

ϵ -聚赖氨酸产生菌新菌株的筛选和产物结构鉴定

黄静敏^{1,2,3} 吴清平^{2*} 刘盛荣^{2,4} 莫树平² 张菊梅²

- (1. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)
(2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)
(4. 华南理工大学 生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要: 通过对 Nishikawa 的方法进行改进, 在广东各地土样中筛选到一株产量为 0.846 g/L 的新 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)产生菌株, 命名为 Str-8。对 Str-8 菌株进行形态、生理生化和 16S rDNA 分析, 初步确定为不吸水链霉菌 *Streptomyces ahngroscopic*。纯化的发酵产物通过水解、质谱、紫外光谱等性质确定为 ϵ -PL。

关键词: ϵ -聚赖氨酸, 放线菌筛选, 产物鉴定

Screening of new ϵ -polylysine producing strain and structure identification of its product

HUANG Jing-Min^{1,2,3} WU Qing-Ping^{2*} LIU Sheng-Rong^{2,4} MO Shu-Ping²
ZHANG Ju-Mei²

- (1. South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)
(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)
(4. School of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: A novel ϵ -polylysine (ϵ -PL) producer with 0.846 g/L yield, designated strain Str-8, was screened from the soil collected from Guangdong, China, by using Nishikawa's method with some improvement. Taxonomic identification of the strain, including morphology, culture characteristics, physiological and biochemical characters were performed and phylogenetic tree was constructed based on the 16S rDNA sequences, which indicated that it belongs to *Streptomyces ahngroscopic*. The purified fermentation product of this strain was identified as ϵ -PL by characteristic analysis, hydrolysate analysis, mass spectrum and UV spectrum.

Keywords: ϵ -Polylysine, *Streptomyces* screening, Structure identification

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是一种由微生物生产的氨基酸同型聚合物,它是由 L-赖氨酸的 ϵ -氨基和另一赖氨酸的 α -羧基形成的 ϵ -酰胺键连接而成。 ϵ -PL 具有水剪性强、抑菌谱广^[1]、可以食用且对人体无任何毒副作用^[2]等特点,成为目前理想的生物型防腐剂^[3]。 ϵ -PL 现已在日本实现工业化生产,并被多个国家批准作为食品防腐剂使用^[4],而我国还处于实验室阶段。

ϵ -PL 产生菌的筛选方法十分复杂,以往主要通过分析发酵液成分来确定,这样的方法难以对大量微生物进行筛选。直到 2002 年,采用一种酸性染料 Poly R-478 建立的新筛选方法才实现对 ϵ -PL 产生菌的大规模筛选^[5]。2005 年,我国学者^[6]也通过在培养基中添加次甲基蓝对 ϵ -PL 产生菌进行筛选,并利用 Dragendorff 试剂检测,提高了筛选的特异性。然而 Poly R-478 现已停产,亚甲基蓝又有毒性,直接添加到培养基中筛选周期比较长。此外,目前生产及研究的 ϵ -PL 产生菌主要是白色链霉菌,其它菌鲜有报道。本文旨在通过改进 ϵ -PL 产生菌的筛选方法,实现产生菌的高效筛选,并期望筛选出与现有白色链霉菌不同的新产生菌,不断丰富 ϵ -PL 产生菌株,为选育 ϵ -PL 高产菌株提供优良的出发菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料

ϵ -PL 标准品(浙江银象生物工程有限公司);其它试剂均为分析纯(广州化学试剂厂)。

高氏一号合成培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, KNO₃ 1, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, 琼脂 20。pH 7.1-7.5, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

M3G 培养基(g/L): 葡萄糖 50, 酵母浸出粉 5, (NH₄)₂SO₄ 10, K₂HPO₄ 0.8, KH₂PO₄ 1.36, MgSO₄·7H₂O 0.5, ZnSO₄·7H₂O 0.04, FeSO₄·7H₂O 0.5。pH 6.8, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 ϵ -PL 产生菌的筛选

从广东各地收集土壤,自然风干 3-10 d,碾碎,50 °C 烘 1-3 h。取 1 g 土样加到 10 mL 0.85%盐水中,30 °C 振荡 10 min 后静置 30 min,吸取上清,适当稀

释涂布于含有 50 mg/L K₂Cr₂O₇ 的高氏一号合成培养基中,30 °C 培养 7 d。

根据菌落形态,挖出与放线菌相似菌落,放置在含有 0.002%亚甲基蓝的高氏一号平板中继续培养,挑取产生较大透明圈的菌落。将所得菌株进行摇瓶培养后,将培养液离心,取上清液,用 Dragendorff 试剂检测,把出现橙色沉淀的发酵液进行含量测定,选取产量较高的菌株进行发酵并提取纯化产物,进行定性分析,确定所筛选的菌株是否为 ϵ -PL 产生菌株。

1.3 发酵产物的纯化

将筛选出的菌株进行摇瓶培养后,发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,上清液用 NaOH 调 pH 至 8.5,再 12 000 r/min 离心 10 min,上清液用阳离子(H⁺)交换树脂(D152)吸附后,分别用 0.2 mol/L 醋酸和 0.1 mol/L 盐酸进行冲洗和洗脱,洗脱液用 NaOH 中和至 pH 6.5,12 000 r/min 离心 10 min,上清液转入透析袋 3000 中透析 1-2 d。

1.4 发酵产物的定性分析

1.4.1 产物主要成分确定:薄层层析:取 1 mL 发酵液纯化样品加入螺旋管中,加入等量的 6 mol/L HCl,120 °C 水解 24 h,用薄层层析分析其组成成分。

薄层:硅胶板;

展开剂:正丁醇:冰醋酸:吡啶:水=4:1:1:2;

显色剂:0.2%茚三酮乙醇溶液。

1.4.2 样品的分子量测定:质谱法^[7]。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 菌株形态特征、生理生化特征:将纯化的菌株进行形态特征、培养特征、生理生化反应测定^[8-10],纯细胞壁化学成分鉴定^[10]。

1.5.2 16S rDNA 序列测定和系统发育树的构建:利用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(广州东盛生物科技有限公司)提取菌株总 DNA,以总 DNA 为模板,采用通用引物 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')/1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACT T-3')进行 PCR 扩增,PCR 纯化产物委托深圳华大基因研究院测序,菌株 16S rDNA 序列全长为 1 431 kb,

GenBank 中的序列号为 HM246524。对菌株的 16S rDNA 序列进行 BLAST 对比, 选取相似序列, 进一步采取 ClustalX 对高同源序列进行多序列连配分析, 利用 MEGA 3.1 软件按照 N-J 法聚类构建系统发育树。根据菌落形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果, 确定所分离的菌株分类地位。

1.6 ϵ -PL 含量的测定

用改进的 Itzhaki 方法^[11]。 ϵ -PL 标准曲线的测定: 取 0.2 mL ϵ -聚赖氨酸浓度为 0–0.4 g/L 的标准液与 0.8 mL 500 μ mol/L 甲基橙溶液混合, 于 30 °C 振荡反应 30 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 将上清液用磷酸钾缓冲液稀释 8 倍, 置分光光度计 464 nm 处测定吸光值, 以磷酸钾缓冲液与甲基橙反应为空白对照。

样品含量测定同上。

2 结果

2.1 产 ϵ -PL 菌株筛选

2.1.1 高氏一号合成培养基中重铬酸钾浓度确定: 把筛选目标集中在放线菌, 重铬酸钾能明显抑制土壤中真菌、细菌的生长, 而对放线菌的抑制作用相对较小, 可选作分离放线菌的一种简单、便宜的抑制剂。经试验确定重铬酸钾的用量为 50 mg/L (表 1), 并成功筛选出 498 株放线菌。

$K_2Cr_2O_7$ 浓度 Concentration of $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)	菌落数 Colony forming units (CFU/dish)		
	放线菌 Streptomycetes	细菌 Bacteria	真菌 Funguses
	0	29	50
50	25	22	2
100	21	11	0
150	10	6	0
200	3	0	0
300	0	0	0
400	0	0	0

2.1.2 产碱菌株的筛选: 如图 1 所示, 挑出的放线菌菌株在含有 0.002% 亚甲基蓝的高氏一号培养基中培养 3–5 d 后, 产生碱性物质的菌株周围能形成透明圈, 据此可以把产碱的菌株筛选出来。用此法从 498 株土壤分离株中共筛选到 204 株产碱菌株。

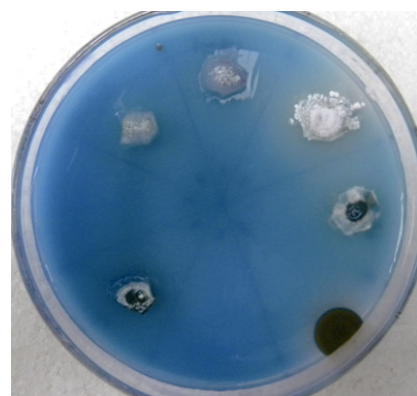


图 1 产碱菌株在培养基上的菌落形态

Fig. 1 The morphology of base-producing strains on medium

2.1.3 产 ϵ -PL 菌株筛选: 把筛选到的产碱菌株进行摇瓶培养, 发酵液离心后取 200 μ L 上清液, 滴入 3 滴 Dragendorff 试剂, 共 9 个菌株的发酵上清液能和 Dragendorff 试剂发生沉淀反应。再用改进的 Itzhaki 方法测定这 9 株菌的 ϵ -PL 产量, 结果见表 2, 其中菌株 Str-8 的产物浓度最高, 达到 0.846 0 g/L。根据 ϵ -PL 和 Dragendorff 试剂及甲基橙溶液的 2 个特征性颜色反应, 初步推断 Str-8 菌株发酵产物为 ϵ -PL。因此选取这株菌用做后续产物纯化和结构鉴定的菌株。

菌号 The number of strains	ϵ -聚赖氨酸的浓度 Concentration of ϵ -polylysine (g/L)
⑩	0.253 2
Str-3	0.550 3
Str-5	0.256 9
Str-6	0.615 6
Str-8	0.846 0
Str-9	0.434 2
Str-10	0.723 6
Str-19	0.737 6
Str-40	0.804 1

2.2 发酵产物鉴定

2.2.1 产物成分鉴定: 为了进一步判断 Str-8 菌株纯化产物的结构, 分别将 Str-8 发酵纯化产物的水解液、 ϵ -PL 标准品的水解液和赖氨酸标准品进行薄层

层析, 结果如图 2 所示, Str-8 菌株纯化产物及 ϵ -PL 的水解产物和赖氨酸标准品在薄板上仅形成一个斑点, 且 R_f 值相等。由此得出结论, Str-8 发酵产物为赖氨酸的均聚物。

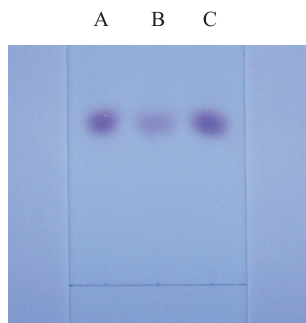


图 2 Str-8 菌株水解产物的薄层层析结果

Fig. 2 The TCL results of Str-8 product

注: A: 赖氨酸标准品; B: Str-8 纯化样品水解产物; C: ϵ -PL 标准品水解产物。

Note: A: Lysine standard; B: Hydrolyzed products of Str-8; C: Hydrolyzed products of standard ϵ -PL.

2.2.2 样品的分子量测定: 采用 MALDI-TOF-MS 测定 ϵ -PL 相对分子质量的分布, 结果如图 3 所示, Str-8 产生的 ϵ -PL 相对分子质量分布为 3 600–4 551 D, 且主要集中在 4 112 D。根据赖氨酸的分

子量, 可知其对应聚合度为 25–30, 主要为 28, 与文献报道^[5]相符。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 16S rDNA 全序列相似性和系统发育分析: 经 PCR 扩增、BLAST 比对后, 发现 Str-8 与链霉菌属的多个种的 16S rDNA 序列相似性达到 99%, 构建系统发育树(图 4), 菌株 Str-8 与淀粉酶产生链霉菌 *Streptomyces diastatochromogenes*、白浅灰链霉菌 *Streptomyces albogriseus*、不吸水性链霉菌 *Streptomyces ahyscopicus* 在同一个分支上, 可见它们是同源的, 所以初步确定 Str-8 菌株为以上链霉菌属中的一个种。

2.3.2 菌株 Str-8 形态学特征: 菌株 Str-8 的营养菌丝体不分离, 不断裂为杆状体, 产生气生菌丝, 孢子成链形成, 符合链霉菌属(*Streptomyces*)特征。在蛋白质培养基中, 气生菌丝体灰色, 产生松散螺旋, 与链霉菌属的烟灰类群和金色类群相似; 孢子丝部分形成螺旋形, 孢子大部分球形至椭圆形, 孢子壁外有刺状物, 大小均一, 通过与链霉菌属相关已知种比较, 发现菌株 Str-8 与不吸水链霉菌 *Streptomyces ahyscopicus* 的形态相似(图 5)。

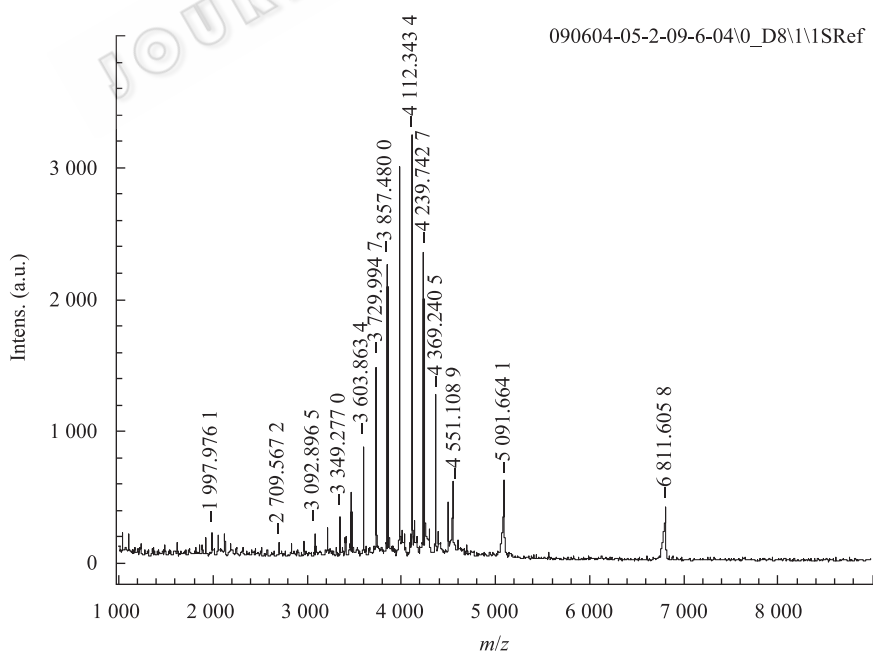


图 3 纯化产物的质谱图

Fig. 3 The mass spectrum of purified polymer

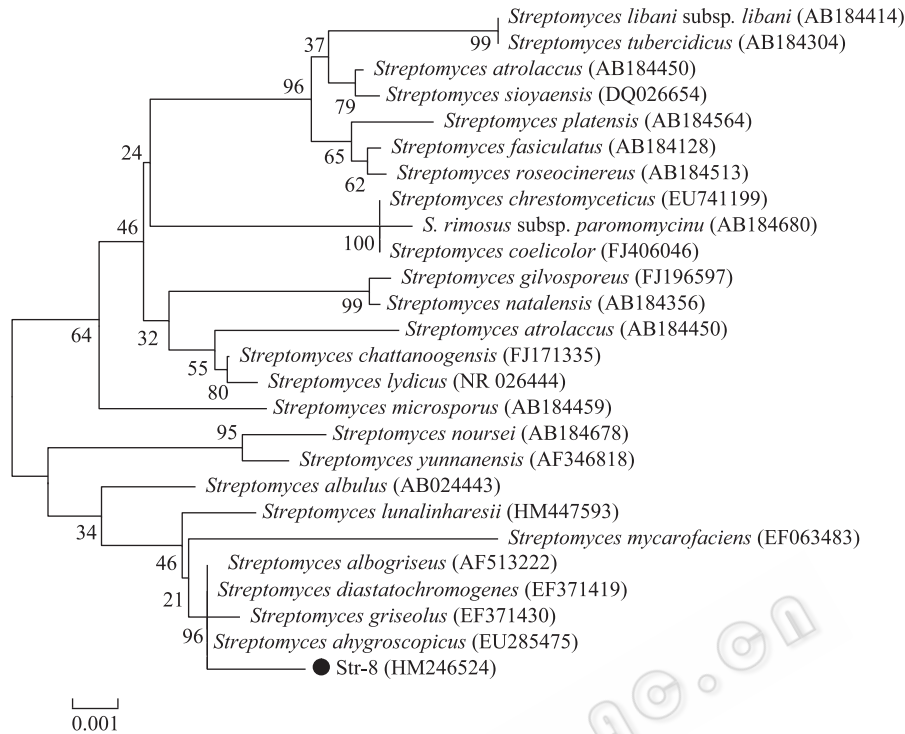


图 4 根据 16S rDNA 全序列构建的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequence

注: 分支上的数值为 Bootstrap 检验的支持百分率; 种属名后的编号是该菌的 16S rDNA 序列在 GenBank 中的序列号。

Note: Numbers on the branchers were the bootstrap value generated from 1 000 pseudoreplicates. Accession numbers of the 16S rDNA from these strains in GenBank were listed after species names.

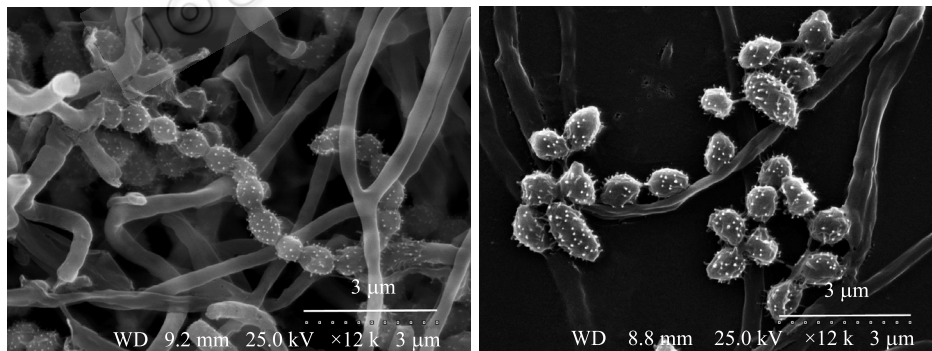


图 5 Str-8 菌扫描电镜图片($\times 12\ 000$)

Fig. 5 Morphology of strain Str-8 ($\times 12\ 000$)

2.3.3 培养特征和生理生化特性: Str-8 菌纯细胞壁水解液中主要含 L-DAP (2,6-二氨基庚二酸), 全细胞壁水解液送到广州分析测试中心检测发现当中没有特征性糖, 属于 I 型细胞壁类型^[12], 符合链霉菌

属的特征。其主要的培养特征(表 3)、生理生化特性(表 4)与不吸水链霉菌基本相同。因此, 结合上面分子生物学、形态学的分析结果, 确定菌株 Str-8 为不吸水链霉菌 *S. ahygroscopicus*。

表3 Str-8菌株培养特征
Table 3 Cultural characteristics of strain Str-8

培养基 Culture medium	基内菌丝 Substrate mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
高氏一号合成培养基 Gause's synthetic medium	白色, 生长良好	灰白色	初期没有, 日久浅黄色
察氏琼脂培养基 Czapek dox agar	灰色, 粉状, 生长一般	灰色	没有
葡萄糖-天门冬素琼脂 Glucose asparagine	灰白色, 生长良好	灰白色	没有
甘油-天门冬素琼脂 Glycerin asparagine	白色, 粉状, 生长良好	黄白色	没有
燕麦粉琼脂 Oatmeal agar	灰白色, 绒状, 生长良好, 致密	灰白色	没有
马铃薯琼脂 Potato agar	黄色, 生长弱	灰白色	淡黄
淀粉铵盐琼脂 Starch reveal salt agar	白色, 生长良好, 致密	灰白色	没有
伊莫松 Emerson agar	白色, 生长良好	白色	没有

表4 Str-8菌株的生理生化特征
Table 4 The physiological characteristics of strain Str-8

特征 Characteristics	Str-8	<i>S. ahngroscopicus</i> 508 ^[9]
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
牛奶凝固 Milk solidification	+	+/-
牛奶胨化 Peptonization	+	+
淀粉水解 Amylohydrolysis	+	+
纤维素利用 Cellulase	+	-
H ₂ S 试验 H ₂ S Test	-	-
黑色素 Melanin	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-
木糖 Xylose	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+
果糖 Fructose	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-
甘露醇 Mannitol	+	+
肌醇 Inositol	+	+

注: - : 阴性; + : 阳性.

Note: - : Negative; + : Positive.

3 讨论

本研究发现在利用亚甲基蓝初筛的过程中, 由于它有毒性, 如果把它直接添加到培养基中, 难以

找到一个合适的浓度, 既能看出明显的透明圈而又可以减少对菌落抑制。针对这个问题, 本研究经过仔细观察, 发现菌落在高氏一号合成培养基长出后, 再用亚甲基蓝进行初筛, 此时由于菌落已经长出, 对亚甲基蓝有一定的耐受能力, ϵ -PL 产生菌株已能分泌 ϵ -PL, 排斥菌落周围的亚甲基蓝, 利于本身的生长, 较好地解决了这个问题。

段杉^[13]等利用一套简易转移装置把培养基中的 ϵ -PL 转移到滤纸上, 再喷洒 Dragendorff 试剂和茚三酮来检测, 虽然比较快速, 但本实验发现假阳性较高。本文直接进行摇瓶发酵一次性进行后续的检测, 较好地提高了筛选的准确性。

虽然 ϵ -PL 产生菌在自然界中分布比较广泛, 但它的筛选工作量很大, 建立一种简便而准确的筛选方法就显得尤其重要。本文通过对筛选方法的改进, 在相对比较短的时间内筛选到了包括不吸水链霉菌在内共 8 株 ϵ -PL 产生菌。目前已报道的 ϵ -PL 产生菌主要为白色链霉菌, 还有北里孢菌、灰橙链霉菌和淀粉酶产色链霉菌^[14], 而不吸水链霉菌则未见报道。而且, 之前报道过的几株 ϵ -PL 产生菌其初始摇瓶产量一般为 0.2-0.4 g/L, 而不吸水链霉菌的初始产量为 0.846 g/L, 本研究为进一步选育 ϵ -PL 高产菌

株提供了优良的新出发菌株。

参 考 文 献

- [1] Chang SS, Lu WYW, Park SH, et al. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by ϵ -polylysine[J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 141(3): 236–241.
- [2] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37(2): 328–340.
- [3] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(9): 1148–1159.
- [4] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(1): 21–26.
- [5] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(7): 3575–3581.
- [6] 朱宏阳, 徐虹, 吴群, 等. ϵ -聚赖氨酸生产菌株的筛选和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(5): 127–130.
- [7] Maeda S, Kunimoto KK, Sasaki C, et al. Characterization of microbial poly(ϵ -L-lysine) by FT-IR, Raman and solid state ^{13}C NMR spectroscopies[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2003, 655(1): 149–155.
- [8] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [9] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. *Analytical Biochemistry*, 1972, 50(2): 569–574.
- [12] Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1970, 20(4): 435.
- [13] 段杉, 朱伟珊. ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 14–16.
- [14] 贾士儒, 许春英, 谭之磊, 等. ϵ -聚赖氨酸产生菌 TUST-2 的分离鉴定[J]. *微生物学报*, 2010, 50(2): 191–196.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。