

一株 γ -PGA 生产菌株的分离鉴定及产物性能研究

张雯, 刘利歌, 张艳, 齐香君

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 采用平板划线法从纳豆中分离了一株具有 γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)生产能力的菌株(JPND618), 通过对该菌株形态、生理生化特性研究以及16S rRNA序列对比分析, 对其进行了鉴定。同时对发酵产物进行了分析鉴定, 研究了其吸水性能、阻垢性能、絮凝性能及可生物降解性能。结果表明, 该菌株生化特征与芽孢杆菌属相似, 且其16S rDNA序列与*Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535同源性达98%, 确定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。发酵生产 γ -PGA产量为4.86 g/L, 发酵产物 γ -PGA的吸水性、可生物降解性明显优于聚丙烯酰胺(PAM), 保水性能与PAM相当, 对CaSO₄、CaCO₃的阻垢率最高可达70%以上, 对高岭土悬浮液具有良好的絮凝作用, 表明菌株JPND618发酵生产 γ -PGA是一种性能优良的环境友好型生物材料, 具有良好的应用前景。本研究为 γ -PGA的发酵生产提供了一株新的菌种, 对 γ -PGA的生物合成研究及应用具有积极意义。

关键词: γ -聚谷氨酸; 菌种分离鉴定; 解淀粉芽孢杆菌; 产物性能

文章编号: 1673-9078(2014)7-44-50

Isolation and Identification of a γ -PGA Producing Strain and its Product Properties

ZHANG Wen, LIU Li-ge, ZHANG Yan, QI Xiang-jun

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

Abstract: A γ -polyglutamic acid (γ -PGA) producing strain (JPND618) was isolated using streaked plate method. The strain was identified through strain morphological, physiological-biochemical characteristics and sequence contrastive analysis of 16S rRNA. The fermenting product was identified, and its water absorption property, scale property, flocculation property and biodegradable property were studied. The results showed that, the physiological-biochemical characteristics of strain JPND618 were similar to *bacillus* genus, and the homology of 16S rDNA sequence with *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535 reached 98%, thus strain JPND618 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The yield of γ -PGA was 4.86 g/L. γ -PGA showed much better water absorption and biodegradable property than Polyacrylamide (PAM), and similar water-retaining property with PAM. The anti scale rates towards CaSO₄, CaCO₃ reached more than 70%, and flocculation towards Gaolin suspension was good. γ -PGA produced by strain JPND618 was proved as a kind of environmental friendly biological materials with high performance, which has a better application prospect. This study supplies a new strain for producing γ -PGA.

Key words: γ -polyglutamic acid; strain isolation and identification; *Bacillus amyloliquefaciens*; product properties

γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)是一种在胞内合成并分泌到胞外的水溶性可生物降解型高分子氨基酸均聚物, 由L型谷氨酸、D型谷氨酸两种单体之间通过 γ -酰胺键聚合而成^[1-2], 作为一种高分子量的聚合物, γ -PGA的分子链上有大量游离羧基, 使其具有一般聚羧酸的性质, 因此具有很强的吸水性^[3], 此外 γ -PGA还具有增稠、乳化、凝胶、成膜、保温、缓释、助溶、黏接和可生物降解等诸多生物学特性^[4], 是一种对生物及环境均无毒害的生物相容性天然高分子。

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 陕西省科技厅自然科学基金项目(2012JM2005); 2012年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210708030)

作者简介: 张雯(1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物制药

可作为果蔬及海产品防冻保鲜剂^[5]、饮料悬浮剂、增稠剂、食品的除涩剂、避苦剂、土壤沙地的蓄水保水剂、食品用水凝胶等, 广泛应用于食品加工、化妆品制造以及生物医学和环境保护等领域。

γ -PGA发现于*B. anthracis*和*B. mesentericus*等微生物的荚膜组成中, 也可从*B. subtilis*培养液中分离得到。目前 γ -PGA的生产主要通过微生物发酵过程进行, 自然界中具有 γ -PGA合成能力的微生物种类繁多, 已报道的有*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*以及*B. subtilis* ZJU-7等^[6-7], 大多属于芽孢杆菌属。本研究以日本纳豆为样品, 从中分离具有 γ -PGA生产能力的微生物菌种, 并对所分离菌株的生理生化特性进行考察, 采用16S rRNA序列比对法对其进行鉴定, 同时研

究目标菌株所生产 γ -PGA吸水性, 保水性, 阻垢性, 絮凝性及可降解性等性能。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

纳豆样品, 购自日本鸟取县便利店; Taq酶、dNTPs、DNA Marker DL2000、Wide Range DNA Marker, 宝生物工程(大连)有限公司; 甲醇(色谱纯), 科密欧; 固体培养基, 葡萄糖10 g、蛋白胨10 g、牛肉膏5 g、NaCl 5 g、琼脂20 g、去离子水1000 mL、pH 7.5; 种子培养基, 蔗糖30 g、牛肉膏10 g、NaCl 5 g、谷氨酸钠30 g、MgSO₄·7H₂O 0.25 g、K₂HPO₄ 0.5 g、去离子水1000 mL、pH 7.5; 发酵培养基, 蔗糖40 g、牛肉膏8 g、谷氨酸钠40 g、MgSO₄·7H₂O 0.24 g、K₂HPO₄ 1.2 g、NaCl 5 g、去离子水1000 mL、pH 7.5; 生物降解培养基^[8], KH₂PO₄ 0.34 g、K₂HPO₄·3H₂O 1.14 g、Na₂HPO₄ 0.71 g、NH₄Cl 0.07 g、CaCl₂·2H₂O 1.10 g、MgSO₄·7H₂O 0.86 g、FeCl₃·6H₂O 0.01 g、酵母膏0.01 g、自来水1000 mL。其余分析试剂均采用国产分析纯或生化试剂。

1.2 仪器与设备

MJ PTC-200 PCR仪, 美国MJ Research公司; DYY-10C电泳仪、DYCP-31D电泳槽, 北京市六一仪器厂; 高效液相色谱仪, Waters; TGL-16C高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; MG250B电热恒温培养箱、HYG-1A恒温振荡器, 上海新瑞仪器有限公司; XPS-8CA光学显微镜, 上海光学仪器有限公司; 752型紫外分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 纳豆中 γ -PGA生产菌株的分离筛选

初筛: 取适量纳豆置于无菌三角瓶中, 加入灭菌生理盐水, 在37℃的摇床中震荡培养18~24 h, 将震荡所得悬液逐级稀释并平板划线于固体培养基平板培养24 h。挑取单一菌落再次划线培养, 如此反复, 直到菌落形态单一为止。最终所得单菌落接固体培养基斜面, 4℃保藏, 备复筛用。

复筛: 96孔板中各孔内加入200 μ L发酵培养基, 取初筛所得菌种分别接入其中, 37℃培养72 h, 通过观察培养液流动性判断其粘度, 选择粘度较大的培养液对应菌株, 经固体培养基斜面活化(37℃培养12 h)、种子培养基制备种子液(37℃, 200 r/min振荡培养12 h)、发酵培养(接种量10%, 装液量50 mL/250 mL三角瓶, 37℃, 200 r/min振荡培养72 h), 取发

酵液进行 γ -PGA提取, 检测发酵液中 γ -PGA的产量, 具有 γ -PGA最大生产能力的菌株为目标菌株。

1.3.2 目标菌株的形态特征、生理生化特性和16S rRNA鉴定

形态特征: 取所筛选菌株的新鲜培养物在光学显微镜下观察菌体形态、大小、运动及产芽孢情况; 通过革兰染色观察染色情况。

生理生化性能测定: 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[9]对所筛选菌株进行糖发酵、过氧化氢酶等生理生化实验进行初步鉴定。

16S rRNA鉴定: 所筛选菌株用种子培养基培养至对数生长期, 收集菌体细胞提取基因组DNA, 使用细菌通用引物扩增16S rDNA (Forward Primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Reverse primer: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。回收PCR扩增产物, 委托深圳华大基因科技服务有限公司进行测序。测序结果使用NCBI的Blastn软件对GenBank中的序列进行比对, 进行同源性比较。下载同属代表种的16S rRNA, 利用ClustalX软件进行多序列比对, 应用邻接法(Neighbor-Joining)以MEGA6.0软件构建系统发育树^[10]。

1.3.3 γ -PGA的发酵生产及提取纯化

利用所筛选目标菌株进行 γ -PGA的发酵生产, 发酵工艺同菌种复筛时 γ -PGA的发酵工艺。

取发酵液于4000 r/min下离心20 min去除菌体细胞, 取上清液加入3倍体积无水乙醇, 充分混合均匀后静置过夜, 8000 r/min下离心20 min, 取沉淀物于60℃下干燥12 h, 得 γ -PGA粗品。蒸馏水加热溶解 γ -聚谷氨酸粗品, 用截流分子量为8000~10000的透析袋透析过夜。透析液加入3倍体积无水乙醇混合均匀后静置过夜, 8000 r/min下离心20 min, 取沉淀物于60℃下干燥12 h, 得 γ -聚谷氨酸纯品。

1.3.4 γ -PGA的鉴定

颜色反应: 配制 γ -PGA水溶液, 加入饱和硫酸铜进行反应, 观察反应过程是否产生蓝色络合物; 紫外扫描: 称一定量 γ -PGA样品溶解于去离子水中, 在200~400 nm进行紫外光谱扫描; 薄层分析: 取5 mL质量浓度为5 mg/mL的 γ -PGA水溶液与5 mL摩尔浓度为6 mol/L的盐酸溶液均匀混合, 100℃回流水解15 h, 100℃烘干, 固体溶解于5 mL去离子水中, 离心取上清液, 备用。以L-谷氨酸标准品为对照, 薄层层析法分别测定样品和标准样的Rf值, 展开剂正丁醇:水:冰乙酸=4:1:2, 对 γ -PGA水解产物进行鉴定。HPLC分析: 称取纯化 γ -PGA 25 mg溶解于5 mL去离子水中, 微孔滤膜过滤, HPLC分析检测。色谱柱: ODS Hypersil C18柱(250 mm×4.6

mm)，检测器：紫外检测器（波长210 nm），流动相：0.015 mol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄（pH 6.98）：甲醇=95:5，流速：1.0 mL/min。

1.3.5 γ-PGA 吸水、保水性能研究

精密称取一定量干燥至恒重的γ-PGA及聚丙烯酰胺（Poly（acrylamide），PAM），分别置于透析袋中，密封后称重，置于1000 mL去离子水中，磁力搅拌下使保水剂充分吸水。每隔一定时间取出透析袋悬空，拭干表面水分后称重。利用下式分别计算γ-PGA及PAM吸水倍数^[11]：

$$Q = (M_t - M_{t_0}) / M_0$$

式中：Q为保水剂的吸水倍数，g/g；M_t为t时刻透析袋及内含物的总重量，g；M_{t₀}为最初透析袋及内含物的总重量，g；M₀为保水剂的重量，g。

将泥土去杂质，烘干并充分研碎。分别取20 mL 5g/L γ-PGA溶液、5 g/L PAM溶液及去离子水，充分拌于40 g干土壤中，均匀分散在Φ 10 cm的平皿中，置于25 °C培养箱中，每隔一定时间取出称重。利用下式计算失水量：

$$Q' = M_{t_0} - M_t$$

式中：Q'为保水剂的失水量，g；M_{t₀}为0 h时表面皿的总重量，g；M_t为t h时表面皿的总重量，g。

1.3.6 γ-PGA 阻垢性能研究

采用静态阻垢试验^[12]分别对γ-PGA阻CaSO₄垢及CaCO₃垢性能进行研究。阻垢率按以下公式计算：

$$\text{阻垢率} = [(V_E - V_0) / (V_T - V_0)] \times 100\%$$

式中，V₀：滴定水浴加热后空白样品（不加γ-聚谷氨酸）所消耗的EDTA体积；V_T：滴定未经水浴加热的A₁液（不加γ-聚谷氨酸）所消耗的EDTA体积；V_E：滴定加有阻垢剂的经水浴加热的水样所消耗的EDTA体积。

1.3.7 γ-PGA 絮凝性能研究

取0.5 g高岭土（平均粒度4 μm）置于100 mL烧杯中，加入100 mL去离子水，搅拌均匀后加入一定量γ-PGA溶液，静置30 min，取上清液微孔滤膜过滤后于550 nm处测吸光度。同时以不加γ-PGA的高岭土悬浊液为对照。通过絮凝率表征γ-PGA絮凝活性，公式如下：

$$\text{絮凝率} R_f = [(A - B) / A] \times 100\% \text{ [13]。}$$

式中，A：对照上清液的光密度值；B：样品上清液的光密度值。

1.3.8 γ-PGA 生物降解性能研究

取花园土置于去离子水中，搅拌后沉淀30 min。粗滤纸过滤，弃去最初200 mL滤液，剩余滤液即可作为降解用菌液。称取0.2 g γ-PGA溶于1000 mL生物降解培养基中，接入2 mL上述菌液。25 °C恒温水浴。每隔一定时间取出一定量溶液分析其总有机碳含量。利用下

式计算γ-PGA的降解率^[8]：

$$DM = \frac{(1 - n) TOC_1}{n TOC_0} \times 100\%$$

式中，n（TOC₁）：为降解一定时间后γ-PGA反应液的总有机碳含量；n（TOC₀）为降解前γ-PGA反应液的总有机碳含量。

2 结果与讨论

2.1 目标菌株鉴定

2.1.1 目标菌株的形态学鉴定结果



图1 菌株 JPND6183 的菌落形态(a、b、c)及细胞形态(d)
Fig.1 Colonial morphology(a, b, c) and cell morphology(d) of strain JPND6183

表1 菌株 JPND618 生理生化实验结果

Table 1 Physiological-biochemical characteristics of strain JPND618

JPND618					
理化指标	结果	理化指标	结果	理化指标	结果
芽孢形状	卵圆	明胶水解	+	D-葡萄糖发酵	-
厌氧生长	+	卵黄卵磷脂水解	-	L-阿拉伯糖发酵	+
接触酶	+	吐温-80水解	-	甘露醇发酵	+
氧化酶	-	柠檬酸利用	-	D-木糖发酵	+
硝酸盐还原	+	石蕊牛奶	A	甘油发酵	+
产生吡啶	-	蔗糖发酵	+	棉籽糖发酵	+
酪氨酸分解	-	乳糖发酵	+	0.001%溶菌酶	-
淀粉水解	+	麦芽糖发酵	+	5%NaCl	-

注：+阳性，-阴性，A酸反应。

根据 1.3.1 所述方法分离筛选具有 γ-PGA 生产能力的目标菌株，编号 JPND6183，生产 γ-PGA 产量为 4.86 g/L。固体培养基平板上进行培养，菌落呈乳白色，无光泽，菌落边缘不规则，用接种针挑取时呈拉丝状。在固体培养基上的生长形态有多样性，培养基表面潮湿时，菌落易扩散，表面呈乳白色致密黏质（图 1（a~c））。培养基表面较干时，菌落单一微小，有褶皱，边缘不规则。菌体显微镜下形态图 1d 所示为固体培养基菌体显微镜下形态，可看出在固体培养基上菌体大多以芽孢形式存在，芽孢呈卵圆形，少数成杆状菌体，革兰氏染色呈阳性。与《常见细菌系统鉴定手册》中关于芽孢杆菌的描述一致，可初步鉴定为厚壁菌门（Firmicutes），芽孢杆菌纲（Bacilli），芽孢杆菌目（Bacillales），芽孢杆菌科（Bacillaceae），芽孢杆菌属（Bacillus）。

2.1.2 目标菌株的生理生化特性

菌株JPND6183生理生化试验结果如表1, 对照《常见细菌系统鉴定手册》, 结合形态学鉴定结果, 进一步鉴定为芽孢杆菌属。

2.1.3 目标菌株 16S rRNA 鉴定结果

经PCR扩增并测序拼接, 得到目标菌株16S rDNA 序列, 长度为1436 bp, 序列如下所示:

CCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTC
CTAAAAGGTTACCTACCGACTTCGGGTGTTACA
AACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
GCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATC
CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCG
AGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAACAGAT
TTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGC
CCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
CAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCAC
CTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAG
ATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC
ACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCC
TATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTC
CTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAG
GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA
GGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATC
GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAG
TTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACG
TGGAATTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGG
GGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCG
AGCCCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTT
GCCACCTACGTAATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
GTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAG
GTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCC
TAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCAT
CACTCACGCGCGTGTGCTCCGTCAGACTTTCGTC
CATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA
GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC
GATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTCGCC
TTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGC
GCCCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGC

CACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAA
CCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTAT
CCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACT
CACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCT
CCCATCTGTCCGCTCGAC

菌株 JPND618 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中序列进行相似性分析, JPND618 菌株与 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535 的核苷酸序列同源性达 98%。采取 MEGA4.0 软件中 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 结果显示菌株 JPND618 与上述菌株聚为一簇 (图 2), 说明其与菌株 JPND618 的亲缘关系最近, 而与 *Bacillus carboniphilus* JCM9731 以及 *Bacillus mojavensis* IFO15718 有较大的差异。结合菌株的形态, 生理生化特征及 16S rDNA 序列比对结果, 将菌株 JPND618 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

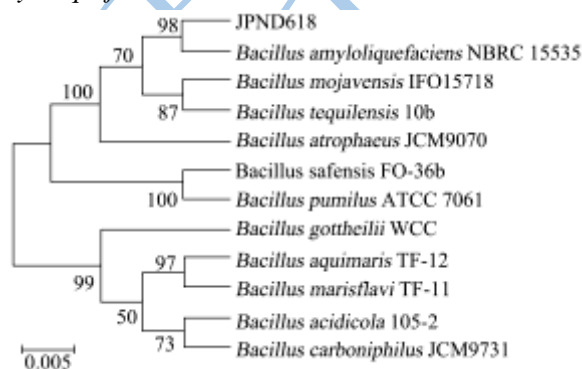


图 2 菌株 JPND618 系统发育树分析

Fig.2 The phylogenetic tree of the strain JPND618

2.2 γ -PGA 的发酵生产及鉴定

利用菌株JPND618发酵生产 γ -PGA, 对产物进行提纯并鉴定。实验结果表明, 提纯产物溶液中添加饱和硫酸铜溶液产生蓝色络合物, 震荡, 络合物不消失, 与蛋白质的颜色反应相同。提纯产物水溶液紫外扫描结果如图3所示, 图3显示该提纯产物的最大吸收峰为 208 nm, 并且只出现一个峰, 与文献[41]的典型紫外吸收波长214 nm相近。由于蛋白质在280 nm有典型的吸收峰, 而该物质在280 nm没有峰出现, 说明该聚合物没有典型的肽链结构, 不属于蛋白质, 产物中含有 α -氨基与 γ -羧基形成的酰胺键, 属于聚酰胺类化合物。提纯产物和其水解产物进行TLC分析, 以L-谷氨酸为对照, 结果见图4。图4表明, 与L-谷氨酸对照品比较, 水解后的样品有明显的谷氨酸色点, 且无其他色点, 说明提纯产物水解样中主要成分为L-谷氨酸, 进一步表明提纯产物为L-谷氨酸的聚合物。HPLC检测结果 (图5) 显示, 提纯产物与对照 γ -PGA在相同色谱条件下进行

HPLC分析, 提纯产物HPLC图谱中与标准品图谱中相同保留时间处有一主峰, 结合上述鉴定结果, 说明菌株JPND618发酵产物为 γ -PGA。

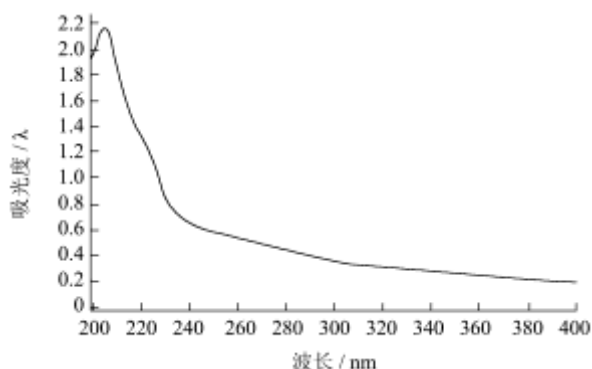


图 3 发酵产物紫外扫描谱图

Fig.3 UV spectrum colonial of fermenting product



图 4 发酵产物水解产物 TLC 谱图

Fig.4 TLC spectrogram of fermenting product hydrolysate

注: 1-L-谷氨酸标准品; 2-发酵产物; 3-发酵产物水解产物

2.3 γ -PGA 性能研究

由 γ -PGA的分子结构可知, 其分子链中含有大量的游离羧基, 与水分子易于形成氢键从而使之与水分子具有较强亲和力, 从而决定了 γ -PGA良好的吸水性能。同时也是因为这种作用的存在 γ -PGA可以将水分子“抓住”, 水分子的失去将变得困难, 从而使得 γ -PGA具有一定的保水能力。菌株JPND618发酵生产 γ -PGA吸水性能研究结果如图6所示, 保水性能研究结果如图7所示。图6表明, 相同质量的 γ -PGA与PAM分别在1000 mL水中经过磁力搅拌器充分吸收水分, 随着时间的增加, 二者的吸水倍数均持续增加, 吸水7 h后, 吸水倍数达到最大, γ -PGA的最大吸水倍数达124.00 g/g, 比PAM的最大吸水倍数高20%, 表明 γ -PGA具有比PAM更好的吸水性。图7表明, 25 °C下, γ -PGA对土壤的保水作用与常用保水剂PAM作用相当, 土壤保水作用可持续36 h以上, 比不加保水剂的土壤中水分维持时间长80%。

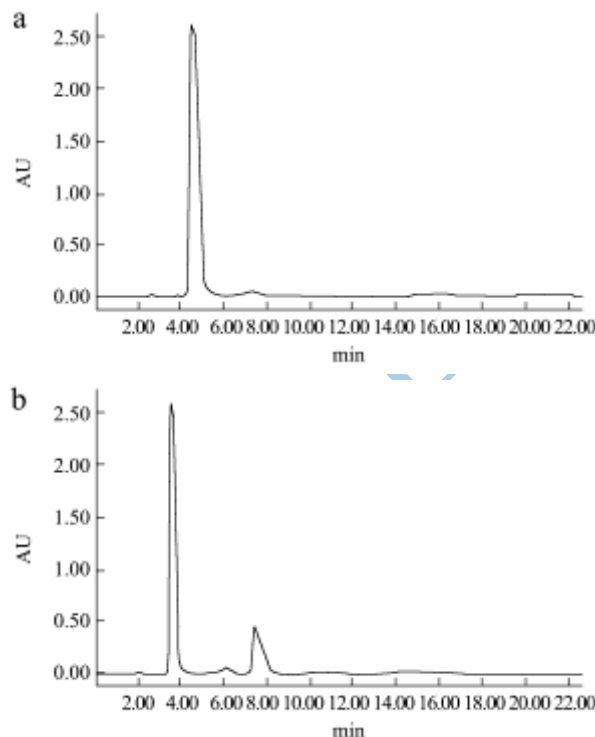


图 5 γ -PGA 标准品 (a) 与发酵产物 (b) HPLC 图谱

Fig.5 HPLC spectrogram of γ -PGA standards (a) and fermenting product (b)

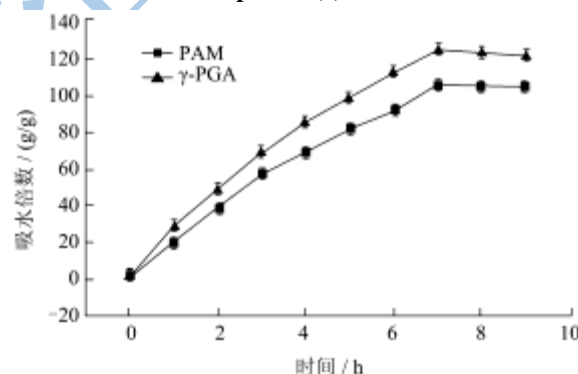


图 6 γ -PGA 与 PAM 吸水性能比较

Fig.6 Comparison on water absorption property of γ -PGA and PAM

阴离子聚合物在水中易解离生成阴离子, 在与碳酸钙微晶碰撞时, 会发生物理化学吸附现象, 使微晶粒的表面形成双电层, 使之带负电。阴离子聚合物的链状结构可吸附多个相同电荷的微晶, 静电斥力可阻止微晶相互碰撞, 从而避免了大晶体的形成, 出现晶粒均匀分散现象, 将 CaSO_4 、 CaCO_3 稳定在溶液中。作为一种典型的阴离子聚合物, γ -PGA亦具有这种阻垢性能。本文研究了菌株JPND618发酵生产 γ -PGA针对 CaSO_4 、 CaCO_3 的阻垢性能, 图8表明, 作用温度60 °C以下时, γ -PGA对 CaSO_4 、 CaCO_3 的阻垢率均达到70%以上, 其中对 CaSO_4 的阻垢能力可达80%以上, 作用温

度80 °C 以下时,随着温度的升高,阻垢能力没有太大变化,表明 γ -PGA能够作为一种有效的阻垢剂加以应用。试验结果同时表明,当作用温度高于80 °C时,随着温度的升高, γ -PGA的阻垢能力开始降低,尤其对CaCO₃的阻垢效果随温度升高显著下降,100 °C时阻垢率仅不到10%。这是因为CaSO₄和CaCO₃在水中的溶解度随着温度的升高而降低,使其阻垢效果下降。研究结果表明, γ -PGA具有阻垢性能优良、水剪性强、对人体及环境无毒及可生物降解等性能,是一种具有发展潜力的生物环保型阻垢剂。

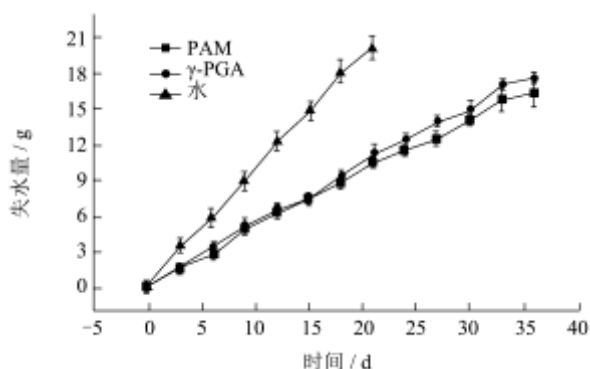


图7 γ -PGA 与 PAM 保水性能比较

Fig.7 Comparison on water-retaining property of γ -PGA and PAM

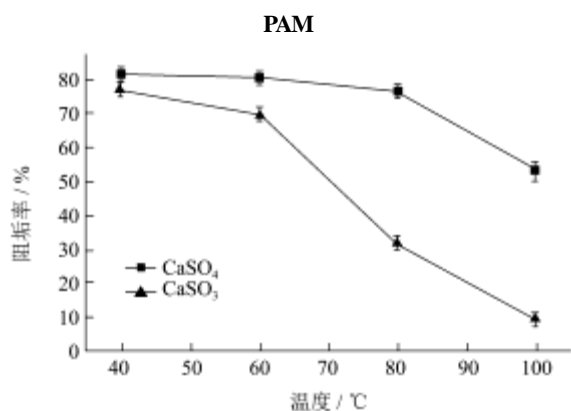


图8 γ -PGA 在不同温度下的阻垢性能

Fig.8 Scale property of γ -PGA under different temperatures

γ -PGA分子链中含有的大量游离羧基及其链状结构使其具有絮凝特性。本文研究了菌株JPND618发酵生产 γ -PGA对高岭土悬浮液的絮凝特性,图9表明,随着絮凝时间的延长, γ -PGA对高岭土悬浮液的絮凝率呈增加趋势,絮凝21h时达到最大絮凝率80.33%,表明产物 γ -PGA对高岭土悬浮液具有良好的絮凝作用。

环境土壤微生物对菌株JPND618发酵生产 γ -PGA及PAM降解情况如图10所示,降解25 d时, γ -PGA降解率可达76.67%,远高于PAM降解率14.90%。表明在相同的降解条件下, γ -PGA的可生物降解性能远优于PAM,是一种良好的环境友好型生物材料。

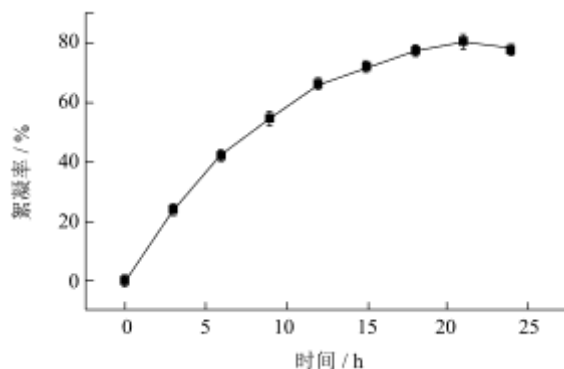


图9 γ -PGA 对高岭土悬浮液的絮凝性能

Fig.9 Flocculation of γ -PGA towards Gaolin suspension at different temperatures

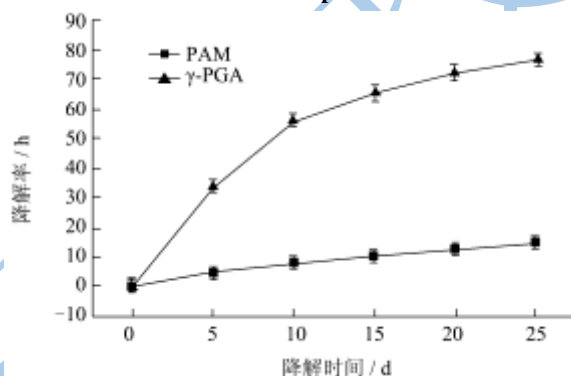


图10 γ -PGA 与 PAM 可生物降解性能比较

Fig.10 Comparison on biodegradable property of γ -PGA and PAM

3 结论

本研究以购自日本的纳豆为样品,采用划线法分离出一株具有 γ -PGA生产能力的菌株(JPND618)。通过对该菌株形态、生理生化特性研究以及16S rRNA序列对比分析,对其进行了鉴定。同时对发酵产物进行了分析鉴定,研究了其吸水性能、阻垢性能、絮凝性能及可生物降解性能。结果表明:

3.1 通过发酵产物颜色反应、紫外扫描、水解产物TLC分析以及HPLC分析,证明了菌株JPND618具有 γ -PGA生产能力,发酵生产 γ -PGA产量为4.86 g/L。

3.2 结合菌落形态及细胞形态,采用生理生化实验以及16S rRNA序列对比分析对菌株JPND618进行了鉴定。结果表明,该菌株生化特征与芽孢杆菌属相似,16S rDNA序列与*Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535同源性达98%,鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

3.3 对发酵产物 γ -PGA吸水性、阻垢性、絮凝性及可生物降解性进行研究,结果表明, γ -PGA的吸水性、可生物降解性明显优于PAM,保水性能与PAM相当,对

CaSO₄、CaCO₃的阻垢率最高可达70%以上,对高岭土悬浮液具有良好的絮凝作用,表明菌株JPND618发酵生产 γ -PGA是一种性能优良的环境友好型生物材料,具有很好的应用前景。

3.4 本研究为 γ -PGA的发酵生产提供了一株新的菌种,对 γ -PGA的生物合成研究及应用具有积极意义。

参考文献

- [1] 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
LU Meng, LIANG Jin-zhong, WANG Feng-qing. An investigation and comparison of batch and fed-batch fermentation of *Bacillus subtilis* for γ -PGA production [J], Food Science, 2011, 23(32):225-228
- [2] CAMERO G P, CONGREGADO F. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly (γ -glutamic acid) [J]. Bou. Biotech. & Bioeng., 1999, 63(1): 110-115
- [3] 刘常金,郑焕兰,姜川,等.纳豆芽孢杆菌液体发酵生产 γ -聚谷氨酸[J].现代食品科技,2009,25(8):935-939
LIU Chang-jin, ZHENG Huan-lan, JIANG Chuan, et al. Production of γ -poly glutamic acid via liquid fermentation by *Bacillus subtilis* natto [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 8(25): 935-939
- [4] Bajaj I Singhal R. Poly (glutamic acid)-an emerging biopolymer of commercial interest [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5551-5561
- [5] Mitsui M, Mizuno A, Tanimoto H, et al. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly (glutamic acids) [J]. J. Agric. Food Chem., 1998, 46(3): 891-895
- [6] Liu J, Ma X, Wang Y, et al. Depressed biofilm production in *Bacillus amyloliquefaciens* C06 causes γ -polyglutamic acid (γ -PGA) overproduction [J]. Current Microbiology, 2011, 62, 235-241
- [7] Fan Zhu, Jin Cai, Xiangting Wu. The main byproducts and metabolic flux profiling of γ -PGA-producing strain *B. subtilis* ZJU-7 under different pH values [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(1): 67-74
- [8] 佟盟,徐虹,王军. γ -聚谷氨酸降解影响因素及其生物降解性能的研究[J].南京工业大学学报(自然科学版), 2006, 28(1): 50-53
TONG Meng, XU Hong, WANG Jun. Influence effects and performance of γ -PGA degradability [J]. JOURNAL OF NANJING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (Natural Science Edition), 2006, 28(1): 50-53
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Manual of Commonly Determinative Bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001
- [10] 肖苏尧,彭维,李赟,等.虎杖中白藜芦醇生物转化菌的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2012,28(7):749-752
XIAO Su-yao, PENG Wei, LI Yun, et al. Screening and Identification of Strain for Resveratrol Biotransform from *Polygonum cuspidatum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 749-752
- [11] 鞠蕾,马霞,张佳. γ -聚谷氨酸的发酵及保水性能[J].中国酿造, 2011,232(7):57-60
JU Lei, MA Xia, ZHANG Jia. Fermentation of γ -poly glutamic acid and its water holding capacity [J]. China Brewing, 2011, 232(7): 57-60
- [12] 蒋守红,徐杰武.有机膦酸阻碳酸钙垢性能研究[J].化学世界,2013,5:273-275
JIANG Shou-hong, XU Jie-wu. Inhibition performance of organic phosphonic acid on calcium carbonate scale [J]. Chemical World, 2013, 5: 273-275
- [13] 李文婧,刘建军,赵祥颖. γ -聚谷氨酸(γ -PGA)絮凝特性的研究.酿酒,2012,39(1):98-100
LI Wen-jing, LIU Jian-jun, ZHAO Xiang-ying. Flocculating activity of γ -PGA produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. LIQUOR MAKING, 2012, 39(1): 98-100
- [14] Bhatt Rama, de Vries Peter, Tulinsky John, et al. Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(1-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin [J]. Medicinal Chemistry. 2003, 46(1): 190-193