

不同干燥方法对菌体蛋白氨基酸分离鉴定的影响

郭凤柱^{1,2}, 谭之磊^{1,2}, 时艺翡^{1,2}, 宋富^{1,2}, 钟其顶³, 贾士儒^{1,2*}

1(天津科技大学 生物工程学院, 天津, 300457) 2(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津, 300457)

3(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100015)

摘 要 分别采用氮吹法、烘干法和真空冷冻干燥法对淀粉酶产色链霉菌的菌体蛋白氨基酸进行干燥处理, 使用气相色谱与质谱联用对相应氨基酸衍生物的出峰时间及峰面积进行分析, 结果表明, 相较于氮吹法和烘干法, 经真空冷冻干燥法预处理后, 所需的 16 种氨基酸衍生物均可被检出, 因此, 真空冷冻干燥法是淀粉酶产色链霉菌中菌体蛋白氨基酸的可靠制备方法。该方法的建立为今后开展 ^{13}C 同位素代谢通量分析, 深入阐明 ϵ -聚赖氨酸生产机制, 提供了技术保障。

关键词 淀粉酶产色链霉菌; 气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 联用; 氨基酸; 干燥处理

ϵ -聚-L-赖氨酸 (ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL) 是目前从自然界中已发现的两种氨基酸同聚物之一, 它是由微生物代谢合成的 (主要为放线菌^[1], 另外个别细菌也可以合成^[2]) 含有 25 ~ 35 个 L-氨基酸残基的同聚氨基酸, 这些 L-赖氨酸 (L-Lys) 残基通过 α -羧基和 ϵ -氨基连接^[3-4]。因其具有安全性高^[5]、抑菌谱广^[6-8]、水溶性好和热稳定性强^[9-10] 等特性, ϵ -PL 已广泛应用于食品、医学和生物材料等领域^[11-17]。我国于 2014 年 4 月批准了 ϵ -聚赖氨酸及其盐酸盐作为食品添加剂新品种^[18]。为了适应 ϵ -PL 在食品应用方面需求量的增大, 许多研究者已投入到旨在提高 ϵ -PL 产量的研究中。但由于 ϵ -PL 的生物合成及整体调控机制尚不十分明确^[19], 因此, 对其生物合成过程中的代谢网络进行定量分析是十分必要的。

^{13}C 同位素示踪技术作为代谢流分析的方法之一, 因其可以准确、快速、直观的反应代谢流向和流量, 受到越来越多科研人员的青睐。 ^{13}C 同位素示踪研究中, 由于中间代谢物反应速度快、浓度低、难以及时定量分析, 而菌体蛋白氨基酸作为菌体的重要组成成分, 并与产物前体之间有着很好的对应关系。因此, 可以根据菌体蛋白水解氨基酸的标记信息来推测胞内代谢物的标记信息, 进而根据胞内标记代谢物的平衡和代谢网络的化学计量关系进行代谢通量分

析^[20]。所以, 菌体蛋白水解氨基酸的分离提取是开展 ^{13}C 稳定同位素示踪研究的关键技术问题。钟其顶等采用氮吹法成功制备了酿酒酵母菌体蛋白氨基酸^[21]; 申铁^[22]、ZAMBONI 等^[23] 采用高温 (100 $^{\circ}\text{C}$) 干燥法对大肠杆菌菌体蛋白氨基酸进行了分离; 但是关于链霉菌菌体蛋白氨基酸的分离制备目前鲜有报道。因此, 通过采用不同预处理手段, 对酸水解后的菌体氨基酸进行干燥, 以探索不同干燥方法对淀粉酶产色链霉菌菌体蛋白氨基酸分离鉴定的影响, 并建立高效的菌体蛋白氨基酸制备方法, 为今后实施 ^{13}C 稳定同位素示踪技术在链霉菌中的应用, 揭示 ϵ -PL 发酵过程的代谢机理提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种和培养基

淀粉酶产色链霉菌 (*Streptomyces diastatochromogenes* CGMCC3145), 由天津科技大学从海南岛土壤样品中分离筛选获得, 现保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

斜面固体培养基 (Bennett's, g/L): 葡萄糖 10, 牛肉膏 1, 蛋白胨 2, 酵母浸粉 1, 琼脂 15 ~ 20, 2 mol/L NaOH 调 pH 7.7, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

种子/发酵培养基 (M3G, g/L): 葡萄糖 50, 酵母浸粉 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.8, KH_2PO_4 1.36, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{ZnSO}_4 \cdot$

第一作者: 博士研究生 (贾士儒教授为通讯作者, E-mail: jiashiru@tust.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金 (31771952); 国家自然科学基金 (21276197)

收稿日期: 2018-06-07, 改回日期: 2018-08-13

7H₂O 0.04, 氨水调 pH 7.2, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.2 试剂

氨基酸标准品 (Sigma-Aldrich 公司, 美国); 无水葡萄糖 (Solarbio 公司, 中国); *N*-(特丁基二甲基硅烷)-*N*-甲基三氟乙酰胺 (MTBSTFA $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich 公司, 瑞士); *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 色谱纯, Adamas 公司, 中国); HCl (优级纯, 国药集团化学试剂有限公司) 等。

1.2 仪器与设备

7890A-5795C 气相色谱与质谱联用仪 (GC-MS), 美国 Agilent Technologies; HYG-II 迴转式恒温调速摇床, 上海欣蕊自动化设备有限公司; LRH-100-S 恒温恒湿培养箱, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; 5804R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; FD-1 真空冷冻干燥机, 上海田枫实业有限公司; HN 200 多功能氮吹仪, 山东海能科学仪器有限公司; GZX-9070 MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂等。

1.3 方法

1.3.1 培养方法

将保藏菌种接至 Bennett's 固体斜面, 30 °C, 湿度 50% 的条件下恒温恒湿培养 5 ~ 7 d, 直至长满孢子, 置于 4 °C 冰箱中保存待用。

从孢子斜面挑一环孢子接于含有 100 mL M3G 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养 30 h。

将种子液以 6% 接种量接于含有 100 mL M3G 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养。隔一定时间取样, 确定发酵液中的菌体生长。

1.3.2 样品处理方法

取对数中后期发酵液, 4 °C 1 2000 × *g* 离心 5 min, 收集菌体; 将菌体用无菌水洗 2 次, 取约 100 mg 湿菌体于 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 的 6 mol/L 盐酸后在 85 °C 下水解 24 h^[24], 水解液经 0.22 μm 滤膜过滤后获得淡黄色氨基酸液体, 分别取 50 μL 氨基酸标准液、菌体水解液于 1.5 mL 新的 EP 管中, 样品分别进行真空冷冻干燥、氮吹仪 40 °C 吹干、烘箱 95 °C 烘干。最终得到黄色氨基酸晶体。

1.3.3 氨基酸的衍生

加入 100 μL DMF 辅助衍生试剂, 振荡混匀, 然后加 100 μL MTBSTFA 衍生试剂, 再次震荡混匀, 80 °C 衍生反应 60 min, 反应完成后冷却至室温, 离心取上清, 待进入 GC-MS 检测^[21, 23]。

1.3.4 氨基酸的测定

色谱条件: HP-5 色谱柱, 载气为氦气, 柱流速 1.0 mL/min, 进样口温度 250 °C, 升温程序为: 起始温度 120 °C, 保持 2 min, 以 3.0 °C/min 升温至 250 °C, 再以 10 °C/min 升温至 270 °C 保留 10 min; 进样体积 1 μL, 分流比 10:1^[21, 23]。

1.3.5 生物量的测定

将化学分析滤纸编号, 95 °C 烘干至恒重, 称量, 备用。吸取 4 mL 发酵液, 6 000 × *g* 离心 10 min, 弃掉上清液。将菌体冲洗至滤纸上, 并用适量去离子水洗 2 ~ 3 次, 95 °C 烘干至恒重, 称量, 计算生物量 (biomass, g/L)。

2 结果与分析

2.1 菌体蛋白氨基酸制备取样点的确定

根据方法 1.2.1, 菌株 *S. diastatochromogenes* CG-MCC3145 种子培养 30 h 后, 以 6% 接种量转接至 M3G 发酵培养基中培养, 每隔 4 h 取样分析其生物量的变化, 菌株 CGMCC3145 的生长曲线如图 1 所示。在菌体生长的指数中后期, 其细胞内代谢系统达到稳定状态^[11], 所以选取 24 h 作为菌体氨基酸制备的取样点。

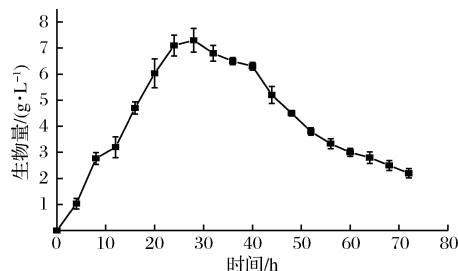


图 1 发酵培养基中菌株 CGMCC3145 的生长曲线

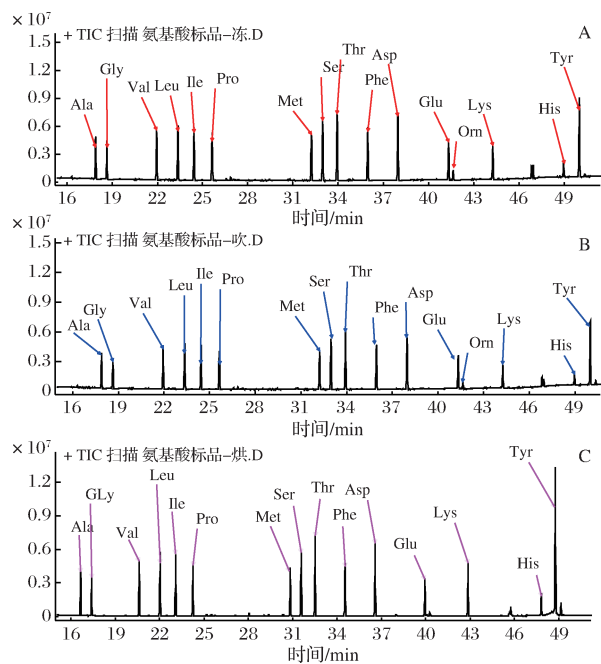
Fig.1 Growth curve of strain *S. diastatochromogenes* CGMCC3145 cultivated in fermentation medium

2.2 氨基酸标品的测定

对氨基酸标准品采用不同干燥方法处理后, 经衍生化, 进行 GC-MS 分析, 由图 2 总离子流图中峰的定性分析可知: (1) 标准品中 16 种氨基酸均能被检测 (仅烘干法中鸟氨酸未检出); (2) 出峰顺序依次为: 丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、鸟氨酸 (精氨酸)、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸; (3) 各氨基酸的分离效果较好。

2.3 菌体蛋白氨基酸的测定

同样, 菌株 *S. diastatochromogenes* CGMCC3145 菌



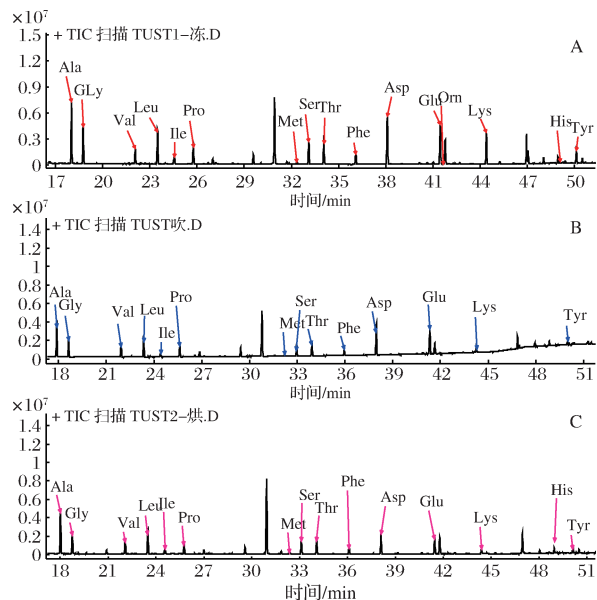
A-真空冷冻干燥法;B-氮吹法;C-烘干法

图2 不同干燥处理方法下氨基酸标准品的气相色谱图

Fig.2 The GC chromatogram of amino acid standards with different drying treatment

体蛋白氨基酸采用不同干燥方法处理后,再经衍生化,进行 GC-MS 分析,总离子流图结果如图 3 所示(各个菌体蛋白氨基酸保留时间与氨基酸标准品保留时间基本一致)。由于菌体蛋白盐酸水解过程中,天冬酰胺转化为天冬氨酸,谷氨酰胺转化为谷氨酸,色氨酸、半胱氨酸被破坏。因此,最多可检测出 16 种氨基酸。通过对总离子流图中峰的定性分析发现,经真空冷冻

干燥处理后(图 3-A),检测到 16 种氨基酸;采用氮吹法处理后(图 3-B),检测到 14 种氨基酸,相较于真空冷冻干燥法,并未有鸟氨酸、组氨酸检出;采用烘干法处理后(图 3-C),共有 15 种氨基酸检出,相较于真空冷冻干燥法,鸟氨酸未检出。这可能是由于鸟氨酸在样品中本身含量极低(由表 1 可知),且经氮吹法或烘干法处理后,受氨基酸热降解影响进而无法被检出。



A-真空冷冻干燥法;B-氮吹法;C-烘干法

图3 不同干燥处理方法下菌体蛋白氨基酸的气相色谱图

Fig.3 The GC chromatogram of protein-bound amino acids with different drying treatment

表1 不同预处理方式对获得菌体蛋白氨基酸种类及含量的影响

Table 1 The effect of different pretreatment on protein-bound amino acids

氨基酸	真空冷冻干燥法		氮吹法		烘干法	
	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积
L-Alanine	18.027	24 467 677	17.884	13 157 241	18.024	16 792 899
Glycine	18.771	14 902 034	18.630	7 182 028	18.767	7 579 728
L-Valine	22.079	6 816 729	21.930	3 716 132	22.078	4 786 441
L-Leucine	23.497	14 089 887	23.350	8 760 378	23.496	9 312 495
L-Isoleucine	24.566	2 875 317	24.417	1 654 771	24.566	2 227 952
L-Proline	25.772	8 559 597	25.622	4 296 140	25.771	3 316 020
L-Methionine	32.359	897 421	32.216	445 658	32.358	540 327
L-Serine	33.109	9 636 063	32.965	4 932 669	33.107	5 149 317
L-Threonine	34.073	10 758 950	33.928	5 297 264	34.069	5 884 233
L-Phenylalanine	36.098	4 064 434	35.960	2 137 901	36.100	2 269 299
L-Aspartic acid	38.104	20 872 369	37.973	12 101 275	38.101	7 860 143
L-Glutamic acid	41.469	15 615 983	41.334	9 228 586	41.462	6 573 423
DL-Ornithine	41.610	303 654	-	-	-	-
L-Lysine	44.400	14 023 623	44.267	2 371 228	44.394	1 848 432
L-Histidine	49.074	1 341 866	-	-	49.074	115 147
L-Tyrosine	50.124	5 218 323	50.009	1 780 143	50.123	1 800 070

注:“-”表示未检出。

进一步对不同处理方式下菌体蛋白氨基酸的 GC-MS 谱图进行分析,发现对于同一氨基酸而言,不同的预处理方法对其含量有显著影响,以 *L*-Alanine 为例:使用真空冷冻干燥法检测的 *L*-Alanine 含量分别是使用烘干法和氮吹法检测含量的 1.46 倍和 1.86 倍;而对于相对含量较少且对温度敏感的组氨酸^[25]而言,使用真空冷冻干燥法检测的含量是使用烘干法检测含量的 11.65 倍,氮吹法处理组则未检出组氨酸,这可能是由于氮吹法干燥过程较为迅速且通过氮气对受热样品进行吹扫增大了样品受热面积从而加剧了组氨酸热降解。而在代谢通量分析中,胞内代谢物的标记信息是根据菌体蛋白氨基酸的标记信息推测的^[20,23,26],因此,选取真空冷冻干燥法作为淀粉酶产色链霉菌菌体蛋白氨基酸制备的方法。

3 结论

对菌体蛋白水解氨基酸分别用不同的处理方法进行干燥处理,无论从氨基酸检出的种类还是从氨基酸检出的峰面积(含量)角度考虑,真空冷冻干燥的方法均优于其余 2 种方法。本文建立了淀粉酶产色链霉菌中菌体蛋白氨基酸的制备方法,为今后开展¹³C 同位素代谢通量分析、深入了解淀粉酶产色链霉菌中心碳代谢途径中的通量分布,对生产菌株合理的代谢改造提供了技术保障。

参 考 文 献

- [1] NISHIKAWA M, OGAWA K. Distribution of microbes producing antimicrobial ϵ -poly-*L*-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3 575 – 3 581.
- [2] EL-SERSY N A, ABDELWAHAB A E, ABOUELKHIIR S S, et al. Antibacterial and anticancer activity of ϵ -poly-*L*-lysine (ϵ -PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp. [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5): 513 – 522.
- [3] SHUKLA S C, SINGH A, PANDEY A K, et al. Review on production and medical applications of ϵ -polylysine[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 65: 70 – 81.
- [4] HAMANO Y. Amino-acid Homopolymers Occurring in Nature[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 61 – 75.
- [5] HIRAKI J, ICHIKAWA T, NINOMIYA S, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, 37(2): 328 – 340.
- [6] BO Tao, LIU Miao, ZHONG Cheng, et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -poly-*L*-lysine on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(19): 4 454 – 4 465.
- [7] BO Tao, HAN Pei-pei, SU Qin-zhi, et al. Antimicrobial ϵ -poly-*L*-lysine induced changes in cell membrane compositions and properties of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Control*, 2016, 61: 123 – 134.
- [8] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The antimicrobial mechanism of action of ϵ -poly-*L*-lysine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7 758 – 7 770.
- [9] 宋庆超, 李秀雯, 王洪翠, 等. ϵ -聚赖氨酸与纳他霉素复配剂抑菌性能的研究[J]. *中国酿造*, 2012, 31(7): 80 – 83.
- [10] YOSHIDA T, NAGASAWA T. ϵ -Poly-*L*-lysine: microbial production, biodegradation and application potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(1): 21 – 26.
- [11] RAJAPAKSHA D S W, KODITHUWAKKU K A H T, SILVA K F S T, et al. Evaluation of potassium sorbate and ϵ -polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days[J]. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2013, 3: 1 – 7.
- [12] 张雪, 赵娟, 谭之磊, 等. 生物食品添加剂在草莓保鲜中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2013(3): 158 – 162.
- [13] 贾士儒, 谭之磊, 罗晶, 等. 一种简单快速、货架期长的馒头的制作方法[P]. 中国专利: ZL 201310182022. X, 2014 – 07 – 14.
- [14] MIYA S, TAKAHASHI H, HASHIMOTO M, et al. Development of a controlling method for *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in fresh market beef by using polylysine and modified atmosphere packaging[J]. *Food Control*, 2014, 37(1): 62 – 67.
- [15] HATA T, SATO T, ICHIKAWA T, et al. Antifungal activity of protamine salmine hydrochloride and ϵ -poly-*L*-lysine in actual food systems, rice or wheat-based confectioneries[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(6): 1 180 – 1 187.
- [16] ZHU Hui-xia, JIA Shi-ru, YANG Hong-jiang, et al. Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(6): 1 479 – 1 484.
- [17] PANDEY A K, KUMAR A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer ϵ -poly-*L*-lysine [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(3): 496 – 505.

- [18] 关于批准 ϵ -聚赖氨酸等 4 种食品添加剂新品种等的公告(2014 年第 5 号)[EB/OL]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,2014;213 – 221.
- [19] 贾士儒. 生物防腐剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009.
- [20] WIECHERT W. ^{13}C metabolic flux analysis[J]. Metabolic Engineering,2001,3(3):195 – 206.
- [21] 钟其顶,李国辉,王道兵,等. 气相色谱-燃烧-同位素质谱仪(GC-C-IRMS)测定游离氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值[J]. 酿酒科技,2013(9):7 – 10.
- [22] 申铁. ^{13}C 代谢通量分析平台的建立与改良[D]. 合肥:中国科学技术大学,2010.
- [23] ZAMBONI N,FENDT S,RÜHL M,et al. ^{13}C -based metabolic flux analysis[J]. Nature Protocols,2009,4(6):878 – 892.
- [24] 赵东东,钟其顶,李国辉,等. 低丰度 ^{13}C 标记的酿酒酵母代谢通量分析探讨研究[J]. 酿酒科技,2014(3):13 – 16.
- [25] 石召华,黄文芳,陈立军,等. 不同干燥方式对地龙提取物中 17 种氨基酸的影响[J]. 中成药,2015,37(5):1 135 – 1 138.
- [26] QUEK L E,DIETMAIR S,KRÖMER J,et al. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture[J]. Metabolic Engineering,2010,12(2):161 – 171.

Effects of different drying methods on cell protein isolate and its amino acid components of *Streptomyces diastatochromogenes*

GUO Fengzhu^{1,2}, TAN Zhilei^{1,2}, SHI Yifei^{1,2},
SONG Fu^{1,2}, ZHONG Qiding³, JIA Shiru^{1,2*}

1 (College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2 (Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

3 (China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

ABSTRACT *Streptomyces diastatochromogenes* cell protein isolates were dried by nitrogen-purge, oven-drying and vacuum lyophilization, respectively. The amino acid components of the cell protein isolates were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). The results showed that 16 kinds of amino acids could only be detected with vacuum lyophilization, indicating the vacuum lyophilization was a suitable method for preparing protein-bound amino acids from *S. diastatochromogenes* cell protein isolates for ^{13}C -labeled metabolic flux analysis during ϵ -poly-*L*-lysine biosynthesis.

Key words *Streptomyces diastatochromogenes*; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); amino acids; drying treatment