

微生物诱变分子机理及其在肉类工业中的应用

张 滨, 马美湖, 唐道邦
(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 随着分子生物学、细胞生物学及分子遗传学等学科的迅猛发展, 对微生物诱变分子机理的研究也日益完善。本文从微生物诱变分子机理出发, 着重介绍了 DNA 损伤分子机理、基因突变分子机理和诱变剂的种类及遗传效应, 同时, 列举了诱变菌在肉类工业中的应用。

关键词: 诱变; 分子机理; 基因突变; 诱变剂; 肉类工业

Review on Microbial Mutagenic Molecular Mechanism and Utilization in Meat Industry

ZHANG Bin, MA Mei-hu, TANG Dao-bang
(Food Science and Technology College, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: The microbial mutagenic molecular mechanism has been increasingly well investigated, thanks to the rapid development of molecule biology, cell biology and molecule genetics and so on. The paper expounded emphatically the molecular mechanism of DNA damage and gene mutation, as well as elucidated varieties of mutagenesis and hereditary effects. And then it enumerated mutants utilized in meat industry.

Key words: mutate; molecular mechanism; gene mutation; meat industry

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)05-0190-04

诱变育种是指利用物理或化学诱变剂处理均匀而分散的微生物细胞群, 促进其突变率显著提高, 然后采用简便、快速和高效的筛选方法, 从中挑选少数符合育种目的的突变株以供生产实践或科学实验之用^[1]。微生物育种的目的就是人为地使某种代谢产物过量积累, 把生物合成的代谢途径朝人们所希望的方向加以引导, 或者促使细胞内发生基因的重新组合优化遗传性状, 实现人为控制微生物获得人们所需要的高产、优质和低耗的菌种^[2]。但是, 在生物漫长的进化过程中, 微生物形成了愈来愈完善的代谢调节机制, 使细胞内复杂的生物化学反应能高度有序的进行和对外界环境条件的改变迅速作出反应, 因此, 为了达到微生物育种的目的, 就必须进行诱变处理以解除或突破微生物的代谢调节控制, 进行优良性状的组合。然而, 由各种方式所得到的诱变异种, 因生物体的改变只有极少数对其环境有利, 而绝大多数存在有害的一面^[3]。随着分子生物学、细胞生物学及分子遗传学等学科的迅猛发展, 对微生物诱变分子机理的研究也日益完善, 其在肉类工业领域中的应用范围也不断扩大。

1 微生物诱变分子机理

1.1 DNA 分子损伤机理

宋钦华^[4]报道 DNA 是电离和紫外线(UV)辐射作用于生物体的主要靶分子。辐射造成 DNA 损伤主要是发生了光化学反应, 即相邻碱基形成了二聚体, 阻碍碱基正常配对而导致碱基置换突变。虽然发生化学改变的部分在整个 DNA 分子结构里所占的比重微乎其微(例如 10 万对碱基中只有一对发生了改变)但是当细胞用一种称之为 SOS 的倾向错误(error-prone)的修复系统来修复损伤时, 就会导致高频率的基因突变, 使细胞的生物功能发生重大改变^[2,3]。

DNA 的损伤主要有碱基脱落、碱基破坏、嘧啶二聚体形成、脱氧核糖的破坏、单链断裂、双链断裂、DNA 的链内交联或链间交联、DNA 和蛋白质的交联等^[5]。

嘧啶碱基在自由基的攻击下易起加成、脱氢等反应, 引起碱基环的破裂, 生成多种分解产物, 以胸腺嘧啶为例, 它的水溶液在 x 射线照射下, 其辐射产物可能多达 30 种以上^{[2][5]}。紫外线引起 DNA 的重要损伤是两个相邻嘧啶碱基之间形成一个环丁烷(一个四碳环)而造成

收稿日期: 2003-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(30270976)

作者简介: 张滨(1971-), 男, 在职硕士, 讲师, 研究方向为动物源食品科学。

的,如胸腺嘧啶二聚体(TT),胸腺嘧啶-胞嘧啶二聚体(TC),胞嘧啶二聚体(CC)等,其中以TT最为常见。Horsfall^[6]等人通过最大和最少剂量的紫外线光诱变剂来预测各自的T—C(6-4)化合物,同时研究了UVCT—C(6—4)化合物和杜瓦效价(Dewar valence)光异构体(photoisomer)。结果发现,UVC(6—4)化合物比T—T化合物少得多,但仍比环丁烷二聚体高得多。在所有被作为靶分子的细胞中,有34%产生了突变体,80%发生了3′C→T转换;杜瓦效价的光异构体,79%的噬菌体繁殖的是突变株,45%为3′C→T转换。3′C→T转换发生的原因在C-5上缺失一个甲基是导致基因突变的首要影响因素;异构体阻碍了DNA复制。

脱氧核糖环受到辐射后易破裂,造成戊糖开环和磷酸酯键的断裂,产生丙二醛,释放出无机磷酸根和碱基,从而引起DNA链的断裂^{[11][21][5]}。单链和双链的断裂数随辐射剂量而增加。在细胞内DNA单链断裂的G值在0.7~1.1之间,双链断裂的G值在0.06~0.16之间。Gentil^[7]等人研究了在紫外线(UV)辐射诱导下形成的顺-顺TT二聚体和T(6-4)T交联光产物。结果表明,两者都为UV辐射诱变所致,且都能发生基因突变,但程度不同。在TT二聚体和T(6-4)T交联物中突变频率分别为2%和60%;TT二聚体的突变位点在3′—T处,而T(6-4)T交联物可产生各种突变体。G→T转换在5′T光产物形成之前产生。

DNA大分子辐射后相邻碱基之间可以发生链内交联,相邻两条链之间可以发生链间交联;在DNA链与蛋白质之间易发生交联,形成共价键,交联后DNA与蛋白质结合的构型和构象都发生相应的变化^{[11][21][5]}。一般来说,紫外线对形成嘧啶二聚体和DNA—蛋白质交联的能力强于r射线,而r射线对链断裂的效应则强于紫外线;中子的效应强于r射线,中子引起的DNA双链断裂数多于r射线,而引起的单断裂数却少于r射线^[9]。

1.2 基因突变的分子机理^[10~12]

Sunsan M 和 Rosenberg^[10]报道,在对各种野生的或“驯化”(domestic)的菌株进行诱发突变的分子机理几乎的确不同。这是个有趣的话题,需作进一步的研究。但至少有三种诱变分子机理有相同之处,即都利用了全面DNA损伤传感器(general DNA damage sensor)、蛋白质修复RecA(repair protein RecA)和类似真核P53(akin to eukaryotic P53)。它们激活了菌株“SOS”DNA损伤应答。但在这三种分子机理中仅有两种使用RecBCD双链断裂蛋白和因发生基因突变而需要高度调控的SOS基因。因诱变处理,在这三种分子机理中,都需要不同于大肠杆菌(E.coli)的聚合酶,即真正的聚合酶Pol II (high-fidelity Pol II)、真正的聚合酶Pol I (high-fidelity Pol I)或DinB。在双链和单链DNA损伤修复期间,因

基因突变激发的DNA合成错误仍需要作严格的测试。Sunsan M 和 Rosenberg 同时又报道,不匹配修复(mismatch repair)受到了限制,并通过两种不同机理促使发生静态突变(stationary-phase mutation)。其一,是由于MutL不匹配修复蛋白(MutL mismatch repair protein)成为限制因素;其二,MutS不匹配修复蛋白(MutS mismatch repair protein)也被限制。这可能是某一DNA聚合酶在起作用的缘故。在静止状态,MutS蛋白数量降低。这可能是被当作错误因子加以限制,但当倾向错误聚合酶Pol IV(error-prone Pol IV)在起作用时,MutL也被限制。这是可能因为在MutS下降前,过多的错误抑制了不匹配修复程序,也可能是因为Pol IV与MutL相互作用时,排斥了MutL。由于诱导突变,那些调控饥饿应答的压迫应答蛋白Rpos、CyaA和CRP同时存在,这表明了突变机理还受压迫应答(stress response)的调控。

静态突变的具体分子机理仍然是需要去解释的谜;同样,由于压迫所致基因重组和点突变的分子机理也正是难以跨越的诱人之路。

J.Arjan^[11]等人报道了由于DNA校对和修复功能的缺失直接导致突变种产生的主要原因,突变率的提高依赖于环境条件。Little J B^[12]证实了离子辐射与x-射线导致基因突变分子机理的不同。Walsh D等^[13]人将两株野生型菌株(WT)和两株抗-抗生素(AR)的单核细胞增生利斯特氏菌(L.monocytogene)突变菌株,在切碎牛肉浆和土豆代替品中,在55℃并在48℃加热初有无热的波动的条件下,测定D值,以比较抗热性能。在切碎牛肉浆和土豆中,AR和WT菌株的D值无显著性差异(p<0.05)。而在加热过程中,热的波动以及微生物生长的介质种类显著地影响D值的大小,因此,是否存在抗-抗生素基因不影响菌株的抗热性。

1.3 诱变剂的种类及其遗传效应

获得特定的突变菌株,往往需要诱发突变处理,诱变剂可通过改变DNA本身结构或影响代谢过程中起直接作用的酶来阻碍专一性功能。Murane J P^[14]将细胞用电离辐射或烷化剂处理可发生延长基因不稳定(genetic instability),诱变结果可由多种方式得以证实,即延迟再生性死亡、提高点突变率和增加染色体重组率(rate of chromosome rearrangement)。Wright E G^[15]研究在电离辐射中照射所产生的生物效应,包括基因突变(gene mutation)、染色体畸变(chromosome aberration)、恶性转变(malignant transformation)和细胞死亡。Morgan W F^[16]报道辐射所致的一些非目标效应(non-targeted effect)包括辐射诱导效应(radiation-induced effect)、非相关效应(bystander effect),质粒中的基因断裂因素(clastogenic factor),进而引起染色体损伤。

表1 诱变剂的种类及诱变功能^[2,5]

诱变因素	作用方式	遗传效应
羟胺(HA)	与胞嘧啶起作用	GC → AT 转换
亚硝酸(NA)	A.G.C的氧化脱胺作用	AT ↔ CG 转换
烷化剂(EMS)	交 联 烷化碱基(主要是G) 烷化磷酸基团 丧失烷化的嘌呤	缺 失 AT ↔ GC 转换 AT ↔ TA 转换 GC → CG 颠换
EES)	糖-磷酸骨架的断裂	巨大损伤(缺失、重复、倒位、易位)
吡啶类(ACR)	碱基之间的相互作用(双链变形)	码组移位(+或-)
紫外线(UV)	形成嘧啶的水合物 形成嘧啶的二聚体 交 联	GC → AT 转换 码组移位(+或-) 缺 失
电离辐射	碱基的羟基化和降解 DNA 降解 糖-磷酸骨架的断裂丧失	AT ↔ GC 转换 码组移动(+或-) 巨大损伤(缺失、重复、倒位、易位)

2 在肉类工业中的应用

2.1 改变菌株生长环境, 提高肉制品质量

Arihara K^[17]报道人体肠道中的主要乳杆菌——加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*), 被利用为益生菌(probiotics)和乳品的工作发酵剂(starter culture)。然而, 加氏乳杆菌(*L. gasseri*)对 NaCl 和 NaNO₂ 相当敏感, 难以作为传统肉类发酵剂。将加氏乳杆菌(*L. gasseri*)菌株通过紫外线(UV)辐射得到几种抗 NaCl 和 NaNO₂ 的突变体, 其中, 诱变菌 1131—M8 在含 3.3% NaCl 和 200 × 10⁻⁶ NaNO₂ 的肉品中生长良好, 而生化特性与常规菌株相比没有区别。结果表明: 加氏乳杆菌(*L. gasseri*)变种代替常规菌种作为工作发酵剂可提高肉品的质量。Yeh C M^[18]等人报道, 由嗜碱芽孢杆菌 YaB(alkalophilic *Bacillus* YaB)分泌的丝氨酸蛋白酶、YaB 枯草杆菌蛋白酶(subtilisin YaB), 是有效的肉类嫩化剂。经野生 YaB 枯草杆菌蛋白酶(wild subtilisin YaB)基因重组和枯草芽孢杆菌 DB104(*Bacillus subtilis* DB104)基因表达, 获得的 G124A、G124V、G159A 和 G159S 适合肉嫩化的突变菌株, 这些突变分泌的酶能显著提高肉的嫩度。将重组枯草杆菌蛋白酶和经基因工程改造的枯草芽孢杆菌以及具有商业用途的木瓜蛋白酶(papain)、菠萝蛋白酶(bromelain)、胶原蛋白酶(collagenase)和弹性蛋白酶(elastase), 利用弹性硬蛋白(elastin)、胶原质(collagen)、酪蛋白(casein)和肌纤维蛋白(myofibrillar protein)作底物比较其蛋白水解能力。牛肉蛋白水解用肌

纤维断裂指数(myofibrillar fragmentation index)和胶原蛋白的溶解性来评价。结果表明: 基因重组 G159A 突变株(recombinant mutant G159A)提高肉嫩度最强, 在肉中 pH 适应范围为 5.5~6.0, 温度适应范围为 10~50℃。

2.2 分析食品致病突变因子, 提高肉品卫生安全

Heddle J A^[19]等人报道了肠道癌(intestinal cancer)与高肉类膳食之间的关系, 因为牛肉、鸡肉、羊肉、猪肉和鱼肉的油炸食品在小鼠肠道中具有致癌突变的能力。在喂养油炸鱼和肉的小鼠中, 大约 1 周获得明显的突变体, 4 至 8 周将表现出相关的突变症状。同样, Dashwood R H^[20]也报道了在烤肉和鱼的过程中, 会产生潜在的突变物质——杂环胺类(HCAs)。在传统的动物试验中, 这几种化合物会导致动物肿瘤(tumor), 并阐述了 HACA 检测突变基因和致癌基因(carcinogenesis)的最新鼠科动物模型, 同时确定了几种能阻止突变活性的化学预防剂(chemopreventive agent), 如与亚油酸、茶叶、姜黄素、叶绿素——壳聚糖交联的 1,2-二硫醇-3-巯基。Svetlana Ermolaeva^[21]报道, 从食物中分离出因利斯特氏菌(*Listeria* spp.)分泌的 PlcB 磷脂酶 C (PlcBphospholipase C)或卵磷脂酶, 是一种重要的潜在的利斯特型的病毒因子, 并作为病原性标示物。然而, 野生型单核细胞增生利斯特氏菌表达出病毒因子非常少, 且其卵磷脂酶的活性也难以在琼脂平板中观察得到。但是, 如把单核细胞增生利斯特氏菌(*L.monocytogenes*)放在有活性炭的环境中生长, 利斯特型的病毒因子产量急剧增加。因而, 基于卵磷脂酶在鸡蛋黄琼脂中有无炭

补充物的活性不同,可设计一种简单的方法迅速地鉴别这两种利斯特氏菌。

2.3 培养新的突变菌株,提高肉制品的产量

Lee S H^[22]等人从3500菌株经MNNG或UV处理弗氏链霉菌NRRL2702(*S. fradiae* NRRL2702)中分离得一株弗氏链霉菌MNU20(*S. fradiae* MNU20)的泰乐菌素高产突变株(tylosin-hyperproducing mutant),在合适的培养条件下,可获得泰乐菌素的产量为159mg生物剂量比母本株(*S. fradiae* NRLL2702)提高14%;添加缬氨酸、琥珀酸酯及自然沸石并在合适的培养条件下,泰乐菌素的产量增加到349mg生物量。在添加以上物质的培养期间,产量呈决定性的增加。Ray S^[23]等人在米曲霉菌株AB(*Aspergillus niger* A B)在乙烯亚胺(1:4000)诱变研究中,获得的突变株米曲霉AB501(*A. niger* A B 501),在肉汤培养基中经浅层发酵产生大量的葡萄糖酸钙,达88.0g/L,而母本的产量仅为36.0g/L;经紫外线(UV)辐射处理获得的突变菌株(*A. niger* AB 1801),在肉汤培养基中,葡萄糖酸钙的产量可达到120g/L。其适宜的pH培养条件为6.5,时间为9d,温度为30℃,接种量(含细胞悬浮量 2.6×10^7 个孢子的工作发酵剂)为7.5ml/L,最大葡萄糖酸钙产量能达到168g/L以上。Hag IU^[24]等人将米曲霉亲本(*A. niger*)利用紫外线(UV)和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)等诱变剂处理,并筛选分离得到六株紫外线辐射诱变株(MUV)和八株MNNG处理诱变株。米曲霉MNNG-2突变株,柠檬酸产量增至87.60g/L,超过亲本BTC-45(19.53g/L)和其他突变株(MUV-5突变株柠檬酸产量为49.85g/L, MNNG-7突变株为76.82g/L)。齐秀兰等^[25]等用LiCl₂·UV复合处理赖氨酸产生菌钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)筛选一高产菌株的L-赖氨酸产量较出发菌株提高17.7%。王筱虹^[26]等用UV照射红霉素产生菌的原生质体得到比对照菌株效价提高225.8%的高产菌株。

参考文献:

- [1] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.
- [2] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [3] 盛祖嘉.微生物遗传学(第二版)[M].北京:科学出版社,1997.
- [4] 宋钦华.DNA光复活作用机理的研究进展[J].化学进展,2001,13(6):428-434.
- [5] 米壬葆.辐射生物学[M].北京:科学出版社,1987.
- [6] Horsfall M J, Accuracy of replication past the T-C(6-4)adduct[J]. J Mol Biol, 1994, 235(2):465-471.
- [7] Gentil A. Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone(6-4)photoproduct in mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(10):1837-1840.
- [8] 崔涛.细胞遗传学[M].合肥:中国科学技术大学出版社,1997.

- [9] J Arjan. The fate of microbial mutators[J]. Microbiology, 2002, 148:1247-1252.
- [10] Susan M, Rosenberg. Microbiology and evolution: Modulating mutation Rates in the Wild[J]. Science, 2003, 300(5024):1382-1383.
- [11] Wright E G. Inducible genomic instability: new insights into the biological effects of ionizing radiation[J]. Med Confl Surviv, 2000, 16(1):117-130.
- [12] Little J B. Induction of genetic instability by ionizing radiation[J]. CR Acad Scill, 1999, 322(2-3):127-134.
- [13] Walsh D. Thermal resistance of wild-type and antibiotic-resistant *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates[J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(4):555-560.
- [14] Murnane J P. Role of induced genetic instability in the mutagenic effects of chemicals and radiation[J]. Mutat Res, 1996, 367(1):11-23.
- [15] Jarvis G N. Isolation and characterization of two glycerol-fermenting clostridial strains from a pilot scale anaerobic digester treating high lipid-content slaughterhouse waste[J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(3):412-420.
- [16] Morgan W F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation[J]. Radiat Res, 2003, 159(5):581-596.
- [17] Arihara K, Itoh M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 200, 56(2-3):227-230.
- [18] Yech C M. Application potency of engineered G159 mutants on P1 substrate pocket of subtilisin Yab as improved meat tenderizers[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(2):6199-6204.
- [19] Heddle J A. A test of the mutagenicity of cooked meats in vivo[J]. Mutagenesis, 2001, 16(2):103-107.
- [20] Dashwood R H. Use of transgenic and mutant animal models in the study of heterocyclic amine-induced mutagenesis and carcinogenesis[J]. J Biochem Mol Biol, 2003, 36(1):35-42.
- [21] Svetlana Ermolaeva. A simple method for the differentiation of *Listeria Monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 82(1):87-94.
- [22] Lee S H. Improvement of tylosin fermentation by mutation and medium optimization[J]. Lett Appl Microbiol, 1999, 28(2):142-144.
- [23] Ray S. Development of a mutant strain of *Aspergillus niger* and optimization of some physical factors for improved calcium gluconate production[J]. Indian J exp Biol, 1994, 32(12):865-868.
- [24] Hag I U. Effect of volume of culture medium on enhanced citric acid productivity by a mutant culture of *Aspergillus niger* in stirred fermentor[J]. Lett Appl Microbiol, 2003, 36(5):302-306.
- [25] 齐秀兰. L-赖氨酸产生菌钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)高产突变株EBO.004-14的选育[J].沈阳药科大学学报, 1994, 14(2):103-106.
- [26] 王筱虹. 原生质体紫外线诱变技术筛选红霉素高产菌株的研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(4):301-303.