



不同分子量 γ -聚谷氨酸的生物合成

陈升宝^{1,2}, 王丽敏^{1*}, 于波¹

1 中国科学院微生物研究所, 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

陈升宝, 王丽敏, 于波. 不同分子量 γ -聚谷氨酸的生物合成. 微生物学报, 2022, 62(7): 2796–2807.

Chen Shengbao, Wang Limin, Yu Bo. Bioproduction of poly- γ -glutamic acid with diverse molecular weights in *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2796–2807.

摘要:【背景】不同分子量的 γ -聚谷氨酸在农业、化妆品和医药领域具有重要的应用价值, 开发不同分子量 γ -聚谷氨酸的生物合成工艺已成为研究热点。【目的】在 γ -聚谷氨酸生产菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) KH2 中实现不同分子量 γ -聚谷氨酸的合成。【方法】分别克隆表达不同来源的水解酶, 包括 *B. subtilis* 来源的 γ -聚谷氨酸水解酶 PgdS 和 YwtE, 以及地衣芽孢杆菌来源的 SGH。研究不同来源水解酶对 *B. subtilis* KH2 产 γ -聚谷氨酸分子量的影响。通过改变水解酶处理条件获得不同分子量 γ -聚谷氨酸的生物合成工艺。【结果】PgdS、YwtE 和 SGH 均可降低 γ -聚谷氨酸的分子量, 其中 PgdS 水解效果最好, 可以将 γ -聚谷氨酸分子量由原来的 1 600 kDa 降低为 180 kDa。通过优化 PgdS 的添加量与添加时间, 在 *B. subtilis* KH2 中获得了分子量为 210–600 kDa 的 γ -聚谷氨酸。【结论】利用水解酶处理, 可以在 *B. subtilis* KH2 中实现不同分子量 γ -聚谷氨酸的生物合成。该方法反应条件温和、分子量可控区间宽, 具有良好的应用前景。

关键词: γ -聚谷氨酸; 分子量; 水解酶; 枯草芽孢杆菌

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY011004); 国家自然科学基金(32070026)

Supported by the Major Science and Technology Innovation Program of Shandong Province (2019JZZY011004) and by the National Natural Science Foundation of China (32070026)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64806117; E-mail: wanglimin@im.ac.cn

Received: 18 November 2021; Revised: 7 December 2021; Published online: 23 December 2021

Bioproduction of poly- γ -glutamic acid with diverse molecular weights in *Bacillus subtilis*

CHEN Shengbao^{1,2}, WANG Limin^{1*}, YU Bo¹

1 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Poly- γ -glutamic acids (γ -PGAs) with different molecular weights are of high application value in agriculture, cosmetics, and medicine, and biosynthesis of γ -PGA with specific molecular weights has attracted the interest of scholars. [Objective] To synthesize γ -PGAs of different molecular weights in a γ -PGA producer, *Bacillus subtilis* KH2. [Methods] Three γ -PGA hydrolases of *B. subtilis* PgdS, *B. subtilis* YwtE, and *B. licheniformis* SGH, were heterologously expressed and their hydrolytic capacities were investigated. γ -PGAs with different molecular weights were yielded in *B. subtilis* KH2 through the modification of enzymatic degradation conditions. [Results] All the three hydrolases can cleave high-molecular-weight γ -PGA into low-molecular-weight γ -PGA, particularly PgdS. The molecular weight of γ -PGA decreased from 1 600 kDa to 180 kDa with the addition of PgdS. Finally, the addition amount and time of PgdS were optimized to yield γ -PGA with the molecular weight of 210–600 kDa in KH2. [Conclusion] γ -PGAs with diverse molecular weights were synthesized in *B. subtilis* KH2 through the controllable treatment with hydrolase. This study provided a promising approach for the sustainable production of γ -PGA with different molecular weights in a wide range under mild synthesis conditions.

Keywords: γ -PGA; molecular weight; hydrolase; *Bacillus subtilis*

γ -聚谷氨酸(γ -PGA),是由 L-和(或) D-谷氨酸通过酰胺键连接形成的一种天然高分子聚合物,是少数的几种可以用微生物发酵法生产的生物聚合物之一^[1]。 γ -PGA 是一种用途广泛的聚合物,由于其可生物降解、易溶解、对人和环境无毒且可食用的特性,在食品、医药、化妆品、农业和污水处理等多个领域具有广泛的应用^[2]。 γ -PGA 分子量(Mw)主要在 10–10 000 kDa 左右。不同分子量的 γ -PGA 具备不同的用途,比如,低分子量的 γ -PGA (Mw<400 kDa)可用于药物载体,将药物靶向递送到癌细胞并释放其包封的活性成分以抑制肿瘤的生长^[3];高分子量 γ -PGA (Mw>1 000 kDa)具有更高的黏度,可以作为絮凝剂吸附水中的重金属,以及作为增稠

剂,用于生物材料的制备^[4–6]。由此可见,不同分子量的 γ -PGA 应用领域不同,开发不同分子量 γ -PGA 的生物合成工艺具有重要的应用价值。

微生物发酵法是 γ -PGA 主要的生产方法,已有多株芽孢杆菌属菌株,包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、以及解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)等被证实具有 γ -PGA 合成能力^[7–9]。不同微生物合成的 γ -PGA 分子量差异较大。通过物理或者化学方法可以获得不同分子量的 γ -PGA^[1,10],然而上述方法存在聚合物的分子量分布范围难以控制的问题,无法实现大规模生产。在 γ -PGA 生产菌株 *B. subtilis* 中,生成的 γ -PGA 可在 γ -PGA 内切水解酶(PgdS 或 YwtE)和外切水解酶(GGT)

的作用下降解为分子量更小的聚合物^[9,11]。在 *B. licheniformis* 中过表达 *B. subtilis* 来源的 PgdS, γ -PGA 的分子量由 1 000–1 200 kDa 降低为 600–800 kDa^[12]。此外在另外一株 γ -PGA 生产菌株 *B. amyloliquefaciens* 中, 过表达 PgdS 可以获得分子量为 20–30 kDa 的 γ -PGA^[9]。与 PgdS 不同, GGT 降解 γ -PGA 释放谷氨酸单体, 因此 GGT 处理后的聚合物不仅分子量有所降低, 聚合物的产量也相应减少^[11,13]。而 PgdS 处理后的聚合物, 在降低聚合物分子量的同时, 聚合物产量并不会降低^[12]。由此可见, γ -PGA 内切水解酶在聚合物分子量降解方面更具有优势, 利用酶解法实现不同分子量 γ -PGA 的合成路线是可行的。与物理和化学法相比, 酶解法具有反应条件温和、聚合物分子量调控范围宽、工艺简单等特点。

B. subtilis KH2 和 *B. licheniformis* WBL-3 为 γ -PGA 的生产菌株^[7], 本研究以 γ -PGA 生产菌株 *B. subtilis* KH2 为研究对象, 分别克隆表达 *B. subtilis* KH2 来源的 γ -PGA 内切水解酶 PgdS 和 YwtE, 以及 *B. licheniformis* WBL-3 来源的 γ -PGA 内切水解酶 SGH。研究不同来源水解酶对 *B. subtilis* KH2 合成 γ -PGA 分子量的影响, 并通过改变水解酶处理条件, 以期获得具有应用前景的不同分子量 γ -PGA 的生物合成路线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

B. subtilis KH2 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 保藏登记号为 CGMCC No. 12426, 由中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室(中国科学院微生物研究所)提供。*B. licheniformis* WBL-3 为本实验室保藏菌株。大肠杆菌

Escherichia coli MG1655、*E. coli* BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司。表达载体 pMA5 和 pTrc99a 为本实验室保存。重组质粒 pMA5-pgdS、pMA5-ywtE、pMA5-sgh 和 pTrc99a-pgdS 为本研究构建, 分别含有 *B. subtilis* KH2 和 *B. licheniformis* WBL-3 来源的 γ -PGA 水解酶基因。

1.1.2 培养基及培养条件

E. coli、*B. licheniformis* WBL-3 和 *B. subtilis* KH2 普通传代培养使用 Luria-Bertani (LB)培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养; 含有重组质粒的 *E. coli* 需在培养基中额外添加 100 mg/L 氨苄青霉素。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, L-谷氨酸钠 20, NH₄SO₄ 5, K₂HPO₄·3H₂O 2, MgSO₄·7H₂O 0.05, MnSO₄ 0.01, 酵母提取物 10, 玉米浆 1, 柠檬酸 3。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30, L-谷氨酸钠 55, NH₄SO₄ 5, K₂HPO₄·3H₂O 2, MgSO₄·7H₂O 0.05, MnSO₄ 0.01。

1.1.3 主要试剂

PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶等均购自 TaKaRa 公司。DNA Marker 和基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 质粒小提试剂盒、片段纯化试剂盒以及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega Biotek 公司。

1.2 目的基因的克隆和表达

引物设计软件为 Primer Premier 5。根据基因组信息设计引物(表 1), 分别以 *B. licheniformis* WBL-3 与 *B. subtilis* KH2 基因组 DNA 为模板, 使用 PrimeSTAR DNA 高保真聚合酶分别扩增得到 3 个水解酶基因。其中水解酶基因 *pgdS*、*ywtE* 分别使用引物对 *pgdS*.F/*pgdS*.R 和 *ywtE*.F/*ywtE*.R 从 *B. subtilis* KH2 基因组扩增

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pgdS.F	CAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCATGAACACACTGGCAAACCTGGA
pgdS.R	TCTGGTACGTACCAAGCTAGCTTATTGCACTCGTATACTTCCTGCGT
ywtE.F	GCAAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCATGAAATGTATTGCGATTGA
ywtE.R	AGATCTGGTACGTACCAAGCTAGCTTATGCATATTGTCTGAAAGAAGCTG
sgh.F	AAAAAGTGAAATCAGGGGGATCCATGATAAAAAAAGCGGCAAACAAAA
sgh.R	ATCTGGTACGTACCAAGCTAGCCTACTCAATTCTGACGCTTCCGGCGT
pMA5.F	GAGGTGGCAGAGGGCAGTTTTTTTT
pMA5.R	CAGCTTGCTTTCGAGGTGAATTAGC
pgdS-pTrc99a.F	AGACCATGGAATTCGAGCTCATGAACACACTGGCAAACCTGGAAG
pgdS-pTrc99a.R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTATTGCACTCGTATACTTCCTGCG

得到, 水解酶基因 *sgh* 使用引物对 *sgh.F/sgh.R* 从 *B. licheniformis* WBL-3 基因组扩增得到。使用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 双酶切表达载体 pMA5, 获得线性化的表达载体片段, 使用 Gibson 等^[14]的方法连接载体和基因片段, 构建得到重组质粒 pMA5-*pgdS*、pMA5-*ywtE* 和 pMA5-*sgh*。重组质粒经质粒 PCR (使用的引物对为 pMA5.F/pMA5.R)和测序验证正确后分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中。以 *B. subtilis* KH2 基因组 DNA 为模板, 使用引物对 *pgdS*-pTrc99a.F/*pgdS*-pTrc99a.R 扩增 *pgdS* 水解酶基因片段, 与经过 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切的表达载体 pTrc99a 连接, 获得诱导型表达的重组质粒 pTrc99a-*pgdS*, 测序验证正确后转化到 *E. coli* MG1655 中进行水解酶表达。

1.3 水解酶初筛

分别将含 3 种重组载体 (pMA5-*pgdS*、pMA5-*ywtE* 和 pMA5-*sgh*)的 *E. coli* BL21(DE3) 以 1%接种量 (*V/V*)接种到 LB 液体培养基中 (添加 100 mg/L 氨苄青霉素), 37 °C、200 r/min 振荡培养。当 *OD*₆₀₀ 达到 0.6–0.8 时, 30 °C 过夜低温表达水解酶蛋白。随后离心收集细胞, 低温条件下超声破碎, 使用粗酶液进行水解酶反应, 筛选获得效果最好的水解酶基因。

水解酶反应条件如下: 以 50 mmol/L、pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液为溶剂, 配制 10 g/L 的 γ -PGA 溶液; 取 800 μ L γ -PGA 溶液, 加入 200 μ L 水解酶粗酶液, 于 37 °C 条件下反应 12 h 后, 置于 95 °C 水浴锅中 5 min 终止反应。使用水相凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 测定 γ -PGA 的分子量^[15]。

1.4 水解酶活力测定

水解酶的酶活测定参照文献[12]的方法。以 50 mmol/L、pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液为溶剂, 配制终浓度为 1 g/L 的 γ -PGA 溶液, 加入终浓度为 1 mg/mL 的水解酶粗酶液, 于 37 °C 条件下水解 2 h 后, 置于 95 °C 水浴锅中加热 5 min 终止反应。取出 0.5 mL 酶解后的 γ -PGA 溶液, 各加入 1 mL 2 mol/L 的醋酸缓冲液 (pH 5.4), 再加入 1 mL 茚三酮显色液, 混匀后在 100 °C 水浴中加热 15 min, 取出置于室温冷却, 加入 3 mL 60%乙醇进行稀释。以不加水解酶的相同反应体系为对照, 测定各水解酶反应体系在 570 nm 处的吸光度值 (*OD*₅₇₀), 结合谷氨酸标准曲线进行酶活分析。

酶活单位定义为: 37 °C 条件下, 在浓度为 1 g/L 的 γ -PGA 溶液中, 水解 1 h 生成 1 μ mol/L 自由氨基基团所需的酶量。

蛋白质浓度使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒(天根生化科技有限公司)进行测定,方法同试剂盒生产商提供的操作说明。

1.5 水解酶酶粉制作

以 1%的接种量将含有质粒 pTrc99a-pgdS 的 *E. coli* MG1655 接种到 LB 液体培养基中(添加 100 mg/L 氨苄青霉素), 37 °C、200 r/min 振荡培养。当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 30 °C 培养 16 h 诱导表达水解酶蛋白。使用高压匀浆机破碎 *E. coli* MG1655 细胞, -80 °C 预冷过夜后, 置于真空干燥机中冻干匀浆液制成水解酶粉。

1.6 γ -PGA 发酵

挑取 *B. subtilis* KH2 单菌落于液体 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12 h, 以 1% (V/V) 接种量接种于种子培养基, 37 °C、220 r/min 培养 16 h 制备种子液。将种子液按 1% (V/V) 的接种量接种于发酵培养基, 37 °C、220 r/min 培养 72 h 得到 γ -PGA 发酵液。

1.7 水解酶酶解时间优化

向 γ -PGA 发酵液中添加水解酶粉(添加量为 1 mg 酶粉/mL γ -PGA 发酵液), 37 °C、pH 7.0 反应 3、5、8、11 和 24 h, 测定 γ -PGA 分子量的变化。

分别在发酵 10、24、34 和 48 h 添加水解酶粉(添加量为 1 mg 酶粉/mL γ -PGA 发酵液), 培养至 72 h 结束发酵。*B. subtilis* KH2 在种子培养基中活化 16 h 后, 以 5%接种量(V/V)接种至发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养。分别在发酵 10、24、34 和 48 h 添加水解酶粉(添加量为 1 mg 酶粉/mL γ -PGA 发酵液), 培养至 72 h 结束发酵。

1.8 γ -PGA 产量测定

γ -PGA 产量测定采用高压液相色谱法

(HPLC)^[12]。发酵结束后, 12 000 r/min 离心 20 min 除去菌体, 向上清液中加入 4 倍体积预冷的无水乙醇, 4 °C 冷藏过夜后 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 经真空干燥机冷冻干燥处理过夜后, 获得 γ -PGA 沉淀。使用 6 mol/L HCL, 105 °C 水解 10 h, 将 γ -PGA 分解为谷氨酸单体, 加入等量 6 mol/L NaOH 调整 pH 至 7.0, 使用 HPLC 检测水解液中谷氨酸含量。HPLC 具体检测方法为: (1) 液相样品预处理: 25 μ L 水解液或不同浓度的谷氨酸标品加入 10 μ L 饱和 NaHCO₃ 溶液和 40 μ L 2,4-二硝基氟苯溶液(25.8 mmol/L, 甲醇溶解), 60 °C 避光处理 30 min, 加入 20 μ L 1 mol/L HCL; (2) 测定条件为: C₁₈ 色谱柱(Eclipse Plus C₁₈, 4.6 \times 250 mm), 流动相为 65%的 0.1%甲酸水和 35%的乙腈, 流速 1 mL/min, 柱温 40 °C, 进样 5 μ L, 紫外检测器检测, 检测波长为 360 nm。根据谷氨酸标品作标准曲线, 以此计算水解液中谷氨酸含量, 进而计算出发酵液中 γ -PGA 产量。

1.9 γ -PGA 分子量测定

γ -PGA 分子量使用水相凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)进行测定^[14], 采用三柱串联, 所用柱型号分别为: Waters UltrahydrogelTM 2000 (7.8 \times 300 mm)、Waters UltrahydrogelTM 250 (7.8 \times 300 mm)和 Waters UltrahydrogelTM 120 (7.8 \times 300 mm)。检测方式: 以去离子水作为流动相, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 65 °C, 示差折光检测器(RI)进行检测。以不同分子质量的葡聚糖为标准样品, 建立分子质量与保留时间之间的标准方程, 计算样品 γ -PGA 的分子量。

1.10 不同来源水解酶氨基酸序列比对

在 NCBI 数据库检索不同种类芽孢菌株来源的 PgdS 水解酶氨基酸序列, 包括: *B. licheniformis* DSM13 (AAU25278.1)、*B. paralicheniformis*

ATCC 9945a (AGN38159.1)、*B. subtilis* KH2 (API45102.1)、*B. subtilis* 168 (QJF42721.1)、*B. amyloliquefaciens* DSM 7 (CBI44552.1)以及 *B. anthracis* 来源的 CapD 水解酶序列 (WP_003159952.1)。使用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)和 ESPrpt 3 (ESPrpt 3 (ibcp.fr))网站工具进行氨基酸序列比对。

1.11 数据分析方法

实验数据以平均值±标准差表示,作图采用 GraphPad Prism 7.0 软件。所有统计分析均采用 SPSS 11.5 软件进行, *P* 值低于 0.01 时具有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 γ -PGA 水解酶筛选与功能验证

B. subtilis 和 *B. licheniformis* 是 γ -PGA 生产菌株,它们可以将合成的 γ -PGA 分泌到细胞外,简化了下游提取与纯化工艺。*B. subtilis* 和 *B. licheniformis* 来源的 γ -PGA 内切水解酶可以作用于 γ -PGA 中 L-谷氨酸和 D-谷氨酸之间的 γ -谷氨酰键,将大分子量的 γ -PGA 降解为小分子量的 γ -PGA^[15],利用 γ -PGA 水解酶的酶解特

性来获得不同分子量 γ -PGA 在理论上是可行的。我们分别克隆了来源于 *B. subtilis* KH-2 的 γ -PGA 水解酶基因(*pgdS* 和 *ywtE*)以及来源于 *B. licheniformis* WBL-3 的 γ -PGA 水解酶基因 *SGH*。由图 1A 可见,在琼脂糖凝胶电泳上均得到单一条带,其中基因 *pgdS* 为 1 242 bp,加上质粒大小为 1 472 bp。基因 *ywtE* 为 861 bp,加上质粒大小为 1 091 bp。基因 *SGH* 为 1 245 bp,加上质粒大小为 1 475 bp,与预测目的片段大小一致。

分别将基因 *pgdS*、*ywtE* 以及 *SGH* 连接在 pMA5 载体上,转入 *E. coli* BL21(DE3)菌株里表达,破碎细胞,获得 γ -PGA 水解酶粗酶液。使用 γ -PGA 水解酶粗酶液处理 *B. subtilis* KH-2 发酵液,3 种水解酶处理后的 γ -PGA 分子量均有明显降低(图 1B)。未经 γ -PGA 水解酶处理的样品中聚合物的分子量为 1 600 kDa。水解酶 YwtE 处理后,聚合物的分子量降低为 230 kDa。经过水解酶 *SGH* 处理的聚合物分子量为 260 kDa。*PgdS* 处理的发酵液, γ -PGA 分子量降低为 180 kDa。3 种水解酶酶活测定结果表明,在含有重组质粒的 *E. coli* 中 YwtE 的酶活

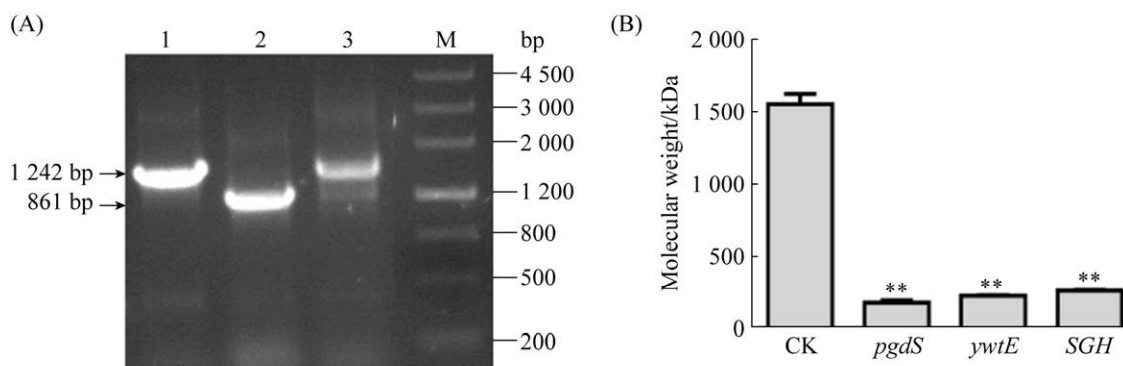


图 1 不同来源 γ -PGA 水解酶重组质粒 PCR 验证(A)和水解能力验证(B)

Figure 1 Analysis of PCR fragments of γ -PGA hydrolase by gel electrophoresis (A) and molecular weight change of γ -PGA after enzymatic breakdown (B). Lane 1: *pgdS* of *B. subtilis* KH2; lane 2: *ywtE* of *B. subtilis* KH2; lane 3: *sgh* of *B. licheniformis* WBL-3; M: DNA molecular weight marker. **: *P*<0.01.

为 102 U, SGH 的酶活为 315 U, PgdS 的酶活为 372 U (图 2)。综上所述, PgdS 水解酶酶活最高, 酶解效果最好, 后续实验我们进一步优化了 PgdS 的酶解条件。

2.2 PgdS 酶解法的工艺优化

在水解酶筛选与功能验证部分, 我们选择组成型启动子过表达目的蛋白, 减少了诱导步骤。在确定了水解效果较优的水解酶后, 需要高效地获得水解酶蛋白。从酶活测定结果可以看出, 在组成型表达的 *E. coli* (pMA5-pgdS) 全细胞反应液中, 水解酶活力为 372 U。然而在诱导表达的 *E. coli* (pTrc99a-pgdS) 中水解酶酶活达到了 782 U, 是组成型表达的 2 倍(图 2)。在本研究中, 我们选择诱导型启动子表达 PgdS 水解酶。

通常聚合物是由不同分子量同系物的混合物组成, 聚合物的分子量可以用多种形式表示。其中重均分子量(weight-average molecular weight, M_w)和数均分子量(number-average molecular weight, M_n)是最重要的 2 个指标^[16]。在本研究中, 我们利用 PgdS 水解酶酶粉处理 *B. subtilis* KH2 γ -PGA 发酵液, 分别处理 3、5、

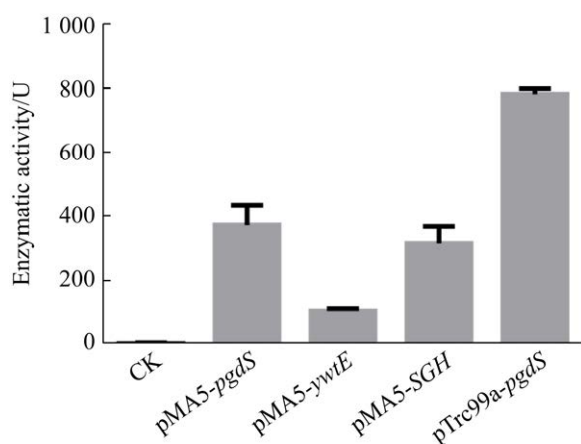


图 2 γ -PGA 水解酶酶活测定

Figure 2 Enzymatic activities of γ -PGA hydrolases. Error bars indicate SD ($n=3$).

8、11 和 24 h, 检测 γ -PGA 分子量的变化, 其中 0 h 为未经 PgdS 水解酶处理的 γ -PGA 发酵液。

结果如图 3 所示, 在 PgdS 水解酶处理后, 聚合物的重均分子量和数均分子量均明显降低。水解酶处理 3 h, γ -PGA 的重均分子量(M_w)由 1 070 kDa 降低到了 500 kDa。水解酶处理 5、8、11 和 24 h, γ -PGA 的重均分子量(M_w)降低到 330–470 kDa (图 3A)。与重均分子量相比, 经过水解酶处理后, 终产物 γ -PGA 的数均分子量(M_n)降低的幅度较大(图 3B)。水解酶处理 3 h, γ -PGA 的数均分子量(M_n)降低为 390 kDa。水解酶处理 8、11 和 24 h, γ -PGA 的数均分子量(M_n)降低为 130–200 kDa。上述结果说明, PgdS 水解酶将 γ -PGA 降解为分子量更小的聚合物, 使 γ -PGA 的分子量分布范围更广, 因此与重均分子量相比, 数均分子量降低的幅度更大。利用 PgdS 水解酶酶解 *B. subtilis* KH2 γ -PGA 发酵液, 可以将高分子量的 γ -PGA 降低为低分子量的 γ -PGA。PgdS 水解酶酶解实验结果表明, 随着处理时间的延长, γ -PGA 的分子量降低幅度越大。后续的实验中, 我们尝试通过在 *B. subtilis* KH2 发酵生产 γ -PGA 的不同阶段加入 PgdS 水解酶, 实现不同分子量 γ -PGA 在微生物细胞中的合成。

2.3 不同分子量 γ -PGA 在 *B. subtilis* KH2 中的合成

为了实现不同分子量 γ -PGA 在微生物细胞中的合成, 我们以 γ -PGA 生产菌株 *B. subtilis* KH2 为出发菌株, 在 *B. subtilis* KH2 发酵生产 γ -PGA 的过程中添加 PgdS 水解酶, 观察不同的添加时间对发酵产物 γ -PGA 分子量的影响。当微生物处于不利于其生长的状态下, γ -PGA 可以作为碳源和氮源为细胞提供能量, 因此, 在 γ -PGA 合成菌株中, 微生物细胞通常在生长的

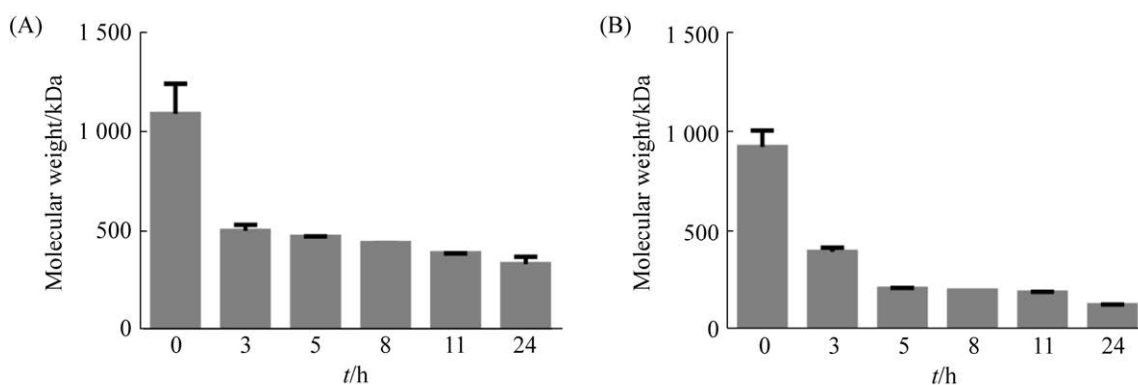


图3 γ -PGA 水解酶 PgdS 处理时间对 γ -PGA 重均分子量(M_w) (A)与数均分子量(M_n) (B)的影响

Figure 3 Effect of PgdS treatment time on weight-average molecular weight (M_w) (A) and number-average molecular weight (M_n) (B) of γ -PGA. Error bars indicate SD ($n=3$).

对数后期开始大量积累 γ -PGA^[17]。我们分别在 *B. subtilis* KH2 发酵生产 γ -PGA 过程中的 10、24、34 和 48 h 添加 PgdS 水解酶,检测 *B. subtilis* KH2 发酵终产物分子量的变化。

在 *B. subtilis* KH2 发酵生产 γ -PGA 过程中添加 PgdS 水解酶,得到了重均分子量为 210–600 kDa 的 γ -PGA (表 2)。在发酵 10 h 时加入水解酶,终产物 γ -PGA 的重均分子量为 310 kDa,产物的终浓度为 16 g/L。在水解酶的作用下大分子量的 γ -PGA 被降解为小分子量的 γ -PGA,经过水解酶处理后 γ -PGA 的数均分子量降低,聚合物分子量的分散系数为 6。在发酵 34 h 时加入水解酶,得到重均分子量为 210 kDa 的 γ -PGA,

表 2 不同分子量 γ -PGA 在 *B. subtilis* KH2 中的合成

Table 2 Biosynthesis of γ -PGA with various molecular weights in *B. subtilis* KH2

Addition time of PgdS/h	γ -PGA/(g/L)	M_w /kDa	M_n /kDa	Polydispersity ^a
10	16±2	305±42	51±2	6
24	14±1	238±30	30±1	8
34	17±1	211±48	30±1	7
48	15±2	598±30	54±0	11

^a: polydispersity= M_w/M_n .

终产物 γ -PGA 的产量为 17 g/L。我们发现在发酵 48 h 时加入水解酶,产物 γ -PGA 的重均分子量为 600 kDa。在水解酶的作用下小分子量 γ -PGA 逐渐增加,因此终产物分子量分布范围广,聚合物分散系数达到 11。

3 讨论与结论

γ -PGA 由于其水溶性、生物相容性和可食用性等特点,在生物医药、化妆品、农业等行业具有广泛的应用。 γ -PGA 的生物功能依赖于其分子量,不同分子量的聚合物其应用领域各不相同,因此研究不同分子量 γ -PGA 的合成具有重要意义^[18]。为了获得不同分子量的 γ -PGA,在过去的几年中学者们利用物理和化学的方法改变 γ -PGA 的分子量^[10]。然而,由于物理和化学方法难以实现对肽键断裂的精确控制,使得上述方法没有取得令人满意的效果。利用酶解方法获得不同分子量 γ -PGA 的工艺条件温和,同时可以通过调节酶解条件实现不同分子量聚合物的获得,具有物理和化学法不可比拟的优点。

微生物细胞合成的 γ -PGA 在生长条件不适合微生物生长的条件下会被分解成谷氨酸,为微生物生长提供氮源。因此,几乎所有具有

γ -PGA 合成能力的菌株中都有 γ -PGA 水解酶的存在。我们对几株代表性的 *B. subtilis* 来源 γ -PGA 内切水解酶的氨基酸序列做了比对分析, 发现除了 *B. anthracis* γ -PGA 水解酶以外, 其他来源的 γ -PGA 水解酶氨基酸水平同源性为

57%–98% (图 4)。在本研究中, 我们以几种代表性菌株来源的 γ -PGA 水解酶为研究对象, 以本研究筛选获得的 γ -PGA 高产菌株 *B. subtilis* KH2 为出发菌株, 开展原位酶解法生成不同分子量 γ -PGA 的工艺研究。在水解酶筛选与功能

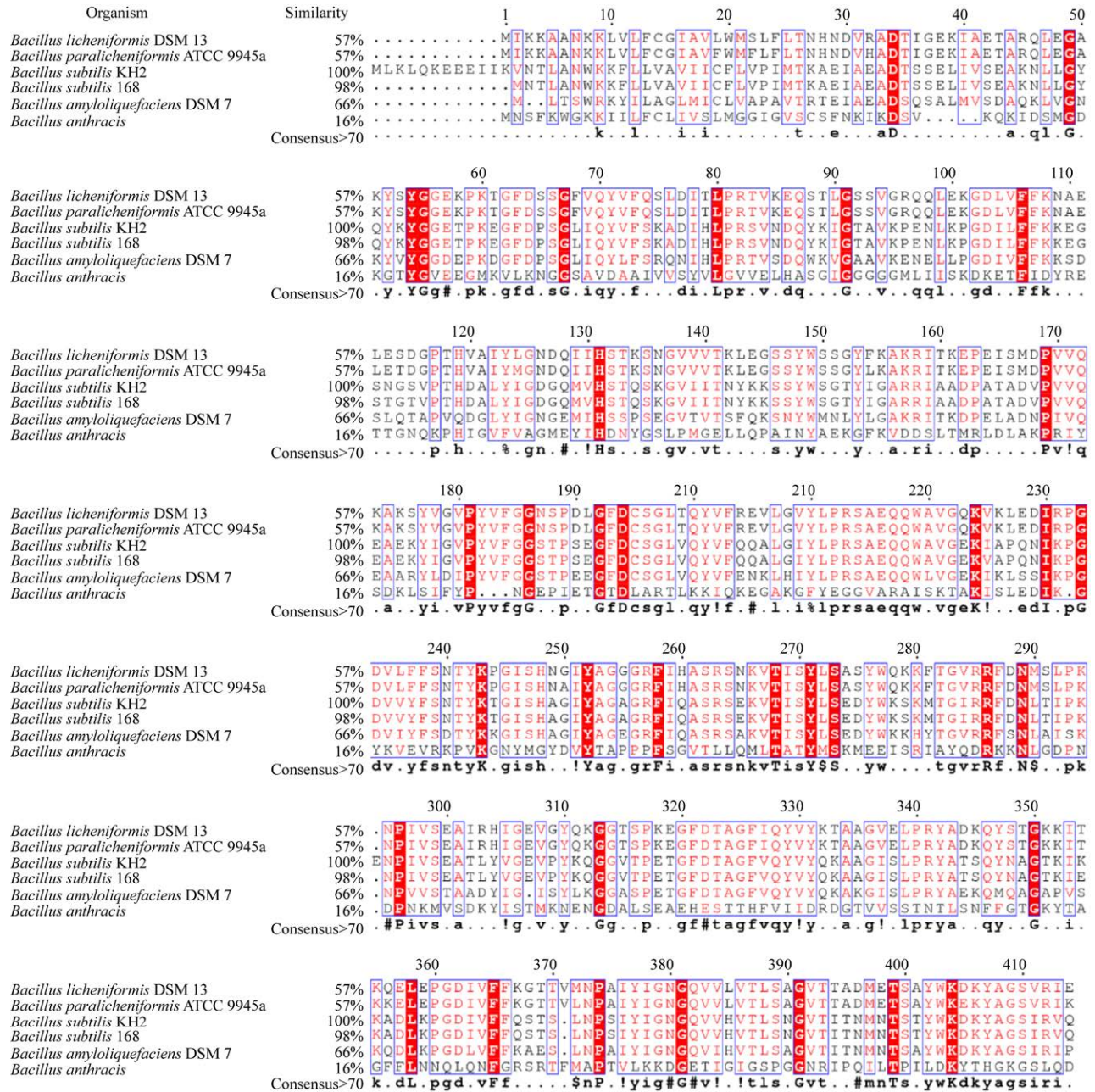


图 4 不同来源 γ -PGA 内切水解酶氨基酸序列比对
Figure 4 Amino acid sequence alignment of γ -PGA hydrolases.

验证部分,我们选择组成型启动子过表达目的蛋白,减少了诱导步骤。在确定了水解效果较优的 *B. subtilis* KH2 来源的 PgdS 水解酶后,我们选择了诱导型启动子表达该酶。从酶活测定结果(图 2)和蛋白表达情况来看,PgdS 水解酶在 *E. coli* 中实现了可溶性表达,并获得了较高的酶活。

在微生物细胞中, γ -PGA 的合成包括底物谷氨酸的合成、谷氨酸聚合以及聚合物的转运等过程。谷氨酸是微生物细胞合成 γ -PGA 所需的底物,其来源可以是培养基中获得或者胞内合成。谷氨酸胞内合成途径是葡萄糖经过糖酵解途径生成丙酮酸,然后进入三羧酸循环,通过酮戊二酸生成谷氨酸(图 5)。L-谷氨酸和 D-谷氨酸都可以作为 γ -PGA 合成的底物,从 L-谷氨酸到 D-谷氨酸的转化有 2 条不同的途径,一是由谷氨酸消旋酶参与的直接途径,二是由 D-丙氨酸转氨酶参与的间接途径^[19]。

γ -PGA 合成酶是位于细胞膜上的一种 ATP 依赖型酰胺连接酶,主要成分包括 3 个功能亚基(PgsB、PgsC 和 PgsA)^[18]。 γ -PGA 水解酶基因(*pgdS*)位于 *pgs* 操纵子下游,PgdS (EC 3.4.19.9) 是 γ -DL-谷氨酰水解酶,它可以水解 γ -PGA 中 L-谷氨酸和 D-谷氨酸之间的 γ -谷氨酰键,可以使聚合物断裂以降低分子量^[20]。Tian 等在 *B. licheniformis* WX-02 中过表达了基因 *pgdS*, γ -PGA 的分子量由 1 000–1 200 kDa 降低到 600–800 kDa^[12]。Sha 等利用 CRISPRi 系统调节基因 *pgdS* 的表达水平,在 *B. amyloliquefaciens* 中获得了分子量为 50–1 400 kDa 的 γ -PGA^[21]。Wang 等通过启动子和信号肽调控 *B. licheniformis* WX-02 中 PgdS 水解酶的表达,获得了分子量为 68–1 780 kDa 的 γ -PGA^[22]。上述研究表明,通过 PgdS 水解酶酶解工艺实现不同分子量 γ -PGA 在微生物细胞中的合成是可行的。

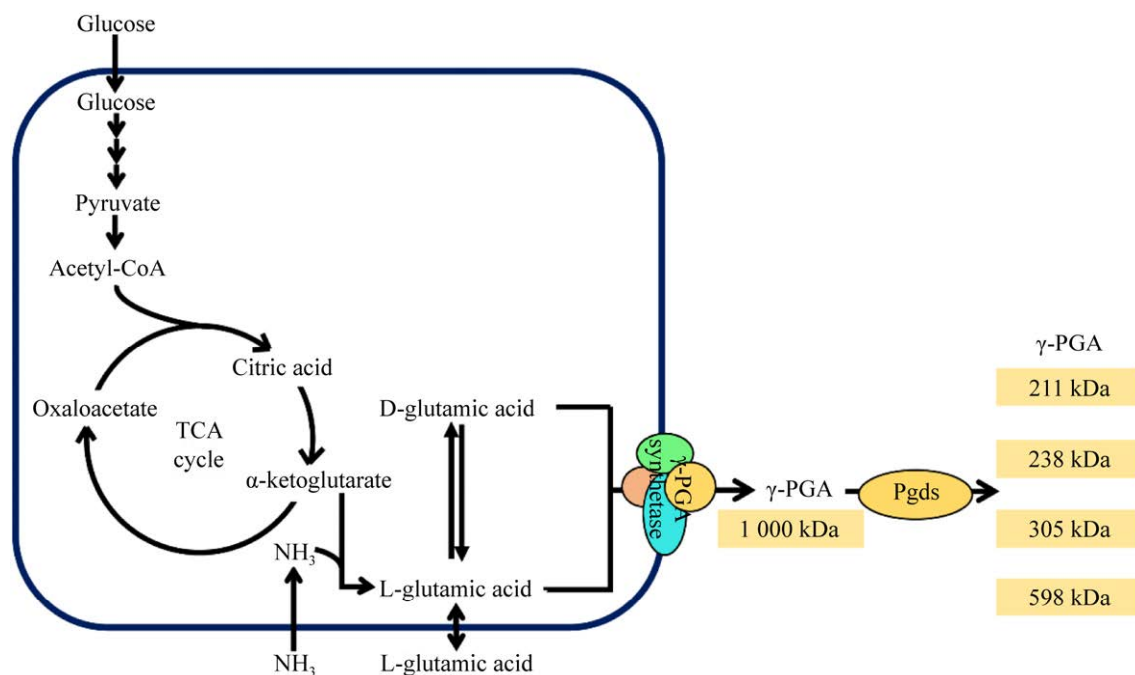


图 5 不同分子量 γ -PGA 合成途径示意图^[18]

Figure 5 Simplified diagram of γ -PGA biosynthetic pathway with various molecular weight^[18].

本研究中, 我们选择具有代表性的高产 γ -PGA 菌株(*B. licheniformis* WBL-3 和 *B. subtilis* KH2)来源的 γ -PGA 水解酶为出发点, 通过体外酶解实验发现 3 种水解酶均可以降低 γ -PGA 的分子量。我们对水解效果最好的 PgdS 水解酶的酶解工艺做了进一步研究, 发现随着酶解时间的延长, γ -PGA 的数均分子量和重均分子量均降低。聚合物是由重复的单体连接形成的长链, 聚合物链的分子量不是一个单一的值, 而是一个聚合物链长和分子量的分布范围。数均分子量(M_n)和重均分子量(M_w)是聚合物分子量表征的 2 个重要指标。 M_n 是聚合物中所有聚合链分子量的统计平均值, 相对于 M_n , M_w 把单链分子量大小的贡献也考虑进去了^[15]。对于 γ -PGA 这样的聚合物来讲, 选择 M_w 作为衡量聚合物的分子量更加合适^[23]。为了实现不同分子量 γ -PGA 在微生物细胞中的合成, 我们在 γ -PGA 生产菌株 *B. subtilis* KH2 发酵过程中添加水解酶, 得到了分子量为 210–600 kDa 的 γ -PGA。

在本研究中我们将 PgdS 水解酶在 *E. coli* 中进行表达, 得到全细胞催化剂 *E. coli* PgdS。使用高压匀浆机破碎表达水解酶蛋白的细胞, 通过向 γ -PGA 发酵过程中添加含有 PgdS 水解酶的全细胞催化剂实现不同分子量 γ -PGA 生产。该工艺不需要繁琐的酶纯化步骤, 通过简单的细胞培养即可在短时间内获得大量的细胞催化剂, 显著降低了生产成本^[24]。本研究建立的 γ -PGA 原位酶解工艺反应条件温和、产物分子量分布范围广、生产成本低。在特定分子量 γ -PGA 在农业、化妆品和医药领域的应用方面具有较好的应用价值。

参考文献

[1] Bajaj I, Singhal R. Poly(glutamic acid) — an emerging

biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 5551–5561.

- [2] Luo ZT, Guo Y, Liu JD, Qiu H, Zhao MM, Zou W, Li SB. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 134.
- [3] Liang HF, Chen SC, Chen MC, Lee PW, Chen CT, Sung HW. Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system against cultured HepG2 cells. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17(2): 291–299.
- [4] Zhao CF, Zhang YW, Wei XT, Hu ZB, Zhu FY, Xu L, Luo MF, Liu HZ. Production of ultra-high molecular weight poly- γ -glutamic acid with *Bacillus licheniformis* P-104 and characterization of its flocculation properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(3): 562–572.
- [5] Taniguchi M, Kato K, Shimauchi A, Ping X, Nakayama H, Fujita KI, Tanaka T, Tarui Y, Hirasawa E. Proposals for wastewater treatment by applying flocculating activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(3): 245–251.
- [6] Poo H, Park C, Kwak MS, Choi DY, Hong SP, Lee IH, Lim Y, Choi Y, Bae SR, Uyama H, Kim CJ, Sung MH. New biological functions and applications of high-molecular-mass poly- γ -glutamic acid. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(6): 1555–1562.
- [7] 马力群, 车程川, 王丽敏, 于波, 杨革. Mn^{2+} 浓度对地衣芽孢杆菌产不同构型聚- γ -谷氨酸机理分析. *微生物学通报*, 2017, 44(6): 1263–1270.
- Ma LQ, Che CC, Wang LM, Yu B, Yang G. Regulation of stereochemical composition of poly- γ -glutamic acids produced by *Bacillus licheniformis* within various Mn^{2+} concentration. *Microbiology China*, 2017, 44(6): 1263–1270. (in Chinese)
- [8] Ashiuchi M, Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1): 9–14.
- [9] Sha YY, Zhang YT, Qiu YB, Xu ZQ, Li S, Feng XH, Wang MX, Xu H. Efficient biosynthesis of low-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by stable overexpression of PgdS hydrolase in *Bacillus amyloliquefaciens* NB. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(1): 282–290.
- [10] Pérez-Camero G, Congregado F, Bou JJ, Muñoz-Guerra S. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(γ -glutamic acid). *Biotechnology and Bioengineering*,

- 1999, 63(1): 110–115.
- [11] Lin LL, Chou PR, Hua YW, Hsu WH. Overexpression, one-step purification, and biochemical characterization of a recombinant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 103–112.
- [12] Tian GM, Fu JT, Wei XT, Ji ZX, Ma X, Qi GF, Chen SW. Enhanced expression of *pgdS* gene for high production of poly- γ -glutamic acid with lower molecular weight in *Bacillus licheniformis* WX-02. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2014, 89(12): 1825–1832.
- [13] Ojima Y, Kobayashi J, Doi T, Azuma M. Knockout of *pgdS* and *ggt* gene changes poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus licheniformis* RK14-46. *Journal of Biotechnology*, 2019, 304: 57–62.
- [14] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [15] Shih IL, Wu PJ, Shieh CJ. Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2827–2832.
- [16] Zeng W, Chen GG, Wang QL, Zheng SF, Shu L, Liang ZQ. Metabolic studies of temperature control strategy on poly(γ -glutamic acid) production in a thermophilic strain *Bacillus subtilis* GX-28. *Bioresource Technology*, 2014, 155: 104–110.
- [17] Cao MF, Feng J, Sirisansaneeyakul S, Song CJ, Chisti Y. Genetic and metabolic engineering for microbial production of poly- γ -glutamic acid. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(5): 1424–1433.
- [18] Wang LM, Chen SB, Yu B. Poly- γ -glutamic acid: recent achievements, diverse applications and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 119: 1–12.
- [19] Hubbard MA, Thorkildson P, Welch WH, Kozel TR. Stereo-selective binding of monoclonal antibodies to the poly- γ -D-glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis*. *Molecular Immunology*, 2013, 55(3/4): 337–344.
- [20] Fukushima T, Uchida N, Ide M, Kodama T, Sekiguchi J. DL-endopeptidases function as both cell wall hydrolases and poly- γ -glutamic acid hydrolases. *Microbiology: Reading, England*, 2018, 164(3): 277–286.
- [21] Sha YY, Qiu YB, Zhu YF, Sun T, Luo ZS, Gao J, Feng XH, Li S, Xu H. CRISPRi-based dynamic regulation of hydrolase for the synthesis of poly- γ -glutamic acid with variable molecular weights. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(9): 2450–2459.
- [22] Wang D, Wang H, Zhan YY, Xu Y, Deng J, Chen JG, Cai DB, Wang Q, Sheng F, Chen SW. Engineering expression cassette of *pgdS* for efficient production of poly- γ -glutamic acids with specific molecular weights in *Bacillus licheniformis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 728.
- [23] Richard A, Margaritis A. Kinetics of molecular weight reduction of poly(glutamic acid) by *in situ* depolymerization in cell-free broth of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(3): 303–307.
- [24] Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Organic Process Research & Development*, 2011, 15(1): 266–274.

(本文责编 张晓丽)