

柠檬酸钠和生物素对白色链霉菌发酵产 ϵ -聚赖氨酸的影响

王凤¹, 石侃¹, 潘涛¹, 吴清平², 莫树平², 吴振强¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广东省微生物研究所, 广东广州 510070)

摘要: 本文研究了不同生长期在培养基中添加柠檬酸钠和生物素对白色链霉菌生长及产 ϵ -PL 的影响, 结果表明添加不同浓度柠檬酸钠对菌体生长的影响不明显, 但对白色链霉菌 ϵ -PL 合成有正向促进作用。0 h 添加 2 g/L 的柠檬酸钠可获得最大的 ϵ -PL 产量 0.92 g/L。随着柠檬酸钠浓度的增加, ϵ -PL 产量先增加后降低。在 0 h 添加 2 g/L 柠檬酸钠并在 36 h 添加 300 μ g/L 生物素, 发酵 72 h 后菌体干重和 ϵ -PL 产量分别达到了 7.86 g/L 和 1.10 g/L, 是空白对照组的 1.30 倍和 1.93 倍, 说明外源添加柠檬酸钠和生物素对白色链霉菌发酵生产 ϵ -PL 有促进作用。

关键词: 白色链霉菌; ϵ -聚赖氨酸; 发酵; 柠檬酸钠; 生物素

文章编号: 1673-9078(2013)6-1230-1233

Effect of Sodium Citrate and Biotin on ϵ -Poly-lysine Fermentation of *Streptomyces albulus*

WANG Feng¹, SHI Kan¹, PAN Tao¹, WU Qing-ping², MO Shu-ping², WU Zhen-qiang¹

(1. College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The effect of sodium citrate on ϵ -PL fermentation of *S. albulus* was investigated. The results showed that sodium citrate concentrations had slight effect on cell growth, but significantly affect the synthesis of ϵ -PL. The addition of 2 g/L sodium citrate at 0 h resulted in the highest ϵ -PL concentration of 0.92 g/L. By adding 2 g/L sodium citrate at 0 h and 300 μ g/L biotin at 36 h to fermentation media, the cell dry weight and ϵ -PL yield reached the highest values of 7.86 g/L and 1.10 g/L, respectively, being 1.30 and 1.93 folds to the control respectively. It was demonstrated that sodium citrate and biotin will promote cell growth and ϵ -PL yield of fermentation of *S. albulus*.

Key words: *Streptomyces albulus*; ϵ -poly-lysine; fermentation; sodium citrate; biotin

ϵ -聚赖氨酸 (ϵ -poly-lysine, ϵ -PL) 是一种水溶性强、抑菌谱广、可以食用并且对人体无任何毒副作用的新型生物防腐剂^[1]。对革兰氏阳性和阴性菌以及一些真菌、耐热芽孢杆菌的繁殖都有强烈的抑制作用^[2], 2003 年美国 FDA 通过了 ϵ -PL 作为食品添加剂的许可, 此外, ϵ -PL 在基因治疗、微囊药物的制备^[3]、高分子材料等领域中亦有着广泛的用途。目前 ϵ -PL 已在日本实现以葡萄糖为原料进行链霉菌发酵的工业化生产。

日本最初用野生的 *S.albulus*346 进行发酵的研究

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 广东省教育部产学研合作项目 (2009B090300300); 国家自然科学基金项目 (31271925)

作者简介: 王凤 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物工程

通讯作者: 吴振强 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为发酵工程和生物化工

中^[4], ϵ -PL 在最优化的培养基中的积累浓度为 0.5 g/L。在发酵过程中, ϵ -PL 的最大积累浓度开始于 pH 值 6.0。当细胞生长达到稳定状态, 培养基 pH 值的降低是 ϵ -PL 生产的关键 (pH 值 3.0~5.0)。随后, Shima^[5]等发现给静止的细胞中添加葡萄糖和硫酸铵作为培养基, 且在酸性 pH 值的条件下, ϵ -PL 的积累量可达 4~5 g/L。 ϵ -PL 在 pH 值 5.0~6.0 时产量迅速下降, 说明 *S. albulus* 中含有 ϵ -PL 降解酶。

国内天津科技大学姜俊云^[6]等采用 5 L 自控式发酵罐研究了 ϵ -PL 分批发酵过程中 pH 对发酵指标以及菌体细胞形态的影响。发现当 pH 值维持在 5 以上, 有利于菌体生长; pH 值 4.0 左右可促进 ϵ -PL 的合成。当搅拌转速为 350 r/min 和控制 pH 值 4.0 时可获得最大的 ϵ -PL 产量 2.95 g/L, 菌体量 9.33 g/L。通过对比不同发酵条件下菌丝体的形态变化, 发现当菌丝球比较均匀、形态无较大差别、具有致密程度相当的核心

时,有利于 ϵ -PL形成。从茂林等^[7]利用氮离子注入法诱变选育的一株白色链霉菌GC11菌株,5L自控发酵罐培养72h后 ϵ -PL产量为4.21g/L,比出发菌株提高了1.30倍。薛晓明等^[8]以白色链霉菌突变株为研究对象,探索不同发酵时间在发酵培养基中添加ATP和生物素对 ϵ -PL产量的影响。结果发现,在36h时添加300 μ g/L的生物素以及2mmol/L的ATP对该白色链霉菌 ϵ -PL产量提升最大,比对照组提高了34.04%,产量达到1.193g/L。但是综观国内 ϵ -PL研究情况,仍与国外先进水平有较大差距,需进一步研究。

ϵ -PL是一种含有25~30个赖氨酸残基的同型单体聚合物多肽,由单一赖氨酸 α -羧基和 ϵ -氨基形成酰胺键连接而成的均聚赖氨酸,故被称为 ϵ -PL^[9]。尽管 ϵ -PL在应用与理论研究方面前景可观,但是 ϵ -PL的生物合成机理至今还在摸索。目前大部分的研究认同 ϵ -PL的合成与多聚 γ -D-谷氨酸在酶作用物氨基酸的腺苷酸合成方面的机理相似^[10],L-谷氨酸的腺苷酸转化被认为是多聚 γ -D-谷氨酸合成的第一步。 ϵ -PL的合成也是以L-赖氨酸为前体物,这一点是由S. Shima等^[4]首次实验发现,他们将^{[14}C]-L-Lys渗入培养基中,通过分析其代谢去向证实了L-Lys是 ϵ -PL的前体物。

L-赖氨酸的前体草酰乙酸主要由对氧浓度要求较高的TCA循环和磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应提供^[11]。在生物合成过程中,当EMP途径通量超出TCA循环的代谢能力时,会使EMP途径生成的丙酮酸积累,则会导致酸及副产物的生成。有研究表明^[12-13],添加柠檬酸钠能显著降低枯草芽孢杆菌代谢途径中磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活力。柠檬酸和葡萄糖的联合代谢会阻遏有机酸的生成,减弱EMP途径及TCA循环途径^[14]。L-赖氨酸和L-亮氨酸都是由前体物质草酰乙酸经代谢合成的,发酵过程中添加柠檬酸钠能够改变L-亮氨酸生物合成途径的关键节点丙酮酸及乙酰辅酶A的代谢流分布,保持EMP和TCA之间代谢流量平衡,有利于减少副产物的生成,提高L-亮氨酸生物合成途径的代谢流量^[15]。因此本实验主要探究添加柠檬酸钠是否能够通过提高L-赖氨酸生物合成途径的代谢流量,从而提高 ϵ -PL的产量。

1 材料和方法

1.1 菌种试剂与培养基

1.1.1 菌种

以广东省微生物所保藏的白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)8号菌为出发菌,经紫外诱变和硫酸二乙酯(DES)化学诱变筛选的突变株DES-2^[16]。

1.1.2 试剂

硫脲、碘化钾、亚硝酸铋(分析纯):天津科密欧化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

(1)贝特纳斜面培养基(g/L):葡萄糖10,蛋白胨2,酵母提取物1,琼脂15,115 $^{\circ}$ C灭菌20min。

(2)种子和发酵培养基(g/L):葡萄糖50,酵母提取物5,(NH₄)₂SO₄10,KH₂PO₄1.36,K₂HPO₄0.8,MgSO₄·7H₂O0.5,ZnSO₄·7H₂O0.04,FeSO₄·7H₂O0.03,pH6.8,115 $^{\circ}$ C灭菌20min。

1.2 种子液制备

刮取1环*Streptomyces albulus*斜面菌种,接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,30 $^{\circ}$ C、200r/min培养30h。

1.3 摇瓶发酵

以6%的接种量将种子液接种于装有50mL发酵培养基的250mL三角瓶中,30 $^{\circ}$ C、200r/min培养72h。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干重测定

取4mL发酵液于预先称重的离心管中,4000r/min离心10min,弃上清液再加入4mL去离子水离心洗涤,反复洗涤2~3次,弃上清,将沉淀置于90 $^{\circ}$ C的烘箱内烘干至恒重,烘干后总重减去离心管重即为菌体干重。

1.4.2 残糖含量测定

残糖含量采用3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS方法)测定^[17]。

1.4.3 ϵ -PL含量测定

ϵ -PL含量测定采用Dragendoff's法^[18-19]:准确吸取含不同浓度 ϵ -PL样品1mL,置于5mL离心管中,加入的1mL的DR试剂,摇匀,形成沉淀,7000r/min离心10min,弃去上清液,用2mL无水乙醇洗涤沉淀,7000r/min离心10min,弃去上清液,加入2mLNa₂S,产生黑色沉淀,12000r/min离心10min,弃去上清液,向沉淀中加入2mL浓硝酸,20min后,待沉淀完全溶解,用去离子水稀释至10mL,取出1mL,加入5mL硫脲溶液,以20%硝酸溶液加入硫脲为空白,在 $\lambda=435$ nm处测定吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 白色链霉菌*Streptomyces albulus*的生长曲线

本研究中白色链霉菌*Streptomyces albulus*的生长过程是典型的微生物生长过程,由图1可知,在温度30 $^{\circ}$ C、转速200r/min、接种量6%、初始pH值为6.8

的培养条件下, 0 h~12 h 为延滞期, 12 h~48 h 为对数生长期; 48 h~60 h 为稳定期, 72 h 后进入衰亡期。从图中可以看出随着细胞增长, 残糖量逐渐降低, ϵ -PL 产量不断增加, 当细胞增长达到一定值时 ϵ -PL 开始大量合成, 在稳定期, 细胞量维持最大值, ϵ -PL 产量继续急剧增加, 至 72 h, ϵ -PL 的产量达到最大值并形成拐点, 之后不断下降。

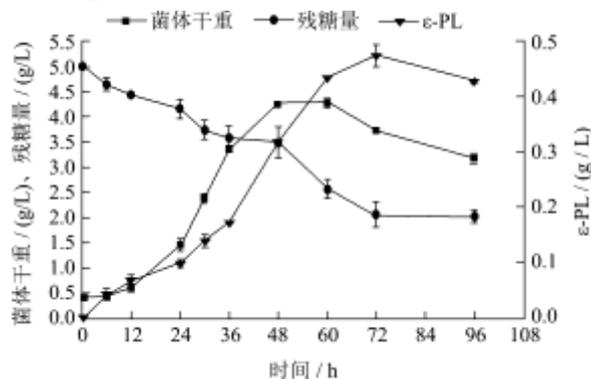


图1 白色链霉菌生长与 ϵ -PL 代谢曲线

Fig.1 The cell growth and ϵ -PL production curve of *S. albulus*

DES-2

根据图1的细胞生长与代谢规律, 本文研究分别在发酵初始和稳定期前期(48 h)添加不同浓度的柠檬酸钠及同时添加生物素对白色链霉菌发酵及 ϵ -PL 产量的影响, 旨在确定柠檬酸钠及生物素对 ϵ -PL 发酵代谢的影响。

2.2 发酵初始添加不同浓度柠檬酸钠对白色链霉菌生长及产 ϵ -PL 的影响

研究在发酵初始添加柠檬酸钠对白色链霉菌生长及 ϵ -PL 产量的影响。柠檬酸钠的浓度梯度为 1 g/L、2 g/L、3 g/L 和参照(不添加柠檬酸钠), 在发酵结束 72 h 取样测定发酵液中的 pH 值、菌体干重、残糖量和 ϵ -PL 产量。结果如图 2 所示。

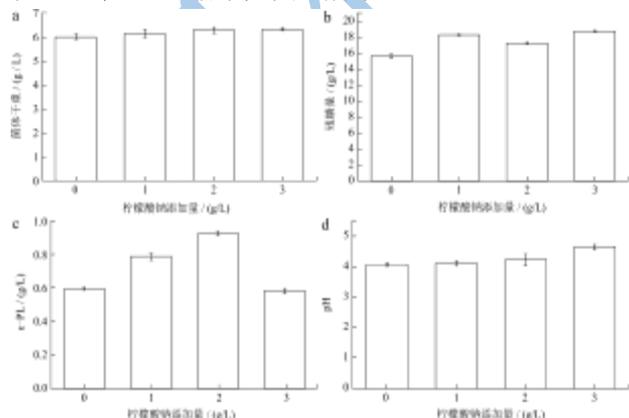


图2 0 h 添加柠檬酸钠对发酵后菌体干重(a)、残糖量(b)、 ϵ -PL 产量(c)和 pH 值(d)的影响

Fig.2 Effect of adding sodium citrate at 0 h on cell dry weight (a), residual sugar content (b), ϵ -PL yield (c) and pH value (d)

由图2中可以看出, 发酵初始添加不同浓度的柠檬酸钠对白色链霉菌菌体的生长影响较小, 发酵结束后菌体干重与对照组基本相同, 且随着柠檬酸钠浓度的提高有增加的趋势。三组实验组的残糖浓度明显都要高于对照组, 这是由于柠檬酸是三羧酸循环的中间产物, 细胞内的柠檬酸含量高, 意味着丰富的生物合成前体存在, 葡萄糖无需为提供合成前体而降解。所以添加柠檬酸钠后会显著降低丙酮酸激酶和磷酸果糖激酶的活力, 从而减弱糖酵解途径通量, 糖耗降低^[20]。

由图中 ϵ -PL 产量的对照柱形图可以看出, 随着柠檬酸钠添加量的增加, ϵ -PL 产量呈现先增加后降低的趋势, 其中添加 2 g/L 柠檬酸钠实验组的 ϵ -PL 产量最高, 为 0.92 g/L, 比对照组(0.58 g/L)提高了 58.62%, 同时添加 1 g/L 和 2 g/L 柠檬酸钠实验组的 pH 值与对照组基本相同, 为 pH 4.1~4.2, 但添加 3 g/L 柠檬酸钠实验组的 pH 明显增高, 发酵结束后为 4.64。Kahar 等人^[19]研究发现, 发酵液在 pH 4.2~4.5 时, 白色链霉菌可以很快合成和分泌 ϵ -PL, 而当 pH 5.0~8.0 时, 由于存在 ϵ -PL 降解酶, ϵ -PL 则立即被菌株降解。2001 年 P Kahar 等^[20]也通过研究发现如果培养液的 pH 控制在 4 左右, 该白色链霉菌 410 菌株细胞会产生高浓度的 ϵ -PL, 然而如果 pH 增加到高于 5 时, 已积累的 ϵ -PL 就会解聚。因此添加 3 g/L 柠檬酸钠实验组的 ϵ -PL 产量较低主要是由于 pH 较高, 一部分合成的 ϵ -PL 分解, 导致产量降低。

实验研究表明, 添加柠檬酸钠不影响菌体的正常生长, 且能够提高 ϵ -PL 产量, 添加浓度以 2 g/L 最佳。

2.3 稳定期前期 48 h 添加不同浓度柠檬酸钠对白色链霉菌生长及产 ϵ -PL 的影响

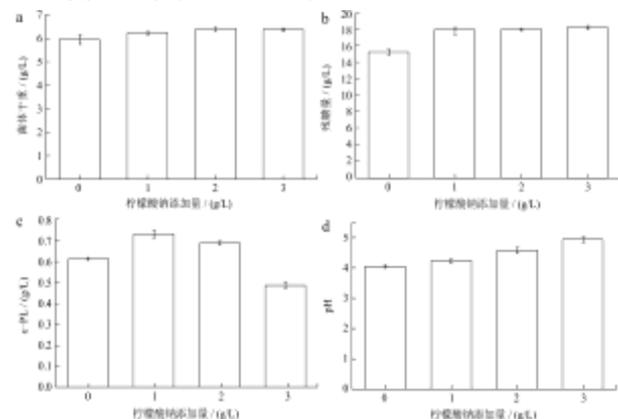


图3 48 h 添加柠檬酸钠对发酵后菌体干重(a)、残糖量(b)、 ϵ -PL 产量(c)和 pH 值(d)的影响

Fig.3 Effect of adding sodium citrate at 48 h on cell dry weight (a), residual sugar content (b), ϵ -PL yield (c) and pH value (d)

研究在发酵稳定期初期 48 h 添加柠檬酸钠对白色链霉菌生长及 ϵ -PL 产量的影响。柠檬酸钠的浓度梯度

为 1 g/L、2 g/L、3 g/L 和参照（不添加柠檬酸钠），在发酵结束 72 h 取样测定发酵液中的 pH 值、细胞干重、残糖量和 ϵ -PL 产量。结果如图 3 所示。

从图 3 中可以看出，48 h 添加柠檬酸钠对菌体生长的影响都不大，且三组实验组的残糖浓度基本相同，都略高于对照组。但 ϵ -PL 浓度随着柠檬酸钠浓度的增加而降低，添加 1 g/L 和 2 g/L 柠檬酸钠实验组发酵结束后 ϵ -PL 浓度分别为 0.73 g/L、0.69 g/L，比对照组（0.61 g/L）增加了 19.67% 和 13.11%。而添加 3 g/L 柠檬酸钠实验组发酵结束后 ϵ -PL 浓度仅为 0.48 g/L，比对照组（0.61 g/L）降低了 21.31%。同时 pH 随柠檬酸钠浓度增加而升高。说明 48 h 添加较低浓度的柠檬酸钠会促进 ϵ -PL 的合成，但随着浓度升高，发酵结束后 pH 较高，导致 ϵ -PL 浓度降低。即稳定期添加柠檬酸钠对 ϵ -聚赖氨酸的代谢也起到正向作用，但效果比发酵 0 时添加的差。

2.4 0 h 添加 2 g/L 柠檬酸钠同时在 36 h 添加 300 μ g/L 生物素对白色链霉菌生长及产 ϵ -PL 的影响

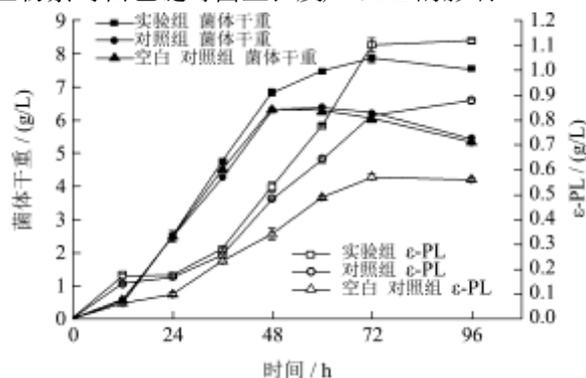


图 4 0 h 添加柠檬酸钠及 36 h 添加生物素对白色链霉菌的生长及 ϵ -PL 合成的影响

Fig.4 Effect of adding sodium citrate at 0 h and adding biotin at 36 h on cell dry weight and ϵ -PL yield

研究表明生物素作为脂肪和蛋白质正常代谢不可或缺的生长因子，其添加可促进草酰乙酸生成，增加天冬氨酸供给，提高赖氨酸产量，为 ϵ -PL 提供充足的底物^[21-22]。根据薛晓明等^[8]的研究发现，36 h 外源添加 300 μ g/L 的生物素对 ϵ -PL 的发酵有一定的促进作用，因此本实验在发酵初始添加 2 g/L 柠檬酸钠同时在 36 h 外源添加 300 μ g/L 的生物素，以只在发酵初始添加 2 g/L 柠檬酸钠实验组为对照组，以正常条件下进行培养的实验组为空白对照组，分别在 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 和 96 h 取样检测发酵液中的菌体干重和 ϵ -PL 浓度，研究柠檬酸钠和生物素的共同作用对白色链霉菌生长及 ϵ -PL 产量的影响。如图 4 所示，白色链霉菌的生长曲线仍然符合典型的微生物生长曲线，同时从表中也可以看出，36 h 添加 300 μ g/L 的生

物素后，菌体干重和 ϵ -PL 产量都高于两对照组，72 h 时实验组的菌体干重和 ϵ -PL 浓度分别为 7.86 g/L 和 1.10 g/L，分别是只添加柠檬酸钠（不添加生物素）对照组的 1.27 和 1.34 倍，是不添加柠檬酸钠和生物素的空白对照组的 1.30 倍和 1.93 倍。

3 结论

发酵过程中外源添加柠檬酸钠能够在不影响菌体正常生长的情况下促进 ϵ -聚赖氨酸的合成和积累，添加生物素则可以促进细胞生长和 ϵ -聚赖氨酸代谢。结果表明，添加柠檬酸钠后会对发酵液的 pH 有影响，发酵结束时添加 1 g/L 和 2 g/L 柠檬酸钠实验组的 pH 值与对照组基本相同，为 pH 4.1~4.2，但添加 3 g/L 柠檬酸钠实验组的 pH 明显增高，达到 4.64，可能是导致 ϵ -聚赖氨酸产量随着柠檬酸钠浓度的增加先增加后降低的原因，最适柠檬酸钠添加浓度为 2 g/L，最适添加时间为发酵 0 时，稳定期前期（48 h）外源添加柠檬酸钠也能促进 ϵ -聚赖氨酸生成，但效果比发酵 0 时添加的效果差。添加柠檬酸钠发酵 72 h 后获得 ϵ -聚赖氨酸产量比对照组提高了 58.62%，达到 0.92 g/L。进一步研究 0 h 添加 2 g/L 柠檬酸钠和 36 h 添加 300 μ g/L 生物素协同作用，发酵 72 h 后菌体干重和 ϵ -聚赖氨酸产量分别是对照组的 1.30 倍和 1.93 倍，分别为 7.86 g/L 和 1.10 g/L。

参考文献

- [1] KAWAI T, KUBOTA T, HIRAKI J. Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albus* [J]. Biochem Bioph Res Co, 2003, 311(3):635-640
- [2] SHIMA S, MATSUOKA H, IWAMOTO T, et al. Antimicrobial Action of ϵ -Poly-L-Lysine [J]. Antibiotics, 1984, 37(11): 1449-1455
- [3] 余兴华. 保健食用油脂-中链脂肪酸三甘酯及其应用[J]. 现代食品科技, 1993, 3:39-41
- [4] SHIMA S, SAKAI H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*, Part II Taxonomy and Fermentation Studies [J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(11): 2497-2502
- [5] SHIMA S, OSHIMA S, SAKAI H, et al. Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine by washed mycelium of *Streptomyces albus* No2346 [J]. Nippon Nogeik Kaishi, 1983, 57(3): 221-226
- [6] 姜俊云, 贾士儒, 董惠钧, 等. 搅拌转速和 pH 对聚赖氨酸发酵的影响[J]. 生物加工过程, 2004, 2(2):60-64
- [7] 丛茂林, 许鹏, 谭之磊, 等. 氮离子注入法筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌株[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5):491-493
- [8] 薛晓明, 吴振强, 吴清平, 等. 添加 ATP 和生物素优化 ϵ -聚赖氨酸

- 酸发酵的研究[J].中国酿造,2012,31:72-76
- [9] SHIMA S, SAKAI H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies [J]. *Agri Biol Chem*. 1981, 45(11): 2503-2508
- [10] ASHIUCHI M, SHIMANOUCI K, NAKAMURA H, et al. Enzymatic synthesis of high molecular-mass poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 4249-4255
- [11] 张伟国. L-赖氨酸发酵的研究[J]. 发酵科技通讯, 2005, 34(1): 7-10
- [12] 唐军, 蔡水洪, 叶勤. 克鲁斯假丝酵母分批发酵生产甘油的代谢流分布[J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(1): 58-63
- [13] 刘新星, 陈双喜, 储炬, 等. 柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 627-630
- [14] GOEL A, JINWOON L, DOMACH M, et al. Metabolic fluxes, pool and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(2): 129-134
- [15] 陈宁, 刘辉. 柠檬酸钠对 L-亮氨酸发酵代谢流分布的影响[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(3): 478-483
- [16] 李双双, 吴振强, 吴清平, 等. 产 ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌复合诱变选育研究[J]. 中国酿造, 2010, 12: 108-111
- [17] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 北京人民教育出版社, 1983
- [18] REEVIDYA N, MEHROTRA S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with dragendorff's reagent in plant materials [J]. *J Aoac Int*, 2003, 86(6): 1124-1127
- [19] 程传荣, 田丰伟, 张灏, 等. 一种快速测定发酵液中 ϵ -PL 的方法[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 133-136
- [20] 刘新星, 陈双喜, 等. 柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 627-630
- [21] 张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992
- [22] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998