

研究报告

暹罗芽孢杆菌高产 γ -聚谷氨酸的发酵条件优化林格儿¹, 刘宏², 刘海杰¹, 闫巧娟², 江正强^{*1}

1 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国农业大学工学院, 北京 100083

林格儿, 刘宏, 刘海杰, 闫巧娟, 江正强. 暹罗芽孢杆菌高产 γ -聚谷氨酸的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3335-3345

Lin Ge'er, Liu Hong, Liu Haijie, Yan Qiaojuan, Jiang Zhengqiang. Optimization of fermentation conditions for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus siamensis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3335-3345

摘要:【背景】 γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)产生菌多为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等, 而暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)相关研究较少。【目的】研究暹罗芽孢杆菌产 γ -PGA 的液体发酵条件。【方法】以自行分离的暹罗芽孢杆菌 CAU83 为出发菌株进行液体发酵, 通过单因素试验和正交试验法研究了碳氮源、前体物质、发酵温度及 pH 对菌株生产 γ -PGA 的影响。【结果】经摇瓶优化, γ -PGA 的最适碳源、氮源和前体物质分别为乳糖 30 g/L、酵母提取物 5 g/L 和 L-谷氨酸钠 60 g/L, 最适培养条件为发酵温度 37 °C 和 pH 7.0, γ -PGA 产量由 8.4 g/L 提升至 30.1 g/L, 比优化前提高了 260%。经分批补料发酵, 60 h 时 γ -PGA 产量最高为 59.5 g/L, 比摇瓶提高了 98%, 产率为 0.99 g/(L·h)。所产 γ -PGA 分子量为 3.8×10^6 Da, 聚合度较高。【结论】确定了暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的最适发酵条件, 为该菌株的工业化生产和应用提供了依据。

关键词: 暹罗芽孢杆菌; γ -聚谷氨酸; 发酵条件优化; 分批补料发酵

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0400404)

Supported by: Key Research and Development Program of China (2018YFD0400404)

*Corresponding author: E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 2021-11-30; Accepted: 2022-01-17; Published online: 2022-02-18

Optimization of fermentation conditions for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus siamensis*

LIN Ge'er¹, LIU Hong², LIU Haijie¹, YAN Qiaojuan², JIANG Zhengqiang^{*1}

¹ College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

² College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] The commonly known poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) producers are *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. licheniformis*, while little is known about *B. siamensis*. [Objective] To study liquid fermentation conditions for γ -PGA production by *B. siamensis*. [Methods] *B. siamensis* CAU83, isolated by our laboratory, was used to produce γ -PGA by liquid fermentation. The effects of carbon sources, nitrogen sources, precursors, temperature, and pH on the synthesis of γ -PGA in shake flasks were investigated by single factor test and orthogonal design. [Results] The optimal carbon source, nitrogen source, and precursor for the synthesis of γ -PGA were 30 g/L lactose, 5 g/L yeast extract, and 60 g/L L-sodium glutamate, respectively. The optimal fermentation conditions were 37 °C and pH 7.0. The yield of γ -PGA increased by 260% from 8.4 g/L before optimization to 30.1 g/L after optimization. The fed-batch fermentation showed the peak yield (59.5 g/L) of γ -PGA at the time point of 60 h, with a productivity of 0.99 g/(L·h), which increased by 98% compared with the yield in shake flasks. The produced γ -PGA had a molecular weight of 3.8×10^6 Da and a high polymerization degree. [Conclusion] The optimal fermentation conditions for *B. siamensis* CAU83 producing γ -PGA determined in this study provide a basis for the industrial production and application of this strain.

Keywords: *Bacillus siamensis*; γ -PGA; optimization of fermentation conditions; fed-batch fermentation

γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)是一种由微生物合成的天然高聚物,由D型谷氨酸和L型谷氨酸单体按不同比例通过 γ -酰胺键连接而成^[1]。1937年,Ivanovics和Bruckner首次从炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)荚膜中分离提取得到胞外多肽 γ -PGA,后来发现 γ -PGA也可以由枯草芽孢杆菌分泌到生长介质中作为发酵的产物^[2]。它是一种绿色新型环保材料,分子量大小在 1×10^4 – 1×10^7 Da之间,而且不同分子量的 γ -PGA可以制成不同的生物制品^[1]。因其具有水溶性、可塑性、高吸附性、生物可降解性等特性,被广泛应用于食品、农业、化妆品、生物医药等行业^[3-8]。

国内外已对 γ -PGA开展了很多工作,主要研究微生物发酵法和基因工程手段改造菌株或改

变代谢途径^[9-13]。相关调控基因多且复杂、代谢途径及网络尚不完善等问题制约了在分子生物学层面面对 γ -PGA的研究。微生物发酵法条件温和,易于控制,合成流程短,易大规模化生产。截至目前,大多数 γ -PGA生产菌为芽孢杆菌属^[14-16]。Li等^[17]利用酵母糖蜜发酵废水加工成的富里酸粉作为贝莱斯芽孢杆菌GJ11合成 γ -PGA的廉价原料,减少了培养基中柠檬酸钠和谷氨酸钠的用量, γ -PGA最大产量为42 g/L;Qiu等^[18]以菊粉粗提物作为原料,通过培养基优化和分批补料液体发酵,解淀粉芽孢杆菌NX-2S发酵 γ -PGA的产量达39.4 g/L。目前研究中依然存在发酵产量较低、生产成本高等问题,严重制约了 γ -PGA的工业化生产及应用。因此,性能稳定优良菌株的选育、发酵条件的优化仍是 γ -PGA工

业生产中提高菌株生产性能、降低成本的主要研究方向。

本文通过研究高产 γ -PGA 菌株暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 发酵条件优化及分批补料发酵, 以期进一步提高 γ -PGA 产量, 降低生产成本, 为该菌株产 γ -PGA 的大规模生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基

暹罗芽孢杆菌 CAU83, 由本实验室筛选和保藏。

基础发酵培养基的配制参照文献[19]。

分批补料发酵培养基(g/L): 乳糖 30.00, L-谷氨酸钠 60.00, 酵母提取物 5.00, NaCl 0.50, K_2HPO_4 0.50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.15, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.10, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.04。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

流加补料培养基(g/L): 乳糖 300.00, 酵母提取物 300.00, L-谷氨酸钠 300.00。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.2 主要试剂和仪器

酵母提取物、蛋白胨, Oxoid 公司; γ -PGA 标品, Bioruler 公司; 窄分布聚乙二醇(PEO)标样, TOSOH 公司。其他试剂若无特殊说明均是国产分析纯。

高效液相色谱泵和示差折光检测器, Shimadzu 公司; 水相凝胶色谱柱, TOSOH 公司; 单层玻璃上机械搅拌发酵罐, 上海国强生化工程装备有限公司。

1.2 摇瓶发酵条件优化

参考 Wang 等^[19]和 Peng 等^[20]的方法确定碳氮源及前体物质筛选浓度。采用单因素试验研究碳源、氮源、前体物质、发酵温度及 pH 对菌株发酵产 γ -PGA 的影响。分别以初始浓度为

30 g/L 的葡萄糖、甘油、蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖和木糖作为基础发酵培养基中的碳源, 在 1%接种量下发酵 48 h, 测定 γ -PGA 产量。确定最适碳源后考察最适碳源的不同浓度(0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 g/L); 在最适碳源下, 以初始浓度为 5 g/L 的酵母提取物、氯化铵、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏、尿素和硫酸铵分别作为发酵氮源, 确定最适氮源后考察最适氮源的不同浓度(0、5、10、15、20、25 和 30 g/L)。在最适碳氮源下, 以初始浓度为 30 g/L 的 L-谷氨酸钠、草酸、丙酮酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸分别作为前体物质, 确定最适前体物质, 再优化最适前体物质的浓度(0、10、20、30、40、50、60 和 70 g/L)。根据上述碳源、氮源及前体物质单因素试验结果, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交试验, 优化乳糖(25、30 和 35 g/L)、酵母提取物(0、5 和 10 g/L)和 L-谷氨酸钠(50、60 和 70 g/L)的用量, 以确定最佳培养基组成。

在上述最适条件下分别对发酵温度(25、30、37、40 和 45 °C)和发酵 pH (5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)进行优化。每组实验设置 3 个重复。

1.3 分批补料发酵

分批补料发酵选用 5 L 发酵罐, 工作体积为 2 L。挑取保存于甘油管中的暹罗芽孢杆菌 CAU83 菌液按照 1% (体积分数)的接种量接入 20 mL 的 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 16 h; 以 1%的接种量转接 200 mL 的 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 16 h。按照 10%的接种量接入分批补料发酵培养基中, 温度 37 °C, 用 20%磷酸及 28%氨水调节 pH 7.0, 初始搅拌转速 400 r/min, 通气量 2 vvm。补料策略为连续补料, 补料速度为 80 s/次, 控制溶氧在 5%–15% 之间波动, 补料后搅拌转速调整为 600 r/min。

每 12 h 取样, 测定菌体湿重及 γ -PGA 产量。

1.4 γ -PGA 的定量检测方法

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)比浊法测定 γ -PGA 含量。十六烷基三甲基溴化铵是一种阳离子表面活性剂, 在溶液中其氮原子可以与聚阴离子化合物 γ -PGA 中羧基氧原子进行特异性配对, 形成混悬液。混悬液在 400 nm 处的吸光度大小与 γ -PGA 浓度成正比, 并具有良好的线性关系, 可以通过反应体系的吸光度来反映其浊度, 从而对 γ -PGA 进行快速定量^[21]。在 2% NaOH 溶液中加入十六烷基三甲基溴化铵, 配制成 0.07 mol/L 的十六烷基三甲基溴化铵溶液。精确称取 γ -PGA 标品, 配制成 10、20、40、50 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 γ -PGA 标准液, 加入等体积的十六烷基三甲基溴化铵溶液, 室温下反应 3 min, 400 nm 测吸光度, 绘制 γ -PGA 的标准曲线。

发酵产物经 10 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。取 10 mL 上清液加入 40 mL 甲醇, 充分振荡后 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清液, 收集沉淀, 用 4 倍体积甲醇洗涤, 得到沉淀, 加入适量的超纯水使沉淀复溶得到 γ -PGA 水溶液。将其适当稀释, 取 500 μL 样品稀释液加入 500 μL 十六烷基三甲基溴化铵溶液, 室温下反应 3 min, 400 nm 测吸光度。将测定得到的吸光值代入 γ -PGA 标准曲线计算得到稀释液中的 γ -PGA 含量, 再乘以稀释倍数后得到 γ -PGA 水溶液中 γ -PGA 含量(g/L)。

1.5 γ -PGA 分子量的测定方法

采用凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, GPC)测定 γ -PGA 分子量。称取 20 mg 样品溶解于 1 mL 水中并混合均匀, 经 0.45 μm 滤膜处理。以 0.1 mol/L NaNO_3 + 0.01 mol/L

NaN_3 水溶液为流动相, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。数据处理采用窄分布 PEO 构建标准曲线, 根据标品的峰值分子量对数和标品色谱峰的峰顶时间拟合出线性方程: $y = -0.6259x + 13.789$, $R^2 = 0.9963$ (其中 y 为以 10 为底的分子量的对数, x 为色谱峰的时间)。将样品出峰时间代入标准曲线计算出色谱峰的切片重均分子量, 通过切片重均分子量乘切片所占百分比累加得到的平均值即为样品的重均分子量。

1.6 数据处理

方差分析及差异显著性分析采用 SPSS 25 进行, 数据统计和图片处理采用 Origin 8.5 进行, 数据均为 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 碳源对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

不同碳源对暹罗芽孢杆菌 CAU83 发酵产 γ -PGA 的影响如图 1 所示。当乳糖作为碳源时, γ -PGA 产量最高, 为 17.9 g/L, 因此选择乳糖作为最适碳源; 在此基础上对乳糖的添加量进行优化, 当乳糖浓度为 30 g/L 时 γ -PGA 产量最高, 达 24.8 g/L。随着乳糖浓度的增加, γ -PGA 的产量逐渐降低, 这是由于高浓度的碳源产生的高渗透压会阻遏菌体的代谢及产物的合成^[22]。因此选取乳糖作为最适碳源, 乳糖的最适添加量为 30 g/L。

2.2 氮源对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

以质量浓度为 30 g/L 的乳糖作为最适碳源, 不同氮源对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响如图 2 所示。与无机氮源相比, 暹罗芽孢杆菌 CAU83 利用有机氮源时 γ -PGA 产量更高, 氮源为酵母提取物、玉米浆以及蛋白胨时, γ -PGA 的产量分别为 27、22 和 20.6 g/L; 当酵母

提取物浓度为 5 g/L 时 γ -PGA 产量最高, 达到 26.8 g/L。由于发酵过程中高浓度的氮源会对菌体生长及利用其他营养物质产生不良影响^[23], 暹罗芽孢杆菌 CAU83 发酵产 γ -PGA 的含量随着酵母提取物浓度的增加呈下降的趋势。因此选取 5 g/L 的酵母提取物作为最适氮源。

2.3 前体物质对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

不同前体物质对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响如图 3 所示。当培养基中不添加 L-谷氨酸钠时 γ -PGA 产量仅为 2.1 g/L, 因此暹罗芽孢杆菌 CAU83 为谷氨酸依赖型菌株。

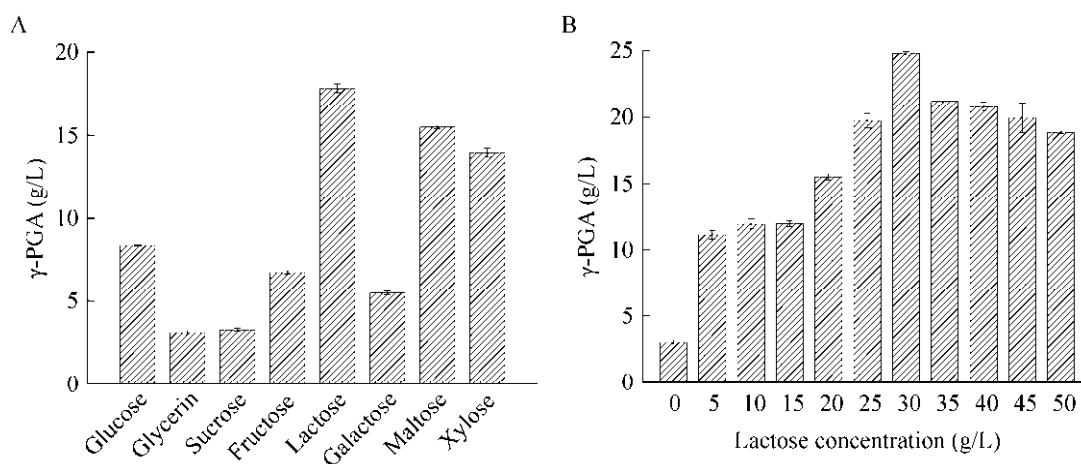


图 1 不同碳源(A)及乳糖浓度(B)对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

Figure 1 The effect of different carbon sources (A) and lactose concentration (B) on the yield of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83.

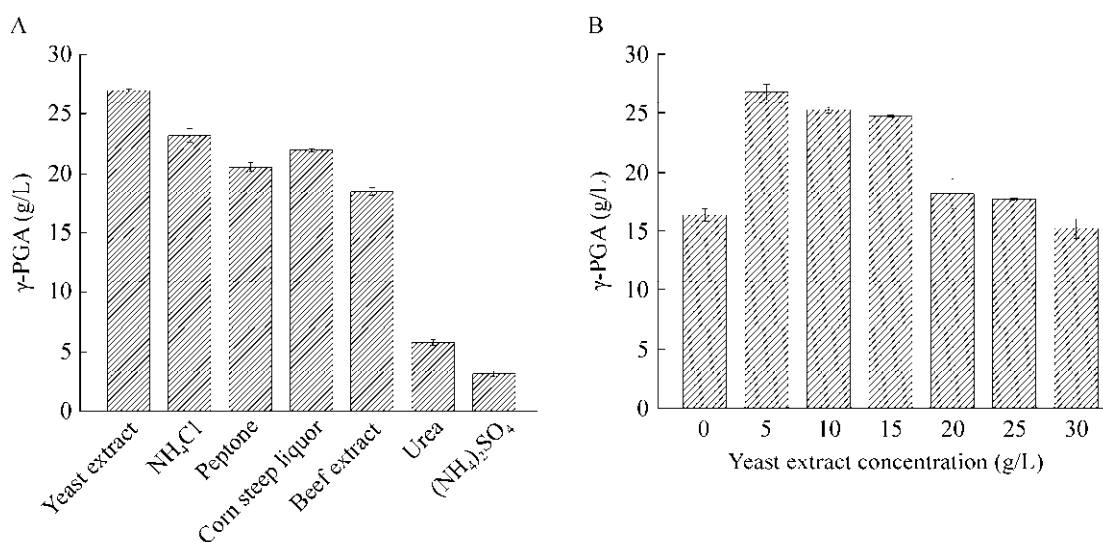


图 2 不同氮源(A)及酵母提取物浓度(B)对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

Figure 2 The effect of different nitrogen sources (A) and yeast extract concentration (B) on the yield of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83.

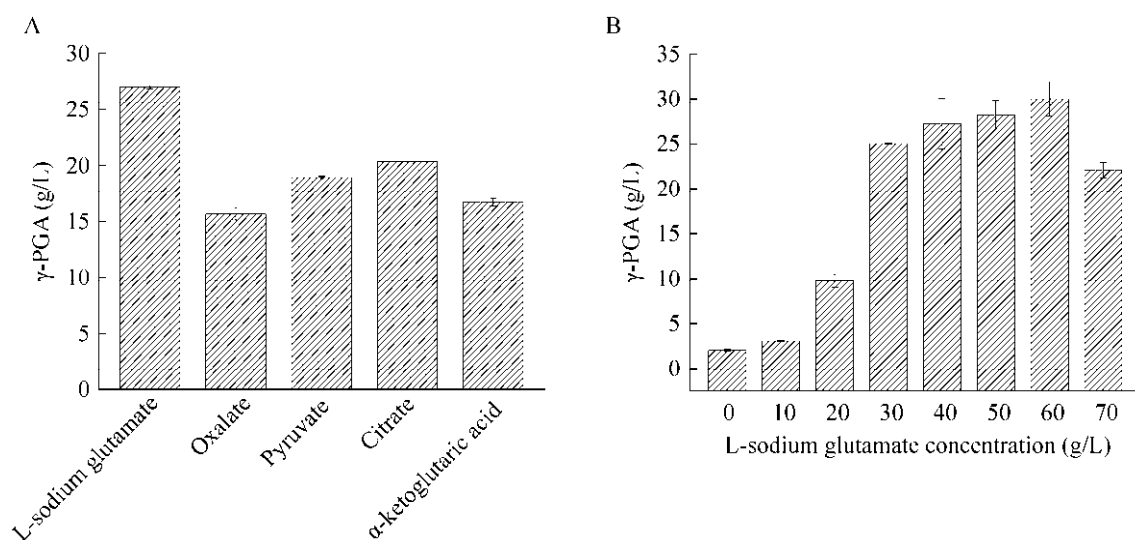


图3 不同前体物质(A)及 L-谷氨酸钠浓度(B)对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

Figure 3 The effect of different precursors (A) and L-sodium glutamate concentration (B) on the yield of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83.

L-谷氨酸钠添加量为 60 g/L 时 γ -PGA 产量最高, 为 30 g/L。添加草酸、丙酮酸、柠檬酸及 α -酮戊二酸时, γ -PGA 产量分别为 15.7、18.9、20.3 和 16.7 g/L。合适的 L-谷氨酸钠浓度对于 γ -PGA 的积累起正向作用, 而谷氨酸钠浓度过高可能会降低谷氨酸转换率^[24]。因此选取浓度为 60 g/L 的 L-谷氨酸钠作为最适前体物质。

2.4 暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 发酵培养基正交优化

以乳糖、酵母提取物和 L-谷氨酸钠为因素的暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 发酵培养基正交优化试验结果如表 1 所示。根据表 1 中 R 值的大小排序得出 3 种因素对 γ -PGA 产量的影响顺序为: 酵母提取物>乳糖>L-谷氨酸钠; 根据表中 K 值的大小, 得出最优组合为 $A_2B_2C_2$ 。进一步试验验证在最优组合条件下, 暹罗芽孢杆菌 CAU83 摇瓶发酵 γ -PGA 产量为 30 g/L。由表 2 方差分析可知, 乳糖浓度和酵母提取物浓度对 γ -PGA 产量的影响呈显著性差异($P<0.05$),

L-谷氨酸钠浓度对 γ -PGA 产量的影响不显著。综合分析可知, 暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的最佳培养基组成为: 乳糖 30 g/L, 酵母提取物 5 g/L, L-谷氨酸钠 60 g/L。

2.5 发酵温度及 pH 对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

在最适培养基的基础上, 考察培养温度和培养基初始 pH 对暹罗芽孢杆菌 CAU83 发酵产 γ -PGA 的影响(图 4)。当发酵温度为 37 °C、培养基初始 pH 为 7.0 时, 暹罗芽孢杆菌 CAU83 发酵产 γ -PGA 含量最高, 为 30.1 g/L。

2.6 5 L 发酵罐分批补料发酵产 γ -PGA

为了评估暹罗芽孢杆菌 CAU83 生产 γ -PGA 的能力, 在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵, 并对发酵所产 γ -PGA 分子量进行监测。由图 5A 可以看出, 当发酵时间为 60 h 时 γ -PGA 产量最高, 达 59.5 g/L, γ -PGA 的生产率为 0.99 g/(L·h), 生物量为 377.4 g/L。由于发酵过程中高黏性 γ -PGA 的积累和生物量的增长会限制氧的传递, 造成罐内溶氧降低, 因此溶氧是

影响 γ -PGA 产量的重要原因^[25]。本文通过调节发酵罐进气量和提高搅拌速度使罐内溶氧保持在 5%–15%，溶氧量仍处于较低水平，一定程度上限制了菌株的生长代谢和 γ -PGA 的合成。

根据 1.5 节的测定方法和图 5B 结果, 计算得到发酵液中 γ -PGA 分子量为 3.8×10^6 Da, 表明暹罗芽孢杆菌 CAU83 分批补料发酵所得 γ -PGA 样品聚合度较高。

表 1 暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 发酵培养基正交优化试验结果

Table 1 Medium optimization of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83 by orthogonal test

试验号 No.	因素 Factors			γ -PGA 产量 Yield of γ -PGA (g/L)
	A: 乳糖浓度 A: Lactose concentration (g/L)	B: 酵母提取物浓度 B: Yeast extract concentration (g/L)	C: L-谷氨酸钠浓度 C: L-sodium glutamate concentration (g/L)	
1	1	1	1	12.4
2	1	2	2	23.1
3	1	3	3	14.7
4	2	1	2	23.9
5	2	2	3	28.6
6	2	3	1	17.2
7	3	1	3	15.5
8	3	2	1	21.3
9	3	3	2	16.7
K_1	50.3	51.8	50.9	
K_2	69.7	73.0	63.8	
K_3	53.5	48.6	58.8	
k_1	16.8	17.3	17.0	
k_2	23.2	24.3	21.3	
k_3	17.8	16.2	19.6	
R	6.5	8.1	4.3	
因素主次顺序 Primary and secondary order	$B>A>C$			
最优组合 Optimal combination	$A_2B_2C_2$			

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源 Source	偏差平方和 Sum of squares	自由度 df	F 值 F value	P 值 P value
乳糖浓度 Lactose concentration (g/L)	72.6	2	25.9	0.037
酵母提取物浓度 Yeast extract concentration (g/L)	117.2	2	41.8	0.023
L-谷氨酸钠浓度 L-sodium glutamate concentration (g/L)	27.8	2	9.9	0.092
误差 Error	2.8	2		

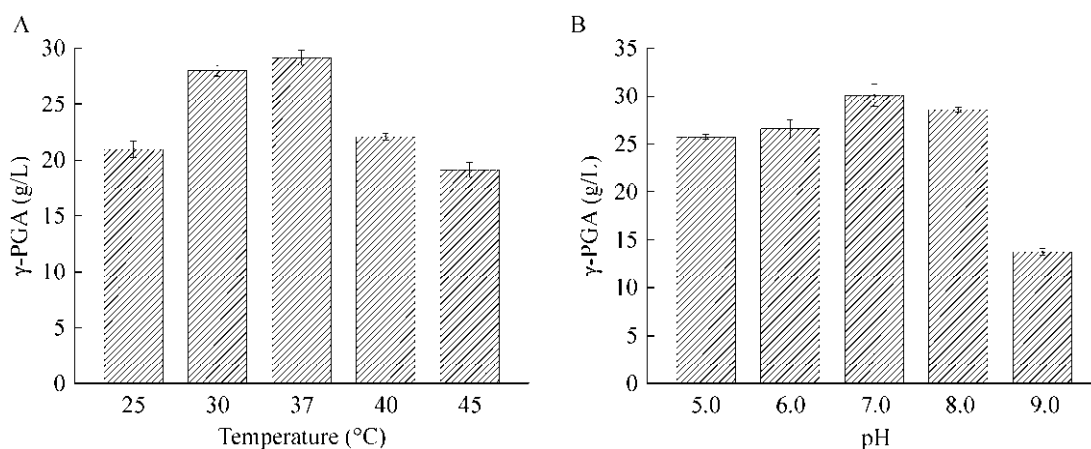


图4 发酵温度(A)及 pH (B)对暹罗芽孢杆菌 CAU83 产 γ -PGA 的影响

Figure 4 The effect of fermentation temperature (A) and pH (B) on the yield of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83.

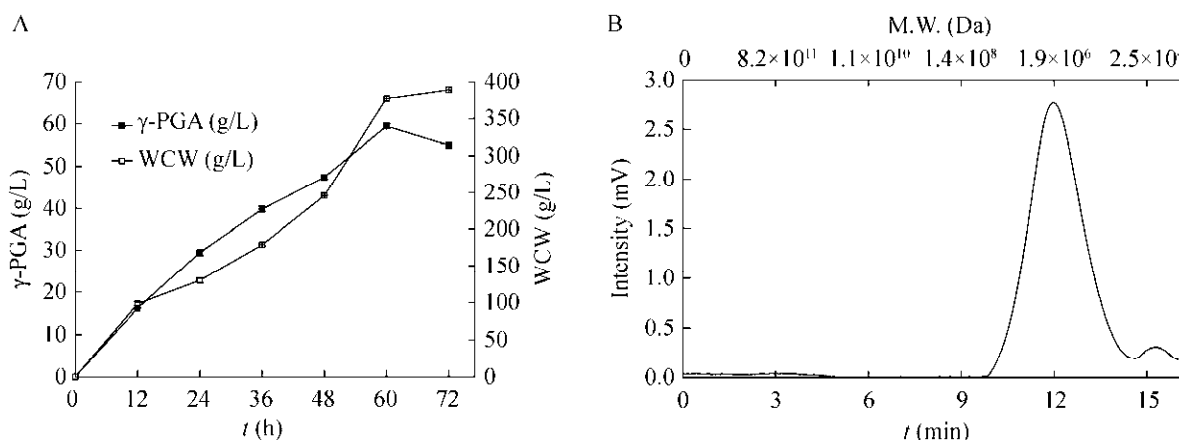


图5 暹罗芽孢杆菌 CAU83 分批补料发酵产 γ -PGA 历程图(A)及 γ -PGA 分子量色谱图(B)

Figure 5 Fed-batch fermentation of γ -PGA (A) and the chromatogram curve of molecular weight of γ -PGA by *Bacillus siamensis* CAU83 (B).

3 讨论

国内外许多学者研究微生物发酵法生产 γ -PGA 所用菌株仍以地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌^[26-27]为主,关于暹罗芽孢杆菌产 γ -PGA 的研究鲜有报道。芽孢杆菌属菌株产 γ -PGA 最适碳源多为蔗糖和葡萄糖^[27-28],而利用乳糖发酵产 γ -PGA 的研究较少且水平较低。甲基营养型芽孢杆菌 SK19.001 和枯草芽孢杆菌 FBL-2 以乳

糖为碳源时, γ -PGA 产量分别为 14.0 g/L 和 0.6 g/L^[2,29];暹罗芽孢杆菌 SB1001 和纳豆芽孢杆菌 TK-2 则无法利用乳糖^[19,30]。本文采用暹罗芽孢杆菌 CAU83 发酵产 γ -PGA 且能以乳糖作为最适碳源, γ -PGA 产量高达 30.1 g/L (图 4),为后续工业化生产及应用提供了一种新型高产 γ -PGA 天然菌株资源。

目前芽孢杆菌属菌株发酵产 γ -PGA 上罐水平在 25–75 g/L^[31-35],其中暹罗芽孢杆菌分批补

料发酵产 γ -PGA 仅有一篇报道, Wang 等^[16]通过对暹罗芽孢杆菌 SB1001 进行诱变和分批补料发酵, 将 γ -PGA 产量提高到 41.4 g/L。本文采用暹罗芽孢杆菌 CAU83 通过在 5 L 发酵罐分批补料发酵得到 γ -PGA 产量为 59.5 g/L (图 5A), 与现有研究报道相比处于较高水平。

现有文献报道天然菌株液体发酵所得 γ -PGA 聚合度相对较低, 分子量普遍分布在 $1.0 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$ Da^[1,32,36], 而且目前仅有一篇文献报道暹罗芽孢杆菌液体发酵产 γ -PGA 的分子量为 7.9×10^5 Da^[19]。本文通过分批补料发酵得到 γ -PGA 分子量分布在 3.8×10^6 Da (图 5B), 聚合度较高, 具有良好的工业应用潜力。

4 结论

本文利用高产 γ -PGA 谷氨酸依赖型菌株暹罗芽孢杆菌 CAU83 进行液态发酵, 优化得到了产 γ -PGA 的最适发酵条件。以 30 g/L 乳糖为最适碳源时, 暹罗芽孢杆菌 CAU83 的 5 L 发酵罐分批补料发酵 γ -PGA 产量最高为 59.5 g/L, 分子量为 3.8×10^6 Da。因此, 本研究所采用的暹罗芽孢杆菌 CAU83 能利用乳糖高效生产高分子量的 γ -PGA, 为该菌株的工业化生产和应用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] Lee JM, Kim JH, Kim KW, Lee BJ, Kim DG, Kim YO, Lee JH, Kong IS. Physicochemical properties, production, and biological functionality of poly- γ -D-glutamic acid with constant molecular weight from halotolerant *Bacillus* sp. SJ-10[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 598-607
- [2] Min JH, Reddy LV, Dimitris C, Kim YM, Wee YJ. Optimized production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus* sp. FBL-2 through response surface methodology using central composite design[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(7): 1061-1070
- [3] Xie XH, Wu XY, Shen Y, Song M, Xu C, Zhang B, Aziz U, Xu XJ. Effect of poly- γ -glutamic acid on hydration and structure of wheat gluten[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(10): 3214-3219
- [4] Zhao CF, Zhang YW, Wei XT, Hu ZB, Zhu FY, Xu L, Luo MF, Liu HZ. Production of ultra-high molecular weight poly- γ -glutamic acid with *Bacillus licheniformis* P-104 and characterization of its flocculation properties[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 562-572
- [5] Yang R, Liu X, Ren YH, Xue WL, Liu S, Wang PH, Zhao M, Xu H, Chi B. Injectable adaptive self-healing hyaluronic acid/poly (γ -glutamic acid) hydrogel for cutaneous wound healing[J]. Acta Biomaterialia, 2021, 127: 102-115
- [6] Zhang CY, Wu HL, Chen J, Zhu PZ, Gao CX. La³⁺ modified poly(γ -glutamic acid) hydrogels with high strength and anti-swelling property for cartilage regeneration[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2021, 138(38): 50978
- [7] Wang R, Wang XX, Zhan YJ, Xu Z, Xu ZQ, Feng XH, Li S, Xu H. A dual network hydrogel sunscreen based on poly- γ -glutamic acid/tannic acid demonstrates excellent anti-UV, self-recovery, and skin-integration capacities[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(41): 37502-37512
- [8] Jang WJ, Lee GH, Lee JM, Kim TY, Jeon MH, Kim YH, Lee EW. Improving enzyme activity, thermostability and storage stability of β -1,3-1,4-glucanase with poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus* sp. SJ-10[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 143: 109703
- [9] Feng J, Gu YY, Quan YF, Gao WX, Dang YL, Cao MF, Lu XY, Wang Y, Song CJ, Wang SF. Construction of energy-conserving sucrose utilization pathways for improving poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 98
- [10] Li BC, Cai DB, Chen SW. Metabolic engineering of central carbon metabolism of *Bacillus licheniformis* for enhanced production of poly- γ -glutamic acid[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(11): 3540-3552
- [11] Sha YY, Sun T, Qiu YB, Zhu YF, Zhan YJ, Zhang YT, Xu ZQ, Li S, Feng XH, Xu H. Investigation of glutamate dependence mechanism for poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis* on the basis of transcriptome analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(22): 6263-6274

- [12] 王凤青, 毕长富, 王川, 王凝, 龚利娟, 周丽洪, 王竹青. 黄水基质微生物发酵合成 γ -聚谷氨酸培养基及条件优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 106-115
Wang FQ, Bi CF, Wang C, Wang N, Gong LJ, Zhou LH, Wang ZQ. Culture medium and condition optimization of γ -polyglutamic acid synthesized by microbial fermentation using yellow water[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 106-115 (in Chinese)
- [13] Zhang RS, Zhang SH, Jiang GY, Gan LZ, Xu Z, Tian YQ. Optimization of fermentation conditions, purification and rheological properties of poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis* 1006-3[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2021
- [14] Feng J, Shi QS, Zhou G, Wang LL, Chen AM, Xie XB, Huang XM, Hu WF. Improved production of poly- γ -glutamic acid with low molecular weight under high ferric ion concentration stress in *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a[J]. Process Biochemistry, 2017, 56: 30-36
- [15] Mahaboob Ali AA, Momin B, Ghogare P. Isolation of a novel poly- γ -glutamic acid-producing *Bacillus licheniformis* A14 strain and optimization of fermentation conditions for high-level production[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(5): 445-452
- [16] Wang DX, Kim H, Lee S, Kim DH, Joe MH. High-level production of poly- γ -glutamic acid from untreated molasses by *Bacillus siamensis* IR10[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19: 101
- [17] Li YZ, Wang JH, Liu N, Ke LX, Zhao XY, Qi GF. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) with fulvic acid powder, the waste from yeast molasses fermentation[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 180
- [18] Qiu YB, Sha YY, Zhang YT, Xu ZQ, Li S, Lei P, Xu Z, Feng XH, Xu H. Development of Jerusalem artichoke resource for efficient one-step fermentation of poly- γ -glutamic acid using a novel strain *Bacillus amyloliquefaciens* NX-2S[J]. Bioresource Technology, 2017, 239: 197-203
- [19] Wang DX, Hwang JS, Kim DH, Lee S, Kim DH, Joe MH. A newly isolated *Bacillus siamensis* SB1001 for mass production of poly- γ -glutamic acid[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 164-173
- [20] Peng YY, Zhang T, Mu WM, Miao M, Jiang B. Intracellular synthesis of glutamic acid in *Bacillus methylotrophicus* SK19.001, a glutamate-independent poly(γ -glutamic acid)-producing strain[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(1): 66-72
- [21] Ashiuchi M. Analytical approaches to poly- γ -glutamate: quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(29): 3096-3101
- [22] 曾家豫, 刘雄雄, 孔维宝, 杨红. 乳酒隐球酵母变种 CK-1 产 β -半乳糖苷酶发酵条件优化[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2010, 46(5): 68-73, 85
Zeng JY, Liu XX, Kong WB, Yang H. Fermentation conditions for β -galactosidase production by *Koumiss cryptococcus* Var CK-1[J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science, 2010, 46(5): 68-73, 85 (in Chinese)
- [23] 许正宏, 窦文芳, 王霞, 陶文沂. 氮源及其添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 合成 L-精氨酸的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 381-385
Xu ZH, Dou WF, Wang X, Tao WY. Effects of nitrogen source and its supply manner on production of L-arginine by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(3): 381-385 (in Chinese)
- [24] Kunioka M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)S[J]. Macromolecular Bioscience, 2004, 4(3): 324-329
- [25] Kongklom N, Luo HZ, Shi ZP, Pechyen C, Chisti Y, Sirisansaneeyakul S. Production of poly- γ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 100: 67-75
- [26] Li X, Yang HQ, Zhou ML, Zhan YY, Liu J, Yan DZ, Cai DB, Chen SW. A novel strategy of feeding nitrate for cost-effective production of poly- γ -glutamic acid from crude glycerol by *Bacillus licheniformis* WX-02[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 176: 108156
- [27] 于平, 黄星星, 张一舒. 枯草芽孢杆菌 ZJS18 发酵生产 γ -聚谷氨酸培养条件的优化[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 87-92
Yu P, Huang XX, Zhang YS. Optimization of culture conditions for poly γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJS18[J]. Food Science, 2018, 39(22): 87-92 (in Chinese)
- [28] Zhu RY, Ma XZ, Liu JY. Optimization of γ -polyglutamic acid synthesis using response surface methodology of a newly isolated glutamate dependent *Bacillus velezensis* Z3[J]. International Microbiology, 2018, 21(3): 143-152
- [29] Peng YY, Jiang B, Zhang T, Mu WM, Miao M, Hua YF. High-level production of poly(γ -glutamic acid) by a

- newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methyilotrophicus*[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(3): 329-335
- [30] 王振强, 贾俊伟, 王浩, 娄军晖. 纳豆芽孢杆菌 TK-2 产 γ -聚谷氨酸发酵工艺优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(11): 95-101
- Wang ZQ, Jia JW, Wang H, Lou JH. Optimization of fermentation process of γ -polyglutamic acid production by *Bacillus natto* TK-2[J]. China Brewing, 2019, 38(11): 95-101 (in Chinese)
- [31] De Cesaro A, Da Silva SB, Ayub MAZ. Effects of metabolic pathway precursors and polydimethylsiloxane (PDMS) on poly-(gamma)-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* BL53[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(9): 1375-1382
- [32] Kumar R, Pal P. Fermentative production of poly (γ -glutamic acid) from renewable carbon source and downstream purification through a continuous membrane-integrated hybrid process[J]. Bioresource Technology, 2015, 177: 141-148
- [33] Kongklom N, Shi ZP, Chisti Y, Sirisansaneeyakul S. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 with environmental controls[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 182(3): 990-999
- [34] Ju WT, Song YS, Jung WJ, Park RD. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by a newly-isolated *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(11): 2319-2324
- [35] Jiang YX, Tang B, Xu ZQ, Liu K, Xu Z, Feng XH, Xu H. Improvement of poly- γ -glutamic acid biosynthesis in a moving bed biofilm reactor by *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 360-366
- [36] Flores C, Medina-Valdez A, Peña C, Serrano-Carreón L, Galindo E. Oxygen transfer rate determines molecular weight and production of poly(γ -glutamic acid) as well as carbon utilization by *Bacillus velezensis* 83[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2020, 95(9): 2383-2392