

文章编号:1009-038X(2004)05-0006-05

聚 γ -谷氨酸高产突变株的选育及摇瓶发酵条件

徐艳萍, 王树英, 李华钟*, 陈坚

(江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)进行亚硝基胍和 ^{60}Co 诱变, 获得一株 γ -PGA的高产菌株C₉。 γ -PGA质量浓度由9.44 g/L提高到19.76 g/L, 提高了109%。突变株传代10次, 质量浓度保持基本稳定。通过正交试验和单因素试验对发酵培养基及发酵条件进行了优化。当发酵培养基中含柠檬酸12 g/L、甘油80 g/L、L-谷氨酸23 g/L、氯化铵7 g/L, pH7.0, 装液量为50 mL/250 mL三角瓶, 接种体积分数为5%时, 37℃摇瓶发酵72 h, γ -PGA达到23.32 g/L。

关键词:聚 γ -谷氨酸; 诱变; 地衣芽孢杆菌; 摇瓶发酵

中图分类号:Q 933

文献标识码:A

Screening of High Productive Mutant of γ - Polyglutamic Acid and Its Fermentation Conditions

XU Yan-ping, WANG Shu-Ying, LI Hua-zhong*, CHEN Jian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A high productive mutant of γ -PGA was obtained from *Bacillus licheniformis* WBL-3 with mutagenesis by NTG and ^{60}Co . The concentration of γ -PGA was increased from 9.44 g/L to 19.76 g/L and the mutant showed genetic stability during 10 generations. The medium composition and the cultivation conditions were optimized by orthogonal and single factor experiment. When the mutant C₉ was cultivated with inoculation size of 5%, at 37℃, pH 7.0, for 72 hours, in the medium containing 12 g/L citric acid, 80 g/L glycerol, 23 g/L L-glutamic acid, and 7 g/L ammonium chloride, the final concentration of γ -PGA reach 23.32 g/L.

Key words: γ -Poly(glutamic acid); mutagenesis; *Bacillus licheniformis*; flask fermentation

聚 γ -谷氨酸[γ -Poly(glutamic acid), γ -PGA]是一种可由微生物合成的胞外氨基酸聚合物, 它由D-型和L-型谷氨酸通过酰胺键连接而成。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, 通常由5 000个左右的谷氨酸单体组成。相对分子质量一般在 $10 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 。

PGA及其衍生物可广泛用作药物缓释材料^[1]、土壤、沙地的蓄水保水剂^[2]、食品的水凝胶^[3], 以及高强度纤维^[4]等。由于一般的 γ -PGA产生菌的产量较低, 为此作者对 γ -PGA生产菌*Bacillus licheniformis* WBL-3进行亚硝基胍(NTG)和 ^{60}Co 诱变处理, 选育出一株聚谷氨酸高产突变株, 并对其摇瓶发酵条件进行了研究。

收稿日期:2003-12-04; 修回日期:2004-01-06。

基金项目:教育部高等学校重点实验室访问学者基金项目(Y66002)资助课题。

作者简介:徐艳萍(1978-), 女, 山东郯城人, 环境工程硕士研究生; * 责任作者。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* WBL-3):由江南大学生物工程学院环境生物技术研究室提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 组分(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 10,酵母膏 3,琼脂 20 pH 7.5。

1.2.2 选择性筛选平板培养基 组分(g/L):柠檬酸 10,谷氨酸 10, NH_4Cl 6, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCl_2 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05,琼脂 20 pH 7.5。

1.2.3 种子培养基 组分(g/L):柠檬酸 10,谷氨酸 10, NH_4Cl 6, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCl_2 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH 7.5。

1.2.4 发酵培养基 组分(g/L):柠檬酸 13.5,谷氨酸 10, NH_4Cl 6.8,甘油 75, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCl_2 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH 7.5。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化 取 WBL-3 菌种一环,接入新鲜斜面培养基内,37℃培养 20 h。

1.3.2 种子培养 250 mL 三角瓶内装 50 mL 种子培养基,接种活化后的斜面培养物一环,于摇床培养,转速 200 r/min,37℃培养 24 h。

1.3.3 发酵培养 以体积分数 5% 的接种量将种子液接入发酵培养基,250 mL 三角瓶内装培养基 50 mL,于 37℃摇瓶柜中振荡培养,转速 200 r/min,37℃培养 72 h。

1.4 诱变方法与筛选方法

1.4.1 亚硝基胍诱变 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℃、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 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液悬浮,调整菌数为 $(1 \sim 5) \times 10^8$ 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亚硝基胍的试管(质量浓度 100 mg/L),于 30℃振荡处理,每隔 10 min 取样用平板菌落计数,计算致死率。以根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,挑取光滑粘稠菌落筛选^[4]。

1.4.2 ^{60}Co 诱变 将制备好的菌悬液 5 mL 移至 6 支无菌试管中。用 ^{60}Co γ 射线处理,分别以 400,600,800,1000,1200,1400 Gy 的剂量处理样品。分别从每个试管样品取出 0.1 mL 的菌悬液,做适当稀释。吸取稀释后的菌悬液 0.1 mL,涂布选择性平板,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剂量进行诱变处理后,于液体培养基中培养。约 10 h 后,按不同稀释度涂筛选平板,挑取光滑粘稠菌落筛选^[4]。

1.5 分析方法

1.5.1 pH 的测定 用 pH S-3 型 pH 计(日本日立公司产品)测定。

1.5.2 含菌量测定 用 721 分光光度计(上海天达实验器材公司制造)测定 600nm 下菌悬液的光密度。

1.5.3 致死率计算

$$\text{致死率} = \left(1 - \frac{\text{诱变后活菌数 CFU/mL}}{\text{诱变前活菌数 CFU/mL}}\right) \times 100\%$$

1.5.4 γ -PGA 的测定 对发酵液离心去除菌体,取上清液测谷氨酸单体的含量;将上清液与 12 mol/L 的盐酸按 1:1(体积比)加入玻璃水解管中,真空封口后于 110℃水解 24 h,然后测定水解液中谷氨酸总量,2 次测得的谷氨酸之差为 γ -PGA 的含量。

1.5.5 谷氨酸测定 用 HITACHI H835-50 氨基酸分析仪(日本日立公司产品)分析。

1.6 主要试剂

亚硝基胍为瑞士 Fluka 公司产品,其余均为国产分析试剂。

2 结果与讨论

2.1 诱变及突变株的筛选

2.1.1 亚硝基胍诱变 致死率试验表明,0.1 mg/mL 的 NTG 对 *B. licheniformis* WBL-3 作用 30 min 时 *B. licheniformis* WBL-3 的致死率为 90%。以此处理剂量对 *B. licheniformis* WBL-3 进行诱变,从筛选平板上挑取粘稠、光滑的菌落 50 株,以 γ -PGA 产量为考察目标,经发酵培养基摇瓶复筛得到 4 株 γ -PGA 产量提高幅度较大的突变株,见表 1。

将上述菌株中 γ -PGA 产量最高的突变菌株 N_4 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。

2.1.2 ^{60}Co 诱变 以 ^{60}Co 对突变株 N_4 进行诱变剂量为 20.64 C/kg 的诱变处理时,致死率约为 65%。从筛选平板上挑取粘稠、光滑的菌落 100 株,

经发酵培养基复筛得到 12 株突变株,见表 2.

表 1 亚硝基胍诱变结果

Tab. 1 The result of mutagenesis by NTG		
菌 株	γ -PGA	
	产量/(g/L)	提高百分率/%
WBL-3	9.44	0
N ₁	10.90	15.47
N ₂	15.17	60.70
N ₃	14.15	49.89
N ₄	16.04	69.91

表 2 N₄突变株经⁶⁰Co 的诱变结果

Tab.2 The mutagenic result of mutant N ₄ by ⁶⁰ Co					
菌 株	γ-PGA		菌株	γ-PGA	
	产量/ (g/L)	提高 百分率/%		产量/ (g/L)	提高 百分率/%
出发菌株	15.48	0	C ₇	18.64	20.41
C ₁	16.20	4.65	C ₈	19.12	23.51
C ₂	16.58	7.10	C ₉	19.76	27.65
C ₃	18.10	16.93	C ₁₀	16.78	8.40
C ₄	17.20	11.11	C ₁₁	18.82	21.58
C ₅	16.94	9.43	C ₁₂	17.86	15.38
C ₆	17.58	13.57			

从上述菌株中挑出 γ -PGA 产量最高、相对粘度最大的菌株 C₉,接入斜面,置冰箱保存待用.

2.2 突变株的传代稳定性

将所选突变株 C₉在斜面培养基中 24 h 转接一次,共转接 10 代,测定每次传代后的产物量,结果见图 1,表明突变株具有较好的传代稳定性.

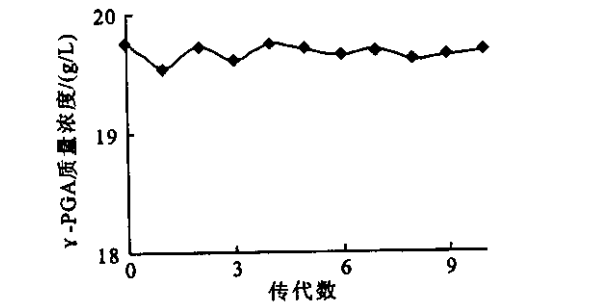


图 1 C₉ 突变株的传代稳定性

Fig. 1 Genetic stability of mutant C₉

2.3 C₉摇瓶发酵营养条件

2.3.1 柠檬酸对 γ -PGA 产量的影响 Atsuo Goto^[5]等人研究了枯草芽孢杆菌的 γ -PGA 与三羧酸循环的关系,通过¹³C 标记的柠檬酸作为培养基,发现添加柠檬酸可以促进 γ -PGA 的生成.图 2 表明,当柠檬酸质量浓度为 14 g/L 时 γ -PGA 产量最高.

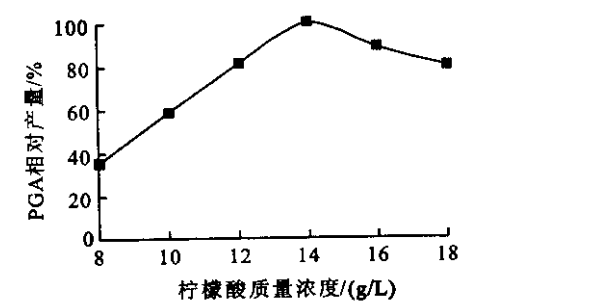


图 2 柠檬酸对 γ -PGA 产量的影响

Fig. 2 Effect of citric acid on γ -PGA production

2.3.2 甘油对 γ -PGA 产量的影响 考察不同甘油质量浓度对 γ -PGA 产量的影响,结果(见图 3)表明,甘油质量浓度在 80 g/L 时, γ -PGA 产量最高,但是随着甘油质量浓度继续增大, γ -PGA 产量逐渐下降.这可能是由于环境中质量浓度过高的甘油使渗透压升高,不利于 γ -PGA 由胞内向胞外分泌,进而抑制菌体的正常代谢活动.

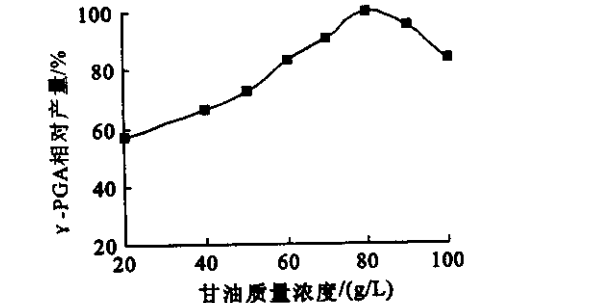


图 3 甘油对 γ -PGA 产量的影响

Fig. 3 Effect of glycerol on γ -PGA production

2.3.3 L-谷氨酸对 γ -PGA 产量的影响 γ -PGA 是由谷氨酸单体通过谷氨酸聚合酶合成的,谷氨酸是 γ -PGA 的合成前体物.从图 4 可以看出,当 L-谷氨酸质量浓度为 25 g/L 时 γ -PGA 产量最高.

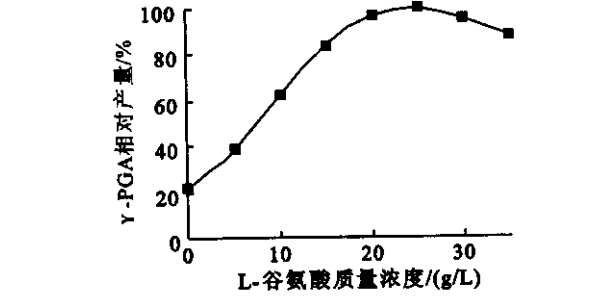


图 4 不同质量浓度的 L-谷氨酸对 γ -PGA 合成的影响

Fig. 4 Effect of L-glutamic acid on γ -PGA production

2.3.4 氯化铵对 γ -PGA 产量的影响 氯化铵为细胞的生物合成提供氮源.培养基中谷氨酸质量浓度与 γ -PGA 产量之间的关系(见图 5)表明,氯化铵质量浓度为 7 g/L 时对 γ -PGA 的生物合成最为有利.

2.3.5 正交试验 结合上述单因素试验,以

γ -PGA 产量为指标,选取甘油、柠檬酸、谷氨酸及氯化铵为考察因素,安排了四因素三水平的正交试验方案,其因素水平表及正交试验结果分别见表 3、4。

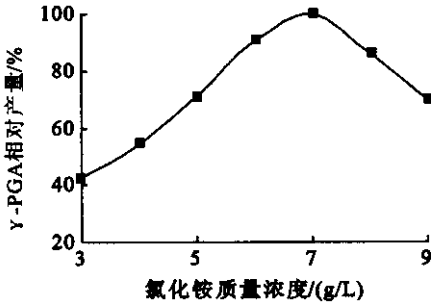


图 5 氯化铵质量浓度对 γ -PGA 产量的影响
Fig.5 Effect of ammonium chloride on γ -PGA

表 3 正交试验因子 $L_9(3^4)$ 水平表

Tab.3 Factors and lever of orthogonal test				
水平	甘油 质量浓度/ (g/L) A	柠檬酸 质量浓度/ (g/L) B	谷氨酸 质量浓度/ (g/L) C	氯化铵 质量浓度/ (g/L) D
1	70	12	20	6.5
2	80	14	23	7.0
3	90	16	26	7.5

表 4 正交试验结果

Tab.4 Results of orthogonal test					
实验号	A	B	C	D	γ -PGA/质量 浓度/(g/L)
1	1	1	1	1	19.53
2	1	2	2	2	18.18
3	1	3	3	3	12.82
4	2	1	2	3	16.31
5	2	2	3	1	23.23
6	2	3	1	2	15.15
7	3	1	3	2	17.71
8	3	2	1	3	11.66
9	3	3	2	1	23.77
γ -PGA 质量浓度/(g/L)					
K 值	A	B	C	D	
K_1	50.53	53.55	46.34	66.53	
K_2	54.69	53.07	58.26	51.04	
K_3	53.14	51.74	53.76	40.79	
k_1	16.84	17.85	15.45	22.18	
k_2	18.23	17.69	19.42	17.01	
k_3	17.71	17.25	17.92	13.60	
R	1.39	0.96	3.97	8.58	

表 5 方差分析表明,氯化铵是影响较为显著的因素,4 个因素对发酵影响的主次顺序为 $D > C > A > B$ 。结合极差与方差分析,其最佳工艺条件为 $A_2B_3C_2D_1$,即甘油 80 g/L,柠檬酸 12 g/L,谷氨酸 23 g/L,氯化铵 7.0 g/L。

表 5 方差分析

Tab.5 Analysis of variance					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
A	2.95	2	1.48	5.00	
C	24.16	2	12.08	40.95	*
D	111.95	2	55.98	189.75	**
误差	0.59	2	0.30		
总和	139.64	8			

注:因为误差的自由度为 0,所以选择平方和最小的一个作为误差; $F_{0.01}(2,2)=99.00$, $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.025}(2,2)=39.00$ 。

2.4 摇瓶发酵的培养条件

2.4.1 培养基 pH 对 γ -PGA 合成的影响 在正交培养基的基础上考察了 pH 值对 γ -PGA 合成的影响。发酵过程中培养液的 pH 值是微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标,它除了对细胞发生直接影响外,还对细胞产生不同的间接影响,即影响培养基中营养物质的离子化程度,从而影响微生物对营养物质的吸收,影响环境中有害物质对微生物的毒性,以及影响代谢反应中各种酶的活性等。图 6 表明,pH 值对 γ -PGA 的生物合成有着显著的影响,当 pH 值为 7.0 时对 γ -PGA 的生物合成最为有利。

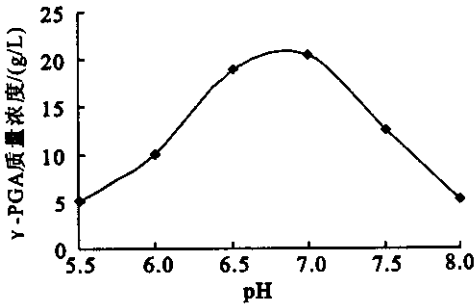


图 6 不同 pH 值对 γ -谷氨酸合成的影响

Fig.6 Effect of different pH γ -PGA production

2.4.2 温度对 γ -PGA 合成的影响 在正交培养基基础上考察了温度对 γ -PGA 合成的影响。由于微生物的生命活动是由一系列生化反应组成的,而这些反应受温度的影响极为明显,因此,温度是影响微生物生长的最重要的因素之一。表 6 表明,37℃是 γ -PGA 合成的较适宜的温度。

2.4.3 接种量对 γ -PGA 合成的影响 在正交培养基基础上考察了接种量对 γ -PGA 合成的影响。

接种量对 γ -PGA 的影响见表 7. 较适宜的接种量为体积分数 5% .

表 6 不同温度对 γ -PGA 合成的影响
Tab.6 Effect of different temperature on γ -PGA fermentation

温度/℃	γ -PGA 质量浓度/(g/L)
28	7.57
30	11.91
35	18.52
37	21.03
40	19.42

表 7 不同接种量对 γ -PGA 合成的影响
Tab.7 Effect of inoculation size on γ -PGA production

接种体积分数/%	γ -PGA 质量浓度/(g/L)
3	18.38
5	20.82
8	20.03
10	19.78

2.4.4 装液量对 γ -PGA 合成的影响 在正交培养基基础上考察了装液量对 γ -PGA 合成的影响. 250 mL 三角瓶中不同装液量对 γ -PGA 发酵的影响见表 8. 结果表明 ,在 250 mL 三角瓶内装液量为 50 mL 时 γ -PGA 产量最高.

表 8 不同装液量对 γ -PGA 合成的影响
Tab.8 Effect of different volume on γ -PGA production

装液体积/mL	γ -PGA 质量浓度/(g/L)
20	19.32
40	19.55
50	21.16
60	11.27
80	5.29

参考文献：

[1] 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.

[2] 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.

[3] Yasuyoshi A , Yuji F , Shuichi K. Health food with poly(γ -glutamic acid) as the chief ingredient [P]. 日本专利 : 5095767A2 , 1993-4-20.

[4] Yahata K , Sadanobu J , Endo T. Preparation of poly-benzyl- γ -glutamic acid fibe[J]. **Polym Prepr Jpn** , 1992 , 42 :1077.

[5] Goto A , Kunioka M. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid , citric acid , and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IF03335[J]. **Applied Microbiology Biotechnology** , 1994 , 40 :867 – 872.

[6] Elizabeth C , King A , Blacker J , *et al.* Enzymatic breakdown of poly- γ -D-glutamic Acid in *Bacillus licheniformis* : identification of a polyglutamic γ -hydrolase enzyme[J]. **Biomacromolecules** , 2000 , 1 : 75 – 83.

2.5 优化条件下 γ -PGA 摇瓶发酵过程曲线

图 7 是 γ -PGA 的发酵过程曲线. 从图中可以看出 γ -PGA 在前 16 h 的产量很低 ,这段时间主要是菌体细胞生长期. 发酵 72 h 后 γ -PGA 产量达到 23.32 g/L ; 72 h 后 γ -PGA 的产量下降 ,可能是 γ -PGA 发生了降解^[6].

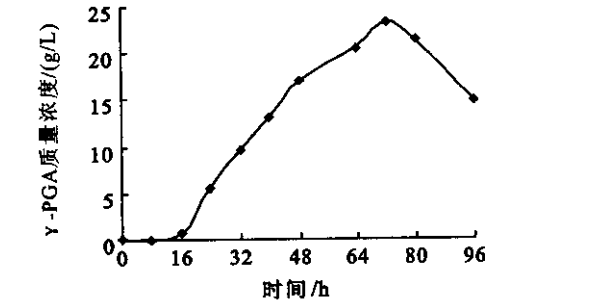


图 7 C₉ 的摇瓶发酵过程曲线
Fig.7 Time-course of γ -PGA flask fermentation

3 结 论

通过亚硝基胍、⁶⁰Co 诱变 ,获得一株突变株 C₉ ,其 γ -PGA 的产量由 9.44 g/L 提高到 19.76 g/L ,提高了 109% ,而且传代稳定. 这说明亚硝基胍和⁶⁰Co诱变是提高 γ -PGA 产量的一种行之有效的诱变方法. 对突变株 C₉的发酵条件研究表明 ,培养基的组分柠檬酸、甘油、L-谷氨酸和氯化铵以及发酵条件 pH 值、温度、接种量和装液量对突变株 γ -PGA的生物合成都有一定程度的影响. 通过正交试验得到发酵培养基中 4 种组分的质量浓度分别为 柠檬酸 12 g/L ,甘油 80 g/L ,L-谷氨酸 23 g/L ,氯化铵 7 g/L 时 ,pH 7.0 ,温度为 37 ℃ ,接种量体积分数为 5% ,装液量为 50 mL/ 250 mL 三角瓶时 ,经 72 h 发酵 γ -PGA 产量达到 23.32 g/L ,比优化前提高了 18% .