

# 一株产 $\gamma$ -PGA的芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件的优化

李晨霞, 梁晶, 孙丽慧\*

(大连理工大学食品与环境学院, 辽宁盘锦 124221)

**摘要:**目的:筛选一株高产 $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA)的菌株,并优化其发酵条件。方法:从豆腐作坊周边土地取样,采用平板稀释涂布法,筛选高产 $\gamma$ -PGA的菌株,通过菌落形态、分子生物学方法对其进行鉴定;以 $\gamma$ -PGA产量为响应值,在单因素实验的基础上,以温度、pH、转速、底物浓度为实验因素,采用Box-Behnken法设计四因素三水平试验进行响应面优化,确定其产 $\gamma$ -PGA最佳发酵条件。结果:筛选获得一株高产 $\gamma$ -PGA的芽孢杆菌B-6578,鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*);通过单因素和响应面最终获得该芽孢杆菌发酵产 $\gamma$ -PGA的最佳条件为:温度37.5℃, pH7.48, 转速240 r/min, 底物浓度52.70 g/L, 摇瓶发酵36 h,  $\gamma$ -PGA的产量达到24.82 g/L,  $\gamma$ -PGA转化率为47.10%,比优化前提高了25.19%。结论:采用响应面法优化得到的发酵条件方便可行,利于 $\gamma$ -PGA的进一步开发利用。

**关键词:** $\gamma$ -聚谷氨酸, 芽孢杆菌, 分离, 鉴定, 响应面法

## Isolation and Identification of a Strain of *Bacillus* Producing $\gamma$ -PGA and Its Fermentation Conditions Optimization

LI Chen-xia, LIANG Jing, SUN Li-hui\*

(School of Food and Environment, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China)

**Abstract:** Objective: A strain with high-yield of the  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -polyglutamic acid) was isolated and purified, and the fermentation conditions for the  $\gamma$ -PGA production were optimized. Methods: A strain of high-yield of  $\gamma$ -PGA production was isolated and identified from the soil around the tofu workshop, the strain was isolated and purified by plate dilution method, and then the strain was identified by the morphological and its 16S rDNA sequence. On the basis of single factor experiment, with temperature, pH, rotating speed and substrate concentration as experimental factors, the Box-Behnken method was adopted to optimize the fermentation conditions. Results: The strain was named as *Bacillus siamensis*. By the experiments of single factor and Box-Behnken design, the optimal culture conditions were as follows: Temperature 37.5 °C, pH7.48, speed 240 r/min, substrate concentration 52.70 g/L, in the condition of shaking flask fermentation 36 h,  $\gamma$ -PGA yield was of 24.82 g/L, the substrate utilization of monosodium glutamate was 47.10%, increased by 25.19% than before optimization. Conclusion: It was convenient and feasible to optimize the fermentation conditions by the response surface method, which is beneficial to the further development and utilization of the  $\gamma$ -PGA.

**Key words:**  $\gamma$ -PGA; *Bacillus*; isolation; identification; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)19-0101-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.018

**引文格式:** 李晨霞, 梁晶, 孙丽慧. 一株产 $\gamma$ -PGA的芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 101-108.

$\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -glutamic acid, 简称 $\gamma$ -PGA), 是由D-谷氨酸和L-谷氨酸单体, 通过 $\gamma$ -酰胺键连接而成的一类均聚氨基酸<sup>[1]</sup>, 最先发现于炭疽杆菌的荚膜中<sup>[2]</sup>。 $\gamma$ -PGA是一种水溶性、可被生物降解、不含毒性的大分子聚合物, 其分子链上大量游离的羧基, 使其具有羧基聚合物的普遍性质。此外, 大量活性位点使它便于进行材料的功能化<sup>[3-4]</sup>。聚谷氨酸的应用范围十分广泛, 分为化妆品级、食品级、药品级、

水处理级、土壤、植物调节剂级等<sup>[5-6]</sup>。尤其在注重环保、强调可持续发展的社会大环境下, 由生物合成的可降解功能型材料 $\gamma$ -PGA, 正日益受到人们的关注, 逐渐地应用于医药制造<sup>[7]</sup>、食品加工、果蔬产品、海产品的防冻和保鲜, 以及化妆品工业及植物种子保护等许多领域, 是一种开发价值大、应用前景广阔的多功能新型生物材料<sup>[8]</sup>, 具有重要的研究价值。

目前合成 $\gamma$ -PGA的方法有化学合成法和生物

收稿日期: 2018-02-09

作者简介: 李晨霞(1998-), 女, 大学本科, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: lichexia920@mail.dlut.edu.cn。

\* 通讯作者: 孙丽慧(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: sunlihui@dlut.edu.cn。

基金项目: 国家级大学生创新创业项目(2017101419802011261)。

合成法<sup>[9-10]</sup>。利用微生物发酵合成 $\gamma$ -PGA具有其独特的优点,例如:经济高效、对环境污染小、反应条件温和等。在 $\gamma$ -PGA的微生物发酵生产中,培养基的组成以及对发酵条件的控制都会显著影响 $\gamma$ -PGA的分子结构组成、相对分子量以及产率。尽管国内外众多学者已经在发酵法生产 $\gamma$ -PGA上取得了很多的研究成果,但目前研究中仍存在着一些不足之处,或是底物谷氨酸钠的利用率低;或是发酵产量比较低,这些问题都不利于 $\gamma$ -PGA的工业化生产。

本文从豆腐作坊周边的土地取样,筛选获得一株高产 $\gamma$ -PGA的暹罗芽孢杆菌,并通过单因素实验和响应面法对其发酵条件进行优化,提高了 $\gamma$ -PGA的产量和转化率,为发酵生产 $\gamma$ -PGA的工业化提供一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

土样品 辽宁省某村庄豆腐作坊周边的土壤取样,表层土,下挖5 cm和10 cm的土;PCR扩增细菌16S rDNA的试剂盒、PCR裂解液 宝生物工程(大连)有限公司;革兰氏染色液试剂盒 青岛海博生物技术有限公司;牛肉膏、胰蛋白胨、酵母膏、琼脂、D-甘露糖、D-核糖、L-鼠李糖 北京奥博星生物技术有限责任公司;味精(谷氨酸钠含量 $\geq 99\%$ ) 红梅味精有限公司;玉米浆 实验室自制;其他试剂 均为分析纯。

梅里埃 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定仪 法国梅里埃公司;麦氏比浊仪 法国梅里埃公司;SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;HPX-9272MBE 电热恒温培养箱 上海博讯实业有限公司;ZWY-1102C 恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 重庆东悦仪器有限公司;光学显微镜 宁波永新光学股份有限公司;SBA-40C 生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 分离平板培养基(g/L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  16,  $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$  40,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  7,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.16,  $\text{MnSO}_4$  0.104,  $\text{FeCl}_3$  0.104, 酵母膏 5, 琼脂 20, 甘油 16, pH7.0~7.4, 115 °C 灭菌 20 min; 液体发酵培养基(g/L):  $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$  80,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  7,  $\text{MgSO}_4$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MnSO}_4$  0.104,  $\text{CaCl}_2$  0.05, 葡萄糖 45, 胰蛋白胨 40, 酵母膏 20, pH7.0, 115 °C 灭菌 20 min; 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5,  $\text{NaCl}$  5, pH7.0, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 菌株的筛选 取适量土样加入 30 mL 无菌水中,充分振荡后静置 2 h,取上层清液 100  $\mu\text{L}$ ,与 900  $\mu\text{L}$  无菌水混合均匀,按此方法进行浓度梯度稀释,选择进行涂布的稀释度为  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ ,每个稀释度涂 3 个平板作为平行,每个平板接种 200  $\mu\text{L}$ ,37 °C 培养 24 h。待平板长出菌落,对长势较好的单菌落进行编号,依次接种到液体发酵培养基中,37 °C,220 r/min 培养 36 h。参照文献[11]的方法测定 $\gamma$ -PGA的产量,检测发酵液中 $\gamma$ -PGA的含

量,选取 $\gamma$ -PGA含量最高的菌株,进行进一步纯化至纯种并保藏,以待后续研究。

1.2.3 菌株的保藏 按 2% 的接种量<sup>[9]</sup>,将上述发酵液接种至种子培养基中,37 °C,220 r/min 培养 18 h。将种子培养基与 40% 的甘油 1:1 混合,于-20 °C 冷冻保藏。

### 1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 菌落形态观察 用肉眼观察分离平板培养基上的菌落形态,然后挑取少量菌落于载玻片进行革兰氏染色,用油镜观察。

1.2.4.2 分子生物学鉴定 16S rDNA 序列扩增与分析 挑取培养基上的菌体于 50  $\mu\text{L}$  TaKaRa Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR (Code No.9164) 中变性后离心(12000  $\times$  g 4 °C,30 min)取上清作为模板,反应条件:80 °C,15 min;然后使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No.RR176)进行 PCR 扩增目的片段,经琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收目的片段,由宝生物工程(大连)有限公司进行测序,通过 NCBI 数据库在线 BLAST 系统进行序列比对,以确定种属。

系统发育树的构建:使用 BLAST 将 16S rDNA 测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上比对,在比对结果中选择模式菌株,据同源性搜索结果,使用 MEGA 5.0 生物学软件,对测试菌株和相关菌株的多个序列进行比对分析及 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.2.4.3 生理生化鉴定 挑取纯化的菌株加至 3 mL 生理盐水中,振荡混匀后,利用麦氏比浊仪测定菌悬液浊度达到 1.80~2.20 麦氏浓度,按照 BCL 芽孢杆菌鉴定卡的操作说明书,进行 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统分析。

1.2.5 单因素实验 分别以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、果糖为碳源,每种碳源的加入量为 40 g/L;分别以牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、玉米浆、酵母膏为氮源,每种氮源的加入量为 40 g/L,于 37 °C、pH7.0,220 r/min 恒温振荡培养 36 h,考察不同碳、氮源对 $\gamma$ -PGA转化率的影响。接着分别探究最适碳、氮源的浓度在 30、35、40、45、50、55、60、65、70 g/L 时,于 37 °C、pH7.0,220 r/min 恒温振荡培养 36 h,考察 $\gamma$ -PGA的转化率的变化。以温度(25、30、35、40、45 °C),pH7.0,转速 220 r/min;pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0),温度 37 °C,转速 220 r/min;转速(160、180、200、220、240 r/min),温度 37 °C,pH7.0,于 1.2.1 的液体发酵培养基,振荡培养 36 h,测定其 $\gamma$ -PGA的产量,考察温度、pH、转速对 $\gamma$ -PGA的产量的影响。以底物谷氨酸钠浓度(20、30、40、50、60 g/L),其余均与 1.2.1 所示的液体发酵培养基相同,温度 37 °C,pH7.0,转速 220 r/min 振荡培养 36 h,考察底物浓度对 $\gamma$ -PGA转化率的影响。按 1.2.2 所述方法测得 $\gamma$ -PGA的产量,采用下列方程计算转化率。所有实验均重复 3 次。

$$\gamma\text{-PGA 转化率}(\%) = \frac{\text{发酵液 } \gamma\text{-PGA 质量浓度 (g/L)}}{\text{底物质量浓度 (g/L)}} \times 100$$

1.2.6 响应面实验 在单因素实验的基础上,选取

温度、pH、转速及底物浓度这四个因素作为多因素交叉组合实验的考察因素,以  $\gamma$ -PGA 的产量作为响应值,利用响应面中的 Box- Behnken Design 方法设计实验,实验组合的因素水平编码见表 1。

表1 Box- Behnken 中心组合实验设计因素和水平  
Table 1 Factors and levels of Box- Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 温度(℃)	25	35	45
B pH	5.0	7.0	9.0
C 转速(r/min)	160	200	240
D 底物浓度(g/L)	20	40	60

1.3 数据处理

单因素实验结果用 Design-Expert 8.0 软件进行分析处理,采用 origin Pro 8.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 高产  $\gamma$ -PGA 菌株的筛选

利用分离平板培养基共检出 12 个菌株,通过观察菌落形态,初步确定这些菌株为芽孢杆菌。将上述获得的菌株分别进行摇瓶培养,发酵条件为 37℃, 220 r/min, 培养 36 h, 利用参考文献[11]所示方法,检测发酵液中  $\gamma$ -PGA 的含量,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,不同芽孢杆菌产  $\gamma$ -PGA 的能力不同,从表层土中筛选出的菌株(以 B 开头的编号)产  $\gamma$ -PGA 的能力要明显好于从下挖 5 cm(以 X5 开头的编号),下挖 10 cm(以 X10 开头的编号)的土样中筛选出的菌株,菌株 B-6578 产  $\gamma$ -PGA 的能力相对较高,达到 17.53 g/L,因此将其进一步分离纯化,保藏待用。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学观察 将菌株 B-6578 在固体培养基上培养 36 h 后,菌株在平板上的单菌落呈圆形,隆起,表面有褶皱,湿润,不透明,边缘不齐,颜色为淡黄色(图 1a),革兰氏染色鉴定为阳性菌(图 1b),呈杆状。

表2 不同发酵液中  $\gamma$ -PGA 含量比较结果  
Table 2 Comparison of  $\gamma$ -PGA production after fermentation by different bacillus

菌株编号	$\gamma$ -PGA 含量 (g/L)	菌株编号	$\gamma$ -PGA 含量 (g/L)
B-801	11.84	X5-524	4.24
B-227	14.17	X5-146	3.16
B-358	15.58	X5-238	4.39
B-6578	17.53	X5-581	2.53
B-125	13.68	X10-147	1.89
B-254	9.34	X10-367	0.00



图1 菌株 B-6578 菌落形态(a)和革兰氏染色镜检结果(b)  
Fig.1 Colony morphology(a) and Gram-stain microscopic examination(b) of strain B-6578

2.2.2 菌株 16S rDNA 序列分析 以菌株基因组 DNA 为模板,经过 PCR 扩增后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,目的片段大约为 1500 bp,将 PCR 产物回收纯化后测序,确定该片段实际长度为 1513 bp。该序列已提交 Genbank,登记号为 MG066538。将该序列在 NCBI 中 Blast 比对发现,菌株与暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*),解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*),地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的同源性极高,序列相似性达到 99%。使用分子软件 MEGA 5.0 对 B-6578 相似度较高的菌株进行多序列比对分析,并利用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树(图 2)。由图可以看出,芽孢杆菌 B-6578 与暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*) 同源性

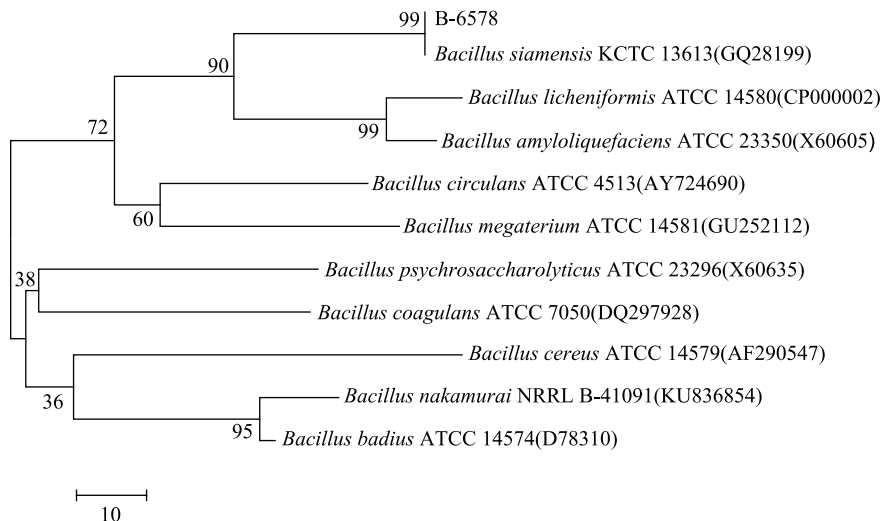


图2 芽孢杆菌 B-6578 基于 16S rDNA 序列及 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree of bacillus strain B-6578 using neighbor-joining based on 16S rDNA



表3 菌株 B-6578 生理生化实验鉴定结果

Table 3 Identification results of physiological and biochemical test of strain B-6578

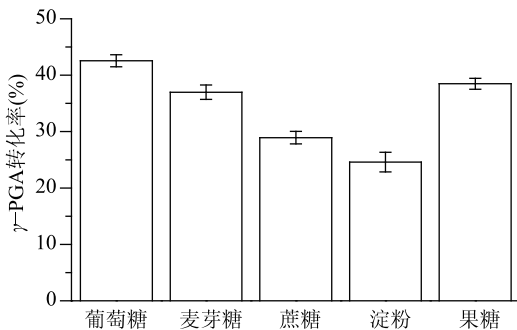
菌株	D-甘露糖	D-核糖	L-鼠李糖
B-6578	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (X60605) <sup>[16]</sup>	+	-	+
<i>Bacillus siamensis</i> (KMB17270) <sup>[16]</sup>	-	+	-
<i>Bacillus licheniformis</i> (N0.8) <sup>[17]</sup>	+	+	-

最高,结合生理生化鉴定实验结果(表3),鉴定为暹罗芽孢杆菌。

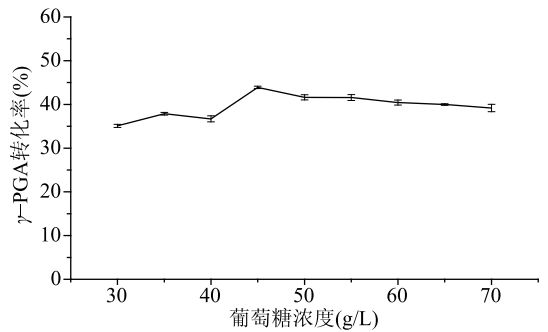
暹罗芽孢杆菌对禾谷镰刀菌有很好的拮抗作用,禾谷镰刀菌可引起小麦赤霉病,导致小麦产量的大幅降低和品质的严重损失。因此,在农业生产中,暹罗芽孢杆菌可提高植株抗病能力<sup>[14-16]</sup>。更为重要的是,尚未见该菌株在 $\gamma$ -PGA生产领域的相关报道,因此,本文对暹罗芽孢杆菌产 $\gamma$ -PGA的发酵条件进行优化。

### 2.3 单因素实验

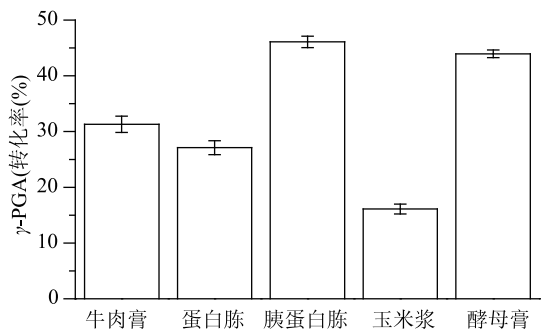
**2.3.1 不同碳源对发酵的影响** 在基础培养基的基础上,分别以40 g/L葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、果糖作为碳源,考察不同碳源对发酵的影响(图3)。总体来看,菌体利用淀粉、蔗糖的能力较差,生长受到一定程度的抑制;葡萄糖、麦芽糖、果糖均显示了较好的 $\gamma$ -PGA的生产性,综合考虑生产成本和原料来源这两个因素<sup>[18-19]</sup>,选择葡萄糖为最佳碳源。进一步研究初始葡萄糖浓度为30~70 g/L对发酵的影响(图4)。结果显示,随着葡萄糖浓度的增加,发酵液中 $\gamma$ -PGA的终浓度逐渐增加。而在初始葡萄糖浓度为45 g/L时, $\gamma$ -PGA的转化率最高,而后,随着初始葡萄糖浓度的增加, $\gamma$ -PGA的转化率反而出现下降的趋势。这可能是由于在高浓度糖基质中,发酵液渗透压增加,从而对菌体生长及其代谢造成一定的抑制作用。因此为了获得较高的 $\gamma$ -PGA转化率,避免高糖浓度对微生物造成的抑制作用,考虑选择发酵初始葡萄糖浓度为45 g/L,进行发酵培养。

图3 碳源种类对发酵 $\gamma$ -PGA的影响Fig.3 Effects of different carbon sources on the fermentation  $\gamma$ -PGA

**2.3.2 不同氮源对发酵的影响** 在基础培养基的基础上,分别以40 g/L的牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、玉米浆<sup>[10]</sup>、酵母膏作为氮源,考虑氮源种类对发酵产 $\gamma$ -PGA的影响(图5)。从图5中可以看出,胰蛋白胨和酵母膏的 $\gamma$ -PGA的转化率明显高于其他氮源,这可能是因为胰蛋白胨和酵母膏中氨基氮的含量均大

图4 葡萄糖浓度对发酵产 $\gamma$ -PGA的影响Fig.4 Effects of different glucose concentrations on the production of  $\gamma$ -PGA

于3%,可以满足微生物生长和代谢的需要。因此,采用胰蛋白胨与酵母膏2:1的复合氮源进行发酵<sup>[20-21]</sup>,有利于芽孢杆菌的生长。进一步研究当该复合氮源初始浓度为30~70 g/L对发酵的影响(图6),结果显示,初始复合氮源浓度为40 g/L时, $\gamma$ -PGA的转化率最高,因此,以胰蛋白胨和酵母膏的比为2:1的复合氮源的最适浓度为40 g/L。

图5 氮源种类对发酵 $\gamma$ -PGA的影响Fig.5 Effects of different nitrogen sources on the fermentation  $\gamma$ -PGA

**2.3.3 温度对发酵的影响** 温度对发酵产 $\gamma$ -PGA的影响结果如图7所示。可见,当温度为35℃时,芽孢杆菌B-6578合成 $\gamma$ -PGA的产量最高,为20.39 g/L。温度过高或过低不仅对菌株的正常生长有影响,而且发生反应所需要的酶在高温下失活,在低温下活性受到较大的抑制,从而导致 $\gamma$ -PGA的产量降低。而梁金钟等<sup>[22]</sup>在利用枯草芽孢杆菌时发现,菌株在37℃时, $\gamma$ -PGA的产量最高,与本文的结果基本相近。因此,本研究选择35℃作为进一步发酵培养的温度。

**2.3.4 pH对发酵的影响** 适宜的pH是菌株生长的必要条件,更重要的是会影响菌株的代谢途径,从而起到调控代谢的作用。通过对pH优化发现(图8),

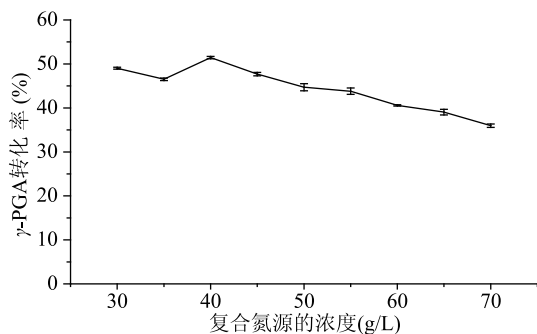


图6 复合氮源不同浓度对发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响  
Fig.6 Effect of different compound nitrogen source concentrations on the production of  $\gamma$ -PGA

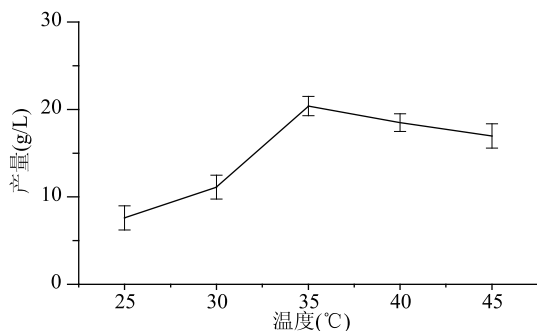


图7 温度对 B-6578 合成  $\gamma$ -PGA 的影响  
Fig.7 Effect of temperature on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

随着初始 pH 的不断增加,芽孢杆菌 B-6578 合成  $\gamma$ -PGA 的量也在不断增加,当初始 pH 达到 7 时,产量最大,为 17.28 g/L,之后随着初始 pH 的继续增加,  $\gamma$ -PGA 的产量却逐渐降低。另外,该菌株在 pH 为 6~8 时,能保持较好的生长,而任尚美等<sup>[10]</sup>和 Feng 等<sup>[23]</sup>结果均表明,pH 为 7 时,  $\gamma$ -PGA 的产量最高,与本文结果相符。因此,选择 pH 为 7 作为进一步发酵的 pH。

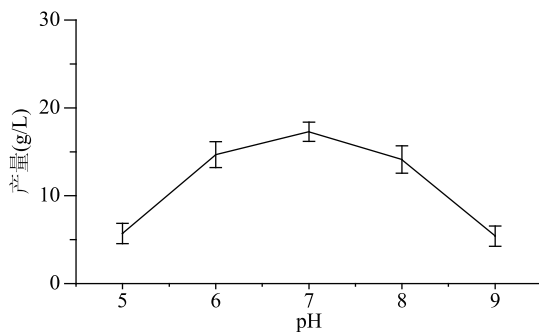


图8 pH 对 B-6578 合成  $\gamma$ -PGA 的影响  
Fig.8 Effect of pH on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

2.3.5 转速对发酵的影响 摇床的转速和装液量影响着发酵液中溶解氧的含量,这对于好氧微生物的发酵是一个重要因素,产  $\gamma$ -PGA 的暹罗芽孢杆菌是好氧菌,且在  $\gamma$ -PGA 这种高黏度的发酵体系中尤为突出,  $\gamma$ -PGA 的产量与氧的传递和料液的氧密度紧密相关,当装液量为 50 mL/250 mL 时,发酵产量最高<sup>[24]</sup>。

通过对转速的研究发现(图 9),当转速大于 200 r/min 时,  $\gamma$ -PGA 的产量较高,转速较低时,由于发酵液的黏度较高,含氧量低,不利于菌株的生长,  $\gamma$ -PGA 的产量也就较低。因此,选择转速 200 r/min 进行进一步发酵。

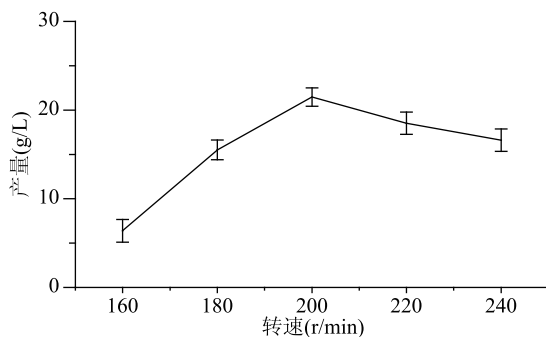


图9 转速对 B-6578 合成  $\gamma$ -PGA 的影响  
Fig.9 Effect of rotational speed on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

2.3.6 底物浓度对发酵的影响 底物谷氨酸钠对  $\gamma$ -PGA 合成的影响如图 10,可以看出,随着谷氨酸钠浓度的增大,  $\gamma$ -PGA 的转化率也逐渐增大,当谷氨酸钠浓度变为 40 g/L 时,  $\gamma$ -PGA 的转化率最大,为 44.78%,之后随着谷氨酸钠浓度的继续增大,  $\gamma$ -PGA 的转化率反而出现下降。可见,底物浓度过高时,可能会降低参与反应的酶活,从而导致实际转化率降低<sup>[25]</sup>。在芽孢杆菌发酵产  $\gamma$ -PGA 的途径中,作为底物的谷氨酸钠的浓度至关重要。浓度过低,菌株不能充分发挥催化转化的能力,浓度过高则会造成转化率低,使成本增加。任尚美等<sup>[10]</sup>通过正交实验发现,谷氨酸钠用量对  $\gamma$ -PGA 产量的影响最大。因此,选择谷氨酸钠的浓度为 40 g/L 进行进一步发酵。

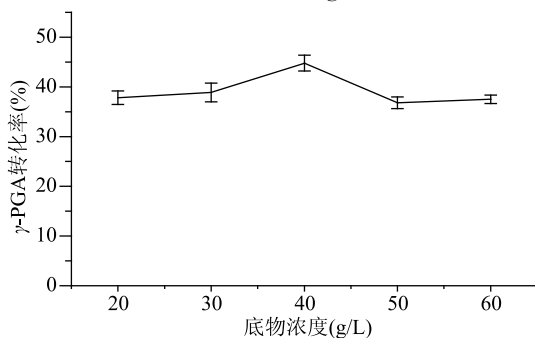


图10 底物浓度对 B-6578 合成  $\gamma$ -PGA 的影响  
Fig.10 Effect of substrate concentration on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

## 2.4 响应面优化芽孢杆菌 B-6578 合成 $\gamma$ -PGA 条件

2.4.1 响应面试验设计及结果 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,选择温度、pH、转速、底物浓度为优化参数,以产量为响应值,对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 实验进行四因素三水平响应面设计,结果见表 4。采用 Design-Expert 8.0.6 软件,对实验数据进行二次多项回归拟合,回归结果与方差分析见表 5,得到目标响应值与各因素关系的二阶经验

表4 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 4 Experiment design and results of Box-Behnken response surface

实验号	A 温度	B pH	C 转速	D 底物浓度	$R_1$	实验号	A 温度	B pH	C 转速	D 底物浓度	$R_1$ (g/L)
1	1	-1	0	0	13.28	16	0	0	0	0	24.89
2	-1	0	0	-1	9.13	17	1	0	0	1	17.26
3	-1	0	0	1	24.36	18	-1	0	-1	0	13.98
4	-1	1	0	0	8.46	19	0	-1	1	0	8.93
5	1	1	0	0	12.58	20	0	0	0	0	25.66
6	0	0	0	0	29.31	21	0	-1	0	1	8.96
7	0	1	0	-1	7.26	22	-1	0	1	0	18.29
8	0	-1	0	-1	10.37	23	0	1	0	1	20.34
9	1	0	-1	0	9.54	24	0	-1	-1	0	8.16
10	-1	-1	0	0	8.23	25	0	0	0	0	25.38
11	0	0	-1	1	20.86	26	0	1	1	0	15.29
12	0	0	-1	-1	11.72	27	1	0	0	-1	6.84
13	0	0	1	1	23.51	28	0	1	-1	0	9.86
14	0	0	1	-1	12.91	29	1	0	1	0	15.22
15	0	0	0	0	25.46						

表5 Box-Behnken 实验方差分析

Table 5 Variance analysis of Box-Behnken experiment

差异来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$p$ 值	显著性
模型	1224.67	14	87.48	10.58	<0.0001	**
A 温度	4.98	1	4.98	0.60	0.4507	
B pH	20.96	1	20.96	2.53	0.1337	
C 转速	33.43	1	33.43	4.04	0.0640	
D 底物浓度	271.32	1	271.32	32.81	<0.0001	**
AB	0.22	1	0.22	0.026	0.8739	
AC	0.47	1	0.47	0.057	0.8152	
AD	5.78	1	5.78	0.70	0.4170	
BC	5.43	1	5.43	0.66	0.4314	
BD	52.49	1	52.49	6.35	0.0245	*
CD	0.53	1	0.53	0.064	0.8033	
$A^2$	279.39	1	279.39	33.79	<0.0001	**
$B^2$	615.88	1	615.88	74.48	<0.0001	**
$C^2$	173.74	1	173.74	21.01	0.0004	*
$D^2$	132.47	1	132.47	16.02	0.0013	*
残差	115.77	14	8.27			
失拟项	102.89	10	10.29	3.19	0.1371	
纯误差	12.88	4	3.22			
总误差	1340.44	28				

$R^2 = 0.9136$      $R^2_{(Adj)} = 0.8273$      $CV(\text{变异系数}) = 18.70$

注: \* 为差异显著( $p < 0.05$ ); \*\* 为差异极显著( $p < 0.0001$ )。

模型:

$$R_1 = 26.14 - 0.64A + 1.32B + 1.67C + 4.76D - 0.23AB + 0.34AC - 1.20AD + 1.17BC + 3.62BD + 0.36CD - 6.56A^2 - 9.74B^2 - 5.18C^2 - 4.52D^2$$

式中: $R_1$  为  $\gamma$ -PGA 的产量 (g/L), A、B、C、D 分别为温度(°C), pH, 转速(r/min), 底物浓度(g/L)。

由表 5 可知,模型极显著( $p < 0.0001$ ),因变量与所考察自变量之间的线性关系显著( $R^2 = 0.9136$ ),模型调整确定系数  $R^2_{(Adj)} = 0.8273$ ,说明该模型能解释 82.73% 响应值变化,拟合程度较高,且失拟项不显著

( $p > 0.05$ ),说明本实验所得的二次方程能较好的对响应值进行预测,即能较好的预测  $\gamma$ -PGA 的产量随温度、pH、转速、底物浓度的变化规律。从回归方程可知,D、 $A^2$ 、 $B^2$  极显著( $p < 0.0001$ ),BD、 $C^2$ 、 $D^2$  显著( $p < 0.05$ ),其他影响均不显著( $p > 0.05$ )。

2.4.2 各因素交互作用分析 通过 Design-Expert 8.0.6 软件绘制响应面图及等高线图(图 11~图 16),等高线图可以直观的反映各因素之间交互作用的强弱,椭圆表示两因素交互作用明显,而圆形则表示交互作用较小或没有交互作用<sup>[12-13]</sup>。可见,随着各因素

水平的升高,  $\gamma$ -PGA 的产量先增加后减少, 底物浓度和 pH 之间的交互作用如图 12 所示, 响应面曲面的坡度陡峭, 等高线呈椭圆形, 说明产量对底物浓度和 pH 的变化比较敏感, 底物浓度和 pH 之间交互作用较强, 对产量的影响显著 ( $p = 0.0245 < 0.05$ )。而底物浓度和温度、pH 和温度、转速和温度、转速和 pH、底物浓度和转速之间的交互作用如图 11、13、14、15、16 所示, 响应面的坡度较为平缓, 等高线近似圆形, 所以底物浓度和温度、pH 和温度、转速和温度、转速和 pH、底物浓度和转速之间的交互作用较弱, 但也对芽孢杆菌 B-6578 产  $\gamma$ -PGA 具有一定的影响。

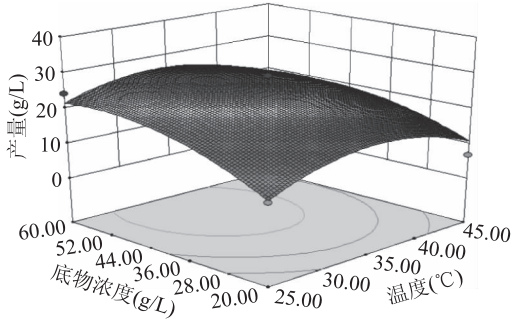


图 11 底物浓度和温度对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.11 Effect of substrate concentration and temperature on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

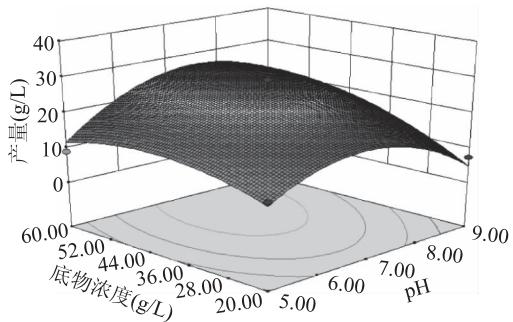


图 12 底物浓度和 pH 对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.12 Effect of substrate concentration and pH on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

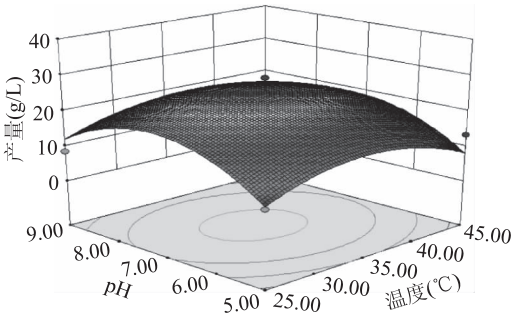


图 13 pH 和温度对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.13 Effect of pH and temperature on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

2.4.3 最优发酵条件及验证 结合响应值与各因素关系的二阶经验模型及三维响应面图, 确定温度、

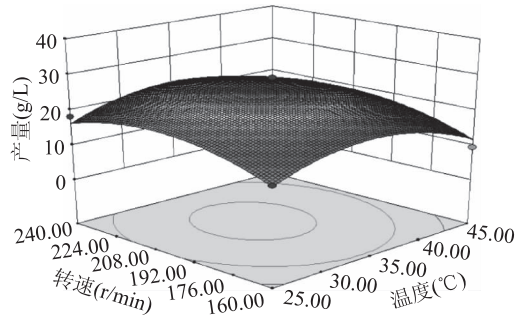


图 14 转速和温度对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.14 Effect of rotational speed and temperature on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

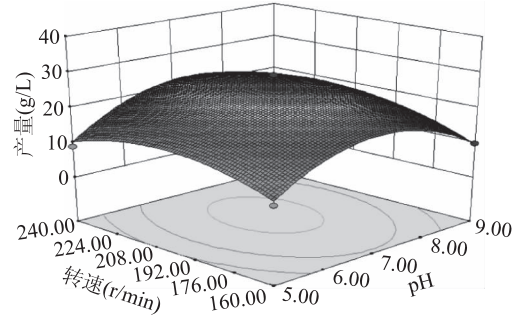


图 15 转速和 pH 对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.15 Effect of rotational speed and pH on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

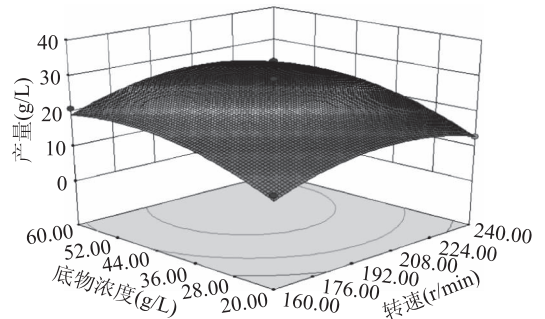


图 16 底物浓度和转速对芽孢杆菌 B-6578 发酵产  $\gamma$ -PGA 的影响

Fig.16 Effect of substrate concentration and rotational speed on  $\gamma$ -PGA production from bacillus strain B-6578

pH、转速、底物浓度的最佳优化水平分别为 37.5 °C、pH7.48、240 r/min、52.70 g/L, 预测  $\gamma$ -PGA 的产量为 23.96 g/L, 采用该优化发酵条件进行实验, 得到实际  $\gamma$ -PGA 的产量为 24.82 g/L (实验重复 3 次, SD = 0.1068)。  $\gamma$ -PGA 的转化率为 47.10%, 比优化前提高了 25.19%。

### 3 结论

本实验从豆腐作坊周边的表层土中筛选出一株产  $\gamma$ -PGA 的菌株, 通过菌落形态和分子生物学分析, 可确定该菌株为暹罗芽孢杆菌。本实验所采用的菌株 B-6578, 初始  $\gamma$ -PGA 的产量为 17.53 g/L,  $\gamma$ -PGA 的转化率为 21.91%, 通过单因素实验和响应面实验优化, 采用温度 37.5 °C, pH7.48, 转速



240 r/min,底物谷氨酸钠浓度 52.70 g/L 的条件,测得  $\gamma$ -PGA 的产量为 24.82 g/L,该结果与模型预测的结果吻合较好,因此,优化后  $\gamma$ -PGA 的转化率为 47.10%,比优化前提高了 25.19%。

### 参考文献

- [1] 阮文辉,杨家志,姚俊,等. $\gamma$ -聚谷氨酸合成菌株的筛选与优化培养[J].中国酿造,2011(5):66-69.
- [2] Kunioka M. Biosynthesis and chemical reactions of poly (amino acids) s from microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(5): 469-475.
- [3] Shih I L, Van Y T. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganism and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2001, 79(3): 207-225.
- [4] Ashiuchi M, Misono H. Biopolymers [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 7: 123-126.
- [5] Shih I L, Wu P J, Shieh C J. Microbial production of a poly ( $\gamma$ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis* [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2827-2832.
- [6] Pereira A E S, Sandoval-Herrera I E, Zavala-Betancourt S A.  $\gamma$ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157(10): 1862-1873.
- [7] Pillarisetti S, Maya S, Sathianarayanan S. Tunable pH and redox - responsive drug release from curcumin conjugated  $\gamma$ -polyglutamic acid nanoparticles in cancer microenvironment [J]. Colloids and Surfaces B Biointerfaces, 2017, 159(1): 809-819.
- [8] 徐虹, 欧阳平凯, 李霜, 等. 利用枯草芽孢杆菌 NX-2 制备  $\gamma$ -聚谷氨酸及其盐和谷胱甘肽及其前体: 中国, 1425762 [P]. 2003-06-25.
- [9] 胡荣章, 叶海峰, 全丽, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸高产菌株筛选及发酵条件优化 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(12): 62-65.
- [10] 任尚美, 马霞, 王海波, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸的发酵条件优化及其初步表征分析 [J]. 中国酿造, 2008(19): 44-48.
- [11] 何剑, 雍晓宇, 周俊, 等. 一株  $\gamma$ -多聚谷氨酸生产菌的分
- 离筛选与鉴定 [J]. 生物加工过程, 2014, 12(4): 87-93.
- [12] 贺杨扬, 曾伟, 王青龙, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产  $\gamma$ -聚谷氨酸发酵工艺 [J]. 食品科学, 2014, 35(9): 147-151.
- [13] 孙梦桐, 马欢欢, 吕欣然, 等. 响应面法优化复合乳酸菌抑制荧光假单胞菌作用 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 119-124.
- [14] 赵月菊, 刘阳, 邢福国, 等. 一株暹罗芽孢杆菌及其在防治禾谷镰刀菌方面的应用: 中国, 104342394 [P]. 2015-02-11.
- [15] 陈倩倩, 刘波, 王阶平, 等. 芽孢杆菌 FJAT-28592 抗真菌脂肽的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(2): 261-269.
- [16] 王瑶, 赵月菊, 邢福国, 等. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定 [J]. 核农学报, 2017, 31(6): 1128-1136.
- [17] 黄福祥, 马建彬, 朱西儒, 等. 地衣芽孢杆菌菌株鉴定和生化特征的研究 [C] // 全国生物农药研讨会, 2004: 111-117.
- [18] 徐艳萍, 王树英, 李华钟, 等. 聚  $\gamma$ -谷氨酸高产突变株的选育及摇瓶发酵条件 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(5): 6-10.
- [19] 冯志彬, 程仕伟, 缪静, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸生产菌的选育及培养条件研究 [J]. 生物加工过程, 2010, 8(1): 40-44.
- [20] 万红兵, 田洪涛, 马乐辉, 等. 保加利亚乳杆菌番茄复合汁增菌培养基的优选研究 [J]. 中国乳品工业, 2006, 34(8): 14-17.
- [21] 卢彦梅.  $\gamma$ -氨基丁酸产生菌的选育及发酵工艺研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [22] 梁金钟, 王凤. 微生物发酵法合成高分子聚合物  $\gamma$ -PGA 的研究 [J]. 北京工商大学学报, 2011, 29(1): 24-29.
- [23] Feng S, Zhinan X, Peilin C. Efficient production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 133(3): 271-281.
- [24] 潘龙, 靳魁奇, 刘宇鹏. 静息细胞转化赤藓糖醇生产 L-赤藓酮糖条件优化 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 72-76.
- [25] 刘晓鸥, 乔长晟, 李睿颖, 等. 枯草芽孢杆菌 TKPG011 聚谷氨酸发酵培养基的优化 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(3): 253-255.
- (上接第 100 页)
- dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome [J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16024.
- [8] Lau J T, Whelan F J, Herath I, et al. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture - enriched molecular profiling [J]. Genome Medicine, 2016, 8(1): 72.
- [9] Balakrishnan B, Luckey D, Marietta E, et al. Development of a real-time PCR method for quantification of *Prevotella histicola* from the gut [J]. Anaerobe, 2017, 48: 37-41.
- [10] Satokari R M, Vaughan E E, Favier C F, et al. Diversity of Bifidobacterium and Lactobacillus spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences [J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2002, 14: 97-105.
- [11] Klaassens E, De Vos W, Vaughan E. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1388-1392.
- [12] Azad M B, Konya T, Guttman D S, et al. Impact of cesarean section delivery and breastfeeding on infant gut microbiota at one year of age [J]. Allergy Asthma and Clinical Immunology, 2014, 10(1): 1-2.
- [13] Wagner J, Coupland P, Browne H P, et al. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rDNA gene classification [J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 274.
- [14] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. I [M]. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1984.
- [15] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 23.
- [16] Kuang Y S, Li S H, Guo Y, et al. Composition of gut microbiota in infants in China and global comparison [J]. Scientific Reports, 2016, 36666(6): 1-10.