

乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 的表达对乳链菌肽产量的影响

胡红梅^{1,2}, 蒋立科¹, 林宇恒², 还连栋², 钟瑾^{2*}

(¹ 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

(² 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要:【目的】通过基因工程手段增加乳链菌肽(nisin)自身免疫基因 *nisI* 在 *nisin* 产生菌 *Lactococcus lactis* NZ9800/pHJ201 中的表达水平, 增强该菌对 *nisin* 的抗性, 从而达到提高 *nisin* 产量的目的。【方法】将带有强组成型启动子 P59 的免疫基因 *nisI* 克隆到 *nisin* 表达质粒 pHJ201 上, 将重组质粒引入 *L. lactis* NZ9800 中, 使 *nisI* 基因过量表达, 得到重组菌株 *L. lactis* NZ9800/pHMI, 并比较该重组菌株与对照菌株 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 的生长曲线、对 *nisin* 的抗性水平、抑菌活性及 *nisin* 产量的差异。【结果】*nisI* 的表达对重组菌的生长速度没有明显的影响, 却能促使重组菌株对 *nisin* 的抗性水平提高 25%、在发酵 6h 和 8h 时, *nisin* 的产量分别提高 32% 和 25%。【结论】增加乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 的表达可以提高产生菌对 *nisin* 的抗性, 从而提高乳链菌肽产量。

关键词: 乳链菌肽; 免疫基因 *nisI*; 抑菌活性; 抗性水平

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1341-06

乳链菌肽(nisin)是由乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)的某些菌株产生的一种阳离子抗菌肽, 对很多能够引起食品腐败和致病性的革兰氏阳性菌具有强烈抑制作用, 而且对人体安全无毒, 目前已被全世界 50 多个国家和地区广泛用作高效天然食品防腐剂^[1]。同时, *nisin* 在医药和轻工业等领域也极具应用潜力。

Nisin 分子由 34 个氨基酸组成, 分子量约为 3510 Da。活性 *nisin* 的产生需要其生物合成基因簇中所有基因的共同作用, 其中包含结构基因(*nisA/nisZ*)、成熟基因(*nisBTCP*)、免疫基因(*nisI*, *nisFEG*)及调控基因(*nisRK*)等。*Nisin* 产生菌为防止受自身产生 *nisin* 的自伤作用, 需要依赖自身的免疫系统, 即 *nisI* 基因编码的脂蛋白 NisI 和 *nisFEG* 基因编码的 ABC(ATP binding cassette)转运蛋白复合体 NisF₂EG。翻译后的 NisI 前体包含 245 个氨基酸

残基, 其 N-端存在一段保守的脂蛋白信号序列, 这段序列在蛋白的转运过程中被切除。有实验证据表明, NisI 定位于细胞膜外表面或被分泌到细胞外, 其 C-末端的结构域能够与 *nisin* 结合从而形成不稳定的不稳定复合物。因此, NisI 的功能是作为 *nisin* 的“截击”分子, 阻止 *nisin* 与靶细胞膜的结合, 从而形成自我保护的第一道防线^[2-3]。除此之外, NisF₂EG 所形成的 ABC 转运复合体, 能够把已经结合到细胞膜上的 *nisin* 转运到细胞外, 防止由于 *nisin* 浓度过高而形成孔洞, 因此在免疫机制中也发挥着重要的作用^[2]。

随着乳链菌肽的应用范围不断扩大, 提高其产量势在必行。然而传统的菌种诱变筛选、发酵工艺改良等手段虽能在一定程度上提高其产量, 但存在过程繁琐、工作量大且成功率低等不足。相比之下, 运用基因工程对乳酸菌进行遗传改造有着潜在的应

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10Z319); 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-YW-G-016)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

作者简介: 胡红梅(1983–), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生, 主要从事乳酸菌分子遗传学研究。E-mail: huhongmei169@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-14; **修回日期:** 2010-05-27

用优势。目前通过基因工程手段提高乳链菌肽产量的成功的例子还并不多。例如:Wu 等人利用 Mu 转座复合体突变技术筛选出影响 nisin 产量的 12 个突变体,但并没有能提高产量,反而其中的 3 个突变体 nisin 产量显著降低^[4];Cheigh CI 等尝试通过增加 nisin 生物合成中的结构基因 *nisZ*、调控基因 *nisRK* 以及免疫基因 *nisFEG* 的拷贝数的方法来提高 nisin 产量,结果发现 *nisZ* 拷贝数的增加达到没有预期效果,而 *nisRK* 及 *nisFEG* 拷贝数的增加虽在一定程度上提高了产量,但却影响了菌体的生长速度^[5];Kim 等将参与乳链菌肽调控及免疫的 5 个基因 *nisR*、*nisK*、*nisF*、*nisE* 和 *nisG* 构建在一个载体上,通过基因工程导入乳链菌肽产生菌中,发现转化后的乳酸菌生长速度加快且产生的 nisin 比对照明显增多^[6]。虽然增加免疫基因 *nisFEG* 的拷贝数能够提高 nisin 产量、导入 *nisI* 基因能提高非 nisin 产生菌对 nisin 的抗性水平^[2],但到目前为止对于利用 *nisI* 直接提高产生菌的 nisin 产量的研究还未有报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *Escherichia coli* JM109、*Micrococcus flavus* NCIB 8166、pUC18-P59、pHJ201^[7] 由本实验室保存,*Lactococcus lactis* NZ9800 购自荷兰乳品研究所。

1.1.2 培养基: *L. lactis*:GM17 培养基,30℃ 静置培养^[8]; *E. coli*:LB 培养基,37℃ 震荡培养^[9]; *M. flavus* NCIB 8166:S1 培养基,30℃ 静置培养^[10]。

1.1.3 工具酶和化学试剂:限制性内切酶、Taq 酶购自 TaKaRa 生物工程公司,碱性磷酸酶购自 NEB 公司,Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 OMEGA 公司。

1.2 DNA 操作

1.2.1 质粒 DNA 纯化:按 OMEGA 公司的说明书进行。DNA 酶切和连接反应条件按厂商产品说明书进行。乳酸菌质粒提取所用方法参照文献^[11],大肠杆菌质粒的提取采用碱裂解法^[12]。

1.2.2 感受态细胞制备:*E. coli* 感受态细胞的制备及转化采用 CaCl_2 介导的方法^[12],乳酸菌感受态细胞制备和电击转化参照文献^[13]。

1.2.3 乳链菌肽免疫基因 *nisI* 的克隆:根据 *nisI* 基因序列,设计如下两条引物:5' 引物 (P1): 5'-CCGAGCTCATGAGAAGATATTTAATAC-3'; 3' 引物 (P2): 5'-ACGCGTCGACCCGTTTCCTACCTTCG

TTGC-3',由三博远志生物工程公司合成。PCR 扩增用 *L. lactis* NZ9800 总 DNA 为模板。反应条件:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环。

1.2.4 pHMI 重组质粒的构建:PCR 产物利用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Sal* I 进行双酶切,纯化酶切产物,用 T4 DNA 连接酶将酶切片段与 pUC18-P59 进行连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,过夜培养后在含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上挑取重组子,提取质粒 DNA,经电泳和酶切鉴定,并测定重组质粒中 PCR 扩增片段的 DNA 序列,重组质粒命名为 pUC18-*nisI*。

根据 P59 启动子序列设计引物 (P3) 5'-CGGAATTCTAACCAAAGAAGCGCGTAATATC-3',根据 *nisI* 的下游序列设计引物 (P4): 5'-CGGAATTCCCGTTTCCTACCTTCGTTGC-3',PCR 扩增出两端含 *Eco*RI 酶切位点的 P59-*nisI* 片段,载体 pHJ201 经 *Eco*RI 酶切并用碱性磷酸酶进行脱磷处理(脱磷方法按照说明书进行)。与外源片段 P59-*nisI* 连接后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,用含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 红霉素的 LB 抗性平板筛选阳性转化子,提取转化子中的重组质粒,经测序和酶切鉴定正确后证明载体构建成功,重组质粒命名为 pHMI。质粒 pHJ201 和 pHMI 利用电击的方法转入 *L. lactis* NZ9800 感受态细胞,得到重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 和 *L. lactis* NZ9800/pHMI。

1.3 重组菌及对照菌株生长曲线的测定

具体方法按照参考文献^[14-15]进行,对 *L. lactis* NZ9800/pHJ201, *L. lactis* NZ9800/pHMI 和 *L. lactis* NZ9800 的生长曲线进行测定,实验重复 3 次。

1.4 重组菌与对照菌对 nisin 的抗性水平测定

具体方法按照参考文献^[14-15]进行,对 *L. lactis* NZ9800/pHJ201, *L. lactis* NZ9800/pHMI 和 *L. lactis* NZ9800 对 nisin 的抗性水平进行测定,实验重复 3 次。

1.5 重组菌与对照菌发酵上清液抑菌活性的定量测定

参考文献^[4]。以 nisin 标准品作为对照,用 0.02 mol/L 的盐酸溶解 nisin 标准品,做 *L. lactis* NZ9800/pHMI 和 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 对指示菌 *M. flavus* NCIB8166 的抑菌活性实验,采用琼脂扩散法测定,检测其抑菌圈直径,根据直径大小作标准曲线,再根据标准曲线公式计算出待测样品的活性;同时 *L. lactis* NZ9800 也设为对照,实验重复 3

次,结果取平均值。

2 结果和分析

2.1 表达 *nisI* 的重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHMI 的构建

2.1.1 pHMI 表达载体的构建:*L. lactis* NZ9800 是将 nisin 产生菌 *L. lactis* NZ9700 中 nisin 生物合成基因簇中结构基因 *nisA* 进行缺失突变得到的突变菌株。其本身不产 nisin,但含有 nisin 生物合成基因簇

中其它基因^[16],因此通过转入含完整 *nisZ* 基因的互补质粒 pHJ201^[7](图 1)便可获得能够产生 nisinZ 的工程菌株 *L. lactis* NZ9800/pHJ201。pHMI 是以 pHJ201 为骨架,插入了 *P59-nisI* 片段而形成的 *nisI/nisZ* 共表达载体(图 1)。得到的阳性转化子经 PCR 和酶切鉴定,分别得到 735 bp 和 920 bp 的目的片段(图 2)。最后经过测序表明重组质粒 pHMI 已构建成功。

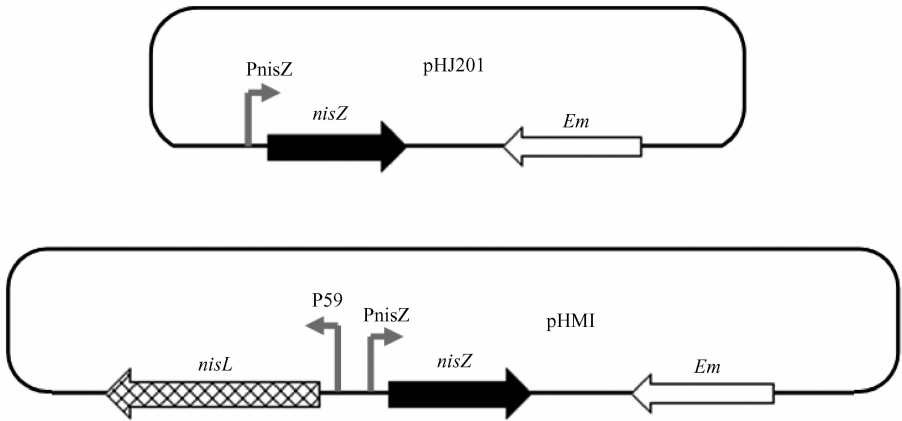


图 1 质粒 pHJ201 及 pHMI 示意图

Fig. 1 Schematic representation for construction of pHJ201 and pHMI PnisZ: nisz induced promoter. nisz: nisin structure gene; Em:erythromycin resistance gene; nisI: nisin immunity gene; P59:a strong constitutive promoter.

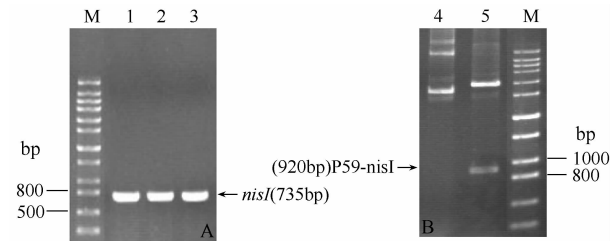


图 2 重组质粒 pHMI 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pHMI. A: colony PCR; B: digestion of the plasmid by endonuclease. 1, 2, 3 pHMI transformants; 4, pHMI; 5, pHMI restricted by *EcoRI*.

2.1.2 重组菌的构建:将质粒 pHMI、对照质粒 pHJ201 电击转化乳酸乳球菌 *L. lactis* NZ9800 感受态细胞,得到的阳性转化子分别命名为 *L. lactis* NZ9800/pHMI、*L. lactis* NZ9800/pHJ201。

2.2 重组菌与对照菌生长曲线的比较

为了解 *nisI* 基因的过表达对于宿主菌的生长是否造成影响,将过夜培养的 *L. lactis* NZ9800/pHMI、*L. lactis* NZ9800/pHJ201 和 *L. lactis* NZ9800 分别以 1:100 的比例转接至新鲜的 GM17 培养基中,从发酵 4h 后开始取培养液原液测定 OD_{630} (图 3)。实验结果表明,重组菌在发酵 14 h 内,不含质粒的 *L. lactis* NZ9800 的生长速度快于含有质粒的转化子 *L.*

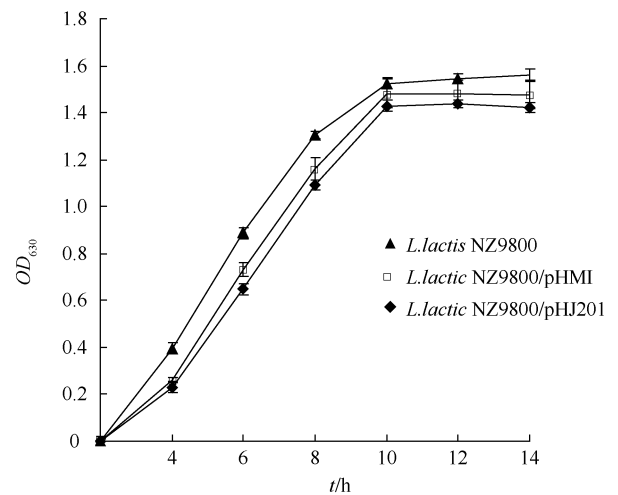


图 3 *L. lactis* NZ9800/pHJ201、*L. lactis* NZ9800/pHMI 和 *L. lactis* NZ9800 的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *L. lactis* NZ9800/pHJ201, *L. lactis* NZ9800/pHMI and *L. lactis* NZ9800.

lactis NZ9800/pHJ201 和 *L. lactis* NZ9800/pHMI,这一结果符合已有的报道^[6],其原因可能是由于质粒的引入和外源基因的表达增加了细胞的负担,从而导致生长速度稍有减慢。然而与 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 相比,然而与 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 相

比,*L. lactis* NZ9800/pHMI 的生长速度并没有很明显的差异,说明 *nisI* 基因的导入对重组菌生长基本上没有影响。

2.3 重组菌与对照菌对 nisin 抗性水平的比较

为了解 *nisI* 基因的过表达是否能提高宿主菌对 nisin 的抗性水平,在培养基 GM17 中加入 nisin 使其浓度分别达到 50、100、150、200、250、1000、1500、1800、2000、2200、2500、2800 IU/mL,测定重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHMI 和对照菌株 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 在 12 h 后的 OD 值,如 OD 值小于 0.2,则认为该浓度的 nisin 对菌的生长有很强烈的抑制作用^[15]。实验结果表明,*L. lactis* NZ9800 本身最高只能抗 250 IU/mL 的 nisin,而 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 能耐受 2000 IU/mL 的 nisin。而对 *L. lactis* NZ9800/pHMI 而言,对 nisin 的最高耐受能力可以达到 2500 IU/mL,与对照 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 相比提高了 25%,说明 *nisI* 基因的导入能有效地提高宿主菌对 nisin 的抗性水平。图 4 是 *L. lactis*

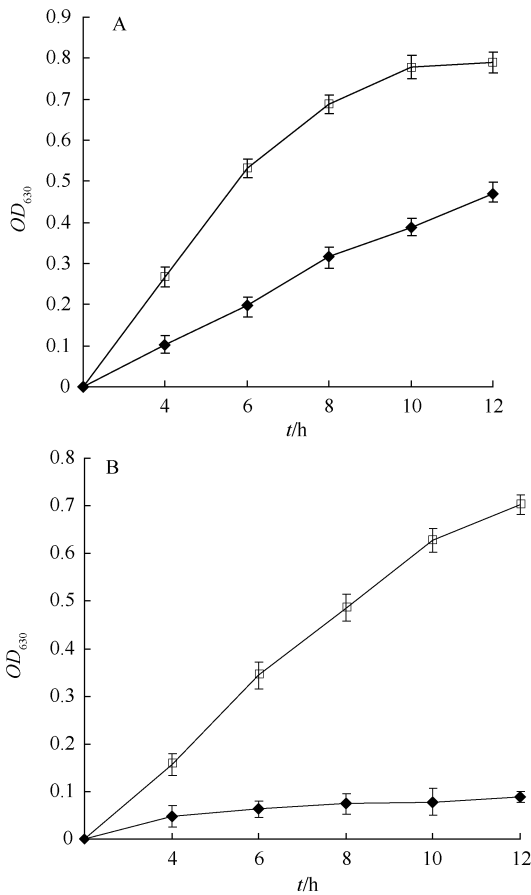


图 4 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 和 *L. lactis* NZ9800/pHMI 对 nisin 的抗性水平比较

Fig. 4 Nisin resistance of *L. lactis* NZ9800/pHJ201 and *L. lactis* NZ9800/pHMI. A: 2000 IU/mL nisin; B: 2500 IU/mL nisin.

NZ9800/pHM 和 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 在最高能耐受 nisin 浓度下的生长曲线。

2.4 重组菌与对照菌发酵液上清抑菌活性及产量的比较

为了解 *nisI* 基因的过表达是否最终能提高宿主菌 nisin 产量,将过夜发酵后的 *L. lactis* NZ9800/pHMI、*L. lactis* NZ9800/pHJ201 和 *L. lactis* NZ9800 培养液以 1:100 的比例转接至新鲜的培养基中,发酵 4 h 后开始取样,每隔 1 h 取一次样,共取 5 次,以 nisin 标准品作对照,测定发酵液上清的抑菌活性(表 1)。实验结果表明(图 5),对照 *L. lactis* NZ9800 的发酵液上清对指示菌 *M. flavus* NCIB8166 没有抑菌活性,而重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHMI、*L. lactis* NZ9800/pHJ201 的上清均有抑菌活性。在发酵 6 - 8 h 时,*L. lactis* NZ9800/pHMI 和 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 的抑菌活性大幅增加,原因是其正处菌体生长对数期,此阶段菌体产生大量的 nisin,因而抑菌活性也明显随时间的改变而增强,而且重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHMI 在发酵 6 h 和 8 h 时,对 *M. flavus* NCIB8166 的抑菌活性与对照 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 相比,分别增加了 32% 和 25%。不过到发酵后期,重组菌与对照相比,nisin 产量差异回归不显著。表 1 列出了重组菌发酵 4 - 12 h 后发酵液上清的 nisin 产量的数据,图 4 则显示了发酵 8 h 时各菌株发酵液上清抑菌活性的比较。结果显示,导入免疫基因 *nisI* 后的确能提高发酵液的抑菌活性,增加 nisin 的产量,从而提高生产效率。

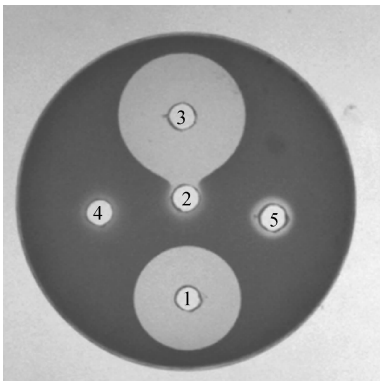


图 5 培养 8 h 后的发酵液上清对黄色微球菌 NCIB8166 的抑菌活性

Fig. 5 Antibacterial activity of supernatants against *M. flavus* NCIB8166 after fermentation for 8h. 1. *L. lactis* NZ9800/pHJ201; 2. *L. lactis* NZ9800; 3. *L. lactis* NZ9800/pHMI; 4. GM17 + 5 µg/mL Em; erythromycin; 5. 5 µg/mL Em; erythromycin.

表 1 *L. lactis* NZ9800/pHMI 与 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 nisin 产量比较

Table 1 Comparison of nisin production of <i>L. lactis</i> NZ9800/pHMI and <i>L. lactis</i> NZ9800/pHJ201			
<i>t</i> /h	Nisin production (IU/mL)		Rate of rise/%
	<i>L. lactis</i> NZ9800/pHMI	<i>L. lactis</i> NZ9800/pHJ201	
4	46.33 ± 0.24	43.33 ± 1.80	7
6	127.11 ± 1.57	96.62 ± 1.30	32
8	379.63 ± 0.92	303.03 ± 2.2	25
10	385.67 ± 1.25	381.15 ± 4.90	1
12	353.54 ± 3.10	336.54 ± 3.20	5

3 讨论

本研究通过增加乳链菌肽自身免疫基因 *nisI* 在乳酸菌中的表达提高了 nisin 的产量。尽管可能由于随着产生菌产生 nisin 量的增加,导致菌体细胞膜表面的 NisI 结合 nisin 的能力达到饱和而造成发酵后期重组菌与对照菌发酵水平的差异回归不显著,但从总体上看,重组菌的 nisin 产量在菌体生长的对数期就得以提高并基本达到最大值,可缩短发酵周期,提高生产效率。比较重组菌与对照菌对 nisin 的抗性水平时发现,对照菌 *L. lactis* NZ9800 本身最高只能抗 250 IU/mL 的 nisin,而 *L. lactis* NZ9800/pHJ201 却能耐受 2000 IU/mL 的 nisin,可能的解释是在 *L. lactis* NZ9800 中,与免疫密切相关的 ABC 转运蛋白复合体 NisF₂EG 的产生需要 nisin 的诱导^[17],因为 *L. lactis* NZ9800 自身不产生 nisin,所以细胞中 NisF₂EG 的表达水平很低,细胞的免疫系统瞬时无法承受过高浓度的 nisin,因此只具有相对较低的抗性水平。重组菌 *L. lactis* NZ9800/pHMI 能耐受更高水平(2500 IU/mL)的 nisin,应该是通过 NisI 的过表达,增加了 NisI 与 nisin 分子在产生菌细胞表面的结合,从而有效地降低细胞外表面的 nisin 浓度而提高宿主抗 nisin 的上限水平^[14],进而也在一定程度上增加了 nisin 产量。

由于 *L. lactis* NZ9800 中本身含有 *nisI* 基因,因此对外源引入的 NisI 蛋白表达的检测成了一个难点。本研究曾尝试在引入的 NisI 蛋白的 C 末端加入 His6 标签,希望利用 His 标签纯化 NisI 蛋白来检测其表达。然而实验结果发现 C 端 His 标签的引入使得重组菌发酵产物的抗菌活性大幅降低,可能的原因是由于 C 端是 NisI 的活性中心,外源片段的加入会导致产生菌自我保护能力的下降。而 NisI 的 N 端是一个 19 个氨基酸的信号肽,在转运的过程中被切除,这使得在 N 端引入 His 标签同样不可行。因此,在 nisin 产生菌中检测外源 NisI 蛋白的表达目前

是通过检测其抗性水平来解决的。

近年来,随着回归大自然的呼声日益高涨,用高效、无毒的天然防腐剂取代传统的化学合成防腐剂是保障人类健康的迫切需要,也是世界潮流发展的大势所趋。为能更好地推动乳链菌肽的广泛应用,如何进一步提高乳链菌肽产生菌的发酵效价、提高乳链菌肽产量、降低生产成本等方法措施成为乳链菌肽研究者和生产者面临的重要课题。而本研究通过增加免疫基因的表达而增强产生菌对 nisin 抗性进而提高 nisin 产量,为通过基因工程手段提高乳链菌肽产量提供了新的途径。

参考文献

[1] Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(3): 455-476.

[2] Stein T, Heinzmann S, Solovieva I, Entian KD. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(1): 89-94.

[3] Takala TM, Koponen O, Qiao MQ, Saris PEJ. Lipid-free NisI: interaction with nisin and contribution to nisin immunity via secretion. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237(1): 171-177.

[4] Wu Z, Xuanyuan Z, Li R, Jiang D, Li C, Xu H, Bai Y, Zhang X, Turakainen H, Saris PEJ, Savilahti H, Qiao M. Mu transposition complex mutagenesis in *Lactococcus lactis*- identification of genes affecting nisin production. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(1): 41-48.

[5] Cheigh CI, Park H, Choi HJ, Pyun YR. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(3): 155-160.

[6] Kim WS, Hall RJ, Dunn NW. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(4): 429-433.

[7] 陈秀珠, 胡海菁, 杨巍, 还连栋. 乳链菌肽前体基因(*nisZ*) 在乳酸乳球菌中的克隆和表达. 遗传学报(*Journal of Genetics and Genomics*), 2001, 28(3): 285-290.

[8] Van Den Hooven HW, Doeland CC, Van De Kamp M, Konings RN, Hilbers CW, Van De Ven FJ. Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the

- presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235 (1-2): 382-393.
- [9] 还连栋, 陈秀珠, 才迎. 乳链菌肽产生菌的定向筛选及发酵产物的鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1997, 37(4): 292-300.
- [10] 陈秀珠 何松. 乳链菌肽高产菌株 AL2 的发酵条件研究. *微生物学通报 (Microbiology China)*, 1995, 22 (4): 215-218.
- [11] O'Sullivan D J, Klaenhammer TR. Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(8): 2730-2733.
- [12] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Wells JM, Wilson PW, Le Page RW. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *The Journal of applied bacteriology*, 1993, 74 (6): 629-636.
- [14] Takala TM, Saris PE. C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 12): 3543-3549.
- [15] Lubelski J, Khusainov R, Kuipers OP. Directionality and coordination of dehydration and ring formation during biosynthesis of the lantibiotic nisin. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(38): 25962-25972.
- [16] Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, De Vos WM. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216(1): 281-291.
- [17] Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, Hammelmann M, Entian KD. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 814-825.

Enhanced nisin production by overexpression of nisin immunity gene *nisI* in the nisin-producing strain

Hongmei Hu^{1, 2}, Like Jiang¹, Yuheng Lin², Liandong Huan², Jin Zhong^{2*}

(¹ College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] Our aim was to enhance nisin production by overexpression of nisin immunity gene *nisI* in nisin-producing strains. [**Methods**] Nisin immunity gene *nisI* with a strong promoter P59 was cloned into vector pHJ201 and introduced into *Lactococcus lactis* NZ9800, resulting in a recombinant strain *L. lactis* NZ9800/pHMI. Then the differences between the recombinant strain and the control strain *L. lactis* NZ9800/pHJ201 were analyzed in several aspects, including their growth curves, nisin resistance level and antibacterial activity against indicator strain *Micrococcus flavus* NCIB 8166. [**Results**] The overexpression of *nisI* had no significant difference in growth rate between recombinant strain and contrast strain. However, it promoted recombinant strain tolerance 25% higher nisin resistance level and stronger antibacterial activity against *M. flavus* NCIB 8166, which was increased by 32% and 25% when fermented for 6 and 8 hours, respectively. [**Conclusion**] These results indicated that overexpression of *nisI* gene in the nisin producing strain can effectively enhance nisin resistance level and thus improve nisin production.

Keywords: Nisin; Immunity gene *nisI*; Antimicrobial activity; Nisin resistance level

(本文责编: 张晓丽)