

# D,L-肽链内切酶基因 *cwlO* 缺失促进地衣芽孢杆菌利用 L-谷氨酰胺合成聚 $\gamma$ -谷氨酸

王思<sup>1</sup>, 李鑫<sup>\*1</sup>, 彭芳<sup>1</sup>, 刘军<sup>1</sup>, 占杨杨<sup>2</sup>, 陈守文<sup>\*2</sup>

1 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430023

2 湖北大学生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

王思, 李鑫, 彭芳, 刘军, 占杨杨, 陈守文. D,L-肽链内切酶基因 *cwlO* 缺失促进地衣芽孢杆菌利用 L-谷氨酰胺合成聚  $\gamma$ -谷氨酸[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2798-2811.

WANG Si, LI Xin, PENG Fang, LIU Jun, ZHAN Yangyang, CHEN Shouwen. Deletion of *cwlO* facilitates the L-glutamine utilization of *Bacillus licheniformis* for poly- $\gamma$ -glutamic acid production[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2798-2811.

**摘要:** 【背景】聚  $\gamma$ -谷氨酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是一种由芽孢杆菌代谢产生的同质氨基酸聚合物, 在众多领域具有广泛的应用潜力。芽孢杆菌 *cwlO* 表达一种 D,L-肽链内切酶, 其对  $\gamma$ -PGA 合成的影响机理尚不清晰。【目的】探究缺失 *cwlO* 对以不同前体发酵  $\gamma$ -PGA 的影响及其机制。

【方法】以地衣芽孢杆菌 WX-02 为出发菌株, 构建缺失 *cwlO* 的重组菌。在 3 L 发酵罐条件下对比重组菌和野生菌利用不同前体发酵产  $\gamma$ -PGA 的发酵性能, 并通过转录水平差异分析、荧光倒置显微镜观察、细胞壁肽聚糖含量和组分分析造成重组菌和野生菌发酵性能差异的原因。【结果】缺失 *cwlO* 的重组菌对 L-谷氨酰胺的代谢利用效率显著提高, 以 L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸为混合前体时, 重组菌的  $\gamma$ -PGA 产量达到 36.3 g/L, 比野生菌高 48.8%。RT-qPCR 结果表明, 相较于野生菌, 重组菌在利用 L-谷氨酰胺时  $\gamma$ -PGA 合成途径和呼吸链上关键基因转录水平均上调。荧光倒置显微镜观察发现重组菌细胞形态相比野生菌变短变圆, 细胞壁肽聚糖含量和组分测定发现, 重组菌细胞壁肽聚糖含量降低, 且肽聚糖中蛋白质占比减少。【结论】地衣芽孢杆菌 *cwlO* 的缺失引起细胞壁肽聚糖含量降低, 促进了菌株对 L-谷氨酰胺的利用, 强化了  $\gamma$ -PGA 的合成, 这为探究 *cwlO* 对  $\gamma$ -PGA 合成的影响提供了新的思路和研究基础。

**关键词:**  $\gamma$ -聚谷氨酸; *cwlO*; L-谷氨酰胺; 地衣芽孢杆菌

资助项目: 湖北省重点研发计划(2022BCA075); 武汉轻工大学科研项目(2022RZ027)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hubei Province (2022BCA075) and the Research Funding of Wuhan Polytechnic University (2022RZ027).

\*Corresponding authors. E-mail: LI Xin, lixin084@163.com; CHEN Shouwen, chenshouwen@hubu.edu.cn

Received: 2022-10-11; Accepted: 2022-11-14; Published online: 2023-01-03

## Deletion of *cwlO* facilitates the L-glutamine utilization of *Bacillus licheniformis* for poly- $\gamma$ -glutamic acid production

WANG Si<sup>1</sup>, LI Xin<sup>\*1</sup>, PENG Fang<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>1</sup>, ZHAN Yangyang<sup>2</sup>, CHEN Shouwen<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

**Abstract:** [Background] Poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA), a homogeneous amino acid polymer produced by *Bacillus*, has application potential in a variety of fields. The *cwlO* in *Bacillus* can express a D,L-endopeptidase to influence  $\gamma$ -PGA production, the underlying mechanism of which remains to be clarified. [Objective] To explore the effect of *cwlO* deletion on  $\gamma$ -PGA production by using different precursors and decipher the underlying mechanism. [Methods] The recombinant strain with *cwlO* deleted was constructed on the basis of *Bacillus licheniformis* WX-02. The fermentation for  $\gamma$ -PGA production was conducted in 3-L fermenters with different precursors, and the performance was compared between the recombinant and the wild type. Moreover, the mechanism for the performance difference was explored by the analysis of transcriptional levels, cell morphology observation via inverted fluorescence microscopy, and the content measurement of peptidoglycan and its components. [Results] The *cwlO*-deleted recombinant showed an improved efficiency on L-glutamine assimilation. With L-glutamine and L-glutamic acid as the mixed precursor, the recombinant showed the  $\gamma$ -PGA production of 36.3 g/L, which increased by 48.8% compared with that of the wild type. The results of RT-qPCR indicated that the transcriptional levels of the key genes involved in  $\gamma$ -PGA synthesis and respiratory chain were up-regulated in the recombinant with L-glutamine as the precursor, compared with those of the wild type. The recombinant cells became shorter and rounder. The peptidoglycan content in the cell wall and the protein content in peptidoglycan of the recombinant were greatly lower than those of the wild type. [Conclusion] Deletion of *cwlO* in *B. licheniformis* decreased the peptidoglycan content in the cell wall and promoted L-glutamine utilization, which enhanced  $\gamma$ -PGA production. This study provides a new insight and research basis for further research on the role of *cwlO* in  $\gamma$ -PGA production.

**Keywords:** poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA); *cwlO*; L-glutamine; *Bacillus licheniformis*

聚  $\gamma$ -谷氨酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA) 是一种由 D-谷氨酸和 L-谷氨酸通过  $\gamma$ -酰胺键连接的同质氨基酸聚合物, 具有水溶性好、成膜性佳、可螯合金属离子、生物安全性好、可自然降解等特性<sup>[1]</sup>。目前,  $\gamma$ -PGA 主要作为肥料增效剂和化妆品保湿剂原料, 应用于农业种植和日用化工领域<sup>[2]</sup>。此外,  $\gamma$ -PGA 及其衍生物

还可以作为环保絮凝剂、营养强化助剂、药物载体应用于环保、食品、医药等领域<sup>[3]</sup>。作为一种绿色环保的生物高分子材料,  $\gamma$ -PGA 的市场需求量正在快速上升, 如何高效发酵合成  $\gamma$ -PGA 是目前研究的重点。

芽孢杆菌是合成  $\gamma$ -PGA 的主要菌株, 目前,  $\gamma$ -PGA 合成与分解相关的基因在芽孢杆菌中被

广泛研究,包括碳源(葡萄糖、甘油等)利用相关基因<sup>[4-5]</sup>、谷氨酸和  $\gamma$ -PGA 合成相关基因<sup>[6-8]</sup>及  $\gamma$ -PGA 水解相关基因<sup>[9-10]</sup>。其中, *cwlO* 在芽孢杆菌中表达一种 D,L-肽链内切酶(cell wall D/L-endopeptidase, CwlO),在细胞增殖过程中参与肽聚糖的局部水解<sup>[11]</sup>。有研究者在枯草芽孢杆菌 NAFM5 中对多种肽聚糖水解酶编码基因(*lytE*、*lytF*、*cwlO* 和 *cwlS*)进行了单敲除,发现敲除了 *cwlO* 的重组菌其  $\gamma$ -PGA 产量是野生菌的 2 倍,且  $\gamma$ -PGA 的分子量显著提高,认为 *cwlO* 表达的 D,L-肽链内切酶在  $\gamma$ -PGA 的合成和水解上均发挥了重要作用<sup>[12]</sup>。Feng 等在解淀粉芽孢杆菌 NK-1 也发现相同现象,单敲除 *cwlO* 的重组菌  $\gamma$ -PGA 产量相比野生菌提高了 36.9%,  $\gamma$ -PGA 分子量由野生菌的 335 kDa 提高到重组菌的 422 kDa;研究者还使用扫描电子显微镜观察到缺失 *cwlO* 的解淀粉芽孢杆菌细胞形态变短<sup>[13]</sup>。现有关于 *cwlO* 功能的研究均集中在基因缺失对菌株形态和发酵性能的表现影响上,尚未对细胞生理状况和代谢通路变化进行深入研究,这导致 *cwlO* 对  $\gamma$ -PGA 合成的影响机理尚不清晰。

本研究通过对比野生菌和缺失 *cwlO* 重组菌利用不同前体发酵产  $\gamma$ -PGA 的发酵性能,研究两株菌在利用不同前体时发酵性能差异的深层原因,以期阐明 *cwlO* 影响  $\gamma$ -PGA 合成的机理,为进一步提升前体转化效率和提高  $\gamma$ -PGA 产量奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究中  $\gamma$ -PGA 生产菌株为地衣杆菌 WX-02 (CCTCC M208065),从中国盐渍土壤中分离得到<sup>[14]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$

是本实验室保藏菌株。重组质粒 T2-*cwlO* 为本研究构建, WX-02- $\Delta$ -*cwlO* 为本研究构建的 WX-02 的重组菌。

#### 1.1.2 培养基及培养条件

LB 培养基的配制参见文献[15]。

地衣芽孢杆菌发酵培养基参考文献[16]并对其优化(g/L): 葡萄糖 80.00, 柠檬酸钠 10.00, NaNO<sub>3</sub> 15.00, NH<sub>4</sub>Cl 8.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.00, 无水 CaCl<sub>2</sub> 1.00, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.00, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.00, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.15。

菌株培养条件: 大肠杆菌和地衣芽孢杆菌菌株无特殊要求均在 37 °C、230 r/min 培养。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

金牌 Mix、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker, TaKaRa 公司; RNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒及 HiScriptR II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒, Vazyme 公司; 质粒抽提试剂盒、片段纯化试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒, Omega BioTek 公司; 标准  $\gamma$ -PGA, 武汉骏安生物科技有限公司。

双联平行发酵罐(3 L), 迪必尔生物工程(上海)有限公司; 荧光倒置显微镜, Leica 公司; Agilent Technologies 1260 Infinity, 安捷伦科技(中国)有限公司。

### 1.2 地衣芽孢杆菌温敏性敲除质粒的构建

采用软件 Primer Premier 5 设计引物。基因组 DNA 模板的提取方法及 PCR 反应体系和条件参见文献[17]。根据基因组信息设计引物(表 1), 根据 *B. licheniformis* WX-02 全基因信息, 在 NCBI 上找到目的基因 *cwlO* 序列, 选取该基因序列的上游片段设计引物 *cwlO*-AF 和 *cwlO*-AR, 选取该基因序列下游片段设计引物 *cwlO*-BF 和 *cwlO*-BR, 并以 WX-02 的基因组 DNA 作为模板, PCR 扩增得到 *cwlO* 的上、下游同源臂片段; 以 PCR 产物为模板, 用引物 *cwlO*-AF 和

表 1 基因敲除所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Size of product (bp)
<i>cwlO</i> -AF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGATCGGCAAACCAATACCTT	636
<i>cwlO</i> -AR	TGTTGTGCGACCGAATCCGATTTCTTTCCGCTTGCT	
<i>cwlO</i> -BF	AGCAAGCGGAAAGAAATCGGATTCGGTGCACAACA	684
<i>cwlO</i> -BR ( <i>Sac</i> I)	CGAGCTCTGATGCTGGGCGGTGATT	
T2-F	ATGTGATAACTCGGCGTA	1 623
T2-R	GCAAGCAGCAGATTACGC	
<i>cwlO</i> -YF	AAGGCACGGAATCAGTCA	1 735
<i>cwlO</i> -YR	TTTGGCAAAGCGGGTGGA	

*cwlO*-BR 进行 SOE-PCR 扩增, SOE-PCR 产物回收纯化后, 用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xba* I 同时酶切, 酶切回收产物与经过同种限制性内切酶酶切处理的质粒 T2(2)-ori 在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶进行连接, 然后将连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 在 LB 固体培养基中添加终浓度为 25 mg/L 的卡那霉素用于筛选阳性克隆子。从抗性平板上筛选出的克隆子接入 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养 10 h, 取适量菌液进行 PCR 验证。经菌落 PCR 验证和测序正确后, 得到敲除质粒 T2-*cwlO*。最后电转化至菌株 WX-02 中, 得到 WX-02- $\Delta$ *cwlO*。

### 1.3 分批发酵

使用 3 L 发酵罐进行分批发酵, 实际装液量为 2 L。将平板上活化好的地衣芽孢杆菌单菌落接入种子培养基在 37 °C、230 r/min 条件下培养 10 h 后, 以 1.5% (体积分数) 的接种量转接到发酵培养基中。发酵罐配备溶解氧(dissolved oxygen, DO)、pH 和温度电极, 用于在线检测相关参数。整个发酵过程中, 搅拌速度和通气量分别为 400 r/min 和 4 L/min。发酵过程中温度控制在 37 °C, 用 28% 的氨水将 pH 值控制在 6.5 以上, 发酵时长 36 h。

### 1.4 生物量检测

生物量检测采用菌体光密度法(optical

density, OD), 将发酵液经 12 000 r/min 离心 5 min, 用灭菌后的生理盐水洗涤菌体后重悬, 分光光度计测定重悬液的 OD<sub>600</sub>。

### 1.5 残留葡萄糖、谷氨酸测定

发酵培养基中葡萄糖和谷氨酸的消耗采用 SBA 生物传感分析仪测定, 操作方法参见文献[18]。

### 1.6 谷氨酰胺浓度测定

样品衍生化方法参考刘铁兵等<sup>[19]</sup>的方法, 采用高效液相色谱进行检测, 检测条件为: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m), 紫外检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 15  $\mu$ L, 流速 1 mL/min; 流动相 A: 四氢味喃: 甲醇: 50 mmol/L 醋酸钠(用冰醋酸调 pH 值至 6.2) 体积比 5:75:420; 流动相 B: 甲醇; 通过测定标准谷氨酰胺峰面积绘制的标准曲线计算谷氨酰胺浓度。

### 1.7 细胞形态检测

发酵 24 h 时从发酵罐中取 10 mL 发酵液, 将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 使用生理盐水多次洗涤, 去除菌落表面黏液。吸取微量菌液置于载玻片上, 涂抹均匀。将涂好的玻片用酒精灯火焰固定, 进行革兰氏染色, 烘干后利用荧光倒置显微镜进行观察。

## 1.8 肽聚糖的提取及多糖、蛋白质含量检测

细胞壁肽聚糖的提取及所提肽聚糖中多糖和蛋白质的含量检测方法参考文献[20],采用三氯乙酸法对菌株 WX-02 和 WX-02- $\Delta cwI O$  细胞壁肽聚糖进行分离提取,将所得肽聚糖于干燥前称重,然后与处理的湿菌总重按以下公式计算肽聚糖含量:肽聚糖含量(mg/g)=得到的肽聚糖质量/处理的菌体质量 $\times 100\%$ 。多糖含量采用苯酚-硫酸法<sup>[21]</sup>进行检测,总蛋白含量采用考马斯亮蓝染色法<sup>[22]</sup>进行检测。

## 1.9 聚 $\gamma$ -谷氨酸浓度测定

聚  $\gamma$ -谷氨酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)的纯化和测定参照 Cai 等的方法<sup>[23]</sup>。检测系统为 Agilent 1100 HPLC 系统; ShodexOHpak SB-806 HQ (8.0 mm ID $\times$ 300 mm, 13  $\mu$ m)凝胶柱,流动相为 25 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:乙腈(8:1, 体积比),流速 0.5 mL/min,进样量 10  $\mu$ L,检测波长 210 nm。通过测定标准  $\gamma$ -PGA 峰面积绘制的标准曲线计算  $\gamma$ -PGA 浓度。

## 1.10 聚 $\gamma$ -谷氨酸分子量测定

$\gamma$ -PGA 样品处理方法、检测系统、波长、流动相同 1.9。使用具有 RI-10 折射率检测器和 ShodexOHpak SB-806 HQ 凝胶柱(8.0 mm ID $\times$ 300 mm, 13  $\mu$ m)的凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, GPC)测量  $\gamma$ -PGA 平均分子量<sup>[24]</sup>。

使用 Pullulan 窄多分散性标准(Shanghai Zzbio Co., Ltd)构建校准曲线,用已知重均分子量葡聚糖作标准曲线计算  $\gamma$ -PGA 的分子量。

## 1.11 $\gamma$ -PGA 的 D/L 单体比测定

$\gamma$ -PGA 的纯化方法同 1.9。 $\gamma$ -PGA 水解和氨基酸衍生化方法参照 Peng 等<sup>[25]</sup>的方法优化后采用高效液相色谱进行检测。HPLC 分析:流动相 A: 50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.7)/乙腈/甲醇

(18/1/1);流动相 B: 50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.7)/乙腈/甲醇(12/7/1);色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm;检测器: 340 nm 紫外检测器;温度和流速: 30  $^{\circ}$ C 和 0.5 mL/min。

## 1.12 基因转录水平分析

采用 real-time quantitative PCR (RT-qPCR) 检测野生型和重组型胞内相关基因转录水平。在发酵培养基中培养 12 h 后,收集细胞以提取 RNA,按照 Animal Total RNA Isolation Kit 操作步骤抽提地衣芽胞杆菌 RNA。采用 HiScriptR II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒进行 RNA 反转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR,计算相对转录水平。RT-qPCR 反应条件和引物设计参考前期研究方法<sup>[26]</sup>。

## 1.13 数据处理

所有实验均进行 3 次重复,每次 3 个平行,采用 Origin 8.0 和 SPSS 19.0 进行数据处理和分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 缺失 *cwI O* 重组地衣芽胞杆菌的构建

以 *B. licheniformis* WX-02 总 DNA 为模板,扩增出 *cwI O* 的上游同源臂(636 bp)和下游同源臂(684 bp),再将上、下游同源臂进行 SOE-PCR,拼接片段大小为 1 320 bp,如图 1A 所示。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切处理拼接片段和 T2(2)-ori 质粒,切胶回收后再用 T4 DNA 连接酶连接拼接片段和 T2(2)-ori 质粒,连接产物通过氯化钙法转化转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,结果如图 1B 所示,PCR 片段大小 1 623 bp 与理论相符。随后将 PCR 片段纯化后进行测序,结果比对正确,表明敲除载体 T2-*cwI O* 构建成功。将敲除载体 T2-*cwI O* 电转进入 *B. licheniformis* WX-02 感受态细胞中进行 *cwI O* 的敲除,用

*cwlO*-YF/*cwlO*-YR 为引物通过 PCR 验证阳性克隆子中的 *cwlO* 是否已被敲除。结果如图 1C 所示,理论上敲除了 *cwlO* 的菌株 PCR 片段大小应为 1 735 bp,与验证结果一致,表明已成功构建缺失 *cwlO* 的重组地衣芽孢杆菌,命名为 WX-02- $\Delta$ *cwlO*。

## 2.2 缺失 *cwlO* 对重组地衣芽孢杆菌利用 L-谷氨酸钠合成 $\gamma$ -PGA 的影响

为了研究 *cwlO* 缺失对  $\gamma$ -PGA 发酵的影响,在 3 L 发酵罐中采用最常规的含 L-谷氨酸钠 (40 g/L) 的发酵培养基对野生菌 WX-02 和重组菌 WX-02- $\Delta$ *cwlO* 进行分批发酵,结果如图 2 所示。两株菌的  $\gamma$ -PGA 发酵均在 36 h 结束,野生菌 WX-02 的  $OD_{600}$  值为 13.1,消耗葡萄糖和 L-谷氨酸钠的浓度为分别为 61 g/L 和 23 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量达到 29.1 g/L;重组菌 WX-02- $\Delta$ *cwlO*

的  $OD_{600}$  值在发酵结束时为 14.7,消耗葡萄糖和 L-谷氨酸钠的浓度为分别为 58 g/L 和 24 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量达到 30.7 g/L。上述结果表明,敲除 *cwlO* 的重组菌在所测试的发酵性能上与野生菌相比无显著差异。

我们进一步分析了重组菌和野生菌以 L-谷氨酸钠为前体合成  $\gamma$ -PGA 的分子量大小和 D/L-谷氨酸含量占比。野生菌所产  $\gamma$ -PGA 在高效液相色谱中的出峰时间为 11.142 min,换算得到的分子量大小为 1 727 kDa, D-谷氨酸含量占比为 84.8%,如图 3 所示。重组菌所产的  $\gamma$ -PGA 的出峰时间为 11.245 min,换算得到的分子量大小为 1 603 kDa,  $\gamma$ -PGA 中 D-谷氨酸含量占比为 84.0%。上述结果表明,敲除 *cwlO* 并未改变菌体所产  $\gamma$ -PGA 的分子量大小,也未影响 D/L-谷氨酸在  $\gamma$ -PGA 中的含量比例。

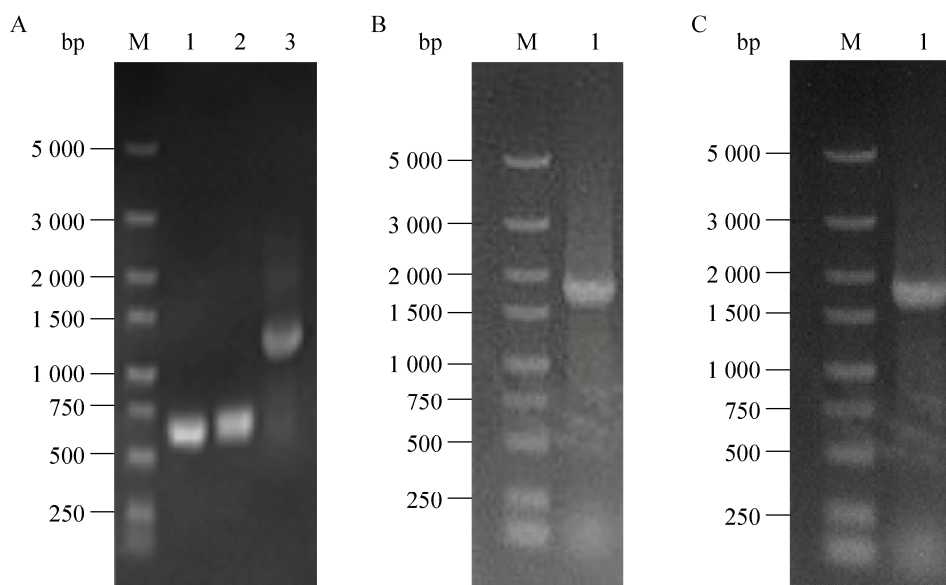


图 1 敲除元件的扩增及菌落 PCR 验证 A: *cwlO* 的上游同源臂片段(泳道 1, 636 bp)、下游同源臂片段(泳道 2, 684 bp)和上下游同源臂的 SOE-PCR 产物(泳道 3, 1 320 bp). B: DH5 $\alpha$ /T2-*cwlO* 的 PCR 产物验证(泳道 1, 1 623 bp). C: WX-02- $\Delta$ *cwlO* 的 PCR 产物验证(泳道 1, 1 735 bp)

Figure 1 Analysis of PCR fragments of  $\gamma$ -PGA hydrolase by gel electrophoresis. A: Lane 1: PCR product of the upstream homologous arm of *cwlO* (636 bp); Lane 2: PCR product of the downstream homologous arm of *cwlO* (684 bp); Lane 3: SOE-PCR product of the up and the down homologous arm of *cwlO* (1 320 bp). B: Lane 1: PCR product of DH5 $\alpha$ /T2-*cwlO* (1 623 bp). C: Lane 1: PCR product of WX-02- $\Delta$ *cwlO* by primers *cwlO*-YF/*cwlO*-YR (1 735 bp).

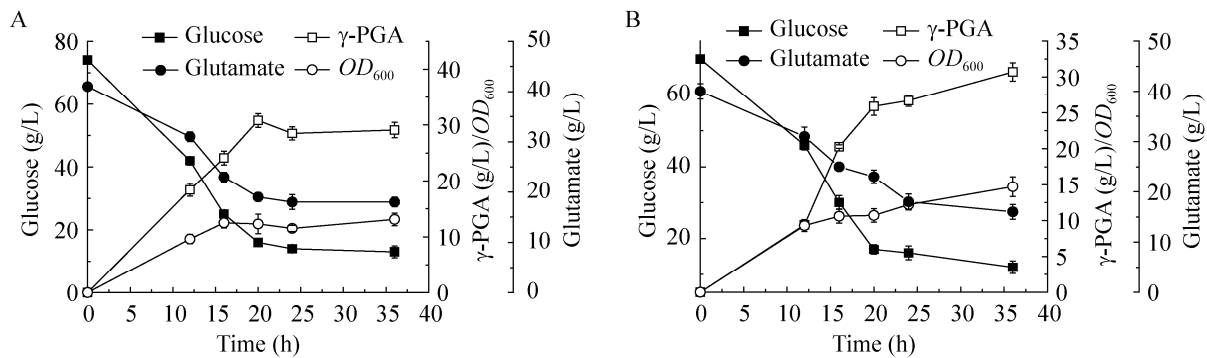


图 2 菌株 WX-02 (A)和 WX-02- $\Delta cwI0$  (B)利用 L-谷氨酸钠批量发酵的概况比较

Figure 2 Comparison of the profiles of batch fermentation of strains WX-02 (A) and WX-02- $\Delta cwI0$  (B) with L-glutamate.

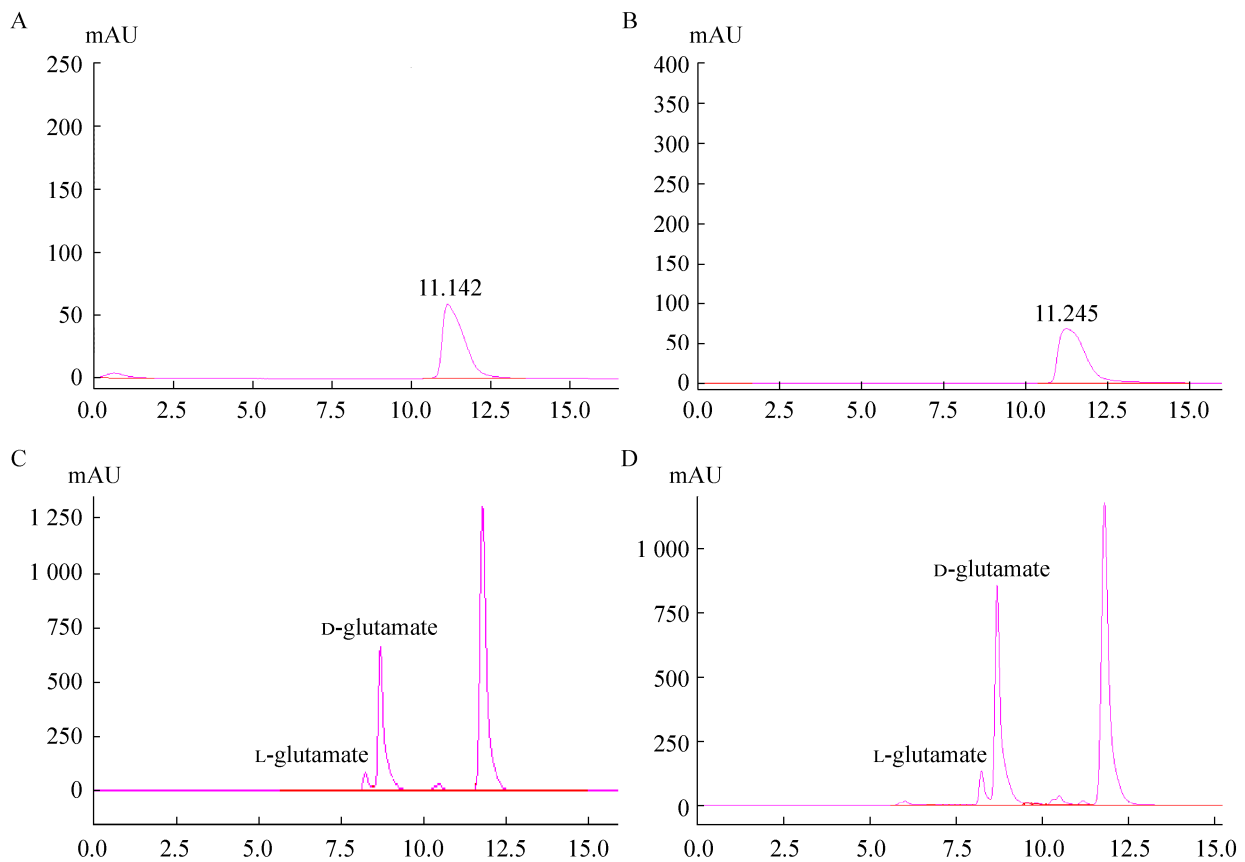


图 3 以 L-谷氨酸钠为前体发酵产  $\gamma$ -PGA 的分子量及 D/L 型谷氨酸比例 A:野生菌产  $\gamma$ -PGA 分子量色谱图. B: 重组菌产  $\gamma$ -PGA 分子量色谱图. C: 野生菌产  $\gamma$ -PGA 的 D/L-谷氨酸含量色谱图. D: 重组菌产  $\gamma$ -PGA 的 D/L-谷氨酸含量色谱图

Figure 3 The molecular weight and the ratio of D/L-glutamate in  $\gamma$ -PGA produced using L-glutamate as the precursor. A: GPC chromatogram of molecular weight of  $\gamma$ -PGA produced by WX-02. B: GPC chromatogram of molecular weight of  $\gamma$ -PGA produced by WX-02- $\Delta cwI0$ . C: HPLC chromatogram of D/L-glutamate produced by WX-02. D: HPLC chromatogram of D/L-glutamate produced by WX-02- $\Delta cwI0$ .

### 2.3 缺失 *cwlO* 对重组地衣芽孢杆菌利用 L-谷氨酰胺合成 $\gamma$ -PGA 的影响

L-谷氨酰胺在芽孢杆菌胞内可以转化合成 L-谷氨酸, 因此可作为合成  $\gamma$ -PGA 的前体。利用 L-谷氨酰胺替代 L-谷氨酸钠作为前体, 在 3 L 发酵罐中对野生菌 WX-02 和重组菌 WX-02- $\Delta cwlO$  进行分批发酵, 发酵时长 36 h, 结果如图 4 所示。野生菌的  $OD_{600}$  值在发酵结束时达到 15.7, 消耗葡萄糖和 L-谷氨酰胺的浓度分别为 58 g/L 和 9.6 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量为 18.5 g/L, 明显低于以 L-谷氨酸钠为前体发酵的水平。重组菌的  $OD_{600}$  值在发酵结束时为 15.0, 消耗葡萄糖和 L-谷氨酰胺的浓度分别为 76 g/L 和 16.5 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量为 29.2 g/L, 与 L-谷氨酸钠为前体发酵的水平相近。进而对以 L-谷氨酰胺为前体合成的  $\gamma$ -PGA 进行了分子量和 D/L-谷氨酸含量占比分析, 结果表明野生菌和重组菌所产  $\gamma$ -PGA 的分子量分别为 1 232 kDa 和 1 608 kDa, 与以 L-谷氨酸钠为前体的水平相比, 野生菌所产  $\gamma$ -PGA 的分子量稍有下降, 而重组菌所产  $\gamma$ -PGA 的分子量则无变化。另外, 野生菌和重组菌所产  $\gamma$ -PGA 中 D-谷氨酸含量占比分别为 81.6% 和 82.2%, 相较于以 L-谷氨酸钠为

前体时的 D-谷氨酸含量占比略有降低。

### 2.4 使用混合前体提高缺失 *cwlO* 基因重组菌的 $\gamma$ -PGA 产量

综合上述研究结果及已报道的文献, 可以发现 L-谷氨酸钠和 L-谷氨酰胺作为前体各有优势, 若将两种前体混合添加或许更有利于缺失 *cwlO* 重组菌合成  $\gamma$ -PGA。

添加 20 g/L L-谷氨酸钠和 20 g/L L-谷氨酰胺为混合前体, 在 3 L 发酵罐中对重组菌和野生菌进行分批发酵。图 5 结果表明, 重组菌 WX-02- $\Delta cwlO$  的  $OD_{600}$  值在发酵结束时为 10.6, 消耗葡萄糖的浓度为 59 g/L, 消耗 L-谷氨酸钠和 L-谷氨酰胺的浓度分别为 16 g/L 和 11.3 g/L,  $\gamma$ -PGA 产量达到 36.3 g/L, 相较于单独使用 L-谷氨酸钠或 L-谷氨酰胺批次的水平分别提高了 18.2% 和 24.3%, 而野生菌,  $OD_{600}$  值在发酵结束时为 13.8, 消耗葡萄糖的浓度为 59 g/L, 消耗 L-谷氨酸钠和 L-谷氨酰胺的浓度分别为 9 g/L 和 9.2 g/L, 比重组菌减少了 43.8% 和 18.5%;  $\gamma$ -PGA 产量达到 24.4 g/L, 比重组菌降低了 32.8%。上述实验结果表明, 使用 L-谷氨酸钠和 L-谷氨酰胺混合前体更有利于缺失 *cwlO* 的重组菌合成  $\gamma$ -PGA。

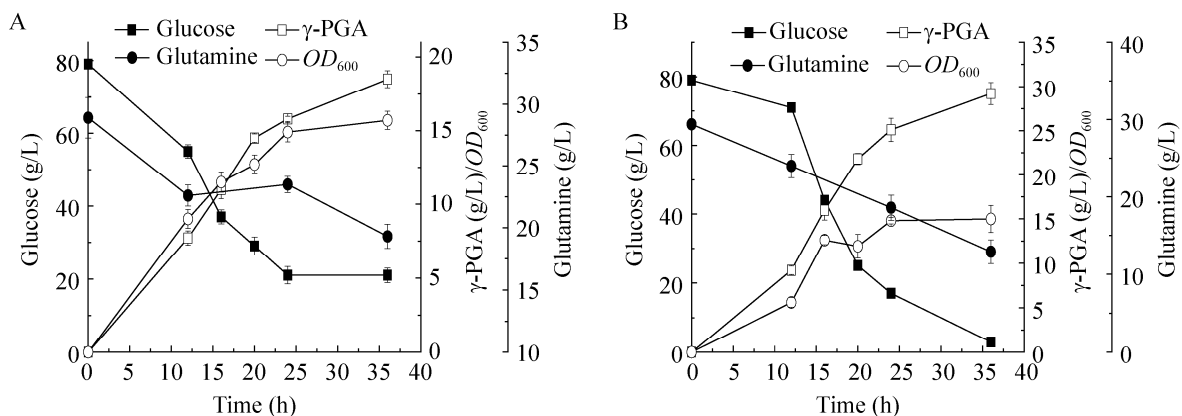


图 4 菌株 WX-02 (A) 和 WX-02- $\Delta cwlO$  (B) 利用 L-谷氨酰胺批量发酵的概况比较

Figure 4 Comparison of the profiles of batch fermentation using L-glutamine by strains WX-02 (A) and WX-02- $\Delta cwlO$  (B).



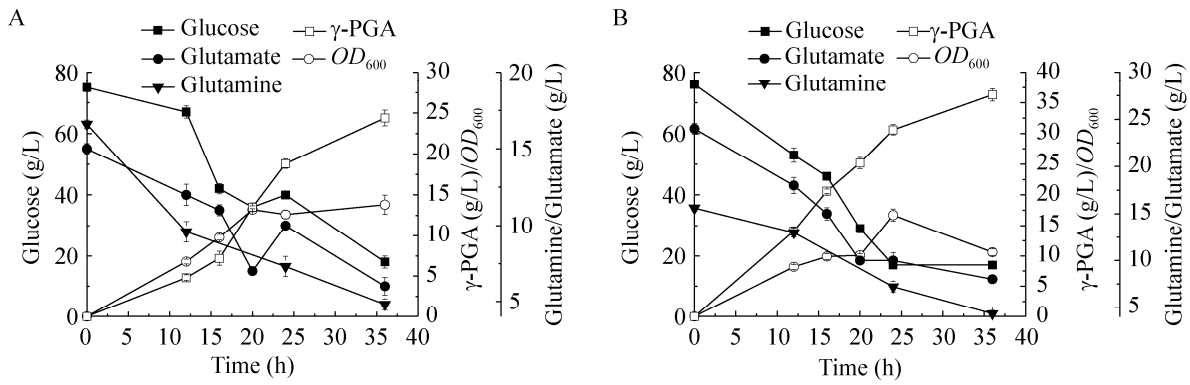


图 5 菌株 WX-02 (A)、WX-02-ΔcwI/O (B) 利用 L-谷氨酸钠和 L-谷氨酰胺混合前体批量发酵的概况比较  
Figure 5 Comparison of batch fermentation of strains WX-02 (A) and WX-02-ΔcwI/O (B) with mixed precursors of L-glutamate and L-glutamine.

2.5 重组菌 L-谷氨酰胺利用效率的提高对 γ-PGA 合成相关代谢途径的影响

为了探究重组菌相较野生菌在以 L-谷氨酰胺为前体时高产 γ-PGA 的原因, 对不同菌株中

γ-PGA 合成途径及呼吸链的关键酶基因转录水平进行了测定和对比分析, 结果如图 6 所示。以野生菌作为参照, 重组菌中谷氨酸脱氢酶编码基因 *rocG*、谷氨酸合酶亚基编码基因 *gltA* 和

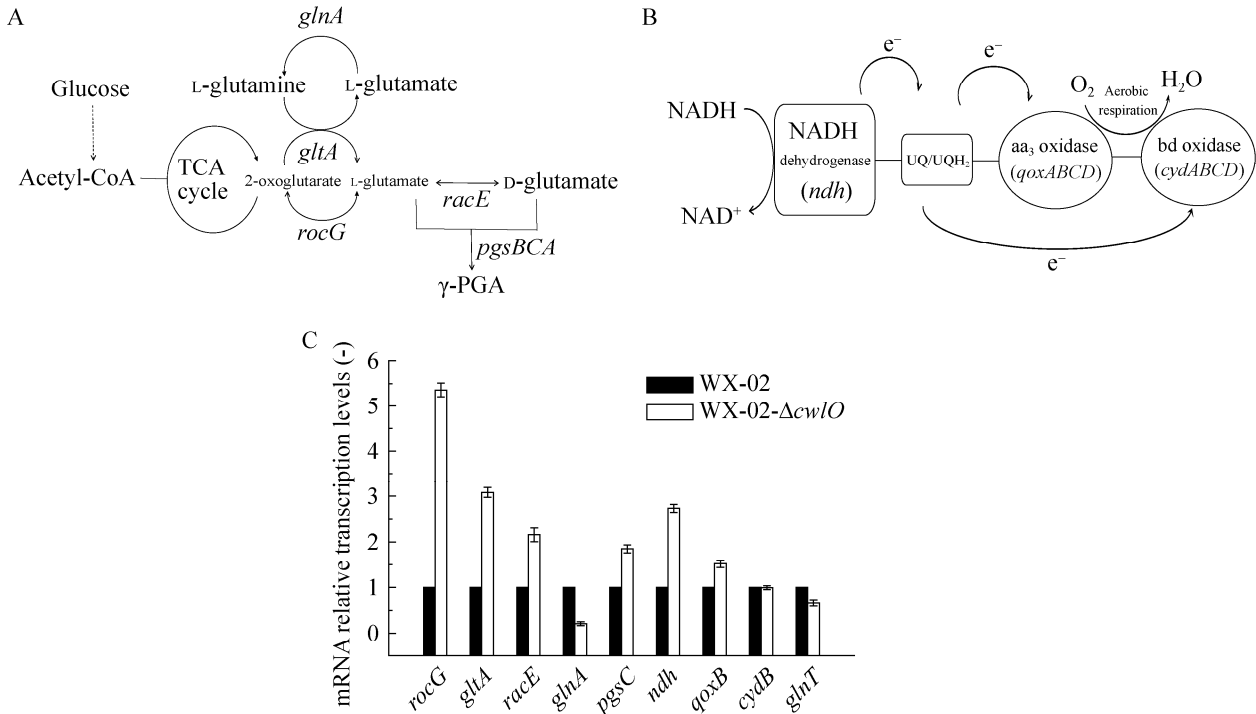


图 6 代谢示意图及转录水平分析 A: γ-PGA 合成途径示意图. B: 呼吸链示意图. C: 关键基因转录水平

Figure 6 Schematic diagrams of metabolism and transcriptional analysis. A: Schematic diagrams of γ-PGA synthesis pathway. B: Schematic diagram of respiratory chain. C: Transcription levels of the key genes.

谷氨酸消旋酶编码基因 *racE* 的转录水平分别上调了 5.36、3.08 和 2.16 倍, 而谷氨酰胺合成酶编码基因 *glnA* 的转录水平则下调了 79%。 $\gamma$ -PGA 合成酶基因亚基编码基因 *pgsC* 的转录水平提高了 1.85 倍。呼吸链中 NADH 脱氢酶编码基因 *ndh* 和细胞色素 *aa3* 氧化酶基因亚基编码基因 *qoxB* 的转录水平在重组菌胞内分别上调了 2.73 倍和 1.52 倍, 而细胞色素 *bd* 氧化酶亚基编码基因 *cydB* 的转录水平与野生菌持平。上述结果表明, 重组菌在以 L-谷氨酰胺为前体时胞内 L-谷氨酸合成途径和呼吸作用均显著强化, 从而为  $\gamma$ -PGA 的合成提供了充足的前体和能量, 因此  $\gamma$ -PGA 产量提高。

还有一点值得关注的是, 重组菌中谷氨酰胺转移酶编码基因 *glnT* 的转录水平仅为野生菌的 66%, 说明重组菌对 L-谷氨酰胺吸收利用效率的提高并非转运蛋白表达量提高的原因所致。

## 2.6 缺失 *cwlO* 对地衣芽孢杆菌细胞形态和细胞壁肽聚糖含量的影响

使用荧光倒置显微镜观察不同培养基中野生菌和重组菌的细胞形态发现, 无论是在 L-谷氨酸钠还是 L-谷氨酰胺的培养基中(图 7), 缺失 *cwlO* 的重组菌细胞均呈现圆点状, 与野生菌细胞的长杆状有明显区别。我们收集了未添加前体物培养的重组菌和野生菌, 对各菌株细胞壁的

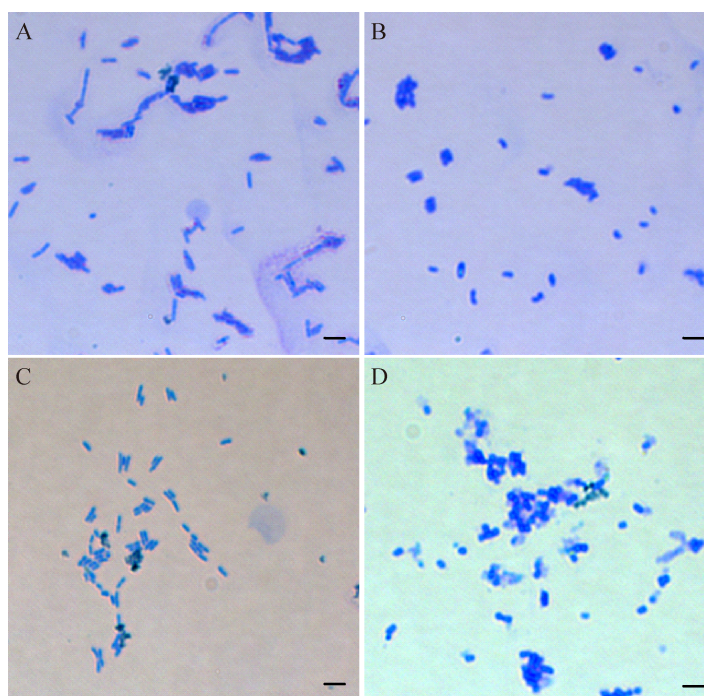


图 7 菌株 WX-02 和 WX-02- $\Delta cwlO$  的细胞形态对比 A: WX-02 在以 L-谷氨酸钠培养基中培养 24 h. B: WX-02- $\Delta cwlO$  在以 L-谷氨酸钠培养基中培养 24 h. C: WX-02 在以 L-谷氨酰胺培养基中培养 24 h. D: WX-02- $\Delta cwlO$  在以 L-谷氨酰胺培养基中培养 24 h. 用荧光倒置显微镜观察细胞, 比例尺为 5  $\mu\text{m}$

Figure 7 Cellular morphology comparison of strains WX-02 and WX-02- $\Delta cwlO$ . A: WX-02 was cultured for 24 h in the medium with L-glutamate as precursor. B: WX-02- $\Delta cwlO$  was cultured for 24 h in the medium with L-glutamate as precursor. C: WX-02 was cultured for 24 h in L-glutamine-precursor medium. D: WX-02- $\Delta cwlO$  was cultured for 24 h in L-glutamine-precursor medium. The cells were observed under fluorescence inverted microscope. Scale bar is 5  $\mu\text{m}$ .

肽聚糖进行了提取,并测定了所提取的肽聚糖中多糖和蛋白质含量。结果如图 8 所示,重组菌的湿菌体中肽聚糖含量为 65 mg/g, 相较野生菌 121 mg/g 的含量降低了 46.3%。重组菌提取的肽聚糖中多糖含量为 33.2 mg/g, 与野生菌的 31.6 mg/g 基本相当; 蛋白质含量为 18.9 mg/g, 相较野生菌 27.8 mg/g 的含量减少了 32.0%。上述结果表明, 缺失 *cw1O* 会导致地衣芽孢杆菌细胞壁肽聚糖含量的下降, 以及肽聚糖中蛋白质含量的减少, 这极有可能是引起重组菌细胞形态变化的主要原因。

### 3 讨论

L-谷氨酰胺与 L-谷氨酸钠相比, 添加到培养基中不会带入大量钠离子而引起渗透压升高, 有利于菌株的生长和代谢产物合成。有研究表明, 添加适量 L-谷氨酰胺能显著提高菌株对葡萄糖和柠檬酸的代谢效率, 减少多糖等副产物的生成, 提高  $\gamma$ -PGA 的得率<sup>[27]</sup>。目前阻碍 L-谷氨酰胺在  $\gamma$ -PGA 中使用的因素, 一方面是 L-谷氨酰胺价格高于 L-谷氨酸钠; 另一方面是菌株对 L-谷氨酰胺代谢利用效率显著低于 L-谷氨酸钠。多项研究结果均表明, L-谷氨酰胺添加量过多会造成其在发酵液中积累, 反而抑制了  $\gamma$ -PGA 的合成<sup>[27-29]</sup>。如果能促进菌体对 L-谷氨酰胺的代谢利用效率, 再调配好 L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸钠的比例, 发挥出各种前体对  $\gamma$ -PGA 代谢的促进效果, 那么 L-谷氨酰胺在  $\gamma$ -PGA 的工业生产中可以得到较好的应用。

本研究构建了一株缺失 *cw1O* 的重组菌 WX-02- $\Delta cw1O$ , 3 L 发酵罐实验结果显示, 该重组菌代谢利用 L-谷氨酰胺的能力明显强于野生菌: 以 L-谷氨酰胺为单一前体时, 重组菌利用 L-谷氨酰胺的总量比野生菌高出 71.9%,  $\gamma$ -PGA 的产量比野生菌高出 57.8%; 在 L-谷氨酰胺和

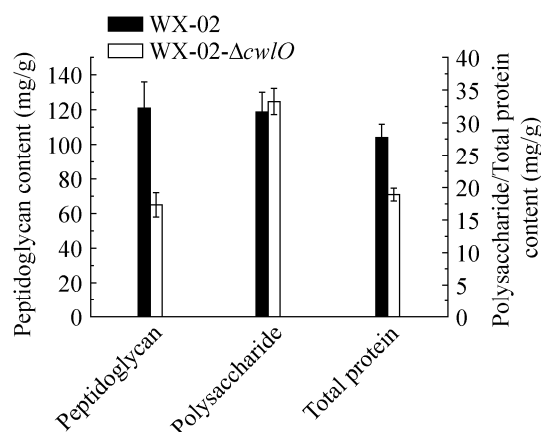


图 8 菌株 WX-02 和 WX-02- $\Delta cw1O$  的细胞壁肽聚糖含量、肽聚糖中多糖和蛋白质含量

Figure 8 The peptidoglycan contents in cell wall of strains WX-02 and WX-02- $\Delta cw1O$ , and the polysaccharide and protein contents in the extracted peptidoglycans.

L-谷氨酸钠以 1:1 (质量比)复配的条件下, 重组菌利用 L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸钠的总量比野生菌分别高出 22.8%和 77.8%,  $\gamma$ -PGA 的产量比野生菌高出 48.8%。转录水平差异分析结果显示, 以 L-谷氨酰胺作为单一前体时, 重组菌胞内  $\gamma$ -PGA 合成途径和呼吸作用的关键基因表达水平平均呈现上调, 表明 L-谷氨酰胺利用效率的提高促进了胞内内源 L-谷氨酸的合成, 同时强化了菌株的呼吸作用, 从而促进了  $\gamma$ -PGA 的合成。上述有关提高菌株 L-谷氨酰胺利用效率对  $\gamma$ -PGA 合成相关代谢影响的研究, 为更好地利用 L-谷氨酰胺作为前体大规模发酵生产  $\gamma$ -PGA 提供了理论基础和技术方向。

另一方面, 缺失 *cw1O* 可提高  $\gamma$ -PGA 产量的研究结果虽有报道<sup>[12-13]</sup>, 但报道中  $\gamma$ -PGA 的产量均很低 (<10 g/L), 且 *cw1O* 缺失对芽孢杆菌生理状况的影响未见提及。本研究在发现缺失 *cw1O* 的重组菌对 L-谷氨酰胺代谢利用效率显著提高的基础上, 对细胞形态和细胞壁肽聚糖含量及组分的变化进行了分析。荧光倒置显微镜

观察发现, 缺失 *cwlO* 的重组菌与野生菌相比, 细胞形态变短变圆, 这与 Feng 等<sup>[13]</sup>报道的结果一致。野生菌的肽聚糖含量为 121 mg/g, 与陈佳妮等<sup>[30]</sup>报道的纳豆芽孢杆菌细胞壁的肽聚糖含量相近。但缺失 *cwlO* 的重组菌肽聚糖含量(65 mg/g)仅为野生菌的 53.7%, 而且重组菌肽聚糖中蛋白质含量相较野生菌也有明显减少。肽聚糖是芽孢杆菌细胞壁的主要成分, 细胞壁中肽聚糖的含量直接影响细胞的形态<sup>[31]</sup>。据此我们推测, 缺失 *cwlO* 会导致地衣芽孢杆菌细胞壁肽聚糖含量降低, 以及肽聚糖中蛋白质占比的下降, 从而引起细胞形态的变化。

另外, 有关细胞壁对 L-谷氨酰胺通透性影响机制的研究鲜见报道。但 L-谷氨酸在这方面确有相关研究, 比如添加适量青霉素能抑制肽聚糖合成, 使细菌失去细胞壁的渗透屏障, 从而提高 L-谷氨酸透过细胞膜的效率<sup>[32]</sup>。因此我们有理由怀疑, 缺失 *cwlO* 导致细胞壁肽聚糖含量降低, 以及肽聚糖中蛋白质占比的减少, 会使细菌细胞壁变薄变疏松, 增加了 L-谷氨酰胺透过细胞膜的效率。

## 4 结论

本研究以地衣芽孢杆菌 WX-02 为出发菌株, 成功构建了缺失 *cwlO* 的重组菌 WX-02- $\Delta$ *cwlO*。重组菌对 L-谷氨酰胺的利用效率显著提高, 其中以 L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸钠为混合前体时重组菌  $\gamma$ -PGA 产量最高, 达到 36.3 g/L。转录水平差异分析结果显示, 以 L-谷氨酰胺为前体时, 重组菌胞内  $\gamma$ -PGA 合成途径和呼吸链上关键基因表达水平均上调。荧光倒置显微镜观察发现重组菌细胞形态相较野生菌变短变圆, 分析发现主要原因是重组菌细胞壁肽聚糖含量降低, 且肽聚糖中蛋白质占比减少。上述结果为进一步探究 *cwlO* 功能、促进菌株高效利用 L-谷氨

酰胺合成  $\gamma$ -PGA 提供了新的思路和研究基础。

## REFERENCES

- [1] 孙廷丽, 施庆珊, 欧阳友生, 陈仪本, 谢小保. 聚谷氨酸在医药领域的应用[J]. 生物技术进展, 2012, 2(1): 34-38.  
SUN TL, SHI QS, OUYANG YS, CHEN YB, XIE XB. Applications of polyglutamic acid in medicine[J]. Current Biotechnology, 2012, 2(1): 34-38 (in Chinese).
- [2] 张世根, 宋杰, 李敏, 宋艳雨, 姜冶, 高彩红. 肥料增效剂  $\gamma$ -聚谷氨酸的生产与应用[J]. 农产品加工, 2010(8): 60-61, 65.  
ZHANG SG, SONG J, LI M, SONG YY, JIANG Y, GAO CH. Production and application of  $\gamma$ -polyglutamic acid[J]. Farm Products Processing, 2010(8): 60-61, 65 (in Chinese).
- [3] 张艳丽, 高华, 刘小红. 微生物合成的聚谷氨酸及其应用[J]. 生物技术通报, 2008(4): 58-62.  
ZHANG YL, GAO H, LIU XH. Biosynthesis and application of polyglutamic acid[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(4): 58-62 (in Chinese).
- [4] ZHAN YY, SHENG BJ, WANG H, SHI J, CAI DB, YI L, YANG SH, WEN ZY, MA X, CHEN SW. Rewiring glycerol metabolism for enhanced production of poly- $\gamma$ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 306.
- [5] ZHAN YY, ZHU CJ, SHENG BJ, CAI DB, WANG Q, WEN ZY, CHEN SW. Improvement of glycerol catabolism in *Bacillus licheniformis* for production of poly- $\gamma$ -glutamic acid[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2017, 101(19): 7155-7164.
- [6] TIAN GM, WANG Q, WEI XT, MA X, CHEN SW. Glutamate dehydrogenase (RocG) in *Bacillus licheniformis* WX-02: Enzymatic properties and specific functions in glutamic acid synthesis for poly- $\gamma$ -glutamic acid production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 99: 9-15.
- [7] OHSAWA T, TSUKAHARA K, OGURA M. *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in  $\gamma$ -poly-glutamic acid synthesis[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(9): 2096-2102.
- [8] LIN BS, LI ZJ, ZHANG HX, WU JW, LUO MC. Cloning and expression of the  $\gamma$ -polyglutamic acid synthetase gene *pgsBCA* in *Bacillus subtilis* WB600[J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 3073949.
- [9] SCOFFONE V, DONDI D, BIINO G, BORGHESE G,

- PASINI D, GALIZZI A, CALVIO C. Knockout of *pgdS* and *ggt* genes improves  $\gamma$ -PGA yield in *B. subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(7): 2006-2012.
- [10] MEISNER J, LLOPIS PM, SHAM LT, GARNER E, BERNHARDT TG, RUDNER DZ. FtsEX is required for CwLO peptidoglycan hydrolase activity during cell wall elongation in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 89(6): 1069-1083.
- [11] HASHIMOTO M, OOIWA S, SEKIGUCHI J. Synthetic lethality of the *lytE cwLO* genotype in *Bacillus subtilis* is caused by lack of D, L-endopeptidase activity at the lateral cell wall[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(4): 796-803.
- [12] MITSUI N, MURASAWA H, SEKIGUCHI J. Disruption of the cell wall lytic enzyme CwLO affects the amount and molecular size of poly- $\gamma$ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto)[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2011, 57(1): 35-43.
- [13] FENG J, GAO WX, GU YY, ZHANG W, CAO MF, SONG CJ, ZHANG P, SUN M, YANG C, WANG SF. Functions of poly-gamma-glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) degradation genes in  $\gamma$ -PGA synthesis and cell morphology maintenance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(14): 6397-6407.
- [14] WEI XT, JI ZX, CHEN SW. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly-gamma-glutamic acid[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(5): 1332-1340.
- [15] 郭敬涵, 陆海燕, 洪解放, 贾玉蝶, 邹少兰. *YPS1/YPS2* 失活改进酿酒酵母 An- $\alpha$  菌株  $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌表达 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4485-4495.
- GUO JH, LU HY, HONG JF, JIA YD, ZOU SL. Improved  $\beta$ -glucosidase expressing in *Saccharomyces cerevisiae* An- $\alpha$  by *YPS1/YPS2* gene inactivation[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4485-4495 (in Chinese).
- [16] 林格儿, 刘宏, 刘海杰, 闫巧娟, 江正强. 暹罗芽孢杆菌高产  $\gamma$ -聚谷氨酸的发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3335-3345.
- LIN GE, LIU H, LIU HJ, YAN QJ, JIANG ZQ. Optimization of fermentation conditions for poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus siamensis*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3335-3345 (in Chinese).
- [17] 陈耀中. 地衣芽孢杆菌利用葡萄糖高效合成聚  $\gamma$ -谷氨酸的代谢工程育种[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2019.
- CHEN YZ. Metabolic engineering breeding of *Bacillus licheniformis* using glucose to efficiently synthesize poly- $\gamma$ -glutamic acid[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2019 (in Chinese).
- [18] 聂志华, 朱蕾蕾. 生物素对发酵过程中 MscCG 外排 L-谷氨酸的影响[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(10): 150-155.
- NIE ZH, ZHU LL. Effects of biotin on L-glutamate efflux mediated by MscCG in fermentation process[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(10): 150-155 (in Chinese).
- [19] 刘铁兵, 龚金炎, 朱银邦, 李博斌, 赵振, 郭小青, 黄俊. 柱前衍生化法农产品中  $\gamma$ -氨基丁酸的检测方法研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(10): 118-121, 128.
- LIU TB, GONG JY, ZHU YB, LI BB, ZHAO Z, GUO XQ, HUANG J. The determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid after pre-column derivatization in farm products[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, 29(10): 118-121, 128 (in Chinese).
- [20] 盛琴. 枯草芽孢杆菌肽聚糖的提取及其小鼠免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2011.
- SHENG Q. Extraction of peptidoglycan from *Bacillus subtilis* and its effects on immune function of mice[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [21] 柴林山, 冯敏, 徐冲, 李剑梅, 张疏雨, 郭玲玲. 野生蛹虫草菌株培养特性及子实体多糖含量比较分析[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(4): 78-83.
- CHAI LS, FENG M, XU C, LI JM, ZHANG SY, GUO LL. Wild *Cordyceps militaris* strains culture characteristics and their fruit body polysaccharide contents comparative analysis[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 40(4): 78-83 (in Chinese).
- [22] 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: 248-254.
- [23] CAI DB, CHEN YZ, HE PH, WANG SY, MO F, LI X, WANG Q, NOMURA CT, WEN ZY, MA X, CHEN SW. Enhanced production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by improving ATP supply in metabolically engineered *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2541-2553.
- [24] 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- $\gamma$ -glutamic acids with specific molecular weights in *Bacillus licheniformis*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 728.
- [25] PENG YY, ZHANG T, MU WM, MIAO M, JIANG B. Intracellular synthesis of glutamic acid in *Bacillus methylotrophicus* SK<sub>19,001</sub>, a glutamate-independent poly ( $\gamma$ -glutamic acid)-producing strain[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(1): 66-72.
- [26] LI X, YANG HQ, ZHOU ML, ZHAN YY, LIU J, YAN DZ, CAI DB, CHEN SW. A novel strategy of feeding nitrate for cost-effective production of poly- $\gamma$ -glutamic acid from crude glycerol by *Bacillus licheniformis* WX-02[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 176: 108156.
- [27] KUNIOKA M. Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 44(3): 501-506.
- [28] BAJAJ IB, SINGHAL RS. Enhanced production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(1): 133-141.
- [29] 王宁, 杨革, 车程川, 刘艳. NaCl、Mn(II)、L-谷氨酰胺和  $\alpha$ -酮戊二酸对地衣芽孢杆菌 WBL-3 合成新型土壤修复材料  $\gamma$ -PGA 的影响[J]. *氨基酸和生物资源*, 2010, 32(3): 26-30, 34.
- WANG N, YANG G, CHE CC, LIU Y. Effect of NaCl, Mn(II), L-glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate on  $\gamma$ -PGA used for restoring soil synthesized by *Bacillus licheniformis* WBL-3[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2010, 32(3): 26-30, 34 (in Chinese).
- [30] 陈佳妮, 黄占旺, 王素贞, 石福磊, 黄永平. 纳豆芽孢杆菌胞壁肽聚糖提取工艺优化及其结构初步鉴定[J]. *江西农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(1): 174-185.
- CHEN JN, HUANG ZW, WANG SZ, SHI FL, HUANG YP. Optimization of extraction process of peptidoglycan from cell wall of *Bacillus natto* and preliminary identification of its structure[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition)*, 2019, 41(1): 174-185 (in Chinese).
- [31] 韩超, 杨帆. 枯草芽孢杆菌细胞壁的研究进展[J]. *江西化工*, 2011(4): 14-17.
- HAN C, YANG F. Research progress of *Bacillus subtilis* cell wall[J]. *Jiangxi Chemical Industry*, 2011(4): 14-17 (in Chinese).
- [32] 周鹏, 许宏贤, 王欣, 段钢. 谷氨酸分泌机制及其代谢工程的研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2013, 42(4): 19-25.
- ZHOU P, XU HX, WANG X, DUAN G. Research progress on secretion mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2013, 42(4): 19-25 (in Chinese).