

一株非谷氨酸依赖型聚 γ -谷氨酸高产菌株的鉴定与诱变育种

疏秀林* 施庆珊 冯 静 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 广东 广州 510070)

摘 要: 从发酵制品中分离到一株不依赖谷氨酸作为发酵底物的高产菌株PGA-N, 通过形态、生理生化试验和遗传学研究, 确定PGA-N为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。根据该菌株的产生环境, 设计了无L-谷氨酸发酵基础培养基, 并对该培养基进行了碳氮源优化和菌种诱变筛选。PGA-N经过亚硝基胍和紫外线诱变筛选后得一突变株——PGA-N-C₁₀, 其 γ -PGA的产量提高到8.82 g/L。实验还考察了搅拌转速与细胞生物量、 γ -PGA产量以及 γ -PGA分子量之间的关系, 在搅拌速度为400 r/min时, γ -PGA产率可高达11.00 g/L。

关键词: 聚谷氨酸(γ -PGA), 鉴定, 诱变筛选, 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 非谷氨酸依赖型

Identification and Simulation Mutation of a High-productive Strain of Poly (γ -glutamic acid) Independent of Glutamic Acid

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

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

Abstract: A high productive poly γ -glutamic acid (γ -PGA) strain PGA-N in a culture medium containing no L-glutamine was isolated from fermentation products. With the following identifications of colony morphology, physiological and biochemistry experiments, and genetics, the strain PGA-N was classified as a *Bacillus licheniformis*. According to the product environment, the base culture medium having no L-glutamine was simulated. In order to enhance the production of the strain PGA-N, the fermentation conditions, such as carbon source, nitrogen source, were optimized and the γ -glutamic acid production reached 5.16 g/L after getting the optimum formulation of this culture medium. PGA-N was mutagenized with combination of NTG and UV. A mutant PGA-N-C₁₀ was screened which PGA production was increased from 5.16 g/L to 8.82 g/L. The study also investigated the effects of agitation speed on the cell biomass, γ -PGA production and the γ -PGA molecular weight. The γ -PGA yield of PGA-N-C₁₀ was as high as 11.00 g/L when the agitation speed was 400 r/min.

Keywords: Poly (γ -glutamic acid) [γ -PGA], Identification, Mutagenic screening, *Bacillus licheniformis*,

Independent-glutamic Acid

γ -聚谷氨酸(Poly γ -glutamic acid, γ -PGA)是一种可由微生物大量合成的氨基酸聚合物,它由D-型或L-型谷氨酸通过 γ -酰胺键连接而成。微生物合成的 γ -PGA是一种水溶性的可生物降解的生物高分子,通常它由5000左右个谷氨酸单体组成,相对分子质量一般在10万~100万。 γ -PGA可以制成不同分子量的产物应用于各种不同领域。如:(1) γ -PGA具食品安全性,可作为膳食纤维、保健食品、食品增稠剂、安定剂或作为化妆品用的保湿剂;(2) γ -PGA可作成水胶,具有极高吸水能力,吸水量达3500倍,极适合于农业土壤和环保产品之应用;(3) γ -PGA可以转化成各种不同的金属盐类,具不同pH值,并有特殊多阴离子表面的特性,适用于组织培养和许多食品、化妆品、生物医学等工业上的应用等。随着从廉价的资源生产可生物降解的多聚物用量的增加,以及 γ -PGA许多新的应用领域的拓展,对 γ -PGA生物合成的兴趣又重新提升起来,目前,世界上有很多研究小组在从事 γ -PGA生物合成的研究。

PGA产生菌可分为两大类:一种是培养基中必须添加L-谷氨酸;另一种是无需谷氨酸作为基质进行发酵。前者包括多种细菌,如*Bacillus licheniformis* ATCC9945a(从土壤中分离得到)^[1]和*B. subtilis* IFO3335(从豆制品中分离得到)^[2]等。后者如*Bacillus licheniformis* A35^[3]、*B. subtilis* TAM-4^[4]等。无谷氨酸发酵型 γ -PGA的生产,由于可用廉价原料代替谷氨酸,因此在工业生产中有其实际应用意义。本实验经过多年的研究,已经分离了数株无谷氨酸发酵型 γ -PGA产生菌^[5],但是一般 γ -PGA产率较低。本研究旨在无谷氨酸依赖型高产菌株的筛选和发酵的研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

PGA-N,来源于无L-谷氨酸作为基质的发酵制品中,具有产 γ -聚谷氨酸特性。

1.2 培养基

1.2.1 种子及平板培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。

1.2.2 液体种子培养基(g/L):柠檬酸钠 20,尿素 8,胰蛋白胨 6,水解酪蛋白胨 3,玉米浆 10,酵母粉

14,氯化钠 2.5, pH 值 6.5。

1.2.3 液体发酵培养基:根据菌株来源环境,初步模拟其发酵基础培养基(g/L)为柠檬酸钠 40,尿素 16,胰蛋白胨 12,水解酪蛋白胨 6,玉米浆 20,酵母粉 28,氯化钠 5, pH 值 6.5。通过发酵培养基的碳、氮源优化实验,确定发酵培养基(g/L)为:柠檬酸钠 40,尿素 16,胰蛋白胨 12,水解酪蛋白胨 6,玉米浆 35,酵母粉 35,氯化钠 5, pH 值 6.5,并且在160 r/min, 37°C下,PGA产量可高达5.16 g/L。

1.3 培养方法

种子培养:斜面菌株经斜面活化后,接入液体种子培养基,在37°C、180 r/min的摇床培养16 h。

摇瓶培养:500 mL三角瓶,装液量80 mL,按5%接种量接种至液体发酵培养基,在37°C、180 r/min摇床上培养4 d。

发酵罐培养:5.0 L全自动控制发酵罐(ALF型,瑞士比欧),装液量为3 L,接种量为5%,通气量为4 L/min,发酵过程中温度控制在37°C。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 菌株的生理生化鉴定:参照文献[6]。

1.4.2 遗传特性鉴定:用16S rRNA测序进行分类学鉴定。细菌菌株基因组DNA的提取,使用北京赛百盛公司的基因组DNA提纯试剂盒提取。PCR扩增采用两种合成的通用引物(由赛百盛公司合成),PCR产物纯化后测序,纯化及测序工作采用上海英骏(Invitrogen)生物技术公司的3730测序仪器完成,测序结果在NCBI数据库中Blast搜索其相似性最高的序列确定菌种分类。

16S rRNA基因系列和PCR反应。PCR仪为Biometra公司AT300,引物:27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1541R: 5'-AAG GAA GTG ATG CAG CCG CA-3'^[7]。

1.5 诱变育种

1.5.1 亚硝基胍(NTG)诱变:从新鲜斜面上取一环菌接入种子培养基(50 mL/250 mL锥形瓶),在37°C、200 r/min培养22 h,取种子液离心,去上清,再用无菌生理盐水洗涤细胞,离心去上清液。用pH 7.0的0.1 mol/L的磷酸缓冲液悬浮,调整菌数为 $(1\sim5)\times 10^8$ 个/mL,取样用平板菌落计数法记活菌数(CFU)。另取适量菌悬液加入盛有亚硝基胍的试管

(质量浓度 100 mg/L), 30℃振荡处理, 每隔 10 min 取样用平板菌落计数, 计算致死率。据致死率实验所确定的诱变剂量处理出发菌株后, 于液体培养基进行后培养。约 10 h 后, 按不同稀释度涂筛选平板, 挑取光滑粘稠菌落进行筛选。

1.5.2 紫外诱变: 制备好的菌悬液 5 mL, 置于 9 cm 内有磁力搅拌子的无菌平皿中, 将平皿置于磁力搅拌器上, 在波长 253.7 nm、功率 8 W 的紫外(UV)灯下, 距离 20 cm, 照射 60 s 后开盖振荡照射。于不同时间分别取样, 采用 10 倍稀释法稀释, 稀释液涂布分离培养基平板, 倒置于 37℃ 恒温箱培养。菌落长好后计数, 计算致死率。根据致死率实验所确定的诱变时间进行诱变处理后, 于液体培养基中培养。约 10 h 后, 按不同稀释度涂筛选平板, 挑取光滑粘稠菌落进行筛选。

1.6 发酵产物分析

1.6.1 γ -PGA 的分离纯化^[8]: 发酵液于 8000 r/min 条件下, 离心 10 min, 取上清液, 加入 4 倍体积无水乙醇, 冰箱沉淀过夜, 10000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 真空干燥得粗品。用蒸馏水溶解粗品, 对蒸馏水反复透析, 透析液冷冻干燥得纯品。

1.6.2 目的产物 γ -PGA 的水解: γ -PGA 样品中加入等量的 6 mo/L 盐酸, 100℃ 下酸解过夜, 60℃ 水浴蒸发掉盐酸, 去离子水溶解, 再进行纸层析, 得到相当于标准品 L-谷氨酸的斑点。再利用高效液相法^[6]测定水解液中的 L-谷氨酸含量, 对纸层析法进行验证, 试验结果证明两者相吻合(见图 1)。

γ -PGA 含量=(酸水解后谷氨酸的含量 - 酸水解前葡萄糖含量)

1.6.3 发酵液菌体浓度测定方法: 细胞干重法和 660 nm 吸光值法: 取一定量发酵液, 适当稀释后在分光光度计 660 nm 处比色, 以 OD 值为菌体浓度相对值。

1.6.4 γ -PGA 分子量的测定: 参照文献[9]。

2 结果与分析

2.1 PGA-N 菌株的鉴定

2.1.1 形态特征: PGA-N 菌株在固体培养基上的生长形态有多样性, 在 LB 培养基平板上, 菌落粘稠、湿润、圆形、不透明, 菌苔边缘整齐, 表面光滑。

2.1.2 生理生化特征: 见表 1。

2.1.3 遗传学特征: PGA-N 菌株 16S rRNA 序列分

析。经 PCR 扩增后回收测序, 将得到的序列送 GenBank 做 Blast 比较, 用 MEGA 3 Tree 构建进化树(图 2)。

根据 GenBank 中提供的基因系列, 依据 16S rRNA 序列构建进化树进行分析, 其中同源性最高

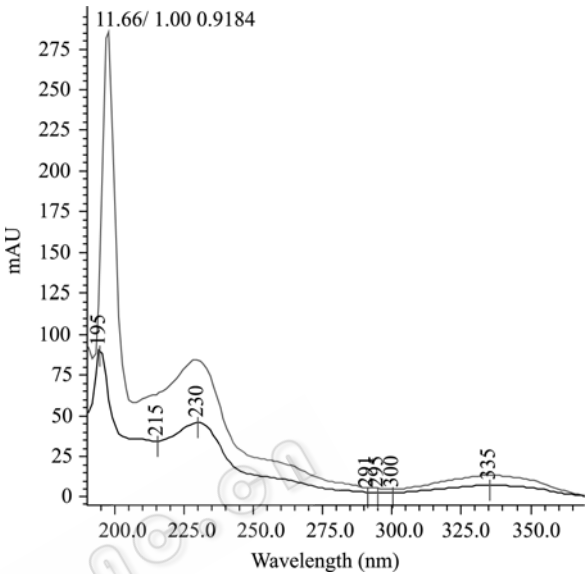


图 1 PGA-N 发酵产物水解物与标准谷氨酸的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC spectrogram of hydrolysis product from PGA-N and standard glutamate

表 1 PGA-N 的生理生化特征 Table 1 Physiological and biochemical characteristics of PGA-N			
Test items	Test results	Test items	Test results
Gram-stained	+	Utilization of propionate	+
Shape	Short rod	Hydrolysis of starch	+
Cytoplasmic granulation	+	Utilization of citrate	+
Endospores	Central, ellipsoidal	Nitrate reduction	+
Sporangia swollen	-	Litmus milk reaction	-
Anaerobic growth	+	Utilization of glucose	+
V. P test	+	Utilization of xylose	+
pH of V-P broth cultures	6.0	Utilization of lactose	+
The highest growth temperature (°C)	50	Utilization of mannitol	+
The lowest growth temperature (°C)	15	Utilization of arabinose	+
Growth on pH 5.7	+	Utilization of maltose	+
Growth in 7% NaCl	+	Utilization of raffinose	+

Notes: +: Positive; -: Negative.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
<http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>

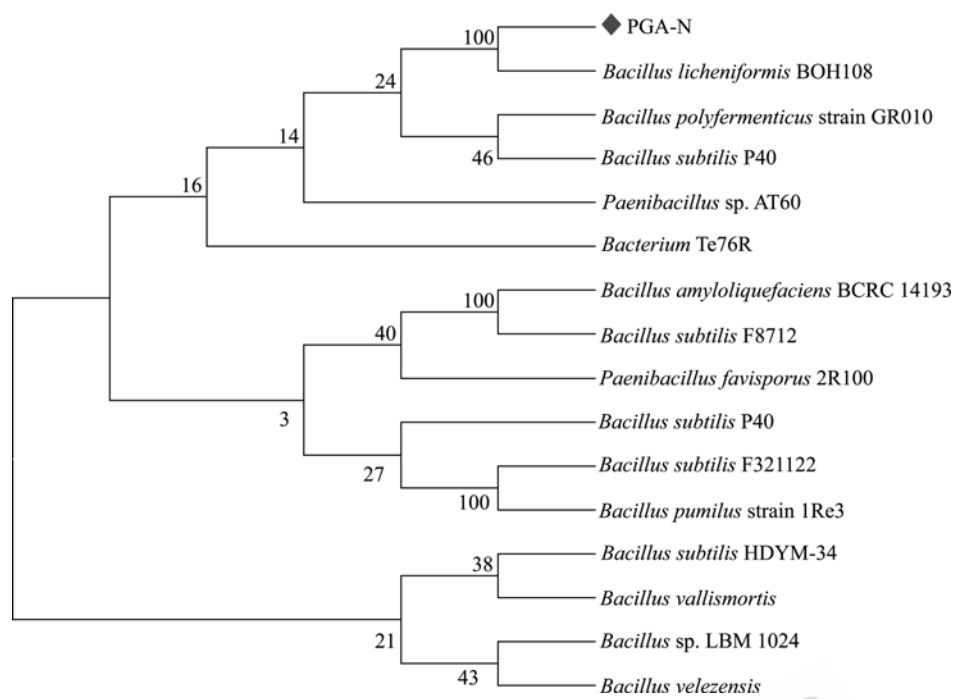


图 2 PGA-N 菌株的系统发育进化树
Fig. 2 The phylogenetic tree of PGA-N

菌株的是*B. licheniformis* BOH108(gb|AY947531.1), 同源性为 100%, 结合形态、生理生化特征以及 16S rRNA 系列分析的系统进化结果, PGA-N 菌株鉴定为芽孢杆菌属地衣芽孢杆菌种(*Bacillus licheniformis*)。

2.2 菌种诱变筛选

2.2.1 亚硝基胍诱变: 致死率试验表明, 用 0.1 g/L 的 NTG 处理 30 min, 地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) PGA-N 的致死率为 80%。以此处理剂量对 PGA-N 进行诱变, 从筛选平板上挑取粘稠、光滑的菌落 25 株, 以 γ -PGA 产量为考察目标, 经发酵培养基摇瓶复筛后得到 5 株 γ -PGA 产量提高幅度较大的突变株, 见表 2。

表 2 亚硝基胍诱变结果 Table 2 Results of NTG mutation		
菌株 Strain	γ -PGA	
	产量 The yield (g/L)	提高百分率 Percentage increase (%)
PGA-N	5.16	—
N ₁	5.43	5.17
N ₂	6.56	27.06
N ₃	6.75	30.75
N ₄	7.38	42.98
N ₅	5.31	2.98

将上述菌株中 γ -PGA 产量最高的突变菌株 N₄ 进行分离纯化。挑出表面光滑、粘稠的单菌落移至斜面上, 置冰箱保存待用。

2.2.2 紫外线诱变: 在亚硝基胍诱变的基础上, 以紫外线对突变株 N₄ 进行 30 s 的诱变照射处理时, 致死率约为 75%。从筛选平板上挑取粘稠、光滑的菌落 40 株, 经发酵培养基复筛得到 12 株突变株, 见表 3。

表 3 N ₄ 突变株经紫外的诱变结果 Table 3 Results of γ -rays mutation of N ₄ strain		
菌株 Strain	γ -PGA	
	产量 The yield (g/L)	提高百分率 Percentage increase (%)
Starting strain N ₄	6.75	0
C ₁	7.06	4.58
C ₂	7.22	6.89
C ₃	7.94	17.63
C ₄	7.56	12.00
C ₅	7.39	9.45
C ₆	8.12	20.31
C ₇	7.73	14.57
C ₈	7.00	3.64
C ₉	7.39	9.55
C ₁₀	8.82	30.65
C ₁₁	8.07	19.58
C ₁₂	7.16	6.00

从表 3 中可以看出, C_{10} 突变株的产量高达 8.82 g/L, 从上述菌株中挑出 γ -PGA 产量最高、相对粘度最大的菌株 C_{10} , 接入斜面, 置冰箱保存待用。

2.2.3 突变株的传代稳定性: 将所选突变株 C_{10} 在斜面培养基中 24 h 转接 1 次, 共转接 10 代, 测定每次传代后的产物量, 结果表明突变株具有较好的传代稳定性。并将 C_{10} 菌株定名为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) PGA-N- C_{10} 。

2.3 搅拌转速对 PGA-N- C_{10} 发酵的影响

γ -PGA 是在细胞膜上合成并分泌到胞外, 是细胞荚膜的主要成分。由于荚膜中产物的高浓度影响了营养物质进入细胞以及氧在发酵液中传质效率, 从而影响细胞的生长代谢和产物合成, 发酵工程中通常通过改变搅拌转速来解决这一问题。

2.3.1 搅拌转速对 *B. licheniformis* PGA-N- C_{10} 细胞生长的影响: 在培养基、培养温度等条件固定情况下, 控制不同搅拌转速, 分别为 200 r/min、400 r/min、600 r/min、800 r/min、1000 r/min, 考察发酵过程中细胞的生长情况。实验结果如图 3 所示。

实验数据表明搅拌转速越高, 菌体代谢周期越短, 菌体生长越快。较高的搅拌转速能使荚膜更快地散落, 降低荚膜对细胞所需营养物质和氧的传递的阻碍。搅拌转速为 1000 r/min 时, 生物量达到最大 7.65 g/L。

2.3.2 搅拌转速对 γ -PGA 产率的影响: 图 4 表示了以上实验中不同搅拌转速下 γ -PGA 产率随时间的变化趋势图。对照图 3, 可以看出在细胞生长期 γ -PGA 生成与细胞的增殖相关, 较高转速 (600 r/min) 下, 体系传质快, 细胞浓度很快达到饱和, 随之衰亡,

但是 γ -PGA 最终产率不高。低搅拌转速时 (200 r/min), 体系的传质较慢, γ -PGA 合成速率也相应降低。400 r/min 时, 发酵 50 h 后, PGA 产率最高, 达 11.00 g/L, 其生产强度为 0.22 g/(h·L)。

2.3.3 搅拌转速对 γ -PGA 相对分子质量的影响: 实验考察结果见图 5, γ -PGA 相对分子质量范围随着搅拌转速的提高而缩小。在低搅拌转速下 (200 r/min) 时, γ -PGA 的分子量范围为 $(0.201 \sim 2.75) \times 10^5$, 但是在高转速情况下 (1000 r/min), γ -PGA 的分子量范围为 $(0.0443 \sim 1.2) \times 10^5$, 最高分子量降低, 分子量范围缩小。推测可能是: 一方面由于 γ -PGA 是线性长链分子, 在搅拌剪切力作用下可能会发生断裂, 从而降低了 γ -PGA 的相对分子质量; 另一方面, 过高搅拌产生的剪切作用影响谷氨酸分子键合到长链 γ -PGA 相对分子质末端, 因而影响 γ -PGA 相对分子质量增加^[10], 这些都有待于实验进一步证实。

B. licheniformis PGA-N- C_{10} 深层发酵合成 γ -PGA 过程中, 搅拌转速对 γ -PGA 合成有重要影响,

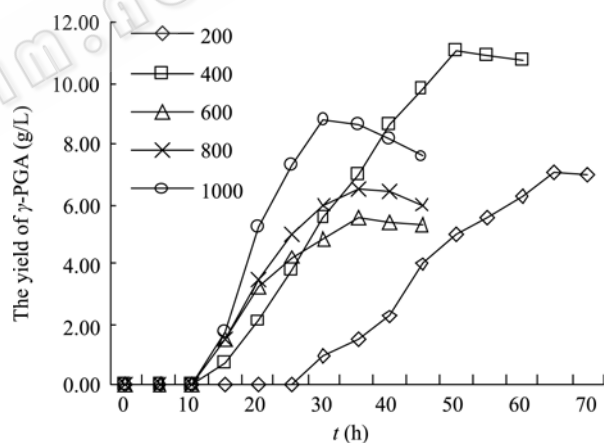


图 4 不同搅拌速率对 γ -PGA 产量的影响

Fig. 4 Effects of agitation speeds on γ -PGA production

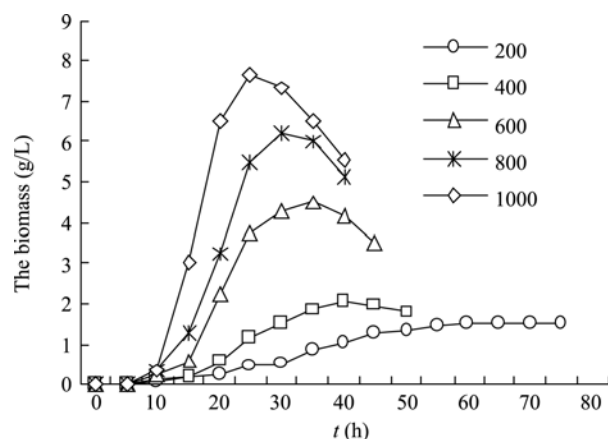


图 3 不同搅拌速度下细胞生长曲线

Fig. 3 Time course of cell growth under different agitation speeds

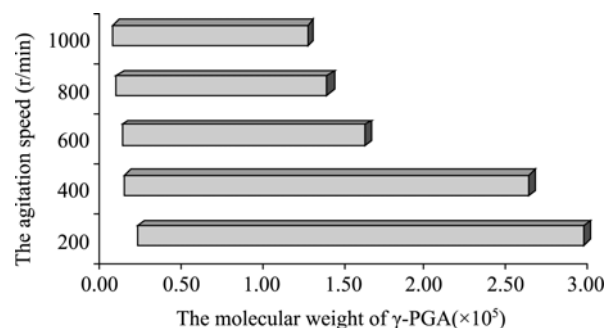


图 5 不同搅拌速度下 γ -PGA 的分子量范围

Fig. 5 Molecular weight of PGA under different agitation speeds

高搅拌转速有利于氧的传递和底物的传质,所以菌体生长快,但过大剪切力有可能破坏 γ -PGA 长链的延伸,不利于合成大分子 γ -PGA。经过多次实验,在搅拌转速为 400 r/min 时,发酵培养 50 h 后, γ -PGA 产率达 11.00 g/L, 并且产量稳定。

3 结论

从某发酵制品中分离到一株不依赖谷氨酸作为发酵基质的生产菌株 PGA-N, 通过生理生化试验结合 16S rRNA 序列分析, 确定菌株为芽孢杆菌种 (*Bacillus licheniformis*), 定名为 *Bacillus licheniformis* PGA-N。本研究根据该菌株的产生环境, 设计了该菌的发酵基础培养基(无 L-谷氨酸), 并对该培养基进行了碳氮源优化, 确定最佳发酵培养基的配方。

由于 *Bacillus licheniformis* PGA-N 为较原始菌株, 我们对其进行了亚硝基胍和紫外线诱变筛选, 使得 γ -PGA 的产量提高到 8.82 g/L。同时本课题还研究了搅拌转速与细胞生物量、 γ -PGA 产量以及 γ -PGA 分子量之间的关系。在搅拌速率为 400 r/min 情况下, PGA-N 突变株 PGA-N-C₁₀ 的产率高达 11.00 g/L, 且产量稳定。

目前, 国内关于非谷氨酸依赖型微生物发酵产聚谷氨酸的研究很少, 且国内外无论谷氨酸依赖或非依赖型发酵法, 都普遍存在营养供给多、发酵时间长等问题, 如 IFO3335 在含 30 g/L 谷氨酸、20 g/L 柠檬酸和 20 g/L 硫酸铵等的培养基中培养 96 h, 生成 20 g/L γ -PGA, 生产强度为 0.21 g/(h·L); TAM-4 菌在 7.5% 果糖作为碳源、1.8% NH₄Cl 作为氮源的无谷氨酸基质培养基中发酵 96 h, γ -PGA 产量为 22.1 g/L, 生产强度为 0.23 g/(h·L)。相对 TM-4 菌株, 本研究筛选出的 PGA-N 菌株不但有效缩短发酵时间、降低发酵生产成本, 而且 γ -PGA 生产强度也与之接近, 为 0.22 g/(h·L)。因此只要进一步优化发酵

条件、研究各种因素对目标产物积累的影响, 水平还有较大的提高空间, 相关的研究进展将在以后陆续报道。

参考文献

- [1] Young K, Richard AG. Effects of glucose and glycerol on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **57** (4): 43-437.
- [2] Atsuo G, Masao K. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1992, **56** (7): 1031-1035.
- [3] Cheng C, Asada Y, Aida T. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agricultural and biological chemistry*, 1989, **53**: 2369-2375.
- [4] Yoshihito I, Takeshi T, Tetsuo O, *et al.* Glutamic acid independent production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, **60**: 1239-1241.
- [5] 施庆珊, 李诚斌, 王春华, 等. 一株不需谷氨酸的产聚 γ -谷氨酸菌株的筛选与鉴定. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 307-311.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.106-119, 349-412.
- [7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, 1991, **173**: 679-703.
- [8] Shih IL, Van YT, Chang YN. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 1282. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31** (3): 213-220.
- [9] Fumio Y, Yoshihiro O, Mamoru K, *et al.* Detection of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by SDS-PAGE. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, **60**(2): 255-258.
- [10] 陆树云, 姚俊, 徐虹, 等. 聚谷氨酸批式生物合成的主要影响因素研究. *生物加工过程*, 2006, **4**(1): 65-69.