

γ -聚谷氨酸产生菌的筛选及发酵条件

桑莉, 徐虹, 李晖, 张鲁嘉, 姜岷

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 从土壤中筛选分离到一株高产 γ -聚谷氨酸的菌株 PGAN-12, 经鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 在含谷氨酸钠和葡萄糖的培养基中可生成大量 γ -聚谷氨酸, 缺少谷氨酸钠和碳源均不能合成 γ -聚谷氨酸. PGAN-12 合成 γ -聚谷氨酸的合适碳源为葡萄糖, 而 TCA 循环中的有机酸包括柠檬酸均不能使 PGAN-12 合成 γ -聚谷氨酸. 最适氮源是酵母膏. PGAN-12 是谷氨酸依赖型的 γ -聚谷氨酸产生菌, 在谷氨酸钠浓度为 70 g/L 时, γ -聚谷氨酸取得最大产量 18.32 g/L, 但在谷氨酸钠浓度为 30 g/L 时, 获得了最大的表观转化率 62.1%, 此时生成 γ -聚谷氨酸为 14.2 g/L.

关键词: γ -聚谷氨酸; 枯草芽孢杆菌; 筛选

中图分类号: Q935; Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)05-0462-05

1 前言

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种由微生物生物合成的聚氨基酸, 它由 D-或 L-谷氨酸单体以 γ -羧基与氨基相缩合而成^[1]. 在生物体内, γ -PGA 生物相容性良好, 可以降解为谷氨酸而直接被生物体吸收, 用作生物医用材料有明显优点. 另外, 主链上有大量游离羧基存在, 使 γ -PGA 具有水溶性聚羧酸的性质, 如强吸水保湿性能, 可用于化妆品、食品、分散剂、螯合剂、建筑涂料、防尘等领域^[2,3]. 这些活性位点为材料的功能化提供了条件. 由于其良好的环境友好性, 在注重环保、强调可持续发展的今天, 这种来自生物质的可降解型功能材料受到人们的青睐.

目前发现了一些细菌能合成 γ -PGA, 研究较为深入的有 *B. Licheniformis* ATCC9945a^[4], *B. subtilis* IFO3335^[5]和 *B. subtilis* TAM-4^[6]. 但普遍存在营养供给多、发酵时间长、 γ -PGA 产率低等问题, 如 ATCC9945a 在 med E(8%甘油、1.2%柠檬酸和 2%谷氨酸)中培养 4 d, 生成 17~23 g/L γ -PGA, 产率为 0.17~0.24 g/(h·L); IFO3335 在含 30 g/L 谷氨酸、20 g/L 柠檬酸和 20 g/L 硫酸铵等的培养基中培养 4 d, 生成 20 g/L γ -PGA, 产率为 0.21 g/(h·L); TAM-4 菌情况也类似^[7]. 本研究对 γ -PGA 产生菌进行筛选和分离, 并对 γ -PGA 合成条件和机理进行了探讨.

2 材料和方法

2.1 菌种筛选

土壤样品悬浮在无菌蒸馏水中煮沸 5 min, 稀释后涂布于分离培养基中, 37°C 培养 2 d 后检出高粘度、生长快的菌落. 将分离得到的菌种接种到发酵培养基中, 于迴转式摇床上以转速 220 r/min 于 37°C 培养 24 h 后检测发酵液中 γ -PGA 的生成量. 挑取高产菌株用于下一步实验.

2.2 培养基和培养条件

分离培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 5, 谷氨酸钠 5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ 0.1, 琼脂 20.

收稿日期: 2003-10-13, 修回日期: 2003-12-24

基金项目: 国家“863”计划资助项目(编号: 2002AA327020); 江苏省高技术基金资助项目(编号: BG2001043); 华东理工大学反应器国家重点实验室开放课题资助项目

作者简介: 桑莉(1974-), 女, 江苏省沐阳县人, 硕士研究生, 生物工程专业; 徐虹, 通讯联系人, Tel: 025-83587332, E-mail: xuh@njut.edu.cn.

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2, $MgSO_4$ 0.25, 谷氨酸钠 10, pH 7.0.

发酵培养基: 碳源、氮源、谷氨酸钠、无机离子浓度同种子培养基, pH 7.5.

2.3 分析方法

细胞生长的测定: 将培养液稀释 25 倍后用 721 分光光度计读取 660 nm 处吸光值 A_{660} .

发酵液中葡萄糖浓度的测定采用葡萄糖氧化酶电极(SBA-50 型生物传感器).

发酵液中谷氨酸浓度的测定采用 L-谷氨酸氧化酶电极(SBA-50 型生物传感器).

γ -PGA 含量分析: 凝胶渗透色谱仪, 色谱柱为 Superose 6(Pharmacia Co.), 流动相为 50 μ mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液, 流速 0.4 mL/min, γ -PGA 标准品为自制.

结构表征: 采用 Bruker Avance 400 高分辨率魔角旋转核磁共振仪(HR/MAS NMR), 工作频率 400.13 Hz. 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 均以 D_2O 为溶剂.

2.4 γ -PGA 的发酵制备过程

发酵过程: 取一环菌体接种于种子培养基(500 mL 三角瓶装液量为 50 mL), 在摇床上于温度 $32^\circ C$ 下以转速 220 r/min 振荡培养 15 h, 然后按 1%接种量接种于发酵培养基, 发酵 22 h.

分离纯化过程: 采用 Goto & Kunioka 法^[8]. 得到的样品经超滤后冻干得到纯品用于结构分析.

3 结果与讨论

3.1 γ -PGA 生产菌的筛选和鉴定

利用分离培养基从各种样品中共检出 400 株高粘度、生长快的菌株, 进行摇瓶实验, PGAN-12 菌生成 γ -PGA 量最大, 用作进一步实验用菌. PGAN-12 经中国科学院微生物研究所鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*). 它是革兰氏阳性菌, 产芽孢, 周生鞭毛, 在生长期能形成明显的荚膜.

3.2 产物结构的表征

将分离纯化得到的产物用常规的蛋白质水解法水解, 用氨基酸分析仪分析水解后氨基酸的组成, 只出现一个谷氨酸峰, 证明产物是谷氨酸的均聚物(图略). 产物用 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 鉴定 (400 MHz, D_2O), 氢谱的化学位移有 $\delta_{4.07}(\alpha-H)$, $\delta_{1.87}$, $\delta_{2.00}(\beta-H_2)$, $\delta_{2.29}(\gamma-H_2)$, 且 H 质子峰面积积分接近 1:2:2. 碳谱的化学位移有 $\delta_{27.3}(\beta-CH_2)$, $\delta_{32.7}(\gamma-CH_2)$, $\delta_{55.3}(\alpha-CH_2)$, $\delta_{175.5}(\text{CONH}_2)$, $\delta_{178.9}(\text{COOH})$, 也与 γ -PGA 结构相符.

3.3 γ -PGA 发酵条件

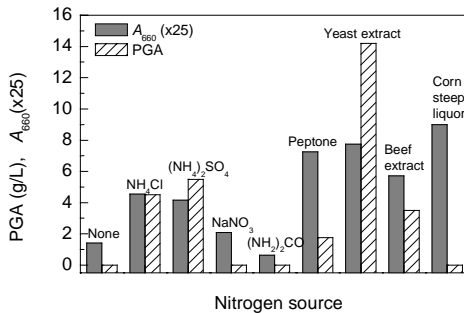
3.3.1 碳源对 γ -PGA 生产的影响

大多数 γ -PGA 发酵培养基以柠檬酸和甘油为复合碳源^[9], 按其配方进行发酵, PGAN-12 不仅生长不好且没有 γ -PGA 产出. 本实验研究葡萄糖、蔗糖、甘油、麦芽糖、果糖、乳糖、淀粉、柠檬酸、富马酸、苹果酸、丁二酸作为单一碳源时对 γ -PGA 生产的影响, 碳源的添加量为 30 g/L, 同时添加谷氨酸钠 30 g/L, 结果示于表 1.

当培养基中不额外添加碳源、菌体以谷氨酸钠为营养进行生长时, 生长较差且检测不到 γ -PGA. 添加葡萄糖到含谷氨酸钠的培养基中, 得到了最大 γ -PGA 生产量, 为 14.55 g/L. 添加麦芽糖、果糖和淀粉、甘油、蔗糖, 也显示了较好的 γ -PGA 生产性. 而乳糖能使菌体较好地生长, 检测培养液中剩余的谷氨酸钠量, 发现有近一半的谷氨酸钠消耗, 但完全不产出 γ -PGA. 而添加柠檬酸、富马酸、苹果酸、丁二酸到培养基中, 生长情况较差, 没有 γ -PGA 生成. 由于葡萄糖作为单一碳源时 γ -PGA 的产量最高, 因此选择发酵培养基的碳源为葡萄糖.

表1 碳源对 γ -PGA 合成的影响Table 1 Effect of carbon source on γ -PGA synthesis

Carbon source	Cell growth (A_{660})	γ -PGA (g/L)	Residual sodium glutamate (g/L)
None	0.080	—	24.40
Glucose	0.272	14.55	12.60
Sucrose	0.300	9.75	16.96
Maltose	0.290	8.50	15.24
Starch	0.402	9.00	20.41
Fructose	0.267	9.25	15.86
Glycerol	0.272	13.25	15.81
Lactose	0.218	—	21.56
Citric acid	0.093	—	24.44
Fumaric acid	0.145	—	17.25
DL-malic acid	0.143	—	26.45
Succinic acid	0.118	—	18.69

图1 氮源对 γ -PGA 合成的影响Fig.1 Effect of nitrogen source on γ -PGA synthesis3.3.2 氮源对 γ -PGA 生产的影响

按 0.8% 浓度添加 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 和酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、玉米浆到培养基中作为氮源, 实验结果(图 1)表明, 加入有机氮源使菌体大量生长, 而无机氮源效果较差. 在有机氮源中, 以酵母膏作为单一氮源时 γ -PGA 的产量最高, 因此选择发酵培养基的氮源为酵母膏.

3.3.3 谷氨酸对 γ -PGA 生产的影响

γ -PGA 生产菌分为两大类: 谷氨酸依赖型和非谷氨酸依赖型, PGAN-12 为前者. 因此谷氨酸作为 γ -PGA 单体原料对 γ -PGA 的产量影响很大. 如表 2 所示, 不同浓度的谷氨酸钠对 γ -PGA 的发酵生产有很大影响, 谷氨酸钠浓度为 10~70 g/L 时, γ -PGA 的产量随谷氨酸钠浓度升高而升高, 当谷氨酸钠浓度为 70 g/L 时, γ -PGA 可积累到 18.32 g/L, 谷氨酸浓度为 70~100 g/L 时, γ -PGA 的产量随着谷氨酸钠浓度升高而下降. 尽管在 70 g/L 谷氨酸钠供给浓度下获得了最大的 γ -PGA 生产量和产率, 但 γ -PGA 对谷氨酸钠的较大表观转化率是在 10~30 g/L 谷氨酸供给浓度下获得的, 当谷氨酸钠供给浓度为 30 g/L 时, 培养液中 γ -PGA 生成浓度为 14.2 g/L, 表观转化率最大, 为 62.1%.

表2 谷氨酸对 γ -PGA 合成的影响Table 2 Effect of sodium L-glutamate on γ -PGA synthesis

Sodium glutamate added (g/L)	Cell growth (A_{660})	γ -PGA (g/L)	Apparent conversion rate (%) ¹⁾	Residual sodium glutamate (g/L)	Residual glucose (g/L)
0	0.132	0.00	0.0	0.00	14.85
10	0.317	4.60	60.3	0.86	9.63
20	0.294	9.28	60.8	5.18	1.38
30	0.268	14.20	62.1	12.60	0.55
40	0.247	14.50	47.5	19.55	0.00
50	0.226	14.68	38.5	27.60	0.00
60	0.221	15.80	34.5	36.80	0.00
70	0.190	18.32	34.3	40.82	0.00
80	0.186	16.50	27.0	46.78	0.00
90	0.180	16.35	24.0	50.48	0.00
100	0.166	15.90	20.8	55.50	0.00

Note: 1) Described as the ratio of γ -PGA to sodium L-glutamic added.

3.3.4 装液量对发酵的影响

500 mL 摇瓶内分别装不同体积的培养基, 对发酵的影响结果见图 2. 由图可知, 装液量很小时, 菌体虽然生长很好, 但 γ -PGA 产量非常低. 装液量低对应溶氧高, 过高的溶氧只能促进菌体生长, 但对 γ -PGA 生产不利. 因此在摇床 220 r/min 的转速下, 取装液量为 80 mL 比较适宜.

3.3.5 初始 pH 对发酵的影响

考察不同初始 pH 值时 γ -PGA 的发酵情况, 结果如图 3 所示. 结果表明, 不同的初始 pH 对菌体的生长和 γ -PGA 产量都有一定的影响, 初始 pH 在中性时, 菌体生长最佳, 但是初始 pH 在 7.5 时, γ -PGA 的产量最高, 因此取发酵培养基的初始 pH 为 7.5, 与自然初始 pH 相近.

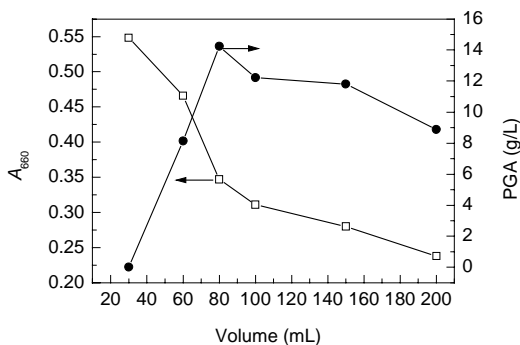


图 2 摇瓶装液量对 γ -PGA 合成的影响
Fig.2 Effect of volume on γ -PGA synthesis

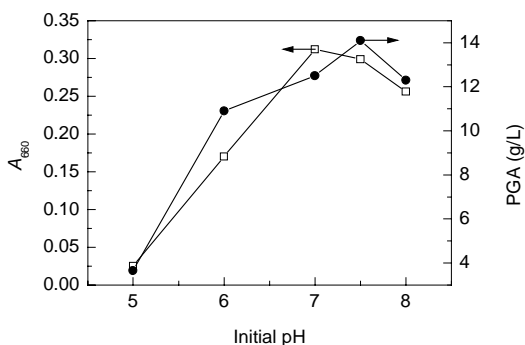


图 3 初始 pH 对 γ -PGA 合成的影响
Fig.3 Effect of initial pH on γ -PGA synthesis

3.3.6 PGAN-12 的发酵过程

在上述工作基础上确定发酵培养基的成分为(g/L): 葡萄糖 30, 酵母膏 8, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2, $MgSO_4$ 0.25, 谷氨酸钠 30, pH 7.5. PGAN-12 的发酵过程见图 4, PGAN-12 经 6 h 左右的停滞期很快进入对数生长期, γ -PGA 生物合成几乎与菌体生长同步, 从 8 h 起菌体快速合成 γ -PGA, 直到 22 h 达到最大产量 14.8 g/L, 这期间 γ -PGA 的产率高达 0.67 g/(h·L). 之后随着葡萄糖耗尽, γ -PGA 浓度达到一个平台, 不再增加, 而菌体继续生长, 与此相对应的谷氨酸钠浓度下降, 推测此时消耗的谷氨酸钠主要供给菌体的生长. 由于葡萄糖消耗速度远快于谷氨酸钠, 发酵终了葡萄糖耗尽, 而谷氨酸钠仍剩余 13.8 g/L, 表明葡萄糖浓度是 γ -PGA 进一步合成的限制性因素. 详细的 γ -PGA 合成机理有待进一步探讨.

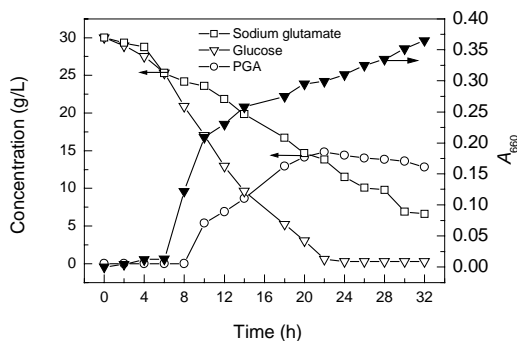


图 4 γ -PGA 生物合成过程
Fig.4 Time course of γ -PGA synthesis

4 结论

为了降低 γ -PGA 的生产成本, 提高菌株的生产率, 减少营养的供给是十分必要的. 本研究采用含有谷氨酸钠的分离培养基, 检出既有高粘度又生长快的菌落, 从中得到了一株高产 γ -PGA 的枯草芽孢杆菌 PGAN-12, 它可利用葡萄糖大量合成 γ -PGA, 而不需要添加高浓度的甘油和柠檬酸作营养, 并且发酵时间较短, 产率约为文献报道值的 3 倍.

参考文献：

- [1] Shih I L, Van Y T. The Production of Poly(γ -Glutamic Acid) from Microorganism and Its Various Applications [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79: 207–225.
- [2] Konno A, Taguchi T, Yamaguchi T. Bakery Products and Noodles Containing Polyglutamic Acid [P]. US Patent: US4888193, 1989–12–06.
- [3] Hasebe K, Inagaki M. Preparation Composition for External Use Containing Poly(γ -Glutamic Acid) and Vegetable Extract in Combination [P]. Japan Patent: JP11240827, 1999–06–05.
- [4] Birrer G A, Cromwick A M, Gross R A. γ -Poly(Glutamic Acid) Formation by *Bacillus Licheniformis* ATCC9945a: Physiological and Biochemical Studies [J]. *Int. J. Bio. Macromol.*, 1994, 16(5): 765–769.
- [5] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and Hydrolysis of Poly(γ -Glutamic Acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335 [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, 63(1): 110–115.
- [6] Ito Y, Tannka T, Chmachi T. Glutamic Acid Independent Production of Poly(γ -Glutamic) by *Bacillus subtilis* TAM-4 [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, 60(8): 1239–1242.
- [7] Kunioka M. Biosynthesis and Chemical Reactions of Poly(Amio Acid)S from Microorganisms [J]. *Appl. Microbiol. Biochem.*, 1997, 47: 469–475.
- [8] Kunioka M. Biosynthesis of Poly(γ -Glutamic Acid) from L-glutamine, Citric Acid and Ammonium Sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335 [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44: 501–506.
- [9] Ogawa Y, Yamaguchi F, Yuasa K. Efficient Production of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus subtilis*(natto) in Jar Fermenters [J]. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61(10): 1684–1687.

Screening of *Bacillus subtilis* PGAN-12 and Production of γ -Polyglutamic Acid by Fermentation

SANG Li, XU Hong, LI Hui, ZHANG Lu-jia, JIANG Min

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Strain PGAN-12 which could produce γ -polyglutamic acid (γ -PGA) was isolated from soils and identified taxonomically as *Bacillus subtilis*. PGAN-12 could produce a large amount of γ -PGA in the medium containing glucose and sodium glutamate. The suitable carbon source was glucose, however, when organic acids in TCA cycle including citric acid were used as carbon sources, PGAN-12 did not produce γ -PGA. The optimum nitrogen source was yeast extract. PGAN-12 is a γ -PGA producing strain depending on L-glutamic acid in the medium. In the presence of 70 g/L sodium glutamate, the highest γ -PGA concentration reached up to 18.32 g/L, while 30 g/L sodium glutamate was added, 14.2 g/L γ -PGA was obtained with the highest yield of 62.1%.

Key words: γ -polyglutamic acid; γ -PGA; *Bacillus subtilis*; screening