



小白链霉菌 ϵ -聚赖氨酸降解酶生理功能分析

刁文娇, 朱道君, 潘龙, 陈旭升*

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

摘要: 【目的】研究小白链霉菌(*Streptomyces albulus*)中 ϵ -聚赖氨酸降解酶(Pld)的分布特征和生理功能。【方法】利用生物信息学手段对已报道的 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)产生菌的Pld进行挖掘和分析, 再通过遗传学方法对小白链霉菌M-Z18基因组中存在的两种*pld*进行敲除、回补和过表达, 最后研究重组菌降解 ϵ -PL能力、最小 ϵ -PL抑制浓度(MIC)及其合成 ϵ -PL情况。【结果】Pld I 和Pld II 广泛且同时分布于小白链霉菌中, 蛋白序列高度保守; Pld I、Pld II 在小白链霉菌M-Z18中均能行使降解 ϵ -PL的功能, 但Pld II 降解活性占主导地位且Pld I 和Pld II 对降解 ϵ -PL具有协同作用; *pld I*、*pld II*过表达重组菌对 ϵ -PL的MIC值显著提高, 其中双过表达*pld I*和*pld II*菌株对 ϵ -PL的MIC值是出发菌株的2.19倍。构建的*pld*重组菌与出发菌株相比, 在考察pH值范围内(pH 3.0–5.5)的 ϵ -PL产量未表现出显著差异。【结论】小白链霉菌中广泛分布Pld I 和Pld II 且序列高度保守, 主要生理功能是保护小白链霉菌在中性环境中免受自身产物 ϵ -PL的抑制。

关键词: 小白链霉菌, ϵ -聚赖氨酸, ϵ -聚赖氨酸降解酶, 基因敲除

小白链霉菌(*Streptomyces albulus*)是 Shima 和 Sakai 于 1977 年从土壤中分离得到的 1 株能够产生生物碱物质的放线菌, 该生物碱物质经化学结构鉴定, 确定为 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, 简写 ϵ -PL)^[1]。由于 ϵ -PL 对细菌、酵母和真菌等微生物和病毒具有较强的抑制活性, 且其水溶性好、耐高温、安全性高, 故被开发用作一种天然防腐剂, 广泛用于食品和化妆品领域^[2–4]。

目前, 小白链霉菌是工业生产 ϵ -PL 的主要生产菌, 也被用作 ϵ -PL 研究的模式菌株。发酵生产 ϵ -PL 的关键控制要素就是 ϵ -PL 积累阶段的 pH 值要控制在酸性环境(pH 4.0 左右), 其主要原因是抑制小白链霉菌中 ϵ -PL 分解酶(Pld)活性, 避免已合成的 ϵ -PL 被分解^[5–6]。为此, 研究者们研究了 ϵ -PL 产生菌中的 Pld 酶学性质, 以期更精准控制发酵过程 pH 值, 实现更高浓度 ϵ -PL 积累。Kito

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20191332); 国家自然科学基金(31671846); 国家重点研发计划(2020YFA0907700)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918296; E-mail: chenxs@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-02-01; 修回日期: 2021-05-01; 网络出版日期: 2021-05-11

等首次从小白链霉菌中分离纯化到 Pld, 发现其是一种亚基分子量为 54 kDa、分布于细胞膜中的氨肽酶, 在中性 pH 环境能够从 ϵ -PL 的 N 端将赖氨酸残基一个一个地水解下来, 其分解活性随 pH 值降低而迅速下降^[5]。随后, 冯小海^[7]和谭之磊^[8]等相继在 ϵ -PL 产生菌 *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012 和淀粉酶产生菌 *TUST2* 中分离纯化到相似性质的 Pld。有趣的是, Kito 等在 ϵ -PL 耐受菌 *Sphingobacterium multivorum* OJ10 中分离纯化到外切型 Pld^[9], 而在另一株 ϵ -PL 耐受菌 *Chryseobacterium* sp. OJ7 中分离纯化到内切型 Pld^[10]。

为了研究 Pld 在 *S. albulus* CR1 中的生理功能, Hamano 等构建了一株 Pld 失活菌株 *S. albulus* CRM001。研究发现, *S. albulus* CRM001 降解 ϵ -PL 能力有所下降, 但仍存在较强的 ϵ -PL 降解活性, 推测 Pld 失活菌株 *S. albulus* CRM001 可能还存在另外一种能降解 ϵ -PL 的降解酶^[6]。随后, Yamanaka 等在 *S. albulus* CR001 中发现了第二种 Pld (Pld II), 该分解酶基因编码 467 个氨基酸, 计算分子量为 51.9 kDa, 其氨基酸序列与 Pld I 具有 36%一致性和 51%相似性。通过在 *S. albulus* CRM001 菌株中敲除 *pld II* 基因, 发现敲除株 *S. albulus* CRM004 完全丧失了降解 ϵ -PL 能力, 同时发现 Pld II 通过内切方式降解 ϵ -PL^[11]。由此可见, *S. albulus* 中同时存在 2 个 Pld, 一个为外切型(命名为 Pld I), 另一个为内切型(命名为 Pld II)。巧合的是, 我们实验室前期在研究小白链霉菌 M-Z18 分解酶时, 意外地分离纯化到 Pld II, 成为目前唯一被分离纯化和研究酶学性质的 Pld II^[12]。研究发现, Pld II 同样也是一种膜蛋白, 其酶促反应的最适温度为 37 °C、最适 pH 为

7.0, 降解活性随 pH 降低而快速下降, 能够通过内切方式降解 ϵ -PL^[12]。

综上所述, ϵ -PL 产生菌中存在两种不同降解方式的 Pld。然而, 两种 Pld 是否广泛分布于 ϵ -PL 产生菌, 以及 2 种 Pld 是否具有协同生理功能等问题仍然不清楚。为此, 本研究以小白链霉菌 M-Z18 为研究对象, 通过基于全基因组的 Pld 序列搜索, 考察了 2 种 Pld 在 6 株 ϵ -PL 产生菌中的分布情况和同源性; 再通过基因敲除、回补和过表达等遗传手段, 构建了 *pld I* 或/和 *pld II* 敲除、回补和过表达重组菌; 最后研究了重组菌降解 ϵ -PL 的过程、对 ϵ -PL 抗性变化以及对合成 ϵ -PL 的影响, 以期揭示 Pld I 和 Pld II 在小白链霉菌 M-Z18 中发挥的生理功能。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

小白链霉菌 M-Z18 由本实验室保藏。由小白链霉菌 M-Z18 衍生而来的 *pld* 敲除株、回补过表达菌株均由本研究构建。敲除载体 pKC1132 由张克诚老师课题组惠赠。用于回补、过表达菌株构建的整合型质粒 pIB139 由山东大学王浩鑫老师惠赠。本研究所用的菌株和质粒见表 1。所用引物(表 2)由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

研究中用到的限制性内切酶、基因组提取试剂盒、片段纯化试剂盒和质粒提取试剂盒购自 TaKaRa (大连)有限公司; ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit、2×Phanta[®] Max Master Mix 购自诺唯赞生物科技(南京)有限公司; 卡那霉素(Km)、安普霉素(Am)、氯霉素(Cm)、萘啶酮酸

表 1. 菌株与质粒
Table 1. Strains and plasmids

Strains/plasmids	Features	Source
<i>Streptomyces albulus</i>		
M-Z18	A mutant of <i>S. albulus</i> Z-18, ϵ -PL production strain	Our laboratory
$\Delta pldI$	<i>pldI</i> deletion mutant	This study
$\Delta pldII$	<i>pldII</i> deletion mutant	This study
$\Delta pldI\Delta pldII$	<i>pldI</i> & <i>pldII</i> deletion mutant	This study
$\Delta pldI::pldI$	<i>pldI</i> complementation strain	This study
$\Delta pldII::pldII$	<i>pldII</i> complementation strain	This study
$\Delta pldI\Delta pldII::pldIpldII$	<i>pldI</i> & <i>pldII</i> complementation strain	This study
OE- <i>pldI</i>	<i>pldI</i> overexpression strain	This study
OE- <i>pldII</i>	<i>pldII</i> overexpression strain	This study
OE- <i>pldIpldII</i>	<i>pldI</i> & <i>pldII</i> overexpression strain	This study
Control-pIB139	M-Z18 harboring the pIB139 plasmid	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cloning host	Our laboratory
ET12567 (pUZ8002)	Methylation-deficient, intergeneric conjugation	Our laboratory
Plasmids		
pKC1132	<i>oriT</i> , suicide plasmid, <i>aac(3) IV</i> , <i>E. coli-Streptomyces shuttle vector</i>	Gift from professor Zhang Kecheng
pIB139	<i>oriT</i> , P _{ermE*} , integrative plasmid, <i>aac(3) IV</i>	Gift from professor Wang Haoxin
pKC1132- <i>pldI</i>	<i>pldI</i> deletion plasmid	This study
pKC1132- <i>pldII</i>	<i>pldII</i> deletion plasmid	This study
pIB139- <i>pldI</i>	<i>pldI</i> complementation and overexpression plasmid	This study
pIB139- <i>pldII</i>	<i>pldII</i> complementation and overexpression plasmid	This study
pIB139- <i>pldIpldII</i>	<i>pldI</i> & <i>pldII</i> complementation and overexpression plasmid	This study

(Nal)、50×TAE 缓冲液等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; ϵ -聚赖氨酸标准品购自郑州拜纳佛生物工程股份有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

PCR 仪、凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司; 电泳仪购自北京市六一仪器厂; 高效液相色谱仪戴安 U-3000 购自赛默飞世尔科技公司; 微量分光光度计 K5800 购自北京凯奥科技发展有限公司; 分光光度计购自优尼科仪器有限公司。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): NaCl 10; 胰蛋白胨 10; 酵母提取物 5; 琼脂粉 20 (固体培养基), pH 7.0。

若需要添加抗生素, Km、Am 和 Cm 添加的终浓度分别为 50 μ g/mL、50 μ g/mL 和 25 μ g/mL。大肠杆菌采用 LB 培养基在 37 °C 下 200 r/min 进行培养。

BTN 琼脂培养基(g/L): 葡萄糖 10; 蛋白胨 2; 酵母提取物 1; 琼脂 20, pH 7.5。若需要添加抗生素, Am、Nal 添加的终浓度为 50 μ g/mL、25 μ g/mL。此培养基为链霉菌的产孢培养基。

种子培养基(M3G) (g/L): 葡萄糖 50; 酵母提取物 5; (NH₄)₂SO₄ 10; KH₂PO₄ 1.36; K₂HPO₄·3H₂O 0.8; MgSO₄·7H₂O 0.5; ZnSO₄·7H₂O 0.04; FeSO₄·7H₂O 0.03, pH 6.8。此培养基用于链霉菌发酵时的种子培养。从产孢平板上刮 3 环孢子接

表 2. 本研究中所用引物
Table 2. Sequence of primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Function
Primers for gene knockout		
<i>PldIU</i> -F	AcgacggccagtcgcaagcttGACGGTGTCTGGGCGGTG (<i>Hind</i> III)	Amplification the upstream sequences of <i>pldI</i>
<i>PldIU</i> -R	acttctctcggcgaCGGTGGGGTGGTCTGTTGC	
<i>PldID</i> -F	caccgTCGCCGAGAAGAAGTCCGG	Amplification the downstream sequences of <i>pldI</i>
<i>PldID</i> -R	CatgattacgaattcgatataACAACCCGAGCCCCGAAC (<i>EcoR</i> V)	
<i>PldIyz</i> -F	GTGTCGGTGAGATGTCGGTC	Verification of <i>pldI</i> knockout
<i>PldIyz</i> -R	CGCTCTTCTCGCCTACTGG	
<i>PldIIU</i> -F	AcgacggccagtcgcaagcttCCCAAGAAGTACGGCACCC (<i>Hind</i> III)	Amplification upstream sequences of <i>pldII</i>
<i>PldIIU</i> -R	acaccGCGACATCTGGCTCAACGA	
<i>PldIID</i> -F	tgagccagatgtcgcGGTGTCTGGGCGTAGGTG	Amplification downstream sequences of <i>pldII</i>
<i>PldIID</i> -R	CatgattacgaattcgatataATCGTCGGCGGAATCC (<i>EcoR</i> V)	
<i>PldIIyz</i> -F	GACCTGTCTGCTGTCTTCC	Verification of <i>pldII</i> knockout
<i>PldIIyz</i> -R	CAGACCCACCTCTTCCAC	
Primers for gene complementation and overexpression		
<i>SCPldI</i> -F	GgttgtaggattccacatataGCCTGCGATGCGTACATAAGC (<i>Nde</i> I)	Amplification the <i>pldI</i> gene for single complementation/single overexpression
<i>SCPldI</i> -R	CtatgacatgattcgaattcTCAGTGACCGGCGTGCAC (<i>EcoR</i> I)	
<i>SCPldII</i> -F	GgttgtaggattccacatataCCCGGCACGCGCGGAGGG (<i>Nde</i> I)	Amplification the <i>pldII</i> gene for single complementation/single overexpression
<i>SCPldII</i> -R	CtatgacatgattcgaattcTCAGGCCGCGAGCGCGGG (<i>EcoR</i> I)	
<i>DCPldI</i> -F	tgaGCGTACATAAGCTCCGTAAGAGATC	Amplification the <i>pldI</i> gene for double complementation/double overexpression
<i>DCPldI</i> -R	CtatgacatgattcgaattcTCAGTGACCGGCGTGCAC (<i>EcoR</i> I)	
<i>DCPldII</i> -F	GgttgtaggattccacatataCGGCACGCGCGGAGGGAG (<i>Nde</i> I)	Amplification the <i>pldII</i> gene for double complementation/double overexpression
<i>DCPldII</i> -R	acggagcttatgtacgcTCAGGCCGCGAGCGCGGGCA	
Primers for gene complementation and overexpression verification		
<i>PldIsyz</i> -F	TTGCGCCCGATGCTAGTCG	Verification of <i>pld</i> gene complementation and overexpression
<i>PldIIsyz</i> -F		
<i>PldIPldII</i> dyz-F		
<i>PldIsyz</i> -R	GCACGACAGGTTTCCCGACTG	
<i>PldIIsyz</i> -R		
<i>PldIPldII</i> dyz-R		

The sequences of restriction sites are underlined.

入 M3G 种子培养基, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 用作种子液。

MS 培养基(g/L): 甘露醇 20; 黄豆粉 20; 琼脂 20。灭菌后加入 MgCl₂ 至终浓度 10 mmol/L。

YT 培养基(2×) (g/L): 胰蛋白胨 16; 酵母提取物 10; NaCl 5, pH 7.0。

营养肉汤培养基(g/L): 胰蛋白胨 10; 牛肉膏 3; 氯化钠 5, pH 7.0。

第一阶段菌体生长培养基(g/L): 甘油 10; 酵母粉 5; MgSO₄·7H₂O 0.5; KH₂PO₄ 0.13; Na₂HPO₄·12H₂O 0.14, pH 6.8。

第二阶段 ε-PL 合成培养基(g/L): 葡萄糖 50; 柠檬酸 40; (NH₄)₂SO₄ 10。NaOH 调至所需 pH。

1.4 生物信息学分析所用网站

SignalP 3.0 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>。

TMHMM Server v.2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>。

PROSITE: <http://www.expasy.org/prosite>。

1.5 *pld* 基因单敲除株及双敲除株的构建

采用同源重组的方法进行基因无痕敲除,原理如图 1 所示。以小白链霉菌 M-Z18 的基因组为模板,PCR 扩增得到 *pld I*、*pld II* 基因的上下游同源臂,扩增 *pld I* 上游同源臂所用的引物为 *Pld I* U-F 和 *Pld I* U-R,下游同源臂扩增所用引物为 *Pld I* D-F 和 *Pld I* D-R。*pld II* 上下游同源臂扩增引物分别为 *pld II* U-F/*pld II* U-R、*pld II* D-F/*pld II* D-R。具体序列见表 2。PCR 产物经纯化后与线性化的载体(pKC1132)通过一步克隆连接,转化至 *E. coli* DH5 α 感受态中,挑选具有安普霉素抗性的菌落培养 12–16 h,提取重组质粒 pKC1132-*pld I*、pKC1132-*pld II* 进行酶切验证。经验证成功的重组质粒转化 *E. coli* ET12567 后经接合转移(步骤见

1.7)转入小白链霉菌 M-Z18 中,在抗性平板(Am、Nal)上筛选出接合子,将接合子在无抗平板上无抗松弛培养三代后,进行影印接种选择对 Am 敏感的菌株进行 PCR 验证,根据野生型和敲除株 PCR 产物长度不同来筛选正确的突变株。

双敲除菌株的构建:将构建好的重组质粒 pKC1132-*pld II* 经接合转移转入 Δ *Pld I* 菌株中,后续步骤同上。

1.6 *pld* 基因回补和过表达菌株的构建

pld 基因单回补和单过表达菌株的构建:以小白链霉菌 M-Z18 的基因组为模板,分别设计引物 *SCPld I* -F/*SCPld I* -R、*SCPld II* -F/*SCPld II* -R 对基因 *pld I*、*pld II* 进行扩增。将扩增的片段与线性化的 pIB139 载体进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态,挑取转化子在含有 Am 抗性的 LB 培养基中培养 12–16 h。提取质粒进行双酶切验证。验证正确的质粒转化 *E. coli* ET12567 经接合转移将重

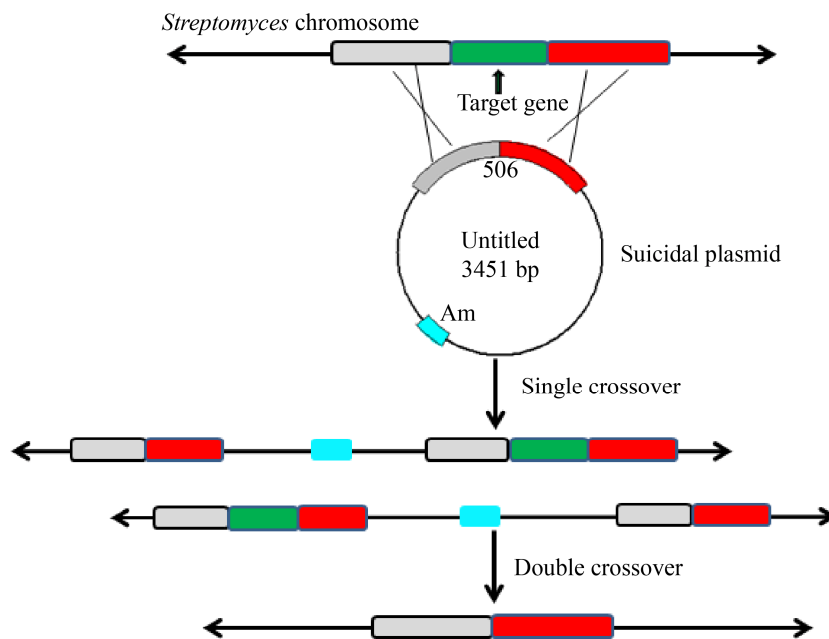


图 1. 同源双交换原理图

Figure 1. The strategy of double crossover for gene deletion.

组质粒整合到相应的 $\Delta pld I$ 、 $\Delta pld II$ 及小白链霉菌 M-Z18 基因组中, 构建相应的回补和过表达菌株。

pld 双回补及双过表达菌株的构建: 以小白链霉菌 M-Z18 的基因组为模板, 分别利用引物 DC*Pld I*-F/DC*Pld I*-R、DC*Pld II*-F/DC*Pld II*-R 扩增出 *pld I* 和 *pld II* 基因。将 *pld I*、*pld II* 片段与线性化的 pIB139 载体通过一步克隆进行连接, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态, 提取转化子培养, 提质粒进行验证, 正确的质粒命名为 pIB139-*pld I pld II*。将正确质粒通过接合转移整合到 $\Delta pld I \Delta pld II$ 及小白链霉菌 M-Z18 基因组中。将有安普霉素抗性的菌株提取基因组后进行 PCR 验证。

pIB139 质粒可以通过整合位点将表达质粒整合到链霉菌基因组中, 从而实现目标基因的回补和过表达。为了排除质粒在基因组中存在的影 响, 我们将空载质粒 pIB139 通过接合转移整合到小白链霉菌 M-Z18 基因组中, 获得的菌株作为对照。

1.7 接合转移

将正确的重组质粒转化 *E. coli* ET12567 (pUZ8002) 后, 挑取单菌落接种含 Am、Cm 和 Km 的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 过夜培养。以 1.0% (V/V) 的接种量转接同样含有以上 3 种抗生素的 50 mL LB 培养基, 继续培养至 OD_{600} 达到 0.4–0.6 之间。于 4 °C 离心收集菌体, 用同体积的 LB 液体培养基洗涤 2 次除去抗生素, 洗涤好的菌体用 1/10 体积的 LB 培养基重悬并置于冰上备用。与此同时, 刮取新鲜培养的小白链霉菌 M-Z18 孢子至无菌水中, 充分打散后过滤, 制备孢子悬浮液(约 10^8 个/mL)。50 °C 热激 10 min, 冷却至室温后加入同等体积的 2×YT 孢

子预萌发培养基, 37 °C 培养 2.5–3.0 h 让孢子萌发, 收集萌发后的孢子用 500 μ L 的 2×YT 重悬。取 500 μ L 已培养好的 *E. coli* ET12567 和 500 μ L 预萌发的孢子充分混匀, 浓缩至 100 μ L, 涂布 MS 培养基, 30 °C 倒置培养 18 h。18 h 后覆盖安普霉素 50 μ g/mL 和萘啶酮酸 25 μ g/mL, 继续培养 3–4 d, 挑取接合子划线含有 Am 和 Nal 的 BTN 平板, 待接合子长出孢子后于无抗平板上松弛培养三代, 刮取孢子制成孢子悬浮液, 并稀释涂布无抗 BTN 平板, 30 °C 倒置培养 4–5 d。对单菌落进行影印接种, 选择在 Am 抗性平板上不生长在无抗平板上生长的菌株进行 PCR 验证。

1.8 重组菌降解 ϵ -PL 活性的测定

测定方法参考文献[11]并稍作修改。将培养的种子液按 8.0% (V/V) 接种量转接菌体生长培养基, 30 °C 培养 12 h。于 4 °C 离心收集菌丝体, 然后用 100 mmol/L MES 缓冲液(pH 6.0)洗涤 2 次。将 100 mg 菌体(湿重)加入到含有 10 mg/mL ϵ -PL 的 MES 缓冲液中。振荡孵育 3 h 后通过离心除去菌丝体, 用 HPLC 分析上清液中 ϵ -PL 的聚合度分布。

1.9 重组菌的 ϵ -PL 最小抑制浓度(MIC)测定

将出发菌株小白链霉菌 M-Z18 及各重组菌的种子液按 1.0% (V/V) 接种量接入含有不同 ϵ -PL 浓度的 10 mL 营养肉汤培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 48 h, 根据菌体生长情况获得 MIC 值。

1.10 重组菌在不同 pH 值下合成 ϵ -PL 情况

采用两阶段恒定 pH 发酵方法进行重组菌 ϵ -PL 产量的评估^[13]。两阶段恒定 pH 发酵: 第一阶段为菌体生长阶段, 此阶段主要用于菌体培养; 第二阶段为 ϵ -PL 合成阶段, 将第一阶段收集

的菌体洗涤后重悬入含有葡萄糖、硫酸铵的不同 pH 柠檬酸缓冲液中进行 ϵ -PL 生物合成, 此阶段主要用于 ϵ -PL 积累。具体操作步骤如下: 刮 3 环出发菌株小白链霉菌 M-Z18 及各重组菌孢子接种 M3G 种子培养基, 将种子液按 8.0% (V/V) 接种量接种至第一阶段的菌体生长培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 12 h。随后于 4 °C 离心、收集菌体, 并用 0.85% 生理盐水洗涤菌体 1 次, 再次离心后, 接入 10 mL 的第二阶段的 ϵ -PL 合成培养基中, 于 30 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 进行 ϵ -PL 浓度检测。

1.11 分析方法

ϵ -PL 聚合度分布检测: 采用 HPLC 检测, 条件参考文献[5]。流动相配制: 流动相 A: 10 mmol/L NaH_2PO_4 , 100 mmol/L $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L 辛烷磺酸钠, 用磷酸调 pH 2.6; 流动相 B: 20 mmol/L NaH_2PO_4 , 200 mmol/L $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 mmol/L 辛烷磺酸钠, 50% (V/V) 乙腈, 用磷酸调 pH 2.6。

ϵ -PL 浓度测定: 采用甲基橙比色法^[14]。

2 结果和分析

2.1 ϵ -PL 产生菌的 *pld* 基因同源性分析

以往研究报道了在 ϵ -PL 产生菌 *Streptomyces albulus* 和 *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012 以及 ϵ -PL 耐受菌 *Sphingobacterium multivorum* OJ10 和 *Chryseobacterium* sp. OJ7 中存在 ϵ -PL 分解酶^[5,7-10], 并通过生化分析研究了这些分解酶的酶学性质。然而, 尚未有研究者对 ϵ -PL 产生菌中 Pld 的分布情况以及不同产生菌之间 Pld 同源性进行研究。为此, 本研究对已在 NCBI 公布的 5 株

ϵ -PL 产生菌(*S. albulus* NBRC14147、*S. albulus* CCRC11814、*S. albulus* NK660、*S. albulus* ZPM、*S. albulus* PD-1) 和本实验室未公布的小白链霉菌 M-Z18 全基因组进行 *pld* 基因序列搜索, 并在氨基酸水平对其进行同源性分析, 结果如图 2-A 所示。6 株 ϵ -PL 产生菌全基因组搜索 *pld* 基因, 发现它们均存在两种 *pld* 基因序列, 命名为 *pld I* 和 *pld II*。氨基酸水平同源性比对分析, 发现 6 株 ϵ -PL 产生菌之间的 Pld I 氨基酸序列相似性为 100%, 而 Pld II 氨基酸序列相似性为 99%–100%, 这表明 Pld I 和 Pld II 在 6 株 ϵ -PL 产生菌中具有高度的保守性。

pld I 基因大小为 1485 bp, 编码 495 个氨基酸; *pld II* 基因大小为 1401 bp, 编码 467 个氨基酸。在氨基酸水平对 Pld I 和 Pld II 的同源性进行比对分析(图 2-B), 发现两者之间只有 34.57% 的一致性和 43.33% 的相似性, 表明二者可能具有明显的功能差异性。利用 BLASTp 将 Pld I、Pld II 与蛋白数据库进行对比, 发现两者广泛存在于链霉菌属中, 属于 M1 家族金属肽酶, 是可以催化肽键水解的一类蛋白酶。利用在线网址 SignalP 3.0 Server、TMHMM Server v.2.0 以及 PROSITE 进行功能预测分析, 发现 Pld I 和 Pld II 均是膜蛋白且都结合在细胞膜的外部, N 末端也均有信号肽序列, 同时都是一种 Zn^{2+} 金属结合蛋白。

2.2 小白链霉菌 M-Z18 降解 ϵ -PL 能力分析

基于上述同源性基因分析, 发现了小白链霉菌 M-Z18 基因组中同时存在 *pld I* 和 *pld II* 基因。为确定 *pld I* 和 *pld II* 基因在小白链霉菌 M-Z18 中是否发挥 ϵ -PL 的降解功能, 本研究将经过 30 °C 培养 12 h 的小白链霉菌 M-Z18 菌体收集、洗涤后, 重悬于含有 10 mg/mL ϵ -PL 的 MES 缓冲

液(pH 6.0)中, 30 °C 孵育 3 h 后, 利用 HPLC 检测上清液的 ε-PL 聚合度分布, 结果如图 3 所示。相比于 ε-PL 标准品(图 3-A), 含有小白链霉菌 M-Z18 菌体的 MES 缓冲液中的 ε-PL 高聚合度含

量明显减少而低聚合度 ε-PL 含量显著增加, 表明小白链霉菌 M-Z18 具有将高聚合度 ε-PL 分解为低聚合度 ε-PL 的能力, 意味着 *pld I* 和/或 *pld II* 基因在小白链霉菌 M-Z18 中发挥了降解 ε-PL 的功能。

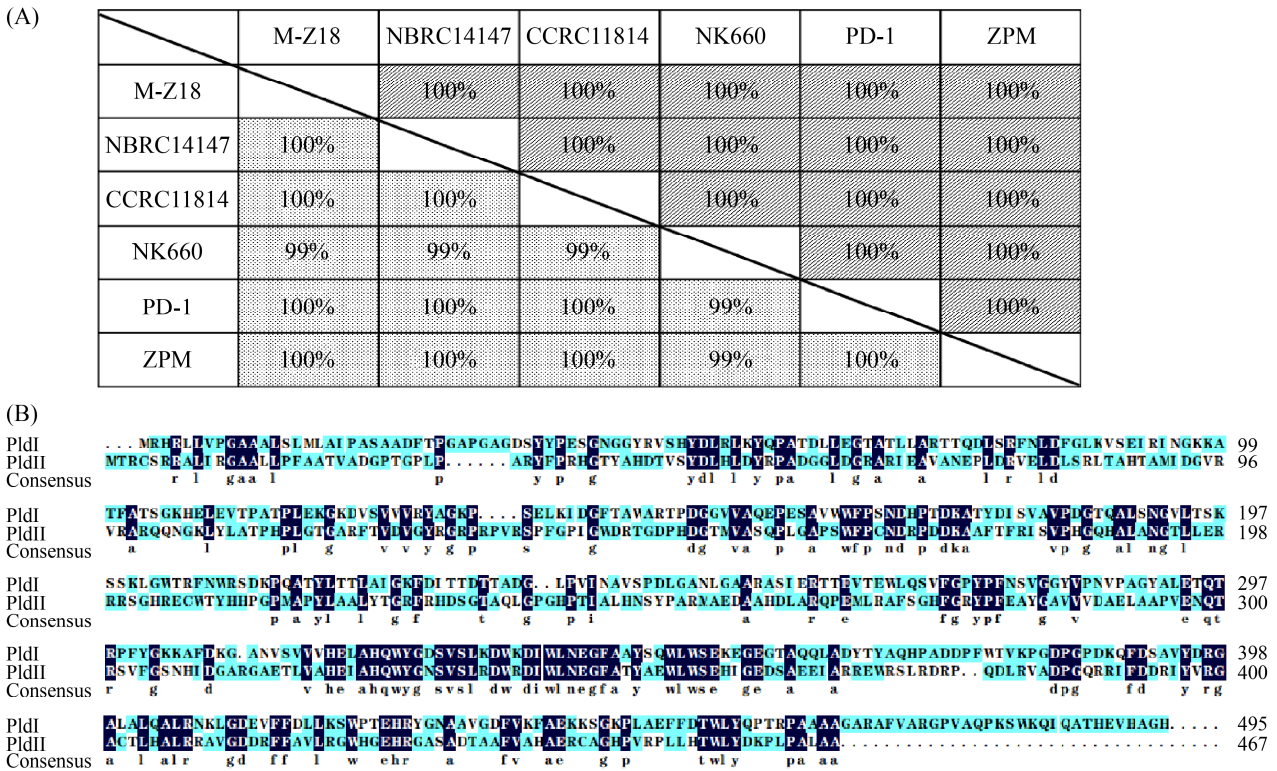


图 2. ε-PL 产生菌 Pld 同源性比较分析

Figure 2. Alignment of Pld amino acid sequence in ε-PL producer strains. A: Alignment of Pld amino acid sequence of *Streptomyces albulus*. Dark gray square represents Pld I amino acid sequence identities, light gray square represents Pld II amino acid sequence identities; B: Alignment of Pld amino acid sequence in *S. albulus* M-Z18. The signal peptide is marked with a frame, and the position of Zn²⁺ binding is indicated by plus signs.

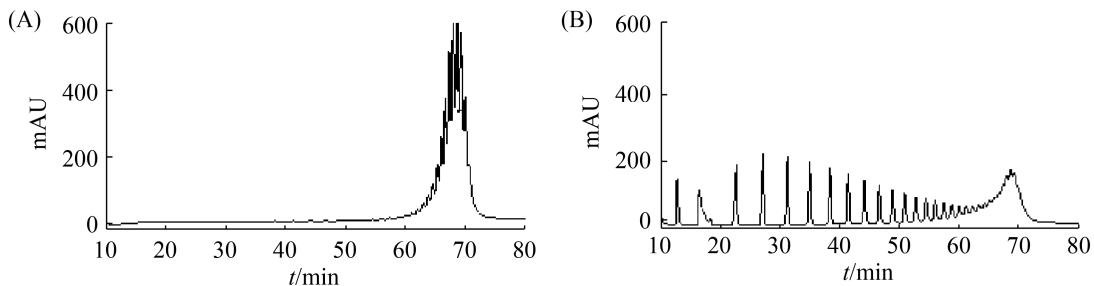


图 3. 小白链霉菌 M-Z18 降解 ε-PL 分析

Figure 3. The ability of *S. albulus* M-Z18 to degradation of ε-PL. A: The HPLC detection of standard ε-PL sample; B: The HPLC detection of *S. albulus* M-Z18 degradation ability.

2.3 小白链霉菌 M-Z18 *pld* 基因敲除、回补和过表达菌株的构建

为探究 Pld I 和 Pld II 在小白链霉菌 M-Z18 中的作用, 本研究通过基因敲除、回补和过表达遗传方法, 分别构建得到了小白链霉菌 M-Z18 的 *pld I* 敲除菌株 $\Delta pld I$ 、*pld II* 的敲除菌株 $\Delta pld II$ 和 *pld I*、*pld II* 双敲除菌株 $\Delta pld I \Delta pld II$, 回补菌株 $\Delta pld I :: pld I$ 、 $\Delta pld II :: pld II$ 、 $\Delta pld I \Delta pld II :: pld I pld II$, 过表达菌株 OE-*pld I*、OE-*pld II*、OE-*pld I pld II*。

2.3.1 小白链霉菌 M-Z18 *pld* 基因敲除菌株的构建: 按照材料与方法中 1.5 所述方法, PCR 扩增得到 *pld I* 长度为 3329 bp 和 3162 bp 的上下游同源臂后, 通过一步克隆试剂盒将其整合到载体 pKC1132 上, 得到重组质粒 pKC1132-*Pld I*。采用同样的方法, 将 *pld II* 长为 3387 bp 的上游同源臂和 3262 bp 的下游同源臂连接载体 pKC1132, 得到重组质粒 pKC1132-*pld II*。验证正确的重组质粒, 通过接合转移转入小白链霉菌 M-Z18 中, 经过 3 次松弛培养后, 利用质粒上携带的安普霉素抗性影印筛选对抗性敏感的菌株。筛选得到候

选突变株, 提取突变株基因组 DNA, 进行 PCR 验证并测序, 最终成功筛选得到 *pld I*、*pld II* 敲除菌株 $\Delta pld I$ 、 $\Delta pld II$ (图 4-A 和图 4-B)。

为获得 *pld* 双敲除菌株, 将已构建好的 *pld II* 敲除质粒 pKC1132-*pld II* 接合转移转入 $\Delta pld I$ 中, 同样经过松弛培养、影印等步骤获得候选突变株。提取候选突变株基因组 DNA 进行 PCR 验证并测序, 最终成功筛选得到双敲除菌株 $\Delta pld I \Delta pld II$ (图 4-C 和图 4-D)。

2.3.2 小白链霉菌 M-Z18 *pld* 基因回补和过表达菌株的构建: 按照材料与方法 1.6 中所述方法, PCR 扩增得到目的基因 *pld I* (1485 bp) 和 *pld II* (1401 bp), 随后整合到载体 pIB139 中, 分别得到重组质粒 pIB139-*pld I* 和 pIB139-*pld II*。将重组质粒通过接合转移分别转入到 $\Delta pld I$ 、 $\Delta pld II$ 菌株中, 筛选得到具有安普霉素抗性的菌株, 提取它们的基因组并利用 pIB139 通用引物 *Pld I* syz-F/*Pld I* syz-R 进行验证, 最终成功得到回补菌株 $\Delta pld I :: pld I$ 和 $\Delta pld II :: pld II$ (图 5-A)。采用同样的操作和验证方法, 将重组质粒 pIB139-*pld I*、pIB139-*pld II* 通过接合转移分别转

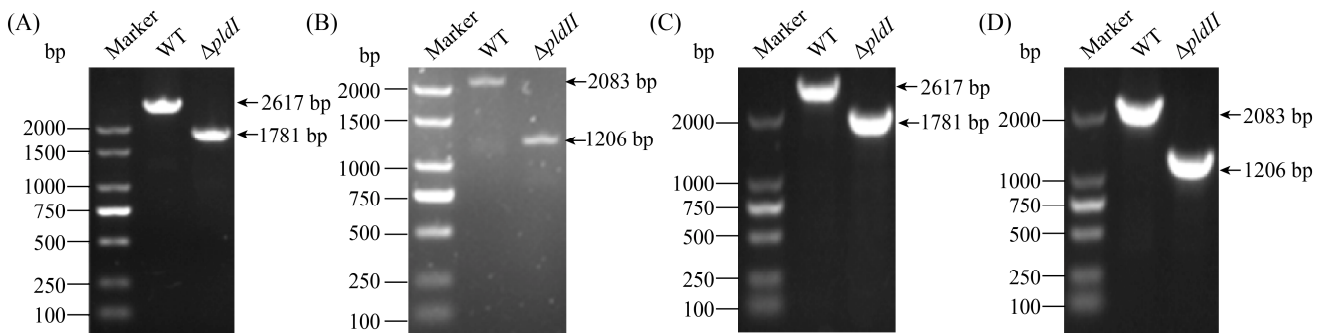


图 4. *pld* 敲除突变株的电泳验证

Figure 4. Electrophoretic verification of *pld I* and/or *pld II* knockout strains. A: *pld I* knockout verification in the single knockout strain; B: *pld II* single knockout verification in the single knockout strain; C: *pld I* knockout verification in the double knockout strain; D: *pld II* knockout verification in the double knockout strain.

入小白链霉菌 M-Z18 中, 成功得到过表达菌株 OE-*pld I* 和 OE-*pld II* (图 5-A)。

按照材料与方法 1.6 中所述方法, 构建 *pld* 双回补和双过表达菌株。首先, 通过 PCR 扩增得到 *pld I* (1485 bp)、*pld II* (1401 bp) 2 个目的片段, 再将 2 个片段与线性化后的载体 pIB139 通过一步克隆试剂进行连接, 得到重组质粒 pIB139-*pld I pld II*。将重组质粒分别转入 Δ *pld I* Δ *pld II* 和小白链霉菌 M-Z18 中, 利用抗性筛选和 PCR 验证, 成功得到双回补菌株 Δ *pld I* Δ *pld II*::*pld I pld II* 和双过表达菌株 OE-*pld I pld II* (图 5-B)。

将空载质粒 pIB139 通过接合转移整合到小白链霉菌 M-Z18 基因组中, 通过 PCR 验证得到 control-pIB139 菌株作为对照(图 5-A)。

2.4 重组菌降解 ϵ -PL 活性分析

为了评估上述构建的重组菌对 ϵ -PL 的降解影响, 各重组菌分别经过 30 °C 培养 12 h, 收集、

洗涤菌体后, 重悬于含有 10 mg/mL ϵ -PL 的 MES 缓冲液(pH 6.0)中, 并在 30 °C 条件下孵育 3 h, 再利用 HPLC 检测上清液的 ϵ -PL, 结果如图 6 所示。相比于野生型菌株小白链霉菌 M-Z18 (图 3-B), Δ *pld I* 菌株降解 ϵ -PL 能力明显减弱, 而 Δ *pld II* 菌株几乎丧失了降解 ϵ -PL 的能力, 达到了与双敲除菌株 Δ *pld I* Δ *pld II* 同等效果。通过回补 *pld I*、*pld II* 和 *pld I-pld II*, 均能使得对应重组菌恢复 ϵ -PL 降解能力, 但都没能达到小白链霉菌 M-Z18 降解 ϵ -PL 的效果(图 3-B)。有趣的是, 在野生型菌株小白链霉菌 M-Z18 中分别过表达 *pld I* 和 *pld II* 时, 过表达菌株降解 ϵ -PL 的能力并未得到明显提高; 而同时过表达 *pld I* 和 *pld II* 时, 重组菌降解 ϵ -PL 的能力被显著增强。这些结果表明, Pld I、Pld II 在小白链霉菌 M-Z18 中均能行使降解 ϵ -PL 的功能, 但 Pld II 降解活性占主导地位, 且 Pld I 和 Pld II 对降解 ϵ -PL 具有一定的协同作用。

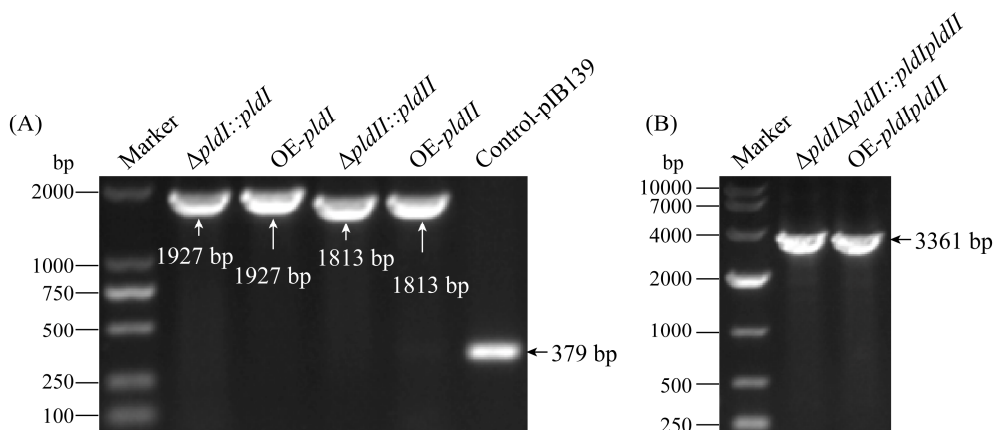


图 5. *pld* 回补和过表达菌株验证

Figure 5. Electrophoretic verification of *pld* complementation strains and overexpression strains. A: Single complementation and single overexpression verification of *pld I* and *pld II* gene; verification of control harboring empty plasmid. B: Double complementation and double overexpression verification of *pld I* and *pld II* gene.

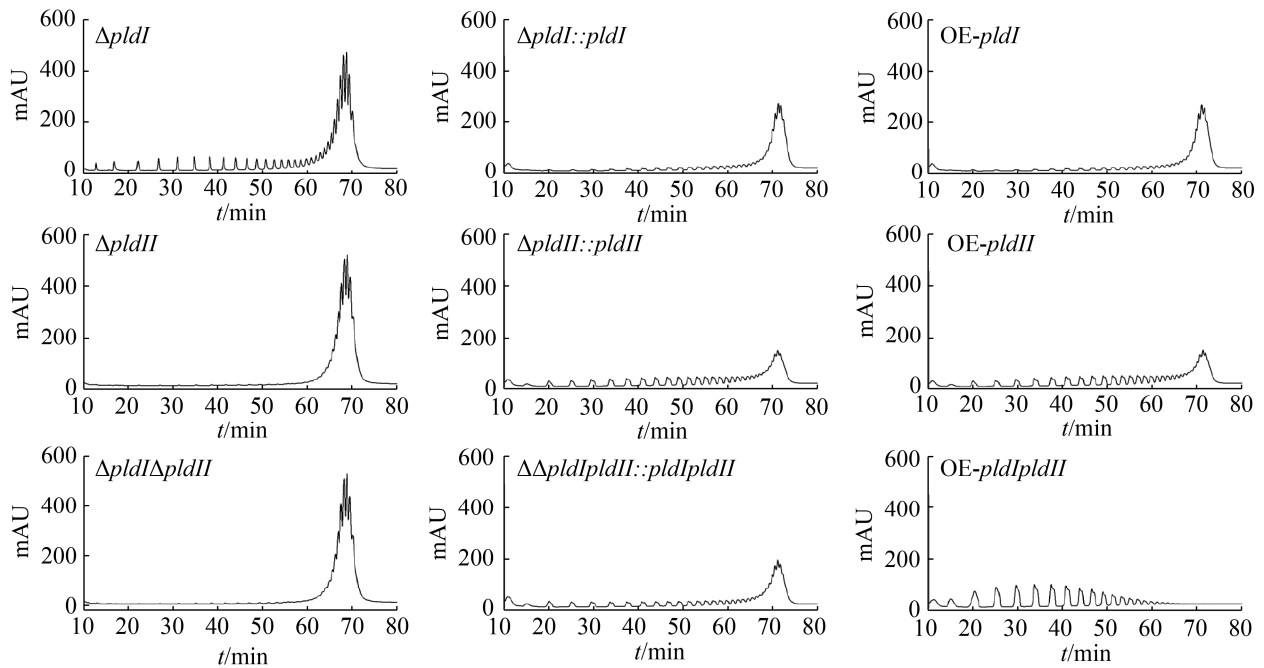


图 6. 重组菌降解 ϵ -PL 情况

Figure 6. The ϵ -PL degrading activities of recombinant *S. albulus* strains.

2.5 重组菌对 ϵ -PL 的 MIC 值测定

为了评估 Pld 在小白链霉菌抵御 ϵ -PL 中的作用, 将液体培养 20 h 后的重组菌按 1.0% 比例接入含有不同 ϵ -PL 浓度的营养肉汤培养基中 (pH 7.0), 30 °C 振荡培养 48 h, 各重组菌的生长情况如图 7 所示。图 7-A 显示, 出发菌株小白链霉菌 M-Z18 (WT) 和敲除重组菌 $\Delta pld I$ 、 $\Delta pld II$ 、 $\Delta pld I \Delta pld II$ 对 ϵ -PL 的 MIC 值分别为 320、250、100 和 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。可见, 不管是单敲除 $\Delta pld I$ 、 $\Delta pld II$ 还是组合敲除 $\Delta pld I \Delta pld II$, 与出发菌株相比, 重组菌对 ϵ -PL 的 MIC 值显著降低, 其中双敲除菌株 $\Delta pld I \Delta pld II$ 对 ϵ -PL 的 MIC 值仅为出发菌株的 18.8%, 下降最为显著。图 7-B 显示的是各回补重组菌株在不同 ϵ -PL 浓度营养肉汤培养基中的生长情况, $\Delta pld I::pld I$ 、 $\Delta pld II::pld II$

和 $\Delta pld I \Delta pld II::pld I pld II$ 对 ϵ -PL 的 MIC 值分别为 270、300、350 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明各回补菌株对 ϵ -PL 的抵抗能力基本恢复至野生菌株水平。图 7-C 显示的是各过表达重组菌在不同 ϵ -PL 浓度营养肉汤培养基中的生长情况, OE-*pld I*、OE-*pld II* 和 OE-*pld Ipld II* 对 ϵ -PL 的 MIC 值, 分别达到 400、600、700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与出发菌株相比, 过表达重组菌对 ϵ -PL 的 MIC 值显著提高, 其中双过表达菌株 OE-*pld Ipld II* 对 ϵ -PL 的 MIC 值是出发菌株的 2.19 倍。上述研究结果与重组菌降解 ϵ -PL 能力 (图 6) 保持了较好的一致, 表明 Pld 在小白链霉菌中的主要生理功能是保护自身免受 ϵ -PL 的抑制。

2.6 重组菌在不同 pH 值下合成 ϵ -PL 能力分析

为考察 Pld 对小白链霉菌合成 ϵ -PL 的影响,

本研究通过两阶段恒定 pH 值发酵分析了出发菌株小白链霉菌 M-Z18 (WT)、*pld I* 敲除菌株 $\Delta pld I$ 、*pld II* 敲除菌株 $\Delta pld II$ 、*pld I* 和 *pld II* 双敲除菌株 $\Delta pld I \Delta pld II$ 以及含空载 pIB139 出发菌株小白链霉菌 M-Z18 (WT-pIB139)、*pld I* 过表达菌株 OE-*pld I*、*pld II* 过表达菌株 OE-*pld II*、*pld I* 和 *pld II* 过表达菌株 OE-*pld I pld II* 在不同 pH 值下 (pH 3.0–5.5) 合成 ϵ -PL 的情况。如图 8-A 所示, 不管是单敲除 *pld I*、*pld II* 还是同时敲除 *pld I* 和

pld II, 与出发菌株相比, 敲除菌株在任何考察 pH 值下 (pH 3.0–5.5) 的 ϵ -PL 产量均未表现出显著差异。同时, 如图 8-B 所示, 不论是过表达 *pld I*、*pld II* 还是同时过表达 *pld I* 和 *pld II*, 与含空载 pIB139 质粒出发菌株相比, 过表达菌株在考察 pH 值下 (pH 3.0–5.5) 的 ϵ -PL 产量也均未表现出明显差异。由此可见, Pld 对小白链霉菌合成 ϵ -PL 不会造成任何影响, 说明 Pld 在小白链霉菌的 ϵ -PL 生物合成中不发挥生理功能作用。

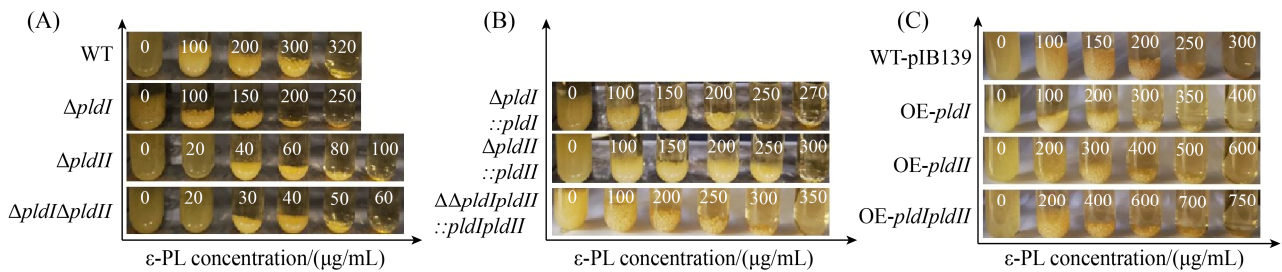


图 7. *S. albulus* 重组菌株对 ϵ -PL 的抗性能力

Figure 7. The ability of recombinant *S. albulus* strains for ϵ -PL resistance. A: MIC value detection of *pld* knockout mutants; B: MIC value detection of *pld* complementation strains; C: MIC value detection of *pld* overexpression strains.

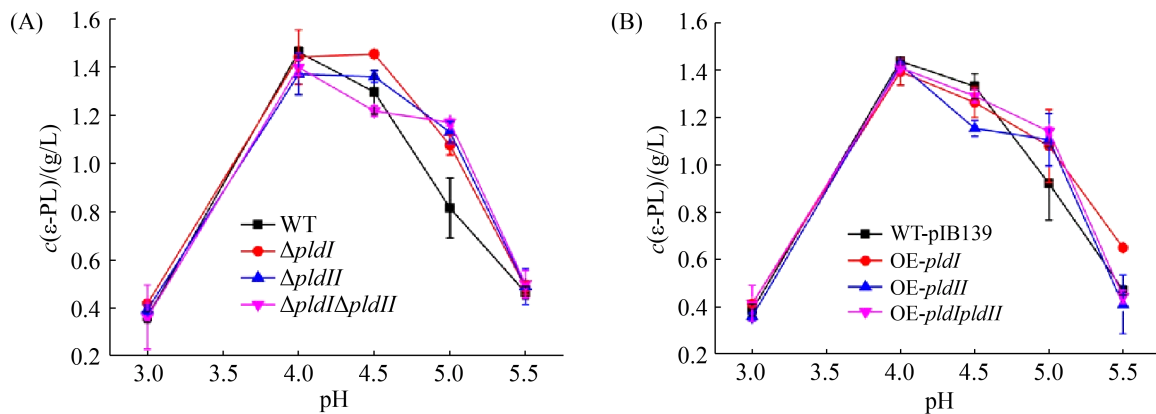


图 8. 重组菌在不同 pH 下合成 ϵ -PL 情况

Figure 8. Production of ϵ -PL under different pH of recombinant *S. albulus* strains. A: ϵ -PL yield of *pld* knockout mutants at different pH; B: ϵ -PL yield of *pld* overexpression strains at different pH. The values represent means \pm SD of three repeats.

3 讨论

Pld 是一种在 ϵ -PL 产生菌或耐受菌中发现的蛋白酶, 依据其降解 ϵ -PL 方式分为内切型(Pld I) 和外切型(Pld II) 两种类型。截止目前, 仅在 1 株 ϵ -PL 产生菌中同时发现存在 2 种类型 Pld^[11]。为了调查 2 种类型 Pld 在 ϵ -PL 产生菌中的分布特点以及同时存在 2 种 Pld 的生理功能, 本研究基于 NCBI 数据库公布的 5 株 ϵ -PL 产生菌和本实验室未公布的小白链霉菌 M-Z18 全基因组数据进行 Pld 序列搜索, 发现 2 种 Pld 在 6 株 ϵ -PL 产生菌中均同时存在且保持高度同源性(99%–100%)。进一步的基因功能实验证明, Pld II 相比于 Pld I 具有更高的 ϵ -PL 降解能力, 且二者在降解和抵御 ϵ -PL 方面存在一定的协同增效作用, 但在 ϵ -PL 生物合成中不发挥作用。本研究为明确 ϵ -PL 产生菌中 2 种 Pld 的分布特点以及 2 种 Pld 在小白链霉菌中发挥的生理功能奠定了基础。

通过 6 株不同来源的小白链霉菌全基因组搜索, 发现 *pld I* 和 *pld II* 基因序列均同时存在它们的各自基因组中。氨基酸水平同源性比对分析发现 6 株 ϵ -PL 产生菌之间的 Pld I 氨基酸序列相似性为 100%, 而 Pld II 氨基酸序列相似性为 99%–100%, 显示 Pld I 和 Pld II 在 6 株 ϵ -PL 产生菌中具有高度的保守性(图 2-A)。进一步分析 Pld I 和 Pld II 之间的同源性(图 2-B), 发现二者之间只有 34.57% 的一致性和 43.33% 的相似性, 说明它们的功能可能不一致。另外, 功能预测发现 Pld I 和 Pld II 均是膜蛋白且都结合在细胞膜的外部, N 末端均有信号肽序列, 同时都是一种 Zn^{2+} 金属结合蛋白, 这与已报道的生化结果相一致^[11]。从文献报道来看, 本研究是首次系统分析

Pld 在 ϵ -PL 产生菌中的分布情况, 且发现两种类型 Pld 具有高度同源保守性。由于已公布的 ϵ -PL 产生菌全基因组信息仅局限在小白链霉菌, 尚不清楚两种 Pld 在其他 ϵ -PL 产生菌中的情况, 如北里胞菌、麦角真菌^[15]和芽胞杆菌^[16]等。

目前发现的 ϵ -PL 产生菌 Pld 除降解方式不同外(Pld I 属于外切型, 而 Pld II 是内切型), 两种降解酶学性质均表现出高度一致性。如, 二者均存在于细胞膜上, Pld I 和 Pld II 在 pH 4.0 条件下都没有活性, 但随着 pH 值升高, 它们的降解活性逐渐增强, 并在 pH 7.0 时达到最高。本研究借助基因敲除、回补和过表达等遗传手段, 构建了 *pld I* 或/和 *pld II* 敲除、回补和过表达重组菌, 并研究了这些重组菌降解 ϵ -PL 的效果。研究发现, Pld I、Pld II 在小白链霉菌 M-Z18 中均能行使降解 ϵ -PL 的功能, 但 Pld II 降解活性明显高于 Pld I, 且 Pld I 和 Pld II 对降解 ϵ -PL 具有协同增效作用(图 6)。重组菌对 ϵ -PL 的 MIC 值测试结果表明, 中性 pH 值环境下 Pld I、Pld II 对小白链霉菌抵御 ϵ -PL 的抑制作用明显, 且双过表达 *pld I* 和 *pld II* 的重组菌对 ϵ -PL 的抵制能力明显优于单一过表达(图 7)。由此可见, 中性 pH 值环境下 Pld 在小白链霉菌中的主要生理功能是保护自身免受 ϵ -PL 的抑制。

本研究通过将 *pld I* 或/和 *pld II* 敲除菌株以及它们的过表达菌株进行恒定 pH 值发酵, 发现不管是敲除菌株还是过表达菌株在 pH 3.0–5.5 内 ϵ -PL 的合成趋势及最终 ϵ -PL 产量较出发菌株均未表现出明显差异(图 8), 该结果与 Yamanaka 等一致^[11]。Yamanaka 等认为 ϵ -PL 在低 pH 环境下的抑菌活性会被抑制, 故 *pld* 敲除菌株能够在酸性 pH 值正常积累 ϵ -PL。因此, 小白链霉菌在低

pH 环境中实现 ϵ -PL 的大量积累, 一方面是因为低 pH 值抑制了 Pld 活性, 另一方面低 pH 值也限制了 ϵ -PL 抑菌活性从而避免了对自身产生菌的抑制作用。

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41(9): 1807–1809.
- [2] 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.
- [3] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*, 1984, 37(11): 1449–1455.
- [4] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, Seki H, Uohama K, Seki H, Kimura S, Yanagimoto Y, Barnett JW Use of ADME studies to confirm the safety of epsilon-polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37(2): 328–340.
- [5] 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.
- [6] Hamano Y, Yoshida T, Kito M, Nakamori S, Nagasawa T, Takagi H. Biological function of the *pld* gene product that degrades-poly-L-lysine in *Streptomyces albulus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(1): 173–181.
- [7] 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(6): 667–672.
- [8] Tan ZL, Jia SR, Zhao Y, Yuan GD, Cao WF. Purification and characterization of an ϵ -Poly-L-lysine-degrading enzyme isolated from *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(12): 2404–2408. (in Chinese)
- [9] 谭之磊, 贾士儒, 赵颖, 袁国栋, 曹伟锋. 淀粉酶产色链霉菌 TUST2 中 ϵ -聚赖氨酸降解酶的纯化和性质. *高等学校化学学报*, 2009, 30(12): 2404–2408.
- [10] Kito M, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Occurrence of epsilon-poly-L-lysine-degrading enzyme in epsilon-poly-L-lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, 207(2): 147–151.
- [11] Kito M, Takimoto R, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and characterization of an ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from the ϵ -poly-L-lysine-tolerant *Chryseobacterium* sp. OJ7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(1): 92–94.
- [12] 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.
- [13] Liu QR, Chen XS, Zeng X, Han D, Mao ZG. Purification, characterization and application of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme from *Streptomyces* sp. M-Z18. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(9): 1022–1032. (in Chinese) 刘庆瑞, 陈旭升, 曾昕, 韩岱, 毛忠贵. 链霉菌 M-Z18 膜蛋白 ϵ -聚赖氨酸降解酶的分离纯化、酶学性质及应用. *微生物学报*, 2014, 54(9): 1022–1032.
- [14] 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.
- [15] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 1972, 50(2): 569–574.
- [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(7): 3575–3581.
- [17] El-Sersy NA, Abdelwahab AE, Abouelkhiir SS, Abou-Zeid DM, Sabry SA. Antibacterial and anticancer activity of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp.. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5): 513–522.

Physiological function analysis of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzymes in *Streptomyces albulus*

Wenjiao Diao, Daojun Zhu, Long Pan, Xusheng Chen*

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

Abstract: **[Objective]** The distribution and physiological function of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme (Pld) in *Streptomyces albulus* were investigated in this study. **[Methods]** The sequence of Pld in the reported ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) producing strains were mined and analyzed from their genome by bioinformatics methods, and then two types of Plds in *S. albulus* M-Z18 genome were knocked out, complemented and overexpressed by genetic methods, those recombinant strains were used to study the degradation of ϵ -PL, the minimum inhibitory concentration (MIC) of ϵ -PL and their ϵ -PL productions. **[Results]** *pld I* and *pld II* are widely distributed in *S. albulus*, and their protein sequences are highly conserved. The results showed that Pld I and Pld II in the *S. albulus* M-Z18 all could degrade ϵ -PL. However, the degradation activity of Pld II was dominant, while Pld I and Pld II had a synergistic effect on the degradation of ϵ -PL. The MIC values of recombinant strains with *pld I* or/and *pld II* overexpression toward ϵ -PL were significantly increased, especially the MIC value of *pld I* and *pld II* co-overexpressed strain was 2.19 folds higher than that of the original strain. Surprisingly, these recombinant strains showed no significant difference in the production of ϵ -PL at pH 3.0–5.5 compared with the original strain. **[Conclusion]** Pld I and Pld II are highly conserved in *S. albulus*, which physiological functions are protect *S. albulus* from the inhibition of its metabolite ϵ -PL by degradation at the neutral pH.

Keywords: *Streptomyces albulus*, ϵ -poly-L-lysine, ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme, gene knockout

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191332), by the National Natural Science Foundation of China (31671846) and by the National Key Research and Development Project (2020YFA0907700)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918296; E-mail: chenxs@jiangnan.edu.cn

Received: 1 February 2021; Revised: 1 May 2021; Published online: 11 May 2021