

# 原生质体诱变选育 $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株

田丰伟 程传荣 袁维涵 赵鑫 赵建新 张灏 陈卫\*

(江南大学食品学院 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以白色链霉菌 UN2-71 为出发菌株, 对其原生质体进行硫酸二乙酯(DES)诱变, 选育  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株。经过试管初筛和摇瓶复筛, 得到 1 株稳定性好的菌株 D3-32, 摇瓶产量达到 1.56 g/L, 比出发菌株提高 49.43%。采用 2.3 L 发酵罐进行发酵试验, 控制 pH 分两阶段培养后,  $\epsilon$ -聚赖氨酸最高产量达到 4.59 g/L, 比出发菌株提高了 2.65 倍。

**关键词:**  $\epsilon$ -聚赖氨酸, 白色链霉菌, 原生质体, 硫酸二乙酯, 诱变

## Microbial Breeding of High $\epsilon$ -polylysine-producing Strains by Diethyl Sulfate Protoplast Mutagenesis

TIAN Feng-Wei CHENG Chuan-Rong YUAN Wei-Han ZHAO Xin  
ZHAO Jian-Xin ZHANG Hao CHEN Wei\*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** *Streptomyces albulus* UN2-71 was selected as original strain and its protoplast was treated by diethyl sulfate (DES) to obtain high  $\epsilon$ -polylysine producing mutants. Through primary screening and confirmed screening with shake flask cultures, one strain designated as D3-32 with a good genetic stability has been acquired, whose production in the shake flask reached 1.56 g/L, which was about 49.43% higher than that of original strain. In the fermentation test with 2.3 L fermentor, after a pH-controlled two-phase fermentation, the highest production of  $\epsilon$ -polylysine reached 4.59 g/L, which was increased by 2.65 times compared to that of the original strain.

**Keywords:**  $\epsilon$ -Polylysine, *Streptomyces albulus*, Protoplast, Diethyl sulfate, Mutagenesis

$\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)是一种由微生物发酵产生的氨基酸同型聚合物, 它由L-赖氨酸的 $\alpha$ -氨基与另一L-赖氨酸的 $\epsilon$ -羧基形成的酰胺键连接而成<sup>[1]</sup>。它是一类具有优良防腐性能的微生物类食品防腐剂, 具有广谱抑菌性, 能够抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌等<sup>[2]</sup>, 并且具有安全性能高<sup>[3]</sup>、水溶性好

和热稳定性好等优点, 在食品工业中具有广泛的用途<sup>[4]</sup>。 $\epsilon$ -PL的生产均采用微生物发酵法, 它是次级代谢产物, 一般情况下产率很低。因此, 通过筛选及改良获得高产菌株, 以及通过代谢调控策略来提高 $\epsilon$ -PL的产率是实现 $\epsilon$ -PL高效生产的关键。

20 世纪 70 年代末, Shima 等首次从白色链霉菌

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z353); 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2009BADB9B05); 国家自然科学基金项目(No. 20836003)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85912155; 信箱: weichen@jiangnan.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>  
收稿日期: 2010-04-19; 接受日期: 2010-06-30

(*Streptomyces albulus*) 的发酵液中发现  $\epsilon$ -PL<sup>[1]</sup>。Nishikawa 等人发现产  $\epsilon$ -PL 菌株大部分属于链霉菌<sup>[5]</sup>。目前,国内外在  $\epsilon$ -PL 高产菌株选育和发酵条件优化方面均进行了大量研究,国外已实现  $\epsilon$ -PL 工业化生产,与之相比国内研究还存在一定的差距。不少学者利用各种诱变剂处理孢子来选育  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株,但是通过原生质体诱变选育优良菌株的报道还很少。由于去除了细胞壁,原生质体对诱变剂更加敏感,有可能更容易得到优良的突变株,因此,作者对本研究室保存的产聚赖氨酸出发菌株 UN2-71 进行原生质体硫酸二乙酯(DES)诱变,旨在得到  $\epsilon$ -PL 产量提高的菌株,为  $\epsilon$ -PL 的工业化发酵生产奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种与试剂

1.1.1 菌种:白色链霉菌 UN2-71 (*Streptomyces albulus* UN2-71)为江南大学生物技术实验室保藏。

1.1.2 生化试剂:溶菌酶购自上海生工;甘氨酸购自上海国药集团化学试剂有限公司。其他均为常规分析纯试剂。

### 1.2 培养基及相关溶液

斜面培养基、种子培养基、发酵培养基均参考文献[6];高渗再生培养基参考文献[7];高渗 P 液、微量元素、TES 缓冲液等参考文献[8]。

菌丝培养基(g/L)<sup>[9]</sup>:可溶性淀粉 40,硫酸铵 8,酵母提取物 6.46,  $K_2HPO_4$  0.8,  $KH_2PO_4$  1.36,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.06,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.045,加水定容至 1 L, pH 6.8,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

溶菌酶溶液:用 P 液配制 2 g/L 的溶菌酶溶液,微孔滤膜过滤。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌丝体培养:250 mL 三角瓶装 50 mL 种子培养基,接种活化后的斜面种子一环,30°C、180 r/min 培养 24 h 后,以 10% 的接种量接种至含 50 mL 灭菌培养基的另一 250 mL 三角瓶,加入 6 mL 已灭菌的 20% 甘氨酸,使培养基中甘氨酸的终浓度为 2%,甘氨酸的加入使菌丝体细胞壁更容易被溶菌酶降解。摇瓶 8 层纱布封口,摇床继续培养 48 h。

1.3.2 原生质体制备:原生质体制备参照 Okanishi 方法<sup>[9]</sup>。取上述培养好的菌丝体 2 mL 于无菌离心管中,4000 r/min 离心 10 min,弃上清,将沉淀悬浮于 2 mL P 液中,4000 r/min 离心 10 min, P 液洗涤沉淀 2 次,弃上清。将菌丝体悬浮于 2 mL 2 g/L 溶菌酶溶液中,30°C 水浴保温 60 min,每隔 15 min 用无菌吸管轻吹吸 1 次。补加 2 mL P 液,反复吹吸,用装有无菌棉花柱过滤除去菌丝,4000 r/min 离心 5 min,温和地沉淀原生质体,弃去上清,将原生质体悬于 P 液中,稀释备用。

1.3.3 原生质体再生:将上述原生质体高渗悬浮液用高渗液适当稀释,吸取 0.1 mL 涂布于再生平板上。将培养皿于恒温培养箱 28°C-30°C 培养 3-4 d。

1.3.4 原生质体 DES 诱变:取原生质体悬浮液加入不同浓度硫酸二乙酯(DES),分别处理不同时间。然后用 25% 硫代硫酸钠终止反应,离心去掉上清液,用 P 液系列稀释后涂再生平皿,30°C 恒温倒置培养 5 d。

1.3.5 诱变后初筛:从再生平板上挑取单菌落孢子接入发酵培养基中(3 mL/10 mL)试管,30°C 培养,200 r/min,7 d 后对发酵液进行快速分析,利用酶标仪扫描测定  $\epsilon$ -聚赖氨酸含量。

1.3.6 摇瓶复筛:初筛高产菌株经活化后,分别取 1 环孢子接入发酵培养基中(30 mL/250 mL 三角瓶),30°C 培养 24 h,然后各取 3.0 mL 种子液加入 3 个发酵瓶中,30°C 培养 96 h 后对发酵液进行分析,测定  $\epsilon$ -聚赖氨酸的含量。取其平均值,确定高产量的优良菌株。

1.3.7 遗传稳定性测验:将摇瓶发酵复筛得到的  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量较高的菌株,连续传代多次。将斜面菌种做摇瓶发酵试验,挑选具有遗传稳定性的菌株,转接斜面保藏。

1.3.8 菌体生长量的测定:5 mL 离心管预先称重,取 4 mL 发酵液,在 7000 r/min 条件下离心 10 min,保存上清液,测定其中残糖与  $\epsilon$ -聚赖氨酸含量。沉淀和离心管在 80°C 干燥至恒重,称量并计算菌体干重。

1.3.9  $\epsilon$ -聚赖氨酸测定方法:(1)分光光度法测定  $\epsilon$ -聚赖氨酸含量,参照 Itzhaki 方法<sup>[10]</sup>。(2)酶标仪高效扫描测定  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量<sup>[11]</sup>。

$\epsilon$ -聚赖氨酸标准曲线测定: 准确吸取不同浓度的  $\epsilon$ -聚赖氨酸标准溶液和对照(去离子水) 50  $\mu$ L 加入到 96 孔板, 加入 50  $\mu$ L DR 试剂沉淀, 3500 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 200  $\mu$ L 乙醇洗涤沉淀, 3500 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 100  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{S}$  溶液, 3500 r/min 离心 20 min, 弃上清, 向沉淀中加入 100  $\mu$ L 浓硝酸, 20 min 后加入 200  $\mu$ L 水稀释, 取 50  $\mu$ L 加入 200  $\mu$ L 3% 的硫脲, 在  $\lambda = 435 \text{ nm}$  处扫描测定吸光值 A。

样品处理及扫描方法同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体制备

对白色链霉菌 UN2-71 的原生质体进行了制备和再生, 确定了白色链霉菌 UN2-71 原生质体制备和再生的最优条件: 在含 2% 甘氨酸的菌丝培养基<sup>[9]</sup>中培养 48 h 后收集菌丝体, 在 30 $^{\circ}\text{C}$  条件下使用 2.0 g/L 溶菌酶酶解菌丝体 60 min, 可获得大量的白色链霉菌原生质体。

### 2.2 $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌种的选育

**2.2.1 DES 诱变剂量的确定:** 诱变剂 DES 浓度设定为: 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%, 每一浓度 DES 分别对原生质体诱变处理 5、10、20、30 和 40 min。诱变完成后加入 25% 硫代硫酸钠终止反应, 离心除去诱变剂, 用 P 液重新悬浮, 涂布于再生平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d 后观察再生结果。

试验结果显示: 当 DES 浓度高于 0.2% 时, 原生质体均被致死, 基本无再生; 当 DES 浓度低于 0.1% 时, 原生质体致死率随时间延长变化不明显。基于以上结果, 我们选择在诱变剂 DES 浓度为 0.1% 和 0.15% 条件下测定白色链霉菌原生质体的诱变致死率曲线, 如图 1、2 所示。

根据遗传育种经验, 正向突变多发生在低剂量处理时, 且致死率在 70%–80% 为佳。根据在 0.1% 和 0.15% DES 诱变条件下所测定的诱变致死曲线, 我们确定了 2 个最佳诱变条件: 0.1% DES 诱变处理 38 min; 0.15% DES 诱变处理 18 min。

由表 1 可知, 原生质体在 0.1% DES 下的正变率为 21.52%, 在 0.15% DES 下的正变率为 15.02%。其菌株正变率都比较高, 表明使用 DES 处理白色链霉菌原生质体是提高其正变率的有效方法。

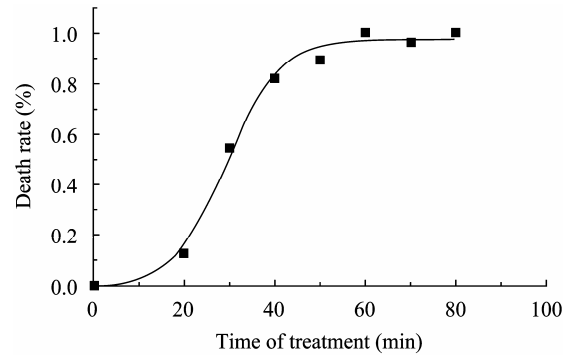


图 1 0.1% DES 处理时诱变致死率

Fig. 1 The death rate of 0.1% DES mutation

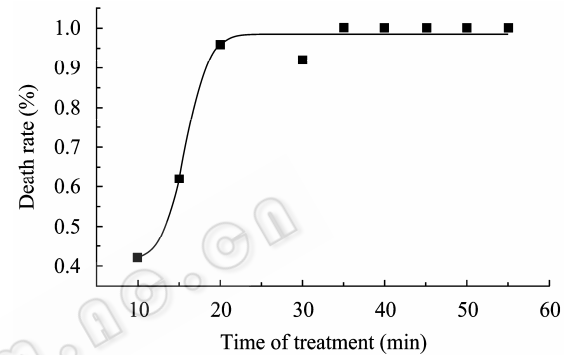


图 2 0.15% DES 处理时诱变致死率

Fig. 2 The death rate of 0.15% DES mutation

表 1 DES 处理后再生菌株突变率

Table 1 Mutation rate of regenerative colonies after DES treatment

DES 浓度 Concentration of DES (%)	处理时间 Time of treatment (min)	挑取菌株数 No. of strains distilled	正变率 The rates of positive mutant (%)
0.10	38	201	21.52
0.15	18	313	15.02

**2.2.2  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌种的初筛:** 以白色链霉菌 UN2-71 为出发菌株, 经过溶菌酶的作用制备成原生质体, 再经不同浓度的 DES 处理后, 于再生平皿上挑取 514 株菌株进行摇试管发酵试验, 经初筛选出 26 株产  $\epsilon$ -聚赖氨酸较高的菌株进行斜面培养, 以备复筛。初筛所得结果见表 2。

**2.2.3 摇瓶复筛:** 将初筛得到的 26 株菌进行摇瓶发酵复筛, 结果表明(表 3)其中大部分菌株比出发菌株产量更高, 其中  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量超过 1.40 g/L 的 3 株菌是 D3-32、D5-63 和 D5-56。其中白色链霉菌 D3-32 的  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量为 1.56 g/L, 比出发菌株提高了 49.43%。

表2 DES 诱变初筛结果  
Table 2 The results of first screening of DES mutation

菌株 Strains	$\epsilon$ -PL 浓度 Concentration of $\epsilon$ -PL (g/L)	菌株 Strains	$\epsilon$ -PL 浓度 Concentration of $\epsilon$ -PL (g/L)	菌株 Strains	$\epsilon$ -PL 浓度 Concentration of $\epsilon$ -PL (g/L)	菌株 Strains	$\epsilon$ -PL 浓度 Concentration of $\epsilon$ -PL (g/L)
UN2-71 Original strain	0.4030	D2-113	0.4948	D4-16	0.4892	D5-62	0.5643
D1-17	0.5728	D2-114	0.4958	D4-43	0.4749	D5-65	0.5189
D1-39	0.5470	D3-31	0.7190	D4-38	0.4579	D5-55	0.5131
D1-3	0.5248	D3-32	0.7672	D4-39	0.5258	D5-56	0.7469
D1-41	0.5119	D3-43	0.6909	D4-51	0.5131	D5-63	0.6059
D1-42	0.6522	D3-54	0.7012	D5-12	0.5953	D3-5	0.7190
D2-22	0.5167	D3-23	0.7050	D2-26	0.5017		

表3 DES 突变株复筛结果  
Table 3 The results of repeat screening of DES mutants

菌株 Strains	产量 Production (g/L)	菌株特征 Features of the Strains	产量提高 Production increased by (%)
Original strain	1.04	坚实干燥皱褶, 呈淡黄色, 孢子圆滑	
D3-32	1.56	致密绒状, 灰白色, 孢子圆滑	49.43
D5-63	1.52	表面呈紧密的绒状金黄色, 孢子圆滑	46.19
D5-56	1.50	表面紧密, 金黄色, 孢子圆滑	44.58

表4 遗传稳定性实验  
Table 4 The stable experiment of the DES's genetic attributes

菌株 Strains	第1次传代的发酵产量 Fermentation production of the 1 <sup>st</sup> generation (g/L)	第2次传代的发酵产量 Fermentation production of the 2 <sup>nd</sup> generation (g/L)	第3次传代的发酵产量 Fermentation production of the 3 <sup>rd</sup> generation (g/L)	第4次传代的发酵产量 Fermentation production of the 4 <sup>th</sup> generation (g/L)	第5次传代的发酵产量 Fermentation production of the 5 <sup>th</sup> generation (g/L)
Original strain	1.04	1.03	0.98	1.10	0.87
D3-32	1.56	1.55	1.52	1.53	1.50
D5-63	1.52	1.52	1.50	1.51	1.50
D5-56	1.50	1.45	1.42	1.46	1.41

**2.2.4 高产菌种遗传稳定性的考察:** 高产菌种遗传稳定性考察的结果见表4。连续5代摇瓶发酵后, 在以上3株突变株中, D3-32和D5-63菌株都有较稳定的产 $\epsilon$ -聚赖氨酸遗传特性。但从试验结果看, 1-3代产量明显高于4、5代菌种, 但变化幅度不大。因此最好用前3代菌种进行发酵。本论文研究得到一株 $\epsilon$ -聚赖氨酸产量较高的菌株D3-32。

**2.2.5 突变菌株D3-32产聚赖氨酸过程曲线:** 将筛选出的D3-32经2.3 L发酵罐检验发酵性能。搅拌转速为300 r/min, 培养温度30°C, 初期通气速率为3.0 L/min, 当溶解氧降至5%后, 调节通风量为4.5 L/min, 初始pH 6.8, 自然降至pH 4.0后以1.0 mol/L NaOH控制pH 4.0。突变菌株在2.3 L自控发酵罐中发酵性能结果见图3。

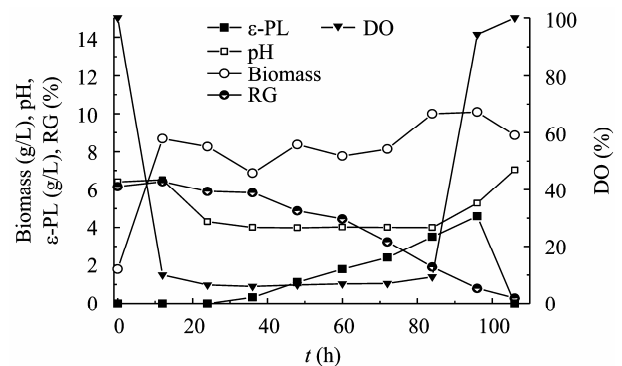


图3 调控pH对菌株D3-32发酵的影响  
Fig. 3 Effects of pH controlled on ferment of mutant strain D3-32

由上述结果可知, 突变株经2.3 L自控发酵罐发酵, 发酵过程中调控pH, 具有很强的产 $\epsilon$ -聚赖氨酸能力, 96 h时产量为4.59 g/L, 同样培养条件下是出

发菌株 UN2-71 的 2.65 倍。在优化条件下 D3-32 聚赖氨酸的产量达到了 8.06 g/L (数据未公布), 与出发菌株相比, 聚赖氨酸的产量得到很大的提高, 产量在国内同类研究中处在前列水平。

### 3 结论与展望

原生质体对诱变剂的敏感性高于孢子, 正变率高, 产量变化幅度往往也高于孢子诱变。通过 DES 诱变, 获得一株  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株 D3-32, 产量达到 1.56 g/L, 与出发菌株相比, 产量提高了 49.43%, 而且发酵性能稳定。在摇瓶发酵的基础上进行了 2.3 L 发酵罐的小试试验, 通过流加 NaOH 溶液控制 pH 在 4 左右, 96 h 时  $\epsilon$ -聚赖氨酸产量为 4.59 g/L, 是同样发酵条件下出发菌株的 2.65 倍。在优化条件下 D3-32 聚赖氨酸的产量达到了 8.06 g/L (数据未公布), 与出发菌株相比, 聚赖氨酸的产量得到了很大提高。目前, 国内  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株的产量一般在 0.79–7.72 g/L<sup>[12–15]</sup>, 本研究所选育菌株的产量在国内同类研究中处在前列水平。

聚赖氨酸是一种由链霉菌等微生物产生的具有广谱抑菌性能的次生代谢产物, 其合成机理复杂, 尚未被完全阐明<sup>[3]</sup>。作为一种被 FDA 认可为“公认安全(GRAS)”的食品级防腐剂, 聚赖氨酸以其广泛而优良的抑菌性能在食品加工领域具有广阔的应用领域和市场前景。利用微生物和生物工程技术开发聚赖氨酸高产菌株, 提高聚赖氨酸产量水平是实现聚赖氨酸工业化生产和应用的技术关键。论文在本实验室前期研究的基础上通过诱变育种得到一株产量较高的菌株, 为研究聚赖氨酸的合成机理和实现工业化应用奠定了很好的基础。目前, 实验室正在尝试研究采用组合优化育种策略进一步提高聚赖氨酸的产量水平, 同时也正在开展白色链霉菌产聚赖氨酸的机理研究。

### 参考文献

[1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*.

*Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, **41**(9): 1807–1809.

- [2] 张东荣, 张超, 段作营, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸抑菌性能的初步研究. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2006(3): 75–80.
- [3] Hiraki J. Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -Polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003(37): 328–340.
- [4] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine. *Journal of Antibiotics*, 1984(37): 1449–1455.
- [5] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial  $\epsilon$ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(7): 3575–3581.
- [6] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of  $\epsilon$ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **91**(2): 190–194.
- [7] 李祥锴, 安志东, 朱非, 等. 林肯链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究. 氨基酸和生物资源, 2001, **23**(4): 24.
- [8] 徐志南, 董悦涵, 谢志鹏, 等. 米多霉素产生菌原生质体融合研究. 浙江大学学报: 工学版, 2006, **40**(7): 1262–1266.
- [9] DA Hopwood. 链霉菌遗传操作实验手册. 邓子新, 唐纪良译. 第 1 版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1988: 8–10.
- [10] Itzhaki FR. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1972(50): 569–574.
- [11] 程传荣, 田丰伟, 张灏, 等. 一种快速测定发酵液中  $\epsilon$ -聚赖氨酸的方法. 食品与发酵工业, 2009, **35**(11): 133–136.
- [12] 贾士儒, 董惠钧, 姜俊云, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株的选育. 食品与发酵工业, 2004, **30**(11): 14–17.
- [13] 陈雄, 章莹, 袁金凤, 等. 聚- $\epsilon$ -赖氨酸高产菌株的筛选及其发酵工艺的初步探究. 微生物学通报, 2007, **34**(4): 731–734.
- [14] 陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹.  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究. 工业微生物, 2007, **37**(2): 28–30.
- [15] 张海涛, 李燕, 欧杰, 等. 诱变选育  $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌株突变株. 食品科学, 2007, **28**(9): 398–400.