

文章编号:1671-1513(2011)01-0024-06

微生物发酵法合成高分子聚合物 γ -PGA 的研究

梁金钟, 王风青

(哈尔滨商业大学 食品工程学院/黑龙江省普通高等学校食品科学与工程重点实验室,
黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:以一株 γ -聚谷氨酸高产菌枯草芽孢杆菌 B-115 为实验菌株,分别考察碳源、氮源种类及浓度、前体物添加量、生长因子和发酵条件对 γ -聚谷氨酸产率的影响。优化结果显示:碳源是 6.5% 的玉米糖化液,氮源是 0.4% 的普通蛋白胨,前体物谷氨酸钠的添加量为 4%,生长因子种类及添加量分别为 0.15% 硫酸镁、0.006% 硫酸锰、0.8% 磷酸二氢钾、1.0% 氯化钠、0.03% 氯化钙;发酵条件为初始 pH 值 6.5,接种量 2%,装液量 50 mL/250 mL,150 r/min,37 °C 培养 84 h; γ -聚谷氨酸的产率可从 57.85 g/L 提高到 68.30 g/L。

关键词: γ -聚谷氨酸;培养基;培养条件;高分子聚合物

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

γ -聚谷氨酸[poly γ -glutamic acid, γ -PGA]是由微生物代谢合成并分泌到细胞外的一种水溶性高分子物质,这种阴离子物质是由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸单体之间通过酰胺键结合而成的同聚酰胺^[1]。 γ -PGA 具有增稠、乳化、保湿、絮凝、粘合,极佳的成膜性、成纤维性、阻氧性、可塑性和可降解性等独特的理化和生物学特性,因此可广泛应用于食品、化妆品、生物医学、环境保护等领域^[2],例如:药物缓释剂^[3]、沙地的保水剂^[4-5]、高吸水剂^[6-7]、食品用水凝胶^[8]、粘稠剂^[9]以及高强纤维等^[10],特别是近年来随着对 γ -PGA 的深入研究, γ -PGA 作为一种高分子生物制品,愈来愈显现出广阔的研究价值和应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B-115(哈尔滨商业大学发酵工程实验室保藏)。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面培养基

蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂

20 g/L,pH 值 7.2 ~ 7.4。将现有斜面菌种活化,37 °C 培养 24 h。

1.2.2 种子培养基

斜面培养基加 2% 葡萄糖,不加琼脂。种子培养:250 mL 三角瓶装液量 50 mL,温度 37 °C,转速 150 r/min,置于摇床上培养 18 h。

1.2.3 基础发酵培养基

还原糖 5.655% (玉米糖化液),谷氨酸钠 5.800%,蛋白胨 0.500%, KH_2PO_4 0.400%, MgSO_4 0.125%,NaCl 1.200%, MnSO_4 0.008%, CaCl_2 0.042%。摇瓶培养:接种量 2%,250 mL 三角瓶装液量为 50 mL,转速 150 r/min,温度 37 °C,培养 48 h。

1.3 玉米糖化液的制备

300 g 市售玉米粉加水 1 000 mL,加入 1.05 g 无水 CaCl_2 煮沸,调节 pH 值为 6.7 ~ 7.0,再加入 α -耐高温淀粉酶(120 U/g 原料),迅速降温 80 ~ 85 °C,保温 15 ~ 20 min,继续降温至 58 ~ 60 °C,调节 pH 值为 4.5,加糖化酶(150 U/g 原料),60 °C 保温 4 h 后,再加热煮沸 10 min,过滤除渣,测定糖化液还原糖浓度,低温保存备用。

收稿日期:2010-09-23

基金项目:黑龙江省“十一五”重大科技攻关项目(GA06B401-2)。

作者简介:梁金钟,男,教授,主要从事微生物发酵方面的研究。

1.4 分析方法

1.4.1 γ -PGA 产率的测定

将发酵液稀释后(发酵液:水=1:1)于9000 r/min离心15 min除去菌体,取上清液10 mL,加入25 mL的无水乙醇,剧烈摇晃得到团状物,将其转入称量瓶,置于电热恒温鼓风干燥箱中105~110℃下烘2~2.5 h,得到黄色块状粗样品,并称量。

1.4.2 pH值的测定

PHS-3C型pH计。

1.4.3 粘度的测定

采用DNJ-5S型数字式粘度计,25℃时二号转子测定。

1.4.4 还原糖的测定

直接滴定法^[11]。

1.4.5 谷氨酸及葡萄糖的测定

采用SBA-40D型生物传感分析仪(山东省科

学院生物研究所)测定。

2 结果与讨论

2.1 培养基优化

2.1.1 碳源及其浓度对 γ -PGA产率的影响

图1为碳源种类和浓度对 γ -PGA产率的影响结果。分别以1%的蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、果糖、玉米糖化液、糊精、柠檬糖为碳源,在培养基的其他组分固定情况下进行单因素实验,结果如图1(a)。由图1(a)可知,碳源中以玉米糖化液的发酵效果最好,产率最高。玉米糖化液中除了葡萄糖,还有木糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、乙酸及少量糠醛等物质,它优于其它单一的碳源,可能就是因为它除了含有菌种生长所必需的碳源外还有其他微量元素和生长因子,其有利于菌种生长或对聚谷氨酸合成酶的活性有所提高。

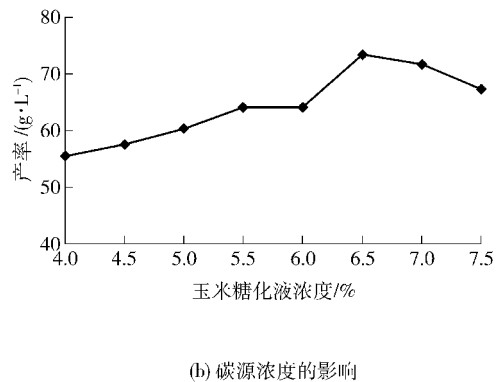
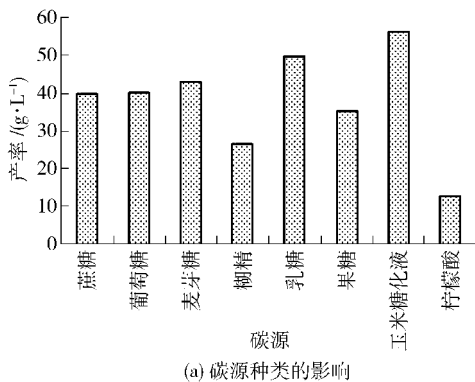


图1 碳源种类和浓度对 γ -PGA产率的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on γ -PGA synthesis

以玉米糖化液为碳源发酵,如图1(b),由图1(b)可知,玉米糖化液浓度为6.5%时 γ -PGA的产率最高。

2.1.2 氮源及其浓度对 γ -PGA产率的影响

氮源对微生物的生长和目标产物的积累有重要的影响,因此合适的氮源对于 γ -PGA的发酵生产具有重要作用。分别选取硫酸铵、氯化铵、酵母粉、牛肉粉及各种蛋白胨作为氮源,在其他条件不变情况下进行单因素实验,结果如图2。由图2可知,以蛋白胨作为氮源发酵效果最好,产率最高,说明本菌种能很好地利用有机氮源蛋白胨作为优化氮源。

以普通蛋白胨为氮源,选择不同浓度的普通蛋白胨进行发酵,结果如图3。由图3可知,当普通蛋白胨浓度为0.4%时产率最高,而且过多的氮源不利于聚谷氨酸的合成。此外,当普通蛋白胨浓度为0

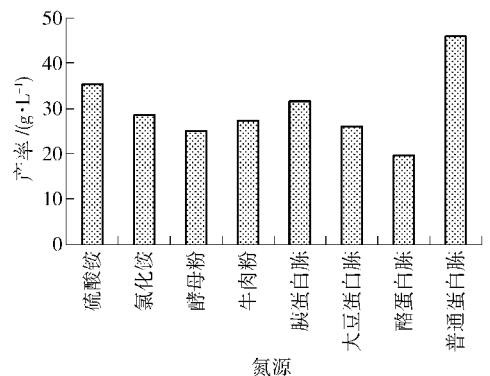
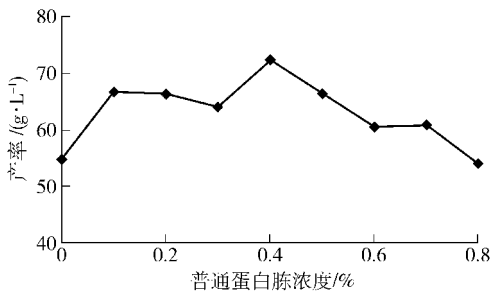


图2 氮源对 γ -PGA产率的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source on γ -PGA synthesis

时,也有产物合成,说明普通蛋白胨不是发酵过程中唯一所需的氮源,综合考虑,选择氮源的添加量是0.4%的普通蛋白胨。

图3 普通蛋白胨浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 3 Effect of concentration of nitrogen source on γ -PGA synthesis

2.1.3 前体物对 γ -PGA产率的影响

其他条件不变的情况下,令谷氨酸钠浓度为:0%,2%,4%,6%,8%,10%,结果如图4.由图4可知,当谷氨酸钠浓度为4%时发酵液黏度最大,当不添加前体物时没有聚谷氨酸形成,说明谷氨酸钠是此菌发酵合成聚谷氨酸的必须物质.随着谷氨酸钠浓度的增大,粘度有所降低,但产率随之上升,说明过多的前体物使 γ -PGA的分子量有所下降,要取得的高分子 γ -PGA同时又比较经济,选择添加4%的前体物.

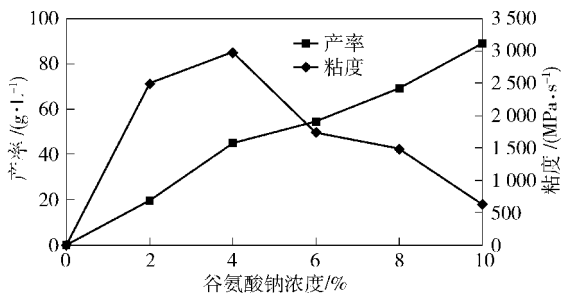


图4 前体物浓度对发酵效果的影响

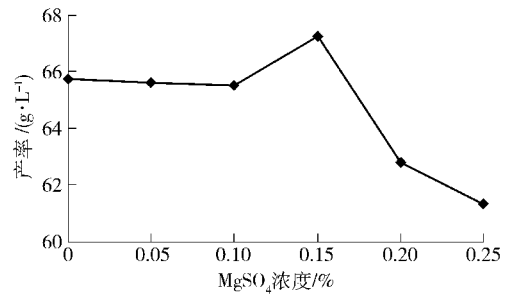
Fig. 4 Effect of concentration of sodium glutamate on γ -PGA synthesis

2.1.4 镁离子对 γ -PGA产率的影响

镁离子能促进碳源的分解,加速菌体能量代谢,有助于细胞有氧氧化,且适量的镁离子有助于减少发酵后期产生的乳酸;同时镁离子又是钙离子和钾离子进出细胞所必须的,又是许多重要酶的激活剂^[12].

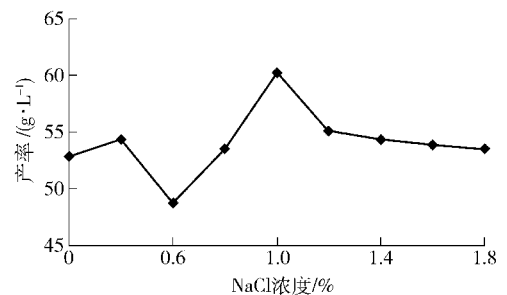
其他条件不变的情况下,改变 $MgSO_4$ 浓度,结果如图5.由图5可知,硫酸镁浓度为0.15%时 γ -PGA产率最大,其浓度小于或大于0.15%时, γ -PGA产率都有所下降,前者可能是由于镁离子对 γ -PGA合成酶激活不充分而使产率较低,后者则可能是高浓度的镁离子对 γ -PGA合成酶起到一定程度

的抑制作用致使产率下降,因此选择0.15%为硫酸镁的优化添加浓度.

图5 镁离子浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 5 Effect of concentration of Mg^{2+} on γ -PGA synthesis

2.1.5 钠离子对 γ -PGA产率的影响

其他条件不变的情况下,改变NaCl浓度,结果如图6.由图6可知,当氯化钠浓度为1.0%时产率最大,随着浓度的继续增大或降低,产率都有不同程度的降低,考虑到实际生产的费用问题,因此选择1.0%的氯化钠为培养基的优化添加量.

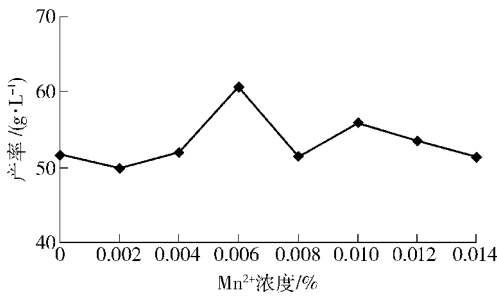
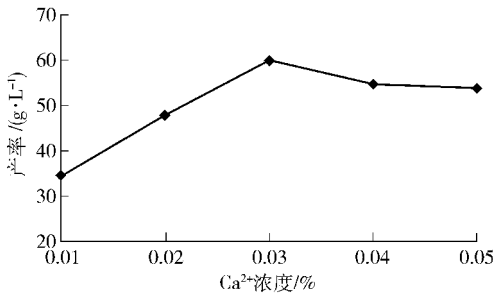
图6 钠离子浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 6 Effect of concentration of Na^+ on γ -PGA synthesis

2.1.6 锰离子对 γ -PGA产率的影响

微生物细胞内的许多酶反应中,二价锰离子都是激活剂,其激活作用可部分的替代镁离子,锰离子和镁离子共同促进激活酶的反应,以弥补镁离子的不足^[13].锰离子的浓度还控制着 γ -PGA内L-型谷氨酸和D-型谷氨酸的比例.锰离子浓度对 γ -PGA产率的影响结果见图7.由图7可知,当锰离子浓度为0.006%时, γ -PGA的产率最高,因此以0.006%的锰为优选浓度.

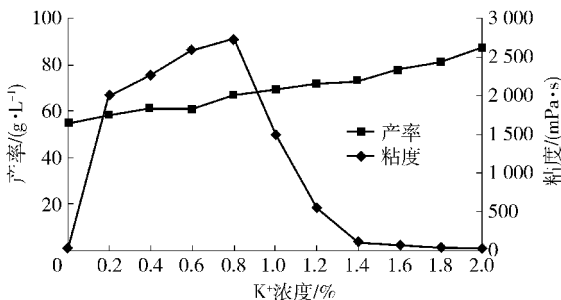
2.1.7 钙离子对 γ -PGA产率的影响

Ca^{2+} 存在于细胞中控制细胞的生理状态,调节质膜的通透性,维持细胞体内的渗透压. Ca^{2+} 也是一些酶的激活剂和部分酶系构成的必要因子,并对一些阳离子的毒性有拮抗作用^[14]. Ca^{2+} 对聚谷氨酸产率的影响如图8.由图8可知, Ca^{2+} 浓度为0.03%时 γ -PGA的产率最高.

图7 锰离子浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 7 Effect of concentration of Mn^{2+} on γ -PGA synthesis图8 钙离子浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 8 Effect of concentration of Ca^{2+} on γ -PGA synthesis

2.1.8 钾离子对 γ -PGA产率的影响

钾离子浓度对 γ -PGA产率的影响结果见图9。由图9可知, γ -PGA的产率随着钾离子浓度的上升而上升,但发酵液的粘度在钾离子的浓度为0.8%时达到最大,随着浓度的增加产量继续上升,但是黏度有所下降,可能是高浓度的磷酸盐抑制了聚谷氨酸合成酶的活性,影响了产物的聚合度,即表现为粘度下降,因此选择磷酸盐浓度为0.8%。

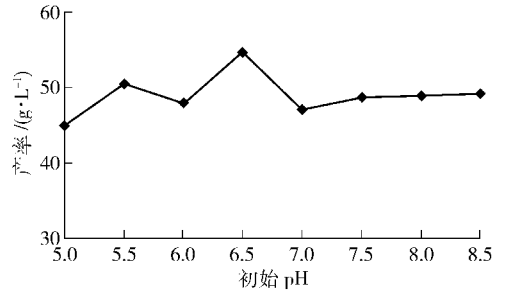
图9 钾离子浓度对 γ -PGA产率的影响Fig. 9 Effect of concentration of K^{+} on γ -PGA synthesis

2.2 培养条件优化

2.2.1 初始pH值对 γ -PGA产率的影响

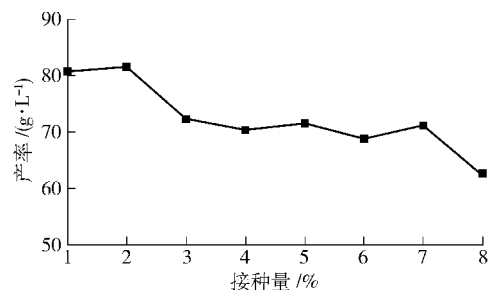
考察初始pH值为5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0和8.5时发酵产 γ -PGA的情况,结果如图10。培养基的pH值不同,将影响营养物质的离子化程度,继而影响微生物细胞的运输机制,促进或妨碍一

些营养物质的吸收;另外,pH值过高或过低常常影响微生物细胞中诸多与代谢有关的酶的活性,进一步对微生物的生长和物质代谢产生较大的影响。由图10可知,当发酵培养基的初始pH值为6.5时, γ -PGA的产率最高,因此在发酵前调pH值到6.5有利于产物的合成。

图10 初始pH对 γ -PGA产率的影响Fig. 10 Effect of initial pH on γ -PGA synthesis

2.2.2 接种量对 γ -PGA合成的影响

培养了16~24h的种子液,分别以1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%的接种量接于发酵培养基中,在发酵48h后检测 γ -PGA的产量,结果如图11所示:当接种量为2%时,产量最高,随着接种量的增加,产率随之下降。不同接种量意味着不同的初始菌体浓度,它影响发酵结束的时间和 γ -PGA的产量,它的大小影响细胞生长迟滞期的长短以及细胞倍增繁殖的速度。对发酵生产 γ -PGA的过程来说,菌体只有在一定浓度范围内才能使 γ -PGA维持比较满意的产量,太低或太高的菌体浓度都不利于 γ -PGA产量的提高。因此优化接种量可认定为2%。

图11 接种量对 γ -PGA产率的影响Fig. 11 Effect of inoculation amount on γ -PGA synthesis

2.2.3 温度对 γ -PGA合成的影响

培养温度直接影响菌体的生长速率和代谢途径,以及菌种内合成聚合物的酶活性,从而影响产物的合成。在转速为150 r/min,发酵时间为48h,装液量50 mL的条件下,通过控制不同的培养温度:31,33,35,37,39 $^{\circ}C$, γ -PGA的产量随温度的变化如图

12所示:γ-PGA产率在37℃最大.

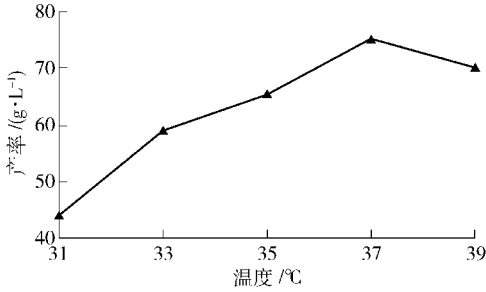


图12 温度对发酵效果的影响

Fig. 12 Effect of temperature on γ -PGA synthesis

2.2.4 溶氧对γ-PGA合成的影响

溶氧在好氧微生物发酵过程中是一个重要因素,产γ-PGA的枯草芽孢杆菌是好氧菌,而在γ-PGA这种高黏度发酵体系中尤为突出.聚谷氨酸在发酵的初始阶段,体系的黏度很低,表现为低黏度牛顿体系,随着聚合物的不断积累,发酵体系的黏度不断增加,特别在发酵后期,发酵体系成为高黏度非牛顿体系,影响了氧的传递和料液的氧密度,从而影响了菌体产γ-PGA的量.分别以摇瓶装液量和摇床转速来考察溶氧对枯草芽孢杆菌发酵产γ-PGA的影响.用250 mL的三角瓶,分别以30,50,70,90,110 mL的装液量进行发酵,结果如图13所示:当装液量为50 mL/250 mL时发酵产率最高.

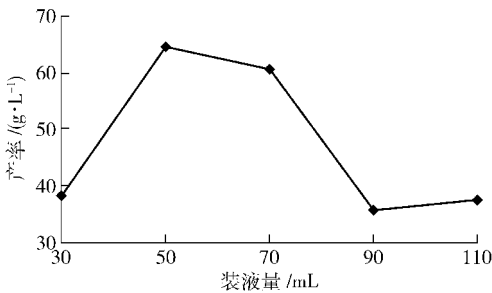


图13 装液量对γ-PGA产率的影响

Fig. 13 Effect of volume on γ -PGA synthesis

再以50 mL的装液量,以100,150,200,250 r/min的不同转速进行发酵,结果如图14所示:当转速在150 r/min较好,因其他转速下发酵产率相对较低,但其发酵液粘度最高且提取产物弹性较好,在较低能耗下获得较高分子量产物,因此综合考虑选150 r/min为佳.

2.2.5 时间对γ-PGA合成的影响

γ-PGA是非生长偶联型产物,并不随菌体量同

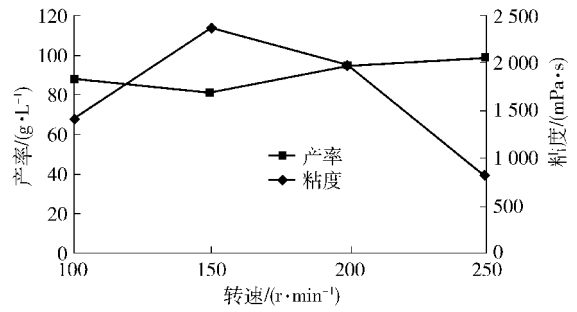


图14 转速对γ-PGA产率的影响

Fig. 14 Effect of rotational speed on γ -PGA synthesis

步增加,而是在细胞进入稳定期后聚合物才大量合成.图15为发酵时间对γ-PGA产率影响结果.由图15可知,随着发酵时间的增加,γ-PGA的产量也随之增加,特别是当发酵时间由84 h延长到96 h时,其产量也增加很多,但同时发酵液的颜色也加深很多,可能是菌体自溶产生某些物质造成的,这样不利于γ-PGA的提取纯化,经综合考虑,发酵时间以选取84 h为宜.

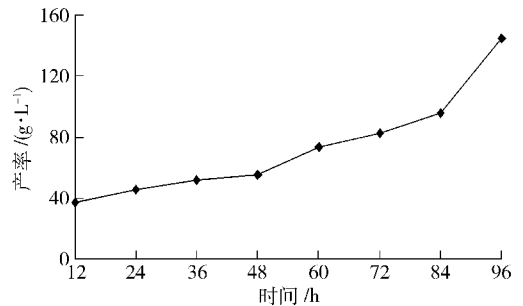
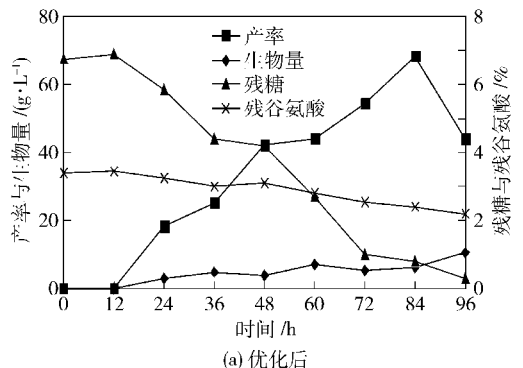


图15 发酵时间对γ-PGA产率的影响

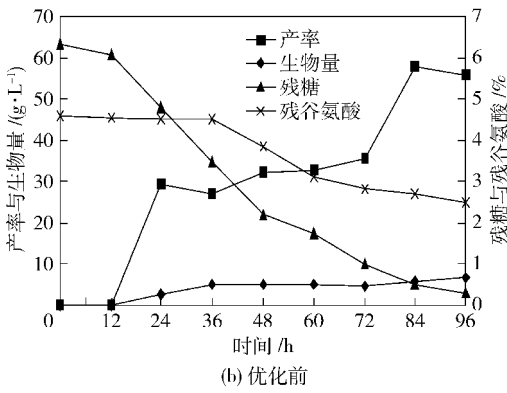
Fig. 15 Effect of fermentation time on γ -PGA synthesis

2.3 优化前后发酵规律曲线

图16为优化前后γ-PGA产率对比结果.由图16可知,优化后γ-PGA的产率可高达68.30 g/L,比优化前提高了10.45 g/L.



(a) 优化后

图16 优化前后 γ -PGA代谢合成曲线Fig. 16 Metabolism synthesis curve of γ -PGA optimized and optimized

3 结论

通过实验,确定了枯草芽孢杆菌发酵合成 γ -PGA的优化培养基组成及培养条件:6.5%玉米糖化液、0.4%的普通蛋白胨、4%的前体物谷氨酸钠、0.15%的硫酸镁、0.006%硫酸锰、0.8%的磷酸二氢钾、1.0%的氯化钠、0.03%氯化钙、初始pH值6.5、接种量2%、装液量50 mL/250 mL、150 r/min、37 $^{\circ}$ C培养84 h;优化后 γ -PGA的产率从57.85 g/L升高到68.30 g/L。

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] 施庆珊. γ -聚谷氨酸的微生物合成与应用[J]. *精细与专用化学品*, 2004, 12(11): 20 - 23.

[3] Kim K S, Kim T K, Graham N B. Controlled release behavior of prodrugs based on the biodegradable poly (γ -glutamic acid) microspheres [J]. *Polymer Journal*, 1999, 31: 813 - 816.
 [4] Choi H J, Kunioka M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by (γ -irradiation from microbial poly γ -glutamic acid) [J]. *Radiat Phys Chem*, 1995, 46 (2): 175 - 179.
 [5] Li C, Ke S, Wn Q P. Tumor irradiation enhances the tumor-specific distribution of poly (L-glutamic acid)-conjugation paclitaxel and its antitumor efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 16(7): 2829 - 2834.
 [6] Chio H J, Yang R, Kunioka M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by irradiation from microbial poly (glutamic acid) [J]. *J Appl Polym Sci*, 1995, 58: 807 - 814.
 [7] Kunioka M, Furusawa K. Poly (γ -glutamic acid) hydrogel prepared from microbial poly (γ -glutamic acid) acid alkylated amine with water-soluble carnodiimide [J]. *J Appl Polym Sci*, 1997, 65: 1889 - 1896.
 [8] Yasuyoshi A, Yuji F, Shuichi K. Health food with poly (γ -glutamic acid) as the chief ingredient: 日本, 5095767A2 [P]. 1993 - 04 - 20.
 [9] Konno A, Taguchi T, Yamaguchi T. Bakery products and noodles containing polyglutamic acid: US, 4888193 [P]. 1989.
 [10] Yahata K, Sadanobu J, Endo T. Preparation of poly-benz- γ -glutamic acid fiber [J]. *Polym Prepr Jpn*, 1992, 42: 77.
 [11] 丛峰松. 生物化学实验 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005.
 [12] 陈三凤, 刘德虎. 现代微生物遗传学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 312.
 [13] Ing-Lung Shih, Yi-Tsong Van. The production of poly (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79(3): 207 - 225.
 [14] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 104 - 106.

Biosynthesis of Macromolecular Polymers γ -PGA by Fermentation

LIANG Jin-zhong, WANG Feng-qing

(School of Food Engineering/Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, 150076, China)

Abstract: The fermentation media and culture conditions of *Bacillus subtilis* B-115 were optimized for producing poly γ -glutamic acid. The optimal fermentation conditions for poly γ -glutamic acid production were as follows: corn saccharification liquid 6.5%, peptone 0.4%, L-glutamate 4%, $MgSO_4$ 0.15%, $MnSO_4$ 0.006%, KH_2PO_4 0.8%, $CaCl_2$ 0.003%, NaCl 1%, inoculums level 2%, flask content 50 mL/250 mL, pH 6.5, temperature 37 $^{\circ}$ C, rotation speed 150 r \cdot min $^{-1}$, and fermentation time 84 h. Under the optimal conditions, the yield of γ -PGA was increased from 57.85 g/L to 68.3 g/L.

Key words: poly- γ -glutamic acid; media; culture conditions; macromolecular polymers

(责任编辑:叶红波)