

# $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株的选育\*

贾士儒 董惠钧 姜俊云 刘伟成

(天津科技大学生化工程研究室, 天津, 300222)

**摘 要** 依据传统诱变理论和白色链霉菌生物合成  $\epsilon$ -聚赖氨酸的特点, 确立了以枯草芽孢杆菌为敏感菌株, 抗性突变株筛选和抑菌圈法相结合的初筛方法。在优化诱变条件的基础上, 以白色链霉菌为出发菌株, 经紫外线与硫酸二乙酯诱变, 选育出一株遗传性状稳定, 遗传标记为 AEC<sup>r</sup> + Gly<sup>r</sup> 的  $\epsilon$ -聚赖氨酸生产菌株, 其产量可达 0.79 g/L。

**关键词**  $\epsilon$ -聚赖氨酸, 白色链霉菌, 诱变育种

有机食品是世界食品工业发展的趋势, 食品防腐剂的天然化成为这一趋势的必然要求。目前  $\epsilon$ -聚赖氨酸是最具优良性能和巨大商业价值的生物防腐剂之一<sup>[1]</sup>。它是含有 25~30 个赖氨酸残基的阳离子聚合多肽, 当聚合度低于 10 肽, 会丧失抑菌活性<sup>[2]</sup>。 $\epsilon$ -聚赖氨酸抑菌谱广, 在酸性和微酸性环境中对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌、霉菌均有抑制作用, 而且对耐热性芽孢杆菌和一些病毒也有抑制作用<sup>[3]</sup>。同时, 其热稳定性高, 水溶性好, 食用安全, 因此, 广泛用于食品保鲜<sup>[4]</sup>。此外, 在基因治疗<sup>[5]</sup>、微囊药物的制备<sup>[6]</sup>、高分子材料等领域中,  $\epsilon$ -聚赖氨酸亦有着广泛的用途。文中以筛选获得的白色链霉菌为出发菌株, 通过紫外线与硫酸二乙酯等的诱变处理, 对  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株进行了筛选。

## 1 材料和方法

### 1.1 出发菌株

白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) TF-1。

### 1.2 培养基

(1) 贝特纳斜面培养基 (%) : 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.2, 酵母浸膏 0.1, 琼脂 1.5。

(2) 种子和发酵培养基 (%) : 葡萄糖 5.0, 酵母浸膏 0.5。

(3) AEC(S-氨基乙基半胱氨酸) 抗性培养基

(%) : 贝特纳培养基 + AEC。

(4) 甘氨酸抗性培养基 (%) : 贝特纳培养基 + 甘氨酸。

### 1.3 试剂

2% 硫代硫酸钠溶液, pH7.2 磷酸缓冲溶液。

### 1.4 诱变育种

(1) 紫外(UV)诱变: 制备孢子悬浮液, 取 5 mL 于  $\phi$ 9 cm 无菌平皿中, 置于功率为 15 W 的紫外灯下 60 cm 处, 照射一定时间。

(2) 硫酸二乙酯(DES)诱变: 在装有 19.0 mL pH7.0 磷酸缓冲液的试管中, 加入 1 mL 单孢子悬浮液, 再加入 DES 溶液, 37℃ 恒温水浴保温一定时间。

### 1.5 筛选方法

(1) 菌株初筛和第 1 次复筛方法: 琼脂块抑菌圈法, 将从 AEC<sup>r</sup> 和 Gly<sup>r</sup> 抗性平板上挑选出的突变株连同培养基琼脂块切下后, 嵌入同样大小的培养基孔中, 30℃ 培养 72 h, 测定抑菌圈直径。

(2) 二次复筛方法: 将第 1 次复筛得到的菌株通过发酵测定  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量。

### 1.6 分析方法

(1) 生物量测定: 干重法测定。

(2) 残糖测定: SBA-40C 生物传感分析仪。

第一作者: 博士, 教授(博士生导师)。

\* 天津市与教育部共建项目(No. GJDF03)

收稿时间: 2004-04-02, 改回时间: 2004-09-13

- (3) pH 测定: PHSJ-4A 型数字 pH 计。  
(4)  $\epsilon$ -聚赖氨酸测定: 参照 Itzhaki 方法<sup>[7]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 AEC 和甘氨酸临界浓度的确定

将处于对数生长期的菌液 0.1 mL 分别涂

布于不同浓度梯度的 AEC 和 Gly 贝特纳培养基平板上, 于 30℃ 培养 48 h, 观察平板上菌落生长情况(见表 1)。当 AEC 和 Gly 浓度分别超过 6 mg/mL 和 3 mg/mL 时, 出发菌株不能生长, 所以 AEC<sup>r</sup> 和 Gly<sup>r</sup> 的临界浓度分别为 6 mg/mL 和 3 mg/mL。

表 1 白色链霉菌 AEC 和甘氨酸抗性临界浓度

AEC 和 Gly 的浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8
含 AEC 平板菌	+	+	+	+	+	+	-	-
含 Gly 平板菌落	+	+	+	-	-			

注: + 生长良好; - 未生长。

2.2 抑菌圈敏感菌株的选择

根据白色链霉菌代谢产物  $\epsilon$ -聚赖氨酸的抑菌特性, 选用酵母菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌做敏感性对比试验, 结果表明(表 2), 枯草芽孢杆菌为敏感菌时, 其 H/C(抑菌圈直径与菌落直径之比)平均值最大, 为 1.51。因此, 选择枯草芽孢杆菌作为敏感菌。

表 2 敏感菌株的确定

菌种	酵母菌	乳酸杆菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
H/C <sup>1)</sup>	1.37	1.23	1.51	0

1) H/C 为抑菌圈直径与菌落直径之比(以下各表与此相同)。

2.3 白色链霉菌 UV 诱变筛选

2.3.1 紫外诱变处理

通过 UV 照射 30 s、60 s、90 s、120 s 的孢子悬浮液, 孢子存活率分别为 63.6%、7.5%、3.7% 和 0.0%(图 1), 根据遗传育种的经验, 正向突变较多地出现在偏低剂量中, 因此依照白色链霉菌存活率曲线图, 确定 45 s 为最适剂量。

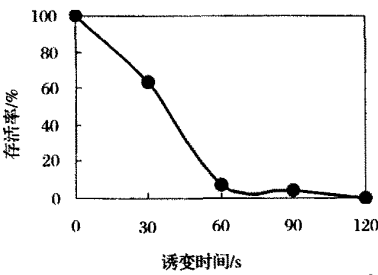


图 1 *Streptomyces albulus* 紫外线诱变存活率

2.3.2 UV 突变株初筛

利用抗性筛选平板筛选抗性突变株是一种简便的获得高产突变株的有效方法。当 AEC 和 Gly 浓度分别为 7 mg/mL 和 4 mg/mL 时(表 3), 其中突变株 2、4、6、10、11 的 H/C 值高于原出发菌株, 因此选择这 5 株突变株进行复筛。

2.3.3 UV 突变株复筛

复筛结果(图 2)表明, 突变株 UM11 和突变株的  $\epsilon$ -PL 产量均高于出发菌株。但 UM2

表 3 UV 突变株初筛结果

突变株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H/C	1.42	1.76	1.43	1.53	1.39	1.52	1.34	1.35	1.41	1.55
突变株	11	12	13	14	15	16	17	18		
原菌株	H/C	1.61	1.42	1.38	1.47	1.42	1.29	1.30	1.39	1.50

的增幅明显。而其他突变株的产酸量均低于出发菌株, 说明初筛得到的一些突变株生产性能不稳定, 生长环境的改变对菌株的代谢影响大。因此选择突变株 UM2 作为下一轮诱变的出发菌株。

2.4 白色链霉菌的 DES 诱变筛选

2.4.1 DES 最佳诱变条件的确定

图 3 和 4 表明, 以 UM2 为出发菌株, 诱变处理 25 min 后, 细胞的存活率为 4.08%, 突变率最大为 60.98%。当 DES 体积浓度为 1.0%

时,菌体存活率为 17.6%,突变率为 45.27%。说明存活率较低时,正向突变率较大。同时也可以看出,随着诱变剂量的增加,突变率反而下降。上述现象说明 DES 对白色链霉菌的诱变有最适剂量。因此由图 4 和图 5 可确定 DES 的最适剂量为:诱变时间 25 min,DES 浓度为 1.0%(体积)。

2.4.2 DES 突变株初筛

表 4 表明,DES 突变株 1、2、3、4、5、6、9 的 H/C 值均高于 UM2 出发菌株,因此选上述突变株进行复筛。

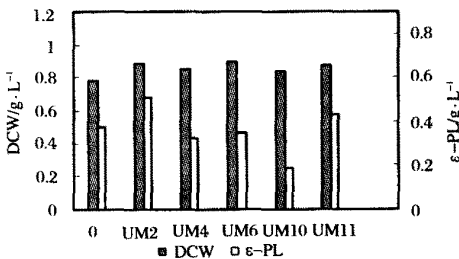


图 2 UV 突变株摇瓶复筛结果

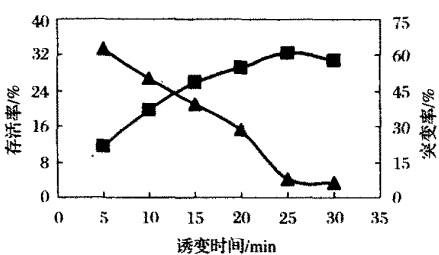


图 3 DES 最佳诱变时间的确定

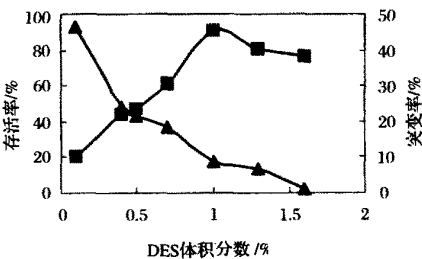


图 4 DES 诱变最佳浓度的确定

表 4 DES 突变株初筛结果

突变株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	UM2
H/C	3.09	2.65	2.97	2.66	3.15	2.68	1.73	1.58	2.45	1.69	1.80

2.4.3 DES 突变株复筛

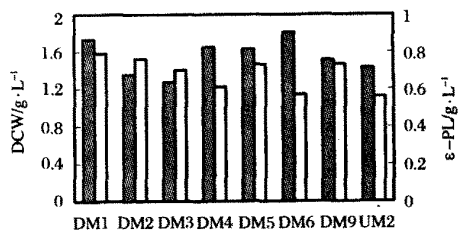


图 5 DES 突变株摇瓶复筛结果

图 5 表明,DM1 的  $\epsilon$ -PL 产量最高为 0.79 g/L,比 DM2 菌株产量高,其他突变株的  $\epsilon$ -PL 产量也均有不同幅度的提高。与紫外诱变相比,DES 的正向突变率相对高。

2.5 突变菌株遗传稳定性试验

白色链霉菌经 UV 和 DES 诱变筛选得到一株产量明显提高的变异株。为验证突变株稳

定性,须经数代继传来测定其产酸能力及其他指标是否发生波动。表 6 表明,突变株 DM1 继代 5 次后, $\epsilon$ -PL 产量的平均值为 0.786 g/L,偏

表 6 DM1 菌株的遗传性状稳定性实验

传代次数	1	2	3	4	5
$\epsilon$ -PL 含量/g·L <sup>-1</sup>	0.82	0.76	0.79	0.80	0.76
生物量/g·L <sup>-1</sup>	1.70	1.62	1.64	1.71	1.65
pH	3.25	3.26	3.26	3.25	3.25
残糖 /%	3.53	3.60	3.58	3.52	3.63

差范围为  $\pm 3\%$ 。其他参数如生物量、pH、残糖均稳定,上述结果证明 DM1 的遗传性状稳定。

参 考 文 献

1 石 功.国外防腐剂市场新动向[N].中国食品报, 2002 年 8 月 7 日,B2  
2 Shoji Shima. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -PL[J]. Journal of Antibiotics, 1984,37:1449~1455  
3 Prihardi kahar, Joshiharuk iwata. Enhancement of  $\epsilon$ -

- PL production by *Streptomyces albulus* Strain 410 using pH Control[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(2): 190~194
- 4 徐红华,王英东,赵新淮. 多聚赖氨酸在食品抑菌方面的研究进展[J]. 粮油食品科技, 1999, 7: 33~34
- 5 Ckenzie. Comparative gene transfer efficiency of low molecular weight polylysine DNA-condensing peptides [J]. Journal of Peptide Research, 1999, 54(4): 311~318
- 6 Nussinovitch-A, Gershon-Z, Nussinovitch-M. Liquid-core hydrocolloid capsules [J]. Food Hydrocolloids, 1996, 10(1): 21~26
- 7 Itzhaki R F. Colorimetric method for estimating polylysine and poly-arginine[J]. Anal Biochem, 1972, 50, 569~574

## The Selection and Breeding of $\epsilon$ -Polylysine High-producing Strain

Jia Shiru Dong Huijun Jiang Junyun Liu Weicheng

(Laboratory of Biochemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300222)

**ABSTRACT** Base on the antimicrobial activity of  $\epsilon$ -polylysine produced by *Streptomyces albulus* and traditional mutagenic theory, the screening method of inhibitive circle and resistant mutant were used to screen the mutant. *Bacillud subtilis* was chosen as sensitive microbial through experiment. After optimizing experiment conditions, the mutant whose productivity of  $\epsilon$ -polylysine and genetic sign were 0.79g/L and AEC<sup>+</sup> + Gly<sup>+</sup> was acquired by treating with UV and DES respectively. The mutant's genetic attributes were stable through five generation cultivation.

**Key words**  $\epsilon$ -polylysine, *Streptomyces albulus*, mutagenic breeding

信息窗

### 天然营养多功能食品添加剂新品种

1. 日本 Sanwa 玉米淀粉公司推出了高纯结晶 L-阿拉伯糖,已被厚生省批准用于调节配料。L-阿拉伯糖在体内能抑制内蔗糖酶的活性,控制血糖值的上升。多年来阿拉伯糖是我国木糖生产中的副产品,含在母液中,一直未找到合适用途,只能作为低价值的焦糖色的原料。

2. 日本 Cogins 推出:(1)大量存在于坚果、植物油及松脂油中的植物甾醇(phytosterol)及酯、植物甾烷醇(phytostanol)及酯,它们具有降低胆固醇和预防心血管疾病的功能。美国 FDA 发布的健康公告称:“植物甾醇(phytosterol)及酯、植物甾烷醇(phytostanol)及酯,能通过降低血中胆固醇水平而有助于减少冠心病的危险。每天从膳食摄取 1.3g 植物甾醇或 3.4g 植物甾烷醇,能达到明显降低胆固醇的作用”。(2)脂肪是食物 3 大营养组成之一,一般情况下,常用油脂为长链(22~22 碳)的三酸甘油酯。进入胃肠,首先要通过胰脂酶水解,转化成二酸甘油酯、一酸甘油酯、甘油和游离脂肪酸。才能在肠内粘膜细胞表面被吸收。而中碳链(十二碳以下)的三酸甘油酯,无需经过脂酶水解及胆盐乳化,即可直接被十二指肠道细胞分解成脂肪酸和甘油。由此可见,中链脂肪酸酯,对于胰酶低下和胆汁酸低下者,能迅速提供能量,缓解老年人脂肪消化不良。可应用于病后调理食品、老年食品、运动员食品等领域。(3)金盏花(marigold)提取物,主要含有叶黄素(lutein)。自然界叶黄素存在于绿色蔬菜和人体的血浆和眼球中。它不仅具有和类胡萝卜素相似的抗氧化活性,而且对视网膜色素斑退化引起的视力下降和失明有明显的保护作用。美、欧等国以金盏花为原料提取叶黄素,美国 Kernin 公司推出了以猕猴桃汁为基料,添加叶黄素的护眼饮料,命名为“超视力饮料”。

3. 美国 Food Ingredient Solutions 推出  $\beta$ -胡萝卜素迷迭香提取物、植物多酚、番茄红素、虾青素(astaxanthin)。番茄红素和虾青素均属于类胡萝卜素,是类胡萝卜素中消除自由基、抗氧化活性最高的品种。番茄红素的抗氧化活性是 V<sub>E</sub> 的 100 倍,虾青素是 V<sub>E</sub> 的 80 倍。高活力清除自由基的抗氧化剂,能预防对低密度脂蛋白的氧化,预防细胞的老化。国内外通常将其应用于开发抗衰老和养颜的功能食品。