

多聚赖氨酸产生菌的筛选与理化性质研究

杨玉红¹, 康宗利¹, 刘长江²

(1. 沈阳农业大学 生物科学与技术学院, 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 食品科学与工程学院, 沈阳 110161)

摘要:对采自长白山的 20 个土样进行多聚赖氨酸产生菌的筛选,通过富集培养,稀释平板法得到单菌落。通过形态培养特征观察和显微形态特征观察以及明胶液化、淀粉水解等生理生化试验对土样进行初筛,用滤纸片抑菌圈法进行复筛,最后筛选出 2 个菌株,其气生菌丝为白色至雪白色绒状;基丝为无色至白色或各种黄色色彩;孢子椭圆形,孢子丝螺旋形,孢子表面光滑。根据形态特征和理化性质可以确定此菌为多聚赖氨酸产生菌^[1-3],产量可达 0.51~0.79 g/L。

关键词: 聚赖氨酸; 筛选; 理化性质

中图分类号: Q 936 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)08-0015-03

随着人们对食品安全性的认识 and 要求的逐步提高, 化学防腐剂受到严峻挑战, 食品防霉防腐剂的天然化已成为今后的发展趋势。天然防霉防腐剂是近年来国内外倡导、开发和寻求的新型产品, 开发抗菌性强、安全无毒的天然防霉防腐剂已成为各国科技工作者的研究热点。它不但对人体健康无害, 有的还具有一定的营养价值, 是今后开发的方向^[4]。ε-多聚赖氨酸是目前天然防腐剂中具有优良防腐性能和巨大商业潜力的微生物类食品防腐剂。它是日本酒井平一和岛昭二两位博士在大量筛选有价值的放线菌时发现的一种新型聚合物, 由 25~30 赖氨酸残基聚合而成, 经过进一步研究发现其具有强烈的抑菌能力, 可以作为防腐剂用于食品的保鲜^[5]。所以对多聚赖氨酸产生菌的筛选和鉴定就有着十分重要的意义。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料来源 供试材料源于吉林长白山上, 分别以露水河-西洋参、露水河-红松、黑风口、紫椴、山顶上、山顶下 50 m 等地点取土样并以取样地点标号土样。

1.1.2 指示菌 金黄色葡萄球菌

1.1.3 主要培养基 高氏一号合成培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, KNO_3 1 g/L, NaCl 0.5 g/L, 琼脂 20 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, 可溶性淀粉 20 g/L, pH 7.2~7.4。牛肉膏蛋白胨培养基: 蛋白胨 1%, 琼脂

1.5%, 氯化钠 0.5%, 水 1 000 mL, 牛肉膏 0.3%, pH 7.2。明胶液化培养基: 蛋白胨 5 g, 明胶 100~150 g, 水 1 000 mL, pH 7.2~7.4(采用间歇灭菌)。种子和发酵培养基(M3G培养基): 葡萄糖 50 g/L, 酵母膏 5 g/L, 硫酸铵 10 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, KH_2PO_4 1.36 g/L, K_2HPO_4 0.8 g/L。

1.2 方法

1.2.1 土样处理^[6,7] 富集培养: 称取 5 g 土样放入 250 mL 三角瓶中加入葡萄糖 5 g, 无菌水 45 mL 在 28℃ 下, 150 r/min 摇瓶培养 24 h。稀释平板: 高氏一号合成培养基中放入重铬酸钾做抑菌剂, 使其浓度为 0.005%。培养液用无菌水稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 做倾注培养, 每份样品 2 个平皿, 放入电热恒温培养箱, 28℃ 培养 5~7 d。挑出单菌落, 再接种到平板中进行划线分离, 挑取单菌落, 移入斜面试管中保存 28℃ 培养 1~1.5 个月。定期镜检观察, 直至菌落特征和菌体特征均一, 得到单一的菌落, 从而进行下一步的鉴定。培养特征观察: 将菌株分别接种到高氏一号合成培养基上, 观察其宏观形态特征包括菌落形态、基生菌丝颜色、气生菌丝颜色、有无可溶性色素等。显微特征观察: 以平皿插片法进行形态观察高氏一号合成培养基作插片于 28℃ 培养分别于 3、6、9、12、15 d 取出插片置载玻片上进行观察: 基丝是否有横隔, 是否断裂孢子, 形状及表面特征, 着生方式, 孢子链有无, 气丝是否断裂等特征。

1.2.2 生理生化试验 革兰氏染色(指示菌:金黄色葡萄球菌,大肠杆菌);明胶液化试验;牛奶的凝固和胨化;淀粉水解测定;抗生素敏感性试验:所选用抗生素为青霉素,测定方法为平板法。试验菌为指示菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。使金黄色葡萄球菌配成菌悬液,以液态菌倒双层培养基(下层为水琼脂)。取

第一作者简介: 杨玉红(1973-),女,辽宁大连人,博士,讲师,主要从事微生物工程和食品生物技术方面的研究。E-mail: kzlyangyuhong@163.com。

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学技术研究资助项目 (2004D236)。

收稿日期: 2007-03-01

生长好的检测菌(打下琼脂块)接种于含抗生素的培养基上, 28℃培养 1~3 d 后观察供试菌株的生长情况, 如生长了表明该供试菌株对该抗生素有抗性, 反之即敏感。

1.2.3 摇瓶发酵测定 ϵ -聚赖氨酸产量 参照 Itzhaki 方法^[8]。发酵液制取: 用接种环挑取一环气生孢子接入到种子培养基中(20 mL 培养基/250 mL 三角瓶) 30℃, 150 r/min 震荡培养 24~36 h 后, 取 5 mL 接入发酵培养基(100 mL/500 mL 三角瓶), 30℃, 150 r/min 震荡培养 36 h~48 h。取发酵液 30 mL 于 6000 r/min 离心 10 min, 取 2 mL 上清液加入 2 mL 甲基橙, 震荡 30 min 后, 于 4000 r/min 离心 15 min, 取 1 mL 上清液定容至 20 mL。于 465 nm 下测 OD 值。

1.2.4 抑菌圈法复筛多聚赖氨酸产生菌 金黄色葡萄球菌培养: 在无菌条件下挑取金黄色葡萄球菌于无菌水

中配成菌悬液, 将 20 mL 牛肉膏蛋白胨培养基均匀地注入一个直径为 9 cm 的平皿, 待牛肉膏蛋白胨培养基凝固后, 将菌悬液倾注于平皿中, 28℃培养 2~3 d。取上述发酵液 30 mL 于 4500 r/min 离心 10 min, 取 2 mL 上清液备用, 在无菌条件下, 用无菌镊子夹取无菌小圆片滤纸浸入上述上清液中, 后转接于含有金黄色葡萄球菌的培养基中, 将平皿于 28℃培养 3~7 d 并观察是否有抑菌圈的形成。

2 结果与分析

2.1 培养特征观察

高氏一号合成培养基中放入重铬酸钾做抑菌剂, 使其浓度为 0.005%, 培养液用无菌水稀释至 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 做倾注培养, 每份样品 2 个平皿, 放入电热恒温培养箱, 28℃培养 5~7 d 后, 部分平皿图样如图 1。

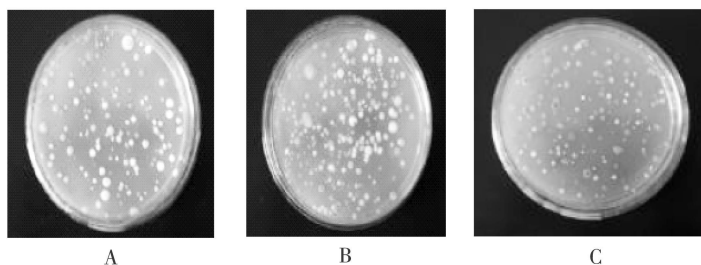


图 1 筛选的部分平皿图样

(A: 露水河-红松土样; B: 黑风口土样; C: 山顶上土样)

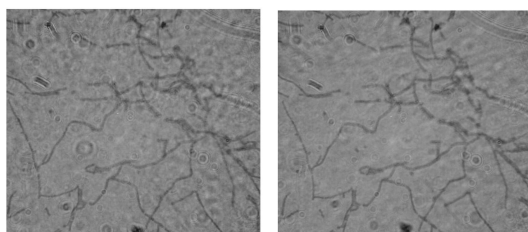


图 2 露水河-红松
显微观察图

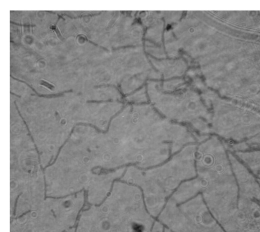


图 3 黑风口显微
观察图

根据多聚赖氨酸产生菌的形态特征及相关文献资料, 针对其气生菌丝为雪白色、薄、边缘有微绒状, 及多为颗粒状形, 挑取形态特征像的菌接于斜面^[9], 于 30 d 后观察斜面培养基情况如表 1。因多聚赖氨酸产生菌在高氏一号培养基上培养若干天后的色素颜色为无色或微黄^[10,11], 由表 1 的色素变化, 挑取露水河-红松, 黑风口, 山顶上土样所筛选的单一菌落, 进行下一步的鉴定。

表 1 30 d 斜面培养后各形似目的菌菌丝及色素变化

土样	气生菌丝	基内菌丝	色素颜色 (培养 30 d 后)
露水河-西洋参	灰白	驼黄	淡绿
露水河-红松	白至雪白色 (较多)薄, 绒状	生长慢, 白色	无
黑风口	雪白色	生长慢, 白色	无
紫椴	白色	白色	灰黑, 淡绿
山顶上	白色	白色	微黄
山顶下 50 m	白色(稀少)	白色	驼黄

2.2 显微特征观察

露水河-红松(图 2), 黑风口(图 3)挑出菌具有相似特征: 基内菌丝交织紧密, 有少量分枝, 无横隔, 弯曲; 气生菌丝弯曲, 局部有短螺旋, 分枝少, 有端裂气生菌丝; 孢子椭圆形, 孢子丝螺旋形, 孢子表面光滑。而山顶上土样筛选菌不具有以上典型的特征, 故仅取露水河-红

松, 黑风口筛选菌做生理生化试验。

2.3 生理生化试验观察

2.3.1 革兰氏染色结果 经制片, 固定, 媒染与染色, 脱色与复染, 水洗与干燥, 吸干镜检观察。两筛选菌均为革兰氏阳性菌, 指示菌为金黄色葡萄球菌。

2.3.2 明胶液化测定结果 露水河-红松, 黑风口土样的两筛选菌于 7 d 后部分明胶凝块在 20℃以下变为可流动的液体, 在 10 d 后, 明胶凝块全部在 20℃下变为可流动的液体, 因此表明明胶水解为阳性。

2.3.3 牛奶的凝固和胨化结果 两筛选菌于 28℃培养, 经观察 3 d 时牛奶完全褪色, 7 d 时牛奶呈粉红色, 10 d 时牛奶凝固, 16 d 时牛奶完全胨化。

2.3.4 淀粉水解测定结果 两筛选菌于 28℃恒温培养 5~10 d 后, 在平板上滴加卢哥氏碘液, 平板呈蓝黑色, 菌落周围有不变色透明圈, 表示淀粉水解阳性。

2.3.5 抗生素敏感性试验结果 两筛选菌接种于含青霉素的培养基上, 28℃培养 1~3 d 后观察供试菌株的生长情况, 两试验菌都生长了, 表明该供试菌株对该抗生素有抗性。

2.4 抑菌圈法复筛结果

在两筛选菌经发酵离心接入含有金黄色葡萄球菌

的平皿后, 将平皿置于 28℃培养 3~7 d 后, 观察到有明显抑菌圈的形成(图 4, 图 5)。

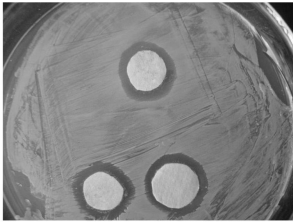


图 4 露水河-红松筛选菌形成的抑菌圈

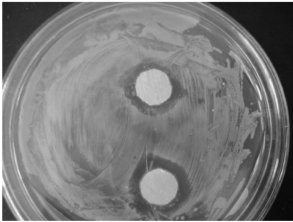


图 5 黑风口筛选菌形成的抑菌圈

2.5 摇瓶发酵测定ε-聚赖氨酸产量

两筛选菌的发酵液经离心等操作, 分光光度计 465 nm测 OD 值, 算得ε-聚赖氨酸量如表 2。可以看出露水河-红松的相对 OD 值较小, 特别是稀释 1 000 倍的土样, 筛选后发酵量最大。

表 2 发酵后两种土样筛选菌产ε-聚赖氨酸量

土样	原土样稀释倍数	OD 值/465 nm	ε-聚赖氨酸量/g·L ⁻¹
露水河-红松 1	1 000	0.161	0.797 821
露水河-红松 2	10 000	0.198	0.699 419
露水河-红松 3	10 000	0.293	0.446 767
黑风口 1	10 000	0.279	0.483 9995
黑风口 2	10 000	0.267	0.515 9135

3 结论

通过用形态特征(各种链霉菌有不同形态的孢子丝 而且形状较稳定, 是进行分类鉴定的重要依据)和生理生化特征对土样进行初筛, 用滤纸片抑菌圈法进行复筛, 然后用摇瓶发酵测定ε-聚赖氨酸产量。依据中国科

学院微生物研究所放线菌组资料, 东秀珠, 蔡秒英等常见细菌系统鉴定手册及其它参考文献, 初步鉴定所筛选菌为白色链霉菌。其气生菌丝为白色至雪白色绒状; 基丝为无色至白色或各种黄色色彩; 孢子椭圆形, 孢子丝螺旋形, 孢子表面光滑。为革兰氏阳性菌, 明胶液化, 淀粉水解阳性; 对一般抗生素有抗性及能形成明显抑菌圈。对筛选较好的露水河-西洋参土样进行再一次的筛选, 结果表明数据有一定的重复性。

参考文献

[1] 刘志恒 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M] . 北京: 科学出版社, 2004; 244-245.
[2] 王意敏 刘志恒. 放线菌的多相分类[J] . 微生物学通报, 1999 26(2): 137-140.
[3] Dunbar J, Barns S M , Ticknor L O , et al. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona Soil[J] . Appl Environ Microbiol, 2002 68: 3035-3045.
[4] 施庆珊. 发酵法生产均聚氨基酸研究进展[J] . 发酵科技通讯, 2004 33(4).
[5] Torsvikv, Ovreas L, Thingstad T F. Prokaryotic diversity magnitude, dynamics and controlling factors[J] . science, 2002 296: 1064-1066.
[6] 安德荣 慕小倩, 赵文军, 等. 土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究[J] . 西北农业学报, 2002 11(1): 106-108.
[7] 肖伟, 李铭刚, 崔晓龙, 等. 几种选择性分离稀有放线菌方法[J] . 微生物学通报, 2006 33(2): 133-137.
[8] Itzhaki R. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. Anal Biochem, 1972, 50: 569-574.
[9] Tsujita T, Sumiyoshi M, Takaku T, et al. Inhibition of Lipases by epsilon-polylysine[J] . J. Lipid Res 2003 44: 2278-2286.
[10] Mukesh D, Banerji A A, Newadkar R, et al. Mathematical modelling of enzymatic butanolysis of vegetable oils[J] . Biocatalysis, 1993, 8: 191-199.
[11] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority[J] . proc Natl Acad sci USA, 1998, 93: 6578-6583.

The Selection of Bacterium of Poly-lysine Production and the Study to its Physical Chemistry Character

YANG Yu-hong¹, KANG Zong-li¹, LIU Chang-jiang²

(1. Biological Science and Technology Institute, Shenyang Agricultural University, 110161, China; 2. College of Food and Engineering , Shenyang Agricultural University, 110161, China)

Abstract: In this thesis we filtrated the germ creating Poly-l-lysine from 20 soil kinds of ChangBai mountain . Through enrichment culture and the dilution flat method we got single colony. Through the appearance development and minute details the appearance characteristic observation, also gelatine liquefaction, the starch hydrolyze etc, we filtrated soil sample. We filtrated again through repressing the germ loop with the filter paper slice. We got two germs finally, the color of its spirit's living hypha was white to snow-white color, velvet form; bottom living hypha color is an achromatic color to a white or various yellow color ; Spore oval shape, the spore silk spiral shape, the surface of the spore is smooth. So we may ascertain this two germs were Poly-l-lysine producing fungus , the yield was 0.51~0.79g/L.

Key words: Poly-Hysine; Filtrate; Physical chemistry character