



ε-聚赖氨酸高产菌选育与发酵性能评价

郑根成, 王靓, 高阳, 向金鑫, 陈旭升*, 毛忠贵*

江南大学生物工程学院, 工业生物教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】选育ε-聚赖氨酸(ε-PL)高产菌, 并探究不同碳源对其发酵性能的影响。【方法】借助基因组重排和核糖体工程两种育种手段强化ε-PL产生菌的合成能力, 并利用pH冲击工艺评价不同碳源对ε-PL发酵的影响。【结果】经过4轮基因组重排和4轮核糖体工程连续选育, 获得1株高产突变株 *Streptomyces albulus* GS114, 其摇瓶ε-PL产量达到3.0 g/L, 较出发菌提高了1.7倍。该改造菌株在5 L发酵罐中分别以葡萄糖和甘油为碳源进行192 h的补料-分批发酵时, ε-PL发酵产量分别达到了43.4 g/L和45.7 g/L, 较出发菌提高了11.0%和14.9%, 而菌体量分别减少了24.0%和33.2%, ε-PL得率提高了34.2%和30.7%。【结论】基因组重排结合核糖体工程育种是一种有效的ε-PL高产菌选育手段, 研究结果将为ε-PL高产菌改造和工业生产碳源选择提供直接指导。

关键词: ε-聚赖氨酸, 链霉菌, 基因组重排, 核糖体工程, 聚合度

ε-聚赖氨酸(ε-poly-L-lysine, ε-PL)是由25–35个L-赖氨酸单体通过α-COOH和ε-NH₂缩合而成的一种同型氨基酸聚合物, 被广泛应用于食品和医药领域。目前, 作为一种生物食品防腐剂是其最主要的用途, 与乳酸链球菌素和纳他霉素并称为三大主要生物食品防腐剂。

ε-PL生产仅能通过微生物发酵法实现。能分泌ε-PL的微生物主要集中在链霉菌属、北里孢菌属和芽孢杆菌属。其中, 最早被发现的ε-PL产生菌是来源于链霉菌属微生物, 包括小白链霉菌(*Streptomyces albulus*)、淀粉酶产色链霉菌

(*Streptomyces diastatochromogenes*)、灰褐链霉菌(*Streptomyces griseofuscus*)等。由于野生型产生菌的产量极低(一般<0.2 g/L), 故借助菌株选育方法提升其合成能力是实现其工业生产的必经过程。迄今为止, 筛选前体L-赖氨酸的结构类似物和甘氨酸双抗性突变株是ε-PL生产菌选育的最主要策略^[1]。尽管该方法帮助日本成功实现了ε-PL工业化生产, 也提高了国内自主筛选的产生菌的产量^[2-3], 但工作量大、耗时长、突变位点单一且产量提高有限是其难以克服的缺陷。

近些年来, 基因组重排^[4](Genome shuffling,

基金项目: 国家自然科学基金(31301556); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51504)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918279, E-mail: 陈旭升, chenxs@jiangnan.edu.cn; 毛忠贵, maozg@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-12-07; 修回日期: 2016-02-22; 网络出版日期: 2016-05-03

GS)和核糖体工程^[5]育种技术成为链霉菌选育的有效方法^[6]。GS能避免经典诱变的繁琐过程,通过递推式的多轮融合,使多个亲株的优良性状集中于同一个细胞中,提高筛选效率。例如,弗氏链霉菌*Streptomyces fradiae*进行一轮亚硝基胍(NTG)诱变后,得到11株高产突变株,再以此为出发菌株进行2轮GS,获得的突变株合成泰乐菌素的浓度较出发菌株提高了6倍,达到20轮传统诱变才能达到的水平^[4]。褐黄孢链霉菌*Streptomyces gilvosporeus* ATCC 13326经过紫外线和5-溴尿嘧啶诱变,醋酸钠和丙酸钠的抗性筛选以及4轮GS选育,最终获得的突变株合成纳他霉素的能力提高了3.8倍^[7]。核糖体工程育种则主要是利用某些抗生素如链霉素、庆大霉素等能与微生物核糖体上作用位点结合,诱使微生物产生类似ppGpp的应急反应,启动次级代谢产物的合成^[6]。例如,通过核糖体工程育种技术,筛选*Streptomyces coelicolor* A3(2)的链霉素抗性突变株,得到了放线紫红素产量为野生型5倍和10倍的突变株^[8]。上述2种育种技术最大的优势在于无需了解菌株的代谢途径、编码生物合成酶的基因以及基因表达调控机制,这对于改造遗传背景尚不清晰的 ϵ -PL产生菌是十分有利的。

ϵ -PL分子量一般受菌株自身调控,不同菌株合成 ϵ -PL聚合度的分布范围存在差异。例如,*Streptomyces albulus* NBRC14147 (3.2–4.5 kDa)^[9],*Streptomyces* sp. USE-51 (2.3 kDa)^[10],*Kitasatospora* sp. PL6-3 (5 kDa)^[11]。另外,已有研究发现,在发酵过程中添加短链脂肪族多元醇,如五亚甲基乙二醇、甘油,能够抑制 ϵ -PL链长延伸,从而达到降低 ϵ -PL聚合度的目的^[12]。

因此,本研究利用基因组重排技术和核糖体工程2种育种手段选育 ϵ -PL高产突变株;同时,考察了出发菌和高产菌以葡萄糖和甘油为碳源的补料-分批发酵过程参数;并分析了高产菌在葡萄糖和甘油为碳源条件下合成的 ϵ -PL聚合度变化,以

期为选育 ϵ -PL高产菌和工业生产 ϵ -PL时碳源的选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 出发菌*Streptomyces albulus* M-Z18和高产突变株*Streptomyces albulus* GS114由本实验室保藏。

1.1.2 培养基: (1) 斜面/平板培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 2, 酵母粉 1, 琼脂 15, pH 7.5。(2) 再生培养基: 蔗糖 103, 葡萄糖 20, 蛋白胨 4, 酵母粉 3, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10, 微量元素溶液 2 mL, TES溶液 10 mL, 琼脂 20。灭菌后每250 mL培养基中加入无菌的 $CaCl_2$ 溶液2 mL、 KH_2PO_4 溶液2.5 mL、NaOH溶液3 mL。(3) 软琼脂培养基: 将再生培养基中的琼脂浓度改为5 g/L。(4) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, 酵母膏 5, $(NH_4)_2SO_4$ 10, KH_2PO_4 1.36, K_2HPO_4 0.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, pH 6.8。(5) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖/甘油 60, 酵母膏8, $(NH_4)_2SO_4$ 10, K_2HPO_4 4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, pH 6.8。

1.2 培养方法

1.2.1 斜面培养方法: 挑取一环孢子划线涂布于斜面培养基上, 30 °C培养7 d, 待长满孢子, 置于4 °C冰箱保存、备用。

1.2.2 平板培养方法: 从斜面上挑取适量的孢子于生理盐水中, 制成孢子悬液, 再进行浓度梯度稀释, 涂布于平板培养基上, 30 °C培养7 d。双层平板再生法: 先用再生培养基制备双层平板的第1层, 然后将融合子与灭菌并冷却至40 °C的软琼脂培养基混合, 并倾倒在第1层上, 涂布均匀, 正放于培养箱中进行融合子再生。

1.2.3 摇瓶发酵方法: 挑取一环孢子于装有40 mL种子培养基的250 mL摇瓶中, 30 °C、200 r/min培养72 h。

1.2.4 发酵罐发酵方法：挑取一环孢子于装有80 mL种子培养基的500 mL摇瓶中，30 °C、200 r/min培养30 h，制成发酵种子液；然后将种子液按8% (V/V)比例接入装有3.25 L发酵培养基中的5 L发酵罐中，发酵控制过程参照文献[13]进行。

1.3 育种方法

1.3.1 基因组重排育种：该育种策略包括亲本突变库构建和多轮原生质体融合。在亲本突变库构建阶段，出发菌株*S. albulus* M-Z18孢子先经过硫酸二乙酯(DES) (3%, W/V)处理15 min，再涂布在含有S-2-氨基乙基-L-半胱氨酸(AEC)(20 mg/mL)和甘氨酸(Gly)(8 mg/mL)抗性平板上，30 °C培养7 d，随机挑取100个左右单菌落进行转接扩培，之后每株菌接入1个摇瓶中进行产量测定，之后进行复筛，每株菌3个重复，其中产量提高的菌株构建成亲本突变库。在原生质体融合阶段，从突变库中选取4株产量提高最显著的突变株做为原生质体融合的发菌株，将4株突变株分别进行培养，随后等比例混合后制备原生质体，而后将原生质体分成2份：一份进行紫外线灭活，一份进行热灭活。在聚乙二醇(PEG6000)介导下进行原生质体融合，采用双层平板法进行再生。再生的单菌落转移到含有AEC的贝特纳平板上，挑取80–100株生长良好且孢子化较快的菌株进行扩培，每株1瓶进行摇瓶发酵，随之进行复筛，每株菌3个重复，选出产量提高突变菌株。将获得的突变株再次制备原生质体进行融合，如此反复，直到第5轮产量无明显提高为止。具体操作过程参考文献[14]。

1.3.2 核糖体工程育种：将基因组重排育种获得的*S. albulus* G4-7作为出发菌株，将其孢子经常压室温等离子体(ARTP)诱变后，涂布在含5 µg/mL的链霉素平板上，挑取单菌落经初筛复筛，选出产量较高的突变株。再将高产突变株孢子经过ARTP诱变后，涂布在含10 µg/mL的链霉素平板上，挑取单菌落再进行初筛复筛，选育高产突变

株，如此反复(链霉素浓度每轮都有5 µg/mL的梯度增长)，直至产量无明显提高为止(第5轮)。具体操作过程参考文献[15]。

1.4 ε-PL样品制备

利用*S. albulus* GS114分别以甘油和葡萄糖为碳源制备的发酵液，经菌体去除、离子交换树脂吸附和洗脱、脱色和脱盐等操作，分别获得纯度为95.6%和97.3%的ε-PL样品。具体提取过程参考文献[16]。

1.5 分析方法

ε-PL聚合度测定采用辅助激光解析电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测，以2,5-二羟基苯甲酸作为基质，具体方法参考文献[17]。菌体干重(DCW)、甘油、葡萄糖和ε-PL含量测定均按文献[18]进行。

2 结果和分析

2.1 ε-PL高产菌*S. albulus* GS114的选育过程

2.1.1 基因组重排育种：每轮融合后随机挑选约100个单菌落进行ε-PL摇瓶产量测定，选取4株产量提高最显著的突变株作为下一轮融合的发菌株，每轮4株产量提高最显著的突变株的平均ε-PL产量如图1所示。经过4轮递推式原生质体融合，最终在第4轮融合子中挑取产量提高最显著的4株菌，其中产量最高的1株菌为*S. albulus* G4-7，其ε-PL摇瓶产量为2.3 g/L，较出发菌株*S. albulus* M-Z18提高了31.4%。

2.1.2 核糖体工程育种：传统的核糖体工程育种是将出发菌的孢子直接涂布在一定浓度的抗生素平板上，再从长出的单菌落中筛选产量提高的突变株。该选育过程筛选到的突变株完全依靠孢子萌发阶段的自发突变实现，故筛选到的高产突变株几率极低。为了增大突变几率，在将*S. albulus* G4-7孢子涂布链霉素抗性平板之前先进行了

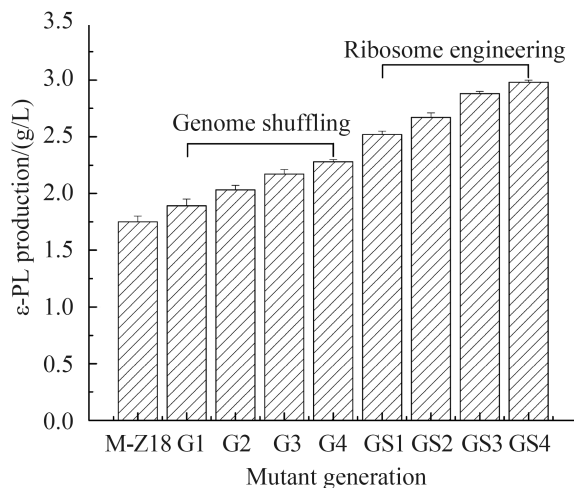


图 1. 利用原生质体融合与核糖体工程技术选育ε-PL高产菌*S. albulus* GS114的过程

Figure 1. The breeding process of *S. albulus* GS114 from progenitor strain by genome shuffling and ribosome engineering.

ARTP诱变。按照此育种策略, 共进行了4次ARTP诱变和4次递增链霉素浓度抗性平板筛选, 每轮均选出4株产量显著提高的突变株作为下轮诱变的出发菌株, 每轮4株高产突变株的平均产量如图1所示。最终, 在第4轮诱变后, 获得1株产量大幅度提高的ε-PL高产菌*S. albulus* GS4-114, 摇瓶产量达到3.0 g/L, 较出发菌*S. albulus* M-Z18和突变株*S. albulus* G4-7分别提高了66.7%和30.4%。目前, 基于物理或化学诱变手段选育高产菌是提高ε-PL产生菌合成能力的主要途径。Zong等^[15]利用ARTP诱变结合AEC+Gly抗性筛选, 将*S. albulus* A-29的ε-PL产量提高到(1.59±0.08) g/L, 较出发菌增加了4倍; Wang等^[19]利用ARTP诱变结合磺胺胍、Gly、L-赖氨酸和α-氨基-β-羟基戊酸抗性筛选, 实现*S. diastatochromogenes* L9产量达到0.77 g/L, 较出发菌提高了15%; 陈玮玮等^[2]利用DES结合AEC抗性筛选方法, 实现*Kitasatospora* sp. MY-36产量达到1.17 g/L, 比出发菌提高了3倍。本研究首次将基因组重排和核糖体工程技术集成用于ε-PL高产菌选育, 并获得1株产量达到3.0 g/L的突

变株, 这是目前国内文献报道的1株最高ε-PL合成能力的产生菌。

2.2 高产菌*S. albulus* GS114利用葡萄糖和甘油发酵生产ε-PL

葡萄糖是ε-PL发酵生产普遍使用的碳源。在利用pH冲击工艺^[13]并以葡萄糖作为碳源发酵生产ε-PL时, 高产菌*S. albulus* GS114溶氧从95%左右恢复到30%需要39 h (图2-A), 而出发菌*S. albulus* M-Z18恢复到溶氧30%却需要99 h (图2-B), 说明突变菌应对低pH值胁迫(pH 3.0)具有更强的适应性。从菌体生长角度来看, *S. albulus* GS114从78 h左右菌体生长进入平稳期, 此时菌体干重达到33 g/L左右(图2-A); *S. albulus* M-Z18从144 h进入平稳期, 菌体干重达到50 g/L左右(图2-B), 表明突变株菌体生长能力相比于出发菌明显减弱。然而, 从最终的ε-PL产量来看, *S. albulus* GS114在178 h实现ε-PL产量达到43.4 g/L, *S. albulus* M-Z18在192 h实现ε-PL产量达到39.1 g/L, 产量提高了11%。从每天的单位菌体合成ε-PL能力来看(图2-C), *S. albulus* GS114的ε-PL比合成速率在发酵周期内明显优于*S. albulus* M-Z18, 尤其在第4天和第6天, 表明在以葡萄糖作为碳源时, 突变株*S. albulus* GS114的单位菌体在单位时间内合成ε-PL能力得到显著提升。

利用工业甘油作为碳源是本实验室建立的1种新型ε-PL发酵方式^[20]。为了进一步评估突变株的发酵性能优势, 本研究继续在pH冲击工艺下考察了2菌株在以甘油为碳源的培养基上发酵参数, 实验结果如图2-(D-F)所示。从图2-D和图2-E中可以看出, 突变株*S. albulus* GS114在192 h实现ε-PL产量达到45 g/L, 比出发菌*S. albulus* M-Z18提高了12.5%; 相反, *S. albulus* GS114菌体干重比*S. albulus* M-Z18减少了36.4%, 达到35 g/L。值得注意的是, 以甘油为碳源时, *S. albulus* GS114从84 h进入平稳期, 而*S. albulus* M-Z18从168 h进入平稳期。

表1汇总了国内外具有代表性的 ϵ -PL发酵水平。突变株*S. albus* GS114较出发菌*S. albus* M-Z18在 ϵ -PL发酵过程中发生了明显变化： ϵ -PL产量、 ϵ -PL产率和 ϵ -PL得率均比出发菌分别提高了

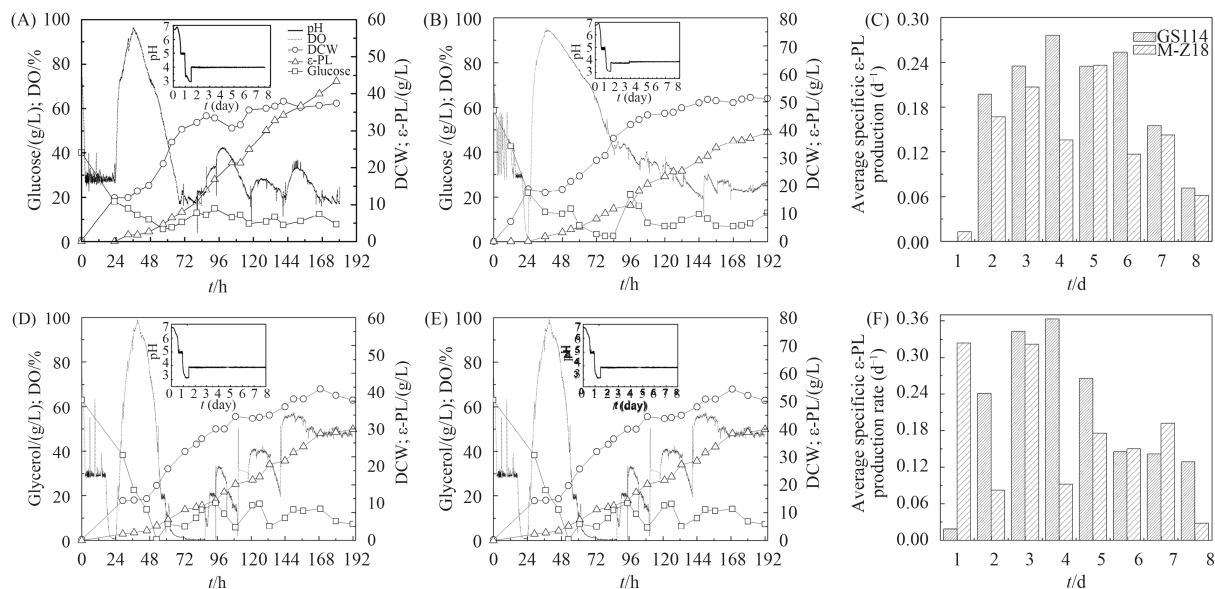


图 2. 高产菌*S. albus* GS114(A、D)和出发菌*S. albus* M-Z18(B、E)在pH冲击策略下以葡萄糖(A-C)和甘油(D-F)为碳源发酵生产 ϵ -PL的过程参数

Figure 2. The effect of glucose and glycerol on fermentation parameters for ϵ -PL production by *S. albus* GS114 and *S. albus* M-Z18 using pH-shock strategy. A, D: process fermentation parameters of *S. albus* GS114 on glucose and glycerol, respectively; B, E: process fermentation parameters of *S. albus* M-Z18 on glucose and glycerol, respectively; C, F: average specific production rate of *S. albus* GS114 and *S. albus* M-Z18 on glucose and glycerol, respectively.

表1. 代表性国内外 ϵ -PL发酵水平比较

Table 1. Comparison of ϵ -PL fermentation parameters among typical ϵ -PL producing strains

Microorg anisms	Carbon source	t (fermentati on time)/h	c (DCW)/(g/L)	c (ϵ -PL production)/(g/L)	ϵ -PL productivity/[g/(L·d)]	ϵ -PL yield/%	Referenc es
<i>S. albus</i> S410	Glucose	192.0	25	48.3	6.1	18.6	[21]
<i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	Glucose	87.6	~20.0	34.1	9.3	/	[22]
<i>S. albus</i> TUST2	Glucose	96.0	20.0	20.0	5.0	/	[23]
<i>Streptomyces</i> sp. GIM8	Glucose	195.0	8.5	23.4	2.9	/	[24]
<i>S. albus</i> PD-1	Glucose	168.0	33.8	30.8	4.4	/	[25]
<i>S. albus</i> M-Z18	Glucose	192.0	51.2	39.1	4.9	7.6	This study
<i>S. albus</i> GS114	Glycerol	192.0	33.6	45.7	5.7	11.9	
<i>S. albus</i> GS114	Glucose	178.0	38.9	43.4	5.8	10.2	

/: represent that the data is not known.

12.8%、16.9%和32.5%；菌体干重却从51 g/L下降到36 g/L，减少了29.4%。这说明经过基因组改组和核糖体工程两种育种手段选育获得的突变株*S. albulus* GS114，具有更高效的 ϵ -PL合成能力和碳源转化率。本研究获得突变株*S. albulus* GS114的 ϵ -PL发酵水平，在 ϵ -PL产量和产率方面，明显优于*S. albulus* TUST2、*Streptomyces* sp. GIM8和*S. albulus* PD-1；但较*S. albulus* S410还存在着显著差距，特别是 ϵ -PL得率低了41.7%。造成 ϵ -PL得率低的主要原因在于*S. albulus* GS114发酵过程中菌体量比*S. albulus* S410高引起的(45%)。因此，通过菌种改造或发酵工艺优化进一步降低菌体量和提高 ϵ -PL产量是下步提高*S. albulus* GS114的 ϵ -PL得率的努力方向。

2.3 不同碳源对高产菌*S. albulus* GS114合成的 ϵ -PL聚合度的影响

将出发菌株*S. albulus* M-Z18和高产菌*S. albulus* GS114分别在葡萄糖和甘油培养基中发酵生产的 ϵ -PL提取纯化后，借助MALDI-TOF-MS对

ϵ -PL聚合度的分布进行分析，结果如图3所示。

从图3-A和图3-B可以看出，*S. albulus* GS114在甘油和葡萄糖培养基中合成的 ϵ -PL表现出显著差异，主要体现在：(1) 聚合度分布范围变宽，甘油培养基中 ϵ -PL聚合度分布范围为10–32；葡萄糖培养基中 ϵ -PL聚合度分布范围为20–34。(2) 聚合度变低，甘油培养基中 ϵ -PL主峰聚合度为25，最大聚合度为32；葡萄糖培养基中 ϵ -PL主峰聚合度为30，最大聚合度为34。上述实验结果说明，以甘油作为碳源能够显著降低*S. albulus* GS114合成的 ϵ -PL链长。值得注意的是，甘油和葡萄糖对出发菌株*S. albulus* M-Z18合成 ϵ -PL聚合度分布的影响与*S. albulus* GS114一致。这表明突变菌株*S. albulus* GS114在不同碳源条件下生产的 ϵ -PL聚合度的改变并非菌株改造所致。

Nishikawa发现*Streptomyces mashuensis* MN-6利用甘油作为碳源能少引起 ϵ -PL聚合度的降低^[13]。为了显著降低 ϵ -PL聚合度，Nishikawa建立

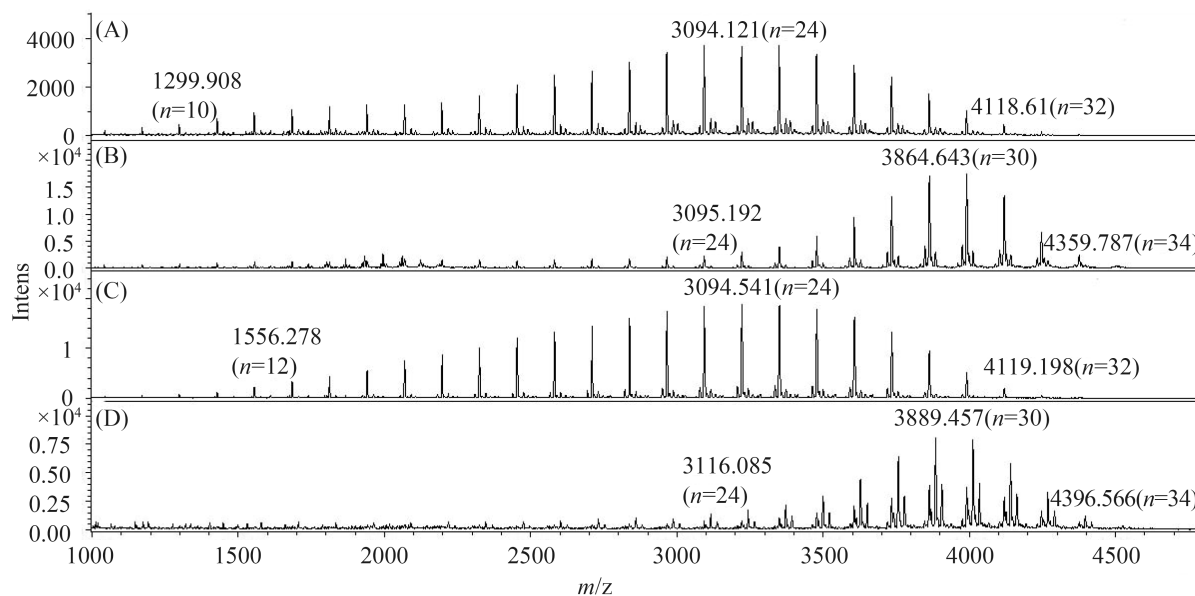


图 3. 碳源对不同菌株生产的 ϵ -PL聚合度分布的影响

Figure 3. Effect of carbon source and strains on polymerization degree of ϵ -PL produced by different strains. $M_r=146.19n-18.02$ ($n-1$), M_r : molecular mass, n : degree of polymerization. A: *S. albulus* GS114 with glycerol; B: *S. albulus* GS114 with glucose; C: *S. albulus* M-Z18 with glycerol; D: *S. albulus* M-Z18 with glucose.

了一种利用甘油作为碳源，并在发酵过程中添加0.6%碘化 β -环糊精的方法，实现 ϵ -PL聚合度由28.6下降到12.9。相比于需要辅助碘化 β -环糊精实现 ϵ -PL聚合度降低，本研究利用*S. albulus* GS114以甘油为碳源即可达到降低 ϵ -PL聚合度的效果，在实际工业生产中具有更低的生产成本和更简单的生产过程优势。

3 结论

本研究通过基因组重排和核糖体工程育种手段，成功实现出发菌*S. albulus* M-Z18摇瓶 ϵ -PL产量从1.75 g/L提高到3.0 g/L，提高了71.4%。进一步的发酵实验显示，经过192 h补料-分批发酵，*S. albulus* GS114以葡萄糖为碳源实现 ϵ -PL产量达到43.4 g/L，以甘油为碳源 ϵ -PL产量达到45.7 g/L，较出发菌*S. albulus* M-Z18分别提高了11%和14.9%。通过分析*S. albulus* GS114以葡萄糖和甘油为碳源生产的 ϵ -PL聚合度分布范围，发现以甘油作为碳源可以使得 ϵ -PL聚合度降低且分布范围变宽，有利于制备低聚合度 ϵ -PL。

参考文献

- [1] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, Izumi Y. Improved ϵ -poly-L-lysine production of an *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsu Kagaku Kaishi*, 1998, 76: 487–493.
- [2] Chen WW, Zhu HY, Xu H. Breeding of mass-producing ϵ -polylysine mutant and its batch fermentation. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(2): 28–30. (in Chinese)
陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹. ϵ -聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究. *工业微生物*, 2007, 37(2): 28–30.
- [3] Cong ML, Xu P, Tan ZL, Mo ZW, Jia SR. Mutation screening of a high ϵ -polylysine-producing strains by nitrogen ion implantation. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(5): 491–493, 506. (in Chinese)
丛茂林, 许鹏, 谭之磊, 莫治文, 贾士儒. 氮离子入法筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌株. *现代食品科技*, 2009, 25(5): 491–493, 506.
- [4] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WPC, Del Cardayré SB. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, 415(6872): 644–646.
- [5] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(6): 1373–1386.
- [6] Zhao WT, Zou Y, Hu CH. Novel methods and strategies for strain improvement. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(6): 801–805. (in Chinese)
赵文婷, 邹懿, 胡昌华. 微生物菌种改良的新方法新策略. *生物工程学报*, 2009, 25(6): 801–805.
- [7] Luo JM, Li JS, Liu D, Liu F, Wang YT, Song XR, Wang M. Genome shuffling of *Streptomyces gilvosporeus* for improving natamycin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(23): 6026–6036.
- [8] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(6): 532–535.
- [9] 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(7): 3575–3581.
- [10] Hirohara H, Takehara M, Saimura M, Masayuki A, Miyamoto M. Biosynthesis of poly (ϵ -L-lysine)s in two newly isolated strains of *Streptomyces* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(2): 321–331.
- [11] 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(12): 1459–1463.
- [12] 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.
- [13] Ren XD, Chen XS, Zeng X, Wang L, Tang L, Mao ZG. Acidic pH shock induced overproduction of ϵ -poly-L-lysine in fed-batch fermentation by *Streptomyces* sp. M-Z18 from agro-

- industrial by-products. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(6): 1113–1125.
- [14] Li S, Li F, Chen XS, Wang L, Xu J, Tang L, Mao ZG. Genome shuffling enhanced ϵ -poly-L-lysine production by improving glucose tolerance of *Streptomyces graminearus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(2): 414–423.
- [15] Zong H, Zhan Y, Li X, Peng LJ, Feng FQ, Li D. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(13): 3154–3158.
- [16] Han D, Chen XS, Zhen B, Liu QR, Mao ZG. Purification of a novel microbial food preservative ϵ -polylysine from fermentation broth. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(6): 221–226. (in Chinese)
韩岱, 陈旭升, 甄斌, 刘庆瑞, 毛忠贵. 新型生物食品防腐剂 ϵ -聚赖氨酸的提取. *食品与发酵工业*, 2014, 40(6): 221–226.
- [17] Nishikawa M. Molecular mass control using polyanionic cyclodextrin derivatives for the epsilon-poly-L-lysine biosynthesis by *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(4): 295–298.
- [18] Chen XS, Ren XD, Dong N, Li S, Li F, Zhao FL, Tang L, Zhang JH, Mao ZG. Culture medium containing glucose and glycerol as a mixed carbon source improves ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(3): 469–475.
- [19] Wang T, Jia SR, Tan ZL, Dai YJ, Song S, Wang GL. Mutagenesis and selective breeding of a high producing ϵ -poly-L-lysine strain. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2012, 6(2): 179–183.
- [20] Chen XS, Li S, Liao LJ, Ren XD, Li F, Tang L, Zhang JH, Mao ZG. Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces* sp. M-Z18 from glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(5): 561–567.
- [21] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, Park EY, Okabe M. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(2): 190–194.
- [22] Hang 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(14): 5523–5527.
- [23] Jia SR, Wang GL, Sun YF, Tan ZL. Improvement of epsilon-poly-L-lysine production by *Streptomyces albulus* TUST2 employing a feeding strategy//Proceedings of the 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Beijing, China: IEEE, 2009: 1–4, doi: 10.1109/ICBBE.2009.5162940.
- [24] Liu SR, Wu QP, Zhang JM, Mo SP. Production of ϵ -poly-L-lysine by *Streptomyces* sp. using resin-based, *in situ* product removal. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(8): 1581–1585.
- [25] Bo FF, Xu ZX, Sun ZZ, Cao CH, Xia J, Xu H, Feng XM. Effect of oxygen-vectors on the production of ϵ -poly-L-lysine. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(3): 431–435. (in Chinese)
薄芳芳, 许召贤, 孙朱贞, 曹长虹, 夏军, 徐虹, 冯小海. 氧载体对小白链霉菌发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的影响. *生物工程学报*, 2015, 31(3): 431–435.

Breeding and fermentation performance of a high-yield ϵ -poly-L-lysine producing strain

Gencheng Zheng, Liang Wang, Yang Gao, Jinxin Xiang, Xusheng Chen^{*}, Zhonggui Mao^{*}

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] A high yield of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) producing strain was bred, and the effect of different carbon sources on fermentation performance was studied. [Methods] Genome shuffling and ribosome engineering were used to enhanced strain's productivity, and pH shock strategy was used to fermentation using different carbon sources. [Results] After four rounds of genome shuffling and ribosome engineering, we obtained a high yield mutant *Streptomyces albulus* GS114 with ϵ -PL productivity of 3.0 g/L, which was 1.7 folds than that of the initial strain. When we performed fed-batch fermentation using glucose and glycerol as carbon sources in a 5-L fermenter, ϵ -PL productions reached 43.4 and 45.7 g/L after 192 h fed-batch fermentations, which were increased by 11.0 % and 14.9 % than that of *Streptomyces albulus* M-Z18, respectively. Meanwhile, the dry cell weights decreased by 24.0% and 33.2%, and ϵ -PL yields increased by 34.2% and 30.7%, respectively. [Conclusion] Genome shuffling and ribosome engineering are effective to breed high yield strains.

Keywords: ϵ -poly-L-lysine, *Streptomyces*, genome shuffling, ribosome engineering, degree of polymerization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Found/ation of China (31301556) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51504)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918279; E-mail: Xushen Chen, chenxs@jiangnan.edu.cn; Zhonggui Mao, maozg@jiangnan.edu.cn

Received: 7 December 2015; Revised: 22 February 2016; Published online: 3 May 2016