文章编号:1008-1542(2023)05-0534-07

芦苇水解液发酵生产 γ-聚谷氨酸工艺优化

徐　佳,冯昆鹏,张智强,王颖赛

(雄安创新研究院,河北雄安新区　071700)

摘　要:为了降低 γ-聚谷氨酸(γ-PGA)的生产成本,实现芦苇等可再生资源的高值化利用,探索建立以芦苇水解液为碳源制备 γ-PGA 的新型发酵过程控制策略的可行性。首先,研究纤维素酶用量和底物浓度对芦苇水解的影响;其次,采用分段式培养及溶氧反馈补料调控策略,对芦苇水解液发酵生产 γ-PGA 进行工艺优化。结果表明,芦苇经预处理后在 10 FPU/g(底物)酶用量和 10%底物添加量的条件下水解,总糖质量浓度可达(76.64±1.74)g/L;以分段式溶氧反馈-分批补料发酵培养方式,利用芦苇水解液生产 γ-PGA,最终产量可达(46.72±1.18)g/L,生产效率较分批发酵提高了 46.06%。因此,将芦苇水解液用于 γ-PGA 的分批补料发酵具有产业化可行性,有助于降低商业化生产的原料成本。

关键词:发酵工程;芦苇水解液;γ-聚谷氨酸;分批补料;溶氧反馈

中图分类号:Q815　　**文献标识码**:A　　**DOI**:10.7535/hbkd.2023yx05012

Optimization of γ-polyglutamic acid production process based on reed hydrolysate fermentation

XU Jia, FENG Kunpeng, ZHANG Zhiqiang, WANG Yingsai

(Xiong′an Institute of Innovation, Xiong′an New Area, Hebei 071700, China)

Abstract: In order to reduce the production cost of γ-polyglutamic acid (γ-PGA) and realize high-value utilization of renewable resources such as reed, the feasibility of establishing a new fermentation process control strategy for the preparation of γ-PGA using reed hydrolysate as carbon source was explored. Firstly, the effects of cellulase dosage and substrate concentration on reed hydrolysis were studied; Secondly, the process of fermentation and production of γ-PGA from reed hydrolysate was optimized by segmented culture and DO feed-back control strategies. The results show that after pretreatment, the total sugar concentration of reed could reach (76.64 ± 1.74) g/L under the condition of 10 FPU/g (substrate) enzyme dosage and 10% substrate addition; the reed hydrolysate was produced γ-PGA by segmented dissolved oxygen feedback-batch feed fermentation culture, and the final yield could reach (46.72 ± 1.18) g/L, with the production

收稿日期:2023-09-08;修回日期:2023-10-07;责任编辑:张士莹

基金项目:河北省重点研发计划项目(21371202D,22326411D)

第一作者简介:徐　佳(1982—),男,河北保定人,副研究员,硕士,主要从事农林废弃物高值化利用方面的研究。

E-mail:xujia@xii.ac.cn

徐佳,冯昆鹏,张智强,等.芦苇水解液发酵生产 γ-聚谷氨酸工艺优化[J].河北科技大学学报,2023,44(5):534-540.

XU Jia, FENG Kunpeng, ZHANG Zhiqiang, et al. Optimization of γ-polyglutamic acid production process based on reed hydrolysate fermentation[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2023, 44(5): 534-540.

efficiency increasing by 46.06% compared with batch fermentation. The use of reed hydrolysate for batch fermentation of γ-PGA is industrially feasible, which helps to reduce the raw material cost of its commercial production.

Keywords: fermentation engineering; reed hydrolysate; γ-polyglutamic acid (γ-PGA); fed-batch; DO feed-back

芦苇是一种大型多年生禾本植物，在雄安新区白洋淀的湿地环境中广泛生长，其地上部分高度能达到 6 m，可通过种子传播或根茎分生繁殖，在短时间内积累大量的生物量[1]。目前，当地将芦苇平衡收割后主要用于造纸和发电，经济价值较低，导致农户收割积极性不高，弃收的芦苇如不开发利用，将会给白洋淀带来新的环境污染。纤维素和半纤维素是芦苇秸秆中的主要成分，其总含量在 60%以上[2]，经过物理和化学预处理，在纤维素酶的催化作用下，可水解为五碳糖和六碳糖为主的糖液，该水解液可用作微生物发酵的碳源，制备生物化工、生物材料、生物能源、生物医药等产品[3-4]。

γ-聚谷氨酸(poly-γ-glutamic acid，γ-PGA)是由 *L* 型和 *D* 型谷氨酸单体通过 γ-羧基与 α-氨基间的 γ-酰胺键聚合而成的一种多肽分子[5]，通常由 500～5 000 个谷氨酸单体组成，分子质量在 100～1 000 kD 之间[6]。γ-PGA 是一种具有良好水溶性、能被生物降解且不会对环境造成危害的高分子多肽[7]，可作为保湿剂、增效剂、增稠剂、缓释剂、防冻剂、医药载体、高吸水树脂、生物絮凝剂和重金属吸附剂，广泛用于农业、化妆品、医药、食品等领域[8-9]。

由于 γ-PGA 生产成本较高，因而阻碍了其广泛应用。葡萄糖和蔗糖是大多数芽孢杆菌工业生产 γ-PGA 的常用碳源，近年来人们开始探索利用廉价的可再生资源来生产 γ-PGA，如糖蜜、粗甘油、玉米秸秆等[10-12]。李海军等[13]利用 350 g/L 的甜菜糖蜜作为碳源，发酵 64 h 后聚谷氨酸产量达到 45.34 g/L。陈鹏程等[14]采用玉米秸秆水解液，以补料分批发酵的方式，培养 54 h 后得到的 γ-PGA 产量为 25.60 g/L。这些成果为将芦苇水解液作为生产 γ-PGA 的廉价营养源提供了研究依据，但 γ-PGA 发酵周期较长、产率不高的问题有待解决。

本研究以芦苇水解糖液为原料制备 γ-PGA，设计不同的补料策略，以 5 L 发酵罐上的 DO 值为反馈参数，建立发酵工艺优化补料策略，在较短发酵周期内提升菌体生产 γ-PGA 的能力，实现芦苇秸秆向天然高分子多聚氨基酸的转化，为利用芦苇等廉价可再生原料发酵生产聚谷氨酸的工业应用提供科学方法。

1　材料、设备和方法

1.1　材料

菌株为雄安创新研究院保藏的枯草芽孢杆菌 XII-PBS004；芦苇取自河北雄安新区白洋淀；氢氧化钠、葡萄糖、酵母粉、蛋白胨、谷氨酸钠等试剂，均为分析纯；纤维素酶(Cellic CTec3，Novozymes)。

1.2　设备

HZQ-X500C 恒温摇床，上海一恒科学仪器有限公司提供；BLBIO-5GJ 发酵罐，百仑生物科技(江苏)有限公司提供；UV-1800 紫外分光光度计，上海菁华公司提供；SBA-40E 生物传感仪，山东省科学院生物研究所提供。

1.3　方法

1.3.1　芦苇水解液制备

1)预处理

将芦苇除尘去杂后晾干并切割至 5 cm 左右的碎段，按照进料浓度 25%(质量体积比，下同)加至双螺杆挤压浸渍机中，控制螺杆转速为 150 r/min 进行处理，挤压后将试样进行碱处理。处理条件：KOH 用量 4%，保温温度 90 ℃，保温时间 2 h，预处理后将试样水洗至中性进行酶解试验。

2)酶解

将上述预处理芦苇进行酶水解，设计单因素试验，纤维素酶(Cellic CTec 3)的用量分别为 5，10，15，20 和 25 FPU/g(底物)，底物浓度分别为 5%，10%，15%和 20%(以预处理后绝干芦苇计)，反应时间为 48 h，酶解体系用 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液调节 pH 值为 4.8，在 50 ℃条件下，150 r/min 水浴恒温振荡处理。水解结束后煮沸 10 min，于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，测定还原糖含量。

1.3.2　培养基配制

1)种子培养基

葡萄糖 20 g/L，酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NH_4Cl 2.5 g/L，KH_2PO_4 2 g/L，$MgSO_4$ 0.4 g/L，pH 值

为7.0,于115 ℃灭菌20 min。

2)基础发酵培养基

$CaCl_2$ 3 g/L,K_2HPO_4 4.5 g/L,$MgSO_4$ 1.5 g/L,NaCl 5 g/L,玉米浆15 g/L,酵母粉5 g/L,柠檬酸钠20 g/L,NH_4Cl 17 g/L,$MnSO_4$ 0.05 g/L,$FeSO_4$ 0.02 g/L,pH值为7.4,于115 ℃灭菌20 min。

1.3.3 种子培养

将枯草芽孢杆菌XII-PBS004的斜面菌种接种于装有50 mL种子培养基的500 mL三角瓶中,于36.5 ℃,200 r/min培养12 h,得到种子培养液。

1.3.4 分批发酵培养

使用5 L搅拌发酵罐进行分批发酵,按5%的接种量将种子液接入发酵罐中进行培养,搅拌转速为800 r/min,通气为8 L/min,培养温度恒定为36.5 ℃,发酵周期为36 h。在发酵过程中在0 h一次性补加灭菌后的芦苇水解液(其总还原糖的质量浓度为600 g/L)和谷氨酸钠溶液(谷氨酸钠的质量浓度为600 g/L),控制总糖和谷氨酸钠的最终质量浓度均为60 g/L。

1.3.5 分段式分批补料发酵培养

使用5 L搅拌发酵罐进行分段式分批补料发酵,按5%的接种量将种子液接入发酵罐中进行培养,搅拌转速为800 r/min,通气8 L/min,培养温度恒定为36.5 ℃,发酵周期为36 h。在发酵周期0 h时连续流加灭菌后芦苇水解液,用来维持发酵液中的总糖质量浓度分别为60,40,20,10,5 g/L,直至发酵结束。在发酵周期13 h开始恒速流加灭菌后谷氨酸钠溶液,控制流加速度为15 mL/h,搅拌转速为800 r/min,通气为8 L/min,培养温度恒定为36.5 ℃,发酵周期为36 h。

1.3.6 恒定pH值分段式分批补料发酵培养

使用5 L搅拌发酵罐进行恒定pH值分段式分批补料发酵,方法同1.3.4,其中的区别为发酵周期0 h时连续流加灭菌后芦苇水解液,维持发酵液中的总糖质量浓度为10 g/L直至发酵结束,并用20%磷酸和20%氢氧化钠维持发酵体系pH值恒定,分别为6.4,6.6,6.8,7.0,7.2,直至发酵结束。

1.3.7 分段式溶氧反馈-分批补料发酵培养

使用5 L搅拌发酵罐进行分段式溶氧反馈-分批补料发酵培养,通气为8 L/min,培养温度恒定为36.5 ℃,pH值恒定为6.8。发酵初始,一次性加入灭菌后芦苇水解液至发酵液中总糖最终质量浓度为10 g/L。发酵罐采用溶氧反馈关联转速和补料控制模式,搅拌转速下限设定为200 r/min,上限设定为800 r/min。发酵周期0～12 h时,溶氧上限设定为40%,下限设定为20%,当溶氧高于40%时开始流加芦苇水解液,溶氧低于20%时停止流加;发酵周期13～36 h时,溶氧上限设定为25%,下限设定为15%,当溶氧高于25%时开始同步流加芦苇水解液和谷氨酸钠溶液,溶氧低于15%时停止流加。

1.3.8 检测方法

还原糖浓度测定:采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法[15]测定还原糖浓度。

生物量的测定:将发酵液适当稀释后,以基础发酵培养基为空白对照,用可见分光光度计于600 nm波长处测定吸光值,以OD_{600}反映菌体生长状况[16]。

发酵液中谷氨酸含量测定:使用生物传感分析仪SBA-40E进行测量。

γ-PGA产量的测定:采用十六烷基甲基溴化铵(CTAB)比浊法测定γ-PGA产量,配置不同浓度γ-PGA标准溶液,制作标准曲线。取5 mL发酵液,于12 000 r/min离心20 min。取3 mL上清液,加入9 mL无水乙醇使γ-PGA沉淀,并将混合物在4 ℃下保持过夜后于12 000 r/min离心20 min,弃上清液,将沉淀用2 mL去离子水充分溶解后与2 mL CTAB于室温下反应3 min,在400 nm波长下测定吸光值,代入标准曲线,计算γ-PGA浓度[17]。

2 结果与分析

2.1 酶用量及底物浓度对芦苇酶解的影响

纤维素酶的用量和底物浓度对木质纤维素类生物质水解影响很大,需考虑在较低的酶负载量下获得较高的酶解效率。由图1可知,随着酶用量的增加,芦苇纤维水解得到的还原糖增多,但当纤维素酶添加量从10 FPU/g(底物)进一步提升时,增长幅度趋于减缓。这主要是由于酶量过大引起竞争性抑制[18],以及木质

素对酶的无效吸附所导致的。较高的底物浓度虽然可以降低成本,提高水解液总糖浓度,但底物浓度过高时,反应体系中的游离水将被限制于芦苇中,导致传质困难,影响酶扩散到底物的结合位点上,同时引起水解液中糖浓度的升高,对水解产生抑制作用。从图 2 中可以看出,芦苇纤维酶解的最适底物浓度为 10%,在 10 FPU/g(底物)的纤维素酶添加量作用下,水解液中还原糖质量浓度可达(76.64±1.74)g/L。

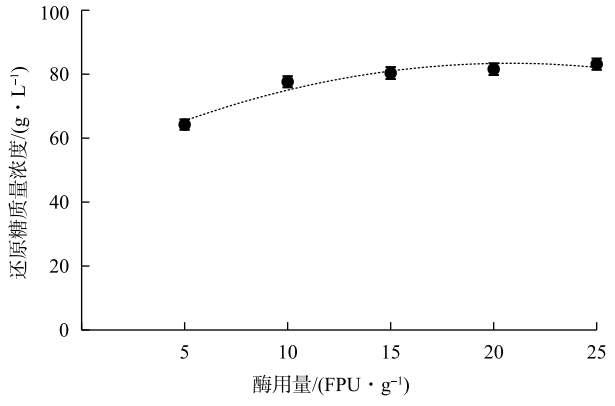

图 1　不同纤维素酶用量对芦苇酶解的影响

Fig. 1　Effects of different cellulase dosages on enzymatic hydrolysis of reed

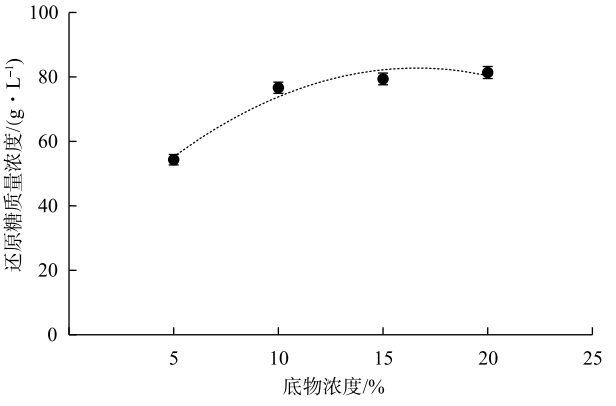

图 2　不同底物浓度对芦苇酶解的影响

Fig. 2　Effects of different substrate concentrations on enzymatic hydrolysis of reed

2.2　分批发酵培养对菌体生长和 γ-PGA 产量的影响

利用芦苇水解液对谷氨酸依赖型菌株枯草芽孢杆菌 XII-PBS004 进行分批发酵培养 36 h,γ-PGA 产量达到(32.62±1.22)g/L,生产效率为(0.89±0.03)g/(L·h)。如图 3 所示,发酵过程中 pH 值波动比较大,不利于菌体生长和 γ-PGA 的合成[19]。发酵液中芦苇水解糖和谷氨酸钠随着时间的延长而减少,在菌体生长的对数期和稳定期消耗较快,发酵终止时仍有较高残留。芦苇水解液中含有机酸和酚类细胞毒性抑制物,当发酵液中糖浓度过高时,影响菌体生长和代谢产物表达。此外,由于谷氨酸钠的初始添加导致发酵液黏度在菌体对数生长期急剧提升,出现氧转移限制和混合效率低的问题,阻碍了菌体生物量的增加。由于分批发酵工艺条件的不适合,致使营养物质和前体物质的利用效率低,菌体生物量和 γ-PGA 的产量不高,因而有必要通过调整发酵控制策略,进一步提高发酵性能。

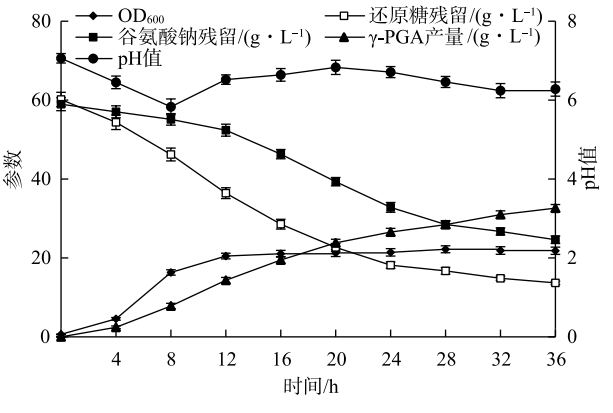

图 3　芦苇水解液分批发酵生产 γ-PGA 过程中参数变化情况

Fig. 3　Changes of parameters in the process of batch fermentation of reed hydrolysate to produce γ-PGA

2.3　分段式分批补料发酵培养对菌体生长和 γ-PGA 产量的影响

基于分批发酵培养中发现的问题,提出分段式分批补料的培养方式,在菌体生长期通过流加芦苇水解液维持较低的糖浓度,并以谷氨酸钠恒速补料的方式在菌体生长稳定期阶段提供 γ-PGA 合成的前体物质,考察发酵过程中维持不同水解液糖浓度对菌体生长和 γ-PGA 产量的影响。由图 4 可知,当发酵液中糖质量浓度维持在 10 g/L 水平时,菌体生物量 OD_{600} 提升了 45.76%,γ-PGA 的发酵水平达到(37.72±0.03)g/L。发酵过程中控制较低的糖浓

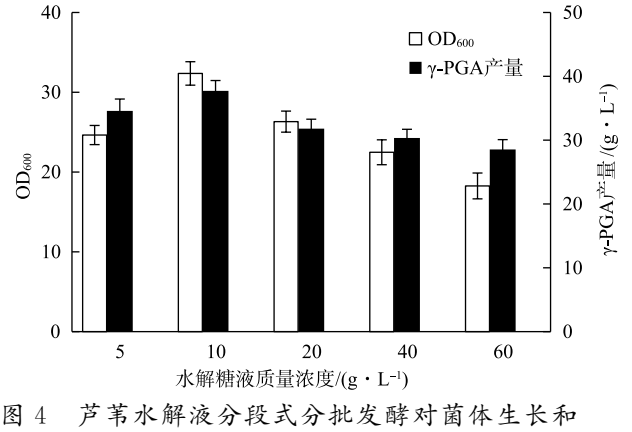

图 4　芦苇水解液分段式分批发酵对菌体生长和 γ-PGA 产量的影响

Fig. 4　Effects of segmented batch fermentation of reed hydrolysate on bacterial growth and γ-PGA yield

度，可使毒性抑制物一开始处于较低的浓度，保证菌株的生长活力，并促进毒性物质在菌株体内被还原成低毒性物质，提高菌株的耐受性。在适当时间补加谷氨酸钠，除了可以避免前期发酵液黏度较高影响溶氧和传质，还可以消除过高谷氨酸浓度对 PGA 合成酶的抑制。糖质量浓度控制在 5 g/L 时结果不佳，可能是由于补料操控难度较大引起发酵液中糖浓度波动过大。

2.4 恒定 pH 值分段式分批补料发酵培养对 γ-PGA 产量的影响

相关研究表明，中性 pH 值条件有利于菌株生长和 γ-PGA 的合成，pH 值显著影响细胞的营养摄取、酶活性和细胞膜形态，从而影响代谢产物的形成[20]。如图 5 所示，维持发酵液 pH 值为 6.8 时，获得的最高菌体生物量和 γ-PGA 产量表明，该 pH 值适合菌体生长并影响其代谢，对 γ-PGA 的合成与释放有正向作用。

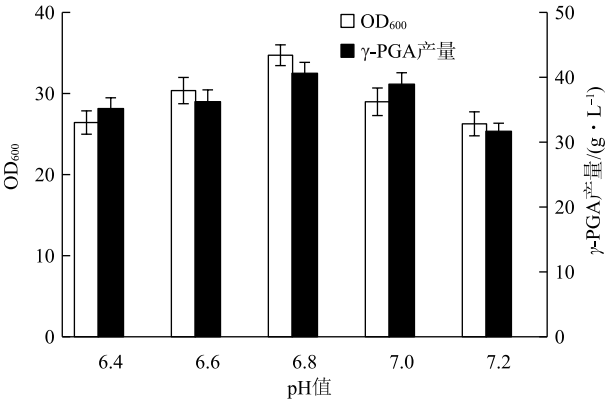

图 5 芦苇水解液恒定 pH 值分段式分批发酵对菌体生长和 γ-PGA 产量的影响

Fig. 5 Effects of segmented batch fermentation of reed hydrolysate at constant pH on bacterial growth and γ-PGA yield

2.5 分段式溶氧反馈-分批补料发酵培养对 γ-PGA 产量的影响

芦苇水解液制备 γ-PGA 属于高黏度好氧发酵，溶氧是该类型发酵过程中一个重要影响因素。本研究提出了分段式 DO-stat 分批补料发酵控制方法，基于 DO 值在线反馈，用以控制搅拌转速以及营养物质和前体物质的流加速度，当底物过度消耗，DO 值趋于增加时开始自动补料，DO 值降低时减缓进料速率，进而维持恒定的 DO 水平，并保持氧消耗和供应之间的平衡。在发酵过程中溶解氧水平直接影响不同酶的合成，导致细胞代谢的变化。采用分段式 DO-stat 分批补料发酵，可以保持较低的底物浓度，减少反馈抑制，加强糖酵解途径和三羧酸循环途径在代谢过程中产生的能量[24]。与分批补料发酵相比，菌体最高生物量和 γ-PGA 产量分别提高 64.32%和 43.22%，水解糖液和谷氨酸钠的利用率得到提升，发酵液中两者的残留大幅降低（见图 6）。本研究与国内外利用木质纤维素水解液发酵生产 γ-PGA 的工艺相比，具有发酵周期短、产量高、生产速率大的优势（见表 1）。

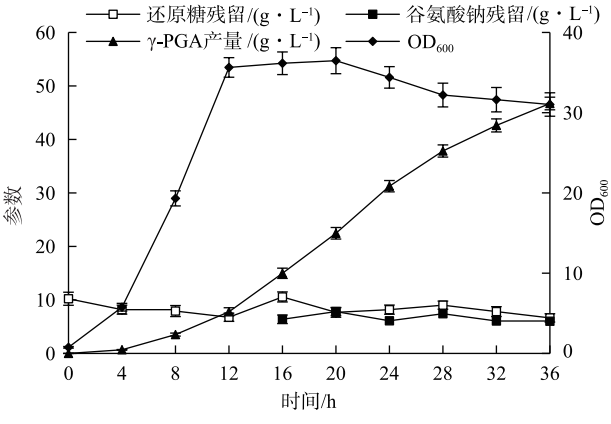

图 6 芦苇水解液分段式溶氧反馈-分批补料发酵生产 γ-PGA 过程中参数变化情况

Fig. 6 Changes of parameters in the process of segmented DO feed-back control of fed-batch fermentation to produce γ-PGA by reed hydrolysate

表 1 利用木质纤维素水解液发酵生产 γ-PGA 的对比

Tab. 1 Comparison of the production of γ-PGA by fermentation of lignocellulosic hydrolysates

碳 源	培养方式	γ-PGA 产量/(g·L⁻¹)	发酵周期/h	γ-PGA 生产速率/(g·L⁻¹·h⁻¹)	参考文献序号
芦苇水解液	分段式 DO-stat 分批补料	46.72	36	1.33	*
玉米秸秆水解液	分批补料	25.60	54	0.48	[14]
竹粉水解液	分批	35.31	48	0.73	[21]
杨木屑水解液	分批	30.87	52	0.59	[22]
小麦秸秆水解液	分批补料	73.00	90	0.81	[23]

注：该数据为本研究利用芦苇水解液发酵生产 γ-PGA 工艺优化后的实验结果。

3 结 论

本文在考察芦苇纤维最佳酶解条件的基础上，对枯草芽孢杆菌利用芦苇水解液发酵生产 γ-PGA 进行了研究，优化其发酵工艺条件。

1）芦苇经双螺杆挤压耦合碱预处理后，在纤维素酶用量为 10 FPU/g（底物）和 10％底物浓度的条件下，水解后还原糖质量浓度可达（76.64±1.74）g/L，可为菌株发酵生产 γ-PGA 提供廉价碳源。

2）分段式分批补料培养方式有利于减少底物浓度和水解液中毒性物质对菌体生长的抑制，在发酵周期 13 h 时开始补料加入谷氨酸钠则有利于降低发酵液前期黏度，提高溶氧及传质，削弱其对 γ-PGA 合成的抑制。将发酵过程中的 pH 值恒定为 6.8，能进一步达到促进菌体繁殖、产物积累的双重目的，与分批发酵模式相比，菌体生物量和 γ-PGA 产量分别提高 56.40％和 24.52％。

3）基于溶氧对聚谷氨酸发酵的重要性，设计并优化了分段式溶氧反馈-分批补料发酵调控策略，其比分批发酵有明显优势，增强了菌株生长水平和 γ-PGA 代谢及释放能力，最高菌体生物量 OD_{600} 由 22.20±0.88 提高至 36.48±1.62，发酵 36 h 后 γ-PGA 的产量可达到（46.72±1.18）g/L，发酵生产效率由（0.89±0.03）g/（L・h）提升至（1.30±0.03）g/（L・h）。

4）以芦苇水解糖液为原料发酵生产 γ-PGA，可为芦苇原料化高效利用、降低 γ-PGA 生产成本提供一种新的途径，具有较高的商业化生产价值。

芦苇水解液可作为廉价碳源用于发酵生产 γ-PGA。本研究中建立的分段式溶氧反馈-分批补料发酵培养调控策略，可以有效提高菌体生物量和 γ-PGA 产量。但对该发酵体系下诸如初始底物浓度等参数的优化还不全面，后续研究将对其进行深入分析，研究芦苇水解液中葡萄糖与木糖对菌体生长和 γ-PGA 合成的影响，从而进一步提高 γ-PGA 产量，降低生产成本。

参考文献/References：

[1] KAUR M，KUMAR M，SACHDEVA S，et al. Aquatic weeds as the next generation feedstock for sustainable bioenergy production[J]. Bioresource Technology，2018，251：390-402.

[2] TANG Zhengyu，YANG Dong，TANG Wei，et al. Combined sulfuric acid and choline chloride/glycerol pretreatment for efficiently enhancing enzymatic saccharification of reed stalk[J]. Bioresource Technology，2023，387. DOI：10.1016/j. Biortech. 2023. 129554.

[3] ZHANG Xinyuan，WANG Yiqin，LU Jie，et al. Biosurfactant promoted enzymatic saccharification of alkali-pretreated reed straw[J]. Bioresource Technology，2023，372. DOI：10.1016/j. biortech. 2023. 128665.

[4] VASMARA C，CIANCHETTA S，MARCHETTI R，et al. Hydrogen production from enzymatic hydrolysates of alkali pretreated giant reed[J]. Energies，2022，15(13)：4876-4889.

[5] 何宇，吕卫光，张娟琴，等. γ-聚谷氨酸的研究进展[J]. 安徽农业科学，2020，48(18)：18-22.
HE Yu，LYU Weiguang，ZHANG Juanqin，et al. Research progress of γ-polyglutamic acid[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences，2020，48(18)：18-22.

[6] GOMAA E Z. Cryoprotection of probiotic bacteria with poly-γ-glutamic acid produced by Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology，2016，14(2)：269-279.

[7] YIN Aiming，JIA Yanping，QIU Tianlei，et al. Poly-γ-glutamic acid improves the drought resistance of maize seedlings by adjusting the soil moisture and microbial community structure[J]. Applied Soil Ecology，2018，129：128-135.

[8] WANG Guoliang，LIU Qing，YANG Y M，et al. Applications and functions of γ-poly-glutamic acid and its derivatives in medicine[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology，2021，22(11)：1404-1411.

[9] 邓星波，邹水洋，朱丹，等. γ-聚谷氨酸的保湿性研究[J]. 广州化工，2019，47(6)：33-35.
DENG Xingbo，ZOU Shuiyang，ZHU Dan，et al. Study on moisture retention capacity of γ-polyglutamic acid[J]. Guangzhou Chemical Industry，2019，47(6)：33-35.

[10] LI Xin，YANG Haiqing，ZHOU Menglin，et al. A novel strategy of feeding nitrate for cost-effective production of poly-γ-glutamic acid from crude glycerol by Bacillus licheniformis WX-02[J]. Biochemical Engineering Journal，2021，176. DOI：10.1016/j. bej. 2021. 108156.

[11] WANG Dexin，KIM H，LEE S，et al. High-level production of poly-γ-glutamic acid from untreated molasses by Bacillus siamensis IR10[J]. Microbial Cell Factories，2020，19(1)：101-112.

[12] ZHU Fan，CAI Jin，ZHENG Qiang，et al. A novel approach for poly-γ-glutamic acid production using xylose and corncob fibres hydrolysate in Bacillus subtillis HB-1[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology，2014，89(4)：616-622.

[13] 李海军，王庆波，张英华，等. 利用廉价原料生产聚谷氨酸的研究[J]. 食品与药品，2022，24(1)：36-39.
LI Haijun，WANG Qingbo，ZHANG Yinghua，et al. Study on production of polyglutamic acid from cheap raw materials[J]. Food and Drug，2022，24(1)：36-39.

[14] 陈鹏程，任东雪，李佳涵，等. 玉米秸秆水解液综合利用生产 γ-聚谷氨酸[J]. 中国油脂，2018，43(11)：94-98.
CHEN Pengcheng，REN Dongxue，LI Jiahan，et al. Integrated utilization of corn stover for poly（γ-glutamic acid）production[J]. China Oils and Fats，2018，43(11)：94-98.

[15] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure Applied Chemistry，1987，59(2)：257-268.

[16] 任玉文,任媛媛,刘雅祯,等.抗植物软腐病枯草芽孢杆菌的高密度发酵优化[J].河北科技大学学报,2020,41(5):433-441.
REN Yuwen,REN Yuanyuan,LIU Yazhen,et al. Optimization of high-density fermentation for Bacillus subtilis resistant to plant soft rot [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology,2020,41(5):433-441.

[17] KONGKLOM N,LUO Hongzhen,SHI Zhongping,et al. Production of poly-γ-glutamic acid by glutamic acid-independent Bacillus licheniformis TISTR 1010 using different feeding strategies[J]. Biochemical Engineering Journal,2015,100:67-75.

[18] ANDRIĆ P,MEYER A S,JENSEN P A,et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis:II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors[J]. Biotechnology Advances,2010,28(3):407-425.

[19] SIRISANSANEEYAKUL S,CAO Mingfeng,KONGKLOM N,et al. Microbial production of poly-γ-glutamic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2017,33(9):173-180.

[20] LI Yazhou,WANG Jianghan,LIU Na,et al. Microbial synthesis of poly-γ-glutamic acid (γ-PGA) with fulvic acid powder, the waste from yeast molasses fermentation[J]. Biotechnology for Biofuels,2020,13:180-187.

[21] 吴建鑫,关常道,孙苗苗,等.竹粉酶解液发酵产γ-聚谷氨酸研究[J].农产品加工,2021(3):7-10.
WU Jianxin,GUAN Changdao,SUN Miaomiao,et al. Fermentation of bamboo powderto produce γ-polyglutamic acid[J]. Farm Products Processing,2021(3):7-10.

[22] ZHANG Chao,REN Huixue,ZHONG Chuanqing. Preparation of γ-polyglutamic acid from enzymatic hydrolysate of poplar sawdust[J]. Arabian Journal of Chemistry,2021,14(4). DOI:10.1016/j.arabjc.2021.103095.

[23] TANG Bao,LEI Peng,XU Zongqi,et al. Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ-glutamic acid) production by Bacillus subtilis NX-2[J]. Bioresource Technology,2015,193:370-376.

[24] LYU Pengjun,QIANG Shan,LIU Liang,et al. Dissolved-oxygen feedback control fermentation for enhancing β-carotene in engineered Yarrowia lipolytica[J]. Scientific Reports,2020,10(1). DOI: 10.1038/s41598-020-74074-0.