

ε-聚赖氨酸产生菌 TUST-2 的分离鉴定

贾士儒¹, 许春英¹, 谭之磊¹, 曹伟锋¹, 欧竑宇², 贺新义², 邓子新²

(¹天津科技大学生物工程学院, 工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

(²上海交通大学生命科学与生物技术学院, 微生物代谢教育部重点实验室, 上海 200240)

摘要:【目的】ε-聚赖氨酸是一种天然氨基酸同聚物, 本研究目的为分离筛选新的 ε-聚赖氨酸产生菌。

【方法】采用一种新的分离方法从土壤中分离 ε-PL 产生菌。分离方法含 3 步: (1) 富集培养 ε-PL 耐受菌;

(2) 通过改进的 Nishikawa 方法筛选; (3) 挑选高浓度 ε-PL 耐受菌株。【结果】从海南省土样中分离获得 ε-聚

赖氨酸产生菌 TUST-2。分类和形态特征属链霉菌属。16S rDNA 序列分析比对结果表明 TUST-2 属淀粉酶

产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*)。经特征反应分析、水解物分析、红外光谱、¹H NMR、¹³C NMR

和 MALDI-TOF-MS 分析表明 TUST-2 发酵产物为 ε-聚赖氨酸。【结论】根据 16S rRNA 基因序列比对和形态

及生理生化特征表明 ε-聚赖氨酸产生菌 TUST-2 属于淀粉酶产色链霉菌, 命名为淀粉酶产色链霉菌 TUST-2。

关键词: ε-聚赖氨酸; 淀粉酶产色链霉菌; 分离鉴定

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 02-0191-06

ε-聚赖氨酸 (ε-poly-L-lysine, ε-PL) 是一种氨基酸的天然均聚物, 由 L-赖氨酸通过 α-羧基和 ε-氨基形成的酰胺键依次连接而成 (图 1)^[1-3]。ε-PL₂₅₋₃₅ 具有广谱抗菌活性, 包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌^[4] 和噬菌体^[5]。由于其安全性和生物可降解性, ε-PL 在日本、南韩以及美国被广泛应用于食品防腐剂。

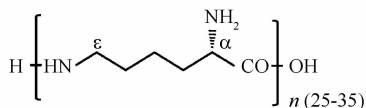


图 1 ε-PL 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of ε-PL.

能够产生 ε-PL 的菌种包括各种链霉菌和一些丝状真菌, 其中又以白色链霉菌最为重要。人们采用了许多种筛选菌种的方法, 比如测定分泌的聚合多肽中带电基团与碱性或酸性染料之间的相互作用^[6-7] 等。本文利用一种新的筛选方法从中国海南

的土样中分离得到一株新的 ε-PL 高产菌株 TUST-2。通过定性分析、水解产物分析、红外光谱、紫外光谱、¹H NMR 和 ¹³C NMR 光谱分析证实 TUST-2 菌株的发酵产物为 ε-PL。通过采用 16S rRNA 序列分析、形态学特性和生理生化特性相结合的方法, 将新的 ε-PL 产生菌 TUST-2 鉴定为淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes*)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 筛选菌株所用土样采自中国海南省。

1.1.2 主要试剂和仪器: D152 树脂 (南开大学化工厂); Sephadex G-25 (GE Healthcare); ε-PL (浙江银象生物工程有限公司); 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent); TSK 凝胶 ODS-120T 柱 (Φ4.6 mm × 250 mm TOSOH); VECTOR 22 型傅立叶变换红外光

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA10Z347); 国家“973 项目” (2007CB714305)

作者简介: 贾士儒 (1954-), 男, 天津人, 教授, 博士, 研究方向为生物工程。Tel: +86-22-60601598; E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

收稿日期: 2009-10-28; 修回日期: 2009-12-02

谱仪 (Bruker); UVPC-2401 型紫外分光光度计 (Shimadzu); 液体核磁共振谱仪 INOVA 500MHZ (Varian)。

1.2 ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选

ϵ -PL 生产菌株 TUST-2 是从中国海南采集的土壤中分离获得的。将 3 g 土壤样本加入到 30 g 含有 0.1 mg/mL - 1.0 mg/mL ϵ -PL 的 SG 富集培养基中, 28°C 下, 120 r/min 摇床培养。利用含有 0.15 g/L $K_2Cr_2O_7$ 和 0.02 g/L 次甲基蓝的 SG^[7] 平板筛选出 ϵ -PL 抗性菌株。28°C 下培养 7 d, 挑取产生较大排斥圈的菌落, 转接于含有 10 g/L ϵ -PL 的富集培养基平板上。28°C 下培养 7 d, 挑选并纯化菌株, 4°C Bennett 斜面保藏。将所得菌株进行摇瓶培养^[8]。将培养液离心后取上清液, 以酿酒酵母为指示菌, 采用管碟法测定其抑菌性能, 筛选抑菌圈直径较大的菌株。

1.3 发酵液抑菌性能的测定

分别以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、酿酒酵母、青霉菌、米根霉作为测试菌, 采用管碟法测定无细胞发酵液的抑菌性能。

1.4 发酵产物的纯化

将筛选出的菌株进行摇瓶培养后, 所得发酵液 80°C 下温浴 20 min, 然后 4°C 下 10000 × g 离心 15 min 并采用 D152 阳离子交换柱进行分离纯化^[7]。当样品液通过 D152 阳离子交换柱以后, 先用少量去离子水进行冲洗, 然后用 0.2 mol/L 醋酸洗下小分子有机物质, 再用少量水冲洗, 最后用 0.4 mol/L HCl 溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 并用活性炭进行脱色, 最后进行浓缩并冷冻干燥获得部分纯化的产品 (ϵ -PLs)。Sephadex G-25 凝胶柱进一步纯化并采用去离子水洗脱, 收集 220 nm 下的吸收峰组分并冷冻干燥获得单一样品。 ϵ -PL 浓度的测定采用 Itzhaki^[4] 方法。

1.5 发酵产物的定性分析

纯化后的产物首先进行定性分析^[1]。用 6.0 mol/L HCl 在 100°C 水解 22 h, 然后进行薄层色谱和纸色谱层析^[7,9], 并利用高效液相色谱法进行 ϵ -PL 的纯度测定。所用缓冲液为 10 mmol/L K_2HPO_4 (pH 3.4), 含 8% 乙腈的 10 mmol/L Na_2SO_4 溶液, 流速 0.4 mL/min, 柱温为 40°C, 检测波长为 215 nm。纯化的产品进一步用红外光谱、¹H NMR、¹³C NMR 以及 MALDI-TOF-MS^[3,7,10-12] 进行测定。

1.6 菌株形态特征

将菌株 TUST-2 在 Bennett 琼脂平板上 30°C 下

培养 7 d 的, 然后利用扫描电镜对其形态特性进行观察。

1.7 菌株生理生化特征

依据链霉菌鉴定手册^[13] 及伯杰氏细菌鉴定手册^[14] 测定菌株的生理生化特性。

1.8 16S rDNA 序列测定和系统发育树的构建

提取细胞总 DNA, 以总 DNA 为模板, 通过 PCR 反应扩增 16S rRNA。引物 A: 5'-CATTCACGGAGAGTTTGATCC -3', 引物 B: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC -3'。PCR 扩增条件: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 5 min。电泳检测扩增结果。用 Baygene DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 将扩增的 16S rDNA 与 pMD18-T 载体 (TAKARA) 在 16°C 连接 30 min。筛选阳性转化子, 送生物公司测序。将 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库进行相似性比较, 并用 MEGA 3.1 进行序列比对及系统发育树的构建。

2 结果

2.1 ϵ -PL 生产菌株的分离筛选

在含有 10 g/L ϵ -PL 的琼脂富集培养基平板上得到 11 株产 ϵ -聚赖氨酸菌株。摇瓶培养结果发现, 菌株 TUST-2 具有最大的抑菌圈直径 (36.2 mm)。挑取菌株 TUST-2 接种于 Bennett 培养基中, 4°C 下保藏。

2.2 菌株 TUST-2 的抑菌活性

菌株 TUST-2 的无细胞发酵液能够抑制革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、丝状真菌、酵母菌 (见表 1), 与文献^[4] 报道的 ϵ -PL 的抑菌谱相似。以未接菌培养基做空白对照。

表 1 菌株 TUST-2 的抑菌圈大小

Table 1 Range of inhibition zones of strain TUST-2

Test organisms	Inhibition zone diameter/mm	Control/mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.3 (26.1 - 28.0)	7.8
<i>Bacillus subtilis</i>	8.2 (8.0 - 8.5)	7.8
<i>Escherichia coli</i>	20.3 (19.5 - 21.6)	7.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36.2 (34.5 - 38.0)	7.8
<i>Penicillium chrysogenum</i>	23.8 (23.0 - 24.6)	7.8

2.3 菌株 TUST-2 发酵产 ϵ -PL 的鉴定

纯化后的产物配成 0.1% 的溶液, 然后加入 1 mL Dragendorff 溶液, 形成红褐色沉淀。用 pH6.8 的磷酸缓冲液溶解纯化后的 TUST-2 发酵产物, 配成 0.1% 的溶液, 取 1 mL 与 1 mL 甲基橙溶液反应, 形成红褐色沉淀。以上为 ϵ -PL 的两种特征反应, 据此初步推断菌株 TUST-2 发酵产物为 ϵ -PL。

为了进一步判断此碱性物质的结构, 分别将 TUST-2 发酵产物、 ϵ -PL 标准品及各自水解液进行薄层层析与纸层析, 结果分别见图 2 与图 3。TUST-2 发酵产物和 ϵ -PL 在该展开剂体系中不能在薄板上展开, 停留在原点; 而 TUST-2 发酵产物及 ϵ -PL 的水解液在薄板上仅形成一个斑点且 R_f 值相等。由此得出结论 TUST-2 发酵产物为赖氨酸的均聚物。

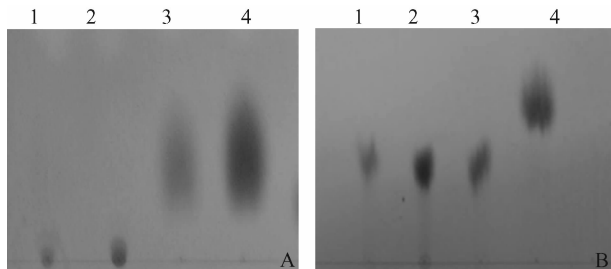


图 2 菌株 TUST-2 所产 ϵ -PL 的薄层色谱图 (A) 和纸层析色谱图 (B)

Fig. 2 Thin-layer chromatography (A) and paper chromatography (B) of ϵ -PL produced by strain TUST-2. A: 1, standard ϵ -PL; 2, ϵ -PL produced by strain TUST-2; 3, heat-treated standard ϵ -PL by 6 mol/L HCl; 4, heat-treated ϵ -PL produced by strain TUST-2 by 6 mol/L HCl. B: 1, heat-treated standard ϵ -PL by 6 mol/L HCl; 2, heat-treated ϵ -PL produced by strain TUST-2 by 6 mol/L HCl; 3, lysine; 4, alanine.

发酵产物经过离子交换柱后, 经 Sephadex G-25 凝胶柱进一步纯化。纯化的产品过 TSK 凝胶 ODS-120T 柱所得液相图谱显示其与标准 ϵ -PL 一样, 在同一保留时间显示唯一峰 (见图 3-A)。

菌株 TUST-2 发酵产物的红外光谱如下。3385 cm^{-1} 和 3144 cm^{-1} 处为 N—H 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动, 1646 cm^{-1} 处为酰胺的特征谱带 I, 1400 cm^{-1} 处为 C—N 伸缩振动 (图 3-B)。结合纸层析结果可以得出结论, TUST-2 发酵产物为 L-赖氨酸以酰胺键聚合而成的同型聚合物。

氨酸以酰胺键聚合而成的同型聚合物。

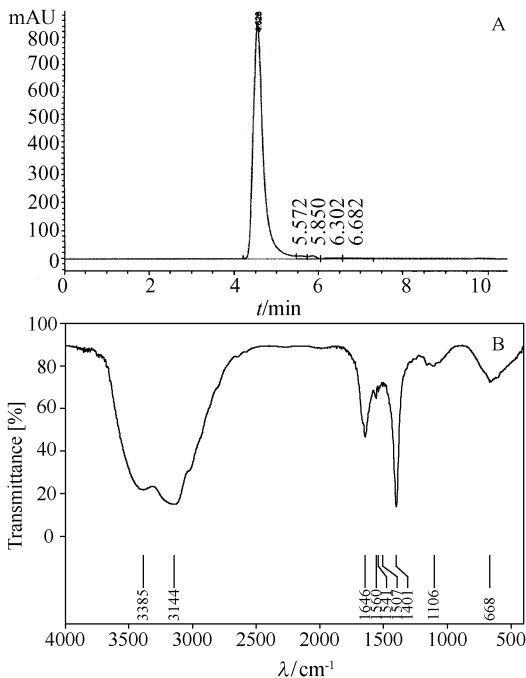


图 3 菌株 TUST-2 所产 ϵ -PL 的高效液相色谱图 (A) 和红外光谱图 (B)

Fig. 3 HPLC chromatogram (A) and infrared spectrum (B) of ϵ -PL produced by strain TUST-2.

图 4-A 为 TUST-2 发酵产物的 ^1H NMR 谱图。胺和酰胺中的 N-H 基团表现出 ^1H NMR 化学位移, 氢与重水的快速交换作用引起低场信号的消失, 此外, N—H 基团相互之间也会发生快速的质子交换作用, 由于在一个聚赖氨酸分子中有多个这样的基团, 因此 NMR 图谱会在平均化学位移上显示单一的 NH 质子峰。图谱中从左到右依次为 CH^α , CH^ϵ , CH^β , CH^δ 及 CH^γ 的质子峰, 其比约为 1:2:2:2:2。以上特征与 ϵ -PL 的 ^1H NMR 谱图相符^[10]。

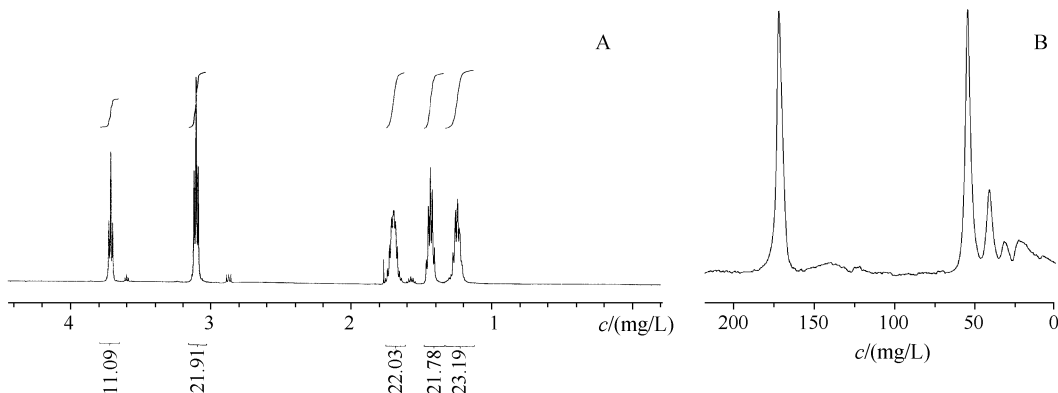


图 4 TUST-2 纯化发酵产物的 ^1H NMR 谱图 (A) 和 ^{13}C NMR 谱图 (B)

Fig. 4 ^1H NMR (A) and ^{13}C NMR (B) of the purified active compound of strain TUST-2.

TUST-2 所产 ϵ -PL 的固态 ^{13}C NMR 光谱显示在图 4B, 化学位移及其分配结果见表 2。 ϵ -PL 的主峰和 ϵ -PL/HCL 形成的峰一样^[11-12]。

表 2 固态 ^{13}C NMR 光谱中峰值的分配

Table 2 Assignment of peaks in solid ^{13}C NMR spectrum

Carbon type	Chemical shifts/(mg/L)
C α	54.6
C β	31.8
C γ	22.9
C δ	22.9
C ϵ	41.0
C ϵ -NHCO	171.1

采用 MALDI-TOF-MS 测定 ϵ -PL 相对分子质量

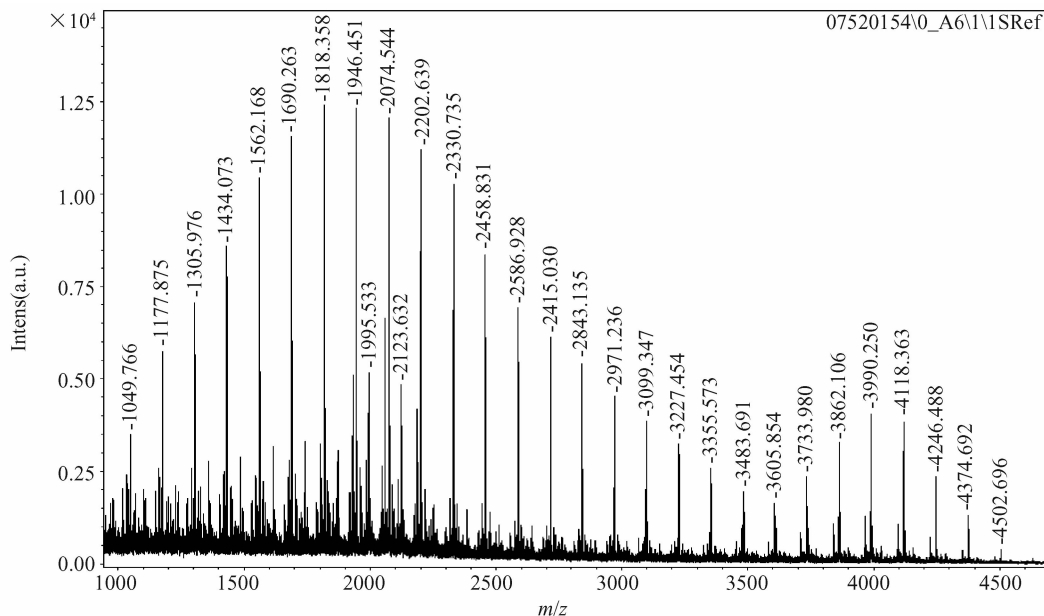


图 5 ϵ -PL 的 MALDI-TOF-MS 图谱

Fig. 5 MALDI-TOF-MS of ϵ -PL.

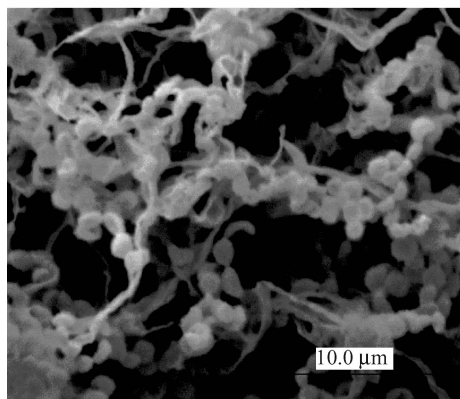


图 6 菌株 TUST-2 的孢子链形态 (10000 \times)

Fig. 6 Scanning electron micrograph showing the spore-chain morphology of strain TUST-2 (10000 \times).

的分布, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, ϵ -PL 是由赖氨酸为单体脱水缩合而成的均聚物, 其相对分子质量分布为 1049-4502, 其对应的聚合度为 8-35, 该结果与 ϵ -PL 相对分子质量理论计算公式相一致。

2.4 菌种鉴定

2.4.1 TUST-2 菌株的形态特征及生理生化特性: 菌株 TUST-2 在 8 种培养基中生长良好, 但在无机盐培养基中生长不良。表 3 为菌株 TUST-2 的培养特征。图 6 为 TUST-2 的孢子链形态, 气生菌丝由长的螺旋型的孢子链构成, 孢子为椭圆形。菌株 TSUT-2 的碳源利用如表 4 所示。

表 3 菌株 TUST-2 的培养特征

Table 3 Cultural characteristics of strain TUST-2

Agar medium	Aerial mycelium	Substrate mycelium
Czapek's	Poor, light grey	Poor, None
Glucose-asparagine	None	Ivory yellow
Glycerol-asparagine	None	Ivory yellow
Inorganic salt starch	Pearl grey	
ISP-2	Argent mouse gray	Fried rice yellow
Oatmeal	Cuttlefish grey	Black
Potato	White	None
Gause No. 1	Light grey	Soy yellow
Santon's	White	Cork yellow

No soluble pigments were produced on the listed agars.

2 菌株 16S rDNA 序列全长为 1411 bp, GenBank 登录号为 EU814698。分别用 BLASTN 和 SeqMatch 在 GenBank 和 Ribosomal Database Project II 中搜索与 TUST2 菌株 16S rDNA 相关的序列。与之相似度最高的序列来源于链霉菌。利用 MEGA 3.1 构建了含有链霉菌 19 个序列的发育树。菌株 TUST2 的发育

2.4.2 16S rDNA 序列比对和系统发育分析: TUST-

树与 *S. diastatochromogenes*, *S. griseolus*, *S. albogriseus*, *S. ahygroscopicus* 及 *S. albulus* 的序列相似(见图 7)。通过表型特征以及系统发育最终确定此菌为淀粉酶产生色链霉菌(*S. diastatochromogenes*)。

表 4 菌株 TUST-2 的单一碳源利用情况

Table 4 Growth of strain TUST-2 on sole carbon sources

Carbon source	Utilization	Carbon source	Utilization	Carbon source	Utilization
Inositol	+	ribose	+	xylose	+
mannitol	+	Sodium Gluconate	+	lactose	-
mannose	+	galactose	+	melezitose	-
salicin	+	maltose	-	arabinose	-
raffinose	-	sodium citrate	+	dextrin	+
rhamnose	-	sodium Succinate	+	Dulcitol	-
starch	-	Sodium malate	+	Erythritol	+
sorbitol	+	cellobiose	-	glycerol	+
sucrose	-	Sorbose	+	Sodium tartrate	-
D-glucose	+	Sodium propionate	+	Sodium hippurate	+
melibiose	-	sodium acetate	+	Trehalose	+
D-Fructose	+				

+, positive; -, negative.

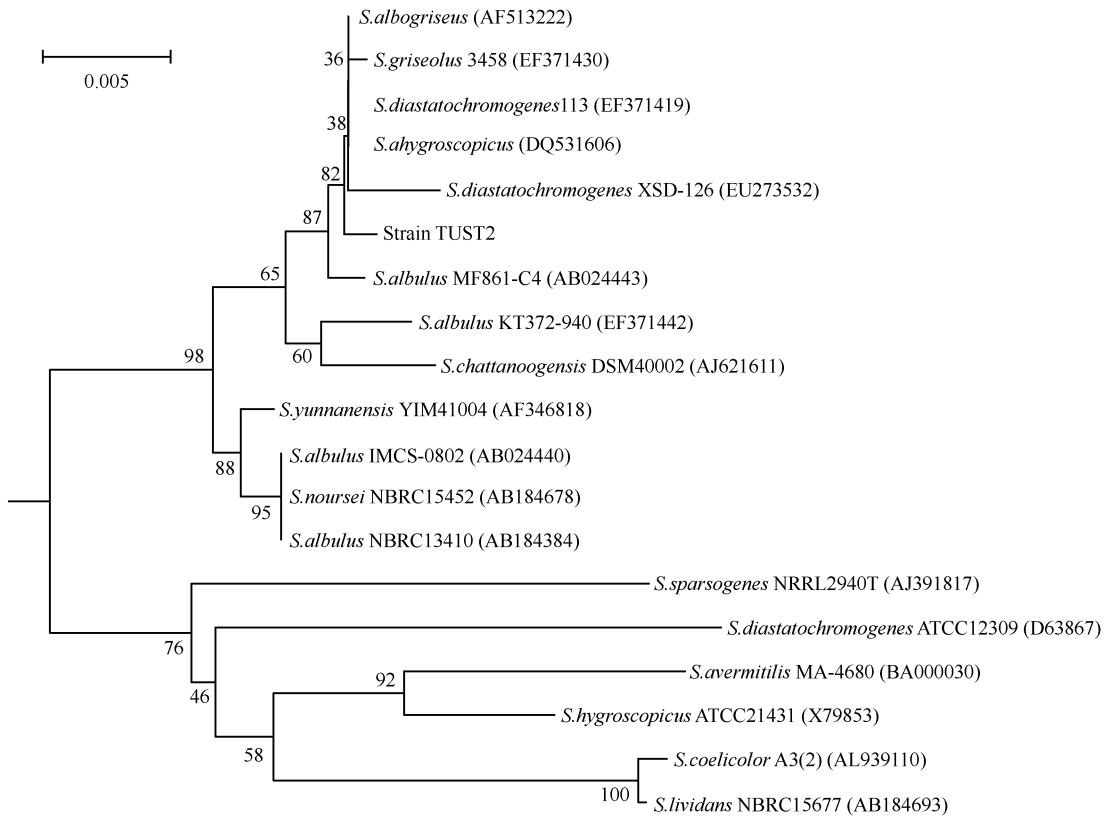


图 7 菌株 TUST2 的系统发育树状图

Fig. 7 Phylogenetic relationship of strain TUST2.

3 讨论

ϵ -PL 产生菌均能够耐受一定浓度的 ϵ -PL, 而 ϵ -PL 又是一种广谱生物防腐剂, 因此首先用含有 ϵ -PL 的培养基进行富集, 再利用含有 0.02 g/L 次甲基蓝的 SG 平板进行筛选可有效提高筛选效率。通过形态学、生理学特性以及 16S rDNA 序列结果综合考虑, 确定菌株 TUST-2 为淀粉酶产生色链霉菌。通过定性分析、水解产物分析、红外光谱、¹H NMR

和 ¹³C NMR 光谱分析确定 TUST-2 的发酵产物为 ϵ -PL。经对 TUST-2 高产突变株发酵条件进行优化, 5 L 发酵罐产量达到 32 g/L (数据未列出), 表明该菌株具有很好的生产应用前景。

参考文献

[1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41: 1807-1809.

- [2] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. II. Taxonomy and fermentation studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45: 2497-2502.
- [3] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. III. Chemical studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 2503-2508.
- [4] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, et al. Antimicrobial action of ϵ -Poly-L-Lysine. *The Journal of Antibiotics (tokyo)*, 1984, 37: 1449-1455.
- [5] Shima S, Matsuoka H, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -Poly-L-Lysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46: 1917-1919.
- [6] 朱宏阳, 徐虹, 陈玮玮, 等. ϵ -聚赖氨酸生产菌株的筛选和鉴定. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2005, 32 (5):127-130.
- [7] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial epsilon-poly -L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3575-3581.
- [8] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement ϵ -Polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2001, 91(2): 190-194.
- [9] 裴炎, 李先碧, 彭红卫, 等. 抗真菌多肽 APS-1 的分离纯化与特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1999, 39(4):344-349.
- [10] Hirohara H, Takehara M, Saimura M, et al. Biosynthesis of poly (ϵ -L-lysine) s in two newly isolated strains of *Streptomyces. sp. Biotechnological Products and Process Engineering*, 2006, 73:321-331.
- [11] Maeda S, Mori T, Sasaki C, et al. Structural investigation of microbial poly (ϵ -L-lysine) derivatives with azo dyes by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR. *Polymer Bulletin*, 2005, 53: 259 - 267.
- [12] Maeda S, Kunimoto K, Sasaki C, et al. Characterization of microbial poly (ϵ -L-lysine) by FT-IR, Raman and solid state ^{13}C NMR spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 2003, 655: 149 - 155.
- [13] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京, 科学出版社, 1975.
- [14] Buchanan R, Gibbons N. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

Isolation and characterization of a new ϵ -poly-L-lysine-producing strain TUST-2

Shiru Jia^{1*}, Chunying Xu¹, Zhilei Tan¹, Weifeng Cao¹, Hongyu Ou², Xinyi He², Zixin Deng²

(¹ School of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

(² School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Key Laboratory of Microbial Metabolism of Ministry of Education, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] ϵ -Poly-L-Lysine (ϵ -PL) is a natural amino acid homopolymer. The study aimed at isolating new ϵ -PL-producing strains. [Methods] ϵ -PL-producing strains were screened from the soil by using a new isolation approach which had three steps, (1) enrichment culturing ϵ -PL tolerating strains; (2) screening by improved Nishikawa's method; (3) selection of strains with higher ϵ -PL tolerant ability. [Results] A new ϵ -PL-producing strain TUST-2 was isolated from the soil collected from Hainan province, China. Chemotaxonomic and morphological characteristics of the isolate were typical of strain of the genus *Streptomyces*. The strain TUST-2 was found to belong to *Streptomyces diastatochromogenes* by comparative 16S rRNA gene sequence analysis. The purified fermentation product of the strain TUST-2 was confirmed as ϵ -PL by characteristic analysis, hydrolysate analysis, infrared spectrum, ^1H NMR Spectrum, ^{13}C NMR Spectrum, and MALDI-TOF-MS. [Conclusion] On the basis of 16S rRNA gene sequence analysis and its morphological and physiological characteristics, ϵ -PL-producing strain TUST-2 is a new isolate of *Streptomyces diastatochromogenes*, named as *Streptomyces diastatochromogenes* TUST-2.

Keywords: ϵ -Poly-L-Lysine; *Streptomyces diastatochromogenes*; Isolation and Characterization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (2006AA10Z3471) and the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ("973" program) (2007CB714305)

* Corresponding author. Tel : +86-22-60601598 ; Fax : +86-22-60602298 ; E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

Received: 28 October 2009/Revised: 2 December 2009