

γ -聚谷氨酸的微生物合成、相关基因及应用展望

曹名锋¹ 金映虹^{1,2} 解慧¹ 王淑芳² 宋存江^{1,2*}

(1. 南开大学生命科学学院微生物系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 南开大学生命科学学院 生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: γ -聚谷氨酸是一种具有极强水溶性、生物相容性、可完全降解性的环境友好型新材料。介绍 γ -聚谷氨酸的基本性质、微生物合成及其影响因素, 综述其合成相关基因、合成酶复合体的研究进展及在水凝胶和药物载体方面的应用前景。

关键词: γ -聚谷氨酸, 生物合成, 合成酶基因, 应用前景

Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid), its related genes and application prospects

CAO Ming-Feng¹ JIN Ying-Hong^{1,2} XIE Hui¹ WANG Shu-Fang²
SONG Cun-Jiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Poly (γ -glutamic acid) is a promising environmental friendly material with outstanding water solubility, biocompatibility and degradability. This review introduces the basal properties of γ -PGA, microbial production of γ -PGA, and the key factors affecting the yield of γ -PGA. Furthermore, the γ -PGA biosynthesis genes, γ -PGA synthetase complex, as well as the application prospects of γ -PGA in hydrogel and drug delivery, are also discussed.

Keywords: Poly (γ -glutamic acid), Biosynthesis, Synthetase genes, Application prospects

γ -聚谷氨酸[Poly (γ -glutamic acid), γ -PGA]是由 D-/L-谷氨酸通过 γ -酰胺键聚合而成的一种高分子阴离子多肽型聚合物。结构式见图 1。生物合成的 γ -

聚谷氨酸通常由 500–5 000 个谷氨酸单体组成, 分子量为 10 kD–10 000 kD, 立体构型分为 γ -聚 D-谷氨酸(γ -D-PGA)、 γ -聚 L-谷氨酸(γ -L-PGA)和 γ -聚

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070039, 51073081); 天津市科技支撑重点项目(No. 09ZCKFSH00800)

* 通讯作者: Tel: 86-22-23503866; ✉: songcj@nankai.edu.cn

收稿日期: 2010-07-14; 接受日期: 2010-11-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

D/L-谷氨酸(γ -D/L-PGA) 3种^[1]。 γ -聚谷氨酸主链上含有大量游离羧基,可发生交联、螯合、衍生化等反应,具有强水溶性、生物相容性、生物降解性等。随着人们环保意识日益增强, γ -聚谷氨酸作为可生物降解高分子材料已备受关注。本文介绍了近年来 γ -聚谷氨酸发酵生产、合成酶研究及应用前景。

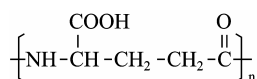


图1 γ -聚谷氨酸结构式

Fig. 1 The structure of poly (γ -glutamic acid)

1 γ -聚谷氨酸的微生物合成

γ -聚谷氨酸生产主要有化学合成法、提取法和微生物发酵法3种。前两种方法因合成的 γ -聚谷氨酸分子量低、副产物多且成本高等无法实现工业化应用。微生物法合成的 γ -聚谷氨酸最早于1913年由Sawamura在日本传统食品纳豆中发现。1937年,Ivanovics等从一种致病的革兰氏阳性细菌炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)的荚膜中分离到 γ -聚谷氨酸。自1942年Bovarnick等发现 γ -聚谷氨酸作为一种发酵产物能自由地分泌到培养基中后,人们发现多种芽孢杆菌能在胞外积累 γ -聚谷氨酸。上世纪90年代以来,伴随 γ -聚谷氨酸在材料领域优越性的展现,国内外对 γ -聚谷氨酸的微生物法制备研究越发活跃,主要集中在筛选高产野生菌株和进行菌种改造,以期适应工业化需求。

1.1 γ -聚谷氨酸合成菌

合成 γ -聚谷氨酸的微生物主要是芽孢杆菌属的细菌。最早在炭疽芽孢杆菌的荚膜(Capsule)中发现的 γ -聚谷氨酸,属于组成型,能增强毒力,配合外毒素(Exotoxins)抑制宿主的吞噬作用和逃避哺乳动物的免疫防御系统。而适合工业化生产的菌株主要是地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),其合成的 γ -聚谷氨酸属于分泌型,通过膜转运到细胞外,作为一种保护因子抵御恶劣环境,或细菌饥饿时的营养物质。此外,Niemetz与Hezayen分别发现盐碱球菌(*Natronococcus occultus*)和古细菌(*Natrialba aegyptiaca*)能在极端强碱或高盐环境

下合成 γ -聚谷氨酸,通过 γ -聚谷氨酸的强结合水能力使菌体不致急剧失水^[2-3]。

根据培养基是否需要添加谷氨酸,将 γ -聚谷氨酸产生菌分为谷氨酸依赖型(分段合成)和谷氨酸非依赖型(从头合成)两类。前者占已报道 γ -聚谷氨酸生产菌中的大多数,包括枯草芽孢杆菌(*chungkookjang*)^[4]、枯草芽孢杆菌 RKY3^[5]、地衣芽孢杆菌 ATCC9945A^[6-7]、地衣芽孢杆菌 NCIM2324^[8]等;后者研究较少,只发现枯草芽孢杆菌 TAM-4^[9]、枯草芽孢杆菌 C1^[10]、地衣芽孢杆菌 A35^[11]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)LL3^[12]等菌株。那么,是什么因素导致同一种细菌的不同菌株具有谷氨酸依赖型和非依赖型呢?目前还没有深入和明确的报道。我们认为有两种可能的机制导致合成 γ -聚谷氨酸时对底物需要的差异。一种假设是细菌具有比较强的谷氨酸合成能力,能借助自身三羧酸循环途径和谷氨酸脱氢酶作用合成足量的谷氨酸单体,通过 γ -酰胺键聚合成 γ -聚谷氨酸;另外一种假设是 γ -聚谷氨酸合成酶系统具有比较强的结合和催化能力,能够充分利用自身合成的谷氨酸作为底物发生聚合作用。虽然谷氨酸非依赖型菌株合成的 γ -聚谷氨酸产量较低,但是由于发酵培养基中无需添加谷氨酸,可以大大降低成本而被关注。

1.2 发酵条件的控制

不同菌株对碳氮源、通氧量、搅拌速度、金属离子、微量元素、前体物质、生物素等的需求存在差异。表1列出了几株谷氨酸依赖型和非依赖型菌株的培养基配方、发酵周期和 γ -聚谷氨酸产量、单体D/L-谷氨酸比例及分子量大小。以谷氨酸依赖型的地衣芽孢杆菌 ATCC9945A和非依赖型的地衣芽孢杆菌 A35为例简述培养条件对 γ -聚谷氨酸产量的影响。

1963年,Leonard等建立了 γ -聚谷氨酸合成最常用的E培养基。Troy等通过制备细胞膜体系来催化合成聚D-谷氨酸,认为地衣芽孢杆菌 ATCC9945A中含有ATP、 Mg^{2+} 、 K^{+} 激活的消旋酶与合成酶系。Yoon等利用控制柠檬酸和L-谷氨酸补料分批培养,

表 1 γ -聚谷氨酸部分合成菌及发酵条件
Table 1 Some γ -PGA-producing strains and their cultivation conditions

菌株 Strains	培养基主要成分 Medium composition (g/L)	发酵周期 Cultivation time (h)	D/L-谷氨酸比例 Ratio of D/L-glutamate	γ -聚谷氨酸分子量 Molecular weight of γ -PGA (M_w , kD)	γ -聚谷氨酸产量 Concentration of γ -PGA (g/L)	文献来源 References
谷氨酸依赖型 Glutamic acid dependent type						
<i>B. subtilis</i> IFO3335	Glutamic acid 30 Glycerol 20 Citric acid 20 (NH ₄) ₂ SO ₄ 10	96	83/17	1 500	10.0–20.0	Goto, Kunioka (1992) ^[13]
<i>B. subtilis</i> (chungkookjang)	Glutamic acid 20 Sucrose 50 (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 NaCl 0.5–5	120	(50–60)/(50–40)	>1 000	13.5	Ashiuchi et al. (2001) ^[4]
<i>B. subtilis</i> ZJU-7	L-glutamic acid 81 Sucrose 60 Tryptone 60 NaCl 10	24	(50–70)/(30–50)	1 240	54.4	Shi et al. (2006) ^[14]
<i>B. subtilis</i> RKY3	Glycerol 17.6 Yeast extract 2.7 Glutamic acid 59.6	24	ND	62	48.7	Jeong et al. (2010) ^[15]
<i>B. licheniformis</i> NK-03	Glutamic acid 30 Glucose 40 Biotin 250	95	2/98	1 360	10.5	Cao et al. (2010) ^[15]
谷氨酸非依赖型 Glutamic acid independent type						
<i>B. licheniformis</i> A35	Glucose 75 NH ₄ Cl 18 KNO ₃ 3	96	(50–80)/(50–20)	300	8.0	Cheng et al. (1989) ^[11]
<i>B. subtilis</i> TAM-4	Fructose 75 NH ₄ Cl 18	72	78/22	200	10.0–14.0	Ito et al. (1996) ^[9]
<i>B. subtilis</i> C1	Citric acid 22 Glycerol 170 NH ₄ Cl 7.0	144	97/3	10 200	21.4	Shil et al. (2005) ^[10]
<i>B. licheniformis</i> PGA-N-C ₁₀	Sodium citrate 40 Urea 16 Tryptone 12	50	ND	20–275	11.0	Shu et al. (2009) ^[16]
<i>B. amyloliquefaciens</i> LL3	Sucrose 50 (NH ₄) ₂ SO ₄ 2	44	1.5/98.5	470	4.4	Cao et al. (2011) ^[12]

注: ND: 未检测。

Note: ND: Not determined.

研究表明当 pH 为 6.5、增加通气量, L-谷氨酸消耗增加, 地衣芽孢杆菌 ATCC9945A 对柠檬酸和甘油的利用率很高, 但立体构型和分子量无明显变化, 建立了 γ -聚谷氨酸高产工艺。地衣芽孢杆菌 A35 可以在硝酸盐呼吸条件下合成 γ -聚谷氨酸。严格控制通气速率, 保持发酵体系中的氧分压(0.03 atm), 有利于 γ -聚谷氨酸的大量合成。该菌株利用葡萄糖、果糖、麦芽糖等来合成 γ -聚谷氨酸, 而当添加有机酸时不能合成; 含有 NH₄Cl、葡萄糖和 NO₃⁻的培养基可高效合成 γ -聚谷氨酸。Mg²⁺、Mn²⁺等影响 γ -聚谷氨酸分子量或 D-谷氨酸含量, 该特征与地衣芽孢

杆菌 ATCC9945A 相似。

γ -聚谷氨酸的发酵研究目前集中于如何达到高产高效。既可通过筛选优良菌株, 又可采用 Plackett-Burman design 设计(PB)等方法对培养基进行优化, 以达到最佳配比。Soliman 等^[17]对谷氨酸非依赖型菌株地衣芽孢杆菌 SAB-26 选择 15 个变量进行 PB 法分析, 发现 K₂HPO₄、KH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 和酪蛋白水解物对合成 γ -聚谷氨酸起最重要的正作用, 基于此方法可获得 33.5 g/L 的 γ -聚谷氨酸; Jeong 等^[5]采用 PB、CCD 设计等获得枯草芽孢杆菌 RKY3 最佳培养基配方, 即甘油 17.6 g/L、谷氨酸

59.6 g/L、酵母粉 2.7 g/L、 K_2HPO_4 2.3 g/L, γ -聚谷氨酸产量达到 48.5 g/L。上述统计学方法可以很大程度上提高 γ -聚谷氨酸产量, 使得两株菌的 γ -聚谷氨酸合成产率几乎达到了已经报道的谷氨酸非依赖型和谷氨酸依赖型的最高水平。另外, 分子遗传操作也被广泛应用于菌株的基因克隆、敲除, 转录和表达方面的研究。Su 等^[18]首次将细菌血红蛋白基因(*vgb*)用同源重组方式整合入枯草芽孢杆菌染色体中, 突变株枯草芽孢杆菌 S18-3-*vgb*⁺能正常表达 VHb, 增强了摄氧能力, 成功克服了发酵时粘度增加引起的溶氧不足, 使菌体浓度提高 1.26 倍, γ -聚谷氨酸产量增至 60.5 g/L; Yeh 等^[19]将一种高效合成表达控制序列(Synthetic expression control sequence, SECS)单拷贝形式整合入非 γ -聚谷氨酸合成菌枯草芽孢杆菌 DB430 *ywsC* 基因上游, 获得重组菌枯草芽孢杆菌 PGA6-2, 其在不添加额外谷氨酸和氯化铵的 Medium A 中产生 28 g/L 的 γ -聚谷氨酸, 而且可以作为遗传研究的选择菌株。综上, 通过将外源基因或调控元件整合入 γ -聚谷氨酸菌株的基因组中, 可以使得菌体浓度、摄氧能力或内源合成酶表达水平提高, 增加 γ -聚谷氨酸的产量。

2 γ -聚谷氨酸生物合成相关基因

γ -聚谷氨酸合成相关基因的命名, 取决于合成的 γ -聚谷氨酸是结构型(作为荚膜成分)还是分泌型(分泌至胞外)。前者基因命名为 *cap* (Capsule), 后者基因命名为 *pgs* (Polyglutamate synthase)。

2.1 炭疽芽孢杆菌荚膜基因 *capBCA*

炭疽芽孢杆菌能合成 γ -聚 D-谷氨酸, 分布在荚膜中, 成为其毒性的主要成分之一。在这种病原菌中具有 2 个质粒 pXO1 (108 kb) 和 pXO2 (951 kb)。1989 年, Makino 等^[20]通过基因互补技术, 在质粒 pXO2 上鉴定出呈簇状分布(图 2)的 3 个顺反子, 并确定其排列顺序: *capB*、*capC* 和 *capA*。这 3 个基因对消除了质粒 pXO2 的炭疽芽孢杆菌突变体的荚膜恢复至关重要、缺一不可, 并推断 γ -聚 D-谷氨酸的合成体系是一多酶复合体, 这是 γ -聚 D-谷氨酸合成基因的首次报道。他们还从 CapBCA 3 个蛋白的氨

基酸分析、定位及对理化处理的敏感性推测这些酶属于膜交联酶。Urushibata 等^[21]将 *capBCA* 基因克隆到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行表达, 发现 *capB* 是一个重叠基因, 能编码 2 个蛋白 CapB 和 CapB', CapBCA 酶以膜结合蛋白形式存在。另外, 在 *capBCA* 基因簇下游发现了编码 γ -聚 D-谷氨酸解聚酶的基因 *dep*。

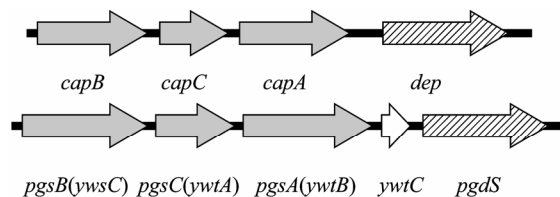


图2 炭疽芽孢杆菌荚膜基因 *capBCA* 与枯草芽孢杆菌 γ -聚谷氨酸合成酶基因 *pgsBCA*

Fig. 2 Capsule synthase genes *capBCA* of *B. anthracis* and poly (γ -glutamic acid) synthesis genes *pgsBCA* of *B. subtilis*

2.2 枯草芽孢杆菌 γ -聚谷氨酸合成酶基因 *pgsBCA*

在许多合成 γ -聚谷氨酸的枯草芽孢杆菌中都具有小的隐蔽质粒。Hara 等^[22]认为枯草芽孢杆菌(Natto)参与聚谷氨酸合成的基因位于质粒上, 其编码的 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl-transpeptidase, GGT)与从枯草芽孢杆菌中提取到的或已知的 GGT 均无序列相似性。Nagai 等^[23]发现消除质粒对合成 γ -聚谷氨酸没有影响, 将此质粒转入 γ -聚谷氨酸非合成菌枯草芽孢杆菌 168, 重组菌仍无合成能力。因此, 枯草芽孢杆菌中质粒并不编码 γ -聚谷氨酸合成基因。那么, GGT 是否具备 γ -聚谷氨酸合成能力呢? Urushibata 等^[24]构建了 *ggt* 基因缺陷菌株枯草芽孢杆菌(Natto), 其 γ -聚谷氨酸合成能力保持不变; 从枯草芽孢杆菌(Natto)与地衣芽孢杆菌培养液中分离纯化得到的 GGT 能以外肽酶形式降解 γ -聚谷氨酸, 且其活性与 γ -聚谷氨酸合成相矛盾, 因此 GGT 应该是一种胞外 γ -聚谷氨酸外解聚酶。

Ashiuchi 等^[25]从枯草芽孢杆菌 IFO3336 基因组文库中, 筛选到编码 γ -聚谷氨酸合成酶复合体的克隆, 其能在胞外合成更高分子量的 γ -聚谷氨酸; 此基因簇包含 3 个基因: *pgsB*、*pgsC* 和 *pgsA*, 与炭疽

芽孢杆菌的 *capBCA* 基因同源性分别为 66%、77% 和 50%。图 2 所示, *pgs* 基因排列成簇, 下游 *ywtC* 基因功能未知, 可能编码 γ -聚谷氨酸解聚酶(PgdS)的先导小蛋白。他们将含有 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA*、*pgsBC*、*pgsBA*、*pgsCA* 和 *pgsBCA* 等不同基因的质粒分别转化大肠杆菌发现, 只有完整的 *pgsBCA* 基因才能合成 γ -聚谷氨酸。枯草芽孢杆菌中是否还存在其他 γ -聚谷氨酸合成酶系? Achiuchi 等^[26]通过基因敲除破坏枯草芽孢杆菌 (*chungkookjang*) 的 *pgsBCA* 基因, 发现突变体不再合成 γ -聚谷氨酸, 推测 PgsBCA 系统是唯一的 γ -聚谷氨酸合成体系。Uruchibata 等^[27]从枯草芽孢杆菌 IFO16449 中获得包含 4 个开放阅读框的 4.2 kb 片段, Northern 杂交显示它们组成一个操纵子, 其中 *ywsC* (*pgsB*)、*ywtA* (*pgsC*)和 *ywtB* (*pgsA*)为 γ -聚谷氨酸合成必要基因; Western 杂交发现 YwsC 蛋白由 44 kD 的 YwsC 和 33 kD 的 YwsC'两部分组成, 且由同向重叠的 *ywsC* 基因编码, 然而两蛋白具体功能尚不清楚。

随着研究深入, 有学者对 *pgsBCA* 基因的必要性提出质疑, 他们认为枯草芽孢杆菌合成 γ -聚谷氨酸时, 基因 *pgsB* (*ywsC*)和 *pgsC* (*ywsA*)是必需的, 而 *pgsA* (*ywsB*)是非必需的。Ashiuchi^[28]利用枯草芽孢杆菌 ISW1214 构建 *pgsBCA* 基因缺陷株 MA41, 往 MA41 导入携带 *pgsBCA* 各基因的质粒构建重组菌, 由木糖诱导基因表达。结果表明, 只有转入完整 *pgsBCA* 基因的 MA41 才能合成 γ -聚谷氨酸, 而缺少 *pgsA* 基因时无法合成; *pgsB*、*pgsC*、*pgsA* 对 γ -聚谷氨酸的合成都是必要的, 这也有助于更好地解释 γ -聚谷氨酸合成酶系 PgsBCA 的定位与作用。虽然枯草芽孢杆菌 Marburg168 不能合成 γ -聚谷氨酸, 但它具有 *pgsBCA* 基因, 如果换用 *spac* 启动子就可以使 Marburg168 具备合成能力, 这说明 γ -聚谷氨酸合成酶操纵子受不同启动子控制, 转录水平的差别造成了合成能力的不同^[21]。

国内关于 γ -聚谷氨酸合成酶基因的研究主要包括: (1) 石峰^[29]从枯草芽孢杆菌 ZJU-7 基因组中扩增到 *pgsBCA*, 通过 pTrc99A 载体转化大肠杆菌 JM109, 构建的大肠杆菌 JM109 工程菌能够正常合成 γ -聚谷

氨酸。(2) 马婕等^[30]从自身不能合成 γ -聚谷氨酸的枯草芽孢杆菌 168 基因组中获得 *ywsC*、*ywtA* 和 *ywtB*, 将 3 个基因连接入 pTrcHisA, 转化大肠杆菌 TOP10 及大肠杆菌 BL21 (DE3)进行表达, 结果宿主菌均具备了 γ -聚谷氨酸合成能力。(3) 金映虹等^[31]成功分离到一株 γ -聚谷氨酸合成菌地衣芽孢杆菌 NK-03, 其合成的 γ -聚谷氨酸中 L-谷氨酸单体高达 98%, 在已报道的同种菌株中尚属首例。他们还通过 PCR 获得地衣芽孢杆菌 NK-03 的 *pgsBCA* 基因, 将其连入大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌 *E. coli-Corynebacterium glutamicum* 穿梭载体 pXMJ19 中, 成功转化大肠杆菌 JM109 和谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 构建重组菌, 实现了 γ -聚谷氨酸的异源合成^[15]。(4) 曹名锋等^[12]筛选到一株谷氨酸非依赖型 γ -聚谷氨酸合成菌解淀粉芽孢杆菌 LL3, 并成功克隆到 *pgsBCA* 基因。通过与谷氨酸依赖型枯草芽孢杆菌 IFO3336 序列比对发现, *pgsB*、*pgsC* 和 *pgsA* 3 个基因的相似性分别为 81.39%、83.33%和 73.80%。目前对谷氨酸非依赖型 γ -聚谷氨酸合成的分子生物学方面的研究报道仍然很少。笔者正在采用分子克隆或敲除手段, 考察在培养基不添加 L-谷氨酸时 LL3 菌株 *pgsBCA* 的表达水平及 γ -聚谷氨酸的产量, 为揭示 γ -聚谷氨酸的生物合成机制奠定基础。

3 γ -聚谷氨酸合成酶体系

多酶复合体大多通过一种非核糖体依赖方式(硫模板机制)进行多肽的合成, 通常对氨基酸前体具有高的立体选择性, 合成的肽段较小, 而且肽链中的氨基酸排列非常严格。对于链极长的 γ -聚谷氨酸来说, 其合成不同于硫模板机制, 采用的是一种更加独特的膜酰胺连接酶方式。

2004 年, Ashiuchi 等^[32]第一次成功分离到枯草芽孢杆菌(*chungkookjang*)的细胞膜成分, 在 ATP 和 D-谷氨酸存在下体外合成了 γ -聚谷氨酸, 而胞质和胞外酶成分都无法合成 γ -聚谷氨酸, 说明 PgsBCA 系统定位于细胞膜上; 并且没有谷氨酸消旋酶活性或其他异构化功能, 对底物没有立体专一性。但是, D-谷氨酸依赖型的 ATP 酶活性要比 L-谷氨酸依赖型

的 ATP 酶活性高,这似乎解释了合成酶系对底物的偏好性,使得 γ -聚谷氨酸中 D-谷氨酸单体比例偏高。另外,ATP 水解产生的是 ADP 而不是 AMP, γ -聚谷氨酸合成酶作为首个膜结合酰胺连接酶系,在酰胺连接酶超家族中具有构象和功能的独特性。

γ -聚谷氨酸合成酶定位在细胞膜上,给酶的分离纯化带来了困难。为深入研究复合酶系各成分的作用,Ashiuchi 等^[24]通过体外转录-翻译系统合成出酶系的 PgsB、PgsC、PgsA 3 种蛋白及蛋白的组合,并对酶系成分的稳定性及 ATP 酶活性进行研究,结果发现: PgsB 和 PgsC 的结合十分紧密,而 PgsBC 和 PgsA 的结合相对松散。结合 γ -聚谷氨酸合成酶基因序列和氨基酸序列特征,对各个成分进行了推测: PgsB 蛋白是第一个被发现的膜酰胺连接酶,具有谷氨酸依赖性的 ATP 水解酶特征; PgsC 的属间保守序列是最疏水部分,在非 γ -聚谷氨酸合成菌中尚无发现,可能与 PgsB 蛋白组成酶复合物的活性位点; PgsA 蛋白既能将酶复合体系锚定在细胞膜上,又能作为转载体将 γ -聚谷氨酸高效地从活性中心位点移开,进而实现链的延长。

γ -聚谷氨酸合成酶的研究是当前的热点和难点,特别是结合域或催化域活性位点、蛋白构象变化、各成分组合反应机制等,需要借助化学、物理学和生物信息学手段,在分离纯化复合酶的同时,解析其三维构象结构,寻找出催化位点;进而更好地了解整个酶系对底物偏好性、 γ -聚谷氨酸链延长以及转运机制等所起的作用,这将对控制 γ -聚谷氨酸的结构、分子量,以及酶法合成具有重大意义。

4 γ -聚谷氨酸应用及展望

根据 γ -聚谷氨酸独特的理化和生物学特性,人们不断开发其在水凝胶、保湿剂、成膜剂、增稠剂、分散剂、药物控释载体^[33]、基因载体^[34]、植入材料^[35]、纳米创伤敷料^[36]、化妆品、烟草、皮革制造工业、植物种子保护和食品添加剂等方面的应用。

γ -聚谷氨酸作为生物多聚物絮凝剂对饮用水、废水处理以及食品发酵工业的下游工艺十分有用。本研究室将经过 γ -射线辐射所形成的 γ -聚谷氨酸低

度交联物与聚合氯化铝(PAC)单独或复配使用,进行了校园水体絮凝实验发现,当两者复配使用在低浓度(各为 10 mg/L)时可达到良好的絮凝效果,不仅降低了单独使用 γ -聚谷氨酸的成本,而且减轻了铝离子对水体的污染。 γ -聚谷氨酸交联后易形成结构稳定的水凝胶,含水量可达 2052 倍,对人工血液和尿液等具有很强的吸水性以及良好的温度和压力保持性^[37]。

γ -聚谷氨酸侧链的阴离子羧基可结合带正电性药物,实现控释和靶向作用。研究室将水溶性较差的抗癌药物紫杉醇(Paclitaxel, TXL)和 γ -聚谷氨酸链上的羧基结合,形成稳定复合物,被靶向运输到肿瘤组织后释放出药物紫杉醇,通过 EPR 效应(肿瘤组织的渗透性和保持力效果增强)发挥作用。Hela 细胞系培养发现, TXL 和 PGA-TXL 对细胞均有抑制作用,但是 PGA-TXL 效果相对更好,主要由于 γ -聚谷氨酸提高了 TXL 的溶解性。此外, γ -聚谷氨酸与阳离子表面活性剂十四烷基三甲基溴化铵(MTAB)、十八烷基三甲基溴化铵(STAB),通过静电作用生成两亲性梳型复合物 PGA-MTAB 和 PGA-STAB,透析法包载 TXL,观察胶束纳米粒子大小。四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)测定了胶束的抑癌效果,与相同浓度的 TXL 效果类似,但是包载的药物处于内核,避免被巨噬细胞识别吞噬,可运载至靶位点缓慢释放,提高了药物的生物利用率^[38]。

γ -聚谷氨酸广阔的发展前景和巨大的开发潜力是毋庸置疑的,而亟需解决的是如何降低生产成本和控制产物结构(L-/D-单体比例)、分子量等。作者根据国内外研究现状,认为 γ -聚谷氨酸的研究方向将主要集中于两大方面:一方面继续寻求利用廉价原料高效高产的优良菌株,特别是谷氨酸非依赖型合成菌,并对发酵条件进行优化;采取与谷氨酸生产菌共混发酵^[39]法,或者利用谷氨酸棒杆菌^[40]、烟草叶肉细胞^[41]作为宿主实现 γ -聚谷氨酸合成酶表达。另一方面致力于对 γ -聚谷氨酸合成体系及合成机制的探索,通过染色体融合、基因剪接、合成酶表面修饰、氨基酸定点突变等生物化学与分子生物学方面深入研究,结合基因和蛋白组数据库、计算

机分析系统等,模拟基因表达和酶系催化,实现 γ -聚谷氨酸的体外合成控制,为大规模生产和应用起到重要作用。目前,本研究组正在进行解淀粉芽孢杆菌 LL3 全基因组测序工作,有关 γ -聚谷氨酸代谢通路的基因和蛋白序列的解析结果将值得期待。

参考文献

- [1] Ashiuchi M, Kamei T, Misono H. Poly- γ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23(2/6): 101–106.
- [2] Niemetz R, Kärcher U, Kandler O, et al. The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 249(3): 905–911.
- [3] Hezayen FF, Rehm BHA, Eberhardt R, et al. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic *Archaea*: application of a novel corrosion-resistant bioreactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(3): 319–325.
- [4] Ashiuchi M, Kamei T, Baek DH, et al. Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(5/6): 764–769.
- [5] Jeong JH, Kim JN, Wee YJ, et al. The statistically optimized production of poly (γ -glutamic acid) by batch fermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(12): 4533–4539.
- [6] Yoon SH, Do JH, Lee SY, et al. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(7): 585–588.
- [7] Gardner JM, Troy FA. Chemistry and biosynthesis of the poly (gamma-D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. Activation, racemization, and polymerization of glutamic acid by a membranous polyglutamyl synthetase complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(14): 6262–6269.
- [8] Bajaj IB, Lele SS, Singhal RS. A statistical approach to optimization of fermentative production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 826–832.
- [9] Ito Y, Tanaka T, Ohmachi T, et al. Glutamic acid independent production of poly (γ - glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1996, 60(8): 1239–1242.
- [10] Shih IL, Wu PJ, Shieh CJ. Microbial production of a poly (γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2827–2832.
- [11] Cheng C, Asada Y, Aida T. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(9): 2369–2375.
- [12] 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[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(5): 4251–4257.
- [13] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56(7): 1031–1035.
- [14] Shi F, Xu ZN, Cen P. Efficient production of poly-gamma-glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 133(3): 271–282.
- [15] 金映虹, 刘静, 刘莉, 等. 利用 *Bacillus licheniformis* NK-03 合成聚谷氨酸及其合成酶基因 *pgsBCA* 的克隆[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2008, 41(3): 57–63.
- [16] 疏秀林, 施庆珊, 冯静, 等. 一株非谷氨酸依赖型聚 γ -谷氨酸高产菌株的鉴定与诱变育种[J]. 微生物学通报, 2009, 36(5): 705–710.
- [17] Soliman NA, Berekaa MM, Abdel-Fattah YR. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(3): 259–267.
- [18] Su YS, Li X, Liu QZ, et al. Improved poly- γ -glutamic acid production by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) in *Bacillus subtilis*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(12): 4733–4736.
- [19] Yeh CM, Wang JP, Lo SC, et al. Chromosomal integration of a synthetic expression control sequence achieves poly- γ -glutamate production in a *Bacillus subtilis* strain[J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(4): 1001–1007.
- [20] Makino S, Uchida I, Terakado N, et al. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(2): 722–730.
- [21] Urushibata Y, Tokuyama S, Tahara Y. Difference in transcription levels of *cap* genes for γ -poly glutamic acid production between *Bacillus subtilis* IFO16449 and Marburg 168[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(2): 252–254.
- [22] Hara T, Nagatomo S, Ogata S, et al. The DNA sequence of γ -glutamyltranspeptidase gene of *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pUH1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology

- ogy, 1992, 37(2): 211–215.
- [23] Nagai T, Koguchi K, Itoh Y. Chemical analysis of poly- γ -glutamic acid produced by plasmid-free *Bacillus subtilis* (natto): evidence that plasmids are not involved in poly- γ -glutamic acid production[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1997, 43(3): 139–143.
- [24] Urushibata Y, Tokuyama S, Tahara Y. γ -Polyglutamic acid productivity of *Bacillus subtilis* NR-1 mutant defective of γ -glutamyltranspeptidase gene[R]. 日本生物工学会大会講演要旨集, Japan: The Society for Bioscience and Bioengineering, 1997: 115.
- [25] Ashiuchi M, Soda K, Misono H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells[J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 1999, 263(1): 6–12.
- [26] Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, et al. Physiological and biochemical characteristics of poly- γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(20): 5321–5328.
- [27] Urushibata Y, Tokuyama S, Tahara Y. Characterization of the *Bacillus subtilis* ywsC gene, involved in γ -polyglutamic acid production[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(2): 337–343.
- [28] Ashiuchi M, Shimanouchi K, Horiuchi T, et al. Genetically engineered poly- γ -glutamate producer from *Bacillus subtilis* ISW1214[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70(7): 1794–1797.
- [29] 石峰, 徐志南, 岑沛霖. 利用枯草芽孢杆菌制备 γ -聚谷氨酸[C]. 中国资源生物技术与糖工程学术研讨会论文集, 2005.
- [30] 马婕, 王丹, 李强, 等. 基因工程大肠杆菌合成 γ -聚谷氨酸[J]. 过程工程学报, 2009, 9(4): 792–795.
- [31] Cao MF, Song CJ, Jin YH, et al. Synthesis of poly (γ -glutamic acid) and heterologous expression of *pgsBCA* genes[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 67(1/2): 111–116.
- [32] Ashiuchi M, Shimanouchi K, Nakamura H, et al. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4249–4255.
- [33] Pasut G, Veronese FM. Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies[J]. Progress in Polymer Science, 2007, 32(8/9): 933–961.
- [34] Kurosaki T, Kitahara T, Kawakami S, et al. γ -Polyglutamic acid-coated vectors for effective and safe gene therapy[J]. Journal of Controlled Release, 2010, 142(3): 404–410.
- [35] Sugino A, Miyazaki T, Ohtsuki C. Apatite-forming ability of polyglutamic acid hydrogels in a body-simulating environment[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008, 19(6): 2269–2274.
- [36] 王敬, 高陪, 沈竞, 等. γ -多聚谷氨酸水凝胶制备及生物安全性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(1): 56–60.
- [37] 宋存江, 刘静, 金映红, 等. 用微生物发酵合成的聚谷氨酸制备超强吸水剂的方法[P]. 中国发明专利, 公开号: CN1730105, 2006.
- [38] 李杰. 聚谷氨酸复合物自组装胶束的制备及应用研究[D]. 南开大学本科生毕业论文, 2008.
- [39] 石峰. 微生物制备 γ -聚谷氨酸的研究[D]. 浙江大学博士学位论文, 2006.
- [40] Sung MH, Park C, Kim KS, et al. Method for Producing Poly- γ -glutamate Using Glutamate Producing *Corynebacteria*[P]. South Korea Patent, KR10-0062761, 2003.
- [41] Tarui Y, Iida H, Ono E, et al. Biosynthesis of poly- γ -glutamic acid in plants: transient expression of poly- γ -glutamate synthetase complex in tobacco leaves. Journal of Bioscience and Bioengineering[J]. 2005, 100(4): 443–448.