基于 ARTP 技术选育维生素 K_2 优势菌株及发酵培养基优化

杨自名，薛正莲，王 洲，冯静静，吴 静，李 伟，刘 艳*

（安徽工程大学 生物与食品工程学院，安徽 芜湖 241000）

摘要：本研究目的在于获得维生素 K_2 优势突变株，并利用响应面设计优化发酵培养基进一步提高其产量。采取常压室温等离子体诱变技术结合结构类似物抗性初筛、24 孔板发酵复筛，对纳豆芽孢杆菌进行诱变选育，并应用 Box-Behnken 设计对发酵培养基进行优化。通过 ARTP 诱变选育得到一株维生素 K_2 优势突变株，维生素 K_2 产量较初始菌株提高了 3.23 倍。Box-Behnken 实验优化后，最佳值为 K_2HPO_4(0.69 g/L)，甘油(66.01 g/L)和酵母粉(25.12 g/L)，发酵后维生素 K_2 产量较优化前提高了 56.7%。通过 ARPT 技术诱变选育出一株维生素 K_2 优势突变株，采用响应面法优化发酵培养基。实验结果表明，突变株具有潜在的生产应用价值，建立的育种方法也可为其他工业微生物的选育提供有益的参考，对提高人们的健康水平具有十分重要的意义。

关键词：纳豆芽孢杆菌；维生素 K_2；常压室温等离子体诱变；Box-Benhnken

中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2020)11-0056-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.008

Screening of High-Yield Vitamin K_2 Strain Based on ARTP Technology and Optimization of Fermentation Medium

YANG Ziming, *XUE Zhenglian*, *WANG Zhou*, *FENG Jingjing*, *WU Jing*, *LI Wei*, *LIU Yan**

(College of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: This study aimed to obtain the vitamin K_2 dominant mutant and to further improve its yield via the fermentation medium optimization using response surface design. The mutagenesis breeding of bacillus natto was carried out through room temperature plasma (ARTP) in combination with the structural analog resistance screening under atmospheric pressure, subsequently rescreened by 24 bore plates fermentation. The fermentation medium was then optimized by Box-Behnken design. A dominant mutant strain of vitamin K_2 was obtained by ARTP mutagenesis with a yield of 3.23 times higher than that of the original strain. The optimal values based on Box-Behnken design were 0.69 g/L of K_2HPO_4, 66.01 g/L of glycerol and 25.12 g/L of yeast powder, with an increase of 56.7% of vitamin K_2 yield. A dominant mutant strain of vitamin K_2 was achieved by ARTP

收稿日期：2019-10-24

基金项目：国家自然科学基金项目(31871781，31772018)；安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2018A0106)；芜湖市科技计划重点项目(2020yf62)；国家级大学生创新创业项目(201810363046，201910363042)；安徽省大学生创新创业计划项目(201710363178)。

* **通信作者：**刘 艳(1981—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事资源生物技术方面的研究。E-mail：liuyan@ahpu.edu.cn

mutagenesis and the fermentation medium was effectively optimized by response surface methodology. The experimental results showed that the mutant strain has potential value in production and application, establishing the breeding method with a beneficial reference for the selection and breeding of other industrial microorganisms, which is of great significance to improve human health.

Keywords: *Bacillus natto*, vitamin K_2, Atmospheric Room Temperature Plasma, Box-Behnken

维生素 K_2(MK,VK_2),又名甲萘醌,属于脂溶性凝血类重要维生素,是由甲基萘醌母环和异戊二烯侧链组成,可有效降低骨折发生率。据报道,日本儿童没有普遍存在的生长痛现象出现,与他们从小吃纳豆有很大关系,纳豆中富含较多维生素 K_2,在人体内可快速被肠道吸收,可促进骨密度增加,使骨骼更加强壮,同时也有许多文献报道,维生素 K_2 摄入量较多的群体能够有效降低心脏病和心血管硬化的发病率[1-5]。另外,随着血清维生素 K 缺乏诱导蛋白质检测技术的突破，越来越多的研究表明,维生素 K 缺乏是引发世界性婴儿出血疾病和死亡的重要原因[6]。近几年国内外学者在 *Science* 和 *Nature* 等顶级国际期刊发表的研究表明，同辅酶 Q 相似,维生素 K_2 作为一种膜结合电子载体,具有修复损伤细胞线粒体的功能[7-9],这对于人类免受帕金森症折磨起着重要的作用。由于这三方面的原因,近年来国际市场对功能性食品维生素 K_2 的需求不断增加。由于化学法合成维生素 K_2 存在许多安全问题,在欧盟和部分亚洲国家被限制不能直接用于食品中。此外,微生物发酵合成维生素 K_2,因具有发酵原料易得、条件温和、环境压力小,同时因为本身来源于生物,合成的产品具有高生物活性和高生物相容性等优点,成为维生素 K_2 合成的首选方法。然而微生物发酵维生素 K_2 得率低、生产成本居高不下的现状仍然制约着微生物法制备维生素 K_2 的发展。

食品级维生素 K_2 主要是由纳豆芽孢杆菌产生,近些年 Tsukamoto Y 等[10]将纳豆芽孢杆菌进行紫外和亚硝基胍复合诱变后,采用结构类似物抗性平板选育出一株维生素 K_2 高产菌株,经过固态发酵后维生素 K_2 的产量达到了 1.719 μg/g。Wu WJ 等[11]从食品中分离到了一株维生素 K_2 高产菌株,对发酵条件进行优化后，维生素 K_2 产量达到了 7.54 μg/g。然而,纳豆芽孢杆菌发酵制备维生素 K_2 的产量尚有待提高。

ARTP 诱变技术是近年来清华大学自主研发的新型诱变技术，它将高纯度的氦气作为激发气体,大量的非平衡性等离子体流作用于微生物的遗传物质,破坏单核苷酸的磷酸二酯键,诱发细胞 SOS 修复机制从而导致遗传物质突变[12]。与其它诱变方法相比,常压室温等离子体生物诱变系统具有非常高的可控性,例如温度控制力度、处理时间快速等。有报道称从常压室温等离子体生物诱变系统释放的等离子体种类丰富,包含紫外线、带电粒子、活性氧、活性氮和其他活性物质等诱变因素[13-15]。因此这些复合的诱变因素能够更有效地提高菌体的突变率,从而更快捷的选育优势突变株。

采用 ARTP 诱变技术对作者所在实验室从纳豆粉中筛选出的纳豆芽孢杆菌 B-N-1 进行诱变,通过结构类似物抗性初筛、24 孔板发酵复筛的方式快速选育优势菌株,通过响应面设计合理的实验方案对筛选获得的一株维生素 K_2 优势突变株纳豆芽孢杆菌 B-N-2 进行发酵培养基优化,对纳豆芽孢杆菌产维生素 K_2 的生产工艺进行研究，为维生素 K_2 的后续开发与利用提供参考,这对提高人们的健康水平具有十分重要的社会和经济意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种 出发菌株由作者所在实验室在纳豆粉中筛选得到,命名为 B-N-1,经 16s rRNA 鉴定,该菌株属于纳豆芽孢杆菌。

1.1.2 培养基 固体培养基（g/L）：胰蛋白胨 10，NaCl 10，酵母粉 10，琼脂 20；灭菌前调节 pH 至 7.0~7.2。

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10,NaCl 10,酵母

粉 10;灭菌前调节 pH 至 7.0~7.2。

摇瓶发酵培养基(g/L):大豆蛋白胨 20,葡萄糖 10,K_2HPO_4 0.3;灭菌前调节 pH 至 7.0~7.3。

1.1.3 主要仪器 诱变仪(ARTP-Ⅱ):源清天幕生物科技有限公司;高效液相色谱仪(LC-2030):岛津公司;双层振荡恒温培养箱:知楚仪器;数显培养箱(250D):金坛市杰瑞尔电器有限公司;台式冷冻高速离心机:赛默飞世尔科技有限公司;高压蒸汽灭菌锅(HVE):日本 HIRAYAMA;双人单面净化工作台(SW-CJ-2FD):苏州净化设备有限公司;电热恒温鼓风干燥机(DHG-9143BS-Ⅲ):上海申安医疗器械厂;数显恒温水浴锅:常州诺基仪器有限公司。

1.1.4 主要试剂 1-羟基-2-萘甲酸(HNA)、NaCl、甘油、K_2HPO_4:分析纯,购于国药集团;胰蛋白胨、酵母粉、生物试剂:购于上海生工生物工程有限公司;甲醇、二氯甲烷、正己烷、异丙醇:色谱纯,购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ARTP 诱变 将出发菌株 B-N-1 进行活化,于 37 ℃恒温振荡培养箱中 200 r/min 培养 15 h。取 1 mL 菌液于 4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min,用 1 mL 无菌生理盐水洗涤菌体 2 次,最后加入 1 mL 无菌生理盐水制成菌悬液。取 10 μL 制备好的菌悬液均匀涂在无菌小铁片上,置于 ARTP 工作台中进行诱变处理:距离 2 mm、通气量 10 SLM、功率 100 W,分别处理 0、30、50、70、90 s。将置于 990 μL 培养基中的小铁片放在混匀振荡器中充分混匀洗脱,于 37 ℃恒温振荡培养箱中 200 r/min 培养 2 h。

1.2.2 存活率和正突变率的计算

致死率:待平板培养皿上长出单菌落后,对诱变平板和对照平板上的菌落进行计数,对照平板上的菌落数减去诱变平板上的菌落数和对照平板上的菌落数之比为致死率。

正突变率:分别在每个诱变处理条件下的平板上挑取单菌落进行发酵,测定每个纳豆芽孢杆菌的维生素 K_2 产量,测定得出维生素 K_2 产量高出对照菌株 10%以上为正突变株,计算其在该处理下所有菌株中所占的比例,即为正突变率。

1.2.3 突变株的筛选方法 初筛采用平板筛选法,在平板培养基中加入一定量维生素 K_2 的结构抗性类似物 1-羟基-2-萘甲酸(HNA)[16],使其终质量浓度为 50 mg/L。取 0.1 mL 稀释后菌液涂布于筛选平板上,于恒温培养箱中 37 ℃倒置培养 1~2 d,待长出单菌落后,挑取单菌落接入到斜面上,于恒温培养箱中 37 ℃培养 1~2 d 后于 4 ℃冰箱保存,进行下一步复筛。

复筛采用孔板发酵法。将保存在斜面上的菌种接入液体种子培养基中,于 37 ℃、200 r/min 振荡培养 15 h 作为初始种子液。取 0.5 mL 种子液转接到装有 5 mL 发酵培养基的 24 孔板内(该孔板每孔可装 12 mL 培养基),于 37 ℃、200 r/min 振荡培养 72 h。高效液相色谱检测分析,以维生素 K_2 产量的高低作为筛选依据。

1.2.4 维生素 K_2 含量测定

1)溶液的配制 萃取液为 $V_{正己烷}$:$V_{异丙醇}$=2:1,流动相为 $V_{二氯甲烷}$:$V_{甲醇}$=1:9。

2)样品中维生素 K_2 的提取方法 参照文献中公布的提取方法[17-19],取 2 mL 混匀发酵液,10 000 r/min 下离心 5 min,弃上清液,加入 2 mL 蒸馏水反复吹打清洗,4 ℃、5 000 r/min 下离心 5 min,弃上清液,将得到的菌体加 500 μL 萃取液,反复吹打混匀,避光静置 30 min,在 4 ℃、12 000 r/min 下离心 5 min,取上层萃取液于 2 mL 离心管中,重复萃取步骤两遍,加强萃取效果,最后定容至 2 mL,经 0.22 μm 有机滤膜过滤得到最终样品。以上操作尽量避光。

3)高效液相色谱条件 色谱仪:岛津液相色谱仪;色谱柱:岛津 5 μm C_{18}(4.6 mm×150 mm);流动相:$V_{甲醇}$:$V_{二氯甲烷}$=9:1;流量:1.0 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:10 μL;紫外检测波长:254 nm。

1.2.5 遗传稳定性验证 对获得的优势突变株菌株 B-N-2 进行 5 次传代实验,测定其维生素 K_2 产量,验证菌种的遗传稳定性。

1.2.6 碳氮源、无机盐筛选以及中心值确定 保持基本培养基中碳氮质量比和其它成分不变,在相同的培养条件下,分别以不同碳氮源和无机盐取代基本培养基中的碳氮源和无机盐,对常用的碳氮源以及无机盐进行初步筛选,筛选过后进行梯度实验,考察它们对 B-N-2 发酵产维生素 K_2 的影响。

1.2.7 Box-Behnken 中心组合实验设计 主要考察在发酵培养基中添加前期实验筛选的单因素 KH_2PO_4、甘油和酵母粉对维生素 K_2 产量的影响,依据碳氮源、无机盐筛选和中心值的确定以及相关文献报道设置中心组合实验,并在中心值上下游再各取一个数值作为响应面实验设计的因素及水平值,

见表 1。

采用 Design-Expert 软件,根据 Box-Behnken 的设计原理,以纳豆芽孢杆菌维生素 K_2 产量为评价指标,设计三因素(KH_2PO_4、甘油和酵母粉)三水平 15 次实验,每组实验设 3 个平行,维生素 K_2 产量取均值,其中零点实验重复 3 次,以减小误差。最后根据得出的实验结果，分析各因素之间的相互作用,得出最佳的发酵培养基组成及含量。

表 1　中心组合实验设计的各因素和水平值

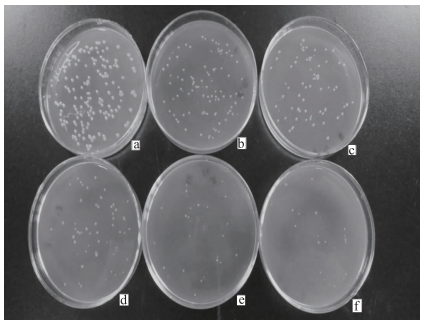
Table 1　Factors and level value of central combination experiment design

因素	水平		
	−1	0	1
KH_2PO_4 质量浓度(A)/(g/L)	0.3	0.5	0.7
甘油质量浓度(B)/(g/L)	60	70	80
酵母粉质量浓度(C)/(g/L)	20	25	30

2　结果与分析

2.1　ARTP 诱变

2.1.1　ARTP 诱变致死率以及正突变率　对菌株 B-N-1 进行 ARTP 诱变处理,菌株生长情况见图 1。结果表明,随着 ARTP 处理时间加长,菌株的死亡率提高,在处理 80 s 时致死率为 91.54%。同时对每个平板上所有菌株进行发酵，测取维生素 K_2 产量,维生素 K_2 产量高出对照菌株 10%以上为正突变株,在处理 80 s 时正突变率最高,见图 2。由文献[20-24]可知,诱变时间的确定需要结合致死率与正突变率,在有一定数量菌株存活的基础上正突变率大的为最佳诱变时间,因此后续实验选择 80 s 作为 ARTP 诱变的处理时间。



a:0 s;b:20 s;c:40 s;d:60 s;e:80 s;f:100 s

图 1　0~100 s 诱变菌株菌落生长状况

Fig. 1　Mutagenized strain colony growth status during 0~100 s

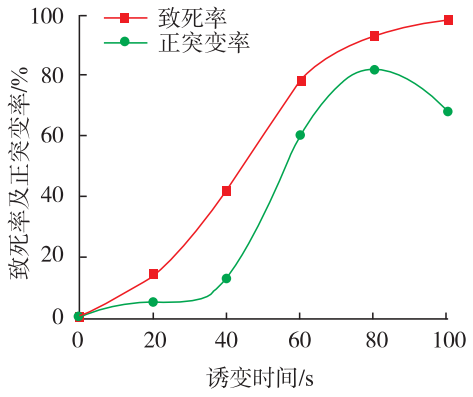


图 2　菌株 B-N-1ARTP 诱变致死曲线和正突变率曲线

Fig. 2　Mutant lethal curve and positive mutation rate curve of strain B-N-1 by ARTP

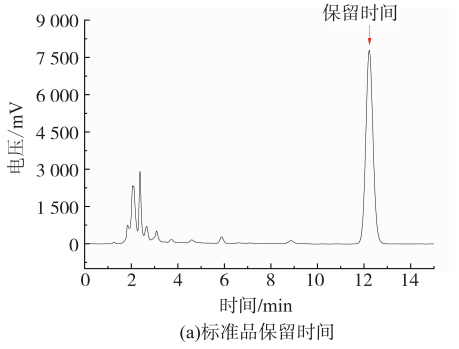
2.1.2　ARTP 诱变处理后得到的优势菌株的产量及遗传稳定性　将菌株 B-N-1 在 ARTP 诱变仪上诱变处理 80 s,稀释涂布于 HNA 平板上,设置 6 个平行，以保证诱变菌株的数量,37 ℃培养 15 h 后,在每个平板上均匀挑取 15 个单菌落（每个平板生长菌落数在 20~30 个),总计挑取 80 株单菌落,经 24 孔板发酵后测定维生素 K_2 产量。经 6 轮有效 ARTP 诱变(有效诱变指产量增加的轮数)处理后(生物量和产量见表 2),得到一株维生素 K_2 优势突变株,经高效液相色谱检测维生素 K_2 产量为 13.33 mg/L,较出发菌株 B-N-1 提高了 3.89 倍,将其命名为 B-N-2。与檀沐报道使用的亚硝基胍(NTG)和低能氮离子束(N^+)注入复合诱变方法相比[25],ARTP 诱变选育系统更具有方便快捷的优势。标准品保留时间、B-N-1 和 B-N-2 维生素 K_2 产量见图 3。

表 2　6 轮有效诱变生物量及维生素 K_2 产量

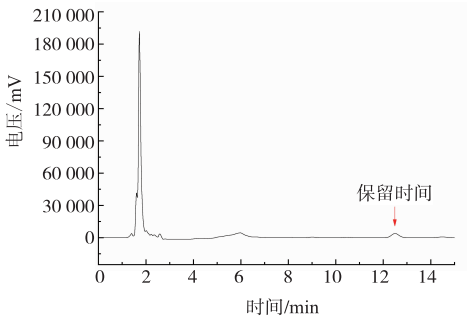
Table 2　Six rounds of effective mutagenesis biomass and vitamin K_2 yield

诱变轮数	生物量(OD_{600})	产量/(mg/L)
1	0.565	4.56
2	0.589	5.69
3	0.614	7.63
4	0.632	9.56
5	0.654	11.64
6	0.663	13.33

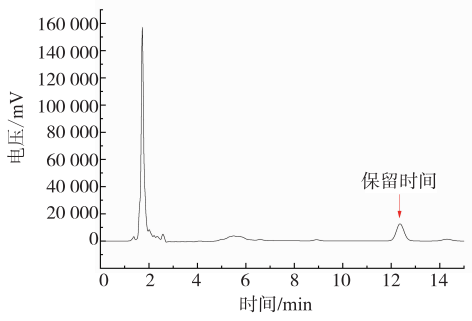
有文献报道突变菌株在连续传代过程中可能会出现各方面不稳定的现象[26-27]。为了验证突变菌株 B-N-2 的遗传稳定性,对该菌株进行传代稳定性实验。由图 4 可以看出,经过 5 次传代,B-N-2 仍具有良好的遗传稳定性。



(a)标准品保留时间



(b)B-N-1高效液相色谱图



(c)B-N-2高效液相色谱图

图 3　标准品保留时间、B-N-1 高效液相色谱图及 B-N-2 高效液相色谱图

Fig. 3　Retention time of standard, B-N-1 HPLC and B-N-2 HPLC

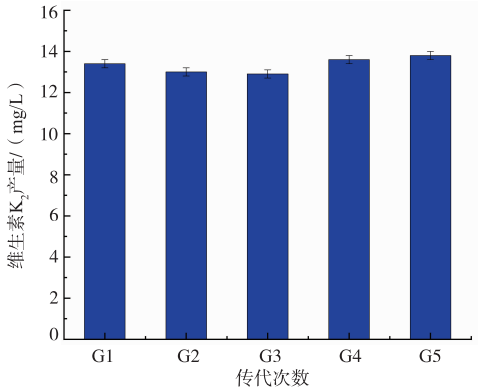
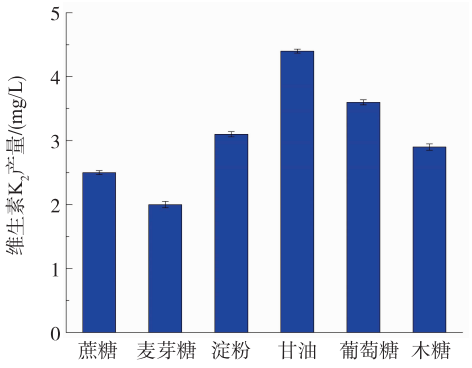


图 4　突变株 B-N-2 的遗传稳定性

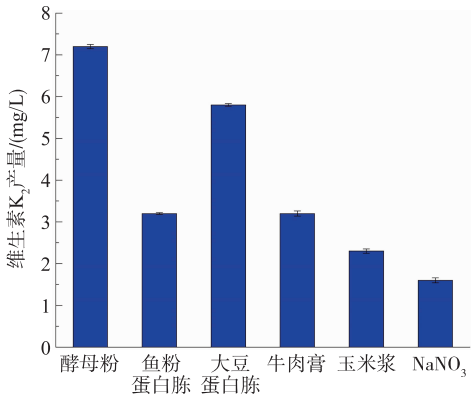
Fig. 4　Genetic stability of mutant B-N-2

2.2　碳源、氮源、无机盐筛选以及中心值确定

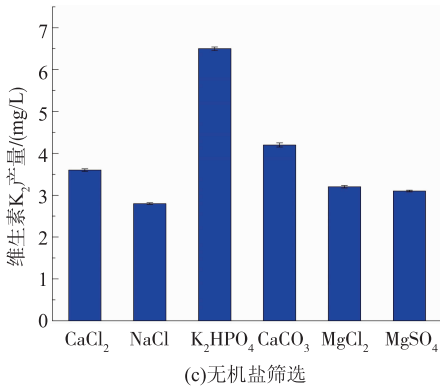
由图 5 可知，甘油作为碳源时维生素 K_2 的产量明显高于其他碳源，速效碳源葡萄糖效果次之，而麦芽糖、木糖、淀粉等虽然也是微生物发酵中常用碳源，但这些迟效碳源效果明显没有速效碳源的效果好。故选取甘油作为碳源进行下一步优化。有机氮源中除含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸外，还含有少量的糖类、脂肪、无机盐等，所以有机氮源的作用要高于无机氮源，效果较好的有机氮源



(a)碳源筛选



(b)氮源筛选



(c)无机盐筛选

图 5　碳源、氮源及无机盐筛选

Fig. 5　Carbon source screening, nitrogen source screening and inorganic salt screening

是酵母提取物,而无机氮源的效果明显低于有机氮源,故选取酵母提取物作为氮源进行下一步培养基优化。K_2HPO_4 作用效果明显高于其它无机盐,故选取 K_2HPO_4 进行下一步的优化实验。由图 6 可知,甘油、酵母粉、K_2HPO_4 的最优质量浓度通过质量浓度梯度实验确定了范围,将其确认为中心值,并进行响应面法优化,进一步缩小范围,以确定最佳的发酵培养基配方。

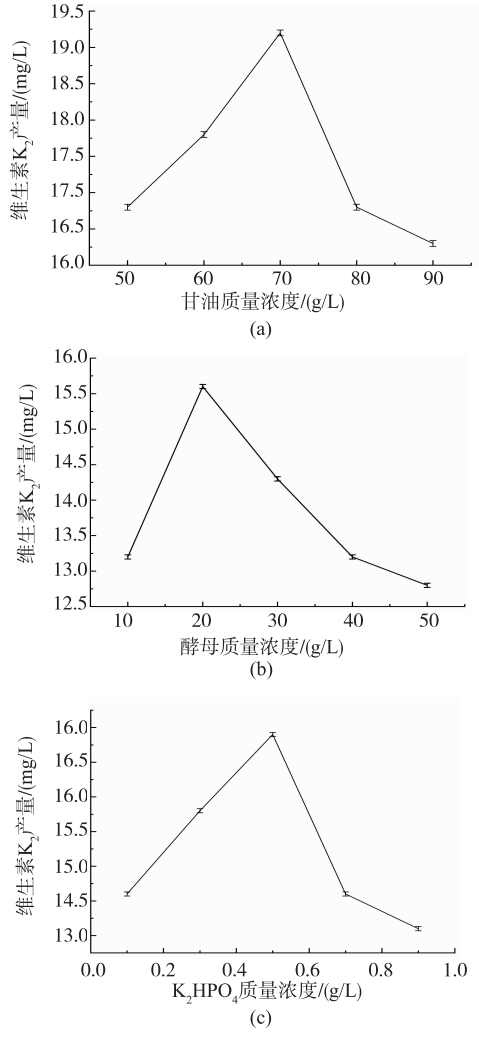


图 6　不同质量浓度的碳源、氮源以及无机盐对纳豆芽孢杆菌产维生素 K_2 产量的影响

Fig. 6　Effects of different concentrations of carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts on vitamin K_2 production by *Bacillus natto*

2.3　响应面法优化回归模型的建立及其分析

根据图 5—6 中碳氮源、无机盐筛选和中心值确定以及文献[26-27]报道,选取以下 3 种培养基成分并采用 Design-Expert 软件的 Box-Behnken 设计响应面回归分析实验,按组合进行 15 次发酵实验,维生素 K_2 产量测定结果见表 3。

建立维生素 K_2 发酵工艺参数的回归模型,获得本实验评价指标(维生素 K_2 产量)的响应值对自变量 A (KH_2PO_4)、B(甘油)、C(酵母粉)的二次多项式回方程：维生素 K_2 产量 $=21.31+0.35A+0.51B+0.28C+0.14AB-0.072AC-0.44BC-1.34A^2-1.56B^2-2.37C^2$,以维生素 K_2 产量为衡量指标对该模型进行方差分析和模型系数进行显著性差异检验。如表 4 所示，回归模型总体在统计学上是呈极显著的($p=0.000\ 4<0.01$)，说明该实验模型具有统计学意义，并且数据分析是有效的；失拟项 $p=0.984\ 9>0.05$,不显著,说明实验模型拟合度较好,残差可能来源于实验过程中的随机误差。模型的校正系数 $R^2=0.955\ 7$,说明该实验具有较高可信度,并且误差较小。在所选取的各因素水平范围内,3 个因素的影响顺序为:B(甘油)> A(酵母粉)> C(KH_2PO_4),且甘油($p=0.008\ 1<0.01$)、KH_2PO_4($p=0.033\ 9<0.05$)对维生素 K_2 产量的影响显著,酵母粉($p=0.069\ 9>0.05$)对维生素 K_2 产量的影响不显著。

表 3　中心组合实验设计方案及响应值

Table 3　Design scheme of central combination experiment and response value

试验号	KH_2PO_4 质量浓度(A)/(g/L)	甘油质量浓度(B)/(g/L)	酵母粉质量浓度(C)/(g/L)	维生素 K_2 产量/(mg/L)
1	−1	0	−1	16.84
2	1	−1	0	18.14
3	−1	0	1	17.65
4	0	−1	−1	16.16
5	1	0	1	18.21
6	1	1	0	19.36
7	0	1	1	17.72
8	−1	1	0	18.39
9	0	−1	1	17.48
10	0	0	0	20.83
11	0	0	0	21.87
12	0	0	0	21.22
13	−1	−1	0	17.71
14	1	0	−1	17.69
15	0	1	−1	18.14

根据模型拟合出的两两因素间相互作用的响应面图,进一步研究各因素间的交互作用强弱[28-31]。

表 4　回归模型方差分析

Table 4　Variance analysis of the regression model

项目	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	36.57	9	4.06	34.56	0.000 6	**
$A(KH_2PO_4)$	0.99	1	0.99	8.39	0.033 9	
B(甘油)	2.12	1	2.12	18.04	0.008 1	**
C(酵母粉)	0.62	1	0.62	5.29	0.069 9	*
AB	0.073	1	0.073	0.62	0.466 7	
AC	0.021	1	0.021	0.18	0.690 0	
BC	0.76	1	0.76	6.44	0.052 1	*
A^2	6.65	1	6.65	56.55	0.000 7	**
B^2	9.04	1	9.04	76.86	0.000 3	**
C^2	20.69	1	20.69	175.92	< 0.000 1	**
残差	0.59	5	0.12			
失拟项	0.036	3	0.012	34.56	0.984 9	not significant
净误差	0.55	2	0.28			

注:* 为显著;** 为极显著。

三维响应面图和二维等高线图分析表明,随着甘油和酵母粉质量浓度的增大,维生素 K_2 产量也随之增加。但当质量浓度增大到一定程度后,维生素 K_2 产量有下降的趋势,见图 7—9。且甘油、酵母粉质量浓度交互作用响应面图坡度较陡,说明对维生素 K_2 产量的影响显著,与方差分析结果一致。KH_2PO_4 和甘油、KH_2PO_4 和酵母粉交互作用响应面图坡度较平缓,对维生素 K_2 产量的影响不显著。

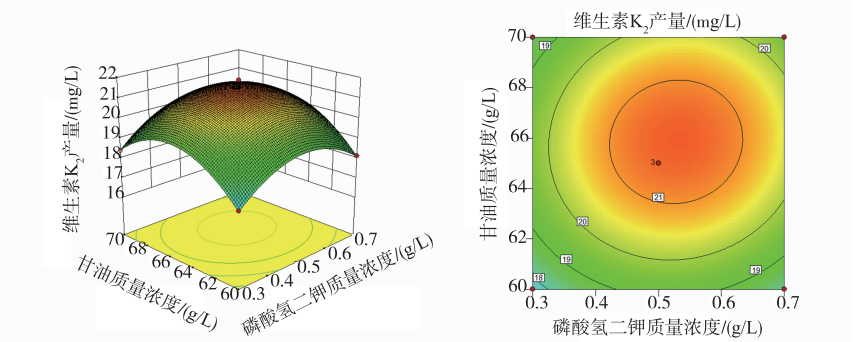


图 7　甘油和磷酸氢二钾对维生素 K_2 产量影响的响应面图和等高线图

Fig. 7　Response surface map and contour map of the combined effects of glycerol and potassium dihydrogen phosphate on vitamin K_2 yield

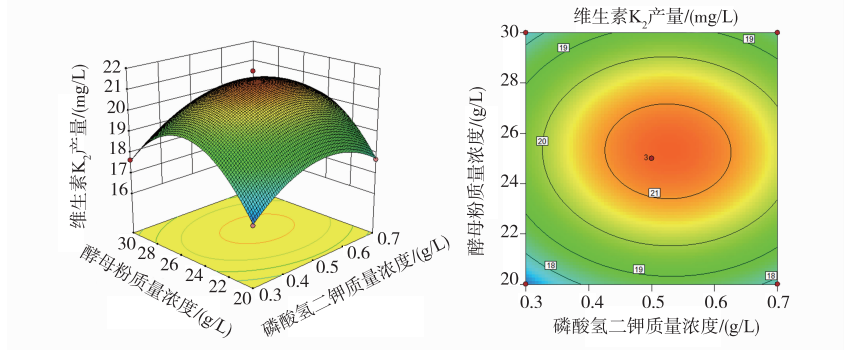


图 8　酵母粉和磷酸氢二钾对维生素 K_2 产量影响的响应面图和等高线图

Fig. 8　Response surface map and contour map of the combined effects of corn steep liquor and potassium dihydrogen phosphate on vitamin K_2 yield

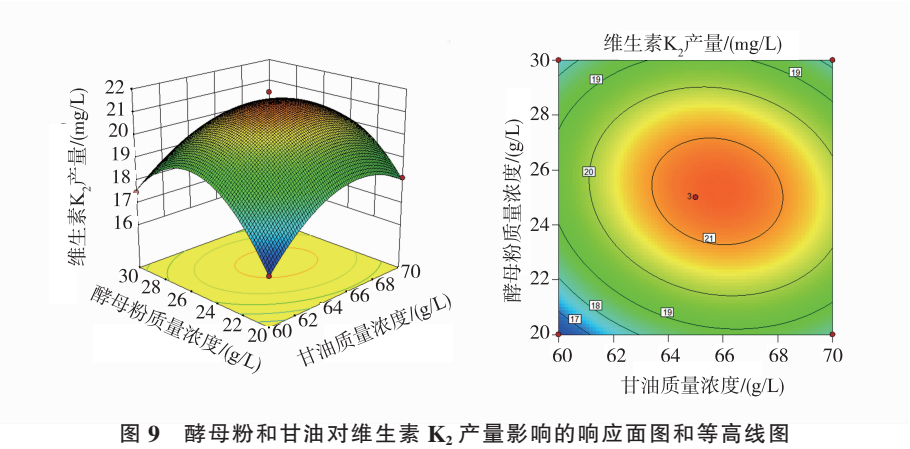


图 9　酵母粉和甘油对维生素 K_2 产量影响的响应面图和等高线图

Fig. 9　Response surface map and contour map of the combined effects of yeast and glycerol on vitamin K_2 yield

通过对响应面图和等高线图的综合分析，并结合 Design-Expert 统计软件对数据的运算处理和响应值预测，在本实验所考察的影响纳豆芽孢杆菌发酵产量的因素和水平范围内，纳豆芽孢杆菌发酵最优工艺为：KH_2PO_4 0.69 g/L，甘油 66.01 g/L，酵母粉 25.12 g/L，在此条件下维生素 K_2 的最大预测产量为 20.47 mg/L。为验证该最优工艺参数，经 3 组重复实验，每组 3 个平行，维生素 K_2 产量均值为 20.89 mg/mL，该均值与响应面分析实验的预测值接近，响应面分析法优化出的最优纳豆芽孢杆菌发酵工艺重复性好。

3 结　语

本研究表明，常压室温等离子体生物诱变系统能够有效地诱变纳豆芽孢杆菌，获得一株维生素 K_2 优势突变株 B-N-2，维生素 K_2 产量是诱变前的 3.23 倍。遗传稳定性试验表明，经诱变后获得的维生素 K_2 优势突变株 B-N-2 保持较高的遗传稳定性。与传统的三角瓶摇瓶培养相比，目前微生物制药领域的微孔板培养技术具有高度平行化、效率高、工作容积小和低消耗等优势[32-33]。作者使用 24 孔板进行复筛，这在目前的相关文献中报道较少，该方法能够更加快捷高效地进行诱变选育。通过 Box-Behnken 优化维生素 K_2 发酵培养基，得到最佳发酵培养基为：酵母粉(25.12 g/L)、甘油(66.01 g/L)、K_2HPO_4(0.69 g/L)。经实验验证后，维生素 K_2 产量较优化前提高了 56.7%。

本研究主要是基于 ARTP 技术选育维生素 K_2 优势突变株，并对其发酵培养基进行优化。后续实验将比较优势突变株与低产菌之间的基因组、转录组以及蛋白质组，进一步探索二者之间的差异。同时摸索优势突变株的最佳培养条件，如前体流加方式、阶段控制策略等，为进一步提高维生素 K_2 产量以及促进维生素 K_2 的开发应用提供技术支撑。

参考文献：

[1] 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.

[2] KANEKI M，HEDGES SJ，HOSOI T，et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K_2：possible implications for hip-fracture risk[J]. **Nutrition**，2001，17(4)：315-321.

[3] MAHDINIA E，DEMIRCI A，BERENJIAN A，et al. Effects of medium components in a glycerol-based medium on vitamin K (menaquinone-7) production by *Bacillus subtilis natto* in biofilm [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**，2016，42(2)：223-232.

[4] LUO M M，REN L J，CHEN S L，et al. Effect of media components and morphology of *Bacillus natto* on menaquinone-7 synthesis in submerged fermentation[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**，2016，21(6)：777-786.

[5] 严为留，张伟国，钱和. 响应面法优化维生素 K2(MK-7)发酵条件[J]. 工业微生物，2015，45(3)：14-23.

[6] SHEARER M J，BOLTONSMITH. The UK food data-base for vitamin K and why we need it[J]. **Food Chemistry**，2000，68(2)：213-218.

[7] BHALERAO S,CLANDININ T R. Vitamin K_2 takes charge[J]. **Science**,2012,336(6086):1241-1242.
[8] VOS M,ESPOSITO G,EDIRISINGHE J N,et al. Vitamin K_2 is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency[J]. **Science**,2012,336(6086):1306-1310.
[9] NAKAGAWA K,HIROTA Y,SAWADA N,et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme[J]. **Nature**,2010,468(7320):117-121.
[10] TSUKAMOTO Y,KASAI M,KAKUDA H,et al. Construction of a *Bacillus subtilis* (*natto*) with high productivity of vitamin K_2 (menaquinone-7) by analog resistance[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,2001,65(9):2007-2015.
[11] WU W J,AHN B Y,et al. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BY01 with high prod-uctivity of menaquinone for cheonggukjang production[J]. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**,2011,54(5):783-789.
[12] DUAN G W,WU B. Replacing water and nutrients for ethanol production by ARTP derived biogas slurry tolerant *Zymomonas mobilis* strain[J]. **Biotechnology for Biofuels**,2019,12(1),124.
[13] ZHANG X,ZHANG X F,LI H P,et al. Atmospheric and roomtemperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesistool [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2014,98(12):5387-5396.
[14] LAROUSSI M,LEIPOLD F. Evaluation of the roles of reactivespecies,heat,and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure[J]. **International Journal of Mass Spectrometry**,2004,233(1-3):81-86.
[15] 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.
[16] TOSHIRO S,YOHKO Y,YUTAKA O,et al. Efficient production of menaquinone (vitamin K_2) by a menadione resistant mutant of *Bacillus subtilis*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**,2001,26(3):115-120.
[17] 刘国庆,赵肖,胡卫华,等. 一种利用纳豆芽孢杆菌生产维生素 K_2 的方法[P]. 中国专利:CN102808005A,2012-12-5.
[18] SUMI H. Method for culturing *Bacillus subtilis* natto to produce water-soluble vitamin K and food product,beverage,or feed containing the cultured microorganism or the vitamin K derivative[P]. US PATENT:US66771-43B2,2004-01-13.
[19] 严为留,张伟国,钱和,等. 纳豆芽孢杆菌发酵生产 MK-7 的产物提取与检测[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(8):891-895.
[20] 蒋汶,张庆庆,汤文晶,等. 紫外 - 等离子体复合诱变红曲霉产胞外多糖[J]. 食品与发酵工业,2016,42(1):64-69.
[21] 张雪,张晓菲,王立言,等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报,2014,65(7):2676-2684.
[22] 李光,唐小玲,韦璇,等. Surfactin 高产菌株的等离子体诱变及其高通量筛选[J]. 食品与发酵工业,2017,43(2):67-72.
[23] 田萍萍,曹鹏,常传友,等. 阿维菌素生产菌的常压室温等离子体诱变育种及培养基优化[J]. 微生物学通报,2017,44(1):150-160.
[24] YANG L P,LI X G,WEI A Y,et al. A mutant strain with high L-tryptophan productivity obtained by atmosphereic and room temperature plasma[J]. **Bulletin of Fermentation Science and Technology**,2015,44(1):28-32.
[25] 檀沐,赵根海,刘会,等. 产维生素 K_2 黄杆菌复合诱变及发酵优化[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2015,33(4):41-49.
[26] 罗苗苗,胡学超,邱宏伟,等. 微生物发酵法制备维生素 K_2 研究进展[J]. 食品与发酵工业,2015,41(10):221-225.
[27] 李拖平,郭梅,王娜,等. 枯草芽孢杆菌生产 VK_2 的技术工艺条件初探[J]. 食品科学,2018,29(11):379-382.
[28] BERENJIAN A,MAHANNAMA R,TOLBOT A,et al. Efficient media for high menaquinone-7 production:response surface methodology approach[J]. **New Biotechnology**,2011,28(6):665-672.
[29] BERENJIAN A,MAHANNAMA R,TOLBOT A,et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of Menaquinone-7[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2014,172(3):1347-1357.
[28] KHURI A I,MUKHOPADHYAY S. Response surface methodology [J]. **Wiley Interdisciplinary Reviews:Computational Statistics**,2010,2(2):128-149.
[29] RAZA W,WU H S,SHEN Q R,et al. Use of response surface methodology to evaluate the effect of metal irons (Ca^{2+},Ni^{2+},Mn^{2+},Cu^{2+}) on production of antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa*[J]. **Bioresource Technology**,2010,101(6):1904-1912.
[30] 赵天天,曹琦,赵丹,等. 应面法优化低聚合度菊糖面包加工工艺[J]. 食品与发酵工业,2017,43(10):189-196.
[31] 陈博,耿丽晶,黄鹤,等. 响应面法优化速食海鲜羹的加工工艺[J]. 食品工业科技,2017,38(15):218-224.
[32] 周扬,薛正莲,夏俊,等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变及高通量筛选那西肽高产菌株[J]. 工业微生物,2015,3(6):87-93.
[33] 余飞,孙俊峰,刘鹏飞,等. 链霉菌产硫酸新霉素高通量选育模型的建立及优化[J]. 食品与发酵工业,2019,45(8):162-177.