

# 链霉素抗性选育 $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株

李芹, 赵俊杰, 刘永娟, 王靓, 毛忠贵, 陈旭升

(工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 基于核糖体工程的育种方法, 通过逐级赋予小白链霉菌 M-Z18 链霉素抗性, 以提高产生菌的  $\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -PL) 合成能力。首先, 通过筛选低浓度链霉素 (1~5 MIC) 抗性突变株, 将 M-Z18 的  $\epsilon$ -PL 的摇瓶产量从 1.6 提高到 2.43 g/L; 随后, 再次提升菌株的链霉素耐受性 (5~10 MIC), 进一步增强菌株的  $\epsilon$ -PL 合成能力; 最后, 获得一株高产突变菌 SS-19, 其  $\epsilon$ -PL 产量和单位菌体合成能力分别为 3.13 g/L 和 0.58 g/g, 较出发菌 M-Z18 分别提高了 95.63% 和 137.61%。研究表明, SS-19 的中心碳代谢途径及  $\epsilon$ -PL 合成相关的关键酶活性有所增加, 意味着  $\epsilon$ -PL 的合成代谢被明显加强。在以葡萄糖为碳源的 RSM 培养基中, SS-19 比前期育种获得的高产菌株表现出更好的  $\epsilon$ -PL 合成能力。以上结果表明, 通过逐步引入高浓度链霉素抗性的筛选方法可有效提升小白链霉菌的  $\epsilon$ -PL 产量。

**关键词:**  $\epsilon$ -聚赖氨酸; 核糖体工程; 低浓度链霉素抗性; 高浓度链霉素抗性; 关键酶活性

文章编号: 1673-9078(2020)03-150-158

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.020

## Breeding of High $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing Strain by Streptomycin Resistance

LI Qin, ZHAO Jun-jie, LIU Yong-juan, WANG Liang, MAO Zhong-gui, CHEN Xu-sheng

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

**Abstract:** Using a ribosome engineering-based breeding approach, the  $\epsilon$ -Poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) biosynthesis capability of *Streptomyces albulus* M-Z18 was gradually enhanced by increasing streptomycin resistance in a stepwise manner. Firstly, the  $\epsilon$ -PL production by *S. albulus* M-Z18 was increased from 1.6 to 2.43 g/L through screening low streptomycin-resistant (1~5 MIC) mutant strains. Subsequently, the streptomycin tolerance was further increased (5~10 MIC), to enhance  $\epsilon$ -PL biosynthesis capability. Finally, a high  $\epsilon$ -PL-producing mutant *S. albulus* SS-19 was obtained, with the yield of  $\epsilon$ -PL and the unit cell synthesis capability as 3.13 g/L and 0.58 g/g, respectively, which were increased by 95.63% and 137.61%, respectively, compared with the original strain M-Z18. Results showed that the activities of the key enzymes involved in the central carbon metabolic pathway and  $\epsilon$ -PL biosynthesis pathway were significantly enhanced, suggested that the anabolic metabolism of  $\epsilon$ -PL was significantly enhanced. In the RSM medium with glucose as the carbon source, *S. albulus* SS-19 exhibited a greater  $\epsilon$ -PL biosynthesis capability compared with the high-yield strains obtained from previous breeding. The above results indicated that the  $\epsilon$ -PL production by *Streptomyces albulus* could be improved effectively by the screening method involving the gradual increase of streptomycin resistance.

**Key words:**  $\epsilon$ -Poly-L-lysine; ribosome engineering; low streptomycin resistance; high streptomycin resistance; key enzyme activities

引文格式:

李芹, 赵俊杰, 刘永娟, 等. 链霉素抗性选育  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 150-158

LI Qin, ZHAO Jun-jie, LIU Yong-juan, et al. Breeding of high  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing strain by streptomycin resistance [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 150-158

$\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -Poly-L-lysine,  $\epsilon$ -PL) 是由 25~35 个 L-赖氨酸单体通过  $\alpha$ -COOH 和  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 脱水缩合而成  
收稿日期: 2019-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31671846); 江苏省自然科学基金项目 (BK20191332)

作者简介: 李芹 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业微生物育种

通讯作者: 陈旭升 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程

的同型氨基酸聚合物, 分子量一般 3200~4500 u, 最先是 Shima 等在 *Streptomyces albulus* 346 的发酵液中发现并提取出的一种具有抑菌效果的物质<sup>[1]</sup>。因其具有良好的热稳定性、抑菌谱广、安全无毒等优点,  $\epsilon$ -PL 可作为一种天然食品防腐剂应用于淀粉、肉以及果蔬等制品的防腐与保鲜<sup>[2]</sup>。

野生型菌株的  $\epsilon$ -PL 合成能力较低, 例如

*Streptomyces noursei* NRRL 5126 和 *Streptomyces griseofuscus* H1,  $\epsilon$ -PL 摇瓶产量仅有 0.42 和 0.39 g/L<sup>[3,4]</sup>。因此,需通过菌种改良提高菌株  $\epsilon$ -PL 合成能力才能满足工业化的需求。国际上,最早是日本研究者利用物理和化学诱变,选育 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)和甘氨酸抗性突变株,以降低或解除前体 L-赖氨酸反馈抑制,历经 20 多年的不间断选育,获得一株摇瓶  $\epsilon$ -PL 产量达到了 2.11 g/L 的高产突变株。在该方法的启发下,国内研究者采用不同的理化诱变手段结合 AEC 抗性选育  $\epsilon$ -PL 高产菌。例如,陈经纬等利用硫酸二乙酯作为诱变剂筛选 AEC 抗性突变株,将 *Kitasatospora* MY5236 的  $\epsilon$ -PL 摇瓶产量提高到 1.17 g/L,产量较野生菌提高了 2 倍<sup>[5]</sup>;余明洁等利用物理和化学诱变,获得 AEC 抗性菌株 *S.albulus* UN2-71 ( $\epsilon$ -PL 产量为 1.64 g/L),其产量为出发菌的 1.42 倍<sup>[6]</sup>;Zong 等采用常温常压等离子诱变将 *S.albulus* A-29 的  $\epsilon$ -PL 产量从 0.40 g/L 提高至 1.59 g/L<sup>[7]</sup>。由此可以看出,利用传统诱变方法可以有效提高产生菌的  $\epsilon$ -PL 产量,但耗时费力且正突变率低。

近年来,有学者利用基因工程的方法,通过强化  $\epsilon$ -PL 合成中重要辅因子的合成代谢途径或氮代谢途径,提高了  $\epsilon$ -PL 的合成能力。许召贤等将 *VHb* 基因整合到 *S.albulus* PD-1 的染色体中以减轻氧限制并增强发酵中  $\epsilon$ -PL 的生物合成。最终,在 5 L 发酵罐中进行补料分批培养后,  $\epsilon$ -PL 的产量提高了 50.66%<sup>[8]</sup>。Xu 等通过在 *S.albulus* PD-1 中过表达铵转运蛋白基因 *amtB* 来改善  $\epsilon$ -PL 的产量,与使用野生型菌株相比,重组细菌的最佳碳氮比增加了 57%,在 5 L 发酵罐中进行补料分批培养后  $\epsilon$ -PL 的产量提高了 57.27%,证明通过过表达 *amtB* 基因增强  $\epsilon$ -PL 的生物合成是有效的<sup>[9]</sup>。但到目前为止,与  $\epsilon$ -PL 合成有关的关键基因改造位点尚未有报道,很大程度影响了基因工程改造  $\epsilon$ -PL 产生菌的进度。因此,寻找一种快速有效的选育  $\epsilon$ -PL 高产菌的方法显得尤为重要。

核糖体工程(ribosome engineering)是由日本学者 Kozo ochi 教授提出来的一种新型育种方法<sup>[10]</sup>。核糖体是微生物进行蛋白质合成的重要细胞器,与胞内代谢活动、基本生理过程密切相关。在稳定生长期,与次级代谢产物生物合成相关基因的大量表达取决于此时核糖体的功能,因此核糖体突变(核糖体蛋白和 rRNA)带来的蛋白合成能力的改变,对次级代谢产物生物合成的影响必然是十分深刻的。抗生素是通过与核糖体的某些部位结合进而影响蛋白质的合成功能,与细胞的严谨反应有类似的作用机理。因此通过向微生物核糖体组分引入点突变,调控代谢系统,诱导或

刺激代谢产物的表达,获得代谢产物合成能力提高的突变菌株。常用于抗性筛选的抗生素主要包括链霉素、利福平、硫链丝菌素、夫西地酸、庆大霉素、巴龙霉素、林肯霉素、遗传霉素等。在所使用的抗生素中,链霉素诱变效果较好,正突变和增产率高,且其抗性突变在诱变育种中应用较多。例如,从每 50 至 100 个随机挑取的链霉素突变株中选取 1 个进行产量测定,约有一半的 *S.chattanoogaensis* 突变株合成弗德利卡霉素的能力有了明显地提高,产量最高可达野生菌株的 26 倍。链霉素引起核糖体改变的机制主要分为两种:高浓度链霉素主要诱导负责编码核糖体 30S 中 S12 蛋白的 *rpsL* 基因突变;低浓度链霉素则导致编码 16S rRNA 甲基转移酶的 *rsmG* 基因发生突变。另外, *rpsL* 基因突变会促进 *frr* 基因表达,其表达产物核糖体循环因子在蛋白合成的最后一步能通过促进 mRNA 和 tRNA 与核糖体解离,提高基因表达<sup>[11-14]</sup>。也有其他研究证明核糖体工程在提高次级代谢物产量的广泛性及有效性,例如, Ochi 等通过对 *Streptomyces coelicolor* A3(2)菌株连续引入链霉素、庆大霉素和利福平抗性突变,最终将放线紫红素产量比出发菌株提升了 48 倍<sup>[15]</sup>; Wang 等在 *Streptomyces coelicolor* 中引入巴龙霉素抗性,显著提高了十一烷基灵菌红素和放线菌紫红素的产量<sup>[16]</sup>; Xie 等证实通过引入利福平抗性,可显著提高 *Pseudomonas protegens* Pf-5 的次级代谢产物的产量<sup>[17]</sup>。

本文以一株小白链霉菌 *S.albulus* M-Z18 为出发菌株,通过高低浓度链霉素抗性,逐级提高菌株的链霉素耐受性,以提高产生菌的  $\epsilon$ -PL 产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*S.albulus* M-Z18(简称 M-Z18)为出发菌株;*S.albulus* S-6(简称 S-6)为低链霉素抗性突变株;*S.albulus* SS-19(简称 SS-19)是高链霉素抗性突变株。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。

链霉素购买于上海生工生物工程公司,葡萄糖、鱼粉蛋白胨、硫酸铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锌、硫酸亚铁等购买于国药集团,酵母粉购买于 OXOID 公司。

### 1.2 设备与仪器

组合式摇床(HPL-C),太仓市强乐设备有限公司;超净工作台(SW-CJ-1FD),苏州安泰空气技术有限公

司; 台式高速冷冻离心机 (3K15), 德国西格玛公司; 精密数显酸度计 (PHS-3TC), 上海天达仪器有限公司; 分光光度计 (UV-2100), 优尼科仪器有限公司; 天平 (AB204-N), 瑞士梅特勒公司; 恒温培养箱 (GNP-9160), 上海光都仪器设备有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 培养基制备

固体培养基(BTN 培养基, g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 2, 酵母粉 1, 琼脂 20, pH 7.5。

种子培养基(M3G 培养基, g/L): 葡萄糖 50, 酵母粉 5, 硫酸铵 10, 磷酸二氢钾 1.36, 磷酸氢二钾 0.8, 硫酸镁 0.5, 硫酸锌 0.04, 硫酸亚铁 0.03, pH 6.8。

优化培养基(YP/YG, g/L): 葡萄糖 30/甘油 60, 酵母粉 8, 硫酸铵 5, 硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 2, 硫酸锌 0.04, 硫酸亚铁 0.03, pH 7.5, 碳源为葡萄糖时, 缩写为 YP, 碳源为甘油时, 缩写为 YG。

RSM 培养基(g/L): 葡萄糖 60, 酵母粉 10, 硫酸铵 5, 硫酸镁 0.8, 磷酸二氢钾 4, 硫酸亚铁 0.04, pH 6.8。

上述培养基均 115 °C 灭菌 20 min。

#### 1.3.2 单孢子悬浮液的制备

将 M-Z18 接种于 BTN 培养基上, 30 °C 培养 8 d 至孢子成熟, 用接种铲刮下孢子, 置于含玻璃珠和无菌水的三角瓶中, 30 °C 摇床上 200 r/min 震荡 20 min, 经 8 层纱布过滤得到单孢子悬浮液, 在光学显微镜下用血球计数板计数, 调整浓度为  $10^8 \sim 10^9$  个/mL, 作为待处理菌液。

#### 1.3.3 链霉素最小抑菌 (minimum inhibitory concentration, MIC) 浓度的测定

将链霉素配制成 5 g/L 的母液, 在 BTN 培养基冷却到 50 °C 时, 加入母液并充分混匀, 分别配制成含有 0、2、4、6 mg/L 链霉素的 BTN 培养基, 相同浓度设置 3 个平行, 取 0.1 mL M-Z18 孢子悬浮液, 均匀涂布在上述 BTN 培养基上, 30 °C 培养 3~5 d, 能完全抑制 M-Z18 孢子生长的最低链霉素浓度即为该菌的链霉素 MIC。

#### 1.3.4 链霉素选育突变株

##### 1.3.4.1 选育低浓度链霉素抗性的突变株

将 M-Z18 制成单孢子悬浮液并稀释到适宜浓度, 涂布到含链霉素 1-5 MIC 的 BTN 培养基上, 30 °C 培养 8 d。挑选直径较大且孢子浓密或与出发菌株有较大差异的菌落进行扩培, 并利用高通量筛选系统进行初筛<sup>[18]</sup>。对初筛结果进行统计分析。

##### 1.3.4.2 选育高浓度链霉素抗性的突变株

将 S-6 制成单孢子悬浮液并稀释到适宜浓度, 涂布到含链霉素 5~10 MIC 的 BTN 培养基上, 30 °C 培养 8 d。挑选直径较大且孢子浓密或与出发菌株有较大差异的菌落扩培, 并利用高通量筛选系统进行初筛。对初筛结果进行统计分析。

#### 1.3.5 培养方法

##### 1.3.5.1 平板培养

接单孢子悬浮液于 BTN 培养基, 30 °C 培养 8 d。

##### 1.3.5.2 初筛培养

无菌牙签刮取孢子, 接种于 YG 培养基中。24 孔板每孔装液量 2 mL, 摇床转速 200 r/min, 30 °C 培养 96 h。

##### 1.3.5.3 复筛培养

种子培养: 30 °C, 装液量 40 mL/250 mL 三角瓶, 摇床转速 200 r/min, 培养 24 h。

发酵培养: 30 °C, 装液量 40 mL/250 mL 三角瓶, 摇床转速 200 r/min, 培养 96 h, 接种量 8%。

#### 1.3.6 高低产菌株生理生化性能差异分析

##### 1.3.6.1 高产菌株的形态特征比较

取 M-Z18 和 SS-19 的孢子悬浮液涂布于 BTN 培养基, 30 °C 下培养至长出孢子, 观察其菌落形态及通过扫描电子显微镜下察看孢子状态。

##### 1.3.6.2 高产突变株菌球形态差异比较

将筛选得到的突变菌以出发菌株 M-Z18 作为对照, 在相同条件下培养 96 h, 在不同时间点观察菌体生长情况。

##### 1.3.6.3 抵抗抗生素能力差异比较

将筛选得到的突变株分别涂布于不同链霉素浓度的抗性平板上, 观察其抵抗链霉素的能力。

##### 1.3.6.4 不同培养基中摇瓶发酵性能差异比较

取 M-Z18 和 SS-19 的孢子, 接种到 M3G、YG、YP 和 RSM 四种培养基中, 每个菌株设置 3 个平行, 30 °C、200 r/min 培养 96 h。测定发酵 pH、菌体干重、 $\epsilon$ -PL 浓度和单位菌体  $\epsilon$ -PL 合成的能力, 比较高低产菌株摇瓶发酵水平。

##### 1.3.6.5 $\epsilon$ -PL 代谢途径关键酶活力差异比较

取 M-Z18 和 SS-19 的孢子, 接种到 YG 培养基中, 取发酵 48 h 的菌液进行离心, 超声破碎制备粗酶液后, 比较  $\epsilon$ -PL 代谢途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)、己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)和柠檬酸合酶(CS)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)、天冬氨酸激酶(ASK)与  $\epsilon$ -PL 合成酶(Pls)等关键酶的活性。

#### 1.3.7 突变菌株遗传稳定性试验

将筛选出的  $\epsilon$ -PL 产量显著提高的菌株进行遗传稳定性试验, 对突变菌株连续传代培养 5 代, 并进行

摇瓶发酵验证筛选出的突变菌株的稳定性。

## 1.4 分析检测方法

### 1.4.1 pH 值的测定

使用 pH 计精确测定。

### 1.4.2 菌体干重测定

采用滤纸差量测重法：取发酵液 10 mL，4500 r/min 离心 15 min，取沉淀加去离子水洗涤两次，用预先 105 °C 烘干并称重的滤纸进行抽滤，之后滤纸置于 105 °C 烘干至恒重后称重，计算前后质量差值，即为菌体干重 (dry cell weight, DCW)。

### 1.4.3 $\epsilon$ -PL 的浓度测定

$\epsilon$ -PL 的浓度测定采用甲基橙比色法，参照 Itzhaki 等<sup>[19]</sup>的方法，将  $\epsilon$ -PL 标准品配成 1 g/L 的母液，用磷酸缓冲液 (0.7 mmol/L) 稀释成 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16 g/L 的溶液，分别取 2 mL 稀释液与等体积的甲基橙振荡反应，置于 30 °C、200 r/min 摇床反应 30 min，然后 4500 r/min 离心 15 min，取 0.5 mL 上清液加入到含有 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，绘制标准曲线。待发酵结束后，用磷酸缓冲液将上清液稀释，使  $\epsilon$ -PL 浓度的 OD 值在 0.2~0.4。经标准曲线计算出  $\epsilon$ -PL 的浓度。

### 1.4.4 $\epsilon$ -PL 代谢途径关键酶活力测定

取菌液 4500 r/min 离心 15 min，用 0.20% 的 KCl 溶液洗涤菌体两次，称取 2 g 湿菌体用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.50) 溶液定容至 10 mL。菌体经超声破碎后 12000 r/min 离心 20 min，上清即为粗酶液。6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH)、己糖激酶 (HK)、丙酮酸激酶 (PK)、柠檬酸合酶 (CS)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)、天冬氨酸激酶 (ASK) 与  $\epsilon$ -PL 合成酶 (Pls) 的酶活力测定方法参考文献<sup>[20]</sup>。

## 1.5 数据统计

本实验所有测量数据均重复测定三次，结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。用 Origin 8.5 软件进行数据统计。

## 2 结果与讨论

### 2.1 链霉素最小抑菌浓度 (MIC)

由图 1 可知，在不加链霉素的平板上 (图 1a)，菌株生长 6 天的孢子量大且浓密；在链霉素浓度为 2 mg/L 时 (图 1b)，平板上呈现出稀疏的菌落，且菌落基本未长出孢子，说明链霉素抑制了菌株的生长。继续增加链霉素的浓度，可以明显地看到菌落数目呈现

递减趋势。当链霉素的浓度达到 6 mg/L 时，菌株的生长基本被完全抑制，由此确定链霉素对 M-Z18 的最小抑菌浓度为 6 mg/L。

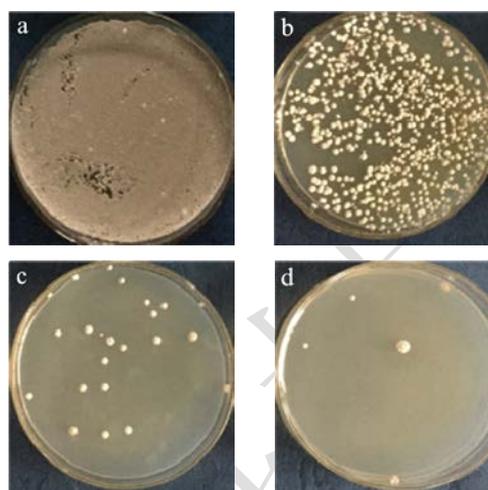


图 1 M-Z18 在不同浓度链霉素的 BNT 平板上的生长情况

Fig.1 Colony forming units of M-Z18 on BNT plates containing different streptomycin concentrations.

注：(a) 0 mg/L；(b) 2 mg/L；(c) 4 mg/L；(d) 6 mg/L。

### 2.2 低浓度链霉素抗性选育高产突变株

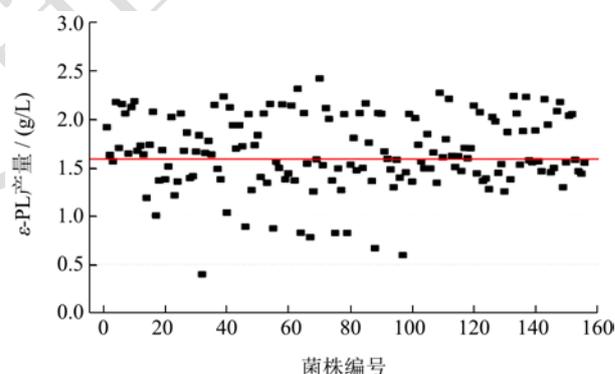


图 2 在含有 1~5 MIC 链霉素平板上挑选的 156 个菌落的发酵结果

Fig.2  $\epsilon$ -PL production of 156 colonies grown on plates with 1~5 MIC streptomycin

在 1~5 MIC 链霉素抗性平板上，随机挑取了 156 个生长速度较快、产孢能力较强的单菌落进行初筛，筛选结果见图 2。由图可知，有 79 株菌株的  $\epsilon$ -PL 比 M-Z18 有显著提升，正突变率为 50.64%。其中，突变株 S-6 的  $\epsilon$ -PL 摇瓶产量最高 (2.43 $\pm$ 0.03 g/L)，较 M-Z18 提高了 51.88%。这个结果，比利用常压室温等离子体诱变茂源链霉菌<sup>[21]</sup>的正突变率 (32%) 高出了 19.88%，说明低链霉素抗性筛选的方法确实能快速提高  $\epsilon$ -PL 产量。这可能是由于编码 16S rRNA 甲基转移酶的 *rsmG* 基因发生突变引起的甲基转移酶功能突变，导致了 16S rRNA 上一个保守的鸟苷甲基化位点 G527 的甲

基化缺失, *rsmG* 突变株中 S-腺苷甲硫氨酸水平上升, 最终促使目的次级代谢物的过量表达<sup>[22,23]</sup>。

### 2.3 高浓度链霉素抗性选育高产突变株

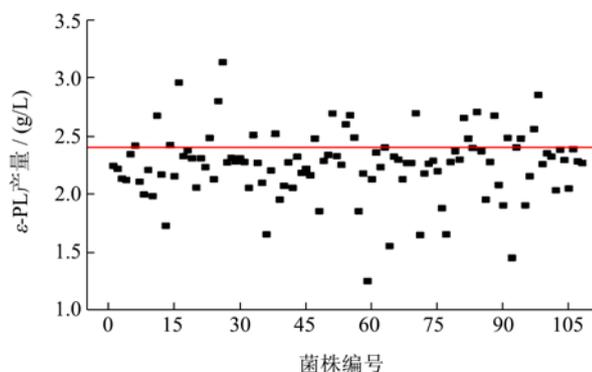


图3 在含有5~10 MIC链霉素平板上挑选的108个菌落的发酵结果

Fig.3  $\epsilon$ -PL production of 108 colonies grown on plates with 5~10 MIC streptomycin

在5~10 MIC链霉素长出菌落的平板上, 随机挑选了产孢能力强、与出发菌形态差大的108个单菌落进行培养和发酵筛选, 结果表明, 有25株菌株的 $\epsilon$ -PL产量较S-6明显提升, 正突变率为23.14% (图3)。经复筛, 发现高浓度链霉素抗性选育获得一株高产菌株 *Streptomyces albus* SS-19, 产量为 $3.13 \pm 0.04$  g/L, 比M-Z18提高了95.63%。实验结果表明, 高浓度链霉素抗性筛选能进一步提高 $\epsilon$ -PL高产菌株产量, 证明通过筛选具有高浓度链霉素抗性的突变菌获得 $\epsilon$ -PL高产菌株仍然具有优势。Li等<sup>[24]</sup>选择链霉素作为选择压力筛选了 *S.albus* GCMCC 4.5716的抗生素抗性菌株, 链霉素抗性菌株沙利霉素的产量是野生菌的4倍。结果表明, 链霉素抗性筛选可能促使编码核糖体S12蛋白的 *rpsL* 基因发生突变, 其核糖体循环因子过表达, 细胞后期生长阶段的蛋白质合成能力增强, 次级代谢起始加快并产生丰富的目的产物<sup>[22]</sup>。然而, 高浓度链霉素抗性筛选的正突变率(23.13%)比低浓度链霉素抗性筛选的正突变率(51.88%)低, 说明虽然阶梯性提高链霉素筛选浓度可以继续强化小白链霉菌的 $\epsilon$ -PL合成能力, 但其正突变率会随着抗性的增加而降低。吴光耀等<sup>[25]</sup>也采用先低(1~10 MIC)后高(10~50 MIC)的链霉素抗性筛选的方法进行了高产菌的选育, 分别将 $\epsilon$ -PL产量分别提高17.9%和10.3%。但实际上, 10 MIC抗性对菌株已产生较强抑制, 具体表现为产孢能力与传代稳定性的明显下降。因此, 本研究采用逐级引入高浓度链霉素抗性的方法, 从而弱化链霉素对菌株的伤害, 结果表明在低浓度(1~5 MIC)选育时,  $\epsilon$ -PL产量提高了51.88%, 在高浓度(5~10 MIC)选育时,

$\epsilon$ -PL产量提高了21.43%。以上结果说明:(1)链霉素抗性筛选确实能有效提高菌株的 $\epsilon$ -PL产量;(2)利用递推式的方法, 逐级增加链霉素抗性更有利于 $\epsilon$ -PL产量的稳步提升。

### 2.4 高产菌株生理生化性能分析

#### 2.4.1 高产突变菌株菌落形态分析

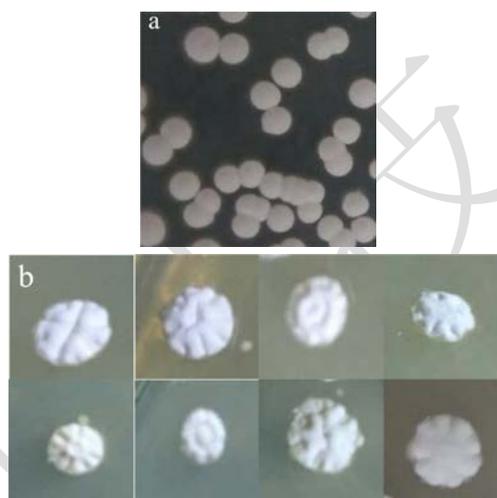


图4 出发菌株M-Z18(a)与高产菌株SS-19(b)典型菌落形态

Fig.4 Typical colony morphology of original strain M-Z18 (a) and the high-yield strain SS-19 (b)

以M-Z18为出发菌株, 获得链霉素抗性菌SS-19, 在BTN培养基上培养后菌落形态发生明显变化, 一些典型菌落如图4b所示。出发菌M-Z18的单菌落较为扁平, 表面光滑, 无褶皱, 菌落形态较单一(图4a); 高产菌株SS-19有丰富的气生菌丝, 单菌落表面出现较多褶皱, 呈现多样性。这些表型变化具有遗传性, 表明M-Z18的遗传物质在链霉素抗性筛选中确实发生了改变, 形态学的变化暗示了菌株M-Z18的基因发生了突变, 因为放线菌表型的多样性往往反应了其基因和产物的多样性。据报道, *Streptomyces avermitilis*的关键产物代谢途径调控基因与其形态学调控基因高度相关, 不同形态的 *S. avermitilis* 产量有很大的差异<sup>[21]</sup>。Wang等<sup>[26]</sup>在高产菌株的选育过程中的菌落形态的分化与本研究M-Z18与SS-19的情况类似, 研究表明 *rpoB* 基因的突变也不但会引起细菌的表型出现较大分化<sup>[27]</sup>, 也会促使菌株大量合成次级代谢产物。

#### 2.4.2 高产突变菌株孢子形态

出发菌株M-Z18与链霉素抗性菌SS-19孢子形态对比如图5所示。M-Z18(图5a)孢子密度较大, 刺突较短, 且部分孢子表面的刺突较为稀少; SS-19(图5b)的孢子密度比M-Z18小, 刺突均长且致密。根据刺的形状, 属尖型针状凸起<sup>[28]</sup>, 这一现象也与梁新乐等<sup>[29]</sup>的研究结果一致。有研究表明, 在链霉菌中 *rpsL*

基因突变也会出现菌丝和孢子形态的变化,这种表型的改变可能有与细菌启动严谨反应相关<sup>[27]</sup>。基于菌落和孢子形态分析,表明经过链霉素抗性选育获得的突变株形态上会与出发菌株产生较大的差异,为后期高产菌的快速选择提供重要依据。

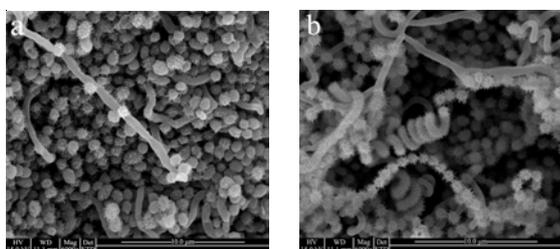


图5 M-Z18 (a) 和 SS-19 (b) 的孢子形态差异

Fig.5 Spore morphology differences between M-Z18 (a) and SS-19 (b)

### 2.4.3 高产突变株菌球形态

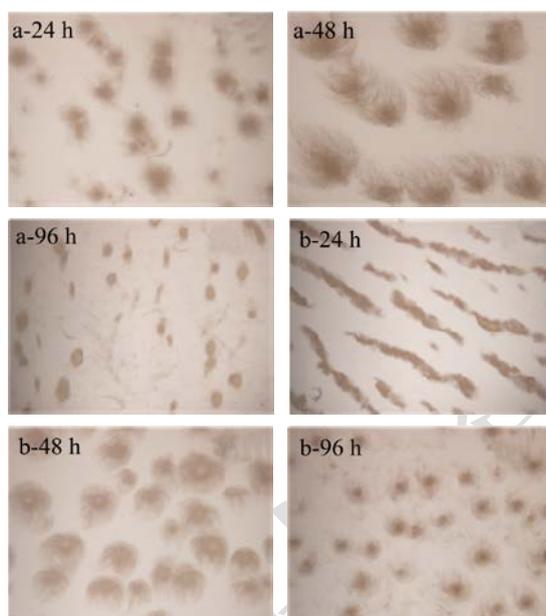


图6 M-Z18 (a) 和 SS-19 (b) 在摇瓶中发酵过程中不同时间点菌体形态比较 (400×)

Fig.6 Comparison of M-Z18 (a) and SS-19 (b) on pellet morphology at different time during fermentation (400×)

出发菌 M-Z18 与高产菌 SS-19 在 YG 培养基中菌体形态对比如图 6 所示。发酵 24 h 时, M-Z18 已开始形成菌球而 SS-19 未形成菌球; 发酵 48 h 时, M-Z18 的菌球较大, 菌丝较长, 而 SS-19 的菌球比 M-Z18 小; 发酵 96 h 时, M-Z18 已大量裂解, SS-19 仅有少量菌球出现裂解, 且相比于 48 h 仍然保留较为完整, 菌球的体积变小。通过比较突变菌和出发菌发酵过程中的菌球形态, 发现突变菌生长速率减慢, 发酵周期延长。研究表明, 菌体在不同碳氮源以及碳氮比例时会呈现出的不同菌球形态, 菌球形态的差异会影响发酵液流变性, 而发酵液的流变性对营养物质和氧的传递又会

造成影响, 进而影响代谢, 最终对目的产物的合成造成不同的影响<sup>[30]</sup>。此外, 在发酵中后期, 当菌球保持一定体积的球核会对合成目的产物十分有利。SS-19 的优势在于后期仍保持较为完整的菌球形态, 使菌株持续发酵产能。所以 SS-19 的优势在于后期仍保持较为完整的菌球形态, 使菌株持续发挥发酵产能。后期通过培养基及发酵策略优化等方法可进一步提高菌株产量。

### 2.4.4 抗生素耐受性差异

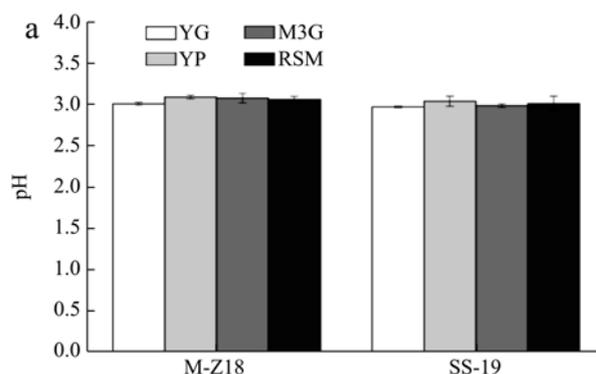
通过核糖体工程技术对菌株 M-Z18 进行选育, 获得了具有链霉素抗性的高产菌株。研究发现, 突变菌在  $\epsilon$ -PL 合成能力得到提升的同时, 自身对于抗生素的耐受能力也会发生变化。对 M-Z18、S-6、SS-19 以及实验中涉及的其他抗性菌株进行链霉素抗性测定。由表 1 可知, 经链霉素抗性筛选后, 菌株链霉素抗性明显提高。低浓度链霉素抗性筛选 (1~5 MIC) 获得的突变菌, 其抗性从原来的 6 mg/L 仅增加至 9 mg/L; 但是经过高浓度链霉素抗性筛选 (5~10 MIC) 获得的高产菌株, 其链霉素抗性高达 45 mg/L。这可能是因为菌株发生链霉素抗性突变后, 很大程度上解除了链霉素对核糖体的抑制作用, 在提高链霉素抗性的同时也大幅提升了  $\epsilon$ -PL 的产量。

表 1 不同菌株链霉素抗性的差异

Table 1 Streptomycin resistance test of different strains during breeding

breeding				
菌株编号	出发菌	筛选抗生素浓度/(MIC)	$\epsilon$ -PL 产量/(g/L)	链霉素抗性/(mg/L)
M-Z18	出发菌		1.60	6.00
S-6	M-Z18	1~5	2.43	9.00
S-11	M-Z18	1~5	2.32	9.00
S-15	M-Z18	1~5	2.28	9.00
SS-19	S-6	5~10	3.13	45.00
SS-32	S-6	5~10	2.96	42.00

### 2.5 高产菌株在不同培养基的发酵性能分析



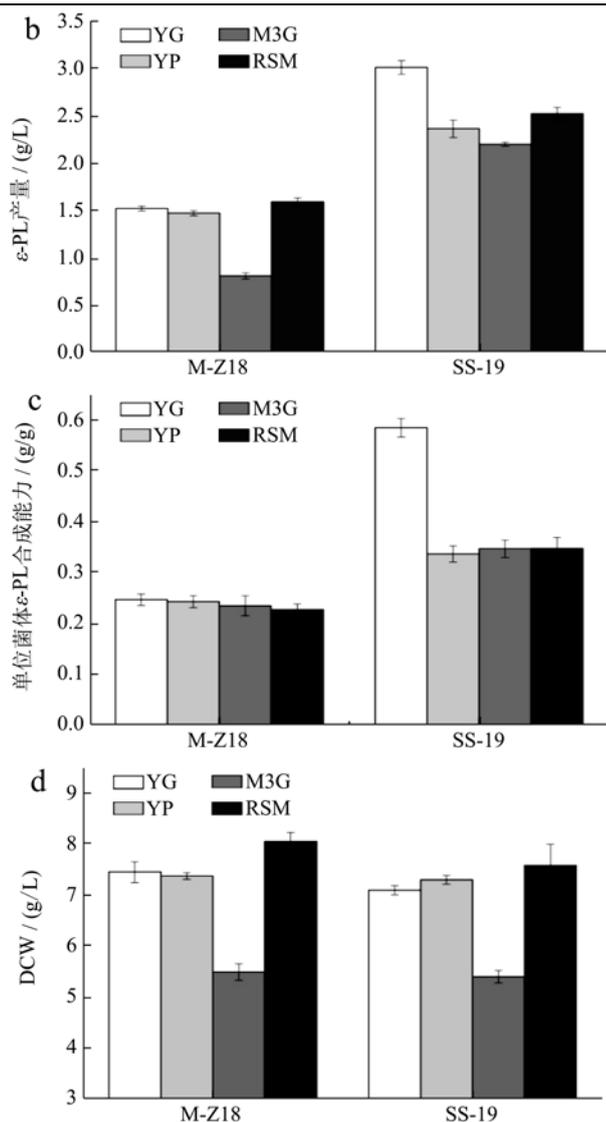


图7 M-Z18和SS-19在不同培养基中摇瓶发酵性能比较

Fig.7 Fermentation performance of M-Z18 and SS-19 at different fermentation media

菌株经高产选育后对营养物质的需求也会随之改变。对 M-Z18、SS-19 在四种常用  $\epsilon$ -PL 发酵培养基 M3G、RSM、YG 和 YP 的发酵参数进行了对比, 实验结果见图 7。结果表明, M-Z18 与 SS-19 在上述四种培养基中发酵结束时, 最终的 pH 值未表现出明显的差异; SS-19 在四种培养基中的  $\epsilon$ -PL 产量和单位菌体合成  $\epsilon$ -PL 能力均高于 M-Z18, 意味着高低链霉素抗性筛选使 SS-19 的  $\epsilon$ -PL 合成能力明显提高。另一方面, 两菌株在 YG 培养基中的产量均高于在其它三种培养基, 说明 YG 培养基更有利于菌株大量积累  $\epsilon$ -PL。在 YG 培养基中, SS-19 的  $\epsilon$ -PL 产量较 M-Z18 提高了 95.63%, 单位菌体  $\epsilon$ -PL 合成能力提高了 137.61%。然而, 虽然以甘油为碳源的培养基 (YG) 获得的  $\epsilon$ -PL 产量较高, 但目前工业化生产仍然倾向于以葡萄糖作为碳源, 其原因是以甘油为碳源发酵生产的  $\epsilon$ -PL 产品

的聚合度低于以葡萄糖为碳源时的产品聚合度, 聚合度的降低会导致  $\epsilon$ -PL 对细菌的抑菌性下降, 产品效价降低。将 SS-19 在上述 4 种培养基中产量与前期选育获得的 WG-608 对比发现, 虽然 WG-608 在 YG 培养基 (甘油为碳源) 中产量比 SS-19 高, 但 SS-19 在以葡萄糖为碳源的 RSM 发酵培养基上的产量比 WG-608 高 9.6%。说明本研究获得的 SS-19 更具有工业生产的潜力。

## 2.6 高产菌代谢途径关键酶活性分析

为了从生理代谢水平进一步了解 SS-19 的高产原因, 对  $\epsilon$ -PL 合成途径的关键酶活性进行了考察, 结果如表 2 所示。与 M-Z18 相比, SS-19 的 HK、G6PDH、PK、CS、PEPC、ASK、Pls 的酶活性分别增加了 40.23%、45.45%、28.13%、142.11%、119.27%、136.49%、34.79%。HK 酶活升高会增加 EMP 途径通量, 有助于 SS-19 对葡萄糖的摄取和消耗。NADPH 是  $\epsilon$ -PL 前体 L-赖氨酸合成中最重要的辅因子, 其主要来源于 PPP 途径。G6PDH 酶活性提高, PPP 途径会被强化, 促使细胞合成更多的 NADPH, 从而促进了 L-赖氨酸合成。EMP 途径代谢末端产物丙酮酸是 TCA 循环所需的碳骨架, 而关键酶 PK 的活力增强直接增加了碳骨架进入 TCA 循环的通量。同时, CS 酶活力的增强也促使 TCA 循环的通量增加。TCA 循环能为细胞提供能量因子 (NADH 和  $FADH_2$ ) 用于呼吸产能, 并生成大量 ATP, 直接参与  $\epsilon$ -PL 的合成代谢。在  $\epsilon$ -PL 合成中大量的 L-赖氨酸会被消耗, 细胞胞内草酰乙酸是相对稀缺的, PEPC 酶活性增加提高了回补途径的通量, 为前体 L-赖氨酸合成提供大量的碳骨架前体 (草酰乙酸) 并流入 DAP 途径。ASK 酶活性的提高会强化 DAP 途径, 促进 L-赖氨酸的合成。此外, Pls 的活力的增加直接提高了细胞的  $\epsilon$ -PL 合成能力。以上结果表明, SS-19 是通过强化初级与次级代谢通量, 合成更多前体物质 L-赖氨酸和辅因子 ATP, 最终大量合成  $\epsilon$ -PL 的。这与许召贤等将 *VHb* 基因整合到 *S.albulus* PD-1 的染色体中以减少氧限制并增强发酵中  $\epsilon$ -PL 的生物合成和 Xu 等通过在 *S.albulus* PD-1 中过表达基因 *amtB* 来改善  $\epsilon$ -PL 的产量的结果是一致的<sup>[8,9]</sup>。

## 2.7 高产突变菌的遗传稳定性

为研究突变株 SS-19 的遗传稳定性, 在 BTN 培养基上对其进行连续 5 次传代培养并进行发酵验证, 结果如表 3。经 5 次传代后, 链霉素抗性突变菌 SS-19 的  $\epsilon$ -PL 产量与出发菌株相比一直稳定高产, 证明该高产突变菌具有良好的遗传稳定性, 可应用于工业生产。

表2 出发菌株 M-Z18 与 SS-19 菌株的关键酶活性比较 (U/mg prot)

Table 2 Key enzyme activities in  $\epsilon$ -PL biosynthesis between M-Z18 and SS-19 (U/mg prot)

菌株	HK	G6PDH	PEPC	ASK	CS	PK	Pls
M-Z18	6.35±0.82	0.11±0.15	0.32±0.28	0.19±0.08	1.09±0.81	0.74±0.38	65.23±1.21
SS-19	8.91±0.05	0.16±0.23	0.41±0.13	0.46±0.12	2.39±0.11	1.75±0.06	87.93±0.45

表3 SS-19 菌株传代稳定性试验

Table 3 Test of passage stability for high-yield mutant SS-19

传代次数	1	2	3	4	5
$\epsilon$ -PL 产量/(g/L)	3.13±0.10	3.03±0.05	2.95±0.14	3.00±0.09	2.94±0.12

### 3 结论

3.1 本研究基于核糖体工程理论,采用先低浓度后高浓度的链霉素对 M-Z18 进行抗性筛选,获得了一株  $\epsilon$ -PL 产量明显提高的突变株 SS-19,摇瓶产量达到 3.13 g/L,较出发菌株提高了 95.63%;单位菌体  $\epsilon$ -PL 合成能力为 0.58 g/g,较出发菌株提高了 137.61%。在相同的培养条件下,SS-19 在发酵后期仍保持较为完整的菌球形态,使菌株持续发酵产生  $\epsilon$ -PL,并且在以葡萄糖为碳源的 RSM 培养基中比之前报道的 WG-608 表现出更好的  $\epsilon$ -PL 合成能力。以上结果表明,通过逐步引入高浓度链霉素抗性的方法可有效提升  $\epsilon$ -PL 产量。进一步对高产菌的  $\epsilon$ -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 HK、G6PDH、PK、CS、PEPC、ASK、Pls 的酶活性均有所增加,表明通过逐步引入高浓度链霉素抗性的筛选方法能够强化小白链霉菌中  $\epsilon$ -PL 合成代谢相关途径的通量,从而提高  $\epsilon$ -PL 的合成能力。经 5 次连续传代培养,SS-19 的  $\epsilon$ -PL 产量仍基本保持稳定,说明 SS-19 菌具有良好的遗传稳定性,可应用于工业生产。

3.2 本文的实验为摇瓶发酵结果,其过程很难对营养、溶氧和 pH 等条件进行控制。因此,在今后的研究中,一方面可以在 5 L 发酵罐中对 SS-19 作进一步发酵优化以提高  $\epsilon$ -PL 发酵产量;另一方面可以对 SS-19 与 M-Z18 进行比较组学分析,找到促进 SS-19 高产的关键原因以剖析 SS-19 高产机制。

### 参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces* [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1977, 41(9): 1807-1809
- [2] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly( $\epsilon$ -lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159
- [3] Bankar S B, SInghal R S. Optimization of poly- $\epsilon$ -lysine production by *Streptomyces noursei* NRRL 5126 [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8370-8375
- [4] 李树. $\epsilon$ -聚赖氨酸产生菌的筛选、育种及发酵研究[D].无锡:江南大学,2013  
LI Shu. Screening, breeding and fermentation researches on  $\epsilon$ -poly-L-lysine producing strains [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [5] 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[J].工业微生物,2007,37(2):28-30  
CHEN Wei-wei, ZHU Hong-yang, XU Hong. Breeding of mass-producing  $\epsilon$ -polylysine mutant and its batch fermentation [J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(2): 28-30
- [6] 余明洁,田丰伟,范大明,等.高产  $\epsilon$ -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  
YU Ming-jie, TIAN Feng-wei, FAN Da-ming, et al. Study on mutation breeding of high  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing *Streptomyces albulus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29 (7): 99-101
- [7] 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
- [8] Xu Z, Cao C, Sun Z, et al. Construction of a genetic system for *Streptomyces albulus* PD-1 and improving poly( $\epsilon$ -L-lysine) production through expression of vitreoscilla hemoglobin [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 25(11): 1819-1826
- [9] Xu D, Yao H, Cao C, et al. Enhancement of  $\epsilon$ -poly-L-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in *Streptomyces albulus* PD-1 [J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2018, 41(4): 1-9
- [10] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2007, 71(6): 1373-1386
- [11] 陈丽杰,商光来,袁文杰,等.利用核糖体工程选育丙酮丁醇菌提高丁醇产量[J].生物工程学报,2012,28(9):1048-1058  
CHEN Li-jie, SHANG Guang-lai, YUAN Wen-jie, et al.

- Screening of *Clostridium strains* through ribosome engineering for improved butanol production [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(9): 1048-1058
- [12] 刘玲,朱湘成,黄勇.微生物核糖体工程在抗生素研发中的应用[J].中国感染控制杂志,2016,15(5):355-360  
LIU Ling, ZHU Xiang-cheng, HUANG Yong. Application of microbial ribosome engineering in the research and development of antibiotics [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2016, 15(5): 355-360
- [13] 谢庶洁,肖静,徐俊.微生物核糖体工程研究进展[J].微生物学报,2009,49(8):981-986  
XIE Shu-jie, XIAO Jing, XU Jun. Advance in microbial ribosome engineering [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(8): 981-986
- [14] 乔长晟,赵男,石漫漫,等.基于核糖体工程理论的常压室温等离子体诱变筛选多杀菌素高产菌[J].中国生物工程杂志,2014,34(1):71-78  
QIAO Chang-sheng, ZHAO Nan, SHI Man-man, et al. Mutation screening of production strains of spinosad based on ribosome engineering theory through ARTP [J]. China Biotechnology, 2014, 34(1): 71-78
- [15] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production [J]. Advances in Applied Microbiology, 2004, 56: 155-184
- [16] Wang G, Inaoka T, Okamoto S, et al. A novel insertion mutation in *Streptomyces coelicolor* ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2009, 53(3): 1019-1026
- [17] Xie Y, Liu Z, Zhang G et al. A rifampicin-resistant (*rpoB*) mutation in *Pseudomonas protegens* Pf-5 strain leads to improved antifungal activity and elevated production of secondary metabolites [J]. Research in Microbiology, 2016, 167(8): 625-629
- [18] Liu Y J, Chen X S, Zhao J J, et al. Development of microtiter plate culture method for rapid screening of  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing strains [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2017, 183(4): 1-15
- [19] Itzhaki R F. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine [J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574
- [20] Zeng X, Chen X S, Ren X D, et al. Insights into the role of glucose and glycerol as a mixed carbon source in the improvement of  $\epsilon$ -poly-L-lysine productivity [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2014, 173(8): 2211-2224
- [21] 田淑翠,牛延宁,常忠义,等.常压室温等离子体(ARTP)诱变茂源链霉菌菌株[J].中国生物工程杂志,2016,36(9):47-53  
TIAN Shu-cui, NIU Yan-ning, CHANG Zhong-yi, et al. The *Streptovorticillium mobaraense* mutagenesis using atmospheric pressure plasma at room temperature (ARTP) method [J]. China Biotechnology, 2016, 36(9): 47-53
- [22] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(24): 7276-7284
- [23] Okamotohosoya Y, Hosaka T, Ochi K. An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Microbiology, 2003, 149(11): 3299-3309
- [24] Li D, Zhang J, Tian Y, et al. Enhancement of salinomycin production by ribosome engineering in *Streptomyces albus* [J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(2): 276-279
- [25] 吴光耀,陈旭升,王靓,等.核糖体工程技术选育  $\epsilon$ -聚赖氨酸高产菌株[J].微生物学通报,2016,43(12):2744-2751  
WU Guang-yao, CHEN Xu-sheng, WANG Liang, et al. Screening of high-yield  $\epsilon$ -poly-L-lysine producing strains through ribosome engineering [J]. Microbiology China, 2016, 43(12): 2744-2751
- [26] WANG L Y, HUANG Z L, LI G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 851-858
- [27] 刘正强.利用核糖体工程技术提高荧光假单胞菌 Pf-5 菌株活性次级代谢产物产量[D].长沙:湖南师范大学,2016  
LIU Zheng-qiang. Improving the production of active secondary metabolites in *Pseudomonas protegens* Pf-5 by using ribosome engineering [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2016
- [28] 丁鑑,刘惠敏,张忠泽,等.应用临界点干燥法在扫描电镜上观察链霉菌孢子形态[J].微生物学通报,1980,7(5):212-214  
DING Jian, LIU Hui-min, ZHANG Zhong-ze, et al. Spore morphology of *Streptomyces* viewed by scanning electron microscopy [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1980, 7(5): 212-214

(下转第 195 页)