

γ -聚谷氨酸产生菌 BLN-2 的分离鉴定及 固体发酵条件初探

冯 静 施庆珊* 疏秀林 林小平 欧阳友生 陈仪本

(广东省微生物研究所 广东省微生物应用新技术公共实验室 广州 510070)

摘 要: 从豆制品中分离得到一株 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)产生菌 BLN-2, 通过对 BLN-2 的生理生化和 16S rRNA 系统发育特征进行分析鉴定, 明确该菌株为枯草芽孢杆菌。以黄豆为基本培养物, 对 BLN-2 的固体发酵条件进行了初步探索, 结果表明, 葡萄糖、果糖和 NaNO_3 、 KNO_3 分别为 BLN-2 的较适碳、氮源。正交试验结果表明, 当向黄豆中添加的果糖终浓度为 0.5%, 葡萄糖、 NaNO_3 及 KNO_3 终浓度均为 2.0% 时, γ -PGA 产量最高, 为 89.05 g/kg, 比相同条件下基本对照黄豆培养物的产量(60 g/kg)高 48.42%。

关键词: γ -聚谷氨酸(γ -PGA), 枯草芽孢杆菌, 分离, 鉴定, 固体发酵

Isolation and Identification of BLN-2 Producing Poly- γ -Glutamic Acid and Studies on Its Solid-state Fermentation

FENG Jing SHI Qing-Shan* SHU Xiu-Lin LIN Xiao-Ping
OUYANG You-Sheng CHEN Yi-Ben

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract: A poly- γ -glutamic acid producing strain--BLN-2, was isolated from the soybean products. According to the biochemical characteristics and 16S rRNA, the strain was identified as *Bacillus subtilis*. Using soybeans as culture, the solid-state fermentation conditions of BLN-2 have been studied. The results showed that the optimal carbon and nitrogen sources of BLN-2 were glucose, fructose, NaNO_3 and KNO_3 , respectively. The orthogonal experiments showed, when the final concentration of the fructose which was added to the soybean culture was 0.5%, the glucose, NaNO_3 and KNO_3 final concentraion were 2.0%, the production of γ -PGA was the highest--89.05 g/kg. It is 48.42% higher than other comparable soybean medium under the same conditions.

Keywords: Poly- γ -glutamic acid (γ -PGA), *Bacillus subtilis*, Isolation, Identification, Solid-state fermentation

γ -多聚谷氨酸(Poly- γ -glutamic acid, 简称 γ -PGA)是由某些微生物合成的一种细胞外水溶性高分子氨基酸聚合物,由 L-谷氨酸和/或 D-谷氨酸单体之间通过 α -氨基和 γ -羧基形成肽键后生成的多聚酰胺聚合形成^[1]。1937 年 Ivanovics 等首次于炭疽芽孢杆菌的夹膜中发现 γ -PGA, 1942 年 Bovarnick 等人发现有些芽孢杆菌属细菌能通过发酵培养积累 γ -PGA^[2]。随后,人们发现多种芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[3-5]、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[6,7]、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)^[8]等都能在胞外产生 γ -PGA。由于 γ -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。

目前, γ -PGA 主要采用微生物液体发酵法进行生产,利用固体发酵方法产 γ -PGA 的研究相对较少。在国内,沙长青等^[9]率先报道了利用黄豆固体发酵可大幅提高 γ -PGA 产量,随后, Wang QJ、Cheng X 等^[10-13]分别用不同的原料作为固体培养基质,进行了多聚谷氨酸固体发酵方面的研究。研究结果均表明,利用固体发酵方式产多聚谷氨酸,不但操作简便,而且产量也比液体发酵高。因而,进行 γ -PGA 固体发酵菌株的分离筛选及发酵条件优化等方面的研究十分必要。基于此,本实验室从豆制品中分离出一批 γ -PGA 产生菌,并从中筛选得到一株产量较高的菌株,对其进行了种属鉴定及固体发酵条件初步优化等方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: BLN-2 由本实验室分离自豆制品中,经生理生化实验和 16S rRNA 鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

1.1.2 培养基和试剂: LB 培养基:蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g,溶解于 1 L 蒸馏水中,调 pH 7.0 后分装, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; 发酵用黄豆购自市场;其余试剂均为常规试剂。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离:取适量豆制品于 10 mL 无菌蒸

馏水中,涡旋器振荡混匀后,稀释成不同浓度菌液。各取 100 μ L 不同浓度的菌液均匀涂布于 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,挑取平板上生长快、黏度高的菌落,转接到 LB 斜面上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。将分离得到的菌株接种到黄豆培养物中, 37 $^{\circ}$ C 温箱静置培养 48 h 后测定 γ -PGA 含量,筛选得到一株产量较高的菌株(编号为 BLN-2)用于下一步实验。

1.2.2 菌株的生理生化特征鉴定:参照微生物分类学^[14]和伯杰细菌鉴定手册^[15]方法进行。

1.2.3 遗传学特性鉴定:采用 16S rRNA 测序方法进行分类学鉴定。按常规方法提取 BLN-2 基因组 DNA 做模板,采用两种合成的细菌通用引物(由北京赛百盛公司合成)进行 PCR 扩增;扩增产物的纯化及测序工作由上海英骏(Invitrogen)生物技术公司的 3730 测序仪器完成;将测序结果提交 NCBI 数据库,利用 Blast 搜索其相似性最高的序列确定菌种分类。其中 PCR 仪为 Biometra 公司 AT3000,细菌通用引物序列为: 27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1541R: 5'-AAG GAA GTG ATG CAG CCG CA-3'。

1.2.4 菌种的活化:取 BLN-2 菌种接于 LB 斜面培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,用作活化菌种。再用无菌接种环取一环培养好的 BLN-2 活化菌种,接种于 50 mL (250 mL 三角瓶装)液体 LB 中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床振荡培养 18 h 得固体发酵种子液。

1.2.5 固体发酵方法:参照沙长青等^[9]方法略有改动进行,以黄豆为基本培养物,进行固体发酵产 γ -PGA。具体过程如下:取大豆 90 g,蒸馏水浸泡 24 h 后平均装至 3 个直径为 120 mm 的培养皿内, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后,取出放无菌室,冷至 50 ~ 60 $^{\circ}$ C,取培养好的 BLN-2 菌液,按 10%(V/W)接种量接种至黄豆培养基中,充分混匀后,覆以 4 层无菌纱布, 37 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养 2 d。

1.2.6 不同碳、氮源对 γ -PGA 产量的影响:按 1.2.5 所述方法,分别向黄豆中添加终浓度为 2%(W/W)的碳、氮源,测试不同碳、氮源对 γ -PGA 产量的影响。供试碳源为蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、柠檬酸及甘油,其中柠檬酸、甘油为 1×10^5 Pa 常规灭菌,蔗糖、果糖、葡萄糖和麦芽糖为过滤灭菌。供试氮源为 NaNO₃、KNO₃、尿素、氯化铵、蛋白胨及硫酸铵,均为 1×10^5 Pa 常规灭菌。

1.2.7 发酵产物的提取:发酵产物的提取参照 Chen

X^[11]等方法略有改动后进行。用 10 倍体积生理盐水(质量分数为 0.85%的 NaCl 溶液)搅拌发酵完毕的黄豆, 5000 r/min 离心 30 min 得上清液。取适量上清液, 加入 4 倍体积无水乙醇, -20℃ 沉淀过夜, 12000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 真空干燥得粗品。用去离子水复溶粗品, 加入 4 倍体积无水乙醇, -20℃ 沉淀过夜后, 再 12000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 蒸馏水溶解沉淀后, 对蒸馏水透析, 透析液冷冻干燥后得纯品。

1.2.8 发酵产物的分析: 向纯化后的发酵产物中加入等量 6 mol/L 盐酸, 110℃ 酸水解过夜, 60℃ 水浴蒸发掉盐酸, 去离子水溶解, 得发酵水解产物。以标准谷氨酸为对照, 分别对水解产物进行纸层析及 HPLC 色谱分析。结果表明, 纸层析水解产物的斑点位置与标准谷氨酸斑点位置同一; 而 HPLC 分析结

果也表明, 水解产物的出峰时间与标准谷氨酸出峰时间相同。从以上两实验结果, 可推断出该发酵水解产物为谷氨酸。

2 结果

2.1 BLN-2 生理生化特征鉴定

参照微生物分类学及伯杰氏细菌鉴定手册, 对 BLN-2 菌株进行了生理生化特征鉴定, 初步判断出该菌株为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 各生理生化特征鉴定结果见表 1。

2.2 遗传学特征鉴定

提取 BLN-2 的 DNA 为模板, 用细菌通用引物进行 PCR 扩增, 回收测序后, 将得到的序列送 GenBank 做 Blast 比较, 用 MEGA 3 Tree 构建进化树, 结果如图 1 所示。

表 1 BLN-2 的生理生化特征
Table1 Physiology and biochemistry characteristics of BLN-2

试验项目 Test items	试验结果 Test results	试验项目 Test items	试验结果 Test results
革兰氏染色 Gram stain	+	Growth on 2% NaCl	+++
形状 Shape	短杆状	Growth on 5% NaCl	++
孢子位置 Endospores position	细胞中央	Growth on 7% NaCl	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	Growth on 10% NaCl	-
Huge-Leifson OF	发酵型产酸	蔗糖发酵 Sucrose ferment	+
西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate utilization test	-	葡萄糖发酵 Glucose ferment	+
H ₂ O ₂ 酶 H ₂ O ₂ oxidase	+	果糖发酵 Fructose ferment	+
明胶水解 Hydrolysis of gelatin	+	乳糖发酵 Lactose ferment	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	甘露醇发酵 Mannose ferment	+
硝酸盐还原 Nitrate deoxidization	+	阿拉伯糖发酵 Arabinose ferment	+
V. P. 试验 Voges-Proskauer test	+	麦芽糖发酵 Maltose ferment	+
M. R 试验 Methyl red test	-	棉子糖发酵 Raffinose ferment	-

+ : 阳性; - : 阴性
+: Positive; -: Negative

根据 GenBank 中提供的基因系列, 构建 BLN-2 系统发育进化树, 其中同源性最高的菌株为 *Bacillus subtilis* C1CC10028(GenBank 登录号为 AY881638.1) 和 *Bacillus subtilis* C1CC10066(GenBank 登陆号为 DQ055131.1) 等, 同源性达 99%。结合形态、生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析的系统进化结果, 鉴定出 BLN-2 为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌种。

2.3 发酵水解产物的 HPLC 分析

取适量 BLN-2 的发酵产物, 用常规方法酸水解

后, 以标准谷氨酸水解产物为对照, 用 HPLC 方法分析发酵产物的主要成分。

HPLC 分析结果表明, BLN-2 水解产物的出峰时间与标准谷氨酸出峰时间相同。通过将二者的光谱图整合, 可看出 BLN-2 水解产物与标准谷氨酸水解产物的峰重叠性较好, 走势一致(见图 2)。由此可推断出 BLN-2 的发酵水解产物为谷氨酸, 从而表明其发酵产物为聚谷氨酸。

2.4 不同碳、氮源对 γ -PGA 产量的影响

以黄豆为基本培养物, 分别向其中加入终浓度

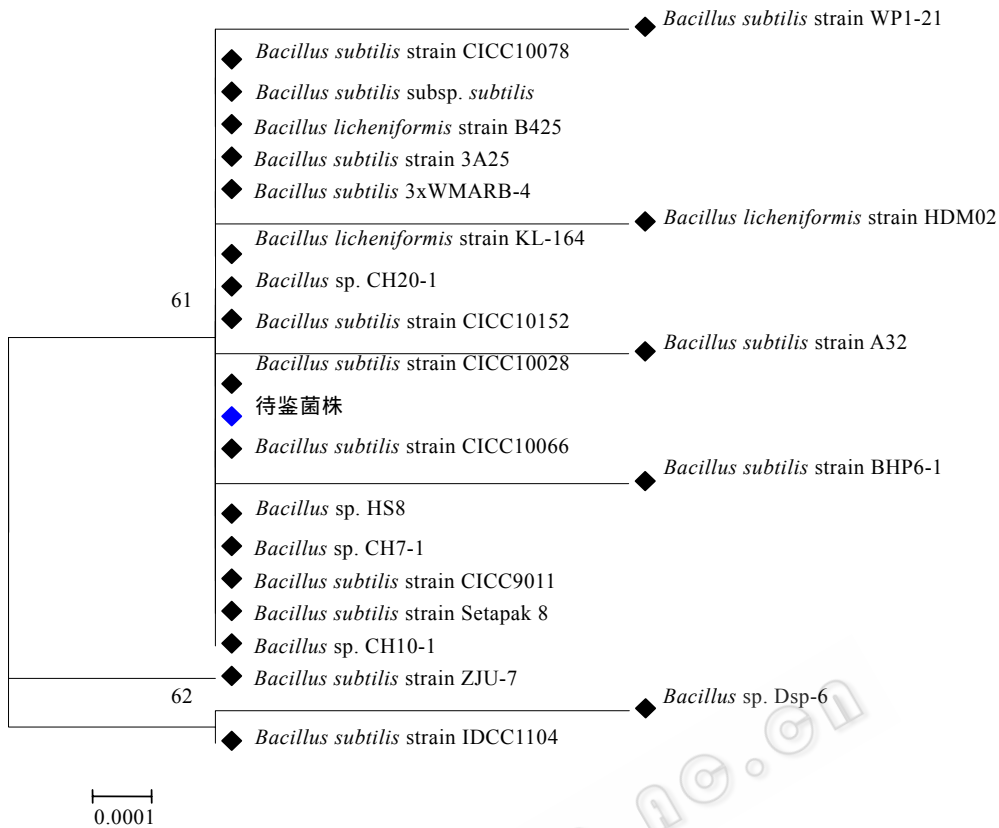


图 1 BLN-2 菌株的系统发育进化树
Fig. 1 The phylogenetic tree of BLN-2

为 2%的蔗糖、果糖、葡萄糖、柠檬酸、甘油及麦芽糖作为供试碳源，终浓度为 2%的 NaNO_3 、 KNO_3 、尿素、 NH_4Cl 、蛋白胨及硫酸铵作为供试氮源，测试不同碳、氮源对 BLN-2 菌株 γ -PGA 产量的影响，结果如图 3、图 4 所示。

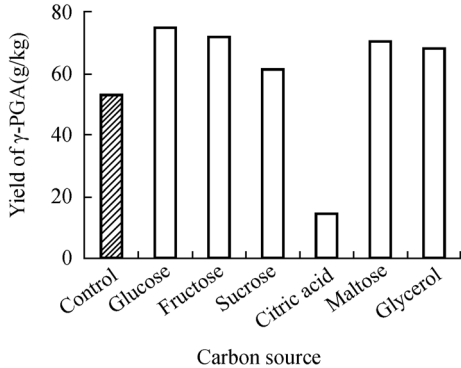


图 3 不同碳源对 γ -PGA 产量的影响
Fig. 3 Effects of various carbon sources on γ -PGA production

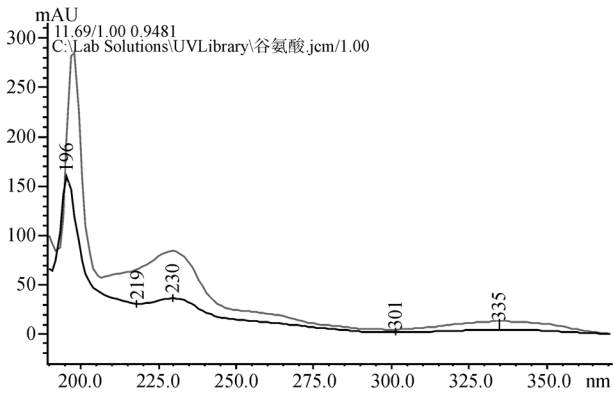


图 2 标准谷氨酸与 BLN-2 发酵水解产物的 HPLC 光谱整合图
Fig. 2 HPLC spectrogram of hydrolysis product from BLN-2 and standard glutamate

由图 3 可知，当以葡萄糖为碳源时， γ -PGA 产量最高，其次为果糖，表明枯草芽孢杆菌菌株 BLN-2 对葡萄糖及果糖的吸收能力较强；而以柠檬酸做碳源时，菌体的长势最差， γ -PGA 产量也最低。由图 4 可知，以 NaNO_3 作为氮源时， γ -PGA 产量最高， KNO_3 次之，表明 NaNO_3 和 KNO_3 为 BLN-2 的较适氮源。分别选取葡萄糖、果糖为碳源， NaNO_3 、 KNO_3

作为氮源, 进行下一步实验。

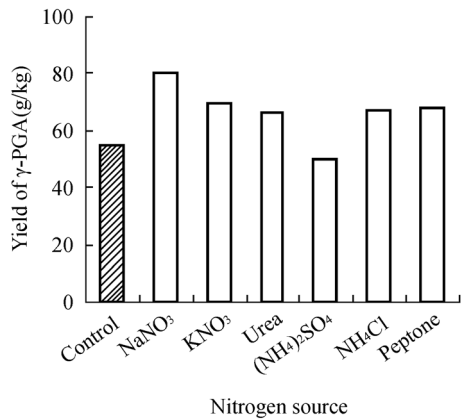


图 4 不同氮源对 γ -PGA 产量的影响
Fig. 4 Effects of various nitrogen sources on γ -PGA production

2.5 正交试验结果

由于当分别以葡萄糖、果糖为碳源, NaNO_3 、 KNO_3 为氮源时, γ -PGA 的产量相对较高, 因而选取果糖和葡萄糖作为 BLN-2 固体发酵的碳源, NaNO_3 和 KNO_3 作为氮源, 进行正交试验。设计了如下实验方案, 正交试验设计及结果见表 2。

从表 2 正交实验结果可知, NaNO_3 对 γ -PGA 产量的影响最大, 葡萄糖次之, 而果糖和 KNO_3 对 γ -PGA 产量的影响则相对较小。当果糖浓度为 0.5%, 葡萄糖、 NaNO_3 及 KNO_3 浓度均为 2.0% 时, γ -PGA 产量最高, 为 89.05 g/kg, 比相同条件下基本对照黄豆培养物的产量(60 g/kg)高 48.42%。说明通过向黄豆中添加适当的碳源及氮源, 有利于 γ -PGA 产量的提高。

表 2 四因素三水平正交实验表及结果分析					
Table 2 The factor-level table of $L_9(3^4)$ and the analysis of results					
因素 Factor	果 糖	葡萄糖	硝酸钠	硝酸钾	γ -PGA 产量
水平 Level	Fructose(%)	Glucose(%)	NaNO ₃ (%)	KNO ₃ (%)	
1	0.5	0.5	0.5	0.5	Yield of γ -PGA(g/kg)
2	1.0	1.0	1.0	1.0	
3	2.0	2.0	2.0	2.0	
Number	Fructose	Glucose	NaNO ₃	KNO ₃	
1	1	1	1	1	
2	1	2	2	2	
3	1	3	3	3	
4	2	1	1	3	
5	2	2	3	1	
6	5	3	3	2	
7	3	1	1	2	
8	3	2	3	3	
9	3	3	3	1	
k1	70.003	59.120	63.933	61.813	
k2	68.200	74.387	61.947	69.693	
k3	66.267	70.963	78.590	73.963	
R	3.736	15.267	16.643	12.150	

3 讨论

从豆制品中分离筛选得到一株 γ -PGA 产生菌 BLN-2, 以黄豆为基本固体发酵培养物, 通过向其中添加适量的碳、氮源, 对 BLN-2 的固体发酵情况进行了初步研究。结果表明, 在基本黄豆培养物上, γ -PGA 的产量能达到约 60 g/kg, 而通过向黄豆中外加一定浓度的碳源和氮源, 则可大大提高 γ -PGA 的产量。当黄豆中添加的果糖浓度为 0.5%、葡萄糖、

NaNO_3 及 KNO_3 终浓度均为 2.0% 时, γ -PGA 产量最高, 可达到 89.05 g/kg, 比相同条件下对照黄豆的产量高 48.42%, 说明通过向黄豆中添加适量的碳源和氮源, 有利于 γ -PGA 产量的提高。

参 考 文 献

[1] Pérez-Camero G, Congregado F, Bou JJ, *et al.* Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly (γ -glutamic acid). *Biotechnol Bioeng*, 1999, **63**(1): 110–115.

- [2] Shih IL, Van YT. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Biore-sour Technol*, 2001, **79**(3): 207–225.
- [3] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IF03335. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**(7): 1031–1035.
- [4] Ashiuchi M, Misono H. Biochemistry and molecular ge-netics of poly- γ -glutamate synthesis. *Appl Microbiol Bio-technol*, 2002, **59**(1): 9–14.
- [5] Shi F, Xu ZN, Cen PL. Efficient production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, **133**(3): 271–282.
- [6] Birrer GA, Cromwick AM, Gross RA. γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physio-logical and biochemical studies. *Int J Biol Macromol*, 1994, **16**(5): 265–275.
- [7] Shih IL, Van YT, Sau YY. Antifreeze activities of poly (γ -glutamic acid) produced by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(20): 213–220.
- [8] Kunioka M. Biosynthesis and chemical reactions of poly (amino acids) from microorganisms. *Appl Microbiol Bio-technol*, 1997, **47**(5): 469–475.
- [9] 沙长青, 李伟群, 赵晓宇, 等. 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*)固体发酵生产 Y-PGA. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**(10): 70–73.
- [10] Wang QJ, Chen SW, Zhang JB, *et al.* Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic acid by solid-state fer-mentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Biore-sour Technol*, 2007, doi:10.1016/j.biortech. 2007.05.052.
- [11] Chen X, Chen SW, Sun M, *et al.* High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. *Biore-sour Technol*, 2005, **96**(17): 1872–1879.
- [12] Xu J, Chen SW, Yu ZN. Optimization of process param-e-ters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. *Pro Biochem*, 2005, **40**(9): 3075–3081.
- [13] 吴永平, 周景文, 陈守文, 等. 枯草芽孢杆菌 ME714 产聚- γ -谷氨酸固态发酵培养基的优化. *应用与环境生物学报*, 2007, **13**(5): 713–716.
- [14] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

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迪性的看法和建议。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 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。