

ϵ -聚赖氨酸生产菌育种研究进展

孙子龙, 扶教龙*, 王月, 周运峰, 李博彦, 钱玮, 白净, 鞠鑫, 李良智
(苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏苏州 215009)

摘要: ϵ -聚赖氨酸 (ϵ -poly-*L*-lysine, ϵ -PL) 是一种含25~35个*L*-赖氨酸残基的新型生物聚合物, 由 ϵ -NH₂和 α -COOH脱水缩合形成。其具有热稳定性、可食性、水溶性、可降解性、抑菌谱广及无毒等优异性能, 作为一种安全的食品防腐剂, 在日本、韩国、美国、中国和一些其他国家得以应用。 ϵ -PL通常由白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) 发酵生产, 对生产菌进行育种改造是提高 ϵ -PL生产和降低成本的关键方法之一。目前, 研究者们已通过理化诱变、核糖体工程、基因组重排、基因工程等方法对 ϵ -PL生产菌进行了大量育种研究, 且得到了一些高产菌株。本文首先简要介绍 ϵ -PL生物合成机理, 并从上述几个方面着重介绍 ϵ -PL生产菌育种研究进展, 然后概述 ϵ -PL发酵生产工艺, 最后对相关研究进行展望, 以期对 ϵ -PL微生物育种和绿色生物制造提供借鉴与参考。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; 育种; 核糖体工程; 基因工程; 白色链霉菌

Advances in Strain Improvement for the Production of ϵ -Poly-*L*-lysine

SUN Zilong, FU Jiaolong*, WANG Yue, ZHOU Yunfeng, LI Boyan, QIAN Wei, BAI Jing, JU Xin, LI Liangzhi
(School of Chemical and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China)

Abstract: ϵ -Poly-*L*-lysine (ϵ -PL) is a novel biopolymer consisting of 25–35 *L*-lysine residues, which is formed by the dehydration condensation of ϵ -NH₂ and α -COOH. ϵ -PL possesses many excellent characteristics, such as antimicrobial activity, edibility, water solubility, biodegradability, thermostability and nontoxicity. As a natural and safe food preservative, ϵ -PL possesses many excellent advantages such as thermal stability, edibility, water solubility, degradability, and broad-spectrum antibacterial activity and has been successfully utilized in Japan, South Korea, the United States, China and other countries. ϵ -PL is usually produced by fermentation with *Streptomyces albulus*, and improving ϵ -PL-producing strains is crucial for enhancing ϵ -PL production and reducing costs. At present, researchers have obtained microbial strains capable of producing high levels of ϵ -PL by using physicochemical mutagenesis, ribosome engineering, genome shuffling, genetic engineering and other methods. This review introduces the mechanism of ϵ -PL biosynthesis and recent progress in strain improvement for the production of ϵ -PL, and gives an overview of the fermentation process of ϵ -PL. Finally, this review concludes with an outlook on future research directions. We hope that this review can help promote strain improvement for green biological manufacturing of ϵ -poly-*L*-lysine.

Keywords: ϵ -poly-*L*-lysine; breeding; ribosome engineering; genetic engineering; *Streptomyces albulus*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221114-158

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 23-0231-09

引文格式:

孙子龙, 扶教龙, 王月, 等. ϵ -聚赖氨酸生产菌育种研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(23): 231-239. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221114-158. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Zilong, FU Jiaolong, WANG Yue, et al. Advances in strain improvement for the production of ϵ -poly-*L*-lysine[J]. Food Science, 2023, 44(23): 231-239. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221114-158. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21676173); 苏州市科技计划项目 (SNG2017053); 苏州科技学院科研基金资助项目 (XKZ201411)

第一作者简介: 孙子龙 (1997—) (ORCID: 0000-0001-6268-6747), 男, 硕士, 研究方向为生物催化转化过程工程。

E-mail: 1134248646@qq.com

*通信作者简介: 扶教龙 (1969—) (ORCID: 0000-0002-8436-2150), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物催化转化过程工程。

E-mail: jlfu999@126.com

ϵ -聚赖氨酸 (ϵ -poly-*L*-lysine, ϵ -PL) 是一种含 25~35 个 *L*-赖氨酸 (*L*-lysine, *L*-Lys) 残基的生物聚合物, 由 ϵ -NH₂ 和 α -COOH 脱水缩合形成^[1], 最早是由日本学者 Shima 等^[2]于 1977 年在白色链霉菌 (*Streptomyces albulus*) 发酵液中发现。因其结构独特, 具有许多优异性能, 如抗菌性、可食性、生物降解性、耐热性、水溶性等。其抑菌谱广泛, 对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 和单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 等革兰氏阴性菌以及革兰氏阳性菌有非常好的抑菌效果, 也对一些霉菌、酵母和病毒有一定抑制作用^[3-6], 常被应用于食品防腐剂、药物载体、食疗剂、乳化剂和水凝胶等领域。

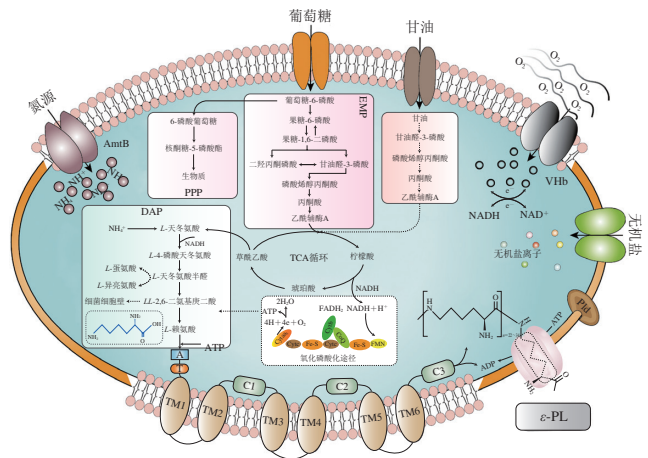
ϵ -PL 应用潜力巨大, 然而野生型菌株 ϵ -PL 合成能力通常较低, 如 *Streptomyces noursei* NRRL 5126 的摇瓶产量只有 0.4 g/L^[7]。筛选产生菌是 ϵ -PL 的研究重点之一, 科学家们选用美蓝、中性红等^[8-9]物质进行筛选, 利用正正相斥原理形成的透明圈来筛选产生菌。目前筛选菌株最经典的实例是 Hiraki 等^[10]使用的 S-2-(氨基乙基)-*L*-半胱氨酸 (S-(2-aminoethyl)-*L*-cysteine, AEC) 结合甘氨酸抗性筛选方法, 其机制是通过筛选 AEC 抗性菌株以解除或减轻赖氨酸对天冬氨酸激酶 (aspartate kinase, Ask) 反馈抑制, 这将引起 ϵ -PL 前体物 *L*-Lys 大量积累, 继而提升 ϵ -PL 产量, 通过此法得到的菌株产量达到了野生型的 10 倍。虽然每年都有大量的 ϵ -PL 产生菌被筛选出来, 但其生产能力仍远远达不到工业生产需求, 因此对 ϵ -PL 产生菌的育种改造势在必行。随着研究的深入, 越来越多育种方法被用于菌种选育与改造, 如传统理化诱变、核糖体工程、基因组重排以及基因工程等, 这对提高 ϵ -PL 产量和降低其生产成本起到了重要作用。

本文根据近 5 年的研究进展, 在简要介绍 ϵ -PL 生物合成机理基础上, 着重介绍 ϵ -PL 生产菌育种进展, 且对 ϵ -PL 相关研究进行展望。期望本文能为相关研究人员提供一定的参考和帮助, 同时也为其他菌种选育提供参考。

1 ϵ -聚赖氨酸生物合成机理

ϵ -PL 通常利用微生物发酵法生产, 主要由链霉菌 (*Streptomyces*)、北里孢菌 (*Kitasatospora*)、链轮丝菌 (*Streptoverticillium*)、香柱菌 (*Epichloe*) 等菌种产生^[1]。随着研究不断深入, 其合成机制也被逐渐摸索出来。Yamanaka 等^[11]报道了 ϵ -聚赖氨酸合成酶 (ϵ -poly-*L*-lysine synthase, Pls) (由 *pls* 基因编码) 纯化及其基因克隆的相关研究, 详细介绍了 Pls 作为一种具有“非核糖体合成酶体系” (nonribosomal peptides synthetases, NRPSs) 特征的腺苷化和硫化化结构域的膜蛋白, 其包含了 6 个跨膜结构域 (TM 域) 和 3 个串联的可溶性结构域 (C1、C2、C3 结构域), 却不包含传统的缩合或硫

酯酶结构域 (图 1)^[1,12-13], 是一种新型单模块 NRPS, 具有类似于氨基酸连接酶的催化活性。Pls 主要分为 T、A、C 3 个区域, *L*-Lys 在 Pls 中 A 区域被腺苷酸化, 而后在 T 区域被进一步硫化化同时释放腺嘌呤核苷酸 (adenosine monophosphate, AMP), 随后被转运到 3 个串联 C 区域中, 并在此区域产生不同程度的聚合。该发现为 ϵ -PL 合成机制的探索提供了基本模型。



EMP. 糖酵解途径 (glycolytic pathway); PPP. 磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway); DAP. 二氨基庚二酸途径 (diaminopimelic acid pathway); TCA 循环. 三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle); Vhb. 透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla hemoglobin*); Pld. ϵ -PL 降解酶 (ϵ -poly-*L*-lysine degrading enzyme); FMN. 黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide); CoQ. 辅酶 Q (ubiquinone); Cytb/c. 细胞色素 b/c (cytochrome b/c); Cytaa3. 细胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase)。

图 1 ϵ -PL 生物合成途径示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the biosynthetic pathway of ϵ -PL

ϵ -PL 是由 EMP、TCA 循环以及 DAP 途径生成 *L*-Lys, 再经过 Pls 聚合而成^[1,14-15]。但在研究中不止发现了 Pls, 还有 Pld。迄今为止, 共发现两种 Pld: PldI 和 PldII^[16]。理论上, 这两种酶缺失会减少 ϵ -PL 的损耗, 并在发酵过程中提高其整体效价。然而, PldI 和 PldII 失活对 ϵ -PL 产生和聚合程度没有影响, 这表明 ϵ -PL 生物合成及聚合物长度似乎是由 Pls 直接控制, 而不是 Pld^[16]。刁文娇等^[17]对 *S. albulus* M-Z18 基因组中存在的两种 *Pld* 基因进行敲除、回补和过表达, 结果表明 PldI 与 PldII 对降解 ϵ -PL 具有协同作用, 且主要生理功能是保护菌株在中性环境中免受自身产物 ϵ -PL 抑制。Li Qinyu 等^[18]利用基于整合质粒 pSET152 的规律成簇的间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 技术抑制 PldII, 发现对 PldII 活性的抑制提高了 ϵ -PL 产物的抗菌效果, 且 PldII 对 ϵ -PL 的水解由两个氨基酸残基 (Thr194 和 Glu281) 启动, 产生了不同链长度的 ϵ -PL, 这导致了不同程度的 ϵ -PL 聚合。截至目前, 对于 Pld 的研究还有待进一步深入。

2 ϵ -聚赖氨酸生产菌育种

2.1 物理化学诱变育种

物理诱变是指通过物理诱变剂处理微生物,从而获得高产菌株。目前被用于 ϵ -PL生产菌诱变的物理诱变方法有紫外(ultraviolet, UV)诱变、离子注入诱变、微波诱变、常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变等。从杨玉红等^[19]通过UV诱变得得到较出发菌株 ϵ -PL产量提升率为20.97%的突变株,到从茂林等^[20]通过氮离子注入结合抗性抑菌圈筛选出提升率是出发菌1.3倍的突变株,再到张海涛等^[21]通过微波处理诱变获得较出发菌株 ϵ -PL产量提升率为23.00%的突变株,物理诱变育种的应用不断发展。而后ARTP这种突变性能更高效、适用范围更广的诱变方法的兴起进一步带动其发展^[22-23]。Zong Hong等^[24]最先使用ARTP对*S. albulus*进行突变处理,获得一株阳性突变株*S. albulus* A-29,最高产量为(1.59±0.08) g/L,是相同培养条件下野生菌产量的3.88倍。席志文等^[25]通过ARTP结合硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)复合诱变结合抗性平板与抑菌圈筛选得到了突变菌株*S. albulus* AD-9,摇瓶产量为2.1 g/L,比出发菌株高110%。对其生理特性研究发现其菌株形态与营养需求都得到了改变,比较突变菌株在3种发酵培养基(M3G、RSM、优化培养基)中的发酵结果,发现突变菌株在优化培养基下发酵效果最佳,其与其他培养基不同之处在于较高的碳源、有机氮源比例以及较低的无机氮源比例。Wang Liang等^[26]以链霉素(streptomycin, Str)抗性结合ARTP诱变,经过3轮筛选,挑选出突变株*S. albulus* AS3-14,其摇瓶产量为2.91 g/L,较初始菌株产量提高了66.3%。对突变株进行酶活性分析与限制性片段多态性分析,结果表明*S. albulus* AS3-14中的关键酶如己糖激酶、丙酮酸激酶、柠檬酸合酶和Ask比出发菌株更活跃,且经ARTP诱变后,AS3-14的基因组DNA变化很大,这些原因可能导致其 ϵ -PL产量提高。

化学诱变育种是用化学诱变剂处理材料,以诱发遗传物质突变,从而引起形态特征变异。目前应用于白色链霉菌育种方面的诱变剂主要有氯化锂(LiCl)、甲基磺酸乙酯(ethyl methylsulfone, EMS)、DES、亚硝基胍(nitroso-guanidin, NTG)等。李聪等^[27]采用DES诱变得到一株突变株FQF-3,经过培养基优化产量达到了1.373 g/L,提升率为53%。Song Shuai等^[28]采用NTG+UV+LiCl复合诱变,得到了突变株*S. diastatochromogenes* 6#-7,其具有良好的遗传稳定性,摇瓶产量为0.775 g/L,比初始菌株高42.2%。近几年传统化学诱变在 ϵ -PL生产菌育种方面没有太多建树,也许是其诱变随机性太高、稳定性不好、诱变效果不理想等原因导致。

物理化学诱变育种因其操作简单、材料获取简单、达到的效果较好,无需了解菌株的遗传背景和基因信息也可进行育种,仍旧在微生物育种工作中发挥着重要作用。

2.2 核糖体工程育种

核糖体工程是一种针对核糖体蛋白突变对微生物次级代谢产物的影响建立的育种方法(图2)^[29-30],该概念由Ochi教授^[29]基于严谨反应激活自身次级代谢现象,利用利福霉素(rifamycin, Rif)与鸟苷四磷酸(guanosine tetraphosphate, ppGpp)诱导激活次级代谢机制以及以Str为代表的其他抗生素均是以核糖体各元件为作用靶点这些发现而提出。其通过确定目标菌株相应抗生素如Str、Rif、巴龙霉素(paromomycin, Par)、硫链丝菌素(thiostrepton, Tsp)、夫西地酸(fusidine, Fus)、庆大霉素(gentamicin, Gen)、林肯霉素(lincomycin, Lin)、遗传霉素(geneticin, Gnt)等的最小抑制浓度(minimum inhibition concentration, MIC),再采用不同MIC倍率的抗性平板培养目标菌株,使菌株本身核糖体结构发生变化,进而引起相关代谢产物发生较大变化^[31-32]。

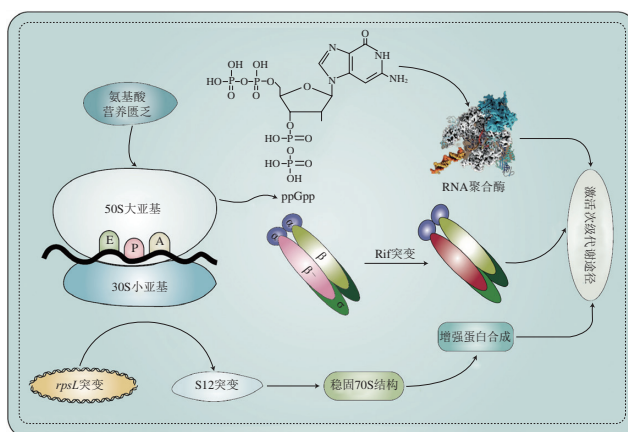


图2 核糖体工程启动细胞示意图

Fig. 2 Schematic diagram of ribosome engineering for activating cell biosynthesis

Liu Yongjuan等^[33]以*S. albulus* M-Z18为出发菌株,添加Str后选育到单重抗生素高产突变株S-23, ϵ -PL产量为2.6 g/L,比出发菌株提高近44.4%;再用Str多次抗性引入选育出高产菌*S. albulus* SS-62,产量达到了出发菌株的1.79倍。蛋白质组学分析显示参与 ϵ -PL前体代谢和能量代谢的蛋白以及参与转录调控和翻译的蛋白表达水平上升,这表明突变体SS-62不仅能增强 ϵ -PL前体代谢和能量代谢,还能调节与转录调控和翻译相关的通路,提供更好的胞内代谢环境。Wang Liang等^[34]通过引入Str、Gen、Rif进行抗性突变,最终得到了单抗菌株*S. albulus* S-88和双抗菌株*S. albulus* SG-31,产量分别达到了2.81 g/L与3.83 g/L,分别是出发菌株的1.75倍与2.39倍。对突变

体分析表明, *rpsL*基因(编码核糖体蛋白S12)发生了点突变, 导致 ϵ -PL生物合成途径中关键酶的活性和转录水平显著增加。而后Wang Liang等^[35]又在之前基础上, 选育出了突变菌株*S. albulus* R6, 其具有Str、Gen、Rif、Gnt、Par、Lin 6种抗生素抗性, ϵ -PL摇瓶产量提升至4.41 g/L, 较亲本菌株提高了2.75倍。吴光耀等^[36]通过Str+Rif双重抗性选育 ϵ -PL高产菌, 获得双重抗性高产突变株*Streptomyces albulus* WG-608。其 ϵ -PL摇瓶产量达到3.7 g/L, 5 L发酵罐补料分批发酵 ϵ -PL产量达到53.0 g/L, 较出发菌株分别提高了42.3%和32.5%。以上都是对核糖体工程的成功运用, 其突变效果显著, 成功率高, 结合组学分析也许能够得到意想不到的效果。

核糖体工程利用各类抗性突变为筛选标记来表征核糖体和RNA多聚酶的功能变化, 从“转录”和“翻译”两个水平来启动微生物细胞的生物合成潜能, 从而高效地获得次生代谢产物合成能力提高的新菌株。该技术简单易行、组合方便, 在相关育种方面有良好的应用前景。然而核糖体工程仍存在较多局限, 如多种抗生素效用机制不明、诱变效率有限等, 会为其应用带来一定限制。因此需要更深入地解析抗生素的作用机制及靶点, 更深入地研究抗生素激活细胞诱导机制以及在分子水平上实现菌株的定向进化等^[33]来进一步发展完善核糖体工程技术。

2.3 基因组重排育种

基因组重排起初是由Stemmer^[37]提出的一种新型选育手段, 因其无须深入了解微生物具体调控机制, 以细胞内整套基因组为对象, 可进行随机交换重组整合, 通过筛选最佳“组合”, 从而加快定向进化速率, 达到快速育种目的。

该方法主要通过对一些经过传统诱变之后目的产物产量提升幅度较大的突变株进行多轮原生质体融合, 使他们染色体重排或重组, 进而获得目的产物大量提升的正向突变株。Li Shu等^[38]首先通过基因组重排技术提高了5种链霉菌野生型菌株的 ϵ -PL产量和高糖耐受性, 然后对所有重组菌株进行随机原生质体融合和种间杂交, 确定了一株高产菌株*S. albulus* FEEL-1, 摇瓶中 ϵ -PL产量为1.12 g/L, 约为野生型的2.75倍。Wang Liang等^[39]通过基因组重排技术结合Gen抗性筛选, 得到一株突变株*S. albulus* AG3-28, 经分析其关键酶活力与*pIs*基因转录水平都有所上调, 进而使 ϵ -PL产量提高。Zhou Yongpeng等^[40]采用基因组重排技术, 经过4轮的原生质体递推融合, 提升 ϵ -PL生产菌的耐受性, 最终获得一株高产 ϵ -PL突变株*S. albulus* F4-22, 其摇瓶产量为3.11 g/L, 较出发菌株 ϵ -PL产量提升81%。Liu Yongjuan等^[41]对从核糖体工程中获得的菌株进行基因组重组, 以获得更好的 ϵ -PL产生菌株, 筛选出的突变株*S. albulus* SG-86产率比亲本菌株

M-Z18高出了144.7%, 通过测序分析发现突变株较亲本菌株缺失了近2.1 Mb基因组信息, 这也许引起了其副产物的减少, 促进了目标产物的合成。

由于绝大部分用于基因组重排的亲本依旧出自于传统随机诱变, 其性能直接影响到突变菌的质量, 所以效率低下这一局限性仍旧是一个无法避免的难题。同时, 由于微生物基因表达和代谢网络调控的复杂性, 使得通过基因组重排富集的多种突变是否一定会产生协同效应这一结果并不能确定, 且可能由于相互干扰而无法促进预期的目标菌种进化。而且由于缺少高效筛选手段, 其稳定性会一代不如一代, 这是基因组重排与其他诱变方法目前亟需解决的问题之一。因此, 独特的筛选手段对于基因组重排菌遗传的稳定十分必要, 且拥有高效的筛选方法也是基因组重排得以有效应用的关键。表1为近几年诱变选育 ϵ -PL生产菌实例。

表1 ϵ -PL生产菌诱变选育实例
Table 1 Examples of strain improvement for ϵ -PL production

菌株	诱变方法	发酵方法	产量/(g/L)	提升率/%	培养时间/h	参考文献
<i>S. albulus</i> A-29	ARTP	摇瓶培养	1.59	288.00	72	[24]
<i>S. albulus</i> AD-9	ARTP+DES	摇瓶培养	2.1	110.00	72	[25]
<i>S. albulus</i> AS3-14	ARTP+核糖体工程	摇瓶培养	2.91	66.30	96	[26]
<i>S. albulus</i> FQF-3	DES	摇瓶培养	1.37	53.00	72	[27]
<i>S. diastatochromogenes</i> 6#-7	NTG+UV+LiCl	摇瓶培养	0.78	42.20	72	[28]
<i>S. albulus</i> SS-62	Str抗性筛选	摇瓶培养	3.04	78.82	96	[33]
<i>S. albulus</i> S-88	核糖体工程	摇瓶培养	2.81	175.00	96	[34]
<i>S. albulus</i> SG-31	核糖体工程	摇瓶培养	3.83	139.00	96	[34]
<i>S. albulus</i> R6	核糖体工程	摇瓶培养	4.41	275.00	96	[35]
<i>S. albulus</i> WG-608	核糖体工程	摇瓶培养	3.70	42.30	96	[36]
<i>S. albulus</i> FEEL-1	基因组重排	摇瓶培养	1.12	173.00	96	[38]
<i>S. albulus</i> AG3-28	基因组重排+核糖体工程	摇瓶培养	3.43	49.10	72	[39]
<i>S. albulus</i> F4-22	基因组重排+DES	摇瓶培养	3.11	81.00	72	[40]
<i>S. albulus</i> SG-86	基因组重排+核糖体工程	摇瓶培养	4.16	145.00	96	[41]
<i>S. albulus</i> AF3-44	基因组重排	摇瓶培养	3.10	34.00	72	[42]
<i>S. graminearus</i> F3-4	基因组重排	摇瓶培养	2.40	50.00	96	[43]
<i>S. Albulus</i> LS-84	种间杂交	5L分批发酵培养	32.60	256.10	196	[44]

2.4 基因工程育种

基因工程是在分子水平上将不同来源的基因通过体外重组后导入受体细胞内, 使这个基因能在受体细胞内复制、转录、翻译表达的操作^[45]。

2.4.1 基于合成途径的基因工程育种

近年来, 随着基因工程在提高菌株初级和次级代谢产物上的广泛应用, 对 ϵ -PL生产菌株进行基因改造是当前研究热点(图3)^[1,46]。当前与 ϵ -PL产量相关的主要难题仍是由复杂的合成途径导致的发酵效率低下, 这限制了基因工程在 ϵ -PL生产菌株中的应用。因此, 拥有全基因组测序提供的遗传信息十分必要, 其能够提供细胞内生理和代谢的全面信息。Wang Lin等^[47]首次获得了完整的*S. albulus* ZPM基因组序列, 共9 784 577 bp, GC(鸟

产量提高有关。Wang Chenying^[59]和Pan Long^[60]等分别对M-Z18耐酸反应进行了转录组分析,发现了一个信号转导系统(Mpr A/B和Pep D),其可以正向调节 pls 转录,从而显著提高 ϵ -PL产量。

此外,还可以通过多种方式促进细胞代谢活性和生物量形成,进而促进目的产物合成。在发酵过程中,随着菌体的生长及目标产物的增加,发酵液会逐渐变得黏稠,大大降低了氧气转移效率。而VHb(由 vgb 基因编码)可以与低浓度氧结合,并将其运输到细胞代谢过程中需要更多氧气供应的位置,可以有效解决此类问题。因此,Xu Zhaoxian等^[61]将 vgb 基因整合到*S. albulus* PD-1染色体中,减轻了氧的限制作用,促进了深层发酵中 ϵ -PL的生物合成。最终,在5 L生物反应器中进行分批培养后, ϵ -PL产量从22.7 g/L增加到34.2 g/L。同年,Gu Yanyan等^[62]也将 vgb 基因插入*S. albulus* NK660染色体中,一氧化碳(CO)差光谱分析表明,*S. albulus* NK660-VHb菌株可表达VHb功能,其 ϵ -PL产量和生物量分别比野生型对照高26.67%和14.57%。从结果看,在生产菌中表达 vgb 基因能够在低氧条件下提高氧气转移效率,从而达到提高 ϵ -PL产量的目的。

发酵过程除了需要氧外,氮也不可或缺。为提高氮利用效率,Xu Delei等^[63]通过在*S. albulus* PD-1中过表达铵转运蛋白基因($amtB$)来提高 ϵ -PL产量,通过测定与铵态氮代谢和 ϵ -PL合成相关基因和酶表达效果,发现*S. albulus* PD-1中 $amtB$ 过表达增加了相应代谢途径的活性,增强了 ϵ -PL生物合成能力,使 ϵ -PL产量增加了57.2%。*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosylmethionine synthetase, SAM)(由 $metK$ 基因编码)是一种甲基供体,它为初级和次级代谢所必需的几种反应提供甲基。Gu Yanyan等^[62]过表达 $metK$ 基因使*S. albulus* NK660-SAM细胞内SAM合成增加,导致 pls 转录水平增加,但是过表达该基因只增加了生物量,并没有增加 ϵ -PL产量,也许将该策略与其他方法相结合,可能会将代谢通量从细胞生长转移到 ϵ -PL生物合成过程中。

随着研究者们对 ϵ -PL合成机制的不断研究,通过基因工程手段在其合成途径对一些关键基因进行表达克隆、敲除等操作,不断地尝试获得了一些 ϵ -PL高产菌株。Huang Rui等^[64]在*S. albulus* NK660中发现了一个新的AdpA同源物AdpASa,随后选择了4种AdpA的同源物进行异源表达。最终发现从*S. neyagawaensis* NRRLB-3092中得到的 $adpA_{sn}$ 基因的异源表达能够有效促进 ϵ -PL的产量。目前为止,关于 ϵ -PL基因工程的报道还不多,不过研究者们从未放缓探索的脚步,随着最近几年来的基因工程研究的增多,相信未来对 ϵ -PL会有更深层次的认识。关于基因工程育种技术在 ϵ -PL生产菌中的部分研究如表2所示。

表2 基因工程选育 ϵ -PL高产菌株Table 2 Genetically engineered strains for enhanced production of ϵ -PL

菌株	基因工程方法	培养方法	产量/(g/L)	培养时间	参考文献
<i>S. lividans</i> ZX7- pls	异源表达 pls 基因	摇瓶培养	0.56	120 h	[8]
<i>S. albulus</i> OE- ppc	过表达 ppc 基因	5 L发酵罐培养	36.50	192 h	[46]
<i>S. albulus</i> OE- pyc	过表达 pyc 基因	5 L发酵罐培养	39.00	192 h	[46]
<i>S. albulus</i> OE- pls	过表达 pls 基因	5 L发酵罐培养	41.30	192 h	[46]
<i>S. albulus</i> CR1- ask	定点突变 ask 基因	5 L发酵罐培养	15.00	168 h	[49]
<i>S. diastatocromogenes</i> 12#-2	过表达 $dapA$ 基因	5 L发酵罐培养	30.54	168 h	[50]
<i>S. albulus</i> Q-PL2	过表达 pls 基因	5 L发酵罐培养	20.10	72 h	[51]
<i>E. festucae</i> Pref:: $VibA$	过表达 $VibA$ 基因	摇瓶培养	0.04	5~10 d	[52]
<i>E. festucae</i> Pref:: $EpIs$	过表达 $EpIs$ 基因	摇瓶培养	0.07	5~10 d	[52]
<i>S. albulus</i> PD-5	低产菌的 pls 基因表达至高产菌中	5 L发酵罐培养	23.60	168 h	[53]
<i>S. albulus</i> NBRC14147	定点突变 tm 、 nys 基因	摇瓶培养	3.50	30 h	[57]
<i>S. albulus</i> M-Z18- fr	过表达 fr 基因	5 L发酵罐培养	3.70	25 h	[58]
<i>S. albulus</i> PD-2	过表达 vgb 基因	5 L发酵罐培养	34.20	168 h	[61]
<i>S. albulus</i> NK660-VHb	过表达 vgb 基因	5 L发酵罐培养	0.76	120 h	[62]
<i>S. albulus</i> NK660-SAM	过表达 $metK$ 基因	5 L发酵罐培养	0.56	120 h	[62]
<i>S. albulus</i> PD-1- $amtB$	过表达 $amtB$ 基因	5 L发酵罐培养	35.70	168 h	[63]
<i>S. albulus</i> SNA	异源表达 $adpA$ 基因	摇瓶培养	0.82	72 h	[64]

3 ϵ -聚赖氨酸发酵生产

为了获得高 ϵ -PL产量,研究者们不仅在菌种选育上投入了大量的精力,还在发酵上做了许多的研究,如改善发酵时的营养条件、调节发酵pH值、溶解氧(dissolved oxygen, DO)以及细胞固定化等^[65]。Fu Jiaolong等^[66]以木薯渣提取物作为碳源进行 ϵ -PL的发酵,通过优化培养基成分使生产成本减少, ϵ -PL的产量得到了提升。Zhang Yi等^[67]更进一步以木薯淀粉作为碳源、鱼粉作为氮源来发酵生产 ϵ -PL,并采用回应面法确定了最佳添加量,最终使 ϵ -PL产量提高了34.02%。菌液在发酵过程中,pH值如果不加以调控,任其自然下降到3.0,在此条件下会严重影响 ϵ -PL的产量,因此控制pH值则成为了发酵过程中不可或缺的一部分。Ren Xidong等^[68]采用三阶段pH值控制策略来发酵*S. albulus* M-Z18,在pH 3.0酸性冲击的基础上添加了在pH 5.0时的预冲击策略, ϵ -PL最终产量达到了57.4 g/L。Pan Long等^[69]根据pH冲击策略,对其进一步改善,在培养与发酵两个阶段都采取冲击策略,进一步提高了 ϵ -PL产量。

由于发酵过程中的高耗氧量和逐渐增加的细胞密度, ϵ -PL发酵液中的氧气供应往往受到限制,因此调节DO也可起到优化发酵的目的。Xu Zhaoxian等^[70]向发酵液中加入正十二烷作为氧载体进行发酵,优化了菌液溶氧环境,最终使 ϵ -PL产量达到了30.8 g/L。与自由细胞发酵相比,固定细胞有几个明显的优势:增加细胞密度、对变化环境的耐受性更好、增加对有毒物质的抗性、减少污染问题以及重复使用。Wang Cheng等^[71]采用在丝络海绵载体上制备的还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide on loofah sponge, rGOLS)作为固定化材料发酵生产

ϵ -PL, 产量达到了39.2 g/L, 且固定的细胞在624 h内重复使用了6次之多。由此可见细胞固定化可以在一定程度上提高产量且大幅减少发酵的成本。

4 结语

ϵ -PL拥有众多优异性能, 作为一种高价值产品, 应用潜力十分巨大。但是, 因为 ϵ -PL具有较为复杂的代谢途径以及较低的合成能力与转化效率, 严重阻碍了其商业化生产。因此, 借助各种手段提升其合成能力、降低生产成本, 是其商业化应用的一个必经过程。截至目前, 已经通过理化诱变、核糖体工程、基因组重排以及基因工程等方法尝试提高生产菌的合成能力, 且在优化生产菌的发酵工艺以及采用更为廉价的工农业副产物作为原料生产方面也有一定的研究。在此, 对于其未来的发展提出一些展望。

1) 更高效筛选方法的建立与应用。菌株选育十分重要, 根据近期数据显示, ARTP诱变与核糖体工程等技术在育种方面都有着不错的表现。但育种过程仍是耗时费力的环节, 且要达到高产的目标, 诱变的随机性也是一个难以忽略的问题。因此高效的筛选方法以及诱变手段是研究者们共同努力的方向, 如Liu Yongjuan等^[72]建立了24/48微孔板发酵产 ϵ -PL体系, 提高了筛选效率。对于 ϵ -PL高通量筛选体系还需不断探究, 理想形式为通过智能化的高通量筛选方法及设备来显著提高筛选效率。

2) 利用各种基因、组学方法, 探究菌株高产机理, 实现定向进化。基因工程技术是提升 ϵ -PL生产菌性能的重要手段。不仅可以通过克隆表达一些关键基因起到提高其产量的目标, 也可通过对副产物相关基因的敲除进而减少合成消耗, 简化合成步骤, 提升目标产量。近期, CRISPR/Cas9作为一种高效基因编辑技术在链霉菌基因改造中^[18,73]逐步得到应用, 关于该技术在 ϵ -PL生产菌中的应用值得研究人员深入探究。基因技术不是闭门造车, 要先结合各种有效信息进行有目的地判断与尝试, 才能少走弯路, 进而取得优异成果。

3) 构建更加高效的菌株发酵手段。目前菌株补料分批发酵生产时间普遍在200 h, 生产效率较低。有研究者尝试将 p_{ls} 在另一种菌株中进行异源表达, 以期提高 ϵ -PL合成效率, 最后发现异源表达菌株虽能产生 ϵ -PL, 但产量太低, 结果不太理想^[8]。随着对 ϵ -PL合成途径和机理的进一步解析, 在发酵过程及 ϵ -PL生物合成途径中由于未知限速步骤所导致的效率问题会逐步得到解决, 相信在不久的将来可以构建出更加高效的基因工程菌株, 为 ϵ -PL高效、绿色生物制造奠定坚实的技术基础。

参考文献:

- [1] WANG Liang, ZHANG Chongyang, ZHANG Jianhua, et al. Epsilon-poly-L-lysine: recent advances in biomanufacturing and applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 748976. DOI:10.3389/fbioe.2021.748976.
- [2] SHIMA S, SAKAI H. Polylysine produced by *Streptomyces*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1977, 41(9): 1807-1809. DOI: 10.1080/00021369.1977.10862764.
- [3] LIU Jianing, CHANG Senlin, XU Pengwei, et al. Structural changes and antibacterial activity of epsilon-poly-L-lysine in response to pH and phase transition and their mechanisms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(4): 1101-1109. DOI:10.1021/acs.jafc.9b07524.
- [4] GEORNARAS I, YOON Y, BELK K E, et al. Antimicrobial activity of ϵ -poly-L-lysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts[J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(8): M330-M334. DOI:10.1111/j.1750-3841.2007.00510.x.
- [5] ZHOU Tao, LIU He, HUANG Yuanmin, et al. ϵ -Poly-L-lysine affects the vegetative growth, pathogenicity and expression regulation of necrotrophic pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(10): 821. DOI:10.3390/jof7100821.
- [6] SHU Chang, CUI Kuanbo, LI Qianqian, et al. Epsilon-poly-L-lysine (ϵ -PL) exhibits multifaceted antifungal mechanisms of action that control postharvest *Alternaria rot*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 348: 109224. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109224.
- [7] BANKAR S B, SINGHAL R S. Optimization of poly-epsilon-lysine production by *Streptomyces noursei* NRRL 5126[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8370-8375. DOI:10.1016/j.biortech.2010.06.004.
- [8] GENG Weita, YANG Chao, GU Yanyan, et al. Cloning of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) synthetase gene from a newly isolated ϵ -PL-producing *Streptomyces albulus* NK660 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(2): 155-164. DOI:10.1111/1751-7915.12108.
- [9] 孙湘婷, 陈婷婷. ϵ -聚赖氨酸高产菌的新型筛选模型[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 202-203; 209. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.02.027.
- [10] HIRAKI J, HATAKEYAMA M, MORITA H, et al. Improved epsilon-poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus*[J]. *Seibutsu-Kogaku Kaishi*, 1998, 12(76): 487-493.
- [11] YAMANAKA K, MARUYAMA C, TAKAGI H, et al. Epsilon-poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(12): 766-772. DOI:10.1038/nchembio.125.
- [12] WANG Ziyuan, GUO Fengzhu, DONG Tianyu, et al. Metabolomic analysis of biosynthesis mechanism of ϵ -polylysine produced by *Streptomyces diastatochromogenes*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 698022. DOI:10.3389/fbioe.2021.698022.
- [13] WANG Dahong, WANG Hemin, WU Jinpeng, et al. Biotechnological production and application of epsilon-poly-L-lysine (ϵ -PL): biosynthesis and its metabolic regulation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(7): 123. DOI:10.1007/s11274-022-03304-6.
- [14] XU Zhaoxian, XU Zheng, FENG Xiaohai, et al. Recent advances in the biotechnological production of microbial poly(ϵ -L-lysine) and

- understanding of its biosynthetic mechanism[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(15): 6619-6630. DOI:10.1007/s00253-016-7677-3.
- [15] LI Shubo, MAO Yunren, ZHANG Lifei, et al. Recent advances in microbial ϵ -poly-*L*-lysine fermentation and its diverse applications[J]. Biotechnology for Biofuels, 2022, 15(1): 65. DOI:10.1186/s13068-022-02166-2.
- [16] YAMANAKA K, KITO N, IMOKAWA Y, et al. Mechanism of epsilon-poly-*L*-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an epsilon-poly-*L*-lysine-degrading enzyme[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 5669-5675. DOI:10.1128/AEM.00853-10.
- [17] 刁文娇, 朱道君, 潘龙, 等. 小白链霉菌 ϵ -聚赖氨酸降解酶生理功能分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3542-3556. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20210072.
- [18] LI Qinyu, CHEN Xiaojia, WU Yuanjie, et al. A study of type II ϵ -PL degrading enzyme (pIdII) in *Streptomyces albulus* through the CRISPRi system[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6691. DOI:10.3390/ijms23126691.
- [19] 杨玉红, 于雪骊, 刘长江. 紫外诱变选育多聚赖氨酸高产菌株的研究[J]. 北方园艺, 2007(9): 45-46.
- [20] 丛茂林, 许鹏, 谭之磊, 等. 氮离子入法筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌株[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 491-493; 506.
- [21] 张海涛, 李燕, 欧杰, 等. 诱变选育 ϵ -聚赖氨酸产生菌突变株[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 398-400.
- [22] OTTENHEIM C, NAWRATH M, WU Jinchuan. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 12. DOI:10.1186/s40643-018-0200-1.
- [23] ZHANG Xue, ZHANG Xiaofei, LI Heping, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396. DOI:10.1007/s00253-014-5755-y.
- [24] ZONG Hong, ZHAN Yao, LI Xiang, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(13): 3154-3158. DOI:10.5897/AJMR11.1251.
- [25] 席志文, 黄林娜, 翟一畅, 等. ARTP-DES连续诱变选育高产 ϵ -聚赖氨酸突变株[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 131-137. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190517-191.
- [26] WANG Liang, CHEN Xusheng, WU Guangyao, et al. Improved ϵ -poly-*L*-lysine production of *Streptomyces* sp. FEEL-1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and streptomycin resistance screening[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2009-2017. DOI:10.1007/s13213-015-1039-8.
- [27] 李聪, 扶教龙, 施磊, 等. ϵ -聚赖氨酸生产菌的硫酸二乙酯诱变及其发酵培养基优化[J]. 中国调味品, 2018, 43(3): 34-40.
- [28] SONG Shuai, TAN Zhilei, GUO Fengzhu, et al. Breeding of *Streptomyces diastatochromogenes* for mass-producing ϵ -poly-*L*-lysine by composite mutation[J]. Lecture Notes in Electrical Engineering, 2014, 249: 359-366. DOI:10.1007/978-3-642-37916-1_37.
- [29] OCHI K. From microbial differentiation to ribosome engineering[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(6): 1373-1386. DOI:10.1271/bbb.70007.
- [30] 谢运昌, 姚仕杰, 李炜, 等. 放线菌核糖体工程的发展与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 546-564. DOI:10.13345/j.cb.210150.
- [31] ZHU Saibin, DUAN Yanwen, HUANG Yong. The application of ribosome engineering to natural product discovery and yield improvement in *Streptomyces*[J]. Antibiotics, 2019, 8(3): 133. DOI:10.3390/antibiotics8030133.
- [32] OCHI K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects[J]. The Journal of Antibiotics, 2017, 70(1): 25-40. DOI:10.1038/ja.2016.82.
- [33] LIU Yongjuan, CHEN Xusheng, ZHAO Junjie, et al. Improvement of ϵ -poly-*L*-lysine production of *Streptomyces albulus* by continuous introduction of streptomycin resistance[J]. Process Biochemistry, 2019, 82: 10-18. DOI:10.1016/j.procbio.2019.04.006.
- [34] WANG Liang, CHEN Xusheng, WU Guangyao, et al. Enhanced ϵ -poly-*L*-lysine production by inducing double antibiotic-resistant mutations in *Streptomyces albulus*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(2): 271-283. DOI:10.1007/s00449-016-1695-5.
- [35] WANG Liang, LI Shu, ZHAO Junjie, et al. Efficiently activated ϵ -poly-*L*-lysine production by multiple antibiotic-resistance mutations and acidic pH shock optimization in *Streptomyces albulus*[J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8(5): e00728. DOI:10.1002/mbo3.728.
- [36] 吴光耀, 陈旭升, 王靓, 等. 核糖体工程技术选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2744-2751. DOI:10.13344/j.microbiol.china.160026.
- [37] STEMMER W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(22): 10747-10751. DOI:10.1073/pnas.91.22.10747.
- [38] LI Shu, CHEN Xusheng, DONG Chuanliang, et al. Combining genome shuffling and interspecific hybridization among *Streptomyces* improved ϵ -poly-*L*-lysine production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(1): 338-350. DOI:10.1007/s12010-012-9969-0.
- [39] WANG Liang, CHEN Xusheng, WU Guangyao, et al. Genome shuffling and gentamicin-resistance to improve ϵ -poly-*L*-lysine productivity of *Streptomyces albulus* W-156[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(8): 1601-1617. DOI:10.1007/s12010-016-2190-9.
- [40] ZHOU Yongpeng, REN Xidong, WANG Liang, et al. Enhancement of ϵ -poly-lysine production in ϵ -poly-lysine-tolerant *Streptomyces* sp. by genome shuffling[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(9): 1705-1713. DOI:10.1007/s00449-015-1410-y.
- [41] LIU Yongjuan, WANG Kaifang, PAN Long, et al. Improved production of ϵ -poly-*L*-lysine in *Streptomyces albulus* using genome shuffling and its high-yield mechanism analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 923526. DOI:10.3389/fmicb.2022.923526.
- [42] 李双, 颜鹏, 曾晨, 等. Genome shuffling筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌及其对代谢流量分配的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(12): 2568-2577. DOI:10.13344/j.microbiol.china.151070.
- [43] LI Shu, LI Feng, CHEN Xusheng, et al. Genome shuffling enhanced ϵ -poly-*L*-lysine production by improving glucose tolerance of *Streptomyces graminearus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(2): 414-423. DOI:10.1007/s12010-011-9437-2.
- [44] LI Shu, WANG Nan, DU Zongjun, et al. Intergeneric hybridization between *Streptomyces albulus* and bacillus subtilis facilitates production of ϵ -poly-*L*-lysine from corn starch residues[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2018, 23(5): 580-587. DOI:10.1007/s12257-018-0253-1.
- [45] LANIGAN T M, KOPERA H C, SAUNDERS T L. Principles of genetic engineering[J]. Genes, 2020, 11(3): 291. DOI:10.3390/genes11030291.
- [46] 张重阳, 杨昊, 朱道君, 等. 过表达 L -赖氨酸合成途径关键基因和 ϵ -聚赖氨酸合成酶基因对 ϵ -聚赖氨酸合成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 49(6): 1-9. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031337.

- [47] WANG Lin, GAO Chunhui, TANG Nan, et al. Identification of genetic variations associated with epsilon-poly-L-lysine biosynthesis in *Streptomyces albulus* ZPM by genome sequencing[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9201. DOI:10.1038/srep09201.
- [48] HAMANO Y, NICCHU I, HOSHINO Y, et al. Development of gene delivery systems for the epsilon-poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(6): 636-641. DOI:10.1263/jbb.99.636.
- [49] HAMANO Y, NICCHU I, SHIMIZU T, et al. Epsilon-poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*, has feedback-inhibition resistant aspartokinase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4): 873-882. DOI:10.1007/s00253-007-1052-3.
- [50] LI Wenchao, LV Junge, DONG Tianyu, et al. Effects of amino acids and overexpression of *dapA* gene on the production of ϵ -poly-L-lysine by *Streptomyces diastatochromogenes* strains[J]. Current Microbiology, 2021, 78(7): 2640-2647. DOI:10.1007/s00284-021-02510-z.
- [51] WANG Aixia, TIAN Wenzhe, CHENG Lei, et al. Enhanced ϵ -poly-L-lysine production by the synergistic effect of ϵ -poly-L-lysine synthetase overexpression and citrate in *Streptomyces albulus*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 288. DOI:10.3389/fbioe.2020.00288.
- [52] PUREV E, KONDO T, TAKEMOTO D, et al. Identification of ϵ -poly-L-lysine as an antimicrobial product from an *Epichloë endophyte* and isolation of fungal ϵ -PL synthetase gene[J]. Molecules, 2020, 25(5): 1032. DOI:10.3390/molecules25051032.
- [53] XU Delei, WANG Rui, XU Zhaoxian, et al. Discovery of a short-chain ϵ -poly-L-lysine and its highly efficient production via synthetase swap strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(5): 1453-1462. DOI:10.1021/acs.jafc.8b06019.
- [54] TAKEHARA M, SAIMURA M, INABA H, et al. Poly(gamma-L-diaminobutanoic acid), a novel poly(amino acid), coproduced with poly(epsilon-L-lysine) by two strains of *Streptomyces celluloflavus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 286(1): 110-117. DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01261.x.
- [55] NISHIKAWA M, KOBAYASHI K. *Streptomyces roseovercillatus* produces two different poly(amino acid)s: lariat-shaped gamma-poly(L-glutamic acid) and epsilon-poly(L-lysine)[J]. Microbiology, 2009, 155(Part 9): 2988-2993. DOI:10.1099/mic.0.029694-0.
- [56] XIA Jun, XU Hong, FENG Xiaohai, et al. Poly(L-diaminopropionic acid), a novel non-proteinic amino acid oligomer co-produced with poly(ϵ -L-lysine) by *Streptomyces albulus* PD-1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17): 7597-7605. DOI:10.1007/s00253-013-4936-4.
- [57] YAMANAKA K, HAMANO Y, OIKAWA T. Enhancement of metabolic flux toward ϵ -poly-L-lysine biosynthesis by targeted inactivation of concomitant polyene macrolide biosynthesis in *Streptomyces albulus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 129(5): 558-564. DOI:10.1016/j.jbiosc.2019.12.002.
- [58] LIU Yongjuan, CHEN Xusheng, PAN Long, et al. Differential protein expression of a streptomycin-resistant *Streptomyces albulus* mutant in high yield production of ϵ -poly-L-lysine: a proteomics study[J]. RSC Advances, 2019, 9(42): 24092-24104. DOI:10.1039/c9ra03156a.
- [59] WANG Chenying, REN Xidong, YU Chao, et al. Physiological and transcriptional responses of *Streptomyces albulus* to acid stress in the biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1379. DOI:10.3389/fmicb.2020.01379.
- [60] PAN Long, CHEN Xusheng, WANG Kaifang, et al. A temporal transcriptomic dynamics study reveals the reason of enhanced ϵ -poly-L-lysine production in *Streptomyces albulus* M-Z18 by pH shock[J]. Process Biochemistry, 2019, 85: 1-11. DOI:10.1016/j.procbio.2019.07.012.
- [61] XU Zhaoxian, CAO Changhong, SUN Zhuzhen, et al. Construction of a genetic system for *Streptomyces albulus* PD-1 and improving poly(ϵ -L-lysine) production through expression of *Vitreoscilla* hemoglobin[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(11): 1819-1826. DOI:10.4014/jmb.1506.06084.
- [62] GU Yanyan, WANG Xiaomeng, YANG Chao, et al. Effects of chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) and *S*-adenosylmethionine synthetase gene (*metK*) on ϵ -poly-L-lysine synthesis in *Streptomyces albulus* NK660[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(7): 1445-1457. DOI:10.1007/s12010-015-1958-7.
- [63] XU Delei, YAO Haiqing, CAO Changhong, et al. Enhancement of ϵ -poly-L-lysine production by overexpressing the ammonium transporter gene in *Streptomyces albulus* PD-1[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(9): 1337-1345. DOI:10.1007/s00449-018-1961-9.
- [64] HUANG Rui, LIU Honglu, ZHAO Wanwan, et al. AdpA, a developmental regulator, promotes ϵ -poly-L-lysine biosynthesis in *Streptomyces albulus*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 60. DOI:10.1186/s12934-022-01785-6.
- [65] 王月, 扶教龙, 张映. ϵ -聚赖氨酸发酵工艺的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(23): 315-321. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031663.
- [66] FU Jiaolong, LI Cong, JU Xin, et al. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine from cassava bagasse hydrolysate used as carbon source by *Streptomyces albulus* US3-18[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022, 45(8): 1407-1419. DOI:10.1007/s00449-022-02755-3.
- [67] ZHANG Yi, BAI Jing, WU Chenqi, et al. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine using cassava starch and fish meal by *Streptomyces albulus* FQC-24[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2022, 52(5): 525-533. DOI:10.1080/10826068.2021.1969577.
- [68] REN Xidong, CHEN Xusheng, ZENG Xin, et al. Acidic pH shock induced overproduction of ϵ -poly-L-lysine in fed-batch fermentation by *Streptomyces* sp. M-Z18 from agro-industrial by-products[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(6): 1113-1125. DOI:10.1007/s00449-015-1354-2.
- [69] PAN Long, CHEN Xusheng, LIU Mingming, et al. Efficient production of ϵ -poly-L-lysine from glucose by two-stage fermentation using pH shock strategy[J]. Process Biochemistry, 2017, 63: 8-15. DOI:10.1016/j.procbio.2017.08.008.
- [70] XU Zhaoxian, BO Fangfang, JUN Xia, et al. Effects of oxygen-vectors on the synthesis of epsilon-poly-lysine and the metabolic characterization of *Streptomyces albulus* PD-1[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 94: 58-64. DOI:10.1016/j.bej.2014.11.009.
- [71] WANG Cheng, CHEN Xi, JIANG Yingying, et al. Facile and green synthesis of reduced graphene oxide/loofah sponge for *Streptomyces albulus* immobilization and ϵ -poly-L-lysine production[J]. Bioresource Technology, 2022, 349: 126534. DOI:10.1016/j.biortech.2021.126534.
- [72] LIU Yongjuan, CHEN Xusheng, ZHAO Junjie, et al. Development of microtiter plate culture method for rapid screening of ϵ -poly-L-lysine-producing strains[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 183(4): 1209-1223. DOI:10.1007/s12010-017-2493-5.
- [73] HRYHOROWICZ M, LIPINSKI D, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2017, 65(3): 233-240. DOI:10.1007/s00005-016-0427-5.