

王昭君,赵志军,孙俊松,等. 产 ϵ -聚赖氨酸菌株的筛选、鉴定及发酵[J]. 江苏农业科学,2019,47(18):291-296.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.062

产 ϵ -聚赖氨酸菌株的筛选、鉴定及发酵

王昭君^{1,2}, 赵志军², 孙俊松², 史吉平², 王绍明¹

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832000; 2. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210)

摘要: 分别在培养基中添加 2 g/L ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)和复合抗生素抑菌剂, 结合 ϵ -聚赖氨酸与亚甲基蓝形成透明圈的现象初筛产 ϵ -PL 的菌株, 根据 ϵ -聚赖氨酸与道夫根试剂的特殊沉淀反应现象复筛获得 5 株菌株, 经生理生化试验和 16S rDNA 分析鉴定, 5 株菌株中包括 1 株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 1 株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 1 株链霉菌属(*Streptomyces* sp., 未鉴定到种)菌株, 1 株糖多孢属(*Saccharopolyspora* sp)菌株, 1 株白色链霉菌(*Streptomyces albulus*), 其摇瓶发酵 ϵ -聚赖氨酸产量分别为 0.06、0.08、0.70、0.82、1.56 g/L; 采用 2 阶段法对 wj4、wj5 进行 5 L 发酵罐发酵, 结果发现, 其 ϵ -聚赖氨酸最大产量分别为 2.54、6.99 g/L。凝胶色谱分析表明 wj5 发酵液中 ϵ -聚赖氨酸分子量大小与对照品相近, 最小抑菌浓度为 250 μ g/mL, 对大肠杆菌的抑菌效果良好。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; ϵ -PL 生产菌株; 不同类型; 筛选; 鉴定; 发酵; 性能分析

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)18-0291-06

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, 简称 ϵ -PL)是由 25~35 个 L-赖氨酸单体通过 α -COOH 和 ϵ -NH₂ 脱水缩合而成的氨基酸同型聚合物, 相对分子质量通常为 3 500~4 500 Du^[1]。 ϵ -PL 具有广泛的抑菌谱, 并且稳定性强, 安全高效, 目前我国已经批准其作为食品防腐剂^[2], 在国外更已被广泛应用。

近年来, 我国研究人员对 ϵ -PL 产生菌的筛选^[3]、发酵^[4]、产物鉴定^[5]、提取^[6]、应用^[7]等进行了大量研究。传统的筛选工作通过鉴定摇瓶发酵液中的产物来确定所筛菌株是否能够产生 ϵ -聚赖氨酸, 筛选过程费时费力, 且效率极低。Nishikawa 等采用一种含酸性染料 polyR-478 的培养基筛选

ϵ -PL 产生菌, 获得了大量 ϵ -PL 产生菌, 包括链霉菌属(*Streptomyces*)、北里胞菌属(*Kitasatospora*)、香柱菌属(*Epichloe*)等^[8]; 该方法大大提高了筛选效率, 且可获得不同菌种的 ϵ -PL 产生菌, 但因为所用染料试剂的停产, 该方法未得到普及^[9]。目前, 我国研究人员多用亚甲基蓝平板筛选法分离筛选 ϵ -PL 产生菌, 如黄莉等利用含 K₂Cr₂O₇ 和亚甲基蓝的平板筛选出一株 *Streptomyces griseolus*, 其 ϵ -PL 产量为 0.808 g/L^[10]。张波用同样的方法从四川省成都市郊区土壤中筛选获得一株 ϵ -PL 产量为 1.893 g/L 的不吸水链霉菌 *Streptomyces ahyscopicus* SAC23^[11]。

江南大学^[12]、天津科技大学^[13]、南京工业大学^[14]等单位在 ϵ -PL 菌种筛选与发酵优化方面做了大量的研究工作。张超等筛到一株 *Streptomyces* sp. M-Z18, 该菌的摇瓶 ϵ -PL 产量为 0.2 g/L, 其所在课题组以 *Streptomyces* sp. M-Z18 为出发菌株采用物理化学诱变、原生质体融合、基因组重排(genome shuffling)技术等一系列方法进行 ϵ -PL 高产菌株选育, 2007 年以该菌株为出发菌株进行紫外诱变得到一株高产 ϵ -PL 的菌株 C-18, 其摇瓶 ϵ -PL 产量为 1.23 g/L^[15]。任喜东等提出了一种酸性 pH 值冲击策略, 先将 pH 值调至 5.0,

收稿日期: 2018-05-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(编号: 31300048)。

作者简介: 王昭君(1991—), 女, 新疆奎屯人, 硕士研究生, 研究方向为绿洲农业生态。E-mail: wzjshz@163.com。

通信作者: 赵志军, 博士, 副研究员, 研究方向为代谢工程, E-mail: zhaozj@sari.ac.cn; 王绍明, 教授, 研究方向为生态学, E-mail: westwild@vip.sina.com。

参考文献:

- [1] 赵素芬. 猪粪好氧堆肥过程中磷元素变化规律的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005: 1-65.
- [2] 黄伟. 红壤中溶磷菌的筛选及溶磷特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006: 1-60.
- [3] 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 溶磷微生物对不同磷矿粉的溶解能力[J]. 中国农业科学, 2002, 35(10): 1232-1235.
- [4] 赵钢, 王安虎. 红花的资源及药用价值[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 24-25.
- [5] 臧威, 孙剑秋, 王鹏, 等. 东北地区四种农作物根际磷细菌的分布[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1206-1210.
- [6] 冯瑞章, 冯月红, 姚拓, 等. 春小麦和苜蓿根际溶磷菌筛选及其

- 溶磷能力测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 28-32.
- [7] 杨美英, 王春红, 武志海, 等. 大豆根际溶磷菌分离鉴定及溶磷过程中有机酸的分泌[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 38-44.
- [8] 徐鸿斌, 王绍明, 赵维奇, 等. 红花根际微生物群落磷脂脂肪酸(PLFAs)特征分析[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(1): 72-78.
- [9] 王震宇, 温胜芳, 邢宝山, 等. 4 种水生植物根际磷素耗竭效应的比较[J]. 环境科学, 2008, 29(9): 2475-2480.
- [10] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与 pH 及分泌有机酸的关系[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 5-7.
- [11] 李玉娥, 姚拓, 朱颖, 等. 兰州地区苜蓿和红豆草根际溶磷菌筛选及菌株部分特性研究[J]. 中国草地学报, 2009, 31(1): 45-51.

对 pH 值冲击阶段进行预适应,再调节 pH 值至 3.0,以调控菌体代谢活力,最后调节 pH 值至 4.0 为 ε -PL 的积累提供最适条件,在此条件下,5 L 发酵罐的发酵产量达 54.70 g/L,不仅达到了商业生产要求,甚至高于日本工业生产用菌 *Streptomyces albulus* stain 410 的报道产量(48.3 g/L)^[16-17]。

本研究在筛选培养基中添加 ε -PL 和复合抗生素抑菌剂,结合 ε -PL 与亚甲基蓝的静电作用形成透明圈的特性,筛选不同类型的 ε -PL 生产菌株,并在摇瓶及 5 L 发酵罐中进行发酵,对不同类型 ε -PL 生产菌株产 ε -PL 的性能进行考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 2016 年 9 月从上海市郊区采集土样,除去表层土,取距表层 5~10 cm 土壤 100 g,装入已灭菌的牛皮纸袋中,于室温下自然风干 3~10 d,碾碎过筛后,在 50 ℃ 下烘 1 h,取 1 g 土样加入 10 mL 灭过菌的 0.005 mol/L 磷酸缓冲液[pH 值为 7.0,其中含 6.00% 蛋白胨和 0.05% 十二烷基硫酸钠(SDS)]中,50 ℃ 下振荡 10 min^[18]。

1.1.2 试剂 ε -PL 对照品购自郑州拜纳佛生物工程股份有限公司;酶及引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA 提取试剂盒购买自碧云天生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器 PCR 仪(BIO-RAD),高压蒸汽灭菌锅(SANYO),电泳仪(BIO-RAD),SBA-40D 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所),5 L 发酵罐(Sartorius Stedim Biotech GmbH),高效液相色谱仪(岛津公司)等。

1.1.4 培养基及溶液 分离培养基(SC 培养基):甘油 1%,酵母膏 0.01%, KH_2PO_4 0.025%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.088%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.066%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%,琼脂 1.5%,pH 值 7.5。115 ℃,灭菌 15 min。

链霉菌筛选(ISP2)培养基:酵母浸膏 0.4%,麦芽浸膏 1%,葡萄糖 0.4%,琼脂 1.5%,微量盐溶液 1 mL,pH 值 7.2。115 ℃,灭菌 15 min。

种子培养基及发酵培养基(M3G):葡萄糖 5.000 0%,酵母粉 0.500 0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.000 0%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.104 8%, KH_2PO_4 0.136 0%,10 倍浓缩盐溶液($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0500%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0030%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004%)100 mL,pH 值 6.8。葡萄糖单独灭菌。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、琼脂 2 g,用蒸馏水定容至 1 000 mL。121 ℃,灭菌 20 min。

微量盐溶液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g,加水定容至 1 L。

复合抗生素抑菌剂:将 10 mg 放线菌酮、10 mg 制霉菌素、20 mg 萘啶酮酸钠分别平铺在三角瓶中,覆盖乙醚,使乙醚没过抗生素粉末,用培养基封口膜封口放入通风橱中待乙醚挥发干后,转至超净台上,加入定量无菌水,于 45 ℃ 下水浴溶解后过 0.2 μm 滤膜。制霉菌素在 pH 值为 7.2 时溶解不完全,需用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 11.0,完全溶解后用盐酸中和滴定,使 pH 值回复至 7.2。

0.1 mol/L 磷酸缓冲液:称取 35.820 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,15.605 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,分别定容至 1 L,相互滴定至 pH 值为 6.6。

道夫根试剂(DR 试剂):参照文献[19]配制。

1.2 方法

1.2.1 产 ε -PL 菌株初筛

1.2.1.1 ε -PL 耐受菌株的筛选 首先对土样进行预处理,具体为大致去除土样中的杂物,风干后碾碎过筛,烘干。取 1 g 预处理过的土样加入 10 mL 无菌水中,30 ℃、100 r/min 振荡 15 min 后静置 30 min,吸取上清液稀释适当倍数后涂布于含 2 g/L ε -PL 的 LB 分离培养基平板上。

1.2.1.2 复合抗生素抑菌剂平板筛选 据文献[20]报道,产 ε -PL 的菌种大多属于北里孢菌属、链霉菌属等,其中链霉菌属的菌种产量普遍较高。萘啶酮酸对细菌的抑制效果较好,制霉菌素能够抑制真菌,放线菌酮能够抑制霉菌和酵母等,因此添加抑制细菌、霉菌、酵母和真菌的抗生素于 ISP2 培养基平板上进行放线菌株的筛选。在已灭菌的 ISP2 平板中加入复合抗生素抑菌剂,倒板涂布,筛选产 ε -PL 的放线菌株。

1.2.1.3 透明圈筛选 挑取 ε -PL 耐受平板和复合抗生素筛选平板上的菌落,接种至含 0.003% 亚甲基蓝的 SC 培养基平板上 30 ℃ 培养 7 d^[8]。亚甲基蓝是一种碱性染料,菌落分泌的带正电荷的物质(ε -PL)会由于静电作用排斥亚甲基蓝,进而形成透明圈,且带正电荷物质的浓度越高,透明圈越大^[21]。挑取有明显透明圈的单菌落进行保存,用于复筛。

1.2.2 复筛 将初筛得到的细菌接种至盛有 30 mL LB 液体培养基的 250 mL 摇瓶中,在 30 ℃、200 r/min 下发酵 84 h;转接到盛有 30 mL M3G 培养基的 250 mL 摇瓶中,在 30 ℃ 下发酵 96 h,收集发酵液在 7 000 r/min 条件下离心 10 min,用 DR 试剂检测发酵产物是否存在 ε -PL。该反应很灵敏,可以有效检测出发酵液中的 ε -PL^[22]。

1.2.3 生理生化鉴定 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 9 版)、《放线菌分类基础》及《链霉菌鉴定手册》对复筛得到的菌株进行初步鉴定。

1.2.4 16S rDNA 鉴定 取摇瓶培养 7 d 后的菌液,采用基因组提取试剂盒提取基因组 DNA,并采用通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'进行 PCR 扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将得到的 16S rDNA 序列与 Gen Bank 数据库中相关种属的序列进行比较,构建系统发育树。

1.2.5 高效液相色谱产量测定 高效液相色谱(HPLC)采用国标法(GB/T 5009.124)进行:C18 柱,流动相为 8% 乙腈,流速为 0.4 mL/min,检测波长为 215 nm,进样体积为 20 μL ,温度为 40 ℃。

1.2.6 菌株生物量测定 采用干质量法测定菌株生物量(DCW)。每隔 12 h 取 5 mL 发酵液样品,在 7 000 r/min 转速下离心 10 min,沉淀(即菌丝体)经蒸馏水洗涤 3 次后放入干燥清洁且已知质量的培养皿中,于 60 ℃ 下烘干至恒质量,称质量得菌体干质量。重复测定 3 次,取平均值。

1.2.7 发酵产物的分子量分析 使用凝胶渗透色谱确定发酵液中 ε -PL 分子量大小。参考色谱条件:凝胶柱为 TSK-gelG2000SWXL;检测温度为 35 ℃,检测波长为 210 nm,流速

为 1 mL/min, 进样量为 20 μ L; 流动相, 乙腈: 水 = 20: 80 (体积比), 含三氟乙酸 1 mL/L^[15, 23-24]。

1.2.8 最小抑制浓度的确定 以郑州拜纳佛生物工程股份有限公司生产的 ϵ -PL 为对照, 从 wj5 发酵液提取得到的 ϵ -PL 固体粉末作为试验样品, 按 0~250 μ g/mL 不同的 9 个浓度梯度添加到培养基中, 将稀释了适当倍数的大肠杆菌 BW25113 菌液涂在平板上, 验证 ϵ -PL 的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 产 ϵ -PL 菌株的初筛

2.1.1 ϵ -PL 耐受菌株和产 ϵ -PL 菌株筛选 以往的经验表明, 目标物的生产菌株通常对目标物具有一定的耐受性, 依据这一特性, 本研究尝试通过筛选 ϵ -PL 的耐受菌株来获得产 ϵ -PL 的菌株。将从 ϵ -PL 耐受平板上筛选出的菌落接种至含 0.003% 亚甲基蓝的 SG 平板上, 筛选出 wj1、wj2 菌株。图 1 为通过该原理筛选出的 2 株在含亚甲基蓝的 SG 培养基上形成透明圈的菌株 wj1、wj2, 根据菌落长出的时间与其湿润、黏稠、易挑起的形态特征初步判断可能是细菌。

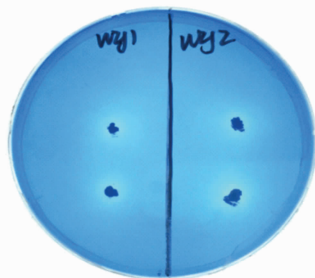


图1 产 ϵ -PL 菌株菌落排斥亚甲基蓝形成的透明圈

2.1.2 复合抗生素抑菌剂平板筛选 将从复合抗生素抑菌剂平板上筛选出的菌落接种至含 0.003% 亚甲基蓝的 SG 平板上, 筛选出 wj3、wj4、wj5 等 3 株透明圈较大的菌株 (图 2), 其中 wj5 菌株形成的透明圈明显大于其他 2 株菌株。从形态特征上看, 这 3 株菌株不同于 wj1、wj2 菌株, 其菌落干燥, 质地紧密而不蔓延, 不易挑起, 初步判断可能是真菌或者放线菌。

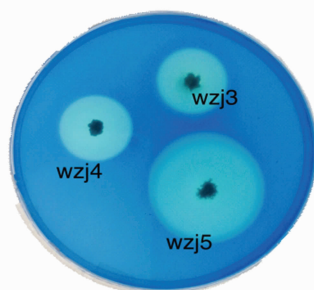


图2 复合抗生素抑菌剂平板筛选

2.2 产 ϵ -PL 菌株的复筛

据文献报道, ϵ -PL 在酸性 (pH 值为 2~5) 条件下能够与 DR 试剂发生特异性反应生成橘红色沉淀 (ϵ -PL · HI)^[25]。本试验结果 (图 3) 表明, wj1、wj2、wj3、wj4、wj5 菌株的发酵液均能够与 DR 试剂发生反应生成橘红色沉淀。其中, wj1、wj2 菌株的发酵液与 DR 试剂反应产生的沉淀偏少, 而 wj3、wj4、wj5 菌株的发酵液与 DR 试剂反应产生的沉淀较多。

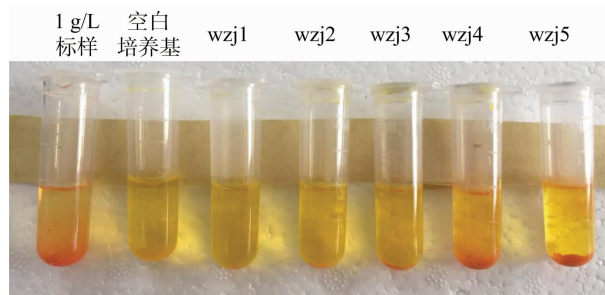


图3 5 菌株发酵液上清与 DR 试剂反应

2.3 ϵ -PL 产生菌的鉴定

2.3.1 生理生化鉴定 传统微生物分类鉴定的主要依据是微生物的形态学特征、生理生化反应特征等, 可初步判定其种属。5 株菌株在 LB 固体培养基上的菌落形态见图 4-a, 它们在显微镜下的个体形态如图 4-b 所示, 形态特征描述与生理生化试验结果见表 1。根据试验结果推测, 菌株 wj1、wj2 归属于芽孢杆菌属; wj3、wj4、wj5 归属于链霉菌属。

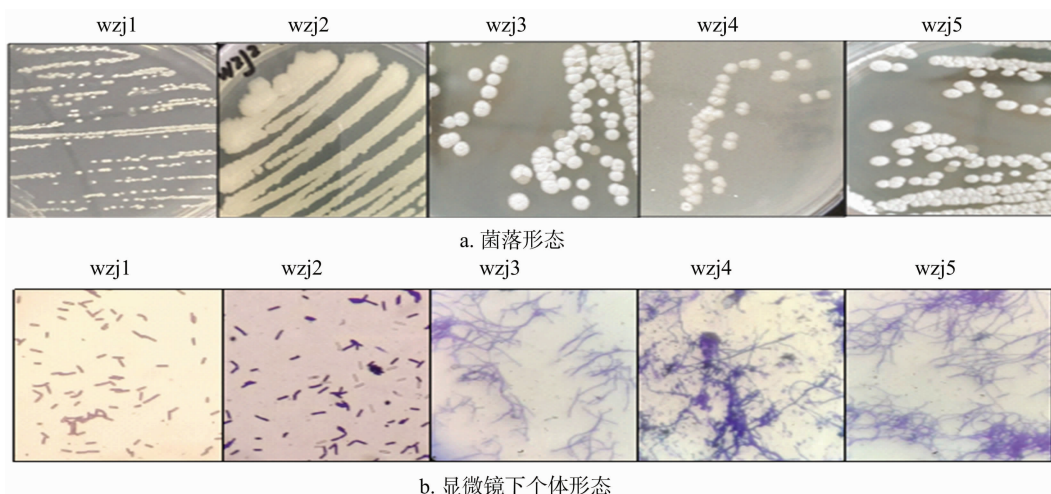


图4 5 菌株在固体培养基上及显微镜下(10×100)的形态特征

表 1 5 株菌株形态特征描述与生理生化试验结果

菌株编号	形态特征	生理生化
wzj1	菌落白色圆形、扁平、中间稍隆起、湿润且有黏性,易挑起;革兰氏阳性菌,菌体杆状,两端钝圆、长短不一	碳源利用:葡萄糖、甘油、果糖、甘露醇、山梨醇阳性;半乳糖阴性;淀粉水解:阳性
wzj2	菌落灰白色、较大不透明,表面较粗糙、融蜡状;革兰氏阳性菌,菌体杆状	碳源利用:葡萄糖阳性;甘油、果糖、半乳糖、甘露醇、山梨醇阴性;淀粉水解:阳性
wzj3	菌落规则圆形、白色粉状、干燥不透明、与培养基链接紧密,不易挑起;革兰氏阳性菌,菌丝长	碳源利用:葡萄糖、甘油、蔗糖、乳糖阳性;果糖、 β -环糊精阴性;淀粉水解:阳性;是否产色素:否;是否产硫化氢:否
wzj4	菌落白色粉状、圆形、较小、不透明,中间有间隙将菌落分成 2~3 瓣,与培养基链接紧密,不易挑起;革兰氏阳性菌,菌丝长	碳源利用:果糖、甘油、甘露醇阳性;葡萄糖、蔗糖、乳糖、 β -环糊精阴性;淀粉水解:阳性;是否产色素:否;是否产硫化氢:否
wzj5	菌落规则圆形、白色粉状、干燥不透明、边缘呈齿轮状凸起、与培养基链接紧密,不易挑起;革兰氏阳性菌,菌丝长	碳源利用:果糖、甘油、葡萄糖、蔗糖、乳糖、 β -环糊精阳性;甘露醇阴性;淀粉水解:阳性;是否产色素:否;是否产硫化氢:否

2.3.2 16S rDNA 鉴定 从 Gen Bank 数据库中通过 Blast 查找与 5 株菌株相似的 16S rDNA 序列,并通过 MEGA 软件与菌株 wzj1、wzj2、wzj3、wzj4、wzj5 的 16S rDNA 序列进行比对,构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树。结果(图 5)表明,菌株 wzj1 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus*

amyloliquefaciens), wzj2 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), wzj3 属于链霉菌 (*Streptomyces* sp, 未鉴定到种), wzj4 为糖多孢菌 (*Saccharopolyspora* sp), wzj5 为白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*)。

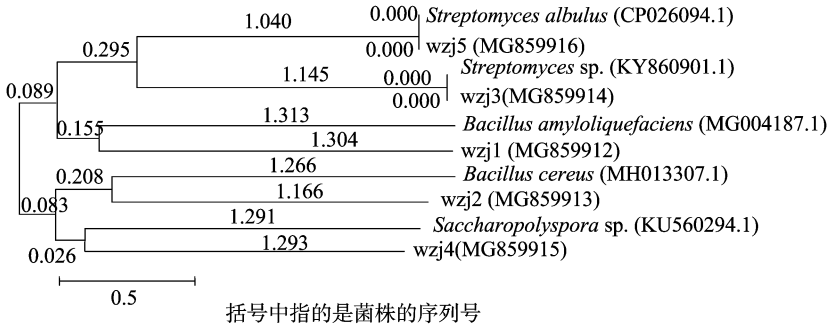


图5 根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树

2.4 ϵ -PL 产量测定

2.4.1 摇瓶发酵 图 6 显示了 5 株菌株在摇瓶发酵过程中 ϵ -PL 浓度的变化,可以看出,wzj1、wzj2 均在发酵 42 h 时达到其最高 ϵ -PL 产量,wzj1 产量为 0.06 g/L,wzj2 产量为 0.08 g/L,在发酵 42 h 后, ϵ -PL 浓度缓慢递减;wzj3 在摇瓶发酵 108 h 时, ϵ -PL 浓度最高,为 0.70 g/L;wzj4 在发酵 84~108 h 时快速积累 ϵ -PL,在 108 h 达到 0.82 g/L;wzj5 发酵产生的 ϵ -PL 含量明显高于其他 4 株菌株,且在摇瓶发酵 96 h 时 ϵ -PL 产量达到最大值,为 1.56 g/L。

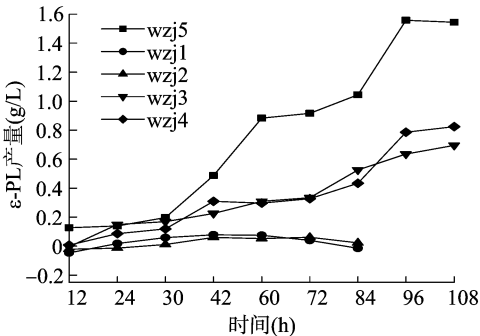


图6 5 株菌株发酵过程中 ϵ -PL 浓度变化

2.4.2 发酵罐发酵 选取摇瓶发酵中 ϵ -PL 产量较高的 wzj4 菌株和 wzj5 菌株进行发酵罐发酵。发酵调控采取 2 阶

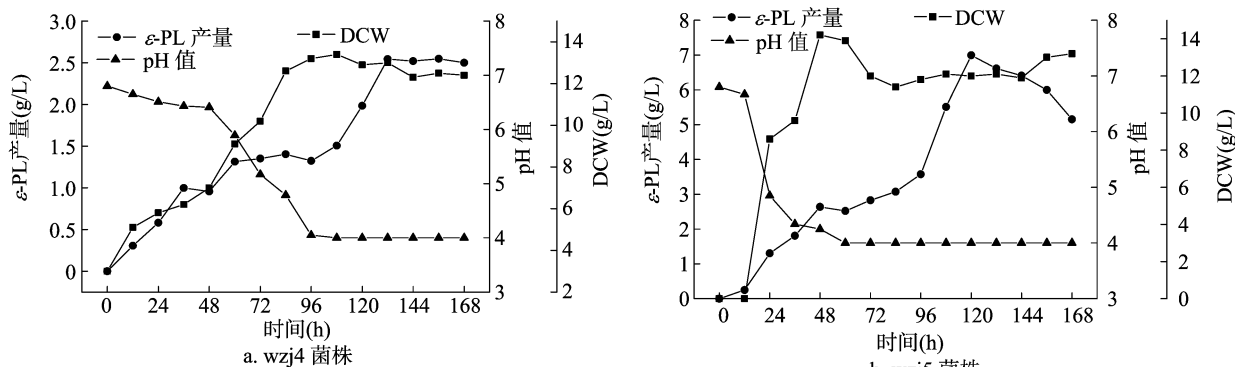
段法:第 1 阶段为菌体生长阶段,初始 pH 值为 6.8;第 2 阶段为 ϵ -PL 合成阶段,pH 值维持 4.0 不变。

图 7-a 是 wzj4 菌株发酵罐发酵过程的参数变化情况,可以看出,第 1 阶段(0~96 h)菌体浓度与条件呈负相关关系,菌体浓度大幅度增长,同时菌体吸收葡萄糖代谢产酸导致 pH 值不断下降。第 2 阶段(96~168 h),维持 pH 值为 4.0。此时在酸性条件下菌体生长受到抑制,菌体浓度逐渐趋于稳定,胞内积累的 ATP 不再主要是用于菌体生长,而是被用于 ϵ -PL 合成酶功能的发挥,有利于 ϵ -PL 的积累。从 132 h 开始, ϵ -PL 产量增长速度变慢,在 156 h 时 ϵ -PL 产量达 2.54 g/L。

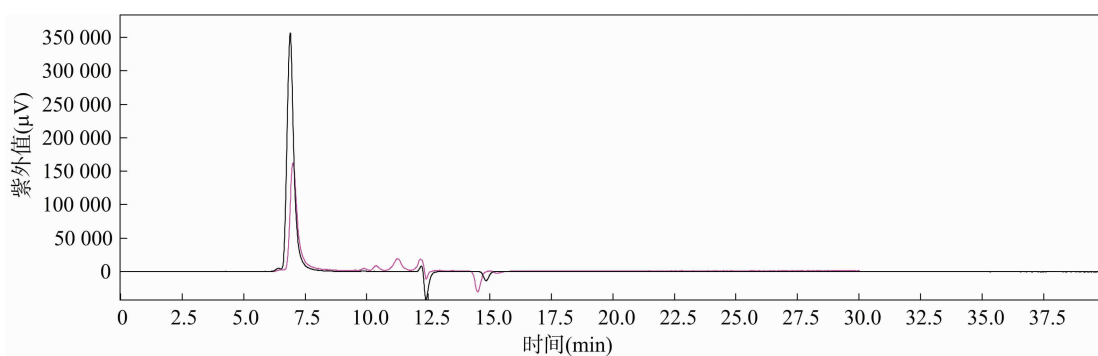
图 7-b 给出了 wzj5 在发酵过程中各参数的变化趋势,其中 0~60 h 为菌体的生长阶段,在产 ϵ -PL 的第 2 阶段(60~168 h)中,在发酵 96~120 h 时 ϵ -PL 积累速率较高,并在发酵 120 h 时达到最大积累量 6.99 g/L。

2.5 平均分子量大小的确定

参照韩岱等的 ϵ -PL 提取方法^[26],对发酵液中的 ϵ -PL 进行提取。以郑州拜纳维生物工程股份有限公司的 ϵ -PL 作为对照,对从 wzj5 菌株发酵液中提取的 ϵ -PL 样品进行凝胶渗透色谱比较分析。结果(图 8)表明,对照在保留时间为 6.9 min 时有最大峰,且样品在此处也存在最大峰,因此确定发酵液中存在与对照分子量大小相近的 ϵ -PL。



所有参数均取 3 次检测值的平均值
图7 wzj4 与 wzj5 菌株 5 L 发酵罐发酵过程的参数变化



黑色线表示 ϵ -PL 标品；粉色线表示提取的 ϵ -PL 样品
图8 凝胶渗透色谱图

2.6 最小抑菌浓度

品基本相近的抑菌能力,最小抑菌浓度为 0.25 mg/mL。

由图 9 可知,从 wzj5 发酵液中提取的 ϵ -PL 具备与对照

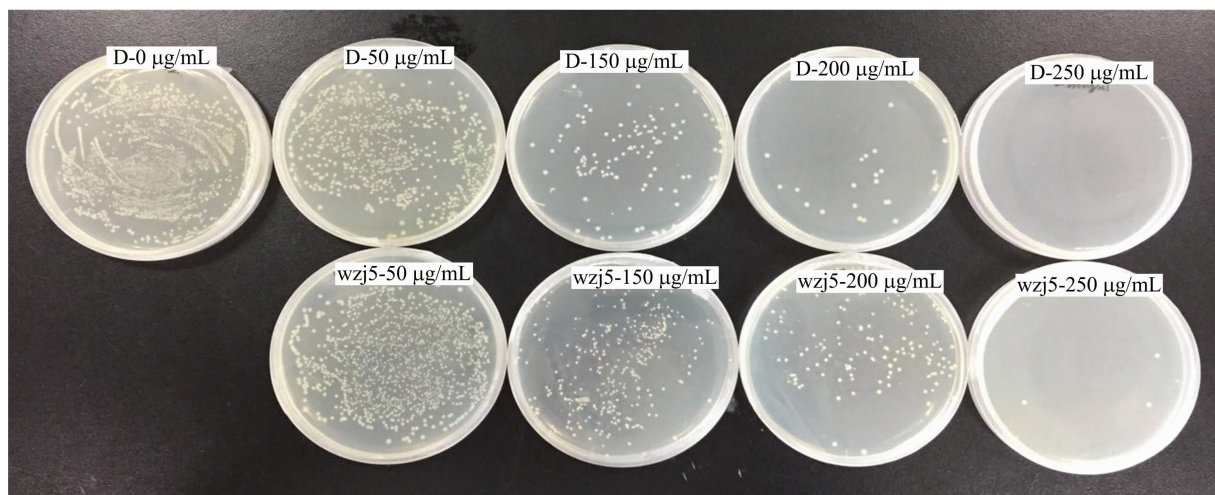


图9 wzj5 发酵液中提取的 ϵ -PL 与对照品抑菌效果对比

3 结论与讨论

ϵ -PL 是一种新型的天然高效生物防腐剂,其菌种选育一直受到研究者的广泛关注。本研究采用不同的方法筛选获得 5 株不同类型的产 ϵ -PL 菌株,其中 2 株芽孢杆菌分别是 *Bacillus amyloliquefaciens* 和 *Bacillus cereus*, ϵ -PL 产量分别是 0.06 g/L 和 0.08 g/L。前期有文献报道,芽孢杆菌产 ϵ -PL 的摇瓶产量为 0.036 ~ 0.083 g/L^[5,27],且已有研究者对产 ϵ -

PL 芽孢杆菌的发酵条件作了初步研究^[28]。芽孢杆菌具有发酵周期短,易培养的优点,对于 ϵ -PL 生产来说,仍具有一定的开发潜力。此外,本研究还筛选到一株糖多孢菌属的菌株 wzj4,其摇瓶最大产量为 0.82 g/L,发酵罐发酵最大产量为 2.54 g/L,该结果为本研究首次报道。

ϵ -PL 产生菌主要集中在链霉菌属^[5,29],包括灰橙链霉菌^[30]、禾粟链霉菌^[31]、稠李链霉菌^[32]等。本研究筛选获得 2 株链霉菌属菌株,其中 wzj3 的摇瓶最大产量为 0.70 g/L,wzj5

的摇瓶最大产量为 1.56 g/L,其发酵罐发酵最大产量为 6.99 g/L,具有较好的产 ε -PL 潜力。菌株 wjz5 的 ε -PL 产量较高,因此提取其发酵液中 ε -PL 进行凝胶色谱分析,结果表明, ε -PL 的分子量大小与郑州拜纳佛生物工程股份有限公司生产的 ε -PL 对照品一致,最小抑菌浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 。

ε -PL 作为一种新型高效安全的天然防腐保鲜剂,具有广阔的应用前景,但与其他生物防腐剂相比,目前 ε -PL 的生产成本和市场价格仍然偏高,后期可采用分子生物学和发酵调控优化等手段,进一步提高 ε -PL 的产量和得率;另外, ε -PL 是聚合度在 25~30 范围内的混合物,其提取与分离工艺比较复杂,仍有较大的技术提升空间。本研究聚焦在产聚赖氨酸菌株的筛选上,并在发酵、产物提取分离和产物性能检测方面进行了初步研究,可为后期进一步的菌株改良、发酵条件优化、提取工艺优化等研究奠定实践基础。

参考文献:

- [1] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1981, 45(11): 2503-2508.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准 ε -聚赖氨酸等 4 种食品添加剂新品种等的公告(2014 年第 5 号)[J]. *中国食品添加剂*, 2014(3): 213-221.
- [3] 黄莉. ε -多聚赖氨酸高产菌的筛选、鉴定及发酵研究[D]. 成都: 西华大学, 2013.
- [4] 孙启星, 陈旭升, 任喜东, 等. 基于 pH 调节和有机氮源流加调控补料分批发酵过程提高 ε -聚赖氨酸产量[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(5): 752-756.
- [5] 黄静敏, 吴清平, 刘盛荣, 等. ε -聚赖氨酸产生菌新菌株的筛选和产物结构鉴定[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 871-877.
- [6] 刘延岭, 邓林. 发酵液中 ε -聚 L-赖氨酸提取工艺的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(4): 17-21.
- [7] 谭之磊. ε -聚赖氨酸及其复合材料的制备与抑菌活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [8] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial ε -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3575-3581.
- [9] 史应武, 姜恺, 李春. ε -聚赖氨酸的生物合成与降解及其应用研究进展[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(3): 1009-1015.
- [10] 黄莉, 唐仁勇, 张佳敏, 等. ε -多聚赖氨酸产生菌的筛选及 16S rDNA 测序鉴定[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(17): 163-167, 172.
- [11] 张波. 发酵法生产聚赖氨酸菌种选育研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2014: 1-72.
- [12] 曾昕. 小白链霉菌同步代谢葡萄糖和甘油合成 ε -聚赖氨酸的生理机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [13] 王静, 谭之磊, 毕德玺, 等. 细菌基因组序列中 ε -聚赖氨酸合

- 成酶的生物信息学识别与分析[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(12): 2495-2504.
- [14] 孙朱贞, 冯小海, 许召贤, 等. 一株产 ε -聚赖氨酸的白色链霉菌遗传转化体系[J]. *生物加工过程*, 2016, 14(2): 27-32.
 - [15] 张超, 张东荣, 贺魏, 等. 一种简便的 ε -聚赖氨酸产生菌的筛选方法[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2006, 44(11): 1104-1107.
 - [16] 任喜东. 小白链霉菌响应酸性 pH 高产 ε -聚赖氨酸的生理解析[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
 - [17] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of epsilon-polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(2): 190-194.
 - [18] 朱宏阳, 徐虹, 吴群, 等. ε -聚赖氨酸生产菌株的筛选和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(5): 127-130.
 - [19] 李树. ε -聚赖氨酸产生菌的筛选、育种及发酵研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
 - [20] Chheda A H, Vernekar M R. Improved production of natural food preservative ε -poly-L-lysine using a novel producer *Bacillus cereus* [J]. *Food Bioscience*, 2014, 7: 56-63.
 - [21] El-Sersy N A, Abdelwahab A E, Abouelkhiir S S, et al. Antibacterial and anticancer activity of ε -poly-L-lysine (ε -PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5): 513-522.
 - [22] 陈旭升. ε -聚赖氨酸高产菌株选育与发酵过程优化[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
 - [23] 孙湘婷, 陈娇婷. ε -聚赖氨酸高产菌的新型筛选模型[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 202-203, 209.
 - [24] 张超, 张东荣, 贺魏, 等. 一种简便的 ε -聚赖氨酸产生菌的筛选方法[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2006, 44(11): 1104-1107.
 - [25] 程传荣, 田丰伟, 张灏, 等. 一种快速测定发酵液中 ε -聚赖氨酸的方法[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(11): 133-136.
 - [26] 韩岱, 陈旭升, 甄斌, 等. 新型生物食品防腐剂 ε -聚赖氨酸的提取[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(6): 221-226.
 - [27] Shima S, Fukuhara Y, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ε -poly-L-lysine produced by *Streptomyces* [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(7): 1917-1919.
 - [28] Shukla S C, Mishra A. ε -polylysine production from sugar cane molasses by a new isolates of *Bacillus* sp. and optimization of the fermentation condition [J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1513-1523.
 - [29] 石慧, 李婵娟, 张俊红. ε -聚赖氨酸产生菌及其应用研究概述[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(9): 263-269.
 - [30] 段杉, 朱伟珊. ε -聚赖氨酸产生菌的筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 14-17.
 - [31] 廖莉娟. ε -聚赖氨酸的菌种选育及合成过程强化[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
 - [32] 李树, 陈旭升, 廖莉娟, 等. ε -聚赖氨酸产生菌的筛选方法改进[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(2): 282-287.