

一株产聚谷氨酸芽孢杆菌的分离与鉴定

惠明 马晓娜 贾洁 牛天贵

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 从超高压灭菌的瓜汁中筛选出 1 株产高分子聚合物的芽孢杆菌 B₅₃。经紫外扫描、高效液相色谱分析及 SDS-PAGE 分子量表征,确定该高分子是由谷氨酸单一成分组成的聚合物,最大吸收波长为 212 nm,分子质量集中在 570~669 ku,呈多分子质量聚集体形式,不具备典型肽或蛋白质特征。依据 B₅₃ 的菌株形态、生理生化特征、G+C 含量(摩尔分数)及 16S rRNA 基因序列分析结果,将芽孢杆菌 B₅₃ 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。

关键词 芽孢杆菌;聚-谷氨酸;分离;鉴定

中图分类号 Q 939

文章编号 1007-4333(2005)01-0006-04

文献标识码 A

Isolation and identification of a *Bacillus* sp. producing poly(γ -glutamic acid)

Hui Ming, Ma Xiaona, Jia Jie, Niu Tianguai

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract A *Bacillus* strain isolated from cantaloupe juice treated by superhigh-pressure sterile was shown to produce a high molecular polymer. The purified polymer, was a homopolymer of glutamic acid and had an absorption peak at 212 nm. The molecular mass was 570 - 669 ku detected by SDS-PAGE electrophoresis and had no typical structure of protein. With the following identifications of colony morphology, physiological and biochemistry experiments, G + C content and 16S rRNA gene sequence as well, the strain was identified as *B. subtilis*.

Key words *Bacillus* sp.; poly- γ -glutamic acid; isolation; identification

聚谷氨酸(γ -PGA)主要是一些芽孢杆菌产生的一种胞外氨基酸聚合物。1937 年 Ivanovic 等发现炭疽芽孢杆菌的荚膜物质的主要成分是 D-谷氨酸的聚合物^[1]。1942 年 Bovarnick 等首次发现枯草芽孢杆菌能够产生聚- γ -谷氨酸^[2],以后进一步发现短小芽孢杆菌及地衣芽孢杆菌等也能产生聚- γ -谷氨酸。由于聚谷氨酸是一种水溶性可生物降解的高分子生物材料,可作为药物载体、增稠剂和保湿剂应用于医药、食品和化妆品的生产,还可作为保水剂(抗旱)及水果、蔬菜的防冻剂,以及作为废水处理所需的生物絮凝剂及重金属螯合剂,等等,应用非常广泛^[3-5];但由于生产成本较高,至今在世界范围内未有工业化大规模生产。目前国外用于研究聚谷氨

酸生产的典型菌株主要有 *Bacillus licheniformis* A TCC9945a(从土壤中分离得到)^[6]和 *B. subtilis* IFO3335(从豆制品中分离得到)^[7]等,我国有学者从国外购得菌种进行研究^[8,9],但未见分离筛选聚谷氨酸产生菌的报道。本研究旨在分离和鉴定本菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 分离样品。超高压灭菌瓜汁(500 MPa, 20 min)、豆豉、酱豆、腐乳、腊肉、奶酪、中草药等。

2) 培养基。

a. 筛选固体培养基(LB):胰蛋白胨 10 g/L,酵

收稿日期:2004-11-03

作者简介:惠明,博士研究生;牛天贵,教授,通讯作者,主要从事微生物资源发掘及发酵工程方面的研究,E-mail:niutiangui@163.com

母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.0。

b. 种子培养基:在筛选培养基中添加 1 g/L 的葡萄糖,不加琼脂。

c. 发酵培养基^[10]:柠檬酸 12 g/L, 谷氨酸 20 g/L, 甘油 80 g/L, 氯化铵 7 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.15 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/L, pH 7.4。

1.2 筛选方法

将分离样品加适量无菌水稀释或浸泡 30 min, 然后煮沸 5 min, 经适当稀释涂布 LB 平板, 37 °C 培养 24 h。选择表面光滑呈黏液状的单菌落, 经平板划线分纯后保存于 LB 斜面。分别接种发酵培养基 (300 mL 摇瓶装液量 50 mL), 37 °C 200 r/min 条件下振荡培养 96 h, 发酵液经离心除菌 (4 °C, 12 000 r/min, 20 min) 用 SNB-1 型数字式黏度计测表观黏度, 选择表观黏度较大的 8 株菌作为复筛菌种。

1.3 目的产物的提取

复筛菌株的发酵液经离心除菌后, 取上清液, 加入 4 倍于上清液体积的乙醇, 搅动后于 6 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀物。沉淀物用适量去离子水溶解, 加入 4 倍于其体积的乙醇沉淀, 此沉淀物用 pH 6.98 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液溶解后, 加入 5 倍于其体积、预冷的丙酮, 6 000 r/min 离心 20 min。将沉淀物倒入截留分子量 8~12 ku 的透析袋透析 40 min, 换水 2~3 次, 冷冻干燥得检测样品。

1.4 产物成分分析

1) 紫外扫描光谱分析。将提纯产物 0.02 g 溶于 10 mL 蒸馏水, 在 200~600 nm 扫描 (TECHCOMP UV 7500), 检验产物最大吸收波长。

2) HPLC 分析。

a. 酸水解。取样品 0.2 g 放入水解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl, 抽真空, 维持 10 min 后封口, 110 °C 水解 24 h, 冷却后移至 100 mL 容量瓶中, 用超纯水洗涤 3 次, 定容, 过滤后取滤液分析氨基酸含量。

b. 色谱条件。固定相: Lichro CART superpher CH-8, 粒径 4 μm, 250 mm × 4 mm ID (Merk Darmastand, F. R. G)。流动相: A 液中 V(乙腈) : V(醋酸钠缓冲液) = 20 : 80, B 液中 V(乙腈) : V(醋酸钠缓冲液) = 70 : 30, 其中乙腈为色谱纯, 醋酸钠缓冲液 0.05 mol/L, pH 4.2; A 液和 B 液中各加入 3 滴三乙胺。荧光检测器: 激发光波长 $\lambda_{\text{EX}} = 260 \text{ nm}$, 发射光

波长 $\lambda_{\text{EM}} = 310 \text{ nm}$ 。

c. 柱前衍生。吸取 1 mL 消化液或标准液, 于 25 mL 磨口烧瓶中 60 °C 蒸干, 加 1 mL 超纯水重复 2 次, 加入 2 mL 内标溶液 (牛磺酸)。在 10 mL 试管中依次加入 0.4 mL 硼酸钠缓冲液 (0.5 mol/L, pH 7.7), 0.1 mL 标准或样本溶液和 0.6 mL FMOIC (fluorenyl methylchloroformate) 溶液 (155 mg FMOIC 溶于 40 mL 丙酮, 冰箱保存), 摇动 40 s 后加入 2 mL 正戊烷 (HPLC 级), 提取过量的 FMOIC, 重复 3 次。吸取衍生后的样品液 0.1 mL 加入 1.0 mL 洗脱液 A 进行稀释, 然后进样 20 μL。

3) 用 SDS-PAGE 电泳法测定聚谷氨酸的分子量。采用分离胶 10% (m(胶) : m(水), 下同), 堆积胶 5%, 电泳条件为操作电压 80 V, 稳压 3 h, 标准蛋白质用考马斯亮蓝 R250 染色, PGA 用阿利新兰 8GX 染色。其他参照文献[11]进行。

1.5 菌株的生理生化鉴定

菌体形态特征和生理生化特征测定参照文献[12]进行。

1.6 遗传特性鉴定

1) G+C 含量 (摩尔分数) 的测定。

采用 PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer 测定, 模式株: *Escherichia coli* K₁₂ (熔点温度 $T_m = 75$ °C), DNA 提取方法参考文献[13]。

2) 16S rRNA 基因序列的测定。

a. 细菌菌株基因组 DNA 的提取。使用赛百盛公司的基因组 DNA 提纯试剂盒提取。

b. 16S rRNA 基因序列的 PCR 反应。以细菌基因组 DNA 为模板, 选择细菌 16S rRNA 基因特异性引物, 使用赛百盛公司的 PCR 相关试剂, 根据产品说明设置反应体系和反应条件。PCR 仪为 PerkinElmer 公司的 PTC100 型。引物: 27f: 5'-GAGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 530f: 5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3'; 1541r: 5'-AAGGAGGTGA TCCA GCCGCA-3'。

使用 QIAGEN 公司的切胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。

c. 16S rRNA 基因序列测定: 采用 ABI 公司 3730XL 型 DNA 测序仪。

2 结果与讨论

2.1 聚谷氨酸产生菌的筛选

从超高压灭菌处理和辐照处理的哈密瓜汁、中

国传统豆制品(干豆豉、豆瓣酱、腐乳、酱豆、辣豆等)、法国奶酪、香肠、腊肉、蟹酥、酱菜、中草药等34个样品中分离出131株产芽孢杆菌,经平板初筛和摇瓶发酵初步确定8株目标菌株。

提取8株目标菌株的摇瓶发酵产物,进行紫外扫描,发现B₅₃菌株的发酵产物最大吸收波长为212 nm,并且只有1个峰(图1),与聚谷氨酸的典型紫外吸收波长非常接近(214 nm),于是确定B₅₃菌株为下一步研究的出发菌株。该物质在260~280 nm没有吸收峰,表明其没有典型的肽链结构。

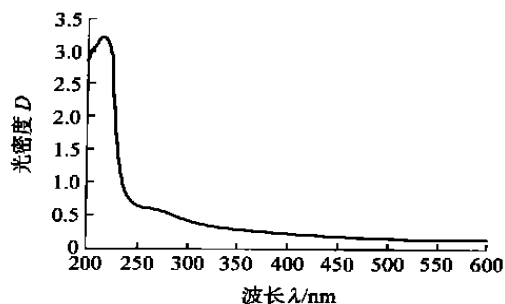


图1 B₅₃菌株发酵产物的紫外扫描光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of the polymer

2.2 B₅₃菌株发酵产物的成分分析

对B₅₃纯化产物常规盐酸水解后,再经处理进行液相色谱分析(图2)。其中左侧第1个峰为内标物即牛磺酸(出峰时间5.74 min);第3个为溶剂峰即FMOC(出峰时间27.26 min),可见此聚合物的水解产物只含有1种氨基酸;第2个峰(出峰时间9.74 min)与谷氨酸的出峰时间相同,推断此水解物为谷氨酸。

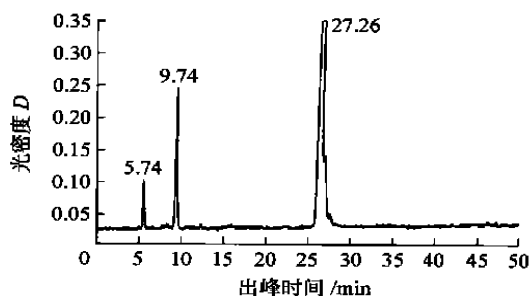
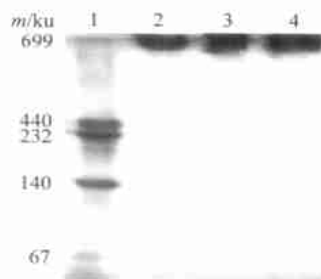


图2 高效液相色谱分析

Fig. 2 HPLC analysis of the polymer

采用SDS-PAGE变性电泳检测到B₅₃产生的聚谷氨酸的分子质量570~669 ku,呈多分子质量分子聚集形式,并非由单一分子质量组成(图3)。



1号泳道为高分子质量标准蛋白质;2,3和4号为样品重复
图3 SDS-PAGE电泳图

Fig. 3 Electrophoresis pattern of SDS-PAGE

2.3 B₅₃菌株的鉴定

2.3.1 形态特征 B₅₃菌株在LB平板上菌落呈圆形,乳白色,表面光滑,菌苔边缘整齐,中间突起。个体较大,细胞形状为杆状,革兰氏阳性,芽孢中生,不膨大。经运动性观察,该菌株具有运动性。

2.3.2 生理生化特征 以 *B. subtilis* CGMCC1.943^T 为参比菌株,对B₅₃菌株进行了部分生理生化特征测定,结果见表1。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》第9版(1994)对芽孢杆菌的阐述,确定B₅₃菌株为芽孢杆菌,命名为 *Bacillus* sp. B₅₃。与模式株相比,生化特性基本一致。

表1 菌株B₅₃生理生化试验结果

Table 1 Results of physiological and biochemistry experiments

项目	<i>Bacillus</i> sp. B ₅₃	<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC1.943 ^T
葡萄糖发酵	+	+
麦芽糖发酵	+	+
棉子糖发酵	+	+
木糖发酵	+	+
乳糖发酵	+	+
甘露醇发酵	+	+
阿拉伯糖发酵	+	+
2% NaCl *	+	+
5% NaCl *	+	+
7% NaCl *	+	+
10% NaCl *	-	+
葡萄糖产气	-	-
厌氧生长	-	-
淀粉水解	+	+
酪朊水解	+	+
硝酸盐还原	+	+
H ₂ O ₂ 酶试验	+	+
卵磷脂酶	+	-
柠檬酸盐试验	+	+
石蕊牛奶还原	+	+
V-P 测定	+	+
明胶液化试验	+	+
x(G+C)/%	43.9	43

注: *为体积分数;“+”为反应阳性,“-”为反应阴性;x(G+C)为摩尔分数。

2.3.3 遗传特征

1) B₅₃ 菌株基因组 DNA G + C 含量的测定。测定得到 B₅₃ 菌株的 m 为 71.5 , 而模式株 Escherichia coli K₁₂ 的 m 为 75 , 所以 B₅₃ 菌株的 G + C 摩尔分数

x(G + C) = 51.2 + 2.08 x(71.5 - 75) = 43.92 %

B. subtilis 的 G + C 摩尔分数为 43 % , 与 B₅₃ 菌株比较接近 , 因此 2 株菌可能同种。

2) B₅₃ 菌株 16S rRNA 序列分析。将得到的 16S rRNA 基因序列送 GenBank 做 Blast 比较 (测定序列的 GenBank accession number 为 AY808064) , 结果见图 4。

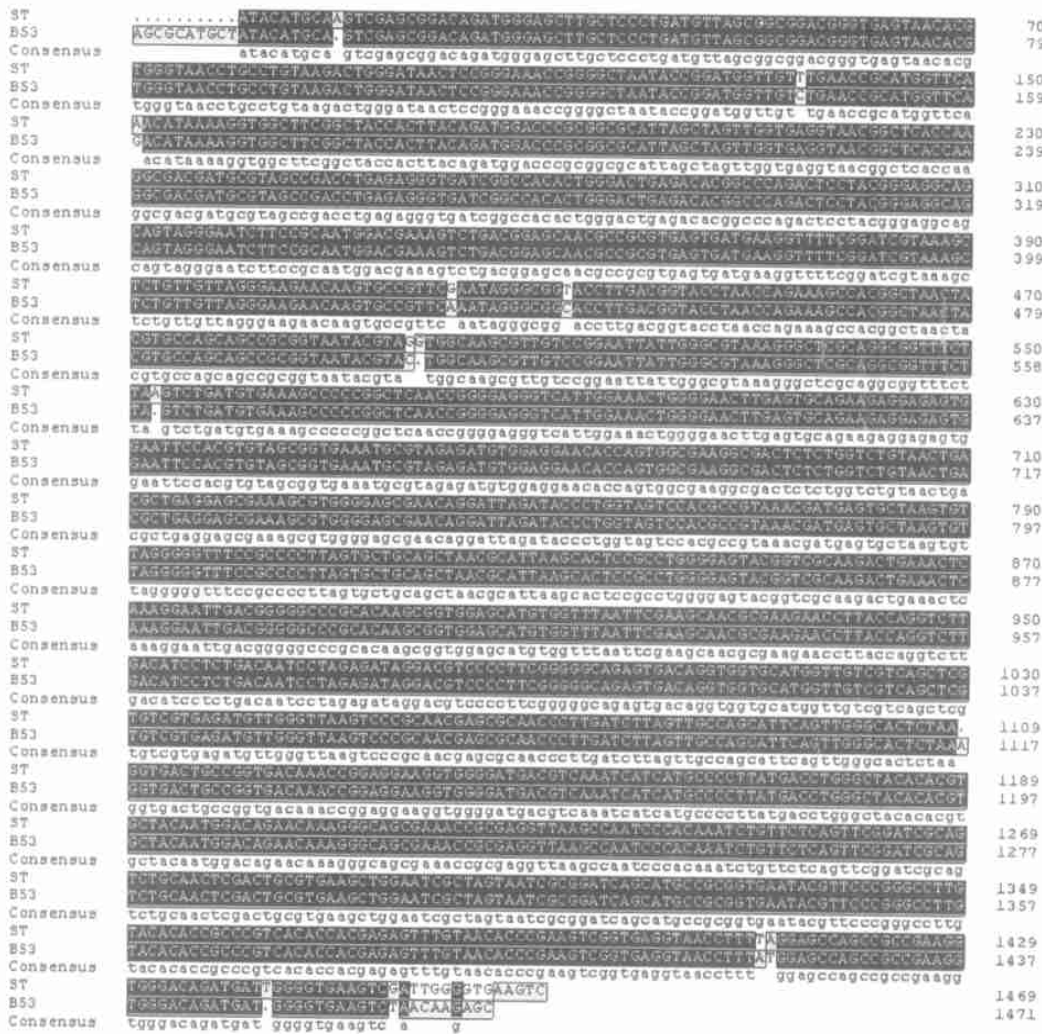


图 4 B₅₃ 菌株与枯草芽孢杆菌 16S rRNA 的基因序列

Fig. 4 Comparison of 16S rRNA gene sequences between B₅₃ and B. subtilis

根据 GenBank 中提供的基因序列 , 同源性的最高的菌株为 B. subtilis (ACCESSION Z99104 AL009126^[14]) , 同源性为 97.6 % , 因此 B₅₃ 菌株鉴定为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌种。因为该菌株是 500 MPa 超高压灭菌瓜汁中残存的典型菌株 , 分类鉴定的结果对解决瓜汁变质和进行安全性评价具有积极意义。

3 结论

从分离得到的 131 株产芽孢细菌中筛选出 1 株高分子聚合物产生菌 B₅₃。采用高效液相色谱及 SDS-PAGE 分析 , 确定 B₅₃ 菌株所产的高分子聚合物为聚谷氨酸 , 其分子质量集中在 570 ~ 669 ku , 呈多分子质量分子聚集体形式 , 最大吸收波长为 212 nm ,

(下转第 63 页)

别为 0.604, 0.576 和 0.540 W/(m·K); 回归方程的计算结果分别为 0.610, 0.580 和 0.534 W/(m·K)。经显著性检测分析, 实际测定结果与计算结果能很好地吻合, 验证了所建立的预测模型的可靠性。

3 结束语

采用微热探针测试装置可方便、快捷地测试果汁的热导率。测试过程中, 被测果汁的温升小, 对试样的物性影响小, 测试结果可较准确地反映果汁的实际状态。通过对同一外界温度(27℃)下不同质量分数苹果汁热导率的测试, 得出了热导率与果汁质量分数的经验关系式, 果汁质量分数 0~70% 时, 热导率随果汁质量分数的增大而呈线性递减趋势, 这一结果可为果汁加工业提供理论参考与测试方法。果汁热导率与外界温度的关系, 将作为下一步的研究。

参 考 文 献

[1] Peacock S. Predicting physical properties of factory juices

and syrups[J]. *Int Sugar*. 1995, 97:571

- [2] Hooper F C, Lopper F R. Transient heat flow apparatus for the measurement of thermal conductivities[J]. *Trans Am Soc Heat Vent Engres*, 1950, 14: 1435 - 1439
- [3] Cheng S X, Jiang Y F, Liang X G. A tiny probe for measuring the thermal conductivities of non-rigid materials[J]. *Meas Sci Technol*. 1994, 5:1339 - 1344
- [4] 张海峰, 程曙霞, 何立群. 微探针法测量低温下生物材料导热系数研究[J]. *仪器仪表学报*, 2004, 25(2): 53 - 56
- [5] 陈则韶, 葛新石, 顾沁. 量热技术和热物性测量[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990:171 - 174
- [6] Christopher M R, Dabir S V, Fuhung H. A Group Contribution Method for the Prediction of Thermal Conductivity of Liquids and Its Application to the Prandtl Number for Vegetable Oils [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1999, 38(11): 4513 - 4519
- [7] 华泽钊, 李里特, 丹阳, 等. 食品冷冻冷藏原理与设备[M]. 北京: 机械工业出版社, 1999:171

(上接第 9 页)

不具备典型肽及蛋白质特征。依据 B₅₃ 的菌株形态、生理生化及遗传特征, 鉴定 B₅₃ 菌株为枯草芽孢杆菌。

参 考 文 献

- [1] Ivánovics G, Erdős L. Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus[J]. *Z Immunitätsforsch*, 1937, 90:5 - 19
- [2] Bovarnick M J. The formation of extracellular D(-) glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis* [J]. *J Biol Chem*, 1942, 145:415 - 424
- [3] 汤谷平. 聚氨基酸材料在药物控释系统中的应用[J]. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18(2): 169 - 172
- [4] 洼田英俊, 南部洋子, 远藤刚. 微生物生产的聚-谷氨酸的性质[J]. *化学与粘合*, 1994, 4:244 - 246
- [5] 游庆红, 张新民, 陈国广, 等. -聚谷氨酸的生物合成及应用[J]. *现代化工*, 2002, 22(12): 56 - 59
- [6] Young H K, Richard A G. Effects of glucose and glycerol on -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1998, 57(4): 430 - 437

- [7] Masao Kunioka, Atsuo Goto. Biosynthesis of poly(-glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO 3335[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 40:867 - 872
- [8] 杨革, 陈坚, 曲音波, 等. 聚-谷氨酸生产菌地衣芽孢杆菌的 He-Ne 激光辐照效应[J]. *激光生物学报*, 2001, 10(4):255 - 260
- [9] 张新民, 游庆红, 徐虹, 等. 生物可降解型聚谷氨酸高吸水树脂的制备[J]. *高分子材料科学与工程*, 2003, 19(2):203 - 205
- [10] Sung Ho Yoon, Jin Hwan Do, Sang Yup Lee. Production of poly(-glutamic acid) by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 585 - 588
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000:76 - 101
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:349 - 412
- [13] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990:82 - 88
- [14] Kunst F, Ogasawara N, Moszer L, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. *Nature*, 1997, 390(6657): 249 - 256