

聚- ϵ -赖氨酸高产菌株的筛选及其发酵工艺的初步研究*

陈 雄** 章 莹 袁金凤 王实玉 王金华

(湖北工业大学生物工程学院 湖北省工业微生物重点实验室 武昌 430068)

摘要 利用亚甲基蓝平板初筛、摇瓶复筛,从土壤中筛选了一株聚- ϵ -赖氨酸(ϵ -PL)高产菌株, ϵ -PL 摇瓶产量大于 2 g/L。经初步鉴定该菌株为白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)。对该菌株发酵生产 ϵ -PL 的培养基成分进行初步研究表明:葡萄糖是最好的碳源,酵母粉和硫酸铵是最佳的复合氮源,在优化培养基下, ϵ -PL 摇瓶产量达到 3.9 g/L。

关键词 聚- ϵ -赖氨酸,白色链霉菌,筛选,发酵工艺

中图分类号 S816.34 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(2007)04-0731-04

Screening of Poly- ϵ -lysine-producing Strain and its Fermentation Technology*

CHEN Xiong** ZHANG Ying YUAN Jin-Feng WANG Shi-Yu WANG Jin-Hua

(College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Wuchang 430068)

Abstract A strain with 2 g/L yield of poly- ϵ -lysine was firstly screened from soil on an agar plate containing methylene blue and then further selected by a flask experiment. The strain was preliminarily identified as *Streptomyces albulus*. The experiment about medium optimization showed that glucose was the best carbon sources and yeast extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were the best compound nitrogen sources. The yield of ϵ -PL reached 3.9 g/L with optimal medium.

Key words Poly- ϵ -lysine, *Streptomyces albulus*, Screening, Fermentation technology

1977 年日本学者 Shima 和 Sakai 偶然发现一株白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)能产生一种与 Dragendoff 试剂呈阳性反应的物质,通过对该物质酸水解产物的分析及结构分析,证实该物质是一种含有 25~30 个赖氨酸残基的同型单体聚合物,这种赖氨酸聚合物是赖氨酸残基通过 α -羧基和 ϵ -氨基形成的酰胺键连接而成,故称为聚- ϵ -赖氨酸(ϵ -PL)^[1]。 ϵ -PL 是淡黄色粉末,吸湿性强,溶于水,可生物降解,可食无毒,热稳定性好,100℃加热 30 min 或 1×10^5 Pa 灭菌 20 min,聚合物长度不变。在食品、医药、环境等方面具有广阔的应用前景,可作为食品防腐剂、乳化剂、药物载体、基因载体、干扰素诱导物、水凝胶和吸水材料等^[2]。同时, ϵ -PL 能抑制小肠对脂肪的吸收,可用于保健食品^[3]。特别是由于 ϵ -PL 防腐性强、安全性高、热稳定性好等优点,它在食品防腐剂方面将具有巨大的商业前景。

近年来, ϵ -PL 正日益受到人们重视。但关于 ϵ -

PL 的产生菌的研究一直没有较大进展,因为以往的通过分析发酵液成分来确定 ϵ -PL 产生菌的筛选方法难以对大量的微生物进行筛选。2002 年, Nishikawa 和 Ogawa 利用带正电分泌物(如 ϵ -PL)能排斥碱性染料(如蓝色的亚甲基蓝)和吸引酸性染料(如红色 Poly R-478)的原理发现了一种简便的平板筛选方法。从约 300 种土样中筛选分离得到了十多种 ϵ -PL 的产生菌。它们分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)或其亲缘属北里孢菌属(*Kitasatospora*)及麦角真菌(*Ergot fungi*)这几类微生物^[4]。

本文利用 Nishikawa 筛选方法并对之稍作改进,从土壤中筛选了一株 ϵ -PL 高产菌株,经过初步鉴定为白色链霉菌(*Streptomyces albulus*),同时对 *Streptomyces albulus* 发酵生产 ϵ -PL 的培养基成分进行了初步优化。

* 湖北省教育厅青年项目(No. Q200514001)

** 通讯作者 Tel 027-63436990, E-mail: cx163_qx@163.com

收稿日期 2007-01-29, 修回日期 2007-04-12

1 材料与方法

1.1 培养基

斜面培养基(modified Bennett):葡萄糖 1%,牛肉膏 0.1%,聚脲 0.2%,酵母膏 0.2%,琼脂 1.5%, pH7.5

平板分离培养基:甘油 1%,酵母粉 0.01%, NaH_2PO_4 0.068%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025% (NH_4)₂SO₄ 0.066%,亚甲基蓝 0.002%,琼脂 1.5%, pH6.8

发酵培养基(M3G):葡萄糖 5%,酵母粉 0.5%, (NH_4)₂SO₄ 1%, KH_2PO_4 0.136%, K_2HPO_4 0.08%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, pH6.8

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选方法 菌株分离:将土样置于有无菌水和玻璃珠的三角瓶中,充分振荡,使样品充分分散,再用无菌水适当稀释,取一定量的稀释液涂布分离培养基平板上,30℃培养 3d~7d,挑取培养基周围蓝色较浅的单个菌落。

菌种纯化:用划线法将上述分离出的菌株进行纯化,挑取单菌落接入斜面,30℃培养 3d~7d。

摇瓶筛选:取1环新鲜斜面菌种于装有30 mL M3G培养基的300 mL三角瓶中,于30℃ 220 r/min培养3d得到发酵液。发酵液于8000 r/min离心10 min,将上清液适当稀释,用Itzhaki方法测定发酵液中 ϵ -PL含量^[5],选取 ϵ -PL产量较高的菌株。

1.2.2 形态观察 菌落形态观察:将待鉴定菌株涂布于M3G培养基的平板上,30℃培养,7d内跟踪观察菌落形态。

个体形态观察:于高氏1号培养基上30℃插片培养7d后于显微镜下观察形态特征。

1.2.3 生理生化特征实验 参照“放线菌的分类与鉴定”^[6]。

1.2.4 16S rDNA 序列相似性分析 按常规方法提取菌株总DNA。引物设计如下:F:TCGCATGATCTCCGTGTGAAAGCT, R:AGCAATGCTGATCTGCGATTACTAG,进行PCR扩增,PCR产物纯化后委托测序公司进行序列测定。将所测得的16S rDNA序列与GenBank数据库中相关种属序列进行比对,确定该菌株的分类地位。

1.2.5 聚合物的初步鉴定 利用高效液相色谱

(HPLC)通过与标准品图谱进行比较分析进行聚合物的初步鉴定。发酵液于8000 r/min离心10 min,将上清液适当稀释,过0.45 μm 微滤膜,滤液进行HPLC分析。HPLC分析条件为^[7,8]:固定相,TSK gel ODS-120T柱 4.6 mm \times 250 mm;流动相,8%乙晴溶液(用磷酸调pH2.6);流速,0.4 mL/min;柱温,25℃;检测波长,215 nm。

1.2.6 ϵ -PL 测定 Itzhaki方法^[5]。制备0.1 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH6.6),0.1 mmol/L甲基橙溶液;将1.9 mL磷酸盐缓冲溶液和2.0 mL甲基橙溶液依次加到0.1 mL发酵上清液中,混合物在30℃往复摇床上充分反应,然后离心,上清液于465 nm测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 ϵ -PL 高产菌株的筛选

亚甲基蓝是一种碱性染料。当微生物发酵产生带正电分泌物(如 ϵ -PL)时,由于静电作用, ϵ -PL等将排斥亚甲基蓝而形成独特透明圈,菌落周围蓝色较浅,示意图见图1。通过这种方法初步筛选了10株菌株。利用甲基橙能够与 ϵ -PL产生沉淀反应原理进行摇瓶复筛^[5], ϵ -PL浓度越大,沉淀越多,因此上清中颜色越浅。将初筛的10株菌株利用M3G培养基进行摇瓶发酵72 h,离心发酵液,收集上清液,利用Itzhaki方法测定上清液中 ϵ -PL含量,发现这10株菌都产生 ϵ -PL,其中1株菌产生 ϵ -PL的浓度在2 g/L以上。将这株菌作进一步的分析。

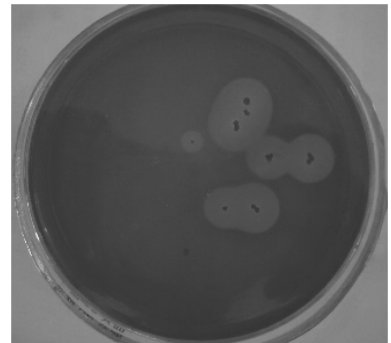


图1 亚甲基蓝平板筛选 ϵ -PL产生菌示意图

2.2 聚合物的初步鉴定

为了验证这株菌产生的碱性物质是 ϵ -PL,将它的发酵液进行HPLC分析,HPLC图谱如图2所示。通过与标准品的图谱(保留时间4.138min)比较分析,发酵液HPLC图谱中3.995min的图谱峰极可能

是 ϵ -PL。另外将发酵液通过离心、离子交换、脱色、有机溶剂沉淀、冷冻干燥等工艺,得到淡黄色粉末样品。将样品装入安瓶管中,加入 6 mol/L HCl,样品终浓度为 0.25%,密封于 100℃ 水解 24 h。水解液经薄层色谱(TLC)分析,通过茚三酮显色反应,水解液迁移率与赖氨酸迁移率一致(图略),可进一步说明样品由赖氨酸聚合而成。

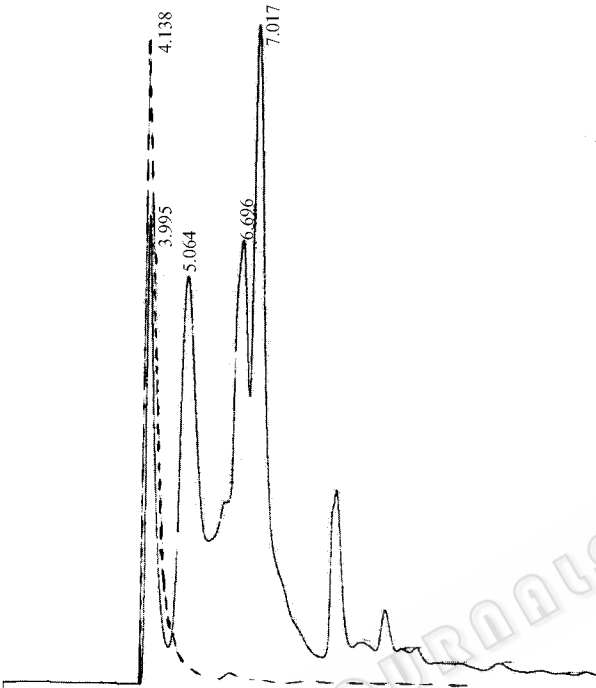


图 2 ϵ -PL 标准品和 *Streptomyces albulus* 发酵液 HPLC 图谱
--- ϵ -PL 标准品, — 发酵液

2.3 形态观察

菌落形态观察:30℃ 培养 7 d 后观察菌落正面为白色,反面为黄色。菌落干燥,不透明,表面形状褶皱,菌落与培养基连接紧密,难以挑取。在 M3G 液体培养基上摇瓶培养时,液面与瓶壁交界处粘附着一圈菌苔,其中悬浮着一些珠状菌丝团。

镜检观察:气生菌丝生长丰富,基内菌丝无横隔,不断裂,孢子丝呈波曲状或螺旋状。

2.4 生理生化特征

生理生化特征如表 1 所示。

2.5 16S rDNA 序列相似性分析

所测菌株的 16S rDNA 核苷酸序列为 1117bp。所测序列输入 GenBank,用 Blast 软件进行相似性搜索比较。筛选菌株与链霉菌属同源性很高(序列相似性在 97%~99% 之间),与多株 *Streptomyces albulus*

表 1 筛选菌株的生理生化试验

性质	描述	性质	描述	性质	描述
明胶液化	+	生长温度(/℃)	15~40	棉籽糖	-
牛奶凝固	+	最适生长温度(/℃)	30	D-甘露糖	+
牛奶胨化	+	D-葡萄糖	+	肌醇	+
淀粉水解	+	D-木糖	-	半乳糖	+
产色素	+	D-果糖	+	L-阿拉伯糖	-

注: + 生长或者利用; - 不生长或者不利用

菌株序列相似性达到 99%。结合菌株形态观察、生理生化特征分析和有关文献报道^[4],可初步判断,该菌株为白色链霉菌(*Streptomyces albulus*),命名为 *Streptomyces albulus* 213。

2.6 发酵培养基初步研究

2.6.1 不同碳源对 ϵ -PL 合成的影响:碳源是微生物生长的碳架和能量来源,是产生各种代谢产物的来源。根据工业化要求和微生物生长代谢的特点,选用葡萄糖、甘油、玉米淀粉、可溶性淀粉、甘露醇作为碳源,将上述碳源(浓度 5%)代替 M3G 培养基中的葡萄糖,研究碳源种类对 ϵ -PL 合成的影响。结果如图 3 所示。

图 3 表明,以葡萄糖为碳源时, ϵ -PL 发酵效果最好,菌体量(DCW)和 ϵ -PL 产量分别达到 1.586 g/L 和 3.846 g/L。其次分别是甘油、甘露醇、可溶性淀粉、玉米淀粉。这表明以葡萄糖为碳源的细胞初级代谢产物不会抑制 ϵ -PL 的次生合成途径以及细胞的生长。链霉菌虽然有较强的产淀粉酶能力,但淀粉无法充分满足菌体生长和产物合成的需要,因此玉米淀粉和可溶性淀粉的产物得率相对较低。

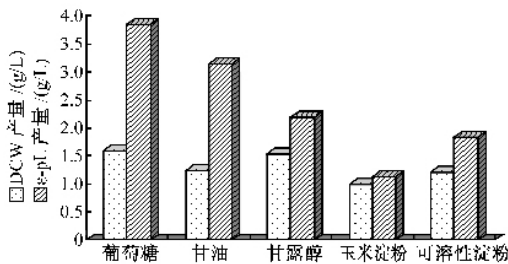


图 3 碳源对 ϵ -PL 合成的影响

2.6.2 不同氮源对 ϵ -PL 合成的影响:氮源提供细胞原生质和其它结构物质中的氮素,同时合成 ϵ -PL 等代谢产物。铵盐、尿素、玉米浆、蛋白胨、酵母粉、大豆饼粉等是常用的工业微生物发酵氮源。本实验以上述氮源分别代替 M3G 培养基中酵母粉和硫

酸铵,发酵结果如表 2 所示。

表 2 表明,有机氮源更有利于菌的生长,无机氮源更有利于 ϵ -PL 的合成。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 NH_4Cl 相比,明显提高了 ϵ -PL 产量,这说明 SO_4^{2-} 有利于 ϵ -PL 的合成,可以推测硫元素可能与 ϵ -PL 的聚合有关^[9]。当采用无机氮和有机氮复配作为氮源,生物量和 ϵ -PL 产量明显提高,其中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与酵母粉组合最好。

以上实验说明,该菌株在 M3G 培养基上 ϵ -PL 产量较高,有关该培养基的优化还将继续进行。

表 2 氮源对 ϵ -PL 合成的影响

氮源	浓度 (%)	生物量 (g/L)	ϵ -PL (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	0.423	0.894
NH_4NO_3	1.0	0.236	0.121
NH_4Cl	1.0	0.286	0.422
蛋白胨	1.0	1.024	0.062
酵母粉	1.0	1.206	0.188
玉米浆	1.0	1.020	0.042
黄豆饼粉	1.0	1.426	0.622
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 蛋白胨	1.0 + 0.5	1.538	2.828
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 酵母粉	1.0 + 0.5	1.624	3.906
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 黄豆饼粉	1.0 + 0.5	1.568	2.984

3 结论

利用亚甲基蓝平板初筛、摇瓶复筛,从土壤中

筛选了一株 ϵ -PL 高产菌株,摇瓶产量大于 2g/L,经初步鉴定该菌株为白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*)。

通过高效液相色谱和薄层色谱初步分析,筛选的菌株产生的发酵产物为聚- ϵ -赖氨酸。

对该菌株发酵生产 ϵ -PL 的培养基成分进行初步研究表明:葡萄糖是最好的碳源,酵母粉和硫酸铵是最佳的复合氮源,在优化培养基下,摇瓶产量达到 3.9 g/L。如果将培养基成分作进一步优化,预计 ϵ -PL 产量还可以进一步提高。

参考文献

[1] Shima S, Sakai H. Agric Biol Chem, 1977 **41**(9):1807 ~ 1809.

[2] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Biores Technol, 2006, **97** :1148 ~ 1159.

[3] Kido, Y, Hiramoto, S, Murao, M, et al. J Nutr, 2003, **133** :1887 ~ 1891.

[4] Nishikawa M, Ogawa K. Appl Environ Microbiol, 2002, **9**(7) :3575 ~ 3581.

[5] Itzhaki R F. Anal Biochem, 1972, **50** :569 ~ 574.

[6] 阎逊初. 放线菌的分类与鉴定. 北京:科学出版社,1992, pp. 296 ~ 1046.

[7] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. J Biosci Bioeng, 2001, **91**(2): 190 ~ 194.

[8] Shih I L, Shen M H. Process Biochem, 2006, **41** :1644 ~ 1649.

[9] Hirohara H, Takehara M, Saimura M, et al. Appl Microbiol Miotechnol, 2006, **73** :321 ~ 331.