

# 聚 $\gamma$ -谷氨酸高产菌的选育与培养基优化

吴学超 曹新江 冀志霞 陈守文\*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘要:** 利用合成培养基为筛选培养基, 以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B6-1 为出发菌株, 经过三轮紫外线诱变和一轮硫酸二乙酯诱变得到了聚  $\gamma$ -谷氨酸高产突变株枯草芽孢杆菌 W003, 摇瓶液体发酵的聚  $\gamma$ -谷氨酸产量由出发菌株的 10.9 g/L 提高到 20.5 g/L。单因素实验结果表明, 该菌产聚  $\gamma$ -谷氨酸的合适碳源为葡萄糖, 氮源为硫酸铵。通过正交实验得到了优化的培养基配方, 经 36 h 液体发酵, 聚  $\gamma$ -谷氨酸产量可达到 45.3 g/L。

**关键词:** 聚  $\gamma$ -谷氨酸, 枯草芽孢杆菌, 诱变, 培养基, 优化

## Screening of Poly- $\gamma$ -glutamic Acid High Productive Strain and Optimization of Fermentation Medium

WU Xue-Chao CAO Xin-Jiang JI Zhi-Xia CHEN Shou-Wen\*

(Huazhong Agricultural University, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070)

**Abstract:** *Bacillus subtilis* B6-1 was used as an original strain for mutagenic treatment and a defined medium was used as the selective medium. A mutant named *B. subtilis* W003 was isolated after three serial ultraviolet (UV) irradiations and one diethyl sulfate (DES) treatment. The  $\gamma$ -PGA yield on a rotary shaker was enhanced from 10.9 g/L in parental strain to 20.5 g/L in the mutant. It was illustrated by single factor experiments that the optimal carbon and nitrogen sources were glucose and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  respectively. The optimal fermentation medium was achieved by orthogonal test. In the optimal medium, a  $\gamma$ -PGA yield of 45.3 g/L was obtained after 36 h cultivation.

**Keywords:** Poly- $\gamma$ -glutamic acid, *Bacillus subtilis*, Mutation, Fermentation medium, Optimization

聚  $\gamma$ -谷氨酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是由微生物合成的胞外氨基酸聚合物, 由 D 型和 L 型谷氨酸通过  $\gamma$ -酰胺键连接而成, 在每一个重复单元的  $\alpha$ -碳原子上还有一个游离的羧基<sup>[1]</sup>。 $\gamma$ -PGA 通常由 5000 个左右的单体组成, 相对分子质量一般在 100 kD~1000 kD<sup>[2]</sup>。 $\gamma$ -PGA 特殊的化学结构以及许多优良的性质赋予了其多种功能特性, 它可以作为

药物载体、食品增稠剂、矿物营养促进吸收剂、保水剂以及絮凝剂等, 可以广泛地应用于医药、食品、轻化工、环保和农业等领域。

$\gamma$ -PGA 的发酵培养基主要包括碳源、氮源和无机盐, 大多菌株还需要加入  $\gamma$ -PGA 合成的前体物谷氨酸或柠檬酸。在迄今报道的  $\gamma$ -PGA 高产发酵案例中, 部分案例选用的碳源为高成本的蔗糖<sup>[3]</sup>和甘油<sup>[4]</sup>

等;选用的氮源大多是有机氮源,如蛋白胨<sup>[3]</sup>、牛肉膏<sup>[5]</sup>、酱汁<sup>[6]</sup>等,导致原料成本高昂,并且有机物质杂质多,不利于 $\gamma$ -PGA提取制备。

要实现 $\gamma$ -PGA的商业化生产,必须有高生产效率和低原料生产成本。本研究以合成培养基为出发培养基,以期得到一株能利用此类低廉培养基的 $\gamma$ -PGA高产菌株,同时优化其发酵条件,为 $\gamma$ -PGA的高效生产奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种:枯草芽孢杆菌 B6-1(本实验室筛选和保藏)。

1.1.2 培养基:(1)斜面培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母抽提物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20, pH 7.2~7.4。(2)平皿筛选培养基:葡萄糖 30, L-谷氨酸钠 20, 柠檬酸钠 12,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  7,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2, 琼脂 20, pH 7.4。(3)种子培养基(g/L):蛋白胨 10.0, 酵母抽提物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2~7.4。(4)发酵培养基(g/L):葡萄糖 80, L-谷氨酸钠 20, 柠檬酸钠 12,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  7,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2, pH 7.4。

1.1.3 培养条件:(1)菌种活化:接一环新鲜的菌种至斜面培养基中, 37℃ 培养 16 h。(2)种子培养:250 mL 三角瓶装液量 50 mL, 置于摇床上, 200 r/min、37℃ 培养 10 h。(3)发酵培养:接种量 3%, 500 mL 三角瓶装液量 70 mL, 200 r/min、37℃ 培养 36 h。

1.1.4 主要仪器与试剂:紫外灯, 飞利浦公司;硫酸二乙酯, 瑞士 Fluka 公司;Agilent 1200 series 液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司。

### 1.2 方法

1.2.1 诱变育种:1) 紫外线(UV)诱变:取 5 mL 浓度为  $10^6$  CFU/mL 的细胞菌悬液置于平皿内, 搅拌照射不同时间(紫外灯功率为 15 W, 照射距离为 30 cm), 将处理后的菌悬液适当稀释后涂平板, 37℃ 避光培养 24 h, 计算致死率。2) 硫酸二乙酯(DES)诱变:取 10 mL 浓度为  $10^6$  CFU/mL 的细胞菌悬液, 加入 0.1 mL DES 溶液(DES 的终浓度为 1%,  $V/V$ )振荡处理不同时间, 用 0.5 mL 25%硫代硫酸钠溶液终止反应, 立即稀释适当倍数后涂平板, 37℃ 培养

24 h, 计算致死率。

1.2.2 突变株筛选:每次诱变处理后, 挑选光滑、黏稠和有明显拉丝的单菌落进行摇瓶发酵复筛, 复筛条件为:37℃、200 r/min 培养 36 h。测定发酵液的 $\gamma$ -PGA含量, 筛选高产的突变株。

1.2.3 传代稳定性实验:将筛选到的 $\gamma$ -PGA高产菌株在斜面培养基上连续传代 10 次, 每两代进行一次摇瓶液体发酵, 测定 $\gamma$ -PGA的生产性能。

1.2.4 致死率计算:致死率(%)=(1-诱变后活菌数 CFU/mL/诱变前活菌数 CFU/mL)×100。

1.2.5  $\gamma$ -PGA 含量的测定:将一定体积的去菌体的发酵液加至水解管中, 加入等体积的浓盐酸, 真空条件下 110℃ 水解 24 h, 水解完毕后用 NaOH 调 pH 至中性, 然后将水解液定容至一定体积, 用高效液相法测定水解液中谷氨酸浓度。通过水解前后发酵液中谷氨酸含量的差值计算 $\gamma$ -PGA含量。

高效液相法测定谷氨酸:待检测的样品经 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤后用 Agilent 液相色谱仪检测(色谱柱为 Lichrospher  $\text{C}_{18}$ , 规格:25 cm×4.6 mm), 检测波长 210 nm, 流动相为 100 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  加 5.0%甲醇(用磷酸调 pH 值至 2.5), 流速 1.0 mL/min。

$\gamma$ -PGA 浓度=(水解后谷氨酸浓度 - 水解前谷氨酸浓度)×129/147。

1.2.6 菌体干重(Dry cell weight, DCW)的测定:取一定体积的发酵液, 用浓盐酸调 pH 至 3.0 以下, 10000 r/min 离心 10 min, 用蒸馏水洗涤沉淀 2 次, 然后将其置于烘箱中 95℃ 烘干至恒重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 枯草芽孢杆菌 B6-1 的选育

2.1.1 紫外线照射时间的选择:以枯草芽孢杆菌 B6-1 为出发菌株, 分别紫外线诱变 30 s、45 s、60 s、75 s、90 s、105 s、120 s, 菌体致死率与照射时间的关系如图 1 所示, 照射时间为 120 s 时, 致死率达到 98.5%。进行紫外线诱变时, 较低的致死率有利于正突变的产生, 并且紫外线诱变后还需进行几次诱变育种, 因此选择致死率为 76.9%的 60 s 为紫外线诱变的照射时间。

2.1.2 DES 处理时间的选择:图 2 为不同的 DES 处理时间与菌体致死率的关系曲线, 结果显示处理时间为 30 min 时, 致死率为 74.5%。选择 30 min 为 DES 诱变的处理时间。

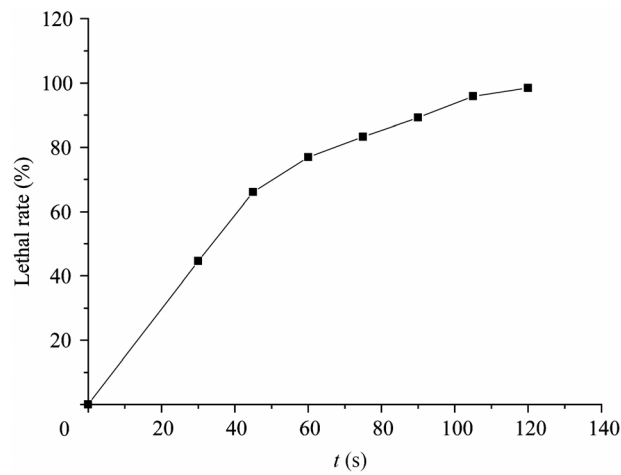


图1 紫外线照射时间对菌株致死率的影响

Fig. 1 The effect of UV irradiation time on the lethal rate of strains

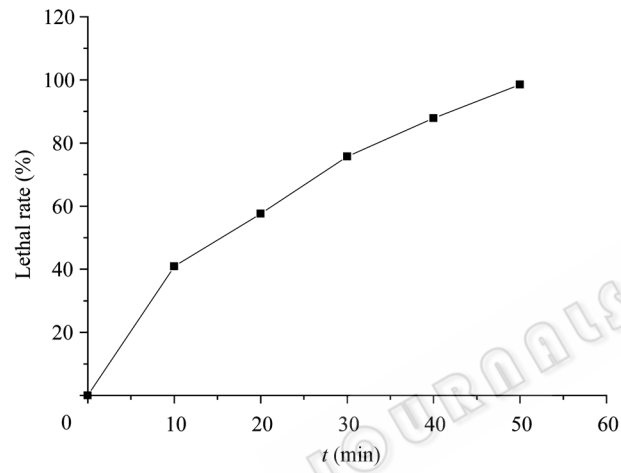


图2 硫酸二乙酯诱变时间对菌株致死率的影响

Fig. 2 The effect of the time of DES treatment on the lethal rate of strains

2.1.3 诱变方案：表1为  $\gamma$ -PGA 产生菌的诱变方案图，枯草芽孢杆菌 B6-1 经过三轮紫外线诱变和一轮 DES 处理，选育出一株  $\gamma$ -PGA 高产突变株枯草芽孢杆菌 W003，产  $\gamma$ -PGA 的能力提高了 88.1%。

表 1 $\gamma$ -PGA 产生菌的诱变方案			
Table 1 The mutation process of $\gamma$ -PGA producer			
菌株	诱变剂	$\gamma$ -PGA (g/L)	产量提高率(%)
Strain	Mutagenic agent		Enhancement of yield (%)
B6-1↓		10.9	0
I 9↓	UV	14.3	31.2
II 6↓	UV	16.1	47.8
III 7↓	UV	17.5	60.6
W003	DES	20.5	88.1

2.1.4 突变株的传代稳定性：将枯草芽孢杆菌 W003 连续传代 10 次，每两代进行一次摇瓶液体发酵，测定  $\gamma$ -PGA 产量，每次 3 个重复。表 2 多重比较结果显示枯草芽孢杆菌 W003 前 8 代  $\gamma$ -PGA 产量之间的差异均未达到  $\alpha=5\%$ 水平上的显著， $\gamma$ -PGA 生产性能无明显的下降，遗传性能稳定，因此可以作为  $\gamma$ -PGA 生产的菌株。

表 2 枯草芽孢杆菌 W003 的遗传稳定性		
Table 2 The genetic stability of <i>B. subtilis</i> W003		
传代次数	$\gamma$ -PGA (g/L)	差异显著性
Generation		Difference significance
0	20.7 ± 0.8	ab
2	21.1 ± 1.1	a
4	20.5 ± 0.7	ab
6	20.4 ± 1.3	ab
8	19.8 ± 0.5	ab
10	18.3 ± 1.5	b

注：差异显著水平( $\alpha>5\%$ )

Note: The level of difference significance ( $\alpha > 5\%$ )

2.2 培养基优化

2.2.1 碳源选择：分别选用 60 g/L 和 80 g/L 两种浓度的葡萄糖、蔗糖和甘油作为碳源，发酵结果表明(见表 3)：甘油和葡萄糖是  $\gamma$ -PGA 合成较合适的碳源，并且高浓度的葡萄糖、蔗糖和甘油均对菌体生长有一定的抑制作用。

表 3 不同碳源对 $\gamma$ -PGA 发酵的影响		
Table 3 The effect of various carbon sources on $\gamma$ -PGA production		
碳源	DCW (g/L)	$\gamma$ -PGA (g/L)
Carbon source (g/L)		
Glucose (60)	2.71	15.6
Glucose (80)	2.25	22.9
Sucrose (60)	1.94	11.5
Sucrose (80)	0.99	11.8
Glycerol (60)	1.56	16.7
Glycerol (80)	1.23	20.5

2.2.2 氮源选择：以 80 g/L 葡萄糖作为碳源，考察了不同氮源对  $\gamma$ -PGA 发酵的影响。从表 4 可知铵盐更适合  $\gamma$ -PGA 的合成；有机氮源以及硫酸铵和有机氮源的组合更适合菌体的生长，但是其  $\gamma$ -PGA 产量较低。

2.2.3 前体物—谷氨酸钠浓度的优化：分别以 80 g/L 葡萄糖和 8.6 g/L 硫酸铵作为碳源和氮源，考

察了不同谷氨酸钠浓度对  $\gamma$ -PGA 发酵的影响。从表 5 可以看出高浓度的谷氨酸钠抑制菌体的生长,但是有利于  $\gamma$ -PGA 的合成;同时,随着谷氨酸钠浓度的增加,表观转化率降低。

表 4 氮源对 $\gamma$ -PGA 发酵的影响 Table 4 The effect of various nitrogen sources on $\gamma$ -PGA production		
氮源 Nitrogen source (g/L)	DCW (g/L)	$\gamma$ -PGA (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (8.6)	2.91	31.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (4.9)	2.28	23.0
NH <sub>4</sub> Cl (10)	1.27	18.0
NH <sub>4</sub> Cl (4)	1.87	20.5
Urea (4.1)	2.15	19.9
Urea (2.3)	3.09	24.4
Peptone (13.0)	5.05	9.3
Peptone (7.0)	6.03	14.4
Yeast extract (13.0)	3.92	9.1
Yeast extract (7.0)	3.14	7.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (4.9) + peptone (7.0)	4.33	22.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (4.9) + Yeast extract (7.0)	3.74	24.5

表 5 谷氨酸钠浓度对 $\gamma$ -PGA 发酵的影响 Table 5 The effect of the concentration of sodium glutamate on $\gamma$ -PGA production			
谷氨酸钠 Sodium glutamate (g/L)	DCW (g/L)	$\gamma$ -PGA (g/L)	表观转化率 (%) Apparent conversion rate (%)
10	2.78	23.7	237.0
20	2.88	30.5	156.0
30	2.65	36.1	120.3
45	2.47	38.0	86.7
60	2.10	43.8	71.3
70	1.87	44.3	63.3
80	1.35	46.3	57.9

注：表观转化率= $\gamma$ -PGA 浓度/培养基中谷氨酸钠浓度  
Note: Apparent conversion rate was defined as the ratio of  $\gamma$ -PGA concentration to the amount of sodium glutamate added in the medium

2.2.4 碳氮源以及前体物浓度的正交设计：结合上述单因素实验结果，设计了葡萄糖、谷氨酸钠、柠檬酸钠和硫酸铵的四因素三水平的正交实验，其因素水平及实验结果分别见表 6 和 7。

从表 7  $\gamma$ -PGA 的 K 值和级差 R 大小可知：影响  $\gamma$ -PGA 产量的主次顺序为 A>B>C>D，即葡萄糖>谷氨酸钠>柠檬酸钠>硫酸铵。因此，产  $\gamma$ -PGA 的最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>，即本实验得到的优化配方

为(g/L)：葡萄糖 80、谷氨酸钠 60、柠檬酸钠 10、硫酸铵 8.6。表 8 菌体干重的 K\*值和级差 R\*大小表明：影响生物量的主次顺序也为 A>B>C>D，但是生物量的最佳组合为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>，即较低的碳氮源和前体物浓度适合菌体的生长。前面单因素实验结果已经证明了高浓度的葡萄糖和谷氨酸钠均对菌体生长有较大的抑制作用，因此，可以知道  $\gamma$ -PGA 发酵的最佳营养条件是在菌体生长受到抑制的情况下取得的，这可能是因为不良的生长环境有利于  $\gamma$ -PGA 的合成。

表 6 正交实验因素水平 Table 6 Factors and their levels employed in orthogonal test			
因素 Factor	水平 Level (g/L)		
	1	2	3
Glucose (A)	60	80	100
Sodium glutamate (B)	45	60	75
Sodium citrate (C)	6	10	14
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (D)	4.3	8.6	12.9

表 7 正交实验结果及极差分析 Table 7 Results of orthogonal test and the analysis of range								
序号 Tests	因素 Factor				DCW (g/L)	$\gamma$ -PGA (g/L)		
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	2.96	27.6	26.7	29.7
2	1	2	2	2	2.54	42.5	46.3	38.7
3	1	3	3	3	1.79	36.3	33.7	33.5
4	2	1	2	3	2.41	42.7	42.9	37.7
5	2	2	3	1	2.07	38.6	38.3	42.2
6	2	3	1	2	1.70	44.8	41.6	36.0
7	3	1	3	2	1.45	24.3	20.7	19.8
8	3	2	1	3	1.65	25.9	29.6	24.0
9	3	3	2	1	1.03	30.7	30.7	28.0
$\gamma$ -PGA (g/L)	K <sub>1</sub>	35.00	30.23	31.77	32.50	产 $\gamma$ -PGA 的最佳组合为 A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>		
	K <sub>2</sub>	40.53	36.23	37.80	34.97			
	K <sub>3</sub>	25.97	35.03	31.93	34.03			
	R	14.57	6.50	6.03	2.47			
	K <sub>1</sub> *	2.43	2.27	2.10	2.02			
DCW (g/L)	K <sub>2</sub> *	2.06	2.09	1.99	1.90	生物量的最佳组合 A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>		
	K <sub>3</sub> *	1.38	1.51	1.77	1.95			
	R*	1.05	0.76	0.33	0.12			

利用本实验得到的优化碳氮源和前体物组合(其他成分同出发培养基)，摇瓶液体发酵 36 h，

$\gamma$ -PGA 产量为 45.3 g/L。

### 3 结论

本研究以合成培养基为筛选培养基, 通过三轮紫外线诱变和一轮 DES 处理, 得到了一株  $\gamma$ -PGA 高产突变株枯草芽孢杆菌 W003, 其产量比出发菌株提高了 88.1%。实验结果表明, 枯草芽孢杆菌 W003 产  $\gamma$ -PGA 的合适碳氮源分别为葡萄糖和硫酸铵。在单因素实验结果的基础上, 进行了碳氮源和前体物的四因素三水平的正交设计, 得到了产  $\gamma$ -PGA 的优化配方为(g/L): 葡萄糖 80, 谷氨酸钠 60, 柠檬酸钠 10, 硫酸铵 8.6。利用此配方, 经过 36 h 发酵,  $\gamma$ -PGA 产量高达 45.3 g/L, 比优化前提高了 121.0%。

### 参 考 文 献

[1] 梁金钟, 李艳华, 范洪臣. 玉米原料高产  $\gamma$ -聚谷氨酸优

良菌株的选育及发酵条件优化. 中国生物工程学报, 2007, 27(12): 46–51.

[2] 施庆珊, 李诚斌, 王春华, 等. 一种不需要谷氨酸的产聚  $\gamma$ -谷氨酸的筛选和鉴定. 微生物学通报, 2007, 34(2): 307–311.

[3] Shi F, Xu ZN, Cen PL. Efficient production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2006, 133: 271–281.

[4] Cromwick AM, Birrer G, Gross R. Effects of pH and aeration on  $\gamma$ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnology Bioengineering*, 1996, 50: 222–227.

[5] Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, et al. Production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1993, 57: 1212–1213.

[6] Shih IL, Van YT. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various application. *Biore-source Technology*, 2001, 79: 207–225.

稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t$  (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: 20 cm  $\times$  0.3 cm, 不能写成 20  $\times$  0.3 cm; 3°C~5°C 不可写成 3~5°C; 3%~6%不可写成 3~6%等。

文中的数值和单位之间应加一个空格, 除了%和°C。