

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :725 - 731; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140513

ϵ -聚赖氨酸发酵过程的活性变化及发酵调控

刘盛荣, 吴清平*, 张菊梅, 杨小鹃, 蔡淑珍

广东省微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东 广州 510070

摘要:【目的】作为一种次级代谢产物, ϵ -聚赖氨酸生物合成受不同因素制约, 为评价细胞活性对 ϵ -聚赖氨酸生物合成的影响, 研究发酵过程细胞活性、 ϵ -聚赖氨酸合成及其它发酵参数变化, 基于此改进发酵工艺。【方法】以 BacLight Live/Dead 和 5-氰基-2,3-二甲苯基氯化四唑 (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC) 为荧光探针, 激光扫描共聚焦显微镜监测不同发酵时期细胞活性, 并分析 pH、细胞生长、 ϵ -聚赖氨酸生物合成以及葡萄糖利用; 通过向 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞添加酵母粉调控细胞活性改进发酵工艺。【结果】BacLight Live/Dead 为探针的共聚焦显示 ϵ -聚赖氨酸发酵过程生长期 (0 - 16 h) 的细胞大都具有活性; CTC 作为探针的分析显示生长期及 ϵ -聚赖氨酸合成前期 (16 - 30 h) 细胞活性高, ϵ -聚赖氨酸合成终止时细胞仅显示微弱活性; 调控 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞活性的发酵工艺 ϵ -聚赖氨酸终浓度达 2.24 g/L (对照 1.04 g/L)。【结论】调控 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞活性的发酵工艺可有效促进 ϵ -聚赖氨酸生物合成。

关键词: 不吸水链霉菌, ϵ -聚赖氨酸, 液体发酵, 细胞活性, 生物合成, 活性调控

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0725-07

ϵ -聚赖氨酸是一种链霉菌生物合成 L-赖氨酸同型聚合物, 通过 L-赖氨酸分子间的 α -羧基与 ϵ -氨基缩合反应形成的酰胺键连接而成, 通常由 25 - 35 个残基组成^[1]。 ϵ -聚赖氨酸对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母菌及丝状真菌具有较好的抑菌作用, 对病毒也有抑制效果, 抑菌机制为富含阳离子的 ϵ -聚赖氨酸经静电作用吸附呈负电荷的微生物细胞表面并破坏细胞结构^[2-3]; ϵ -聚赖氨酸在体内无残留、无致畸性、无致突变性以及可生物降解^[4]。 ϵ -聚赖氨酸的抑菌效果和安全性使其可作为一理想的食品防腐剂。2004 年美国 FDA 批准 ϵ -聚赖氨酸 GRAS (Generally recognized as safe, 一般认为安全) 地位,

用于米饭、软饮料、蛋类制品、沙拉、鱼、奶酪、调味品等食品的防腐保鲜^[5]。我国于 2014 年批准 ϵ -聚赖氨酸可作为食品防腐剂使用。此外, ϵ -聚赖氨酸还可作为药物载体、细胞促融剂以及可作为亲水凝胶和电子元器件的制作材料等多种用途^[6-8]。

作为一种次级代谢产物, ϵ -聚赖氨酸生物合成研究受到人们关注。研究表明 ATP 参与 L-赖氨酸磷酸化, 磷酸化 L-赖氨酸在 ϵ -聚赖氨酸合成酶作用下聚合至 ϵ -聚赖氨酸链上^[9]; ϵ -聚赖氨酸聚合度受合成酶控制, 与位于细胞膜上的降解酶无直接关联^[10]; 硫酸化 β -环糊精在含有甘油的发酵培养基中可降低细胞合成 ϵ -聚赖氨酸聚合度, 由于苦味减轻

基金项目: 粤港招标项目——食用菌烘焙制品安全生产关键技术研究及产业化 (2009A020700006); 食品微生物安全溯源系统智能化研究及应用 (2011A011303001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

作者简介: 刘盛荣 (1973 -), 男, 福建三明人, 博士, 主要从事微生物发酵及代谢研究, 现在福建省宁德师范学院工作。E-mail: fjhost@163.com

收稿日期: 2014-10-25; **修回日期:** 2015-01-12

更适合作为一种食品防腐剂^[11]; ϵ -聚赖氨酸合成酶是一种非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)^[12], 由腺苷酰化结构域 (底物识别及活化)、肽酰载体蛋白结构域 (活化底物载体)、跨膜结构域等组成, 不同结构域分工协作经多次缩后反应将 L-赖氨酸生物合成为链长不一的 ϵ -聚赖氨酸。

ϵ -聚赖氨酸生物合成与 pH 有十分密切的关系, pH 5.0 以上时有利于细胞生长, 但发酵液中无 ϵ -聚赖氨酸积累; pH 4.0 时有利于 ϵ -聚赖氨酸合成, 但细胞生长受抑制^[13], 为克服 ϵ -聚赖氨酸生物合成和细胞生长 pH 要求的显著差异, 研究两阶段 pH 控制发酵, pH 5.0 控制阶段及以前为阶段 I 以利细胞生长, 阶段 II 为 pH 4.0 控制阶段以利 ϵ -聚赖氨酸生物合成, 该发酵方法可显著提高 ϵ -聚赖氨酸产量。Kito 等^[14] 从产生菌白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) 中分离到分子量为 54 kDa 的 ϵ -聚赖氨酸降解酶, pH 7.0 时有最高活性, pH 4.0 时降解活性受抑制。Feng 等^[15] 从北里孢菌 (*Kitasatospora*) 中分离到分子量为 82 kDa 的 ϵ -聚赖氨酸降解酶, 降解活性适宜 pH 为 6.0 - 8.0, pH 4.0 时无活性。因此, 研究人员认为中性发酵液无 ϵ -聚赖氨酸积累是细胞自身降解酶降解活性所致, 也因此 ϵ -聚赖氨酸合成期 pH 通常控制为 4.0。显然 ϵ -聚赖氨酸发酵过程 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞受酸等抑制, 因此发酵过程细胞活性研究十分必要, 对发酵调控具有指导意义。

BacLight Live/Dead 和 5-氰基-2,3-二甲苯基氯化四唑 (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC) 是微生物活性研究最常用荧光探针^[16-20], 前者由碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 与 SYTO9 两种染料组成, SYTO9 为膜通透性探针, 进入细胞后与核酸结合激发后产生绿色荧光, PI 只能进入膜受损细胞, 进入后可替换与核酸结合的 SYTO9 激发后产生红色荧光, 典型图像为绿色 (活性细胞) 或红色 (死亡细胞)。CTC 为无色水溶性分子, 可被微生物细胞膜上电子呼吸传递链中的脱氢酶还原为一种非水溶性荧光物质沉积于细胞, 激发后产生红色荧光^[16-17]。为考察 ϵ -聚赖氨酸发酵过程细胞活性及评价其对 ϵ -聚赖氨酸生物合成的影响, 以 BacLight Live/Dead 和 CTC 为探针研究 ϵ -聚赖氨酸产生菌不吸水链霉菌 (*Streptomyces ahysgroscopicus*) 发酵过程活性变化, 并分析 ϵ -聚赖氨酸合成和其它发酵参数,

基于此改进发酵工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: BacLight Live/Dead L7007 购自英韦创津 (Invitrogen, USA); CTC 试剂盒 BS02 购自同仁化学研究所 (Dojindo, Japan)。激光扫描共聚焦显微镜 LSM700 为蔡司公司 (Zeiss company, Germany) 产品。

1.1.2 菌株: 本课题组所分离的 1 株产 ϵ -聚赖氨酸不吸水链霉菌 (*S. ahysgroscopicus*) GIM8 为实验菌株^[21]。

1.1.3 培养基 (g/L): 培养基改自 M3G 培养基^[13], 葡萄糖由 50 g/L 改为 30 g/L, 其余保持不变, 即: 葡萄糖, 30; 酵母粉, 5; (NH₄)₂SO₄, 10; KH₂PO₄, 1.36; K₂HPO₄, 0.8; MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.04; FeSO₄·7H₂O, 0.03; 去离子水 1 L; 调 pH 7.2。121 \square 灭菌 20 min, 作为种子和发酵培养基。

1.2 发酵培养

1.2.1 种子培养: 从新鲜培养斜面菌种刮取 1 环孢子至装有 50 mL 培养基的 250 mL 摇瓶。30 \square 、190 r/min 培养 20 h 作为种子。

1.2.2 摇瓶发酵: 吸取 2 mL 种子至装有 50 mL 培养基的 250 mL 摇瓶, 30 \square 、190 r/min 培养 72 h, 不同时间取样。接种 4 瓶, 3 瓶用于取样分析发酵参数 (作为 3 个重复), 1 瓶用于取样共聚焦分析。

1.2.3 调控发酵: 接种及培养同上, 发酵至 16 h 添加灭过菌的酵母粉浓溶液, 使其浓度为 0.5% (W/V), 未添加的作为对照, 发酵时间 96 h, 3 个重复。不同时间取样分析发酵参数和细胞活性 (比色法, 见 1.5)。

1.3 活性染色

1.3.1 BacLight Live/Dead 染色: 不同发酵时间取样 1 mL, 立即用 1 mol/L NaOH 调 pH 至中性, 吸取 0.5 mL 样品于 1.5 mL EP 管, 4 \square 保存, 所有样品采集后取出恢复至室温, 吸取 0.1 mL 样品至 1.5 mL EP 管, 加入 1:1 预混好的 BacLight Live/Dead L7007 染色液 0.3 μ L, 混匀, 置室温、暗处染色 10 min, 全部样品一次性用于共聚焦分析。

1.3.2 CTC 染色: 从上述剩余样品 (0.5 mL) 中吸取 0.2 mL 至 1.5 mL EP 管, 依次加入 0.8 mL 去离

子水、20 μL 50 mmol/L CTC 和 5 μL 增强剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡孵育 30 min, 染色后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 所有样品收集后全部样品一次性用于共聚焦分析。

1.4 共聚焦分析

BacLight 染色样品: 吸取 20 μL 样品至载玻片, 盖上玻片, 两光通道顺序扫描, 其中一通道激发波长 488 nm, 检测波长 500 - 530 nm, 设置为绿色; 另一通道激发波长 550 nm, 检测波长 570 - 630 nm, 设置为红色, 除焦距及放大倍数外全部样品共聚焦参数设置完全相同。

CTC 染色样品: 吸取 20 μL 染色样品于载玻片, 盖上玻片, 两光通道顺序扫描, 其中一通道激发波长 488 nm, 检测波长 530 - 620 nm, 设置为红色, 另一通道拍摄明场, 显示全细胞切面。除焦距及放大倍数外全部样品共聚焦参数设置完全相同。

1.5 细胞活性比色分析

不同发酵时间取样 1 mL, 立即吸取 0.2 mL 样品至 EP 管, CTC 染色同 1.3.2, 染色后离心倾去上清去除未还原 CTC, 每管移入 1 mL 二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO), 用枪头将细胞打散以充分抽提 CTC 还原产物 (CTC-formazan, CTF), 抽提 10 min, 其间拍打 1 - 2 次。10000 $\times g$ 离心 5 min, 吸取上清 (或适当稀释) 以 DMSO 为空白测 OD_{470} 。

参照文献 [17] 制备 CTF, 配制不同浓度 CTF 以 DMSO 为空白测 OD_{470} , Excel 建标准曲线。染色细胞所形成 CTF 量参照标准曲线。本研究 1 单位 (U, activity unit) 细胞代谢活性定义为染色条件下 (1 mmol/L CTC、37 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 min) 形成 1 $\mu\text{mol/L}$ CTF 所需要的细胞量。细胞比代谢活性 = 代谢活性单位数 (U) / 细胞干重 (mg)。

1.6 发酵参数测定

1.6.1 生物量 (干重法): 发酵液 10000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 重悬。重复 2 次, 沉淀连同已恒重离心管置 90 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱至恒重, 两者之差为干重。

1.6.2 pH: 使用数显 pH 计测定。

1.6.3 葡萄糖: 3, 5-二硝基水杨酸比色法。

1.6.4 ϵ -聚赖氨酸: 甲基橙比色法 [22]。

2 结果和分析

2.1 发酵过程参数

图 1 为发酵过程 pH、生物量、 ϵ -聚赖氨酸合成以及葡萄糖变化曲线, 显示发酵过程 pH 快速下降,

至 16 h 时降至约 4.0, 终点时降至 2.88。发酵液 pH 持续下降与葡萄糖利用有关 [23]。发酵过程细胞生长迅速, 16 h 时达最大生物量 11.38 g/L, 随着细胞开始合成 ϵ -聚赖氨酸后生物量开始持续下降, 表明 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞死亡及随后自溶大于细胞的生长。发酵液低 pH 以及生长因子的耗尽可能是促进细胞死亡的主要原因。

发酵至 16 h 时细胞开始合成 ϵ -聚赖氨酸, 48 h 后不再增加, 终浓度为 1.04 g/L。 ϵ -聚赖氨酸生物合成终止可能与活性细胞数量少或活性低、终产物反馈抑制以及生长因子耗尽等因素有关。 ϵ -聚赖氨酸发酵过程细胞生长期 (0 - 16 h) 葡萄糖从 30 g/L 降至 19.93 g/L, 主要用于合成细胞组成成分, 进一步降至 ϵ -聚赖氨酸合成结束时 (48 h) 的 13.50 g/L, 主要被细胞用以降解产生能量和生物合成 ϵ -聚赖氨酸合成过程所需要的中间产物。

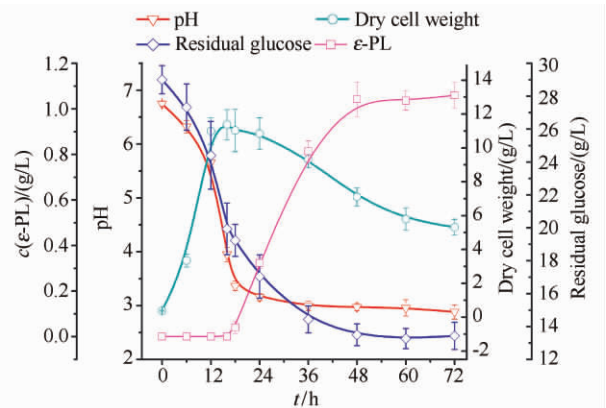


图 1. 发酵过程 pH、生物量、 ϵ -聚赖氨酸合成及葡萄糖变化曲线

Figure 1. Profiles of the pH, dry cell weight, ϵ -poly-L-lysine formation, and residual glucose during flask fermentation by *Streptomyces ahysroscopicus* GIM8.

2.2 发酵不同时期产生菌 BacLight Live/Dead 染色的共聚焦图片

图 2 是 ϵ -聚赖氨酸发酵不同时期产生菌 BacLight Live/Dead 染色的共聚焦图片, 可以看出发酵前期 (0 - 12 h) 大部分细胞为绿色, 为活性细胞, 少数细胞为红色, 为无活性细胞; 发酵至 18 h 后 (细胞已开始合成 ϵ -聚赖氨酸约 2 h) 大部分细胞为一种浅绿色, 为一种非典型 BacLight Live/Dead 图片, 且荧光变弱。此外, 还可以看出 ϵ -聚赖氨酸合成期产生菌菌丝球分布极少数绿色细胞, 推测是新近生长细胞, 显示 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞生长受到严重抑制。

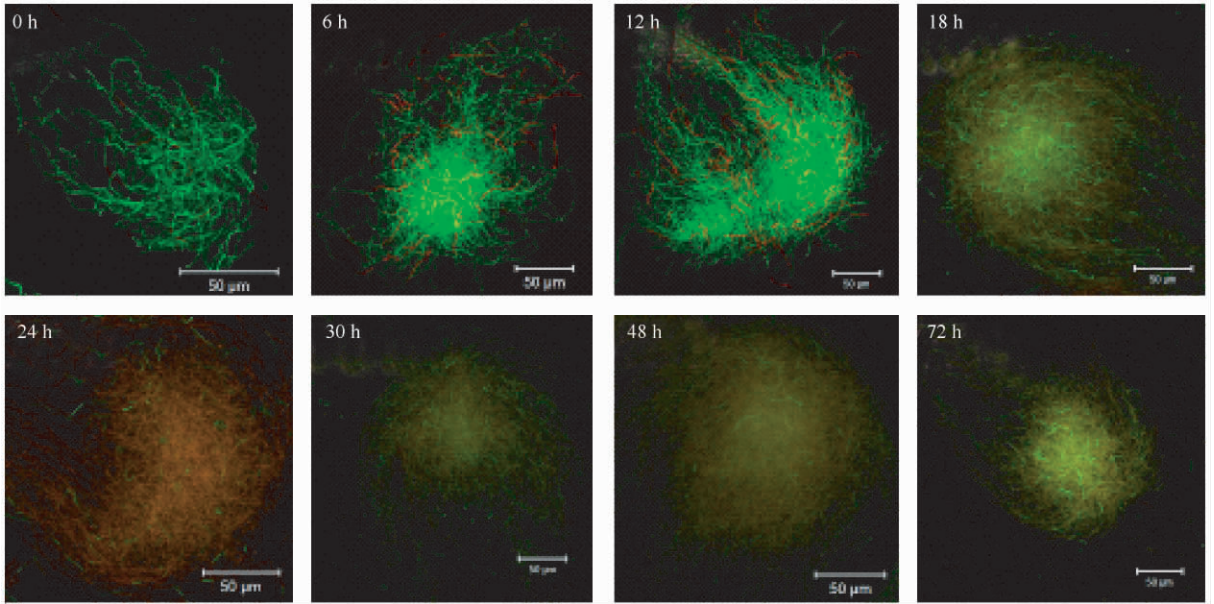


图 2. ϵ -聚赖氨酸不同发酵时期产生菌 BacLight Live/Dead 染色的共聚焦图片

Figure 2. Typical laser scanning confocal microscopy images of BacLight Live/Dead-stained *Streptomyces ahgroscopicus* GIM8 growing at different fermentation time.

2.3 发酵不同时期产生菌 CTC 染色的共聚焦图片

ϵ -聚赖氨酸不同发酵时期产生菌 CTC 染色的共聚焦图片如图 3 所示,从荧光强度可以看出 0 - 18 h 细胞活性高,24 h 细胞与 30 h 细胞的活性无明显差异;至 48 h 时即 ϵ -聚赖氨酸生物合成终止时细胞仅显示微弱活性,72 h 时细胞几乎不显示活性。

共聚焦图片还可以看出发酵前期菌丝球不断增大,这与细胞生长相吻合;与发酵至 12 h、24 h 以及 30 h 时相比,发酵至 48 h 及 72 h 时的菌丝球更小,菌丝断裂、脱落、萎缩、死亡以及自溶等是造成该现象的主要原因。须指出的是活性细胞激发后产生红色荧光,而微弱或无活性细胞无荧光产生或荧光极

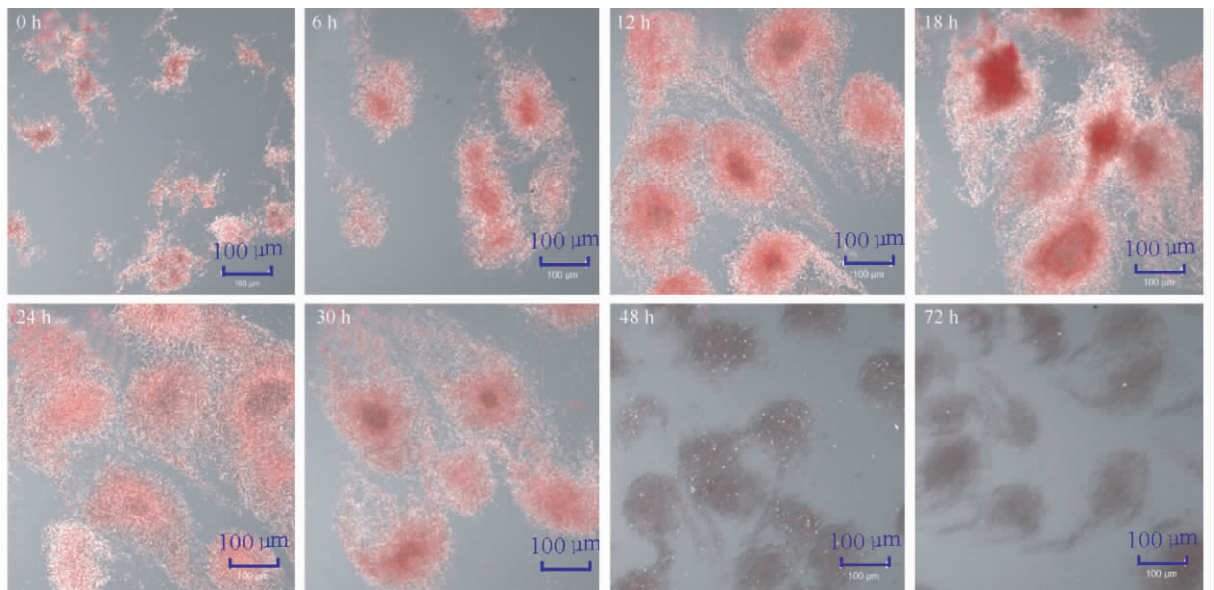


图 3. ϵ -聚赖氨酸不同发酵时期产生菌 CTC 染色的共聚焦图片

Figure 3. Typical laser scanning confocal microscopy images of CTC-stained *Streptomyces ahgroscopicus* GIM8 growing at different fermentation time.

弱,可能降低成像放大率。

2.4 活性调控发酵

CTC 作为探针的共聚焦显示 ϵ -聚赖氨酸生物合成终止时细胞仅显示微弱活性,这可能是其生物合成终止的主要原因,为此通过向 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞添加酵母粉调控其活性改进发酵工艺。

图 4 可以看出酵母粉添加(发酵至 16 h)显著提高了细胞活性,24 h、36 h 及 48 h 细胞活性分别为 1.24、0.94 和 0.83 U/mg,对照为 0.37、0.23 和 0.17 U/mg,前者分别为后者的 3.35、4.08 和 4.88 倍。

利用酵母粉作为活性调控因子调控合成期细胞活性的发酵 ϵ -聚赖氨酸终浓度达 2.24 g/L,与对照 1.04 g/L 相比提高 115.4% (参照已发表文章^[24])。须指出的是发酵过程酵母粉添加不仅提高 ϵ -聚赖氨酸合成细胞活性,同时也对细胞生长、pH 变化和细胞葡萄糖利用产生显著影响(参照已发表文章^[24]),这或直接或间接影响 ϵ -聚赖氨酸生物合成。

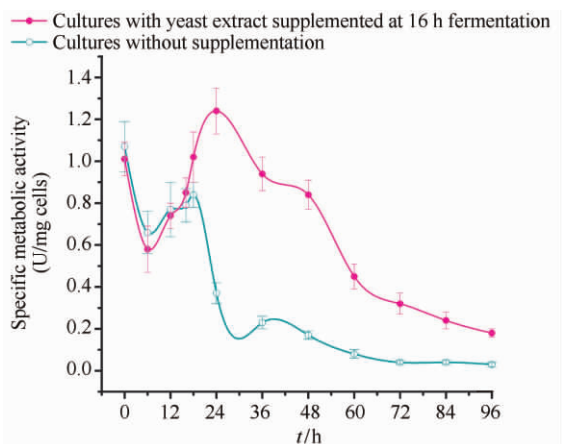


图 4. ϵ -聚赖氨酸发酵合成期添加酵母粉对产生菌活性的影响

Figure 4. Effects of the yeast extract (0.5%, W/V) supplemented at the time (16 h cultivation) on the cellular metabolic activity of *Streptomyces ahgrosopicus* GIM8 during flask fermentation.

3 讨论

链霉菌是一类重要的微生物类群,是生物活性物质的重要来源。链霉菌发酵过程细胞分化及其活性研究一直受到人们重视^[25-26]。Sebastine 等^[27]以 BacLight Live/Dead 为探针研究克拉维酸(Clavulanic acid)发酵中产生菌棒状链霉菌

(*Streptomyces clavuligerus*) 活性动态变化,发现活性细胞比例从接种时 100% 降至 64%, 随后上升至 75%, 最后上升至 93%。克拉维酸小试及中试发酵时棒状链霉菌活性比例高(80% - 90%)且保持相对恒定^[28]。本研究以 BacLight Live/Dead 为探针显示 ϵ -聚赖氨酸发酵前期大多数细胞具有活性,进入 ϵ -聚赖氨酸合成期后细胞呈一种非典型 BacLight Live/Dead 图像。 ϵ -聚赖氨酸合成阶段发酵液的低 pH 致膜通透性不可逆增加可能是形成该现象的原因,此时 PI 可穿透细胞但未能有效替换与核酸结合的 SYTO9,核酸同时结合 PI 和 SYTO9 两种荧光染料结果形成一种非典型图像。此外 SYTO9 与 PI 在一定条件下可发生共振能量转移^[20],即 SYTO9 激发后产生的绿色荧光作为激发光激发 PI,结果呈现非典型 BacLight Live/Dead 图像,本研究不排除非典型图像为该原因所致,以此可合理解释 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞荧光减弱现象。

Christiansen 等^[29]采用流式细胞仪研究 savinase 蛋白酶高密度发酵过程克劳氏芽胞杆菌(*Bacillus clausii*)活性变化,发现线性递增补料时发酵过程中死亡细胞比率不断增加,指数补料时仅稍为增加,低于前者,此结果可作为补料方式选择的依据。Bouix 和 Leveau 发现酒精发酵后期活性酵母比例显著降低,认为活性酵母减少是酒精合成效率下降的原因^[30],为发酵工艺优化指明了方向。本研究以 CTC 为探针发现 ϵ -聚赖氨酸生物合成终止时细胞仅显示微弱活性,推测低细胞活性是 ϵ -聚赖氨酸生物合成终止的重要原因,为此调控 ϵ -聚赖氨酸合成期细胞活性以改进发酵工艺,结果 ϵ -聚赖氨酸发酵产率显著提高。

作为活性调控因子的酵母粉含有大量氨基酸、维生素和矿物质, ϵ -聚赖氨酸发酵过程其添加不仅提高发酵细胞活性,也引起其它系列反应,如促进细胞生长,从而提高细胞密度,这有利于 ϵ -聚赖氨酸生物合成;更为重要的是维生素和矿物质可分别作为参与 ϵ -聚赖氨酸生物合成过程酶的辅酶和激活剂,使得 ϵ -聚赖氨酸生物合成反应速率加快;最后,发酵过程中酵母粉添加可能上调 ϵ -聚赖氨酸合成酶以及与 ϵ -聚赖氨酸生物合成有关基因的表达或改变代谢流向,结果促进其生物合成。因此,酵母粉作为活性调控因子调控合成期细胞活性的发酵工艺, ϵ -聚赖氨酸生物合成极大提高是细胞活性增强、细胞密度提高以及生物合成反应速率加快等不同效

应共同作用的结果,其中活性调控在 ϵ -聚赖氨酸生物合成促进效应中所起作用值得更深入研究。

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41: 1907-1909.
- [2] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial action of ϵ -poly-l-lysine. *Journal of Antibiotics*, 1984, 37(11): 1449-1455.
- [3] Shima S, Fukuhara Y, Sakai H. Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-l-lysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(7): 1917-1919.
- [4] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya S, Seki H, Uohama K, Seki H, Kimura S, Yanaqimoto Y, Barnett JW. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37(2): 328-340.
- [5] Hyldgaard M, Mygind T, Vad BS, Stenvang M, Otzen DE, Meyer RL. The antimicrobial mechanism of action of ϵ -poly-l-lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7758-7770.
- [6] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-l-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(1): 21-26.
- [7] Shih IL, Shen MH, Van YT. Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 2006, 97(9): 1148-1159.
- [8] Pandey AK, Kumar A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymers epsilon-poly-l-lysine. *Process Biochemistry*, 2014, 49(3): 496-505.
- [9] Kawai T, Takaaki K, Hiraki J, Izumi Y. Biosynthesis of ϵ -poly-l-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(3): 635-640.
- [10] Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, Maruyama C, Utagawa T, Hamano Y. Mechanism of ϵ -poly-l-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an ϵ -poly-l-lysine-degrading enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5669-5675.
- [11] Nishikawa M, Ogawa K. Inhibition of epsilon-poly-l-lysine biosynthesis in *Streptomycetaceae* bacteria by short-chain polyols. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2306-2312.
- [12] 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(12): 766-772.
- [13] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, Park EY, Okabe M. Enhancement of polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2001, 91(2): 190-194.
- [14] 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 of Microbiology*, 2002, 178(5): 325-330.
- [15] Feng XH, Xu H, Xu XY, Yao Y, Yao Z. Purification and some properties of ϵ -poly-l-lysine-degrading enzyme from *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012. *Process Biochemistry*, 2008, 43(6): 667-672.
- [16] Créach V, Baudoux AC, Bertru G, Rouzic BL. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(1): 19-28.
- [17] Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 29(3): 161-175.
- [18] Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Eqli T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3283-3290.
- [19] Boulou L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 37(1): 77-86.
- [20] Stocks SM. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry Part A*, 2004, 61A(2): 189-195.
- [21] Huang JM, Wu QP, Liu SR, Mo SH, Zhang JM. Screening of new ϵ -polylysine producing strain and structure identification of its production. *Microbiology China*, 2011, 38(6): 871-877. (in Chinese)
黄静敏,吴清平,刘盛荣,莫树平,张菊梅. ϵ -聚赖氨酸产生菌新菌株的筛选和产物结构鉴定. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 871-877.
- [22] Zhang C, Zhang KF, Hou SG, Ma YS. Medium

- optimization of ϵ -polylysine production by response surface analysis. *Microbiology China*, 38 (5): 641-646. (in Chinese)
- 张超, 张克峰, 侯书国, 马永山. 利用响应面法优化 ϵ -聚赖氨酸发酵培养基. *微生物学通报*, 2011, 38 (5): 641-646.
- [23] Shih IL, Shen MH. Optimization of cell growth and poly (ϵ -lysine) production in batch and fed-batch cultures by *Streptomyces albulus* IFO 14147. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (7): 1644-1649.
- [24] Shengrong Liu, Qingping Wu, Jumei Zhang, Shuping Mo. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine by *Streptomyces ahygroscopicus* using one-stage pH control fed-batch fermentation coupled with nutrient feeding. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25 (3): 358-365.
- [25] Yagüe P, Manteca A, Simon A, Diaz-Garcia ME, Sanchez J. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (10): 3401-3404.
- [26] Manceta A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (12): 3877-3886.
- [27] Sebastine IM, Stocks SM, Cox PW, Thomas CR. Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. *Biotechnology Letters*, 1999, 13 (6): 419-423.
- [28] Pinto LS, Vieira LM, Pons MN, Fonseca MM, Menezes JC. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2004, 26 (3): 177-184.
- [29] Christiansen T, Michaelsen S, Wümpelmann M, Nielsen J. Production of savinase and population viability of *Bacillus clausii* during high-cell-density fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83 (3): 344-352.
- [30] Bouix M, Leveau JY. Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 2001, 107 (4): 217-225.

Enhanced ϵ -poly-L-lysine production by improving cellular activity during fermentation

Shengrong Liu, Qingping Wu^{*}, Jumei Zhang, Xiaojuan Yang, Shuzhen Cai

Guangdong Institute of Microbiology, Ministry-Guangdong Province Jointly State Key Laboratory of Applied Microbiology, Southern China, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] To assess the effect of cellular activity on ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) biosynthesis and thereby to rationally improve the production, we studied the cellular activity, ϵ -PL formation and other parameters cross flask fermentation by *Streptomyces ahygroscopicus*. [Methods] Laser scanning confocal microscopy and a colorimetric method were used to determine cellular activity using BacLight Live/Dead and 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) as viable stains. To enhance the activity of the cells in the ϵ -PL production period, yeast extract was added. [Results] During ϵ -PL submerged fermentation in flasks, most cells were active in the growth period (0 - 16 h); cells had metabolic activity in the growth and earlier ϵ -PL production periods between 0 and 30 h fermentation. Almost no activity was detected after 48 h fermentation when no ϵ -PL was produced. The improved fermentation achieved 2.24 g/L ϵ -PL from 1.04 g/L. [Conclusion] Biosynthesis of ϵ -PL can be boosted by up-regulating cell activity in its production phase.

Keywords: *Streptomyces ahygroscopicus*, ϵ -poly-L-lysine, liquid fermentation, cellular activity, biosynthesis, control fermentation

(本文责编:王晋芳)