

链霉菌 ϵ -聚赖氨酸发酵过程中的氧化胁迫效应

颜鹏¹ 孙浩本¹ 毛忠贵² 唐蕾^{1,2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】探究 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)产生菌对 pH 和 ϵ -PL 的耐受性、氧化胁迫与 ϵ -PL 合成之间的关系。【方法】选取 3 株 ϵ -PL 产生菌 *Streptomyces* sp. AF3-44、*Streptomyces* sp. AS32 和 *Streptomyces albulus* F15, 比较其在发酵性能、pH 和 ϵ -PL 耐受性以及抗氧化胁迫能力上的差异, 并对菌株发酵过程的活性氧成因进行分析。【结果】在 3 株菌中 AF3-44 具有最强的 pH 和 ϵ -PL 耐受性及抗氧化胁迫能力, 因而在发酵后期能够保持良好的细胞活性和最高的 ϵ -PL 浓度; ϵ -PL 引起的氧化胁迫主要发生在发酵前期, 而发酵中后期氧化胁迫的产生主要由酸性 pH 导致。【结论】提高链霉菌 ϵ -PL 发酵过程中的抗氧化胁迫能力, 可提升菌体活力和发酵水平。

关键词: 氧化胁迫, ϵ -聚赖氨酸, 活性氧, 链霉菌

Oxidative stress in ϵ -poly-L-lysine fermentation by *Streptomyces*

YAN Peng¹ SUN Hao-Ben¹ MAO Zhong-Gui² TANG Lei^{1,2*}

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

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To study the relationship between the tolerance of pH and ϵ -PL, oxidative stress and ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) synthesis in ϵ -PL producing strain. [Methods] The fermentation activities, pH and ϵ -PL tolerance, and antioxidative abilities among *Streptomyces* sp. AF3-44, *Streptomyces* sp. AS32 and *Streptomyces albulus* F15 were compared, and the cause for reactive oxygen species generation was analyzed. [Results] AF3-44 had the best pH and ϵ -PL tolerance and antioxidative ability among three tested strains, and kept good cell activity with the highest ϵ -PL concentration. ϵ -PL caused the oxidative stress at the earlier but pH at the later stage of fermentation. [Conclusion] Improvement of the antioxidative ability in ϵ -PL fermentation by *Streptomyces* could increase the cell activity and ϵ -PL level in fermentation.

Keywords: Oxidative stress, ϵ -Poly-L-lysine, Reactive oxygen species, *Streptomyces*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21376106); 111 Project (No. 111-2-06)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

Received: February 03, 2017; Accepted: April 12, 2017; Published online (www.cnki.net): April 18, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376106); 111 引智计划(No. 111-2-06)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-02-03; 接受日期: 2017-04-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-18

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -Poly-L-lysine, ϵ -PL)是微生物产生的由 25–30 个赖氨酸残基经 α -COOH 和 ϵ -NH₂ 缩合而成的聚合物^[1]。 ϵ -PL 带有正电荷,水溶性及生物相容性好,无毒且抑菌谱广,可应用于食品、医药等领域^[2]。 ϵ -PL 作为食品添加剂已在日本、美国、中国等国家获准使用,具有广阔的市场前景^[3-4]。

目前微生物发酵是 ϵ -PL 工业化生产的主要方式,产物浓度低、成本高是症结所在,如常用的 *Streptomyces albulus* 摇瓶发酵, ϵ -PL 的浓度在 0.3–0.9 g/L^[5],解决问题的方式包括 ϵ -PL 菌种的遗传改造以及发酵工艺控制等。依据 L-赖氨酸的代谢途径,解除天冬氨酸激酶的反馈控制,提高单体 L-赖氨酸的胞内含量曾经是 ϵ -PL 菌种改造的有效方法,如 *S. albulus* 摇瓶发酵中 ϵ -PL 的浓度提高到 1.2 g/L^[6-7]。但是这种通过对单一酶活力的调控以提升产物浓度的幅度有限。近年来,利用基因组重排(Genome shuffling, GS)和核糖体工程的方法在全基因组和细胞蛋白合成水平上尝试 ϵ -PL 生产菌种的改良已初见成效,摇瓶发酵 ϵ -PL 的浓度在 3.0 g/L 以上^[8-9],但其相关机制尚不明确。本研究的前期工作是将 *Streptomyces* sp. AS32 和 *Streptomyces albulus* F15 进行 GS 育种,获得的 GS 菌种 *Streptomyces* sp. AF3-44 其 ϵ -PL 合成的代谢通量发生改变,合成能力有所提升^[9]。本研究试图在此基础上进一步拓展,深入分析是否存在其他因素能够显著影响 ϵ -PL 合成,阐明 GS 方式改良 ϵ -PL 生产菌种的机理。

发酵工艺控制是 ϵ -PL 增产的另一种策略。在链霉菌 ϵ -PL 发酵过程中,pH 的变化是 ϵ -PL 合成与否的关键。当培养基 pH 值降低到 4.0 时 ϵ -PL 开始合成,但酸性环境对菌体的生长显然不利。Kahar 等^[10]采用生长与产物合成分阶段控制的手段,5 L 发酵罐、流加发酵条件下, ϵ -PL 的浓度达到 48.3 g/L。Ren 等采用 pH 冲击策略,流加培养中 ϵ -PL 的浓度为 54.7 g/L,较未冲击提高了 52.5%^[11]。另外,作为抑菌剂 ϵ -PL 的累积对产生菌自身也是不利的,Liu 等^[12]通过原位分离和固定化技术解除 ϵ -PL 的产

物抑制和对菌体的毒害作用,并通过外源添加酵母提取物增强菌体活性,30 L 发酵罐、流加发酵条件下, ϵ -PL 的浓度为 28.2 g/L^[13]。Zhou 等^[14]利用 GS 手段选育出一株 ϵ -PL 耐受型高产菌株,能够在恒定 pH 4.0 时维持较好的菌体活力和 ϵ -PL 合成能力,但其耐受机制尚不明确。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是正常有氧代谢过程中形成的一类活性物质的总称,过高的 ROS 会引起 DNA、蛋白质、脂质等胞内生物大分子的氧化损伤,影响细胞活性^[15]。Wang 等^[16]研究表明,酸胁迫能够诱发谷氨酸棒杆菌产生过量的 ROS,导致酸胁迫下的细胞毒性。Ye 等^[17]报道 ROS 参与了 ϵ -PL 介导的抑菌作用。因此,在好氧、低 pH 和高 ϵ -PL 的发酵条件下,ROS 有可能对生产菌株产生损伤,导致细胞活性的降低,从而影响 ϵ -PL 积累。

为了验证上述推测,本文从不同 ϵ -PL 产生菌株对 ϵ -PL 和 pH 耐受性及 ROS 和发酵性能之间的关系出发,探究在发酵过程中 ϵ -PL 和 pH 对 ϵ -PL 耐受型 GS 菌株 ROS 形成的影响,从而为控制 ROS 水平及提升菌体活力和 ϵ -PL 的发酵水平提供一个新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种:葡萄糖耐受型 *Streptomyces* sp. AS32、 ϵ -PL 耐受型 *S. albulus* F15 和 GS 菌株 *Streptomyces* sp. AF3-44 为实验室保存 ϵ -PL 产生菌株^[9]。

1.1.2 培养基:平板培养基(BTN)的配制参照文献^[9]。种子培养基和发酵培养基的配制参照文献^[9]中的筛选培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器:纯度 99%的 ϵ -PL 样品,浙江新银象生物工程公司;其它试剂均为分析纯,中国医药集团上海试剂公司。UV-2100 分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;多功能酶标仪 BIOTEK,美国伯腾仪器有限公司;激光共聚焦显微镜 Leica TCS SP8,德国莱卡公司;超声波细胞破碎仪 SM-650D,南京舜玛仪器设备有限公司;紫外可见分光光度计 U-3900,日本日立株式会社;高效液相

色谱系统 DIONEX U-3000, 美国戴安公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法: 固体平板培养和种子培养参照文献[18]。摇瓶发酵培养: 将 3 mL 种子液接入含有 40 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 3 d。

1.2.2 不同 ϵ -PL 浓度和不同 pH 固体培养基的配制: 向灭菌后的 BTN 培养基中加入无菌 ϵ -PL 母液, 使 BTN 培养基中 ϵ -PL 的终浓度分别为所需浓度, 倒平板。pH 4.0 时 BTN 培养基中琼脂含量为 40 g/L, pH 5.0 时为 30 g/L, 其余为 20 g/L。

1.2.3 不同 pH 缓冲体系的配制: 参考 Ren 等^[19]的方法。

1.2.4 发酵过程参数的测定: ϵ -PL 浓度的测定参考 Itzhaki 等^[20]的方法。菌体干重(DCW)的测定参考 Chen 等^[21]的方法。

1.2.5 丙二醛(Malonaldehyde, MDA)和 ROS 的测定: 参考 Zeng 等^[22]的方法。

1.2.6 细胞活力的测定: 参考 Zhou 等^[18]的方法。

1.2.7 细胞提取液的制备: 发酵液经 4 500 r/min 离心 10 min, 用 0.2% KCl 洗涤 2 次, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 取 1 g 菌泥并用 Tris-HCl (0.5 mol/L)定容至 5 mL, 进行超声波细胞破碎。破碎条件: 功率 40% (总功率为 650 W), 破碎 2 s 停 2 s, 工作 20 min (实际破碎 10 min), 破碎过程在冰水混合物(0 °C)中进行。经 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为细胞提取液, 用于海藻糖含量和抗氧化酶类活性测定。

1.2.8 海藻糖含量的测定: 取细胞提取液 300 μ L, 加入无水乙醇 700 μ L, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液采用高效液相色谱法测定海藻糖含量。色谱柱为 Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, 9 μ m, Hercules, CA); 检测器为 RI (Shodex RI-101, Japan); 流动相 5 mmol/L 硫酸; 柱温 60 °C; 流速 0.6 mL/min; 进样量 10 μ L。

1.2.9 抗氧化酶类活力测定: 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)活力、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶

(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)活力的测定参考 Zeng 等^[22]的方法。其中, SOD 酶活定义为: 在 1 mL 反应液中, 1 min 内抑制联苯三酚自氧化速率达到 50%时的酶量为 1 个酶活单位; CAT 酶活定义为: 在 25 °C、pH 7.0 条件下, 每分钟分解 1 μ mol/L H₂O₂所需酶量为 1 个酶活单位; G6PDH 酶活定义为: 每分钟产生 1 μ mol NADPH 所需的酶量为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 3 株 ϵ -PL 产生菌发酵过程参数比较

选取前期研究中获得的葡萄糖耐受型 *Streptomyces* sp. AS32、 ϵ -PL 耐受型 *S. albulus* F15 和上述两种菌株为亲本, 经过三轮 GS 筛选得到的 ϵ -PL 耐受型 *Streptomyces* sp. AF3-44^[9]作为研究对象。F15 来源于 ϵ -PL 生产的常用菌株 *S. albulus* 且具有产物耐受性, AS32 为底物耐受型菌株, AF3-44 为 F15 和 AS32 的融合菌株, 3 种菌株各具特征。本研究比较了它们在摇瓶发酵过程中 pH、 ϵ -PL 和菌体生长的差异。pH 是影响 ϵ -PL 合成和菌体生长的重要因素, 如图 1 所示。F15 和 AF3-44 的 pH 值下降速度较 AS32 快, ϵ -PL 开始合成的时间早于 AS32, 但 F15 的菌体生长受到抑制, 发酵结束时菌体量为 5.4 g/L, 低于 AS32 的 6.8 g/L。AF3-44 的菌体量为 6.4 g/L, 虽略低于 AS32, 但 ϵ -PL 的浓度明显高于 F15 和 AS32, 说明 AF3-44 的单位菌体 ϵ -PL 合成能力强于其亲本菌株 F15 和 AS32。

2.2 3 株菌的 pH 和 ϵ -PL 耐受性比较

由上述发酵参数分析可知, GS 菌株 AF3-44 的 ϵ -PL 浓度高于亲本菌株, 而自然发酵过程中培养基 pH 值低于亲本菌株。为探究 AF3-44 菌产物浓度高于亲本是否由于提高了菌株对酸性 pH 和 ϵ -PL 耐受能力所致, 比较了 GS 菌株与亲本菌株对 pH 和 ϵ -PL 的耐受性。

用无菌牙签刮取孢子进行等面积涂布, 比较 3 株菌在不同 pH 和 ϵ -PL 固体培养基上的生长和孢子生成情况, 结果如图 2 所示。在 pH 7.0 和 5.0 的条件下, AF3-44 菌的孢子形成能力强于 F15 和 AS32,

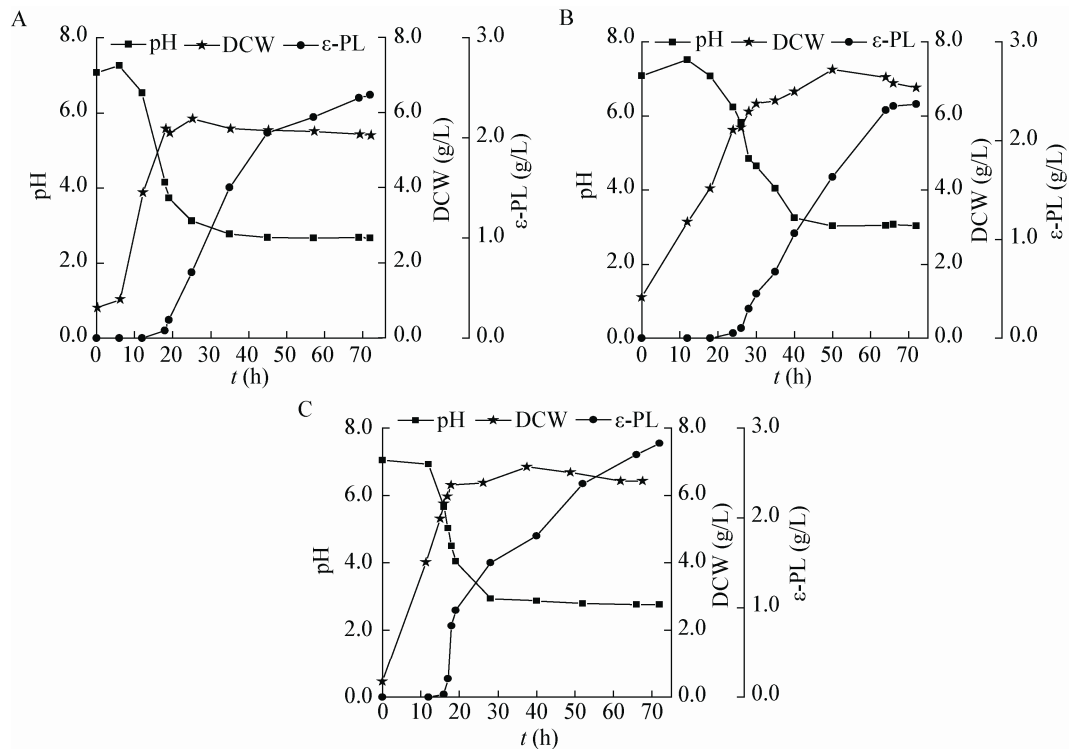


图1 菌株 F15 (A)、AS32 (B)和 AF3-44 (C)摇瓶发酵过程参数

Figure 1 Profile of process parameters of strain F15 (A), AS32 (B) and AF3-44 (C) in shake flask fermentation

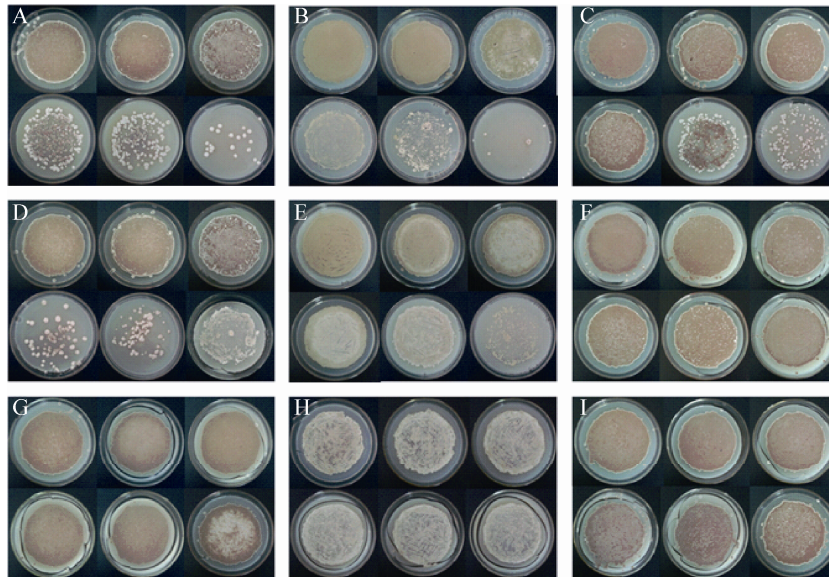


图2 3 菌株对 pH 和 ϵ -PL 耐受性的比较

Figure 2 Comparison of pH and ϵ -PL tolerance of three strains

注: A、D、G 分别代表菌株 F15 在 pH 7.0、5.0、4.0 的固体培养基上生长及孢子形成情况; B、E、H 分别代表菌株 AS32 在 pH 7.0、5.0、4.0 的固体培养基上生长及孢子形成情况; C、F、I 分别代表菌株 AF3-44 在 pH 7.0、5.0、4.0 的固体培养基上生长及孢子形成情况; 添加的 ϵ -PL 终浓度依次为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L。

Note: A, D and G represent the growth and spore formation of strain F15 on solid media under pH 7.0, 5.0, 4.0, respectively; B, E and H represent the growth and spore formation of strain AS32 on solid media under pH 7.0, 5.0, 4.0, respectively; C, F and I represent the growth and spore formation of strain AF3-44 on solid media under pH 7.0, 5.0, 4.0, respectively; The final concentration of ϵ -PL in media is 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L respectively.

而且随着 ϵ -PL 浓度的增高, F15 和 AS32 的生长受到抑制。在 pH 4.0 时 AF3-44 菌的孢子形成能力优于 AS32, 但是与 F15 相差不大。为比较在 pH 4.0 条件下 AF3-44 和 F15 孢子生长能力, 进一步提高了 ϵ -PL 的添加浓度, 结果表明当 ϵ -PL 升至 8.0 g/L 和 10.0 g/L 时抑制了 F15 的生长(图 3)。综上所述, GS 菌 AF3-44 不论是在酸性 pH 还是在高 ϵ -PL 浓度下, 菌体生长和孢子形成能力均高于亲本菌株 F15 和 AS32。也就是说, GS 菌对酸性 pH 和高浓度 ϵ -PL 的耐受能力均强于亲本菌株。

2.3 3 株菌发酵过程中氧化损伤及菌体活力比较

以上结果表明低 pH 和高浓度的 ϵ -PL 会抑制菌

体生长, 与已有的文献报道相一致^[12], 但是其作用机制以及 GS 菌株耐受机制未见报道。一般认为 ϵ -PL 可以与敏感菌的细胞膜结合, 导致细胞膜完整性的缺失, 近年的研究表明 ROS 介导的核酸与蛋白质氧化也是造成敏感菌死亡的原因^[17]。酸胁迫曾被报道造成谷氨酸棒杆菌 ROS 的上升和菌体活性的下降。对于 ϵ -PL 产生菌而言, 发酵过程中 ROS 是如何变化, ROS 的水平与细胞氧化损伤之间的关系尚不清楚。为此, 首先检测了 3 株菌在发酵过程中 ROS 水平, 以及以 MDA 为指标的氧化损伤程度。

结果表明随着发酵进行, 3 株菌中 ROS 的含量均呈上升趋势(图 4A), 说明 pH 的下降和 ϵ -PL 累

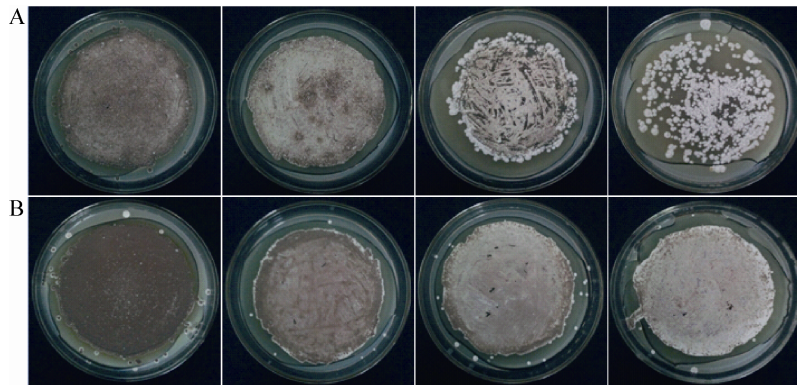


图 3 pH 4.0 时菌株 F15 和 AF3-44 对高浓度 ϵ -PL 的耐受性比较

Figure 3 Comparison of tolerance to high concentration of ϵ -PL between F15 and AF3-44 under pH 4.0

注: A、B 分别代表菌株 F15 和菌株 AF3-44 在 pH 4.0 的固体培养基上生长及孢子形成情况; 添加的 ϵ -PL 终浓度依次为 3.0、5.0、8.0、10.0 g/L。

Note: A, B represent the growth and spore formation of strain F15 and strain AF3-44 on solid media under pH 4.0 respectively; The final concentration of ϵ -PL in media is 3.0, 5.0, 8.0, 10.0 g/L respectively.

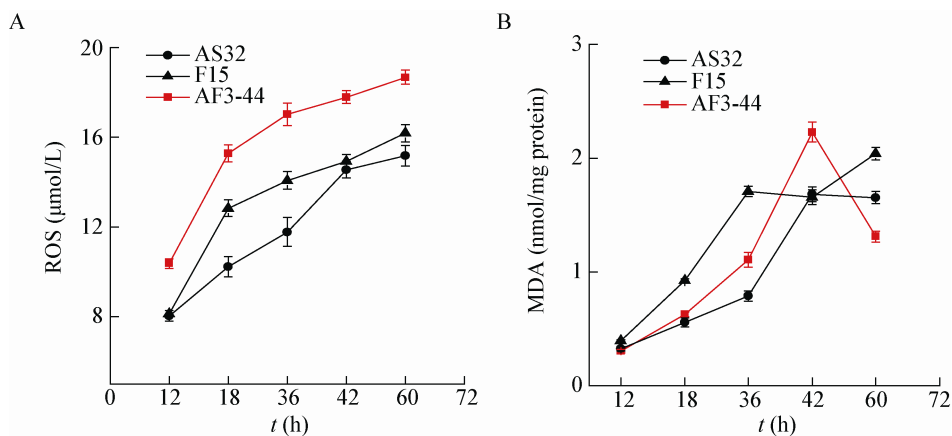


图 4 摇瓶发酵过程中 3 株菌 ROS (A) 和 MDA (B) 含量变化

Figure 4 Changes of ROS (A) and MDA (B) contents of three strains in shake flask fermentation

积确实可以导致 ROS 的提升。有文献报道 ROS 的增加会导致膜脂不饱和脂肪酸被氧化生成 MDA, 其含量能够间接反映膜脂受损情况^[23]。虽然 GS 菌株 AF3-44 的 ROS 水平要显著高于其亲本 AS32 和 F15, 但是 MDA 的含量却介于 AS32 和 F15 之间, 发酵后期还呈现下降趋势且 60 h 时明显低于两亲本(图 4B)。这表明 GS 菌在发酵后期膜的损伤程度低于亲本菌株, 菌体活性强于亲本, 以至于 GS 菌呼吸活力高, 呼吸链的电子传递速率更快, 但同时也增加了电子泄漏的可能性, 导致 ROS 高于亲本^[24]。

进一步采用 5-氰基-2,3-二-(p-苄基-四唑氯化物)(5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC) 细胞染色的方法比较了发酵过程中 3 株菌的菌体活力。CTC 自身并无荧光, 但与微生物细胞膜接触后, 可被位于膜表面电子传递链中的脱氢酶还原成非水溶性红色荧光物质^[18], 荧光强弱与细胞活性相对应。染色结果表明, 随着发酵的进行, 3 株菌的荧光强度逐渐减弱, 表明细胞活力下降, 但在后期仍能维持较强的菌体活力(图 5)。利用系统软件将荧光信号转化为具体数值, 结果表明发酵 36 h 后 AF3-44 活力显著高于 AS32 和 F15 (图 6), 与上述 AF3-44

细胞抗氧化能力较强、膜氧化损伤较少相一致。

2.4 3 株菌发酵过程中抗氧化胁迫能力比较

微生物为了能够在氧化胁迫下生存, 将会激活相关胁迫抵制系统来对抗不利的生活环境。抗氧化胁迫系统一般包含抗氧化酶类和抗氧化物质^[25]。抗氧化酶类包含 SOD、CAT、G6PDH^[26]等; 抗氧化物质一般有海藻糖^[27]、谷胱甘肽^[28]等。为探究促进 GS 菌提升抗氧化胁迫应激的相关机制, 对 3 株菌发酵过程中 SOD、CAT、G6PDH 酶活以及海藻糖含量分别进行测定, 结果表明: 发酵 12-18 h 时, 3 株菌的 SOD 酶活力上升, 随后逐渐降低(图 7A), CAT 和 G6PDH 酶活力随着发酵的进行逐渐升高(图 7B、C)。一般认为 SOD 通过歧化作用将 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 量的增加会抑制 SOD 酶的活性; 相反, CAT 则会被 H_2O_2 诱导激活^[29]。G6PDH 是磷酸戊糖途径的关键酶, 该代谢途径为细胞活动提供大量的还原力 NADPH。有研究发现, G6PDH 除了提供 NADPH 外还对 H_2O_2 产生的胁迫具有抵制作用^[26]。本研究中随着发酵过程 ROS 含量的增加(图 4A), SOD 酶活先上升后下降, CAT 和 G6PDH 显著升高, 与上述文献报道相一致。GS 菌 AF3-44 的 SOD 和

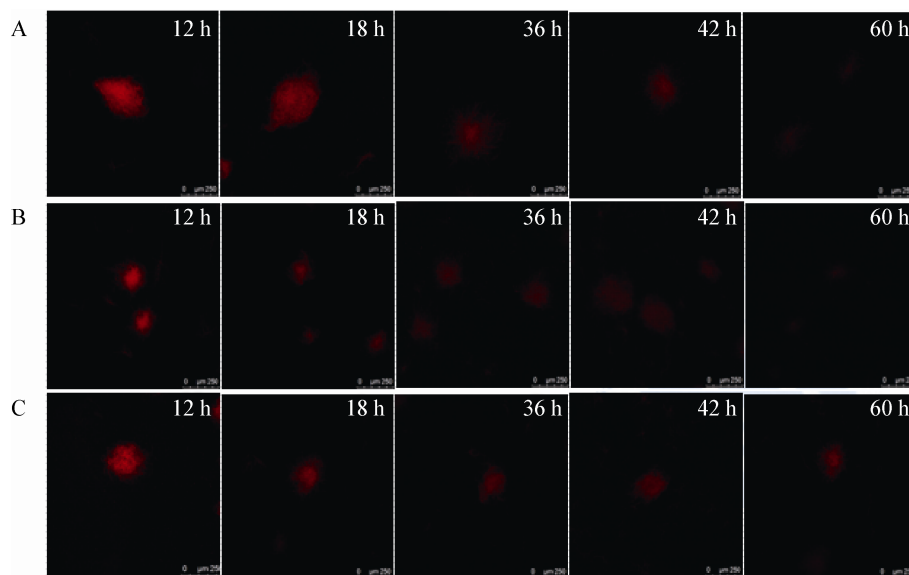


图 5 摇瓶发酵中菌株 AS32 (A)、F15 (B)与 AF3-44 (C) CTC 染色比较

Figure 5 Comparison of AS32 (A), F15 (B) and AF3-44 (C) with CTC staining in shake-flask fermentation

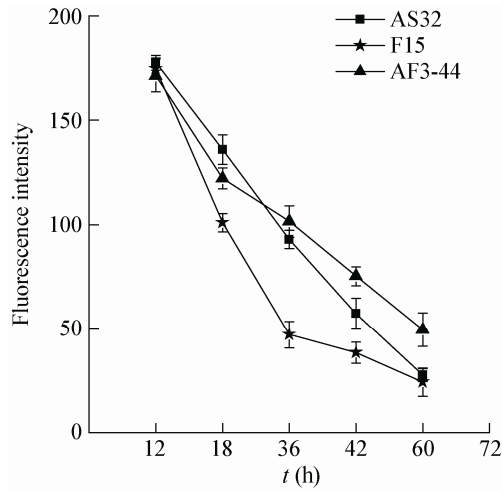


图 6 摇瓶发酵过程中 3 株菌菌体活力比较
 Figure 6 Comparison of the cell activity of three strains in shake-flask fermentation

CAT 酶活力前期高于两亲本 F15 和 AS32 (图 7A、B)，能够抵制氧化胁迫对菌体的损害；随着发酵的进行，GS 菌的 CAT 和 G6PDH 酶活力也随之上升且活力均高于亲本(图 7B、C)，可对发酵过程中产生的 ROS 进行清除，从而减轻氧化损伤。

海藻糖是一种非还原性双糖，作为一种抗氧化物质能够避免蛋白质和细胞膜在多种氧化胁迫条件下发生变性或失活，同时海藻糖还是组成放线菌细胞壁的基本成分^[30]。对 3 株菌发酵过程中胞内海藻糖含量的分析显示：3 株菌的海藻糖含量均呈现先上升后下降的趋势。GS 菌 AF3-44 的胞内海藻糖含量始终高于亲本 F15 和 AS32，并且在发酵 60 h、F15 和 AS32 中海藻糖含量开始下降时达到最大值，

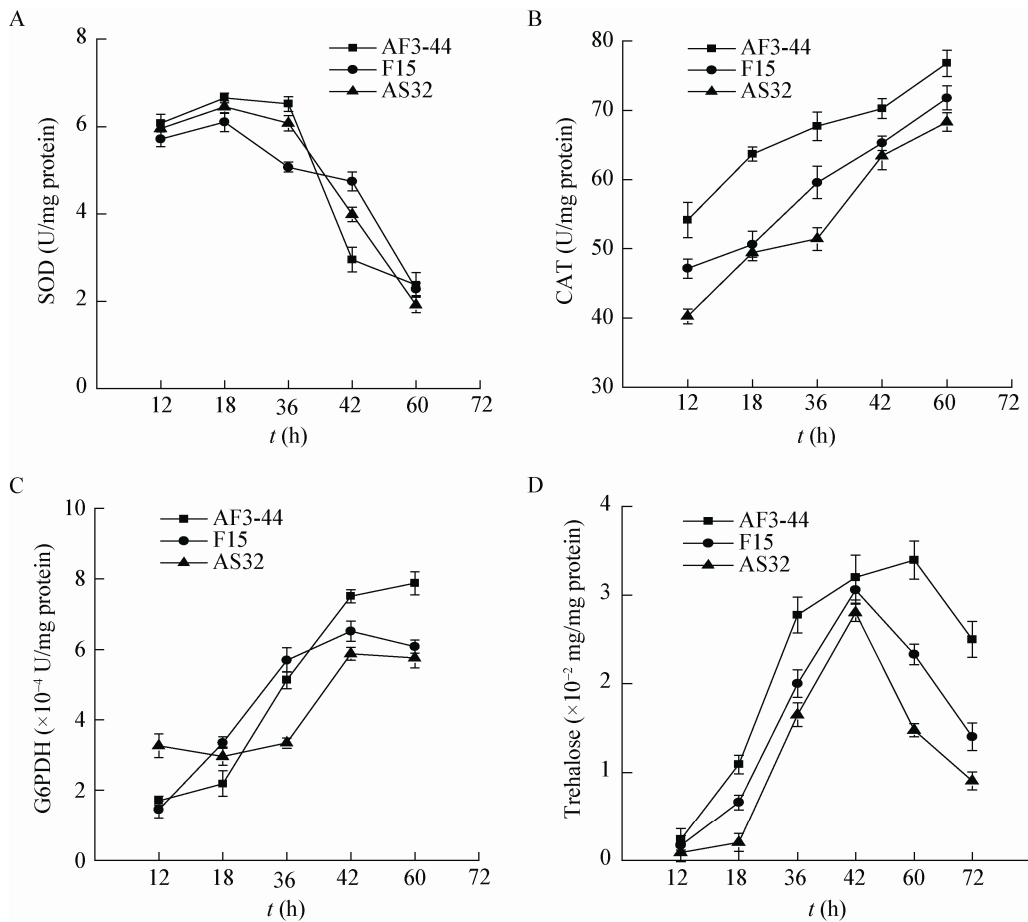


图 7 摇瓶发酵过程中 GS 菌与亲本菌株抗氧化胁迫能力的比较

Figure 7 Comparison of antioxidative activity between GS strain and parent strains in shake-flask fermentation

Note: A: SOD; B: CAT; C: G6PDH; D: Trehalose.

分别是 F15 和 AS32 的 1.5 和 2.3 倍(图 7D), 对氧化胁迫下的 GS 菌具有保护作用。

2.5 ϵ -PL 发酵过程中氧化胁迫的诱发因素

有研究证实, 温度、金属离子、酸碱、化学试剂等因素都可以诱导生物体产生氧化胁迫, 导致生物体的活力降低甚至死亡。上述结果表明在 ϵ -PL 发酵过程中伴随着 ROS 的产生, 并且浓度逐渐上升, 诱发因素尚不清楚。pH 是非常重要的 ϵ -PL 发酵参数, 摇瓶自然发酵过程中 pH 值逐渐降低, 低 pH 值可能诱发 ROS 的产生; 发酵产物 ϵ -PL 能够结合在微生物细胞膜上, 引起细胞膜通透性增加, 而 ROS 主要来自细胞膜上呼吸链的电子传递, 随着发酵产物 ϵ -PL 的积累, 有可能引发电子泄漏和 ROS 的生成。

为了研究 ϵ -PL 对 ROS 生成的影响, 将培养好的 AF3-44 种子液转接到发酵培养基预培养 10 h 后, 加入终浓度分别为 1.0、2.0、3.0 g/L 的 ϵ -PL, 以未添加 ϵ -PL 的发酵为对照, 每隔 6 h 对 ROS 进行测定。如图 8 所示, 当 ϵ -PL 加入后, 发酵前期 6–12 h ROS 有明显增加趋势且与添加的 ϵ -PL 浓度呈正相关; 而 12–30 h 中 ROS 的变化与 ϵ -PL 浓度变化没有明显的相关性。这可能与发酵前期 pH 值较高, ϵ -PL 对菌体损伤作用大有关。

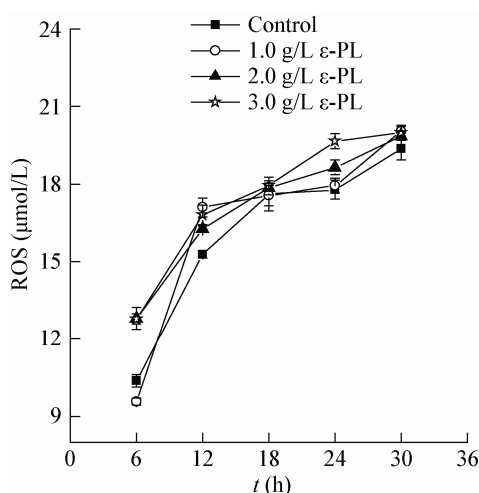


图 8 摇瓶发酵过程中 ϵ -PL 对 ROS 生成的影响
Figure 8 Effects of ϵ -PL on ROS generation in shake-flask fermentation

由发酵过程参数分析可知, 在发酵 10–30 h pH 值会出现一个快速下降过程, 对细胞造成损害, 为研究 pH 对氧化胁迫的影响, 首先要将 pH 稳定在不同水平, 为此选取 pH 为 3.0、4.0、5.0 的醋酸-醋酸钠和甘氨酸-盐酸缓冲体系, 测定摇瓶发酵结束时 pH、DCW 和 ϵ -PL 水平, 结果如表 1 所示。发酵结束后 G3、G4 控制的培养基 pH 分别为 4.8 和 5.1, 与缓冲液所对应的 pH 3.0 和 4.0 不相符, 并且 DCW 远高于 pH 不控制时的 6.4 g/L (图 1C)。然而通过醋酸-醋酸钠缓冲体系(A)控制的培养基, 发酵结束时的 pH 与缓冲液所对应的 pH 差别不大, DCW 接近 6.4 g/L, 因此选用 A 作为调控摇瓶发酵 pH 的缓冲体系。当培养基 pH 值分别自然下降到 5.0、4.0、3.0 时加入对应的 A5、A4、A3, 每隔 6 h 对发酵过程中的 ROS 进行测定。

如图 9 所示, ROS 随 pH 值的降低而增加, 并且当调控 pH 维持 4.0 和 5.0 时, 发酵过程中会出现 ROS 迸发现象; 然而调控 pH 维持 3.0 时, 6–12 h 时 ROS 有明显上升趋势, 随着 pH 调控时间的延长并没有出现 ROS 迸发现象, 可能是由于 pH 值过低导致菌体活力下降所致。综上所述, 虽然 ϵ -PL 和酸性 pH 都会引发 ϵ -PL 产生菌的氧化胁迫效应, 但 ϵ -PL

表 1 不同缓冲体系对 GS 菌发酵参数的影响
Table 1 Effects of different buffer systems on fermentation parameters of GS strain

缓冲体系 Buffer system	Parameters		
	pH	DCW (g/L)	ϵ -PL (g/L)
A3	3.10±0.01	5.40±0.05	1.20±0.03
A4	4.10±0.02	5.50±0.06	0.60±0.02
A5	4.90±0.04	5.70±0.07	0
G3	4.80±0.05	12.90±0.05	0
G4	5.10±0.02	13.80±0.03	0
G5	5.40±0.04	14.00±0.08	0

注: A3、A4、A5 分别代表 pH 为 3.0、4.0、5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲体系; G3、G4、G5 分别代表 pH 为 3.0、4.0、5.0 的甘氨酸-盐酸缓冲体系。

Note: A3, A4, A5 represent acetic acid-sodium acetate buffer system with pH 3.0, 4.0, 5.0 respectively; G3, G4, G5 represent the glycine-hydrochloric acid buffer system with pH 3.0, 4.0, 5.0 respectively.

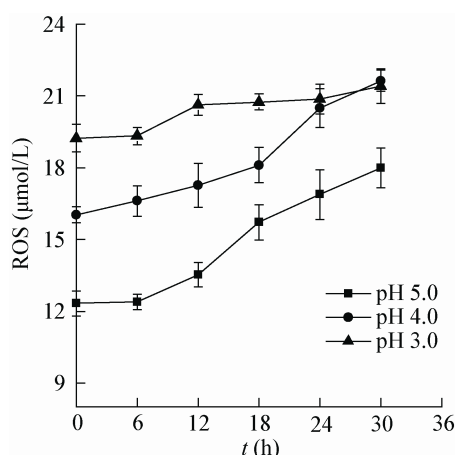


图9 摇瓶发酵过程中 pH 对 ROS 生成的影响

Figure 9 Effects of pH on ROS formation in shake-flask fermentation

主要在发酵前期 pH 接近中性条件时起作用; 到发酵中后期, pH 值逐渐降低, 培养基被酸化, 菌体受到酸胁迫会诱发 ROS 的迸发。因此, 根据上述特点对 ϵ -PL 发酵过程的 ROS 进行调控可能会提高 ϵ -PL 的浓度, 目前该工作正在进行中。

3 结论与讨论

ϵ -PL 作为天然防腐剂颇具应用价值, 但是野生型菌 ϵ -PL 的合成能力较低, 近年来新型的育种方法如 GS、核糖体育种等, 较传统的方法很大程度上提升了 ϵ -PL 的浓度。阐明突变株的高产机制, 将为后续工业化应用打下基础^[31-32]。本文比较了利用 GS 方法选育的耐受型高产菌株和其亲本菌株在 pH 和 ϵ -PL 耐受性上的差异, 发现 GS 高产菌株在低 pH 和高浓度的 ϵ -PL 下能够保持高的菌体活力。为了解决 ϵ -PL 产生菌对低 pH 敏感及产物的反馈抑制造成的菌体量不足和产物浓度低的问题, 使用固定化和营养物质流加的工艺控制, 可以提高菌体活力, 增加 ϵ -PL 的合成量^[13]。本文研究发现通过 GS 育种手段获得的菌株可改善菌体自身耐受性, 达到上述工艺控制所达到的目的, 从而简化工艺控制过程, 为 ϵ -PL 菌种的遗传改造提供新的思路。

作为好氧发酵过程, ROS 被认为可以降低链霉菌细胞活力和 ϵ -PL 的比生成速率^[25], 本研究发现虽然 GS 高产菌株的 ROS 水平高于亲本菌株, 但是

由于其抗氧化胁迫能力, 包括抗氧化酶类的活性和抗氧化物质的含量高于亲本菌株, 所以减弱了 ROS 造成的损伤, 因而在发酵后期保持了较强的菌体活力和较高的 ϵ -PL 水平, 从抗氧化胁迫角度提出了 GS 选育的菌株耐受性强及产量高的生化机制。

酸性 pH 和高浓度的 ϵ -PL 均可以造成发酵过程中 ROS 的增高, 但是由于 pH 值降低伴随 ϵ -PL 的累积, 较难区分在自然发酵过程中二者对 ROS 水平的影响。本研究采用缓冲体系控制 pH 和外源添加 ϵ -PL 的方式, 发现 ϵ -PL 引起的氧化胁迫主要发生在发酵前期, 而发酵中后期氧化胁迫的产生主要由酸性 pH 导致, 为今后控制 ϵ -PL 发酵过程中的 ROS 水平、提升 ϵ -PL 浓度提供了一种新的发酵过程控制策略。

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] 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] Li F. ϵ -Poly-L-lysine producing strain breeding by genome shuffling[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
李凤. Genome shuffling 技术选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
- [4] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Announcement on the approval of ϵ -polylysine and other four new food additives (No. 5, 2014)[J]. China Food Additives, 2014(3): 213-221 (in Chinese)
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准 ϵ -聚赖氨酸等 4 种食品添加剂新品种等的公告(2014 年第 5 号)[J]. 中国食品添加剂, 2014(3): 213-221
- [5] Chheda AH, Vernekar MR. Improved production of natural food preservative ϵ -poly-L-lysine using a novel producer *Bacillus cereus*[J]. Food Science, 2014, 7: 56-63
- [6] Wang T, Jia SR, Tan ZL, et al. Mutagenesis and selective breeding of a high producing ϵ -poly-L-lysine strain[J]. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2012, 6(2): 179-183
- [7] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, et al. Improved epsilon-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
- [8] Wu GY, Chen XS, Wang L, et al. Screening of high-yield ϵ -poly-L-lysine producing strains through ribosome engineering [J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2744-2751 (in Chinese)
吴光耀, 陈旭升, 王靓, 等. 核糖体工程技术选育 ϵ -聚赖氨酸

- 高产菌株[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2744-2751
- [9] Li S, Yan P, Zeng C, et al. Effect of genome shuffling on ϵ -poly-L-lysine synthesis and metabolic flux[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2568-2577 (in Chinese)
李双, 颜鹏, 曾晨, 等. Genome shuffling 筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌及其对代谢流量分配的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2568-2577
- [10] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(2): 190-194
- [11] Ren XD, Chen XS, Zeng X, et al. Acidic pH shock induced overproduction of ϵ -poly-L-lysine in fed-batch fermentation by *Streptomyces* sp. M-Z18 from agro-industrial by-products[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(6): 1113-1125
- [12] Liu SR. Study on ϵ -poly-L-lysine biosynthesis and metabolic regulation[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2012 (in Chinese)
刘盛荣. ϵ -聚赖氨酸生物合成及代谢调控研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2012
- [13] Liu SR, Wu QP, Zhang JM, et al. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine by *Streptomyces ahyscopicus* using one-stage pH control fed-batch fermentation coupled with nutrient feeding[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(3): 358-365
- [14] 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
- [15] Zhang QS, Zhang M, Liu XJ, et al. Progress in protein carbonylation[J]. Chinese Journal of Brain Diseases and Rehabilitation (Electronic Edition), 2014, 4(6): 54-57 (in Chinese)
张秋生, 张猛, 刘晓佳, 等. 蛋白质羰基化的研究进展[J]. 中华脑科疾病与康复杂志: 电子版, 2014, 4(6): 54-57
- [16] Wang TT, Gao F, Kang YW, et al. Mycothiol peroxidase MPx protects *Corynebacterium glutamicum* against acid stress by scavenging ROS[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1221-1228
- [17] Ye RS, Xu HY, Wan CX, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 439(1): 148-153
- [18] Zhou YP. Genome shuffling and metabolic regulation analysis of ϵ -poly-L-lysine producing strains[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
周永鹏. ϵ -聚赖氨酸产生菌的基因组重排与代谢调控分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [19] Ren XD. Regulation of ϵ -poly-L-lysine biosynthetic process by *Streptomyces* sp. M-Z18[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
任喜东. *Streptomyces* sp. M-Z18 生物合成 ϵ -聚赖氨酸过程调控研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
- [20] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574
- [21] Chen XS, Li S, Liao LJ, et al. Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces* sp. M-Z18 from glycerol[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(5): 561-567
- [22] Zeng X. Physiological analysis of the ϵ -poly-L-lysine fermentation with simultaneous consumption of glucose and glycerol by *Streptomyces albulus* M-Z18[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
曾欣. 小白链霉菌同步代谢葡萄糖和甘油合成 ϵ -聚赖氨酸的生理机制研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2016
- [23] Deng XP, Xia Y, Hu W, et al. Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of *N*-acetyl-L-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L.[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 180(1/3): 722-729
- [24] Na YA, Lee JY, Bang WJ, et al. Growth retardation of *Escherichia coli* by artificial increase of intracellular ATP[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(6): 915-924
- [25] Zeng X, Chen XS, Gao Y, et al. Continuously high reactive oxygen species generation decreased the specific ϵ -poly-L-lysine formation rate in fed-batch fermentation using glucose and glycerol as a mixed carbon source[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 1993-2003
- [26] Izawa S, Maeda K, Miki T, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Journal, 1998, 330(2): 811-817
- [27] Moon MH, Ryu J, Choeng YH, et al. Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *Streptomyces albus*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17(5): 986-996
- [28] Li Y, Hugenholtz J, Abee T, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 5739-5745
- [29] Beites T, Pires SDS, Santos CL, et al. Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in *S. natalensis* ATCC 27448: modulation of pimaricin production by intracellular ROS[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27472
- [30] Song XL, Shi DS, Wen JW, et al. Biological synthesis pathways and biological characteristics of trehalose[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(8): 167-171 (in Chinese)
宋晓丽, 石东升, 温佳文, 等. 海藻糖的生物合成途径及其生物学功能[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 167-171
- [31] Wang L, Chen XS, Wu GY, et al. Enhanced ϵ -poly-L-lysine production by inducing double antibiotic-resistant mutations in *Streptomyces albulus*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(2): 271-283
- [32] Jin C. Screening of high-yield ϵ -poly-L-lysine producing strains[J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2743 (in Chinese)
金城. ϵ -聚赖氨酸高产菌株的选育[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2743