

基于抑菌活性的 ϵ -聚赖氨酸的微孔板生物检测法

骆健美^{1,2,3*} 成永新³ 李培君³ 王建锋³ 郑宇^{1,2,3} 王敏^{1,2,3}

(1. 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津 300457)

(2. 天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

(3. 天津科技大学 生物工程学院 天津 300457)

摘要: 基于 ϵ -聚赖氨酸的抑菌活性, 以 96 微孔板为平台, 建立适合大规模样品快速分析的微孔板生物检测法。结果表明, 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)为最敏感指示菌, 当敏感指示菌初始浓度为 10^7 – 10^8 CFU/mL, 培养时间为 4 h 时, ϵ -聚赖氨酸浓度在 100.00–500.00 mg/L 范围内与抑菌率呈较显著的线性关系($R^2=0.997\ 5$)。该方法不仅表现出良好的精密度和准确度, 与 HPLC 和甲基橙法的实验结果对比, 微孔板生物检测法的相对标准偏差(RSD)和相对偏差(RD)分别小于 3.5%和 3.0%, 说明该方法是一种与 HPLC 法有类似分析精度, 但能直接反映样品的抑菌活性, 且更适合大规模样品快速检测的方法, 可用于发酵过程中 ϵ -聚赖氨酸产量的检测和突变株的高通量筛选。

关键词: ϵ -聚赖氨酸, 微孔板, 生物检测, 抑菌活性, 藤黄微球菌

A microplate bioassay to determine ϵ -polylysine based on antimicrobial activity

LUO Jian-Mei^{1,2,3*} CHENG Yong-Xin³ LI Pei-Jun³ WANG Jian-Feng³
ZHENG-Yu^{1,2,3} WANG Min^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

(3. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Based on the antimicrobial activity of ϵ -polylysine, a 96-well microplate bioassay was established to rapidly determine large numbers of ϵ -polylysine samples. The results showed that a high correlation coefficient ($R^2=0.997\ 5$) was obtained for linear regression in the ϵ -polylysine concentration range of 100.00–500.00 mg/L with 10^7 – 10^8 CFU/mL indicator strain (*Micrococcus luteus*) and the incubation time of 4 h. Using these parameters, the microplate bioassay has showed good precision and accuracy, and the relative standard derivation (RSD) and relative derivation (RD) were lower than 3.5% and 3.0% respectively. Compared with the results by Itzhaki method and HPLC assay, the microplate

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划项目(No. 20080603); 国际科学基金项目(No. F/4239-1)

* 通讯作者: Tel: 86-22-60601256; E: luojianmei@tust.edu.cn

收稿日期: 2010-11-15; 接受日期: 2011-02-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

bioassay showed no considerable difference with HPLC, but could directly indicate the inhibition activity and more suitable for rapid determination of numerous samples, which could be used for ϵ -polylysine quantification in fermentation process and high throughput screening from large numbers of mutants.

Keywords: ϵ -polylysine, Microplate, Bioassay, Inhibition activity, *Micrococcus luteus*

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Polylysine, ϵ -PL)是由白色链霉菌(*Streptomyces albus*)发酵合成的一种由赖氨酸单体通过 ϵ -酰胺键形成的多肽^[1], 它对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和病毒有明显的抑制作用, 具有抑菌谱广、水溶性好、安全性高等优点^[2]。目前, 作为食品防腐剂、乳化剂、食疗剂和药物载体等得到广泛应用^[3-4]。

1972 年, Itzhaki 根据甲基橙与 ϵ -聚赖氨酸间形成复合物的特性, 建立了用甲基橙测定聚赖氨酸含量的方法^[5]。但该法受 pH、无机盐离子和甲基橙浓度的影响较大, 对于成分复杂的发酵液样品测定结果的重现性差^[6-7]。2009 年, 江南大学程传荣等人^[8]建立了 Dragendorff's 沉淀法, 该法相比于 Itzhaki 法准确度有所提高, 但因为是生物碱沉淀法, 所以发酵液中的生物碱类物质都可以被检测出来, 对实验结果造成干扰, 增大实验误差。

本文利用 ϵ -聚赖氨酸的抑菌作用, 以具有微量、标准化和平行化特点的微孔板为检测平台, 利用多道移液器和酶标仪等多孔道检测器, 建立一种与 HPLC 分析法有类似分析精度、但能直接反映样品的抑菌活性、且更适合大规模样品快速检测的方法。实验对敏感指示菌的种类和初始浓度、 ϵ -聚赖氨酸加入浓度和培养时间等参数进行了优化, 对建立的微孔板生物检测法进行了精密度和准确度实验, 并将测定结果与常用的甲基橙法和 HPLC 法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验菌株: 敏感指示菌藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* 1.290)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 1.2465)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 1.308)、大肠杆菌(*Escherichia coli* 1.907)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* 2.486)、

黑曲霉(*Aspergillus niger* 3.6471)及 ϵ -聚赖氨酸产生菌白色链霉菌(*Streptomyces albus* 4.566), 中国普通微生物菌种保藏管理中心购买, 天津科技大学微生物制药研究室保存。

1.1.2 培养基: 白色链霉菌的斜面培养基、种子培养基、发酵培养基及其对应的培养条件参照文献[9]。敏感指示菌培养基: 细菌采用 LB 培养基, 酵母和霉菌采用 PDA 培养基。

1.1.3 主要仪器: 1500 型酶标仪, 美国 Thermo 公司; Agilent-1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; UVmini-1240 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 平底 96 微孔板 128.2 mm×86.0 mm×17.0 mm, 德国 Brand 公司; 50-1 000 μ L 8 道移液器, 美国 Thermo 公司。

1.1.4 主要试剂和药品: ϵ -聚赖氨酸标准品(Sigma 公司购买, 纯度大于 95%); 实验过程中所使用的药品及试剂均为分析纯, 用于 HPLC 分析的药品和试剂为色谱纯级别, 使用前均用微孔滤膜过滤。

1.1.5 相关溶液: ϵ -聚赖氨酸标准溶液: 准确称取 0.100 g 的 ϵ -聚赖氨酸标准品, 用少量无菌水溶解后, 转移入 100 mL 容量瓶中, 再用无菌水定容至 100 mL, 配成 ϵ -聚赖氨酸浓度为 1 000.00 mg/L 的标准母液, 然后用无菌水稀释到不同浓度备用。

1.2 实验方法

1.2.1 微孔板生物检测法: 平底 96 微孔板上取 3 个微孔作为空白对照孔, 每个微孔内分别装有 200 μ L 无菌培养基; 取 3 个微孔作为菌液对照孔, 每个微孔内分别装有 200 μ L 一定浓度的敏感指示菌培养液; 其余微孔作为样品测定孔。向样品测定孔中加入 200 μ L 一定浓度的敏感指示菌培养液, 再依次加入 10 μ L 不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸标准溶液, 于最适温度下静置培养一定时间后, 用酶标仪在波长 600 nm 下测定微孔板中各孔内培养液的 OD 值, 计算各孔中样品的抑菌率。抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率 \%} = \frac{OD_R - OD}{OD_R - OD_B} \times 100\%$$

式中： OD_R ：菌液对照孔的吸光值； OD_B ：空白对照孔的吸光值； OD ：样品测定孔的吸光值。

1.2.2 精密度试验：准确配制 400.00 mg/L ϵ -聚赖氨酸标准液，在同一时间同一实验条件下用建立的微孔板生物检测法进行多次测定，评定测定结果为日内精密度；在不同时间同一实验条件下对配制 400 mg/L ϵ -聚赖氨酸的标准液进行多次测定，评定测定结果为日间精密度。

1.2.3 加标回收率试验：取不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸发酵液样品，用 HPLC 法^[10]测定其浓度，然后与 400.00 mg/L ϵ -聚赖氨酸的标准溶液等体积混合，用建立的微孔板生物测定方法测定混合液中聚赖氨酸浓度，计算样品加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 微孔板生物检测方法的建立

2.1.1 敏感指示菌的选择：用管碟法^[11]考察了 ϵ -聚赖氨酸对 6 种敏感指示菌的抑制作用。结果发现，藤黄微球菌为敏感指示菌时，产生的抑菌圈边缘整齐、清晰且直径最大。因此，选择藤黄微球菌作为敏感指示菌进行后续实验。

2.1.2 敏感指示菌初始浓度的确定：以藤黄微球菌作为敏感指示菌，不同初始浓度下 ϵ -聚赖氨酸的

MIC₅₀ 值见表 1。MIC (Minimum Inhibitory Concentration)为最小抑制浓度，下标为 0、50 和 100 时分别代表菌体生长受到 0、50%和 100%抑制时的 ϵ -聚赖氨酸浓度。由表 1 可知，随着敏感指示菌初始浓度的增加， ϵ -聚赖氨酸的 MIC₅₀ 值不断增大。初始浓度在 4.0×10^7 ~ 4.0×10^8 CFU/mL 时，MIC₅₀ 由 73.39 mg/L 增大到 200.93 mg/L，初始浓度进一步增大到 1.0×10^9 CFU/mL 时，MIC₅₀ 快速增加到 822.42 mg/L，说明 ϵ -聚赖氨酸的抑菌效果明显减弱。因此，敏感指示菌的初始浓度应控制在 10^7 ~ 10^8 CFU/mL 范围内。

2.1.3 ϵ -聚赖氨酸加入浓度和敏感指示菌培养时间的确定： ϵ -聚赖氨酸加入浓度和敏感指示菌培养时间对抑制效果的影响见图 1。

表 1 藤黄微球菌初始浓度对 ϵ -聚赖氨酸 MIC ₅₀ 的影响	
Table 1 Effects of initial <i>Micrococcus luteus</i> concentration on MIC ₅₀ of ϵ -polylysine	
敏感指示菌初始浓度 Initial indicator strain concentration (CFU/mL)	MIC ₅₀ (mg/L)
4.0×10^7	73.39±2.42
7.5×10^7	98.34±4.51
1.0×10^8	124.67±7.76
2.0×10^8	170.36±8.90
4.0×10^8	200.93±7.37
1.0×10^9	822.42±9.63

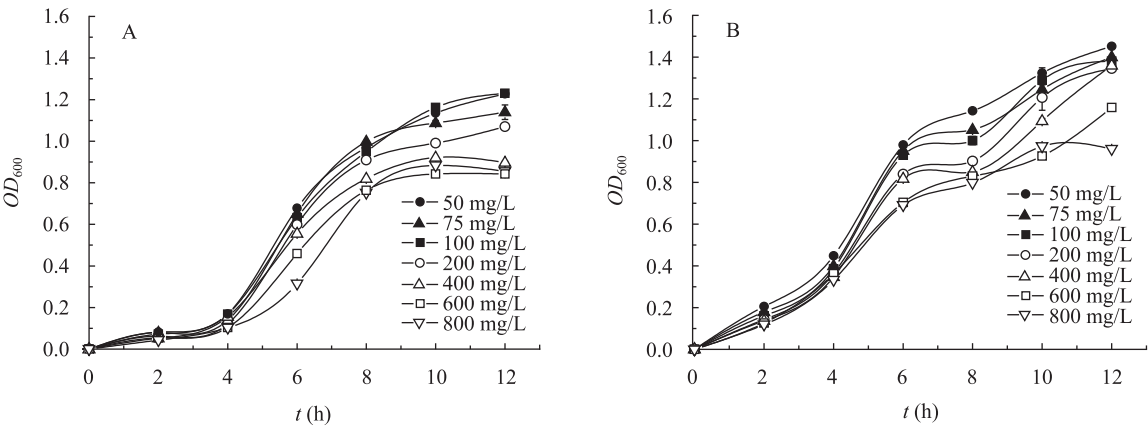


图 1 ϵ -聚赖氨酸加入浓度和敏感指示菌培养时间对抑制效果的影响

Fig. 1 Effects of ϵ -polylysine adding concentration and incubation time on inhibition activity

Note: A: The initial indicator strain concentration was 4.0×10^7 CFU/mL; B: The initial indicator strain concentration was 4.0×10^8 CFU/mL.

由图 1 可知，藤黄微球菌初始浓度为 4.0×10^7 CFU/mL 和 4.0×10^8 CFU/mL 时，加入不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸，菌体的生长趋势在 0–4 h 之间基本重合。当敏感指示菌初始浓度为 4.0×10^8 CFU/mL，培养 4 h 时，菌液的 OD 值与 ϵ -聚赖氨酸标准液浓度成较好的指数关系，如图 2 所示。

因此，实验将 ϵ -聚赖氨酸的浓度控制在 50–800 mg/L 之间，培养时间为 4 h。

2.1.4 抑菌率曲线的建立：将不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸标准液和对应的抑菌率作图，得到最终的抑菌率曲线。由图 3 可知， ϵ -聚赖氨酸浓度在 100–500 mg/L 范围内与抑菌率呈良好的线性关系，线性回归方程为 $y=191.50x-8.87$ ，相关系数 R^2 为 0.997 5。

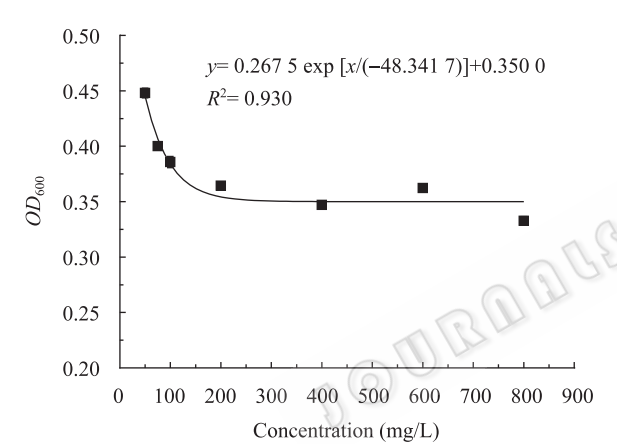


图 2 ϵ -聚赖氨酸浓度与 OD 值的回归曲线
Fig. 2 The exponential regression curve between ϵ -polylysine concentration and OD value
Notes: The absorbance at 600 nm were measured after 4 h at 4.0×10^8 CFU/mL of the initial indicator strain concentration.

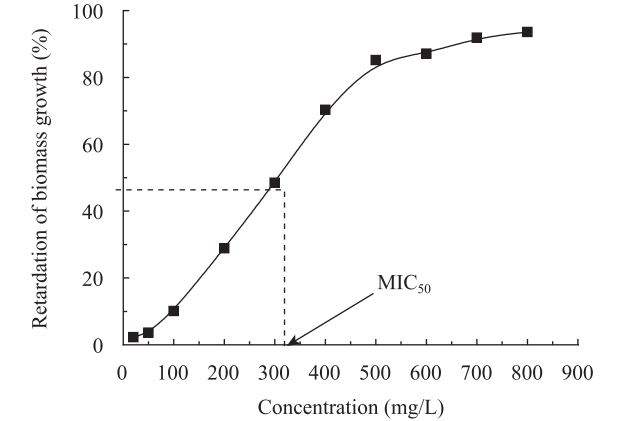


图 3 ϵ -聚赖氨酸对藤黄微球菌的抑菌曲线
Fig. 3 The dose-response curve of *Micrococcus luteus* to ϵ -polylysine

根据图 3 所得的回归方程，可分别计算出 ϵ -聚赖氨酸的 MIC_0 、 MIC_{50} 、 MIC_{100} ，所得结果如表 2 所示。

表 2 ϵ -聚赖氨酸对藤黄微球菌的抑菌活性 Table 2 The inhibition activity of ϵ -polylysine to <i>Micrococcus luteus</i>			
敏感指示菌 Indicator strain	MIC (mg/L)		
	MIC_0	MIC_{50}	MIC_{100}
藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	46.32 ± 5.39	307.42 ± 8.93	568.51 ± 14.03

2.2 方法可靠性验证
2.2.1 精密度实验：表 3 和表 4 分别列出了这种 96 微孔板检测方法的日内精密度和日间精密度。由表可知，两组实验的相对标准偏差(RSD)分别为 2.93% 和 3.33%，说明该方法对 ϵ -聚赖氨酸进行定量测定具有较好的重现性。

表 3 微孔板生物检测法的日内精密度 Table 3 Intra-day repeatability of microplate bioassay				
试验次数 Test number	理论值 Theory value (mg/L)	测定值 Experimental value (mg/L)	空白加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)
1	400.00	383.01	95.75	2.93
2	400.00	392.31	98.00	
3	400.00	408.10	102.00	
4	400.00	404.98	101.25	

2.2.2 回收率实验: ϵ -聚赖氨酸微孔板检测方法的回收率实验结果见表 5。由表可知, 加标回收率在 97.50%–102.59% 之间, 平均样品加标回收率为 99.82%, 相对标准偏差(RSD)为 2.57%, 表明该方法具有较高的准确度。

2.2.3 与甲基橙法、HPLC 法的比较: 表 5 列出了微孔板生物检测法、甲基橙法^[12]和 HPLC 法^[3]对 5 个 ϵ -聚赖氨酸样品的测定结果。由表 6 可知, 微孔板生物检测法得到的相对标准偏差(RSD)和相对偏差(RD)分别小于 3.5%和 3.0%, Itzhaki 法得到的相对标准偏差(RSD)和相对偏差(RD)分别小于 8.5%和 7.0%, HPLC 得到的相对标准偏差(RSD)和相对

偏差(RD)分别小于 3.2%和 2.5%, 说明本实验建立的微生物检测法要明显优于传统的甲基橙法, 而具有与 HPLC 法接近的分析精度, 是一种快速的、更适合检测大规模 ϵ -聚赖氨酸样品的定量方法。

3 结论

本论文利用 ϵ -聚赖氨酸的抑菌作用, 以具有标准化、平行化和微量化特点的微孔板为操作平台, 建立了以藤黄微球菌为指示菌, 能直接反映 ϵ -聚赖氨酸抑菌活性的生物检测法。与其他方法相比, 微孔板生物检测法具有良好的准确度和精密度, 且操作简单、检测快速和节约实验材料(表 7), 是一种更

表 4 微孔板生物检测法的日间精密度
Table 4 Inter-day repeatability of microplate bioassay

试验次数 Test number	理论值 Theory value (mg/L)	测定值 Experimental value (mg/L)	空白加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)
1	400.00	385.01	96.25	3.33
2	400.00	386.12	96.50	
3	400.00	405.01	101.25	
4	400.00	411.13	102.75	

表 5 微孔板生物检测方法的回收率试验
Table 5 Recovery experiment of microplate bioassay

试验次数 Test number	样品浓度 Sample concentration (mg/L)	加标溶液 Adding solution concentration (mg/L)	实测含量 Experimental value (mg/L)	样品加标回收率 Recovery (%)	平均样品加标回收率 The average of recovery (%)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)
1	365.72	400.00	377.86	97.50	99.82	2.58
2	340.00	400.00	368.72	99.36		
3	465.89	400.00	438.13	102.59		

表 6 微孔板生物检测法、甲基橙法和 HPLC 法的检测结果
Table 6 The experimental results of microplate bioassay, Itzhaki method and HPLC assay

HPLC 法 HPLC assay			微孔板生物检测法 Microplate bioassay			甲基橙法 Itzhaki method		
平均值 Average value (mg/L)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)	相对偏差 Relative derivation (%)	平均值 Average value (mg/L)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)	相对偏差 Relative derivation (%)	平均值 Average value (mg/L)	相对标准偏差 Relative standard derivation (%)	相对偏差 Relative derivation (%)
49.95	3.16	-0.10	48.54	2.34	-2.92	47.27	8.42	-5.46
98.72	1.95	-1.28	102.03	3.25	2.03	106.62	5.89	6.62
199.80	0.23	-0.10	200.04	1.29	0.02	196.13	4.05	-1.94
460.84	0.45	2.41	452.33	3.15	0.52	465.78	6.13	3.51
810.38	2.58	1.30	797.98	1.65	-0.25	782.39	5.39	-2.20

表 7 不同 ϵ -聚赖氨酸检测方法的比较 Table 7 Comparison of different methods for ϵ -polylysine determination			
	HPLC 法 HPLC assay	微孔板生物检测法 Microplate bioassay	甲基橙法 Itzhaki method
精密度 Precision	RSD<3.2%	RSD<3.5%	RSD<8.5%
准确度 Accuracy	RD<2.5%	RD<3.0%	RD<7.0%
制备时间 Preparation time	About 10 min for sample processing and 30 min for system stabilization	About 10 min/microplate with multipipette and 4 h incubation	About 50 min/sample (including shaking 30 min, centrifugation 15 min)
测定时间 Reading time	15 min/sample	Seconds/microplate	1 min/sample

适用于大规模样品检测的方法, 可用于发酵过程中 ϵ -聚赖氨酸产量的定量和突变菌的高通量快速筛选工作。

参 考 文 献

[1] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(11): 2503–2508.

[2] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, et al. Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine[J]. Journal of Antibiotics, 1984, 37(11): 1449–1455.

[3] Hiraki J. Basic and applied studies on ϵ -polylysine[J]. Journal of Antibacterial Antifungal Agents, 1995, 23: 349–354.

[4] Hiraki J. ϵ -polylysine, its development and utilization[J]. Fine Chemicals, 2000, 29(1): 18–25.

[5] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569–574.

[6] 董惠钧. 生物防腐剂 ϵ -聚赖氨酸的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士毕业论文, 2003.

[7] 姜俊云. ϵ -聚赖氨酸生产菌株的选育与发酵工艺的研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士毕业论文, 2004.

[8] 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.

[9] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(11): 2497–2502.

[10] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of Bioscience and Bio-engineering, 2001, 91(2): 190–194.

[11] 倪清艳, 李燕, 张海涛. ϵ -聚赖氨酸的抑菌作用及在保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 102–105.

[12] 孙湘婷, 王岩, 陈少欣. 甲基橙比色法测定发酵液中 ϵ -聚赖氨酸含量[J]. 分析实验室, 2008, 27(z1): 302–304.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名, 造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱, 这大大影响了本刊在国际上的传播, 也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论, 以及主办单位批准, 本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”, 请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。