

芽胞杆菌培养上清赖氨酸含量分析及高产赖氨酸突变株的筛选

王升平^{1,2} 范觉鑫³ 李丽立¹ 张彬³ 蒋竹英³

1.中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室,长沙 410125; 2.湖南省微生物研究院,长沙 410009;

3.湖南农业大学动物科技学院,长沙 410125

摘要 通过传统分离培养法从动物肠道分离得到 112 株芽胞杆菌,其培养物通过离心过滤后采用氨基酸全自动分析仪对分离得到的 100 多株芽胞杆菌进行上清氨基酸分析,采用打孔法测定芽胞杆菌对大肠杆菌 O₈ 株的抑制效果,通过紫外诱变和 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸筛选对菌株进行选育。结果发现,不同芽胞杆菌菌株产赖氨酸能力相差较大,其中产赖氨酸水平高、抑菌性好的菌株枯草芽胞杆菌 PA105,上清赖氨酸水平超过 0.3 g/L。将枯草芽胞杆菌 PA105 进行紫外诱变和 AEC 筛选,获得产赖氨酸高且抗菌的突变菌株枯草芽胞杆菌 PL83,上清赖氨酸水平达到 0.582 g/L,几乎比常规菌株提高了 1 倍。

关键词 芽胞杆菌; 培养液; 赖氨酸; S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)

中图分类号 S 834.83 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0099-06

赖氨酸是机体必需氨基酸之一,能促进机体发育、增强免疫功能,并有提高中枢神经组织功能的作用^[1]。由于谷物食品中的赖氨酸含量低,且在加工过程中易被破坏而缺乏,为人的第一限制性氨基酸^[2]。在养殖业中,赖氨酸是猪的第一限制性氨基酸和家禽的第二限制性氨基酸,是饲料中添加最多的氨基酸之一^[2-3]。目前,饲料行业利润空间不断压缩,赖氨酸的添加量受到限制,一般情况下,添加水平不足以满足动物生长的需求。芽胞类益生菌能够改善肠道微生态环境、降低肠道致病菌的数量、促进机体生长和调节免疫机能^[4-5]。芽胞杆菌在饲料中添加已经十分普遍,添加成本较低,目前 60% 的全价料饲料中都添加有芽胞杆菌类饲料添加剂。

然而,目前国内外对芽胞杆菌益生菌的研究都只考虑芽胞杆菌的益生性能^[4-5],而其营养代谢相关特性尚未涉及。如果将两者相结合,使所选育的芽胞杆菌既具有常规芽胞杆菌的益生属性,同时又能增加赖氨酸的供给,这将为养殖业益生菌的开发提供一种新的思路,目前国内外尚未有相关报道。因此,本研究通过筛选出抗菌活性强且产赖氨酸水平高的芽胞益生菌,利用紫外线对目标细菌进行突变

后,用赖氨酸结构类似物 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)进行筛选,选育对 AEC 反应不敏感的突变菌株,以提高目标菌株的产赖氨酸能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 试验动物。3 头 28~35 日龄健康断奶杜洛克×长白×大约克三元杂交仔猪购买自湖南广安生物技术有限公司。

2) 试验菌株。大肠杆菌 O₈ 株由笔者所在实验室保存。

3) 培养基。LB 培养基:酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g。以上组分用 1 000 mL 双蒸水定容,12 ℃ 灭菌 20 min 用作芽胞杆菌液体培养基,另加 1.5%~2.0% 琼脂粉即为固体培养基,调整 pH 至 7.4~7.6。

1 mol/L HEPES 缓冲液配制:119.15 g HEPES 溶解在 400 mL 蒸馏水中,加 0.5~1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0,然后用蒸馏水定容至 500 mL,于 4 ℃ 保存。

MM 培养基:(NH₄)₂SO₄ 1 g、K₂HPO₄ 7 g、

收稿日期:2015-01-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31302003);长沙市科技领军人才创新创业专项(K1307006-21);长沙市科技计划重点项目(K1201108-21)

王升平,博士。研究方向:动物健康养殖与环境。E-mail: funfarm@126.com

通信作者:李丽立,研究员。研究方向:动物健康养殖与环境。E-mail: lili@isa.ac.cn

KH_2PO_4 3 g、柠檬酸钠 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、葡萄糖 5 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

4) 试剂。S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)购自 Sigma Corporation of America。

1.2 芽胞杆菌的分离纯化

每次选取 28~35 日龄健康断奶杜洛克×长白×大约克三元杂交仔猪 1 头, 心脏放血法处死后, 迅速剖开腹部, 用灭菌后的棉线结扎回肠后, 迅速取出回肠并转移至无菌操作台, 取 1 g 回肠食糜装入 10 mL 离心管中, 用蒸馏水稀释至 5 mL, 涡旋混匀, 100 °C 煮沸 5 min, 静置 5 min, 取上清倍比稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 3 个梯度, 将梯度稀释好的接种液涂布于 LB 固体培养皿上, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h^[6]。

每头猪从 LB 固体平板上挑取 40 个单细菌克隆接种至 LB 液体培养基, 于 37 °C 摇床上 200 r/min 培养 24 h, 用铂耳蘸取摇好的液体菌种培养液, 接种于固体 LB 培养板中, 连续纯化 2~3 次。所分离的所有菌株用 20% 甘油(体积比)混合后置于 -80 °C 低温冻存。

1.3 芽胞杆菌抑菌筛选

抑菌试验: 芽胞杆菌培养上清对致病性大肠杆菌 O_8 的抑制试验采用打孔方法^[5]。从 LB 固体培养基挑取单个克隆待测菌株, 接种到 LB 液体培养基, 培养 24 h 至对数期, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 100 μL 。活化的大肠杆菌稀释成 10^5 cfu/mL, 取 0.1 mL 均匀涂布于 LB 固体培养板中, 待其干燥 30 min 后, 用打孔器在固体培养基上打孔, 每个培养皿打孔 6 个。用移液枪移取 100 μL 培养好的芽胞杆菌菌液(24 h 培养液)加至孔中, 每个菌株做 3 个重复, LB 培养基作对照, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 使用游标卡尺测量其抑菌圈直径, 并计算出平均值^[7]。

1.4 芽胞杆菌的鉴定

革兰氏染色: 所分离的菌株用革兰氏染色试剂盒(研域(上海)化学试剂有限公司)根据使用说明书进行染色, 观察所分离菌株的形态, 选出革兰氏阳性、形状为杆菌的细菌菌株。

芽胞杆菌种属的鉴定: 通过 16S rDNA 测序分析进行芽胞杆菌种属的鉴定^[8]。所分离的细菌菌株经革兰氏染色后, 接种 LB 固体培养基, 挑选单个克隆接种于 LB 液体培养基, 取 5 mL 菌液 12 000

r/min 离心 2 min, 用 QIAGEN 细菌基因组提取试剂盒提取细菌总 DNA, 纯化后用于 PCR 模板。采用细菌 16S rDNA 通用引物 F8(5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3')与 R1492(5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')对每个细菌菌株的 16S rDNA 基因进行全长扩增。PCR 反应体系为 50 μL : 5 μL 的 10×Buffer, 4 μL 的 25 mmol/L dNTP mixture, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Corp), 40 $\mu\text{mol/L}$ 上游和下游引物, 模板为 10 ng 的基因组 DNA。扩增程序为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环数为 30, 72 °C 10 min, 4 °C 保存, PCR 扩增采用 Eppendorf PCR 系统(Gottingen, 德国), PCR 扩增产物直接送至北京华大基因股份有限公司进行测序分析, 所测结果在 PUBMED 公共服务平台上应用 Blast 软件进行比对分析, 确定所分离菌株亲缘关系最近的细菌种属。

1.5 氨基酸测定

芽胞杆菌培养上清应用 L-8800 氨基酸分析仪(日本日立)按照文献[5]使用的方法进行分析。

1.6 芽胞杆菌紫外诱变及赖氨酸类似物筛选

将对数期枯草芽胞杆菌(摇床培养 18~24 h)离心去上清, 用生理盐水制备菌悬液, 调整细菌浓度为 1×10^8 cfu/mL。取 3 mL 菌悬液加至 7 cm 的培养皿中, 将平皿放在磁力搅拌器上, 进行紫外光照, 照射诱变时间为 6 min, 平皿离紫外灯的距离在 30 cm 左右, 然后在含有 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)终质量浓度为 6.0 mg/mL 的 MM 培养基上涂布, 37 °C 恒温、避光、静置培养 10 h 后进行菌落计数, 获得突变克隆^[9], 并测定上清赖氨酸含量。

1.7 数据处理

芽胞杆菌抑制大肠杆菌 O_8 增值的数据重复数为 3, 采用 Excel 2007 中的 STDEVP 函数计算其标准差。通过 MEGA 6.06 软件^[10]根据各菌株的 16S rDNA 基因序列进行系统发育进化分析。采用 NJ 法构建系统发育进化树, 重复 1 000 次并计算 NJ 系统发育进化树内每个分枝的 Bootstrap 值。紫外诱变 AEC 筛选后的芽胞杆菌上清赖氨酸含量数据重复数为 3, 采用 SPSS 21.0 软件中的 Independent Sample Test 与诱变前的 PA105 菌株进行差异显著性分析^[11]。采用 SPSS 21.0 软件中 one-way anova 中的 Duncan's 多重比对分析枯草芽胞杆菌 PA105 诱变后部分菌株产赖氨酸水平和抑菌性能。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌的分离

经过 LB 培养基 3 次纯化,共得到 112 株细菌菌株,这些菌株在 LB 固体平皿中培养 24 h 后一般形成白色、圆形、不规则形或呈车轮状等、表面光滑或粗糙、边缘不整齐、有的有透明分泌物的克隆。

革兰氏染色镜检结果为革兰氏阳性菌,菌体呈杆状,主要为散在的单个细菌、短链或长链状。

2.2 芽胞杆菌抑菌试验

抑菌试验结果表明,大部分所分离的芽胞杆菌具有抑制大肠杆菌 O₈ 株的作用。表 1 列出了部分芽胞杆菌菌株对大肠杆菌 O₈ 抑制效果,数据为平均数±标准差($n=3$)。其中对大肠杆菌 O₈ 具有较强抑制效应的芽胞杆菌菌株有多株,比如 PA103、

PA105和PA106等,有的菌株对大肠杆菌 O₈ 没有抑制效果,比如 PA013、PA057 等(表 1)。

表 1 部分芽胞杆菌菌液对大肠杆菌 O₈ 株的抑制作用

Table 1 Inhibition effect of some <i>Bacillus</i> strains to <i>E.coli</i> O ₈			
菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter	菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter
PA013	5.16±0.12	PA103	23.03±0.73
PA057	5.07±0.13	PA105	19.37±0.18
PA066	15.97±0.22	PA106	20.36±0.36
PA074	5.61±0.13	PA137	5.08±0.62

2.3 芽胞杆菌产氨基酸分析

对筛选出来的 112 株芽胞杆菌进行上清氨基酸测定,其中有 102 株结果如表 2,其他 10 株没有获得检测结果。从表 2 数据可以看出,每株菌上清中赖氨酸质量浓度都不一样,但大部分都在 0.18~0.33 g/L,其中第 4、6、9、14、20、21、25、30、31 和 105 号上清赖氨酸超过 0.3 g/L。

表 2 芽胞杆菌产赖氨酸分析

Table 2 Ability producing lysine of different strains										mg/L
菌株号 Strain number	赖氨酸水平 Lysine content	菌株号 Strain number	赖氨酸水平 Lysine content	菌株号 Strain number	赖氨酸水平 Lysine content	菌株号 Strain number	赖氨酸水平 Lysine content	菌株号 Strain number	赖氨酸水平 Lysine content	
1	208.06	37	276.18	69	254.86	110	236.17	153	242.68	
3	282.71	38	253.62	70	261.37	111	236.88	160	232.88	
4	310.06	39	256.61	76	242.41	113	226.35	161	234.01	
6	310.59	40	254.88	77	216.61	114	248.89	164	246.78	
9	312.80	45	244.13	78	248.76	122	245.79	165	248.05	
11	270.32	46	258.13	79	227.95	123	254.81	176	257.09	
14	300.89	47	264.08	80	227.39	127	281.34	178	254.61	
16	275.95	51	244.15	81	244.25	128	278.56	179	253.61	
17	278.06	52	240.63	82	239.69	129	259.54	180	251.63	
20	312.15	53	239.06	83	301.17	130	261.60	182	269.03	
21	304.30	54	251.18	84	241.45	131	273.51	183	242.03	
25	307.19	55	263.51	85	260.09	132	252.93	185	257.25	
26	290.79	56	230.47	86	146.86	134	250.63	186	254.57	
27	276.29	57	252.62	87	241.53	135	253.58	187	239.03	
28	285.49	58	245.42	88	257.71	139	268.85	188	254.75	
29	281.71	59	242.66	89	274.86	140	255.12	189	183.07	
30	324.88	60	250.11	90	281.07	141	281.59	190	251.41	
31	306.66	61	250.55	91	280.16	147	230.37	198	243.10	
32	296.78	64	244.93	93	279.65	148	222.78			
35	253.59	65	252.79	105	303.39	151	250.04			
36	243.79	68	247.64	108	274.54	152	246.80			

2.4 芽胞杆菌种的鉴定

对上述部分芽胞杆菌中的 20 株进行 16S rDNA 测序分析,结果表明,20 株芽胞杆菌中有枯草芽胞杆菌 11 株、地衣芽胞杆菌 5 株、坚硬芽胞杆菌 2 株和蜡样芽胞杆菌 2 株。其中枯草芽胞杆菌 PA105 在抑制大肠杆菌和产赖氨酸能力 2 个指标上效果较好,因此,作为备选菌进行后续的紫外诱变

和 AEC 筛选。枯草芽胞杆菌 PA105 已保藏在中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称 CCTCC),保藏编号为 CCTCC M 2011328,枯草芽胞杆菌 PA105 的 16S rDNA 序列已上传至 PUBMED,登录号为 GenBank: JN831089.1,通过 MEGA6.06 分析获得的系统进化树如图 1。

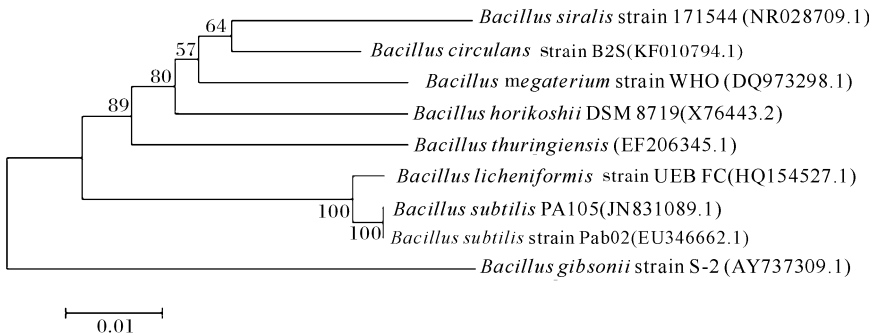


图 1 基于 16S rDNA 基因序列的枯草芽胞杆菌 PA105 系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Bacillus subtilis* PA105 based on the 16S rDNA sequences

2.5 枯草芽胞杆菌 PA105 紫外诱变及 AEC 筛选

选取诱变之前上清中赖氨酸含量高、抑制大肠杆菌效果好的枯草芽胞杆菌 PA105 进行紫外诱变,然后用 AEC 进行筛选,从诱变培养皿上随机选取其中部分菌株进行培养,培养上清进行赖氨酸水平分析,结果表明,诱变后上清中氨基酸水平有不同程度的升高(表 3),PL9 号诱变菌株可达 0.568 g/L,

PL30 号诱变菌株最高可达 0.627 g/L,PL83 号诱变菌株最高可达 0.582 g/L,显著高于诱变前(枯草芽胞杆菌 PA105)的水平(0.303 g/L),经过对突变株进行大肠杆菌抑菌实验(表 3),PL83 号菌株基本保持原有抗菌属性,对大肠杆菌的抑菌圈为 16.33 mm,但小于诱变前的 19.37 mm。PL9 号和 PL30 号菌株抗菌活性不明显。

表 3 枯草芽胞杆菌 PA105 诱变后部分菌株产赖氨酸水平及抑制大肠杆菌效果¹⁾

Table 3 Supernatant lysine content and inhibition effect to *E. coli* O₈ of different mutant strains from *Bacillus subtilis* PA105

菌株 Strains	PL7	PL9	PL18	PL29	PL30	PL66	PL71	PL83	PL87
赖氨酸水平/(g/L)	0.439±	0.568±	0.437±	0.587±	0.627±	0.508±	0.533±	0.582±	0.324±
Lysine level	0.01 ab	0.01 c	0.02 ab	0.03 c	0.03 c	0.04 bc	0.03 bc	0.19 c	0.01 a
抑菌圈直径/mm	15.33±	8.31±	11.28±	12.65±	9.16±	14.43±	9.73±	16.33±	10.33±
Inhibition diameter	0.23 g	0.16 a	0.32 d	0.27 e	0.19 b	0.42 f	0.73 bc	0.25 h	0.82 c

1) 数据为平均数±标准差(n=3),表中同行不同字母表示差异达到 0.05 的显著水平。The data is average±SD(n=3),different letter within a column differ means sharing (P<0.05).

3 讨论

3.1 芽胞杆菌在动物养殖中的应用

本研究从仔猪回肠食糜中筛选到了 112 株芽胞杆菌,其中主要为枯草芽胞杆菌。目前国内外芽胞杆菌应用的主要菌种为枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌,大部分研究发现,芽胞杆菌应用仔猪效果较好,能降低仔猪腹泻率、缓解仔猪应激、改善肠道微生态等,然而芽胞杆菌在中大猪应用上效果差异很大^[12-14],可能的原因是不同研究所采用的菌株不同,因为不同种属,甚至即使同一种属但不同的菌株,其性质都有很大的差异。比如本研究中的芽胞杆菌上清赖氨酸含量,不同菌株就存在很大的差异。

对所分离的 112 株芽胞杆菌进行抑制大肠杆菌试验表明,不同芽胞杆菌抑制大肠杆菌效果差异较大,有的菌株具有较强的抑菌效果,有的则完全没有抑菌效果,部分菌株甚至能和被检大肠杆菌一起生长。总的说来,根据本研究结果发现,大部分枯草芽胞杆菌抑制大肠杆菌效果较好,而地衣芽胞杆菌增殖较快。因此,芽胞杆菌在动物养殖应用过程中,由于其生理生化特性差异巨大,菌株的筛选尤为重要。

本研究发现,每株芽胞杆菌的抑菌机制差异很大,同一属的不同菌株差异也大,这可能与芽胞杆菌的次级代谢复杂多变有关,芽胞杆菌能随外界条件的变化而改变自身代谢,因此具有很强的外界环境适应性,比如,在极端恶劣的环境下能形成芽胞,

在合适的环境下再萌发。我们在培养芽胞杆菌的过程中发现,培养 24 h 与培养 48 h,代谢产物差异很大,比如,培养 48 h 比培养 24 h 代谢产物中氨含量明显增多,因此,应用芽胞杆菌作益生菌,在其生产过程中,一定要注意生产条件的稳定,从而使每一批次的产品具有稳定的质量。

3.2 芽胞杆菌产赖氨酸分析

目前,芽胞杆菌的研究主要集中在其益生属性上,比如抑制有害细菌的生长繁殖,降低幼龄动物腹泻率等方面,而在芽胞杆菌对动物的代谢影响方面很少有报道。其他细菌对动物氨基酸代谢的影响目前有一些相关报道,戴兆来^[15]发现不同肠段来源、以及不同种属细菌(链球菌属、大肠杆菌、克雷伯菌属)对氨基酸的利用速率不同,大肠杆菌和克雷伯菌氨基酸利用速率较快,而同一种细菌对不同氨基酸利用速率也不相同,细菌对谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸和苏氨酸的利用速率较快,这提示动物赖氨酸不足的原因,一是因为机体不能合成或合成不够,再就是可能部分赖氨酸被动物体内的微生物分解了,选育有利于赖氨酸合成而不是分解的益生菌菌株用于动物生产是有可能节省赖氨酸在饲料中的添加量的一种方法。而在芽胞杆菌产赖氨酸研究方面,主要集中在通过育种、发酵条件优化等,提高芽胞杆菌产赖氨酸的能力,比如王震宇^[16]将短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*) D8 进行紫外诱变和溴化乙锭诱变,并通过 6.0 mg/mL 的赖氨酸结构类似物 AEC 进行抗性筛选,使赖氨酸含量达到 50.83 g/L。然而这些产赖氨酸高的菌株比如短小芽胞杆菌、谷氨酸棒杆菌等目前并不能作为饲料添加剂用于动物生产。利用目前我国农业部饲料添加剂目录中规定可以使用的菌种,通过菌种选育提高其赖氨酸的产量,同时又具有常规益生菌属性,是本研究的主要思路。

从表 2 我们可以看到,不同野生型芽胞杆菌上清中赖氨酸含量差异很大,分布在 0.18 g/L 至 0.33 g/L 之间,平均值为 0.25 g/L,符合正态分布。目前,专业用于生产赖氨酸的芽胞杆菌,通过选育和培养条件优化,其赖氨酸产量最高能达 50 g/L^[17]。我们也应用 AEC 进行了诱变筛选,赖氨酸的产量从 0.303 g/L 提高到了 0.587 g/L,提高了 94%,但远低于专业用于生产赖氨酸的芽胞杆菌,由此可见,通过常规或分子育种筛选,使具有优良抗菌属性的野生型芽胞杆菌产赖氨酸的能力还具有大幅提高的空

间,使之能有效用于动物养殖生产,以降低饲料生产成本和氮排放。由于紫外诱变选育菌株属于随机突变,且这种突变容易产生回复突变,菌株的属性容易发生改变,因此,对菌株进行定向选育将是我们下一步的研究方向,比如细菌天门冬氨酸半醛有 2 个代谢方向,分别是朝赖氨酸和朝苏氨酸、蛋氨酸方向代谢,如果将朝苏氨酸和蛋氨酸方向代谢这条支路切断,将有利于天门冬氨酸半醛朝赖氨酸方向代谢,从而使细菌生产更多的赖氨酸用于动物生长。

参 考 文 献

- [1] 任建民,刘强.赖氨酸营养研究进展[J].饲料博览,2009(3):13-15.
- [2] 孙朋朋,宋春阳.猪限制性氨基酸研究进展[J].饲料广角,2013(23):29-31.
- [3] 鲁友均,刘树民,刘评,等.氨基酸添加剂在猪饲料中的研究进展[J].当代畜牧,2014(9):27-29.
- [4] 靳二辉,陈耀星,王群,等.芽胞杆菌类益生菌对肉鸡血细胞及免疫器官组织结构的影响[J].畜牧兽医学报,2013(5):778-787.
- [5] WANG S P, TANG X S, LI L L, et al. Dietary supplementation with high-dose *Bacillus subtilis* or *Lactobacillus reuteri* improves growth performance but impairs immunity in weaned piglets[J]. Journal of Food, Agriculture and Environment, 2011, 9(2):181-187.
- [6] 窦茂鑫,赵迪,王蕾,等.猪源枯草芽胞杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].养殖与饲料,2012(4):11-14.
- [7] 全永娟,萨仁娜,张宏福,等.三株芽胞杆菌抑菌活性分析及对肉鸡舍空气微生物的影响[J].中国农业科学,2013,46(20):4344-4353.
- [8] WANG S P, BO M J, KONG X F, et al. 16S rRNA gene-based analysis of ilea bacterial community and phylogeny in nursing and weaned piglets[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 1(4/5):12-17.
- [9] 李永峰,李建政,任南琪,等.发酵产氢细菌的紫外线诱变筛选高产菌株[J].化工学报,2004(S1):119-121.
- [10] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30: 2725-2729.
- [11] 龚江,石培春,李春燕.使用 SPSS 统计软件进行多因素方差分析[J].农业网络信息,2012(4):33-35.
- [12] 潘宝海,张建东,谯仕彦.芽胞杆菌对畜禽生产性能的影响[J].饲料研究,2007(1):60-62.
- [13] 李国建.凝结芽胞杆菌替代抗生素对猪生产性能的影响[J].河南农业科学,2004(10):72-74.
- [14] KORNEGAY E T, RISLEY C R. Nutrient digestibilities of a corn-soybean meal diet as influenced by *Bacillus* products fed

to finishing swine[J].Journal of Animal Science,1996,74:799-805.

[15] 戴兆来.猪小肠微生物氨基酸代谢的生态分析[D].南京:南京农业大学图书馆,2010.

[16] 王震宇.芽胞杆菌高产赖氨酸突变株的选育及代谢途径初步研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学图书馆,2010.

[17] 王冠蕾,谢辉.赖氨酸高产短小芽胞杆菌诱变选育及关键酶基因的分析[J].中国调味品,2013(2):31-34.

**Lysine content in culture supernatant of *Bacillus*
and screening of lysine high-yielding strain**

WANG Sheng-ping^{1,2} FAN Jue-xin³ LI Li-li¹ ZHANG Bin³ JIANG Zhu-ying³

- 1.Laboratory of Animal Nutrition and Human Health and Key Laboratory of Agro-Ecology,
Institute of Subtropical Agriculture,Chinese Academy of Sciences,Changsha 410125,China ;
- 2.Hunan Microbiology Institute,Changsha 410009,China ;
- 3.College of Animal Science and Technology,Hunan Agricultural University,
Changsha 410128,China

Abstract The present research aimed to develop a new probiotic product with functions of both lysine high-yielding and strong inhibition on the growth of *E. coli* O₈ by screening and mutation breeding of the *Bacillus* strains.A total of 112 *Bacillus* strains were isolated from pig intestine in the present study by traditional culture-based method.The lysine content in the culture supernatant of *Bacillus* strains was determined by Automatic Amino Acid Analyzer.The inhibition effects of *Bacillus* strains on the growth of *E. coli* O₈ were determined using an inhibition zone assay.The UV-mutagenesis and s-(2-aminoethyl)-L-cysyeine hydrochloride(AEC)screening was conducted on bacterial strain.The results indicated that there existed large differences for the lysine content of the culture supernatant among different *Bacillus* strains.The *Bacillus subtilis* PA105 can effectively inhibit the growth of *E. coli* O₈ and its lysine content in the culture supernatant was up to 0.3 g/L. The UV-mutagenesis and S-(2-aminoethyl)-L-cysyeine hydrochloride(AEC)screening was conducted on *B. subtilis* PA105.The lysine content in the culture supernatant of the resulting mutant strain *B. subtilis* PL83 was up to 0.582 g/L.The lysine content in the culture supernatant of the resulting bacterial strain in the present research is increased by almost 100 percent compared with conventional strains.

Key words *Bacillus*; culture supernatant; lysine; S-(2-aminoethyl)-L-cysyeine hydrochloride (AEC)

(责任编辑:边书京)