

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2020.01.008

文章编号:2095-6002(2020)01-0060-07

引用格式:孙博,邵蕾娜,殷娴,等.常压室温等离子体诱变选育富硒纳豆芽孢杆菌[J].食品科学技术学报,2020,38(1):60-66.

SUN Bo, SHAO Leina, YIN Xian, et al. Screening of selenium-enriching *Bacillus natto* by atmospheric and room temperature plasma mutation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020,38(1):60-66.

常压室温等离子体诱变选育富硒纳豆芽孢杆菌

孙博, 邵蕾娜, 殷娴, 王凤寰*, 张雨

(北京工商大学轻工科学技术学院, 北京 100048)

摘要: 纳豆芽孢杆菌可以转化亚硒酸钠为有机硒。对一株纳豆芽孢杆菌的生长曲线进行测定, 确定了亚硒酸钠适宜的添加时间和添加量。以纳豆芽孢杆菌 BSN424 为出发菌株, 采用常压室温等离子体诱变系统进行诱变, 根据耐硒和富硒能力筛选, 经连续传代培养后筛选出了富硒纳豆芽孢杆菌。结果表明, 适宜加硒时间为培养后 3 h, 培养时间为 24 h, 培养基适宜硒质量浓度为 $6 \mu\text{g/mL}$, 常压室温等离子体诱变系统功率为 100 W, 诱变时间为 25 s。诱变后筛选得到一株具有较高富硒能力的诱变菌株 BN-44, 经摇瓶发酵后的富硒量为 $1\ 136.43 \mu\text{g/g}$, 相比出发菌株的 $742.12 \mu\text{g/g}$ 提高了 53.13%。研究表明常压室温等离子体诱变育种能有效地对纳豆芽孢杆菌 BSN424 进行诱变, 旨在为有机硒生物转化法中寻找益生菌富硒载体及其诱变育种提供一定依据。

关键词: 纳豆芽孢杆菌; 富硒; 常压室温等离子体; 诱变; 筛选

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

硒元素是人体必需微量元素之一, 是维持人体正常生理功能的重要营养成分, 具有保护组织和细胞膜免受氧化应激反应, 提高人体免疫力, 保护肝脏等的生理功能^[1-3]。由于硒在人体内的安全阈值很低, 硒摄入量连续低于 $40 \mu\text{g/d}$ 会出现缺硒症状, 高于 $400 \mu\text{g/d}$ 则可能产生硒中毒现象^[4]; 因此, 补硒需慎重。食品中硒的毒性和活性取决于硒的化学结构, 相比于无机硒, 有机硒具有更高的生物利用度和更低的毒性^[5]。由于人工合成有机硒成本高且技术难度大, 因此生物转化法是目前最常用的有机硒合成方法, 其中以微生物作为载体研究和运用最多的是富硒酵母^[6]。纳豆是大豆经纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 发酵而形成的一种豆制品, 具有预防中风、心脏病、骨质疏松、肥胖症及由病原菌引起的消化道疾病等的作用^[7]。纳豆芽孢杆菌作为枯草芽孢杆菌的亚种, 其本身具有良好的耐硒能力, 可

成为一种新型的有机硒微生物转化载体, 具有非常广阔的开发应用前景, 而使用纳豆菌诱变选育富硒载体的相关研究较少。

常压室温等离子体 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变具有操作简单、诱变效果好、成功率高、成本低等优点, 是常用的微生物诱变技术^[8]。研究旨在利用 ARTP 对纳豆芽孢杆菌 BSN424 进行诱变, 以期建立 ARTP 诱变和筛选富硒纳豆芽孢杆菌的方法, 并对突变菌株进行遗传稳定性实验, 最终获得硒转化率较高、遗传稳定性较好的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验菌种

诱变出发菌株为一株纳豆芽孢杆菌, 编号为

收稿日期: 2019-02-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFB03089); 国家自然科学基金资助项目(21808005)。

第一作者: 孙博, 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

*通信作者: 王凤寰, 男, 副教授, 博士, 主要从事食品生物技术方面的研究。

BSN424,由北京工商大学酶工程实验室从纳豆粉中分离得到。

1.1.2 培养基

LB 固体培养基:酵母浸粉 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,去离子水 1 000 mL,琼脂粉 15 g/L,pH 值 7.0。121 ℃ 灭菌 15 min。

改良大豆蛋白胨培养基:葡萄糖 10 g,大豆蛋白胨 10 g,七水合硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 2.3 g,无水氯化钙 0.1 g,十二水合磷酸氢二钠 1.26 g,去离子水 1 000 mL,自然 pH 值。115 ℃ 灭菌 15 min。

1.1.3 实验试剂

酵母浸粉,英国 Oxoid 公司;蛋白胨、大豆蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;琼脂粉,北京康倍斯科技有限公司,以上均为生物试剂。分析纯试剂葡萄糖、氯化钠、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、无水氯化钙、十二水合磷酸氢二钠、亚硒酸钠、氢氧化钠及优级纯试剂过氧化氢(体积分数 30%)、盐酸、硝酸、硼氢化钾,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

ARTP 诱变系统,北京思清源生物科技有限公司;LC-AFS6500 型液相色谱原子荧光联用仪,北京海光仪器有限公司;Mars 6 型微波消解仪,美国 CEM 公司;EHD-40 型电热消解仪,北京东航科仪仪器有限公司;Ecotron 型恒温震荡培养箱,瑞士 INFORS 公司;Infinite M200 型酶联免疫检测仪,帝肯(上海)贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化

从冻藏的 BSN424 菌株保藏管中蘸取一环菌液,划线涂布于 LB 固体培养基。37 ℃ 恒温培养 12 h 后,挑取培养基上的单菌落接种于含 4 mL 改良大豆蛋白胨液体培养基的摇菌管中,37 ℃、220 r/min 条件下恒温培养 12 h。取 400 μL 菌液转接到含 40 mL 改良大豆蛋白胨液体培养基的 100 mL 三角瓶中,37 ℃、220 r/min 条件下恒温培养 12 h,得到活化二代的种子液,备用。

1.3.2 纳豆芽孢杆菌生长曲线测定

通过测定纳豆芽孢杆菌生长曲线,确定适宜的培养时间和加硒时间。种子液以 1% 的接种量接入到改良大豆蛋白胨液体培养基中,250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL。37 ℃、220 r/min 培养,每隔 2 h 取样,采用比浊法,测定纳豆芽孢杆菌的 OD₆₀₀ 值,绘

制生长曲线。

1.3.3 适宜硒质量浓度的选择

将活化好的种子液以 1% 的接种量分别接种于硒质量浓度不同(0、2、4、6、8、10、12、14 μg/mL)的改良大豆蛋白胨液体培养基中,37 ℃、220 r/min 培养 24 h,8 000 r/min 离心 5 min,观察菌体颜色变化,确定最适加硒质量浓度^[9]。

1.3.4 ARTP 诱变

将培养至对数中后期的纳豆芽孢杆菌菌液离心收集,用生理盐水洗涤 2 次后,稀释成 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 的菌悬液,取 10 μL 菌悬液滴加在载片上,涂布均匀后放入 ARTP 诱变系统中进行诱变,诱变条件见表 1。

表 1 ARTP 诱变条件

Tab. 1 Mutagenic conditions of ARTP mutation

| 操作条件 | 参数 |
|-----------------------------|---------------------|
| P(输出)/W | 100 |
| l(照射)/mm | 2 |
| 载气 | 氦气 |
| 气体流量/(L·min ⁻¹) | 10 |
| t(照射)/s | 0、15、20、25、30、45、60 |
| V(样品)/μL | 10 |

将经过诱变处理后的载片置于装有 1 mL 生理盐水的 1.5 mL 离心管中,震荡洗脱 60 s 左右,将洗脱后的菌悬液按 10 倍梯度稀释 6 次,分别记为 10⁻¹~10⁻⁶。将 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 的稀释菌悬液涂布在 LB 固体培养基上,37 ℃ 恒温培养 12 h,每个梯度做 3 组平行实验,未经诱变的载片作对照组,在相同条件下培养,进行平板菌落计数。通过平板菌落数来计算诱变致死率,并获得致死率曲线,致死率的计算见式(1)^[10]:

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

式(1)中, T 为不经诱变处理的对照组平板菌落数,CFU; M 为经诱变处理后的平板菌落数,CFU。

1.3.5 硒含量的测定

采用氢化物发生-原子荧光光谱仪(HG-AFS)检测硒含量。HG-AFS 是一种具有我国自主知识产权的分析仪器,具有结构简单、分析成本低、气相干扰少、灵敏度高等优点^[11]。检测条件见表 2。

1.3.5.1 标准曲线的绘制

1 mg/mL 亚硒酸钠标准溶液(以硒元素含量

表2 HG-AFS检测条件

Tab. 2 Measurement conditions of HG-AFS

| 操作条件 | 参数 |
|-------------------------------|--|
| U (负高压)/V | 250 |
| 光源 | 硒高性能空心阴极灯 |
| I (灯)/mA | 80 |
| 载气 | 氦气 |
| 载气流量/(mL·min ⁻¹) | 300 |
| 屏蔽气流量/(mL·min ⁻¹) | 800 |
| t (读数)/s | 16 |
| t (延迟)/s | 6 |
| 载流 | 0.6 mol/L HCl 溶液 |
| 还原剂 | 体积分数 2% KBH ₄ 溶液 (含体积分数 0.5% NaOH) |

计)配制:准确称取亚硒酸钠109.5 mg,用去离子水定容至50 mL,过滤除菌,现用现配。取硒质量浓度为1 mg/mL的亚硒酸钠标准溶液,依次用1.2 mol/L HCl溶液稀释至硒质量浓度分别为200、160、120、80、40、20、10 ng/mL,用HG-AFS以表2条件测定标准溶液及空白对照的荧光强度,绘制标准曲线。

1.3.5.2 培养基中初始硒含量测定

纳豆芽孢杆菌富硒培养过程中,向培养基中添加亚硒酸钠溶液,迅速混匀,立即取样1 mL,用1.2 mol/L HCl溶液稀释10倍后,测定硒含量,即为培养过程中添加亚硒酸钠溶液时培养基中的初始硒含量。

1.3.5.3 发酵上清液中残留硒含量测定

发酵结束后,将发酵液以10 000 r/min离心10 min,并吸取1 mL上清液加入微波消解消化管中,再加入4 mL硝酸和1 mL 30%过氧化氢溶液,根据GB 14880—2012以表3条件进行消化处理^[12]。

表3 微波消解条件

Tab. 3 Conditions of microwave digestion

| 阶段 | P/W | 升温时间/ | 温度/℃ | 保持时间/ |
|----|-------|-------|------|-------|
| | | min | | min |
| 1 | 1 000 | 6 | 120 | 1 |
| 2 | 1 000 | 3 | 150 | 5 |
| 3 | 1 000 | 5 | 200 | 10 |

消解结束后,于赶酸仪上加热至管中液体体积剩余1 mL左右,冷却后加入4 mL浓盐酸,再次加热至管中液体体积剩余1 mL左右,将六价硒还原成四

价硒,冷却。用1.2 mol/L HCl溶液转移至50 mL容量瓶中定容,混匀,测定硒含量,即为发酵上清液中残留硒含量。

1.3.5.4 菌体培养物中硒含量测定

发酵液以10 000 r/min离心10 min,弃去上清液,获得菌体培养物,用磷酸盐缓冲液反复洗涤3次,以去除附着于细胞表面的硒化合物,冷冻干燥后,保存备用^[13]。

准确称取10 mg菌体冻干粉末,加入微波消解消化管中,消解后测定菌体培养物中的硒含量。

1.3.6 突变菌株耐硒能力测定

随机挑取经ARTP诱变后的LB固体培养基上的单菌落于每孔含有1 mL改良大豆蛋白胨培养基(硒质量浓度6 μg/mL)的96孔深孔板中,每块孔板接种93株突变菌株,3株出发菌株BSN424,共10块板。930株突变菌株于振荡培养箱中37℃、220 r/min恒温培养24 h后,观察菌液颜色变化情况,挑选颜色较浅菌株并使用酶标仪测定菌悬液OD₆₀₀值。

1.3.7 突变菌株复筛

将挑选出的耐硒能力较强的菌株接种于含适宜硒质量浓度的改良大豆蛋白胨液体培养基中,250 mL三角瓶中装液量为100 mL,37℃、220 r/min条件下富硒培养24 h后,测定其硒转化率和富硒量,计算见式(2)、式(3)^[14]。

$$\text{硒转化率} = \frac{m_0}{m_1} \times 100\% = \frac{\rho_0 - \rho_1}{\rho_0} \times 100\%; \quad (2)$$

$$\text{富硒量} = \frac{m_0}{m_2} \quad (3)$$

式(2)、式(3)中, m_0 为菌体细胞内硒质量,μg; m_1 为添加的总硒质量,μg; m_2 为菌体细胞干质量,μg; ρ_0 为培养基初始硒质量浓度,μg/mL; ρ_1 为发酵上清液硒质量浓度,μg/mL。

1.3.8 突变菌株遗传稳定性测定

将复筛后富硒能力较高的突变株在LB固体培养基上连续7代传代培养,并将各代分别进行相应种子液的制备以及改良大豆蛋白胨液体培养基的发酵培养,通过比较突变菌株的富硒量来测定突变菌株的遗传稳定性。

1.4 数据处理

使用Origin Pro 2019软件对实验数据进行处理,计算相对标准偏差并绘图。

2 结果与分析

2.1 培养时间及加硒时间的确定

纳豆芽孢杆菌 BSN424 生长曲线如图 1。培养 3 h 后,菌体开始进入对数期;培养 24 h 后,菌体开始降解。由于亚硒酸钠对菌体生长有抑制作用,加硒时间不宜过早,而在对数期,菌体生长代谢旺盛,硒转化率高。Yin 等^[15]研究发现,在酿酒酵母对数生长前期添加无机硒,所得酵母细胞生物量、总硒含量及有机硒比例最高。靳志强等^[16]研究也发现,在对数生长初期添加亚硒酸钠得到的菌体,其总硒含量及硒转化率均最大。故从菌体生长及硒转化率方面考虑,选择在纳豆芽孢杆菌对数生长初期添加无机硒,即在培养 3 h 后添加亚硒酸钠溶液,培养 24 h。

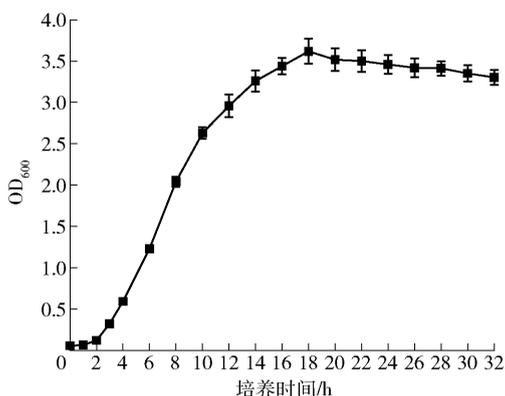


图1 纳豆芽孢杆菌 BSN424 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus natto* BSN424

表4 纳豆芽孢杆菌 BSN424 在不同硒质量浓度下培养 24 h 后菌体颜色变化

Tab. 4 Color changes of *Bacillus natto* BSN424 cultured in medium with different concentrations of selenium for 24 h

| $\rho(\text{硒})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 颜色 | 正常 | 正常 | 正常 | 微红 | 淡红 | 红 | 红 | 红 |

的菌体颜色,挑选出在 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硒质量浓度下转化单质硒较少的菌株,同时再对比菌悬液的 OD_{600} 值,以挑选出生长较好的突变菌株。经对比,初筛共挑选出 64 株耐硒诱变菌株。

2.5 突变菌株富硒筛选结果

2.5.1 硒标准曲线的绘制

HG-AFS 测定的硒质量浓度标准曲线见图 3,标准曲线回归方程为 $Y = 90.5053X + 295.9396$, $R^2 = 0.99944$ 。

2.2 培养基中适宜硒质量浓度的确定

纳豆芽孢杆菌在一定硒质量浓度条件下可将无机硒转化为有机硒,但当环境中硒含量过高时,菌体会把大量的无机硒还原为红色的单质硒,故使菌体呈现出不同程度的红色^[17]。纳豆芽孢杆菌 BSN424 在不同硒质量浓度条件下的菌体颜色见表 4。如表 4 所示,在设定的硒质量浓度范围内,菌体颜色变红程度与培养基中硒质量浓度成正相关。硒质量浓度在 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时菌体颜色变化不明显,低于 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时颜色没有变化,说明培养基中硒质量浓度超过 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时会使其在细胞内大量转化为红色的单质。为了减少单质硒的转化,使更多的无机硒在细胞内转化为有机硒,选择 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为培养基的适宜硒质量浓度。

2.3 ARTP 诱变适宜照射时间的确定

诱变处理后根据纳豆芽孢杆菌致死率绘制致死率曲线,如图 2。由图 2 可知,诱变致死率随照射时间增加而增大,照射 20 s 时可杀死 90% 的菌体;当照射时间达到 60 s 时,诱变致死率已达到 100%。由现代育种理论可知,诱变致死率在 90% ~ 95% 时正向突变率最高。因此实验选择的适宜诱变时间为 25 s,致死率为 94.3%。

2.4 突变菌株耐硒筛选结果

利用含亚硒酸钠抗性培养基的 96 孔深孔板培养突变菌株,并通过菌悬液 OD_{600} 值和菌体颜色变化筛选突变菌株。通过对比诱变出发菌株与诱变菌株

2.5.2 突变菌株富硒能力分析

2.5.2.1 突变菌株的硒转化率

出发菌株 BSN424 及 64 株初筛得到的耐硒诱变菌株经摇瓶富硒发酵后测定的硒转化率见图 4。

由图 4 可知,诱变出发菌株 BSN424 的硒转化率为 21.8%,共有 34 株突变菌株的硒转化率高出发菌株,其中硒转化率最高的突变菌株编号为 BN-I214,硒转化率达到 37.8%,比诱变出发菌株高出了 16%。

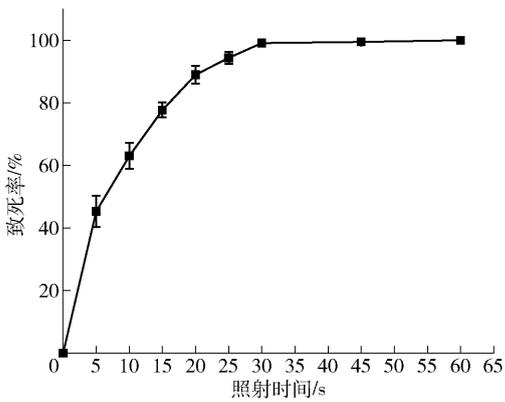


图2 不同照射时间下 ARTP 诱变致死率曲线

Fig. 2 ARTP mutagenic lethal rate curve with different treatment time

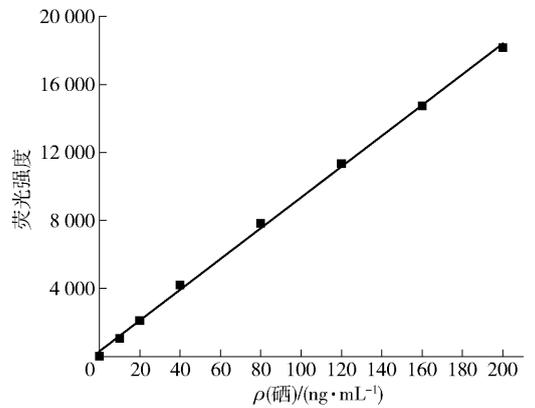


图3 硒标准曲线

Fig. 3 Standard curve of selenium

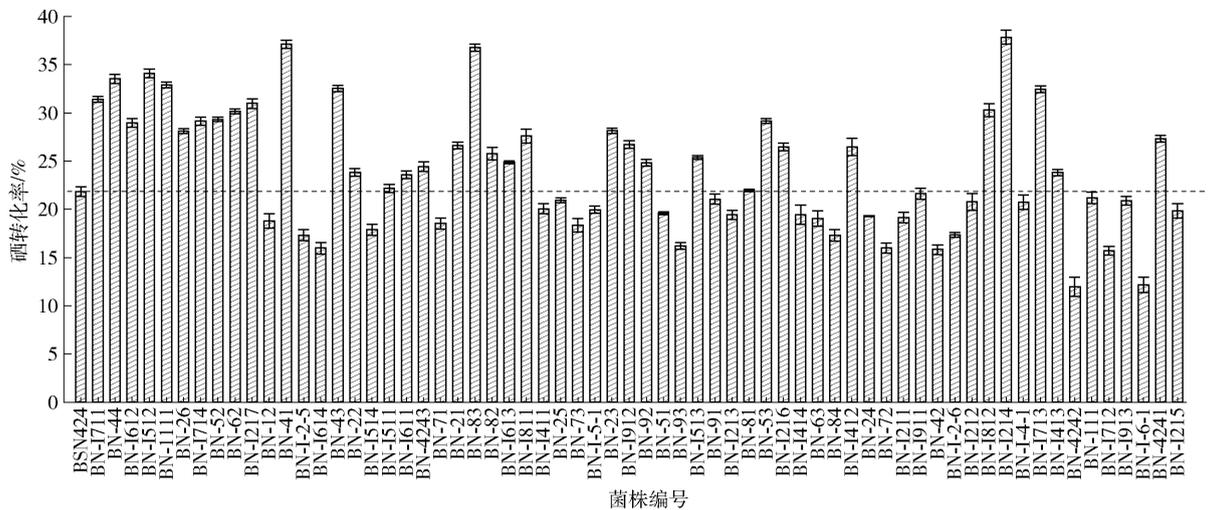


图4 突变菌株摇瓶复筛后的硒转化率

Fig. 4 Selenium conversion rate of mutagenic strains after shake flask screening

2.5.2.2 突变菌株的富硒量

挑选突变菌株中硒转化率最高的6株突变菌株:BN-1214、BN-41、BN-83、BN-1512、BN-44、BN-1111及诱变出发菌株BSN424,分别测定其摇瓶富硒发酵后的富硒量,见图5。

由图5可知,诱变出发菌株BSN424的摇瓶发酵富硒量为742.12 μg/g,6株突变菌株的富硒量均大于诱变出发菌株,说明以硒转化率作为筛选富硒纳豆芽孢杆菌的依据是可行的,其中突变菌株BN-44的富硒量最高,达1136.43 μg/g,比出发菌株提高了53.13%。

2.6 突变菌株遗传稳定性分析

用LB固体培养基分别将富硒量较高的突变菌株(BN-1214、BN-41、BN-44)传代7代,将各代菌株制成种子液后接种到改良大豆蛋白胨液体培养基

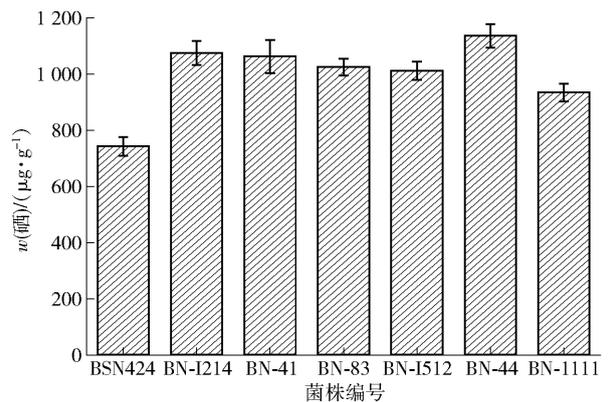


图5 突变菌株摇瓶复筛后富硒量

Fig. 5 Selenium content of mutagenic strains after shake flask screening

进行富硒摇瓶发酵,测定富硒量,结果见图6。

由图6可知,经ARTP诱变的3株突变菌株经

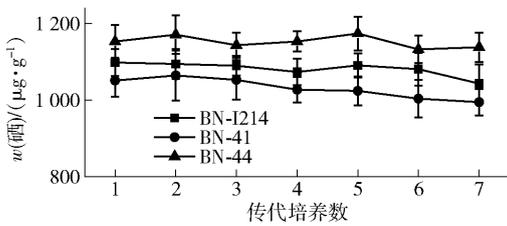


图6 突变菌株遗传稳定性

Fig. 6 Genetic stability of mutagenic strains

传代7代后富硒量没有明显的下降,均具有较好的遗传稳定性,其中BN-44富硒量最高。因此,综合考虑选择BN-44菌株作为最终筛选得到的纳豆芽孢杆菌富硒诱变菌株。

3 结论

实验通过对纳豆芽孢杆菌BSN424生长曲线的测定,确定适宜加硒时间为培养后第3小时,培养时间为24h;通过适宜硒质量浓度的选择,确定富硒培养过程中,培养基中适宜硒质量浓度为6 μg/mL。研究表明ARTP诱变育种方法能有效地对纳豆芽孢杆菌BSN424进行诱变,适宜诱变时间为25s,经耐硒能力、富硒能力及富硒量的测定,筛选出一株富硒纳豆芽孢杆菌BN-44,富硒量为1 136.43 μg/g,相比出发菌株的742.12 μg/g提高了53.13%,具有较强的富硒能力。本实验以期有机硒生物转化法中寻找益生菌富硒载体及其诱变育种提供一定依据,但突变菌株BN-44富硒量提高的原理尚不清楚,有待进一步的研究。

参考文献:

[1] FAIRWEATHER-TAIT S J, BAO Y B, BROADLEY M R, et al. Selenium in human health and disease [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 14(7): 1337 - 1383.

[2] KRYUKOV G V, CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes [J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1439 - 1443.

[3] BRIGELIUS-FLOHE R, MAIORINO M. Glutathione peroxidases [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2013, 1830(5): 3289 - 3303.

[3] HATFIELD D L, BERRY M J, GLADYSHEV V N. Selenium: its molecular biology and role in human health [M]. New York: Springer US, 2006.

[5] BROZMANOVA J, MANIKOVA D, VLCKOVA V,

et al. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer [J]. *Archives of Toxicology*, 2010, 84(12): 919 - 938.

- [6] PEREZ-CORONA M T, SANCHEZ-MARTINEZ M, VALDERRAMA M J, et al. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: laboratory-scale experiments [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 1050 - 1055.
- [7] 付志英, 丁玲, 彭宏. 中国传统纳豆中纳豆菌的分离筛选及其发酵特性初步研究 [J]. *中国调味品*, 2016, 41(1): 56 - 61.
- FU Z Y, DING L, PENG H. A preliminary study on the isolation and screening of *Bacillus natto* and its fermentation characteristics in Chinese traditional natto [J]. *Chinese Condiments*, 2016, 41(1): 56 - 61.
- [8] 秦艳飞, 徐飞, 朱振坤, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变选育恩拉霉素高产菌株 [J]. *食品与发酵科技*, 2018, 54(3): 32 - 36.
- QIN Y F, XU F, ZHU Z K, et al. Mutation by using atmospheric and room temperature plasmas method for improving production of enramycin of *Streptomyces fungicidius* [J]. *Food and Fermentation Technology*, 2018, 54(3): 32 - 36.
- [9] 曾议霆, 郭溪浪, 周康, 等. 富硒乳酸菌的筛选及鉴定 [J]. *食品科学*, 2015, 36(3): 178 - 182.
- ZENG Y T, GUO X L, ZHOU K, et al. Screening and identification of Se-enriching lactic acid bacteria [J]. *Food Science*, 2015, 36(3): 178 - 182.
- [10] 李小坤, 王旺, 林影, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变选育高核酸酿酒酵母 [J]. *现代食品科技*, 2018, 34(12): 137 - 144.
- LI X K, WANG W, LIN Y, et al. Screening of high-yield nucleic acid *Saccharomyces cerevisiae* strain by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) technique [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(12): 137 - 144.
- [11] 肖志明, 宋荣, 贾铮, 等. 液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱法测定富硒酵母中硒的形态 [J]. *分析化学*, 2014, 42(9): 1314 - 1319.
- XIAO Z M, SONG R, JIA Z, et al. Quantitative determination of selenium species in Se-enriched yeast using liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(9): 1314 - 1319.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准: GB

- 14880—2012[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.
- [13] OGRRA Y, SHIMIZU M, TAKAHASHI K, et al. Bio-transformation of organic selenium compounds in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metallomics*, 2018, 10(9): 48–54.
- [14] 朱何东, 常峰, 罗俊成, 等. 富硒乳酸菌的筛选及其富硒能力的初步研究[J]. *酿酒科技*, 2005(8):29–31.
ZHU H D, CHANG F, LUO J C, et al. Screening of an abundant-Se-containing *Lactobacillus* strain and its abundant-Se-containing capability [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005(8):29–31.
- [15] YIN H F, FAN G J, GU Z X. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(4): 666–669.
- [16] 靳志强, 张博文, 李平兰. 动物双歧杆菌01耐硒性能及富硒条件的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(15): 184–187.
JIN Z Q, ZHANG B W, LI P L. Selenium tolerance and enrichment in *Bifidobacterium animalis* 01 [J]. *Food Science*, 2009, 30(15): 184–187.
- [17] LAMPIS S, ZONARO E, BERTOLINI C, et al. Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 324: 3–14.

Screening of Selenium-Enriching *Bacillus natto* by Atmospheric and Room Temperature Plasma Mutation

SUN Bo, SHAO Leina, YIN Xian, WANG Fenghuan*, ZHANG Yu

(*School of Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China*)

Abstract: *Bacillus natto* can convert sodium selenite into organic selenium. The growth curve of a strain of *Bacillus natto* was measured, and the optimum time and addition amounts of sodium selenite were determined. Using *B. natto* BSN424 as original strain, based on screening of Se-tolerance and Se-enriching, a genetic stable mutant strain BN-44 was obtained by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis system. The results showed that the optimum time for selenium addition was at the 3rd hour in the culture period, and then the culture was continued to 24 hours. The optimum mass concentration of selenium in culture medium was 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The power of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis system was 100 W and the mutagenic time was 25 s. After mutagenization, the BN-44 was eventually selected as the best strain with a high selenium content. Compared to the original strain, the selenium content after shaking and fermentation by BN-44 was increased from 742.12 $\mu\text{g}/\text{g}$ to 1136.43 $\mu\text{g}/\text{g}$, which was increased by 53.13%. The results had shown that the atmospheric and room temperature plasma mutagenesis breeding method could mutagenize *Bacillus natto* BSN424 effectively, which provided a basis for the search of Se-enriching probiotic vector and its mutation breeding in organic selenium biotransformation.

Keywords: *Bacillus natto*; Se enrichment; atmospheric and room temperature plasma; mutation; screening

(责任编辑:张逸群)