微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
2020, 60(5): 887–896
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20190349

Research Article 研究报告

一株 ε-多聚赖氨酸产生菌的筛选与鉴定

徐鹏[1]，王大红[1,2*]，郑迎莹[1]，沈文浩[1]

[1]河南科技大学食品与生物工程学院，河南 洛阳 471023
[2]河南省食品微生物工程技术研究中心，河南 洛阳 471023

摘要：【目的】筛选和鉴定产 ε-多聚赖氨酸(ε-polylysine，ε-PL)的放线菌菌株，测定所产 ε-PL 的结构和聚合度，研究其抑制微生物生长的效果。【方法】利用亚甲基蓝和 ε-PL 因静电排斥而形成透明圈原理筛选 ε-PL 产生菌，采用 Itzhaki 方法复筛。考察分离菌株的形态、生理生化特征和 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因序列的同源性鉴定菌种。结合其波谱特征对其所产 ε-PL 进行结构和聚合度鉴定。采用抑菌圈法考察所产 ε-PL 对 7 株指示菌的抑菌活性。【结果】获得 3 株能够产生 ε-PL 的放线菌，其中 X-18 的 ε-PL 产量最高，达到 0.8 g/L，综合形态、生理和分子生物学分析结果，鉴定为白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)。根据波谱学特征，并与标准品比对，证实该 ε-PL 分子聚合度为 25–30，抑菌实验结果显示，它对细菌的抑菌效果明显好于真菌。【结论】从土壤中分离到 1 株抑菌效果较好的 ε-PL 产生菌 *S. albulus* X-18，丰富了 ε-PL 产生菌资源。

关键词：ε-聚赖氨酸，分离，鉴定

随着食品工业的快速发展，全世界约有 10%–20%的食品损失源于腐败。ε-聚赖氨酸(ε-polylysine，简称 ε-PL)由赖氨酸残基通过 ε 酰胺键连接而成[1]，其聚合度一般为 25–30[2]，由于其含有带正电荷的氨基，它对真菌、细菌、噬菌体或病毒都显示出广泛的抗微生物活性[3]；并且人体可将其分解为 L-赖氨酸，为人体所吸收[4]，具有防腐与营养强化的双重功能，是一种优良的天然生物类食品防腐剂。ε-PL 的研究和商业化应用最早从日本开始，之后在韩国和美国得到广泛应用[5]。2014 年，我国批准 ε-PL 及其盐酸盐作为新型食品添加剂可以在食品工业中使用，该物质还可用于化妆品、药物包被物、基因载体、电子材料和环保材料等方面[6–7]，从而导致全球对 ε-PL

基金项目：国家自然科学基金(31401672)；河南省高校青年骨干教师项目(2016GGJS-060)
*通信作者。Tel/Fax：+86-379-64282342；E-mail：wangdahong2003@163.com
收稿日期：2019-08-04；修回日期：2019-10-05；网络出版日期：2020-03-06

的需求量逐年增加。

在 ε-PL 产生菌中，多以链霉菌属为主，主要为白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)[8]，但也有研究者报道了其他产生菌，段杉等筛选到一株产 ε-PL 的灰橙链霉菌(*Streptomyces griseoaurantiacus*)[9]；Li 等筛选到一株灰色链霉菌(*Streptomyces griseofuscus*)[10]；Ouyang 等从土壤里筛选到一株产 ε-PL 的北里孢菌[11]；此外还有诺氏链霉菌、弗吉尼亚链霉菌、麦角真菌、枯草芽孢杆菌等均能产生 ε-PL。对 ε-PL 的研究在日本进行较早并比较成熟，Kahar 等利用筛选得到的白色链霉菌 S410 经过两段发酵和补料发酵，使 ε-PL 产量达 48.3 g/L[12]。我国的相关研究起步较晚，江南大学、华南理工大学、南京工业大学和南开大学等单位在 ε-聚赖氨酸产生菌株的筛选、诱变、分子改良育种及发酵生产上作了大量研究[13–14]，但与日本相比仍有一定差距，并且具有自主知识产权的菌株较少。本文主要是从土壤中筛选能够生产 ε-PL 的放线菌菌株，采用生理生化特征、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因分析相结合的方法对获得的菌株进行鉴定，并对其代谢产物结构进行鉴定，进一步测定了该 ε-PL 对不同微生物生长的抑制能力，本文研究结果为该菌株的进一步研究和所产生 ε-PL 的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

土样采自河南、河北、江苏等地；以林地、荒草地、菜园为主，取距表层 5–15 cm 的土壤 30 g 左右，自然风干 3–7 d，研钵碾碎后过筛。

1.2 培养基

SG 富集培养基(分离培养基) (g/L)：甘油 10，酵母膏 0.10，NaH_2PO_4 0.68，$MgSO_4·7H_2O$ 0.25，$(NH_4)_2SO_4$ 0.66，pH 7.0。

LB 种子培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母 5，NaCl 5，pH 7.0。

M_3G 发酵培养基(复筛培养基)(g/L)：葡萄糖 50，$(NH_4)_2SO_4$ 10，酵母膏 5，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，$ZnSO_4·7H_2O$ 0.04，$FeSO_4·7H_2O$ 0.03，K_2HPO_4 0.8，KH_2PO_4 1.36，水 1 L，pH 6.8 [葡萄糖，酵母膏，$(NH_4)_2SO_4$ 分开灭菌]。

1.3 实验方法

1.3.1 富集培养：称取 2.5 g 土样，置于 25 mL SG 富集培养基中，30 °C、220 r/min 恒温振荡培养 2 d。

1.3.2 初筛和复筛：对富集培养液进行梯度稀释，取各稀释度的菌悬液 0.2 mL 分别涂布于加有 0.02 g/L 的亚甲基蓝的 SG 分离培养基(含 1.8%琼脂粉)，30 °C 恒温培养，至菌落长出；观察菌落生长情况，对形成透明圈的菌落，反复划线纯化，直至获得纯种。

挑取获得的菌落接种于 LB 种子培养基中，30 °C、220 r/min 培养 24 h。再将生长好的种子液按 6%接种到 M_3G 发酵培养基中，30 °C、220 r/min 发酵 96 h，获得发酵产物。

1.3.3 ε-PL 的定性和定量检测：定性检测：ε-PL 是生物碱，可与碘化铋钾试剂(dragendorff)反应产生红色沉淀。向发酵上清液中滴加数滴 dragendorff 试剂，若有砖红色沉淀出现，即为阳性反应，表明有 ε-PL 产生。

定量检测：参照 Itzhaki 方法[15]。

1.3.4 菌体形态观察和生理生化特征的测定：菌体形态观察：收集菌体→加入 2.5%戊二醛→4 °C 过夜固定→PBS 溶液清洗→乙醇梯度脱水→醋酸异戊酯置换→晾干→离子溅射仪喷银→观察。

生理生化特征的测定参照《常见细菌系统鉴定手册》[16]。

1.3.5 分子生物学鉴定：挑取待鉴定菌株的纯培养物，按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的指示提取 DNA，并进行 PCR 扩增。16S rRNA 基因序列 PCR 扩增采用细菌通用引物 27F (5′-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3′)和 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)；7F (5′-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3′)和 1540R (5′-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)。DNA 促旋酶 B 亚基基因(*gyrB*)序列 PCR 扩增采用的引物为 5′-ATCGTGCCGTCCGAGAACAA-3′和 5′-CTTCACGAAGTCGACGATGC-3′。PCR 扩增采用 PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序，将该的菌株序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对，并使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.3.6 产物鉴定：(1) 发酵产物的分离和纯化：发酵液 10000 r/min 离心 10 min 除去菌体，将上清液 pH 调至 3.0，70 °C 处理 30 min，去除沉淀的杂蛋白，利用弱酸性阳离子树脂 D152 进行产物吸附，树脂采用蒸馏水及 0.2 mol/L 醋酸洗去未吸附的杂质，然后用 0.1 mol/L 盐酸洗脱产物，洗脱液用 2 mol/L NaOH 溶液中和至 pH 7.0 后进行减压蒸发浓缩，活性炭过滤脱色后透析袋除盐，收集袋内液体并冷冻干燥，冻干粉用于结构鉴定和抑菌活性分析。

(2) 发酵产物分子量的测定：发酵产物分子量的测定使用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)，根据其质谱信息，并与 ε-PL 标准品对比，确定其分子量范围。

(3) 产物紫外光谱测定：将发酵产物进行紫外全波长扫描，采样范围 190–1100 nm，采样间距 1 nm，观察其吸收峰特征，并与 ε-PL 标准品对比。

(4) 产物红外光谱测定：取适量充分干燥发酵产物，采用 KBr 压片法，测定该物质在 4000–400 cm^{-1} 范围内的红外吸收光谱，分辨率 1 cm^{-1}，并与 ε-PL 标准品对比。

(5) 核磁共振波谱测定：将适量充分干燥的发酵产物溶于 D_2O 中，使用 400 MHz 核磁共振波谱仪测定其 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR，并与 ε-PL 标准品对比。

1.3.7 抑菌性试验：选取经活化后的供试菌(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、产黄青霉、红曲霉)，制成含菌量或孢子含量为 10^6–10^7 个/mL 的菌悬液，取 1 mL 倒于灭菌平皿中，然后再加入冷却至 45–50 °C 的培养基 30 mL，制成含菌平板，采用打孔法(孔径 5 mm)测定 ε-PL 对不同微生物的抑菌能力。

2 结果和分析

2.1 ε-PL 产生菌的分离筛选

因为 ε-PL 分子带有正电荷，与亚甲基蓝因静电而产生排斥现象，会使亚甲基蓝变色，从而产生透明圈。在本研究中，富集后的样品在含有 0.02 g/L 亚甲基蓝的 SG 分离培养基中培养 5–7 d 后，在 ε-PL 产生菌的菌落周围形成透明圈，结果如图 1 所示。对初筛到的菌株进行定性检测，其中 X-3、X-7、X-18 三株菌产 ε-PL，这 3 株菌在高氏一号固体培养基中培养 5 d，结果如图 2，可以看到明显菌落形态，菌落隆起，较小而分散呈地衣状，不蔓延，最初表面光滑，然后发育一层短菌丝体，表面呈较紧密的绒状，符合放线菌特征。

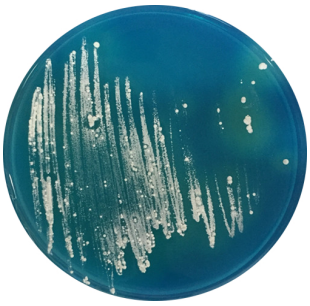

图 1. 产 ε-PL 菌株在含亚甲基蓝的 SG 固体培养基上的透明圈

Figure 1. The transparent zone of the ε-PL-producing strain on SG solid medium with methylene blue.

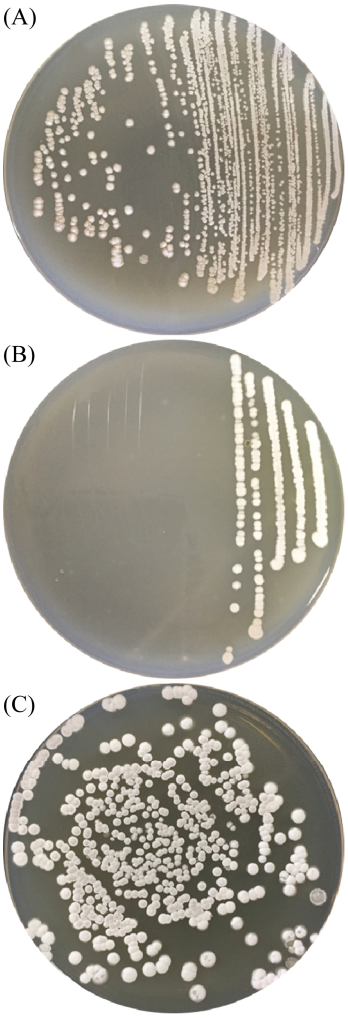

图 2. 产 ε-PL 菌株在高氏一号培养基上的形态(培养 5 d)

Figure 2. The colony of ε-PL-producing strains on Gauze's medium for 5 days. A: X-3; B: X-7; C: X-18.

X-3、X-7 和 X-18 经 M_3G 发酵培养基摇瓶发酵 96 h 后，发酵液采用 Itzhaki 方法定量检测，ε-PL 产量分别为 0.13、0.2、0.8 g/L，选择产量较高的 X-18 进行菌种鉴定以及其产物结构鉴定。

X-18 菌分别接种在高氏一号固体培养基(培养 5 d)和 M_3G 发酵培养基(培养 3 d)中，扫描电镜下观察菌丝形态和孢子的特征。从图 3 可以看出其菌丝体直径约 0.5 μm，在固体平板中，菌丝和孢子堆砌在一起，相互交叉重叠，大量孢子附着在菌丝上；在液体培养基中，菌丝粗壮，表面略有褶皱，菌丝体形态正常。

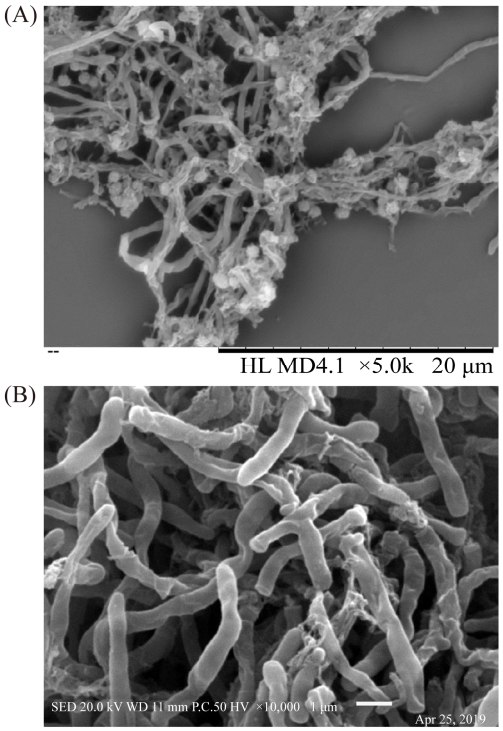

图 3. X-18 菌在高氏一号固体培养基(5 d)和 M3G 发酵培养基(3 d)的菌丝扫描电镜图

Figure 3. Scanning electron micrograph of strain X-18. A: The strain X-18 was cultured on Gauze's medium for 5 days and the mycelium was observed by scanning electron microscope (5000×); B: The strain X-18 was cultured on M_3G medium for 3 days and the mycelium was observed by scanning electron microscope (10000×).

2.2 X-18 菌株的生理生化特征

X-18 菌株的生理生化试验包括接触酶试验、革兰氏染色试验、明胶液化试验、淀粉水解试验和糖类利用试验等。由表 1 可知，X-18 菌株为革兰氏阳性，在温度为 15–40 °C、pH 2.0–10.0 之间均能生长，接触酶试验、明胶液化试验、亚硝酸还原和淀粉水解试验为阳性，V-P 试验和纤维素利用试验为阴性，能够代谢利用葡萄糖、D-甘露醇和麦芽糖等。

表 1. X-18 菌株的生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of strain X-18

Objects	Results	Objects	Results
15 °C growth	+	V-P test	–
40 °C growth	+	Nitrite reduction test	+
pH 2.0 growth	+	Utilization of cellulose	–
pH 10.0 growth	+	Starch hydrolysis test	+
Catalase test	+	Utilization of glucose	+
Gram stain	+	Utilization of D-mannitol	+
Gelatin liquefaction test	+	Utilization of maltose	+

+: positive reaction; –: negative reaction.

2.3 X-18 菌株的分子生物学鉴定

X-18 菌株用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后，使用通用引物 PCR 扩增目的基因，测序由上海生工生物公司完成。所获得 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对，并构建系统发育树(图 4)，结果显示 X-18 菌株 16S rRNA 基因与链霉菌属白色链霉菌 *Streptomyces albulus* NBRC 13410^T (NR112393)序列显示出 99%的相似性。

DNA 促旋酶 B 亚基基因(*gyrB*)在进化速率上较 16S rRNA 基因快，常用于属内种水平上的分类鉴定，将已获得的该菌株 *gyrB* 基因在 NCBI 中进行 BLAST 比对，系统发育树显示其与 *Streptomyces albulus* AS 4.1585^T 的相应基因序列高度相似，说明该菌株与 *Streptomyces albulus* AS 4.1585^T 亲缘关系最近(图 5)。综合菌体形态、生理生化特征、16S rRNA 基因及 *gyrB* 基因鉴定结果，该菌株被鉴定并命名为白色链霉菌 X-18 (*Streptomyces albulus* X-18)。

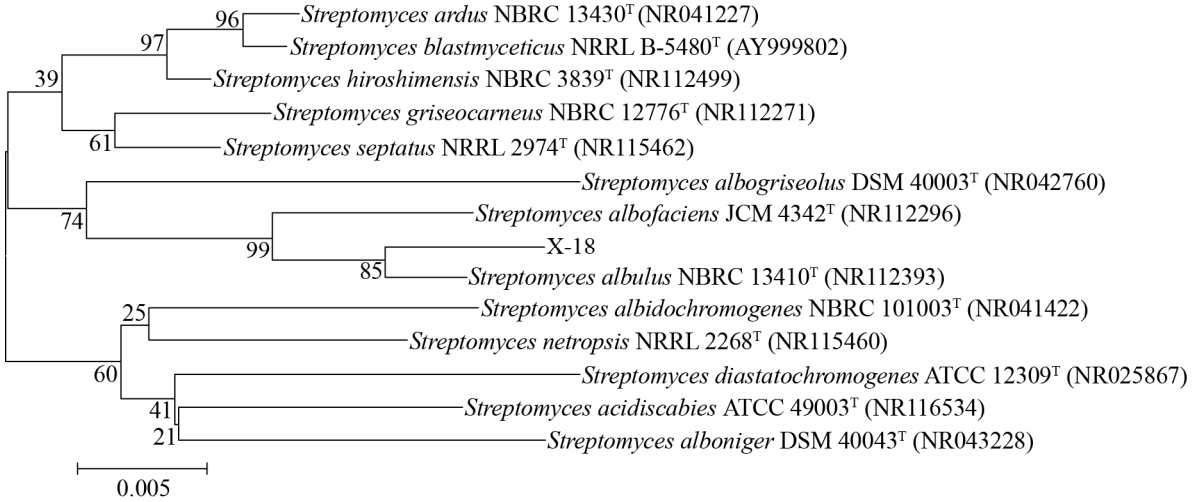

图 4. 基于菌株 X-18 的 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain X-18 and reference strains. The phylogenetic tree was constructed by MEGA 6.0 software using random concatenation of aligned core genes as the dataset. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap; Bar 0.005 at the bottom is the sequence divergence; Those in parentheses are the accession numbers in GenBank.

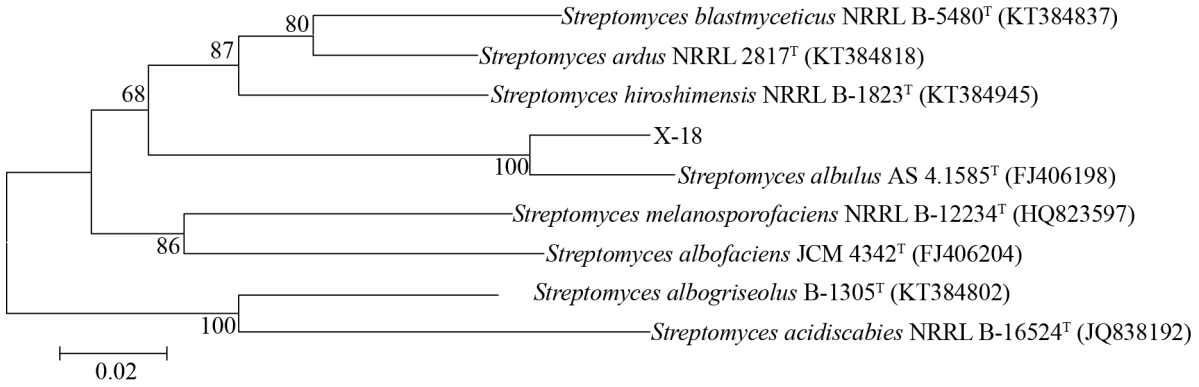

图 5. 基于菌株 X-18 的 gyrB 基因构建的系统发育树

Figure 5. Phylogenetic tree based on the gyrB gene sequence of strain X-18 and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap; Bar 0.02 at the bottom is the sequence divergence; Those in parentheses are the accession numbers in GenBank.

2.4 产物鉴定

2.4.1 紫外全波长扫描：将纯化得到 *S. albulus* X-18 的发酵产物溶于重蒸水中，以重蒸水作对照，用紫外可见分光光度计检测其紫外吸收光谱，测定波长范围为 190–1100 nm。紫外全波长扫描结果如图 6 所示，该物质的最大吸收峰在 192 nm，该图谱与 ε-PL 的标准品基本一致。

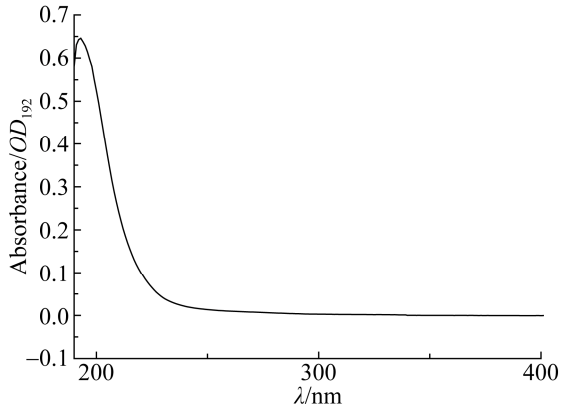

图 6. 发酵产物全波长扫描图

Figure 6. Full-wavelength scanning of the fermentation product. UV spectrum was recorded on a spectrophotometer with the wavelength from 190 nm to 1100 nm.

2.4.2 红外光谱测定：为获取该发酵产物的基团信息，取充分干燥的 *S. albulus* X-18 发酵产物，采用 KBr 压片法，使用红外光谱仪测定该物质在 4000–400 cm^{-1} 范围内的吸收光谱，分辨率 1 cm^{-1}。红外光谱如图 7 所示，从图中可以看出，3389 cm^{-1} 和 3258 cm^{-1} 左右为 N-H 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动，属第一峰区。1670 cm^{-1} 左右为酰胺的特征谱带酰胺Ⅰ带，1510 cm^{-1} 左右为 N-H 弯曲振动(C-N 伸缩振动)即酰胺的特征谱带酰胺Ⅱ带，1263 cm^{-1} 为 C-N 伸缩振动(N-H 弯曲振动)，是酰胺的特征谱带酰胺Ⅲ带。2360 cm^{-1} 可能是未能全扣除空气背景中的二氧化碳。红外光谱表明，*S. albulus* X-18 的发酵产物为一种由氨基酸以酰胺键聚合的聚合物，和 ε-PL 标准品的红外光谱基本相符。

2.4.3 质谱分析：为了获得该发酵产物的分子结构和聚合度，采用 MALDI-TOF-MS 测定该发酵产物的质谱信息，并与标准品作对比。*S. albulus* X-18 的发酵产物质谱图如图 8 所示，从图中可以看出，丰度最高的分子离子峰$[M+Na]^+$在 3370–3883 之间，并且相邻离子峰之间的质荷比相差 128，为赖

氨酸缩去 1 个 H_2O 分子的赖氨酸残基质量(单体赖氨酸分子量为 146.19)，所合成 ε-PL 聚合度在 25–30 个赖氨酸之间。

2.4.4 核磁共振波谱(NMR)测定：将适量充分干燥的发酵产物溶于 D_2O 中，使用 400 MHz 核磁共振波谱仪测定其 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR，并与标准品作对比。*S. albulus* X-18 的发酵产物的 ^{1}H-NMR 如图 9 所示，图中 H 的化学位移从低场到高场分别为 δ_H 3.72、3.09、1.68、1.42 和 1.23，其峰面积比约为 1:2:2:2:2，从左到右依次为 CH^{α}、CH_2^{ε}、CH_2^{β}、CH_2^{δ} 及 CH_2^{γ} 的质子峰，酰胺中的氢与重水的快速交换作用引起在高场信号的消失。以上特征与 ε-PL 的理论特征和标准品的 ^{1}H-NMR 谱图相符。

S. albulus X-18 的发酵产物的 ^{13}C-NMR 如图 10 所示，C 原子化学位移分别为 δ_C 170.66、53.32、38.95、30.89、27.86 和 21.66，从左到右分别为 $C_{\varepsilon\text{-NHCO}}$、$C_{\alpha}$、$C_{\varepsilon}$、$C_{\beta}$、$C_{\gamma}$ 和 C_{δ}，与标准品的 ^{13}C-NMR 谱图特征一致。

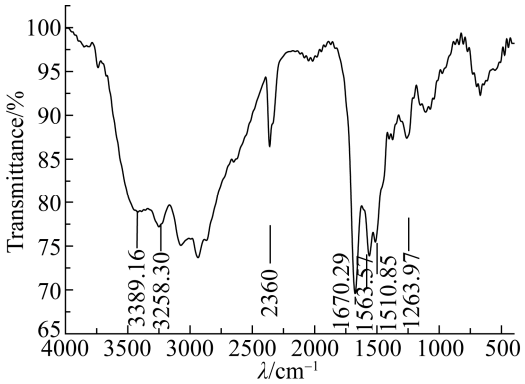

图 7. 发酵产物红外光谱图

Figure 7. Infrared spectrum of fermentation product. The figure was obtained using KBr pressing method. The adsorption peak was measured from 4000 to 400 cm^{-1}.

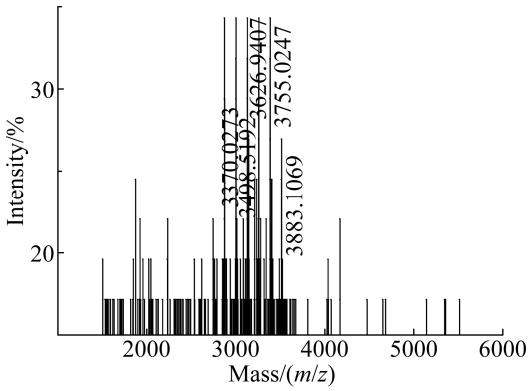

图 8. 发酵产物的 MALTI-TOF-MS

Figure 8. MALTI-TOF-MS of fermentation product. The high-resolution MS was obtained by MALTI-TOF-MS in the positive ESI mode and the spectral data were processed by MassLynx 4.1 software.

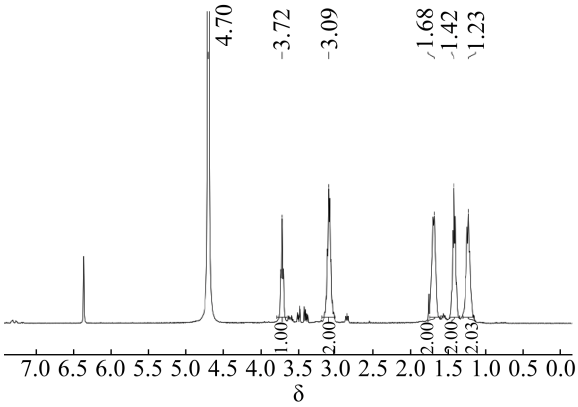

图 9. 发酵产物的 ^{1}H-NMR 图

Figure 9. ^{1}H-NMR of fermentation product. The data of ^{1}H-NMR was detected with 400 MHz varian inova in D_2O.

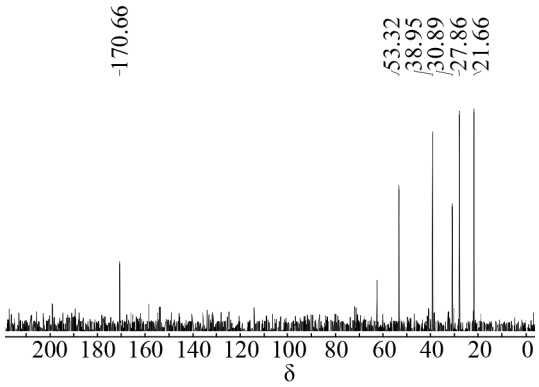

图 10. 发酵产物的 ^{13}C-NMR 谱图

Figure 10. ^{13}C-NMR spectrum of fermentation product. The data of ^{13}C-NMR was detected with 400 MHz varian inova in D_2O.

2.5 抑菌性试验

检测 ε-PL 对不同种类微生物生长的抑制能力，结果如表 2 所示。ε-PL 对酿酒酵母、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌及枯草芽孢杆菌等生长有明显的抑制效果，对红曲霉和产黄青霉等霉菌的抑制能力要差一些(表 2)。实验结果显示，ε-PL 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌的最低抑制浓度(MIC)为 40 mg/L，对金黄色葡萄球菌 MIC 为 20 mg/L，对酿酒酵母的 MIC 为 15 mg/L，对产黄青霉和红曲霉的 MIC 为 70 mg/L。

表 2. ε-PL 对不同菌株生长的抑制作用

Table 2. Inhibition effects of ε-PL on the growth of different kinds of microbiology

Test organisms (Inhibition zone diameter/mm)	Concentration of ε-PL/(mg/L)									
	10	15	20	30	40	50	60	70	80	100
Escherichia coli	+	+	+	+	7.2	10.8	11.6	13.3	–	–
Salmonella	+	+	+	+	6.5	9.2	10.9	13.0	–	–
Staphylococcus aureus	+	+	6.0	8.7	11.1	11.8	13.9	–	–	–
Bacillus subtilis	+	+	+	+	5.6	6.7	9.1	11.2	–	–
Saccharomyces cerevisiae	+	5.8	7.2	9.1	12.6	13.4	14.8	–	–	–
Penicillium chrysogenum	+	+	+	+	+	+	+	5.6	6.8	8.1
Monascus	+	+	+	+	+	+	+	6.3	8.3	9.4

The diameter of the pore was 5 mm. +: no inhibition zone; –: the experiment was not performed.

3 讨论

目前，日本和我国对 ε-PL 产生菌的研究较多，发酵产量较高的菌株主要集中在链霉菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和北里孢菌，但产量较高的菌株大多数为日本研究者所筛选，如摇瓶发酵 ε-PL 产量最高的菌株 *Streptomyces aureofaciern* 为日本研究者所筛选，产量达到了 4.5 g/L，而我国摇瓶发酵产量最高的菌株 *Streptomyces* sp. AF3-44 为 3.11 g/L[17]。不同的链霉菌发酵生产 ε-PL 的能力差别较大，最低的不到 1 g/L，最高的可达到 4.5 g/L，因此，生产性能良好的菌株是提高 ε-PL 产量的基础。在本研究中，以亚甲基蓝为指示剂，从土壤中分离出 3 株具有 ε-PL 生产能力的放线菌，其中 X-18 菌株的 ε-PL 发酵产量最高，为 0.8 g/L，根据该菌的菌体生理生化特征、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列比对，鉴定该菌株为白色链霉菌，该菌的 ε-PL 初始产量高于已报道的 *S. albulus* No.410 (0.5 g/L)，但与 *S. albulus* NBRC 14147 (2.8 g/L)相比仍有差距[18]。

不同 ε-PL 产生菌株所合成 ε-PL 的聚合度不同，ε-PL 聚合度大小与抑菌活性密切相关，分子量在 3600–4300 Da 间的 ε-PL 具有高抑菌活性[19]，当分子量小于 1300 Da 时，ε-PL 失去抑菌活性[20]，通常 25–35 个氨基酸残基的 ε-PL 用作食品防腐剂。在本研究中，通过对 *S. albulus* X-18 发酵产物的紫外光谱、红外光谱、质谱和核磁谱等波谱学特征进行分析，并与 ε-P 标准品比较，波谱特征基本一致，确定该代谢产物为 ε-PL，且该 ε-PL 的聚合度在 25–30 之间，抑菌能力实验显示该物质具有较好的抑菌能力，特别是对细菌和酿酒酵母的生长抑制能力较好，具有良好的应用前景。但是该菌的 ε-PL 产量较低，在后期的研究中将对该菌进行选育，并优化其培养基组成和调控其发酵条件，为其工业化应用奠定基础。

参 考 文 献

[1] Shukla SC, Singh A, Pandey AK, Mishra A. Review on production and medical applications of ε-polylysine. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 65: 70–81.

[2] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial ε-poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3575–3581.

[3] Li TT, Wen CR, Dong YY, Li DM, Liu M, Wang ZL, Janaswamy S, Zhu BW, Song S. Effect of ε-polylysine addition on κ-carrageenan gel properties: rheology, water mobility, thermal stability and microstructure. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 212–218.

[4] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly(ε-lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 2006, 97(9): 1148–1159.

[5] Xu DL, Yao HQ, Xu ZX, Wang R, Xu Z, Li S, Feng XH, Liu YH, Xu H. Production of ε-poly-lysine by *Streptomyces albulus* PD-1 via solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 149–156.

[6] Liu YJ, Chen XS, Zhao JJ, Li Q, Mao ZG. Improvement of ε-poly-L-lysine production of *Streptomyces albulus* by continuous introduction of streptomycin resistance. *Process Biochemistry*, 2019, 82: 10–18.

[7] Zhao QN, Yuan Z, Duan ZH, Jiang YD, Li X, Li ZM, Tai HL. An ingenious strategy for improving humidity sensing properties of multi-walled carbon nanotubes via poly-L-lysine modification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 289: 182–185.

[8] Xu ZX, Xu Z, Feng XH, Xu DL, Liang JF, Xu H. Recent advances in the biotechnological production of microbial poly(ε-L-lysine) and understanding of its biosynthetic mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(15): 6619–6630.

[9] Duan S, Zhu WS. Isolating of a ε-polylysine-producing strain. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(8): 14–17. (in Chinese)
段杉, 朱伟珊. ε-聚赖氨酸产生菌的筛选. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 14–17.

[10] Li S, Tang L, Chen XS, Liao LJ, Li F, Mao ZG. Isolation and characterization of a novel ε-poly-L-lysine producing strain: *Streptomyces griseofuscus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(4): 557–563.

[11] Ouyang J, Xu H, Li S, Zhu HY, Chen WW, Zhou J, Wu Q, Xu L, Ouyang PK. Production of ε-poly-L-lysine by newly isolated *Kitasatospora* sp. PL6-3. *Biotechnology Journal*, 2006, 1(12): 1459–1463.

[12] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, Park EY, Okabe M. Enhancement of ε-Polylysine production by *Streptomyces albulus* Strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(2): 190–194.

[13] Chen XS, Li Q, He HG, Zhang JH, Mao ZG. Effect of ion form of the ion-exchange resin on ε-poly-L-lysine purification from microbial fermentation broth. *RSC Advances*, 2019, 9(21): 12174–12181.

[14] Zeng X, Miao WY, Wen BB, Mao ZG, Zhu MZ, Chen XS. Transcriptional study of the enhanced ε-poly-L-lysine productivity in culture using glucose and glycerol as a mixed carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(4): 555–566.

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

[16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.

[17] Li S, Yan P, Zeng C, Zhang HJ, Mao ZG, Tang L. Effect of genome shuffling on ε-poly-L-lysine synthesis and metabolic flux. *Microbiology China*, 2016, 43(12): 2568–2577. (in Chinese)
李双, 颜鹏, 曾晨, 张宏建, 毛忠贵, 唐蕾. Genome shuffling 筛选 ε-聚赖氨酸高产菌及其对代谢流量分配的影响. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2568–2577.

[18] Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, Maruyama C, Utagawa T, Hamano Y. Mechanism of ε-Poly-L-Lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an ε-poly-$_L$-lysine-degrading enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5669–5675.

[19] Xu DL, Wang R, Xu ZX, Xu Z, Li S, Wang MX, Feng XH, Xu H. Discovery of a short-chain ε-poly-L-lysine and its highly efficient production via synthetase swap strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(5): 1453–1462.

[20] Chen XS, Wang KF, Zheng GC, Gao Y, Mao ZG. Preparation, characterization and antimicrobial activity of ε-poly-L-lysine with short chain length produced from glycerol by *Streptomyces albulus*. *Process Biochemistry*, 2018, 68: 22–29.

Screening and identification of an ε-polylysine-producing bacterium

Peng Xu[1], Dahong Wang[1,2*], Yingying Zheng[1], Wenhao Shen[1]

[1] College of Food and Bioengineering, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471023, Henan Province, China

[2] Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang 471023, Henan Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate and identify ε-polylysine-producing (ε-PL) actinomycetes from the environment, followed by determining the structure of ε-PL, and studying its inhibition of microbial growth. **[Methods]** Strains were isolated based on the transparent zone formed by themethylene blue and ε-PL. Itzhaki method was used to screen the strains. A bacterium strain was identified by morphological and physiological characterization and sequence analyses of 16S rRNA and *gyrB* gene. The structure of ε-PL was studied by spectrum analysis. Its antimicrobial activity was measured by inhibition zone method. **[Results]** We isolated 3 actinomycete strains. Strain X-18, with the highest ε-PL yield (0.8 g/L), was identified as *Streptomyces albulus.* The molecular polymerization degree of ε-PL was 25–30 by the spectral data analysis and the comparison with the ε-PL standard. Its antimicrobial effect was better on bacteria than fungi. **[Conclusion]** An ε-PL-producing strain *S. albulus* X-18 was successfully isolated to enrich the resources of ε-PL producers.

Keywords: ε-polylysine, separation, identification

（本文责编：李磊）

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401672) and by the Fund of Young Teachers in Colleges and Universities of Henan Province (2016GGJS-060)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-64282342; E-mail: wangdahong2003@163.com

Received: 4 August 2019; Revised: 5 October 2019; Published online: 6 March 2020