



团 体 标 准

T/SOFIDPA XXXX—2023

超高分子量聚谷氨酸发酵工艺规程

Fermentation process of ultra-high molecular weight polyglutamic acid

(征求意见稿)

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 实施

四川省有机肥料产业发展促进会

发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 生产环境及生产车间要求	1
5 生产技术流程	2
附录 A（资料性）	7
附录 B（规范性）	8

前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由四川省有机肥料产业发展促进会提出并归口。

本文件起草单位：XXX。

本文件主要起草人：XXX。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——本次为首次发布。

超高分子量聚谷氨酸发酵工艺规程

1 范围

本标准规定了超高分子量聚谷氨酸发酵生产中所涉及的生产环境、生产车间、菌种、发酵扩培、后处理、包装、储运及质量检验等技术环节作出要求。

本标准适用于以淀粉、淀粉糖、蔗糖、葡萄糖、糖蜜、甘油等为主要原料经微生物发酵生产超高分子量的聚谷氨酸。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 3095 环境空气质量标准

GB 3838 地表水质量标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

聚谷氨酸 polyglutamic acid

聚谷氨酸（也称 γ -聚谷氨酸， γ -PGA），是由D-谷氨酸和L-谷氨酸按照不同比例组成的，通过 α -氨基和 γ -羧基之间的 γ -酰胺键连接形成的一类聚合氨基酸。

3.2

溶解氧 (DO) dissolved oxygen

溶解在水中的空气中的分子态氧称为溶解氧，水中的溶解氧的含量与空气中氧的分压、水的温度都有密切关系，在发酵聚谷氨酸时所测值为溶解在发酵液中的分子态的氧被菌体消耗利用后的剩余含量。

3.3

耗氧速率 (OUR) oxygen uptake rate

指生物和微生物进行呼吸作用所消耗氧气的速度。

3.4

比好氧速率 (q_{O_2}) specific oxygen uptake rate

单位重量的细胞(干重)在单位时间内所消耗的氧气, $\text{mmol O}_2/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。

4 生产环境及生产车间要求

4.1 生产环境要求

a) 生产设施满足产品需要并符合安全、环保、消防等条件要求。

- b) 厂区空气质量达到大气环境质量标准GB 3095-1996中的II类标准。
- c) 发酵用水达到地表水质量标准GB 3838-2002中的III类水质标准，冷却水及其他用水达到标准中的IV类水质要求。

4.2 生产车间要求

- a) 发酵车间应建立单独的消毒杀菌间，人员进发酵车间前应进行消毒杀菌；
- b) 菌种的储藏间、无菌操作间与生产车间相对隔离。
- c) 发酵车间与浓缩等后处理车间相对隔离，有可以灭菌的传输管道。
- d) 建立定期用消毒剂进行生产设备和环境消毒的车间环境卫生制度。
- e) 建立定期对生产设备设施进行检查检修的车间安全制度。

4.3 库房

满足（原料/成品）存放需要的场所要求密闭、通风、干燥、避免阳光直射。

4.4 仪器设备

4.4.1 生产设备

主要生产设备有液体种子罐、液体发酵罐、补料罐、冷水机、配料机、空压机、蒸汽锅炉、压滤设备、蒸发浓缩设备等。

4.4.2 主要分析检测设备：

主要分析检测设备有高效液相色谱仪、尾气分析仪、恒温摇床、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅、紫外分光光度计、生物质传感分析仪、天平等。

5 生产技術流程

聚谷氨酸发酵生产的一般技术环节为：菌种→活化→种子扩培→发酵培养→后处理→包装→产品质量检验→出厂。流程图见附录A。

5.1 菌种

5.1.1 原种

原种是生产用菌种的母种，对菌种的要求如下：

- a) 有菌种鉴定报告；
- b) 有菌种的企业编号、来源等信息。

5.1.2 菌种的保存和管理

菌种常见保存方式见表1。

表1 常见菌种保存方式

保藏方式	一般存放条件	一般保存期限
冻干管保藏	冰箱或室温	5年以上
石蜡油保藏	4℃冰箱	1年以上
甘油管保藏	-18℃或更低温度	1年以上

常规斜面保藏	4℃冰箱	2个月—12个月
--------	------	----------

- a) 采用合适的多种方式保存菌种，确保无杂菌污染，菌种不退化。应选用一种以上适宜方法保藏。
- b) 分类存放，定期检查；
- c) 建立菌种档案，记录菌种使用及保藏等信息。

5.1.3 菌种质量控制

在生产之前，应用平皿划线和摇瓶发酵对菌株进行检查，确认菌株纯度和发酵性能没有发生退化。出现污染或退化的菌种不能作为生产用菌种，需进行5.1.4或5.1.5操作。

5.1.4 菌种的纯化

当菌种不纯时，需进行纯化。可采用平皿划线分离法或稀释涂布法得到纯菌种，再对分离纯化的菌种进行发酵性能验证，验证合格的菌种方可用于后续发酵生产。

5.1.5 菌种复壮

当菌种发生下列现象之一，应进行菌种复壮。

- a) 菌体形态或菌落形态发生变化；
- b) 代谢活性降低，发酵周期改变；
- c) 重要功能性物质的产生能力下降；
- d) 其他重要特性的退化或丧失。

菌种复壮的方法：通过功能平皿多次选育或接回原分离培养基传代培养，重新分离该菌种。

5.2 发酵扩培

5.2.1 种子扩培

原菌种应连续转接活化至生长旺盛后才能应用。

种子扩培过程包括试管斜面菌种、摇瓶（或茄瓶斜面）、种子罐扩培三个阶段，操作过程要保证菌种不被污染、菌种生长旺盛。种子罐扩培根据发酵体系选择对应多级种子培养。

5.2.2 培养基

培养基重要原料满足一定的质量要求，包括成分、含量、有效期以及生产厂家等。对新使用的发酵原料需经过摇瓶试验及发酵罐小试后方可用于规模发酵生产。

5.2.2.1 种子培养基

种子培养基要保证菌种的生长延滞期短，生长旺盛。原料应使用易被菌体吸收利用的碳、氮源，且氮源比较高，营养丰富完全，有一定的pH缓冲能力。当有多级种子时，种子培养基应逐步向发酵培养基转换，即逐步用发酵培养基的成分替代部分种子培养基，以减少后期因为培养基差异过大菌种的适应期。

5.2.2.2 发酵培养基

发酵培养基主要是淀粉、淀粉糖、蔗糖、葡萄糖、糖蜜、甘油等为主要碳源、味精为发酵底物、柠檬酸为发酵诱导物、及适量的金属盐离子组成。发酵组分含量要求接种后菌株能生长旺盛，快速进入聚谷氨酸代谢途径。

5.2.3 灭菌

常用的灭菌方式见附录C。

5.2.3.1 发酵罐空消

- a) 在装料前需要对发酵罐清洗、空消，空消前需要取出发酵罐pH、溶氧电极。
- b) 空消灭菌温度121℃~125℃（压力0.103 MPa~0.168 MPa），0.5h~1.0h。
- c) 空消结束降温后装上pH、溶氧电极。

5.2.3.2 培养基实消

- a) 液体培养基、补料罐（消泡剂）、管道、发酵设备及空气过滤系统灭菌温度为121℃~125℃（压力0.103 MPa~0.168 MPa），0.5h~1.0h。液体培养基装料量为50%~70%发酵罐容积（需计算种子液体积和灭菌增加体积）。
- b) 在使用葡萄糖、糖蜜等为原料时（谷氨酸与糖在高温灭菌时会产生美拉德反应），应采用分开灭菌的方式对葡萄糖或糖蜜进行灭菌，灭菌完成后再加入已灭菌的剩余发酵培养基组分中。
- c) 培养基灭菌后按照5.2.4进行检查。若灭菌不彻底，培养基不能使用。

5.2.4 灭菌效果检查

采用显微镜染色观察法或发酵管试验法检验培养基的灭菌效果。

5.2.4.1 染色观察法

- a) 对待检测培养基无菌操作取样，在洁净的载玻片上涂片、染色、镜检。
- b) 若镜检发现有菌体，即可认为灭菌不彻底，需进行5.2.4.2操作，无活菌体后培养基可用于接种发酵生产使用。
- c) 若未发现菌体，初步认为灭菌彻底，培养基可以使用。在必要时，需进行5.2.4.2操作，进一步确认培养基灭菌是否彻底。

5.2.4.2 发酵管试验法

用无菌操作技术将1 mL待检测培养基加入5 mL已灭菌肉汤培养基中，重复三次。置于37℃培养，24 h后培养基无浑浊、镜检无菌体即可认为灭菌彻底。反之，即可判定培养基灭菌不彻底。

5.2.5 无菌空气

发酵生产中所通入的无菌空气采用过滤除菌设备制得，空气过滤系统应采用二级以上过滤。对制得的无菌空气按如下步骤检验合格后可用于发酵生产。

用无菌操作技术，向装有200 mL无菌肉汤培养基的三角瓶中通入待检测的过滤空气10min~15min。三角瓶置于37℃摇床150r/min培养，24h后培养基无浑浊、镜检无菌体即判定合格。

5.3 发酵控制

5.3.1 接种量的要求

- a) 摇瓶种子转向种子发酵罐培养的接种量为1%~10%。
- b) 在多级发酵生产阶段，对生长繁殖快的菌种（代时<3h），从一级转向下一级发酵的接种量为5%~10%；对生长繁殖较慢的菌种（代时>6h），接种量不低于10%。

c) 最后一级种子接入发酵培养基的接种量为5%~10%。

5.3.2 培养温度

发酵温度应控制在33℃~37℃，在发酵过程中，可根据不同聚谷氨酸生产菌株的生长代谢特性在不同的发酵时期采用不同的发酵温度。

5.3.3 供氧

采用的供氧方式是向培养基中连续补充无菌空气，并与搅拌相配合，供氧量根据聚谷氨酸发酵菌株在发酵不同时期供氧需求差异，采取不同的供氧量。

5.3.4 发酵pH

发酵初始pH值为7.0~7.5，发酵过程通过补加氢氧化钠溶液或柠檬酸溶液使pH值维持在6.0~7.5范围内。

5.3.5 消泡

发酵过程中，当聚谷氨酸开始合成时，发酵液中会出现大量泡沫，此时需要流加消泡剂进行消泡处理，消泡剂应选择对菌体生长和聚谷氨酸合成没有影响的产品。

5.3.6 发酵过程控制

聚谷氨酸发酵为好氧生物过程，供氧水平对菌体生长和 γ -PGA合成至关重要。在机械搅拌发酵罐中，供氧水平受搅拌桨尺寸、搅拌速率、通气量、气体分布方式、氧气分压、发酵液流变特性等多个因素的影响，特别是发酵液黏度增加，会造成通气的气泡直径变大、气液交换面积减少、气泡停留时间缩短，因此氧传递速率降低、出现溶氧限制。本调控的核心在于控制发酵液中菌体的数量，在相同溶氧的条件下提高了单位菌体的比好氧速率（ qO_2 ），从而减少或解除发酵过程的溶氧限制，主要通过以下调控措施实现：

- 发酵初期维持发酵罐转速和通气量在一个相对较低的水平，发酵初期只是菌体的增殖，不会进入聚谷氨酸发酵合成途径，通过供氧和搅拌的调控，限制菌体过量繁殖。
- 当发酵液开始起泡后，表明菌株开始进入聚谷氨酸发酵代谢途径，此时适当增加搅拌转速和通气量以提高发酵液中的溶氧保证发酵供氧需求。
- 发酵过程中应对发酵液连续取样，采用生物传感分析仪测定发酵液中的糖和谷氨酸底物残留，并根据测定结果进行补料，使谷氨酸浓度维持在10 g/L以上，糖浓度维持在20 g/L以上。
- 通过实时测定发酵液菌体含量（通过建立菌体的细胞干重和600 nm处吸光值（OD600）之间相互关联曲线，以此来进菌体密度的快速测定）、发酵罐尾气数据、进气数据、装样量计算菌体的比好氧速率（ qO_2 ）。
- 发酵液起泡进入代谢途径后，通过对空气通气量和搅拌速率的调控，使单位菌体的比好氧速率（ qO_2 ）始终维持在20 mmol O_2 /(g·h)~30 mmol O_2 /(g·h)，以减少发酵液的溶氧限制。
- 发酵过程通过流加氢氧化钠或柠檬酸对发酵液pH进行调控，使其控制在6.0~7.5范围内。

5.3.7 发酵终点判

下列参数为发酵终点判定依据：

- 监测发酵液中的葡萄糖、谷氨酸、发酵液OD值、pH值、溶解氧浓度及发酵液粘度等理化参数；

- b) 监测发酵过程中好氧速率、CO₂产生率、呼吸商、氧传递系数等发酵代谢特征参数。
- c) 发酵液中聚谷氨酸产量、发酵液颜色、形态、气味等指标。

5.4 后处理

后处理过程可分为发酵液直接分装；发酵液除菌、分装；发酵液除菌、浓缩、分装三种类型。

5.4.1 发酵液直接分装

对于发酵液直接分装的产品剂型，可根据产品要求进行包装。

5.4.2 发酵液除菌、分装

对于产品有除菌要求的，应采取以下步骤进行除菌处理：

- a) 在发酵结束后采用高压蒸汽对发酵液进行121℃~125℃高温灭菌20min（压力0.103 MPa~0.168 MPa）。
- b) 灭菌结束后通过压滤等处理去除聚谷氨酸发酵液中的菌体。
- c) 除菌后的发酵液再根据产品要求进行包装。

5.4.3 发酵液除菌、浓缩、分装

对发酵液中聚谷氨酸浓度有较高要求，且发酵液中聚谷氨酸浓度不能达到要求时需要进行以下步骤进行发酵液浓缩处理：

- a) 进行5.4.2发酵液除菌处理操作，去除发酵液中的菌体。
- b) 根据发酵液中聚谷氨酸浓度和产品要求聚谷氨酸浓度进行计算浓缩倍数，采用蒸发浓缩，使产品中聚谷氨酸浓度满足要求。
- c) 浓缩后的产品根据产品要求进行包装。

5.4.4 建立生产档案

每批产品的生产、检验结果应存档记录，包括检验项目、检验结果、检验人、批准人、检验日期等信息。

5.5 产品质量跟踪

定期检查产品质量，并对产品建立应用档案，跟踪产品的应用情况。

附录 A
(资料性)

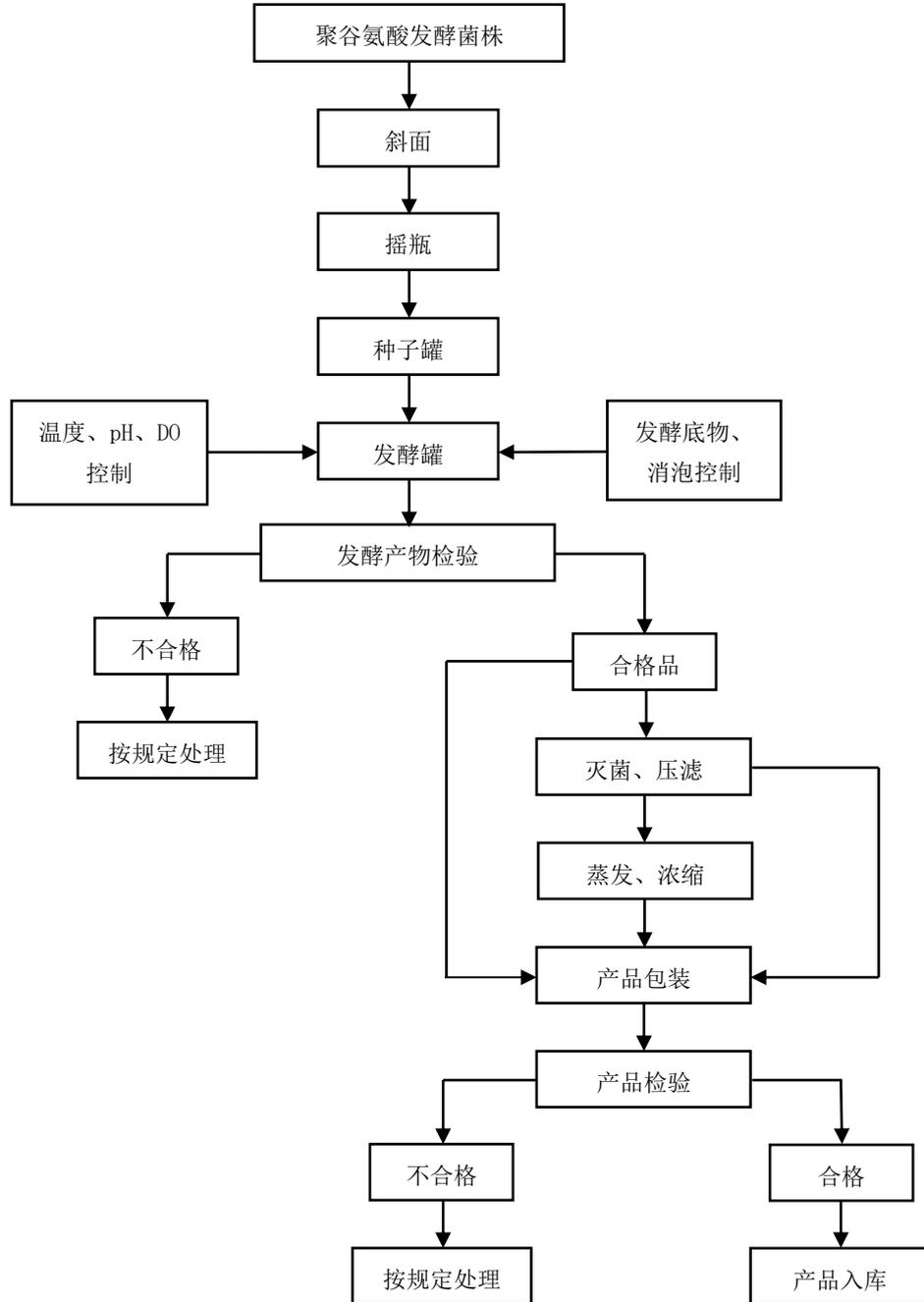


图1 超高分子量聚谷氨酸发酵生产工艺流程示意

附 录 B

(规范性)

聚谷氨酸分子量及含量的测定 高效液相色谱法

B.1 原理

以硫酸钠溶液为流动相，以不同含量的聚谷氨酸标准溶液紫外吸收值为检测对象，利用高效液相色谱法测定聚谷氨酸的含量；以不同分子质量的葡聚糖标准品溶液作为参照，通过检测聚谷氨酸在示差折光检测器下的出峰时间，利用高效液相色谱法测定聚谷氨酸的分子质量。

B.2 试剂或材料

B.2.1 试剂、溶液和水：本方法采用符合 GB/T 6682 中的一级水、色谱纯无水硫酸钠，其余试剂、溶液，在未注明规格和配置方法时，均应符合 HG/T 2843 的规定。

B.2.2 流动相硫酸钠溶液 (0.3 mol/L)：称取 42.6 g (精确至 0.0001 g) 无水硫酸钠溶解并定容至 1 L, 用乙酸调节 pH 至 4.0, 用孔径 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 超声波脱气 15min。

B.2.3 聚谷氨酸标准贮备液 (10.0 mg/mL)：称取聚谷氨酸标准品 (含量 (以干基计)) $\geq 99.0\%$ 1.0 g (精确至 0.0001 g), 用流动相溶解并定容至 100 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存条件下有效期 1 周。

B.2.4 聚谷氨酸标准工作液 (1.0 mg/mL)：取 10 mL 聚谷氨酸标准贮备液于 100 mL 容量瓶中, 用流动相定容至 100 mL, 获得聚谷氨酸标准工作液 (1.0 mg/mL), 此标准工作液使用前制备。

B.2.5 葡聚糖标准品：色谱纯, 分子质量为 5900 Da、22800 Da、47300 Da、112000 Da、244000 Da、670900 Da、1194000 Da、2693000 Da。

B.2.6 葡聚糖标准溶液：以葡聚糖标准品为分子质量标准品, 分别取 8 种不同分子质量色谱纯葡聚糖标准品各 0.05 g, 溶解转移至 50 mL 容量瓶中定容。

B.3 仪器设备

B.3.1 一般实验室仪器和设备。

B.3.2 高效液相色谱仪：配有紫外检测器、视差折光检测器。

B.4 色谱参考条件

B.4.1 检测温度：35 $^{\circ}\text{C}$ 。

B.4.2 紫外检测器：检测波长：210 nm；视差折光检测器。

B.4.3 流速：0.5 mL/min。

B.4.4 进样量：50 μL 。

B.4.5 色谱柱：凝胶色谱柱 (7.8 mm \times 300 mm, 或达到同等效果及规格的凝胶色谱柱)。

B.5 试验步骤

B.5.1 标准工作曲线的绘制

聚谷氨酸含量标准曲线：分别准确移取 0.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、15.0 mL、20.0 mL、25.0 mL 聚谷氨酸标准工作液稀释液至 25 mL 容量瓶中并定容, 配成 0.00 mg/mL、0.20 mg/mL、0.40 mg/mL、0.60 mg/mL、1.00 mg/mL 溶液, 溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 打开色谱仪, 并调至工作状态, 待基线平稳后, 依次将上述聚谷氨酸溶液注入色谱柱中, 进样量为 50 μL , 记录峰面积。以标准溶液中聚谷氨酸浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

分子质量标准曲线：将 8 个不同分子量的葡聚糖标准品溶液分别经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，打开视差折光检测器，并调至工作状态，待基线平稳后，依次将上述样品注入色谱柱中，进样量为 50 μL，采用视差折光检测器的方法测定出峰时间，以葡聚糖标准品出峰时间为横坐标，其分子质量为纵坐标绘制分子量标准曲线。

B.5.2 试样溶液制备

称取 1 g 聚谷氨酸样品（精确到 0.0001 g），用流动相溶解并定容至 100 mL，配好的试样经 0.22 μm 滤膜过滤。

B.5.3 试样测定

聚谷氨酸含量测定：取以上试样经 0.22 μm 微孔滤膜过滤两次。打开色谱仪，并调至工作状态，待基线平稳后，进样量为 50 μL，进行高效液相色谱检测，以聚谷氨酸出峰时间峰形一致的完整峰（参考标品峰形）记录峰面积，并根据标准曲线计算得到试样中聚谷氨酸的浓度。

聚谷氨酸分子量测定：进样量为 50 μL，进行试样检测，记录出峰时间（以峰值为准），并根据分子量标准曲线计算得到试样中聚谷氨酸的分子量。

注：每次检测结束，用流动相继续冲洗色谱柱至少 30min，待基线平稳后方可进行下次检测。

B.5.4 结果的表述和计算

以质量分数表示的聚谷氨酸含量 ω 按公式 (B.1) 计算：

$$\omega = \frac{\rho \times 100}{m \times 10^{-3}} \dots \dots \dots (B.1)$$

式中：

ω ——样品中聚谷氨酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ ——根据标准曲线计算的试样中聚谷氨酸的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

100——聚谷氨酸样品溶解的体积，单位为毫升（mL）；

m ——称取的聚谷氨酸的质量，单位为克（g）；

10^{-3} ——克与千克之间的换算系数。

计算结果表示的小数点后一位，取平行测定结果的算术平均值作为测定结果。

B.5.5 精密度

平行测定结果的相对相差应不大于 15%。

不同实验室测定结果的相对相差应不大于 30%。

注：相对相差为两个平行测定结果的相对差值与两个平行测定结果的平均值之比，以百分数（%）表示。