

谷氨酸棒杆菌一步法发酵糖质原料生产 γ -聚谷氨酸

程慧^{1,2,3}, 陈园园^{1,2,3}, 朱亚鑫^{1,2,3}, 曹蓉^{1,2,3}, 徐国强^{1,2,3}, 张晓梅⁴, 史劲松⁴, 许正宏^{1,2,3}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与工艺技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

4 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

程慧, 陈园园, 朱亚鑫, 等. 谷氨酸棒杆菌一步法发酵糖质原料生产 γ -聚谷氨酸. 生物工程学报, 2020, 36(2): 295–308.

Cheng H, Chen YY, Zhu YX, et al. γ -Polyglutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* using sugar by one-step fermentation. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 295–308.

摘要: γ -聚谷氨酸在食品、化妆品、生物医药等领域具有广泛的应用, 目前主要的生产菌株是谷氨酸依赖型菌株, 在生产过程中需要添加谷氨酸作为前体, 因而生产 γ -聚谷氨酸的成本较高。文中主要研究从糖质原料一步法发酵合成 γ -聚谷氨酸的生产工艺。首先, 从产 γ -聚谷氨酸的菌株枯草芽孢杆菌中克隆 γ -聚谷氨酸合成酶的基因簇 *pgsBCA*, 在谷氨酸棒杆菌模式菌株 ATCC13032 中进行诱导型和组成型表达, 结果显示, 仅诱导型表达菌株可以积累 γ -聚谷氨酸, 产量为 1.43 g/L。进一步对诱导条件进行优化, 确定诱导时间为 2 h, IPTG 浓度为 0.8 mmol/L, γ -聚谷氨酸产量为 1.98 g/L。在此基础上, 在一株高产谷氨酸的谷氨酸棒杆菌 F343 中外源表达 *pgsBCA*, 对重组菌进行发酵, 结果表明, 在摇瓶发酵中 γ -聚谷氨酸产量达到 10.23 g/L, 在 5 L 发酵罐中产量达到 20.08 g/L; 继而对 γ -聚谷氨酸进行分子量测定, 结果显示, 产自 F343 重组菌的 γ -聚谷氨酸的重均分子量比产自枯草芽孢杆菌的提高 34.77%。文中构建了一步法发酵糖质原料生产 γ -聚谷氨酸的新途径, 同时为开发其潜在应用奠定了基础。

关键词: γ -聚谷氨酸, 谷氨酸棒杆菌, 一步法发酵, 糖质原料, *pgsBCA*

Received: February 22, 2019; **Accepted:** July 2, 2019

Supported by: Program of National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-11), Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (No. 111-2-06), International Joint Research Laboratory for Engineering Synthetic Biosystems for Intelligent Biomanufacturing at Jiangnan University, the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (No. 2015-SWYY-006), Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions (TAPP).

Corresponding author: Guoqiang Xu. Tel: +86-510-85327353; E-mail: xuguoqiang@jiangnan.edu.cn

轻工技术与工程国际一流学科建设项目 (No. LITE2018-11), 高等学校学科创新引智计划 (No. 111-2-06), 江南大学合成生物系统与生物制造国际联合实验室项目, 江苏省六大人才高峰项目 (No. 2015-SWYY-006), 江苏高校品牌专业建设工程项目 (TAPP) 资助。

网络出版时间: 2019-12-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191210.1052.002.html>

γ -Polyglutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* using sugar by one-step fermentation

Hui Cheng^{1,2,3}, Yuanyuan Chen^{1,2,3}, Yaxin Zhu^{1,2,3}, Rong Cao^{1,2,3}, Guoqiang Xu^{1,2,3}, Xiaomei Zhang⁴, Jinsong Shi⁴, and Zhenghong Xu^{1,2,3}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: γ -polyglutamic acid (γ -PGA) is widely used in food processing, cosmetic production, medicinal industry, etc. Currently, the production strains used in fermentation process are commonly glutamic acid-dependent, which results in extra cost. In this study, a *de novo* way of producing γ -PGA from sugars was reported. To this end, the γ -polyglutamate synthase gene cluster *pgsBCA* was cloned from the natural γ -PGA-producing strain *Bacillus subtilis* (ATCC 6051-U), and was constitutively and inducibly expressed in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Only inducible expression of *pgsBCA* can lead to the generation of γ -PGA with a titer of 1.43 g/L from glucose, without any supplementation of glutamic acid. The production was further elevated to 1.98 g/L upon optimization of the induction conditions with the induction time at 2 h post-inoculation and the IPTG concentration of 0.8 mmol/L. Moreover, to achieve a higher titer of γ -PGA, *pgsBCA* was inducibly expressed in *C. glutamicum* F343, which shows a paramount glutamate production capacity. The final γ -PGA production reached 10.23 g/L in shake flasks and 20.08 g/L in a 5-L fermentor using glucose as the substrate. The weight-average molecular weight (M_w) of γ -PGA from recombinant strain F343 showed 34.77% higher than that produced by *B. subtilis*. This study provides a novel way of producing γ -PGA from sugars directly and potentiates new applications of γ -PGA in the future.

Keywords: γ -polyglutamate, *Corynebacterium glutamicum*, one-step fermentation, sugar, *pgsBCA*

γ -聚谷氨酸 (γ -PGA) 是一种由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸单体聚合成的生物聚合物, 分为 γ -L-PGA (仅由 L-谷氨酸单体聚合而成)、 γ -D-PGA (仅由 D-谷氨酸单体聚合而成)、 γ -LD-PGA (由 D-谷氨酸、L-谷氨酸两种单体聚合而成)。 γ -PGA 具有高水溶性、良好的生物降解特性、较强的增稠能力、对高金属离子具有优异的吸收性和结合能力等性质^[1]。近年来, γ -PGA 广泛应用于食品、化妆品、生物医学、环境保护等领域。在食品工业中, γ -PGA 可以用作食品补充剂、增强剂、冷冻保护剂和减油剂^[2-3]; 在医药领域, γ -PGA 因其良好的生物兼容性和无细胞毒性, 可以作为重要的生物医药材料 (如抗凝血材料和药物载体)^[4]; 在环境保护领域, γ -PGA 作为絮凝剂用来除去污水中的重金属离子^[5]。此外, 大分子的 γ -聚谷氨酸可以提高幼苗的胁迫耐受性, 增加种子萌发率^[6],

在农业生产中有重要用途。

已报道的 γ -PGA 合成方法有化学合成法、肽合成法、生物转化法和微生物发酵法。与其他方法相比, 微生物发酵法具有许多优点, 包括廉价的原料、较小的环境污染、较高的天然产物纯度和温和的反应条件^[2, 7]。在微生物发酵法中, 目前主要的生产菌株是枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*, 两者均为谷氨酸依赖型菌株, 在发酵过程中需添加外源谷氨酸作为前体物质。例如, 浙江大学 Huang 等^[8]在 10 L 发酵罐中采用高密度发酵工艺, 利用枯草芽孢杆菌生产 γ -聚谷氨酸, 最高产量 101.1 g/L, 但发酵过程中需添加 30 g/L 的谷氨酸和 40 g/L 酵母浸出物, 流加 750 g/L 的葡萄糖, 生产成本较高。为解决上述问题, 研究人员尝试从自然界中筛选非谷氨酸依赖型菌株, Geng 等从发酵食品

中分离获得不依赖于谷氨酸的解淀粉芽孢杆菌 LL3^[9], Shin 等从非巴氏灭菌的酱油中分离出非谷氨酸依赖型菌株枯草芽孢杆菌 C1^[10], 但均存在 γ -聚谷氨酸产量不高、菌株遗传背景不清晰、不易进行基因操作等缺点。除此之外, Cao 等^[11]利用代谢工程手段, 从解淀粉芽孢杆菌 LL3 中克隆 γ -PGA 合成酶基因 *pgsBCA*, 分别在大肠杆菌 JM109 和谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中成功表达, 但是, 其基因工程菌发酵产 γ -PGA 产量较低。

在芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 中, γ -PGA 合成酶是 γ -聚谷氨酸合成的关键酶。在枯草芽孢杆菌中已鉴定出 γ -PGA 合成途径关键酶编码基因 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA* 和 *pgsE*, 其中 PgsB 和 PgsC 是 ATP 依赖型酶, 催化 γ -PGA 聚合, 在 PgsA 存在下, 其活性得到进一步增强^[13], 而在无 PgsA 存在下, 枯草芽孢杆菌可以过量产生具有富含 L-谷氨酸的单体比率的 γ -PGA^[14]。在炭疽杆菌中编码 γ -PGA 的合成酶基因簇为 *capBCAE*^[7,12]。由 *capE* 编码的 47 个氨基酸的肽位于炭疽杆菌膜上, Candela 等认为 CapE 与 CapA 可能存在互动, 在 γ -聚谷氨酸合成中具介导 γ -PGA 转运的作用^[15-16], 决定合成的 γ -PGA 被保留或释放。来源于枯草芽孢杆菌的 PgsE 也被命名为 YwtC, 它类似于 CapE, 有关 PgsE 蛋白在 γ -PGA 合成中的作用报道较少。Ashiuchi 等在枯草芽孢杆菌分别敲除 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA*, 发现敲除菌株无法合成 γ -PGA, 由此推断编码 γ -PGA 合酶复合物的关键基因为 *pgsBCA*。本研究以产 L-谷氨酸的谷氨酸棒杆菌为底盘微生物, 外源表达来源于 *B. subtilis* ATCC6051-U γ -PGA 合成酶基因簇 *pgsBCA*, 以期实现在不添加外源谷氨酸的条件下, 直接利用葡萄糖一步法合成 γ -聚谷氨酸。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株: *Bacillus subtilis* 从 ATCC 购买, 菌株

号为 ATCC 6051-U, 是 γ -聚谷氨酸合成酶的基因簇 *pgsBCA* 的来源菌株。谷氨酸棒杆菌 F343 由江南大学郑璞教授提供, 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 由本实验室保藏。

质粒: pZM1 由美国伦斯勒理工学院 Mattheos A. G. Koffas 教授惠赠。

1.2 培养基与试剂

LB-Glu 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, 葡萄糖 1 (LB-Glu 平板加入 2% 的琼脂), pH 7.0–7.2。

种子培养基 (g/L): 玉米浆 35, 葡萄糖 25, K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.6, $FeSO_4$ 0.005, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.005, 尿素 2.5 (分消, 过滤除菌), pH 7.2–7.3, 每 250 mL 三角瓶中装液 25 mL。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 120, 玉米浆 10, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4$ 0.6, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.002, 尿素 7.0 (分消, 过滤除菌), 硫胺素 7.5×10^{-5} , pH 7.2–7.3, 500 mL 三角瓶装液量为 50 mL。

三乙胺乙腈: 三乙胺 1.4 mL, 乙腈 8.6 mL, 混匀 (现配现用)。

PITC 乙腈: PITC 25 μ L, 乙腈 2 mL (不超过 7 d)。

1.3 培养条件

1) 活化培养条件: 从保菌管中吸取菌液 2–5 μ L, 在 LB-Glu 培养基中进行划线, 谷氨酸棒杆菌及本文所涉及的所有谷氨酸棒杆菌基因工程菌株 32 $^{\circ}C$ 下培养 32 h, 枯草芽孢杆菌 30 $^{\circ}C$ 下培养 12 h。

2) 种子培养条件: 从活化平板上挑取单菌落, 接入种子培养基, 谷氨酸棒杆菌及其基因工程菌株在往复式摇床中, 120 r/min、32 $^{\circ}C$ 培养 24 h, 枯草芽孢杆菌在回旋式摇床中 30 $^{\circ}C$ 下培养 12 h。

3) 发酵培养条件:

谷氨酸棒杆菌及枯草芽孢杆菌: 从种子培养基中取 1.0 mL 于 50 mL 发酵培养基中, 在往复式

摇床中 120 r/min 37 °C 培养至发酵结束。

本文所涉及的所有谷氨酸棒杆菌基因工程菌：从种子培养基中取 2.5 mL 于发酵培养基中，在往复式摇床中 120 r/min、32 °C 培养，添加诱导剂 IPTG 后 32 °C 下培养 1 h，将温度调为 37 °C。

5 L 发酵罐的培养条件：5 L 发酵罐装液量为 3.5 L，用 25% 氨水和 25% 稀盐酸流加调节初始 pH 为 7.2，发酵罐转速为 300 r/min，到发酵稳定期将转速设置成与溶氧关联，使溶氧维持在 30%，通气量为 1 vvm，接种量为 10%，36 °C 下发酵 12 h，在 39 °C 培养至 48 h。

1.4 构建重组质粒 pZM1-*pgsB*、pZM1-*pgsC*、pZM1-*pgsA*

以 *B. subtilis* ATCC 6051-U 的基因组为模板，分别以 *pgsB*-*Nde* I F/*pgsB*-*Bam*H I -R、*pgsC*-*Nde* I -F/*pgsC*-*Bam*H I -R、*pgsA*-*Nde* I -F/*pgsA*-*Bam*H I -R 为引物 (序列见表 1)，PCR 扩增出带酶切位点的目的基因 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA* 片段。将酶切的目的基因 *pgsB* 片段与双酶切 (*Nde* I、*Bam*H I) 线性化的载体 pZM1 用 T4 DNA 连接酶进行过夜连接，并转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中，在含有 25 mg/L 的卡那霉素 (Kan) LB-Glu 抗性平板上进行筛选，获得的转化子经菌落 PCR 验证及酶

切验证，得到正确的转化子，再用同样的方法将 *pgsC*、*pgsA* 分别连接到载体 pZM1 中。

1.5 RT-PCR

分别培养携带组成型和诱导型质粒的谷氨酸棒杆菌基因工程菌株 (*C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1 (*Peftu*) *pgsBCA*、*C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1 (*Ptac*) *pgsBCA*)，收集两者对数生长期 (8 h、16 h、24 h) 的菌体，液氮研磨并用 Trizol[®] 试剂提取出总 RNA，以 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 逆转录出的 cDNA 为模板，以 *C. glutamicum* ATCC 13032 的 16S rRNA 用作内部参考基因，以相应的基因引物 (表 1) 进行荧光定量 PCR。

1.6 分析方法

1.6.1 生物量的检测

将各个取样点的样品稀释至 OD_{600} 值为 0.2–0.8，量取 200 μ L，用核酸蛋白仪在波长 600 nm 处测取吸光度。

1.6.2 谷氨酸含量的检测

1) 氨基酸的衍生化

将不同取样点的样(或氨基酸标样) 12 000 r/min 离心 10 min 取上清 200 μ L，置于 1.5 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 5 min，加入三乙胺乙腈和

表 1 本研究中所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'–3')
<i>pgsB</i> - <i>Nde</i> I -F	TATACATATGTGGTTACTCATTATAGCCTGTGC
<i>pgsB</i> - <i>Bam</i> H I -R	CGCGGATCCCTAGCTTACGAGCTGCTTAACCTTG
<i>pgsB</i> -R1	CCATGACATCCATGTGGTCTTCTAAAAC
<i>pgsB</i> -F2	GTTTTAGAAGACCACATGGATGTCATGG
<i>pgsC</i> - <i>Nde</i> I -F	TATACATATGTTCGGATCAGATTTATAACATCG
<i>pgsC</i> - <i>Bam</i> H I -R	CGCGGATCCTTAAATTAAGTAGTAAACAAACATGATAGC
<i>pgsA</i> - <i>Nde</i> I -F	TATACATATGAAAAAGAAGACTGAGCTTTTCAT
<i>pgsA</i> - <i>Bam</i> H I -R	CGCGGATCCTTATTTAGATTTTAGTTTGTGCGTATG
16S-R	ATATCAGGAGGAACACCAAT
16S-F	ACTACCAGGGTATCTAATCC
<i>PgsBCA</i> -R	AAGCCAATATCGGTGTTA
<i>PgsBCA</i> -F	TATAAGGAATAGTAGCGGTAA

PITC 乙腈各 100 μ L, 混匀, 反应 1–2 h, 加入正己烷 400 μ L, 剧烈振荡后放置 10 min, 取下层 PITC-氨基酸溶液, 用 0.45 μ m 针式过滤器过滤, 取滤液 100 μ L 加入到 400 μ L 的水中, 稀释混匀, 加入进样瓶^[17]。

2) 高效液相色谱(HPLC)分析

流动相 A(2 L): 15.2 g 乙酸钠, 加入 1 850 mL 超纯水溶解后用冰醋酸调 pH 至 6.5, 0.45 μ m 过滤膜抽滤, 然后加入 140 mL HPLC 级乙腈, 混匀, 超声 30 min。

流动相 B: 80%乙腈水溶液。

柱温 40 $^{\circ}$ C, 波长 250 nm。

色谱柱: Hypersil ODS-C18 4 mm \times 125 mm。

1.6.3 γ -聚谷氨酸含量的检测

样品处理: 将发酵液 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 稀释适当倍数, 用 0.45 μ m 过滤膜过滤, 取 500 μ L 于 2 mL 进样瓶中, 待测^[18]。

色谱柱: TSKgel super Aw 4000、TSKgel super Aw 5000。

流动相: 0.3 mol/L Na_2SO_4 , 用冰醋酸调节流动相 pH 至 4.0 左右^[18]。

柱温: 35 $^{\circ}$ C, 进样量 50 μ L。

检测器: Waters 液相 RID 示差检测器。

1.6.4 葡萄糖含量的检测

通过 HPLC 检测分析, HPLC 仪器为 Waters 1515, 检测器为示差检测器。

1.6.5 NMR 的检测条件

$^1\text{H-NMR}$ 用 VARIAN-300 核磁共振仪测定, 工作频率为 299.95 MHz, 以 D_2O 为溶剂, 50 $^{\circ}$ C 下采样 2 s, 延迟时间 10 s。

2 结果与分析

2.1 以菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 为底盘微生物外源表达 *pgsBCA*

2.1.1 γ -PGA 生产菌株的构建

为研究谷氨酸棒杆菌一步法发酵糖质原料生产 γ -聚谷氨酸, 根据方法 1.4 构建了诱导型表达载体 pZM1(Ptac)*pgsB*、pZM1(Ptac)*pgsC*、pZM1(Ptac)*pgsA*。随后用酶 *Avr* II、*Sal* I 酶切质粒 pZM1(Ptac)*pgsC* 获得元件 *Ptac-lacO-RBS-pgsC-T7* (图 1), 同时以酶 *Nhe* I、*Sal* I 双酶切获得的线性质粒 pZM1(Ptac)*pgsB* 为载体, 由于

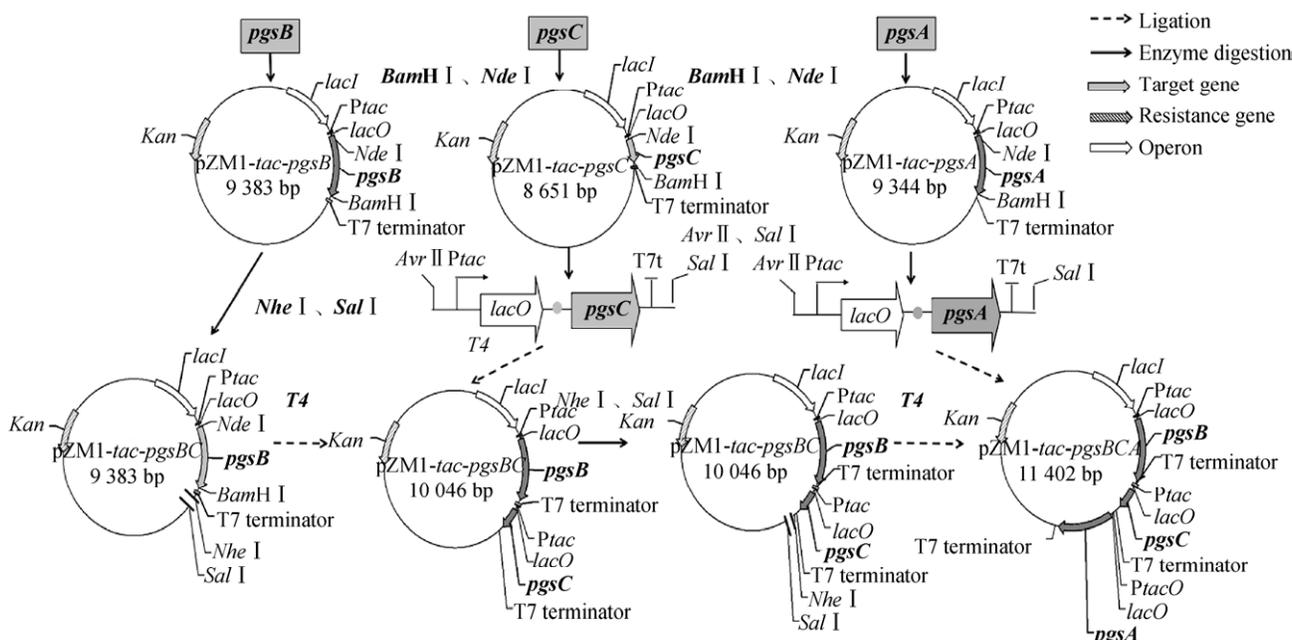


图 1 重组质粒 pZM1 (Ptac) *pgsBCA* 的构建过程

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pZM1 (Ptac) *pgsBCA*.

Nhe I 与 *Avr* II 为一对同尾酶, 故用 T4 DNA 连接酶将上述元件和载体于 4 °C 过夜连接, 得到重组质粒 pZM1(*Ptac*)*pgsBC*。在此质粒基础上用相同方法连接上元件 *Ptac-lacO-RBS-pgsA-T7*, 得到重组质粒 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA*, 将重组质粒转化到大肠杆菌 JM109 后, 提取质粒作为模板, 并用酶 *Avr* II 和 *Sal* I 进行双酶切验证。条带大小与 *pgsBCA* 理论大小 (3 500 bp) 相符, pZM1(*Ptac*) 全长 8 304 bp, 条带验证结果与理论大小相符, 为正确重组质粒 (图 2)。

用酶 *Avr* II 和 *Sal* I 双酶切质粒 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* 获得含有 γ -PGA 合成酶基因 *pgsBCA* 的元件, 同时以酶 *Nhe* I、*Sal* I 双酶切获得组成型线性载体 pZM1(*Peftu*), 将上述所得元件和线性载体用 T4 DNA 连接酶于 4 °C 过夜连接, 构建携带组成型表达载体的重组质粒 pZM1(*Peftu*)*pgsBCA*, 所得两个质粒经金唯智技术有限公司测序, 结果正确。将上述验证正确的组成型和诱导型重组质粒分别电转入 *C. glutamicum* ATCC 13032 中, 在含有 25 μ g/L 的卡那霉素抗性平板中进行筛选, 挑取转化子进行菌落 PCR, 验证正确。

2.1.2 产物核磁共振鉴定

图 3A 是纯化得到发酵产物的 ^1H 核磁共振谱, 从图中可见谱峰的化学位移。其中水的化学位移为 4.810 ppm; 化学位移为 H 2.056–2.203 ppm

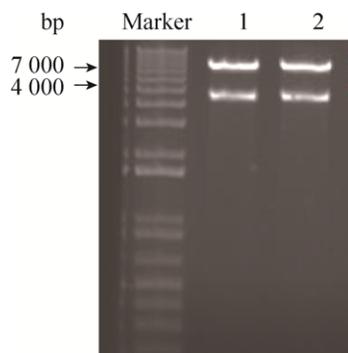


图 2 重组质粒 pZM1(*Ptac/lefu*)*pgsBCA* 的酶切验证
Fig. 2 Identification of recombinant plasmids with enzyme digestion. M: DNA marker; 1: pZM1(*Ptac*)*pgsBCA*; 2: pZM1(*Peftu*)*pgsBCA*.

的是 γ -聚谷氨酸分子式 (图 3B) 中 2 号质子的特征谱峰, 2 号 H 质子由于与 1 号 α 位手性碳原子上的 H 质子相耦合而生成双峰; 图 3B 中 3 号 (γ 位) 氢质子的个数与 2 号 (β 位) 的氢质子个数相同, 因此是一个峰面积为 2 号双峰面积之和的单峰, 其化学位移为 H 2.480 ppm (图 3A); 1 号处氢质子与手性碳原子相连, 受羧基的影响而使其向低磁场移动, 化学位移为 H 3.985 ppm (图 3A)。从图 3A 可以看出, 该化合物的氢谱信号峰并不多, α 位的羧基向高磁场位移, 说明发酵产物中存在 γ -酰胺键, 产物为 γ -聚谷氨酸, 这与陈雄等^[19] 的研究结果保持一致。

通过对产自重组菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* 的发酵产物的 NMR 检测, γ -

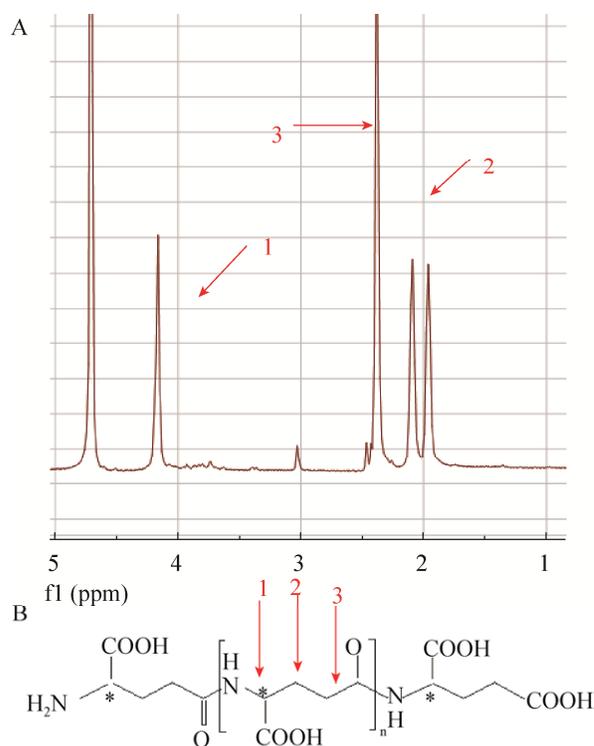


图 3 发酵产物的核磁共振鉴定 (A: 产自 *C. glutamicum* ATCC13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* 的 γ -PGA 的核磁共振氢谱图; B: γ -PGA 的结构式)

Fig. 3 Nuclear magnetic resonance identification of fermentation products. (A) Molecular structure of γ -PGA. (B) NMR of γ -PGA from *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA*.

聚谷氨酸中的 γ -酰胺键上的特殊氢峰 1、2、3 号峰都能被检测到,说明 *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* 发酵的聚合物是通过 γ 位上的羧基形成的肽键,是 γ -聚谷氨酸。说明已成功在谷氨酸棒杆菌中异源表达合成酶基因 *pgsBCA*, 发酵生成 γ -聚谷氨酸。

2.1.3 摇瓶发酵特性评价

将重组菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1 (*Ptac*) *pgsBCA* 按方法 1.3 进行发酵, 结果如图 4 所示, 发酵到 16 h, 菌株由对数生长期进入到稳定期, 生物量在 24 h 达到 OD_{600} 12.33(图 4A)。发酵进行到 48 h, γ -聚谷氨酸产量最高, 达到 1.43 g/L(图 4C), 同时(48 h)谷氨酸含量达到 10.63 g/L(图 4D), 葡萄糖剩余量为 47.0 g/L(图 4B)。发酵液中谷氨酸含量较多, 这可能与 γ -聚谷氨酸的合成机制有关。Ashiuchi 等^[20]认为由 *pgsBCA* 编码的 γ -聚谷氨酸合酶由催化部位定位在细胞膜上, 因此发酵液中谷氨酸含量较多可能是因为在 *C. glutamicum*

ATCC 13032 中的胞内谷氨酸大量外排, 而未被聚合。也有学者认为 L-谷氨酸在聚合之前需在 L-谷氨酸激酶的催化下被活化, 以获得聚合的额外能量, L-谷氨酸激酶较少或酶活不够高也可能是原因之一。

将验证正确的重组子 *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Peftu*)*pgsBCA* 在上述发酵培养基(添加 25 μ g/L 卡那霉素)中发酵, 发酵液无明显粘度, 通过 HPLC 在检测方法 1.6.3 下测 γ -聚谷氨酸含量, 并未检测到目标产物。

2.1.4 IPTG 添加时间及浓度的优化

异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)和乳糖均是乳糖操纵子的有效诱导剂。乳糖有双效作用, 既能作为诱导剂, 又可以作碳源, 在诱导过程中很不稳定; IPTG 由于不被菌体代谢, 诱导效率高, 诱导效果持续稳定而受到广泛应用, 然而 IPTG 对于细胞具有潜在的毒性, 因此适宜的诱导时间对重组菌发酵产 γ -PGA 较为重要。因此, 采用单因素

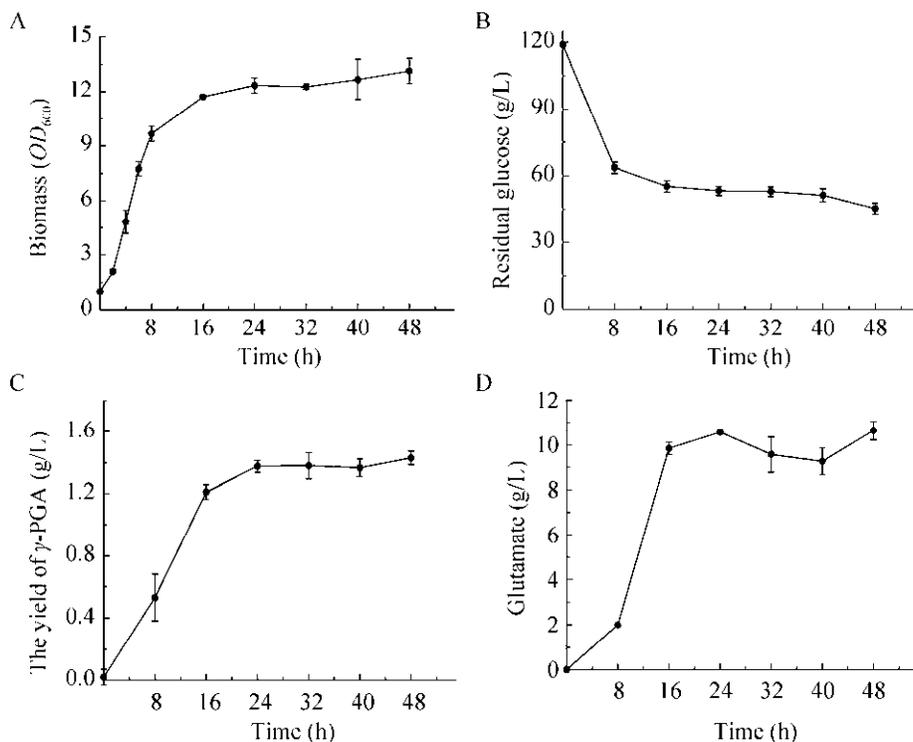


图 4 *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* 摇瓶发酵性能

Fig. 4 Fermentation performance by *C. glutamicum* ATCC 13032 pZM1(*Ptac*)*pgsBCA* in flask. (A) The curve of biomass. (B) The curve of residual glucose. (C) The curve of γ -PGA content. (D) The curve of glutamate content.

实验优化 IPTG 的诱导时间 (0 h、2 h、3 h、4 h、5 h) 和诱导浓度 (0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L), 探究其对 γ -PGA 产量的影响。

由图 5A 可知, 在 0 h 进行诱导时, 谷氨酸棒杆菌基因工程菌不能积累 γ -PGA, 随着诱导时间的延长, γ -PGA 的产量先上升后下降, 在 2 h 诱导时, γ -PGA 的产量最高, 为 1.76 g/L, 较 3 h 添加 IPTG 时的产量 (1.48 g/L) 上升了 18.92%。在此基础上, 通过单因素实验优化 IPTG 的添加浓度, 结果如图 5B 所示。随着 IPTG 浓度的增加, γ -PGA 的产量先上升后下降, 当 IPTG 的浓度为 0.8 mmol/L 时, γ -PGA 的产量最高, 为 1.98 g/L, 较添加浓度为 1.0 mmol/L 时的产量增加了 12.50%。因此通过

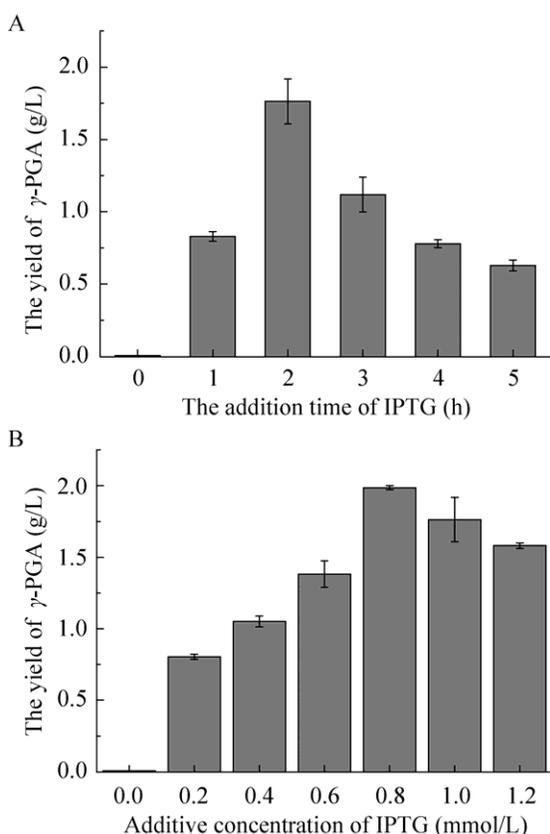


图 5 诱导条件的优化 (A: 诱导时间的优化; B: 诱导浓度的优化)

Fig. 5 Optimization of induction conditions. (A): Optimization of induction time. (B): Optimization of induction concentration.

对诱导条件的优化, 确定其较优的诱导条件为: 在发酵 2 h 时进行诱导, 诱导浓度为 0.8 mmol/L。

2.2 以工业菌株 *C. glutamicum* F343 为底盘微生物外源表达 *pgsBCA*

C. glutamicum ATCC 13032 作为谷氨酸棒杆菌的模式菌株, 具有清晰的遗传背景, 但其谷氨酸产量较低。因此, 我们选用一株高产谷氨酸的工业菌株 *C. glutamicum* F343 作为底盘微生物, 以期提高 γ -聚谷氨酸产量。

将上述验证正确的重组质粒 pZM1(*Ptac*) *pgsBCA* 转化到谷氨酸棒杆菌 F343 感受态中, 以含有 25 μ g/L 卡那霉素的 LB-Glu 抗性平板进行筛选, 挑出转化子进行菌落 PCR, 验证结果正确。

2.2.1 底盘微生物 *C. glutamicum* F343 发酵产 L-谷氨酸的发酵特性研究

谷氨酸作为 γ -聚谷氨酸的前体物质, 提高出发菌株 F343 的谷氨酸产量是高产 γ -聚谷氨酸的重要基础。因此我们首先进行 F343 菌株发酵产谷氨酸的研究, 在发酵过程中, 分别每 4 h、8 h 用 pH 试纸检测发酵液 pH, 并用 1% 的无菌尿素调节 pH 在 7.2–7.3 之间。分别测定了菌体生物量、葡萄糖消耗量和谷氨酸产量, 结果如图 6 所示。

从图 6C 可知, 从 12 h 到 36 h, 谷氨酸含量迅速增加, 相同时间点上, 通过每 4 h 调节一次 pH 的谷氨酸含量比每 8 h 调节一次 pH 的谷氨酸含量显著提高, 在 36 h 时, 通过每 4 h 调节一次 pH 的谷氨酸含量达到 11.05 g/L, 相比 8 h 调节一次 pH, 提高了 60.72%。说明 F343 产谷氨酸的发酵过程中, 实时调控 pH 是谷氨酸高产的关键。从糖耗的曲线图 6B 中可以看出, 在每 4 h 调节一次 pH 与每 8 h 调节一次 pH 的条件下, F343 菌株对碳源的利用无明显差异。不同的 pH 调节对菌株生长的影响如图 6A 所示, 从图中可已看出, 在不同的 pH 调节时菌体生长都呈 S 型曲线, 在 0 h 到 8 h 之间, 两种 pH 调节对生物量无显著影响, 但在 12 h 到 36 h 之间, 每 4 h 调节一次 pH 的生物量提高显著。其中, 在 36 h 时, 每 4 h 调节一次

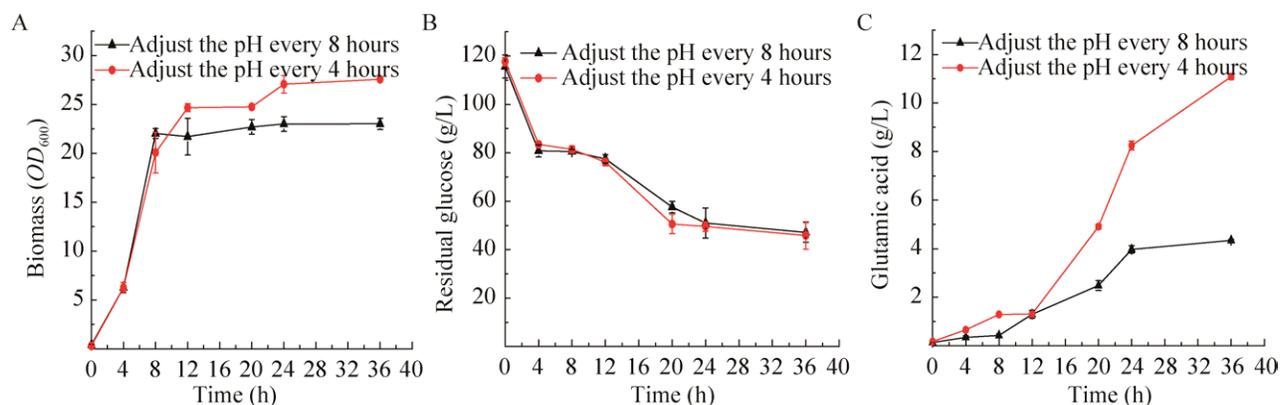


图 6 *C. glutamicum* F343 摇瓶发酵性能

Fig. 6 Fermentation performance by *C. glutamicum* F343 in flask. (A) The curve of biomass. (B) The curve of residual glucose. (C) The curve of glutamate content.

pH 的生物量达到 OD_{600} 为 27.58, 相比每 8 h 调节一次 pH 的生物量 (OD_{600} 为 23.02) 提高 19.80%。说明 F343 菌体的生长对 pH 很敏感, 这与 Zheng 等^[21]的研究结果保持一致。

为进一步提高 *C. glutamicum* F343 的谷氨酸产量, 作者在实验方法 1.3 的 5 L 发酵罐的培养条件下开展了谷氨酸棒杆菌的罐上发酵实验。结果如图 7 所示, *C. glutamicum* F343 菌体在 16 h 达到生长稳定期, 生物量 OD_{600} 达到 50.00, 较摇瓶发酵水平的生物量 OD_{600} (26.00) 提高了 92.30%, 同时葡萄糖在 16 h 时被迅速消耗, 剩余量为 27.60 g/L。谷氨酸在 12 h 之后开始积累, 到 32 h 间积累迅速, 在 32 h 达到 44.61 g/L, 在发酵结束时(48 h), 谷氨酸含量达到 47.61 g/L, 较摇瓶水平(11.08 g/L) 提高了 3.29 倍。以上结果显示, 谷氨酸棒杆菌 F343 是一株对发酵液 pH 敏感的菌株, 通过对发酵 pH 的实时控制显著提升了谷氨酸的产量, 为谷氨酸棒杆菌发酵生产 γ -PGA 提供了充足的前体物质。Zheng 等通过两阶段控制 *C. glutamicum* F343 发酵过程中的 pH, 在最初的 26 h 内, pH 值控制在 7.3 和 7.5 之间, 在最后 4 h 内, pH 值控制在 7.2 和 7.5 之间, 使谷氨酸含量显著提高, 说明 *C. glutamicum* F343 对发酵 pH 较为敏感。本实验结果与其结果一致^[21]。

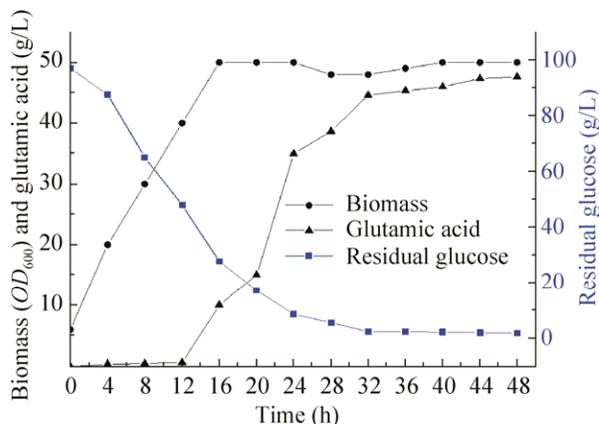


图 7 *C. glutamicum* F343 在 5 L 发酵罐水平的发酵性能
Fig. 7 Fermentation profile of *C. glutamicum* F343 in 5 L Fermentor.

2.2.2 F343 重组菌摇瓶发酵性能评价

在方法 1.3 的培养条件下, 考察了菌株 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 的发酵特性。如图 7A 所示, 发酵进行到 24 h 时, 菌株 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 已经进入稳定期, 菌体生物量 OD_{600} 达到 11.46, 同时, 谷氨酸和 γ -聚谷氨酸的产量也迅速增加, 分别达到 6.90 g/L (图 8D) 和 8.79 g/L (图 8C), 同一时间点上(24 h), 葡萄糖含量由最初的 120.0 g/L 下降到 77.6 g/L。随着发酵时间的延长, 谷氨酸和 γ -聚谷氨酸进一步积累, 发酵进行到 48 h 时, γ -聚谷氨酸的产量达到最高 10.23 g/L (图 8C), 较 *C. glutamicum*

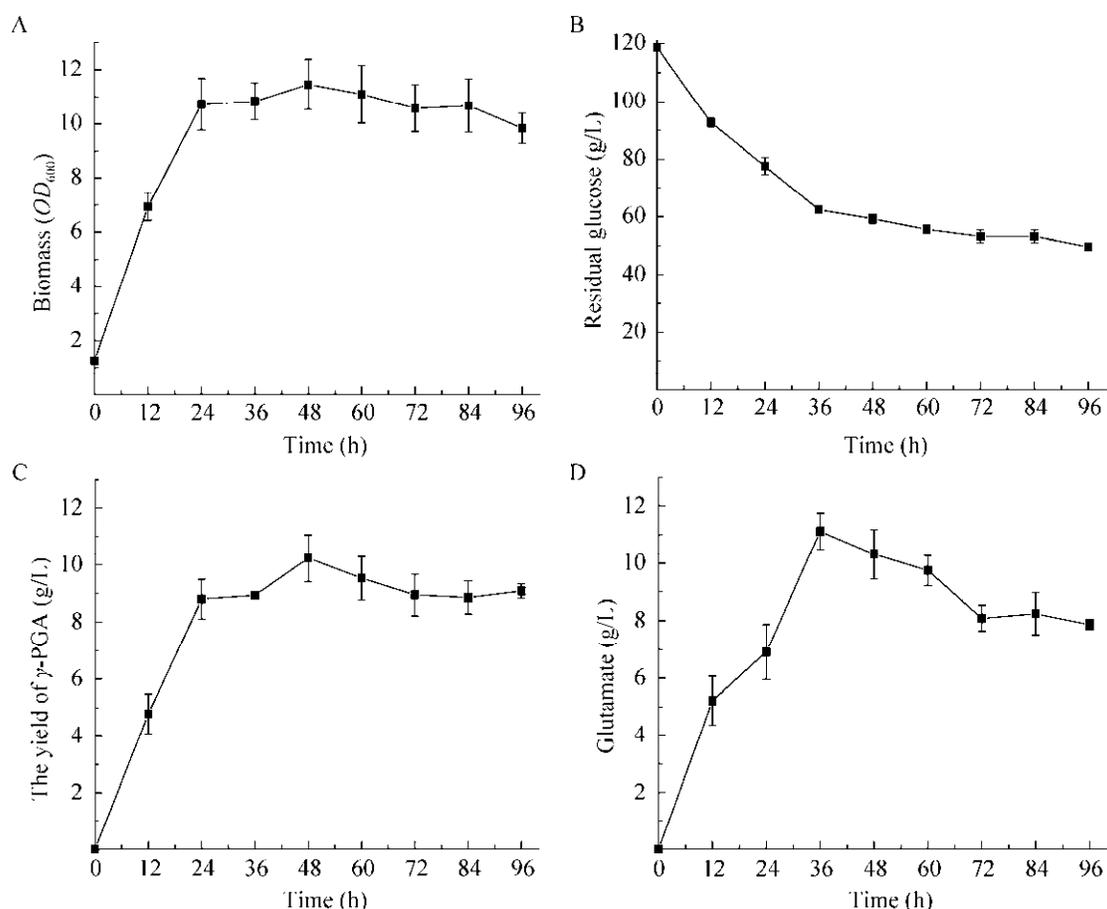


图8 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 摇瓶发酵性能

Fig. 8 Fermentation performance by *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA in flask. (A) The curve of biomass. (B) The curve of residual glucose. (C) The curve of γ -PGA content. (D) The curve of glutamate content.

ATCC 13032 pZM1(Ptac)pgsBCA 的产量 (1.98 g/L) 提高了 4.16 倍, 这可能是因为底盘微生物 *C. glutamicum* F343 较 *C. glutamicum* ATCC13032 的产谷氨酸能力更强, 在摇瓶水平上, *C. glutamicum* F343 的谷氨酸产量约为 *C. glutamicum* ATCC 13032 的 10 倍 (数据未显示), 为 γ -聚谷氨酸的合成提供了较为充足的前体物质。在 36 h 时谷氨酸积累达到最高 11.10 g/L (图 8D), 随着发酵时间的延长, 谷氨酸和 γ -PGA 均有部分下降, 在 96 h 时, 谷氨酸、 γ -PGA 以及葡萄糖含量分别为 7.86 g/L、9.07 g/L 和 49.6 g/L。

γ -聚谷氨酸产量较 48 h 的产量下降 11.34%, 此实验结果分别与 Huang 等^[8]在 *B. subtilis* 和 Regestein 等^[22]在 *B. licheniformis* 中的研究保持一

致, 即在发酵过程中 γ -PGA 的含量受环境和微生物生长等影响而减少, 这也可能是因为谷氨酸棒杆菌里存在一种类似于 CW10 的细胞壁水解酶, 这种酶广泛存在于各种细菌中, 且其调控机理不清晰^[23]。

在方法 1.3 条件下, 考察了 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 发酵罐水平的发酵性能, 结果如图 9 所示, 由图可以看出, 菌株在 24 h 进入稳定期, 生物量在 48 h 达到 OD_{600} 27.00, 与摇瓶水平上的生物量 OD_{600} (11.46) 相比, 提高了 1.35 倍, 与 5 L 发酵罐水平上的 *C. glutamicum* F343 的生物量 (OD_{600} 为 50.00) 相比, 下降了 46%; 谷氨酸产量在 16 h 之前迅速增加, 在 16 h 之后产量相对稳定, 在 40 h 谷氨酸的积累量最大, 为 18.00 g/L,

较摇瓶水平上的谷氨酸积累量 (6.90 g/L) 提高了 1.61 倍; γ -PGA 的产量先上升后下降, 在 24 h 达到最高产量 20.08 g/L, 较摇瓶水平上的产量 (10.23 g/L) 提高了 1.03 倍; 葡萄糖的含量在发酵过程中逐渐降低, 在 48 h 时, 其葡萄糖剩余量为 12.0 g/L, γ -PGA 产物得率为 0.19 g/g。

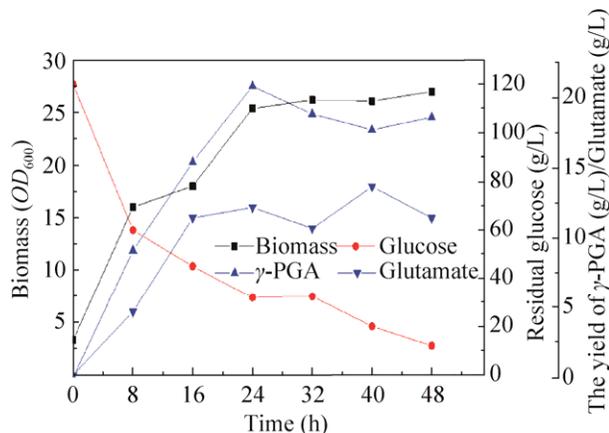


图 9 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 发酵罐水平的发酵性能

Fig. 9 Fermentation profile of *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA in 5 L fermentor.

表 2 产自 *B. subtilis* ATCC6051-U 和 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 的 γ -PGA 分子量比较

Table 2 Molecular weight of γ -PGA from *B. subtilis* ATCC6051-U and *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA

Strains	Molecular weight			
	$M_n(\times 10^5 \text{ Da})$	$M_p(\times 10^6 \text{ Da})$	$M_w(\times 10^6 \text{ Da})$	$M_z(\times 10^6 \text{ Da})$
<i>B. subtilis</i> ATCC6051-U	9.24($\pm 21.60\%$)	1.19($\pm 4.97\%$)	1.20($\pm 11.17\%$)	1.67($\pm 26.57\%$)
F343pZM1(Ptac)-pgsBCA	10.10($\pm 6.31\%$)	1.80($\pm 1.42\%$)	1.61($\pm 2.48\%$)	2.45($\pm 5.79\%$)

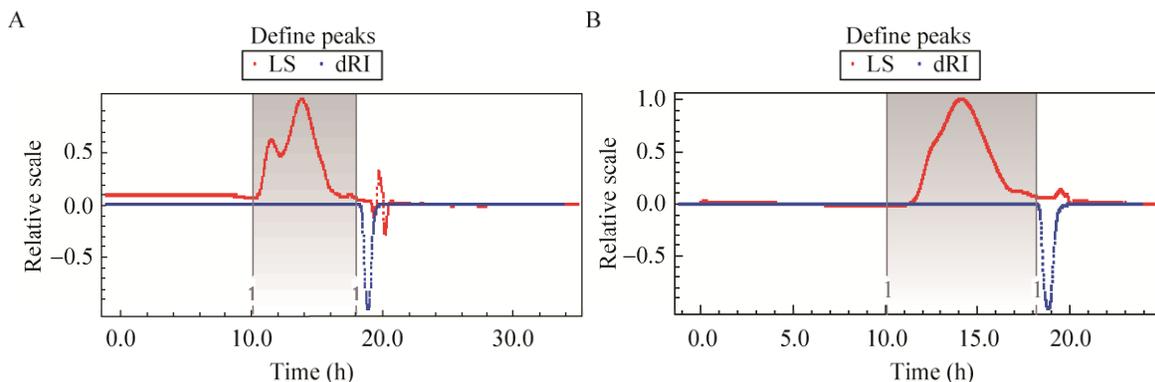


图 10 凝胶渗透色谱检测 (A: 产自 *B. subtilis* ATCC6051-U 的 γ -PGA 的凝胶渗透色谱; B: 产自 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 的 γ -PGA 的凝胶渗透色谱)

Fig. 10 Detection by gel permeation chromatography. (A) GPC of γ -PGA from *B. subtilis* fermentation production. (B) GPC of γ -PGA from *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA fermentation production.

2.3 产物分子量的测定

分别对产自菌株 *B. subtilis* ATCC6051-U 和 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 的 γ -PGA 进行醇沉, 低温烘干, 加水溶解后用 20 kDa 的透析袋进行透析后冷冻干燥, 获得白色纯化样品, 用流动相稀释至适当倍数, 采用凝胶渗透色谱 (GPC) 法分别检测其分子量, 两者的数均分子量 (M_n) 分别为 $9.24 \times 10^5 (\pm 21.60\%) \text{ Da}$ 和 $1.01 \times 10^6 (\pm 6.31\%) \text{ Da}$ 。重均分子量 (M_w) 分别为 $1.20 \times 10^6 (\pm 11.17\%) \text{ Da}$ 和 $1.61 \times 10^6 (\pm 2.48\%) \text{ Da}$ 。产自 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 的 γ -PGA 分子量较 *B. subtilis* 的相比较, 重均分子量提高了 34.77%。峰顶处分子量的大小由 M_p 表征, 结合表 2 中的数据, 产自谷氨酸棒杆菌 F343 重组菌的 γ -PGA 的 M_p ($1.80 \times 10^6 (\pm 1.14\%) \text{ Da}$) 较对照菌株的 M_p ($1.19 \times 10^6 (\pm 4.97\%) \text{ Da}$) 提高了 51.26%。

从图 10A 中, 我们可以看出 *B. subtilis* ATCC 6051-U 所产的 γ -PGA 的 GPC 峰图有 2 个峰, 在 12 min 存在 1 个峰使峰图不成正态分布曲线,

说明其分子量的分布不均一, 而由图 10B 可知, 其峰型接近正态分布图, 无叉开的小峰, 较图 10A 相比, 其 γ -PGA 分子量的分散性较差, 即 F343 pZM1(Ptac)*pgsBCA* 所产的 γ -PGA 均一性较 *B. subtilis* ATCC6051-U 好。

3 讨论

γ -聚谷氨酸在现代农业、生物医药、化妆品行业、环保行业及食品行业有着广泛的应用, 目前主要生产菌株为谷氨酸依赖型菌株, 发酵过程中需添加外源谷氨酸, 具有生产成本较高的问题。目前, 对 γ -聚谷氨酸合成酶的异源重组表达获得的 γ -聚谷氨酸产量仍处于较低水平。

本研究首次利用合成生物学技术构建了两株重组菌株, 分别是诱导型菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 pZM1 (Ptac)*pgsBCA* 和组成型菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 pZM1(Peftu)*pgsBCA*。进一步发酵结果表明, 仅诱导型菌株可以成功产 γ -PGA。为探究其原因, 采用 qRT-PCR 技术, 比较了组成型和诱导型重组菌株中 *pgsBCA* 基因转录水平上的差异, 如图 11 所示, *pgsBCA* 基因在诱导型菌株中的转录强度较组成型相比较弱, 在 8 h、16 h、24 h 分别下降了 57.05%、66.27%、45.28%。导致组成型菌株不生产 γ -PGA 的可能原因是 *pgsBCA* 基因的过早或过强表达不利于 γ -PGA 的合成。在对 IPTG 的诱导时间的优化结果(图 5A)也支持这一假设, 即在 0 h 开始诱导时, 诱导型菌株不生产 γ -PGA, 在 2 h 之后诱导, γ -PGA 的产量下降, 即 γ -PGA 的产量对诱导时间较为敏感, 诱导时间不同 *pgsBCA* 的表达时间也有所差异, 这与枯草芽孢杆菌中的诱导表达机制一致^[10]。在 γ -PGA 生产菌株枯草芽孢杆菌中, *pgs* 操纵子的完全启动需要 SwrAA 和磷酸化形式的 DegU(DegU~P)共存^[24], DegU (DegU~P)或 SwrAA 单独存在仅对 *pgs* 操纵子的转录和 γ -PGA 的生成有微弱影响^[25], 因此, γ -PGA 合成酶是需要菌体特定的生长期启动表达。通过 NMR 定性检测

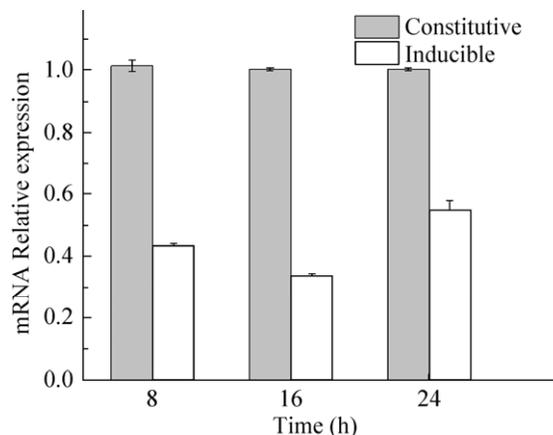


图 11 组成型及诱导型工程菌株 *pgsBCA* 基因转录水平的比较

Fig. 11 Comparison of transcript levels of *pgsBCA* gene in constitutive and inducible engineering strains.

发酵产物结构, 发现发酵产物是具有 γ 酰胺键的 γ -PGA。将诱导型菌株 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)*pgsBCA* 发酵到 48 h, γ -聚谷氨酸达到最高产量 1.43 g/L(图 4C)。2010 年, Cao 等^[26]在 *C. glutamicum* ATCC13032 中外源表达来自 *B. licheniformis* NK-03 的 γ -聚谷氨酸合成酶基因 *pgsBCA*, 产量达到 0.69 g/L, 与之相比, 本研究达到的产量提高了约 2 倍。

为进一步提高 γ -PGA 的产量, 本研究提出通过提高底盘微生物的产谷氨酸能力来提高 γ -PGA 产量的策略, 选用一株高产谷氨酸的谷氨酸棒杆菌 F343 为底盘微生物, 构建重组菌 *C. glutamicum* F343 pZM1 (Ptac)*pgsBCA*。通过对底盘微生物 *C. glutamicum* F343 谷氨酸发酵性能的探究, 发现 *C. glutamicum* F343 菌株是一株对发酵 pH 较敏感的菌株。在本文的发酵条件下 γ -PGA 产量大幅度提高, 最终摇瓶产量达到 10.23 g/L, 耗糖 56.62 g/L (48 h), 5 L 发酵罐的产量达到 20.08 g/L, 耗糖 108.0 g/L。在枯草芽孢杆菌的生产菌株中, 目前 γ -PGA 最高产量为 101.1 g/L^[8], 发酵过程中需添加 30 g/L 的谷氨酸和 40 g/L 酵母浸出物, 流加 750 g/L 的葡萄糖; 在地衣芽孢杆菌中 γ -PGA 最高的产量是 45.73 g/L^[27], 但其消耗糖 80 g/L, 添加外源谷氨酸

和柠檬酸各 20 g/L、18 g/L, 而谷氨酸的成本价约为工业葡萄糖的 4 倍, 因此如果通过发酵优化等策略进一步提高菌株 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 直接利用葡萄糖发酵产 γ -PGA 的产量, 将有望节约 γ -PGA 的发酵成本。除此之外, 地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌主要原料为甘油, 因此本研究在直接利用葡萄糖为原料生产 γ -PGA 上具有很大优势。

最后, 本研究纯化出产自 *C. glutamicum* F343 pZM1(Ptac)pgsBCA 和 *B. subtilis* ATCC6051-U 的 γ -PGA, 测得其重均分子量较 *B. subtilis* ATCC6051-U 产的天然 γ -PGA 的相比提高了 34.77%, 推测可能由于在枯草芽孢杆菌中存在 γ -PGA 降解基因 *ggt*、*cwlO*、*pgdS*^[28-29]。不同的相对分子质量的 γ -聚谷氨酸的用途也各不相同, 例如相对分子质量在 2 kDa 时常应用在现代农业中^[30-31], 在 45-60 kDa 的 γ -PGA 是良好的药物载体^[32], 化妆品级的集中在 80-120 kDa^[33], 200 kDa 左右的主要用作抑菌剂和絮凝剂^[34], 目前已经可以通过各类酶解法、碱水解法等方法控制其相对分子质量^[35]。因此我们发酵所获得的高分子量的 γ -PGA 具有很大的应用潜力, 为其在化妆品、医药等各个行业的应用奠定了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Hsueh YH, Huang KY, Kunene SC, et al. Poly- γ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2644.
- [2] Luo ZT, Guo Y, Liu JD, et al. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 134.
- [3] Sung MH, Park C, Kim CJ, et al. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and applications. *Chem Rec*, 2005, 5(6): 352-366.
- [4] Clarke DE, Pashuck ET, Bertazzo S, et al. Self-Healing, self-assembled β -sheet peptide poly(γ -glutamic acid) hybrid hydrogels. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(21): 7250-7255.
- [5] Yao J, Xu H, Wang J, et al. Removal of Cr(III), Ni(II) and Cu(II) by poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* NX-2. *J Biomater Sci, Polym Ed*, 2007, 18(2): 193-204.
- [6] Lei P, Pang X, Feng XH, et al. The microbe-secreted isopeptide poly- γ -glutamic acid induces stress tolerance in *Brassica napus* L. seedlings by activating crosstalk between H_2O_2 and Ca^{2+} . *Sci Rep*, 2017, 7: 41618.
- [7] Ashiuchi M. Microbial production and chemical transformation of poly- γ -glutamate. *Microb Biotechnol*, 2013, 6(6): 664-674.
- [8] Huang J, Du YM, Xu GH, et al. High yield and cost-effective production of poly(γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*. *Eng Life Sci*, 2011, 11(3): 291-297.
- [9] Geng WT, Cao MF, Song CJ, et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3, which exhibits glutamic acid-independent production of poly- γ -glutamic acid. *J Bacteriol*, 2011, 193(13): 3393-3394.
- [10] Shin IL, Wu JY, Wu PJ, et al. An unusual bioconjugate of glycerol and poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis* C1. *J Microbiol Biotechnol*, 2005, 15(5): 919-923.
- [11] Cao MF, Geng WT, Liu L, et al. Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresour Technol*, 2011, 102(5): 4251-4257.
- [12] Ashiuchi M, Kamei T, Misono H. Poly- γ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 23(26): 101-106.
- [13] Gomez Leonard C, Housewright RD, Thorne CB. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol*, 1958, 76(5): 499-503.
- [14] Sawada K, Araki H, Takimura Y, et al. Poly-L-gamma-glutamic acid production by recombinant *Bacillus subtilis* without *pgsA* gene. *AMB Express*, 2018, 8: 110.
- [15] Ashiuchi M, Soda K, Misono H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 1999, 263(1): 6–12.
- [16] Candela T, Mock M, Fouet A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol*, 2005, 187(22): 7765–7772.
- [17] Zhang XM, Lai LH, Xu GQ, et al. Effects of pyruvate kinase on the growth of *Corynebacterium glutamicum* and L-serine accumulation. *Process Biochem*, 2017, 55: 32–40.
- [18] Wu Q, Xu H, Xu L, et al. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2: regulation of stereochemical composition of poly(γ -glutamic acid). *Process Biochem*, 2006, 41(7): 1650–1655.
- [19] Chen X. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* and its application[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.
陈雄. 枯草芽胞杆菌高产聚- γ -谷氨酸及其应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [20] Ashiuchi M, Kamei T, Song JJ, et al. Physiological and biochemical characteristics of poly γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, 2001, 268(20): 5321–5328
- [21] Zheng P, Liu M, Liu XD, et al. Genome shuffling improves thermotolerance and glutamic acid production of *Corynebacteria glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(3): 1035–1043.
- [22] Regestein Née Meissner L, Arndt J, Palmen TG, et al. Investigation of poly(γ -glutamic acid) production via online determination of viscosity and oxygen transfer rate in shake flasks. *J Biol Eng*, 2017, 11: 23.
- [23] Mitsui N, Murasawa H, Sekiguchi J. Disruption of the cell wall lytic enzyme CwlO affects the amount and molecular size of poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (*natto*). *J Gen Appl Microbiol*, 2011, 57(1): 35–43.
- [24] Stanley NR, Lazazzera BA. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol Microbiol*, 2005, 57(4): 1143–1158.
- [25] Osera C, Amati G, Calvio C, et al. SwrAA activates poly- γ -glutamate synthesis in addition to swarming in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2009, 155(7): 2282–2287.
- [26] Cao MF, Song CJ, Jin YH, et al. Synthesis of poly(γ -glutamic acid) and heterologous expression of *pgsBCA* genes. *J Mol Catal B: Enzym*, 2010, 67(12): 111–116.
- [27] Mitsunaga H, Meissner L, Palmen T, et al. Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly(γ -glutamic acid) biosynthesis of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(4): 413–419.
- [28] Feng J, Gao WX, Gu YY, et al. Functions of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) degradation genes in γ -PGA synthesis and cell morphology maintenance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(14): 6397–6407.
- [29] Scoffone V, Dondi D, Biino G, et al. Knockout of *pgdS* and *ggt* genes improves γ -PGA yield in *B. subtilis*. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(7): 2006–2012.
- [30] Lei P, Xu ZQ, Ding Y, et al. Effect of poly(γ -glutamic acid) on the physiological responses and calcium signaling of rape seedlings (*Brassica napus* L.) under cold stress. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(48): 10399–10406.
- [31] Xu ZQ, Lei P, Feng XH, et al. Analysis of the metabolic pathways affected by poly(γ -glutamic Acid) in *Arabidopsis thaliana* based on geneChip microarray. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(32): 6257–6266.
- [32] Ye HF, Jin L, Hu RZ, et al. Poly(γ ,L-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice. *Biomaterials*, 2006, 27(35): 5958–5965.
- [33] Liu X, Liu F, Liu SY, et al. Poly- γ -glutamate from *Bacillus subtilis* inhibits tyrosinase activity and melanogenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(22): 9801–9809.
- [34] Bhat AR, Irorere VU, Bartlett T, et al. Improving survival of probiotic bacteria using bacterial poly- γ -glutamic acid. *Int J Food Microbiol*, 2015, 196: 24–31.
- [35] ShaYY, Zhang YT, Qiu YB, et al. Efficient biosynthesis of low-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by stable overexpression of PgdS hydrolase in *Bacillus amyloliquefaciens* NB. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(1): 282–290.

(本文责编 陈宏宇)