

微生物固体培养基凝固剂研究进展*

吴清平¹ 孙永^{1,2,3} 蔡芷荷⁴ 张菊梅¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)¹

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)² (中国科学院研究生院 北京 100049)³

(广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)⁴

摘要: 明胶是最早使用的固体培养基凝固剂, 已逐渐被琼脂所代替。琼脂由于形成凝胶后透明度高、保水性好、无毒、不被微生物液化等优点, 逐渐成为最常用的凝固剂。后来, 又发现无机硅胶、瓜尔胶、卡拉胶在某些情况下可用作凝固剂。近年来, 兴起一种基于微生物快速检测的快速测试片, 其所用凝固剂发展到黄原胶、刺槐豆角、聚丙烯酸系等。但新型凝固剂在使用过程中仍存在许多弊端, 因此, 从吸水和保水的机理出发对其研究和改性是一项重要的任务。

关键词: 固体培养基, 琼脂, 凝固剂, 高分子聚合物

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 [2006] 05-0145-05

Review of the Gelling Agents for Solid Microbial Media*

WU Qing-Ping¹ SUN Yong^{1,2,3} CAI Zhi-He⁴ ZHANG Ju-Mei¹

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)¹ (Wuhan Institute of Virology, Wuhan 430071)²

(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)³

(Guangdong Huankei Microbial Sci & Tech Co., Ltd., Guangzhou 510070)⁴

Abstract: Gelatin was the first one used as gelling agent for solid media, and then replaced by the agar. Agar gel was clear, good-absorbable, non-toxic and unused by microorganisms, so it became the most popular gel. Afterward, people found the silica gel, guar gum and carrageenan also could be used in some situation. Recently, an express detection slip came out for microbe detection. Its gelling agents were Xanthan gum, Locust bean gum and PAA etc. But there were many disadvantages when used. So it was an important work for us to research and modify them according to the mechanism of absorbing and obtaining water.

Key words: Solid media, Agar, Gelling agent, Macromolecule polymer

在一般常态培养温度下呈固体状态的培养基都称固体培养基。固体培养基的凝固剂一般不是微生物的营养成分, 只起固化或粘合作用。常见凝固剂有琼脂、明胶、无机硅胶等^[1]。此外, 由于微生物快速检测的巨大需求而研制的微生物快速测试片, 是通过凝固剂将营养成份和特异显色物质粘附在塑料载体上而成, 使用前不需进行培养基制备和加热而可直接应用, 如美国3M公司的PetriFilm和广东环凯科技有限公司的微生物计数卡。测试片中凝固剂有瓜尔胶、黄原胶、刺槐豆角、聚丙烯酸系高分子化合物等^[2]。

* 广东省科技计划项目 (No. C12105)

通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: Wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2005-12-16, 修回日期: 2006-03-03

1 琼脂

1.1 琼脂的成分与分子结构 琼脂 (agar) 产自石花菜或其他几种红海藻, 包含有两个组分: 一个是可以形成结实而强力的凝胶, 称“琼脂糖” (agarose); 另一个则是不会发生凝胶化的组分, 称“琼脂胶” (a-garopectin)。琼脂糖约占天然琼脂 80%, 琼脂胶是琼脂糖的硫酸酯。由于琼脂的来源不同, 琼脂糖和琼脂胶的含量也随之变化^[3]。

琼脂糖分子以线型链的形式存在, 它是红海藻的一个成分, 与 *iota*- 和 *kappa*-卡拉胶成镜像关系。这一线型分子链包含有以 (1→3) 联结的 β -D-吡喃半乳糖基单元 (A 单元) 与以 (1→4) 联结的 3, 6-失水 α -D-吡喃半乳糖基单元 (B 单元) 相联结。A 单元及 B 单元构成二糖单元, 因 3, 6-失水环接近于每个 B 单元, 它可以很容易变化而发生水解。琼脂糖的二糖单元及二级结构可表示如图 1^[3,4]:

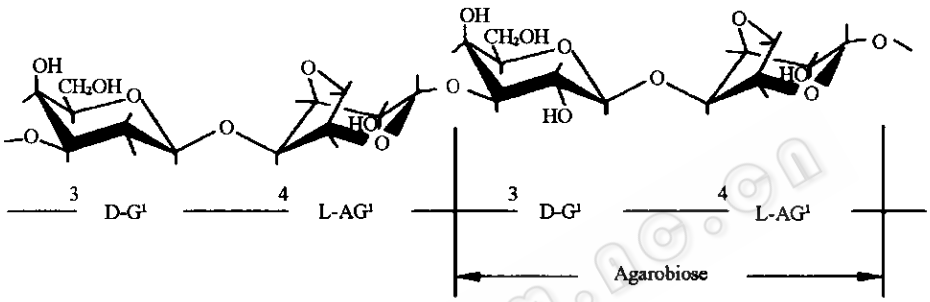


图 1 琼脂糖的二糖单元 (D-G 为 A 单元, L-AG 为 B 单元, Agarobiose 为二糖单元)

1.2 琼脂的物理性质

1.2.1 形态特征: 成品琼脂一般分为细长条状和粉末状。细长条状的琼脂在市场上常被称为“洋菜”, 色类白或淡黄色; 半透明, 表面皱缩, 微有光泽, 质轻软而韧, 不易折断; 完全干燥后, 则脆而易碎; 无嗅无味^[3]。

1.2.2 溶解性: 高纯度的琼脂在常温下实际上不溶于水, 只吸收水分发生溶胀和微微地溶于乙醇胺和甲酰胺, 在接近沸腾的情况下可分散到中水形成溶胶。其浓度达到 15g/L 的溶液时仍清澈透明^[3]。

1.2.3 凝胶化温度: 琼脂的凝胶化温度远低于凝胶融化温度, 其可用于微生物固体培养基的凝固剂也是因为这一点。由不同种类的原料所制取的琼脂, 明显地具有不同的凝固温度, 但来自相同原料的琼脂, 其凝固温度基本上是一致的。用于微生物固体培养基凝固剂琼脂的凝胶化温度一般在 35℃ ~ 40℃, 而凝胶熔点应在 75℃ ~ 85℃^[3]。

酸碱度对琼脂的凝固性影响很大, 而高温高压 (1.1kg/cm², 1 × 10⁵Pa) 的影响很小。酸碱度是琼脂在正常浓度范围内能否凝固的关键因素。当 4.30 < pH < 10.05 时, 琼脂水溶液均可正常凝固, 超过此范围, 培养基不能正常凝固^[5]。

1.3 琼脂的凝胶化原理 凝胶化是指体型缩聚反应进行到一定程度, 反应体系的黏度突然增加, 并且出现具有弹性凝胶的现象。此时, 体系中包含了两部分: 一部分是凝胶, 它具巨型网络结构, 不溶于一切溶剂; 另一部分是溶胶, 其分子量较小, 被笼罩在凝胶的网络结构中^[6]。因此, 凝胶是介于固体和液体之间的一种物质状态。根据交联方式, 凝胶可分为化学交联和物理交联两种。化学交联是高分子链段间以共价键交联起来, 这种交联很牢固, 使高分子只发生溶胀, 而不能熔融更不溶解。物理交联包

括有氢键、库伦力、配位键及物理缠结等形成的线性分子间的交联^[7]。琼脂依靠高分子链段相互作用间可形成氢键而成为凝胶结构。这种氢键会因加热等而被破坏,使凝胶变为溶胶^[8]。

琼脂的凝胶化主要是其琼脂糖之间氢键结合的结果,其含有的大量的水在网络结构稳定上发挥了重要的作用^[9]。凝胶中水有几种状态存在,在分子网络附近的水与网络有很强的相互作用。将紧挨着分子网络的,在极低温度下也不冻结的水称为不冻水;而将在-10℃~-20℃才冻结的水称为束缚水;离网络很远的水,显示与普通水同样的性质,称作自由水^[7]。在溶胶状态,温度接近水沸点时,琼脂分子是一种随机卷曲状态。温度降至凝固点,在凝胶状态时,琼脂分子相互交联,形成三维网络结构,基本结构为左手双螺旋。沿着螺旋轴两侧有很大的空穴,使琼脂能结合足够多的水^[4]。

琼脂的流变性变化是琼脂凝胶化过程中的一个重要特征。在温度高时,其流变行为与稀溶液中的聚物流变行为相似;在温度低至凝固点以下时,流变行为像交联的聚合物;温度在溶胶和凝胶的变化过程中,流变性更为复杂。另外,琼脂的流变性受琼脂的浓度、分子量以及其它物质(如甘油)的影响^[10-12]。

1.4 琼脂在微生物固体培养基凝固剂方面的应用 琼脂是微生物固体培养基和半固体培养基中最常用的性能优良的凝固剂。在液体培养基中加10~20g/L的琼脂后加热融化,凝固后即可得固体培养基,加5g/L的琼脂可得半固体培养基^[11]。陈宏伟经过多次试验后提出:用凝胶强度来计算琼脂的用量更为科学。固体培养基的适宜凝胶强度为250~450g/cm²之间,这样硬度的固体培养基,既有利于物质的扩散和微生物对物质的吸收,又有一定的硬度,有利于划线、涂布和影印等技术的操作。而半固体培养基的适宜凝胶强度为90g/cm²左右,这样的培养基既可以凝固而不流动,又不影响菌体的运动,用手轻轻敲打试管即可使培养基破碎^[13]。

2 明胶

明胶(gelatin)是胶原蛋白经适度降解变性而得到的产物。作为一种蛋白质,明胶的氨基酸组成较为特殊,其含硫氨基酸很少,而甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸四种氨基酸含量很高,约占总氨基酸的67%。明胶大分子是由若干种氨基酸以肽键和次级键连接而成,肽键和次级键决定了大分子的结构,次级键有氢键、盐键、疏水键、酯键和二硫键等。明胶溶液的温度在熔点以上时其分子呈无规则线团构象。当温度降至凝固点以下时,明胶分子的某些链段复旋为左手螺旋。相邻3条左手螺旋链间产生氢键交联,复性为类似胶原的右手超螺旋结构^[14]。明胶成品为无色或淡黄色的透明薄片或微粒。明胶不溶于冷水,但可缓慢吸水膨胀软化,明胶可吸收相当于其重量5~10倍的水。明胶可溶于热水,形成热可逆性凝胶^[14]。

明胶是最早用来作为凝固剂的物质,用量为液体培养基的5%~12%。可是由于明胶的融化温度(约25℃)和凝固温度(约20℃)相差不大、比较容易被微生物分解、不适于较高温度下长期使用,以及耐加压灭菌较差等缺点,已逐渐被琼脂所代替^[1]。

3 无机硅胶

硅胶(silica gel)是由多聚硅酸经分子内脱水而形成的一种多孔性物质,其化学组SiO₂·XH₂O,属于无定性结构。硅胶不溶于水和任何溶剂,无毒无味。由于硅胶为多

孔性物质, 具有较大的比表面, 而且表面的羟基具有一定程度的极性, 所以有很好的吸水性^[15]。用于固体培养基的硅胶是由无机的硅酸钠及硅酸钾被盐酸及硫酸中和时而形成的胶体, 它不含有有机物, 主要用于分离与培养自养微生物的培养基^[1]。

4 瓜尔胶

瓜尔胶 (guar gum) 是一种高纯化多糖, 就分子结构来说是一种非离子化的半乳甘露聚糖, 它以 β - (1 \rightarrow 4) 键连接的聚 *D*-吡喃甘露糖为主链, *D*-吡喃半乳糖支链以 α - (1 \rightarrow 6) 键连接在主链上, 其中甘露糖与半乳糖的摩尔比约为 2:1^[16]。瓜尔胶极易溶于冷水和热水、无毒、在一般情况下不形成凝胶, 不过在高压灭菌锅灭菌冷却后可以形成凝胶。并且形成的凝胶在 70℃ 以下是不可溶的^[17]。

瓜尔胶在固体培养基的用量为 30 ~ 40 g/L, 根据其高温不溶的特性, 可用于嗜热菌的分离和保藏。细菌和真菌在其上面有良好的生长, 真菌还要比在琼脂上长得更好一些, 而且瓜尔胶要比琼脂便宜 8 倍, 所以其有巨大的应用价值^[17]。

5 卡拉胶

卡拉胶 (carrageenan) 是从海藻中提取来的一种阴离子多糖, 其结构根据原料来源不同而不同, 可溶于热水, 不溶于乙醇、异丙醇等, 基本骨架是 α -1, 3 和 β -1, 4 糖苷键交替联结形成的半乳聚糖重复单元。卡拉胶的粘度很大, 在浓度低至 2 g/L 时也能形成凝胶, 不过形成凝胶时是离子 (K^+ 或 Ca^+) 依赖性的。卡拉胶约 60℃ 熔化, 45℃ 凝固^[18]。由于卡拉胶是一种离子依赖型凝胶剂, 所以无法完全代替琼脂。但可用于某些微生物的培养, 其用量约为 10g/L^[19]。

6 黄原胶

黄原胶 (xanthan gum) 是由 *D*-葡萄糖、*D*-甘露糖、*D*-葡萄糖醛酸、乙酸和丙酮酸组成的“五糖重复单元”结构聚合物。主链和侧链间通过氢键形成双螺旋和多重螺旋结构^[20]。黄原胶既能溶于热水, 又能溶于冷水; 不能发生凝胶化; 具有很强的粘性, 具有高度的生物稳定性, 多数酶类不能对其降解^[20]。

7 刺槐豆胶

刺槐豆胶 (locust bean gum) 是一种无色, 无味的植物胚乳精制多糖。刺槐豆胶是以甘露糖为主链的半乳甘露聚糖, 甘露糖与半乳糖的比例为 1:4, 分子量大约为 300kD。刺槐豆胶本身无凝胶特性, 其最重要的特点是与琼脂、卡拉胶及黄原胶等亲水胶体有良好的凝胶协同效应, 可使复合后的用量水平很低并改善凝胶组织结构。普通刺槐豆胶在冷水中只有部分溶解, 加热至 85℃ 保持 10min 以上才能充分水化^[21]。

8 聚丙烯酸系高分子化合物

聚丙烯酸系 (PAA) 高分子化合物是一种化学合成的高吸水性树脂。高吸水性树脂可以吸收自身质量的几百乃至上千倍的水, 不但具有优良的吸水性能, 而且具有卓越的保水能力; 即使加压, 所吸收的水也不溢出。自然界中能吸水的物质很多, 按其吸水的性质来分, 基本上分为两类: 一类是物理吸附, 其吸水主要是毛细管的吸附原理, 所

以这类物质吸水能力不高,只能吸收自重的几十倍的水,一旦施压,水就逸出。另一类是化学吸附,是通过化学键的方式把水和亲水性物质结合在一起成为一个整体。此种吸附结合很牢,加压也不会失水。高吸水性树脂是由三维空间网络构成的高聚物,它带有大量亲水基团(如羧基、羟基、羧酸盐、酰胺基等)。它的吸水,既有物理吸附,又有化学吸附。因此,它具有神奇的吸水能力以及较高的保水能力^[22]。

9 讨论

虽然琼脂已经被应用了100多年,它的可应用性也得到了大家的充分认可,可是由于其资源的过分开采而导致价格上升,寻找一种较便宜的胶体来代替很有必要。另外,有些情况下琼脂并不适用,如高温培养。这样,需要人们去寻一种新的胶体来代替或兼而用之。过去一段时间里,虽然人们做了大量的尝试,取得了一定的成果,但仍未找到一种可以完全代替之的物质。所以,我们还要继续努力,从琼脂的可应用原理出发,来选择新的胶体或来对现有的胶体改性,以达到应用目的。

快速测试片由于其简便、准确、省时、省力、可应用于现场等特点,将会在检测部门广泛推广。可是现有产品的凝固剂吸水性不好,不能快而均匀地吸收水分,使菌体生长不均匀而导致检测结果的偏差。所以寻找一种可用于检测片的胶体也十分重要。

随着高分子化学的发展,天然高分子聚合物的凝胶化和流变性原理已越来越透彻,吸水、保水原理也已明确。对其改性得到所需的产品是可能的。聚丙烯酸系高分子化合物的合成机理和方法已经十分成熟,合成可用于测试片的高分子物质也是可行的。

参 考 文 献

- [1] 沈 萍主编. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2002. 86 ~ 87.
- [2] Williams. United States Patent, 2003, 6649406.
- [3] 明胶科学与技术编辑部信息组. 明胶科学与技术, 2005, 25 (3): 123 ~ 130.
- [4] Labropoulos K C, Niesz D E, Danforth S C, *et al.* Carbohydrate Polymers, 2002, 50: 393 ~ 406.
- [5] 张端玲, 毛静琴, 程丽芬, 等. 山西林业科技, 1997, 1: 35 ~ 37.
- [6] 林尚安, 陆 耘, 梁兆熙编著. 高分子化学. 北京: 科学出版社, 2000. 272.
- [7] 顾雪蓉, 朱育平编. 凝胶化学. 北京: 化学工业出版社, 2005. 1 ~ 5.
- [8] Ross-Murphy S. B Journal of Texture Studies, 1995, 26: 391 ~ 400.
- [9] Watase M, Nishinari K. Food Hydrocolloids, 1986, 1: 25 ~ 36.
- [10] Labropoulos K C, Niesz D E, Danforth S C, *et al.* Carbohydrate Polymers, 2002, 50: 407 ~ 415.
- [11] Barrangou L M, Daubert C R E. Food Hydrocolloids, 2006, 20: 184 ~ 195.
- [12] A Kh Lahrech, Safouane J, Peyrelasse Physica A, 2005, 358: 205 ~ 211.
- [13] 陈宏伟. 微生物学通报, 2000, 27 (5): 384 ~ 385.
- [14] 娄 翔, 罗晓燕, 尹玉姬, 等. 化学通报, 2005, 6: 452 ~ 457.
- [15] 梅 华, 陈道远, 姚虎脚, 等. 天然气化工, 2004, 29: 21 ~ 25.
- [16] Xiong R C, Chang M Z, Chen J M, *et al.* Chinese Chemical Letters, 2005, 16 (4): 545 ~ 546.
- [17] Jain R, Anjaiah V, Babbar S B. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41: 345 ~ 349
- [18] Norziah M H, Foo S L, Karim A A. Food Hydrocolloids, 2006, 20: 204 ~ 217.
- [19] Bromke B J, Furiga M. J Microbiol Methods, 1991, 13: 61 ~ 65.
- [20] 赵世匡, 程菊花, 张玉苍, 等. 食品科学, 1998, 19 (4) 12 ~ 15.
- [21] 任 平, 阮祥稳, 王冬良. 食品研究与开发, 2004, 25 (5): 39 ~ 44.
- [22] 林润雄, 姜 斌, 黄毓礼. 北京化工大学学报, 1998, 25 (3): 20 ~ 25.