

一株 γ -聚谷氨酸合成菌的筛选与鉴定

姚俊¹ 陈宽婷¹ 魏钦俊^{1*} 阮文辉² 曹新¹ 鲁雅洁¹

(1. 南京医科大学基础医学院生物技术系 江苏 南京 210029)

(2. 山西省医药与生命科学研究院 山西 太原 030001)

摘要: 从土壤中筛选分离获得一株 γ -聚谷氨酸合成菌 PGS-1, 经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 在富含谷氨酸和葡萄糖的培养基中可大量合成 γ -聚谷氨酸, 摇瓶发酵产量达 26 g/L, 不同于大多文献报道的微生物合成的 γ -聚谷氨酸具有较高的分子量, 该菌株合成的 γ -聚谷氨酸分子量较低(3×10^5 – 4×10^5 kD), 分子量分布较窄, 可适用于低分子量要求的应用领域, 如作为药物的控缓释载体, 值得深入开发研究。

关键词: γ -聚谷氨酸, 筛选, 枯草芽孢杆菌, 摇瓶发酵

Screening and identification of a novel γ -polyglutamic acid producing strain

YAO Jun¹ CHEN Kuan-Ting¹ WEI Qin-Jun^{1*} RUAN Wen-Hui² CAO Xin¹
LU Ya-Jie¹

(1. Department of Biotechnology, School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

(2. Shanxi Institute of Medicine and Life Science, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: A novel γ -polyglutamic acid (γ -PGA) producing-strain *Bacillus subtilis* PGS-1 was isolated from soil, which could produced a large mount of γ -PGA in the medium containing glucose and glutamate. The highest yield 26 g/L of γ -PGA was obtained in flask culture. Compared with other reported γ -PGA producing-strain, γ -PGA derived from *Bacillus subtilis* PGS-1 had a lower molecular weight (3×10^5 – 4×10^5 kD) and a narrower polydispersity (1.3–2.0), which could endow γ -PGA a promising application, such as in the drug delivery system.

Keywords: γ -polyglutamic acid, Screening, *Bacillus subtilis*, Flask culture

γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, 简称 γ -PGA)是由多种杆菌(如炭疽芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣

芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌等)产生的一种胞外聚合物, 由于其水溶性好、吸水性好、可生物降解并具

有良好的生物相容性,在工农业、食品与医药等领域极具应用潜力^[1-3]。

Bacillus species 产生的 γ -PGA 分子量在 10^4 – 10^6 kD 之间,分子量分布的多分散系数在 3.0–10.0 之间^[1-4]。高分子量的 γ -PGA (10^6 kD)作为增稠剂用于制备高吸水性树脂,这类 γ -PGA 合成菌文献报道较多,而较低分子量的 γ -PGA (10^5 kD)用于药物的控缓释载体更为有利,但一直未能筛选到既能高效合成又适合工业化生产的合成菌株,其制备只能采用物理或化学降解的方法^[5-8]。此外,分子量窄分布的 γ -PGA 更利于其精细化应用。作者从土壤中筛选得到一株较低分子量 γ -PGA 的合成菌 *Bacillus subtilis* PGS-1,并对发酵产物进行了系统的表征和鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种筛选

户外采集富含盐分且潮湿的土壤,将土样悬浮于无菌蒸馏水中煮沸 5 min,稀释后涂布于分离培养基中,37 °C 下培养 2 d 后挑出生长快、表面光滑且粘稠的单菌落,将分离得到的菌种接种到摇瓶发酵培养基中,温度 37 °C,摇床转速 220 r/min,培养 48 h。检测发酵液中 γ -PGA 的生成量。

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 筛选平板培养基(g/L): 葡萄糖 10, 酵母膏 5, 谷氨酸钠 5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.2, MgSO_4 0.1, 琼脂 20, pH 7.5。

1.2.2 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 谷氨酸钠 10, NaCl 5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2, MgSO_4 0.25, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, pH 7.0。

1.2.3 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50, 谷氨酸钠 50, 氮源采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, 其余同种子培养基成分。

1.2.4 培养条件: (1) 平板培养: 接菌种于平板培养基, 37 °C 培养 24 h。(2) 种子培养: 接一环菌于装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 220 r/min、37 °C 培养 15 h。(3) 发酵培养: 以 2%接种量将种子培养液接入发酵培养基中, 500 mL 三角瓶装液量为 80 mL, 温度 37 °C, 摇床转速 220 r/min, 培养 48 h。

1.3 γ -PGA 的分离纯化

发酵液经预处理和分离纯化后得 γ -PGA 纯品,用于后续的产物分析,具体方法参见文献[9]。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 基因组 DNA 的提取: 按 VIOGENE 公司的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明进行。

1.4.2 16S rDNA 的扩增与分析^[10]: 使用细菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增,引物设计如下: F primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R primer: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

反应体系: 25 μL , 包括 10 \times buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , F 和 R 引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 模板 DNA 1 μL , 5.0 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL , 去离子水 18.25 μL 。

PCR 程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 45 s, 12 个循环,且每个循环降低 0.5 °C; 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。

扩增产物的纯化按上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收 PCR 产物纯化试剂盒说明,测序由南京金斯特生物科技有限公司完成。将测序结果在 NCBI 中 BLAST 比对后递交 GenBank 数据库与已有的序列进行比较分析,确定该菌株的分类地位。

1.5 分析方法

1.5.1 细胞干重(DCW)测定: 发酵液酸化,离心,收集菌体,水洗涤 2 次,80 °C 干燥至恒重。

1.5.2 葡萄糖和谷氨酸含量的测定: 采用 SBA-40C 型生物传感器。

1.5.3 发酵产物的分析与鉴定: (1) 多糖测定: 采用硫酸-苯酚法测定发酵产物有无多糖。(2) 水解产物分析: 将 1.3 获得的样品用常规的蛋白质水解法水解,采用 HITACHI 655 氨基酸分析仪分析氨基酸组分。(3) 结构表征: 将制备的 γ -PGA 样品溶于 D_2O (0.05 g/mL),加入定量二甲基亚砜(DMSO)作为内标,采用 BRUKER AVANCE 400 (SB)核磁共振谱仪,工作频率 400.13 MHz。(4) 红外光谱分析: 采用 Nicolet 360FT-IR 型傅里叶变换红外光谱仪。

1.5.4 γ -PGA 含量、分子量 and 多分散系数的测定: 凝胶渗透色谱法(GPC)^[11-12]。 γ -PGA 标准品(10^6 kD, 纯度 70%)由南京工业大学徐虹教授惠赠。

2 结果与讨论

2.1 γ -PGA 生产菌的筛选和鉴定

2.1.1 γ -PGA 生产菌的筛选: γ -PGA 是某些微生物荚膜的主要成分, 在很多环境下作为微生物的一种适应性因子存在, 如保护细胞不受蛋白酶的 attack 或高盐环境下吸收与保持水分^[2], 故选择在连云港、盐城等沿海地区的户外采集富含盐分的土样, 经预处理后利用筛选平板培养基共检出 200 多个生长快、表面光滑且粘稠的菌株, 再分别进行摇瓶培养, PGS-1 生成 γ -PGA 量最高, 故选择作为后续的实验用菌。PGS-1 在富含葡萄糖和谷氨酸的培养基中可大量合成 γ -PGA, 属于谷氨酸依赖型的 γ -PGA 合成菌^[2-3]; 革兰氏染色呈阳性, 产芽孢; 结晶紫染色后能观察到较明显的透明状荚膜(图 1 所示)。

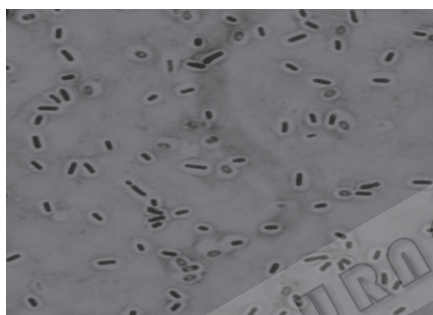


图 1 PGS-1 结晶紫染色镜检图

Fig. 1 Morphology of *B. subtilis* PGS-1

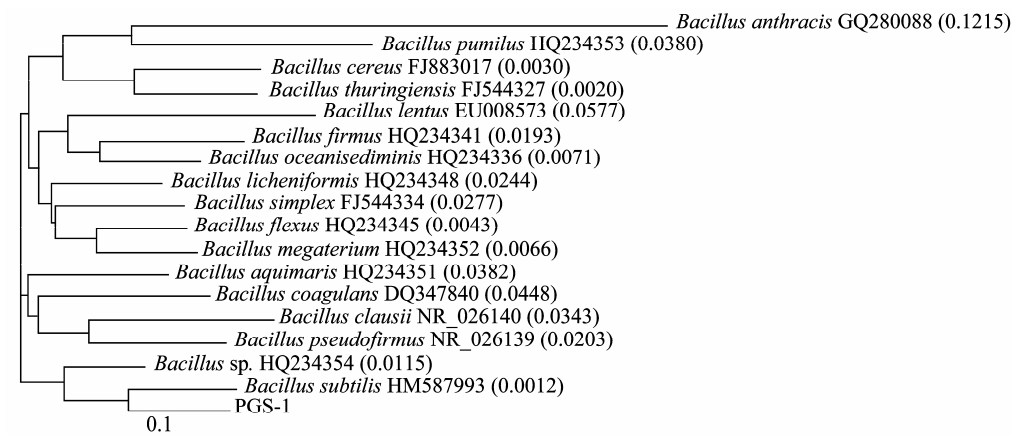


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

2.1.2 16S rDNA 序列分析: PCR 获得 PGS-1 菌株 16S rDNA 基因的部分片段, 长度为 1 415 bp, 测序后与 GenBank 数据库收录的相关 DNA 序列进行比较, 构建以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树(图 2)。结果表明 PGS-1 菌株与芽孢杆菌(*Bacillus species*)同源性为 98.1%, 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)同源性达到 99.9%, 可以将 PGS-1 的分类定位为枯草芽孢杆菌, 现已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏号: CGMCC No. 4034)。

2.2 发酵产物的鉴定和结构表征

发酵产物经鉴定无多糖成分; 氨基酸分析仪分析水解氨基酸组分只出现一个谷氨酸峰(图略), 证明产物为谷氨酸的均聚物; 经 ¹H-NMR 测定, α 、 β 与 γ 位 H 质子峰面积积分接近 1:2:2, 碳谱的化学位移如图 3 所示, 有 $d_{26.8}(\beta\text{-CH}_2)$ 、 $d_{32.1}(\gamma\text{-CH}_2)$ 、 $d_{54.5}(\alpha\text{-CH}_2)$ 、 $d_{174.9}(\text{CO-NH}_2)$ 和 $d_{178.2}(\text{COOH})$ (图中未示)。

发酵产物的红外图谱如图 4 所示: $3\ 434.75\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰系 N-H 对称伸缩振动带, $1\ 624.19\ \text{cm}^{-1}$ 处系酰胺基中 -C=O 的伸缩振动带(酰胺吸收带 I), $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收带来源于 NH 弯曲和 C-N 伸缩振动的偶合(酰胺吸收带 II), 两者结合证明了酰胺基的存在; $1\ 445.54\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 406.19\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰表明了分子结构中存在脂肪烃类 $\text{-CH}_2\text{-}$ 或 -CH_3 ^[13]。

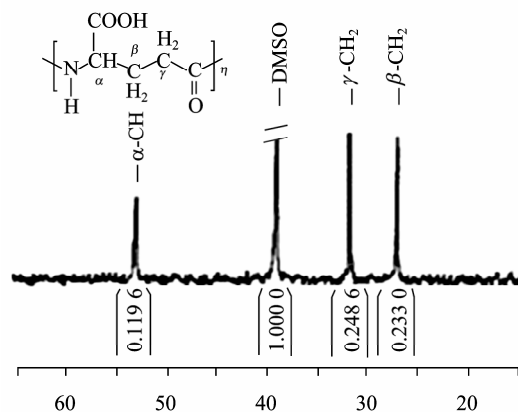
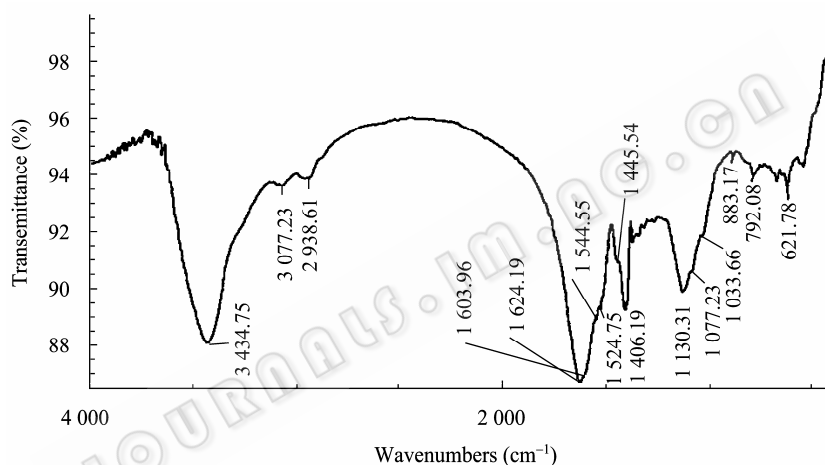
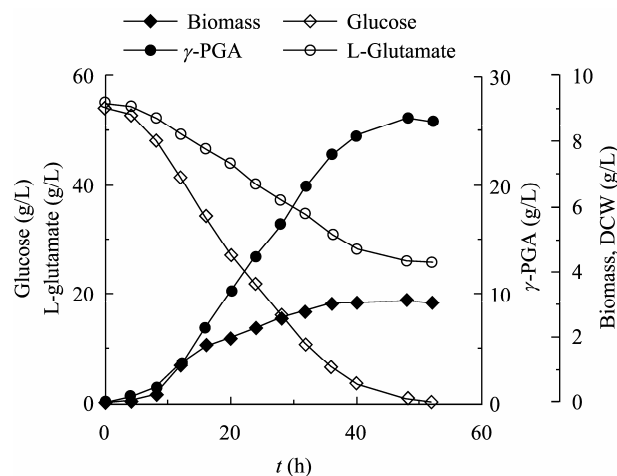
图3 发酵产物 ^{13}C -NMR 谱图Fig. 3 ^{13}C -NMR analysis of culture product

图4 发酵产物红外图谱分析

Fig. 4 FTIR analysis of culture product

图5 γ -PGA 摇瓶发酵过程曲线Fig. 5 Time course of γ -PGA batch production in flask

以上分析结果表明发酵产物与 γ -PGA 的理论结构相符。

2.3 摇瓶发酵过程分析

摇瓶发酵过程曲线如图 5 所示。可以看出, γ -PGA 合成和菌体生长曲线部分偶联。迟滞期底物消耗相对较少, 菌体生长和产物合成缓慢; 8 h 后进入对数生长期, 葡萄糖和谷氨酸浓度快速降低, 菌体生长旺盛, γ -PGA 开始积累; 30 h 后菌体生长量趋于稳定, γ -PGA 则继续积累, 发酵 50 h 时糖耗尽, 菌体进入衰亡期, γ -PGA 产量最高达 26 g/L。摇瓶发酵过程的研究将为后来的罐上发酵条件的优化和放大提供借鉴和指导。

2.4 γ -PGA 分子量与多分散系数的测定

采用 GPC 法对 PGS-1 合成的 γ -PGA 分子量特性进行了研究: 取对数生长期晚期(30 h)和稳定期(48 h)的发酵提取产物, 分别测定其分子量与多分散系数(重均分子量 M_w /数均分子量 M_n)。实验结果(图 6)表明 PGS-1 合成的 γ -PGA 出峰时间明显滞后于标准品 γ -PGA (1×10^6 kD), 发酵 30 h 时, γ -PGA 分子量为 4×10^5 kD; 发酵 48 h 时, γ -PGA 分子量为 3×10^5 kD; 分子量的多分散系数均分布在 1.3~2.0 之间。与大多文献报道的微生物合成的 γ -PGA 相比^[1-4], PGS-1 合成的 γ -PGA 分子量较低, 分子量分布较窄, 因此可适用于低分子量和窄分布要求的医药、化妆品和水处理剂等应用领域。

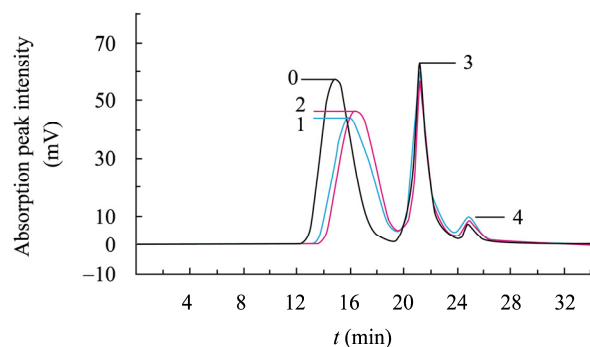


图 6 GPC 检测图谱

Fig. 6 Determination of γ -PGA by GPC

注: 0: γ -PGA 标准品; 1: 发酵产物 48 h; 2: 发酵产物 30 h; 3: 盐; 4: 杂质峰.

Note: 0: Standard γ -PGA; 1: Culture product of 30 h; 2: Culture product of 48 h; 3: Salt; 4: Impurity.

3 小结

从土壤中筛选得到一株 γ -PGA 高产菌株 PGS-1, 经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 摇瓶发酵产量达 26 g/L. 该菌株合成的 γ -PGA 分子量仅为 3×10^5 – 5×10^5 kD, 低于大多文献报道的生物合成的 γ -PGA, 且分子量分布较窄(其多分散系数为 1.3–2.0), 因此极具应用开发价值. 后续将进行系统的培养条件优化以及罐上扩大培养等方面的研究. 此外, 如何实现发酵过程 γ -PGA 分子量的调控也将是今后研究的重要内容.

参 考 文 献

- [1] Shih IL, Van YT. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(3): 207–225.
- [2] Ashiuchi M, Misono H. Biopolymers[M]. Weinheim:

Wiley-VCH, 2002: 7.

- [3] 徐虹, 欧阳平凯. 生物高分子[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 18–96.
- [4] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(7): 1031–1035.
- [5] Oppermann FB, Pickartz S, Steinbuechel A. Biodegradation of polyamides[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1/3): 337–344.
- [6] Pérez-Camero G, Congregado F, Bou JJ, et al. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(γ -glutamic acid)[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 63(1): 110–115.
- [7] Kubota H, Nambu Y, Endo T. Alkaline hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism[J]. Journal of Polymer Science part A: Polymer Chemistry, 1996, 34(7): 1347–1351.
- [8] 佟盟, 徐虹, 王军. γ -聚谷氨酸降解影响因素及其生物降解性能的研究[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(1): 50–53.
- [9] 梁金丰, 徐虹, 姚俊, 等. γ -聚谷氨酸提取的发酵液预处理及分离纯化工艺[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(3): 6–11.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349–399.
- [11] Xu H, Jiang M, Li H, et al. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 519–523.
- [12] Yao J, Xu H, Wang J, et al. Removal of Cr(III), Ni(II) and Cu(II) by poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Journal of Biomaterial Science Polymer Edition, 2007, 18(2): 193–204.
- [13] 中本一雄. 无机和配位化合物的红外和拉曼光谱[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991: 256.