

味精粗料作为聚谷氨酸合成前体的培养条件优化

刘 岑 徐志南 石 峰 岑沛霖

(浙江大学化工与生物工程系生物工程研究所,杭州,310027)

摘 要 为降低聚谷氨酸生产成本,采用本实验室筛选得到的枯草芽孢杆菌,编号为 CGMCC No.1250。考察了不同的谷氨酸钠替代品,味精粗料最佳,并考察了味精粗料的含量、碳源和氮源及其浓度、NaCl 浓度、装液量以及温度等对 γ -PGA 产量的影响。实验结果表明,对于该菌株,最适碳源和氮源分别是蔗糖和蛋白胨;在含有 70 g/L 蔗糖、50 g/L 蛋白胨、30 g/L NaCl, pH7.0, 含味精粗料体积分数为 26.6% (含谷氨酸 120 g/L) 的发酵液中, 37℃, 220 r/min 培养 24 h, γ -PGA 的产量达到 41.7 g/L。

关键词 聚谷氨酸, 谷氨酸, 味精粗料

γ -聚谷氨酸(Poly γ -glutamic acid, γ -PGA)是一种通过微生物合成的均氨基酸化合物,它由谷氨酸单体以 γ -羧基与氨基相缩合而成^[1]。 γ -PGA 是一种对人体及环境无毒害的生物相容性高分子,一般由 500~5 000 个左右的谷氨酸单体组成,分子质量在 $10 \times 10^4 \sim 10 \times 10^5$ u。 γ -PGA 以及其衍生物可广泛用作药物缓释剂^[2]、土壤、沙地的蓄水保水剂^[3,4]、高吸水剂^[5,6]、食品用水凝胶^[7]、粘稠剂^[8],以及高强度纤维等^[9]。

γ -聚谷氨酸可以采用发酵法生产, *Bacillus anthracis*、*Bacillus natto* 等都能够生物合成,文献中所报道的 γ -PGA 产生菌、 γ -PGA 产量及其分子质量列于表 1。本实验室筛选得到了 1 株 γ -PGA 分子质量达到 1.24×10^6 u 的高产菌株 CGMCC No.1250。

由于 γ -PGA 产生菌株多以谷氨酸、谷氨酸钠作为前体合成^[10],这使得生产成本较高,因此利用价格比较低廉的前体代替精制的味精将有利于降低 γ -PGA 的成本。

表 1 γ -PGA 生产菌、 γ -PGA 产量及分子质量

菌株	主要营养成分/g·L ⁻¹	培养时间/h	γ -PGA/g·L ⁻¹	分子质量/u
<i>B. licheniformis</i> ATCC 9945a	谷氨酰胺, 20	96	17~23	$(1.4 \sim 9.8) \times 10^5$
	甘油, 80			
	柠檬酸, 12			
<i>B. subtilis</i> IFO3335	谷氨酰胺, 30	48	10~20	$1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$
	柠檬酸, 20			
<i>B. subtilis</i> TAM-4	果糖, 75	96	22	$6.0 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$
	NH ₄ Cl, 18			
<i>B. subtilis</i> F-2-01	谷氨酰胺, 70	96	48	1.2×10^6
	葡萄糖, 1			

本研究在前期工作的基础上,采用味精厂的发酵液和味精粗料替代商品味精生产 γ -PGA,并考察了味精粗料的含量、不同碳源和氮源及其浓度、溶氧和温度等对 γ -PGA 产量的影响。

1 材料和方法

1.1 材 料

γ -PGA 标准品(Sigma 公司,美国);谷氨酸钠含量为 90 g/L 的谷氨酸棒杆菌发酵末期发酵液,谷氨酸钠含量分别为 450 g/L、质量分数为 99% 的味精粗

料及味精(杭州味精厂),均以谷氨酸钠含量配制发酵培养基。

1.2 菌种来源

枯草芽孢杆菌,编号为 CGMCC No.1250,本实验室保藏。

1.3 培养基和培养条件

分离、种子培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,谷氨酸钠 40,NaCl 10,琼脂 20, pH7.0。

1.4 培养方法

菌种活化:从甘油管取 100 μ L 菌液,稀释后涂布于分离培养基,37℃ 培养 10 h。

种子培养:活化的菌种接入装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶,200 r/min,37℃ 培养 8 h。

第一作者:硕士研究生(徐志南为通讯作者)。

收稿日期:2005-12-19,改回日期:2006-02-27

发酵培养:种子液接入装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 的摇瓶中,200 r/min,37℃ 培养 24 h。

1.5 分析方法

pH 测定:用 delta 320 pH 计(Mettler Toledo 公司,瑞士)测定。

含菌量测定:发酵液稀释后用 Ultrospec 3300 pro 紫外/可见分光光度计(安玛西亚公司,美国)于 600 nm 读取菌悬液的 OD₆₀₀ 值。

γ-PGA 的测定:参考文献[11]。

γ-PGA 标准溶液:称取 50 mgγ-PGA 标准品,加 0.015 mol/L Na₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液使其溶解,定容至 10 mL,配成 5 g/L 的 γ-PGA 标准溶液,微孔滤膜过滤,临用前用缓冲液稀释。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸替代品对 γ-PGA 生产的影响

谷氨酸作为 γ-PGA 的前体对谷氨酸依赖型的菌株 CGMCC No.1250 的 γ-PGA 产量影响显著,为降低生产成本,分别用谷氨酸发酵液及味精粗料作为 γ-PGA 的前体原料进行了对比实验,均折合成 40 g/L 的谷氨酸钠浓度添加到培养基中,添加葡萄糖 50 g/L,蛋白胨 30 g/L,37℃ 培养 24 h 后的实验结果如表 2 所示。

表 2 谷氨酸替代品对 γ-PGA 生产的影响

γ-PGA 前体原料	γ-PGA/g·L ⁻¹	菌体浓度/OD ₆₀₀
谷氨酸发酵液	8.0	0.220
味精粗料	12.5	0.458

以谷氨酸发酵液作为前体原料,菌体生长缓慢,γ-PGA 产量最低,只有 8.0 g/L。由于谷氨酸棒杆菌培养基中含有某些微量重金属离子、大量的氨和谷氨酸棒杆菌代谢产物的积累,可能会抑制菌体生长和 γ-PGA 合成。而以味精粗料作为谷氨酸替代物,γ-PGA 生产量最大,为 12.5 g/L,与发酵液相比,γ-PGA 产量及菌体浓度均为最高。可能是因为味精粗料中含有钠盐和粗蛋白,有利于菌体生长和 γ-PGA 的生产。

2.2 谷氨酸钠含量对 γ-PGA 生产的影响

将不同量的含谷氨酸钠 450 g/L 的味精粗料加入发酵液作为 γ-PGA 合成的前体,考察了谷氨酸钠浓度对 γ-PGA 产量的影响。同时添加 50g/L 葡萄糖,30 g/L 蛋白胨到培养基中作为碳、氮源,37℃ 培养 24 h 后的实验结果如表 3 所示。

表 3 味精粗料添加量对 γ-PGA 生产的影响

谷氨酸钠 /g·L ⁻¹	γ-PGA 质量 浓度/g·L ⁻¹	表观转化率 /%	菌体浓度 OD ₆₀₀
20	7.9	39.5	0.177
40	11.3	30.7	0.318
60	13.4	22.3	0.335
80	17.9	22.3	0.460
100	21.2	21.2	0.473
120	23.7	19.7	0.479

味精粗料添加量对 γ-PGA 的生物合成有很大影响。向发酵液中添加味精粗料,使谷氨酸钠浓度达到 20~120 g/L。从表 3 数据可以看到,菌体生长量和 γ-PGA 的产量均随谷氨酸钠浓度升高而升高,味精粗料不仅提供 γ-PGA 合成的前体,谷氨酸钠和味精粗料中的粗蛋白也为菌体生长提供了复合碳、氮源,当谷氨酸钠含量为 120 g/L,即味精粗料的体积分数达到 26.6%时,菌体生长量和 γ-PGA 产量均达到最大值,但是味精的表观转化率下降。

2.3 氮源对 γ-PGA 生产的影响

添加浓度为 30 g/L 的蛋白胨、酵母膏、(NH₄)₂SO₄、豆饼粉、玉米粉、鱼粉到培养基中作为氮源,50 g/L 的葡萄糖作为碳源,加入体积分数为 26.6%的味精粗料,使发酵液中味精浓度达到 120 g/L,37℃ 培养 24 h 后的实验结果如图 1 所示。

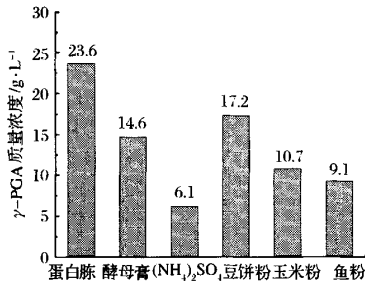


图 1 氮源对 γ-PGA 生产的影响

以 (NH₄)₂SO₄ 作为氮源时,γ-PGA 的产量只有 6.1 g/L,采用有机氮源时,γ-PGA 产量都高于无机氮源,其中以蛋白胨作为氮源时 γ-PGA 产量最高,达到 23.6 g/L。

进一步考察蛋白胨浓度对 γ-PGA 产量的影响,结果如表 4 所示。蛋白胨浓度为 60 g/L 时,γ-PGA 的产量最高,为 28.0 g/L,当蛋白胨浓度大于 50 g/L 时,蛋白胨浓度对细胞生长和 γ-PGA 产量的影响已经不大。上述结果表明,用枯草芽孢杆菌 CGMCC No.1250 生产 γ-PGA 时对氮源具有较高的要求。从

经济角度考虑,蛋白胨最适浓度为 50 g/L。

表 4 蛋白胨对 γ -PGA 生产的影响

蛋白胨浓度 /g·L ⁻¹	γ -PGA /g·L ⁻¹	表观转化率 /%	菌体浓度 OD ₆₀₀
10	13.6	11.3	0.357
20	17.2	14.3	0.423
30	23.6	19.6	0.479
40	25.1	20.9	0.490
50	27.8	23.2	0.525
60	28.0	23.3	0.527

2.4 碳源对 γ -PGA 生产的影响

据文献报道, *Bacillus subtilis* PGAN-12^[12] 和 *Bacillus subtilis* NX-2^[13] 在采用葡萄糖和蔗糖作为碳源时, γ -PGA 的产量分别为 14.5 g/L 和 30.1 g/L, 甘油也可以作为 γ -PGA 发酵培养基的复合碳源^[14]。本实验在不添加其他碳源的情况下, 添加浓度为 50 g/L 的甘油、蔗糖、麦芽糖、淀粉、乳糖及葡萄糖作为碳源, 以 50 g/L 的蛋白胨作为氮源, 味精粗料的体积分数为 26.6%, 37℃ 培养 24 h 后的实验结果如图 2 所示。

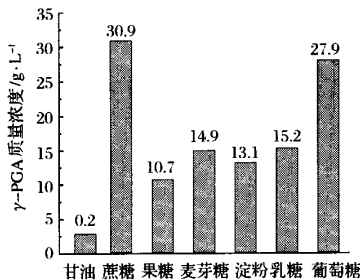


图 2 碳源对 γ -PGA 生产的影响

从图 2 可以观察到, 除甘油外, 蔗糖、果糖、麦芽糖、淀粉、乳糖及葡萄糖作为碳源时都能够获得较高的 γ -PGA 产量, 其中以蔗糖或葡萄糖作为碳源时 γ -PGA 的产量最高, 特别是蔗糖, γ -PGA 产量达到 30.9 g/L。因此, 选择蔗糖作为发酵培养基的碳源。

进一步考察蔗糖浓度对 γ -PGA 产量的影响, 结果如表 5 所示。蔗糖浓度增加时, 对菌体生长有明显的促进作用, 但当蔗糖浓度大于 110 g/L 时, 对菌体生长产生了明显的抑制。当蔗糖浓度高于 70 g/L 时, 对 γ -PGA 的产量几乎没有影响。因此, 培养基中蔗糖浓度以 70 g/L 为宜, γ -PGA 产量为 34.9 g/L, 表观转化率达到 29.0%。

表 5 蔗糖对 γ -PGA 生产的影响

蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	γ -PGA /g·L ⁻¹	表观转化率 /%	菌体浓度 OD ₆₀₀
50	30.9	25.7	0.550
70	34.9	29.0	0.661
90	35.3	29.4	0.693
110	35.5	29.5	0.710
130	35.6	29.6	0.655

2.5 NaCl 对 γ -PGA 生产的影响

由于 γ -PGA 发酵液粘度较高, 不利于菌体生长, 添加 NaCl 可降低发酵液粘度, 从而增加 γ -PGA 的产量。向培养基中添加不同浓度的 NaCl 对 γ -PGA 合成的影响见图 3。培养基中蔗糖浓度为 70 g/L, 蛋白胨浓度为 50 g/L, 味精粗料的体积分数为 26.6%。

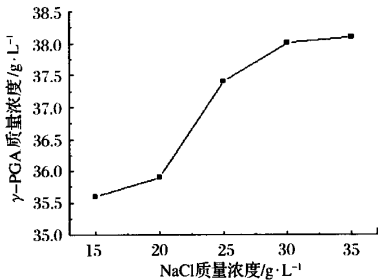


图 3 NaCl 浓度对 γ -PGA 生产的影响

实验结果表明, γ -PGA 的产量随发酵液中 NaCl 浓度的增加而增加。NaCl 浓度为 30 g/L 时, γ -PGA 的产量达到了 38.0 g/L, NaCl 浓度继续增加对 γ -PGA 产量的影响很小, 因此取 30 g/L 为 NaCl 最适浓度。

2.6 摇瓶装液量对 γ -PGA 生产的影响

γ -PGA 发酵是好氧过程, 摇瓶发酵时装液量的大小反映了氧传递的能力。文献中曾报道摇瓶装液量对 γ -PGA 产量影响很大。若装液量过小, γ -PGA 产量非常低, 500 mL 摇瓶中装液 30 mL, 几乎检测不到 γ -PGA 的存在^[7]。本实验以 70 g/L 蔗糖作为碳源, 50 g/L 蛋白胨作为氮源, 味精粗料的体积分数为 26.6%, NaCl 浓度 30 g/L, 在 250 mL 三角瓶内分别装不同体积的培养基, 以考察摇瓶装液量对发酵的影响, 结果如图 4 所示。可以看到, 菌体生长情况随着装液量的增加而变差, 而对 γ -PGA 的合成而言, 存在着一个最佳装液量, 说明太差或太好的氧传递都不利于 γ -PGA 的合成。装液量为 30 mL 时 γ -PGA 产量最高, 为 38.0 g/L。

2.7 温度对 γ -PGA 生产的影响

温度对 γ -PGA 合成的影响结果见图 5。培养条

件: 70 g/L 蔗糖, 50 g/L 蛋白胨, 30 g/L NaCl, 味精粗料的体积分数为 26.6%, 在 250 mL 三角瓶内装液 30 mL。可以发现, 37℃ 为 γ -PGA 合成的最适温度, γ -PGA 产量为 38.0 g/L。

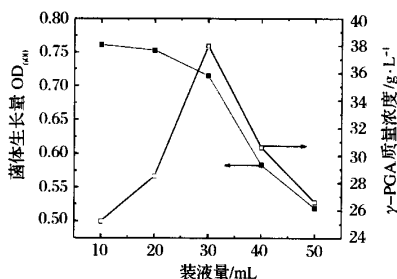


图4 摇瓶装液量对 γ -PGA 生产的影响

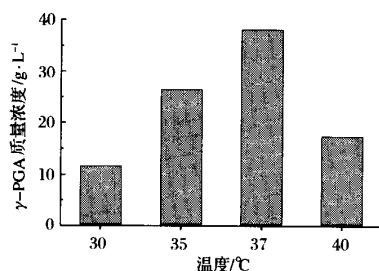


图5 温度对 γ -PGA 生产的影响

2.8 摇床转速对 γ -PGA 生产的影响

摇床转速对氧传递和剪切力都有很大影响。在上述优化条件下, 进一步考察了摇床转速对 γ -PGA 发酵的影响, 结果见图 6。适当增加摇床转速可以促进氧传递, 从而改善细胞的生长, 但摇床转速超过 350 r/min 后, 高剪切力使细胞生长受到了影响。对 γ -PGA 合成的最佳摇床转速为 220 r/min, 说明 γ -PGA 合成对溶氧要求不高而对剪切力较为敏感。摇床转速 220 r/min 时 γ -PGA 的产量为 41.4 g/L。

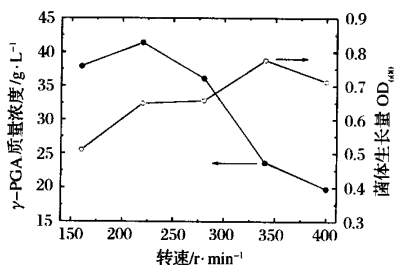


图6 摇床转速对 γ -PGA 生产的影响

通过以上对培养基成分和培养条件的优化, 利用 CGMCC No. 1250 间歇发酵生产 γ -PGA 时前体谷氨酸消耗、菌体生长及 γ -PGA 合成如图 7 所示。可以

看到, 前体谷氨酸消耗、菌体生长及 γ -PGA 合成的变化规律基本同步, 当细胞处于指数生长阶段时, 前体谷氨酸快速消耗, 与此同时, γ -PGA 则被大量合成。前体谷氨酸的消耗量远高于 γ -PGA 的合成量, 说明部分谷氨酸用于菌体的生长。

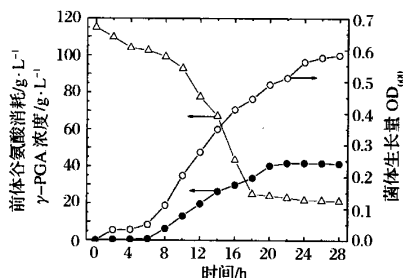


图7 γ -PGA 生物合成过程

△—sucrose ●— γ -PGA ○—菌体生长

3 结 论

为了降低 γ -PGA 的生产成本, 提高 γ -PGA 的产量, 可以以味精粗料代替精制味精作为 γ -PGA 的合成前体, 并优化了发酵培养基配方, 确定 γ -PGA 发酵培养基成分 (g/L) 为: 蔗糖 70, 蛋白胨 5, 味精粗料 266 mL/L, NaCl 30, pH7.0。发酵条件: 摇床装液量 30 mL/250 mL 三角瓶, 摇床转速 220 r/min, 37℃。在优化条件下, 培养 24 h 后 γ -PGA 的最高产量为 41.7 g/L, 高于大多数文献报道的以精制味精为前体的 γ -PGA 产量^[10]。

参 考 文 献

- Shih I L, Van Y T. The Production of Poly(γ -Glutamic Acid) from Microorganism and Its Various Applications[J]. Bioresource Technology, 2001, 79: 207~225
- Kim K S, Kim T K, Graham N B. Controlled release behavior of prodrugs based on the biodegradable poly(γ -glutamic acid) microspheres[J]. Polymer Journal, 1999, 31: 813~816
- Choi H J, Kunioka M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by (γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid)) [J]. Radiat Phys Chem, 1995, 46 (2): 175~179
- Li C, Ke S, Wn Q P. Tumor irradiation enhances the tumor-specific distribution of poly(L-glutamic acid)-conjugation paclitaxel and its antitumor efficacy [J]. Clin Cancer Res, 2000, 16(7): 2 829~2 834
- Chio H J, Yang R, Kunioka M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid) [J]. J Appl Polym Sci,

- 1995,58:807~814
- 6 Kunioka M, Furusawa K. Poly(γ -glutamic acid) hydrogel prepared from microbial poly(γ -glutamic acid) acid alkacedi-amine with water-soluble carnodiimide[J]. J Appl Polym Sci, 1997,65:1 889~1 896
 - 7 Yasuyoshi A, Yuji F, Shuichi K. Health food with poly(γ -glutamic acid) as the chief ingredient [P]. 日本专利: 5095767A2,199324220
 - 8 Konno A, Taguchi T, Yamaguchi T. Bakery products and noodles containing polyglutamic acid[P]. US Patent No. 4888193,1989
 - 9 Yahata K, Sadanobu J, Endo T. Preparation of poly-benzyl- γ -glutamic acid fiber[J]. Polym Prepr Jpn, 1992, 42: 1 077
 - 10 陈咏竹,孙启玲, γ -多聚谷氨酸的性质、发酵生产及其应用[J].微生物学通报,2004,31(1):122~126
 - 11 杨 革,陈 坚,曲音波,等. 细菌聚 γ -谷氨酸的研究[D]. 江南大学博士学位论文,2001.53
 - 12 桑 莉,徐 虹,李 晖,等. γ -聚谷氨酸产生菌的筛选及发酵条件[J]. 过程工程学报,2004,4(5):462~466
 - 13 Hong Xu, Min Jiang, Hui Li, et al. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Process Biocemistry, 2005,40:519~523
 - 14 Ogawa Y, Yamaguchi F, Yuasa K. Efficient Production of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus subtilis* (natto) in Jar Fermenters[J]. Biosci Biotech Biochem, 1997,61(10):1 684~1 687

Optimizing Fermentation of Polyglutamic Acid by Unrefined Glutamic Acid as Raw Material

Liu Cen Xu Zhinan Shi Feng Cen Peilin

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT In order to reduce the cost of fermentation of polyglutamic acid, *Bacillus subtilis* CGMCC No.1250 screened in our lab was applied to produce polyglutamic acid with the best substitutes of sodium glutamate, unrefined (glutamic acid) raw material. The effects of the substitutes of sodium glutamate, carbon source, nitrogen source and their concentrations, volume, temperature on γ -PGA synthesis were evaluated. The best carbon and nitrogen sources were sucrose and tryptone. When 70 g/L of sucrose, 50 g/L of tryprone, 30 g/L of NaCl and 26.6% (v/v) of unrefined raw material(120 g/L of sodium glutamate) were added to the media(pH7.0), CGMCC No.1250 was cultivated at 37℃, 220 r/min, for 24 hours, the productivity of γ -PGA reached 41.7g/L.

Key words polyglutamic acid, glutamic acid, unrefined (glutamic acid) raw material

市场动态

青岛啤酒悄然进军台湾

青岛啤酒股份有限公司是中国最大的啤酒生产商和销售商之一。2005年,中国啤酒产量首次突破3 000 000万L大关,达到3 061 000万L,同比增长5.2%,产销量已连续4年位居世界第1,但增长率较2004年趋缓。同时,啤酒行业呈现了新一轮整合的态势,以国际国内大企业之间的并购整合规则和大型企业的全国布局调整为主。通过规则整合,大企业的市场份额在不断提高,国内前10大啤酒生产商已占全国市场份额的61%,较2004年再提高6%。

近年来,青岛啤酒股份有限公司不断加大对产品品牌、品种结构整合的力度,2005年,主品牌全年销量达133 000万L,同比增长近14%,青岛主品牌与汉斯、崂山、山水等前6大品牌的销量已达总销量的66%,同比也提高了7%。

在进行产品结构调整的同时,青岛啤酒股份有限公司不断加大投资力度,以获得更大的市场。目前其已在全国18个省市拥有50家啤酒厂,覆盖了中国发达地区的主要市场,年啤酒生产能力超过510 000万L。“青啤大优”全年实现销量较大增长,市场占有率由原来不足5%迅速提升至目前的20%;而在台湾地区,青岛啤酒与当地经销商合作建设的规模10万t台湾青啤股份有限公司,首期5万t已于2005年5月正式投产,青岛啤酒悄无声息地进入台湾人民的生活,不得不说是个奇迹。