



Nisin 高产菌株的高通量筛选

龙燕¹, 刘然², 梁恒宇^{3,4}, 刘天罡^{1*}

¹ 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

² 武汉臻智生物科技有限公司, 湖北 武汉 430075

³ 安泰生物工程股份有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 161031

⁴ 武汉生物技术研究院, 湖北 武汉 430075

摘要:【目的】乳酸链球菌素(nisin)是一种天然生物活性抗菌肽,对包括食品腐败菌和致病菌在内的许多革兰氏阳性菌具有强烈的抑制作用,而用作食品的防腐剂。本研究通过建立高通量筛选方法,实现高效快速省力的高产菌株筛选,为工业上筛选高产菌株提供研究方案。【方法】通过对 *Lactococcus lactis* ATCC11454 菌株进行紫外诱变,获得 2511 株突变株。利用 Biomek FXP 自动工作站建立 96 微孔板的高通量筛选方法,突变株经高通量挑选、菌种培养及菌液稀释后,加入到生长至对数中期的藤黄微球菌中,采用改进后的比浊法快速检测 nisin 生物活性。用此方法对突变株进行初筛、复筛后可得到 nisin 高产菌株,并通过摇瓶发酵评估高通量筛选方法。【结果】确定比浊法检测的条件为: nisin 活性稀释在 10–25 IU/mL 范围内,与藤黄微球菌反应 2 h 后检测藤黄微球菌的菌体量(OD_{600})。2511 株突变株经过 2 轮高通量筛选,最终获得约 50 株产量提升的菌株,对其中 8 株进行摇瓶精确测量,显示产量均有提高,并且其中一株产量提升了 30%,成功建立了高通量筛选 nisin 高产菌株的方法。【结论】利用比浊检测法,在其基础上成功建立高通量筛选高产 nisin 菌的方法,经过初筛复筛,整个周期由 1 人耗时 5 d 即可完成 2511 株突变株的筛选工作。相较于传统的选育方法,高通量筛选具有快速、稳定、高效的特点,提高了筛选效率,缩短了选育周期,是工业上筛选高产 nisin 菌的有效手段。

关键词: 高通量自动化筛选, nisin, 乳酸乳球菌 ATCC11454

乳酸链球菌素(nisin)是乳酸菌产生的一种天然活性抑菌多肽,属于羊毛硫抗生素家族^[1]。成熟的 nisin 由 34 个氨基酸构成,对于大多数革兰氏

阳性菌及其芽孢具有强烈的抑制作用,在与 EDTA 等共同作用时对革兰氏阴性菌也具有杀伤作用^[2],是唯一被批准用于食品防腐的细菌素^[3]。Nisin 对

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-16; 修回日期: 2018-01-18; 网络出版日期: 2018-02-01

蛋白酶特别敏感, 在消化道中能很快被 α -胰凝乳蛋白酶分解而不影响肠道内正常菌群, 对人体基本无毒性, 也不与医用抗生素产生交叉抗药性^[4]。现已成为一种极具前景的绿色食品添加剂和潜在的抗生素替代品, 被广泛应用于食品工业及生物医药领域^[5]。

目前市场对于 nisin 的需求极大, 近年来利用基因工程技术提高 nisin 产量的研究日渐增多, 胡红梅等^[6]通过增加 nisin 产生菌的免疫基因 *nisI* 的拷贝数使 nisin 产量提高 32%。樊苗苗等^[7]通过构建 *nisA* 游离型和 *nisA* 整合型表达载体以实现 *nisA* 的过表达, 结果游离型表达载体菌株的 nisinA 产量提高了 31%。而利用体外合成的方法仅初步实现了 nisin 的合成, 尚不能实现 nisin 的大量生产^[8]。因此, 目前 nisin 主要通过乳酸菌发酵生产, 而传统诱变方式仍是选育高产 nisin 菌株的主要方法, 但大量的人工操作使得筛选工作极其耗时费力。菌株选育的关键在于快捷的检测方法, 而限速步骤则是如何从大量突变株中快速筛选出高产菌株。

最常用于检测 nisin 生物活性的方法为琼脂扩散法^[9], 在琼脂表面利用指示菌的生长显示出抑菌效果。但制板、指示菌培养、平板孵育等过程耗时久, 所需时间至少 24–48 h 才能观测到明显抑菌圈从而得到准确结果^[10]。因此, 需要建立一种快速的检测方法以提高检测效率。Berridge 等^[11]以无乳链球菌为指示菌, 运用分光光度法测定 nisin 的生物活性。但该方法灵敏度低, 且对耗材需求量大。本研究以普遍应用于抗生素效价测定的藤黄微球菌作为指示菌, 利用 96 孔聚乙烯板, 建立了通量更大、灵敏度更高、耗材需求更少且更快捷的检测 nisin 生物活性的方法。该方法快速准确,

极大程度缩短了检测时间, 可用以评估突变株的产量, 解决了筛选菌株的一大难题。

高通量自动化筛选技术弥补了常规育种的另一不足。高通量筛选(high throughput screening, HTS)技术^[12–14]是以微孔板为载体, 实验过程自动化, 检测灵敏快速, 实验数据的采集与分析由计算机分析处理, 通过单个人员操作即可在短时间内筛选数以万计的样品^[15]。通过建立标准化的实验程序^[16], 利用高通量筛选技术能在大量的突变株中实现快速筛选, 大大缩短筛选所需的时间。本研究将传统育种、快捷的检测方法以及高通量筛选技术相结合, 设计了以藤黄微球菌为指示菌通过比浊法快速测定 nisin 效价的方法, 在此基础上建立了 nisin 高产菌选育的高通量筛选方法。通过对 *Lactococcus lactis* ATCC11454 进行常规诱变与高通量筛选, 首次实现了 nisin 高产菌株的高通量筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: nisin 产生菌乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* ATCC11454 购于美国标准生物品收藏中心。效价检测指示菌藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* NCIB 8166 购于中国 BNCC 菌种库。

1.1.2 试剂与培养基: nisin 标准品, Sigma N5764, 比活性 1000 IU/mg, 用 0.02 mol/L HCl 配置成 10000 IU/mL 的母液。平板及种子培养基: M17 培养基(g/L): 大豆蛋白胨 5.00, 牛肉膏 5.00, 胰蛋白胨 5.00, 酵母提取物 2.50, 抗坏血酸 0.50, MgSO₄ 0.25, β -甘油磷酸二钠 19.00, 使用时添加 0.5% (W/V) 葡萄糖, 固体培养基在液体培养基基础上加入 18 g/L 琼脂。发酵培养基(g/L): 蔗糖 10.0,

酵母提取物 10.0, 蛋白胨 10.0, KH_2PO_4 10.0, NaCl 2.0, MgSO_4 0.2。效价检测培养基(g/L): 胰蛋白胨 12.0, 酵母提取物 7.5, NaCl 7.5, NaH_2PO_4 3.0, 使用时添加 0.75% (W/V)葡萄糖, 严格控制 pH 7.1, 固体培养基在液体培养基基础上加入 20 g/L 琼脂。

1.1.3 仪器设备与耗材: Greiner bio-one 96 孔板。微生物菌落挑选系统 Molecular Devices Qpix 460、Thermo 连续分液仪、Biomek FXP 自动化工作站、Perkin Elmer 微孔板酶标仪、Thermo 台式冷冻离心机和 Kuhner 高通量温控摇床由武汉生物技术研究院高通量平台提供。

1.2 紫外诱变

1.2.1 *L. lactis* ATCC11454 生长曲线测定: 将 *L. lactis* ATCC11454 在平板上划线后于 30 °C 培养 12 h, 挑取活化后的单菌落接入 10 mL GM17 培养基, 于 30 °C 静置培养 12 h。接着以 2%接种量转接于 50 mL GM17 培养基, 每隔 1 h 取样测定 OD_{600} , 从而绘制 *L. lactis* ATCC11454 生长曲线。

1.2.2 紫外诱变: 取于种子培养基中培养至对数期的 *L. lactis* ATCC11454 野生型菌液, 4000 r/min 离心 10 min, 去上清后用无菌水重悬并稀释至浓度为 10^4 个/mL。取 15 mL 稀释后菌液于无菌玻璃平皿内, 放入灭菌的转子, 将平皿置于磁力搅拌器上, 并调节转速, 整个装置平放在 15 W 紫外(UV)灯管下。调整照射距离为 26 cm, 照射时间梯度设为 0、10、20、30、40、50、60、70 s。未照射前取 100 μL 菌液, 每照射完 1 个梯度, 即取 100 μL 涂布在种子 GM17 平板上, 并用锡箔纸包裹, 整个操作过程均在红光中进行。将平板于 30 °C 避光培养 2 d, 统计平板上的菌落数, 计算存活率, 绘制致死率曲线。计算时以 0 s 的活菌数

为基准, 计算不同 UV 剂量的致死率。致死率为 0 s 的活菌数减去照射后的活菌数, 再除以 0 s 的活菌数。

1.3 比浊法检测 nisin 生物活性

以藤黄微球菌为指示菌, 将藤黄微球菌于效价培养基平板上划线, 30 °C 培养 24 h, 挑取单菌接于液体培养基中 30 °C、220 r/min 培养 12 h 作为种子液。以 2%接种量接于 50 mL 效价培养基中, 220 r/min、30 °C 培养至酶标仪测定 OD_{600} 为 0.3 左右。使用 Biomek FXP 自动化工作站将菌液每孔 200 μL 分装于 96 孔板。

将 10000 IU/mL nisin 母液和 *L. lactis* ATCC11454 发酵液分别用 0.02 mol/L HCl 稀释不同倍数, 85 °C 加热 5 min, 4000 r/min 离心 10 min, 随后取 50 μL 上清分别加入到上述 96 孔板中, 以未添加 nisin 和 0.02 mol/L HCl 的孔及添加同体积 0.02 mol/L HCl 的孔为对照组。30 °C、220 r/min 培养, 每 10 min 于酶标仪中测定各孔 OD_{600} , 以确定检测的最佳时间及最适稀释倍数。

1.4 Nisin 高产菌株的高通量筛选

1.4.1 Qpix460 全自动高通量克隆挑选: 使用 Thermo 连续分液仪将 GM17 培养基以每孔 200 μL 分装于 96 孔板中, 利用 Qpix460 全自动高通量克隆挑选系统对平板上生长的突变株进行挑选, 40 min 内可完成多达 3000 个突变株的挑选工作, 并将单菌落接种于相应孔中, 每个 96 孔板中分别设有野生型对照和空白对照各 3 个, 标记为 A 板(图 1)。

1.4.2 菌株培养与菌液处理: 将 A 板于 30 °C 培养箱静置培养 18 h, 用酶标仪测定 A 板 OD_{600} , 剔除与野生型对照的 OD_{600} 差异大于 0.05, 生长状况差异较大、平行比较误差大的菌株。利用 Thermo

连续分液仪将 0.02 mol/L HCl 分装于新的 96 孔板, 标记为 B 板。从 A 板吸取一定体积的菌液对应注入 B 板中, 利用枪头将稀释后的菌液吹吸混匀。静置 30 min 后将 B 板 4000 r/min 离心 10 min, A 孔余下菌液由 Biomek FXP 工作站加入等体积的 50%甘油保种。

1.4.3 比浊法检测与筛选: 对稀释后菌液采用比浊法检测 nisin 生物活性。将指示菌培养至 OD_{600} 为 0.3 左右, 利用 Biomek FXP 自动化液体处理站将指示菌每孔 200 μL 分装于新的 96 孔板, 标记为 C 板, 并从离心后的 B 板中吸取 50 μL 上清对应注入 C 板中吹吸混匀。在体系反应一定时间后用 Perkin Elmer 微孔板酶标仪测定体系的 OD_{600} , 并计算同一块 96 孔板中诱变株作用于指示菌后的 OD_1 与野生型作用于指示菌后的 OD_0 的差值

ΔOD_{600} , 绘制散点图。初步筛选出差值更小产量更高的菌株, 随后重复上述步骤进行复筛。

1.5 摇瓶发酵鉴定

将复筛后得到的高产菌株于 GM17 平板划线, 30 °C 培养 24 h, 挑取 5–6 个单菌落于 10 mL 种子培养基中 30 °C 培养 12 h, 随后以 2% 接种于 50 mL 摇瓶, 30 °C 培养, 从 16 h 开始每 2 h 取样测定效价。

2 结果和分析

2.1 紫外诱变

2.1.1 *L. lactis* ATCC11454 生长曲线: 在诱变育种中, 一般都要求选用生理状态一致的微生物细胞, 使得菌悬液的细胞在诱变处理前应尽可能达

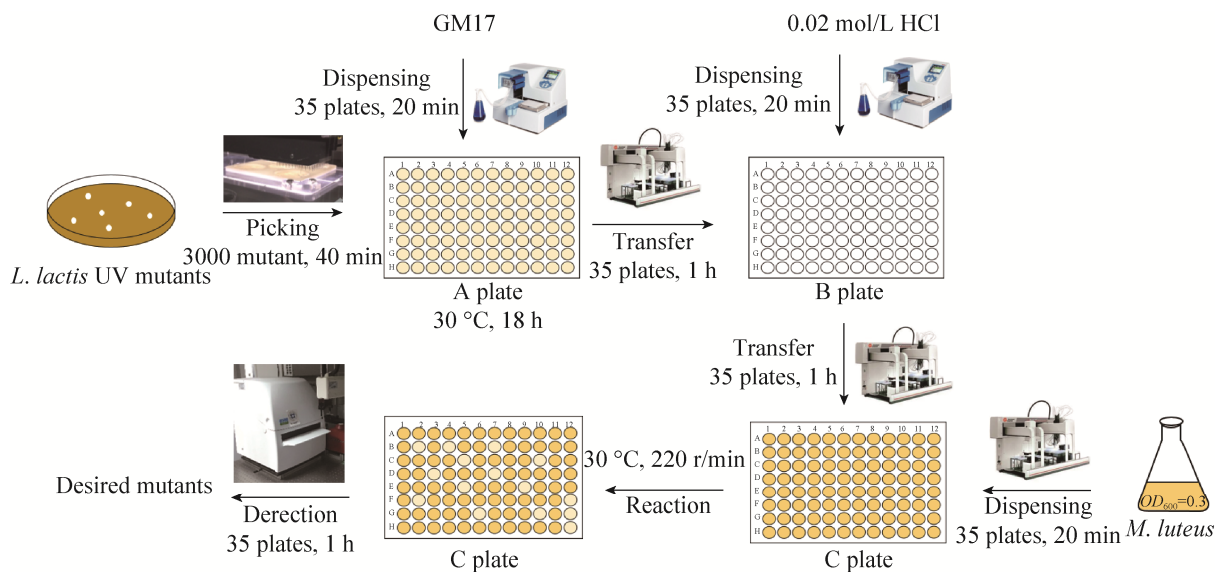


图 1. 高通量工作站筛选示意图

Figure 1. The screening process of high throughput automation workstation. Dispensing the GM17 medium into 96-well plates by Thermo Multidrop Combi and then picking the single colony of the mutant in 96-well plates by Molecular Devices Qpix 460, the survival rates up to 98%. The Biomek FXP automated workstations complete multiple pipetting operations and the Perkin Elmer automated microplate reader complete the data reading. One person took 24 h to complete all the high-throughput screening process.

到同步生长状态。因此,常采用对数生长期的细胞,此时细胞的生长状态比较同步,容易发生变异,且重复性较好^[17]。通过对 *L. lactis* ATCC11454 的生长状态进行检测,由图 2 可以看出,野生型 *L. lactis* ATCC11454 在 0–2 h 时菌体生长缓慢,此时仍处于适应新的培养环境阶段。菌体在培养 2–7 h 后生长增快处于对数生长期,随后进入稳定期。根据 *L. lactis* ATCC11454 的生长曲线可以确定对数中期大约在 3–4 h 之间,在后续进行紫外诱变时应将菌株根据生长曲线培养至对数中期。

2.1.2 紫外诱变致死率曲线: 紫外诱变是利用 DNA 分子强烈吸收紫外线,可引起 DNA 链的断裂以及 DNA 分子内部结构的改变使得被诱变生物发生可遗传给后代的变异^[18]。在菌体密度为 10^4 个/mL 时,菌体在距离 15 W 紫外灯 26 cm 的条件下,每隔 10 s 测定菌株的致死率,结果如图 3 所示,10 s 以内菌株大量存活,随着紫外诱变时间的增加,菌株致死率逐渐升高,照射 40 s 时就有 90% 以上的菌体死亡,照射 50 s 时已无菌存活。现代育种理论认为^[19],通常在致死率 60%–80% 之间时,发生正突变的概率更高,因此选择照射时间 35 s 进行诱变。

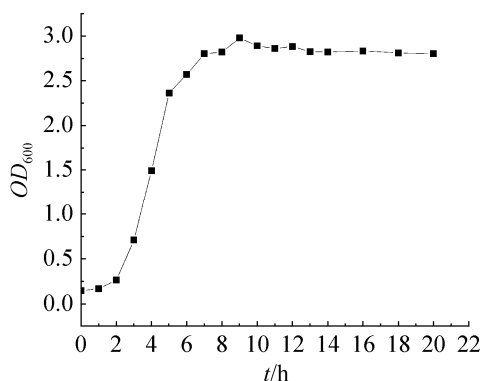


图 2. *L. lactis* ATCC11454 生长曲线

Figure 2. The growth curve of *L. lactis* ATCC11454.

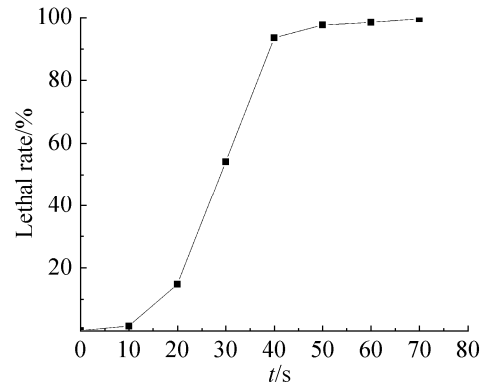


图 3. *L. lactis* ATCC11454 紫外照射致死率曲线

Figure 3. The lethality curve of *L. lactis* ATCC11454 exposed to ultraviolet radiation.

2.2 比浊法检测条件确定

2.2.1 比浊法检测时间与最佳检测范围的确定:

由于 nisin 对藤黄微球菌的生长具有抑制作用, nisin 的浓度越高,对藤黄微球菌的抑制越强,则藤黄微球菌 OD_{600} 随着时间下降越显著^[20],因此可以通过藤黄微球菌生长受抑制的程度来反应 nisin 的浓度。高通量筛选属于一种粗略的筛选方法,因此只有将评价体系做得更精确才能更准确地进行菌株筛选。

为了更精确地评估 nisin 浓度与藤黄微球菌 OD_{600} 之间的相关性,我们将 nisin 标准品稀释至不同浓度,并与培养好的藤黄微球菌反应,通过测定二者作用后的 OD_{600} 以对 nisin 的产量进行细致的评估。按照 nisin 浓度从 8.3–200.0 IU/mL 的条件与初始 OD_{600} 为 0.3 的藤黄微球菌作用一定时间后,对藤黄微球菌的 OD_{600} 进行测量。由于不同浓度 nisin 对藤黄微球菌抑制程度不同,在反应 1 h 后,反应体系中的藤黄微球菌的 OD_{600} 相较于对照组呈现不同程度的下降。在随后的 3 h 内,该差异随着时间逐渐增大(图 4)。为缩短检测时间并且选择 OD_{600} 差异跨度较为合理的范围,后续实验将选择在二者反应 2 h 后进行测定。

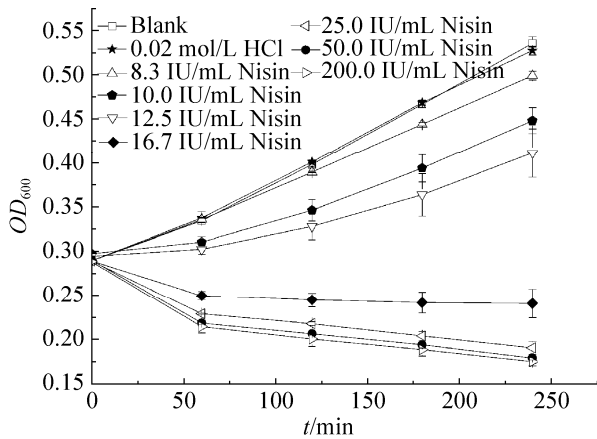


图 4. 藤黄微球菌在不同浓度 nisin 作用下的生长曲线
Figure 4. The growth curves of *M. luteus* reaction with different concentrations of nisin. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent the data range.

从图 5 结果可以看出, 当 nisin 终浓度在 10–25 IU/mL 范围内, 藤黄微球菌的 OD_{600} 随 nisin 浓度的升高呈明显的线性降低。当 nisin 终浓度在 25–50 IU/mL 范围内, 虽然藤黄微球菌的 OD_{600} 随 nisin 浓度的升高数值减小, 但并没有呈现明显的线性关系, 且 OD_{600} 的变化范围狭窄。当 nisin 终浓度在 50–200 IU/mL 范围内, 藤黄微球菌的 OD_{600} 随 nisin 浓度的升高没有明显差异, 说明此区间不能利用藤黄微球菌的 OD_{600} 来反映 nisin 浓度的变化。

因此, 在高通量筛选中, 虽然出发菌株可能不同, 但经过适当倍数稀释后使发酵液中 nisin 浓度在 10–25 IU/mL 区间内, 可以通过藤黄微球菌的 OD_{600} 数值来反映 nisin 的浓度差异。选择测定样品与初始 OD_{600} 为 0.3 的藤黄微球菌反应 2 h 后的 OD_{600} , 样品中 nisin 的含量越高, 则藤黄微球菌的 OD_{600} 值越小, 可通过比较突变株和野生型数值差异来筛选高产菌株。

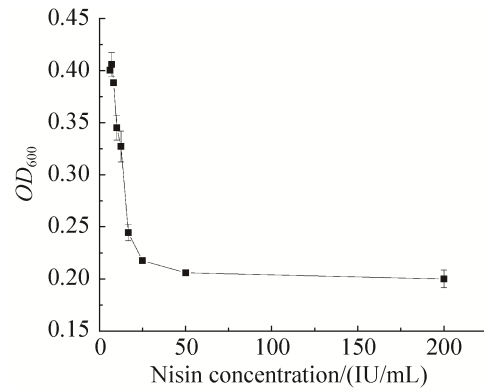


图 5. 藤黄微球菌与不同浓度 nisin 作用 2 h 后的生物量(OD_{600})

Figure 5. The biomass of *M. luteus* detected after a 2 h reaction with different concentrations of nisin. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent the data range.

2.2.2 *L. lactis* ATCC11454 的最适稀释倍数: 通过上述研究已表明只有在适宜浓度的 nisin 范围内, 才能通过测量藤黄微球菌的 OD_{600} 来反映 nisin 的浓度, 因此, 需针对 *L. lactis* ATCC11454 发酵液的处理条件进行优化。诱变菌株经挑选后于 96 孔板中培养 18 h, 随后对发酵液进行适当稀释, 选择合适稀释倍数以使得发酵液对藤黄微球菌的抑制在线性范围内, 利于后续筛选。从图 6 中可以看出, 当 *L. lactis* ATCC11454 发酵液最终稀释倍数在 15–50 倍的区间内, 随着 nisin 浓度的降低, 藤黄微球菌的 OD_{600} 呈线性升高。因此, 为了使不同产量的菌株的发酵液经过稀释后都能处于线性相关的范围内, 后续将选择最终稀释倍数为 25 倍的稀释条件进行高通量筛选。

2.3 高通量筛选 nisin 高产菌

2.3.1 初筛: 按照 1.2.2 所述方法, 经 UV 诱变, 在 2 d 的时间内, 剔除与野生型对照的 OD_{600} 差异大于 0.05、生长状况差异较大、平行比较误差大

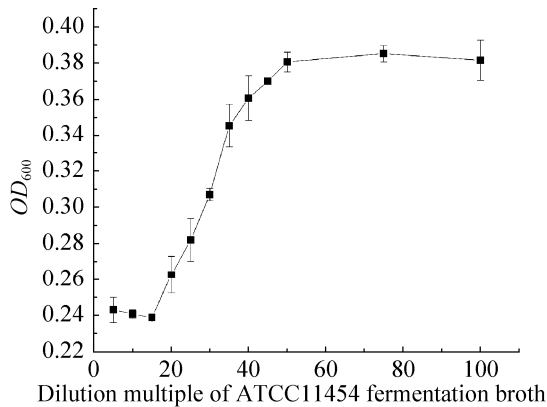


图 6. 藤黄微球菌与不同稀释倍数的 *L. lactis* ATCC11454 作用 2 h 后的生物量(OD_{600})

Figure 6. The biomass of *M. luteus* detected after a 2 h reaction with different dilution of *L. lactis* ATCC11454 fermentation broth. Three replicates per sample were assayed and the error bars represent the data range.

的菌株后,共获得了 2511 株生长状态良好的突变株。随后进行高通量初筛,整个初筛过程耗时 1 d。筛选过程如图 1 所示,利用 Qpix460 将诱变株挑于 96 孔板中培养,经过优化,96 孔板培养成功率达到 98%以上,18 h 后将发酵液进行稀释处理并离心,随后将其与 OD_{600} 长至 0.3 的藤黄微球菌进行反应。

上述研究已表明,进行比浊法检测时,藤黄微球菌初始 OD_{600} 相同,nisin 产量高的菌株对藤黄微球菌的抑制更强,使得藤黄微球菌 OD_{600} 更低。在 2 h 后通过对 2511 株诱变菌株作用于藤黄微球菌的 OD_1 与同一块 96 孔板中野生型作用于藤黄微球菌的 OD_0 的差值 ΔOD_{600} 进行分析,如图 7 所示,该值越小,则相应诱变菌株的产量越高。因此,在横坐标轴以下的为发生正突变使得产量有所提升的菌株,随后从中选择 ΔOD_{600} 小于 -0.01 的菌株共 240 株进行复筛。

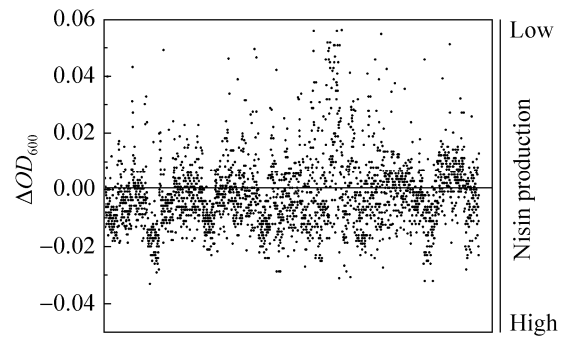


图 7. 初筛时突变株与野生型作用于藤黄微球菌的生物量差值(ΔOD_{600})

Figure 7. The *M. luteus* biomass differences between reaction with wild-type and mutant strains during the first screening. OD_1 : OD_{600} of *M. luteus* reaction with mutant strains fermentation broth; OD_0 : OD_{600} of *M. luteus* reacted with wild type strain fermentation broth; $\Delta OD_{600} = OD_1 - OD_0$.

2.3.2 复筛: 通过优化筛选流程,在初筛后增加复筛的流程,复筛结果如图 8 所示,50%的菌株产量仍保持正向提升, ΔOD_{600} 小于 -0.01 的菌株约有 50 株。随后从中挑选出 8 株 ΔOD_{600} 最小、产量提升幅度最高的菌株进行摇瓶发酵以检测产量,用以评估筛选实验的准确性。整个初筛与复

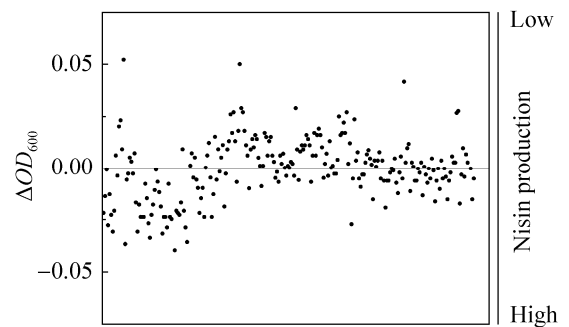


图 8. 复筛时突变株与野生型对藤黄微球菌抑制的生物量差异(ΔOD_{600})

Figure 8. The *M. luteus* biomass differences between reaction with wild-type and mutant strains during the second screening. OD_1 : OD_{600} of *M. luteus* reaction with mutant strains fermentation broth; OD_0 : OD_{600} of *M. luteus* reacted with wild type strain fermentation broth; $\Delta OD_{600} = OD_1 - OD_0$.

筛过程共耗时 5 d, 剔除生长状态差异较大的菌株后对余下 2511 株突变菌进行筛选, 并实现 50 株菌的 2 次筛选工作, 工作量与传统的筛选方法 1 个月的工作量相当。

2.3.3 摇瓶发酵检测产量: 将选出的 8 株菌进行摇瓶发酵, 结果如表 1 所示, 在 16–18 h 时各菌株产

量已达到稳定, 20 h 时产量略有下降。与 1 号原始菌株相比, 随机挑选出的 2–9 号诱变菌株的 nisin 产量均有不同幅度的提升, 且 *P* 值均小于 0.05, 为显著差异, 其中 7 号突变株产量最高, 发酵 18 h 后相对于原始菌株提升了 30%。表明经过初筛复筛的高通量筛选结果可靠, 获得阳性突变株的效率极高。

表 1. 突变株与野生型在摇瓶发酵中不同时间 nisin 的产量

Table 1. Production of nisin at different times in shake flask fermentation of mutant strains and wild-type strain

Strain	16 h			18 h			20 h		
	Nisin production/ (IU/mL)	Rate of rise/%	<i>P</i> -value	Nisin production/ (IU/mL)	Rate of rise/%	<i>P</i> -value	Nisin production/ (IU/mL)	Rate of rise/%	<i>P</i> -value
1	553.66±12.21	–	–	584.85±16.46	–	–	535.78±27.98	–	–
2	724.12±10.88	32	0.0142	738.46±7.83	26	0.0069	675.60±14.45	26	0.0210
3	733.29±12.15	35	0.0027	743.84±23.25	27	0.0025	683.49±14.68	28	0.0045
4	748.22±10.39	35	0.0104	755.22±9.19	29	0.0097	702.48±10.09	31	0.0072
5	645.20±7.41	17	0.0260	650.90±14.59	11	0.0209	630.29±39.28	18	0.0053
6	717.19±14.37	30	0.0138	729.09±13.22	25	0.0040	665.54±4.59	24	0.0439
7	676.50±22.20	22	0.0208	761.62±6.20	30	0.0037	722.20±13.13	35	0.0004
8	623.14±12.83	13	0.0183	645.76±16.23	10	0.0013	608.67±44.41	14	0.0324
9	726.74±26.27	31	0.0020	744.73±7.61	27	0.0056	696.11±10.20	30	0.0306

1: wild type strain; 2–9: mutant strains. Three replicates per sample were assayed.

3 讨论

Nisin 因其高效的抗菌活性、对人体安全无毒、不易产生耐药性等优点而受到人们广泛的关注^[21]。目前 nisin 仍采用发酵生产, 通过传统育种方式选育高产菌株。传统的选育方法是随机筛选, 即采用摇瓶逐个发酵, 然后测定目标产物的产量, 该方法存在工作量大、耗时费力等缺点, 限制了菌株的大规模筛选。此外, 检测产量常用的琼脂扩散法检测时间长、操作复杂, 进一步制约了菌株筛选工作的展开。因此, 急需建立一种简便、快速的 nisin 高产菌检测与筛选方法来解决这一问题。

琼脂扩散法为最常用的检测 nisin 生物活性的方法, 但国内外的研究者着重于对琼脂扩散法的改进^[22], 而对比浊法研究较少, 筛选 nisin 高产菌株时仍依赖于琼脂扩散法。琼脂扩散法制板过程繁琐, 单个平板可测定样品量仅 8 个左右, 孵育 24 h 后才出现明显结果, 且需利用游标卡尺进行人工测量^[23]。比浊法通过浊度测定来评价指示菌与 nisin 浓度之间的关系, 是一种定性和半定量的筛选方法, 操作简便。检测时以藤黄微球菌为指示菌, 通过样品对指示菌的抑制强度来比较样品的产量高低^[11]。比浊法检测时以 96 孔板为载体, 同批次可检测样品数量大大提高。同时利用酶标仪测定,

减少人工操作的时间消耗,可在短时间内获得大量数据,通过进一步分析即可快速获得高产菌株。相较于琼脂扩散法,检测时间由 24 h 缩短至 2 h,为高通量筛选奠定了基础。

随着高通量筛选技术不断发展和成熟^[24],高通量技术和装置被逐步应用于微生物菌种筛选中。国外已经发明了多种全自动高通量菌种筛选系统^[25-27],可以组合成一套连续的自动化系统。而突变株的培养、菌液处理及比浊法检测等过程对操作时间和精度要求高,高通量筛选设备不仅能满足相关实验要求,还能通过不断地优化相关条件^[28]进一步提高筛选效率。相较于传统的基于琼脂扩散法检测的人工筛选 nisin 高产菌的方式^[29],通过高通量筛选,40 min 内即可完成多达 3000 株突变株的挑选,存活率高达 98%,扩大了筛选规模。经过初筛过程的菌株,将进一步复筛,经 2 次筛选后,筛选结果的准确率大大提高。复筛后选出的 8 株突变株经摇瓶鉴定产量均高于原始菌株,表明优化筛选流程后的高通量筛选方法准确,可以用于评估菌株的产量,适用于大量样品的筛选。

利用比浊法检测、高通量筛选,不仅能降低经济成本,还能缩短菌种选育周期,可在 5 d 内完成多达 3000 株诱变株的筛选,相较于传统筛选加大了菌株筛选范围和数量,可高效、快速地筛选 nisin 高产菌。

本研究以藤黄微球菌作为指示菌,采用比浊法检测 nisin 生物活性,为高通量筛选奠定基础。同时,结合高通量平台设备,实现 nisin 的快速检测,成功建立高产 nisin 菌的高通量筛选方法。对 2511 株突变株的高通量筛选结果显示,该方法快速有效,1 周内即获得了一株产量提升达 30%的

nisin 高产菌株。本方法的建立不仅可以使 nisin 高产菌的筛选效率得到上百倍提高,还能应用于其他微生物的筛选,也为后续培养基优化、体外合成 nisin 的条件优化等提供了更好的选择。

参考文献

- [1] Patton GC, van der Donk WA. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(5): 543-551.
- [2] Bauer R, Dicks LMT. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(2): 201-216.
- [3] Bordignonjunior SE, Miyaoka MF, Costa JDL, Benavente CAT. Inhibiting Gram-negative bacteria growth in microdilution by Nisin and EDTA treatment. *Journal of Biotechnology & Biodiversity*, 2012, 3(4): 127-135.
- [4] Joo NE, Ritchie K, Kamarajan P, Miao D, Kapila YL. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Medicine*, 2012, 1(3): 295-305.
- [5] Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LMT. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 23-28.
- [6] Hu HM, Jiang LK, Lin YH, Huan LD, Zhong J. Enhanced nisin production by overexpression of nisin immunity gene *nisI* in the nisin-producing strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(10): 1341-1346. (in Chinese)
胡红梅, 蒋立科, 林宇恒, 还连栋, 钟瑾. 乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 的表达对乳链菌肽产量的影响. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1341-1346.
- [7] Fan MM, Qiu YM, Liu C, Ji ZX, Ma X, Yu Y, Chen SW. Effect of overexpressing Nisin A structural gene *nisA* on Nisin A production. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(10): 1175-1183. (in Chinese)
樊苗苗, 邱一敏, 刘晨, 冀志霞, 马昕, 虞沂, 陈守文. Nisin A 前体基因 *nisA* 的过量表达对 Nisin A 产量的影响. *生物工程学报*, 2012, 28(10): 1175-1183.
- [8] Cheng F, Takala TM, Saris PEJ. Nisin biosynthesis *in vitro*. *Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology*, 2007, 13(4): 248-254.
- [9] Wolf CE, Gibbons WR. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 1996, 80(4): 453-457.

- [10] Tramer J, Fowler GG. Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 1964, 15(8): 522–528.
- [11] Berridge NJ, Barrett J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *Journal of General Microbiology*, 1952, 6(1/2): 14–20.
- [12] Dunn DA, Feygin I. Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization: submicroliter fluid handling. *Drug Discovery Today*, 2000, 5(12 Suppl 1): 84–91.
- [13] Brandt DW. Multiplexed nanoliter transfers for high throughput drug screening using the biomek 2000 and the high density replicating tool. *Journal of Biomolecular Screening*, 1997, 2(2): 111–116.
- [14] Cohen Y, Schuldiner M. Advanced methods for high-throughput microscopy screening of genetically modified yeast libraries//Cagney G, Emili A. Network biology. Methods in molecular biology, Vol. 781. New Jersey: Humana Press, 2011: 127–159.
- [15] Brandt DW. Core system model: understanding the impact of reliability on high-throughput screening systems. *Drug Discovery Today*, 1998, 3(2): 61–68.
- [16] Fox S, Farr-Jones S, Yund MA. High throughput screening for drug discovery: Continually transitioning into new technology. *Journal of Biomolecular Screening*, 1999, 4(4): 183–186.
- [17] 刘晓蓉. 微生物学基础. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
- [18] Kalra MS, Kuila RK, Ranganathan B. Activation of nisin production by UV-irradiation in a nisin-producing strain of *Streptococcus lactis*. *Experientia*, 1973, 29(5): 624–625.
- [19] 章名春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1984.
- [20] Wu ZL, Jia YS, Tan XW, Yu GH. Fast-detection of the potency of nisin by spectrophotometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(S1): 227–230. (in Chinese)
吴兆亮, 贾永生, 谭相伟, 于广和. 分光光度法快速测定乳链菌肽效价. *分析化学*, 2006, 34(S1): 227–230.
- [21] Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1449–1465.
- [22] Li Y, Gao C, He JT. Effect of culture medium optimization on two methods of nisin detection. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(15): 320–324. (in Chinese)
李莹, 高晨, 贺进田. 培养基优化对两种乳链菌肽效价测定方法的影响. *食品工业科技*, 2016, 37(15): 320–324.
- [23] Chandrapati S, O’Sullivan DJ. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 1998, 63(3): 229–233.
- [24] Beydon MH, Fournier A, Dugeault L, Becquart J. Microbiological high throughput screening: an opportunity for the lead discovery process. *Journal of Biomolecular Screening*, 2000, 5(1): 13–21.
- [25] Blow N. Lab automation: tales along the road to automation. *Nature Methods*, 2008, 5(1): 109–112.
- [26] Wei S, Wang CG, Zhu PY, Zhou GB, Fu W, Wu XY. A high-throughput multiplex tandem PCR assay for the screening of genetically modified maize. *LWT - Food Science and Technology*, 2018, 87: 169–176.
- [27] Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang YZ, Singh M, Zhang C, Schnell C, Yang GZ, Zhang Y, Balbin OA, Barbe S, Cai HB, Casey F, Chatterjee S, Chiang DY, Chuai S, Cogan SM, Collins SD, Dammassa E, Ebel N, Embry M, Green J, Kauffmann A, Kowa C, Leary RJ, Lehar J, Liang Y, Loo A, Lorenzana E, McDonald ER, McLaughlin ME, Merkin J, Meyer R, Naylor TL, Patawaran M, Reddy A, Röelli C, Ruddy DA, Salangsang F, Santacrose F, Singh AP, Tang Y, Tinetto W, Tobler S, Velazquez R, Venkatesan K, Von Arx F, Wang HQ, Wang ZY, Wiesmann M, Wyss D, Xu F, Bitter H, Atadja P, Lees E, Hofmann F, Li E, Keen N, Cozens R, Jensen MR, Pryer NK, Williams JA, Sellers WR. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nature Medicine*, 2015, 21(11): 1318–1325.
- [28] Duffy S, Avery VM. Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 2012, 86(1): 84–92.
- [29] Zheng ZX, Zhu YG, Zhou B, Chen ML. Screening of high-yield nisin-producing *Lactococcus lactis* mutants using adaptive mutation methods. *Industrial Biotechnology*, 2016, 12(6): 350–356.

High-throughput screening method for high-yield nisin strain

Yan Long¹, Ran Liu², Hengyu Liang^{3,4}, Tiangang Liu^{1*}

¹ Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

² J1 Biotech Co., Ltd, Wuhan 430075, Hubei Province, China

³ Amtech Biological Technology Co., Ltd, Qiqihar 161031, Heilongjiang Province, China

⁴ Wuhan Institute of Biotechnology, Wuhan 430075, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] Nisin, a bioactive antimicrobial peptide, inhibits many Gram-positive bacteria causing food spoilage and infection. In this study, cost-effective screening method for high-yield nisin strains was developed using high-throughput screening technology to provide a practical method for screening during the industrial production process. [Methods] Mutants (2511) were obtained by applying ultraviolet mutagenesis treatments to *Lactococcus lactis* ATCC 11454, followed by development of a 96-well plate high-throughput screening method using a Biomek FXP automatic workstation to select mutant strains for culture dilution. Diluted bacterial solutions were transferred to another 96-well plate with *Micrococcus luteus* grown to logarithmic phase, and an improved turbidimetric method was used to rapidly detect the biological activity of nisin and screen the mutants associated with the high-yield strains. High-yield strains were fermented by shake-flask fermentation to evaluate the screening method. [Results] Turbidimetric detection revealed nisin activity in the range between 10 and 25 IU/mL, with *M. luteus* biomass detected after a 2 h reaction with nisin. After two rounds of high-throughput screening, about 50 high-yield strains were obtained from the 2511 mutants, with 8 accurately detected by shake-flask fermentation. Results indicated that the nisin yield of the tested strains all increased, with one strain showing a 30% increase in production, indicating the efficacy of the high-throughput screening method. [Conclusion] Our high-throughput screening method was capable of screening high nisin-producing bacteria.

Keywords: high throughput automatic screening, nisin, *Lactococcus lactis* ATCC11454

(本文责编: 李磊)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68755086; E-mail: liutg@whu.edu.cn

Received: 16 November 2017; Revised: 18 January 2018; Published online: 1 February 2018