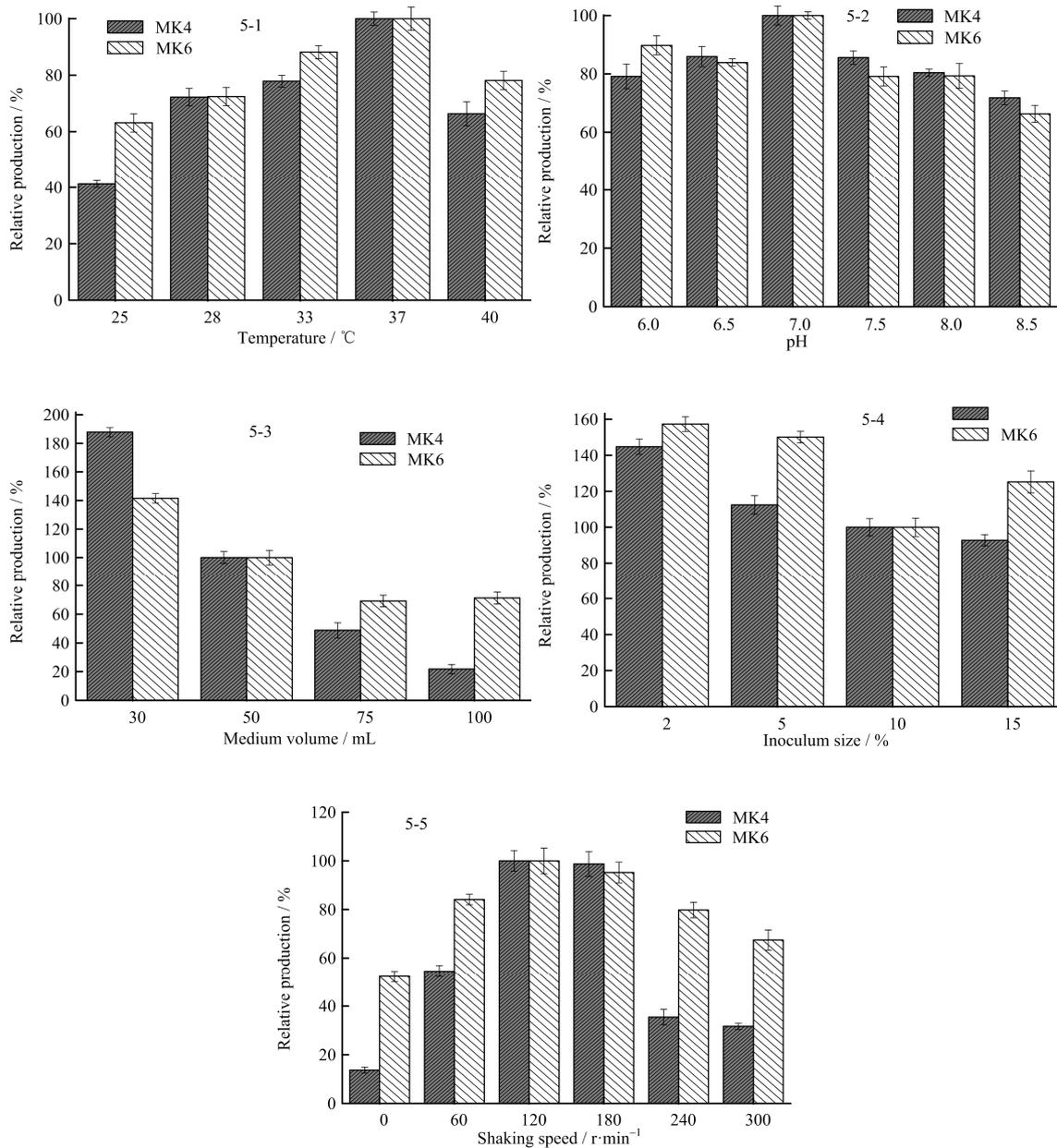


图5 发酵条件对黄杆菌产维生素 K₂ 的影响
Fig.5 Relative production of VK₂ under different fermentation conditions

通过图 5-3 至 5-5 我们得到最优装液量、接种量及摇床转速为 30 mL (250 mL 三角瓶)、2% 和 120 r/min。由图 5 可知, MK4 对这 3 个因素的敏感性较 MK6 高, 尤其表现在装液量和摇床转速上, 当装液量从 30 mL 上升到 100 mL, MK4 下降幅度高达 166%, 当转速在 240 r/min 时, MK4 的相对产量从 98.7% 降到 35.4%, MK6 仅降了 15% 的幅度。在大肠杆菌体内, 甲萘醌能作为二氢乳酸耦合延胡索酸酯的氢载体, 能够在厌氧条件下被大量合成^[26]。本实验数据显示, 高转速带来相对高的溶氧环境确实也不利于黄杆菌体内积累 VK₂。最终优化发酵条件为: 温度 37 °C、起始 pH=7.0, 装液量 30 mL (250 mL 三角瓶), 接种量 2%、摇床转速 120 r/min。

2.4.2 花生衣对黄杆菌产 VK₂ 的影响

如图 6 所示, 在原始发酵培养基的基础上, 我们探讨花生衣(*Arachis hypogaea*)对黄杆菌生产 VK₂ 的影响。分别在培养基中添加不同浓度花生衣后, 得到图 6-1。由图可知, VK₂ 随着花生衣浓度的增大先上升后下降。其中, 当花生衣浓度在 0.1–0.5 mg/mL 时, VK₂ 产量下降, 尤其是 MK4 产量。当浓度上升到 2.5 mg/mL, MK4 相对产量达到最大值 186%。MK6 相对产量最大值 137% 出现在 3 mg/mL 的花生衣添加浓度。根据 VK₂ 产量的对比, 我们确

定 3 mg/mL 为花生衣最佳添加浓度。花生衣除了作为发酵培养基成分外, 还可能作为一种诱导物。图 6-2 表明花生衣添加时间对 VK₂ 产量的影响。由图可知, 即使在发酵 8 h 后添加 3 mg/mL 的花生衣, 总 VK₂ 产量仍然比对照高。MK4 对花生衣添加时间反应更明显。最佳添加时间为 72 h, 这时的 MK4 相对产量达到 371%, MK6 相对产量达到 149%。故在优化发酵条件下, 我们选择在 72 h 后添加 3 mg/mL 花生衣, 以进一步增加 VK₂ 的积累。有研究表明, 花生衣富含蛋白质和维生素^[27]。其含有的酚类化合物、白芦藜醇、生物碱、黄酮类化合物及维生素 K 等能起到抗氧化的作用^[28], 此外, 花生衣中还含有氧自由基清除酶如 SOD、APX 及 CAT^[29]。2006 年江南大学的张红梅等^[30]开展了花生红衣抗氧化活性的研究, 发现花生红衣色素对超氧阴离子及羟自由基均有不同程度的清除作用, 尤其对脂质过氧化有明显的抑制效果。研究表明, 甲萘醌有助于体内超氧化物生成, 在细内积累后会产生细胞毒性, 影响细胞正常代谢生长^[31]。因此我们认为花生衣作为添加物在黄杆菌发酵生产 VK₂ 过程中可能起到清除氧自由基、减少细胞损伤的作用, 更有利于细胞对甲萘醌的积累。

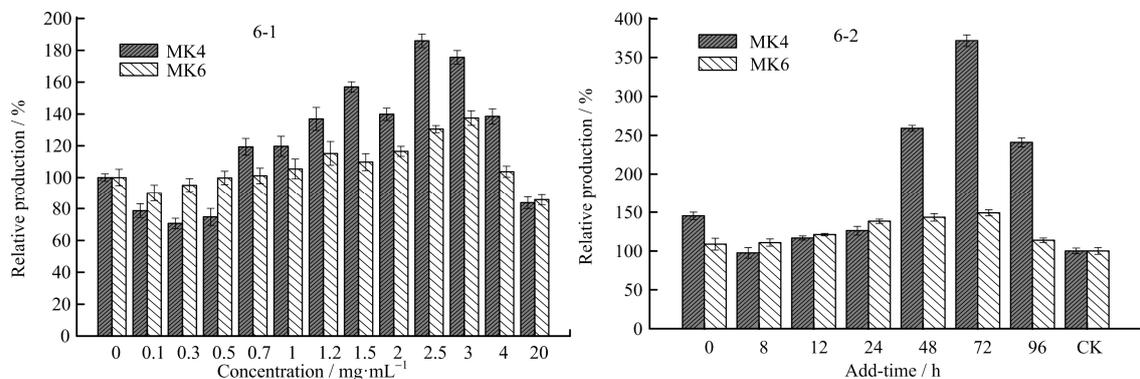


图 6 花生衣对黄杆菌产维生素 K₂ 的影响
Fig.6 Effects of *Arachis hypogaea* on production of VK₂

2.5 发酵过程曲线对比

图 7 直观地给出了相同时间内原始菌 SP-1、突变菌 SP-L-01 和优化后菌株的发酵过程曲线。优化后的黄杆菌 VK₂ 产量为 8.02 mg/L, 较突变株 SP-L-01 提高了 31%, 较原始菌株 SP-1 提高了

240%。在相同发酵时间内, 突变菌株和发酵优化后菌株 VK₂ 的产量均比原始菌株有明显提高。发酵后 144 h VK₂ 产量达到最大。原始菌和突变菌在发酵的前 60 h 内 VK₂ 产量没有明显的提高, 而优化后菌株从发酵的前 36 h 开始增长幅度较大, 直至 144 h 达到 8.02 mg/L, 说明优化对发酵过程中 VK₂ 的积累

与合成阶段产生了影响，这对后续发酵过程控制研究提供实验基础。

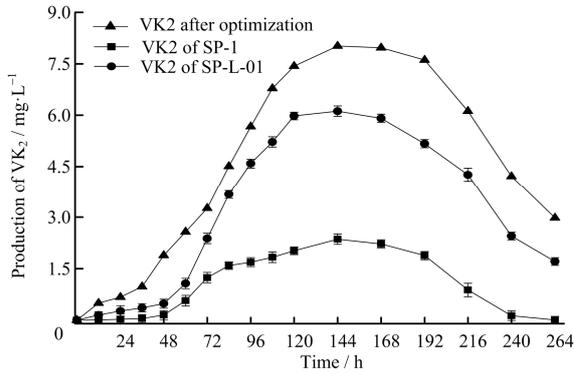


图 7 发酵过程曲线对比

Fig.7 Fermentation process curve comparison

3 结论

本实验中突变菌 SP-N3-1 的 VK₂ 产量较出发菌提高了 50%，对其继续诱变后得到的突变株 SP-L-01 的 VK₂ 产量较出发菌提高了 159%。其中，最佳诱变条件为：NTG 诱变处理时间 20 min，处理浓度 0.8 mg/mL；N⁺ 离子注入能量 15 keV，注量 80 (2.6×10¹³ cm⁻²)。N⁺ 离子注入和 NTG 均能产生较为明显的“马鞍形”存活率曲线。发酵条件优化添加花生衣，产量较初始值提高了 240%。最佳发酵条件为：温度 37 °C、起始 pH=7.0，装液量 30 mL (250 mL 三角瓶)，接种量 2%、摇床转速 120 r/min，花生衣添加浓度 3 mg/mL，添加时间为发酵后 72 h。本研究结果表明，NTG 和 N⁺ 注入复合诱变具有正突变率高、诱变后菌株稳定性好等特点，说明该复合诱变手段是一种较为理想的诱变技术。

参考文献

- Liu Y, Zheng Z M, Qiu H W, *et al.* Surfactant supplementation to enhance the production of vitamin K₂ metabolites in shake flask cultures using *Escherichia sp.* mutant FM3-1709 [J]. Food Technology and Biotechnology, 2014, **52**(3): 269-275.
- Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, *et al.* Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach [J]. New Biotechnology, 2011, **28**(6): 665-672.
- Ishida Y. Vitamin K₂ [J]. Clinical Calcium, 2008, **18**(10):

1476-1482.

- Gast G C M, De Roos N M, Sluijs I, *et al.* A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease [J]. NutrMetab Cardiovas, 2009, **19**(7): 504-510.
- Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Menatetrenone (vitamin K₂) and bone quality in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Nutrition Reviews, 2006, **64**(12): 509-517
- Vos M, Esposito G, Edirisinghe J N, *et al.* Vitamin K₂ is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency [J]. Science, 2012, **336**(6086): 1306-1310.
- 邹志强. 维生素 K₂ 的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, **11**(3): 389-392.
ZOU Zhiqiang. Advances in Vitamin K₂ [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, **11**(3): 389-392.
- 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1998: 223-247.
YU Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology [M]. Hefei: Science and Technology of Anhui Press, 1998: 223-247.
- Yu Z L, Yu L D, Brown I, *et al.* Introduction to Ion Beam Biotechnology [M]. Springer, New York, 2006.
- Feng H Y, Yu Z L, Chu P. Ion implantation of organisms [J]. Materials Science & Engineering R, 2006, **54**: 49-120.
- Liu Y, Wang L, Zheng Z M, *et al.* Improvement of vitamin K₂ production by *Escherichia sp.* with nitrogen ion beam implantation induction [J]. Plasma Science and Technology (in China), 2015, **17**(2): 159.
- Song J Y, Liu H X, Wang Li, *et al.* Enhanced production of vitamin K₂ from *Bacillus subtilis (natto)* by mutation and optimization of the fermentation medium [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2014, **57**(4): 606-612.
- 宋均营, 贡国鸿, 王丽, 等. 纳豆芽孢杆菌产 VK₂ 菌株的 NTG 与 N⁺ 注入复合诱变选育[J]. 工业微生物, 2014(2): 52-56.
SONG Junying, GONG Guohong, WANG Li, *et al.* Combined mutation breeding of *Bacillus subtilis natto* producing vitamin K₂ by NTG and low energy ions beam implantation [J]. Industrial Microbiology, 2014(2): 52-56.
- Yoshiki T, Naoki S. Menaquinone-4 production by a mutant of *Flavobacterium sp.* 238-7 [J]. Agricultural and

- Biological Chemistry, 1987, **51**(9): 2409-2415.
- 15 Hisataka T, Takashi S, Chiranun D, *et al.* Menaquinone-4 production by a sulfonamide-resistant mutant of *Flavobacterium* sp. 238-7 [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, **53**(11): 3017-3023.
- 16 Yoshiki T, Satoru A, Hideaki Y. Production of menaquinone (vitamin K₂)-5 by a hydroxynaphthoate-resistant mutant derived from *Flavobacterium meningosepticum*, a menaquinone-6 producer [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, **49**(1): 111-115.
- 17 Hisataka T, Takashi S, Yoshiki T. Selective release of menaquinone-4 from cells of a mutant of *Flavobacterium* sp. 238-7 with a detergent [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1995, **59**(6): 1137-1138.
- 18 李戈, 曾会才. 诱变在产抗生素微生物育种中的应用进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, **35**(4): 970-971.
LI Ge, ZENG Huicai. Application progress of mutation in antibiotic microorganism [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2007, **35**(4): 970-971.
- 19 潘燕, 肖翔, 吴李君, 等. N⁺离子注入对干旱胁迫条件下甘草幼苗的SOD酶和CAT酶活性及丙二醛含量的影响[J]. *激光生物学报*, 2005, **14**(6): 442-446.
PAN Yan, XIAO Xiang, WU Lijun, *et al.* Effect of SOD and CAT on licorice seedling in drought stress condition by N⁺ implantation [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2005, **14**(6): 442-446.
- 20 Wu L J, Gerhard R P, Hei T K. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(9): 4959-4964.
- 21 Nie G J, Yang X R, Liu H, *et al.* N⁺ ion beam implantation of tannase-producing *Aspergillus niger* and optimization of its process parameters under submerged fermentation [J]. *Annals of Microbiology*, 2013, **63**(1): 279-287.
- 22 丁艳, 郑之明, 王丽, 等. N⁺注入诱变选育井冈霉素 A 高产菌的研究[J]. *工业微生物*, 2013(3): 18-22.
DING Yan, ZHENG Zhiming, WANG Li, *et al.* Study of mutant strain producing validamycin A by N⁺ ion implantation [J]. *Industrial Microbiology*, 2013(3): 18-22.
- 23 Foti A M, Milano F, Torrisi L. Amino acid decomposition induced by keV ion irradiation [J]. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B*, 1999, **46**(1): 361-363.
- 24 Wang P, Zhang L M, Zheng Z M, *et al.* Microbial lipid production by co-fermentation with *Mortierella alpine* obtained by ion beam implantation [J]. *Chemical Engineering Technology*, 2011, **34**(3): 422-428.
- 25 Russell J B, Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on bacterial growth [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1997, **39**: 205-234.
- 26 Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria [J]. *Microbiological Reviews*, 1982, **46**(3): 241.
- 27 Olajuyigbe F M. Optimized production and properties of thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* SHS-04 grown on groundnut (*Arachis hypogaea*) meal [J]. *Advances in Enzyme Research*, 2013, **1**(4): 112.
- 28 Tamura T, Inoue N, Ozawa M, *et al.* Peanut-Skin polyphenols, procyanidin A1 and epicatechin-(4 β →6)-epicatechin-(2 β →O→7, 4 β →8)-catechin, exert cholesterol micelle-degrading activity *in vitro* [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2013, **77**(6): 1306-1309.
- 29 Sankar B, Jaleel C A, Manivannan P, *et al.* Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, **60**(2): 229-235.
- 30 张红梅, 金征宇, 朱立贤, 等. 花生衣红抗氧化活性的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, **24**(6): 83-87.
ZHANG Hongmei, JING Zhengyu, ZHU Lixian, *et al.* Research of antioxidant activity on *Arachis hypogaea* [J]. *Journal of Food and Biological Technology*, 2006, **24**(6): 83-87.
- 31 Vattanaviboon P, Whangsuk W, Mongkolsuk S. A suppressor of the menadione-hypersensitive phenotype of a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* oxyR mutant reveals a novel mechanism of toxicity and the protective role of alkyl hydroperoxide reductase [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**(5): 1734-1738.

Combined mutation of *Flavobacterium* sp. producing vitamin K₂ and optimization of the fermentation

TAN Mu ZHAO Genhai LIU Hui LI Zhemin SUN Xiaowen ZHENG Zhiming
(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

ABSTRACT The study was to enhance vitamin K₂ production of *Flavobacterium* sp. by combined mutation of N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG) and low energy N⁺ ion beam implantation, and optimize the fermentation conditions. The best mutation conditions were as follows: induced dose and time of NTG were 0.8 mg/mL and 20 min; induced energy and dose of N⁺ implantation were 15 keV and 80 (2.6×10¹³ cm⁻²). Vitamin K₂ production of the mutant strain reached 6.12 mg/L, which was 159% higher than that of the original. After 6 generations of propagation, the mutant strain with high stability was obtained. Optimal fermentation conditions were obtained when 2% seed culture was inoculated into 250-mL flasks with 30 mL fermentation medium (pH=7.0) and incubated at 37 °C and 120 r/min. Meanwhile, after 72 h of fermentation, *Arachis hypogaea* in dose of 3 mg/mL was added into the medium as a useful inducer. Vitamin K₂ production after optimized-fermentation was 31% higher than that of the mutant strain before optimization.

KEYWORDS *Flavobacterium* sp., N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG), N⁺ implantation, Vitamin K₂

CLC TQ924, TL929, Q68