

## $\gamma$ -多聚谷氨酸的性质、发酵生产及其应用

陈咏竹 孙启玲\*

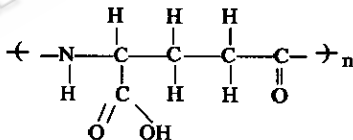
(四川大学生命科学学院 成都 610064)

**摘要:**系统地介绍了 $\gamma$ -多聚谷氨酸这种水溶性生物可降解的阴离子物质的基本性质、发酵生产方法及其在工业上的潜在应用,揭示了这种新型高分子氨基酸聚合物具有极其广泛的经济效益和开发价值。

**关键词:**  $\gamma$ -多聚谷氨酸, 生物可降解性, 生物合成, 应用

中图分类号: 093 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 01-0122-05

$\gamma$ -多聚谷氨酸[ $\gamma$ -Poly (glutamic acid),  $\gamma$ -PGA]是由微生物合成的一种细胞外高分子氨基酸聚合物。 $\gamma$ -多聚谷氨酸(以下简称  $\gamma$ -PGA)这种阴离子物质是由 L-谷氨酸和/或 D-谷氨酸单体之间通过  $\alpha$ -氨基和  $\gamma$ -羧基形成肽键之后生成的同聚酰胺。其结构式如下:



1937 年 Ivānovics 等首次发现了  $\gamma$ -PGA, 而自从 1942 年 Bovarnick 发现  $\gamma$ -PGA 作为一种发酵产物能自由地分泌到枯草芽孢杆菌的生长培养基中后, 人们发现多种芽孢杆菌

\* 联系人

收稿日期：2003-04-21，修回日期：2003-07-25

都能在胞外产生  $\gamma$ -PGA<sup>[1]</sup>。 $\gamma$ -PGA 具有极佳的成膜性、成纤维性、阻氧性、可塑性、粘结性、保湿性和可生物降解等独特的理化和生物学特性,因而具有增稠、乳化、凝胶、成膜、保湿和粘接等功能,是一种对人体和环境无毒害的生物相溶性新型天然高分子。在研究初期,对  $\gamma$ -PGA 的研究主要集中在美国和日本,他们在 20 世纪 90 年代初开展了一些利用深层发酵生产  $\gamma$ -PGA 的研究。而我国近几年才注意到了  $\gamma$ -PGA 的重要性,可见  $\gamma$ -PGA 作为一种有着广泛用途的新型物质还有着极大的研究价值。

## 1 $\gamma$ -多聚谷氨酸的性质与生物合成

**1.1  $\gamma$ -PGA 的性质** 分子量和多分散性是  $\gamma$ -PGA 的重要特征参数,Shih 等<sup>[1]</sup>对  $\gamma$ -PGA 分子量的控制进行了专门的研究。一般而言,由芽孢杆菌产生的  $\gamma$ -PGA 的平均分子量 ( $\overline{M}_w$ ) 在  $10^5 \sim 8 \times 10^6$  之间,而多分散性在 2~5 之间。分子量越大,其流变性越难控制也很难被化学试剂修饰,从而限制了  $\gamma$ -PGA 的应用。目前已采用碱水解、超声波降解、微生物降解或酶降解以及改变培养基成分等方法来得到不同分子量的 PGA。Birrner 等人<sup>[2]</sup>提高了培养基 E 中 NaCl 的含量,用 *B. licheniformis* ATCC9945A 获得了分子量相对很高的  $\gamma$ -PGA。因此笔者认为改变培养基的离子强度的方法将最终成为  $\gamma$ -PGA 分子量控制的一种策略。杨革等<sup>[3]</sup>研究了聚  $\gamma$ -谷氨酸水溶液的流变性能,认为  $\gamma$ -PGA 溶液是非牛顿剪切变稀的假塑性流体,具有典型的幂律性,其粘度随温度的升高而呈现出下降态势。 $\gamma$ -PGA 易溶于水形成有粘弹性的弱凝胶,但长时间的高温加热或酸、碱处理,以及添加一定量的某些金属盐会破坏  $\gamma$ -PGA 形成的凝胶网络结构,甚至使  $\gamma$ -PGA 的粘弹性完全丧失。Goto 等<sup>[4]</sup>通过监测 PGA 随时间变化的分子量,研究了 80℃、100℃ 和 120℃ 下 PGA 在水溶液中的水解模型。最终认为平均分子量的倒数 ( $1/\overline{M}_n$ ) 和水解时间在 3 个温度下,都分别呈线性关系。这个结果说明,水溶液中 PGA 的水解可通过加热的方式使多肽链随机断裂。

**1.2  $\gamma$ -PGA 生物合成的相关酶** 研究  $\gamma$ -PGA 的合成发现 PGA 的产生可能是由一对复合酶系统完成的<sup>[5]</sup>。但  $\gamma$ -PGA 的合成机制至今尚未弄清,因此,在众多文献中仍存在着许多争议,也可能说明不同的菌株形成  $\gamma$ -PGA 的酶系统不同。Ogawa 等报道过一种转谷氨酸酶,它与 *Bacillus subtilis* NR-1 产 PGA 有关。但是 Gardner 等也曾报道过转谷氨酸酶与 *B. licheniformis* 产生 PGA 无关。他们发现与膜结合的 PGA 合成酶复合体能催化 L-谷氨酸聚合形成 PGA<sup>[5]</sup>。Kunioka<sup>[6]</sup>研究了枯草芽孢杆菌 IF03335 合成 PGA 的过程后认为由 2-氧化谷氨酸形成 L-谷氨酸的途径是利用谷氨酰胺合成酶 (GS) 和 2-氧化谷氨酸转氨酶 (GOGAT) 来完成的。研究表明<sup>[6]</sup> *B. anthracis* 合成的 PGA 仅由 D-谷氨酸构成。由(纳豆)枯草芽孢杆菌产生的 PGA 则含有大量的 D, L-谷氨酸, D-型占 50%~80% 而 L-型占 20%~50%。而 *B. licheniformis* 则产生了多种立体化学结构的 PGA, D-型同分异构体的比例从 10%~100% 不等。曾经认为在枯草芽孢杆菌的 D-谷氨酸合成中有一种 D-氨基酸转氨酶导致 L-谷氨酸形成 D-谷氨酸,但经 Ashiuchi 和 Kunioka 等<sup>[6]</sup>研究发现, D-氨基酸转氨酶并不参与枯草芽孢杆菌合成 PGA 的 D-谷氨酸的形成,而菌体中一种有高度活性的谷氨酸消旋酶可能是提供 D-谷氨酸合成 PGA 的酶。

## 2 $\gamma$ -多聚谷氨酸的产生菌及诱变育种

**2.1  $\gamma$ -PGA 的产生菌** 据文献报道,  $\gamma$ -PGA 的生产菌主要是芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的

菌株,包括各种(纳豆)枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[4,5,7]</sup>、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)<sup>[2,8]</sup>、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)<sup>[6]</sup>。

**2.2  $\gamma$ -PGA 的产生菌诱变育种**  $\gamma$ -PGA 的诱变育种可采用传统的物理、化学的诱变手段,例如紫外线照射、亚硝基胍诱变等。杨革等<sup>[9]</sup>提到应用 He-Ne 激光对 *Bacillus licheniformis* AACC 9945A 进行辐射处理,初步筛选到产  $\gamma$ -PGA 含量有较大变化的辐射变异菌株。虽然对 PGA 的酶合成系统的反应机制已研究了很长时期,但目前为止仍未达成共识<sup>[2,5,6]</sup>。Makino 等<sup>[5]</sup>证实 *B. anthracis* 的 *cap* BCA 基因与  $\gamma$ -PGA 的产生有关,这些基因位于质粒上而不在染色体上。但 Nagai 等人发现质粒并不编码  $\gamma$ -PGA 生产所需的基因。因此,他们提出  $\gamma$ -PGA 的基因可能存在于 *B. subtilis* (*natto*) 的基因组 DNA 上<sup>[1]</sup>。研究人员用 *B. subtilis* *Chung kook jang* 细胞建立了一个 *pgs* BCA 基因缺损菌株,这种 *pgs* 无效的突变株在任何条件下都不能产生 PGA<sup>[5]</sup>。Hara 等用形质转换的方法使 PGA 产生能力高的 *B. natto* *asahikawa* 的遗传性质高频率地转移到无 PGA 产生能力 *B. subtilis* Marburg 168 菌株中产生了大量的 PGA<sup>[1]</sup>。因此我们认为与传统的诱变育种相比,新兴的基因工程手段有望成为  $\gamma$ -PGA 高产菌株的有效改造方式。

### 3 $\gamma$ -多聚谷氨酸的发酵生产

**3.1 碳源等营养因素对  $\gamma$ -PGA 发酵生产的影响** PGA 生产菌所需的碳源约是所合成的 PGA 总量的 2~20 倍。Goto 等<sup>[4]</sup>研究  $\gamma$ -PGA 生产的多种碳源,发现只有在谷氨酸培养基中添加柠檬酸作为碳源,才有利于 *B. subtilis* IFO3335 生产 PGA,而葡萄糖和乙酸等其它碳源都不利于 PGA 的生成。同样杨革<sup>[10]</sup>利用 *B. licheniform* WBL-3 发酵生产  $\gamma$ -PGA 时也提到柠檬酸、甘油是最适碳源,而其它成分都不利于  $\gamma$ -PGA 的合成。但 Cheng 等人研究了 *B. licheniformis* A35 生产  $\gamma$ -PGA 的碳源,发现葡萄糖等六碳糖作为碳源时有较高的产量,而当有机酸作为碳源时却不能产生 PGA<sup>[5]</sup>。因此相比较而言,笔者认为柠檬酸是大部分 PGA 生产菌的最适碳源。L-谷氨酸:根据营养需求的不同,可将 PGA 生产菌分为两大类:一类是需在培养基中添加 L-谷氨酸以刺激细胞生长和  $\gamma$ -PGA 的形成,另一类则不需要 L-谷氨酸。但文献中报道得最多的仍然是以 L-谷氨酸依赖菌作为生产实用菌。Kunioka<sup>[11]</sup>以谷氨酸依赖菌 *B. subtilis* IFO3335 生产  $\gamma$ -PGA,用少量的 L-谷氨酰胺来代替 L-谷氨酸,形成了大量没有任何多糖副产品的  $\gamma$ -PGA。此外,Goto 等<sup>[4]</sup>认为 PGA 中的谷氨酸单体主要来源于柠檬酸和硫酸铵,而培养基中添加的谷氨酸仅起到激活合成 PGA 的一系列酶的作用。金属离子:杨革等人<sup>[12]</sup>研究了培养基中金属离子对菌体生长以及对  $\gamma$ -PGA 合成及其结构组成的调控作用。结果表明, $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  是地衣芽孢杆菌的必需营养物质,而  $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等离子对  $\gamma$ -PGA 合成酶系都有着极其重要的影响。此外  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  还能提高  $\gamma$ -PGA 中 D-谷氨酸的含量。以往的文献报道中还存在着一个争议,即  $Mn^{2+}$  离子的浓度变化是否能调整 *B. licheniformis* 9945A 所形成的  $\gamma$ -PGA 的立体化学结构,因为它可能控制着专一性很强的 D-和 L-多肽合成酶系统。经研究表明,随着  $Mn^{2+}$  离子浓度的增加,D-谷氨酸含量不断增加<sup>[2,10]</sup>。但另一方面,据报道 *B. subtilis* 5E 产的  $\gamma$ -PGA 的立体化学结构却不会随着培养基中  $Mn^{2+}$  浓度和其他组分的变化而变化<sup>[6]</sup>。

**3.2  $\gamma$ -PGA 的提取制备** 通过微生物发酵得到高粘度的发酵液,可用有机溶剂沉淀法、化学沉淀法和膜分离沉淀法获得  $\gamma$ -PGA。有机溶剂沉淀是指利用离心或凝聚菌体的

方法除去发酵液中的菌体,在上清液中加入低级醇类(如甲醇、乙醇)可沉淀得到 $\gamma$ -PGA,经冷冻干燥得到白色结晶。而化学沉淀是用饱和 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 溶液代替低级醇类盐析沉淀 $\gamma$ -PGA。对高粘度的发酵液还可采取膜分离沉淀法。经干燥得到白色结晶仅是粗制 $\gamma$ -PGA,将其溶解于蒸馏水中后,离心除去不溶解的杂质,然后采用透析或电透析除盐的方法得到PGA的水溶液,经低压冻干后,即可得精制PGA<sup>[4,8,11]</sup>。

## 4 $\gamma$ -PGA 的应用

$\gamma$ -PGA 由于其独特的理化和生物学特性,被广泛用于医药制造,食品加工,蔬菜、水果、海产品防冻、保鲜,化妆品工业,烟草、皮革制造工业和植物种子保护等许多领域,具有极大开发价值和应用前景。

**4.1  $\gamma$ -PGA 水凝胶** Kunioka 等<sup>[11]</sup>发现PGA的水溶液经 $\gamma$ -线照射可制得PGA水凝胶。该水凝胶对水有很强的吸附作用,其吸水总量相当于自身重量的200~3500倍,且具有生物可降解性,并可在100℃高温下被降解。水凝胶可作为植入体用在药物释放上。此外日本九州大学的农学家还提出了利用PGA水凝胶来帮助绿化沙漠的设想。

**4.2  $\gamma$ -PGA 絮凝剂** 近来发现*B. licheniformis* CCRC12826, *B. subtilis* PY-90 和 *B. subtilis* IF03335 产生的 $\gamma$ -PGA 都有很高的絮凝活性。传统的有机人工多聚体絮凝剂很难被生物降解,而有些物质降解后的单体(如:丙烯酰胺)有神经毒性甚至是强烈的人体致癌物,其广泛应用必然带来一些环境和健康问题<sup>[1]</sup>。因此 $\gamma$ -PGA 作为生物多聚物絮凝剂十分有利于废水处理和饮用水处理以及食品、发酵工业的下游工艺。

**4.3  $\gamma$ -PGA 吸附重金属和放射性核素** 由于环境中积累的重金属和放射性核素威胁着人们的健康,因此能吸附重金属和放射性核素的物质越来越引起人们的关注。 $\gamma$ -PGA 是种阴离子物质,经研究发现其结合的金属包括: $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Cr}^{3+}$  等。Bhattacharyya 等<sup>[14]</sup>报道用廉价微生物滤膜共价连接PGA后具有很高的吸收重金属的能力。此外,以硅为基质的PGA膜的金属吸附能力已经接近以纤维素为基质的膜,并且还有优异的酸溶稳定性<sup>[1]</sup>。

**4.4  $\gamma$ -PGA 类生物医学材料**  $\gamma$ -PGA 类药物载体: $\gamma$ -PGA 作为抗肿瘤药物的载体,起到控释和提高药效的作用。多聚谷氨酸紫杉醇(PG-TXL)是通过天然紫杉醇和谷氨酸多聚体共价结合形成的,它具有极好的水溶性,因而显示出了比不溶性紫杉醇更加显著的强抗肿瘤活性<sup>[1]</sup>。彭银仙等人介绍了一种用 $\gamma$ -PGA 作为药物载体,形成活性的、相对稳定的CDDP-PGA 复合物,能有效抑制卵巢癌的生长。另外PGA可用作多柔比星(阿霉素,ADR)的载体,使白血病小鼠存活时间明显延长<sup>[15]</sup>。 $\gamma$ -PGA 类生物粘合剂: $\gamma$ -PGA 作为生物粘合剂用于控制组织的持续性渗血或密封气体和机体内液体的渗漏,也可应用于大动脉切割的修补,是一种新型、安全无害的生物胶带。最近发明了一种由猪的胶原质和多聚-L-谷氨酸制成的新型生物胶质,用于防止肺部气体泄漏方面比纤维素更加优越<sup>[1]</sup>。

**4.5  $\gamma$ -PGA 的其他应用** 研究指出 $\gamma$ -PGA 的羧基经酯化后可作为极好的热塑性塑料<sup>[1,7,11]</sup>。而 $\gamma$ -PGA 和 $\alpha$ -苯甲酯能形成纤维素和膜,具有极好的力度、透明度和弹性。此外PGA还能增加细胞内和细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 的可溶性,及肠内 $\text{Ca}^{2+}$ 的吸收,因而可作为一种治疗骨质疏松症的重要工具。此外,PGA还可作为多种环境下的适应剂,例如在碱性环境下细胞表面附近的pH中和作用,以及在极端高盐环境下能防止嗜盐菌的剧烈脱

水。由于它是一种  $\gamma$ -多聚体,因而也可保护细胞发生蛋白酶水解反应。此外,由于 PGA 有许多羧基,也适合作为一种低温防护材料<sup>[5]</sup>。目前  $\gamma$ -PGA 已作为一种食品中的苦味祛除剂以提高食品的味道和口感。含有  $\gamma$ -PGA 的芦荟、绿茶等植物萃取物能增加皮肤吡咯烷酮羧酸,以达到提高湿润效果的作用<sup>[1]</sup>。

## 5 结论

$\gamma$ -PGA 被人们了解已 70 多年了,对其已开展了很多研究。但其合成机制甚至原理仍未完全明白,在各种文献中时常存在严重的矛盾。虽然如此,人们已经了解了不同的细菌产 PGA 的机制和途径都不同。此外,  $\gamma$ -PGA 还给我们提供了关于高分子多肽和光学异构体的一些生理信息。 $\gamma$ -PGA 最令人感兴趣的就是它的水溶性、阴离子性和生物可降解性等。正是这些特性使其应用于医药、食品、塑料以及其它很多方面。并且它易于生产而且通过在发酵罐里进行细菌培养就能够得到较高的胞外物产量。同时  $\gamma$ -PGA 的发酵生产有着充裕而易得的原料,因此发展这种生态原料是既有经济价值又有环保价值的。

## 参考文献

- [1] Shih, I L, Van Y T. *Bioresource Technology*, 2001, **79**: 207 ~ 225.
- [2] Birrer G A, Cromwick A M, Gross R A. *Int J Biol Macromol*, 1994, **16**: 265 ~ 275.
- [3] 杨革, 陈坚, 曲音波, 等, 高分子学报, 2002, **3**: 345 ~ 348.
- [4] Goto A, Kunioka M. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56** (7): 1031 ~ 1035.
- [5] Ashiuchi M, Misono H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 9 ~ 14.
- [6] Kunioka M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**: 469 ~ 475.
- [7] Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, *et al.* *Biosci Biotech Biochem.*, 1993, **57**: 1212 ~ 1213.
- [8] Shih I L, Van Y T, Chang Y N. *Enzyme and Microbial Tehnology*, 2002, **31**: 213 ~ 220.
- [9] 杨革, 陈坚, 曲音波, 等, 激光生物学报, 2001, **10** (4): 255 ~ 260.
- [10] 杨革, 陈坚, 曲音波, 等, 化工学报, 2002, **53** (3): 317 ~ 320
- [11] Kunioka M. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **44**: 501 ~ 506.
- [12] 杨革, 陈坚, 曲音波, 等, 生物工程学报, 2001, **17** (6): 706 ~ 709.
- [13] Ritchie S M C, Bachas L G, Olin T, *et al.* *Langmuir*, 1999, **15**: 6346 ~ 6357.
- [14] 彭银仙, 徐虹, 陈国广, 等. 中国新药杂志, 2002, **11** (7): 515 ~ 519.

## · 论文写作要点 ·

## 论文与综述的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启发性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近五年国内外正式发表的研究论文,本刊引用文献一般限定在 15 篇以内。