

# 地衣芽胞杆菌 WX-02 补糖发酵聚 $\gamma$ -谷氨酸的工艺优化

胡丽芳 李欣 冀志霞 陈守文

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) WX-02 为研究对象, 在摇瓶发酵中得到优化的葡萄糖补料方案, 即初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时, 发酵至 15 h 一次性补加 15 g/L 葡萄糖。将此补料方案在 3 L 发酵罐上进行验证, 结果表明: 发酵生物量和聚  $\gamma$ -谷氨酸产量最大值分别为 3.9 g/L 和 44.5 g/L, 与对照相比分别提高 56% 和 50%; 谷氨酸利用率达到 46%, 而对照中仅为 30%。通过补糖可以提高生物量, 提高对谷氨酸的利用率, 从而提高聚  $\gamma$ -谷氨酸发酵水平。

**关键词** 地衣芽胞杆菌; 聚  $\gamma$ -谷氨酸; 补糖发酵; 生物量; 产量

**中图分类号** TQ 920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0287-06

聚  $\gamma$ -谷氨酸 (poly  $\gamma$ -glutamic acid, 简称  $\gamma$ -PGA) 是微生物合成的一种高分子聚合物, 由 D-型或 L-型谷氨酸通过  $\alpha$ -氨基和  $\gamma$ -羧基形成肽键后连接而成。由于分子链上带有大量的游离羧基, 使得其在食品加工、微生物制剂、农业、医药和水处理等领域有广泛的应用<sup>[1-4]</sup>。

目前,  $\gamma$ -PGA 生产多采用微生物发酵, 葡萄糖作为常用碳源, 在微生物代谢中除作为细胞生长基质外, 还可提供大量的 ATP 用于产物  $\gamma$ -PGA 的合成。但培养基中葡萄糖浓度过高会抑制细胞生长, 从而影响  $\gamma$ -PGA 合成; 浓度过低则会导致  $\gamma$ -PGA 产量下降<sup>[5]</sup>, 而合适的葡萄糖浓度会减少菌体代谢副产物, 如乙酸的产生<sup>[6]</sup>。与传统的分批发酵相比, 补料分批发酵可以解除底物抑制、葡萄糖效应等问题, 补料分批发酵在  $\gamma$ -PGA 生产中具有很好的应用前景<sup>[7]</sup>。在  $\gamma$ -PGA 发酵过程中, 缪静等<sup>[8]</sup> 在 10 L 发酵罐中培养 *Bacillus subtilis* y102, 采用溶氧控制的脉冲补料方式, 在残糖质量浓度降至 10 g/L 时根据溶氧情况调整葡萄糖与柠檬酸 (体积比为 50:1) 流加速率, 发酵 50 h 后  $\gamma$ -PGA 产量达到 34.5 g/L; Yao 等<sup>[9]</sup> 在 *B. subtilis* NX-2 发酵生产  $\gamma$ -PGA 时, 当初始葡萄糖质量浓度为 10 g/L 时采用

流加方式在 3 L 发酵罐补加葡萄糖, 并使其质量浓度保持在 5~10 g/L, 发酵 120 h 后,  $\gamma$ -PGA 最高产量为 42.0 g/L; Sung 等<sup>[10]</sup> 通过同时脉冲补加柠檬酸 (1.44 g/h) 和谷氨酸 (2.4 g/h),  $\gamma$ -PGA 最高产量达到 35.0 g/L。Huang 等<sup>[11]</sup> 利用 *B. subtilis* ZJU-7 在 10 L 发酵罐中发酵生产  $\gamma$ -PGA, 以 40 g/L 酵母粉和 30 g/L 谷氨酸为基质, 通过补料发酵维持葡萄糖质量浓度在 3~10 g/L, 发酵周期 50 h,  $\gamma$ -PGA 最高产量和  $\gamma$ -PGA 生产力分别达到 101.1 g/L 和 2.19 g/(L·h), 并在 100 L 发酵罐中得到成功放大。因此, 通过调整培养基的成分和补料工艺, 可以充分发挥菌种的生产潜力, 提高发酵水平。本研究利用筛选得到的 1 株地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*) WX-02 (前期工作已确定其最适碳源及发酵条件) 探讨葡萄糖质量浓度及补糖发酵对  $\gamma$ -PGA 产量的影响, 以期对地衣芽胞杆菌 WX-02 工业化补糖发酵生产  $\gamma$ -PGA 提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*) WX-02 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保藏, 菌

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970036) 和农业科技成果转化资金项目 (2010GB23600662)

胡丽芳, 硕士研究生。研究方向: 微生物工程。E-mail: llifanghu@163.com

通讯作者: 陈守文, 博士, 教授。研究方向: 微生物工程及代谢。E-mail: chenshouwen@mail.hzau.edu.cn

种保藏编号:CCTCC M208065。

## 1.2 培养基

斜面培养基:LB 固体培养基。

种子培养基:LB 液体培养基。

发酵培养基:谷氨酸 70 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 值 7.2~7.4。

## 1.3 培养方法

1) 摇瓶培养。从新鲜斜面挑一环菌于种子培养基中, 控制摇床温度 37 °C, 转速 180 r/min 培养 11 h, 按体积比 2% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 °C, 180 r/min, 培养 35 h。

2) 发酵罐培养。3 L 发酵罐 (Bioflo 110 New Brunswick Scientific Co.) 装液量 1.5 L, 控制温度 37 °C, 转速 600 r/min, 通气量 1.5 L/min。

## 1.4 葡萄糖补加方法

1) 考察不同葡萄糖质量浓度对  $\gamma$ -PGA 合成的影响。在发酵培养基中分别加入 10、30、50 和 70 g/L 葡萄糖, 其他条件不变。

2) 考察摇瓶补糖方案对  $\gamma$ -PGA 合成的影响。当初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L 时, 分别在 10、15 和 20 h 一次性补加 10 g/L 或 20 g/L 葡萄糖; 当初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时, 分别在 10、15 和 20 h 一次性补加 15 g/L 或 30 g/L 葡萄糖, 考察不同补糖方案对  $\gamma$ -PGA 合成的影响。

3) 考察发酵罐补糖方案对  $\gamma$ -PGA 合成的影响。当初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时, 在 15 h 补加 15 g/L 葡萄糖; 以初始葡萄糖质量浓度 70 g/L 和 85 g/L, 中途不补糖为对照。

## 1.5 分析方法

生物量的测定: 质量法<sup>[12]</sup>。

$\gamma$ -PGA 产量采用质量法测定: 取 2 mL 发酵液, 加适量盐酸调节 pH 至 3.0, 10 000 r/min 离心 10 min 后上清加 NaOH 调节至中性, 加入 3 倍体积冷乙醇后振荡, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 2 mL 水溶解后振荡均匀, 加入 3 倍体积冷乙醇振荡, 10 000 r/min 离心 10 min 后沉淀置于 80 °C 烘箱烘干至恒定质量。

葡萄糖和谷氨酸质量浓度的测定: 使用 SBA-40C 生物传感分析仪检测 (山东省科学院)<sup>[13]</sup>。

谷氨酸利用率 = (培养基中初始谷氨酸质量浓度 - 培养基中残留谷氨酸质量浓度) / 培养基中初始

谷氨酸质量浓度  $\times 100\%$ ;

发酵液粘度: 使用 NDJ-1 型旋转式黏度计测定 (上海舜宇衡平科学仪器有限公司)<sup>[12]</sup>。

数据分析方法: 使用 SPSS16.0 对数据进行方差显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 初始葡萄糖质量浓度对 $\gamma$ -PGA 发酵的影响

发酵培养基中分别加入 10、30、50、70 g/L 葡萄糖, 发酵培养 35 h, 考察初始葡萄糖质量浓度对  $\gamma$ -PGA 合成的影响。由表 1 可知, 培养基中葡萄糖质量浓度从 10 g/L 增加到 70 g/L 时, 生物量和  $\gamma$ -PGA 产量随之逐渐提高, 当葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时, 生物量和  $\gamma$ -PGA 产量达到最大, 分别为 3.3 g/L 和 31.0 g/L; 而葡萄糖质量浓度提高到 90 g/L 时, 生物量和  $\gamma$ -PGA 产量分别下降。可见, 葡萄糖质量浓度过低会降低生物量和  $\gamma$ -PGA 产量, 而糖质量浓度过高则会抑制细胞生长和  $\gamma$ -PGA 合成。

从葡萄糖的消耗情况可知, 在初始葡萄糖质量浓度小于 70 g/L 时, 发酵结束残留的葡萄糖为 0.0 g/L。当葡萄糖质量浓度为 90 g/L 时, 发酵结束后培养基中残留葡萄糖质量浓度为 24.0 g/L, 没有消耗完造成浪费。作为  $\gamma$ -PGA 合成的主要底物, 培养基中残留谷氨酸质量浓度与  $\gamma$ -PGA 产量密切相关。

由表 1 可知,  $\gamma$ -PGA 产量越高则残留谷氨酸质量浓度越低, 葡萄糖质量浓度为 70 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量最高达 31.0 g/L, 残留谷氨酸质量浓度为 45.3 g/L。因此, 以葡萄糖质量浓度为 70 g/L 进行葡萄糖分批补加优化, 以期提高  $\gamma$ -PGA 产量。

### 2.2 不同葡萄糖补料方案对 $\gamma$ -PGA 发酵的影响

在地衣芽胞杆菌 WX-02 发酵  $\gamma$ -PGA 过程中, 分别在菌体对数生长期 (即发酵的 10~20 h) 的前期、中期和后期补加葡萄糖补糖方案, 发酵终点时生物量、葡萄糖和谷氨酸质量浓度以及  $\gamma$ -PGA 产量如表 2。当培养基中总葡萄糖质量浓度为 60 g/L 时,  $\gamma$ -PGA 产量在补糖方案中与未采用补料工艺时很接近。随着总糖质量浓度逐步提高, 虽然培养基中初始葡萄糖质量浓度不同, 但是中期补加葡萄糖有利于地衣芽胞杆菌 WX-02 合成  $\gamma$ -PGA。在所有补糖方案中, 在菌体对数生长中期补加葡萄糖分别至 85 和 100 g/L 的效果是最好的, 其发酵终点的生物量分别为 4.0 和 3.7 g/L, 而  $\gamma$ -PGA 产量则分别达到 39.2 和 39.0 g/L。另外, 当将 85 g/L 葡萄糖在

发酵初始阶段一次性加入到培养基中后,生物量和  $\gamma$ -PGA 产量受到严重的影响,比同等总糖质量浓度条件下分别降低了 50% 和 24%,这是因为初始葡萄

糖质量浓度过高会抑制菌体的生长,进而降低  $\gamma$ -PGA 产量。可见,保持适当的培养基中初始葡萄糖质量浓度对于补料工艺和  $\gamma$ -PGA 的合成同样重要。

表 1 初始葡萄糖质量浓度对聚  $\gamma$ -谷氨酸( $\gamma$ -PGA)产量的影响<sup>1)</sup>

Table 1 Effect of different initial glucose concentrations on poly  $\gamma$ -glutamic acid( $\gamma$ -PGA) fermentation

g/L

初始葡萄糖质量浓度 Initial glucose concentration	生物量 Cell dry weight	聚 $\gamma$ -谷氨酸产量 $\gamma$ -PGA yield	残留葡萄糖质量浓度 Residual glucose concentration	残留谷氨酸质量浓度 Residual glutamic acid concentration
10	1.4±0.1 e	5.9±0.2 d	0.0±0.0 b	58.7±0.5 a
30	2.0±0.1 d	15.7±0.4 c	0.0±0.0 b	57.3±0.3 b
50	2.3±0.1 c	23.9±0.7 b	0.0±0.0 b	54.0±1.0 c
70	3.3±0.2 a	31.0±0.7 a	0.0±0.0 b	45.3±0.5 d
90	1.9±0.2 b	29.6±1.4 b	24.0±0.5 a	53.7±0.5 c

1) 同列不同的字母表示 Duncan 检验有显著差异,  $P < 0.05$ , 下同。In the same column, different alphabets denote significant difference of Duncan's-test,  $P < 0.05$ , the same as below.

表 2 不同的补糖方案对  $\gamma$ -PGA 补料分批发酵的影响

Table 2 The results of  $\gamma$ -PGA fermentation under different glucose feeding methods

g/L

初始葡萄糖质量浓度 Initial glucose concentration	补糖方案(补糖量) Glucose feeding method (Glucose amount fed)			葡萄糖总质量浓度 Total glucose concentration	生物量 Cell dry weight	$\gamma$ -PGA 产量 $\gamma$ -PGA yield	残留葡萄糖质量浓度 Residual glucose concentration	残留谷氨酸质量浓度 Residual glutamic acid concentration
	10 h	15 h	20 h					
50	—	—	—	50	2.3±0.1 g	23.9±0.7 h	0.0±0.0 e	54.0±1.0 a
50	10	—	—	60	3.3±0.1 e	26.1±0.7 g	0.0±0.0 e	51.3±1.2 b
50	—	10	—	60	3.5±0.1 c	29.0±0.9 f	0.0±0.0 e	48.3±0.5 c
50	—	—	10	60	3.0±0.1 f	25.8±0.9 g	0.0±0.0 e	51.3±1.2 b
60	—	—	—	60	2.1±0.1 f	29.5±0.6 e	1.0±0.0 e	48.3±1.4 b
50	20	—	—	70	3.5±0.1 de	29.2±0.5 e	1.3±0.5 e	47.7±0.5 d
50	—	20	—	70	3.6±0.1 c	32.7±1.0 d	0.0±0.0 d	43.3±0.5 c
50	—	—	20	70	3.6±0.1 cd	32.2±0.3 f	1.3±0.5 e	44.3±0.5 e
70	—	—	—	70	3.3±0.2 c	31.0±0.7 d	0.0±0.0 d	45.3±0.5 de
70	15	—	—	85	3.9±0.0 a	36.9±0.8 c	1.7±0.5 d	40.3±0.5 f
70	—	15	—	85	4.0±0.0 a	39.2±0.8 a	0.0±0.0 e	38.7±0.5 g
70	—	—	15	85	3.6±0.1 c	38.0±0.5 bc	1.3±0.5 d	40.3±0.5 f
85	—	—	—	85	1.9±0.2 f	29.9±0.5 e	23.5±0.7 a	50.5±2.1 c
70	30	—	—	100	3.1±0.1 f	33.6±0.8 d	15.7±0.5 b	44.0±1.0 de
70	—	30	—	100	3.7±0.1 b	39.0±0.6 ab	10.3±0.5 b	40.3±0.5 f
70	—	—	30	100	3.5±0.0 cd	37.8±0.9 c	7.6±0.5 c	38.0±1.0 g
100	—	—	—	100	1.7±0.1 g	31.0±1.4 e	29.0±1.4 a	53.0±1.4 a

当总糖质量浓度超过 70 g/L 时,菌体对数生长前期和后期补加葡萄糖均存在发酵终点葡萄糖残留的现象。同时,在菌体对数生长中期补加葡萄糖后培养基中残留的谷氨酸更少。这些结果表明,在总糖质量浓度相同的条件下,在摇瓶中第 15 小时即菌体对数生长中期补加葡萄糖的方案效果最佳。发酵至 10 h 补糖,葡萄糖质量浓度过高抑制了菌体生

长,导致总生物量降低和葡萄糖残留。而发酵至 20 h 菌体生长已处于稳定期,补加的葡萄糖对细胞合成贡献不大。发酵至第 15 小时地衣芽胞杆菌 WX-02 处于菌体与产物快速合成阶段,也是对营养需求最旺盛的阶段,此时补加的葡萄糖正可作为细胞合成基质并为产物合成提供能量。

鉴于上述分析获得的最佳补料方案为:初始葡

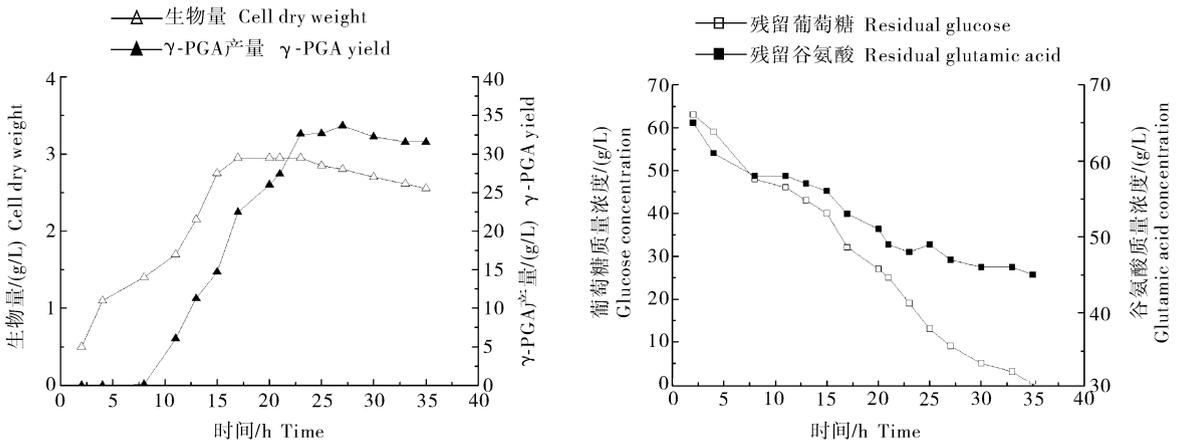


图 1 地衣芽胞杆菌 WX-02 在 3 L 发酵罐上发酵  $\gamma$ -PGA 过程曲线(初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L)

Fig. 1 Time-course of  $\gamma$ -PGA fermentation by *B. licheniformis* WX-02 in 3 L fermentor(initial glucose concentration 70 g/L)

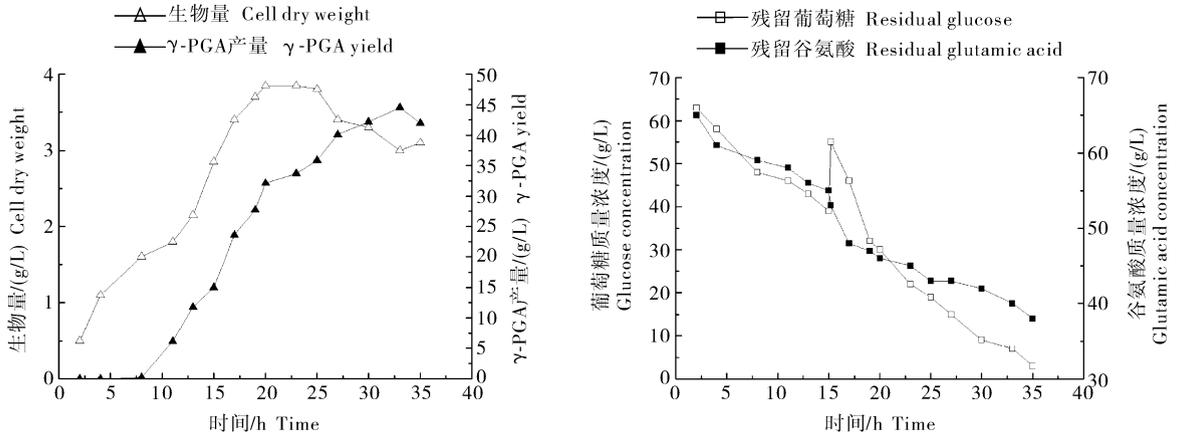


图 2 地衣芽胞杆菌 WX-02 在 3 L 发酵罐上补糖发酵过程曲线

Fig. 2 Time-course of glucose feeding fermentation in 3 L fermentor by *B. licheniformis* WX-02

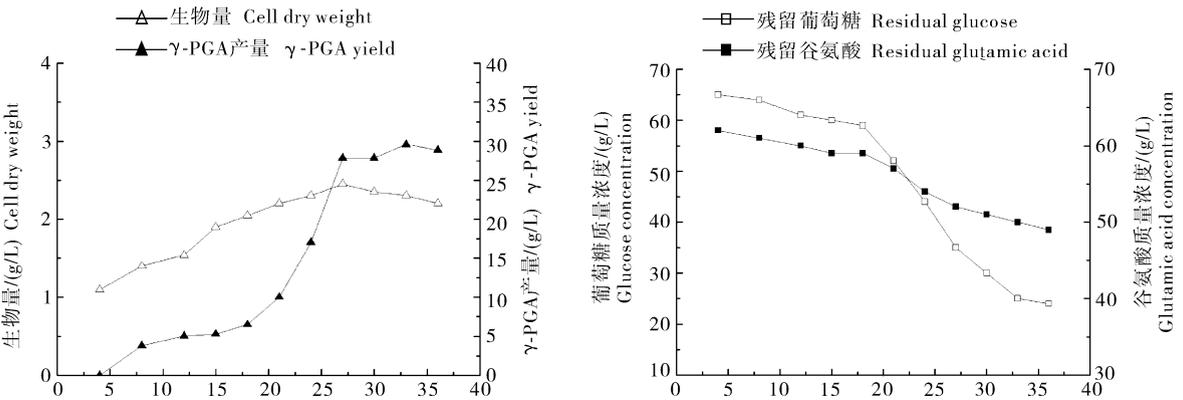


图 3 地衣芽胞杆菌 WX-02 在 3 L 发酵罐上发酵  $\gamma$ -PGA 过程曲线(初始葡萄糖质量浓度为 85 g/L)

Fig. 3 Time-course of  $\gamma$ -PGA fermentation by *B. licheniformis* WX-02 in 3 L fermentor(initial glucose concentration 85 g/L)

葡萄糖为 70 g/L,补糖量为 15 g/L,补糖时间为第 15 小时。将其在 3 L 发酵罐验证补糖效果。

### 2.3 补糖对 3 L 发酵罐发酵 $\gamma$ -PGA 的影响

初始培养基中葡萄糖质量浓度为 70 g/L,发酵过程不补糖,结果如图 1 所示。经延滞期,生物量逐渐增加,在发酵至 17 h 达到最高值 3.0 g/L;而  $\gamma$ -PGA 产量则在发酵至 27 h 达到最大值(33.7 g/L),其  $\gamma$ -PGA 生产力为 1.25 g/(L·h)。由此可见, $\gamma$ -PGA 发酵过程中,细胞合成和产物合成在不同时期达到最大值,表明细胞边生长边合成  $\gamma$ -PGA。细胞与产物快速合成导致葡萄糖消耗加快,而在这一时期补加葡萄糖将会为细胞与产物合成提供基质与能量。

初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时,在 15 h 补加 15 g/L 葡萄糖,3 L 发酵罐上验证结果如图 2 所示。补糖后生物量和  $\gamma$ -PGA 快速积累,其产量上升速度远远快于不补糖培养基,最大生物量和  $\gamma$ -PGA 产量分别达到 3.9 g/L 和 44.5 g/L,比不补糖提高 26% 和 32%, $\gamma$ -PGA 生产力为 1.35 g/(L·h)。由图 3 可知,初始葡萄糖质量浓度为 85 g/L 时,最大生物量和  $\gamma$ -PGA 产量仅为 2.5 g/L 和 29.6 g/L, $\gamma$ -PGA 生产力仅为 0.9 g/(L·h),总生物量的下降影响了  $\gamma$ -PGA 产量的提高。

以初始葡萄糖质量浓度为 85 g/L 为对照,补糖后生物量与  $\gamma$ -PGA 产量分别提高 56% 和 50%,谷氨酸利用率达到 46%,而对照中仅为 30%。由图 2 中补糖发酵曲线可知,补糖后在发酵的 15~20 h,葡萄糖消耗率达到 5 g/(L·h),而对照中同一阶段的葡萄糖消耗率仅为 2.4 g/(L·h)。这说明菌体代谢活跃,补加的葡萄糖用于生物量和产物  $\gamma$ -PGA 合成。综上,初始葡萄糖质量浓度过高会抑制菌体生长,而保持初始培养基中适当的葡萄糖质量浓度,在发酵中期进行补加,不仅可以提高总生物量,还可促进菌体对葡萄糖和谷氨酸的利用,提高谷氨酸向  $\gamma$ -PGA 的转化,进而提高  $\gamma$ -PGA 的产量。

## 3 讨论

本研究以地衣芽胞杆菌 WX-02 为研究对象,探讨了葡萄糖质量浓度及其补加方案对  $\gamma$ -PGA 发酵的影响,表明高糖培养基抑制菌体生长和降低  $\gamma$ -PGA 产量,发酵过程补糖可改善  $\gamma$ -PGA 发酵,由此得到优化的葡萄糖补加方案,并在 3 L 发酵罐上进行验证,以初始葡萄糖质量浓度 85 g/L,发酵过

程不补糖为对照发现,初始葡萄糖质量浓度为 70 g/L 时,在 15 h 补加 15 g/L 葡萄糖,生物量和  $\gamma$ -PGA 产量分别达到了 3.9 g/L 和 44.5 g/L,比对照分别提高了 56% 和 50%。

由 3 L 发酵罐葡萄糖消耗曲线(图 1)可知,发酵至 15 h 残糖为 40 g/L,而在如此高的葡萄糖浓度下补糖,生物量和  $\gamma$ -PGA 产量都得到了提高,可能是因为  $\gamma$ -PGA 发酵生成需要高糖环境。Du 等<sup>[14]</sup>在研究甘油对  $\gamma$ -PGA 发酵的影响时发现,当甘油浓度从 0 增加到 70 g/L 时, $\gamma$ -PGA 产量随之逐渐上升;而进一步研究发现高浓度甘油的添加改变了微生物细胞膜的磷脂组分,从而影响  $\gamma$ -PGA 的分泌。Wei 等<sup>[12]</sup>在地衣芽胞杆菌 WX-02 发酵生成  $\gamma$ -PGA 时,将培养基中 NaCl 质量浓度从 0 增加到 70 g/L, $\gamma$ -PGA 产量随之升高,且在 NaCl 质量浓度为 70 g/L 时达到最大。高浓度的 NaCl 可以促进地衣芽胞杆菌 WX-02 合成  $\gamma$ -PGA,这可能是培养基中高渗透环境对微生物生长造成压力,促使其更多地合成和分泌  $\gamma$ -PGA 作为保护剂。本研究表明中期补糖,提高发酵环境中的葡萄糖质量浓度,可能会对菌体造成一定的压力,促使其更多地合成和分泌  $\gamma$ -PGA,具体机制还有待进一步试验研究。

在发酵工业的应用生产中,简单、高效是它的终极目标。本研究在地衣芽胞杆菌 WX-02 发酵生产  $\gamma$ -PGA 中采用一次性补加葡萄糖, $\gamma$ -PGA 最高产量达到 44.5 g/L, $\gamma$ -PGA 生产力为 1.35 g/(L·h),而发酵周期仅为 35 h,在工业生产上具有一定的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 董惠均,赵鹏,王卉,等.均聚氨基酸及其应用[J].食品科学,2003,24(3):163-165.
- [2] 陈守文,谢津,魏雪团,等.一种地衣芽胞杆菌菌株及用途和其生产聚  $\gamma$ -谷氨酸的方法:中国,CN200810055068.4[P].2008-10-05.
- [3] 胡荣章,叶海峰,金丽,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.
- [4] 彭银仙,徐虹,陈国广,等.新型药物载体聚谷氨酸的合成及其应用[J].中国新药杂志,2002,11(7):515-519.
- [5] 李相焯,张虎男.通过补糖生产高浓度聚谷氨酸的方法:韩国,00819560[P].2000-07-14.
- [6] 程立坤,黄静,秦永,等.代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响[J].微生物学通报,2010,37(2):166-173.
- [7] 蔡谨,孙章辉,王隽,等.补料发酵工艺的应用及其研究进展

- [J]. 工业微生物, 2005, 35(1): 42-48.
- [8] 缪静, 杨在东, 冯志彬, 等. 碳源对  $\gamma$ -聚谷氨酸发酵的影响[J]. 中国酿造, 2010(3): 70-72.
- [9] YAO J, XU H, SHI N N, et al. Analysis of carbon metabolism and improvement of  $\gamma$ -polyglutamic acid production from *Bacillus subtilis* NX-2[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160: 2332-2341.
- [10] SUNG H Y, JIN H D, SANG Y L, et al. Production of polyglutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis* [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 585-588.
- [11] HUANG J, DU Y M, XU G H, et al. High yield and cost-effective production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis* [J]. Eng Life Sci, 2011, 11(4): 1-7.
- [12] WEI X T, JI Z X, CHEN S W. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly- $\gamma$ -glutamic acid[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 160(5): 1332-1340.
- [13] WU Q, XU H, YING H J, et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for poly( $\gamma$ -glutamic acid) production with *Bacillus subtilis* CGMCC0833[J]. Biochem Eng J, 2010, 50(1): 24-28.
- [14] DU G C, YANG G, QU Y B, et al. Effects of glycerol on the production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2143-2147.

## Optimization of glucose fed-batch culture in poly( $\gamma$ -glutamic acid) fermentation by *Bacillus licheniformis* WX-02

HU Li-fang LI Xin JI Zhi-xia CHEN Shou-wen

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Through flask-shaking fed-batch fermentation, the optimum system of glucose feeding for poly( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA) fermentation by *Bacillus licheniformis* WX-02 was summarized as follows: the initial concentration of glucose was 70.0 g/L, then 15.0 g/L of glucose was added at 15th hour of fermentation carried out in a 3.0 L fermentor. The results showed that the biomass and the yield of  $\gamma$ -PGA were 3.9 g/L and 44.5 g/L, increasing 56% and 50% compared with the control. The utilization rate of glutamic acid in the end of fermentation was 46%, while that of control was 30%. Feeding glucose at the 15th hour of fermentation process could increase biomass, enhance utilization of glutamic acid and finally increase the  $\gamma$ -PGA yield by *B. licheniformis* WX-02.

**Key words** *Bacillus licheniformis*; poly( $\gamma$ -glutamic acid); glucose feeding fermentation; cell dry weight; yield

(责任编辑: 张志钰)