

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(1):49-55; 4 January 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

枯草杆菌 SBS 液体发酵联产血栓溶解酶和 γ -聚谷氨酸

胡淳罡, 刘常金*, 郑焕兰, 周平

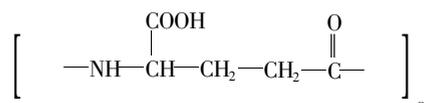
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 泰达 BIO-X 系统生物技术研究中心, 天津 300457)

摘要 【目的】利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* SBS)进行联产血栓溶解酶和 γ -聚谷氨酸研究【方法】本研究以实验室自行分离的 *Bacillus subtilis* SBS 为出发菌株,进行了液体发酵,通过正交实验研究了碳、氮源对血栓溶解酶和 γ -聚谷氨酸联产的影响,并运用多种检测方法对产物进行了鉴定。【结果】在未添加谷氨酸的培养基中合成了 γ -聚谷氨酸,表明该菌是非谷氨酸依赖型菌。合成血栓溶解酶的合适碳、氮源分别是可溶性淀粉和大豆蛋白胨,合成 γ -聚谷氨酸的合适碳、氮源分别是蔗糖和 NH_4Cl 。【结论】以蔗糖和大豆蛋白胨、 NH_4Cl 分别作为碳源和氮源进行血栓溶解酶和 γ -聚谷氨酸的联产。在蔗糖 10 g/L、大豆蛋白胨 20 g/L、 NH_4Cl 8 g/L 时,血栓溶解酶酶活为 265 ± 25 IU/mL, γ -聚谷氨酸产量为 1.183 ± 0.015 g/L,均接近了单独合成时的水平。

关键词: 血栓溶解酶, γ -聚谷氨酸, 枯草芽孢杆菌 SBS, 联产

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0049-07

γ -多聚谷氨酸[Poly- γ -glutamic acid, γ -PGA]是一种对人体和环境无毒害的生物相容性天然高分子。最早于 1913 年在炭疽芽孢杆菌的细胞荚膜中发现。 γ -多聚谷氨酸(以下简称 γ -PGA)是由 L-谷氨酸和/或 D-谷氨酸单体之间通过 α 氨基和 γ 羧基形成肽键之后生成的聚酰胺^[1-3],其分子式如下:



γ -PGA 生产菌分为谷氨酸依赖型菌和谷氨酸非依赖型菌,目前报道的绝大多数是前者,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* MR-141)^[4]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* IFO3335)^[5]、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* ATCC9945a)^[6]等,而后的报道很少,如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* A35)^[7]。 γ -PGA 为一种高分子量的聚合物,分子链上有大量游离羧基,使其具有一般聚羧酸的性质,因此其有很强的吸水性。此外 γ -PGA 还具有增稠、乳化、凝胶、成膜、

保温、缓释、助溶和黏接等功能^[8-9]。SBS 菌产血栓溶解酶(以下简称 BTE)是一种胞外蛋白酶,具有很强的溶解纤维蛋白的效果,相对于传统的溶栓药物,其作用时间长、无副作用、安全性高。国内外对各种血栓溶解酶和 γ -PGA 的生产开展了很多工作,1987 年日本学者须见洋行首先从纳豆中分离出具有溶栓功能的纳豆激酶,齐海萍^[10]也从传统食品豆豉中分离出豆豉溶栓酶,邵丽等^[11]从传统食品豆瓣酱中分离获得一株产 γ -PGA 的谷氨酸依赖型菌株 L536。Kunioka^[12]以谷氨酸依赖菌 *Bacillus subtilis* IFO3335 生产 γ -PGA,用少量的 L-谷氨酰胺来代替 L-谷氨酸,形成了大量没有任何多糖副产品的 γ -PGA。但是同时具有合成血栓溶解酶和 γ -PGA 能力的非谷氨酸依赖型菌株还鲜有报道。本实验室从稻草中获得了产血栓溶解酶的生产菌 *Bacillus subtilis* SBS^[13],由于在前期研究中发现生产血栓溶解酶和 γ -PGA 的操作过程和发酵条件相似,因此本研究对两者的联产进行了初步探讨。

* 通信作者。Tel: +86-22-60601442; E-mail: zjliu@tust.edu.cn

作者简介: 胡淳罡(1983-)男,天津市人,硕士研究生,研究方向为农产品生物资源转化。E-mail: huchungang27@163.com

收稿日期: 2008-07-09; 修回日期: 2008-09-24

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* SBS)为本实验室分离筛选并保存。

1.1.2 斜面培养基和发酵基础培养基:参见文献[13]。

1.1.3 主要试剂和仪器:牛纤维蛋白原为Sigma公司产品;凝血酶为Fluka公司产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、TEMED、过硫酸铵、巯基乙醇、溴酚蓝、曲拉通(Trion X-100)、氨基黑为BBI公司产品;其余试剂均为国产试剂纯。北京瑞利分析仪器公司UV-9100型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器公司TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计,天津东港科技发展公司Wgh-30型双光束红外分光光度计,Bio-Rad蛋白质电泳仪北京“六一”仪器厂WD-9413B凝胶成像系统,Agilent 1100高效液相色谱仪,Agilent TC-C18色谱柱(φ 4.6 mm \times 250 mm)。

1.2 液体种子制备及摇瓶培养

参见文献[13]。

1.3 目的产物的制备

参照胡淳罡的方法^[14]进行血栓溶解酶的分离纯化,参照Goto等的方法^[5]进行改进,发酵液经离心后取上清液,利用乙醇沉淀,透析去除盐,等电点沉淀等方法,然后冷冻干燥得到精制的 γ -PGA,用于结构分析。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量的测定:读取600 nm处的吸光度值 OD_{600} 。

1.4.2 产物的紫外分析:将产物溶于蒸馏水配制成1 mg/mL溶液用紫外-可见分光光度计测定。

1.4.3 产物的红外分析:KBr压片法^[15]。

1.4.4 血栓溶解酶酶活的测定:采用改进的纤维蛋白平板法^[13]。10 mL生理盐水中加入0.15 g琼脂糖后加热融化,冷却至50°C后加入0.03 g牛纤维蛋白原和1 mL凝血酶(10 U/mL),迅速混匀,冷却凝固后在平板上打孔3 mm。配制浓度分别为10 IU/mL、20 IU/mL、50 IU/mL、80 IU/mL、100 IU/mL的尿激酶标准溶液。各取10 μ L点样于纤维蛋白平板的小孔内,37°C保温18 h,游标卡尺测定透明圈的两个垂直直径,以不同单位标准尿激酶的对数为横坐标,以透明圈两垂直直径的积的对数为纵坐标作标准曲线。将发酵液离心后以上述同样方法测定透明圈的两个垂

直直径,和尿激酶标准曲线作比较,得出与尿激酶酶活单位(IU/mL)相对应的血栓溶解酶的酶活。

1.4.5 纤维蛋白-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Fibrin-SDS-PAGE):在10%分离胶中添加0.05%的纤维蛋白原和0.05 mL凝血酶(10 IU/mL),3.9%浓缩胶,4% Trion X-100溶液复性,37°C酶反应,0.1%氨基黑染色液染色,蒸馏水脱色。

1.4.6 γ -PGA水解后液相分析(1)水解条件:取样品0.02 g放入水解管中,加入10 mL 6 mol/L的HCl,通入氮气,维持10 min后封口,110°C水解24 h,冷却后移至10 mL容量瓶中。超纯水定容,过滤后备用。(2)衍生方法:衍生剂:2,4-二硝基氟苯;衍生缓冲液: Na_2CO_3 4.2 g定容至100 mL;定容缓冲液: KH_2PO_4 3.4 g加入0.1 mol/L NaOH 145.5 mL,用水定容至500 mL。10 μ L样品+150 μ L衍生缓冲剂+150 μ L衍生剂+690 μ L定容缓冲液,混匀,60°C保温1 h,0.45 μ m膜过滤后备用。(3)液相色谱条件:流动相A:乙腈/水1:1,流动相B:NaAc-HAc(pH6.4),柱温:30°C,流速0.8 mL/min,紫外检测器,波长:360 nm,进样量20 μ L。

2 结果和分析

2.1 血栓溶解酶和 γ -PGA的联产

SBS菌产血栓溶解酶是一种胞外蛋白酶,在液体发酵培养基中添加氨基酸类物质对其合成具有抑制作用,而本实验菌株是非依赖型 γ -PGA合成菌株,并不需要在培养基中加入谷氨酸,因此,有可能利用本菌株进行二者联产。本实验初步研究了几种不同碳、氮源对血栓溶解酶和 γ -PGA联产的影响。

2.1.1 碳源对联产的影响:在不改变发酵基础培养基其他条件的情况下,选择葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉和柠檬酸作为碳源进行发酵,前期研究表明碳源浓度过大会降低血栓溶解酶的活性,因此碳源的添加量为10 g/L。结果显示(表1),添加可溶性淀粉为碳源,血栓溶解酶的酶活最高,其次是蔗糖,而添加柠檬酸时几乎检测不到酶活,添加柠檬酸后

表1 不同碳源对BTE酶活和 γ -PGA产量的影响

Table 1 Effect of carbon source on BTE activity and the production of γ -PGA

Carbon source	BTE activity(IU/mL)	γ -PGA(g/L)
Glucose	207 \pm 18	0.114 \pm 0.022
Sucrose	220 \pm 22	0.952 \pm 0.036
Maltose	103 \pm 15	1.233 \pm 0.050
Soluble starch	251 \pm 36	0.427 \pm 0.055
Citric acid	0	1.961 \pm 0.048

γ -PGA 的产量最高,其后依次是麦芽糖与蔗糖,而葡萄糖作为碳源时 γ -PGA 的产量最低,因此本实验选择蔗糖作为联产时的碳源。

2.1.2 氮源对联产的影响 在不改变发酵基础培养基其他条件的情况下,选择大豆蛋白胨、酵母膏、胰蛋白胨、豆浆汁(蛋白质含量 40 g/L)及 NH_4Cl 作为氮源进行发酵。结果显示(表 2),有机氮源对血栓溶解酶和 γ -PGA 的产量影响不显著,使用无机氮源 NH_4Cl 时 γ -PGA 的产量最高,这可能是因为无机氮源中的铵离子在 γ -PGA 合成过程中更容易被利用;但是加入无机氮源 NH_4Cl 后血栓溶解酶的酶活较低,而加入大豆蛋白胨后血栓溶解酶的酶活最高,这

可能是因为有机氮源分解后所得的小分子物质对血栓溶解酶的合成有诱导作用。

2.1.3 正交实验 对血栓溶解酶酶活影响较大的培养基成分是大豆蛋白胨,而对 γ -PGA 合成有利的碳氮源是蔗糖和 NH_4Cl ,因此,选择蔗糖、大豆蛋白胨和 NH_4Cl 作为关键组分设计三水平 $L(3^3)$ 正交实验,研究培养基主要成分对两种物质合成的影响,分别以血栓溶解酶酶活和 γ -PGA 产量为指标对正交实验结果进行分析。结果显示(表 3),蔗糖浓度对联产的影响最显著,增加蔗糖浓度可以提高 γ -PGA 产量,但过量的蔗糖会对血栓溶解酶酶活有抑制作用;大豆蛋白胨的浓度对血栓溶解酶酶活影响显著,增加大豆蛋白胨浓度,可以提高血栓溶解酶酶活,但对 γ -PGA 的影响很小。因此,可以适当调节蔗糖和大豆蛋白胨的浓度来控制血栓溶解酶和 γ -PGA 的发酵,而不对另一种物质产生过大影响,为二者的联产提供了前提条件。正交实验结果表明,对血栓溶解酶和 γ -PGA 联产有利的组成为蔗糖 10 g/L、大豆蛋白胨 15 g/L、 NH_4Cl 8 g/L。在此条件下,血栓溶解酶的酶活达到 265 ± 25 IU/mL, γ -PGA 产量为 1.183 ± 0.015 g/L,均接近了单独合成时的水平。

表 2 不同氮源对 BTE 酶活和 γ -PGA 产量的影响

Table 2 Effect of Nitrogen source on BTE activity and the production of γ -PGA

Nitrogen source	BTE activity(IU/mL)	γ -PGA(g/L)
Soya peptone	209 \pm 22	0.787 \pm 0.021
Yeast extract	189 \pm 20	0.692 \pm 0.017
Tryptone	205 \pm 12	0.714 \pm 0.032
Soybean milk	200 \pm 35	0.553 \pm 0.025
NH_4Cl	40 \pm 8	1.632 \pm 0.051

表 3 正交实验设计及实验结果

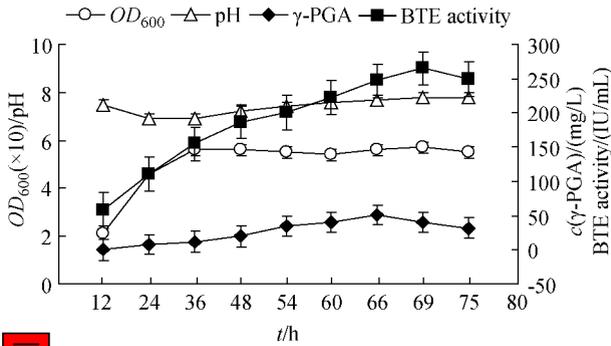
Table 3 Design and results of orthogonal experiments

No.	γ Sucrose(g/L)	γ Soya peptone(g/L)	γ NH_4Cl (g/L)	BTE activity(IU/mL)	γ -PGA(g/L)
1	I(5)	I(10)	I(4)	126	0.752
2	I(5)	II(15)	II(6)	153	1.006
3	I(5)	III(20)	III(8)	153	1.211
4	II(10)	I(10)	II(6)	245	0.993
5	II(10)	II(15)	III(8)	265	1.183
6	II(10)	III(20)	I(4)	278	1.057
7	III(15)	I(10)	III(8)	135	1.150
8	III(15)	II(15)	I(4)	168	0.588
9	III(15)	III(20)	II(6)	166	0.862
k1	144	169	191		
k2	263	195	188		
k3	156	200	184		
R	119	31	7		

2.2 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* SBS 的发酵进程曲线

发酵过程中每隔一定时间取样,测定生物量、pH 值、血栓溶解酶活力和 γ -PGA 产量。如图 1 所示,菌体在培养初期大量繁殖,在 32 h 后达到稳定期,70 h 后进入衰亡期。在发酵过程中 pH 值先下降后上升最后略高于初始值;菌种在发酵前期不产

生血栓溶解酶,对数期内产酶量大量增加,68 h 左右达到最大值,而 γ -PGA 的生产从 36 h 开始,逐渐增加至 60 h 左右达到最高峰,然后迅速下降。因此,发酵时间控制在 70 h 内,既不影响血栓溶解酶的生产,同时可获得 γ -PGA。此外,在培养过程中发现谷氨酸浓度一直很低,表明菌株在合成 γ -PGA 的过程中很少分泌胞外谷氨酸。

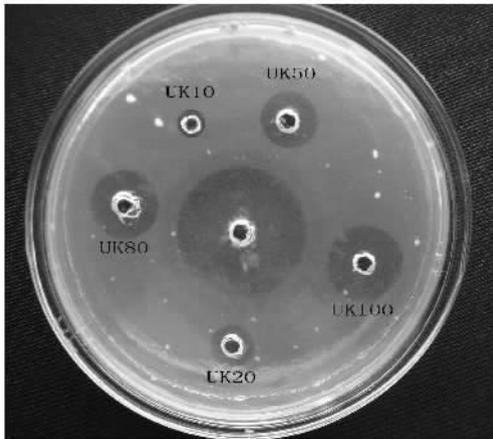


1 枯草杆菌 SBS 的发酵曲线

Fig.1 Fermentation course curve of *Bacillus subtilis* SBS.

2.3 产物鉴定

2.3.1 血栓溶解酶活力的测定:采用纤维蛋白平板法和纤维蛋白—十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(Fibrin-SDS-PAGE)法相结合。如图2所示,以



2 枯草杆菌血栓溶解酶活力的测定

Fig.2 Activity determination of BTE.

不同浓度的尿激酶标准溶液作为对照,得到尿激酶标准曲线为 $y = 0.4841x + 1.3267$, $R^2 = 0.9946$ 。表明利用尿激酶标准曲线表示血栓溶解酶活力的方法是可行的。图2中间最大的透明圈为 SBS 菌单产的血栓溶解酶溶解纤维蛋白的透明圈。

2.3.2 血栓溶解酶分子量的确定:血栓溶解酶的 SDS-PAGE 图谱见胡淳罡^[14],分子量为 32 kDa。根据枯草杆菌血栓溶解酶能水解纤维蛋白的性质,建立了纤维蛋白-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Fibrin-SDS-PAGE)。并尝试进行微波染色和蒸馏水微波脱色的方法,以缩短实验时间,节约试剂。如图3所示,经 SDS-PAGE 检验为单一组分的酶产品具有溶解纤维蛋白的能力,此法不但可以证明粗酶溶液中只有分子量为 32 ku 的枯草杆菌血栓溶解酶具有溶解纤维蛋白的能力,而且相比纤维蛋白平板法,在操作上可以节约大量时间。



3 枯草杆菌血栓溶解酶的 Fibrin-SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Fibrin-SDS-PAGE of BTE after Sephadex G-75 Chromatography. 1. BTE; 2. Crude BTE.

此外,通过微波的方法,可将染色时间缩短至 5 min,以蒸馏水为脱色剂脱色时间缩短至 10~15 min,不但缩短了实验时间,也大大节约了脱色液的用量。

2.3.3 紫外光谱鉴定:将初步提纯后的 γ-PGA 溶于

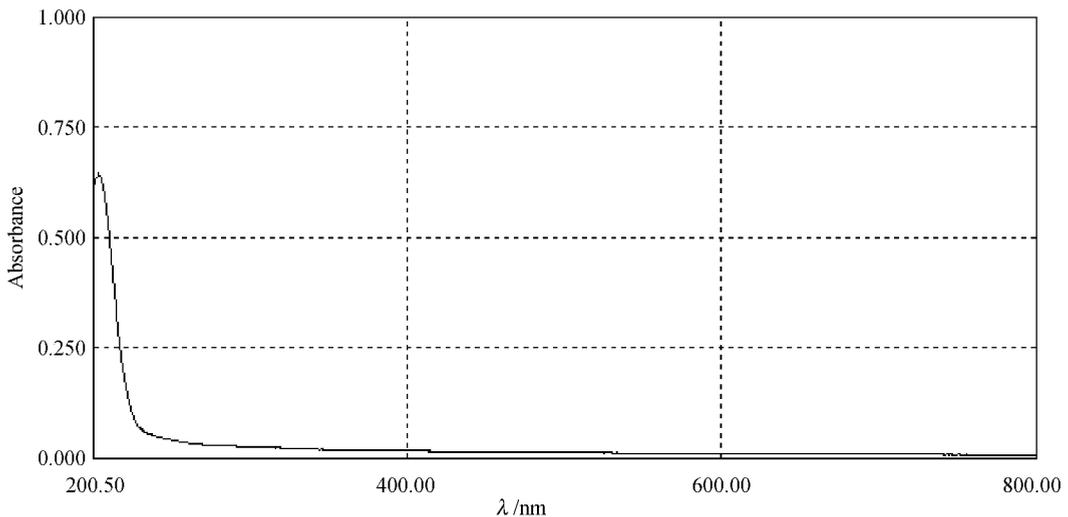


图4 γ-PGA 的紫外光谱

Fig.4 UV spectrum of γ-PGA.

水配制成 1 mg/mL 的溶液,进行紫外扫描。结果显示(图 4),该产物只有 1 个主吸收峰,其最大吸收波长在 204 nm 处,而在 260 nm ~ 280 nm 没有明显的吸收峰,这表明该物质中不含有蛋白质,对产物进行茚三酮显色反应,结果呈阴性,表明产物中没有游离的氨基。将产物水解后进行茚三酮反应,结果呈阳性,表明水解产物含氨基,证明了在聚合物中氨基参与成键。

2.3.4 红外光谱鉴定 图 5 为 γ -PGA 的红外扫描结果,波长在 3472 cm^{-1} 是 N-H 对称伸缩震动带,波长在 1641 cm^{-1} 有很明显的羧酸盐 ($-\text{COO}^-$) 的特征谱带, 1400 cm^{-1} 处的吸收峰表明了分子结构中存在 CH_2 的 C-H 变形振动,低频区 $1000 \sim 500\text{ cm}^{-1}$ 的宽吸收峰是 $(\text{CH}_2)_n$ ($n > 4$) 的平面摇摆振动及面内弯曲振动。通过图谱解析结合标准谱图^[16]对照,可推断该物质是 γ -PGA。

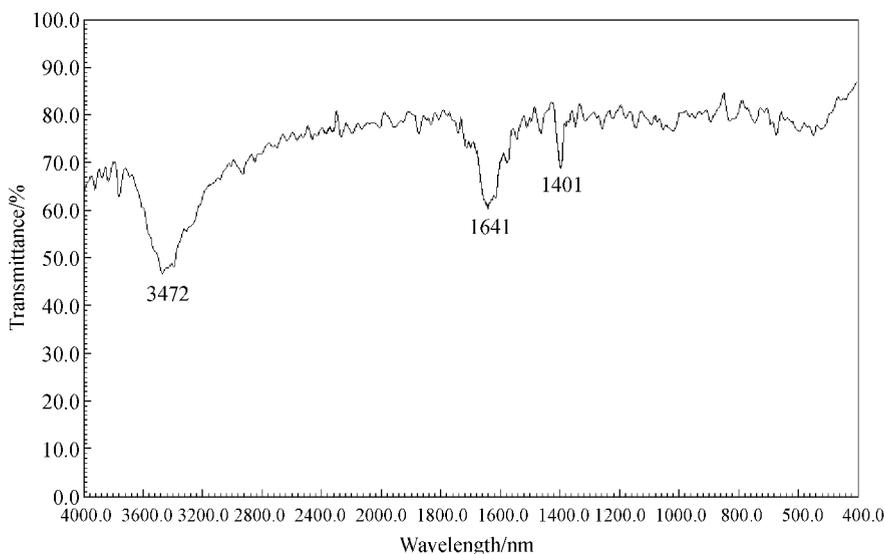


图 5 γ -PGA 的红外光谱

Fig.5 FT-IR spectrum of γ -PGA.

2.3.5 HPLC 鉴定 将 γ -PGA 水解后进行高效液相色谱分析。结果显示(图 6),左侧第 1 个峰的出峰时间为 4.87 min,与 L-谷氨酸标准品的出峰时间一致,可以表明水解产物是 L-谷氨酸。右侧为衍生剂峰。

3 两种产物初步分离的讨论

通过微生物发酵得到的 γ -PGA 分子量较大,一般为 $300 \sim 1000\text{ kDa}$ ^[17-18],而前期研究表明 *Bacillus subtilis* SBS 产血栓溶解酶的分子量约为 32 kDa ,两者的分子量存在很大的差距,因此可以将发酵液离心,除去菌体等杂质后,加入无水 CaCl_2 ,搅拌并调节 $\text{pH}6 \sim 7$,达到初步脱色、除杂并降低粘度的作用,以利于超滤的进行。冷冻离心后收集上清液备用。

上清液用 300 kDa 超滤膜超滤脱盐,压力为 0.1 Mpa ,血栓溶解酶含在超出液中,而 γ -PGA 被截留,实现了联产后两种产物的初步分离,在大规模工业生产中完全可行而且利于控制成本。

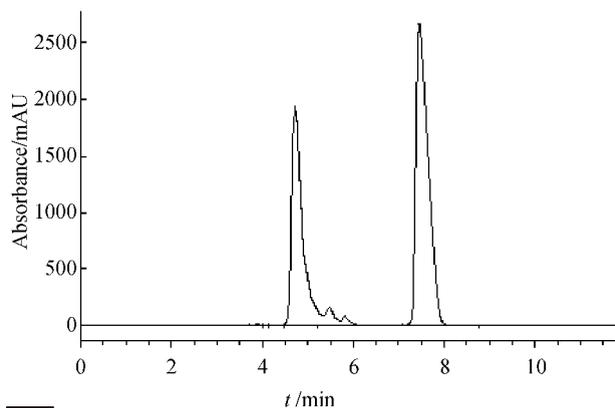


图 6 水解物的液相色谱图

Fig.6 HPLC spectrum of the hydrolysate.

4 结论

以实验室自行分离的 *Bacillus subtilis* SBS 为出发菌株,进行了液体发酵联产血栓溶解酶和 γ -PGA

研究,在未添加谷氨酸的培养基中合成了 γ -PGA,表明该菌是非谷氨酸依赖型菌。在发酵过程中谷氨酸浓度一直很低,表明菌株在合成 γ -PGA 的过程中很少分泌胞外谷氨酸。正交实验结果表明:在培养基中适当增加碳、氮源的浓度能分别促进血栓溶解酶和 γ -PGA 的合成,而不抑制另一产物的合成,有利于两者的联产。在蔗糖 10 g/L、大豆蛋白胨 20 g/L、 NH_4Cl 8 g/L 时,血栓溶解酶酶活为 265 ± 25 IU/mL, γ -PGA 产量为 1.183 ± 0.015 g/L,均接近了单独合成时的水平。由于生产血栓溶解酶和 γ -PGA 的操作过程和发酵条件相似,可以利用两者分子量的差异通过超滤等方法进行初步分离提纯,因此充分利用了资源,为工业化生产奠定了基础,以创造更大的经济效益。

参考文献

- [1] 桑莉,徐虹,李晖,等. γ -聚谷氨酸产生菌的筛选及发酵条件. 过程工程学报(*The Chinese Journal of Process Engineering*) 2004, 4(5) :462 - 466.
- [2] 王圣磊. 产生 γ -聚谷氨酸发酵的条件分析. 齐鲁药事(*Qilu Pharmaceutical Affairs*) 2006, 25(7) :438 - 440.
- [3] Shih IL, Van YT. The Production of Poly(γ -Glutamic Acid) from Microorganism and Its Various Applications. *Bioresource Technology* 2001, 79 :207 - 225.
- [4] Ogawa Y, Yamaguchi F, Tahara Y, et al. Efficient production γ -Poly Glutamic Acid by *Bacillus subtilis* natto in jar fermentors. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1997, 61 :1684 - 1687.
- [5] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and Hydrolysis of γ -poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1992, 56 :1031 - 1035.
- [6] Birrer GA, Cromwick AM, Gross RA. γ -poly (glutamic acid) Formation by *Bacillus licheniformis* 9945a : : Physiological and Biochemical Studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1994, 16 :265 - 275.
- [7] Cheng C, Asada Y, Aaida T. Production of γ -Poly Glutamic Acid by *Bacillus subtilis* A35 under Denitrifying Conditions. *Agricultural and biological Chemistry*, 1989, 53 :2369 - 2375.
- [8] 施庆珊, 许虹, 林小平, 等. γ -聚谷氨酸的微生物合成. 生物技术(*Biotechnology*) 2004, 14 (1) :65 - 67.
- [9] Maria B, Yukio N, Janos B. Biosynthesis and chemical modification of poly(γ -glutamic acid) Polymer. *Bulletin*, 1994, 32 :127 - 132.
- [10] 齐海萍. 豆豉纤溶酶的酶学特性及功能性质研究. 江南大学学位论文, 2004.
- [11] 邵丽, 刘建军, 赵祥颖. 一株产聚 γ -谷氨酸菌株的筛选. 山东食品发酵(*Shandong Food Ferment*), 2007, 4 :5 - 7.
- [12] Kunioka M. Biosynthesis and chemical reactions of poly (amino acid)s from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47 :469 - 475.
- [13] 刘常金, 赵彦丽, 曹卫忠. 产纤溶酶枯草杆菌液体发酵工艺优化研究. 生物技术(*Biotechnology*) 2004, 14(6) :52 - 54.
- [14] 胡淳罡, 刘常金, 周平. 枯草杆菌溶栓酶的液体发酵工艺和分离纯化研究. 中国酿造(*China Brewing*), 2008, 19 :32 - 35.
- [15] 林新花. 仪器分析. 第一版. 广州:华南理工大学出版社, 2002.
- [16] Liang H, Yang T, Huang C. Preparation of nanoparticles composed of poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) block copolymers and evaluation of their uptake by HepG2 cells. *Controlled Release* 2005, 105 :213 - 225.
- [17] 沙长青, 李伟群, 赵晓宇, 等. 纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* natto) 固体发酵生产 γ -PGA. 中国生物工程杂志(*China Biotechnology*) 2004, 10 :70 - 73.
- [18] 陈国广, 张钧寿, 陈茂伟, 等. 低分子聚谷氨酸的制备工艺研究. 中国药科大学学报(*Journal of China Pharmaceutical University*) 2003, 34(3) :225 - 227.

Co-production of thrombolytic enzyme and γ -polyglutamic acid by liquid-culture of *Bacillus subtilis* SBS

Chungang Hu, Changjin Liu*, Huanlan Zheng, Ping Zhou

(TEDA BIO-X Center for Systems Biotechnology, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract [Objective] To analyze the co-production of thrombolytic enzyme and γ -polyglutamic acid by liquid-culture of *Bacillus subtilis* SBS. **[Methods]** We used *Bacillus subtilis* SBS to produce thrombolytic enzyme (BTE) and γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by liquid fermentation. We conducted orthogonal experiments analysis between carbon source and nitrogen source. Then through Fibrin-SDS-PAGE, UV spectrum, Infra-Red spectrum and high performance liquid chromatography (HPLC), we identified the production. **[Results]** We synthesized γ -PGA in the medium without the addition of L-glutamic acid. *Bacillus subtilis* SBS was a L-glutamic acid-independent bacterium. The suitable carbon and nitrogen sources for the synthesis of thrombolytic enzyme (BTE) were soluble starch and soybean peptone. However, the suitable carbon and nitrogen sources for the synthesis of γ -PGA were sucrose and NH_4Cl . **[Conclusion]** The yields of both products could close to the levels of the single synthesis when the concentrations of sucrose, soybean peptone and NH_4Cl were 10, 20, 8 g/L respectively, the activity of BTE reached 265 ± 25 IU/mL, and the concentration of γ -PGA reached 1.183 ± 0.015 g/L.

Keywords : BTE ; γ -PGA ; *Bacillus subtilis* SBS ; Co-production

(本文责编 :王晋芳)

* Corresponding author. Tel : + 86-22-60601442 ; E-mail : cjliu@tust.edu.cn

Received 9 July 2008 / Revised 24 September 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问 :贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答 :我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复,5~7 个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后,首先将请 2 位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第 3 位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的),作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问 :如我的投稿没有被贵刊录用,是否告知退稿原因?对退稿有异议怎么办?

答 :本着对每一篇投稿负责的原则,本刊一贯遵循三审制的制度,即:编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿,都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿,我们都会详细写明退稿原因,为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议,可以给我们写信表明看法,本刊将请专家予以复审。

问 :我可否指定审稿人,或言明请某审稿人回避?

答 :您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单,或请予回避的审稿人名单,供编辑部参考,但编辑部是否采纳将视具体情况而定。