

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1022-1032; 4 September 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.007

链霉菌 M-Z18 膜蛋白 ϵ -聚赖氨酸降解酶的分离纯化、酶学性质及应用

刘庆瑞, 陈旭升*, 曾昕, 韩岱, 毛忠贵*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】研究链霉菌 *Streptomyces* sp. M-Z18 ϵ -聚赖氨酸降解酶(Pld)的分离纯化及其生理生化特性, 并利用该酶制备低聚合度 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)。【方法】菌体细胞经超声破碎、NaSCN 溶解和 HiTrap™ Butyl HP 疏水层析制备到 Pld, 随后研究了其酶学性质、动力学和降解 ϵ -PL 过程, 最后利用常量稀释法比较了不同聚合度范围 ϵ -PL 的最小抑菌浓度。【结果】从 *Streptomyces* sp. M-Z18 细胞膜上分离纯化到 Pld, 纯化倍数为 80.4 倍, 回收率达到 59.3%。以 L-赖氨酸对硝基苯胺为底物, 酶促反应的最适温度为 37℃, 最适 pH 为 7.0, 动力学常数 K_m 为 0.621 mmol/L, V_{max} 为 701.16 nmol/min·mg; 酶活在 pH 7.0-10.0 和 50℃ 以下稳定。降解 ϵ -PL 实验发现, 纯化到的 Pld 以内切方式降解 ϵ -PL。抑菌实验表明, 高聚合度 ϵ -PL(30-35) 对细菌的抑制效果较好, 而低聚合度 ϵ -PL(8-20) 更有利于抑制酵母菌的生长, 各种聚合度 ϵ -PL 对霉菌的生长抑制均较差。【结论】从 ϵ -PL 产生菌中分离纯化到内切型 ϵ -PL 降解酶, 发现不同聚合度范围 ϵ -PL 对微生物的抑制能力存在显著差异。

关键词: ϵ -聚赖氨酸降解酶, 链霉菌, 分离纯化, 聚合度, 最小抑菌浓度

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209(2014)09-1022-11

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)一般是由 25-35 个 L-赖氨酸单体通过 α -COOH 和 ϵ -NH₂ 脱水缩合而成的同型氨基酸聚合物, 分子量为 2500-4500 Da。由于 ϵ -PL 能够高效抑制细菌、真菌和病毒^[1-2] 且具有较高的食品安全性(GRN000135)^[3], 目前 ϵ -PL 主要作为一种优良的生物食品防腐剂被广泛用于日本、韩国、美国 and 欧洲等国家和地区的食品加工领域。

ϵ -PL 广谱抑菌机制在于其能够在酸性、中性及

微碱性环境下与微生物细胞膜通过静电吸附作用相结合, 从而引起微生物细胞质的异常分布, 进而造成微生物的死亡^[1]。由此可以看出, ϵ -PL 的抑菌作用并非具有特异性, 故 ϵ -PL 对其自身产生菌也具有一定的抑制作用^[4]。然而, ϵ -PL 产生菌和耐受菌具备抵抗 ϵ -PL 的生理机制—合成 ϵ -PL 降解酶(ϵ -PL-degrading enzyme, Pld), 以保护自身的正常生长和繁殖。已有文献报道显示, Pld 能够以内切或外切的方式降解 ϵ -PL。Kito 等于 2002 年首次在 ϵ -PL 产生

基金项目: 国家自然科学基金(31301556); 江苏省科技支撑计划(BE2012616); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2013015-11)

* 通信作者。陈旭升, Tel/Fax: +86-510-85918296, E-mail: chenxs@jiangnan.edu.cn; 毛忠贵, Tel/Fax: +86-510-85918279, E-mail: maozg@jiangnan.edu.cn

作者简介: 刘庆瑞(1988-), 女, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为酶的分离与纯化。E-mail: liuqingrui5@163.com

收稿日期: 2013-12-24; **修回日期:** 2014-03-07

菌白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) 细胞膜上分离纯化到外切型 Pld^[5], 随后他们在 ϵ -PL 耐受菌株金黄杆菌 (*Chryseobacterium* sp. OJ7) 分离纯化到内切型 Pld^[6]。在此之后, 研究者们陆续在 ϵ -PL 产生菌北里胞菌 (*Kitasatospora* sp. CCTCC M205012)^[7] 和淀粉酶产生链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes* TUST2)^[8] 细胞膜上也发现了 Pld 的存在。然而, 到目前为止, 尚未有在 ϵ -PL 产生菌中分离纯化到内切型 Pld 的报道。另外, Shima 等^[1] 指出 ϵ -PL 聚合度在 10 以上才会具有抑菌活性, 而 Nishikawa 和 Ogawa 发现高聚合度的 ϵ -PL 呈现一定的苦味^[9]。因此, 将 ϵ -PL 聚合度控制在何种合适的分布范围成为其在食品行业高效应用的重要研究内容。

本文以一株具有潜在工业应用价值的 ϵ -PL 高产菌 *Streptomyces* sp. M-Z18^[10] 为研究对象, 建立了一步疏水层析纯化 Pld 的方法, 并对纯化得到的 Pld 酶学性质进行了系统研究。在此基础上, 将内切型 Pld 用于制备低聚合度 ϵ -PL, 并比较了不同聚合度分布范围的 ϵ -PL 样品对主要常见食品污染微生物的抑制能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 链霉菌 *Streptomyces* sp. M-Z18, 由本实验室保藏的一株具有潜在工业应用价值的 ϵ -PL 高产菌。抑菌实验中的金黄色葡萄球菌、变形杆菌、产气杆菌为本实验室保藏, 其他菌株由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心 (CICIM-CU) 赠送。

1.1.2 主要试剂和仪器: L-赖氨酸对硝基苯胺 (Sigma 公司), BCA 试剂盒和标准分子量蛋白 (上海 Sangon 公司), ϵ -PL 样品 (日本 JNC 公司, 纯度 98% 以上), 其他试剂均为国药集团分析纯试剂。蛋白质电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), AKTA avant 25 蛋白质纯化仪和 HiTrapTM Butyl HP 预装柱 (美国 GE 公司), 酶标仪 PLUS 384 (美国 Molecular Devices 公司), 基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪 MALDI-TOF/TOF MS (美国 Bruker Daltonics Inc 公司), 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), Millipore 切向流超滤系统和 Pellicon 2 膜包 (美国 Millipore 公司), 超声波细胞破碎仪 (南京舜玛仪器设备有限公司)。

1.1.3 培养基及培养条件: *Streptomyces* sp. M-Z18 菌体生长培养条件参照文献 [10], 培养基是在 M3G 培养基的基础上添加 21 g/L 柠檬酸。细菌采用肉汤液体培养基, 酵母菌采用 YPD 液体培养基, 霉菌采用 PDA 液体培养基。

1.2 Pld 的分离纯化与鉴定

1.2.1 Pld 在细胞中的位置确定: 将摇瓶培养 24 h 的细胞培养液经 $2348 \times g$ 离心 10 min, 分别收集上清液 I (细胞外蛋白) 和菌体沉淀; 菌体细胞沉淀经 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 3 次后取 3 g 湿菌体重悬于 20 mL 该缓冲液中, 冰浴条件下超声破碎 (260 W, 破 2 s 停 2 s, 工作时间 10 min) 后 $6010 \times g$ 离心 20 min, 分别收集上清液 II (细胞内蛋白) 和细胞碎片。细胞碎片用 20 mL pH 7.0 的磷酸钾缓冲液 (含 1.6 mol/L NaSCN) 处理 5 min, 以溶解出细胞膜蛋白, 随后 $6010 \times g$ 离心 20 min, 即得上清液 III (细胞膜蛋白)。分别测定上清液 I、II 和 III 中 Pld 活性, 并以细胞外蛋白、细胞内蛋白和细胞膜蛋白的 Pld 总活性为 100%, 分别计算 Pld 在菌体细胞不同位置的活性分布。

1.2.2 Pld 的纯化: 按方法 1.2.1 制备的细胞膜粗蛋白用含 5% 甘油的 PBS 缓冲液透析 (截留分子量为 8 - 14 kDa) 过夜, 除去 NaSCN, 即为粗酶液。粗酶液上样于已用 PBS 缓冲液平衡好的 HiTrapTM Butyl HP 层析柱, 用 10 mmol/L 碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.0) 进行洗脱, 并按峰收集洗脱液, 再测定各管中 Pld 活性和蛋白含量。

1.2.3 SDS-PAGE 分析: 参照文献 [11], 采用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶。其中, 非还原 SDS-PAGE 样品处理时不加热和未添加 1,4-二硫代苏糖醇。

1.2.4 Pld 的 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定: 参照文献 [12], 对 Pld 进行 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定。

1.3 Pld 的酶学性质

1.3.1 Pld 的最适温度及热稳定性: 在 pH 7.0 的 100 mmol/L Tris/HCl 缓冲液中, 于不同温度 (20、25、30、35、37、40、45 $^{\circ}$ C) 下测定酶活, 以酶活最高者为 100%, 计算相对酶活性, 以考察 Pld 的最适反应温度。将酶液于上述缓冲液中在 4、30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C 分别放置 1 h, 并每隔 10 min 测定剩余酶活性, 以酶活最高者为 100%, 计算相对酶活性, 以考察 Pld 对温度的稳定性。

1.3.2 Pld 的最适 pH 及 pH 稳定性: 使用不同 pH

值的 100 mmol/L 缓冲液 [柠檬酸/柠檬酸钠 (pH 4.0 - 6.0)、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾 (pH 6.0 - 7.5)、甘氨酸/NaOH (pH 9.0 - 10.0)、Tris/HCl (pH 7.0 - 9.0)、巴比妥钠/HCl (pH 7.5 - 9.5)、乙酸/乙酸钠 (pH 4.0 - 6.0)、HEPES/NaOH (pH 6.0 - 8.0)], 于 37°C 下测定酶活力, 以酶活最高者为 100%, 计算相对酶活力, 以研究 Pld 酶促反应最适 pH。将酶液分别置于不同缓冲体系构成的不同 pH 值 (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0) 条件下, 于 4°C 放置 24 h 后测定剩余酶活性, 以酶活最高者为 100%, 计算相对酶活, 以研究 Pld 的 pH 稳定性。

1.3.3 金属离子和 EDTA 对 Pld 活性的影响: 在 pH 7.0 的 100 mmol/L Tris/HCl 缓冲液组成的反应体系中分别加入终浓度为 1 mmol/L 各种金属离子和 EDTA, 37°C 条件下测定酶活性, 以不含金属离子和 EDTA 的反应体系为对照, 计算相对酶活力, 观察金属离子和 EDTA 对 Pld 酶活性的影响。

1.3.4 动力学常数 K_m 及 V_{max} 的测定: 在 pH 7.0 的 100 mmol/L Tris/HCl 缓冲液中, 将酶液与不同浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L) 的 L-赖氨酸对硝基苯胺于 37°C 反应, 测定酶的反应初速率。用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出以 L-赖氨酸对硝基苯胺为底物的酶的 K_m 及 V_{max} 。

1.4 Pld 降解 ϵ -PL 过程研究

向 pH 7.0、100 mmol/L Tris/HCl (含 1 mmol/L Li^+) 中添加 0.5 U Pld 和 10 mg ϵ -PL, 使得该反应体系的终体积为 10 mL, 置于 37°C, 200 r/min 条件下, 连续降解 36 h。在此期间, 每间隔 6 - 12 h 进行取样, 再利用 MALDI-TOF MS 和 HPLC 分别检测留样中 ϵ -PL 聚合度和 L-赖氨酸含量, 以研究 ϵ -PL 随时间的降解规律。

1.5 不同聚合度范围 ϵ -PL 的抑菌效果比较

1.5.1 高聚合度和低聚合度分布范围 ϵ -PL 样品的制备: 将自然 ϵ -PL 样品 (日本 JNC 公司) 配置成 25 g/L 水溶液, 使用 Millipore 小型切向流超滤系统, 采用截留分子量为 1 kDa 的 Pellicon 2 膜包进行超滤浓缩, 直到透过液中不再有 ϵ -PL 透过时结束超滤操作, 将浓缩液冻干后即得到高聚合度分布范围 ϵ -PL 样品, 并利用 MALDI-TOF MS 测定该样品中 ϵ -PL 聚合度分布范围。

向 pH 7.0 的 100 mmol/L Tris/HCl 缓冲液体系

(含 1 mmol/L Li^+) 中添加 1 g ϵ -PL 和 50 U Pld 粗酶液 (1.2.2 制备), 终体积为 100 mL, 于 37°C、200 r/min 条件下降解 36 h。降解结束后, 煮沸 10 min, 6010 × g 离心 20 min, 将上清液冻干后即得到低聚合度分布范围 ϵ -PL 样品, 并利用 MALDI-TOF MS 测定该样品中 ϵ -PL 聚合度分布范围。

1.5.2 菌悬液制备: 细菌悬液制备参照文献 [13]。酵母菌、霉菌悬液制备: 用接种环挑取活化后的酵母菌至 YPD 培养基中, 挑取活化后的霉菌至 PDA 培养基中, 稀释至酵母数或孢子数 $1 - 5 \times 10^3$ 备用。

1.5.3 不同聚合度分布范围 ϵ -PL 样品的最小抑菌浓度 (MIC) 测定: 采用常量稀释法, 向每个试管内加入 1 mL 倍比稀释后的 ϵ -PL 溶液和 1 mL 上述制备好的接种物, 每管最终细菌 [13] 菌液浓度约为 5×10^5 cfu/mL, 酵母菌 [14]、霉菌 [15] 终浓度为 0.5 - 2500 cfu/mL。其中, 细菌第 1 管至第 11 管 ϵ -PL 浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/mL, 酵母菌、霉菌第 1 管至第 11 管 ϵ -PL 浓度分别为 1280、640、320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25 μ g/mL。细菌于 35°C 培养 16 h, 酵母菌、霉菌于 35°C 培养 48 h 后, 肉眼观察以完全抑制菌体生长的最低 ϵ -PL 浓度为最小抑菌浓度。

1.6 测定方法

1.6.1 Pld 酶活性测定: 以对硝基苯胺的生成速率来表示酶活性大小, 参照文献 [5]。在 pH 7.0、100 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液中, 37°C 条件下每分钟产生 1 μ mol 对硝基苯胺所需要的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

1.6.2 蛋白质浓度测定: 蛋白质浓度测定采用 BCA 法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.6.3 ϵ -PL 浓度及聚合度检测: ϵ -PL 浓度测定采用甲基橙比色法, 具体参照文献 [16]。 ϵ -PL 聚合度测定使用 MALDI-TOF MS, 基质为 2,5-二羟基苯甲酸。

1.6.4 L-赖氨酸含量测定: 参照文献 [17], 样品经过 9-氯甲酸苄甲酯 (FMOC) 柱前衍生化, 然后在 C18 反相柱 ODS HYPERSIL 上分离。

2 结果和分析

2.1 Pld 在 *Streptomyces sp.* M-Z18 中位置的确定
已有报道显示, Pld 可以被分泌到培养液中 [6]、存在胞质中 [18] 和细胞膜上 [5,7-8], 因此确定

Streptomyces sp. M-Z18 中 Pld 存在位置是分离纯化该酶的重要前提。图 1 显示的是 *Streptomyces* sp. M-Z18 的细胞外、细胞内和细胞膜上 Pld 活性分布情况。

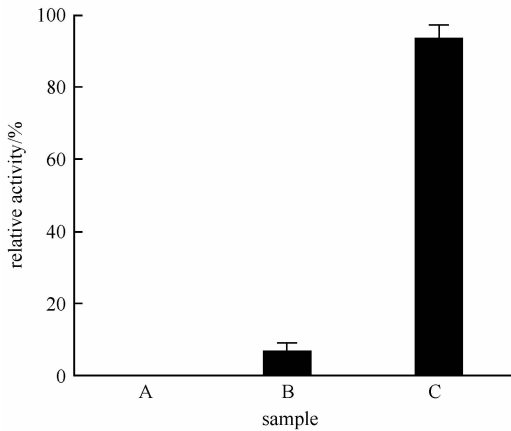


图 1. Pld 在 *Streptomyces* sp. M-Z18 细胞中的分布

Figure 1. The distribution of Pld in *Streptomyces* sp. M-Z18. A: Extracellular protein; B: Intracellular protein; C: Membrane protein.

从图 1 中可以看出, *Streptomyces* sp. M-Z18 的 Pld 活性主要集中在细胞膜上; 而在细胞内检测到少许 Pld 酶活性, 可能是细胞破碎过程中从细胞膜中脱落的 Pld 引起。菌体培养液中未检测到 Pld 酶活性, 表明该酶是一种非分泌蛋白。由此可以确定, *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 是一种细胞膜结合蛋白。

这一结果与已报道的所有 ϵ -PL 产生菌中 Pld 的存在位置相一致^[5,7-8]。

2.2 Pld 的分离纯化与鉴定

2.2.1 Pld 的分离纯化: 由于 Pld 为细胞膜结合蛋白, 疏水性较强, 故选择疏水性较弱的 HiTrap™ Butyl HP 层析柱用于选择性纯化 Pld。将已制备好的 Pld 粗酶液上样于 PBS 缓冲液平衡好的 HiTrap™ Butyl HP 层析柱, 随后用 10 mmol/L 碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 10.0) 进行洗脱, 按峰收集洗脱液并测定各管 Pld 酶活性与蛋白含量, 结果如图 2 所示。经过一步疏水层析纯化, 实现 Pld 纯化 80.4 倍, 比酶活达到 10.05 U/mg, 回收率为 59.3%, 分离纯化结果见表 1。

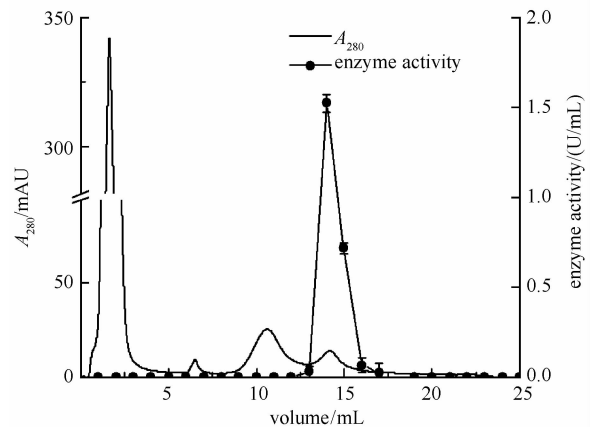


图 2. HiTrap™ Butyl HP 疏水作用色谱

Figure 2. Hydrophobic chromatography of Pld on HiTrap™ Butyl HP.

表 1. *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 的分离纯化过程

Table 1. Purification process of Pld from *Streptomyces* sp. M-Z18

Step	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Yield/%	Purification fold
broken cell	2304	288	0.125	100	1
cell membrane	1628	264	0.162	91.6	1.29
solubilized by NaSCN	424	232	0.547	80.5	4.37
HiTrap™ Butyl HP	17	171	10.050	59.3	80.40

纯化后的 Pld 进行 SDS-PAGE 分析, 发现纯化后的 Pld 为单一条带, 且分子量约为 55 kDa, 结果见图 3-A。说明该酶达到电泳纯, 可以用于后续酶学性质研究。进一步的 Pld 还原与非还原 SDS-PAGE 分析发现 (图 3-B), Pld 在还原与非还原条件下均为同样分子量大小的单一条带, 这表明 Pld 中不存在

二硫键, 因此初步推测该酶为单亚基蛋白^[11]。

2.2.2 Pld 鉴定: 为进一步确定上述获得的蛋白样品为 Pld, 将该蛋白的 MALDI-TOF/TOF MS 二级质谱图导入 Bio Tools 软件, 进行 Mascot MS 搜库, 获得一个 Mascot score 达到 745 和氨基酸覆盖率为 20% 的有效匹配蛋白。该匹配蛋白由 495 个氨基酸组

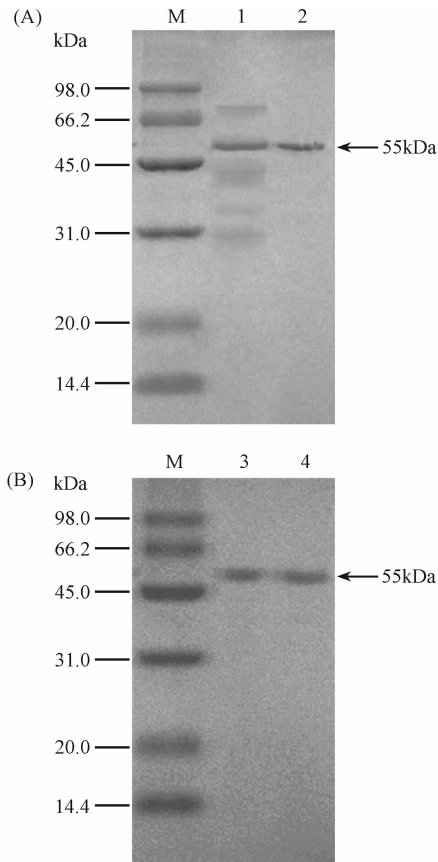


图 3. Pld 的 SDS-PAGE 分析

Figure 3. SDS-PAGE analysis of Pld. M: Molecular weight markers; lane 1: crude enzyme; lane 2: purified Pld; lane 3: purified Pld under reduced condition; lane 4: purified Pld under non-reduced condition (without heating and DL-dithiothreitol addition).

成,分子量 53931 Da,为来自 *Streptomyces albulus* 的 Pld(登录号:gi91204806),其肽指纹图谱中有 9 条序列与 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 相匹配,如表 2 所示,表明该纯化蛋白为 Pld。

2.3 Pld 的酶学性质研究

2.3.1 Pld 最适温度和热稳定性:在 pH7.0,温度为 20–45℃ 条件下考察 Pld 的酶活性变化情况,实验结果如图 4-A 所示。由图可知,该酶在低温范围内,随着温度的升高,酶活性逐渐增加,并在 37℃ 时酶活性达到最高;而当温度继续升高,Pld 活力呈现迅速下降趋势。这一实验结果不同于与其他文献中报道的 Pld 最适温度为 30℃ 的实验结果^[7–8]。热稳定性实验结果如图 4-B 所示,Pld 在 4–50℃ 活力较稳定,维持 60 min 后相对酶活仍在 90% 以上。然而,随着温度的进一步升高,酶活稳定性开始显著下降。当 Pld 在 60℃ 维持 60 min,酶活下降了 40%;而在 70℃ 维持 10 min,酶活即完全丧失,这表明温度对 Pld 的稳定性有较大影响。

2.3.2 Pld 最适反应 pH 及 pH 稳定性:在 37℃,不同缓冲液体系形成的 pH 4.0–10.0 环境下考察 Pld 的酶活力变化,实验结果见图 5A。由图可以看出,Pld 最适 pH 为 7.0,且在 100 mmol/L Tris/HCl 中酶活力最高,这与已报道的结果相一致^[5, 7–8, 18]。有趣的是,Pld 在不同缓冲体系所形成的同一 pH 条件下表现出很大的酶活力差异(如 pH 7.0),这种差异可能是由于组成缓冲体系的盐离子种类的不同造成的。为考察 Pld 的 pH 稳定性,将 Pld 在 pH 3.0–11.0 条件下分别保存 24 h 后在 100 mmol/L Tris/HCl 中测定其酶活性,实验结果如图 5B 所示。从图中可以看出,Pld 在 pH 3.0 和 pH 11.0 条件下保存 24 h 后酶活性会完全丧失,而在 pH 4.0–9.0 的条件下酶活性保留值会随着 pH 升高不断升高,其中在 pH 9.0 时酶活保留值达到最大。这说明该酶在碱性条件下相对稳定,具有较高的碱依赖性。

表 2. 与 *Streptomyces albulus* 中 Pld 的匹配肽段

Table 2. Matched peptides with Pld of *Streptomyces albulus*

Start-end	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Peptide
48–54	889.4659	888.4586	888.4454	R. VSHYDLR. L
55–73	2074.1871	2073.1789	2073.1470	R. LKYQPATDLLEGTATLLAR. T
57–73	1832.9990	1831.9917	1831.9680	K. YQPATDLLEGTATLLAR. T
74–88	1754.9262	1753.9189	1753.8999	R. TTQDLRFNLDLFGK. V
99–119	2227.1880	2226.1808	2226.1532	K. ATFATSGKHELEVTPTPLEK. G
129–146	2010.0664	2009.0591	2009.0370	R. YAGKPSLEKIDGFTAWAR. T
138–146	1036.5383	1035.5310	1035.5138	K. IDGFTAWAR. T
389–397	1100.5200	1099.5217	1099.4934	K. QFDSAVYDR. G
407–419	1537.8540	1536.8467	1536.8188	R. NKLGDVFFDLLK. S

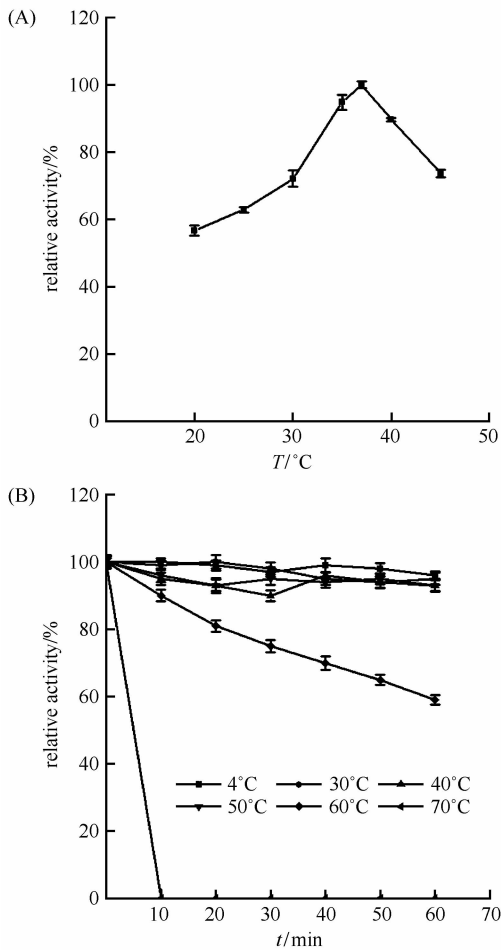


图 4. Pld 最适反应温度及其热稳定性

Figure 4. The optimal temperature (A) and thermal stability (B) of Pld.

2.3.3 金属离子和 EDTA 对 Pld 活力的影响: 在 Pld 酶促反应体系中分别添加终浓度为 1 mmol/L 各种金属离子和 EDTA, 其中以不添加的反应体系作为对照, 并设定其酶活为 100%, 考察金属离子和 EDTA 对 Pld 活力的影响, 结果见表 3。从表中可以看出, Ca^{2+} 和 Li^{+} 对酶活力有一定的促进作用, Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 可以显著抑制酶活力, 而 Cu^{2+} 则能够完全抑制该酶活力。另外, EDTA 可以显著抑制酶活力, 表明 Pld 是一种金属依赖酶。Kito et al.^[5] 用邻菲咯啉将 *Streptomyces albulus* Pld 螯合以后, 发现脱除辅酶后的 Pld 会失去活力, 但当添加 1 mmol/L Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 可以使得 Pld 酶活力恢复 60% 以上, 而添加 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 则不能恢复该酶活力。Feng et al.^[7] 研究发现 Co^{2+} 对

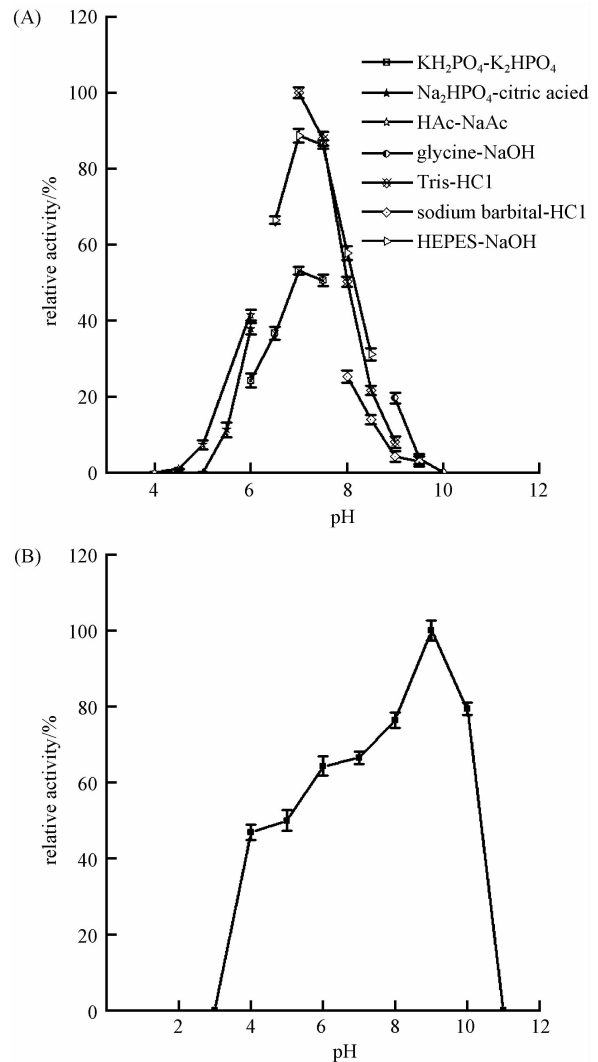


图 5. Pld 的最适反应 pH 及其 pH 稳定性

Figure 5. The optimal pH (A) and pH stability (B) of Pld.

Kitasatospora sp. CCTCC M205012 Pld 有激活作用, 而 Ca^{2+} 对其活力却有抑制作用。谭之磊等^[8] 发现 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 Pld 活力有激活作用, 而 Ag^{+} 、 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 对其有抑制作用。可见, 目前发现的 ϵ -PL 产生菌细胞膜结合 Pld 均为金属依赖酶, 但不同来源的 Pld 酶活力对金属离子种类的依赖性存在着明显差异。

2.3.4 Pld 动力学米氏常数 K_m 及最大反应速率 V_{\max} 测定: 利用不同浓度的 L-赖氨酸对硝基苯胺 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L) 作为底物, 测定 Pld 的反应初速率。按照米氏方程, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求得 Pld 的表观米氏常数 K_m 为 0.621 mmol/L, 最大反应速率 V_{\max} 为

701.16 nmol/min · mg。该 Pld 动力学常数较 Feng 等^[7]报道的 K_m (0.216 mmol/L) 较大,这说明

Streptomyces sp. M-Z18 Pld 对 L-赖氨酸对硝基苯胺亲和力较弱。

表 3. 金属离子及 EDTA 对 Pld 活力的影响

Table 3. Effect of metal ion and EDTA on Pld activity at their concentrations of 1 mmol/L, respectively

Ion	Control	Zn ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Li ⁺	Ca ²⁺	Ba ²⁺	Co ²⁺	EDTA
relative activity/%	100.00	59.65	94.36	42.08	0	39.26	38.61	110.34	109.43	43.60	21.90	6.94

2.4 Pld 降解 ϵ -PL 过程研究

根据上述酶学性质研究结果,确定了 Pld 降解 ϵ -PL 最佳条件为: pH 7.0 的 100 mmol/L Tris/HCl

缓冲体系, 1 mmol/L Li⁺, 37°C。为研究 Pld 降解 ϵ -PL 的过程,向该体系(10 mL)中添加 10 mg ϵ -PL 和 0.5 U Pld,利用 MALDI-TOF MS 和 HPLC 检测 ϵ -PL

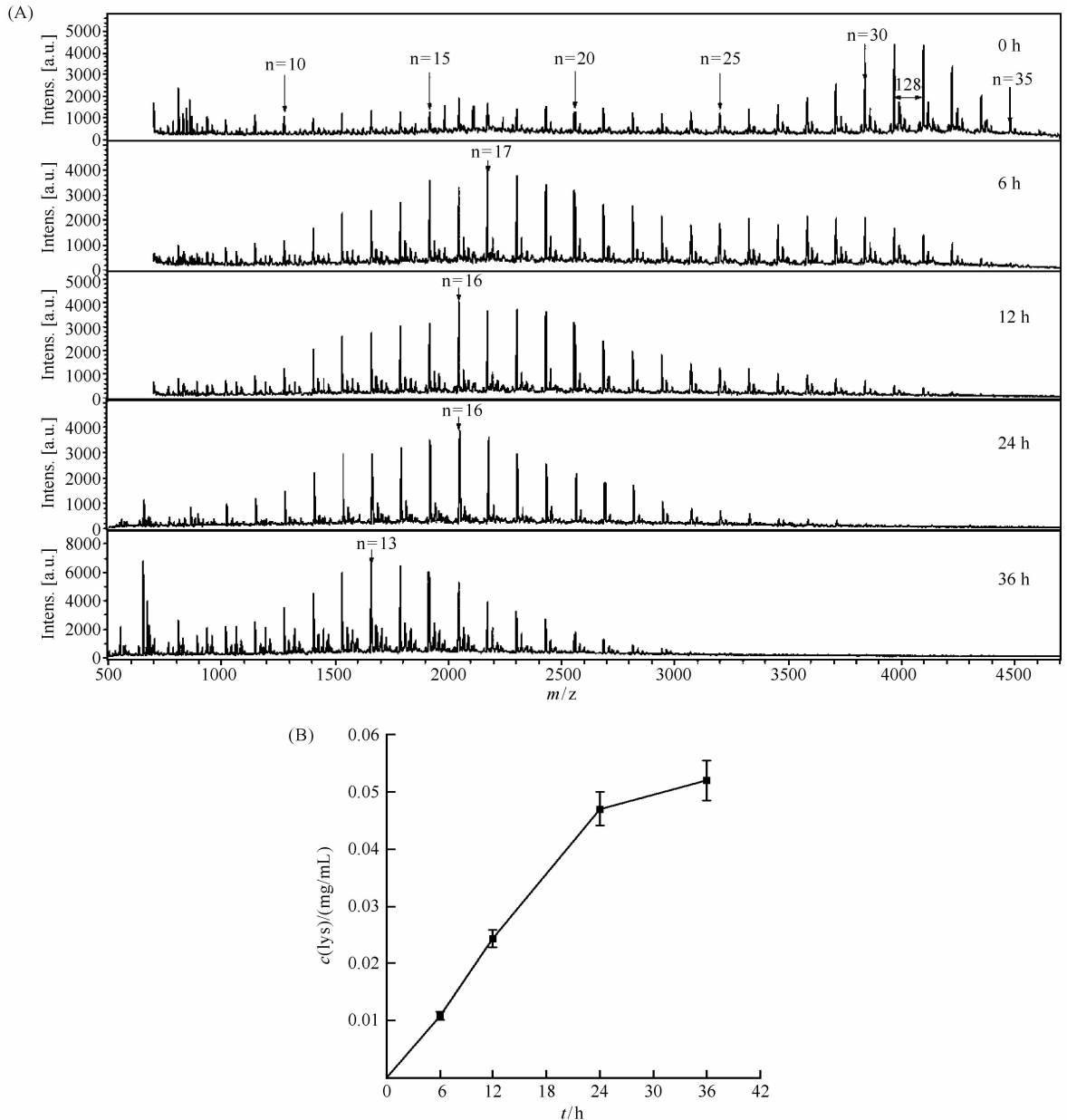


图 6. Pld 降解 ϵ -PL 过程

Figure 6. Time profiles of ϵ -PL degradation by the purified Pld from *Streptomyces* sp. M-Z18. A: MALDI-TOF MS of ϵ -PL degradation by the purified Pld, $n = (m - 18.02) / 128.17$. B: L-Lysine formation by the purified Pld.

聚合度和 L-赖氨酸生成量随时间的变化, 实验结果如图 6 所示。

从图 6-A 可以看出, 随着降解时间延长, 高聚合度 ϵ -PL 逐渐减小; 降解 24 h 后, 聚合度大于 25 的 ϵ -PL 基本全部消失。然而, 当降解时间延长到 36 h 时, ϵ -PL 降解速率明显下降, 并最终维持 ϵ -PL 聚合度在 8-20。24 h 以后 Pld 降解 ϵ -PL 速率下降, 一方面可能是由于 Pld 活性下降, 另一方面可能是 Pld 对低聚合度 ϵ -PL 底物亲和力不如高聚合度强。图 6-B 显示的是 ϵ -PL 降解过程中 L-赖氨酸生成量随时间的变化。尽管 L-赖氨酸生成量随着降解时间的延长而增加, 但整个过程中 L-赖氨酸生成量极低, 不足 ϵ -PL 总量的 5%。因此, 初步判定该酶为内切型 Pld。

2.5 不同聚合度分布范围 ϵ -PL 的抑菌效果比较

基于 Pld 能够降解 ϵ -PL 的特点, 可以利用 Pld 粗酶制备到低聚合度分布范围 ϵ -PL, 故考察了 3 种聚合度分布范围(自然、高聚合度和低聚合度)的 ϵ -

PL 对常见食品污染微生物革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母菌、霉菌的抑制作用, 实验结果如表 4 所示。从表 4 中可以看出, 高聚合度 ϵ -PL (30-35) 不管是对革兰氏阳性还是阴性细菌的 MIC 值基本上是自然 ϵ -PL (8-35) 的 1/2 到 1/4; 而低聚合度 ϵ -PL (8-20) 的 MIC 值大致是自然 ϵ -PL 的 2 到 4 倍。由此可以看出, ϵ -PL 聚合度越高越有利于抑制细菌。然而, 3 种聚合度 ϵ -PL 对真菌的抑制效果远远低于它们对细菌的抑制 (MIC 值均大于 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。对于酵母菌来说, 低聚合度 ϵ -PL 的 MIC 是自然和高聚合度 ϵ -PL 的 1/2, 这表明低聚合度的 ϵ -PL 有利于抑制酵母菌; 对于霉菌来说, 不管是自然还是高、低聚合度 ϵ -PL 对于其抑制能力都很弱 (MIC 均大于 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。上述实验结果表明, 有效抑制细菌和酵母菌需要选用不同聚合度分布范围的 ϵ -PL, 造成这种差异可能是由细菌和酵母菌的细胞壁和/或细胞膜结构组成成分不同引起的。

表 4. 不同聚合度分布范围 ϵ -PL 的最小抑菌浓度

Table 4. MIC of ϵ -PL with different degrees of polymerization on microorganism

Test strain	c(MIC) / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	8-35	30-35	8-20
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.25	4
<i>Bacillus subtilis</i> CICIM B0629	1	0.5	2
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1	0.25	4
Gram-negative bacteria			
<i>Escherichia coli</i> CICIM B0013	1	0.5	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CICIM B0125	1	1	4
<i>Proteusbacillus vulgaris</i>	1	1	2
Yeasts			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CICIM Y0086	320	320	160
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> CICIM Y0045	320	320	160
<i>Torulopsis globosa</i> CICIM Y1017	640	640	320
Molds			
<i>Aspergillus niger</i> CICIM F0045	>1280	>1280	>1280
<i>Aspergillus oryzae</i> CICIM F1005	>1280	>1280	>1280
<i>Penicillium chrysogenum</i> CICIM F0058	>1280	>1280	>1280

3 讨论

本研究通过一步疏水层析操作, 实现 ϵ -PL 生产菌 *Streptomyces* sp. M-Z18 细胞膜蛋白 Pld 的分离与纯化, 并对纯化后的 Pld 酶学性质以及其降解 ϵ -PL 过程进行了深入研究。自从 Kito et al. [5] 利用苯基

琼脂糖凝胶色谱柱从 *Streptomyces albulus* 细胞膜上首次发现并分离纯化到 ϵ -PL 产生菌 Pld 开始, 截止到目前, ϵ -PL 产生菌中发现的 Pld 均为细胞膜结合蛋白。针对 Pld 属于膜蛋白这一特点, 研究者们尝试了不同方法实现 Pld 的有效分离与纯化。Feng 等 [7] 利用 3 步离子交换色谱 DEAE-Sepharose、Source 15Q 和 Mono Q 分离纯化到 *Kitasatospora* sp.

CCTCC M205012 Pld, 实现 Pld 纯化 500 倍, 收率达到 40.9%。谭之磊等^[8] 利用乙醇沉淀结合凝胶色谱层析 Sephadex G100 实现 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 Pld 纯化 4.02 倍和 25.4% 回收率。我们借助疏水层析柱 HiTrap™ Butyl HP 实现 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 纯化 80.4 倍, 回收率达到 59.3%。本研究建立的一步疏水层析纯化 Pld 的方法, 不仅简化了纯化步骤, 避免了酶活损失, 而且还提高了 Pld 收率, 为研究 Pld 酶学性质奠定了基础。

尽管 ϵ -PL 产生菌和耐受菌存在 Pld 的生理基础都是为了应对 ϵ -PL 的胁迫, 但由于菌株之间的差异, 除了 Pld 在细胞上存在的位置不同外, Pld 酶学性质也存在着显著区别差别。表 5 系统比较了已报道的 ϵ -PL 产生菌和耐受菌的 Pld 酶学性质。从表中可以看出, 目前发现的 ϵ -PL 产生菌 Pld 主要存在于细胞膜上且均属于外切酶; 而耐受菌 Pld 则存在

细胞内或细胞外, 并可以通过内切或外切的方式降解 ϵ -PL。虽然本文的研究对象 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 部分肽段表现出与 *Streptomyces albulus* Pld 具有较高的同源性, 但 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 是以内切的方式降解 ϵ -PL, 属于一种内切型 ϵ -PL 降解酶; 另外, 该酶的最适作用温度为 37℃, 显著低于 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 的最适温度 50℃。这些实验结果均说明, 本文分离和纯化到的 *Streptomyces* sp. M-Z18 Pld 是一种有别于 *Streptomyces albulus* Pld 的 ϵ -PL 降解酶。事实上, 不管是 ϵ -PL 耐受菌还是产生菌拥有 Pld 对于 ϵ -PL 生产来说都是十分不利的。这是因为 ϵ -PL 耐受菌可能成为 ϵ -PL 发酵生产的主要污染对象, 而 ϵ -PL 产生菌拥有 Pld 存在将已合成的 ϵ -PL 降解的潜在风险。因此, 研究 Pld 酶学性质成为建立针对性控制 ϵ -PL 发酵过程 Pld 活性 (ϵ -PL 产生菌和耐受菌) 手段的重要内容。

表 5. ϵ -聚赖氨酸降解酶性质

Table 5. Characteristics of Pld from ϵ -PL-producing and -tolerant microorganisms

Strain	Localization	Degradation type	Optimum temperature	Optimum pH	Molecular weight	References
ϵ -PL-producing microorganism						
<i>S. albulus</i>	membrane-bound	exo-type	50℃	7.0	54 (the subunit)	[5]
<i>Kitasatospora</i> sp. CCTCC M205012	membrane-bound	exo-type	30℃	7.0	87	[7]
<i>S. diastatochromogenes</i> TUST2	membrane-bound	/	30℃	7.0	54.7 (the subunit)	[8]
<i>Streptomyces</i> sp. M-Z18	membrane-bound	endo-type	37℃	7.0	55	this study
ϵ -PL-tolerant microorganism						
<i>Sphingobacterium multivorum</i> OJ10	intracellular	exo-type	30℃	7.0	80	[18]
<i>Chryseobacterium</i> sp. OJ7	extracellular	endo-type	55℃	7.5	38.4	[6]

由于高聚合度的 ϵ -PL 呈现一定的苦味, 而聚合度小于 10 的 ϵ -PL 又不具有抑菌活性。因此, 如何有效控制 ϵ -PL 在合适的分布范围成为研究热点^[19-21]。然而, 实现控制 ϵ -PL 聚合度范围的重要前提需要明确不同聚合度范围 ϵ -PL 的抑菌能力。本研究首次探讨了利用内切型 Pld 制备低聚合度 ϵ -PL 的方法, 并实现 ϵ -PL 聚合度由 8-35 减小到 8-20。该方法不仅可以通过控制水解时间方便地获得低聚合度 ϵ -PL, 而且由于 Pld 是疏水性蛋白使得后续的低聚合度 ϵ -PL 分离与纯化操作变得十分简单和高效。同时, 借助超滤浓缩制备到聚合度为 30-35 的高聚合度 ϵ -PL。在此基础上, 比较研究了不同聚合度范围 ϵ -PL (8-35, 30-35 和 8-20) 对细菌和真菌的最小抑菌浓度; 发现高聚合度范围 ϵ -PL

(30-35) 对细菌的抑菌效果较好, 而低聚合度范围 ϵ -PL (8-20) 却能很好的抑制酵母菌。这一实验结果将为利用菌种筛选^[19] 和发酵过程添加多元醇^[20] 和/或糊精^[21] 等方法控制 ϵ -PL 链长以及 ϵ -PL 实际应用提供指导。

参考文献

- [1] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*, 1984, 37(11): 1449-1455.
- [2] Shima S, Fukuhara Y, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(7): 1917-1919.
- [3] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya S, Seki H, Uohama K,

- Seki H, Kimura S, Yanagimoto Y. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37(2): 328-340.
- [4] 刘盛荣. ϵ -聚赖氨酸生物合成及代谢调控研究. 华南理工大学博士学位论文, 2012.
- [5] Kito M, Takimoto R, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and characterization of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from an ϵ -poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus*. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(5): 325-330.
- [6] Kito M, Takimoto R, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and characterization of an ϵ -poly-lysine-degrading enzyme from the ϵ -poly-L-lysine-tolerant *Chryseobacterium* sp. OJ7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(1): 92-94.
- [7] Feng X, Xu H, Xu X, Yao J, Yao Z. Purification and some properties of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012. *Process Biochemistry*, 2008, 43(6): 667-672.
- [8] Tan Z, Jia S, Zhao Y, Yuan G, Cao W. Purification and characterization of an ϵ -Poly-L-lysine-degrading enzyme isolated from *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(12): 2404-2408. (in Chinese)
谭之磊, 贾士儒, 赵颖, 袁国栋, 曹伟锋. 淀粉酶产色链霉菌 TUST2 中 ϵ -聚赖氨酸降解酶的纯化和性质. 高等学校化学学报, 2009, 30(12): 2404-2408.
- [9] Takehara M, Aihara Y, Kawai S, Yoshikabu H, Inoue Y, Hirohara H. Strain producing low molecular weight ϵ -poly-L-lysine and production of low molecular weight ϵ -poly-l-lysine using the strain. Japan patent; 2001-17159, 2001.
- [10] Chen X, Li S, Liao L, Ren X, Li F, Tang L, Zhang J, Mao Z. Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces* sp. M-Z18 from glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(5): 561-567.
- [11] Kong Y, Wu W, Wu R. Comparison of methods used for determination of molecular weight of a newly found protein. *Analytical Instrumentation*, 2003(2): 44-46. (in Chinese)
孔毅, 吴梧桐, 吴如金. 蛋白质分子量测定方法比较研究. 分析仪器, 2003(2): 44-46.
- [12] Xie F, Chao Y, Shi J, Zhang G, Yang J, Qian S. Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* 168 transforming cis-propenylphosphonic acid to fosfomycin. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(6): 735-750. (in Chinese)
解复红, 钞亚鹏, 石家骥, 张国青, 杨敬, 钱世钧. 枯草芽胞杆菌 168 不对称转化产生磷霉素的蛋白质组学分析. 生物工程学报, 2013, 29(6): 735-750.
- [13] 冯羨菊. 微生物实验技术与临床. 郑州: 郑州大学出版社, 2010: 247-306.
- [14] Sun C, Zeng X, Yang Y. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Jiangxi Journal of Medical Laboratory Sciences*. 2007, 25(1): 57-60. (in Chinese)
孙长贵, 曾贤铭, 杨燕. 肉汤稀释法酵母菌药物敏感性试验及质量控制介绍. 江西医学检验, 2007, 25(1): 57-60.
- [15] Sun Z, Li R, Li D, Wan Z, Wang X. Reference NCCLS method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2001, 24(1): 43-44. (in Chinese)
孙志坚, 李若瑜, 李东明, 万喆, 王晓红. 产孢丝状真菌 NCCLS 药敏试验方法的应用. 中华检验医学杂志, 2001, 24(1): 43-44.
- [16] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 1972, 50(2): 569-574.
- [17] 代小芳. 苹果籽、南瓜籽对团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 生长, 部分生理机能, 鱼体脂肪酸和氨基酸组成的影响. 苏州大学硕士学位论文, 2010.
- [18] Kito M, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Occurrence of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme in ϵ -poly-L-lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 207(2): 147-151.
- [19] Takehara M, Hibino A, Saimura M, Hirohara H. High-yield production of short chain length poly (ϵ -l-lysine) consisting of 5 - 20 residues by *Streptomyces aureofaciens*, and its antimicrobial activity. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(9): 1299-1303.
- [20] Nishikawa M, Ogawa K. Inhibition of ϵ -poly-L-lysine biosynthesis in *Streptomycetaceae* bacteria by short-chain polyols. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2306-2312.
- [21] Nishikawa M. Molecular mass control using polyanionic cyclodextrin derivatives for the epsilon-poly-l-lysine biosynthesis by *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(4): 295-298.

Purification, characterization and application of ϵ -poly-L-lysine- degrading enzyme from *Streptomyces* sp. M-Z18

Qingrui Liu, Xusheng Chen^{*}, Xin Zeng, Dai Han, Zhonggui Mao^{*}

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [**Objective**] The ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme (Pld) derived from *Streptomyces* sp. M-Z18 was purified and characterized. Furthermore, Pld was used to produce the low polymerization of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL). [**Methods**] Pld was purified to electrophoretical homogeneity through HiTrapTM Butyl HP hydrophobic chromatography after pretreated by ultrasonic and NaSCN dissolving. Subsequently, enzymatic characteristics, kinetic parameters and the time profile of ϵ -PL degradation by the purified Pld were studied. Meanwhile, we examined the effect of ϵ -PL with different degrees of polymerization on the minimal inhibitory concentration of bacteria and fungi. [**Results**] Pld was purified to homogeneity with a final fold of 80.4 and an overall yield of 59.3%. The optimal temperature and pH for the purified Pld were 37°C and 7.0, respectively. Moreover, the K_m with L-lysyl-p-nitroanilide as substrate was calculated to be 0.621 mmol/L, and the V_{max} was 701.16 nmol/min·mg. Pld was stable in the range of pH 7.0 – 10.0, and temperature up to 50°C, respectively. Time profile of ϵ -PL degradation by the purified Pld indicated that Pld catalyzed endo-type degradation of ϵ -PL. The experiments of minimal inhibitory showed that ϵ -PL with high degree of polymerization (30 – 35) had a superior antibacterial effect on bacteria and the low degree of polymerization ϵ -PL (8 – 20) had a better antibacterial effect on yeasts. However, ϵ -PL with various degrees of polymerization had a poor antibacterial effect on mould. [**Conclusion**] The present result showed that an endo-type Pld from ϵ -PL-producing strain was purified. Meanwhile, it is proved that ϵ -PL with different degrees of polymerization have exhibited significant different antibacterial effects on microorganism.

Keywords: ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme, *Streptomyces*, purification, degree of polymerization, minimal inhibitory concentration

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31301556), by the Jiangsu Key Project of Scientific and Technical Supporting Program (BE2012616) and by the Cooperation Project of Jiangsu Province among Industries, Universities and Institutes (BY2013015-11)

^{*} Corresponding author. Xusheng Chen, Tel/Fax: +86-510-85918296, E-mail: chenxs@jiangnan.edu.cn; Zhonggui Mao, Tel/Fax: +86-510-85918279, E-mail: maozg@jiangnan.edu.cn

Received: 24 December 2013/ Revised: 7 March 2014