

# 玉米秸秆水解液综合利用生产 $\gamma$ -聚谷氨酸

陈鹏程,任东雪,李佳涵,郑 璞

(江南大学 生物工程学院,工业微生物教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

**摘要:**以玉米秸秆预处理以及酶水解得到的还原糖作为碳源发酵产  $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA),分别探究了葡萄糖、木糖、L-谷氨酸钠一水合物和金属离子对 *B. subtilis* CGMCC 1250 生长以及  $\gamma$ -PGA 生产的影响,在摇瓶中优化培养基组分,并进行发酵罐放大操作。结果表明:玉米秸秆经过稀碱预处理以及复合酶水解后,得到的混合糖质量浓度为  $(76.3 \pm 5.7)$  g/L,其主要成分是葡萄糖和木糖,两者比例为 2.19:1;在配制发酵培养基时添加 40 g/L 的 L-谷氨酸钠一水合物,及  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.29 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.11 g/L,摇瓶发酵可得到产量为  $(20.5 \pm 2.70)$  g/L 的  $\gamma$ -PGA;在 3 L 发酵罐实验中采用补料分批发酵的方式生产可以提高产物产量,得到产量为 25.6 g/L 的  $\gamma$ -PGA。

**关键词:**玉米秸秆水解液;葡萄糖;木糖;发酵; $\gamma$ -聚谷氨酸

中图分类号:TQ922.1;TQ920.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)11-0094-05

## Integrated utilization of corn stover for poly ( $\gamma$ -glutamic acid) production

CHEN Pengcheng, REN Dongxue, LI Jiahuan, ZHENG Pu

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Corn stover was pretreated and enzymatically hydrolyzed into reducing sugar to produce poly  $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) by fermentation. The effects of glucose, xylose, L-monosodium glutamate monohydrate and metal ion on the growth of *B. subtilis* CGMCC 1250 and  $\gamma$ -PGA production were studied, and the components of the fermentation medium were optimized and fermentation was conducted in a fermenter. The results showed that corn stover was pretreated by dilute base and enzymatically hydrolyzed by compound enzyme, and mass concentration of the reducing sugar was  $(76.3 \pm 5.7)$  g/L. The hydrolysate was mainly composed by glucose and xylose, with a ratio of 2.19:1. Then 40 g/L of L-monosodium glutamate monohydrate, 0.29 g/L of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g/L of  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.11 g/L of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  were added into the initial fermentation medium, resulting into  $(20.5 \pm 2.70)$  g/L of  $\gamma$ -PGA. Finally, a fed-batch strategy was conducted in a 3 L fermenter to increase product yield, and 25.6 g/L of  $\gamma$ -PGA was achieved.

**Key words:** corn stover hydrolysate; glucose; xylose; fermentation; poly( $\gamma$ -glutamic acid)

$\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -PGA)是一种聚合物功能材料,其高吸水性、良好的生物相容性使其在农业、医

药、食品、化妆品等诸多领域表现强劲<sup>[1]</sup>。在食品领域, $\gamma$ -PGA 可以与食品中油脂和脂肪酸结合形成抗氧化剂,避免油脂和脂肪酸在高温加工时遭到破坏; $\gamma$ -PGA 作为添加剂可以促进唾液分泌从而刺激味觉、增进食欲; $\gamma$ -PGA 还可以起到延缓食物变质的作用,将其添加到沙拉酱中能够增强牛乳的稳定性,延长其酸败变质时间;此外, $\gamma$ -PGA 还对食物中的毒素有较好的抑制作用<sup>[2-6]</sup>。微生物生产  $\gamma$ -PGA 的菌株主要是芽孢杆菌属的细菌,如枯草

收稿日期:2018-07-06;修回日期:2018-07-17

基金项目:国家自然科学基金青年基金(21604032);“十二五”农村领域国家科技计划(2015BAD15B04)

作者简介:陈鹏程(1988),女,讲师,博士,研究方向为发酵工程、功能材料(E-mail) chenpengcheng@jiangnan.edu.cn。

通信作者:郑 璞,教授,博士(E-mail) zhengpu@jiangnan.edu.cn。

芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,最常见用于生产的碳源是六碳糖和柠檬酸<sup>[7-8]</sup>。为了适应不同行业对产品的需求,研究者仍然在不断寻找廉价可再生的原料以降低生产成本。

我国是农业大国,玉米、水稻、小麦、甘蔗在我国种植面积广、产量高,每年产生大量的纤维素废弃物。传统的处理这些农业废弃物的方式有填埋、焚烧、作为堆肥,这些处理方式存在对环境的污染或成本较高,因此急需经济环保的处理农业废弃物的方式。将农业废弃物水解后产生的糖液作为碳源进行发酵生产目标产物是一个很好解决农业废弃物的方式,兼具经济性和环保价值。目前农业废弃物用于实际生产 $\gamma$ -PGA的例子还比较少,原因主要有木质纤维素降解成可利用糖的效率不高以及能利用木糖转化生产聚合物的细菌种类较少等。

本研究考察了菌株 *B. subtilis* CGMCC 1250 以玉米秸秆水解液作为碳源发酵生产 $\gamma$ -PGA的可行性,通过稀碱预处理、复合酶水解得到富含葡萄糖和木糖的玉米秸秆水解液,分别探讨了葡萄糖和木糖对菌体生长和 $\gamma$ -PGA生产的影响,并证明了玉米秸秆水解液能够高效转化为产物,为工业化生产 $\gamma$ -PGA提供了一种廉价可再生原料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* CGMCC 1250),由浙江大学徐志南教授赠予,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)<sup>[9]</sup>。玉米秸秆产自于江苏连云港,晒干粉碎后过80目筛。纤维素酶购自山东泽生生物科技有限公司,木聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶购自白银赛诺生物科技有限公司。

种子培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 5 g/L, NaCl 5 g/L,木糖 5 g/L,115℃灭菌 20 min;发酵初始培养基:碳源 60 g/L,蛋白胨 40 g/L, L-谷氨酸钠一水合物 40 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0, 115℃灭菌 20 min。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 玉米秸秆的预处理和酶水解

预处理:取过筛后的玉米秸秆按照 1:20 的料液比加入质量分数 1% 的 NaOH 水溶液,灭菌锅 121℃ 处理 40 min,处理后 300 目纱布抽滤过滤,并水洗残渣至中性,70℃ 烘干备用。

酶水解:称取 2 g 预处理后的干燥玉米秸秆于 50 mL 的醋酸钠缓冲溶液(50 mmol/L, pH 4.8)中,添加纤维素酶、木聚糖酶以及 $\beta$ -葡萄糖苷酶,添加量分别为 25、85、40 FPU/g(以底物干质量计,下

同),于 50℃ 摇床中 180 r/min 振荡反应一定时间。

#### 1.2.2 发酵

摇瓶发酵:取 -40℃ 条件下的冷冻甘油管中的 *B. subtilis* 以体积分数 1% 的接种量接入种子培养基,于 37℃ 摇床中 110 r/min 振荡培养 12 h。按照体积分数 10% 的接种量将种子液装入 250 mL 锥形瓶中,发酵培养基装液量为 30 mL,调节 pH 为 7.0,于 37℃ 摇床中 200 r/min 振荡培养 48 h。

发酵罐发酵:采用 3 L 发酵罐,装液量为 1.5 L, 115℃ 灭菌 20 min。以体积分数 6% 的接种量接入种子液,发酵过程控制温度为 37℃,通气量为 2 L/min,转速为 600 ~ 1 000 r/min。发酵过程中通过体积分数 25% 盐酸与体积分数 50% 氨水维持罐体的 pH 在 7.0 左右。在流加补料操作中,在糖质量浓度低于 5 g/L 时开启蠕动泵流加 200 g/L 的高质量浓度的糖溶液,流速设置为 15 ~ 20 mL/h,使罐体中糖质量浓度保持在 5 ~ 10 g/L。

#### 1.2.3 检测分析

以去离子水为空白对照,利用可见光分光光度计在波长 600 nm 处检测菌液的吸光值 OD<sub>600</sub> 来表征生物量。

用高效液相色谱分析玉米秸秆水解液中还原糖的含量,色谱柱为 Aminex HPX-87H 型反相色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 10 μm),流动相为 3.3 mmol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,流速 0.5 mL/min,检测器温度 35℃,柱温 55℃。

$\gamma$ -PGA 采用称重法检测,取 5 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 30 min 除去菌体,取上清加入 15 mL 乙醇沉淀,在 12 000 r/min 转速下离心 30 min,将沉淀置于 60℃ 真空干燥箱烘干称重。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米秸秆的预处理对玉米秸秆水解效果的影响

通过 NERL 法<sup>[10]</sup>测定玉米秸秆中纤维素含量为(38.0 ± 5.6)%,半纤维素含量为(23.6 ± 1.8)%,木质素含量为(16.5 ± 2.3)%。预处理可以去除结晶纤维素,增加后期纤维素酶对于纤维素的可及性,降低纤维素的聚合度,去除木质素等。玉米秸秆用质量分数为 1% 的 NaOH 水溶液进行预处理后纤维素含量为(58.7 ± 6.6)%,半纤维素含量为(33.6 ± 2.5)%,木质素含量为(5.7 ± 0.6)%,说明预处理后纤维素含量比较高,有利于后期用酶进行水解的过程。图 1 为预处理对玉米秸秆水解效果的影响。

由图 1 可以看出,玉米秸秆经过预处理水解后的总糖质量浓度明显高于未预处理时的总糖质量浓

度,在 80 h 时得到的总糖质量浓度为  $(76.3 \pm 5.7)$  g/L。总糖液中主要成分是葡萄糖和木糖,两者比例为 2.19:1,此外还有少量的阿拉伯糖。

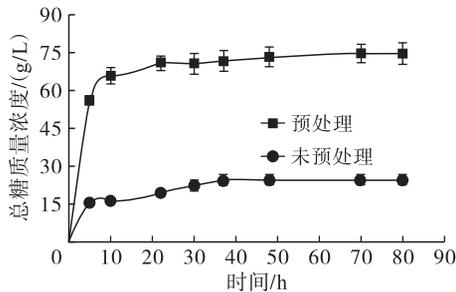


图1 预处理对玉米秸秆水解效果的影响

## 2.2 葡萄糖和木糖对 *B. subtilis* 生长和 $\gamma$ -PGA 产量的影响

碳源是生物生长以及生产活动重要的能源物质。由于玉米秸秆水解液中主要含有葡萄糖和木糖,因此通过摇瓶实验分别研究这两种碳源对 *B. subtilis* 生长和  $\gamma$ -PGA 产量的影响,结果如图 2(a)和(b)所示。

由图 2(a)可以看出,发酵液生物量以及  $\gamma$ -PGA 产量随着葡萄糖质量浓度的增加先增加后下降,当葡萄糖质量浓度为 60 g/L 时,生物量以及  $\gamma$ -PGA 产量均达到最大值。木糖也可作为有效碳源为菌体生长和产物生成提供支持。由图 2(b)可以看出,当木糖质量浓度为 60 g/L 时, $\gamma$ -PGA 产量最

高;而质量浓度分别为 80 g/L 和 100 g/L 的木糖更有利于菌体生长,综合考虑生物量以及产物产量,木糖的最适质量浓度为 40 g/L。比较这两种单糖对 *B. subtilis* 生长和  $\gamma$ -PGA 产量的影响结果,可以看出,木糖更利于菌体生长,而葡萄糖能更有效地被 *B. subtilis* 利用生产  $\gamma$ -PGA。将发酵培养基中碳源质量浓度固定为 60 g/L,使用不同葡萄糖和木糖浓度配比的模拟糖液作为碳源在摇瓶中发酵产  $\gamma$ -PGA,并与直接以玉米秸秆水解液作为碳源的结果相比较,结果如图 2(c)所示。由图 2(c)可以看出,使用混合糖液发酵得到的  $\gamma$ -PGA 产量高于单一使用葡萄糖或者木糖,且葡萄糖含量的提高有利于产物生成。值得注意的是,使用玉米秸秆水解液发酵可得产量为  $(8.50 \pm 0.20)$  g/L 的  $\gamma$ -PGA,这一数值与使用葡萄糖与木糖比例为 2:1 的混合糖液得到的结果相当,证明了玉米秸秆水解液作为碳源发酵产  $\gamma$ -PGA 的可行性。以下实验均以总糖质量浓度为 60 g/L 的玉米秸秆水解液作为碳源。由图 2(c)还可以看出,使用玉米秸秆水解液发酵后的生物量低于直接使用葡萄糖与木糖比例为 2:1 的混合糖液发酵得到的生物量,这可能是由于玉米秸秆水解液中除了葡萄糖和木糖,还存在一些醛类物质,这些物质会对菌体生长带来抑制作用。

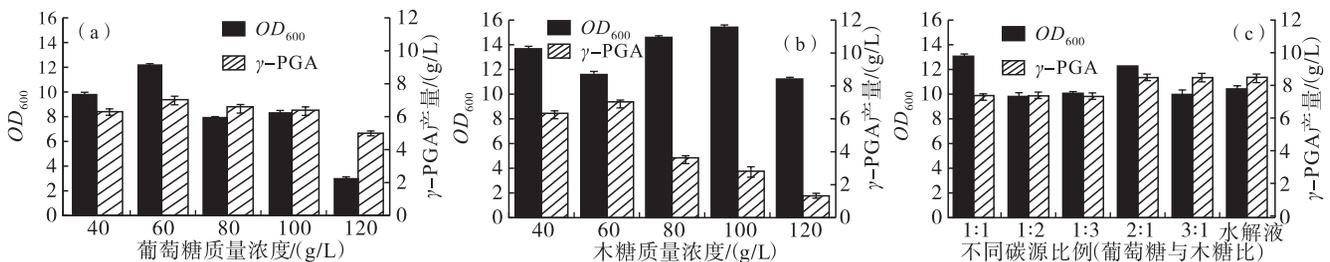


图2 葡萄糖(a)、木糖(b)及其配比(c)对生物量和  $\gamma$ -PGA 产量的影响

## 2.3 *L*-谷氨酸钠一水合物添加量和添加时间对 *B. subtilis* 生长和 $\gamma$ -PGA 产量的影响

由于 *B. subtilis* CGMCC 1250 是外源性谷氨酸依赖型菌株,主要利用外源谷氨酸合成  $\gamma$ -PGA,因

此研究了 *L*-谷氨酸钠一水合物添加量和添加时间对 *B. subtilis* 生长和  $\gamma$ -PGA 产量的影响,结果如图 3 所示。

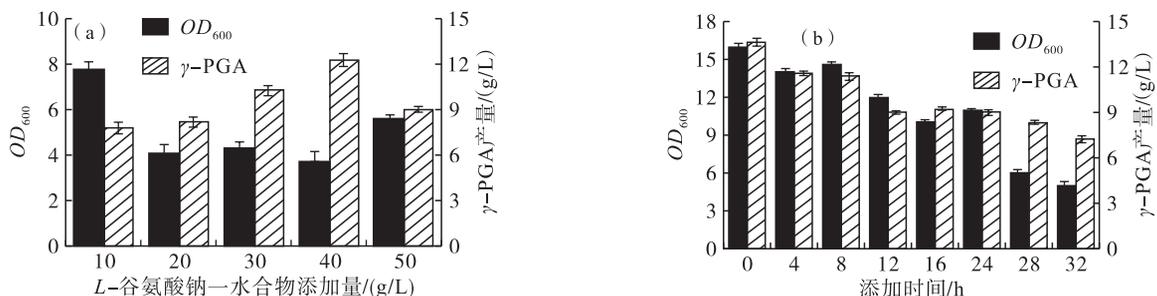


图3 *L*-谷氨酸钠一水合物添加量(a)和添加时间(b)对 *B. subtilis* 生长和  $\gamma$ -PGA 产量的影响

由图3(a)可以看出,*L*-谷氨酸钠一水合物添加量为40 g/L时可以获得 $\gamma$ -PGA最高产量,故选择40 g/L为最适添加量。值得一提的是在不添加外源谷氨酸时,仍然可以得到 $(8.50 \pm 0.20)$  g/L的 $\gamma$ -PGA,这说明可能存在来自碳源通过内循环合成的物质作为合成 $\gamma$ -PGA的前体<sup>[11]</sup>。由图3(b)可以看出,如果在配制培养基时直接添加*L*-谷氨酸钠一水合物,发酵后得到的 $\gamma$ -PGA产量最高,为 $(13.6 \pm 2.39)$  g/L,此时生物量也为最大;随着添加时间的推后, $\gamma$ -PGA的产量呈现下降趋势。鉴于上述结果,在配制发酵培养基时直接添加40 g/L的*L*-谷氨酸钠一水合物。

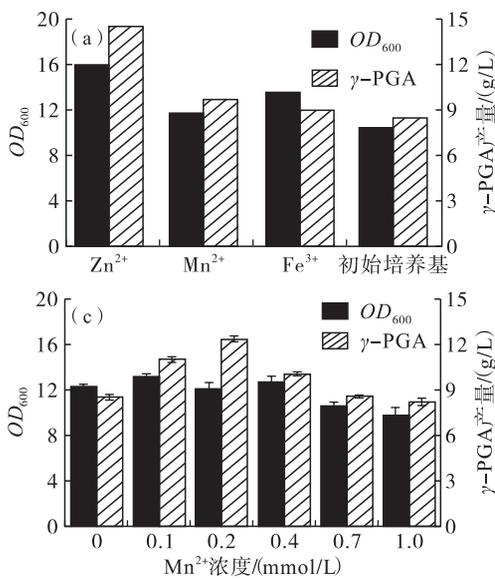


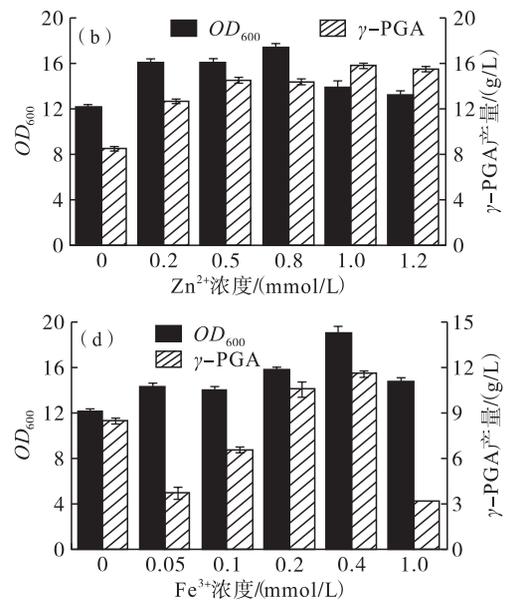
图4 金属离子对*B. subtilis*生长和 $\gamma$ -PGA产量的影响

由图4(b)可以看出,添加Zn<sup>2+</sup>可以使 $\gamma$ -PGA产量得到明显提高,Zn<sup>2+</sup>浓度在1.0 mmol/L时, $\gamma$ -PGA产量高达 $(15.8 \pm 0.20)$  g/L;生物量随着Zn<sup>2+</sup>浓度的升高先呈现增大趋势,在Zn<sup>2+</sup>浓度为0.8 mmol/L时,生物量达到最大值,进一步增加Zn<sup>2+</sup>浓度会对菌体生长产生抑制作用。由图4(c)可以看出,Mn<sup>2+</sup>浓度为0.2 mmol/L时, $\gamma$ -PGA产量达到最大值,为 $(12.3 \pm 0.15)$  g/L;Mn<sup>2+</sup>浓度超过0.4 mmol/L会抑制菌体生长,此时 $\gamma$ -PGA产量降低。由图4(d)可以看出,添加Fe<sup>3+</sup>可以显著提高生物量,生物量随着Fe<sup>3+</sup>浓度的升高呈现先增加后下降的趋势;Fe<sup>3+</sup>浓度为0.2、0.4 mmol/L时, $\gamma$ -PGA产量增加,在0.4 mmol/L时,生物量和 $\gamma$ -PGA产量同时达到最大值。

根据以上结果可知,Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>的最适浓度分别为1.0、0.2 mmol/L以及0.4 mmol/L,相对应的添加水合盐的质量浓度分别为ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

## 2.4 金属离子对*B. subtilis*生长和 $\gamma$ -PGA产量的影响

金属离子对聚谷氨酸合成酶及其他三羧酸循环的酶类有着重要影响,进而会影响菌体生长和 $\gamma$ -PGA合成。分别研究了添加Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>对菌体生长以及产物生成的影响,这3种离子均以水合盐的形式添加。结果如图4所示。图4(a)显示的是离子浓度均为0.5 mmol/L时得到的结果。由图4(a)可以看出,以上3种离子均对*B. subtilis*生长以及 $\gamma$ -PGA的生成有促进作用。接下来分别研究这3种离子浓度对*B. subtilis*生长和 $\gamma$ -PGA产量的影响。



0.29 g/L、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g/L、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.11 g/L,并将这3种水合盐同时加入发酵培养基中,发酵可得 $\gamma$ -PGA产量为 $(20.5 \pm 2.70)$  g/L,较未添加时产量提高了50.7%。

## 2.5 玉米秸秆水解液生产 $\gamma$ -PGA的发酵罐放大研究

采用摇瓶优化的条件于3 L发酵罐中进行 $\gamma$ -PGA的生产,图5(a)为分批发酵结果。由图5(a)可以看出,前8 h菌体主要消耗葡萄糖实现快速增长,木糖几乎不被消耗;随后葡萄糖和木糖同时被消耗, $\gamma$ -PGA产量持续增加,在24 h达到最大值18.3 g/L,此时葡萄糖几乎耗尽;24 h之后菌体利用木糖生长,生物量增长,但是 $\gamma$ -PGA产量开始下降,这可能由于 $\gamma$ -PGA是聚合物,胞外其他产物的累积会使其水解酶活力增加,从而降解 $\gamma$ -PGA供自己生长<sup>[12]</sup>。

为了提高产物产量,在发酵液中葡萄糖质量浓

度低于 5 g/L 时,采用流加高质量浓度玉米秸秆水解液的方式进行补料分批发酵,水解液糖质量浓度为 200 g/L,发酵结果如图 5(b) 所示。由图 5(b) 可以看出,发酵进行到 22 h 时开始补料操作,可以看出补料操作提高了谷氨酸的利用率;22 ~ 34 h 时葡萄糖质量浓度很低,这可能是由于加入的葡萄糖及

时被利用;在 30 h 左右,生物量达到最大值;45 h 左右停止流加,葡萄糖与木糖都保持一定的质量浓度;由于生物量下降,无法利用谷氨酸继续合成  $\gamma$ -PGA,产量在 53 h 时左右开始下降,在 53 h 获得最高  $\gamma$ -PGA 产量,可达到 25.6 g/L。

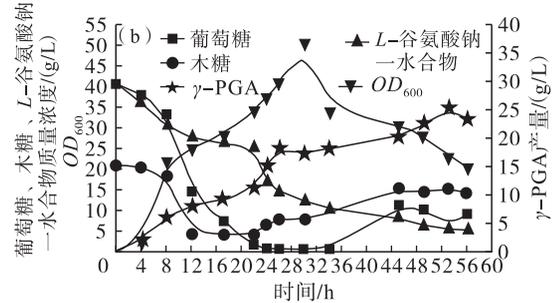
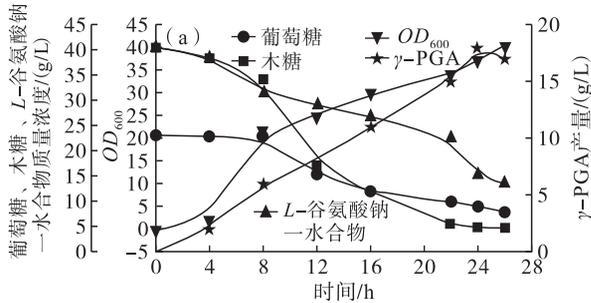


图 5 玉米秸秆水解液分批 (a) 和补料分批 (b) 发酵生产  $\gamma$ -PGA

### 3 结论

本文考察了菌株 *B. subtilis* CGMCC 1250 以玉米秸秆水解液作为碳源发酵生产  $\gamma$ -PGA 的可行性。玉米秸秆经过质量分数 1% 的稀碱预处理以及复合酶水解后,得到的水解液总糖质量浓度明显高于未处理时的总糖质量浓度,混合糖质量浓度为  $(76.3 \pm 5.7)$  g/L,主要成分是葡萄糖和木糖,两者比例 2.19:1。随后在摇瓶中优化了发酵培养基组分:碳源 60 g/L,蛋白胨 40 g/L,L-谷氨酸钠一水合物 40 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g/L,  $CaCl_2$  1 g/L, NaCl 10 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.29 g/L,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g/L,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.11 g/L。摇瓶发酵可得产量为  $(20.5 \pm 2.70)$  g/L 的  $\gamma$ -PGA。最后在 3 L 发酵罐上进行  $\gamma$ -PGA 的放大生产,采用补料分批发酵的方式可以提高产量,得到 25.6 g/L 的  $\gamma$ -PGA。

#### 参考文献:

- [1] SUNG M H, PARK C, KIM C J, et al. Natural and edible biopolymer poly- $\gamma$ -glutamic acid: synthesis, production, and applications [J]. Chem Rec, 2005, 5(6): 352-366.
- [2] 王卫国, 王卫, 赵永亮, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸的研究及应用进展 [J]. 河南工业大学学报, 2016, 37(2): 117-122.
- [3] 王国良, 关阳, 张荣秀, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸在食品中的功能性研究进展 [J]. 食品工业, 2013, 34(10): 201-213.
- [4] FONSECA V D C D, HAMINIUK C W I, IZYDORO D R, et al. Stability and rheological behaviour of salad dressing

obtained with whey and different combinations of stabilizers [J]. Int J Food Sci Tech, 2009, 44(4): 777-783.

- [5] WANG T L, KAO T H. Inhibition effect of poly( $\gamma$ -glutamic acid) on lead-induced toxicity in mice [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(23): 12562-12567.
- [6] LIU J, HE D, LI X Z, et al.  $\gamma$ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 15(8): 190-197.
- [7] BAJAJ I, SINGHAL R. Poly(glutamic acid)—an emerging biopolymer of commercial interest [J]. Bioresour Technol, 2011, 102(10): 5551-5561.
- [8] 石东霞.  $\gamma$ -聚谷氨酸的微生物合成、分离纯化及性质与应用研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2010.
- [9] ZHU F, CAI J, ZHENG Q, et al. A novel approach for poly- $\gamma$ -glutamic acid production using xylose and corn cob fibers hydrolysate in *Bacillus subtilis* HB-1 [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2014, 89: 616-622.
- [10] 陶生涛. 以甘蔗渣为原料发酵生产丁二酸的研究 [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2015.
- [11] LUO Z T, GUO Y, LIU J D, et al. Microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives [J]. Biotechnol Biofuels, 2016, 9: 134.
- [12] YOON S H, DO J H, LEE S Y, et al. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis* [J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 585-588.