

ϵ -聚赖氨酸生物合成及其产生菌遗传转化研究进展

吴清平¹, 刘盛荣^{1,2}, 张菊梅¹

¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

²华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

摘要: ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)是由 25-35 个 L-赖氨酸(L-lysine)通过 α - ϵ 酰胺键连接的具有很强抗菌活性的聚合物,是自然界中迄今为止仅发现的 2 种均聚氨基酸(ϵ -聚赖氨酸和 γ -聚谷氨酸)之一。目前,研究发现 ϵ -聚赖氨酸的合成酶是一种非核糖体肽合成酶,它催化前体物质 L-lysine 经多轮缩合反应合成链长不均一的 ϵ -聚赖氨酸,与 I 型聚酮合成酶的合成过程相似。 ϵ -聚赖氨酸的合成不受降解酶控制。同时,针对产生菌遗传转化的穿梭质粒载体 pLAE001 和 pLAE003 已构建成功,为进一步探索 ϵ -聚赖氨酸生物合成提供了条件。本文主要就 ϵ -聚赖氨酸生物合成及产生菌遗传转化体系进行综述。另外,扼要介绍了作者所在课题组的相关研究工作、取得的进展并提出了相应的见解,论文最后部分对组合生物合成在 ϵ -PL 产生菌菌种改造中的应用前景进行了探讨。

关键词: ϵ -聚赖氨酸, 生物合成, 遗传转化体系, 组合生物合成

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0718-07

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)最初在放线菌发酵液被发现并鉴定^[1],由 L-赖氨酸(L-lysine)分子间的 α -羧基与 ϵ -氨基缩合而成,这种不同于天然蛋白氨基酸残基间 α - α 酰胺键的 α - ϵ 酰胺键赋予了其独特的特性,如相对 α -聚赖氨酸(α -PL, $n = 50$)更强的抗菌活性和稳定性^[2-3]。 ϵ -PL 通常由 25-35 个赖氨酸残基组成,分子量 3500-4500。迄今为止,自然界中仅发现 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)和 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)两种同型聚氨基酸,前者仅含有 L-构型赖氨酸,而后者同时含有 L-型和 D-型谷氨酸^[4]。

ϵ -PL 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌、霉菌等具有较好的抑菌效果,对耐热芽孢杆菌和一

些病毒也有抑制作用^[2,5],还具有安全性和可生物降解等优点^[6],因此已被用于食品防腐保鲜,此外 ϵ -PL 作为食品防腐剂对预防肥胖也能起一定作用^[7],同时又是药物载体、基因转移载体、吸水材料以及生物芯片包被剂等^[8]。目前,日本通过发酵白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)变异株,实现了 ϵ -PL 的工业化生产并进入商业市场。

最新报道显示, ϵ -PL 的研究在降解酶^[9-13]、固定化细胞发酵^[14]、降低 ϵ -PL 分子大小^[15]等方面受到重视,其中 ϵ -PL 生物合成的研究尤引人关注,如 ϵ -PL 聚合度的控制机制和 α - ϵ 键的形成机制等。而遗传转化体系的构建是 ϵ -PL 生物合成研究和高产菌株构建等的必要手段。本文主要就 ϵ -PL 生物

基金项目: 省部产学研项目(2009B090300300,2008A010900003); 粤港关键领域重点突破项目(2007A020902003); 广东省科技计划项目(2009B011300004)

作者简介: 吴清平(1962-),男,广东梅州人,博士,研究员,主要从事食品安全监测和控制研究。Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-10-17; **修回日期:** 2010-12-24

合成及其产生菌遗传转化的研究进展进行综述,并对组合生物合成在 ϵ -PL 产生菌改造中的前景及意义进行了初步的探讨。

1 ϵ -PL 产生菌的多样性

自 1977 年 Shima 等^[1]在筛选有价值代谢物时

偶然发现 ϵ -PL 产生菌以来,新菌株分离进展缓慢。2002 年 Nishikawa 等^[16]将酸性染料 Poly-R-478 应用于产生菌筛查,该染料与带正电的 ϵ -PL 分子源于静电引力相结合,在产生菌的周围形明显的红色圈,具有灵敏度高的特点,极大地促进了新菌株的分离。近年来, ϵ -PL 的研究引起我国研究人员的重视,产生菌的筛查取得明显进展(表 1)。

表 1 ϵ -PL 产生菌的分离与多样性

Table 1 Isolation and diversity of ϵ -poly-L-lysine-producing strains

Strain	Reporter	Strain source	Ref(s)
<i>Streptomyces albulus</i>	Shima et al.	Japan	[1]
<i>Streptomyces mashuense</i>	Nishikawa et al.	Japan	[16]
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Nishikawa et al.	Japan	[16]
<i>Kitasatospora kifunense</i>	Nishikawa et al.	Japan	[16]
<i>Streptomyces roseoverticillatus</i>	Nishikawa et al.	Japan	[17]
<i>Streptomyces celluloflavus</i>	Takehara et al.	Japan	[18]
<i>Streptomyces herbaricolor</i>	Hirohara et al.	Japan	[19]
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Hirohara et al.	Japan	[19]
<i>Kitasatospora</i> sp	Zhu et al.	China	[20]
<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	Duan et al.	China	[21]
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Jia et al.	China	[22]
<i>Streptomyces padenus</i>	Li et al.	China	[23]

表 1 显示 ϵ -PL 产生菌都属于链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) 的链霉菌属 (*Streptomyces*) 和北里孢菌属 (*Kitasatospora*),表现出菌种多样性,不过这些产生菌在 ϵ -PL 分子大小^[16]、发酵中菌丝形态^[24]、外源 L-lysine 对 ϵ -PL 合成影响^[25]等方面差异明显,预示产生菌的发掘还有很大的潜力。目前,产 ϵ -PL 的微生物还在不断地被发现。作者采用亚甲基蓝法 (methylene blue) 分离到 4 株 ϵ -PL 产生菌,经形态、生理生化和 16S rDNA 鉴定,其中 1 株为不吸水链霉菌 (*Streptomyces ahysroscopicus*),其 16S rDNA 序列已提交 GenBank (accession number 246524)。

2 ϵ -PL 生物合成

2.1 ϵ -PL 与 γ -PGA 生物合成比较

γ -聚谷氨酸 (γ -PGA) 是芽孢杆菌 (*Bacillus species*) 产生的一种胞外物质,由 D-和 L-谷氨酸通过 γ -谷氨酰胺键聚合而成。 ϵ -PL 与 γ -PGA 的生物合成在氨基酸单体的活化上有相似之处,但在以下两方面截然不同:一是两者的前体物构型不同,L型和 D-型-谷氨酸均可作为 γ -PGA 合成的前体物,即使在培养基中不添加 D-glutamate,合成产物中也含有 D-glutamate,因为合成酶系中的谷氨酸异构酶可使 L-

glutamate 异构化为 D-glutamate^[26]。而 ϵ -PL 合成酶对合成底物极其专一,它的前体物只能是 L-lysine 和合成产物中只含有 L-lysine 单体^[27-28];二是两者的合成酶性质不同, ϵ -PL 合成酶是一种非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal Peptide Synthetase, NRPS)^[28],而 γ -PGA 合成酶是一庞大的多酶复合体,非 NRPS,包含有 γ -谷氨酰转移酶、L 和 D-氨基酸转氨酶、丙氨酸消旋酶、谷氨酸异构酶和聚合酶等^[29]。目前, ϵ -PL 生物合成的研究还不全面,而在 γ -PGA 生物合成方面,研究已深入到生物合成的调控^[30]以及产物的胞外转运机制^[31]等层面。

2.2 ϵ -PL 生物合成途径

Shima 等^[27]以 L-[¹⁴C] lysine 为底物进行的合成实验表明,L-lysine 分子直接聚合至 ϵ -PL 中。Hiraki 等^[32]选育的 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(赖氨酸结构类似物)和甘氨酸双重抗性突变株中,99% 的突变株表现出更高的生产能力。这些突变株的天冬氨酸激酶活性更高,而且抗赖氨酸和甘氨酸的反馈抑制。研究者认为 L-lysine 的合成经天冬氨酸途径:天冬氨酸磷酸化后由天冬氨酸- β -半醛脱氢酶催化生成天冬氨酸- β -半醛,进入赖氨酸支路或苏氨酸、甲硫氨酸支路,最后,合成的 L-lysine 在 ϵ -PL 聚合酶的催化下得到 ϵ -PL^[33]。该合成途径中的天冬氨酸激酶和天冬氨酸- β -半醛脱氢酶是关键酶,其酶

活性受到终端氨基酸的调控。

作者在对 L-lysine 生物转化法生产 ϵ -PL 研究中发现,在 ϵ -PL 合成阶段向培养基中添加一定浓度的 L-lysine 能提高 ϵ -PL 的产量,但外源 L-lysine 的过量添加对胞内 ATP 的合成具有抑制效应(未发表数据)。

2.3 硫元素及金属离子在 ϵ -PL 生物合成中的作用

SO_4^{2-} 在 ϵ -PL 生物合成中是必需的,硫可能作为辅助底物参与 L-lysine 活化和代谢中形成的硫醇与腺苷化的赖氨酸形成硫酯,硫酯键上的赖氨酸转移并聚合至正在延长的 ϵ -PL 链上的 ϵ -氨基上^[25, 28]。 Fe^{2+} 和 Co^{2+} 等离子能促进 *Kitasatospora kifunense* 合成 ϵ -PL,而 Mn^{2+} 只能平板上促进其合成 ϵ -PL。这些金属离子可能通过与铁吸收调节蛋白 (ferric uptake regulation protein, Fur) 发生作用,对 ϵ -PL 合成酶基因的表达产生影响^[34]。

2.4 ϵ -PL 合成酶和基因

Kawai 等^[35] 调查了 ϵ -PL 产生菌的不同细胞成分的 ϵ -PL 合成活性,结果显示膜蛋白的合成活性最高,表明 ϵ -PL 合成酶与 γ -PGA 合成酶相似,也定位于细胞膜上。研究还发现:(1) ϵ -PL 合成活性依赖于 ATP,且不受核糖核酸酶 A、卡那霉素和氯霉素的影响,显示 ϵ -PL 的合成不同于蛋白分子的合成;(2) ϵ -PL 的合成过程会形成大量 AMP,反应体系中形成的 ADP 与 L-lysine 无关联性,推测 L-lysine 在

ϵ -PL 合成中至少要经过 L-lysine 腺苷化以及腺苷化 L-lysine 的聚合作用两个步骤。

Yamanaka 等^[28] 克隆了产生菌 *S. albulus* NBRC1417 的包含合成酶基因的 33 kb DNA 片段 (accession number, AB385841),研究表明 ϵ -PL 合成酶由 1319 个氨基酸残基组成,分子量 130 kDa,是一种非核糖体肽合成酶,包含腺苷化域 (adenylation)、缩合域 (condensation) 和硫化域 (thiolation),它催化 ϵ -PL 的合成是以 L-lysine 聚合物或单体 L-lysine 作为受体,L-lysine 为供体经多轮缩合反应合成链长不均一的 ϵ -PL,它的催化合成过程与聚酮合成酶 (Polyketide synthase, PKS) 相似,暗示两者可能起源于共同的代谢途径。目前, ϵ -PL 生物合成的引发、终止以及合成后产物的转运机制还不清楚。

2.5 降解酶及其基因在 ϵ -PL 生物合成中的作用

ϵ -PL 基于静电引力吸附于微生物细胞表面并发生作用,导致微生物死亡或其生长受到抑制^[2]。研究发现, ϵ -PL 合成活性与 ϵ -PL 降解活性相关^[9],降解酶是 ϵ -PL 产生菌正常生长和代谢所必需。近年来,为了解降解酶在保护产生菌免受 ϵ -PL 对自身的伤害及可能在 ϵ -PL 合成中的作用,对降解酶特性和生物功能等进行了研究,表 2 列出了目前已知降解酶的相关参数及酶学特性,显示不同来源的降解酶在分子大小、亚基组成、降解模式(内切或外切)以及金属离子对酶活性的影响等存在差异。

表 2 不同菌株来源的 ϵ -PL 降解酶特性

Table 2 Characterization of ϵ -PL-degrading enzyme isolated from different strains

Strain	Molecular Weight/kDa	Subunit	Degradation mode	Metal ion on Enzyme activity	Location	Ref(s)
<i>Streptomyces albulus</i>	54	1	exo-type	$\text{Zn}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{activator}$	cell membrane	[9]
<i>Kitasatospora</i> sp.	87	2	exo-type	$\text{Co}^{2+}/\text{activator}/\text{Ca}^{2+}/\text{depressor}$	cell membrane	[10]
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	80	1	exo-type	$\text{Co}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{activator}$	cytoplasm	[11]
<i>Chryseobacterium</i> sp.	38.4	2	endo-type	$\text{Cu}^{2+}/\text{Ag}^{+}/\text{depressor}$	Extracellular	[12]

Hamano 等^[13] 研究了 *S. albulus* 降解酶基因 (*pld*) 的生物学功能,认为该基因编码的降解酶对菌株防止 ϵ -PL 的伤害起了一定作用。Yamanaka 等^[36] 则认为降解酶主要对外源 ϵ -PL 起作用以及 ϵ -PL 的链长由合成酶本身决定,不受降解酶控制。迄今为止,对降解酶在产生菌的自我保护中的作用看法不一致以及对它在 ϵ -PL 合成中的作用认识还不清楚,而降解酶功能的深入研究对于代谢调控和菌株改造具有不可低估的作用。作者所在课题组就外源 ϵ -PL 对产生菌的细胞膜损伤、生物大分子渗漏以及对自身合成的影响进行了研究。结果发现, ϵ -PL 在中性条件下能明显导致产生菌 ATP、 K^{+} 渗漏以及

细胞膜损伤,而在酸性条件下(ϵ -PL 合成必须)这种影响几乎可以忽略,因此认为,酸性条件下合成 ϵ -PL 可能是产生菌的一种自我保护机制。目前没有证据表明产生菌在中性条件下合成 ϵ -PL 并即被降解酶所降解,基于产生菌的自我保护,推测产生菌在中性条件不合成 ϵ -PL。同时, ϵ -PL 作为终端产物,反馈抑制效应强烈,可能也是 ϵ -PL 低产率的原因之一(未发表数据)。

3 ϵ -PL 产生菌遗传转化体系

ϵ -PL 拥有潜在的巨大需求,然而自然界分离的

野生型菌株的低产率及苛刻的培养条件成为制约 ϵ -PL 生产和应用的一个主要瓶颈,因此遗传改良十分必要。采用分子生物学技术对菌株进行改造具有精确、针对性强、效果显著等特点,但需构建有效的遗传转化体系。重组 DNA 导入原核细胞的方法主要有 CaCl_2 介导的转化法、PEG 介导的原生质体转化法、接合作用转化法等。在链霉菌遗传转化研究方面,PEG 介导的原生质体转化法最为常用。

传统育种在 ϵ -PL 产生菌的改造上取得了一定的成功,但有必要通过分子育种构建 ϵ -PL 高产菌株,为此需构建克隆载体^[37]。Takagi 等^[37]从 ϵ -PL 产生菌中发现了功能未知质粒 pNO33,发现 pNO33 的一个开放阅读框(ORF)与天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中的与形态及抗体合成有关 *bldB* 基因具有 54% 的相似性;又以 pNO33 为探针,通过 Southern 杂交进一步发现与产生菌分类地位相近的非产生菌 *S. albulus* IFO13410 和诺尔斯链霉菌(*S. noursei* IFO15452)中无该质粒,推测 pNO33 可能与 ϵ -PL 的合成或抗性有关。

Hamano 等^[38]将 pNO33 的复制子与硫链丝菌肽基因(*tsr*)连接构建得到 pBBH4, pBBH4 分别与 pNEB193 和 pK18mob 进行适当的分子操作构建了穿梭质粒载体 pLAE001 和 pLAE003, pLAE001 用于 PEG 介导的原生质体的基因转入, pLAE003 用于大肠杆菌介导的接合转移。源于白色链霉菌的 pLAE001,每 μg DNA 转化可得到约 10000 个转化子; pLAE003 的转化频率为 4.0×10^{-7} 。相较于 pLAE001, pLAE003 的接合转移具有更高的效率,并可克服原生质体形成及再生的障碍。目前 pLAE001 已用于天冬氨酸激酶基因与 ϵ -PL 合成关系的研究^[33]。考虑到 ϵ -PL 产生菌的多样性, pLAE001 和 pLAE003 对不同菌株的有效性有待进一步验证。

Hoshino 等^[39]认为 pNO33 具有中等拷贝数和多个特异性酶切位点,如有合适的遗传标记基因则可构建为克隆载体,为此克隆了 *S. albulus* NBRC1417 中的 β -内酰胺酶基因和尝试构建以 β -内酰胺酶基因为遗传标记、pNO33 为主要元件的克隆载体。总之,针对 ϵ -PL 产生菌的遗传转化体系已经基本建立。

4 展望

组合生物合成是建立在次级代谢产物合成酶结构与功能的模块性基础之上,主要通过对接级代谢产物的代谢途径进行遗传修饰,以达到新型复杂化合物的生物合成。采用的方法有 2 种:一是针对性

的通过基因置换、倍增、异源途径的表达等方式对接级代谢产物的生物合成途径进行遗传修饰,提高化合物的产量和获得新型结构类似物;二是将不同来源的次级代谢产物的生物合成基因进行重组,理论上可以认为如果有 R 个可操作的基因数和 n 个功能相似基因(即为含该种基因的菌种数),组合生物合成能产生 R^n 个新型化合物,此重组微生物库所产生的新型产物构成了类似物库^[40-41]。

ϵ -PL 合成酶的模块化功能域^[28]与 I 型 PKS 的模块非常相似,这种结构与功能的模块性为遗传操作和组合生物合成提供了条件,利用组合生物合成对 ϵ -PL 产生菌进行改造成为可能。随着 ϵ -PL 生物合成研究的进一步深入,特异性的对 ϵ -PL 合成酶基因的功能域进行缺失、置换、倍增、外源基因导入等操作将成为现实,针对性改变 ϵ -PL 合成酶的底物选择性、降低 ϵ -PL 的链长、提高产量和产生类似 ϵ -PL 的新型化合物等。同时, ϵ -PL 合成酶基因的研究,将丰富 PKS 和 NRPS 的基因资源,为今后通过“剪切加粘贴”的方式产生大量新型化合物奠定基础。

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41: 1807-1809.
- [2] Shima S, Matsuoka H, Iwanoto T, Sakai H. Antimicrobial action of ϵ -poly-L-lysine. *Journal of Antibiotics*, 1984, 37: 1445-1449.
- [3] Hiraki J. ϵ -Polylysine: its development and utilization. *Fine Chemicals*, 2000, 29: 18-25.
- [4] Ashiuchi M, Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 9-14.
- [5] Shima S, Fukuhara Y, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46: 1917-1919.
- [6] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, Seki H, Uohama K, Seki H, Kimura S, Yanagimoto Y, Barnett J. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37: 328-340.
- [7] Kido Y, Hiramoto S, Murao M, Horio H, Miyazaki T, Kodama T, Nakabou Y. ϵ -Poly-L-lysine inhibits pancreatic lipase activity and suppresses postprandial

- hypertriacylglyceridemia in rats. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133: 1887-1891.
- [8] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 1148-1159.
- [9] Kito M, Takimoto R, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and characterization of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from an ϵ -poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus*. *Archives Microbiology*, 2002, 178: 325-330.
- [10] Feng XH, Xu H, Xu XY, Yao J, Yao Z. Purification and some properties of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012. *Process Biochemistry*, 2008, 43: 667-672.
- [11] Kito M, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Occurrence of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme in ϵ -poly-L-lysine-tolerant *Shingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 207: 147-151.
- [12] Kito M, Takimoto R, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and characterization of an ϵ -poly-lysine-degrading enzyme from the ϵ -poly-lysine-tolerant *Chryseobacterium* sp. OJ7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96: 92-94.
- [13] Hamano Y, Yoshida T, Kito M, Nakamori S, Nagasawa T, Takagi Y. Biological function of the *pld* gene product that degrades ϵ -poly-L-lysine in *Streptomyces albulus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72: 173-181.
- [14] Zhang Y, Feng XH, Xu H, Yao Z, Ouyang PK. ϵ -Poly-L-lysine production by immobilized cells of *Kitasatospora* sp. MY 5-36 in repeated fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5523-5527.
- [15] Nishikawa M. Molecular mass control using polyanionic cyclodextrin derivatives for the epsilon-poly-L-lysine biosynthesis by *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45: 295-298.
- [16] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3575-3581.
- [17] Nishikawa M, Kobayashi K. *Streptomyces roseovorticillatus* produces two different poly(amino acid)s; lariat-shaped γ -poly(L-glutamic acid) and ϵ -poly(L-lysine). *Microbiology*, 2009, 155: 2988-2993.
- [18] Takehara M, Saimura M, Inaba H, Hirohara H. Poly (γ -L-diaminobutanoic acid), a novel poly (amino acid), coproduced with poly(ϵ -L-lysine) by two strains of *Streptomyces celluloflavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 286: 110-117.
- [19] Hirohara H, Saimura M, Takehara M, Miyamoto M, Ikezaki A. Substantially monodispersed poly(ϵ -L-lysine)s frequently occurred in newly isolated strains of *Streptomyces* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 1009-1016.
- [20] 朱宏阳, 徐虹, 吴群, 陈玮玮. ϵ -聚赖氨酸菌的筛选和鉴定. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2005, 32 (5): 127-130.
- [21] 段杉, 朱伟珊. ϵ -聚赖氨酸的筛选. *食品与发酵工业 (Food and Fermentation Industries)*, 2007, 33 (8): 14-16.
- [22] 贾士儒, 许春英, 谭之磊, 曹伟锋, 欧竝, 贺新义, 邓子新. ϵ -聚赖氨酸产生菌 TUST-2 的分离鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50 (2): 191-196.
- [23] 李树, 陈旭升, 廖莉娟, 张建华, 毛忠贵. ϵ -聚赖氨酸产生菌的筛选方法改进. *食品与生物技术学报 (Journal of Food Science and Biotechnology)*, 2010, 29 (2): 282-287.
- [24] Ouyang J, Xu H, Li S, Zhu HY, Chen WW, Zhou J, Wu Q, Xu L, Ouyang PK. Production of ϵ -poly-L-lysine by newly isolated *Kitasatospora* sp. PL6-3. *Biotechnology Journal*, 2006, 1: 1459-1463.
- [25] Hirohara H, Takehara M, Saimura M. Biosynthesis of poly (ϵ -L-lysine)s in two newly isolated strains of *Streptomyces* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, 73: 321-331.
- [26] Ashiuchi M, Tani K, Soda K. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IF03336 producing poly-gamma-glutamate. *Journal of Biochemistry*, 1998, 123: 1156-1163.
- [27] Shima S, Oshima S, Sakai H. Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine by washed mycelium of *Streptomyces albulus* No346. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1983, 57: 221-226 (In Japanese).
- [28] Yamanaka K, Maruyama C, Takagi H, Hamano Y. ϵ -Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4: 766-772.

- [29] Nagai T, Koguchi K, Itoh Y. Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto): evidence that plasmids are not involved in poly- γ -glutamic acid production. *Journal of General Applied Microbiology*, 1997, 43: 139-143.
- [30] Mader U, Antermann H, Buder T. *Bacillus subtilis* functional genomics; genome-wide analysis of the DegS-DegU regulation by transcriptomics and proteomics. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268: 455-467.
- [31] Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, Song JJ, Hong SP, Sung MH, Soda K, Yagi T, Misono H. Physiological and biochemical characteristics of poly γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268: 5321-5328.
- [32] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita S, Izumi Y. Improved poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistance mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsu Kagaku*, 1998, 76: 487-493.
- [33] Hamano Y, Nicchu I, Shimizu T, Onji Y, Hiraki J, Takagi H. ϵ -Poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*, has feedback-inhibition resistant aspartokinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 873-882.
- [34] Kobayashi K, Nishikawa M. Promotion of ϵ -poly-L-lysine by iron in *Kitasatospora kifunense*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 2007, 23: 1033-1036.
- [35] Kawai T, Takaaki K, Hiraki J, Yoshikazu I. Biosynthesis of ϵ -poly-L-Lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311: 635-640.
- [36] Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, Maruyama C, Utagawa T, Hamano Y. Identification and analysis of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme reveal the mechanism of ϵ -poly-L-lysine production and accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* (in press), 2010, DOI: 10.1128/AEM.00853-10.
- [37] Takagi H, Hoshino Y, Nakamori S, Inouye S. Isolation and sequence analysis of plasmid pN033 in the ϵ -poly-L-lysine-producing actinomycete *Streptomyces albulus* IFO14147. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89: 94-96.
- [38] Hamano Y, Nicchu I, Hoshino Y, Kawai T, Nakamori S, Takagi H. Development of gene delivery system for the ϵ -poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*. *Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99: 636-641.
- [39] Hoshino Y, Nakamori S, Takagi H. Cloning and analysis of the β -Lactamase gene from ϵ -poly-L-lysine-producing actinomycete *Streptomyces albulus* IFO14147. *Journal of Biochemistry*, 2003, 134: 473-478.
- [40] Floss H. Combinatorial biosynthesis-potential and problems. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124: 242-257.
- [41] Baltz R. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nature Biotechnology*, 2006, 24: 1533-1540.

Progress in biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine and genetic transformation for ϵ -poly-L-lysine producer-A review

Qingping Wu^{1*}, Shengrong Liu^{1,2}, Jumei Zhang¹

¹Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China

²School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: ϵ -Poly-L-lysine (ϵ -PL) is a polymer with strong antimicrobial activity and consists of 25 – 35 L-lysine

Supported by the Program for Industry-Academia-Research (2009B090300300, 2008A01090003), by the Guangdong-Hongkong Technology Cooperation Funding (2007A020902003) and by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2009B011300004)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

Received: 17 October 2010/Revised: 24 December 2010

monomers linked via ϵ -amino- α -carboxyl peptide bond. This polymer is one of only two homo-poly(amino acid) polymers known in nature. To date, the biosynthesis mechanism of ϵ -PL was remained unclear. Recently, ϵ -PL synthetase was identified as a nonribosomal peptide synthetase and it utilized L-lysine to synthesize ϵ -PLs of various chain length by iteratively condensing reaction, which was similar to type I polyketide synthase and was not determined by ϵ -PL-degrading enzyme. Meanwhile, the shuttle vectors pLAE001 and pLAE003, special for ϵ -PL producer have been constructed, which is significant for studying ϵ -PL biosynthesis. In this review, the biosynthesis of ϵ -PL and the genetic transformation were introduced. Also, the study in our group was presented and the views related to ϵ -PL study were raised. Finally, the prospect of application of combinational biosynthesis in ϵ -PL-producing strain improvement was also discussed considering ϵ -PL synthetase is a nonribosomal peptide synthetase containing several modules.

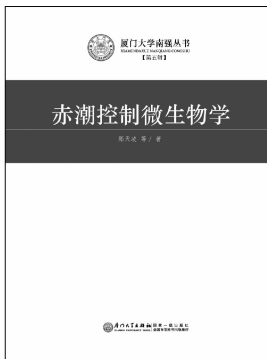
Keywords: ϵ -poly-L-lysine, biosynthesis, genetic transformation system, combinational biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

厦门大学出版社书讯

赤潮控制微生物学——厦门大学南强丛书第五辑

郑天凌 等/著; 978-7-5615-3848-7; ¥48.00; 2011年4月 出版



内容简介: 本书针对全球水体富营养化问题, 聚焦于赤潮生消过程中微生物的特殊地位与作用, 旨在挖掘高效抑/杀藻微生物资源, 积极阐释其调控藻华、防治有害赤潮的途径、机理及方法。全书内容由三篇组成, 第一篇为概论, 主要介绍赤潮及赤潮成因的研究进展; 第二篇重点探讨海洋中的有效抑/杀藻微生物(细菌、放线菌及病毒)及其活性成分对有毒藻的作用方式与过程和赤潮发生水域菌-藻关系问题; 最后一篇简要叙述了赤潮防治的现状与研究展望。

本书主要读者对象包括水生生态学、微生物学、藻类学、海洋生态学、水产养殖学、海洋环境污染及水体(淡水、海水)富营养化等领域的科技人员与管理人员、高等院校的教师及学生人群。

欢迎各界人士邮购厦门大学出版社各类图书

邮购地址: 厦门市软件园望海路39号 厦门大学出版社 邮编: 361005

联系人: 陈进才(0592-2188509) 吕静琳(0592-2184866)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目