

Bacillus methylotrophicus γ -聚谷氨酸合成酶基因的克隆表达

彭英云^{1,2}, 张涛², 江波^{*2}, 沐万孟², 缪铭²

(1. 盐城工学院 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224003; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了一株非谷氨酸依赖型 γ -聚谷氨酸 (poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) 产生菌 *Bacillus methylotrophicus* SK19.001 合成酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达。以 pET-28a(+) 载体构建含有 *pgsBCA* 合成酶基因的表达式载体, 转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 构建重组菌。结果表明, 在分别以葡萄糖和谷氨酸为底物的培养基中, 重组工程菌都具有合成 γ -PGA 的能力, 说明 *pgsBCA* 合成酶基因对于 *B. methylotrophicus* SK19.001 产 γ -PGA 是必需的。*pgsBCA* 合成酶基因序列比对的结果表明, *pgsB* 和 *pgsC* 基因编码的氨基酸序列相对保守。

关键词: *Bacillus methylotrophicus*; 非谷氨酸依赖型; γ -聚谷氨酸合成酶; 克隆表达

中图分类号: Q 812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)12—1253—07

Cloning and Expression of Poly- γ -Glutamic Acid Synthase Gene of *Bacillus methylotrophicus*

PENG Yingyun^{1,2}, ZHANG Tao², JIANG Bo^{*2}, MU Wanmeng², MIAO Ming²

(1. School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China;
2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) synthase gene *pgsBCA* of a glutamic acid-independent γ -PGA producing strain *Bacillus methylotrophicus* SK19.001 was cloned and expressed in the *Escherichia coli*. The pET-28a-*pgs* vector harboring *pgsBCA* genes were constructed and transformed into *E. coli* BL21. *E. coli* BL21 could synthesize γ -PGA when cultivated in the flask culture of LB plus glucose and L-glutamate, respectively. The *pgsBCA* genes were proved be essential for the synthesis of γ -PGA in *B. methylotrophicus* SK19.001. The blast result of deduced amino acid sequence from the *pgsBCA* genes in SK19.001 comparing other reported strains showed that the *pgsB* and *pgsC* gene were relatively conservative gene for *pgsBCA*.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, glutamic acid-independent, poly- γ -glutamic acid synthase gene, cloning and expression

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102)。

作者简介: 彭英云(1976—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 讲师, 主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail: xyng8@126.com

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶学方面的研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

γ -聚谷氨酸 (Poly- γ -Glutamate, γ -PGA) 是一种多功能生物可降解高分子材料, 相对分子质量一般在 10 000~1 000 000 左右^[1], 通常由 D-谷氨酸和 L-谷氨酸通过酰胺键聚合而成。 γ -PGA 由于能被彻底生物降解, 对环境无毒无害, 又具有如良好的水溶性, 超强的吸附性, 可食用等独特性质, 其在环保、农业、食品、医药、化工等领域具有广泛的应用前景, 如作为土壤保水剂、食品增稠剂、污水絮凝剂、重金属吸附剂、药物或肥料缓释剂及药物载体等。 γ -PGA 目前多由微生物合成, 根据培养基中是否需要谷氨酸, 可以把 γ -PGA 产生菌分为谷氨酸依赖型菌株和非谷氨酸依赖型菌株, 前者主要通过外源谷氨酸合成 γ -PGA, 后者则通过胞内合成途径将非谷氨酸底物如柠檬酸、葡萄糖等转化合成 γ -PGA^[2]。

目前, 研究者已经从自然界筛选了许多株 γ -PGA 产生菌, 其中大多为谷氨酸依赖型菌株如 *B. subtilis* IF03335^[3], *B. licheniformis* ATCC9945^[4], *B. subtilis* F-2-01^[5]等。对这些菌株的研究包括发酵过程的优化设计和分子生物学的研究包括对产酶基因的克隆和表达、合成酶蛋白质的结构分析及蛋白质组学分析等, 其中对 *pgsBCA* 合成酶基因的研究多为谷氨酸依赖型菌株的相关基因, 而非谷氨酸依赖型的菌株的合成酶基因信息较为鲜见。

Bacillus methylotrophicus SK19.001 是一株自然筛选得到的非谷氨酸依赖型 γ -PGA 产生菌, 其特点是产量高, 产物相对分子质量大, 可通过多种非谷氨酸碳源如甘油、葡萄糖、可溶性淀粉等发酵得到 γ -PGA^[6]。作者主要对 *B. methylotrophicus* SK19.001 产 γ -PGA 的合成酶基因进行研究。克隆 SK19.001 的产酶基因 *pgsBCA* 基因, 对基因核苷酸序列和氨基酸进行比对和分析; 以 pET-28a(+) 为载体构建含有 *pgsBCA* 合成酶基因的表达载体, 转化至大肠杆菌 *E. coli* 构建重组菌, 并测定工程菌合成 γ -PGA 的能力, 这将为进一步研究微生物细胞合成生物大分子的机制提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

菌株: *B. methylotrophicus* SK19.001, 前期研究筛选得到^[6]; 克隆宿主 pET-28a(+) 质粒: 购自生工生物工程(上海)有限公司; 表达载体 *E. coli* BL21:

购自 Novagen 公司。

1.2 工具酶和相对分子质量 Marker

Pfu DNA 聚合酶, NcoI, XhoI 限制性内切酶, EZ-10 离心柱式基因组 DNA 抽提试剂盒, SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒: 购自生工生物工程(上海)有限公司。T4 DNA 连接酶、DNA Maker: 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 培养基

1.3.1 种子培养基(g/L) 葡萄糖 20, 酵母膏粉 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 1; pH 7.0~7.2, 37 °C, 200 r/min 离心 12 h。

1.3.2 LB 培养基(g/L) 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10; pH 7.0~7.5, 固体加琼脂粉 20, 0.1 MPa、121 °C 灭菌 20 min。

1.3.3 *E. coli* BL21 谷氨酸发酵培养基 (g/L) 添加 L-谷氨酸 20, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5) 的 LB 培养基, pH 7.5, 0.1 MPa, 121 °C 灭菌 20 min, 使用前加入 0.1% 卡那霉素。

1.3.4 *E. coli* BL21 葡萄糖发酵培养基 (g/L) 添加葡萄糖 20, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5) 的 LB 培养基, pH 7.5, 0.1 MPa, 115 °C 灭菌 30 min, 使用前加入 0.1% 卡那霉素。

1.4 仪器和设备

PCR 仪: 美国 Thermo 公司; 核酸蛋白电泳电源系统、垂直板蛋白电泳系统、凝胶成像系统、核酸电泳槽: 美国 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司。

1.5 引物设计

参考 *B. amyloliquefaciens* LL3 γ -PGA 合成酶基因序列 *pgsBCA* (GenBank accession No. HM034756.1, HM034757.1, HM034759.1)^[7], 设计 *B. methylotrophicus* SK19.001 合成酶基因 *pgsBCA* PCR 扩增引物。上游引物 P1: ATGTGTTACTCATTATAGCCT, 下游引物 P2: TACACCAATGAGTAATATCGGA, 将 PCR 扩增产物纯化并测序; 根据测序结果设计 pET-28a-*pgs* 载体构建上游引物 P3: CATGCCATGGGAATGTGGTTA CTCATTATAG (含 NcoI 酶切位点), 下游引物 P4: CCGCTCGAGTCAC TCCGCT TTCTTT (含 XhoI 酶切位点), 由上海生物

工程公司合成。

1.6 *B. methylotrophicus* SK19.001 *pgsBCA* 基因的克隆

1.6.1 基因组 DNA 的提取 按照《分子克隆实验指南》进行 *B. methylotrophicus* SK19.001 基因组 DNA 的提取^[8],保存于-20℃。

1.6.2 *pgsBCA* 基因的 PCR 扩增 以 *B. methylotrophicus* SK19.001 基因组 DNA 为模板,用引物 P1、P2 扩增目的基因。PCR 反应体系:DNA 模板 1 μ L, 引物 P1 和 P2 各 4 μ L, 10 $\times$ Buffer 10 μ L, dNTP 8 μ L, Pfu 2 μ L, ddH₂O 71 μ L。反应条件:95℃预变性 3 min, 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 3.5 min, 30 个循环, 72℃延伸 2 min。扩增产物以 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6.3 PCR 产物纯化回收 PCR 产物纯化回收按照 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收方法进行回收,并送至商业公司测序。

1.7 pET-28a-*pgs* 重组质粒的构建

利用 *E. coli*-BL21 载体 pET-28a(+)与 γ -PGA 合成酶基因 *pgsBCA* 双酶切后相连接,构建表达质粒 pET-28a-*pgs*,采用引物为 P3/P4,上下游引物的酶切位点为 NcoI 和 XhoI。PCR 回收产物双酶切体系:NcoI 1 μ L, XhoI 1 μ L, Buf Tango 5 μ L, PCR 产物 30 μ L, ddH₂O 13 μ L; 载体双酶切体系:NcoI 1 μ L, XhoI 1 μ L, Buf Tango 5 μ L, pET-28a (+) 37 μ L, ddH₂O 6 μ L。将酶切回收后的目的基因片段与质粒连接,构建重组质粒 pET-28a-*pgs*^[9]。连接反应体系:T4 连接酶 1 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, 目的基因片段 10 μ L, pET-28a(+) 1 μ L, ddH₂O 6 μ L, 连接反应于 16℃反应 12 h。

1.8 pET-28a-*pgs* 重组质粒的转化和验证

采用 CaCl₂ 法转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中,采用菌落 PCR 和酶切进行阳性克隆的鉴定。将 PCR 验证和酶谱鉴定正确的工程菌株用 DNA 抽提试剂盒提取质粒后送上海生工生物工程有限公司测序。

1.9 工程菌株发酵和产物鉴定

1.9.1 重组质粒的诱导表达 从工程菌 LB 固体平板上挑取一单菌落,接种于含 5 μ L 抗生素的 5 mL LB 液体培养基中,于 37℃摇床培养 12 h;取 4 mL 菌液接种到含 100 μ L 抗生素的 100 mL 发酵培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养;当 OD_{600 nm} 达到

1.5~1.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导 *pgsBCA* 基因表达,继续培养 36 h。

1.9.2 γ -PGA 产物的提纯和相对分子质量的测定 按照 PENG Y 等人的方法进行^[9]。

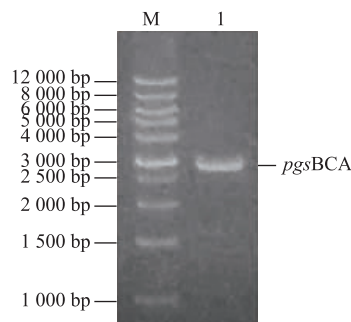
1.9.3 γ -PGA 产物中 L-/D-谷氨酸比例测定 按照 PENG Yingyun 等人的方法进行测定^[10]。

1.9.4 γ -PGA 产物的鉴定 通过核磁共振 H 谱和 C 谱分析鉴定。

2 结果与讨论

2.1 *B. methylotrophicus* SK19.001 *pgsBCA* 基因的克隆

以提取的 *B. methylotrophicus* SK19.001 基因组 DNA 为模板,采用引物 P1/P2,PCR 扩增出的 *pgsBCA* 片段大小约为 2.8 kb,见图 1,与预期基本一致。纯化回收后的 PCR 产物,送至上海生工生物工程有限公司测序,*pgsBCA* 基因片段大小共为 2 812 bp,在 GenBank 上通过比对确定包含 3 个开放阅读框,分别为:*pgsB*(1 182 bp)、*pgsC*(450 bp)和 *pgsA*(1 149 bp),分别编码 393 个、149 个、382 个氨基酸。在 GenBank 上提交获得序列号分别为:*pgsB*: KP698949;*pgsC*: KP698950;*pgsA*: KP698951。



M: DNA Marker; 1: PCR 产物(*pgsBCA*)

图 1 *pgsBCA* 基因 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification of *pgsBCA*

2.2 pET-28a-*pgs* 载体的构建与转化

采用 pET-28a (+) 为构建重组质粒的载体, pET-28a(+) 的基因片段大小约为 5 369 bp,将目的基因用带有酶切位点的引物 P3、P4 进行 PCR 扩增,扩增产物和质粒载体 pET-28a (+) 分别用 NcoI 和 XhoI 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳切胶回收后连接,得到重组表达载体 pET-28a-*pgs*,见图 2。将构建的 pET-28a-*pgs* 质粒转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞,提取转化工程菌质粒进行 PCR 验证和酶切验证并

测序。图 3(a)为采用引物 P3 和 P4,PCR 扩增出的 *pgsBCA* 片段大小约为 2.8 kb,与预期基本一致。分别用 *Nco*I、*Xho*I 对从工程菌中提取的质粒进行单酶切,琼脂糖电泳只出现大约 8.0 kb 的一条带,见图 3 (b); 用 *Nco*I 和 *Xho*I 对工程菌质粒进行双酶切,琼脂糖电泳出现约 2.8 kb 和 5.2 kb 两条带,见图 3 (c)。将工程菌提取质粒送至上海生工生物工程有 限公司测序,测序结果与前面所测序列一致,说明 pET-28a-*pgs* 重组质粒构建成功。

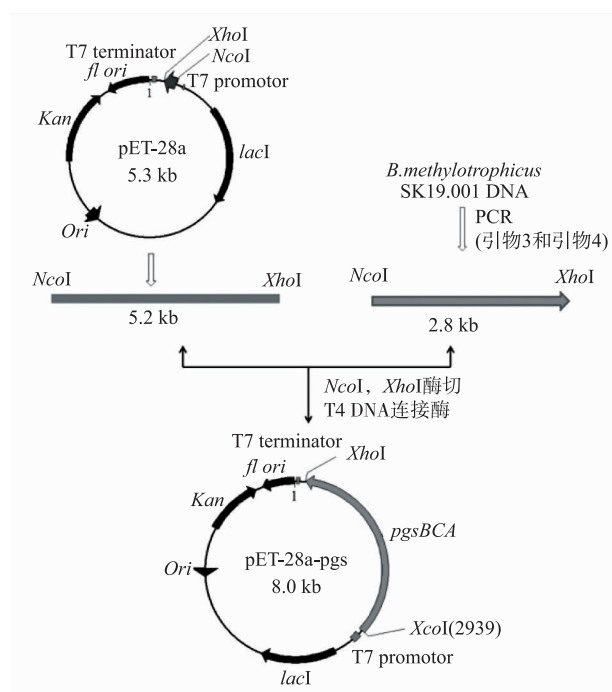


图 2 pET-28a-*pgs* 载体的构建

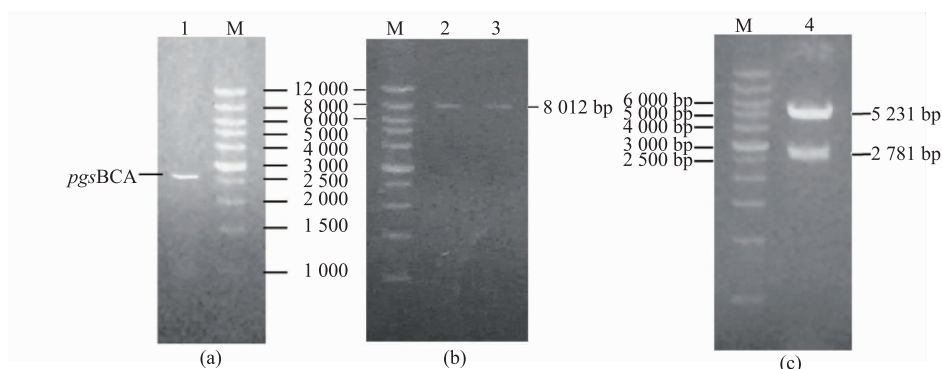
Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pET-28a-*pgs*

2.3 含 *pgsBCA* 基因的 *E. coli* 重组菌的发酵

在成功构建含 γ -PGA 合成酶基因的 pET-28a-

pgs 重组质粒的基础上,对 *E. coli* BL21 基因工程菌进行了发酵研究,证明大肠杆菌工程菌确实具有 γ -PGA 的合成能力,并尝试分析不同培养基(分别含谷氨酸和葡萄糖)对谷氨酸非依赖型来源的 *pgsBCA* 基因的表达,即催化合成 γ -PGA 产量及相对分子质量大小等的影响。

2.3.1 含 *pgsBCA* 基因的工程菌发酵 分别采用添加 L-谷氨酸或葡萄糖底物的 LB 培养基对 *E. coli* 工程菌进行发酵。诱导表达 36 h 后停止发酵,对发酵液进行处理,无水乙醇沉淀后透析脱盐,冷冻干燥获得 γ -PGA。构建的 *E. coli* 基因工程菌在不同培养基中发酵合成 γ -PGA 的情况见表 1。结果显示:葡萄糖和 L-谷氨酸都能作为底物(或碳源)合成 γ -PGA,但产量远低于野生菌(33.84 g/L)^[6],但与报道的 *E. coli* 基因工程菌合成 γ -PGA 的产量相近。曹名锋等^[11]用 *B. amyloliquefaciens* LL3 中的 *pgsBCA* 酶基因构建的 *E. coli* 工程菌,以谷氨酸为碳源的 γ -PGA 的产量为 0.558 g/L,以葡萄糖为碳源的 γ -PGA 的产量为 0.376 g/L;江昊^[12]以 *B. subtilis* strain (chungkookjang) 的 *pgsBCA* 酶基因构建的 *E. coli* 工程菌,以谷氨酸为碳源的摇瓶发酵产量为 0.051 g/L。葡萄糖作为底物工程菌发酵 γ -PGA 的产量明显少于 L-谷氨酸作为底物时 γ -PGA 的产量;发酵 36 h 后,两种培养基的发酵液 pH 有明显差异,这可能跟 *E. coli* 对碳源的利用有关。D-谷氨酸含量与野生菌(65%~70%)相比低了很多^[10],可能因为 *E. coli* 工程菌中缺乏 GLR 消旋酶活性。本课题组前期的研究结果推测,*pgsBCA* 合成酶基因可能对底物具有立体选择性^[10],这可能也导致了 *E. coli* 工程菌中 γ -PGA 产量较低,在将来的研究中可考虑将谷氨酸消旋酶



M: DNA Marker; 1: PCR 产物(*pgsBCA*); 2: *Nco*I 单酶切; 3: *Xho*I 单酶切; 4: 双酶切条带

图 3 PCR 和酶切验证电泳图

Fig. 3 Electrophoresis analysis of PCR of recombinant plasmid pET-28a-*pgs*

基因 *glr* 与 *pgsBCA* 合成酶基因一起导入工程菌,研究对 γ -PGA 产生的影响。相对分子质量测定结果表明, *E. coli* 工程菌所产 γ -PGA 的相对分子质量大约在 160 000~185 000, 同样远低于野生菌所产 γ -PGA 相对分子质量 ($>10^7$)^[6], 这可能是因为野生菌中 PgsBCA 复合酶系主要定位于细胞膜^[1], 而导入 *E. coli* 工程菌的酶组分可能位于膜内, 对产物的跨膜运输效果可能不及野生菌。曹名锋等^[11]研究的 *B. amyloliquefaciens* LL3 *pgsBCA* 基因在大肠杆菌中表达, 合成的 γ -PGA 相对分子质量大约为 40 000。

表 1 *E. coli* 工程菌不同培养基中发酵生产 γ -PGA

Table 1 γ -PGA product by *E. coli* BL21/pET-28a-*pgs* in different media

底物	γ -PGA 产量/(g/L)	发酵液 pH 值	D-谷氨酸比例/%	相对分子质量
L-谷氨酸	0.65	8.16	3.98	166 000
葡萄糖	0.45	4.25	6.81	185 300

2.3.2 发酵产物的鉴定 对 *E. coli* 工程菌产物纯化后进行 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 检测。图 4(a) 为纯化产物的 ^1H -NMR 谱图, 图 4(b) 为纯化产物的 ^{13}C -NMR 谱图。出峰时间和数量可以表明纯化产物为 γ -PGA, 说明重组质粒 pET-28a-*pgs* 在 *E. coli* 中表达成功。

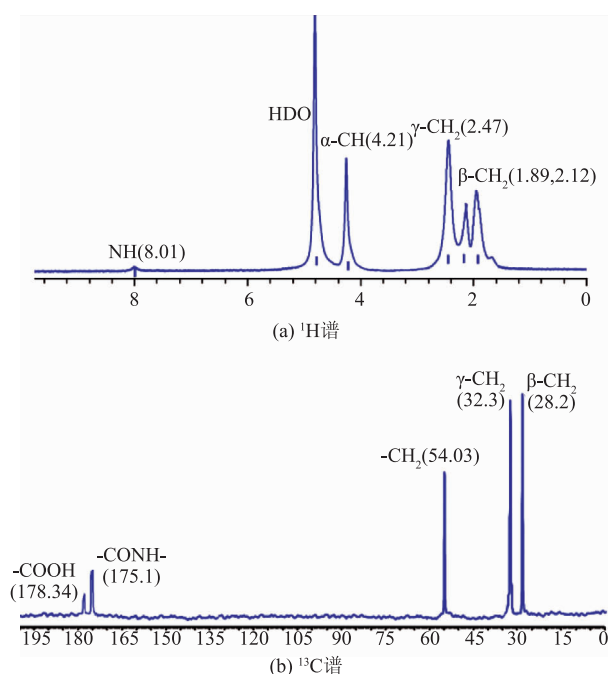


图 4 *E. coli* 工程菌发酵产物 NMR 图谱

Fig. 4 NMR spectra of the product by *E. coli* in D_2O

2.4 *B. methylotrophicus* SK19.001 *pgsBCA* 合成酶基因和编码蛋白质序列分析

将 SK19.001 *pgsBCA* 酶基因和编码蛋白质序列与 NCBI 数据库已测定的 γ -PGA 产生菌的 *pgsBCA* 合成酶基因进行比对, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 谷氨酸依赖型菌株和谷氨酸非依赖型菌株各自的 *pgsBCA* 合成酶基因序列一致性非常高, 但依赖型和非依赖型菌株之间的 *pgsBCA* 合成酶基因序列一致性却较低, 这说明产聚谷氨酸菌株的谷氨酸依赖性可能和 *pgsBCA* 合成酶基因有很大的关系。从表 2 还可以看出, *pgsB* 和 *pgsC* 在不同菌株中具有更高的相似度, 而 *pgsA* 相似度较低。

根据 Ashiuchi 等人^[13-14]的分析, PgsB 被认为是最主要的催化组分, 是合成酶催化作用的能量 ATP 提供中心, 它具有酰胺连接酶结构, 负责酰胺键的链接; PgsC 可能是酶的一个膜嵌入组分, 也是最具疏水性的蛋白质, 它含有跨膜螺旋结构, 与 N-乙酰谷氨酸合成酶中 N-乙酰转移酶相似。PgsC 与 PgsB 一起构成酶复合体的催化部位, 通过两者的联合作用对底物谷氨酸进行聚合。PgsA 具有膜锚定区并位于细胞表面。PgsA 可能负责 PGA 的转运, 从表 2 的数据分析, 在依赖型和非依赖型菌株之间的 *pgsBCA* 合成酶基因和蛋白质序列有较大的差异, 其中 PgsB、C 的酶蛋白序列差异达到 6%~12%, 这些氨基酸序列的差异可能存在于酶的结合和催化部位, 从而造成酶对底物的结合和催化能力的差异; PgsA 的差异更加显著, 达到 22%~35%, 可能影响了 γ -PGA 的相对分子质量大小和产量。但详细的合成机制需要更多的研究来验证, 如结合部位和催化部位如何起作用, 关键的氨基酸有哪些, 如何完成产物大分子的链接以及跨膜运输等。

微生物合成产生 γ -PGA 是一个复杂的过程, 在整个合成过程中, 需要各种酶的参与, PgsBCA 合成酶是其中最重要的酶, 但影响菌株是否具有谷氨酸依赖性的酶不仅仅取决于 PgsBCA 合成酶, 而与 TCA 循环中的酶、谷氨酸合成途径相关的酶有关, 要明确地了解菌株对谷氨酸底物的依赖性需要更多关于整个合成途径生物学信息的了解和分析, 如对 TCA 循环 α -KG 支路相关的酶以及谷氨酸合酶、氨基转氨酶、谷氨酰胺酶等的研究, 同时也需要更多的其它产 γ -PGA 菌株的基因信息进行比对研究, 从而全面的了解 γ -PGA 在各菌株中的合成机制。

表 2 产 γ -PGA 菌株的 *pgsBCA* 基因和相应的合成酶序列的比较Table 2 Comparison of the *pgsBCA* genes and PgsBCA synthetase complex of SK19.001 with those of other γ -PGA producing strains

γ -PGA 产生菌	GenBank 登录号	<i>B. methylotrophicus</i> SK19.001 两序列的一致性					
		<i>pgsB</i>	<i>pgsC</i>	<i>pgsA</i>	PgsB	PgsC	PgsA
<i>B. amyloliquefaciens</i> LL3 (非谷氨酸依赖型)	HM034756.1 HM034757.1 HM034758.1	96.7%	96.9%	94.9%	100%	100%	98.4%
<i>B. subtilis</i> IFO3336 (谷氨酸依赖型)	AB016245.1	82.4%	83.1%	75.4%	93.1%	93.9%	78.9%
<i>B. subtilis</i> ZJU-7 (谷氨酸依赖型)	DQ086153.1	82.1%	83.1%	74.9%	92.8%	93.9%	78.7%
<i>B. licheniformis</i> NK-03 (谷氨酸依赖型)	EF066513.1 EF071858.1 EF071859.1	82.1%	83.1%	75.2%	93.1%	93.9%	78.9%
<i>B. licheniformis</i> 9945A (谷氨酸依赖型)	CP005965.1	78%	78.2%	68.3%	88.3%	86.3%	65.3%

3 结 语

通过基因组 DNA 提取和 PCR 扩增得到非谷氨酸依赖型 γ -PGA 产生菌株 *B. methylotrophicus* SK19.001 *pgsBCA* 合成酶基因序列。利用该合成酶基因构建了表达载体 pET-28a-*pgs* 并成功导入宿主 *E. coli* BL21, 分别使用 L-谷氨酸和葡萄糖作为碳源培养 36 h, 分别得到 0.65 g/L 和 0.45 g/L 的 γ -PGA。说明 *pgsBCA* 合成酶基因对于 *B. methylotrophicus* SK19.001 产 γ -PGA 是必需的。

将 *pgsBCA* 合成酶基因和相应的编码蛋白质与 GenBank 中已获得的其它 γ -PGA 产生菌的酶基因序列进行比对, 发现谷氨酸依赖型菌株之间 *pgsBCA* 合成酶基因相似性非常高, 同样非谷氨酸依赖型菌株之间 *pgsBCA* 合成酶基因相似性也非常高, 但依赖型和非依赖型菌株之间的 *pgsBCA* 合成酶基因相似性却较低, 说明 *pgsBCA* 合成酶基因与菌株的谷氨酸依赖性有一定的关系; *pgsB* 和 *pgsC* 在不同菌株中具有更高的一致性, 而 *pgsA* 序列一致性较低, 这可能导致了不同菌株相对分子质量和产量的不同。

参考文献:

- [1] ASHIUCHI M. Occurrence and biosynthetic mechanism of poly- γ -glutamic acid [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 77-93.
- [2] SHIH I L, Van Y T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. **Bioresource Technology**, 2001, 79(3): 207-225.
- [3] KUNIOKA M. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1995, 44(3-4): 501-506.
- [4] TROY F A. Chemistry and biosynthesis of the poly (γ -d-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis* properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1973, 248(1): 305-315.
- [5] KUNIOKA M, GOTO A. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium-sulfate in *Bacillus-Subtilis* IFO3335[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1994, 40(6): 867-872.
- [6] PENG Y, JIANG B, ZHANG T, et al. High-level production of poly(γ -glutamic acid) by a newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methylotrophicus*[J]. **Process Biochemistry**, 2015(3): 329-335.
- [7] CAO M, GENG W, LIU L, et al. Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(5): 4251-4257.

- [8] SAMBROOK J, RUSSEN D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂,等译. 北京:科学出版社,2002(9):95-99.
- [9] 曹慧萍, 郑璞, 唐云平, 等. 谷氨酸棒杆菌中谷氨酰胺合成酶的克隆表达及固定化 [J]. 食品与生物技术学报,2016(8): 883-889.
- CAO Huiping, ZHENG Pu, TANG Yunping, et al. Cloning, expression and immobilization of glutamine synthetase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016(8): 883-889. (in Chinese)
- [10] PENG Yingyun, ZHANG Tao, MU Wanmeng, et al. Intracellular synthesis of glutamic acid in *Bacillus methylotrophicus* SK19.001, a glutamate-independent poly (γ -glutamic acid)-producing strain [J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016(1), 66-72.
- [11] 曹名锋. 微生物合成 γ -聚谷氨酸及其分子生物学研究[D]. 天津:南开大学,2011.
- [12] 江昊. 聚- γ -谷氨酸在枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中的生物合成[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [13] ASHIUCHI M, NAWA C, KAMEI T, et al. Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2001, 268(20): 5321-5328.
- [14] ASHIUCHI M, NAKAMURA H, YAMAMOTO T, et al. Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 23(2): 249-255.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第七届工业生物过程国际论坛

会议名称(英文): The 7th International Forum on Industrial Bioprocesses (IFIBiop 2016)

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学, 生物技术与生物工程

开始日期: 2017-05-07

结束日期: 2017-05-10

所在城市: 江苏省 无锡市

主办单位: 江南大学

摘要截稿日期: 2016-09-30

联系电话: +86-510-85918516 +86-510-85197012

E-MAIL: ifibiop2016@jiangnan.edu.cn

会议网站: <http://www.ifibiop2016.org/>

会议背景介绍: The 7th International Forum on Industrial Bioprocesses (IFIBiop 2016) will be held at Wuxi in China. This event aims at promoting an efficient communication and collaboration in the field of industrial biotechnology.

It covers the following topics: Biocatalysis and Biotransformation; Biofuels and Biorefineries; Bioprocess Integration and Intensification; Bioreactors Engineering; Bioresources and Biomaterials; Biosensors; Carbohydrate Chemistry and Biotechnology; Food Biotechnology and Engineering; Microbial and Enzyme Technology; Molecular Bioengineering, Systems Biology and Metabolic Engineering; Purification of Biomolecules.