

Mn²⁺浓度对地衣芽孢杆菌产不同构型聚-γ-谷氨酸机理分析

马力群^{1,2} 车程川¹ 王丽敏² 于波² 杨革^{1*}

(1. 曲阜师范大学生命科学学院 山东 曲阜 273100)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要:【目的】分析 Mn²⁺对地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) WBL-3 产不同比例聚-γ-谷氨酸(γ-PGA)的机理。【方法】以枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) KH-2 为对照菌株, 克隆表达 L-谷氨酸和 D-谷氨酸代谢关键酶, 分别为谷氨酸消旋酶(GR)、D-丙氨酸转氨酶(D-DDT)和谷氨酰胺合成酶(GS)。通过体外酶活实验与体内转录水平分析, 初步探讨 Mn²⁺浓度对不同比例 γ-PGA 的生成机理。【结果】当 Mn²⁺浓度为 0 与 0.6 mmol/L 时, γ-D-PGA 所占的比例分别为 22%和 67%。在 0.6 mmol/L Mn²⁺浓度下, *B. licheniformis* WBL-3 中 GR 的催化活性(k_{cat}/K_m 值)比未添加 Mn²⁺时高, GS 只有在 Mn²⁺存在下才具有催化活性。实时荧光定量 PCR 结果表明, Mn²⁺提高了 GR、D-DDT 和 GS 的转录水平, 提高倍数分别为 2.16、4.44 和 1.84 倍。【结论】Mn²⁺激活了 GR、D-DDT 与 GS 的表达, 促进 L-谷氨酸的代谢, 使得菌体内 D-谷氨酸比例升高, 从而提高了 γ-D-PGA 的比例。

关键词: Mn²⁺, 地衣芽孢杆菌, γ-D-PGA, 谷氨酰胺合成酶

Regulation of stereochemical composition of poly-γ-glutamic acids produced by *Bacillus licheniformis* within various Mn²⁺ concentration

MA Li-Qun^{1,2} CHE Cheng-Chuan¹ WANG Li-Min² YU Bo² YANG Ge^{1*}

(1. College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273100, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] The mechanism of the generation of various kinds of poly-γ-glutamic acids (γ-PGA) from *Bacillus licheniformis* WBL-3 affected by Mn²⁺ was investigated in this study. [Methods] Three L- and D-glutamic metabolism related enzymes, glutamate racemase (GR; encoded by *racE*), D-alanine aminotransferase (D-DDT; encoded by *dat*) and glutamine synthetase (GS; encoded by *gltA*), were cloned and expressed meanwhile *B. subtilis* KH-2 was used as the control strain. The mechanism synthesis of γ-PGA by different concentration of Mn²⁺ was studied using the methods of enzyme activity, combined with transcriptional analysis. [Results] When the concentration of Mn²⁺ varied from 0 to 0.6 mmol/L, the proportion of D- isomer increased from 22%

*Corresponding author: Tel: 86-537-4456179; E-mail: yangge100@126.com

Received: October 09, 2016; Accepted: November 25, 2016; Published online (www.cnki.net): December 05, 2016

*通讯作者: Tel: 86-537-4456179; E-mail: yangge100@126.com

收稿日期: 2016-10-09; 接受日期: 2016-11-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-05

to 67%. The catalytic activity (k_{cat}/K_m) of GR in *Bacillus licheniformis* WBL-3 with 0.6 mmol/L Mn^{2+} is higher than that without Mn^{2+} . The GS activity was measured only in the presence of Mn^{2+} . RT-PCR study showed that the transcription ratio of *racE*, *dat* and *gltA* with 0.6 mmol/L Mn^{2+} to those without Mn^{2+} was 2.16, 4.44 and 1.84-fold, respectively. **[Conclusion]** Mn^{2+} activated the expression of GR, D-DDT and GS, promoted the metabolism of L-glutamic acid, increased the proportion of D-glutamic acid, and increased the proportion of γ -D-PGA.

Keywords: Mn^{2+} , *Bacillus licheniformis*, γ -D-PGA, Glutamine synthetase

聚- γ -谷氨酸(γ -PGA), 又称纳豆胶、多聚谷氨酸, 是由 L-或 D-谷氨酸通过谷氨酰键连接形成的一种高度带负电荷的谷氨酸均聚物(γ -L-PGA、 γ -D-PGA、 γ -DL-PGA)。 γ -PGA 是一种可降解的、水溶性的、对人体无毒的生物高分子, 具有可生物降解性、耐热和耐紫外线特性^[1]。因其特殊的生物学性质, γ -PGA 在生产中应用广泛。在农业肥料中添加 γ -PGA, 可以提高小麦玉米的发芽率^[2]。此外, γ -PGA 不仅可以增强土壤的持水能力, 还可以改变土壤剖面水分的分布形态^[3]。 γ -PGA 还可应用于新型生物材料制品, 作为稳定剂、冷冻保护剂及絮凝剂^[4]。

20 世纪初 γ -PGA 在革兰氏阳性菌 *Bacillus anthracis* 荚膜中首次被发现。研究发现其他种类微生物也可产生聚 γ -PGA, 如 *B. licheniformis*、*B. subtilis*、*B. megaterium* 和 *B. halodurans*^[5]。不同菌种合成的 γ -PGA 分子大小和立体化学组成也不尽相同。吴群等发现当培养基中添加 Mn^{2+} 会影响 *B. subtilis* NX-2 产 γ -PGA 的构型比, 当 Mn^{2+} 浓度从 0 到 0.09 g/L, γ -D-PGA 所占的比例从 18% 增加到 77%, γ -D-PGA 升高的原因主要是因为谷氨酸消旋酶的活力提高了 0.24 U/mg^[6]。 Mn^{2+} 还可以影响 γ -PGA 的产量, 提高碳源的利用率, 延长发酵时间, Cromwick 等研究发现在培养基中添加 Mn^{2+} γ -PGA 的产量增加了 12 g/L, 但是对于 Mn^{2+} 浓度为什么可以影响产物立体特异性, 只是提出了一种理性假设, 在 Mn^{2+} 存在下, D-谷氨酸特异性酶具有更高活性, 或者可以抑制 L-谷氨酸特异性酶^[7]。

不同构型的 γ -PGA 具有不同的用途。 γ -L-PGA 具有更佳生物相容性, 高 L-型含量的 γ -PGA 广泛应用于化妆品中。许多药物可以对恶性肿瘤起作用, 但由于其水溶性而难以应用, 而高 D-型含量的

γ -PGA 不易降解, 因此药物的短链与高 D-型含量的 PGA 缀合而成为治疗剂。由于高 D-型 γ -PGA 较为稳定, 为了产生适用于人类的高性能粘合剂, 已经提出了 PGA 胶^[6]。因此生产单一构型的 γ -PGA (γ -L-PGA 或者 γ -D-PGA) 具有重要意义。研究表明 Mn^{2+} 可以改变 *B. licheniformis* 产 γ -D-PGA 的比例, 而此方面的研究鲜有报道。 γ -PGA 是微生物次级代谢产物, L-谷氨酸或者 D-谷氨酸在 γ -PGA 合成酶的作用下生成 γ -PGA。由于 γ -PGA 合成酶没有构型的区分, 因此底物 L-或 D-谷氨酸的比例决定了 γ -PGA 中 γ -L-PGA 或者 γ -D-PGA 的比例^[8]。

本研究以地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) WBL-3 为研究对象, 以枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) KH-2 作为对照, 分析 Mn^{2+} 对 L-谷氨酸与 D-谷氨酸代谢关键酶、谷氨酸消旋酶(GR, 编码基因 *racE*)、D-丙氨酸转氨酶(D-DDT, 编码基因 *dat*) 和谷氨酰胺合成酶(GS, 编码基因 *gltA*) 的催化活性与转录水平的影响, 探讨 Mn^{2+} 对 *B. licheniformis* WBL-3 生成不同比例 γ -PGA 的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Bacillus subtilis* KH-2 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 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。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) WBL-3 为本实验室保藏菌株。*Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3) 购自天根生化科技(北京)有限公司。表达载体 pET-28a 为本实验室保存。pET-28a-*racE*、pET-28a-*dat*、pET-28a-*gltA* 为本研究构建, 分别含有来自 *Bacillus*

subtilis KH-2、*Bacillus licheniformis* WBL-3 的谷氨酸消旋酶基因、D-丙氨酸转氨酶基因和谷氨酰胺合成酶基因。

1.1.2 培养基及培养条件: *B. licheniformis* WBL-3 和 *B. subtilis* KH-2 接种于发酵基础培养基(g/L)^[7] 37 °C、200 r/min 振荡培养。含有重组质粒的 *E. coli* 接种于 LB 培养基(含 40 mg/L 卡那霉素)中^[9], 37 °C、200 r/min 振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 连接酶、*ExTaq* 酶、Real-time PCR 试剂盒等均购自北京六合通经贸有限公司; RNA 反转录试剂盒、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、纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒购自美国 Omega Biotek 公司; Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。PCR 仪购自北京六合通经贸有限公司; 扫胶仪购自上海天能科技有限公司; 蛋白脱色摇床购自海门麒麟医

用仪器厂; 超声破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 离心机购自湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆和表达: 根据基因组信息设计引物(表 1), 分别以地衣芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌为模板, 使用 *Pfu* DNA 聚合酶分别扩增得到 6 个基因。将基因片段经合适的限制性内切酶酶切后连接到表达载体 pET-28a 上, 构建得到重组质粒 pET-28a-*racE*、pET-28a-*dat*、pET-28a-*gltA*, 重组质粒经双酶切并测序验证正确后分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中。

分别将含 6 种重组载体的 *E. coli* BL21(DE3)以 1%接种量接种到 LB 液体培养基中(含 40 mg/L 卡那霉素), 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 0.8 mmol/L 的 IPTG、GR 与 D-DDT 蛋白 16 °C 诱导表达过夜, GS 蛋白 37 °C 诱导表达 6 h。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

目的基因 Target gene	序列 Sequence (5'→3')
枯草芽孢杆菌 KH-2 <i>racE</i> 扩增引物 <i>Bacillus subtilis</i> KH-2 <i>racE</i> amplification primer	GCGGGATCCTTGTTGGAACAACCAATAGG GCGAAGCTTCTACTTTTTAATCGGTC
地衣芽孢杆菌 WBL-3 <i>racE</i> 扩增引物 <i>Bacillus licheniformis</i> WBL-3 <i>racE</i> amplification primer	GCGGGATCCTTGATCAACCGATAGGAGTCA GCGGAATTCCTATTTTACAGCGGTCTCCT
枯草芽孢杆菌 KH-2 <i>dat</i> 扩增引物 <i>Bacillus subtilis</i> KH-2 <i>dat</i> amplification primer	GCGGAATTCCTTGAAAGAAGATGAATACA GCGCTCGAGTTCTCCATCCCCTTATTTT
地衣芽孢杆菌 WBL-3 <i>dat</i> 扩增引物 <i>Bacillus licheniformis</i> WBL-3 <i>dat</i> amplification primer	GCGGGATCCATGAAAGTTCTTTTTAACGGCC GCGGAATTCCTAAACCCTTTGGCTGTTCCG
枯草芽孢杆菌 KH-2 <i>gltA</i> 扩增引物 <i>Bacillus subtilis</i> KH-2 <i>gltA</i> amplification primer	GCGGGATCCATGGCAAAGTACACTAGA GCGCTCGAGTTAATACTGAGACATATACT
地衣芽孢杆菌 WBL-3 <i>gltA</i> 扩增引物 <i>Bacillus licheniformis</i> WBL-3 <i>gltA</i> amplification primer	GCGGGATCCATGGCAAAGTATACAAGA GCGCTCGAGTTAATACTGAGACATATACT
<i>racE</i> Real-time PCR 引物 <i>racE</i> Real-time PCR primer	TAGGAGTCATTGATTCGGGAGT ACGAGCATTTAATATGGTGGC
<i>dat</i> Real-time PCR 引物 <i>dat</i> Real-time PCR primer	GAAGCATCAATACGGAGCAGG TGTCGTCCGCAGTAATAGCC
<i>gltA</i> Real-time PCR 引物 <i>gltA</i> Real-time PCR primer	CGGTTCAAACGGAAAGACG GAATGGTGATAATCGAGATGGG
16S rRNA 基因 16S rRNA gene	GGAGGGTCATTGGAAACTGG AGCACTAAAGGGCGGAAAAC

1.2.2 重组蛋白的纯化: 由于重组蛋白 N 端含组氨酸标签 His-Tag, 因此使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化。菌体的超声波破碎、层析柱的平衡、可溶性蛋白的上样及杂蛋白的清洗等过程参照试剂盒手册进行。杂蛋白用洗脱液(pH 7.9 Tris-HCl 4 mmol/L, 咪唑 60 mmol/L, NaCl 0.1 mol/L)进行洗脱, 利用 pH 7.9 Tris-HCl 4 mmol/L, 咪唑 300 mmol/L, NaCl 0.1 mol/L 进行目的蛋白的洗脱并通过超滤管脱盐、浓缩后于 -80°C 保存。收集各阶段的洗脱液进行 SDS-PAGE (13%分离胶, 4%浓缩胶)电泳和考马斯亮蓝(R-250)染色分析^[10]。

1.2.3 体外酶活测定: GR 与 D-DDT 活性测定采用 HPLC 检测 D-谷氨酸的生成, 酶活单位(1 U)定义为: 在特定条件下, 每分钟产生 1 μmol D-谷氨酸所需要的酶量。GR 具体反应体系(100 μL)为 4 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 4 mmol/L L-谷氨酸, 酶液适量, 测定温度为 37°C 。反应 4 min 后加入 6 mmol/L 盐酸终止反应, 空白对照中不含 L-谷氨酸^[11]。D-DDT 具体反应体系(200 μL)为 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 25 mmol/L D-丙氨酸, 10 mmol/L α -酮戊二酸, 0.05 mmol/L 维生素 B₆, 酶液适量, 测定温度为 37°C 。反应 10 min 后加入 6 mmol/L 盐酸终止反应, 空白对照中不含 D-丙氨酸^[12]。GS 活性测定采用分光光度法^[11], 以盐酸羟胺为底物, 利用生成物与 Fe 离子发生显色反应于 540 nm 处检测来表征^[13]。具体反应体系(500 μL)为: 咪唑盐酸缓冲液(pH 7.0) 25 mmol/L, 盐酸羟胺 25 mmol/L, ATP 2 mmol/L, 10 mmol/L L-谷氨酸, 酶液适量, 测定温度为 37°C 。反应 20 min 后, 加入 1 mL 终止缓冲液(5.5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2%三氯乙酸, 0.78%盐酸), 空白对照中不含 L-谷氨酸。GS 的一个酶活单位(1 U)定义为: 在特定条件下, 每分钟生成 1 μmol γ -谷氨酰羟肟酸所需要的酶量。

1.2.4 重组蛋白的动力学参数测定: 在测得以上各酶的最适反应温度和最适 pH 后, 在最适酶活测定条件下, 以不同浓度的底物测定酶活, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 计算 GR、D-DDT、

GS 的 K_m 值、 V_{\max} 值、 k_{cat} 值以及 k_{cat}/K_m 值^[14]。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析: 提取 24 h *B. licheniformis* WBL-3 菌体 RNA, 电泳检测样品完整性, 并在 260 nm 波长下测定样品浓度。不同浓度 RNA 样品分别作为模板进行反转录生成 cDNA。以 16S rRNA 基因为内参, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 *B. licheniformis* WBL-3 中各关键酶编码基因和 16S rRNA 基因序列的高特异性引物(表 1)。采用 SYBR Premix ExTaq (TaKaRa)进行实时定量 PCR (RT-PCR), 每个样品做 3 个平行且保证 3 个平行的误差在 15%之内。

1.2.6 聚- γ -谷氨酸构型方法分析: 发酵结束后, 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min 后除去菌体, 向上清液中加入 4 倍体积的冷乙醇, 冷藏过夜后离心并倾去上清液, 将沉淀重新溶解在去离子水中, 透析过夜。将透析后的溶液冷冻干燥, 用 6 mol/L HCl, 105°C 水解 10 h, 加入 6 mol/L NaOH 中和, 水解物用 HPLC 检测 L-谷氨酸和 D-谷氨酸的量来测定其比例。测定条件为: 手性柱流动相为 2 mmol/L CuSO_4 , 流速 0.5 mL/min, 柱温 25°C , 进样 5 μL , 紫外检测器检测, 检测波长 254 nm^[15]。

2 结果与分析

2.1 不同 Mn^{2+} 浓度下 γ -PGA 构型变化

在不同 Mn^{2+} 浓度下, *B. licheniformis* WBL-3 产 γ -L-PGA 和 γ -D-PGA 的比例见表 2。 Mn^{2+} 浓度为 0 时 γ -D-PGA 仅占 22%, 当 Mn^{2+} 浓度为 0.6 mmol/L 时, γ -D-PGA 构型所占的比例最高, 达到 67%, 继续提高 Mn^{2+} 浓度, 发酵液中 γ -D-PGA 所占的比例出现降低的趋势。而对比菌株 *B. subtilis* KH-2, 在含有不同的 Mn^{2+} 浓度(0、0.6、1.2、1.8 和 2.4 mmol/L)的发酵液中, γ -D-PGA 所占的比例稳定, 见表 2。上述结果表明, Mn^{2+} 对 *B. licheniformis* 产 D-/L-构型 γ -PGA 的比例有影响, 而不会影响 *B. subtilis* KH-2 产不同构型 γ -PGA 的比例。

2.2 重组蛋白的纯化

鉴于单体 L-谷氨酸和 D-谷氨酸的比例决定着

表 2 不同 Mn²⁺浓度下 *B. licheniformis* WBL-3 与 *B. subtilis* KH-2 γ-PGA 构型比

Table 2 γ-PGA stereochemical composition of *B. licheniformis* WBL-3 and *B. subtilis* KH-2 with various Mn²⁺ concentration

Mn ²⁺ concentration (mmol/L)	γ-L-PGA (%)	γ-D-PGA (%)
0 ^a	78	22
0 ^b	14	86
0.6 ^a	33	67
0.6 ^b	15	85
1.2 ^a	34	66
1.2 ^b	15	85
1.8 ^a	40	60
1.8 ^b	16	84
2.4 ^a	42	58
2.4 ^b	15	85

注: ^a *B. licheniformis* WBL-3 中 γ-PGA 构型比; ^b *B. subtilis* KH-2 中 γ-PGA 构型比。

Note: ^a: γ-PGA stereochemical composition of *B. licheniformis* WBL-3; ^b: γ-PGA stereochemical composition of *B. subtilis* KH-2.

γ-PGA 中 D-/L-构型的比例,以 L-谷氨酸与 D-谷氨酸代谢关键酶——GR (EC5.1.1.3, 催化 L-谷氨酸与 D-谷氨酸之间相互转化)、D-DDT (EC2.6.1.21, 催化 D-谷氨酸与 D-丙氨酸之间相互转化)和 GS (EC6.3.1.2, 催化 L-谷氨酸与 L-谷氨酰胺之间相互转化)为研究对象。分别构建重组质粒 pET-28a-*racE*、pET-28a-*dat*、pET-28a-*gltA*, 经双酶切和测序验证

正确后,分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中进行诱导表达, Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行蛋白纯化。纯化后的蛋白利用 SDS-PAGE 进行检测,得到单一条带(图 1),其中 GR 为 30 kD, D-DDT 为 31 kD, GS 为 49 kD,与预测目的蛋白大小一致。收集纯化的蛋白进行后续的酶学性质研究。

2.3 体外酶活

在各自最适反应条件下分别测定 Mn²⁺为 0 与 0.6 mmol/L (0.1 g/L)下的 GR、D-DDT 和 GS 的动力学参数,计算其 K_m 值、V_{max} 值、k_{cat} 值以及 k_{cat}/K_m 值(表 3, 表 4)。

B. subtilis KH-2 中 Mn²⁺并未对 3 种代谢关键酶起到激活作用,而对于 *B. licheniformis* WBL-3 Mn²⁺对 GR 起到一定的促进作用,其中底物亲和力升高,催化效率(k_{cat}/K_m 值)升高。体外酶学性质研究得出 Mn²⁺对 GR 的催化效率和结合能力都比没有 Mn²⁺存在时高。只有在 Mn²⁺存在时才检测到 GS 的活性,由于 GS 催化 L-谷氨酸生成 L-谷氨酰胺,而 GR 催化 L-谷氨酸转化生成 D-谷氨酸,因此,在 Mn²⁺存在下,体系中 L-谷氨酸积累减少,而 D-谷氨酸积累增加,导致发酵液中 γ-D-PGA 所占的比例增加。

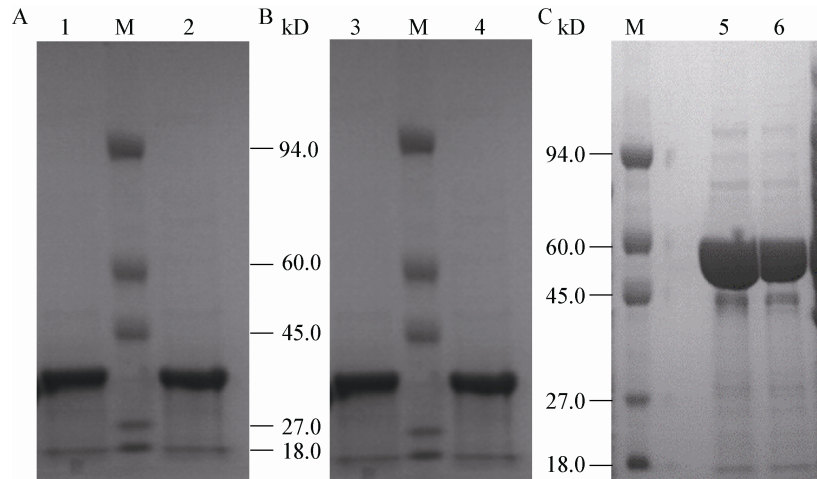


图 1 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 1 Analysis of purified proteins by SDS-PAGE

注: M: 蛋白分子量标准。A: 重组蛋白 GR; 1: 来源于 *B. subtilis* KH-2 的 GR; 2: 来源于 *B. licheniformis* WBL-3 的 GR。B: 重组蛋白 D-DDT; 3: 来源于 *B. subtilis* KH-2 的 D-DDT; 4: 来源于 *B. licheniformis* WBL-3 的 D-DDT。C: 重组蛋白 GS; 5: 来源于 *B. subtilis* KH-2 的 GS; 6: 来源于 *B. licheniformis* WBL-3 的 GS。

Note: M: Protein molecular weight marker. A: Purified proteins of GR; 1: GR of *B. subtilis* KH-2; 2: GR of *B. licheniformis* WBL-3. B: Purified proteins of D-DDT; 3: D-DDT of *B. subtilis* KH-2; 4: D-DDT of *B. licheniformis* WBL-3. C: Purified proteins of GS; 5: GS of *B. subtilis* KH-2; 6: GS of *B. licheniformis* WBL-3.

表3 *B. licheniformis* WBL-3 和 *B. subtilis* KH-2 中 GS、D-DDT、GR 无 Mn^{2+} 存在的动力学参数
Table 3 Kinetic parameters of GS, D-DDT, GR from *B. licheniformis* WBL-3 and *B. subtilis* KH-2 without Mn^{2+}

酶 Enzyme	K_m (mmol/L)	V_{max} (mmol/(min·mg))	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (L·min/mmol)
GR ^a	11.44±2.10	2.75±0.42	164.42±1.22	14.61±2.60
GR ^b	15.51±2.10	4.78±0.68	291.79±3.43	18.98±2.39
D-DDT ^a	12.92±1.0	1.14±0.02	153.80±3.41	14.76±0.58
D-DDT ^b	7.28±0.47	0.70±0.58	107.31±2.70	11.94±0.68
GS ^a	ND	ND	ND	ND
GS ^b	ND	ND	ND	ND

注：^a：*B. licheniformis* WBL-3 中酶活力测定；^b：*B. subtilis* KH-2 中酶活力测定；ND：未检测到产物生成。

Note: ^a: The activity was assayed from *B. licheniformis* WBL-3; ^b: The activity was assayed from *B. subtilis* KH-2; ND: Product was not detected.

2.4 谷氨酰胺合成酶体内酶活检测

为了验证 GS 体内活性，通过 HPLC 对 *B. licheniformis* WBL-3 菌体破碎粗酶液中的 GS 进行检测^[16]。在未添加 Mn^{2+} 的反应液中未检测到谷氨酰胺的生成，而 Mn^{2+} 存在的反应液中，则检测到 0.71 mmol/L 的谷氨酰胺生成(图 2)。以上结果与体内酶活实验吻合，进一步说明了 *B. licheniformis* WBL-3 菌体内积累的 L-谷氨酸浓度降低，使得 γ -D-PGA 比例增加。

2.5 γ -D-PGA 合成相关基因体内转录水平的变化

虽然在体外、体内酶活实验检测到 Mn^{2+} 对 *B. licheniformis* WBL-3 中谷氨酸消旋酶与谷氨酰胺合成酶活力具有促进作用，但是 Mn^{2+} 是否在菌体生长过程中对关键酶基因转录起到一定的促进

作用呢？进一步测定了 Mn^{2+} 对关键酶编码基因转录水平的影响。通过 RT-PCR 实验检测了不同 Mn^{2+} 浓度下(0 与 0.6 mmol/L) *B. licheniformis* WBL-3 在生长对数期谷氨酸代谢关键基因(谷氨酸消旋酶编码基因 *racE*、D-丙氨酸转氨酶编码基因 *dat* 和谷氨酰胺合成酶编码基因 *gltA*)的转录水平。实验数据分析采用经典的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法，结果如图 3 所示。在 Mn^{2+} 作用下 *racE* 转录水平是无 Mn^{2+} 的 2.16 倍，*dat* 的转录水平是无 Mn^{2+} 的 4.44 倍，*gltA* 的转录水平是无 Mn^{2+} 的 1.84 倍。由此可见，*B. licheniformis* WBL-3 中 L-谷氨酸代谢基因和 D-谷氨酸合成基因的转录水平在 Mn^{2+} 存在条件下均高于无 Mn^{2+} ，进一步证实了 Mn^{2+} 的存在，使得体系中 D-谷氨酸积累增加，导致发酵液中 γ -D-PGA 所占的比例增加。

表4 *B. licheniformis* WBL-3 和 *B. subtilis* KH-2 中 GS、D-DDT、GR 有 Mn^{2+} (0.6 mmol/L) 存在的动力学参数
Table 4 Kinetic parameters of GS, D-DDT, GR from *B. licheniformis* WBL-3 and *B. subtilis* KH-2 at Mn^{2+} concentration of 0.6 mmol/L

酶 Enzyme	K_m (mmol/L)	V_{max} (mmol/(min·mg))	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (L·min/mmol)
GR ^a	9.89±1.76	2.52±0.29	177.00±2.80	18.12±2.90
GR ^b	19.26±0.37	5.37±0.03	273.90±2.79	14.61±0.13
D-DDT ^a	15.56±0.34	1.43±0.16	156.60±1.69	11.90±0.37
D-DDT ^b	6.86±0.29	0.69±0.10	81.64±2.20	10.10±0.11
GS ^a	1.23±2.79	0.06±0.02	45.45±2.30	36.65±3.20
GS ^b	ND	ND	ND	ND

注：^a：*B. licheniformis* WBL-3 中酶活力测定；^b：*B. subtilis* KH-2 中酶活力测定；ND：未检测到产物生成。

Note: ^a: The activity was assayed from *B. licheniformis* WBL-3; ^b: The activity was assayed from *B. subtilis* KH-2; ND: Product was not detected.

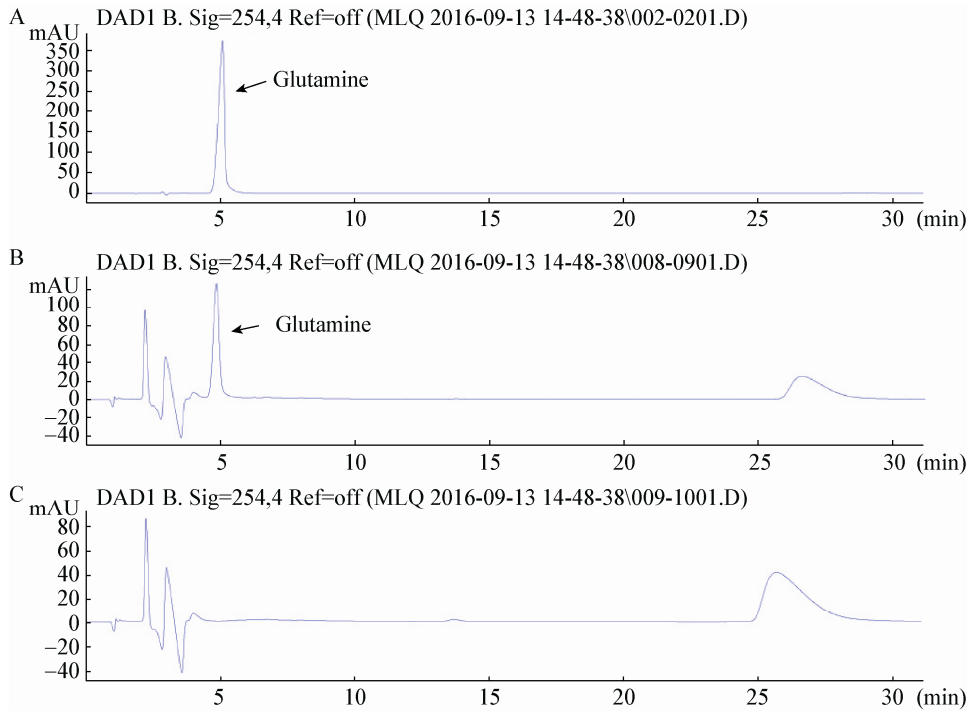


图2 HPLC测定GS活性

Figure 2 Analysis of the glutamine synthetase activity of HPLC

注：A：谷氨酰胺标准品；B：GS反应；C：加入失活GS对照反应。

Note: A: The standard of glutamine; B: The reduction of GS; C: The back of GS.

3 讨论

γ-PGA的手型构型对抗原抗体特异性研究具有重要意义^[17]。只有 *B. anthracis* 合成的 γ-PGA 由 100% D-谷氨酸组成，但是由于该菌具有毒性，并不能进行工业化生产 γ-PGA。*B. licheniformis* WBL-3

是一株具有代表性的高产 γ-PGA 的菌株。本研究分别从基因、转录和蛋白水平对不同 Mn²⁺浓度下的不同比例 γ-D-PGA 和 γ-L-PGA 进行了比较分析，揭示了 *B. licheniformis* WBL-3 产不同比例 γ-D-PGA 的机理，为 γ-D-PGA 合成菌株的遗传性改造奠定理论基础。

从 L-谷氨酸到 D-谷氨酸的转化有两条不同的途径(图 4)，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^[2]，Ashiuchi 等于 1998 年在 *B. subtilis* IFO 3336 中没有检测到 D-丙氨酸转氨酶的活性^[18]，而在 *B. subtilis* NX-2 中 Mn²⁺使谷氨酸消旋酶的活性提高 2 倍，从而 D-构型的 γ-PGA 从 18% 增加到 77%^[19]。谷氨酰胺合成酶是催化 L-谷氨酸代谢成 L-谷氨酰胺^[20]。然而，关于 Mn²⁺对地衣芽孢杆菌 γ-PGA 构型比的研究国内未见报道。

本研究中 *B. licheniformis* WBL-3 的 3 个 L、D-谷氨酸代谢关键酶中的谷氨酰胺合成酶只有在 Mn²⁺

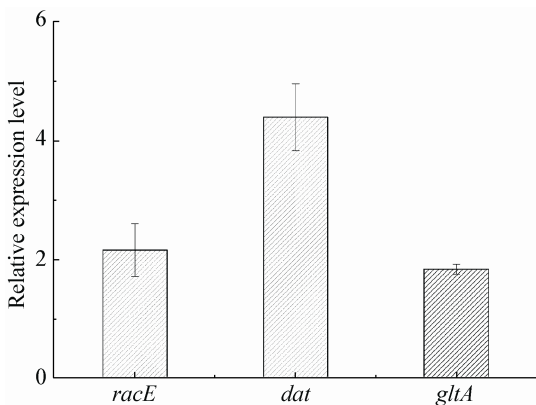


图3 RT-PCR分析关键酶编码基因转录水平

Figure 3 Determination of the relative transcription levels of key enzymes' encoding genes by RT-PCR analyses

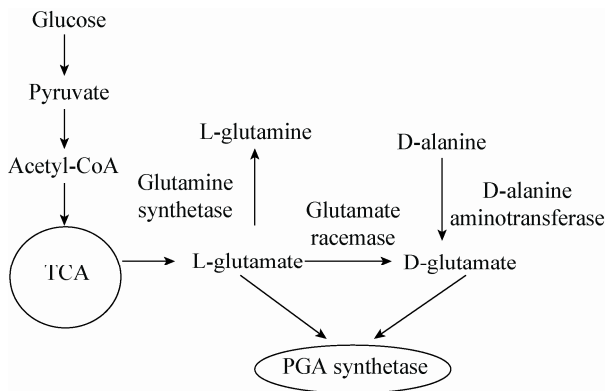


图4 聚 γ 谷氨酸合成途径示意图

Figure 4 Simplified diagram of γ -PGA biosynthetic pathway

存在下才具有活性，而谷氨酸消旋酶在 0.6 mmol/L Mn^{2+} 条件下的催化活性升高， K_m 值减小，说明 Mn^{2+} 对地衣芽孢杆菌中的谷氨酸消旋酶有一定的促进作用。而对于 *B. subtilis* KH-2 并未发现在 Mn^{2+} 存在下对关键酶酶活有促进作用。综上所述， Mn^{2+} 不仅可以促进 L-谷氨酸合成 L-谷氨酰胺，而且可以提高谷氨酸消旋酶的催化活性，从而 γ -L-PGA 降低， γ -D-PGA 增加。转录水平上的研究也证实， Mn^{2+} 可以提高 *B. licheniformis* WBL-3 中 L-谷氨酸代谢基因与 D-谷氨酸生产基因的转录水平。这也初步阐明了不同 Mn^{2+} 浓度对地衣芽孢杆菌产不同比例 γ -PGA 的机理。

参考文献

- [1] Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria[J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(5): 1091-1098
- [2] Kongklor N, Luo HZ, Shi ZP, 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
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. 2nd Edition. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Ashiuchi M. Microbial production and chemical transformation of poly- γ -glutamate[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(6): 664-674
- [5] 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
- [6] Wu Q, Xu H, Xu L. Regulation of stereochemical composition of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus subtilis* NX-2[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(3): 458-461 (in Chinese)
吴群, 徐虹, 许琳. *Bacillus subtilis* NX-2 合成 γ -聚谷氨酸的立体构型调控机理[J]. 过程工程学报, 2006, 6(3): 458-461
- [7] Cromwick AM, Gross RA. Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC9945A physiology and γ -poly (glutamic acid) formation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1995, 17(5): 259-267
- [8] Shih IL, van YT. The production of poly- (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(3): 207-225
- [9] Fan XR, Sheng P, Li GW. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 1989: 67-72 (in Chinese)
范秀容, 沈萍, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989: 67-72
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [11] 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)[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(7): 1650-1655
- [12] Martinez-carrion M, Jenkins WT. Some properties of a D-alanine D-glutamate aminotransferase purified from *Bacillus subtilis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1963, 12(5): 365-368
- [13] Bender RA, Janssen KA, Resnick AD, et al. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 129(2): 1001-1009
- [14] Zheng ZJ, Sheng BB, Ma CQ, et al. Relative catalytic efficiency of *ldhL*- and *ldhD*-encoded products is crucial for optical purity of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3480-3483
- [15] Jiang F, Qi GF, Ji ZX, et al. Expression of *glr* gene encoding glutamate racemase in *Bacillus licheniformis* WX-02 and its regulatory effects on synthesis of poly- γ -glutamic acid[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(9): 1837-1840
- [16] Kingdon HS, Hubbard JS, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase. XI. The nature and implications of a lag phase in the *Escherichia coli* glutamine synthetase reaction[J]. Biochemistry, 1968, 7(6): 2136-2142
- [17] Hubbard A, Thorkildson P, Welch WH, et al. Stereo-selective binding of monoclonal antibodies to the poly- γ -d-glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis*[J]. Molecular Immunology, 2013, 55(3/4): 337-344
- [18] Ashiuchi M, Tani K, Soda K, et al. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly- γ -glutamate[J]. Journal of Biochemistry, 1998, 123(6): 1156-1163
- [19] 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
- [20] Fedorova K, Kayumov A, Woyda K, et al. Transcription factor TnrA inhibits the biosynthetic activity of glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*[J]. FEBS Letters, 2013, 587(9): 1293-1298