

知识介绍

γ -聚谷氨酸的生物合成及应用

游庆红 张新民 陈国广 徐虹 欧阳平凯
(南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要: 聚谷氨酸是一种可降解的生物高分子, 可由微生物生物聚合而得到。综述了聚谷氨酸的生物合成方法、高吸水性聚谷氨酸制备技术以及在农业、医药、化工等领域的应用。

关键词: 聚谷氨酸; 生物聚合; 高吸水树脂; 应用

中图分类号: TQ929

文献标识码: A

Biosynthesis and application of poly(γ -glutamic acid)

YOU Qing-hong, ZHANG Xin-min, CHEN Guo-guang, XU Hong, OU-YANG Ping-kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing university of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Poly(γ -glutamic acid), which can be produced by microbial, is a kind of biodegradable high molecular polymer. The preparation methods of γ -PGA and crosslinked γ -PGA high water sorption hydrogel and their applications in agriculture, pharmacy, chemical industry are reviewed.

Key words: poly(γ -glutamic acid); biosynthesis; high water sorption hydrogel; application

γ -聚谷氨酸(γ -PGA)是一种可由微生物大量生物合成的氨基酸聚合物, 它由 *D*-型或 *L*-型谷氨酸通过 γ -酰胺键连接而成, 结构式如图 1。微生物合成的 γ -PGA 是一种水溶性的可生物降解的生物高分子, 通常它由 5 000 个左右谷氨酸单体组成, 相对分子质量一般在 10 万 ~ 100 万。 γ -PGA 及其衍生物可广泛用作药物缓释材料^[1], 土壤、沙地的蓄水保水剂^[2], 食品的水凝胶^[3,4] 以及高强度纤维^[5] 等。近 10 多年来, γ -PGA 受到了世界上许多国家的关注。可以预见, 这种来自生物物质的可降解功能材料的生产及应用将会获得更大的发展。

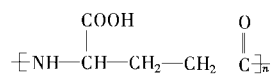


图 1 γ -PGA 的结构式

1 γ -PGA 的合成

1.1 生物聚合所用的微生物菌株特征

γ -PGA 是迄今发现的少数几个可利用生物聚合

得到的聚氨基酸之一, 它最早于 1937 年 Ivanovics 等人从炭疽芽孢杆菌的荚膜中发现的, 随后 Bovarnick 等人研究发现有些芽孢杆菌属细菌能在发酵培养基中蓄积 γ -PGA。尤其是 20 世纪 90 年代以来, 寻找微生物高效生产 γ -PGA 的研究一直十分活跃。

γ -PGA 的合成与培养基的营养因子、培养方法等关系密切, 分子质量随菌株显著变化, 从几万到几百万不等。根据培养基中是否需提供谷氨酸, 将 γ -PGA 产生菌分为两类, 一类为需要谷氨酸来产生 γ -PGA (I 型), 而另一类培养基中不需要加入谷氨酸 (II 型)。前者包括许多微生物, 如 *B. subtilis* ATCC9945, *B. subtilis* IFO3335, *B. subtilis* F-2-01, 这类菌通常生成较多量的 γ -PGA。后一类包括 *B. subtilis* TAM-4, *B. licheniformis* A35, 由于培养基中不需提供谷氨酸, 可显著降低生产成本, 但这类菌较少, 且在培养基中积累的 γ -PGA 量较低 (10 g/L 左右)。表 1 列出了各种芽孢杆菌产生 PGA 的情况。

收稿日期: 2002-09-17

基金项目: “863”课题(2002AA327030), 江苏省高技术基金(BG2001043), 江苏省教育厅自然科学基金和华东理工大学生物反应器国家重点实验室开放课题

作者简介: 游庆红, 男, 1976 年生, 硕士生; 徐虹, 女, 1964 年生, 博士, 教授, 从事生物化工方面的研究。

表1 聚谷氨酸产生菌的特点

菌株及作者	培养基成分及质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	培养方法	相对分子质量	产物中谷氨酸组成比(D-/L-)	γ -PGA生成量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
<i>B. subtilis</i> TAM-4 广崎大学, 1996 ^[6]	葡萄糖 75, NH_4Cl 18, K_2HPO_4 1.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35, $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCO_3 30	37℃, 4天	20万(随培养时间而变化)	78:22(培养过程恒定)	10~14
<i>B. licheniformis</i> A35 Cheng C 等人 ^[7]	葡萄糖 75, NH_4Cl 18, 其他无机盐	厌氧培养, 30℃, 4天	—	(50~80):(50~20)	8.0
<i>B. subtilis</i> F-2-01 明治制果公司, 1989, 1993 ^[8,9]	葡萄糖 80, 酵母膏 5, 蛋白胨 15, 尿素 3, 谷氨酸 7, K_2HPO_4 2	37℃, 4天	50万	69:31(随时间变化)	25~50
<i>B. subtilis</i> MR-141 静岡大学, 1997 ^[10]	麦芽糖(或葡萄糖) 60, 大豆汁 70, 谷氨酸钠 30, K_2HPO_4 2.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5	30 L 罐 40℃, 4天	—	—	35(25 ^①)
<i>B. licheniformis</i> ATCC9945A Cross A 等人 1996, 1998 ^[11,12]	柠檬酸 12, 甘油 80, 谷氨酸 20, NH_4Cl 7, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15, $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1	37℃, 4天	20万~80万	(45~85):(55~15)	5~20.5
<i>B. licheniformis</i> NCI-MB11709 西班牙 Gracidap C ^[13]	柠檬酸 12, 甘油 80, 谷氨酸 20, NH_4Cl 7, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15, $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1	30℃, 140 h	40万~100万	(10~90):(90~10)(受 Mn^{2+} 等离子影响)	5~17.8
<i>B. subtilis</i> IFO3335 三菱制纸株式会社, 国冢, 1992 ^[14,15]	柠檬酸 20~50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5~10, 谷氨酸 30, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 生物素 50 μl	37℃, 3天	100万	80:20	10
<i>B. subtilis</i> S-2(IFO14898, FERM BP-2528) 武田化学公司, 1993 ^[16]	葡萄糖 40, 尿素 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02	5L 罐, 37℃, 1天	—	—	24.5

注:①表示葡萄糖为碳源时 γ -PGA 的生成量。

1.2 生物聚合生成 γ -PGA 的机理

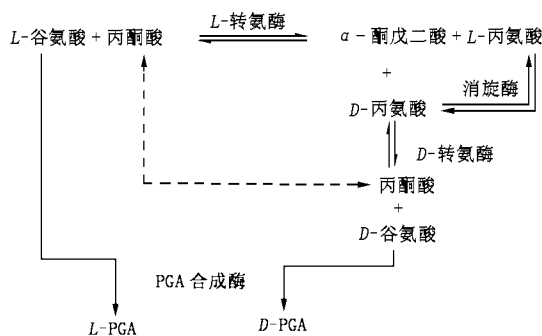


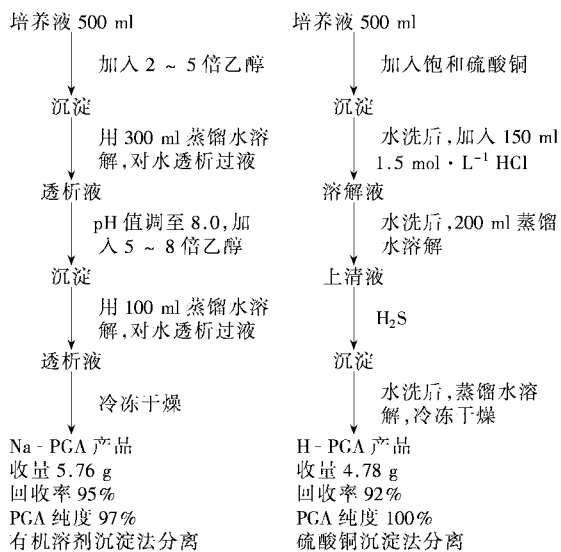
图2 聚谷氨酸生物合成的可能途径

γ -PGA 生物合成的机理至今尚不清楚。由于产物中存在 2 种构型谷氨酸单体,故存在 D-谷氨酸如何合成的问题。一般细菌的细胞壁含 D-丙氨酸,细菌的细胞都具有丙氨酸消旋酶,细胞质中瞬间会有 D-丙氨酸存在。据此 Thorne 推测 D-谷氨酸来自 D-转氨酶催化 D-丙氨酸转氨而得到, γ -PGA 生物合成的可能途径如图 2^[17],但此途径仍有待探讨。

γ -PGA 和其单体谷氨酸的供给关系也使人迷惑,不同的菌株表现出很大的差异,大多数菌株需要供给谷氨酸才能合成 γ -PGA,但谷氨酸是否是 γ -PGA 的原料倒也值得商榷。国冢在研究 *B. subtilis* IFO3335 合成 γ -PGA 时发现,尽管 γ -PGA 合成依赖于培养基中供给的谷氨酸,但合成过程中谷氨酸浓度维持不变,表观上谷氨酸并没消耗,培养基中供给的谷氨酸是一种调节剂,而不是作为原料聚合成 γ -PGA,产物 γ -PGA 所需的谷氨酸来自菌体代谢产生的谷氨酸。相反,静岡大学的 Ogawa 等人通过¹⁴C示踪分析,证实产物 γ -PGA 有¹⁴C存在,即培养基的谷氨酸被转化到产物中。另外有些菌如 *B. subtilis* TAM-4, *B. licheniformis* A35 合成 γ -PGA 并不需要供给谷氨酸,是否是这些菌在代谢葡萄糖或柠檬酸等碳源时,边合成谷氨酸边将其转化到产物 γ -PGA 中,这些疑问尚待进一步探讨。

1.3 产物 γ -PGA 的分离纯化

γ -PGA 的分离纯化通常采用有机溶剂或铜盐沉淀法。以 Thorne 的实验为例归纳如图 3^[18]。

图 3 γ -PGA 的分离工艺

2 高吸水性交联聚谷氨酸的制备

高吸水性树脂是近年来发展迅速的一类新型高分子材料,它具有吸水数百倍至上千倍的能力,并具有优异的保水性,已被广泛用于农业、园艺、医药、卫生、建筑涂料、环境保护、石油脱水等方面,1999 年全世界产量已达到 100 t。

目前国内外吸水树脂主要是聚丙烯酸,它在环境中难以降解,长久下去对土壤等环境造成严重污染,加上其以石油加工衍生物为原料,存在资源日益消耗并走向短缺的问题,而交联的聚谷氨酸是理想的替代品。

表 2 PGA 树脂的吸水性能

	PGA 交联物		市售吸水树脂	
	放射线照射	化学交联	丙烯酸系	磺酸系
蒸馏水	4600	1250	1100	200 ~ 700
0.9% NaCl	162	64	70	60
人工海水	75	41	12	30
0.2% CaCl ₂	64	64	2	35
10% CaCl ₂	41	22	1	20

注:吸水率指吸收的水相对于树脂的质量的倍数。

对生物聚合得到的水溶性 PGA 通过简单的辐射或化学交联剂部分交联可得到高吸水聚谷氨酸。日本物质工学工业研究所用 γ -射线使 γ -PGA 交联可得到吸水倍数约为 3 500 倍的 PGA 树脂^[2],日本九州大学农学系原敏夫采用化学交联剂获得吸水率为 1 250 倍的 PGA 树脂,用电子束对 γ -PGA 辐照数秒钟则得到比纸尿裤等近 5 倍的 PGA 高吸水树脂,

其最大吸水量约为自身重量的 5 000 倍,对盐水溶液等吸水性也高于市售高吸水树脂^[19]。表 2 列出了 PGA 吸水树脂和市售高吸水树脂的比较。

3 聚谷氨酸的应用

通过微生物生物聚合生产的聚谷氨酸是一种高分子量的聚合物,它的分子链上有大量游离羧基,使其具有一般聚羧酸的性质,如强吸水、能与金属螯合等特点,此外,大量的活性位点便于材料的功能化,如部分交联后成高吸水树脂,因此用途十分广泛。

3.1 农业

3.1.1 土壤、植物的保水剂

将聚谷氨酸吸水树脂与土壤结合,不仅可以改进团粒,还能改进土壤的保墒、保湿、保肥性能,在改造荒山、秃岭、沙漠方面发挥积极作用。日本将聚谷氨酸吸水树脂包裹草种籽,撒于缺水的阿苏山山麓的沙地上进行绿化试验,一周后种子发芽生长得十分顺利。而过去,植物在那里是不会发芽生长的。

3.1.2 农药、肥料的缓释剂

在肥料、杀虫剂、除草剂、驱虫剂等使用时,加入适量的聚谷氨酸盐可以延长这些药物在作用对象表面上的停留时间,不易因干燥、下雨而被刷掉。

3.2 医药

聚谷氨酸在医药上的应用专利非常多,在所有专利中约占 50%。

3.2.1 药物的缓释、靶向载体

利用聚氨基酸作为药物的载体或介质,制成一定的剂型,控制药物在人体内的释放速率,使药物按照设计的剂量,在要求的时间按一定的速率在体内释放,以达到有效治疗的目的。例如,红豆杉中紫杉烷类化合物,如紫杉醇(paclitaxel, TXL),具有抗肿瘤活性,但水溶性差,使药用开发受到很大限制。但 TXL-PGA 体系显示较高的水溶性,在体内连续释放 TXL,以保持 TXL 在细胞内的浓度。临床发现 TXL-PGA 体系对白血病细胞的治疗效果优于 TXL。

聚谷氨酸用糖基修饰后的衍生物可作为肝细胞特殊药物的载体,把药物运输到肝细胞内。动物静脉内给药试验表明药物和糖酯化的 PGA 复合物在肝脏中有很大积聚,起到了靶向作用。糖酯化的 PGA 在肝脏中由酶作用能被迅速降解成内源性物质谷氨酸,不会在体内产生积蓄和毒副作用。

3.2.2 外用药物的载体

PGA 的医药用途还表现在它可作为外用药物的载体,PGA 与明胶有较好的兼容性,适用制作外科及

手术用的粘胶剂、止血剂及密封剂。

3.3 可降解热塑料和纤维

研究发现 PGA 酯是一种性能良好的耐热塑料^[20];PGA 苯酯可制成高强度纤维^[5]。

4 结束语

γ -聚谷氨酸是一种有良好的生物相容性和生物可降解性的新型高分子材料,利用微生物聚合制备 γ -聚谷氨酸的原料来自自然界并可循环再生,随着生产和应用不断深入,这种材料发展前景十分广阔。

近几年来, γ -聚谷氨酸应用研究甚多,有些应用如吸水树脂,已进入应用试验阶段,但要真正大规模应用尚需假以时日,其中一个原因是微生物法生产的成本较高,因此高效、低成本生产 γ -聚谷氨酸是决定该材料大规模应用的关键。

参考文献

- [1] Kim K S, Kim T K, Graham N B. Controlled release behavior of prodrugs based on the biodegradable poly(γ -glutamic acid) microspheres [J]. Polymer Journal, 1999, 31: 813 ~ 816
- [2] Choi H J, Kunioka M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid) [J]. Radiat Phys Chem, 1995, 46(2): 175 ~ 179
- [3] Yasuyoshi A, Yuji F, Shuichi K. Health food with poly(γ -glutamic acid) as the chief ingredient [P]. JP, 5095767A2. 1993-4-20
- [4] Konno A, Taguchi T, Yamaguchi T. Bakery products and noodles containing poly(γ -glutamic acid) [P]. US, 4888193. 1989-12-19
- [5] Yahata K, Sadanobu J, Endo T. Preparation of poly-benzyl- γ -glutamic acid fiber [J]. Polym Prepr Jpn, 1992, 42: 1077
- [6] Ito Y, Tannka T, Chmachi T. Glutamic acid independent production of poly(γ -glutamic) by *Bacillus subtilis* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996: 1239 ~ 1242
- [7] Cheng C, Asada Y, Aida T. Production of γ -polyglutamic by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions [J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2369 ~ 2375
- [8] 明治製菓株式会社. γ -ポリグルタミン酸の製造法 [P]. JP, 特开平 01-174397. 1989-07-10
- [9] Kubota H. Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01 [J]. Biosci Biotech Biochem, 1993: 1212 ~ 1213
- [10] Ogawa Y, Yamaguchi F, Yuasa K. Efficient production γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(10): 1684 ~ 1687
- [11] Cromwick A M, Birrer G A, Gross R A. Effects of pH and aeration on γ -polyglutamic acid formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures [J]. Biotech Bioeng, 1996, 50(2): 222 ~ 227
- [12] Ko Y H, Gross R A. Effects of glucose and glycerol on γ -polyglutamic acid formation by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a [J]. Biotech Bioeng, 1998, 57(4): 430 ~ 437
- [13] Graciela P C, Francisco C, Jordi J B. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(γ -glutamic acid) [J]. Biotech Bioeng, 1999, 63(1): 110 ~ 115; 430 ~ 437
- [14] 三菱製紙株式会社. γ -ポリグルタミン酸の製造法 [P]. JP, 特开平 5-304977. 1993-11-19
- [15] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335 [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 63(1): 110 ~ 115
- [16] Kanegae Y, Sugiyama Y, Nakatsui I. Method for producing polyglutamic acid or a salt thereof [P]. US, 5268279. 1993-12-7
- [17] 原敏夫, 田誠之助. 聚谷氨酸的生产 和遗传子解析 [J]. 发酵与工业, 1985, 43(10): 910 ~ 918
- [18] 村尾汉夫. 氨基酸聚合物 [J]. 高分子, 1967, 16(188): 1204 ~ 1211
- [19] 黄汉生. 日本研究开发可生物降解的高吸水树脂 [J]. 江苏化工, 2000, 4: 42
- [20] Giannos S A, Shah D, Gross R A. The biosynthesis of unusual polyamides containing glutamic acid [J]. ACS Polym Prepr, 1990, 31: 209 ■

声学技术在清除和防止工艺设备换热面水垢或化工物料所结硬垢方面的应用

通过清华大学国际转移中心引进的源自俄罗斯的声学防垢技术,可对设备及工艺管线起在线除垢作用并以此达到彻底的防垢效果。换言之,声学防垢技术可在设备不间断运行的情况下,持续不断地剥落硬垢,从而使设备永久无垢运行。因其通过物垢硬而脆的机械特性起作用的特点,而具有极大的适应范围,对各种类型水垢和高浓度无机化工液体所结盐垢均能达到极好的效果。

声学防垢装置由发生器和换能器组成,换能器通过连接头焊接固定在需要防护的热交换设备金属外壳上,发生器产生的控制脉冲通过换能器转换成超声振动,此超声波沿着热交换设备的金属构件传至换热面上而起作用。

网址 <http://www.gdmountain.com>

(汕头高新区雄岳有限公司 李文忠)