

核糖体工程技术选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株

吴光耀 陈旭升 王靓 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】利用核糖体工程技术选育 *Streptomyces albulus* AS3-14 的链霉素和利福平双重抗性突变株, 以提高其 ϵ -聚赖氨酸合成能力。【方法】通过链霉素抗性筛选, 获得链霉素抗性的 ϵ -聚赖氨酸产量提高突变株; 在此基础上, 继续筛选其利福平抗性突变株, 实现链霉素和利福平双重抗性 ϵ -聚赖氨酸高产菌选育。【结果】获得的双重抗性高产突变株 *Streptomyces albulus* WG-608 的 ϵ -聚赖氨酸摇瓶产量达到 3.7 g/L, 5 L 发酵罐补料分批发酵 ϵ -聚赖氨酸产量达到 53.0 g/L, 较出发菌株分别提高了 42.3% 和 32.5%。【结论】链霉素和利福平双重抗性选育能够显著提高 ϵ -聚赖氨酸产生菌 *Streptomyces albulus* 的产物合成能力。

关键词: ϵ -聚赖氨酸, 核糖体工程, 抗生素抗性, 酶活力分析, 补料分批发酵

Screening of high-yield ϵ -poly-L-lysine producing strains through ribosome engineering

WU Guang-Yao CHEN Xu-Sheng WANG Liang MAO Zhong-Gui*

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

Abstract: [Objective] We used ribosome engineering technology, with which antibiotic-resistant strains are resulted from mutations on microbial ribosome, to improve the capacity to produce ϵ -PL by *Streptomyces albulus* AS3-14. [Methods] A single drug-resistant mutant was obtained from the original *S. albulus* AS3-14 with the presence of mutagen of streptomycin. A double drug-resistant mutant *S. albulus* WG-608 was obtained on the basis of single drug-resistant mutant with the presence of mutagen of rifampicin, of which the ϵ -PL productivity was improved. [Results] The highest ϵ -PL-producing strain, named *S. albulus* WG-608, could produce ϵ -PL of 3.7 g/L in shake-flask and 53.0 g/L in a 5-L fermentor, 42.3% and 32.5%, respectively higher than that of the parent strain. [Conclusion] Screening of streptomycin and rifampicin resistant strains might be a promising alternative to obtain a high ϵ -PL-producing *S. albulus* strain.

Keywords: ϵ -Poly-L-lysine, Ribosome engineering, Drug resistance, Enzyme activities analysis, Fed-batch fermentation

Foundation item: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51504)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85918279; E-mail: maozg@jiangnan.edu.cn

Received: January 08, 2016; Accepted: March 30, 2016; Published online (www.cnki.net): April 08, 2016
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSRP51504)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85918279; E-mail: maozg@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-08; 接受日期: 2016-03-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-08

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Poly-L-lysine, ϵ -PL)是由链霉菌产生, 含有25–35个L-赖氨酸残基, 并以 α -羧基和 ϵ -氨基缩合而成的一种同型氨基酸聚合物^[1-3]。因其对细菌、霉菌、酵母菌等有强烈的生长抑制作用, 且水溶性好、热稳定性强、安全无毒, 因此 ϵ -PL作为一种生物食品防腐剂, 被广泛应用于日本、韩国、美国和欧盟等国家和地区^[4-5]。2014年, 中国也批准了 ϵ -PL作为食品防腐剂在淀粉制品、肉制品和果蔬制品等食品中的使用^[6]。

现在野生型产生菌的 ϵ -PL合成能力都比较低, 只有经过育种改造才能满足工业生产的需求。例如, *Streptomyces albulus* Z-18、*Streptomyces noursei* NRRL 5126和*Streptomyces griseofuscus* H1的摇瓶产量分别只有0.24、0.42和0.7 g/L^[7-8]。目前, ϵ -PL产生菌改造较为成功的方法是利用物理和化学诱变, 选育S-2-氨基乙基-L-半胱氨酸和甘氨酸抗性突变株^[9-12], 以降低或者解除前体L-赖氨酸反馈抑制。经过近20年的持续选育, Hiraki等最终得到了一株突变株*Streptomyces albulus* 11011A, ϵ -PL摇瓶产量达到了2.11 g/L, 较野生型出发菌产量提高了10倍^[13]。近几年, 等离子诱变技术和基因组重排技术也被应用到 ϵ -PL的菌株选育上。2012年, Zong等通过常压等离子体诱变, 将*Streptomyces albulus* A-29的 ϵ -PL产量从0.4 g/L提升到1.59 g/L^[14]; Li等采用基因组重排技术, 进行葡萄糖耐受性菌株选育, 获得一株突变株*Streptomyces graminearus* F3-4, 其 ϵ -PL摇瓶产量达到2.4 g/L, 比出发菌株提高了50%^[15]。2015年, Zhou等同样利用基因组重排技术进行 ϵ -PL耐受菌株的选育, 获得了一株 ϵ -PL产量达到3.11 g/L的突变株*Streptomyces* sp. F4-22, 比出发菌株提高了181%^[16]。由此可见, 通过物理、化学诱变或基因组重排技术, 选择合理的筛选条件, 均能有效提高原始菌株的 ϵ -PL合成能力。然而, 传统的选育手段耗时、耗力、操作复杂、效率低下, 严重制约了 ϵ -PL菌株产量的进一步提升。

2007年, Ochi等提出了一种利用抗生素抗性

提高次级代谢产物产量的育种新方法——核糖体工程^[17], 这一技术主要利用链霉素(*Streptomycin*, Str)、庆大霉素(*Gentamicin*, Gen)、利福平(*Rifampicin*, Rif)等进行菌株选育。菌株通过获得以上抗生素的抗性突变, 自身的核糖体结构和次级代谢活动会发生一些改变, 进而导致相关目标代谢产物产量有了较大提升^[18]。Ochi等于2001年, 通过对一株*Streptomyces coelicolor* A3(2)连续引入Str、Gen和Rif 3种抗性突变, 最终得到一株三重抗性突变菌株, 其放线紫红素产量比出发菌株提升了48倍^[18]。这一方法效果明显, 说明了筛选多重抗性突变株在提升目标菌株的次级代谢产物产量方面是一种有效方法。另外, 与其他育种方法相比, 核糖体工程简单易行, 便于大批量筛选。

本文以一株经过多轮原生质体融合和常压等离子体诱变改造菌株*S. albulus* AS3-14为出发菌, 通过引入链霉素和利福平抗性, 以提高其 ϵ -PL产量, 为后续工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *S. albulus* AS3-14为出发菌株, ϵ -PL摇瓶产量为2.51 g/L; *S. albulus* WG-600为低Str抗性突变株, ϵ -PL摇瓶产量为2.96 g/L; *S. albulus* WG-601为高Str抗性突变株, ϵ -PL摇瓶产量为3.26 g/L; *S. albulus* WG-608为Str、Rif双重抗性突变株, ϵ -PL摇瓶产量为3.7 g/L。上述菌株均保藏于江南大学生物工程学院发酵与生态工学研究室。

1.1.2 培养基: (1) 固体培养基(BTN培养基, g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 1.2, 酵母粉 1.0, 琼脂 20.0, pH 7.5; (2) 种子培养基(M3G培养基, g/L): 葡萄糖 50.0, 酵母膏 5.0, 硫酸铵 10.0, 磷酸二氢钾 1.36, 磷酸氢二钾 0.8, 七水合硫酸镁 0.5, 硫酸锌 0.04, 硫酸铁 0.03, pH 6.8; (3) 优化培养基(发酵培养基, g/L): 葡萄糖 60.0, 酵母粉 8.0, 硫酸铵 5.0, 七水合硫酸镁 2.0, 磷酸二氢钾 2.0, 硫酸锌 0.03, 硫酸铁 0.04, pH 6.8; (4) RSM

培养基(g/L): 葡萄糖 60.0, 牛肉膏 10.0, 硫酸铵 5.0, 七水合硫酸镁 0.8, 磷酸二氢钾 4.0, 硫酸铁 0.04, pH 6.8。所有培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 单孢子悬浮液制备: 实验中所用菌株均保藏在 -80 °C 的甘油管中。在实验前, 将甘油管中保藏的菌株进行逐层解冻, 然后孢子涂布到固体培养基上, 30 °C 培养 7 d, 获得数量倍增的菌株以及孢子。单孢子悬浮液制备方法参照文献[19], 每个平板用 5 mL 的无菌水进行冲洗孢子, 得到的孢子悬浮液进行充分漩涡振荡打散后, 经 8 层纱布过滤得到单孢子沉淀。沉淀用无菌水冲洗 2 次, 加入适量无菌水, 调整孢子浓度到 10^9 个/mL 左右。在每次接种孢子到固体培养基前, 用超声器将孢子充分打散, 再进行接种实验。

1.2.2 最小抑菌浓度(MIC)测定: 取孢子生长情况良好的菌株制备单孢子悬浮液, 调整其孢子浓度到 10^6 个/mL 左右。取 120 μ L 单孢子悬浮液涂布到设计的抗生素梯度浓度的固体培养基上, 相同浓度设置 3 个平行, 30 °C 培养 5 d。观察菌落生长情况, 记录无菌落生长的最小浓度, 即抗生素对该菌株的最小抑菌浓度(MIC)。Str 的浓度梯度为: 0、1、2、3、4、5 mg/L; Rif 的浓度梯度为: 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L。

1.2.3 低浓度 Str 高产突变菌株选育: 将菌株制备单孢子悬浮液并稀释到适宜浓度, 涂布到含链霉素(1–10 MIC)的固体培养基上, 30 °C 培养 5 d。根据菌株生长情况, 挑选直径较大或者与原始菌有较大差异的菌落, 进行初筛。对于产量提升幅度较大的菌株再次进行复筛, 选择产量提升最高的 5 株菌进行保藏, 供下一步实验使用。

1.2.4 高浓度 Str 高产突变菌株选育: 以上一步获得的产量提升较多的低 Str 抗性菌株为出发菌, 制备适宜浓度的单孢子悬浮液, 涂布到含 Str (20、50、100 MIC)的固体培养基上, 30 °C 培养 5 d。根据菌株生长情况挑选菌落、扩大培养, 并进行初筛和复筛。选择产量提升最高的 5 株菌进行保藏, 供下

一步实验使用。

1.2.5 双重抗生素抗性突变菌株选育: 以上一步获得的产量提升较多的高 Str 抗性菌株为出发菌, 制备适宜浓度的单孢子悬浮液, 分别涂布到含有不同浓度(5–20 MIC)的利福平的固体培养基平板上, 30 °C 培养 5 d。根据菌株生长情况挑选菌落、扩大培养, 并进行初筛和复筛。选择产量提升最高的 10 株菌进行保藏。

1.2.6 初筛和复筛: 初筛时, 刮 3 环孢子接种到含 40 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶, 在摇床中 30 °C、200 r/min 培养 96 h。对培养好的菌株用甲基橙法^[20]进行 ϵ -PL 产量测定, 选出产量高的菌株。复筛时, 先将菌株在种子培养基中 30 °C、200 r/min 培养 24 h; 然后将种子液转接到 3 个平行的含 40 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 在摇床中 30 °C、200 r/min 培养 96 h, 测定 ϵ -PL 产量, 选出高产菌株。

1.2.7 高产突变株不同培养基发酵性能测试: 取 *S. albulus* AS3-14、链霉素抗性菌株 *S. albulus* WG-601、双重抗性菌株 *S. albulus* WG-608, 接种到 M3G 培养基、RSM 培养基、优化培养基 3 种培养基中, 每个菌株设置 3 个平行, 30 °C、200 r/min 培养 4 d, 测定 ϵ -PL 的产量, 对比 3 种培养基上的 ϵ -PL 摇瓶发酵水平。

1.2.8 5 L 发酵罐补料分批发酵: 5 L 发酵罐配制 3.2 L 灭菌的发酵培养基, 接入培养 30 h 的 320 mL 种子液, 同时用氨水(12.5%, 体积比)调节初始发酵罐的 pH 到 6.8。当发酵开始, pH 下降到 4.0 后, 自动流加氨水来维持 pH。通过调节发酵罐的转速(200–800 r/min)来控制溶氧水平在 30%左右。发酵过程中, 以补料形式自动流加灭菌的葡萄糖, 使其浓度维持在 10 g/L 左右。同样, 通过添加灭好菌的硫酸铵来控制发酵罐中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度在 1 g/L。

1.3 分析方法

1.3.1 葡萄糖浓度测定: 使用 SBA-40D 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定发酵液中葡

葡萄糖的浓度。取 10 mL 发酵液, 4 500 \times g 离心 10 min, 把上清液稀释至糖浓度小于 1 g/L。取 25 μ L 稀释液直接进样。读取数值, 计算发酵液糖浓度。

1.3.2 菌体干重(DCW)测定: 取 10 mL 发酵液, 4 500 \times g 离心 10 min; 去掉上清液, 将沉淀用无菌水冲洗 2 次, 105 $^{\circ}$ C 烘干至恒重, 测定菌体细胞干重。

1.3.3 ϵ -PL 浓度的测定: 参考文献[20], 采用甲基橙测定法: 取发酵液 10 mL 进行 4 500 \times g 离心 10 min, 取上清用磷酸缓冲液(0.7 mmol/L)稀释, 使 ϵ -PL 浓度在 0.075–0.135 g/L。用 2 mL 的稀释液与等体积甲基橙溶液(1 mmol/L)振荡混匀, 置于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床反应 30 min, 然后 4 500 \times g 离心 15 min, 将 0.5 mL 上清加入到含有 9.5 mL 磷酸缓冲液的玻璃试管中, 振荡混匀。用磷酸缓冲液标零分光光度计, 在 465 nm 处测定 OD 值, 经标准曲线计算出 ϵ -PL 的浓度。

1.3.4 ϵ -PL 代谢途径关键酶活力测定: 取菌株孢子接种到含发酵培养基 40 mL 的 250 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。30 h 后, 取发酵液经过 4 500 \times g 离心 10 min 后, 去除上清液; 用 0.2% 的 KCl 溶液离心洗涤 2 遍(4 500 \times g 离心 10 min), 悬浮于含有 20% 甘油和 1 mmol/L 二硫苏糖醇的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中, 其中 1 g 湿菌体对应 5 mL 缓冲液。采用超声破碎细胞后, 经 12 000 \times g 离心 20 min, 取上清液即为粗酶液。6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose 6-phosphatedehydrogenase, G6PDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)、柠檬酸合成酶(Citrate synthase, CS)和天冬氨酸激酶(Aspartokinase, AsK)的酶活力测定方法参考文献[21]。

2 结果与讨论

2.1 抗生素最小抑菌浓度

图 1 显示的是 *S. albulus* AS3-14 单孢子悬浮液

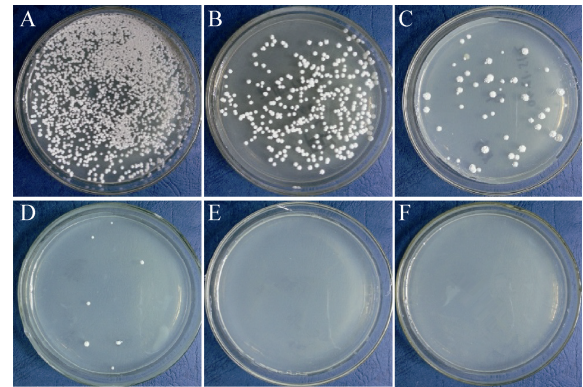


图 1 *S. albulus* AS3-14 在不同浓度 Streptomycin 的 BNT 平板上的生长情况

Figure 1 The growth of *S. albulus* AS3-14 on BNT plate contained with different Str concentrations on 5th day

注: A: 链霉素浓度 0 mg/L; B: 链霉素浓度 1 mg/L; C: 链霉素浓度 2 mg/L; D: 链霉素浓度 3 mg/L; E: 链霉素浓度 4 mg/L; F: 链霉素浓度 5 mg/L.

Note: A: 0 mg/L streptomycin; B: 1 mg/L streptomycin; C: 2 mg/L streptomycin; D: 3 mg/L streptomycin; E: 4 mg/L streptomycin; F: 5 mg/L streptomycin.

(孢子浓度为 10^6 个/mL 左右)在含有不同浓度 Str 的固体培养基上生长情况。从图 1 中可以看出, *S. albulus* AS3-14 能够在无 Str 的平板上生长良好, 并在第 5 天开始形成孢子(图 1A); 在含有 1 mg/L 和 2 mg/L 的 Str 的平板上, 菌体生长受到抑制, 只有少数单菌落出现, 且未形成孢子(图 1B 和 1C); 而当 Str 浓度达到 3 mg/L 及以上, *S. albulus* AS3-14 均不能在平板上生长。因此, 确定 *S. albulus* AS3-14 的 Str 最小抑菌浓度(MIC)为 3 mg/L, 相同实验测得 *S. albulus* AS3-14 的 Rif 最小抑菌浓度(MIC)为 0.2 mg/L。

2.2 选育 Str 抗性的 ϵ -PL 高产菌株

2.2.1 选育低浓度 Str 抗性 ϵ -PL 高产突变株: 将 *S. albulus* AS3-14 孢子悬浮液(孢子浓度为 10^6 个/mL)涂布在含 Str 的梯度浓度平板上(1–10 MIC), 经过 5–7 d 的培养, 从平板上共挑选出 125 个单菌落。通过初筛和复筛, 发现有 41 株突变株产量获得提升(表 1), 正突变率为 33%; ϵ -PL 摇瓶平均产量达到 2.9 ± 0.1 g/L, 较出发菌株提高 16%, 最高 ϵ -PL

产量达到 2.96 ± 0.1 g/L (菌株 *S. albulus* WG-600)。由此可以看出,通过筛选 *S. albulus* AS3-14 的 Str 抗性突变菌株来选育 ϵ -PL 高产突变株的方法,不仅能够获得较高的正突变率,而且能够显著提高产生菌的 ϵ -PL 产量。这表明链霉素抗性菌株筛选是一种有效的 ϵ -PL 产生菌育种手段。

2.2.2 选育高浓度 Str 抗性 ϵ -PL 高产突变株: 选取低浓度 Str 抗性突变株 *S. albulus* WG-600 作为出发菌株,继续进行较高浓度 Str (20、50、100 MIC) 抗性菌株选育。实验结果显示,Str 浓度为 100 MIC 的抗性平板上几乎长不出单菌落,而 20、50 MIC 的抗性平板上菌落生长良好。因此,分别从 20 MIC 和 50 MIC 的 Str 平板上,挑选 135 株和 145 株单菌落进行初筛和复筛,结果如表 1 所示。在 50 MIC 链霉素平板上共获得 14 株 ϵ -PL 产量达到 3.2 ± 0.1 g/L 突变株,比出发菌产量提高了 10.3%,最高 ϵ -PL 产量达到 3.26 ± 0.1 g/L (菌株 *S. albulus* WG-601),实验结果表明经过高浓度 Str 抗性筛选能够进一步提高 ϵ -PL 高产突变株产量。

本实验先对 *S. albulus* AS3-14 进行较低浓度 Str 抗性菌株(1–10 MIC)筛选,再进行较高浓度 Str 抗性菌株(20 MIC、50 MIC)筛选,最后获得了 Str 抗性的高产突变菌株 *S. albulus* WG-601,使其 ϵ -PL 产量相比于出发菌 *S. albulus* AS3-14 提高了 28%。Tanaka 等在 2009 年曾报道^[22]Str 低、高抗性双突变菌株的次级代谢产物产量会有进一步的提升;并证明低浓度 Str 抗性突变一般是发生了 *rsmG* 基因的

突变,较高浓度 Str 抗性突变一般是发生了 *rpsL* 基因的突变,而先进行低 Str 抗性菌株筛选再进行高 Str 抗性菌株筛选,很可能结合了这两种突变效果。本实验对 ϵ -PL 产生菌进行低浓度和高浓度的 Str 的二次筛选后,显著地提高了小白链霉菌产 ϵ -PL 的水平。通过 Str 低、高浓度的抗性突变菌株的筛选,得到了一株高产 ϵ -PL 的菌株 *S. albulus* WG-601,下一步以此菌株为出发菌筛选抗生素双重抗性菌株。

2.3 选育双重抗生素抗性 ϵ -PL 高产菌株

将上述获得的 Str 抗性的高产突变株 *S. albulus* WG-601 孢子悬浮液涂布在含有 Rif 的梯度浓度平板上(5–20 MIC),从长出的单菌落中挑选了 133 株进行初筛和复筛。实验结果发现,在利福平抗性平板上高产菌株的突变率达到了 15%,其中一株高产菌株 WG-608 的 ϵ -PL 最高产量达到了 3.7 ± 0.1 g/L,是 *S. albulus* AS3-14 的 1.4 倍(表 1)。由此可以看出,对菌株进行 Rif 抗性筛选能够进一步提高 *Streptomyces albulus* 的 ϵ -PL 产量。值得指出的是,Str 和 Rif 双重抗性突变株 *S. albulus* WG-608 的产孢子时间由 7 d 延长到了 8 d,这也说明了双重抗性引入改变了菌株的正常生理代谢。

2.4 不同培养基发酵产量对比

一般情况下,由于目标代谢产物的产量出现了较大提升,高产突变株相比于出发菌株往往在营养需求上会发生较大改变,因此考察了它们在 3 种 ϵ -PL 发酵培养基上的摇瓶发酵产量。从图 2

表 1 筛选抗性菌株结果统计

Table 1 The statistical data of screening the drug-resistant mutants experiment

筛选方法 Screening methods	出发菌株 Parent strain	筛选浓度 Screening concentration (MIC)	正突变率 Positive mutation rate (%)	平均产量 Average production (g/L)	最高产量 Maximum production (g/L)
Screening of low Str resistance strain	AS3-14 (2.5 g/L)	Str: 1–10	33 (41/125)	2.9 ± 0.1	2.96 ± 0.1
		Str: 20	15 (20/135)	3.1 ± 0.2	3.20 ± 0.1
		Str: 50	10 (14/145)	3.2 ± 0.1	3.26 ± 0.1
Screening of high Str resistance strain	WG-600 (2.9 g/L)	Str: 100		未生长孢子	
Screening of double resistance strain	WG-601 (3.2 g/L)	Rif: 5–20	15 (20/133)	3.6 ± 0.3	3.70 ± 0.1

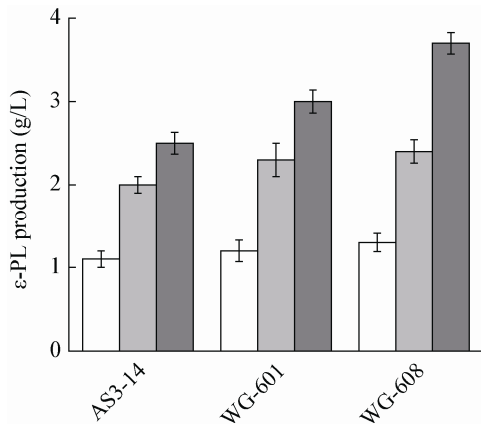


图2 AS3-14、WG-601、WG-608 在 3 种培养基的 ϵ -PL 产量对比

Figure 2 The results of ϵ -PL production in M3G, RSM and the optimized media in shake-flask

注: □: M3G 培养基; ▨: RSM 培养基; ■: 优化培养基.
Note: □: M3G medium; ▨: RSM medium; ■: Optimized medium.

可以看出, 突变株 *S. albulus* WG-601 和 *S. albulus* WG-608 在不同培养基的 ϵ -PL 产量增加趋势与出发菌株 *S. albulus* AS3-14 相同, 但突变株 *S. albulus* WG-601 和 *S. albulus* WG-608 在 RSM 培养基和优化培养基上增加幅度明显超过出发菌株; 高产突变株 *S. albulus* WG-608 在 3 种培养基中均表现出最高 ϵ -PL 产量, 表明双重抗生素抗性显著增强了 *S. albulus* WG-608 的 ϵ -PL 合成能力。另外实验结果表明: 相比较于其他 2 种培养基, 优化培养基更有利于菌株发挥 ϵ -PL 生产能力。因此下一步选择优化培

养基用于考察出发菌 *S. albulus* AS3-14 和高产突变株 *S. albulus* WG-608 在发酵罐上的发酵过程差异。

2.5 5 L 发酵罐补料分批发酵生产 ϵ -PL 对比

由于 ϵ -PL 发酵过程严重依赖 pH 值控制, 而摇瓶发酵过程很难实现 pH 值的准确控制, 因此在 5 L 发酵罐中进一步评价高产突变株的 ϵ -PL 的生产能力, 如图 3 所示。利用 pH 4.0 恒定控制策略, 结合葡萄糖和硫酸铵补料, 经过 192 h 连续发酵, 高产突变株 *S. albulus* WG-608 的 ϵ -PL 产量达到了 53 g/L, 较出发菌株 *S. albulus* AS3-14 (40 g/L) 提高了 32.5%。另外, 高产突变株 *S. albulus* WG-608 的菌体量最高达到了 55 g/L, 较出发菌株 *S. albulus* AS3-14 (40 g/L) 提高了 30%。因此, 高产菌株 *S. albulus* WG-608 的 ϵ -PL 产量提高是通过增加菌体量的方式实现的。以上实验结果说明, 通过双重抗生素抗性的引入, 能够显著提升 ϵ -PL 生产菌在 5 L 发酵罐 ϵ -PL 发酵水平。

2.6 ϵ -PL 合成相关的中心碳代谢途径中关键酶酶活性分析

众所周知, 酶是微生物生理代谢的基础。在我们之前的研究中, 已经阐明了 *S. albulus* 中的 ϵ -PL 合成相关的中心碳代谢途径以及其中涉及的关键酶^[21]。为了从生理代谢水平探究高产菌株 *S. albulus* WG-608 高产 ϵ -PL 的机制, 本文初步考察了与菌体生长和 ϵ -PL 合成相关的中心碳代谢途

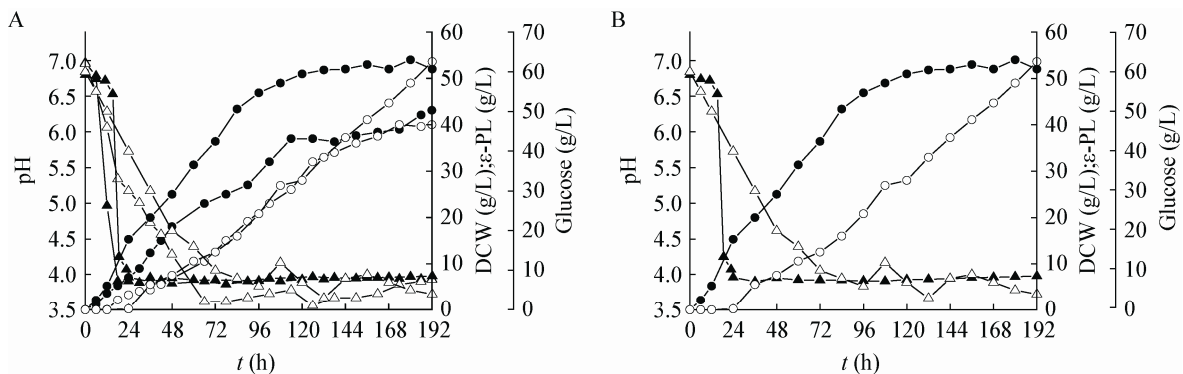


图3 出发菌株 *S. albulus* AS3-14 (A) 与双重抗性菌株 *S. albulus* WG-608 (B) 补料分批发酵对比

Figure 3 Comparison of fed-batch fermentation between *S. albulus* AS3-14 (A) and *S. albulus* WG-608 (B)

注: 黑色圆圈: DCW; 白色圆圈: ϵ -PL 浓度; 黑色三角: pH; 白色三角: 葡萄糖浓度。

Note: Black circle: DCW; White circle: ϵ -PL concentration; Black triangle: pH; White triangle: Glucose concentration.

径中的 4 个关键酶, 即戊糖磷酸途径中的 G6PDH, 回补反应中的 PEPC, 三羧酸循环中的 CS 以及 ϵ -PL 合成途径中的 AsK。从表 2 的结果中可以看出, 高产菌株的 4 个关键酶酶活性均比出发菌株显著提高。突变株 G6PDH 酶活力由出发菌株 3.3 ± 0.1 U/mg 提高到 8.1 ± 0.2 U/mg, 说明突变株中有更多的代谢流量流向了戊糖磷酸途径, 为菌体的生长提供了更多前体, 这与高产菌株相比出发菌株在 5 L 发酵罐中菌体量提高相吻合; 相比于出发菌株, 高产菌株 *S. albulus* WG-608 的 PEPC 酶和 CS 酶活力均有提高, 可以为三羧酸循环提供更多的草酰乙酸, 高产菌株的三羧酸循环通量增大, 并为 ϵ -PL 的合成提供更多的 ATP 和前体物质。另外, AsK 酶是 ϵ -PL 合成前体 L-赖氨酸合成途径的第一个酶, 该酶活力比出发菌株提高了 60%, 意味着更多的碳代谢流流向了该途径, 从而可以提供更多的前体 L-赖氨酸。上述中心碳代谢途径关键酶酶活性的增加, 均为高产菌体生长和 ϵ -PL 合成提供了更多的前体和能量。

3 结论

本研究基于核糖体工程菌株选育理念, 通过 Str 和 Rif 两种抗生素抗性筛选, 获得了一株 ϵ -PL 高产突变株 *S. albulus* WG-608, 其摇瓶产量达到 3.7 g/L, 较出发菌提高了 42.3%。高产菌株在不同培养基中均表现出 ϵ -PL 产量提高, 且在优化培养基中实现了最高摇瓶发酵产量。5 L 发酵罐补料-分批发酵实验结果表明 ϵ -PL 产量可达到 53 g/L, 比出发菌株产量提高了 32.5%。进一步对菌体生长和 ϵ -PL 合成相关的中心碳代谢途径关键酶活性的研究发现, 高产菌株较出发菌株的 G6PDH 酶、PEPC

酶、CS 酶和 ASK 酶活性均有所增加, 表明抗生素抗性菌株选育策略能够强化小白链霉菌中与 ϵ -PL 合成相关的代谢能力。

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45(11): 2497-2502
- [2] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. chemical studies[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45(11): 2503-2508
- [3] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41(9): 1807-1809
- [4] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(9): 1148-1159
- [5] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(1): 21-26
- [6] National Health and Family Planning Commission. Notice on the approval of ϵ -Poly-L-lysine, etc. four new varieties of food additives(No.5,2014)[EB/OL]. 2014-09-10. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201404/a93467d652c24a75a6de637abde31f30.shtml> (in Chinese)
- [7] Bankar SB, Singhal RS. Optimization of poly- ϵ -lysine production by *Streptomyces noursei* NRRL 5126[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8370-8375
- [8] Zhang C, Zhang DR, He W, et al. A simple and sensitive method for screening ϵ -PL producing strains from soils[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2006, 44(11): 1104-1107 (in Chinese)
- [9] 张超, 张东荣, 贺魏, 等. 一种简便的 ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选方法[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2006, 44(11): 1104-1107
- [9] Chen WW, Zhu HY, Xu H. Breeding of mass-producing ϵ -polylysine mutant and its batch fermentation[J]. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(2): 28-30 (in Chinese)
- [9] 陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹. ϵ -聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究[J]. *工业微生物*, 2007, 37(2): 28-30
- [10] Jia SR, Dong HJ, Jiang JY, et al. The selection and breeding of ϵ -polylysine high-producing strain[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(11): 14-17 (in Chinese)
- [10] 贾士儒, 董惠钧, 姜俊云, 等. ϵ -聚赖氨酸高产菌株的选育[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(11): 14-17
- [11] Yu MJ, Tian FW, Fan DM, et al. Study on mutation breeding of high ϵ -poly-L-lysine-producing *Streptomyces albulus*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(7): 99-101,104 (in Chinese)
- [11] 余明洁, 田丰伟, 范大明, 等. 高产 ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌的复合诱变选育研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 99-101,104
- [12] Zhang C, Wang ZG, Duan ZY, et al. Breeding of high-yield ϵ -PL mutant strains with UV[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2007, 5(3): 64-68 (in Chinese)
- [12] 张超, 王正刚, 段作营, 等. 大剂量紫外诱变选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(3): 64-68
- [13] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, et al. Improved ϵ -poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus*[J]. *Seibutsu-Kogaku Kaishi*, 1998, 76(12): 487-493
- [14] Zong H, Zhan Y, Li X, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(13): 3154-3158
- [15] Li S, Li F, Chen XS, et al. Genome shuffling enhanced ϵ -poly-L-lysine production by improving glucose tolerance of *Streptomyces graminearus*[J]. *Applied Biochemistry and*

表 2 出发菌株 *S. albulus* AS3-14 与 *S. albulus* WG-608 菌株的关键酶酶活力对比

Table 2 Comparison of key enzyme activities between *S. albulus* AS3-14 and *S. albulus* WG-608

菌株 Strains	关键酶酶活 Key enzyme activity (U/mg protein)			
	G6PDH	PEPC	CS	AsK
WG-608	8.1±0.2	45.3±2.0	43.2±1.8	8.1±0.2
AS3-14	3.3±0.1	34.5±1.7	37.8±2.4	5.6±0.1

- Biotechnology, 2012, 166(2): 414-423
- [16] Zhou YP, Ren XD, Wang L, et al. Enhancement of ϵ -poly-lysine production in ϵ -poly-lysine-tolerant *Streptomyces* sp. by genome shuffling[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(9): 1705-1713
- [17] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(6): 1373-1386
- [18] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production[J]. Advances in Applied Microbiology, 2004, 56: 155-184
- [19] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF. Genetic Manipulation of *Streptomyces* a Laboratory Manual[M]. Translated by Deng ZX and Tang JL. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1988: 8-10 (in Chinese)
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 邓子新, 唐纪良, 译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 8-10
- [20] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574
- [21] Zeng X, Chen XS, Ren XD, et al. Insights into the role of glucose and glycerol as a mixed carbon source in the improvement of ϵ -poly-L-lysine productivity[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(8): 2211-2224
- [22] Tanaka Y, Komatsu M, Okamoto S, et al. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4919-4922

编辑部公告

《微生物学通报》2017年“环境微生物专刊”征稿通知

一、《微生物学通报》简介

《微生物学通报》1974年创刊,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会共同主办,中国科学院主管,国内外公开发行人,以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性期刊。刊登内容涉及工业、环境、农业、食品、兽医、药物、医学微生物学,微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物、技术成果产业化研究,以及微生物学教学研究改革等诸多领域。

本刊为中文核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012-2015年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续4年获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。《微生物学通报》2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

二、2017年“环境微生物专刊”介绍

为了展现环境微生物学科研工作者取得的最新进展,促进我国环境微生物学的进步和发展,本刊结合“第十九次全国环境微生物学学术研讨会”进行征稿,出版2017年“环境微生物专刊”。专刊出版周期短,深受广大作者的普遍欢迎,也方便相关领域科研工作者及时、方便地了解该领域研究状况。为缩短发表周期,加快专刊稿件的出版速度,本刊将对专刊稿件进行快速处理,最终择优筛选出一定数量的稿件以“环境微生物专刊”出版。

1、征稿范围:环境微生物学领域所取得的最新研究成果和技术成果,包括研究论文和综述

2、收稿截止日期:2017年1月31日

3、投稿方式:请参见我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“投稿须知”。

注:请在您的稿件标题上加注“环境微生物专刊”字样,否则将以普通稿件处理。

4、特别说明:本专刊不是增刊,而是在2017年6月或7月《微生物学通报》正刊上刊出。

5、联系方式:

电话:010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

投稿中若有问题,欢迎随时与我们联系,我们将在第一时间给您答复。