

利用枯草芽孢杆菌发酵生产 γ -聚谷氨酸

桑秀梅, 王晶, 赵杰, 高品, 刘萍, 殷志敏*

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子医学重点实验室, 南京 210046)

摘要: 利用实验室筛选得到的一株枯草芽孢杆菌发酵生产 γ -聚谷氨酸 (γ -PGA), 主要对其发酵工艺参数进行了优化。先通过单因素优化及 PB 试验筛选重要因子, 然后利用 Box-Behnken 优化发酵工艺最佳组合, 获得了最佳培养基组成和最佳培养条件, 且在摇床水平上使 γ -PGA 产量由最初的 $6.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $10.98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。接着通过对补料工艺的探索, 确定了最佳补料时间和补料配方, 最后在 5 L 发酵罐上进行了放大生产, 最终 γ -PGA 的最高产量可达到 $31.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 枯草芽孢杆菌; γ -PGA; 发酵工艺优化

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0567-07

Production of poly- γ -glutamic acid by fermentation of *Bacillus subtilis*

SANG Xiumei, WANG Jing, ZHAO Jie, GAO Pin, LIU Ping, YIN Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210046)

Abstract: In this study, we optimized the fermentation parameters of poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis*, a strain selected through a lab screen. A single factor experiment and PB experiment were first carried out, and then the optimal composition of the medium and optimum culture conditions were obtained by optimizing the fermentation process with Box-Behnken. The yield of γ -PGA increased from $6.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $10.98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at the shaker level. We further explored the feeding process to determine the best time and feeding materials. Finally, a 5 L fermentor was used to increase the production, and the highest yield of γ -PGA reached to $31.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: *Bacillus subtilis*; γ -PGA; optimization of fermentation process

γ -PGA 是一种可由微生物合成的聚氨基酸化合物, 由 D-型或 L-型谷氨酸通过 γ -酰胺键连接而成, 分子量在 $100\sim 1\ 000 \text{ kDa}$ 不等。是一种可食用、易降解、无毒害和水溶性好的生物高分子材料, 在医药、环保、农业、食品和化妆品行业拥有广阔的应用空间^[1-2]。

γ -PGA 的合成方法最早是从植物纳豆中提取的, 但是该法成本高, 后来又通过多肽合成法和谷氨酸二聚体脱水缩合法等化学合成法来合成, 但是化学合成法技术要求高, 难度大, 产量低。近来也有报道通过微生物酶法合成 γ -PGA, 但是其合成产物分子量一般较小, 应用空间不大。而微生物发酵法是近几年来发展最快也是应用最广的制取 γ -PGA

的方法, 其条件简单, 周期短, 产物分子量较大, 是目前最具工业化生产的方式^[1-2]。日本味之素株式会社和中国台湾味丹企业均已开发利用微生物合成 γ -PGA 的工艺, 并进行了工业化生产。

本试验通过对实验室分离的一株枯草芽孢杆菌生产聚谷氨酸的发酵工艺参数进行探究优化, 目的是提高 γ -PGA 的产量, 降低成本, 同时为大规模微生物合成 γ -PGA 提供新方法和思路, 对 γ -PGA 发酵产业产生一定的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 枯草芽孢杆菌由本实验室分离保存。

收稿日期: 2016-12-26

基金项目: 江苏省科技厅产学研联合创新资金“前瞻性研究项目 (BY2013001-03)”资助。

作者简介: 桑秀梅, 硕士研究生。E-mail: 1571343401@qq.com

* 通信作者: 殷志敏, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

1.1.2 培养基 种子培养基: LB 液体培养基(蛋白胨 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母粉 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 氯化钠 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

基础培养基: 葡萄糖 $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母粉 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 谷氨酸钠 $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH6.5。

1.1.3 主要仪器与设备 摇床, 培养箱, pH 计, 多功能酶标仪, SBA-40D 生物传感分析仪, 5 L 发酵罐, KRH-BIO3000 型发酵罐控制系统。

1.1.4 主要化学试剂 蛋白胨、酵母粉购自英国 OXOID 公司; 葡萄糖、氯化钠、七水硫酸镁、硫酸锰、氯化铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、柠檬酸和十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 等分析纯类均购于国药集团化学试剂有限公司; 果糖-1,6-二磷酸(FDP)为本实验室自己生产。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验 挑取菌株单菌落至装有 4 mL LB 液体培养基中, 37°C , $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 震荡培养 16 h。将各种影响因素在基础发酵培养基的条件上逐一改变, 然后将种子液按 3% 的接种量转接至 40 mL 的仅改变某一因素的发酵培养基中(250 mL 锥形瓶), 37°C , $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 震荡培养 24 h, 通过检测并比较 γ -PGA 产量来确定每个因素的最佳值^[3-5]。

1.2.2 PB 试验 采用 PB 设计对单因素试验得到的 8 种显著因素进行筛选, 各因素的浓度水平及范围见表 3, 本试验采用 Design-Expert.V8.0.6 软件进行试验设计和结果分析^[6]。枯草芽孢杆菌的培养方法和发酵时间同单因素试验。

1.2.3 Box-Behnken 试验 根据 PB 试验确定的因素和水平, 采用 Box-Behnken 设计对 γ -PGA 发酵培养基进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验设计, 利用 Design-Expert.V8.0.6 软件对试验结果进行分析^[7-9]。枯草芽孢杆菌的培养方法和发酵时间同单因素试验。

1.2.4 补料试验 先绘制发酵曲线, 即按最佳培养基组合和最佳培养条件恒温振荡培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 测定菌体量、产物合成量、葡萄糖和谷氨酸钠残余量。再探究补料时间: 在发酵时间至 16、18 和 20 h 时补加质量浓度为 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖, 继续恒温培养至 24 h。最后, 在最佳补料时间分别补

加 A、B、C 和 D 配料, 继续恒温培养至 48 h ^[10-11]。配方如下:

A: 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

B: 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

C: 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, FDP $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

D: 葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $2.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, FDP $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 柠檬酸 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.5 5L 发酵罐放大试验 发酵培养基即是本试验所优化的培养基, 装液量为 3 L, 发酵初期, 搅拌速度为 $230 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 通风量为 0.5 vvm, 后期搅拌速度可增至 $290 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 通风量可增至 1.0 vvm。

1.2.6 分析方法 pH 测定: pH 计和 pH 试纸。

γ -PGA 产量测定: 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[12]。

生物量的测定: 发酵液稀释 10 倍后测 OD_{600} 。

残糖、残谷氨酸钠含量测定: 发酵液稀释 100 倍后采用生物传感分析仪。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

先通过比较 5 种不同碳源和 4 种不同氮源对 γ -PGA 产量的影响, 确定了最佳碳源是葡萄糖, 最佳氮源是酵母粉, 结果如表 1 和表 2 所示。然后经过试验确定了最佳碳源浓度为 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最佳氮源浓度为 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 底物 L-谷氨酸钠的最佳浓度为 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 促进剂 NH_4Cl 的最佳浓度为 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸盐 K_2HPO_4 的最佳浓度为 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过比较不同金属离子对 γ -PGA 产量的影响来选出影响最显著的金属离子, 结果表明一定范围内的 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 FeCl_3 对生产 γ -PGA 有促进作用, CaCl_2 作用不明显, 而低浓度的 ZnCl_2 对生产 γ -PGA 有抑制作用, 结果如图 1 所示。因此, 单因素优化的培养基组成为葡萄糖 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、谷氨酸钠 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NH_4Cl $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

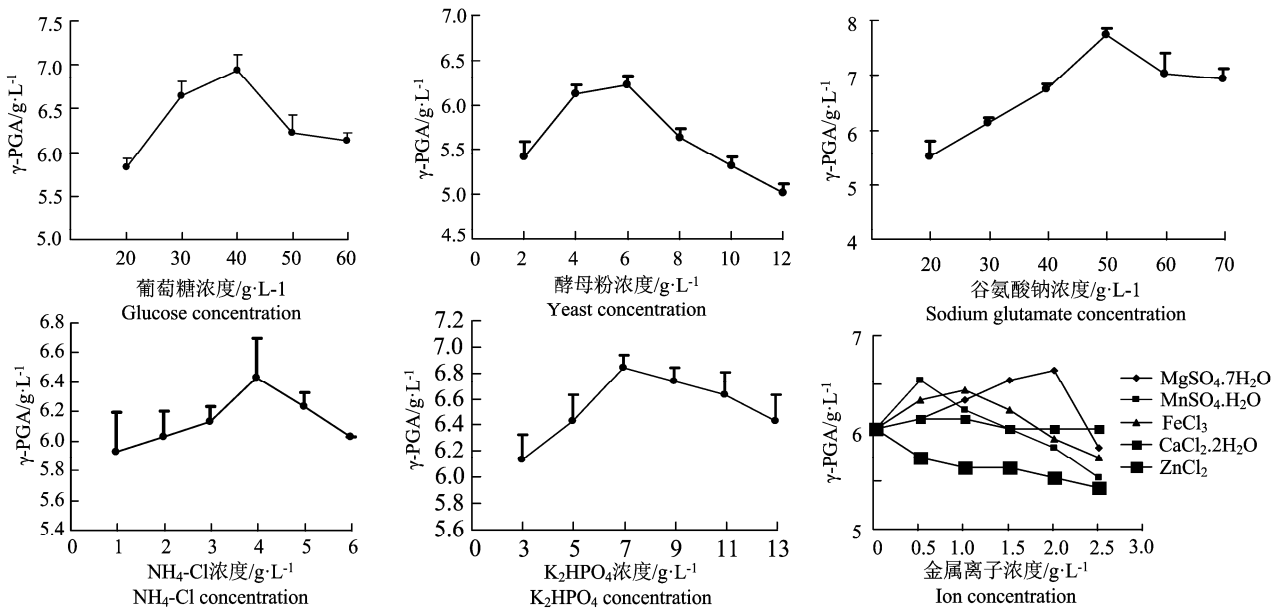
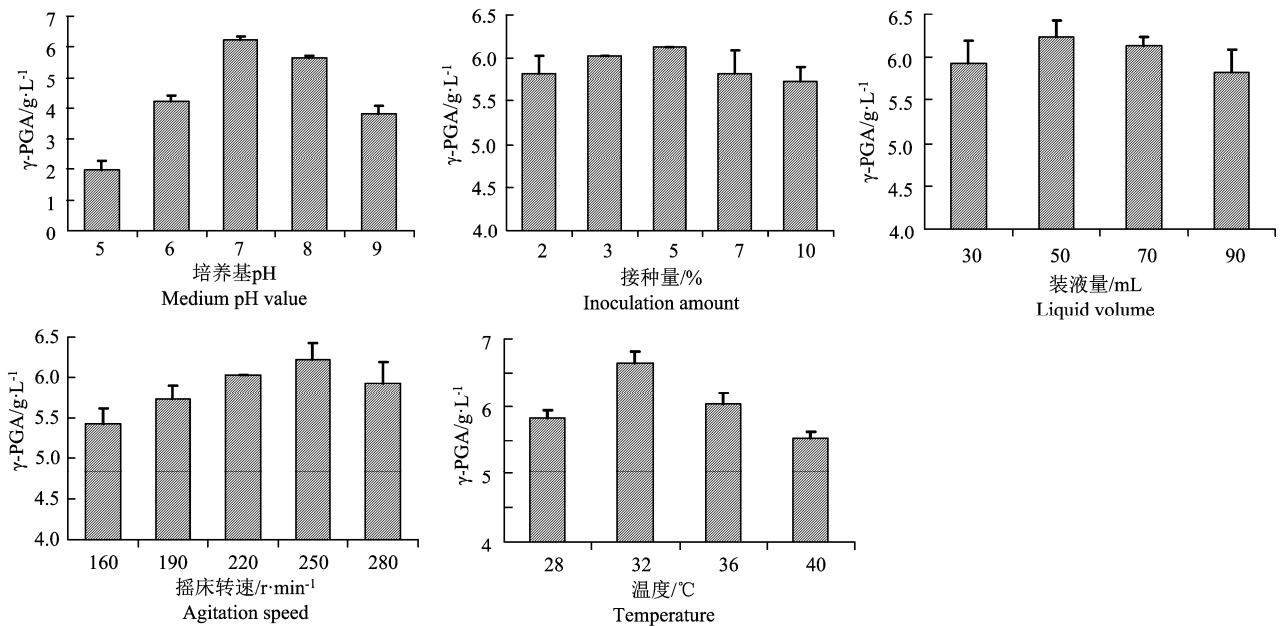
表 1 不同碳源对菌体生长和 γ -PGA 产量的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on cell growth and production of γ -PGA

碳源 Carbon source	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	柠檬酸 Citric acid	麦芽糖 Maltose	甘油 Glycerin
OD_{600}	10.52 ± 0.58	9.35 ± 0.59	0.84 ± 0.06	10.2 ± 0.66	8.93 ± 0.20
γ -PGA/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6.03 ± 0.46	5.42 ± 0.35	1.08 ± 0.1	5.72 ± 0.18	5.12 ± 0.46

表 2 不同氮源对菌体生长和 γ -PGA 产量的影响Table 2 Effects of different nitrogen sources on cell growth and production of γ -PGA

氮源 Nitrogen source	酵母粉 Yeast	玉米浆 Corn syrup	大豆蛋白胨 Soy peptone	蛋白胨 Peptone
OD_{600}	11.25±0.97	3.62±0.34	10.94±0.33	8.7±0.68
γ -PGA/g·L ⁻¹	6.23±0.44	2.29±0.1	5.63±0.61	5.01±0.40

图 1 不同浓度原料对 γ -PGA 产量的影响Figure 1 Effects of raw materials with different concentrations on production of γ -PGA图 2 不同培养条件对 γ -PGA 产量的影响Figure 2 Effect of different culture conditions on production of γ -PGA

在确定了培养基组成的基础上, 探究了不同培养条件对 γ -PGA 产量的影响, 结果 (图 2) 显示, 该菌的最适 pH 为 7, 最适发酵温度为 32 °C, 最适接种量为 5%, 最适装液量为 50 mL (250 mL 锥形瓶), 最适摇床转速为 250 r·min⁻¹。

2.2 Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素

通过单因素试验选取了 8 个因素: 葡萄糖、酵母粉、谷氨酸钠、NH₄Cl、MgSO₄·7H₂O、转速、温度和 K₂HPO₄, 依次设计为 PB 试验设计的 8 个因素 X₁、X₂、...X₇ 和 X₈, 每个因素分别取 2 个水平, 低

水平和高水平的取值如表 3 所示, γ -PGA 的产量作为响应值 Y ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 试验次数为 12。试验设计与结果见表 4。从表 4 可以看出, 经过 F 、 T 检验, 选取的 8 种因素对响应值 γ -PGA 的产量的显著性排列为

谷氨酸钠 > 葡萄糖 > K_2HPO_4 > $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ > NH_4Cl > 温度 > 酵母粉 > 转速。筛选结果表明谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 是影响 γ -PGA 产量的重要因素, 其中谷氨酸钠和葡萄糖对 γ -PGA 产量影响显著。

表 3 各因素的变化范围
Table 3 Range of the eight factors

X	因素 Factor	下限 (-1) Lower limit	上限 (1) Upper limit
X_1	葡萄糖/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose	30	50
X_2	酵母粉/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Yeast	4	8
X_3	谷氨酸钠/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Sodium glutamate	40	60
X_4	$\text{NH}_4\text{Cl}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3	5
X_5	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.5	2.5
X_6	转速/ $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ Agitation speed	220	280
X_7	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	28	36
X_8	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6	8

表 4 PB 试验设计、响应值与极差分析
Table 4 Experimental design, responses and intuitive analysis of Plackett-Burman design

编号 No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	Y
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	7.46
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	7.65
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	9.3
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	5.45
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	6.82
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	5.13
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	6.34
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5.69
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	9.14
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	5.85
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	9.94
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.65
F -test	47.74	0.28	61.47	2.54	4.78	0.15	2.13	6.43	
$P_{i>t}$	0.0062	0.6346	0.0043	0.2095	0.1166	0.7283	0.2409	0.0851	
Ranking	2*	7	1*	5	4	8	6	3	

注:*为 0.05 水平上的显著性差异。Note:"*" refers to the different significance at 0.05 levels.

表 5 Box-Behnken 因子水平编码
Table 5 Factors and levels for response surface analysis

编码 Code	A	B	C
水平 Level	谷氨酸钠/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Sodium glutamate	葡萄糖/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
-1	40	30	6
0	50	40	7
1	60	50	8

2.3 Box-Behnken 优化发酵培养基组合

为进一步优化发酵工艺, 基于 Plackett-Burman 试验设计得到的试验分析结果, 采用响应面分析法中的 Box-Behnken 设计法对发酵工艺进行优化。从以上的 PB 试验得知, 谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 是

影响 γ -PGA 产量的重要因素, 因此以这 3 个因素为自变量, 以 γ -PGA 的产量为响应值, 设计 3 因素 3 水平的试验, 寻找出上述 3 个因素的最优浓度水平。据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 共设计了 17 个试验, 其中 5 个为零点, 用于估计试验误差。各因

素水平、试验设计和试验结果如表 5 和表 6 所示。

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Experimental design and responses in Box-Behnken design

编号 No.	A	B	C	γ -PGA/g·L ⁻¹
1	0	-1	-1	10.38
2	0	0	0	10.48
3	1	0	1	9.36
4	0	1	1	10.07
5	0	0	0	10.38
6	-1	1	0	8.76
7	0	1	-1	8.25
8	1	0	-1	10.27
9	0	0	0	10.38
10	0	0	0	10.58
11	1	-1	0	10.37
12	-1	0	1	9.36
13	0	-1	1	9.36
14	-1	0	-1	8.15
15	-1	-1	0	9.46
16	1	1	0	9.46
17	0	0	0	10.48

根据上面设计的试验水平及自变量因素, 在摇瓶中进行发酵试验。试验中通过响应面分析软件对试验结果进行分析以及二次项拟合处理, 得到以 γ -PGA 的产量 Y 为响应值, 与谷氨酸钠 (A)、葡萄糖 (B) 和 K_2HPO_4 (C) 的回归方程:

$$Y=10.46+0.47^*A-0.38^*B+0.14^*C-0.053^*A^*B-0.53A^*C+0.71^*B^*C-0.59^*A^2-0.36^*B^2-0.59^*C^2$$

对试验

结果进行全模方差分析, 分析结果如表 7 所示。

由表 7 可知, 回归模型 P 值 0.001, 说明模型建立影响显著, 进而可以用来进行响应值预测。模型中的失拟项为 $0.1423 > 0.05$, 说明该模型失拟不显著, 不需要再引进更高的次数项。本试验中 R^2 为 0.9905, 说明预测值与试验值的相关度较高。模型中的 $R^2=0.9905$, $R^2_{Adj}=0.9782$, 说明的模型拟合效果良好。C.V=1.20%, 相对误差较小, 该模型能够表示 γ -PGA 的产量。同时, 由全模方差分析可知 A^2 、 B^2 和 C^2 的 P 值较小, 对响应值影响显著, 说明谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 是影响 γ -PGA 产量的重要因素。经全模方差结果分析可知, 回归方程中谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 是影响 γ -PGA 产量的重要因素, 谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 对 γ -PGA 的产量的影响见图 3。

分析响应曲线图可知, 响应值中有使 γ -PGA 产量最高的发酵工艺组合, 由 Design-Expert.V8.0.6 软件分析可知, 发酵工艺的最佳组合为谷氨酸钠 $58.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 为 $6.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 该组合培养条件下 γ -PGA 的产量理论值可达 $10.94 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其余培养基成分和培养条件均相同, 将菌种分别使用 Box-Behnken 优化组合的培养基和单因素优化组合培养基发酵 γ -PGA, γ -PGA 的产量分别为 $10.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 产量相对提高 8%, 较未优化前的 $6.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 产量相对提高 82%。

表 7 Box-Behnken 试验方差分析

Table 7 Analysis of variance of the full-mode

因素 Source	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
回归模型 Model	10.02	9	1.11	80.94	0.001
A	1.74	1	1.17	126.45	<0.001
B	1.15	1	1.15	83.44	<0.001
C	0.15	1	0.15	11.00	0.0128
AB	0.011	1	0.011	0.80	0.4004
AC	1.12	1	1.12	81.70	<0.001
BC	2.02	1	2.02	146.61	<0.001
A ²	1.46	1	1.46	106.12	<0.001
B ²	0.54	1	0.54	39.40	0.0004
C ²	1.45	1	1.45	105.22	<0.001
残差 Residual	0.096	7	0.014		
失拟项 Lack of fit	0.068	3	0.023	3.25	0.1423
纯误差 Pure error	0.028	4	0.007		
总差 Overall error	10.11	16			
$R^2=0.9905$	$R^2_{Adj}=0.9782$	C.V=1.20%			

2.4 补料工艺优化

在最佳培养基组成和最佳培养条件下, 在摇瓶

水平上发酵生产 γ -PGA, 并跟踪取样, 测定菌体量、残糖量、残余谷氨酸钠量及 γ -PGA 产量, 绘制曲

线如图4。由图4可知随着发酵的进行,经过4h的延滞期菌体量开始快速增加,18h达到稳定。 γ -PGA随着菌体量的增加而持续合成,24h发酵结束时 γ -PGA质量浓度达到最大,即 $10.98\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。葡萄糖

在12h时消耗加快。18h后浓度低于 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,此时菌体生长速率开始减小。在发酵后期发现葡萄糖耗尽,而谷氨酸钠仍有大量剩余,因此考虑在16~20h之间对其进行补料。

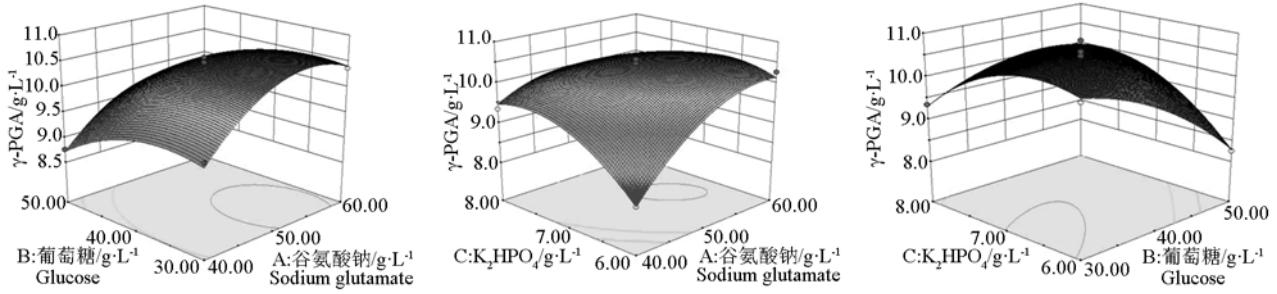


图3 谷氨酸钠、葡萄糖和 K_2HPO_4 对 γ -PGA的产量的影响

Figure 3 Effects of sodium glutamate, glucose and K_2HPO_4 on production of γ -PGA

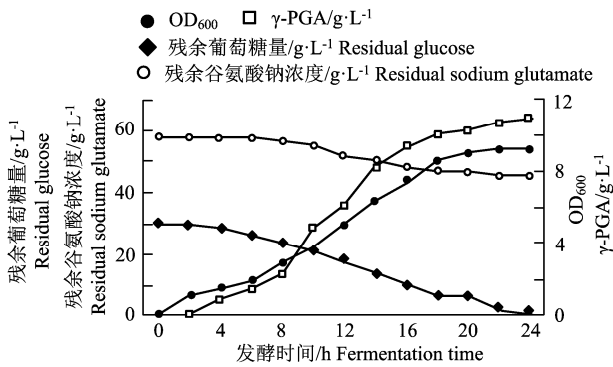


图4 γ -PGA 发酵曲线

Figure 4 Curves of γ -PGA fermentation

本研究先考察了不同时间补加葡萄糖对 γ -PGA产量的影响。经过3次重复试验得出24h的发酵结果(表8)显示18h补糖效果最佳。可能原因是16h时发酵液中葡萄糖浓度仍较高,若继续补加会使发酵液中葡萄糖浓度过高,此时菌体会利用葡萄糖进行快速分裂增长,而不是合成 γ -PGA。而18h葡萄糖剩余量较少,菌体量有一定积累,此时补加葡萄糖有利于菌体合成 γ -PGA。20h补料,最终产物的合成也有提高,但不如18h补料结果明显。

对于微生物发酵而言,营养成分的补给方式也很重要,它不仅影响菌体生长而且会对目标产物合

成有很大影响。根据经验,确定18h补糖浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,使得总糖量为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;氮源通过发酵过程中使用氨水调节pH值的方法来补加;底物谷氨酸钠在发酵时间结束时浓度较高,还有 $45\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,所以不添加。为了提高 γ -PGA产量,在添加葡萄糖的基础上按培养基中葡萄糖与其他营养元素的比例添加无机盐,FDP和柠檬酸。故设计出A、B、C和D4种配方。根据本试验设计的补料配方A、B、C和D,在第18小时进行补料,跟踪取样,观察葡萄糖,底物,以及产物变化,发酵培养48h,经过3次重复试验得出结果如表9。从表9可以看出,A组单独补加葡萄糖收效不明显,B、C、D组有较明显提高,但产量提高最多的是D组,即补加葡萄糖,无机盐,FDP和柠檬酸。可能原因是柠檬酸和柠檬酸盐对微生物的生长有重要的促进作用,而FDP能聚增细胞内高能磷酸池,产生大量的ATP,能促进菌体生长并为产物合成提供能量,具体机制仍在进一步研究中。

48h后跟踪测糖直至糖完全耗掉,发现 γ -PGA量并没有提高,分析原因可能是发酵液黏度越来越大,已严重影响发酵液中的溶氧,菌体供氧不足会影响菌体生长,还会促进菌体合成 γ -PGA降解酶导致 γ -PGA产量降低。因此选择一次补料是更为经济有效的提高产量和生产效率的方法。

表8 补料时间对 γ -PGA产量的影响

Table 8 Effect of feed time on production of γ -PGA

补料时间/h Feed time	残糖量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Residual glucose	补糖量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Added glucose	总糖量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Total glucose	γ -PGA量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Production of γ -PGA
16	10	20	50	12.09 ± 0.35
18	7	20	50	13.30 ± 0.17
20	6	20	50	12.49 ± 0.10

表 9 补料配方对 γ -PGA 产量的影响
Table 9 Effect of feed formula on production of γ -PGA

补料配方 Feed formula	菌体量 OD600 Cell growth	残糖量/g·L ⁻¹ Residual glucose	残谷氨酸钠量/g·L ⁻¹ Residual sodium glutamate	γ -PGA 量/g·L ⁻¹ Production of γ -PGA
A	15.82	14	43	15.52±0.10
B	15.24	16	41	16.94±0.17
C	15.31	12	40	18.45±0.18
D	15.77	13	38	20.07±0.10

通过摇瓶补料发酵试验,对枯草芽孢杆菌合成 γ -PGA 进行研究,在不补料的情况下,摇瓶培养 24 h, γ -PGA 产量最高仅为 10.98 g·L⁻¹,在补料发酵中,第 18 小时补料,产量提高最明显,因此选定 18 h 为最佳补料时间。在对其补料配方的确定中,D 配方补料产量提高最多,确定了 D 配方为最佳配方。在第 18 小时补加 D 配方的试验中,培养至 48 h 产量达到最高 20.07 g·L⁻¹。

2.5 5 L 发酵罐放大试验

为了进一步检验摇瓶试验结果的可靠性,本研究通过在 5 L 发酵罐中进行放大试验,选择 D 配方,在发酵进行到 18 h 时进行补料,培养 48 h。测量结果显示, γ -PGA 产量由原来的 22.09 g·L⁻¹ 提高到 31.18 g·L⁻¹,相比提高了 41%。

3 讨论

本研究通过优化最佳发酵工艺参数,先经单因素优化及 PB 试验确定了谷氨酸钠、葡萄糖和 K₂HPO₄ 对 γ -PGA 产量有重要影响。后借助 Design-Expert.V8.0.6 软件进行响应面试验的设计和数据分析,得到回归模型,筛选出了以谷氨酸钠、葡萄糖、酵母粉和 K₂HPO₄ 等为主要原料的发酵培养基组成和最佳发酵条件,摇瓶发酵试验结果接近于目前一般工业发酵生产 γ -PGA 的水平^[6-8]。最后通过对补料工艺的探索,确定了最佳补料时间和补料配方,并在 5 L 发酵罐上进行了放大生产, γ -PGA 产量提高到 31.18 g·L⁻¹,接近于目前一般工业发酵生产 γ -PGA 的水平^[10-11],而且筛选所得的原料廉价易得,适用于大规模的 γ -PGA 工业化发酵生产。

参考文献:

- [1] 王卫国,王卫,赵永亮,等. γ -聚谷氨酸的研究及应用进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(2): 117-122.
- [2] 王浩,杨丽萍,乔君,等. γ -聚谷氨酸的研究进展[J]. 山东食品发酵, 2011(4): 30-34.
- [3] 吴青录,秦秀丽. 枯草芽孢杆菌液体培养条件的研究[J]. 吉林农业, 2012(4): 64-65.
- [4] 叶倩君,邹水洋,董锦安,等. 枯草芽孢杆菌 Dg5041 液体发酵生产 γ -聚谷氨酸[J]. 广东化工, 2014, 41(14): 25-27.
- [5] 李宏杰,方军,蒋彩霞,等. γ -聚谷氨酸发酵工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(14): 79-82.
- [6] 张智维,刘婷,张海群. 响应面法优化 γ -聚谷氨酸发酵条件[J]. 中国调味品, 2015, 40(7): 56-60.
- [7] 贺杨扬,曾伟,王青龙,等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产 γ -聚谷氨酸发酵工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 147-151.
- [8] 张海群,张智维,刘婷. γ -聚谷氨酸产生菌发酵培养基的响应面优化研究[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(1): 79-83.
- [9] 洒荣波,王辉,高艳霞,等. 黄伞胞外多糖发酵培养基的响应面法优化[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 722-725.
- [10] 王青龙,陈桂光,郑双凤,等. 发酵生产 γ -聚谷氨酸的补料策略[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(9): 52-56.
- [11] 吕萌,梁金钟,王凤青. 补料发酵枯草芽孢杆菌合成 γ -聚谷氨酸的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 225-228.
- [12] 张庆庆,金鑫强,陈剑翔,等. 发酵液中 γ -聚谷氨酸含量快速测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 294-296.