

文章编号: 1673-1689(2010)02-0282-06

ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选方法改进

李树^{1,2}, 陈旭升^{1,2}, 廖莉娟^{1,2}, 张建华^{1,2}, 毛忠贵^{* 1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 改进了 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL) 产生菌的筛选方法。在加有复合抑制剂的初筛平板上涂布土壤悬液, 于 30 °C 培养 7 d 后, 将琼脂整体揭下, 平铺到另一加有美兰的琼脂上。挑取形成透明圈的 137 株菌进行摇瓶发酵, 发酵液与 Dragendorff 试剂和甲基橙反应, 有 50 株呈阳性。通过薄板层析, 确定有 42 株菌的产物含有赖氨酸聚合物。通过水杨醛保护氨基的化学法对产物进行了酰胺键连接方式的研究, 确定了聚赖氨酸是由 ϵ -NH₂ 和 α -COOH 形成的 ϵ -酰氨键聚合而成。通过生理生化特征和分子生物学鉴定, 表明其中的一株菌为链霉菌属中的稠李链霉菌 *Streptomyces padanus*, 其初始菌的摇瓶产量可达 0.8 g/L。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; 筛选; 菌种鉴定; 16s rDNA

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

A Protocol for Screening of ϵ -Polylysine Producing Strains

LI Shu^{1,2}, CHEN Xu-sheng^{1,2}, LIAO Li-juan^{1,2},

ZHANG Jian-hua^{1,2}, MAO Zhong-gui^{* 1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A novel ϵ -polylysine produce strain screen protocol was developed in this study based on the chemical characteristics of ϵ -polylysine. Through this three-steps protocol, 42 strains has been identified as lysine polymer producer, then those polymer structure were analyzed by chemical method, by which confirms that the polymer is linked by ϵ -NH₂ and α -COOH. Among of them, one strain, 0.8 g/L ϵ -polylysine was found in fermentation broth, was identified as *Streptomyces padanus* by the combination results of physiological and biochemical characteristics, and 16s rDNA sequence.

Key words: ϵ -polylysine, screening, strain identification, 16s rDNA

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL) 是一种水溶性强、抑菌谱广、可以食用并且对人体无任何毒副作用的新型生

物防腐剂, 它由单一的 L-赖氨酸通过 α -COOH 和 ϵ -NH₂ 形成的 ϵ -型酰氨键聚合而成, 在人体内可分解

收稿日期: 2009-04-01

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020301)。

* 通信作者: 毛忠贵 (1954-), 男, 江苏溧水人, 教授, 博士生导师, 主要从事清洁生产、功能性物质开发及纤维资

源高值转化方面的研究。Email: maozg@vip.163.com。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为L-赖氨酸,作为人体必需氨基酸被吸收,不存在任何毒副作用^[1-2]。1989年日本窒素公司首先用生物技术方法工业生产 ϵ -PL,并获日本厚生省批准使用,以后韩国也允许作为食品添加剂使用。2003年10月,美国FDA正式批准 ϵ -PL可以作为天然食品添加剂,即美国也开始使用 ϵ -PL。有报道称将 ϵ -PL与其它防腐剂如山梨酸钾复合使用则效果更佳^[3]。除此以外,它还可以作为生物材料广泛应用于药物载体和基因芯片等领域^[4]。因此, ϵ -PL在近年来引起了学者们的广泛关注。

ϵ -PL在国外尤其是日本研究较成熟且应用广泛,而在我国正处于研发阶段中,尚未见工业化生产报道。目前,国内有关 ϵ -PL的研究领域走在前列的是天津科技大学^[5]和南京工业大学^[6],他们通过菌种选育和发酵条件的优化,使 ϵ -PL实验室水平达到20~30 g/L,但与日本窒素公司48.3 g/L的工业化水平相比还有较大差距。

研究 ϵ -PL原始产生菌的筛选方法,获得高产出发菌是通向产业化的重要途径。2002年,Masanobu Nishikawa^[7]通过在培养基中加入一种染料PolyR-478,使聚赖氨酸产生菌的周围产生颜色变化,据此形成了大通量筛选方法。其研究表明,聚赖氨酸基本上是由链霉菌科的一些菌株产生的,少数麦角真菌也能产生。2005年,南京工业大学朱宏阳等^[10]对赖氨酸产生菌进行了筛选,他们在初筛培养基中加入了美兰,并利用检测生物碱的Dragendorff试剂检测,从而使筛选的特异性大为提高,并且筛选到了一株北里孢菌。江南大学的张超采用这种方法,在2006年也筛选到了一株白色链霉菌^[9]。2007华南农业大学的段杉等用喷洒美兰的方法代替了往培养基中添加美兰,并设计了一种转移装置将琼脂块中成分转移浓缩到滤纸上,简化了显色和检测方法,筛得了一株灰橙链霉菌^[11]。

在上述研究的基础上,作者对段杉的筛选方法做了改进,实现了聚赖氨酸产生菌更灵敏的筛选方法;结合形态观察和生理生化培养实验,对其中一株潜在高产菌进行16S rDNA基因序列分析,鉴定为稠李链霉菌(*Streptomyces padanus*),这一结果尚未见报道。经摇瓶试验,稠李链霉菌发酵产量达0.8 g/L。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样 采自山东、山西、江苏、内蒙古等地,以林地和荒草地为主。除去表层土,取距表层5~

15 cm的土壤50 g左右,装入已灭菌的牛皮纸袋中。

1.1.2 培养基

1) 初筛培养基:甘油10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.66 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, NaCl 0.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, 酵母膏0.1 g, 抑菌剂(重铬酸钾30 mg, 氟哌酸3 mg, 青霉素2 mg, 制霉菌素80 mg), 琼脂条20 g, 纯净水1 000 mL, pH 7.2。

2) 复筛培养基:葡萄糖50.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0 g, 酵母膏5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, K_2HPO_4 0.8 g, KH_2PO_4 1.4 g, 水1 000 mL, pH 6.8。

1.2 实验方法

1.2.1 初筛方法 将稀释后的土壤悬液涂布于初筛平板上,30℃恒温培养7 d。将长有菌落的琼脂整块揭下来,平铺到另一个加有美兰的琼脂平板上,其中美兰质量浓度为0.003 g/dL。将两层琼脂于30℃放置2 h,观察是否有透明圈形成。保留有透明圈形成的菌落进一步复筛。

1.2.2 复筛方法 菌落接种于复筛培养基,于30℃摇床培养,200 r/min离心72 h。离心去除菌体,取上清液分别与Dragendorff试剂和1 mmol/L的甲基橙溶液混合,两者都有砖红色沉淀生成的为阳性。从发酵液中提取产物,用6 mol/L的盐酸水解,与赖氨酸作对照进行层析。

1.2.3 ϵ -聚赖氨酸的定量测定 见文献[11]。

1.2.4 ϵ -聚赖氨酸的提取 发酵液过滤除菌体后,滤液用NaOH调至pH 8.5,再过滤除去沉淀,滤液用阳离子(H^+)交换树脂(Amberlite IRC-50)吸附,分别用0.2 mol/L醋酸和0.1 mol/L盐酸进行冲洗和洗脱,洗脱液用NaOH中和至pH 6.5,再进行减压蒸发浓缩,浓缩液用活性炭脱色后,加入乙醇和乙醚(2:1)混合液,过滤后得到的沉淀物即为 ϵ -聚赖氨酸粗品。将提取到的 ϵ -聚赖氨酸粗品溶解在蒸馏水中,然后经G-25凝胶柱纯化,冻干后得到固体样品^[6]。

1.2.5 ϵ -聚赖氨酸的聚合方式鉴定 由于赖氨酸有 $\alpha\text{-NH}_2$ 和 $\epsilon\text{-NH}_2$ 两个氨基,理论上可形成 α -PL和 ϵ -PL两种形式的聚赖氨酸,所以需鉴定酰胺键的连接方式。准确称取 ϵ -PL标准品和样品1.5 g,吸取2.3 mL水杨醛,分别加入装有20 mL无水乙醇的圆底烧瓶中,加热回流2 h。反应完毕后,过滤所得的沉淀,烘干,置于无水乙醇中,添加4 g NaBH_4 还原,待反应完全后,加入蒸馏水,回收沉

淀,烘干,加入 6 mol/L HCl,密封,于 121 ℃ 水解 24 h,用薄层层析分析组成成分。

1.2.6 菌株鉴定

- 1) 形态与培养特征鉴定方法: 参考文献[13]。
- 2) 生理生化特征鉴定方法: 参考文献[14]。
- 3) 16S rDNA 分子生物学鉴定: 取待鉴定菌株的纯培养物,提取 DNA,由上海生工生物工程技术服务公司进行 PCR 扩增及 16S rDNA 的测序,将得到的碱基序列在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索,找出与待鉴定菌株同源性最高的模式菌株^[15]。

2 结果与讨论

2.1 初筛

2.1.1 初筛培养基中抑制剂的确定 相对于真菌和细菌来说,放线菌生长缓慢,为有效分离放线菌,需要抑制平板上细菌和真菌的生长。根据文献报道,使用重铬酸钾可以有效抑制细菌和霉菌的生长,并且在一定程度上还能促进放线菌的生长。本研究中单独使用重铬酸钾的效果并不好,难以满足分离放线菌的要求,于是试验了抑制剂青霉素、氟哌酸、制霉素、重铬酸钾的抑制效果^[11],最终确定在初筛培养基中复合添加氟哌酸 3 mg/L,青霉素 2 mg/L,制霉素 80 mg/L,重铬酸钾 30 mg/L。采用这种组合,平板培养 7 d 内,几乎没有细菌和霉菌生长,并且放线菌的菌落数和菌落大小基本不受影响,见图 1。

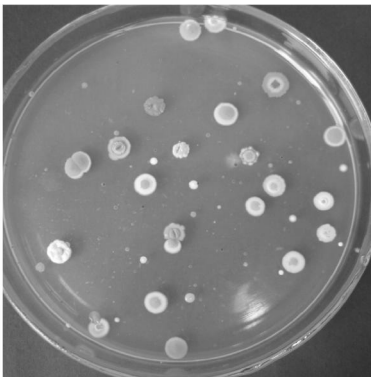


图 1 放线菌在复合抑制剂平板上的形态
Fig.1 Colony morphology on petri dish added inhibitors of Actinomyces

2.1.2 平板初筛 将生长有菌落的琼脂平铺到美兰琼脂上后,上层琼脂中的产物就会扩散到下层,由于美蓝带有正电荷,与同样带正电荷的碱性物质(包括 ε 聚赖氨酸)发生静电排斥作用,在菌落的周

围形成透明圈,见图 2。初筛中共发现 137 株产正电荷物质的放线菌。

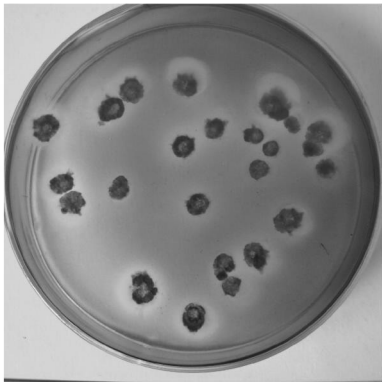
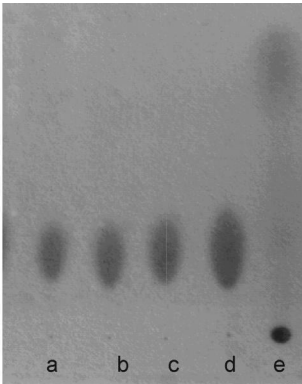


图 2 产正电荷物质的菌落排斥美兰形成透明圈
Fig.2 Special zoon formed by the electrostatic polymer producing strains

2.2 复筛

将 137 株产生透明圈的放线菌接种到复筛培养基中,发酵结束后离心除去菌体,取上清液分别与 Dragendorff 试剂和 1 mmol/L 的甲基橙溶液混合。由于 ε 聚赖氨酸呈现生物碱的性质,能与 Dragendorff 试剂反应生成砖红色沉淀;聚赖氨酸的氨基阳离子能与甲基橙的磺酸基阴离子形成离子对,在 pH 3~ 10 范围内形成复合物沉淀。研究中共有 50 株菌的发酵液符合以上两种特性。

选取有潜在高产能力的 3 株菌的发酵液按照 1.2.4 的方法提取产物,再用 6 mol/L 盐酸水解后与赖氨酸对照层析,结果见图 3。发酵液的提取产物 e 停留在原点,通过与茚三酮显色而呈现氨基酸的性质;而 3 种提取产物 a, b 和 c 的水解物在赖氨酸 d 相应的位置分别有条带,这表明这些提取产物中均有赖氨酸聚合物的存在。



(e 为提取产物; d 为赖氨酸标样带; a, b, c 分别为 3 种提取产物的水解物)
图 3 薄板层析的条带图谱

Fig.3 Strips on Chromatography plate

2.3 赖氨酸单体连接方式的鉴定

通过 ϵ 酰胺键连接成的 ϵ 聚赖氨酸分子式见图 4。

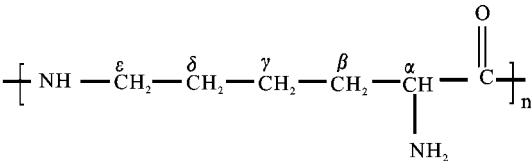
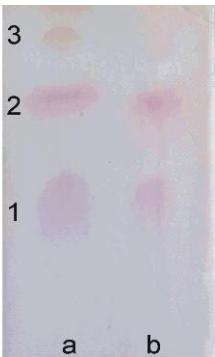


图 4 ϵ 聚赖氨酸的分子结构

Fig. 4 The molecular structure of ϵ PL

水杨醛保护 ϵ PL 中游离的 NH_2 , 经 NaBH_4 还原后再水解得到两种保护的赖氨酸, 即 N^α -邻羟基苯甲基赖氨酸(图 5 中以 3 代表)和 N^α , N^ϵ -二邻羟基苯甲基赖氨酸(图 5 中以 2 代表)。由于第一步反应是可逆反应, 反应体系中残留部分 ϵ PL, 再进一步水解成赖氨酸(图 5 中以 1 代表)。若样品为 α -PL, 用上述方法将生成 1、3 和 N^ϵ -邻羟基苯甲基赖氨酸(图 5 中以 4 代表), 而 2 与 4 的 R_f 值是不同的, 据此来判断酰胺键的连接方式。在图 5 中, 样品的层析条带中 2 与标准品的 2 有相同的 R_f 值, 说明样品为 ϵ PL。

通过化学法合成的聚赖氨酸一般为 α 型, 而微生物合成的聚赖氨酸大多为 ϵ 型, 至今尚未有化学法合成 ϵ PL 的报道。



a 为用水杨醛保护的 ϵ PL 标准品水解样, b 为用水杨醛保护的样品水解样; 1 为赖氨酸, 2 为 N^α , N^ϵ -二邻羟基苯甲基赖氨酸, 3 为 N^ϵ -邻羟基苯甲基赖氨酸。

图 5 样品酰胺键连接方式的测定结果

Fig. 5 The structure of poly-L-lysine produced by actinomycetes

2.4 菌株的鉴定

在筛选获得的诸多菌株中, 编号 L5 的初步摇瓶产量最高, 达到 0.8 g/L 左右。

2.4.1 形态与培养特征 菌株 L5 在无机盐淀粉琼脂培养基上生长良好, 孢子丝在油镜下观察呈波曲状或松柔旋, 电镜下孢子圆形至椭圆形, 大小差别较大, 其培养特征见表 1。与白色链霉菌^[9]、北里

孢菌^[10]、灰橙链霉菌^[11]相比具有较大差异。

表 1 L5 菌株的培养特征

Tab. 1 Morphological characteristics of L5 on petri dishes			
培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
高氏一号	白色变灰色, 生长较差	淡黄色	无
葡萄糖-天门冬素	白色变灰色, 生长良好, 致密	白色	无
甘油-天门冬素	白色, 生长良好, 致密	白色	无
察氏淀粉琼脂	白色变灰色, 生长较差	白色	无
无机盐淀粉琼脂	白色变灰色, 生长良好, 致密	淡黄色	无
明胶琼脂	白色, 生长中度	白色	无
贝特纳琼脂	白色变灰色, 生长良好	淡黄色	无

2.4.2 生理生化特征 L5 可以以多种物质为唯一碳源生长, 如葡萄糖、蔗糖、甘油、半乳糖、果糖、甘露醇、麦芽糖、糊精、山梨醇等, 不利用棉籽糖, 木糖与肌醇利用可疑。能快速液化明胶、水解淀粉、使牛乳凝固且胨化, 稍微利用纤维素, 不产生 H_2S , 不产生几丁质酶, 不产生黑色素。

综合菌株 L5 的培养特征与生理生化特性, 对照《伯杰氏细菌系统鉴定手册》, 初步确定 L5 属于链霉菌属, 并且与多个种之间有较相近的表型。这几个种为: 稠李链霉菌 *Streptomyces padenus*、微白链霉菌 *Streptomyces albidus*、生白链霉菌 *Streptomyces albofaciens*、白浅灰链霉菌 *Streptomyces albobogriseolus*。

2.4.3 16S rDNA 分子鉴定 为了进一步对 L5 的种属进行鉴定, 将提取出 L5 菌株的 DNA, 进行了 PCR 扩增及 16S rDNA 测序实验, 最终获得了该菌株的碱基序列, 见图 6。通过将碱基序列与 GenBank 数据库中相关同源序列进行对照, 确定与 L5 菌株同源性最高的模式菌株。16S rDNA 长度 1 478 bp, 其序列见图 6。

用 DNAMAN 软件将菌株 L5 的 16S rDNA 碱基序列分别与稠李链霉菌、微白链霉菌、生白链霉菌、白浅灰链霉菌的 16S rDNA 碱基序列进行比对, 计算其同源性。结果表明: 菌株 L5 与白浅灰链霉菌 *Streptomyces albobogriseolus* 的同源性为 92.4%, 与生白链霉菌 *Streptomyces albofaciens* 同源性为 93.3%, 与微白链霉菌 *Streptomyces albidus* 同源性为 96.6%, 与稠李链霉菌 *Streptomyces padenus*

的同源性为 99.8%。由此可以基本确定菌株 L5 的分类地位,即:菌株 L5 属于链霉菌属,并且与稠李

链霉菌具有极高的同源性,所以初步确定 L5 为稠李链霉菌。

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC
GATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG
CCTTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCATCTTG
GGCGTCTTGATGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC GCGGC CTATCAGCT
TGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGA
CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGA
AGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCTCG
GGGCTTAACCCGAGTCTGCAGTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATC
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA
GGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCC
ACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTA
ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAG
ATAGTGCCCCCCTTGTTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGG
CCCTTGTTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG
GGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCC
GGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTT
CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA
GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCAAGG
TGGGACCAGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAG

图 6 L5 菌株 16s rDNA 的碱基序列
Fig. 6 The 16S rDNA sequence of strain L5

3 结 语

根据文献[16]报道,重铬酸钾对真菌和细菌都有很显著的抑制作用,而且在一定程度上还有促进放线菌的生长作用。但是实验发现,重铬酸钾对细菌、霉菌、放线菌有几乎同等程度的抑制作用,不能满足筛菌的需求^[17]。参考段杉等人的研究方法,采用了抗生素等复合抑制剂,达到了满意的效果。但采用段杉的喷洒美兰方法,那么本来相对失水的琼脂会快速吸水,美兰吸附在琼脂表面,由于亲和力较大而不易被排斥;若喷洒量过大,则溶液会在琼脂表面流动,这样就有可能使相邻几株菌的产物混溶在一起,产物被稀释也不易形成透明圈,而且喷

洒美兰会对实验环境造成污染,平板也不易洗干净。作者对聚赖氨酸产生菌的筛选方法做了另一种改进,即把这种喷洒美兰法改成了平铺美兰琼脂法。这样,菌落产生的物质可以扩散到下层排斥美兰产生透明圈,从而避免了上述的问题。方便了检测,段杉等人的研究中首创了一套简易转移装置,可以使琼脂块中的产物转移到分别蘸有 Dragendorff 试剂和茚三酮的滤纸上。但是,微生物在代谢过程中总要不可避免的要利用或合成一些氨基酸类物质,而与茚三酮显色是氨基酸类物质普遍拥有的性质,所以上述的茚三酮滤纸检测缺乏针对性。再者,即使是经过复筛挑选出的菌株也必须经过摇瓶发酵才能进行后续的层析和产量测定。所以,作者直接进行摇瓶发酵一次性进行后续的检测。发

酵液先与 Dragendorff 试剂和 1 mmol/L 的甲基橙进行双重反应, 两者都呈阳性者进行下一步的层析, 同时也测定了聚赖氨酸的质量浓度。因而, 这种方法具有更强的实用性。

采用以上的筛选方法, 作者所在实验室在较短的时间内筛得了包括稠李链霉菌在内共 42 株 ϵ PL 产生菌, 证明了该筛选方法的灵敏性和实用性, 而且该法还有较高的重复性, 目前报道的 ϵ PL 产生

菌主要有白色链霉菌、北里孢菌和灰橙链霉菌 3 种, 而稠李链霉菌则未见报道, 其培养特征与生理生化特性与前 3 者也是明显不同的。报道过的几株 ϵ PL 产生菌, 其初始产量一般为 0.2~0.4 g/L, 其中北里孢菌的初始产量最高, 为 0.41 g/L, 而稠李链霉菌的初始产量为 0.8 g/L, 若经过菌种改造和发酵工艺的优化, 其生产潜力应该会得到更大的提升。

参考文献 (References):

- [1] Yoshizawa K, Takahashi K. Utilization of urease for decomposition of urea in sake[J]. **Brew Soc Japan**, 1988, 83(2): 142-144.
- [2] Kakimoto S, Sumino Y. Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1990, 32: 538-543.
- [3] Weatherburn M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. **Anal Chem**, 1967, 39(8): 971-974.
- [4] Shoji Shima, Heiichi Sakai. Polylysine produced by streptomyces[J]. **Agric Biol Chem**, 1977, 41(9): 1807-1809.
- [5] 贾士儒, 董惠均. ϵ -聚赖氨酸高产菌株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 14-17.
JIA Shi-ru, DONG Hui-jun. The selection and breeding of ϵ -polylysine high-producing strain[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2004, 30(11): 14-17. (in Chinese)
- [6] 陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹. ϵ -聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(2): 28-30.
CHEN Wei-wei, ZHU Hong-yang, XU Hong. Breeding of mass-producing ϵ -polylysine mutant and its batch fermentation [J]. **Industrial Microbiology**, 2007, 37(2): 28-30. (in Chinese)
- [7] Masanobu Nishikawa, Kenichi Ogawa. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine in soil polymers microflora determined by a novel method [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(7): 3575-3581.
- [8] 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.
ZHU Hong-yang, XU Hong, WU Qun. Screening and Identification of ϵ -PL producing strain[J]. **Microbiology**, 2005, 32(5): 127-130. (in Chinese)
- [9] 张超, 张东荣, 贺巍, 等. 一种简便的 ϵ -聚赖氨酸生产菌的筛选方法[J]. 山东大学学报, 2006, 44(11): 1104-1107.
ZHANG Chao, ZHANG Dong-rong, HE Wei, et al. A simple and sensitive method for screening ϵ -PL producing strains from soils[J]. **Journal of Shandong University**, 2006, 44(11): 1104-1107. (in Chinese)
- [10] 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.
DUAN Shan, ZHU Wei-shan. Isolating of a ϵ -polylysine-producing strain[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2007 33(8): 14-17. (in Chinese)
- [11] Ruth F Itzhaki. Colorimetric method for estimating poly-lysine and polyarginine [J]. **Analytical Biochemistry**, 1972, 50: 569-574.
- [12] 陈旭升, 李树, 张超, 等. 微生物合成 ϵ -聚赖氨酸的结构鉴定及其抑菌活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(9): 54-57.
- [13] 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.
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌系统鉴定手册(第九版)[M]. 北京: 北京科学出版社, 1984.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] 杨宇容, 徐丽华, 李启任, 等. 放线菌分离方法的研究抑制剂的选择[J]. 微生物学通报, 1995, 22(2): 88-93.
YANG Yu-rong, XU Li-hua, LI Qi-ren, et al. A study on isolation methods of actinomycetes[J]. **Microbiology**, 1995, 22(2): 88-93. (in Chinese)
- [17] 司美茹, 薛泉宏. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制放法研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 61-64.
SI Mei-ru, XUE Quan-hong, LAI Hang-xian. Studies on Selection of the isolation medium for *Actinomycetes* and inhibition methods to miscellaneous microorganism[J]. **Microbiology**, 2004, 31(2): 61-64. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)