

# 乳链菌肽高产菌株的选育及其基因定位\*

还连栋 陶 勇 何 松 田宇清 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 以乳酸乳酸球菌 7962 为原始菌株,用紫外线、LiCl、 $^{60}\text{Co}$  及 8-MOP + NUV 等多种理化诱变剂对其进行诱变处理,获得一株乳链菌肽高产突变株 AL2。其效价稳定在 2300~2500 IU/ml。经 DNA 杂交证实,编码乳链菌肽的前体基因位于染色体上,其遗传性状是稳定的。毒理试验表明 AL2 及其产物属于实际无毒类物质。

**关键词** 乳酸乳酸球菌,乳链菌肽,诱变育种,基因定位

乳链菌肽(nisin)是某些乳酸乳酸球菌产生的一种多肽,对许多革兰氏阳性菌,包括梭菌属、芽孢杆菌属和利斯特氏菌属等腐败菌和病原菌有强烈抑制作用,并能被消化道内的酶很快降解成氨基酸,故是一种无毒的天然食品防腐剂。已被 50 多个国家和地区广泛应用于乳制品、罐装食品、高蛋白食品及乙醇饮料的防腐保鲜<sup>[1]</sup>。我国对乳链菌肽的研究和应用尚属空白。为尽快满足我国现代食品工业发展及人民健康的需要,我们以乳酸乳酸球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 7962 为原始菌株,用理化诱变因子多次诱变处理,获得一株乳链菌肽高产突变株 AL2。本文报道该菌株的选育及乳链菌肽基因定位。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

本研究共收集乳酸乳酸球菌 36 株,其中本实验室分离 8 株,本所凌代文教授惠赠 14 株,菌种保藏委员会 7 株,国外收集 7 株。

### 1.2 培养基

乳酸乳酸球菌试管斜面、平板分离、液体种子及发酵培养基均采用 M17G 培养基<sup>[2]</sup>,固体培养基则加入 1.5% 琼脂。

### 1.3 诱变处理方法

1.3.1 紫外线、LiCl、 $^{60}\text{Co}$  等处理方法: 参见文献[3]。

1.3.2 8-MOP + NUV 复合处理方法: 参见文献[4]。

### 1.4 乳链菌肽效价检测

采用生物测定法。测定指示菌为黄色微球菌(*Micrococcus flavus*) NCIB 8166。用英国 Aplin & Barrett 公司样品为标准品。测定方法参见文献[5]。

### 1.5 乳酸乳酸球菌的鉴定

\* 国家自然科学基金资助项目及中国科学院“八五”重点科研项目。

参加本研究工作的还有董可宁研究员、庄增辉研究员。

本文于 1994 年 10 月 24 日收到。

参见文献[6]。

## 1.6 DNA 的提取、纯化、酶切及小片段回收

质粒 DNA 的提取、纯化、酶切及小片段回收均按文献[7]方法。乳酸乳酸球菌总 DNA 的提取按文献[8]方法。

## 1.7 DNA 杂交

用 EcoRI、Hind III 双酶切 pMG503<sup>[9]</sup>, 琼脂糖纯化回收 330 bp 片段作为杂交探针, 使用 Boehringer-Mannheim 公司的 DIG 标记和检测试剂盒, 具体方法按厂方提供的说明书进行。

# 2 结果和讨论

## 2.1 乳链菌肽高产菌株的选育

从国内外收集和分离到的 36 株乳酸乳酸球菌中, 用多种筛选方法反复筛选, 得到一株生长较好、乳链菌肽产量较高的乳酸乳酸球菌 7962 作为进一步研究的原始菌株。用紫外线、LiCl、<sup>60</sup>Co 等多种理化诱变剂对其进行多次单因子处理或复合处理, 使乳链菌肽产量大幅度提高, 获得乳酸乳酸球菌 AL2 高产突变株, 乳链菌肽效价稳定在 2500~2500 IU/ml。菌种选育谱系见图 1。



图 1 菌种选育谱系图

Fig. 1 Genealogy of the mutants

## 2.2 菌株鉴定

参照《一般细菌常用鉴定方法》对 AL2 进行初步鉴定。结果为: 18~24 h 的 AL2 斜面培养物革兰氏染色阳性, 镜检球菌成对或链。接触酶试验阴性。在 pH 7.0 的液体培养基中培养 18~24 h, pH 值降到 4.0~4.5。发酵液用新华滤纸层析, 展开液用正丁醇:冰醋酸:水 (4:1:2), 显色剂用 0.05% 溴酚蓝酒精溶液, 证明产乳酸。依据《伯杰氏系统细菌学手册》<sup>[10]</sup>表明 AL2 确为乳酸乳酸球菌。

## 2.3 基因定位

为进一步证明 AL2 确是来源于乳酸乳酸球菌 7962 的乳链菌肽产生菌。以乳链菌肽产生菌乳酸乳酸球菌 ATCC11454 总 DNA 为模板, 用 PCR 技术扩增编码乳链菌肽前体的基因<sup>[1]</sup>。以扩增片段为探针与 11454、7962、AL2 及不产乳链菌肽的乳酸乳酸球菌 LM0230 总 DNA 杂交。结果显示 11454、7962、AL2 在染色体部位有明显杂交带,

而 0230 则不显示任何杂交带。用 Hind III 酶切上述四株菌总 DNA, 然后再与扩增片段杂交, 11454 有一约 4 kb 片段, 7962 和 AL2 各有一约 10 kb 片段分别与扩增片段有一个杂交带, 而 0230 仍不显示任何杂交带(图 2)。这一结果揭示: (1) 由于 AL2 能与探针杂交, 说明 AL2 的确含有乳链菌肽前体基因; (2) 因 AL2 杂交带型与 7962 一致, 说明 AL2 是来源于 7962 的一株乳链菌肽产生菌; (3) 根据 DNA 杂交位置, 表明 7962 和 AL2 中乳链菌肽前体基因都位于染色体上。但 Tsai 和 Sandine<sup>[11]</sup> 曾报道乳链菌肽的产生与 7962 的一个 17.5 MDa 质粒有关。我们的结果与 Tsai 等人的结果有所不同, 其原因有待于进一步研究。

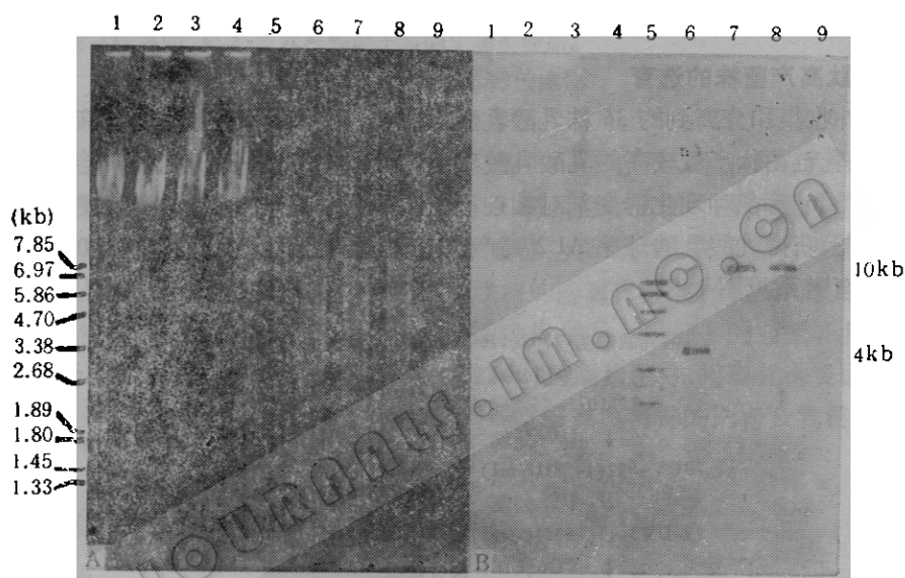


图 2 杂交定位图谱

A. 电泳照片; B. 杂交照片。

Fig. 2 Hybridization patterns of DNA from nisin-producing *L. lactis* subsp. *lactis* strains

A. Agarose gel stained by E. B.; B. Hybridization patterns.

1. Total DNA from *L. lactis* LM0230; 2. Total DNA from *L. lactis* AL2; 3. Total DNA from *L. lactis* 7962; 4. Total DNA from *L. lactis* ATCC11454; 5. SPP1/EcoRI; 6. Total DNA from *L. lactis* ATCC11454/Hind III; 7. Total DNA from *L. lactis* 7962/Hind III; 8. Total DNA from *L. lactis* AL2/Hind III; 9. Total DNA from *L. lactis* LM0230/Hind III.

## 2.4 AL2 的遗传稳定性

将 AL2 在菌种保藏传代培养基上连续转接 10 次, 每次取 10 个单菌落测定效价。原始斜面的乳链菌肽效价为 2405 IU/ml, 转接 5 次斜面的效价为 2426 IU/ml, 转接 10 次的效价为 2333 IU/ml。以原始斜面的效价为 100%, 转接 10 次后, 其效价仍有 97%, 说明乳酸乳球菌 AL2 产乳链菌肽的特性是稳定的。

## 2.5 AL2 菌株毒理试验

将乳酸乳球菌 AL2 接入发酵培养基中培养过夜。送北京市卫生防疫站毒理科进行乳链菌肽产生菌毒理实验。经小鼠急性经口 LD<sub>50</sub> 测定, 在 14 d 的观察期内, 实验动

物未见异常反应,  $LD_{50} > 21,500\text{mg/kg}$  体重。根据《食品毒理安全性评价程序和方法》判定, 乳酸乳球菌 AL2 及其产物属于实际无毒类物质。

### 3 结论

综上所述, 可以得出以下结论: 以乳酸乳球菌 7962 为原始菌株, 经多种理化因子诱变处理, 获得一株乳链菌肽高产突变株。DNA 杂交结果表明编码乳链菌肽的前体基因位于染色体上, 其遗传性状是稳定的。毒理试验证明 AL2 及其产物属于实际无毒类物质, 所以乳酸乳球菌 AL2 是一株具有工业生产前景的乳链菌肽产生菌。

### 参 考 文 献

- [1] Delves-Broughton J. *Food Technol.* 1990, 44(11): 100~117.
- [2] Dodd H M, Horn N, Hao Z *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1992, 8(11): 3683~3693.
- [3] 中国科学院微生物研究所《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种, 北京: 科学出版社, 1973.
- [4] 还连栋, 柳君科, 庄增辉, 等. 抗生素, 1987, 12(2): 120~125.
- [5] Tramer J, Fowler G G. *J Sci Food Agric*, 1964, 15(8): 522~528.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法, 北京: 科学出版社, 1978.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Lewington J, Greenaway S D, Spillane B J. *Letts Appl Microbiol*, 1987, 5(3): 51~53.
- [9] 还连栋, 陶 勇, 田宇清等. 生物工程学报(印刷中).
- [10] Holt J C, Krieg N R, Sneath P H A *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, 528~529.
- [11] Tsai H J, Sandine W E. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(2): 352~357.

## THE SCREENING OF HIGH-YIELD NISIN PRODUCING STRAINS AND LOCALIZATION OF PRECURSOR NISIN GENE

Huan Liandong Tao Yong He Song Tian Yuqing Xue Yugu

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

**Abstract** A mutant strain AL2 with high yield of nisin was obtained from *Lactococcus lactis* 7962 by treatment with physical and chemical factors. The nisin activities of fermentation medium were 2300~2500 IU/ml.  $LD_{50}$  test results indicated that AL2 strain and its product (nisin) are nontoxic. Hybridization experiments suggested that the presence of precursor nisin gene is on the chromosome.

**Key words** *Lactococcus lactis*, Nisin, Mutation breeding, Gene localization