



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108330077 B

(45) 授权公告日 2021.02.26

(21) 申请号 201710276460.0

(22) 申请日 2017.04.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108330077 A

(43) 申请公布日 2018.07.27

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No. 13734 2017.03.08

(73) 专利权人 云南中烟工业有限责任公司  
地址 650231 云南省昆明市五华区红锦路  
367号云烟科技园C区

(72) 发明人 李源栋 刘秀明 段焰青 岳蕊  
杨根华 董文汉

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务  
所(普通合伙) 53108

代理人 谢嘉

(51) Int.Cl.

*G12N 1/20* (2006.01)

*A24B 15/20* (2006.01)

*C12R 1/465* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1954076 A, 2007.04.25

审查员 苏存生

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种黄暗色链霉菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种黄暗色链霉菌及其应用。该菌株的分类命名为黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*), 于2017年03月08日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.13734。本发明的黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*) 具有抑制巴氏醋杆菌, 土壤球菌和芽孢杆菌生长的作用, 可以用于预防烟用香精香料的变质, 对烟用香精香料品质防控技术的提升具有重要的价值。

1. 一种黄暗色链霉菌菌株, 其特征在于: 所述菌株的分类命名为黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*), 于2017年03月08日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No.13734。

2. 权利要求1所述的菌株在抑制巴氏醋杆菌, 土壤球菌和芽孢杆菌中的应用。

3. 权利要求1所述的菌株在防止烟用香精香料变质中的应用。

4. 根据权利要求3所述的菌株在防止烟用香精香料变质中的应用, 其特征在于: 按每毫升烟用香精香料加入5  $\mu$ g 黄暗色链霉菌活性物质。

## 一种黄暗色链霉菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于应用微生物技术领域,具体涉及一种能够抑制细菌生长的黄暗色链霉菌。同时,本发明还涉及所述的黄暗色链霉菌在烟草生产中的用途。

### 背景技术

[0002] 烟草是我国财政的重要支柱之一。近二十年来,每年烟草税收占国家财政收入的10%左右,对我国的社和经济展作出了巨大贡献。烟用香精香料作为重要的辅料在卷烟生产中具有十分重要的作用,其质量的稳定对于维持卷烟正常生产和保证卷烟品质至关重要。通过大量实验,从多层面、多角度查找和分析原因后发现,变质烟用香精香料中主要存在拜耳结合酵母,巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌四种微生物。目前有关烟用香精香料品质防控技术的研究还非常少,特别是针对烟用香精香料腐败变质的问题还没有相应的解决措施。

[0003] 放线菌是一类有着广泛实际用途的微生物资源,与人类的关系极为密切。据统计,在已发现的抗生素中,有61.7%为放线菌所产生。现有技术中关于链霉菌作为杀菌剂的研究已有记载,但有关链霉菌在防治烟用香精香料腐败变质方面的应用尚未见报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种能够抑制巴氏醋杆菌,土壤球菌和芽孢杆菌生长的黄暗色链霉菌。

[0005] 本发明的目的还在于提供所述黄暗色链霉菌在烟草生产中的应用。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案予以实现。

[0007] \*除非另有说明,本发明中所采用的百分数均为质量百分数。

[0008] 本发明从土壤中分离出一株优势微生物YNAU-2作为试验菌种,对其进行16S rDNA分析,鉴定结果表明该细菌属于放线菌种链霉菌属,其分类命名为黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*),保藏号CGMCC No.13734。

[0009] 所述的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)菌株在高氏一号固体培养基上的形态学特征为:气生菌丝灰白色至紫灰色,基内菌丝浅黄色至黄褐色,产生少量浅黄色可溶性色素。

[0010] 所述的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)菌株分子生物学鉴定:利用上海生工生物工程有限公司合成的通用引物PA(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')PB(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'),以黄暗色链霉菌的基因组DNA作为模板扩增得到1500bp左右的PCR产物,回收测序、校正之后得到的黄暗色链霉菌菌株的部分16S rDNA基因序列。对菌株的16S rDNA序列进行PCR扩增,用于放线菌的分子分类学鉴定。采用2×Power Taq PCR Master Mix,25μL反应体系,放线菌反应条件:94℃预变性6min,94℃变性1min,53℃退火1min,72℃延伸2min,30次循环;最后72℃延伸10min。鉴定结果表明该细菌属于放线菌种链霉菌属,其分类命名为黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)。

[0011] 所述的黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*) 具有确切的抑菌效果,能够抑制烟用香精香料中巴氏醋杆菌,土壤球菌和芽孢杆菌的生长,从而防止烟用香精香料变质。

[0012] 利用黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*) 预防烟用香精香料变质的优选方法:按每毫升烟用香精香料加入5ug黄暗色链霉菌活性物质,可取得最佳防腐效果。

[0013] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0014] 1、本发明成功地将生物防治技术引入烟用香精香料生产中,是烟草生产技术的的一个重要突破。实验数据表明,黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*) 对引起烟用香精香料变质的3种优势细菌:巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌有明显抑制作用。

[0015] 2、本发明公开的黄暗色链霉菌及其应用绿色无污染,对环境无害。

[0016] 3、工艺简单,操作容易,成本低,适于推广应用,对促进卷烟工业健康发展具有积极意义。

[0017] 保藏生物材料的说明

[0018] 本发明的菌株,已于2017年03月08日,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC);该中心地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。该菌株的分类命名为黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*);保藏号为CGMCC No.13734。

## 具体实施方式

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例及试验数据,对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不是对本发明技术方案的限定。

[0020] 实施例1:黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus*) 的分离和鉴定

[0021] (1) 土样处理

[0022] 中国云南省昆明市盘龙区云南农业大学后山采集土样自然风干,称取1g土样于盛有99mL无菌水并装有玻璃珠的三角瓶中,振荡20min,使土壤中的菌体,芽孢或孢子均匀分散,此即为 $10^{-2}$ 浓度的土壤悬浮液,静置30s,另取装有9mL无菌水的试管三支,编号 $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ 。用无菌吸管无菌操作取 $10^{-2}$ 浓度的土壤悬浮液1mL并加入编号 $10^{-3}$ 的无菌试管中,吹吸3次,使与9mL水混匀,即为 $10^{-3}$ 浓度的土壤悬浮液,以此类推直到稀释至 $10^{-5}$ 。(每个稀释度换一个无菌吸管),稀释过程在无菌条件下进行。

[0023] (2) 菌株纯化培养

[0024] 分别取 $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ 土壤悬浮液100 $\mu$ L均匀涂布于高氏一号培养基上,37 $^{\circ}$ C恒温培养,待培养基表面长出不同形态、颜色的菌落时,将不同形态的菌落,取单菌落在新鲜培养基上划线培养,如此重复直到新长出来的菌形态和颜色单一时为止,即得到纯培养的菌株。采用甘油-80 $^{\circ}$ C低温保存。

[0025] (3) 菌株鉴定

[0026] 采用形态学与分子生物学相结合的方法对所分离的微生物鉴定。

[0027] 分子生物学鉴定:本发明从土壤中分离出了一株优势微生物YNAU-2作为实验菌种,对该菌株的16S rDNA序列进行PCR扩增,用于放线菌的分子分类学鉴定。放线菌PCR扩增

的引物为:PA (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') PB (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')。引物由上海生工生物工程有限公司合成。采用2×Power Taq PCR Master Mix, 25μL反应体系,放线菌反应条件:94℃预变性6min, 94℃变性1min, 53℃退火1min, 72℃延伸2min, 30次循环;最后72℃延伸10min。鉴定结果表明该细菌属于放线菌种链霉菌属,其分类命名为黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*),保藏号CGMCC No.13734。

[0028] 形态学鉴定:根据菌落的形态,颜色等生理生化特性按照常规方法进行分析鉴定。所述的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)菌株在高氏一号固体培养基上的形态学特征为:气生菌丝灰白色至紫灰色,基内菌丝浅黄色至黄褐色,产生少量浅黄色可溶性色素。

[0029] 实施例2黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)CGMCC No.13734抑菌效果实验。

[0030] 通过前期大量实验研究,结果表明:拜耳结合酵母,巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌是引起烟用香精香料浓缩液变质的主要微生物。

[0031] 1、实验准备

[0032] (1) 样品:烟用香精香料:紫云和软珍

[0033] (2) 培养基制备:放线菌采用高氏一号培养基,细菌和真菌采用LB培养基。

[0034] LB平板培养基,1L配方为胰蛋白胨(10g),酵母粉(5g),琼脂(16g),氯化钠(10g),补充蒸馏水至1000mL,调节pH 7.0~7.2,121℃高压蒸汽灭菌20min。

[0035] 高氏一号培养基:可溶性淀粉(20g),KNO<sub>3</sub>(1g),K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.5g),MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.5g),NaCl(0.5g),FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.01g),调节pH7.2-7.4121℃高压蒸汽灭菌20min。

[0036] 高氏一号合成培养基的制备:先将可溶性淀粉称好,在小烧杯内用50~100ml水调成糊状,再在另一容器内加入900~950ml热水,将小烧杯内淀粉倒入混匀。再分别称取其它药品,并加热搅拌使之溶解后,调pH至7.2~7.4,分装,0.1Mpa(15lb/in<sup>2</sup>)15~30min高压蒸汽灭菌。

[0037] 2、抑菌实验

[0038] (1) 取从香精香料中分离鉴定出来的四种菌(拜耳结合酵母,巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌)分别放入装有LB液体培养基的2mL离心管,在恒温振荡器振荡24h备用。

[0039] (2) 将上述4种菌悬液用移液枪分别取100μL均匀涂在高氏一号培养基上。

[0040] (3) 用接种针将挑取少量纯化后的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)接在涂有菌液的高氏一号培养基上,每个培养皿3~6次重复,每种菌(拜耳结合酵母,巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌)3皿,培养3~4天后观察细菌的生长情况。

[0041] (4) 通过观察是否产生抑菌圈来判断黄暗色链霉菌对引起香精香料变质的微生物是否有抑制效果,数值去平均数。

[0042] 表1黄暗色链霉菌对从已变质香精香料中分离的4种微生物的拮抗作用

放线菌名称	抑制圈直径 (mm)			
	拜耳结合酵母	醋酸杆菌	土壤球菌	芽孢杆菌
A7 黄暗色链霉菌	-	8	5	12

[0044] 注:表中为3次处理平均值“-”表示没有抑菌圈

[0045] 表1表明,黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)对变质香精香料中分离得到的3种细菌(巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌)均有明显抑制效果,而对真菌拜耳结合酵母没有抑制作用。

[0046] 实施例3:黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)发酵液对变质香精香料的抑菌实验。

[0047] (1)将纯化后的黄暗色链霉菌接种于高氏一号液体培养基中,30℃摇床培养2个星期,制成发酵液。

[0048] (2)将已变质紫云和软珍香精香料用移液枪分别取100uL均匀涂在LB培养基上。

[0049] (3)用接种针将挑取少量黄暗色链霉菌发酵液接在涂有菌液的LB培养基上,每个培养皿3~6次重复,设计3个处理,培养3~4天后观察细菌的生长情况。

[0050] (4)通过观察是否产生抑菌圈来判断黄暗色链霉菌对引起香精香料变质的微生物是否有抑制效果。

[0051] 表2黄暗色链霉发酵液原液对香精香料中微生物的拮抗作用

放线菌名称	抑制圈直径 (mm)		
	处理 1	处理 2	处理 3
A7 黄暗色链霉菌 发酵液原液	4	2	7

[0053] 表2结果表明,黄暗色链霉菌发酵液原液对变质香精香料中微生物有明显的抑制效果

[0054] 实施例4:利用发酵液次生代谢产物来抑制细菌

[0055] (1)将纯化后的黄暗色链霉菌接种于高氏一号液体培养基中,30℃摇床培养2个星期,制成发酵液。

[0056] (2)发酵液乙酸乙酯2倍体积提取3次,蒸干乙酸乙酯萃取液。

[0057] (3)将已变质紫云和软珍香精香料用移液枪分别取100uL均匀涂在LB培养基上。

[0058] (4)用接种针将挑取少量黄暗色链霉菌萃取液接在涂有菌液的LB培养基上,每个培养皿3~6次重复,培养3~4天后观察细菌的生长情况。

[0059] (5)通过观察是否产生抑菌圈来判断黄暗色链霉菌对引起香精香料变质的微生物是否有抑制效果。

[0060] 表3黄暗色链霉菌萃取液对香精香料中微生物的拮抗作用

放线菌名称	抑制圈直径 (mm)		
	处理 1	处理 2	处理 3
A7 黄暗色链霉菌 萃取液	7	6	9

[0063] 表3结果表明,黄暗色链霉菌萃取液对变质香精香料中微生物有明显的抑制效果。

[0064] 实施例5:利用黄暗色链霉菌活性物质来抑制细菌和酵母。

[0065] (1) 将纯化后的黄暗色链霉菌接种于高氏一号液体培养基中,30℃摇床培养2个星期,制成发酵液。

[0066] (2) 发酵液乙酸乙酯2倍体积提取3次,蒸干乙酸乙酯萃取液。

[0067] (3) 将黄暗色链霉菌活性物质按1ug/mL,3ug/mL,5ug/mL加入香精香料中。

[0068] (4) 将实验组与对照组样品装入150ml三角瓶,封口,置于30℃恒温振荡器培养7天。在无菌条件下,采用平板涂布培养法,取RZ和ZY样品每个处理各10ul分别与990ul无菌水混合均匀,然后取100μL混合样品均匀涂布于LB培养基上,各3个重复,30℃恒温下培养3~5d观察并记录微生物菌落数量。通过微生物数量变化来判断黄暗色链霉菌活性物质是否对引起香精香料品质变化的微生物有抑制作用。

[0069] 表4黄暗色链霉菌活性物质抑菌测定

实验处理	紫云		软珍	
	培养皿中菌落数/100uL	抑菌率/%	培养皿中菌落数/100uL	抑菌率/%
[0070] CK	18000	/	12000	/
1ug/ml 黄暗色链霉菌活性物质	12000	33.33	75000	37.5
[0071] 3ug/ml 黄暗色链霉菌活性物质	8000	55.56	3000	75
5ug/ml 黄暗色链霉菌活性物质	4500	75	1000	91.67

[0072] 表4结果表明,将黄暗色链霉菌活性物质按每毫升烟用香精香料加5ug黄暗色链霉菌活性物质的比例,加入烟用香精香料中,可取到最大防腐效果,对紫云的抑菌率达75%,对软珍的抑菌率达91.67%。

[0073] 通过以上实验证明,本发明公开的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)对引起烟用香精香料变质的主要微生物种群巴氏醋杆菌,土壤球菌,芽孢杆菌有明显的抑菌圈,黄暗色链霉菌活性物质对香精香料中微生物有明显的抑制效果,当添加浓度为5ug/ml黄暗色链霉菌活性物质时,抑菌率达75%~91.67%。实验已证明微生物是引起烟用香精香料变质的主要原因,因此本实验所公开的黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*)对烟用香精香料具有明显防腐效果,为烟用香精香料品质防控技术提供了新的防控方向。

[0074] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。