

# $\gamma$ -聚谷氨酸产生菌发酵培养基的响应面法优化研究

张海群, 张智维, 刘 婷

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:**利用从纳豆中筛选得到的一株纳豆芽孢杆菌发酵生产 $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA)。在单因素优化实验的基础上,通过响应面法对发酵培养基进行优化,得到最佳培养基配方为蔗糖43.92 g/L、大豆蛋白胨7.00 g/L、谷氨酸钠46.32 g/L, $\gamma$ -PGA产量由原来的7.253 g/L提高到11.794 g/L。

**关键词:**纳豆芽孢杆菌;响应面分析法; $\gamma$ -聚谷氨酸

**中图分类号:**TQ 920.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)01-0079-05

## Optimization of fermentation medium for $\gamma$ -PGA producing strain by response surface methodology

ZHANG Hai-qun, ZHANG Zhi-wei, LIU ting

(College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an Shaanxi 710021)

**Abstract:** $\gamma$ -polyglutamic acid was produced by fermentation with *bacillus natto* screened from natto. Optimization of the fermentation medium by response surface method on the basis of single factor experiments was studied. Results revealed that the optimal medium constituents were as follows: sucrose 43.92 g/L, soy peptone 7.00 g/L, sodium glutamate 46.32 g/L. The production of  $\gamma$ -PGA increased from 7.253 g/L to 11.794 g/L.

**Key words:***bacillus natto*; response surface methodology;  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA)

$\gamma$ -聚谷氨酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,简称 $\gamma$ -PGA)是一种水溶性、生物降解、不含毒性、使用微生物发酵法制得的生物高分子,最早发现于1913年,后来被证实是一类芽孢杆菌的荚膜结构的主要成分,1973年Troy发现 $\gamma$ -PGA是一种水溶性酰胺化合物,可以通过芽孢杆菌的变种来生产<sup>[1-3]</sup>。经研究发现, $\gamma$ -PGA是一种对人体和环境无害的氨基酸聚合物,分子量为1万~200万<sup>[4]</sup>。 $\gamma$ -PGA由L-谷氨酸和(或)D-谷氨酸通过 $\alpha$ -氨基和 $\gamma$ -羧基间的酰胺键连接而成<sup>[5]</sup>,通常由上千个谷氨酸单体组成,不同菌种产生的 $\gamma$ -PGA的分子量不同。

根据培养基是否需要加入谷氨酸,将产生 $\gamma$ -PGA的产生菌分为谷氨酸依赖型和非谷氨酸依赖型<sup>[6]</sup>。非谷氨酸依赖型菌株合成 $\gamma$ -PGA的产量很低,所以现在大多数采用谷氨酸依赖型菌株发酵生产 $\gamma$ -PGA。

目前生产 $\gamma$ -PGA比较常用的方法有化学合成法、酶转化法、提取法和微生物发酵法。微生物发酵法是通过大量培养菌体后,从发酵液中提取出 $\gamma$ -PGA,该法相比于其他方法具有条件简单、生长周期短、目标产物含量高和相对分子质量适宜等优点,是目前最常用的生产 $\gamma$ -PGA的方法。但是由于 $\gamma$ -PGA的生产菌生产能力低以及缺乏系统的提取工艺等原因,导致 $\gamma$ -PGA产量低,严重影响了 $\gamma$ -PGA在我国的大规模应用<sup>[7-8]</sup>。

本实验通过响应面法对实验室分离提取的一株纳豆芽孢杆菌的发酵培养基进行优化,目的是提高 $\gamma$ -PGA的产量、降低生产成本。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

菌种:纳豆芽孢杆菌由生命科学与工程学院微生物实验室分离保存。

试剂:酵母粉、琼脂、蔗糖、牛肉膏、硫酸镁、葡萄糖、大豆蛋白胨、淀粉、L-谷氨酸钠、磷酸氢二钾、无

收稿日期:2014-07-14

作者简介:张海群,1988年出生,男,在读硕士研究生。

通讯作者:张智维,1967年出生,女,陕西西安人,高级工程师。

水乙醇、氯化氨、乳糖、柠檬酸、氢氧化钠、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、蛋白胨,以上试剂均为分析纯。

$\gamma$ -PGA 对照品由南京赛特斯生物技术有限公司提供。

### 1.2 仪器与设备

电炉:天津泰斯特仪器公司;电子天平:上海精科仪器有限公司;LDZX-40SB型立式自控电热压蒸汽灭菌器:上海电安医疗器械厂;隔水式303-3型电热培养箱:江苏东台县电器厂;恒温振荡器:江苏常华仪器公司;无菌操作台:苏净集团安泰公司制造;BK-FL荧光显微镜:重庆奥特光学仪器有限公司;水浴锅:西安华辰乐天实验设备有限公司;HC-2518R高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;UV-1800紫外分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;DX94878移液器:大龙兴创实验仪器有限公司。

### 1.3 实验培养基

斜面培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L,葡萄糖 1 g/L,琼脂 20 g/L,酵母粉 2 g/L,蒸馏水,pH 7.5,121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基:蔗糖 20 g/L,牛肉膏 5 g/L,大豆蛋白胨 10 g/L,谷氨酸钠 30 g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L,蒸馏水,pH 7.5,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基:蔗糖 30 g/L,谷氨酸钠 50 g/L,大豆蛋白胨 6 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5 g/L,蒸馏水,pH 7.5,121 °C 灭菌 20 min。

### 1.4 实验方法<sup>[9-11]</sup>

#### 1.4.1 菌种的活化和形态观察

将实验室保存的纳豆芽孢杆菌转接到斜面培养基上,37 °C 恒温培养 24 h 进行革兰氏染色并在显微镜下进行观察。

#### 1.4.2 发酵液中 $\gamma$ -PGA 的检测

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液与  $\gamma$ -PGA 反应产生浑浊的特性,通过反应体系的吸光度来反映其浊度,进而通过浊度与  $\gamma$ -PGA 浓度的线性关系确定  $\gamma$ -PGA 浓度,是一种快速、准确的发酵液中  $\gamma$ -PGA 的测定方法。

发酵液中  $\gamma$ -PGA 的检测及对照曲线的制作参考文献<sup>[12-13]</sup>。

#### 1.4.3 培养方法

菌种活化:取 1 环菌种接入斜面培养基,37 °C

培养 24 h,用作活化菌种。种子培养:取 1 环斜面菌种接种于种子培养基(250 mL 三角瓶装液量为 30 mL),200 r/min,37 °C 恒温振荡培养 18 h。

摇瓶发酵:250 mL 三角瓶装发酵培养基 40 mL,种子液以 3%(W/W)的接种量接入发酵培养基中,37 °C、200 r/min 恒温震荡培养 28 h。

#### 1.4.4 响应面实验设计<sup>[14-16]</sup>

在单因素实验的基础上,选取蔗糖、大豆蛋白胨和谷氨酸钠三个因素为自变量,以  $\gamma$ -PGA 产量为响应值,利用 Design Expert 8.0 软件设计三因素三水平的响应面实验(表 1)。Box-Behnken 实验设计是可以评价指标和因素间的非线性关系的一种实验设计方法,实验组合数少、准确经济。

表 1 Box-Behnken 因子水平编码表

编码水平	A 蔗糖/(g/L)	B 大豆蛋白胨/(g/L)	C 谷氨酸钠/(g/L)
-1	35	7	45
0	40	8	50
1	45	9	55

## 2 结果与分析

### 2.1 纳豆芽孢杆菌的形态观察

将活化好的纳豆芽孢杆菌做成切片进行革兰氏染色,在显微镜下面进行观察,结果如图 1 所示。

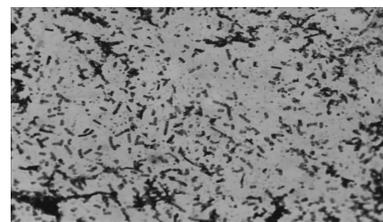


图 1 纳豆芽孢杆菌显微镜(10 × 100 油镜)下的形态

从图 1 可看出菌体革兰氏染色为阳性,菌体为杆状而且有芽孢,符合纳豆芽孢杆菌的典型形态。

### 2.2 $\gamma$ -PGA 的标准曲线

实验分别选择在 230、240、250、300、350、400、450、500 nm 波长处,测定  $\gamma$ -PGA 标准液与 CTAB 试液反应体系的吸光度,在上述各波长处,得到的  $R^2$  分别为 0.979 3、0.982 7、0.984 7、0.999 8、0.993 9、0.996 0、0.993 2、0.988 8。吸光度与  $\gamma$ -PGA 标准液浓度具有较好的线性相关性,实验选择在 300 nm 处的曲线,此时  $R^2$  为 0.999 8,标准曲线为  $Y = 0.014 41X + 0.001 4$  ( $Y$  为吸光度, $X$  为  $\gamma$ -PGA 浓度)。

### 2.3 不同碳源对 $\gamma$ -PGA 产量的影响

以发酵培养基为基础培养基,分别添加 30 g/L 的葡萄糖、淀粉、乳糖、蔗糖、柠檬酸代替原来的碳源(蔗糖),其他营养成分不变。结果如表 2 所示,得出最佳碳源是蔗糖,选择不同的蔗糖浓度考察蔗糖浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响。结果显示(图 2),在添加量为 40 g/L 时  $\gamma$ -PGA 产量最高。

表 2 不同碳源下  $\gamma$ -PGA 的产量 g/L

项目	葡萄糖	蔗糖	乳糖	淀粉	柠檬酸
$\gamma$ -PGA 产量	5.94	6.77	5.15	3.44	5.38

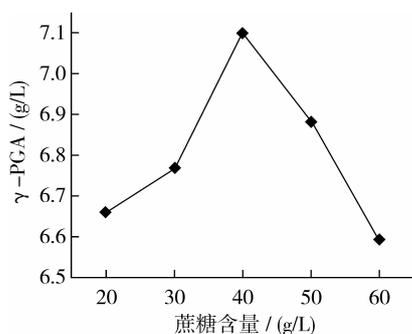


图 2 蔗糖浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响

### 2.4 不同氮源对 $\gamma$ -PGA 产量的影响

以发酵培养基为基础培养基,分别添加 6 g/L 的蛋白胨、牛肉膏、大豆蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  代替原来的氮源(大豆蛋白胨),其他营养成分不变。结果如表 3 所示,最佳氮源是大豆蛋白胨,选择不同浓度的大豆蛋白胨,考察浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响。结果显示(图 3),添加量为 8 g/L 时  $\gamma$ -PGA 产量最高。

表 3 不同氮源下  $\gamma$ -PGA 的产量 g/L

项目	蛋白胨	大豆蛋白胨	牛肉膏	$\text{NH}_4\text{Cl}$
$\gamma$ -PGA 产量	6.27	6.94	5.15	5.98

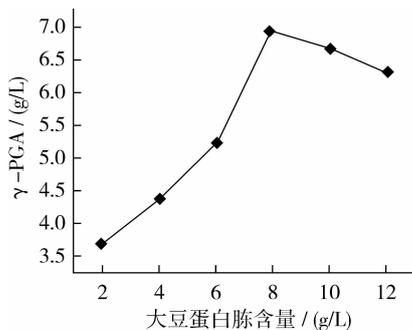


图 3 大豆蛋白胨浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响

### 2.5 谷氨酸钠浓度对 $\gamma$ -PGA 产量的影响

以发酵培养基为基础,分别添加 10、20、30、40、50、60、70 g/L 的谷氨酸钠,其他条件相同,考察谷氨酸钠浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响。结果见图 4,当

谷氨酸钠浓度为 50 g/L 时  $\gamma$ -PGA 产量最高。

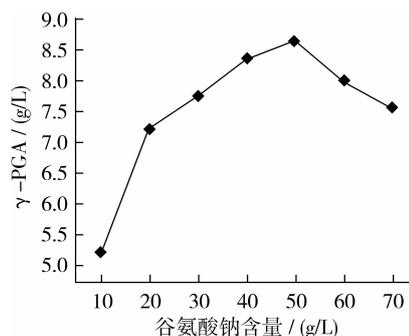


图 4 谷氨酸钠的浓度对  $\gamma$ -PGA 产量的影响

### 2.6 响应面实验结果

#### 2.6.1 模型建立和方差分析

采用 Design Expert 8.0 软件对实验结果(表 4)进行回归分析和方差分析(表 5),得到的回归方程为:

$$Y = 11.558 + 0.51A - 0.3875B + 0.19C - 0.575AB - 0.6075AC + 0.7125BC - 0.6478A^2 - 0.6378B^2 - 0.6778C^2$$

由表 5 可得,回归模型显著,调整后的复相关系数  $R^2$  为 0.9676,说明模型与实际实验拟合程度较好。由表 6 的回归模型系数的显著性检验结果可知,模型的一次项 A、B、C 均显著,二次项 AC、BC、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  也显著,表明各因素对  $\gamma$ -PGA 产量的影响不是简单的线性关系。对拟合得到的方程进行分析得到,预测的最佳培养基组成为:蔗糖 43.92 g/L、大豆蛋白胨 7.00 g/L、谷氨酸钠 46.32 g/L,此时的  $\gamma$ -PGA 产量为 11.923 g/L。

表 4 响应面实验结果

实验号	A 蔗糖	B 大豆蛋白胨	C 谷氨酸钠	$\gamma$ -PGA 产量/(g/L)
1	-1	0	1	10.39
2	-1	-1	0	10.41
3	-1	0	-1	8.98
4	-1	1	0	9.59
5	0	0	0	11.62
6	0	0	0	11.49
7	0	-1	1	10.32
8	0	0	0	11.42
9	0	-1	-1	11.18
10	0	0	0	11.68
11	0	1	-1	9.14
12	0	1	1	11.13
13	0	0	0	11.58
14	1	0	1	10.27
15	1	-1	0	11.47
16	1	0	-1	11.29
17	1	1	0	10.42

表5 回归模型方差分析表

因素	平方和	自由度	均方	F值	P值
回归模型	12.10	9	1.345	54.18	0.000 1
A	2.08	1	2.081	83.82	0.000 1
B	1.20	1	1.201	48.39	0.000 2
C	0.29	1	0.289	11.63	0.011 3
AB	0.01	1	0.013	0.53	0.489 2
AC	1.48	1	1.476	59.46	0.000 1
BC	2.03	1	2.031	81.80	0.000 1
A <sup>2</sup>	1.77	1	1.767	71.16	0.000 1
B <sup>2</sup>	0.81	1	0.807	32.50	0.000 7
C <sup>2</sup>	1.93	1	1.934	77.91	0.000 1
残差	0.17	7	0.025		
失拟项	0.13	3	0.044	4.07	0.104 3
纯误差	0.04	4	0.011		
总差	12.28	16	1.345		

注:模型的确定系数 R<sup>2</sup> = 0.985 8,模型的调整确定系数 R<sup>2</sup> = 0.967 6。

表6 回归模型系数的显著性检验结果

因素	回归系数	自由度	标准差	-95%置信下限	95%置信上限	显著性
A	0.51	1	0.06	0.38	0.64	**
B	-0.39	1	0.06	-0.52	-0.26	**
C	0.19	1	0.06	0.06	0.32	*
AB	-0.06	1	0.08	-0.24	0.13	
AC	-0.61	1	0.08	-0.79	-0.42	**
BC	0.71	1	0.08	0.53	0.90	**
A <sup>2</sup>	-0.65	1	0.08	-0.83	-0.47	**
B <sup>2</sup>	-0.44	1	0.08	-0.62	-0.26	**
C <sup>2</sup>	-0.68	1	0.08	-0.86	-0.50	**

注:\*\*表示极显著,\*表示显著。

### 2.6.2 响应面分析

借助 Design Expert8.0 软件,根据回归模型作出相应的响应曲面和等高线图。从等高线中可以直观地判断两因素的交互作用情况,圆形表示两因素交互作用不显著,椭圆表示两因素交互作用显著<sup>[17]</sup>。由图5~图6看出 $\gamma$ -PGA含量随着蔗糖和大豆蛋白胨的增加呈现先增大后减小的趋势。图7~图8表明蔗糖和谷氨酸钠对 $\gamma$ -PGA的交互作用十分显著,蔗糖添加量为35~45 g/L,谷氨酸钠添加量为45~55 g/L时 $\gamma$ -PGA产量先增大后减小。图9~图10则表明随着谷氨酸钠添加量的增加 $\gamma$ -PGA的含量先增大后减少,大豆蛋白胨的添加量为

7~9 g/L时, $\gamma$ -PGA的产量先增大后减小,存在最大值。

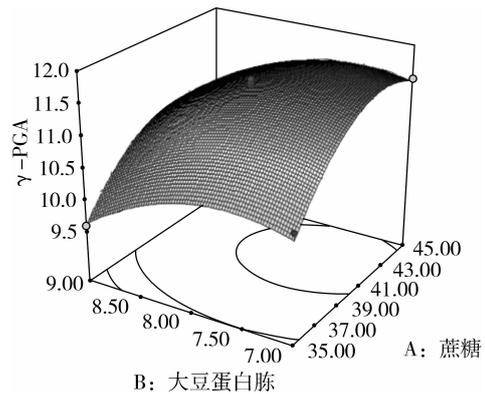


图5 蔗糖和大豆蛋白胨相互作用的响应面图

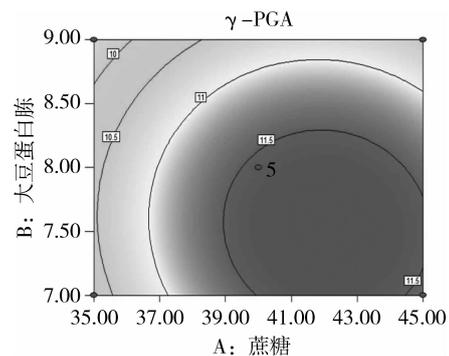


图6 蔗糖和大豆蛋白胨相互作用的等高线图

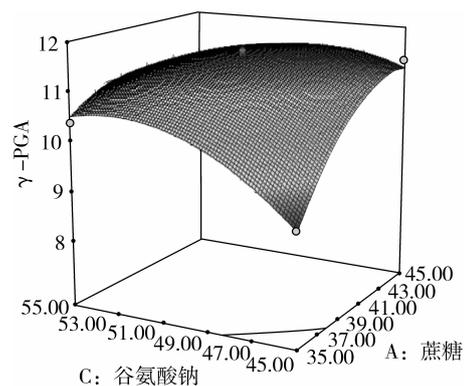


图7 蔗糖和谷氨酸钠相互作用的响应面图

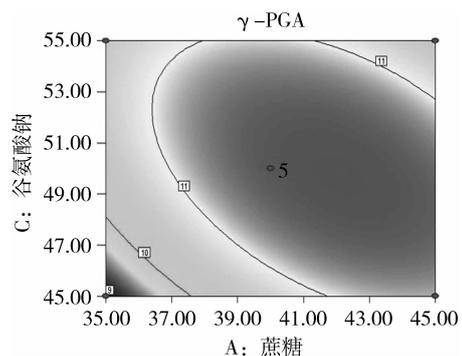


图8 蔗糖和谷氨酸钠相互作用的等高线图

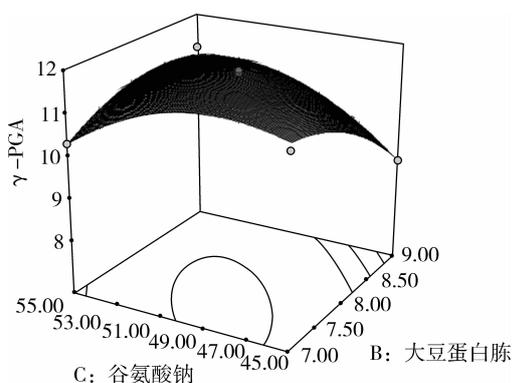


图9 大豆蛋白胨和谷氨酸钠相互作用的响应面图

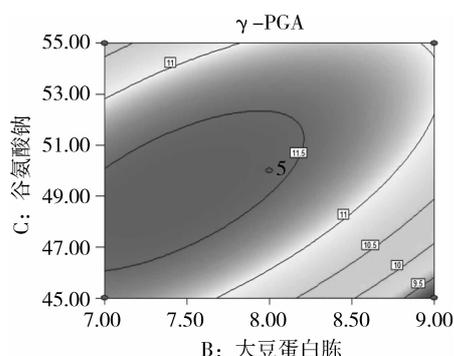


图10 大豆蛋白胨和谷氨酸钠相互作用的等高线图

### 2.6.3 最优培养基的确定

通过对回归方程进行数学分析得出,最佳培养基组成为:蔗糖43.92 g/L、大豆蛋白胨7.00 g/L、谷氨酸钠46.32 g/L,此时预测的 $\gamma$ -PGA产量为11.923 g/L。按照优化的培养基组成做验证实验,平行三次取平均值,结果为11.794 g/L,与预测值仅相差1.1%,比优化前的发酵培养基的 $\gamma$ -PGA产量(7.253 g/L)提高约1.63倍,因此用响应面法对培养基进行优化是一种切实可行的方法。

### 3 结论

利用响应面法对实验室分离的一株产 $\gamma$ -PGA的纳豆芽孢杆菌的发酵培养基进行优化,得到的最优组成为:蔗糖43.92 g/L、大豆蛋白胨7.00 g/L、谷氨酸钠46.32 g/L,此培养基下 $\gamma$ -PGA产量为11.794 g/L,比优化前的原发酵培养基的 $\gamma$ -PGA

产量(7.253 g/L)提高约1.63倍。

### 参考文献:

[1] Troy F A. Chemistry and biosynthesis the poly( $\gamma$ -D-glutamyl) capsule in bacillus licheniformis[J]. J Biol Chem, 1973, 248(1): 305-315.

[2] Troy F A. Peptide antibiotics biosynthesis and functions; enzymatic formation of bioactive peptides and related compounds[M]. New York: walter de Gruyter, 1982:49-83.

[3] 王辉,董超,史延茂,等.多聚谷氨酸发酵的响应面法优化[J].食品研究与开发,2011,32(12):150-154.

[4] 施庆珊.  $\gamma$ -聚谷氨酸的微生物合成与应用[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(11): 20-23.

[5] YOON S H, DO J H, LEESY, et al. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by fed-batch culture of Bacillus licheniformis[J]. Biotechnol Lett, 2000(22): 585-588.

[6] 曹名锋,金映虹,解慧,等.  $\gamma$ -PGA的微生物合成、相关基因及应用展望[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 388-395.

[7] 桑莉,徐虹,李晖,等.  $\gamma$ -聚谷氨酸生产菌的筛选及发酵条件[J]. 过程工程学报, 2004, 4(5): 426-466.

[8] 游庆红,张新民,陈国广,等.  $\gamma$ -聚谷氨酸的生物合成及应用[J]. 现代化工, 2002, 22(12): 56-59.

[9] 李文婧,赵祥颖,田延军,等.  $\gamma$ -聚谷氨酸生产菌的发酵培养基优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 108-111.

[10] 梁静波,郭轩,张大龙,等. 响应面法优化谷氨酸温度敏感突变株生产L-谷氨酸[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41(2): 4-9.

[11] 王晓丽,贺玉明,俞建良. 响应面法优化谷氨酸发酵培养条件的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(11): 2-7.

[12] Ashiuchi M. Analytical approaches to poly- $\gamma$ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation[J]. Journal of chromatography B, 2011, 173(5): 1-6.

[13] 张庆庆,金鑫强,陈剑翔,等. 发酵液中 $\gamma$ -聚谷氨酸含量快速测定方法研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 294-300.

[14] 于晓丹,马霞,王可,等. 利用响应面法优化 $\gamma$ -聚谷氨酸发酵培养基[J]. 中国酿造, 2010(11): 132-135.

[15] 贺阳阳,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(9): 147-151.

[16] 杜沛,朱丽娟,陈双喜. 响应面法优化 Bacillus subtilis HD-F9 产 $\gamma$ -聚谷氨酸发酵培养基[J]. 河南大学学报, 2010, 40(5): 488-503.

[17] 王允祥,吕凤霞,陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 89-94.

(上接第34页)

[13] Sun - Waterhouse D, Zhou J, Miskelly G M, et al. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid[J]. Food Chemistry, 2011, 126(6): 1049-1056.

[14] Polavarapu S, Oliver C M, Ajlouni S, et al. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil and fish oil-extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin[J]. Food Chemistry, 2011, 127(8): 1694-1705.

[15] Silva K A, Coelho M A Z, Calado V M A, et al. Olive oil and lemon salad dressing microencapsulated by freeze-drying[J]. LWT - Food Science and Technology, 2013, 50(5): 569-574.

[16] 李彦军,毛跟年,马小燕. 大豆异黄酮苷元 $\beta$ -环糊精微胶囊的制备和鉴定[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 183-185.

[17] 邓靖,谭兴和,刘婷婷,等. 肉桂精油- $\beta$ -环糊精微胶囊的制备[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(2): 89-91.

[18] 李超,肖佰惠. 超声法制备苘麻籽油微胶囊的工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 39-43.

[19] 李延啸. 大蒜素 $\beta$ -环糊精微胶囊制备工艺及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 194-197.

[20] 苏阳,匡立学,周金星,等. 包络结合法制备 $\beta$ -环糊精鱼油微胶囊[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(10): 76-80.