DOI:10.12441/spyswjs.20250916002 [文章编号] 1673-1689(2026)04-0009-09

*Streptomyces noursei*的选育、产孢恢复及pH冲击强化合成ε-聚赖氨酸的研究

谭 蕾 王双羽 李 树*

(山东大学海洋学院,山东 威海 264209)

摘要:【目的】以 *Streptomyces noursei* GX6(*S. noursei* GX6)为出发菌株,通过菌种选育提升其ε-聚赖氨酸(ε-PL)产量,并解决突变株产孢能力退化的问题,再利用pH调控发酵进一步提高突变株的ε-PL产量。**【方法】**采用离子注入诱变结合多抗生素抗性筛选的方法选育 *S. noursei* GX6,从中筛选ε-PL高产突变株;然后对培养高产菌株的培养基成分和质量浓度进行优化,观察其产孢情况;最后在5 L发酵罐中进行恒定pH发酵和pH冲击发酵。**【结果】**选育获得高产突变株 *S. noursei* T9,ε-PL摇瓶产量为2.97 g/L;采用MGY培养基(含黄豆粉、甘露醇、葡萄糖、酵母提取物和$CaCO_3$)能有效恢复 *S. noursei* T9的产孢能力,其连续传代10次后仍能维持遗传稳定性;在发酵罐中进行恒定pH 4.0的补料分批发酵,*S. noursei* T9的ε-PL产量达56.8 g/L,相较于 *S. noursei* GX6的47.2 g/L提高了20.3%;进一步采用pH冲击策略,单次冲击可使其ε-PL产量提升至62.1 g/L,增幅为9.3%,而2次pH冲击则使ε-PL产量进一步提高至69.5 g/L,生产效率达到0.006 3 g/(g·h)。**【结论】**该研究为解决 *S. noursei* GX6在工业生产应用中孢子形成能力不足及提高ε-PL产量提供了实用策略。

关键词:*Streptomyces noursei*;ε-聚赖氨酸;孢子化;培养基优化;pH冲击

Breeding and Sporulation Recovery of *Streptomyces noursei* and ε-Poly-lysine Synthesis Enhancement by pH Shocks

*TAN Lei WANG Shuangyu LI Shu**

(Marine College, Shandong University, Weihai 264209, China)

Abstract: [**Objective**] With *Streptomyces noursei* GX6 (*S. noursei* GX6) as the starting strain, strain breeding was carried out to increase the yield of ε-poly-lysine (ε-PL) and solve the problem of sporulation ability degradation of the mutant strain. Then, pH regulation of fermentation was employed to further increase the ε-PL yield of the mutant strain. [**Method**] Ion implantation mutagenesis combined with multi-antibiotic resistance screening was carried out for *S. noursei* GX6, and high-yield mutant strains of ε-PL were screened. Then, the components and their mass concentrations of various culture media were optimized for cultivating the high-yield strain, and the sporulation was observed. Finally, fermentation experiments with constant pH and pH shocks were carried out in a 5 L fermenters. [**Result**] The high-yield mutant strain *S. noursei* T9 obtained through breeding had a ε-PL yield of 2.97 g/L in shake flasks. The use of the MGY medium (containing soybean powder, mannitol, glucose, yeast extract, and $CaCO_3$) effectively restored the sporulation ability of *S. noursei* T9. Moreover, this strain maintained genetic stability after 10 passages. During the fed-batch fermentation with constant pH 4.0 in the fermenter, the ε-PL yield of *S. noursei* T9 reached 56.8 g/L, which was 20.3% higher than that (47.2 g/L) of *S. noursei* GX6. When the pH shock strategy was further adopted, a single shock increased the ε-PL yield to 62.1 g/L,

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2023MC081)。

通信作者:李树(1984—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事发酵工程、代谢工程研究。E-mail:lishu2016@sdu.edu.cn

收稿日期:2025-09-16 **修回日期:**2025-10-15

with an increase of 9.3%, while two pH shocks further increased the ε-PL yield to 69.5 g/L, with the production efficiency reaching 0.006 3 g/(g·h). [**Conclusion**] This study provides practical strategies for addressing the insufficient sporulation capacity and increasing the ε-PL yield of *S. noursei* in industrial production.

Keywords: *Streptomyces noursei*; ε-poly-lysine; sporulation; medium optimization; pH shock

ε-PL是由链霉菌发酵产生的一种均聚物抗菌肽[1-2]，广泛应用于食品、化妆品、饲料、生物材料及基因芯片等多个领域[3-4]。在前期研究中，作者所在课题组筛选出若干可分泌ε-PL的链霉菌属菌株，包括 *Streptomyces rochei*（*S. rochei*）、*Streptomyces yunnanensis*（*S. yunnanensis*）和 *S. noursei* 等，但这些菌株在摇瓶培养中的ε-PL产量较低，仅为0.72~0.98 g/L。为提高ε-PL产量，有研究者采用种间杂交、基因组改组及多抗生素抗性筛选等育种策略，成功获得一株高产菌株 *S. noursei* GX6，在补料分批发酵中ε-PL产量达到47.2 g/L[5]。为进一步提升该菌株的ε-PL产量，作者所在课题组再次利用抗生素抗性的筛选方案，在庆大霉素、林可霉素、利福霉素和链霉素的基础上，新增了巴龙霉素与新霉素，因为它们可促进丰加霉素和青霉酮A的合成[6-7]。然而，筛选过程中发现 *S. noursei* 的孢子形成能力显著减弱，甚至完全丧失。在工业发酵实践中，放线菌的孢子制备是扩大培养与大规模发酵的关键环节，因此解决 *S. noursei* 孢子形成障碍对推进菌株改良与提升ε-PL产量具有重要意义。

研究表明，孢子形成对链霉菌代谢物的产量起到关键作用，孢子形成效率与代谢物产量之间存在显著正相关。例如，在 *Streptomyces griseus*（*S. griseus*）中，营养缺陷型突变株SKK815和秃头型突变株SKK817的孢子形成缺陷与链霉素生物合成中止同时发生，而回复突变可协同恢复两者的功能[8]。在 *Streptomyces coelicolor*（*S. coelicolor*）中，敲除关键孢子形成基因 *ssgA* 后，导致放线紫红素产量几乎完全丧失，而通过基因回补可同时恢复孢子形成与放线紫红素合成能力[9]。类似地，在 *Streptomyces lincolnensis*（*S. lincolnensis*）中，*bldA* 基因参与菌丝形态分化和林可霉素生物合成，其失活会同时导致孢子化能力下降与林可霉素产量降低[10]。尽管上述研究通过遗传手段成功恢复了孢子形成功能，但难以直接应用于工业生产，因为工厂菌株孢子退化的原因较多。作者通过优化培养基组成以改善 *S. noursei* 的孢子形成能力，并结合多次pH冲击策略提高突变株的ε-PL产量，为解决孢子形成障碍及提升工业发酵性能提供了可行的策略，同时为放线菌在连续传代与大规模发酵中的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

S. noursei GX6：作者所在课题组筛选和保藏，在NCBI中的序列号为PP292016。

葡萄糖、$(NH_4)_2SO_4$、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、甘露醇、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$、KH_2PO_4、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：均为分析纯，国药化学试剂（上海）有限公司；$CaCO_3$、NaCl、可溶性淀粉、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、KNO_3：均为分析纯，西陇科学股份有限公司；庆大霉素、林可霉素、利福霉素、链霉素、巴龙霉素、新霉素：均为分析纯，生工生物工程（上海）股份有限公司；胰蛋白胨、琼脂粉：青岛海博生物技术有限公司；酵母粉：美国赛默飞世尔科技公司；黄豆粉：北京鸿润宝顺科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

生化培养箱：SPX-250B-Z型，谦科仪器设备（上海）有限公司；立式全温振荡培养箱：MQL-61FR型，上海旻泉仪器有限公司；全自动高压蒸汽灭菌锅：GI54TW型，致微（厦门）仪器有限公司；紫外-可见分光光度计：721型，上海佑科仪器仪表有限公司；洁净工作台：BCM-1000A型，苏州安泰空气技术有限公司；pH计：PHS-3E型，上海仪电科学仪器有限公司；自动发酵罐：GBCN-5L型，镇江东方生物工程设备技术公司；离子注入诱变仪：ARTP-II型，北京思清源生物技术公司；生物传感器分析仪：SBA-40B型，济南延和生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

贝特纳培养基（BTN，g/L）：葡萄糖10.0、酵母粉1.0、胰蛋白胨2.0、琼脂20.0。

2倍贝特纳培养基（2-BTN，g/L）：葡萄糖20.0、酵母粉2.0、胰蛋白胨4.0、琼脂20.0。

1/2贝特纳培养基（1/2-BTN，g/L）：葡萄糖

5.0、酵母粉0.5、胰蛋白胨1.0、琼脂20.0。

高氏一号培养基（GMN，g/L）：可溶性淀粉20.0、KNO_3 1.0、NaCl 0.5、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01、琼脂20.0。

国际链霉菌计划4号培养基（ISP4，g/L）：可溶性淀粉10.0、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0、NaCl 1.0、$(NH_4)_2SO_4$ 2.0、$CaCO_3$ 2.0、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01、琼脂20.0。

链霉菌产孢培养基（MS，g/L）：黄豆粉20.0、甘露醇20.0、$CaCO_3$ 3.0、琼脂20.0。

发酵培养基（M3G，g/L）：葡萄糖50.0、$(NH_4)_2SO_4$ 10.0、酵母粉7.0、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5、KH_2PO_4 2.5、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03。

以上所有培养基均用2 mol/L NaOH溶液调节pH至7.0，121 ℃灭菌15 min。

1.2　方法

1.2.1　离子注入诱变与抗生素抗性筛选

用PBS缓冲液将*S. noursei* GX6孢子悬浮液浓度调整至1×10^8 CFU/mL，取5 mL悬浮液倒入直径9 cm培养皿，置于离子注入诱变仪的突变舱中。仪器参数设置如下：能量30 keV，氮离子注入剂量1×10^{21} m^{-2}，真空度5×10^{-2} Pa，温度25 ℃，束流10 mA，处理时间60 s。诱变完成后，将孢子悬浮液涂布于梯度平板中，6种抗生素的最高质量浓度分别为：庆大霉素18.0 μg/mL、林可霉素10.0 μg/mL、利福霉素12.0 μg/mL、链霉素8.0 μg/mL、巴龙霉素10.0 μg/mL、新霉素15.0 μg/mL。30 ℃培养5 d后，从梯度平板的高浓度区域挖取单菌落，接种于BTN培养基，再培养10 d形成孢子。每株菌取3环孢子接种于含80 mL M3G培养基的500 mL摇瓶中，200 r/min旋转培养96 h，离心后取上清液测定ε-PL产量。

1.2.2　高产突变株的补料分批发酵

将高产突变株的孢子培养24 h，取320 mL种子液接种至装有3.5 L M3G培养基的5 L自动发酵罐。发酵参数设置为：初始pH 6.8，温度30 ℃，搅拌速度200 r/min，通气量3 L/min。采用pH电极连续监测pH，自然降至4.0后自动流加体积分数12%的NH_4OH溶液维持该pH。通过溶氧（DO）电极监测DO水平，动态调整搅拌速度使DO水平维持在10%~15%。当葡萄糖质量浓度和硫酸铵质量浓度分别降至10 g/L和2 g/L时，启动补料泵自动流加葡萄糖液（700 g/L）和硫酸铵溶液（400 g/L），使发酵罐中葡萄糖质量浓度维持在5~15 g/L，硫酸铵质量浓度维持在1~3 g/L。

1.2.3　高产突变株补料分批发酵的pH冲击

单次pH冲击方案与补料分批发酵基本一致，主要区别在于：当pH自然降至3.3时，自动泵入NH_4OH溶液将pH稳定在3.3，维持6 h，之后手动启动泵将pH迅速升至4.0并保持。从pH 4.0降至3.3的阶段定义为一个pH冲击期，约8 h；多次pH冲击方案是在单次冲击的基础上重复增加次数，首先实施第1次pH冲击，间隔40 h后关闭NH_4OH泵，使pH自然下降，继而按上述方法实施第2次pH冲击。同样操作在100 h和140 h分别实施第3次和第4次冲击。

1.2.4　各成分质量浓度测定方法

发酵过程中各成分质量浓度的测定参考Yang等[11]的方法并略加修改。取10 mL发酵液，5 000 r/min离心10 min后，用甲基橙比色法检测ε-PL质量浓度，用SBA-40B生物传感器分析仪测定葡萄糖质量浓度，用奈斯勒试剂比色法测定硫酸铵质量浓度；将菌体沉淀用蒸馏水洗涤2次，用事先称质量的滤纸抽滤，在95 ℃下加热干燥至质量恒定，测定生物量。

1.3　数据处理

所有试验均重复3次，采用GraphPad Prism（v10.6）软件对数据进行绘图，再利用SPSS Statistic 29.0软件对结果进行差异性分析，最终结果用平均值±标准差表示。

2　结果与讨论

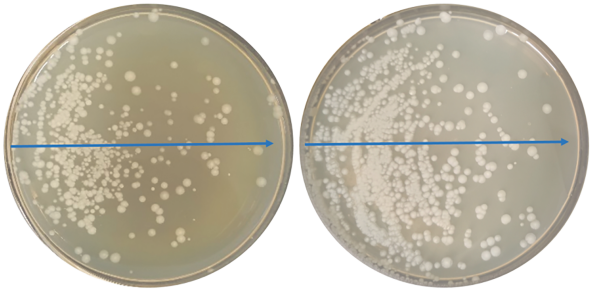
2.1　离子注入诱变与抗生素抗性筛选结果

离子注入诱变利用高能离子束轰击微生物细胞，可诱导遗传物质发生永久性改变。该方法具有突变率高、突变谱广、死亡率低和有益突变率高等优点。因此，采用氮离子注入诱变*S. noursei* GX6。在先前的育种试验中，作者所在课题组使用含4种抗生素的梯度平板选育*S. noursei*，抗生素质量浓度分别为：庆大霉素14.0 μg/mL、林可霉素8.0 μg/mL、利福霉素10.0 μg/mL、链霉素6.0 μg/mL[5]。本研究中不仅提高了这4种抗生素的质量浓度，还引入了巴龙霉素和新霉素，以进一步增强*S. noursei*的多重抗生素抗性及ε-PL产量。诱变

操作完成后，将 *S. noursei* GX6 孢子涂布于含上述 6 种抗生素的梯度平板上，其生长状态见图 1。*S. noursei* 在低质量浓度抗生素区域，即梯度平板的左侧部分，菌落生长较为密集，这是因为低质量浓度抗生素不会抑制该菌的生长。随着抗生素质量浓度在梯度平板上增加，菌落往右侧区域生长，逐渐分散且数量减少，这表明高质量浓度抗生素抑制了 *S. noursei* 的生长，这与作者所在课题组之前选育获得 *S. noursei* GX6 的现象一致[5]，并且在这些耐受高质量浓度抗生素的菌株中，很有可能存在着 ε-PL 产量正向突变株，需进行摇瓶发酵复筛。

2.2 摇瓶发酵复筛高产菌株

从梯度平板的高质量浓度抗生素区域随机挑选了 50 株菌，分别在 BTN 培养基上培养后接种于 M3G 培养基进行摇瓶发酵，检测 ε-PL 产量，结果见图 2。有 29 株菌的 ε-PL 产量比 *S. noursei* GX6 高出至少 10%，正突变率可达 58%，表明离子注入诱变结合多抗生素抗性筛选的策略具有非常高的筛选效率。在这些突变株中，编号为 T9 菌株的 ε-PL 产量最高，达到（2.97±0.08）g/L，较 *S. noursei* GX6 提高了 38.5%，因此选择其作为后续的研究对象。



(a) 菌落分布示例1　(b) 菌落分布示例2

图 1　*S. noursei* 在含 6 种抗生素梯度平板上的菌落分布情况

Fig. 1　Distribution of *S. noursei* colonies on gradient plates containing 6 antibiotics

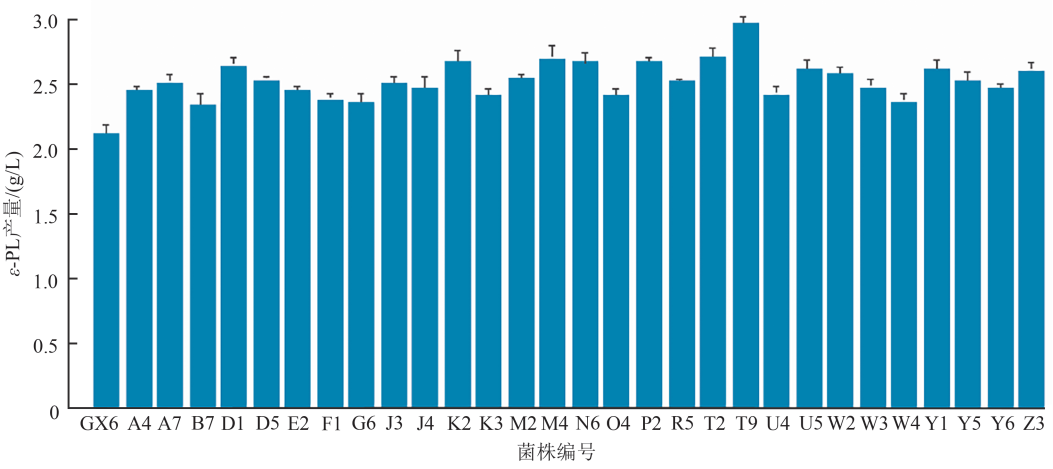


图 2　GX6 和 29 株阳性突变株在摇瓶发酵中的 ε-PL 产量

Fig. 2　ε-PL yields of GX6 and 29 positive mutant strains in shake flask fermentation

核糖体工程是一种基于抗生素诱导突变的遗传改良策略，其核心在于通过引入针对核糖体或 RNA 聚合酶的耐药性突变，改变核糖体的空间结构与功能状态，进而影响细胞内的基因表达谱和蛋白质合成效率，最终调控次级代谢产物的合成能力。该技术目前已成功应用于放线菌、杆菌及真菌等多种高产菌株的选育[12]。作者采用离子注入诱变技术，并结合多种抗生素筛选策略，使该技术的应用效果得到进一步提升，且阳性突变率更高，在优良工业菌株的选育中显示出重要潜力。

2.3 *S. noursei* T9 在传代中的孢子化稳定性

S. noursei T9 需具备良好的遗传稳定性，然而在 BTN 培养基上传代时，其孢子形成能力显著下降。如图 3 所示，第 2 次传代中 *S. noursei* T9 孢子形成良好，白色气生菌丝在 6 d 后能够分化为灰色孢子；至第 4 次传代时，T9 在 BTN 培养基边缘有部分气生菌丝未分化成孢子，但中心区域仍可形成孢子；随着传代次数增加，第 6 次传代时 T9 边缘白色菌丝区域显著扩大，中心区域孢子形成明显减少；到第 8 次传代时，*S. noursei* T9 完全丧失了孢子化能力，整个琼脂表面被白色菌丝覆盖，即

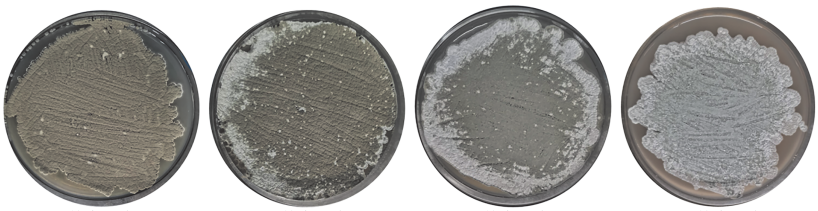


图3　*S. noursei* T9在BTN培养基上传代过程中的孢子化状态

Fig. 3　Sporulation status of *S. noursei* T9 during subculturing on BTN medium

使延长培养至10 d仍无孢子形成迹象。这一现象对育种工作构成重大挑战，因为链霉菌的孢子化能力受损会使获得的高产突变株丢失。因此，探索恢复*S. noursei* T9孢子化能力的方法至关重要。

S. noursei T9孢子化能力的减弱，可能与氮离子注入诱变和多抗生素抗性筛选所诱导的孢子形成相关基因突变有关。类似现象在其他链霉菌研究中亦有报道。例如，*sasA_2*基因编码组氨酸激酶MtrB（MtrAB双组分系统的组成部分），敲除该基因可能导致MtrA组成型激活，这与抗生素过量产生和孢子形成异常相关[13-14]。此外，AfsR可被丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶AfsK磷酸化，研究表明，*Streptomyces roseosporus*（*S. roseosporus*）中*afsR*基因的敲除会导致孢子形成异常[15]。另外，*S. coelicolor*的*relA*缺失突变体也表现出孢子形成缺陷[16]。综上，尽管*S. noursei* T9的孢子化能力下降可能是相关基因突变引起的，但通过基因工程方法恢复该功能并不理想，因为诱变引入的突变数量多且随机，有关*S. noursei*的遗传操作工具和参考资料目前较少，并且遗传修复尝试较为耗时、费力。已有研究表明，不同成分的培养基对放线菌的生长和孢子形成具有显著影响[17]，因此，通过优化培养基的组成以补偿这些遗传缺陷并恢复*S. noursei*的孢子化能力，是一种可行且实用的替代策略。

2.4　培养基成分对*S. noursei* T9孢子化的影响

首先进行BTN培养基的优化，将营养成分质量浓度分别减半（1/2-BTN）和加倍（2-BTN）进行验证。结果如图4所示，*S. noursei* T9在1/2-BTN培养基上生长较差，仅形成薄层气生菌丝，直至第8天时最初变白区域的菌丝才分化成灰色孢子，这表明营养匮乏并不能增强*S. noursei* T9的孢子化能力；在营养丰富的2-BTN培养基上，*S. noursei* T9生长情况优于1/2-BTN培养基，气生菌丝更厚，但孢子形成仍不理想，第6天时仅中心区域少量菌丝分化为孢子，即使到第8天也无明显改善。因此，BTN培养基中的3种营养成分无论质量浓度高低，均不利于*S. noursei* T9孢子的恢复。

GMN是一种专门用于放线菌培养和分离的合成培养基，因组成简单、成本低廉且能有效抑制细菌和真菌生长，选择性促进放线菌增殖而广泛应用。然而，*S. noursei* T9在GMN上生长极差，气生菌丝稀疏，培养8 d后仍无孢子形成。ISP4培养基也是一种国际上进行链霉菌分离和鉴定的通用培养基，*S. noursei* T9在ISP4培养基上生长不佳，气生菌丝薄且稀疏，8 d后仍无孢子形成。这些结果表明，合成培养基中的营养过于匮乏，尤其是缺乏有机氮源，不利于*S. noursei* T9的生长和孢子形成，因此需要寻找其他营养丰富的有机氮源。

MS培养基是一种用于放线菌孢子形成的营养型培养基，由甘露醇、黄豆粉和$CaCO_3$组成。如图4所示，*S. noursei* T9在MS培养基上生长良好，气生菌丝丰富。培养至第4天时，气生菌丝变白；第6天，中心区域菌丝分化为灰色孢子；第8天，孢子形成区域扩大至覆盖琼脂中间区域。该结果表明，MS培养基可有效改善*S. noursei* T9的孢子形成，但效果并不是很理想。这些结果表明，尽管MS培养基中的黄豆粉提供了包括潜在孢子诱导因子在内的全面营养素，但其氮源的生物可利用性不如酵母粉，而甘露醇作为碳源的利用效率低于葡萄糖。相反，2-BTN培养基虽然营养丰富，但酵母粉和蛋白胨中可能缺乏孢子形成所需的特定微量营养素。基于此，作者开发了MGY培养基，即在MS培养基中添加葡萄糖和酵母粉，使其与BTN培养基进行营养组合。如图4所示，*S. noursei* T9在MGY培养基上生长良好，气生菌丝丰富。第4天，气生菌丝全面变白；第6天，菌丝几乎都分化为了灰色孢子；第8天，孢子形成区域覆盖整个培养基表面。该结果表明，MGY培养基

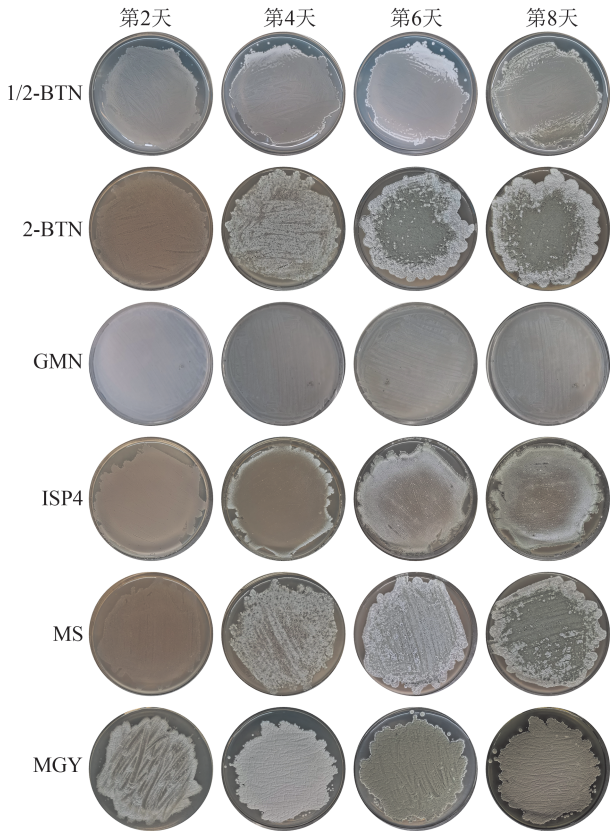


图 4　*S. noursei* T9 在不同培养基上的孢子形成情况

Fig. 4　Sporulation of *S. noursei* T9 on different media

可有效支持 *S. noursei* T9 的孢子形成，其中黄豆粉起到了关键作用，其可能含有潜在的孢子诱导因子，有待后续深入研究。*S. noursei* T9 在 MGY 培养基上进行了连续 10 次传代，均展示了良好的孢子化能力。此外，摇瓶发酵表明，各代次菌株的 ε-PL 产量均稳定在（2.86±0.06）g/L，说明该菌株在 MGY 培养基上具有优异的遗传稳定性。

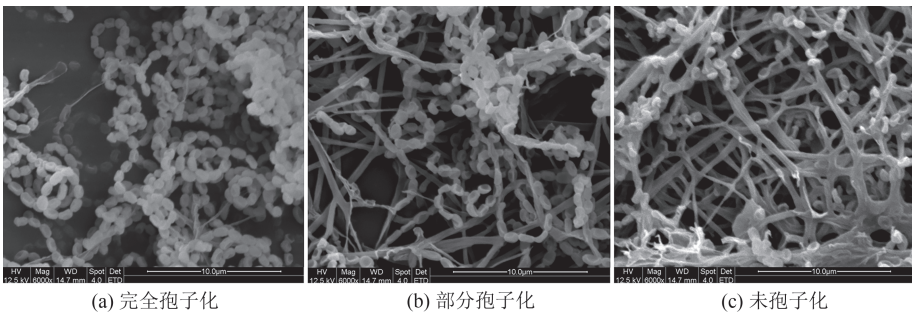
S. noursei T9 在不同培养基上的孢子化程度可用扫描电子显微镜进行观察。如图 5（a）所示，在 MGY 培养基上培养的第 8 天，*S. noursei* T9 以特征性孢子链为主要结构，几乎无残留菌丝存在。在 2-BTN 培养基培养的第 8 天，扫描电子显微镜照片则显示培养基中央区域线性菌丝与孢子链共存，见图 5（b）；而在不产生孢子的培养基中，例如 GMN 和 ISP4，*S. noursei* T9 仅呈现丝状菌丝结构，完全缺乏孢子链形态特征，见图 5（c）。该结果进一步证明，通过肉眼观察 *S. noursei* T9 在不同培养基上的生长状态和颜色变化，可以判断其孢子形成的程度。

2.5　*S. noursei* T9 的补料分批发酵

在摇瓶发酵中，*S. noursei* T9 的 ε-PL 产量为 2.97 g/L，较出发菌株 *S. noursei* GX6 提高了 38.5%。为评估其在放大发酵过程中的潜力，在 5 L 自动发酵罐中进行了补料分批发酵。如图 6 所示，在维持 pH 为 4.0 的发酵过程中，发酵周期为 192 h，最终生物量为 54.6 g/L，ε-PL 产量达到 56.8 g/L。在之前的研究中，出发菌株 GX6 进行相同 192 h 的补料分批发酵的生物量为 52.8 g/L，ε-PL 产量为 47.2 g/L[5]。突变株 T9 在生物量上仅仅比 GX6 提高了 3.4%，但 ε-PL 产量增幅达到了 20.3%。这意味着 *S. noursei* T9 的 ε-PL 产量提升不仅与其生物量增加有关，也归因于离子注入诱变及抗生素抗性筛选过程。这一结果不仅表明 *S. noursei* T9 在控制 pH 的放大发酵过程中具有较高的 ε-PL 生产能力，更佐证了核糖体工程对其育种的有效性。

2.6　单次 pH 冲击对 *S. noursei* T9 发酵的影响

作者将 pH 调控 *S. noursei* T9 发酵生产 ε-PL 的过程进行了修改，先使 pH 自然下降至最低点并维持一段时间后再调高 pH 至 4.0 并维持。如图 7 所示，该操作虽然使发酵前期葡萄糖消耗速率降低并引起 *S. noursei* T9 生物量暂时下降，但在 pH 提升至 4.0 后，*S. noursei* T9 迅速表现出底物利用加



(a) 完全孢子化　(b) 部分孢子化　(c) 未孢子化

图 5　扫描电子显微镜下 *S. noursei* T9 的孢子形成状态

Fig. 5　Scanning electron microscopy images of sporulation status of *S. noursei* T9

速、细胞生长增强和 ε-PL 合成增加，最终实现了 57.4 g/L 的生物量（相比常规补料分批发酵提高 4.5%）和 62.1 g/L 的 ε-PL 产量（相比常规补料分批发酵提高 9.3%）。研究表明，在微生物培养过程中 pH 的骤变可增强微生物胁迫耐受性与代谢可塑性，最终促进次级代谢产物的合成[18-19]，因而被称为“pH 冲击”，该策略已在 ε-PL[20-21]、春日霉素[22]以及格尔德霉素[23]等抗生素生产过程中得到验证。作者将 pH 冲击应用于 *S. noursei* T9 发酵生产 ε-PL，从而进一步证实了该调控策略的有效性。

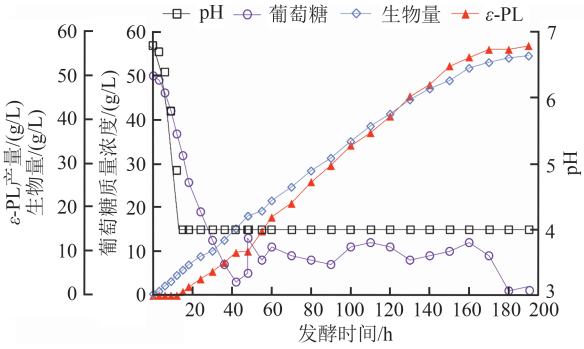


图 6　*S. noursei* T9 在恒定 pH 4.0 下进行补料分批发酵生产 ε-PL 的参数变化

Fig. 6　Parameter changes in fed-batch fermentation at constant pH 4.0 for ε-PL production by *S. noursei* T9

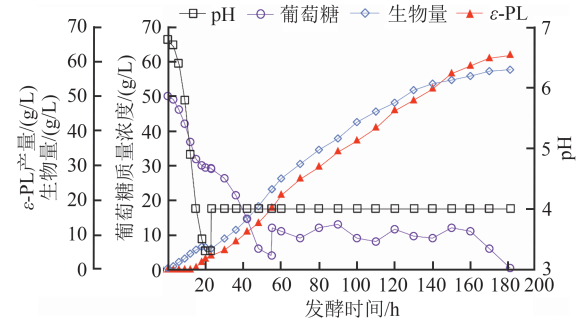


图 7　补料分批发酵中单次 pH 冲击下 *S. noursei* T9 的 ε-PL 产量

Fig. 7　ε-PL yield of *S. noursei* T9 in fed-batch fermentation with a single pH shock

单次 pH 冲击使 ε-PL 产量提升了 9.3%，其核心机制可从酶活性调控与菌体代谢适应两方面解析。从酶学层面看，ε-PL 的合成与降解分别依赖 ε-PL 合成酶（Pls）和 ε-PL 降解酶（Pld），两者最适 pH 均大于 7.0[24-25]。发酵过程中 pH 自然降至 3.3 时，Pld 活性被进一步抑制（接近完全失活），显著减少了已合成 ε-PL 的降解损耗；而 Pls 仍保留约 20% 的酶活性，可维持基础合成效率[24]。随后 pH 升至 4.0，既避免了高 pH 环境下 Pld 的重新激活，又为 Pls 提供了相对稳定的催化条件。从能量代谢层面看，Pls 催化 *L*-赖氨酸聚合为 ε-PL 需消耗大量 ATP，而菌体仅在酸性环境中能有效积累 ATP[25]。pH 冲击过程中，短期低 pH（3.3）胁迫可诱导 *S. noursei* T9 表达耐酸相关基因（如质子泵基因、耐酸蛋白基因），增强菌体对酸性环境的适应能力，即通过强化细胞膜质子转运效率来减少胞内酸性损伤，进而维持 ATP 合成通路的稳定，为 ε-PL 合成提供持续的能量供给。这一过程不仅验证了 pH 冲击对次级代谢的促进作用，更补充了“低 pH 胁迫-耐酸适应-能量保障-产物合成”的关联机制，完善了 ε-PL 发酵的调控理论。

2.7　多次 pH 冲击对 *S. noursei* T9 发酵的影响

分别在 60、100、140 h 增加 *S. noursei* T9 发酵过程中的 pH 冲击次数，均保持总葡萄糖消耗量（1 650 g）不变，实施方案见图 8，结果见表 1。在不同次数的冲击中，发酵周期分别延长了 1、8、15、30 h；随着冲击次数的增加，ε-PL 产量也随之增加，在冲击 3 次的发酵中达到最高 70.6 g/L，而在冲击 4 次时有所下降；生物量的增长趋势与 ε-PL 产量一致，也是在冲击 3 次时达到了最高 60.1 g/L。在发酵生产中，常用生产效率表明产量与生物量和发酵周期的关系，即生产效率=产量/（生物量×发酵周期）。分析显示，2 次冲击策略实现了最高的发酵效率，为 0.006 3 g/(g·h)，比非冲击对照组 0.005 7 g/(g·h)提高了 10.5%，而 3 次和 4 次冲击分别降至 0.006 1 g/(g·h)和 0.005 5 g/(g·h)，因而进行 2 次 pH 冲击的效果是最好的，这一研究结果与 *Bacillus pumilus*（*B. pumilus*）通过多次 pH 冲击生产 γ-聚二氨基丁酸的研究一致[26]。

在多次 pH 冲击试验中，2 次冲击使 ε-PL 产量与生产效率分别达到 69.5 g/L、0.006 3 g/(g·h)，而 3 次和 4 次冲击则导致产量与效率下降，其核心逻辑与发酵周期及菌体应激响应密切相关。首先，*S. noursei* T9 发酵周期长达 192 h，单次 pH 冲击诱导的耐酸因子（如耐酸蛋白质、质子转运体）会随发酵进程逐渐降解或因基因表达下调而活性减弱。间隔 40 h 的第 2 次冲击可重新激活耐酸相关通路，维持菌体在中后发酵期的酸适应能力。一方面持续抑制 Pld 活性，避免 ε-PL 降解加剧；另一

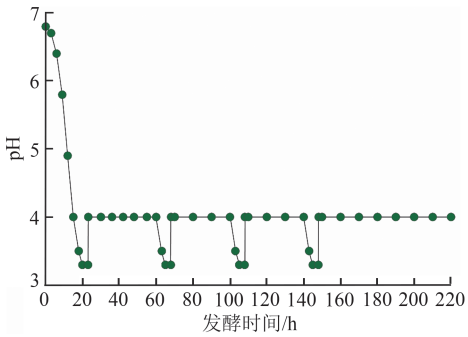


图 8 *S. noursei* T9 补料分批发酵中的重复 pH 冲击过程

Fig. 8 Repeated pH shocks in fed-batch fermentation of *S. noursei* T9

表 1 补料分批发酵中重复 pH 冲击的结果

Table 1 Results of fed-batch fermentation with repeated pH shocks

pH 冲击次数/次	发酵周期/h	生物量/（g/L）	ε-PL 产量/（g/L）	生产效率/（g/（g·h））
0	180	54.6	56.8	0.005 7
1	181	57.4	62.1	0.006 0
2	188	58.3	69.5	0.006 3
3	195	60.1	70.6	0.006 1
4	210	58.7	68.9	0.005 5

方面保障 ATP 稳定供应，防止 Pls 因能量不足而活性下降，从而实现 ε-PL 合成的“全程高效”。其次，3 次和 4 次冲击后产量下降主要源于“应激过载”与“资源挤占”：频繁 pH 骤变会导致菌体将大量能量与前体物质（如氨基酸）用于应激响应（如修复细胞膜损伤、合成应激蛋白质），而非合成 ε-PL；同时，发酵周期延长不仅增加了能耗与杂菌污染风险，还可能因后期营养失衡（如 *L*-赖氨酸不足）进一步抑制 Pls 活性。此外，作者发现 2 次冲击的生产效率较对照组提升 10.5%，与 *B. pumilus* 生产 γ-聚二氨基丁酸的 pH 冲击规律一致[26]，说明“多次适度冲击”对聚氨基酸类产物发酵具有普适性，但具体冲击次数需结合发酵周期、菌体代谢特性动态调整，这为其他链霉菌次级代谢产物的发酵调控提供了优化思路。

3 结论

作者围绕 *S. noursei* 高产 ε-PL 及恢复孢子化能力展开，通过菌株选育、培养基优化与发酵调控取得了较为理想的成果。以 *S. noursei* GX6 为出发菌株，经氮离子注入诱变结合 6 种抗生素（庆大霉素、林可霉素、利福霉素、链霉素及新增的巴龙霉素与新霉素）抗性筛选，获得高产突变株 *S. noursei* T9，其摇瓶 ε-PL 产量达（2.97±0.08）g/L（较 GX6 提高 38.5%），5 L 发酵罐恒定 pH 4.0 补料分批发酵产量 56.8 g/L（较 GX6 提高 20.3%），证实巴龙霉素与新霉素抗性对 ε-PL 合成的正向调控作用，拓展了核糖体工程在链霉菌育种中的应用范围。针对 *S. noursei* T9 传代中孢子化能力下降的问题，开发的 MGY 培养基（含黄豆粉、甘露醇、葡萄糖、酵母粉及 $CaCO_3$）可使其连续传代 10 次仍稳定产孢，且各代次 ε-PL 产量维持在（2.86±0.06）g/L，提供了无需基因操作即可解决工业菌株孢子退化的实用方案。多次 pH 冲击试验表明，2 次冲击的效果最优，ε-PL 产量达 69.5 g/L、生产效率为 0.006 3 g/（g·h）（较无冲击组分别提高 22.3%、10.5%），完善了长周期发酵中 pH 调控的理论与实践。不足之处在于 MGY 培养基中促孢子化的特定因子及信号通路未明确，pH 冲击的阈值、时长等参数需进一步优化，且未评估菌株在工业规模发酵中的放大效应及杂酸对 ε-PL 合成的影响，后续需通过组分分离、转录组学分析、响应面法及工业级试验来完善。

参考文献

[1] ZHU D J，LIU Y X，YANG H，et al. Combinatorial strain improvement and bioprocess development for efficient production of ε-poly-*L*-lysine in *Streptomyces albulus*[J]. Bioresource Technology，2024，407：131123.

[2] LI S，YAO Y，HU S J，et al. Short-chain poly（γ-diaminobutanoic acid），a poly（amino acid）produced by a marine bacteria *Bacillus pumilus* [J]. Current Microbiology，2021，78（4）：1142-1149.

[3] ZHANG X L，HOU Z P，TIAN X，et al. Multi-omics reveals host metabolism associated with the gut microbiota composition in mice with dietary ε-polylysine[J]. Food & Function，2022，13（7）：4069-4085.

[4] 刘梦琪，史明骅，吴健清，等. 小麦豆粕饲粮添加 ε-聚赖氨酸盐酸盐对蛋鸡生产性能、蛋品质和肝脏脂质代谢的影响[J]. 农业生物技术学报，2024，32（11）：2582-2592.
LIU M Q，SHI M H，WU J Q，et al. Effects of wheat soybean meal diet supplemented with ε-polylysine hydrochloride on laying performance，egg quality and liver lipid metabolism of laying hens（*Gallus gallus domesticus*）[J]. Journal of Agricultural Biotechnology，2024，32（11）：2582-2592.（in Chinese）

[5] LI S，WANG N，ZHANG M C，et al. Enhanced ε-poly-*L*-

lysine production in *Streptomyces* species by combining interspecific hybridization with multiple antibiotic resistance[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2024,47(4):519-532.

[6] SHENTU X P, CAO Z Y, XIAO Y, et al. Substantial improvement of toyocamycin production in *Streptomyces diastatochromogenes* by cumulative drug-resistance mutations[J]. PLoS One,2018,13(8):e0203006.

[7] WU C J, YI L, CUI C B, et al. Activation of the silent secondary metabolite production by introducing neomycin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59[J]. Marine Drugs,2015,13(4):2465-2487.

[8] KENDRICK K E, ENSIGN J C. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture[J]. Journal of Bacteriology,1983,155(1):357-366.

[9] VAN WEZEL G P, VAN DER MEULEN J, KAWAMOTO S, et al. ssgA is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and affects hyphal development by stimulating septum formation[J]. Journal of Bacteriology, 2000,182(20):5653-5662.

[10] HOU B B, TAO L Y, ZHU X Y, et al. Global regulator BldA regulates morphological differentiation and lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2018,102(9): 4101-4115.

[11] YANG H, ZHU D J, KAI L, et al. Engineering *Streptomyces albulus* to enhance *ε*-poly-*L*-lysine production by introducing a polyphosphate kinase-mediated ATP regeneration system[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1):51.

[12] 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.
XIE Y C, YAO S J, LI W, et al. Development and application of ribosomal engineering in actinomycetes[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2022,38(2):546-564. (in Chinese)

[13] SOM N F, HEINE D, HOLMES N, et al. The MtrAB two-component system controls antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology,2017, 163(10):1415-1419.

[14] SOM N F, HEINE D, HOLMES N A, et al. The conserved actinobacterial two-component system MtrAB coordinates chloramphenicol production with sporulation in *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442 [J]. Frontiers in Microbiology,2017,8:1145.

[15] COLEMAN R H, ENSIGN J C. Regulation of formation of aerial mycelia and spores of *Streptomyces viridochromogenes* [J]. Journal of Bacteriology,1982,149(3):1102-1111.

[16] HESKETH A, CHEN W J, RYDING J, et al. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Genome Biology,2007,8(8):R161.

[17] DE LIMA J A A, DE SOUSA E C, DE OLIVEIRA T H B, et al. Isolation, identification, biochemical profile and antifungal effect against *Candida* spp. of an actinomycete isolated from *Aniba parviflora* rhizosphere on Amazon region, Brazil [J]. Observatório de la Economía Latinoamericana,2025,23(4):e9521.

[18] KAHAR P, IWATA T, HIRAKI J, et al. Enhancement of *ε*-polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2001,91(2):190-194.

[19] HAYES A, HOBBS G, SMITH C P, et al. Environmental signals triggering methylenomycin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 1997,179(17):5511-5515.

[20] WANG L, LI S, ZHAO J J, 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.

[21] ZHANG H J, YANG H, ZHANG C Y, et al. Identification and combinatorial overexpression of key genes for enhancing *ε*-poly-*L*-lysine biosynthesis in *Streptomyces albulus*[J]. Fermentation,2024,10(1):65.

[22] KIM C J, CHANG Y K, CHUN G T. Enhancement of kasugamycin production by pH shock in batch cultures of *Streptomyces kasugaensis*[J]. Biotechnology Progress, 2000,16(4):548-552.

[23] SONG J Y, KIM Y J, HONG Y S, et al. Enhancement of geldanamycin production by pH shock in batch culture of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *duamyceticus* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology,2008,18(5): 897-900.

[24] YAMANAKA K, KITO N, IMOKAWA Y, et al. Mechanism of *ε*-poly-*L*-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an *ε*-poly-*L*-lysine-degrading enzyme [J]. Applied and Environmental Microbiology,2010,76(17):5669-5675.

[25] LI Q Y, CHEN X J, WU Y J, et al. A study of type II *ε*-PL degrading enzyme (pld II) in *Streptomyces albulus* through the CRISPRi system[J]. International Journal of Molecular Sciences,2022,23(12):6691.

[26] LI S, WANG N, LI X T. Enhancement of poly-*γ*-*L*-diaminobutanoic acid production in *Bacillus pumilus* by repeated pH shocks [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering,2024,47(9):1547-1554.