

γ -聚谷氨酸生产菌的筛选及其对乳液稳定性的影响

张辉燕, 代俊, 高志明, 钱莹*

(湖北工业大学生命科学与健康工程学院 科技部/教育部细胞调控与分子药物学科“111”引智基地
发酵工程教育部重点实验室 工业发酵湖北省协同创新中心 工业微生物湖北省重点实验室 武汉 430068)

摘要 豌豆分离蛋白营养丰富,在食品领域应用广泛,而较差的水溶性限制了其应用范围。为探究微生物来源的 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)对豌豆分离蛋白乳液稳定的作用,采用平板分离方法从传统自制黄豆酱中分离到1株高产胶状发酵产物的菌株BM202001,经16S rRNA基因测序和序列同源性分析鉴定为枯草芽孢杆菌。菌株发酵产物经纯化后,采用紫外光谱、红外光谱、氨基酸分析等方法鉴定为 γ -PGA。通过测定乳液电位、粒径和微观结构,发现0.01% γ -PGA与15 mg/mL豌豆蛋白制备的乳液稳定性好,液滴小且均匀,可提高豌豆蛋白乳液的稳定性。研究结果为拓宽 γ -PGA和豌豆蛋白在食品中的应用提供参考。

关键词 γ -聚谷氨酸; 枯草芽孢杆菌; 豌豆分离蛋白; 乳液稳定性

文章编号 1009-7848(2024)11-0086-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.11.009

豌豆分离蛋白(PPI)是一种优质植物蛋白资源,其氨基酸组成均衡,富含赖氨酸,且成本低廉,易获得,与其它豆类蛋白相比具有更低的致敏性,然而PPI较差的水溶性限制了其在食品领域的应用。有研究表明,PPI在中性pH值条件下具有良好的乳化活性,具有成为食品工业用新型乳化剂的潜力^[1]。然而,在工业条件下制备的PPI乳液稳定性较差,提高其稳定性至关重要。

γ -聚谷氨酸(γ -Polyglutamic acid, γ -PGA)是一种天然的生物多聚物,由 γ -酰胺键连接的D-和L-谷氨酸单元组成^[2],具有水溶性、吸水性、金属结合性、可降解性、可食用性和对人类和环境无毒等特点^[3],被广泛应用于食品工业^[4]、化妆品^[5]、农业^[6]和生物医药领域^[7]。 γ -PGA作为一种特殊的阴离子聚合物,在较宽的pH值范围内带负电荷,初级羧基的离解常数相对较低^[8],在乳液体系中能够形成多层包被的脂滴,起到维稳液滴的作用^[9]。

γ -PGA的生产方法大致可以分为3种类型:化学合成法(传统的肽合成法、二聚体缩合法)、酶转化法、微生物发酵法。由于前2种方法存在一定的局限性,如合成方法难度大,路线长,副产物多,

产率低,操作困难、耗损大等问题^[10],因此, γ -PGA的微生物发酵仍是目前主要的生产策略。发酵生产 γ -PGA的菌株主要为芽孢杆菌属的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等^[11],在传统发酵食品黄豆酱中存在,其发酵产物使豆制品具有黏稠的特性^[12]。其中,枯草芽孢杆菌在发酵生产 γ -PGA时,营养需求低,具有广阔的工业化应用价值^[13]。

为提高PPI乳液的稳定性,本研究通过添加来源于微生物发酵的 γ -PGA,研究 γ -PGA维持豌豆蛋白乳液稳态的最佳比例,为PPI乳液稳定性的提高开发一种新方法,拓宽 γ -PGA及豌豆蛋白在食品中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与菌株 黄豆酱,湖北农家自制。豌豆蛋白,烟台东方蛋白科技公司购买。

1.1.2 试剂 基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司;大豆油,中粮福临门食品营销有限公司;premix Taq酶,大连宝生物公司;BCA试剂盒,碧云天生物技术公司;异硫氢酸荧光素,上海源叶有限公司;尼罗红,上海源叶有限公司;二甲亚砜,阿拉丁试剂有限公司;氯仿、磷酸二氢钠、硫酸钠等,均为分析纯级,国药集团化学试剂公司。

收稿日期: 2023-11-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972033)

第一作者: 张辉燕,女,硕士生

通信作者: 钱莹 E-mail: 20229027@hbut.edu.cn

1.1.3 培养基

1.1.3.1 分离培养基 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 琼脂粉 15 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH=7.4, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3.2 发酵培养基 蔗糖 30 g/L, 酵母粉 63 g/L, CaCl₂ 2 g/L, NaH₂PO₄ 1 g/L, MnSO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, pH 值自然, 115 °C 灭菌 30 min。

1.2 仪器与设备

SPX-150D 型恒温生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; C1000 PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; CJ-2D 型无菌操作台, 天津市泰斯特仪器有限公司; SMZ745T 光学显微镜, 日本尼康公司; UVmini-1240 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; TGL-20 台式高速离心机, 武汉中科科仪技术发展有限责任公司; HH-S 型水浴锅, 巩义市矛华仪器有限责任公司; HNYC-200F 恒温摇床, 天津欧诺仪器仪表有限公司; D2401 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; HITACHI853 型氨基酸分析仪, 日本日立有限公司; Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位分析仪、Mastersizer 2000 激光粒度分析仪, 英国马尔文公司; Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔 (Scientific) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离 称取自制黄豆酱样品 1.0 g, 加入盛有 9 mL 无菌水的试管中, 振荡 10 min 使样品充分混匀, 静置 5 min 后, 将上清液梯度稀释制成 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 倍数的菌悬液, 取 100 mL 涂布到平板上, 倒置于 28 °C 培养箱中培养 3 d。从平板上挑取表面黏稠光滑的菌落接种到相应平板上划线分离, 直到分离出纯培养菌落。

1.3.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析 取 1.5 mL 菌液, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株染色体 DNA。16S rDNA 引物由由上海英骏生物公司合成。上游引物 27F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物 1527R: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'。参照表 1 体系进行 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增。

聚合酶链式反应 (PCR) 扩增条件为: 1) 预变性 94 °C, 10 min。2) 变性 94 °C, 30 s, 复性 60 °C, 1 min, 延伸 72 °C, 1 min, 30 个循环。3) 延伸 72 °C,

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR reaction system	
试剂	用量/ μ L
premix Taq 酶	25
上游引物 (20 μ mol/L)	1
下游引物 (20 μ mol/L)	1
模板 DNA (200 ng/ μ L)	1
无菌水	22
总体积	50

10 min。PCR 扩增样品送上海英骏公司测序分析。

将测序后的 16S rRNA 基因序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 网站进行同源性分析。利用 MEGA 7 软件采用 neighbor-joining (邻位相接法, NJ) 算法构建相应的系统发育树。

1.3.3 γ -PGA 的发酵及制备 采用发酵培养基, 以 3% 的接种量, 30 °C、200 r/min 条件下摇床培养 24 h。收集 1 L 发酵液, 置于 80 °C 水浴 20 min 灭菌, 经 10 000 r/min 离心 20 min 除去菌体后, 在磁力搅拌下加入 3 倍体积的无水乙醇沉淀聚合物, 将沉淀物重新用 1 L 去离子水溶解, 再次用 3 倍体积无水乙醇沉淀, 重复此过程 3 次, 沉淀物冷冻干燥 48 h 得到样品粉末。

1.3.4 γ -PGA 的检测

1.3.4.1 紫外分析 使用紫外分光光度计在 190~800 nm 范围内扫描样品水溶液。

1.3.4.2 水解氨基酸分析 将 0.5 mL 的 20 g/L 的样品水溶液与 0.5 mL 11.8 mol/L 的盐酸溶液混合后, 装入安培管中。熔封后, 置于烘箱中 105 °C 水解 24 h。水解样品使用氨基酸分析仪进行分析。

1.3.4.3 红外分析 使用傅里叶变换红外光谱仪测定样品在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内的红外光谱吸收。

1.3.4.4 凝胶渗透色谱分析 采用凝胶渗透色谱-多角度激光光散射仪-示差检测器串联法 (GPC-MALLS-RI) 测定多糖的平均相对分子质量 (Mw) 及其分布系数 (PDI)^[4]。测试条件: 色谱柱: Shodex OHpak SB-805 HQ (300 mm \times 7.8 mm)。检测器: 干涉型示差检测器 (dRI)、多角度激光光散射检测器 (LS)、紫外检测器 (UV)。流动相 0.1 mol/L 的硫酸钠水溶液, 柱温: 25 °C, 示差温度: 25 °C,

流速 0.4 mL/min, 进样体积 30 μ L。试样制备: 准确称取样品 1 mg, 用 2 mL 的 0.1 mol/L 硫酸钠溶液充分溶解, 配成 0.5 mg/mL 的 γ -PGA 溶液, 过 2 次 0.22 μ m 水系滤膜, 使用 0.22 μ m 针孔过滤器过滤后, 注射器吸取并手动进样。

1.3.5 乳液的制备 使用磷酸盐缓冲液 (PBS, 10 mmol/L, pH 7.0) 溶解不同质量的豌豆蛋白, 质量浓度分别为 10 mg/mL 和 15 mg/mL, 室温下搅拌 24 h, 然后分别加入不同质量的 γ -PGA, 质量分数分别为 0%, 0.01%, 0.05%, 磁力搅拌 30 min, 充分混合, 置于冰箱水合过夜。将蛋白溶液和油相按 9:1 的体积比混合, 利用高速分散机预乳化 2 min (转速为 10 000 r/min), 接着使用高压均质机在 40 MPa 压力下循环 3 次, 制得乳液。

1.3.6 乳液稳定性的测定 使用多重光散射测定乳液稳定性, 将乳状液装入样品池, 进样高度固定为 (45 \pm 0.5) mm; 设定背散射光、透射光检测器和近红外光源的扫描波长为 880 nm, 设定频率为每 5 min 扫描一次。通过样品的扫描图谱变化情况, 分析乳液的稳定性。

1.3.7 乳液粒径 使用激光粒度分析仪测定乳液中液滴的粒径分布, 仪器测定时选择的遮光度为 1%~10%, 通过粒径分布得到体积平均直径和面积平均直径。每个样品重复测量 3 次。

1.3.8 乳液电位的测定 使用纳米粒度电位分析仪测定乳液的电位, 设定仪器操作温度为 25 $^{\circ}$ C, 平衡时间为 40 s。使用 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.0) 将乳液稀释 5~10 倍。每个样品重复测量 3 次。

1.3.9 乳液激光共聚焦成像 利用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 观察乳液的微观结构, 用异硫氢酸荧光素 (FITC, 0.01% 二甲基亚砷溶解, 激发/发射波长=494/518 nm) 染色蛋白质, 用尼罗红 (Nile Red, 0.01% 无水乙醇溶解, 激发/发射波长=488~530/575~580 nm) 染色油相。为了同时观察蛋白和油相的分布, 将异硫氢酸荧光素和尼罗红同时与样品混合, 充分混匀后取 20 μ L 样品置于单凹片中盖上盖玻片并密封, 用激光共聚焦显微镜观察乳液微观结构。

1.3.10 界面吸附率与吸附载量 新鲜乳液的界面吸附百分比 (AP) 和吸附载量 (τ) 采用 Ye^[15] 和

Puppo 等^[16] 描述的方法进行测定。收集经 0.45 μ m 的针头式过滤器过滤后的乳清层。经再次离心 (10 000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) 后收集乳清层下清液, 使用 BCA 试剂盒, 以 BSA 作为标准物, 测定乳清层和蛋白溶液的蛋白浓度。根据测定乳液液滴的粒径分布以及蛋白浓度, 利用公式计算得到吸附蛋白百分比 (AP) 和吸附载量 (τ)。

$$AP(\%) = [1 - (C_{SER}/C_{EMU})] \times 100 \quad (1)$$

式中: C_{SER} 为乳清层的蛋白浓度, mg/mL; C_{EMU} 为乳液初始蛋白浓度, mg/mL。

$$\tau(\text{mg}/\text{m}^2) = [D_{32} \times (C_{EMU} - C_{SER}) \times (1 - \Phi)] / (6\Phi) \quad (2)$$

式中: D_{32} 为面积平均直径, m^2 ; Φ 为油相的体积分数, %。

1.3.11 数据处理 利用 SPSS 26.0 软件进行数据对比分析和差异显著性检验 ($P < 0.05$)。用 Origin 2021 软件进行数据处理和作图。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

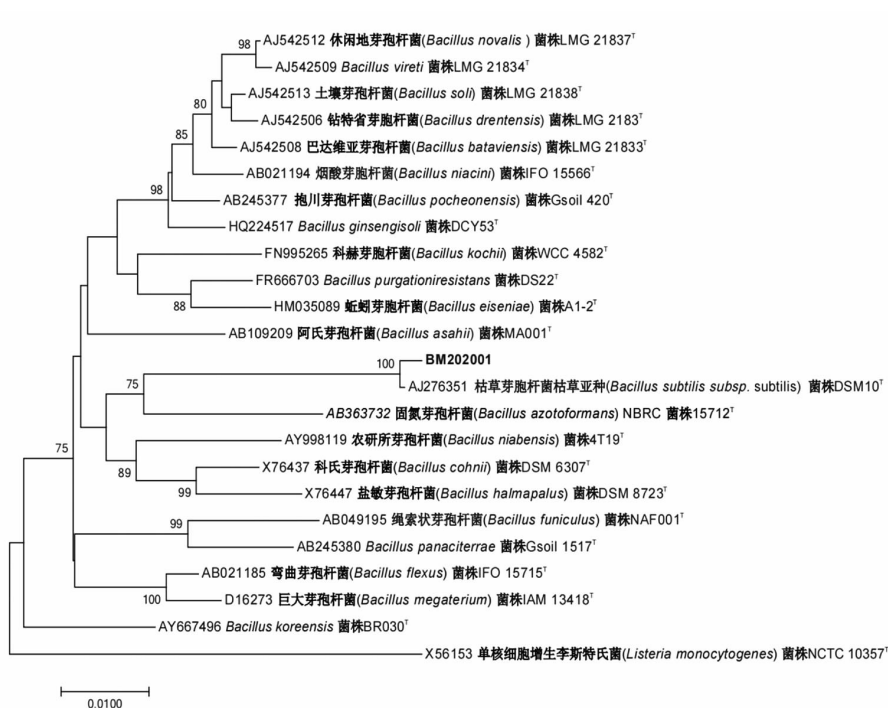
将黄豆酱样品涂布 LB 平板, 筛选出一株表面黏稠的菌株, 命名为 BM202001。通过 16S rRNA 基因测序比对, 发现其序列相似性与芽孢杆菌属已报道的序列相比均大于 99.8%, 构建的系统发育树 (图 1) 表明 BM202001 菌株在芽孢杆菌属进化簇内部, 且与枯草芽孢杆菌枯草亚种 DSM10^T 聚类在一个分支上。上述结果说明 BM202001 菌株属于枯草芽孢杆菌。

2.2 γ -PGA 的检测

2.2.1 紫外分析 菌株 BM202001 接入发酵培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 24 h 后离心收集上清液, 经过乙醇沉淀和冷冻干燥, 得到 12.1 g/L 的样品粉末。将样品制备成 1 g/L 的水溶液, 用紫外分光光度计进行 190~800 nm 波长范围的扫描, 样品的最大吸收波长位于 216 nm 附近 (图 2), 与 γ -PGA 的特征吸收波长一致^[17]。

2.2.2 水解氨基酸分析 如图 3 所示, 样品水解产物主要为谷氨酸, 占比 92.80%; 其次为赖氨酸, 占比 0.84%。

2.2.3 红外分析 为进一步分析样品的官能团结构, 利用傅里叶红外光谱对样品进行分析。根据图 4 结构显示, 3 381.30 cm^{-1} 处的吸收峰代表 N-H



注:本图基于芽孢杆菌属(*Bacillus*)中相关种模式菌株的 16S rRNA 基因序列构建,括号中的数字为菌株 16S rRNA 基因序列的 NCBI 数据库的序列编号。根值(1 000 个重复)显示了使用最大似然法检索到的分支百分数。标尺表示每 100 个核苷酸位置有 1 个替换。

图 1 菌株 BM202001 的系统进化树图

Fig.1 Phylogenetic tree of strain BM202001

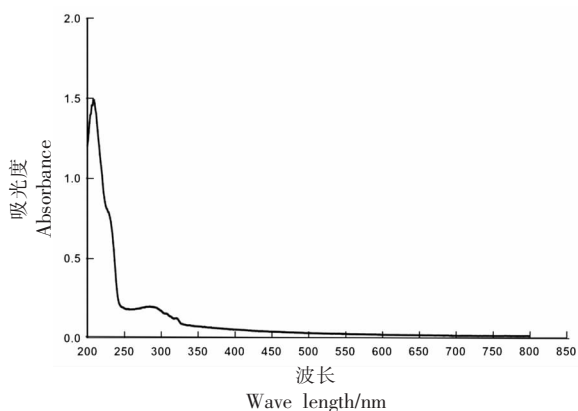


图 2 样品的紫外扫描图谱

Fig.2 UV scan of the sample

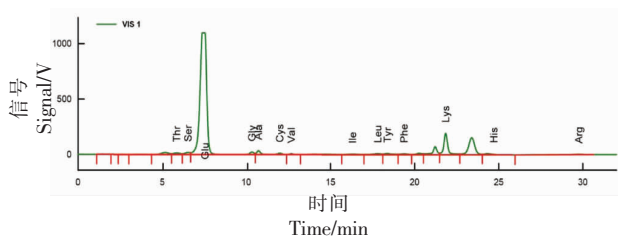


图 3 水解样品的氨基酸分析图谱

Fig.3 Amino acid analysis of hydrolyzed samples

对称伸缩振动,由于 γ -PGA 分子内部的氢键作用,峰位向低频方向移动;1 598.06 cm^{-1} 处的强吸收峰代表酰胺基团中的 -CONHR 不对称伸缩振动;上述两峰为鉴定酰胺基团的主要标志,证明了 γ -PGA 中酰胺基团的存在。2 936.29 cm^{-1} 处的吸收峰代表饱和 C-H 键的对称和反对称伸缩振动;1 406.55 cm^{-1} 处的吸收峰代表脂肪烃中 -CH₂ 或 -CH₃ 的弯曲振动;1 015.77 cm^{-1} 处的吸收峰代表 C-O 键的伸缩振动;小于 1 000 cm^{-1} 处的吸收峰代表 N-H 的非平面弯曲振动的特征吸收。上述结果与 γ -PGA 标准品图谱特征峰描述吻合,可以确定该样品为 γ -PGA^[18]。

2.2.4 凝胶渗透色谱分析 为了分析样品的分子质量,使用 GPC-MALLS-RI 测得的图谱如图 5 所示,出峰时间为 46~64 min,示差信号(图 5:虚线)较宽,说明 γ -聚谷氨酸包含不同分子质量聚谷氨酸的组分。 γ -聚谷氨酸的重均分子质量(Mw)为 7.163×10^4 g/mol,数均分子质量(Mn)为 5.545×10^4 g/mol,z-均分子质量(Mz)为 1.093×10^5

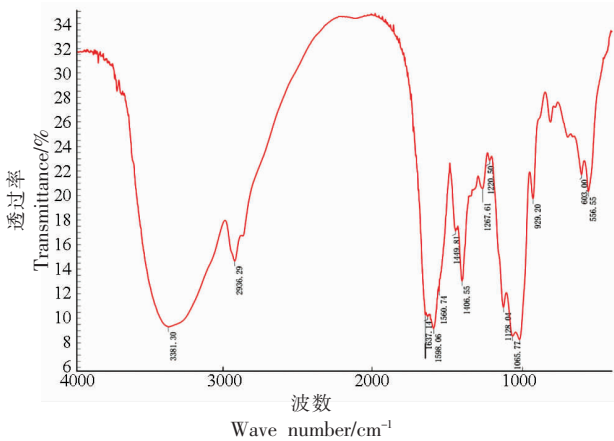


图4 样品的红外吸收图谱

Fig.4 The IR spectrums of sample

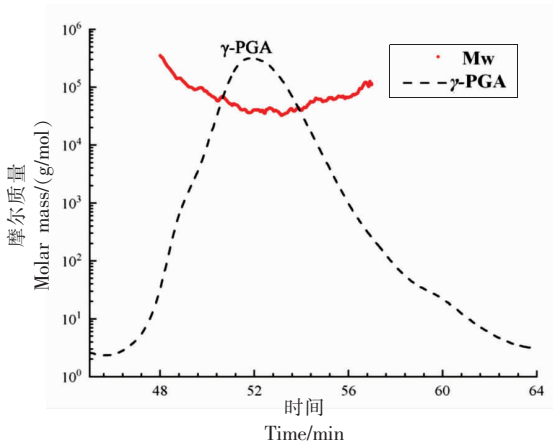


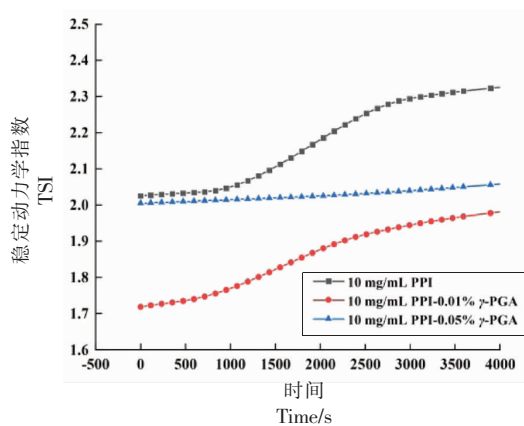
图5 γ -PGA的GPC-MALLS-RI图谱

Fig.5 The GPC-MALLS-RI of γ -PGA

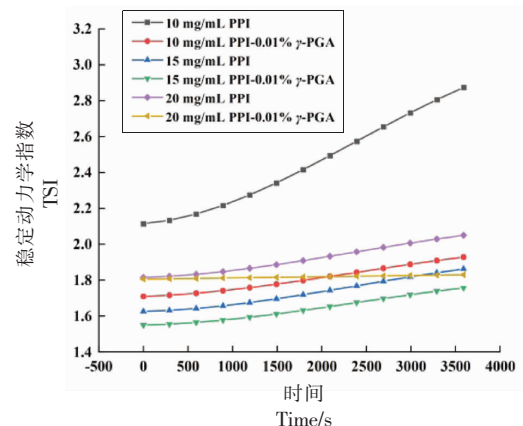
g/mol, 峰值分子质量(M_p)为 3.705×10^4 g/mol, 分散系数(M_w/M_n)为 1.292, 由 M_p 可知, γ -聚谷氨酸的分子质量集中在 1.279×10^4 g/mol; 当 M_w/M_n 为 1.00, 表明多糖分子质量分布均一, 而 γ -聚谷氨酸的 M_w/M_n 为 1.292, 表明 γ -聚谷氨酸分子质量分布较窄, 为窄分布分子聚合物^[19]。

2.3 γ -PGA对乳液物理稳定性的影响

为了探究 γ -PGA对豌豆蛋白乳化特性的影响, 通过稳定性分析仪测定其乳液稳定性, 并不断优化试验中豌豆分离蛋白(PPI)与 γ -PGA的添加量, 使之达到最适配比。如图 6a 所示, 乳液的稳定动力学指数(TSI)数值越大、斜率越大, 则表明乳液的分层现象越明显, 乳液稳定性越低。选取 10 mg/mL PPI 乳液作为空白样品, 10 mg/mL PPI-0.05% γ -PGA 样品 TSI 值在 0 h 时与空白样品(2.09)无显著差异; 而随着储藏时间的增加, 空白样品的乳液分层明显, 失稳现象加剧, TSI 值不断升高, 3 840 s 时为 2.32; 而 10 mg/mL PPI-0.05% γ -PGA 样品 TSI 值无明显变化, 乳液稳定性较空白样品好。当 PGA 添加量为 0.01% 时, 10 mg/mL PPI-0.01% γ -PGA 的 TSI 值在 0 h 时较空白样品显著降低, 为 1.73, 随着时间的增加, 样品 TSI 虽逐渐升高, 3 840 s 时为 1.98, 但低于空白样品 TSI 值, 该现象说明 γ -PGA 的添加量能够提高豌豆蛋白的乳化稳定性。基于上述结果, 在保持 0.01% PGA 添加量的同时, 进一步优化了豌豆蛋白的含量。结果如图 6b 所示, 在 PPI 含量为



(a) 10 mg/mL PPI

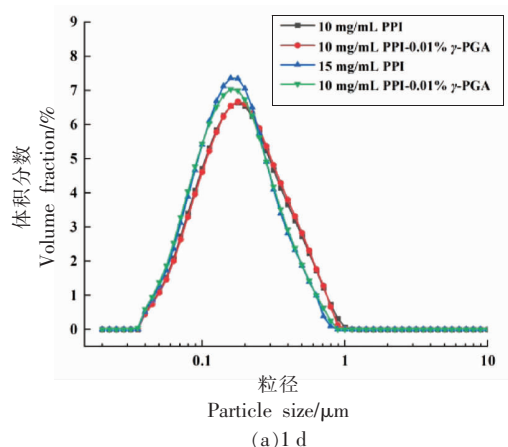


(b) 0.01% γ -PGA

图6 不同配比乳液稳定性分析

Fig.6 Stability analysis of emulsions with different ratios

10~15 mg/mL 时,随着蛋白含量的增加,乳液愈稳定;而当蛋白含量为 20 mg/mL 时,制备得到的乳液 TSI 值增大,表明蛋白含量较大时,对乳液稳定作用产生负反馈作用^[20]。因此,在本文后续研究中主要研究 γ -PGA 添加量为 0.05% 时,PPI 含量为 10 mg/mL 和 15 mg/mL 条件下, γ -PGA 对乳液稳定作用及影响。



2.4 γ -PGA 对乳液液滴变化的影响

将 PPI 乳液静置储存,测定其粒径分布,从而进一步分析乳液稳定性;乳液粒径变化越小,说明乳液稳定性越高,图 7 结果表明,4 组样品的粒径均小于 1 μm ,且在 7 d 内无明显变化,这表明乳液在 7 d 内具有良好的储藏稳定性。

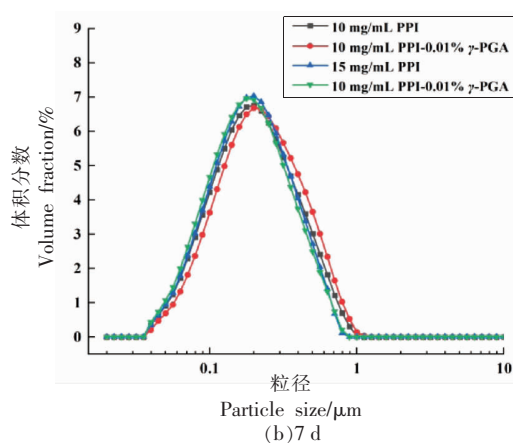
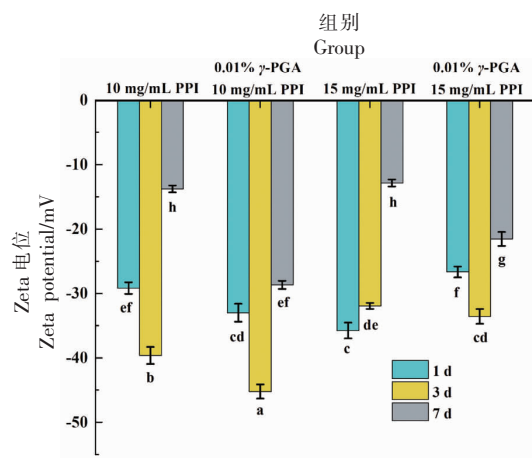


图 7 不同配比乳液在不同储存时间下粒径分布的变化

Fig.7 Particle size distribution changes of emulsions with different ratios under different storage time

乳液液滴表面电荷可以在液滴之间产生静电排斥,使乳液保持稳定^[21]。表面电荷量越多,则电位的绝对值越高,乳液液滴之间排斥力越强,絮凝难度越大,乳液愈稳定。根据乳液液滴的电位(图 8)结果,所测的电位均为负值,随着储存时间的增加,样品电位绝对值呈现先增加后减小的趋势。未加入 γ -PGA 的样品相较于添加组,电位绝对值下降更快,这说明液滴间的斥力更小,乳液更容易絮凝聚合,与激光共聚焦的结果相验证,进一步说明 γ -PGA 的加入有利于保持乳液液滴的电荷值,从而促进乳液稳定。

同时,激光共聚焦显微镜 (CLSM) 能够更直观地展现出乳液的粒径大小,进而反应其稳定状况。由图 9 可知,空白样品的乳液在储存 7 d 后出现了大量液滴絮凝,而 γ -PGA 的加入使的乳液液滴分散较均匀、絮凝现象较少,这说明了 γ -PGA 对 PPI 乳液良好的稳定作用。该现象于现象多重光散射的结果相吻合,这可能是由于 γ -PGA 提高了乳液的表面电荷量,进而增强了液滴之间斥力有关。相较而言,15 mg/mL PPI 与 0.01% γ -PGA 制备的乳液稳定性较好,液滴较小且均匀。



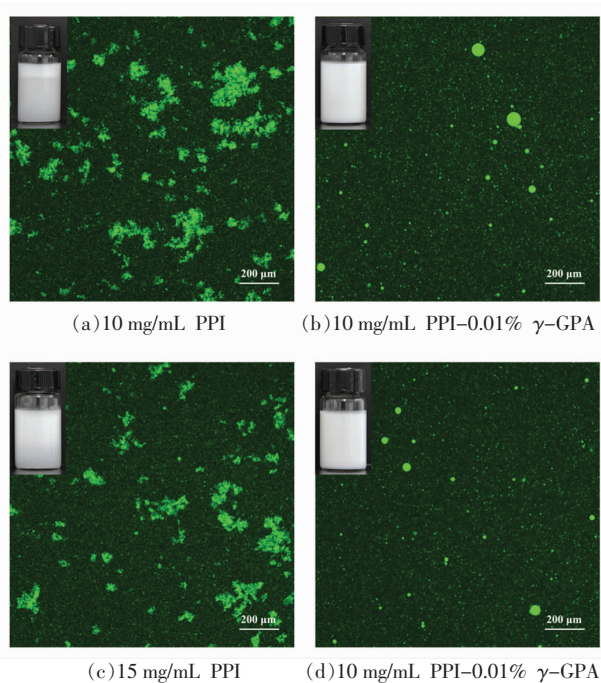
注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 8 不同配比乳液在不同储存时间下电位变化

Fig.8 Potential changes of emulsions with different ratios under different storage time

2.5 γ -PGA 对乳液界面吸附的影响

15 mg/mL PPI 与 0.01% γ -PGA 制备的乳液稳定性是所以组中最好的,其中最有可能与乳液的界面吸附率和吸附载量有关。进一步测定乳液的界面吸附率和吸附载量,结果如图 10 所示。



注:储存时间为7 d。

图9 不同配比乳液的激光共聚焦图像

Fig.9 Confocal laser images of emulsions with different ratios

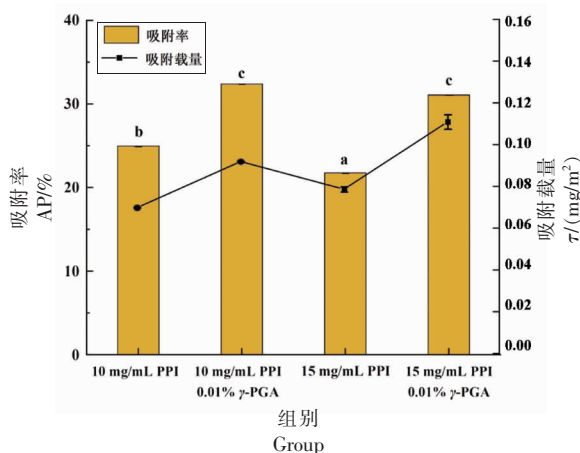


图10 乳液的界面吸附率及吸附载量变化

Fig.10 Changes of interfacial adsorption rate and adsorption load of emulsion

加入 γ -PGA 后,蛋白在界面上吸附率与吸附载量增大:样品 10 mg/mL PPI-0.01% γ -PGA 在界面上的吸附率高于样品 15 mg/mL PPI, 这表明 γ -PGA 可以促进蛋白在油水界面上吸附作用。同时,样品 15 mg/mL PPI-0.01% γ -PGA 的吸附量高于样品 10 mg/mL PPI-0.01% γ -PGA, 这说明前者

乳液液滴界面上的 PPI 含量更多,进而增加了油水界面之间的交联程度,提高了乳液的储藏稳定性。这一结果与前面观察到的宏观现象趋势保持一致。

3 结论

本研究从自制黄豆酱中筛选到 1 株枯草芽孢杆菌 BM202001, 提取并鉴定其发酵产物为 γ -PGA。对不同配比乳液的特性进行稳定性分析,得到 15 mg/mL PPI 与 0.01% γ -PGA 制备的乳液相较其它样品更稳定。通过乳液的粒径分布,电位及激光共聚焦测定,发现样品粒径相近,表明 γ -PGA 的添加未改变乳液的粒径;乳液液滴的电位结果表明,未加入 γ -PGA 的样品,电位值下降较快,液滴间的相互作用斥力较小,容易絮凝聚合。同时,激光共聚焦的结果表明, γ -PGA 的加入使的乳液液滴分散较均匀,絮凝现象较少,乳液在储藏期间未出现明显分层现象,进一步说明 γ -PGA 的加入有利于保持乳液液滴的电荷值,从而促进乳液稳定。乳液的界面吸附率与吸附载量的结果表明,加入 γ -PGA 后,蛋白在界面上吸附率与吸附载量均有所增加,由此推测, γ -PGA 可以促进蛋白在油水界面上作用,并起到了稳定滴液的作用。

参 考 文 献

- [1] DJOULLAH A, HUSSON F, SAUREL R. Gelation behaviors of denaturated pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 636-645.
- [2] ZHANG C, WU D J, QIU X L. Stimulatory effects of amino acids on γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17934.
- [3] ZHANG C, WU D J, REN H X. Economical production of agricultural γ -polyglutamic acid using industrial wastes by *Bacillus subtilis* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 146: 117-123.
- [4] YOKOIGAWA K, SATO M, SODA K. Simple improvement in freeze-tolerance of bakers' yeast with poly- γ -glutamate[J]. Journal of Bioscience and Bio-

- engineering, 2006, 102(3): 215-219.
- [5] DAHIYA D, CHETTRI R, NIGAM P S. Chapter 25 – Biosynthesis of polyglutamic acid (γ -PGA), a biodegradable and economical polyamide biopolymer for industrial applications[M]// Microbial and Natural Macromolecules. New York: Academic Press, 2021: 681-688.
- [6] BAI N L, ZHANG H L, LI S X, et al. Effects of application rates of poly- γ -glutamic acid on vegetable growth and soil bacterial community structure [J]. Applied Soil Ecology, 2020, 147: 103405.
- [7] FANG Y, ZHU X Q, WANG N, et al. Biodegradable core-shell electrospun nanofibers based on PLA and γ -PGA for wound healing[J]. European Polymer Journal, 2019, 116: 30-37.
- [8] MURIEL MUNDO J L, ZHOU H L, TAN Y B, et al. Stabilization of soybean oil-in-water emulsions using polypeptide multilayers: Cationic polylysine and anionic polyglutamic acid[J]. Food Research International, 2020, 137: 109304.
- [9] TAO L, LONG H Y, ZHANG J F, et al. Preparation and coating application of γ -polyglutamic acid hydrogel to improve storage life and quality of shiitake mushrooms[J]. Food Control, 2021, 130: 108404.
- [10] 张艳丽, 高华, 刘小红. 微生物合成的聚谷氨酸及其应用[J]. 生物技术通报, 2008(4): 58-62.
ZHANG Y L, GAO H, LIU X H. Biosynthesis and application of polyglutamic acid [J]. Biotechnology Bulletin, 2008(4): 58-62.
- [11] WANG J Q, ZHAO J, XIA J Y. γ -PGA fermentation by *Bacillus subtilis* PG-001 with glucose feedback control pH-stat strategy[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(5): 1871-1880.
- [12] THAPA P, THAPA A, KHADKA S, et al. Screening and characterization of potent poly glutamic acid producing *Bacillus* sp. isolated from Kinema, water and soil samples[J]. Heliyon, 2021, 7(8): e7715.
- [13] ZENG W, LIANG Z Q, LI Z, et al. Regulation of poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis* GXA-28 by potassium[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 61: 83-89.
- [14] 王莹, 辜冬琳, 杨建波, 等. 何首乌九蒸九晒炮制过程中多糖结构的动态变化研究[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(12): 1285-1290.
- WANG Y, GU D L, YANG J B, et al. Dynamic changes of polysaccharide structure during a nine-time repeat of steaming and drying of *Polygoni multiflori* Radix [J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2022, 19(12): 1285-1290.
- [15] YE A Q. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 946-952.
- [16] PUPPO M C, BEAUMAL V, SPERONI F, et al. β -Conglycinin and glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperature-high-pressure treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(3): 389-397.
- [17] CROMWICK A, BIRRER G A, GROSS R A. Effects of pH and aeration on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 50(2): 222-227.
- [18] 于晓丹. γ -聚谷氨酸发酵条件优化及结构表征分析[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2011.
YU X D. Fermentation conditions optimization and structural characterization of γ -PGA[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2011.
- [19] 王鑫. 五味子叶多糖提取及其对阿尔茨海默症模型小鼠作用研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2022.
WANG X. Study on the extraction and treating alzheimer's disease model mice of polysaccharides from *Schisandra chinensis* leaf[D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2022.
- [20] DEGNER B M, CHUNG C, SCHLEGEL V, et al. Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods[J]. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, 2014, 13(2): 98-113.
- [21] 李杨, 徐清清, 韩璐, 等. 添加菊粉条件下的豌豆分离蛋白乳化特性研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(7): 382-388.
LI Y, XU Q Q, HAN L, et al. Emulsifying properties of pea protein isolate with inulin[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(7): 382-388.

Screening of γ -Polyglutamic Acid-producing Strains and Its Effect on Emulsion Stability

Zhang Huiyan, Dai Jun, Gao Zhiming, Qian Ying*

(School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, National '111' Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation (Ministry of Education & Hubei Province), Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068)

Abstract Pea protein isolate is nutritionally rich and widely used in the food industry, but its poor water solubility limits its application scope. To explore the effect of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) from microbial sources on the stability of pea protein isolate emulsions, a strain BM202001 with high production of gel-like fermentation products was isolated from traditional homemade soybean sauce using the plate separation method. The strain was identified as *Bacillus subtilis* through 16S rRNA gene sequencing and sequence homology analysis. The fermentation product was purified and identified as γ -PGA using methods such as ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, and amino acid analysis. By measuring the emulsion potential, particle size, and microstructure, it was found that 0.01% γ -PGA and 15 mg/mL pea protein could prepare emulsions with good stability, small and uniform droplets, which could improve the stability of pea protein emulsions. The results provide a reference for broadening the application of γ -PGA and pea protein in food.

Keywords γ -polyglutamic acid; *Bacillus subtilis*; pea protein isolate; emulsion stability