

谷氨酸废液对枯草芽孢杆菌 KH2 合成 γ -聚谷氨酸的抑制机制

胡瑞鑫^{1,5#}, 田缘^{2,3#}, 鞠建松^{1,5*}, 于波⁴, 王丽敏^{4*}

- 1 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄
- 2 黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨
- 3 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨
- 4 中国科学院微生物研究所, 北京
- 5 河北省生态环境协同创新中心, 河北 石家庄

胡瑞鑫, 田缘, 鞠建松, 于波, 王丽敏. 谷氨酸废液对枯草芽孢杆菌 KH2 合成 γ -聚谷氨酸的抑制机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3686-3701.

HU Ruixin, TIAN Yuan, JU Jiansong, YU Bo, WANG Limin. Inhibitory mechanism of glutamate waste liquid for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* KH2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3686-3701.

摘要: 谷氨酸废液是谷氨酸生产过程中的废弃物, 具有低 pH、高铵根、高硫酸根等特点。废液中含有谷氨酸, 可作为原料用于生产 γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA), 从而实现废液的资源化利用。【目的】针对谷氨酸废液对 γ -PGA 合成存在抑制作用的问题, 利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) KH2 进行发酵合成 γ -PGA 并评估谷氨酸废液对该合成反应的抑制情况。【方法】通过转录组学比较, 挖掘 γ -PGA 合成通路的关键基因, 分析抑制因子, 并利用关键基因的过表达与敲除技术, 明确抑制因子, 进而进行发酵验证。【结果】谷氨酸废液作为底物发酵生产 γ -PGA 时呈现出显著的抑制效应。利用转录组学技术共筛选出 1 819 个显著差异基因, 其中 952 个显著上调, 867 个显著下调。在原始发酵和谷氨酸废液发酵过程中, *B. subtilis* KH2 中 10 个参与 γ -PGA 合成途径的基因(*alsS*、*pgsA*、*gltT*、*budA*、*fumC*、*ptsG*、*racE*、*opuAB*、*acoC*、*rocG*)转录水平发生明显变化。将其中 8 个下调表达的基因(*alsS*、*pgsA*、*gltT*、*budA*、*fumC*、*ptsG*、*racE*、*opuAB*)进行过表达并进行发酵验证后, γ -PGA 产量分别提升了 91.20%、120.77%、137.50%、36.44%、40.85%、104.58%、65.67%、69.72%; *pgsA*、*gltT*、*ptsG*、*racE*、*opuAB* 基因的过表达使谷氨酸利用率分别提升了 11.57%、35.53%、12.83%、21.43%、14.80%。*alsS*、*budA*、*fumC* 的过表达对提升谷氨酸利用率效果不明显。2 个上调表达基因(*acoC*、*rocG*)的敲除对 γ -PGA 生产和谷氨酸利用影响不大。【结论】在废液发酵过程中, *ptsG*、*gltT*、*racE*、*pgsA*、*fumC* 等基因的下调对底物利

资助项目: 黑龙江省科学院生物经济“揭榜挂帅”项目(JBGS2024SW01)

This work was supported by the Bioeconomy Open Competition Project of Heilongjiang Academy of Sciences (JBGS2024SW01).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: JU Jiansong: jujiansong@126.com; WANG Limin: wanglimin@im.ac.cn

Received: 2025-01-27; Accepted: 2025-03-10; Published online: 2025-06-03

用、谷氨酸构型转换与聚合、TCA 循环等产生显著影响,从而降低了 γ -PGA 的合成效率。本研究初步揭示了谷氨酸废液对 γ -PGA 合成的抑制机制,为利用工业废液生产高附加值生物聚合物提供了一种可持续的生物技术方法。

关键词: γ -聚谷氨酸; 枯草芽孢杆菌 KH2; 谷氨酸废液; 比较转录组; 抑制因子

Inhibitory mechanism of glutamate waste liquid for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* KH2

HU Ruixin^{1,5#}, TIAN Yuan^{2,3#}, JU Jiansong^{1,5*}, YU Bo⁴, WANG Limin^{4*}

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei, China

2 Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang, China

3 College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang, China

4 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

5 Hebei Collaborative Innovation Center for Eco-environment, Shijiazhuang, Hebei, China

Abstract: Glutamate waste liquid is the waste produced in the production process of glutamic acid, with low pH, high ammonium, and high sulfate. The waste liquid contains glutamic acid and can be used as a raw material to produce poly- γ -glutamic acid (γ -PGA), achieving the recycling of waste liquid. **[Objective]** To investigate the inhibitory effect of glutamate waste liquid on γ -PGA synthesis, we used *Bacillus subtilis* KH2 to synthesize γ -PGA and evaluated the inhibitory effect of glutamate waste liquid on the synthesis of γ -PGA. **[Methods]** Comparative transcriptomics was employed to excavate the key genes and inhibitory factors involved in γ -PGA synthesis, and key gene overexpression and knockout were conducted to identify the inhibitory factors. Fermentation experiments were then performed for verification. **[Results]** The glutamate waste liquid as the substrate for production of γ -PGA by fermentation showed significant inhibitory effects. A total of 1 819 significantly differentially expressed genes were identified, including 952 genes with significantly up-regulated expression and 867 genes with significantly down-regulated expression. The transcript levels of 10 genes (*alsS*, *pgsA*, *gltT*, *budA*, *fumC*, *ptsG*, *racE*, *opuAB*, *acoC*, and *rocG*) involved in γ -PGA synthesis of *B. subtilis* KH2 changed significantly during primary fermentation and glutamate waste liquid fermentation. Eight down-regulated genes (*alsS*, *pgsA*, *gltT*, *budA*, *fumC*, *ptsG*, *racE*, and *opuAB*) were overexpressed, which increased the production of γ -PGA by 91.20%, 120.77%, 137.50%, 36.44%, 40.85%, 104.58%, 65.67%, and 69.72%, respectively. The overexpression of *pgsA*, *gltT*, *ptsG*, *racE*, and *opuAB* increased glutamic acid utilization by 11.57%, 35.53%, 12.83%, 21.43%, and 14.80%, respectively. The overexpression of *alsS*, *budA*, and *fumC* had no obvious improving effect on the utilization of glutamic acid. The knockout of two up-regulated genes (*acoC* and *rocG*) had little effect on γ -PGA production and glutamic acid utilization. **[Conclusion]** The downregulation of *ptsG*, *gltT*, *racE*, *pgsA*, and *fumC* in waste liquid fermentation has significant effects on substrate utilization, glutamic acid configuration conversion and polymerization, and TCA cycle, which reduces the synthesis

efficiency of γ -PGA. This study reveals the inhibitory mechanism of glutamate waste liquid in γ -PGA synthesis and provides a sustainable biotechnology for the production of value-added biopolymers from industrial waste liquid.

Keywords: poly- γ -glutamic acid; *Bacillus subtilis* KH2; glutamate waste liquid; comparative transcriptome; inhibitory factor

我国是全球最大的味精生产国，产品产量约占全球的 80%^[1]。谷氨酸废液是味精工业生产的副产物，含有大量有机污染物，属于典型的高化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、高生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)、高菌体含量、高铵根、高硫酸根和低 pH 的“五高一低”废水^[2-3]，是食品制造业的重大污染源。随着味精产业的持续发展，如何提升谷氨酸的提取效率、增强资源的循环利用率，以及有效处理发酵废液，已成为该产业面临的主要挑战。相较于传统的物理化学处理方式，生物处理法在环境兼容性、可持续性和资源回收方面展现出显著优势^[4]，成为处理谷氨酸废液的有力选择。根据废液的特定成分选择合适的微生物进行发酵能够将有机化合物有效降解或转化为有价值的副产品，以实现资源的循环利用。通过基因编辑对微生物进行改造以适应特定的处理需求，可以增强微生物对废液特定成分的降解能力。

γ -聚谷氨酸(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)是由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸单体以 γ -酰胺键连接形成的高分子量聚合物，具有保水性、增稠性、生物可降解性，在食品、化妆品、医药、农业等领域被广泛应用^[5-7]。作为一种极具发展潜力的绿色生物制剂， γ -PGA 主要通过化学合成法、提取法、酶转化法和微生物发酵法等技术生产^[8-10]。其中，微生物发酵法具有环境友好、工艺稳定、成本低等特点，是实现 γ -PGA 大规模工业化生产的主要方法^[11]，正成为国内外 γ -PGA 行业的研究热点。目前， γ -PGA 主要是通过各类芽孢杆菌以葡萄糖、甘油等为碳源，流加谷氨酸的方式生产，生产成本较高。利用

谷氨酸废液中残留的谷氨酸和氨氮作为 γ -PGA 生产的前体原料和氮源，不仅可以降低生产成本，还可以解决味精工业的环保问题，为味精企业带来新的经济增长点^[12]。然而，谷氨酸废液中存在的复杂成分对微生物生长通常具有显著抑制作用，使得 γ -PGA 转化率低下，成为在工业应用中难以回避的实质性障碍。因此，解析谷氨酸废液发酵生产 γ -PGA 过程中的抑制机制，并提高底物利用率尚待进一步探究，亟需开发一种绿色环保的工艺和技术，以高效生产 γ -PGA，实现良好的经济效益^[13]。

Dong 等^[14]前期在土壤中筛选获得一株产 γ -PGA 的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) KH2，该菌株在含有 4% L-谷氨酸的培养基中发酵 48 h 后， γ -PGA 产量达到 41 g/L。本研究选用 *B. subtilis* KH2 发酵谷氨酸废液，测定其对 γ -PGA 合成的抑制效果；基于比较转录组学方法分析 γ -PGA 合成途径中的差异基因，挖掘谷氨酸废液对发酵的潜在抑制机制；并对关键元件过表达的工程菌株合成 γ -PGA 的能力进行摇瓶发酵验证，以期对谷氨酸废液的合理利用提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10、*E. coli* S17-1、*B. subtilis* KH2、*B. subtilis* KH2 Δ res1 Δ res2、*B. subtilis* 168 均为本实验室保存，敲除质粒载体 pKVMK7-2、表达质粒载体 pMACm2 均为实验室前期所构建^[15]。

本研究使用的引物如表 1 所示，均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

质粒 Plasmid	基因 Gene	引物 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
pMACm2- <i>alsS</i>	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA alsS-R	GCTTTTGTCAAGTGATACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
	<i>alsS</i>	alsS rbsxynA-F	GGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACTTGACAAAAGCAACAAAAGAACAAAATCC
pMACm2- <i>pgsA</i>		alsS pMACm2-R	CGAGACGTCATTTCACTAGAGAGCTTTCGTTTTCATGAGTTCC
	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA pgsA-R	TCTTTTTCATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
pMACm2- <i>gltT</i>	<i>pgsA</i>	pgsA rbsxynA-F	GGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGC
		pgsA pMACm2-R	CGAGACGTCATTTCAATTATTAGATTTAGTTTGTCTACTATGATCAATATCAAACGTC
	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
pMACm2- <i>budA</i>		xynA gltT-R	ATTCTTTTCATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
	<i>gltT</i>	gltT rbsxynA-F	GACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGAAAAGAAATTAAGTTTGATTAGCCACAC
		gltT pMACm2-R	ACGAGACGTCATTTCAATTAACCAGAAATGGTTGCGTTTGTTC
pMACm2- <i>fumC</i>	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA budA-R	CTCGTTTCATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
	<i>budA</i>	budA rbsxynA-F	GGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGAAACGAGAAAGCAACATTCAGTG
pMACm2- <i>ptsG</i>		budA pMACm2-R	ACGAGACGTCATTTCAATTACAGGCTTCCTTCAGTTGTTTC
	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA fumC-R	TATTCATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
pMACm2- <i>ptsG</i>	<i>fumC</i>	fumC rbsxynA-F	GGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGGAATACAGAATTGAACGAGACACC
		fumC pMACm2-R	ACGAGACGTCATTTCAATACGCCTTTGGTTTTACCATGTCTTC
	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
pMACm2- <i>racE</i>		xynA ptsG-R	TAAACATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
	<i>ptsG</i>	ptsG rbsxynA-F	GGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGTTAAAGCATTATTCGGCGTTCTTC
		ptsG pMACm2-R	CGAGACGTCATTTCAATATTTTCAATCTTCACAATATCTTCTGTCTCTGTTGACT
pMACm2- <i>opuAB</i>	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA racE-R	TCCAACAAGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
	<i>racE</i>	racE rbsxynA-F	GGGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACTTGTGGAACAACCAATAGGAGTCATTG
pMACm2- <i>acoC</i>		racE pMACm2-R	CGAGACGTCATTTCACTATCTTTAATCGGTTCTTGCAGTGAGATAC
	<i>P_{xynA}</i>	xynA pMACm2-F	AGGGAAAGCTTGTTTTCTTCTTCAGTTCTTCATATTCTTCATAAATTTGC
		xynA opuAB-R	CTATCCATGTGTACATTTACCTCCTTTGATCGTCCCTTCAGTATAATACCACG
pKVMK7- 2- <i>ΔacoC</i>	<i>opuAB</i>	opuAB rbsxynA-F	GGGACGATCAAAGGAGGTGAAATGTACACATGGATAGACTGCCTAGAAATACCTTTAGC
		opuAB pMACm2-R	CGAGACGTCATTTCACTAGGCATTTCCCTTCG
	<i>acoC</i>	acoCup pKVMK7-2-F	TGGAATTCGAGCTCCGGCTGCGGCATCAACC
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>	uparm	acoCup-R	TTTACCTGCTTTTCTTGTGTTCCCTTTAATTCATTGCC
	<i>acoC</i>	acoCdown-F	AAAGGGGGAACACAAGAAAAGCAGGTGAAAACGACATGAC
	downarm	acoCdown	CCATGGAGGTACCCGCACATAATCGGCCCTTCGTTTAAACTCTC
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>		pKVMK7-2-R	
	<i>rocG</i>	rocGup pKVMK7-2-F	TGGAATTCGAGCTCCCTGTTCCCGCCATAATCGCG
	uparm	rocGup-R	ATGAGGTGAAAAAGTTTGAGAAGCCTCCGCAAAATAATTTTGC
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>	<i>rocG</i>	rocGdown-F	CGGAGGCTTCTCAAACTTTTTCACCTCATTGTTTTTGGCC
	downarm	rocGdown	CCATGGAGGTACCCGCAAGTGTAATATTCCTTAAAAAACATTACTTCCATGG
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>		pKVMK7-2-R	
	<i>pMACm2-F</i>		TGAAATGACGTCTCGTTGTATCTTACC
	<i>pMACm2-R</i>		CAAGCTTTCCCTTTTCAGATAATTTAGATTGTC
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>	<i>pMACm2-seq-F</i>		GGGCCAGTTTGTGAAGATTAGATGC
	<i>pMACm2-seq-R</i>		TTCACGGGTGGGCCTTTCTT
	<i>pKVMK7-2-F</i>		CGGGTACCTCCATGGACG
pKVMK7- 2- <i>ΔrocG</i>	<i>pKVMK7-2-R</i>		GGAGCTCGAATTCCTGACTC

(待续)

(续表 1)

质粒 Plasmid	基因 Gene	引物 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
		pKVMK7-2-seq-F	TGCTGGCCTTTTGCTCACATG
		pKVMK7-2-seq-R	GCCAAAATTAACGTAATGATTGGGTAGTG
		Δacoc-seq-F	TACAGGAATTCGGGCGTACAAGAG
		Δacoc-seq-R	TTCGTCTGCATGTGCCCATTC
		ΔrocG-seq-F	CCTCCATGACCTCGACAAATTTTGC
		ΔrocG-seq-R	AATCGAAGAGCAGAGGCATCTTC
		alsS-F	TCCGCAGCTACGAGCCGTTA
		alsS-R	AACCGCCGTCACCAGAGACA
		psgA-F	TGACCAAGGCTGGACGAGAACA
		psgA-R	ACAGGTGCAGGTGTCGCTTCA
		gltT-F	TGCCATATCCATGATGCGGTCT
		gltT-R	CTGCCGTGCCTGGTACTTCTT
		budA-F	AGATCAGCCTGTGAGCCAGATT
		budA-R	GGTTCCGATACCGAAGTCTCCA
		fumC-F	TCTTCAGGATGCTACGCCACTG
		fumC-R	CCGACAGCCGTTCCACCAAT
		ptsG-F	CACTCGTCTGCGTGTGACTGTA
		ptsG-R	GCCTGAATGTTGTTGCCGACTT
		racE-F	ACATTCCACATGCCCGACTTCA
		racE-R	TGCTGAACCAGTCTCCGATTGC
		opuAB-F	AGCAACTGAGGCATTCGGTTCT
		OpuAB-R	CGACCATTCGCGCGATAACAAC
		KH2 16S-F	CAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
		KH2 16S-R	CACGACACGAGCTGACGACAAC

1.1.2 主要试剂

2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Plasmid Mini Kit、Gel Extraction Kit、Cycle-Pure Kit 以及 Bacterial RNA Kit 均购自 Omega Bio-tek 公司。

1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L): 酵母浸粉 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00。固体培养基添加 1.50% 琼脂。利用氯霉素(终浓度 25.00 μg/mL)筛选转化子。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, L-谷氨酸钠 20.00, 酵母膏 5.00, K₂HPO₄ 2.00, MgSO₄·7H₂O 0.25, pH 调至 7.00。

原始发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30.00, L-谷氨酸钠 30.00, (NH₄)₂SO₄ 5.00, K₂HPO₄ 2.00,

MgSO₄·7H₂O 0.25, pH 调至 7.00。

谷氨酸废液发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30.00, L-谷氨酸钠 29.35, K₂HPO₄ 2.00, MgSO₄·7H₂O 0.25, 添加谷氨酸废液使 (NH₄)₂SO₄ 终浓度为 5.00、谷氨酸终浓度为 30.00, pH 调至 7.00。

谷氨酸废液采集自宁夏伊品生物科技股份有限公司, 4℃保存。其中谷氨酸含量为 19.00 g/L, (NH₄)₂SO₄ 含量为 146.00 g/L, NH₄⁺-N 含量为 30.90 g/L, pH 3.17。

1.2 菌种活化及发酵培养

取 200 μL *B. subtilis* KH2 甘油菌接种至 LB 培养基中, 37℃、200 r/min 培养 24 h。再以 10% 接种量接种至种子培养基, 继续培养 16 h 制备种子液。种子液以 10% 接种量分别接种至

原始发酵培养基和谷氨酸废液发酵培养基中, 继续培养 50 h。在发酵 0、24、50 h 时分别取样, 对其生物量、葡萄糖浓度、谷氨酸浓度、 γ -PGA 浓度进行测定。

1.3 转录组测序分析

按 1.2 节所述条件发酵 36 h 后取样, 4 °C、10 000×g 离心 20 min 收集菌体, 液氮速冻 20 min 后置于超低温冰箱保存。委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行 RNA 的提取、质控、建库及 Illumina HiSeq™ 测序。对原始测序结果进行过滤、基因组定位分析、基因表达水平计算、基因表达差异分析, 以 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 为筛选标准。对差异表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 以 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值。

1.4 逆转录实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 验证

B. subtilis KH2 在原始发酵培养基和谷氨酸废液发酵培养基中培养, 36 h 后收集菌体细胞。提取总 RNA, 总 RNA 检验合格并定量后, 将其反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 验证, 以 *B. subtilis* KH2 16S rRNA 基因为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析各基因相对表达水平。

1.5 质粒构建

根据基因组信息, 使用 SnapGene 软件设计引物(表 1)。以质粒或 *B. subtilis* KH2 基因组为模板, 使用 2×Phanta Max Master Mix 高保真聚合酶分别扩增质粒载体和转录关键基因。采用 Gibson 等^[16]方法连接目的基因与线性表达载体构建过表达/敲除质粒, 其中载体和片段的摩尔比为 1:2。

1.6 质粒接合转移

将目标质粒以化学转化方式转入 *E. coli* S17-1, 利用质粒对应抗生素筛选转化子, 将其作为接合转移的供体菌。Chen 等^[15]前期构建了

转化效率更高的基因敲除株 *B. subtilis* KH2 Δ res1 Δ res2, 将其作为受体菌。将供体、受体菌株分别培养至 OD_{600} 为 1.0, 用无抗 LB 培养基洗涤 2 次后混合点种于无抗 LB 平板上, 根据质粒类型分别置于 30 °C 或 37 °C 培养。选择质粒对应抗生素和 20 μ g/mL 多黏菌素 B 筛选转化子, 进行 PCR 验证。

1.7 使用 pKVMK7-2 进行基因敲除

在构建敲除质粒并接合转移入受体菌后, 在 1% 木糖和 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板与只含有 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板 45 °C 下培养, 菌落 PCR 以筛选一次同源重组菌株。将其接种到 LB 液体培养基中, 37 °C 培养活化 4 h。在添加了 1% 木糖的无抗 LB 平板上划线, 45 °C 培养 17 h, 筛选二次同源重组菌株。将其分别在 30 μ g/mL 的卡那霉素的 LB 平板和无抗 LB 平板上划线, 37 °C 培养以测试抗性。挑取只能在无抗平板上生长的单菌落, 利用引物 Δ acoC-seq-F/ Δ acoC-seq-R 或 Δ rocG-seq-F/ Δ rocG-seq-R 进行菌落 PCR 验证, 验证结果阳性即敲除成功。

1.8 重组菌株发酵验证

按 1.2 节所述, 将种子液以 10% 接种量接种至谷氨酸废液发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 50 h, 进行相关参数的测定。

1.9 相关参数测定

1.9.1 生物量、葡萄糖和谷氨酸浓度检测

生物量采用光密度法测定 OD_{600} 值。葡萄糖及谷氨酸浓度使用 SBA-40D 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)进行测定。

1.9.2 γ -PGA 浓度检测

配制 100 μ g/mL 的 γ -PGA 标准品溶液, 依次稀释后准确定容, 得到 30、40、50、60、70、80、90 μ g/mL 的 γ -PGA 标准液。

吸取待测菌液, 4 °C、10 000×g 离心 20 min 以去除菌体, 上清液中添加 4 倍体积预冷无水乙醇, 4 °C 冷藏过夜后, 4 °C、10 000×g

离心 20 min 去除无水乙醇, 得到 γ -PGA 沉淀, 加入同等体积蒸馏水复溶稀释 40–200 倍测定 γ -PGA 浓度。

采用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 比浊法测定 γ -PGA 浓度^[17]。以 2% NaOH 溶液配制 5 g/L 的 CTAB 溶液, 准确吸取 100 μ L 标准液及待测液置于 96 孔板中, 加入 100 μ L CTAB 溶液反应 3 min, 于 240 nm 处检测吸光值。根据标准曲线计算待测液 γ -PGA 浓度。

1.10 数据处理及分析

所有实验均重复 3 次, 使用 GraphPad Prism 软件对实验数据进行统计分析并作图, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 γ -PGA 生产菌 *B. subtilis* KH2 废液利用效率评估

通过比较 *B. subtilis* KH2 在利用替代氮源时的 γ -PGA 合成能力, 可以看出谷氨酸废液作为底物发酵生产 γ -PGA 呈现了显著的抑制效应。如图 1A 所示, 发酵 50 h 后 γ -PGA 产量仅达到 3.32 g/L, 相较于原始发酵培养基 (16.11 g/L γ -PGA) 降低了 79.39%。谷氨酸的消耗也证实了这一结果。在无废液的情况下, 至发酵结束谷氨酸钠共消耗了 40.00%, 而以废液替代硫酸铵后, 谷氨酸钠仅被利用了 21.88% (图 1B)。值得注意的是, 尽管废液抑制了谷氨酸的利用却加

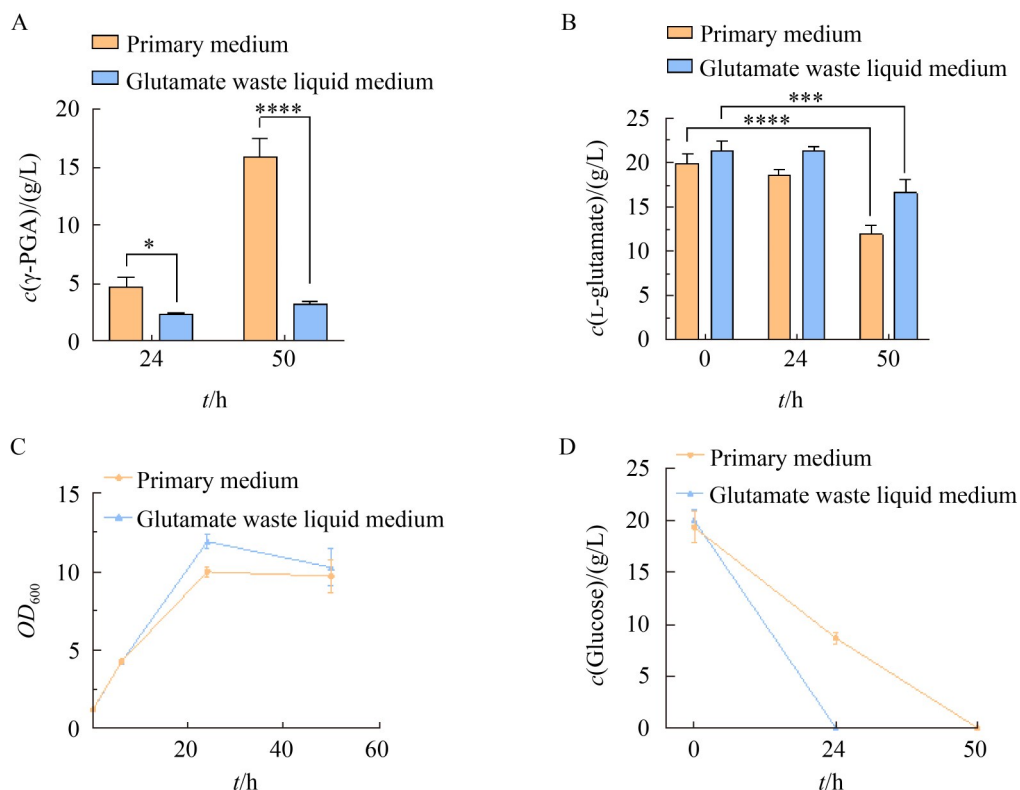


图1 枯草芽孢杆菌KH2在原始培养基和谷氨酸废液培养基发酵过程中 γ -PGA浓度(A)、谷氨酸浓度(B)、 OD_{600} (C)和葡萄糖浓度(D)的变化

Figure 1 Changes of γ -PGA concentration (A), glutamate concentration (B), OD_{600} (C) and glucose concentration (D) in primary medium and glutamate waste liquid medium fermentation of *Bacillus subtilis* KH2.

*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

快了碳源的消耗和菌体的生长。在发酵 24 h 时, 废液组中 *B. subtilis* KH2 的 OD_{600} 达到了 12.0 (图 1C), 并将培养体系中的葡萄糖全部耗尽(图 1D)。在 2 种培养条件下, 菌体的生长与 γ -PGA 的合成并不同步, 相对较高的生物量并未提升 γ -PGA 的产量, 说明谷氨酸废液在 γ -PGA 合成过程中对 *B. subtilis* KH2 产生了某种抑制效应, 其潜在机制的挖掘将有助于针对性地提高产物的产量和合成效率。

2.2 谷氨酸废液对 γ -PGA 合成的转录组学分析

2.2.1 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

通过 Illumina 平台对原始发酵(A)和谷氨酸废液发酵(B) 2 组样品进行测序。在分析前对原始数据进行处理以保证数据分析的质量。如表 2 所示, 各样品的 G+C 含量均在 45.45% 以上, Q20 比率在 96.22%–98.85% 之间, Q30 比率在 96.22%–96.53% 之间, 表明本次转录组测序数据质量较高, 可用于下一步的数据分析。

对各基因表达量进行统计, 筛选差异基因并绘制火山图, 结果如图 2A 所示。A 和 B 共筛选出 1 819 个显著差异基因, 其中 952 个显著上调, 867 个显著下调。为了确定差异基因在不同发酵体系中的功能, 对其进行了 GO 和 KEGG 富集分析。由图 2B 可知, 相较于以硫酸铵作为

氮源的对照组, 差异基因主要参与有机氮化合物代谢、小分子代谢等生物过程, 所处细胞组成主要为细胞、细胞器等, 富集的差异基因在分子功能中主要涉及核苷磷酸结合、碳水化合物衍生物结合、核苷结合等。 γ -PGA 合成的差异可能与差异基因在这些代谢过程中的作用有关。

为了明确差异基因参与的主要生化代谢途径及信号转导途径, 对不同发酵体系的差异表达基因进行 KEGG 通路分析, 结果如图 2C 所示。以谷氨酸废液替代硫酸铵发酵后, 差异基因显著富集于次级代谢产物的生物合成、氨基酰基-tRNA 生物合成和卟啉代谢这 3 条通路中, 其中富集到次级代谢产物的生物合成达 239 个, 辅因子的生物合成达 109 个。

2.2.2 关键基因的筛选及实时定量验证

根据转录组测序结果, 并结合 *B. subtilis* KH2 中参与 γ -PGA 合成途径的基因分析, 初步筛选了 10 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。这些基因包括: γ -PGA 合成相关基因 *pgsA*; PTS 葡萄糖转运蛋白亚基基因 *ptsG*; 谷氨酸转运相关基因 *gltT*; 乙偶姻代谢途径相关基因 *alsS*、*budA*; TCA 途径相关基因 *fumC*; 谷氨酸消旋酶基因 *racE*; ABC 转运蛋白相关基因 *opuAB*; 乙偶姻脱氢酶基因 *acoC*; 谷氨酸脱氢

表2 测序数据质量汇总情况

Table 2 Summary of sequencing data quality

样品名称 Sample name	原始读数 Raw reads	过滤后读数 Clean reads	过滤后数据 碱基数 Clean bases (Gb)	错误率 Error rate (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C 含量 G+C content (%)
A1	7 943 798	7 618 002	1.1	0.01	98.85	96.53	45.63
A2	7 879 596	7 573 138	1.1	0.01	96.28	96.28	45.46
A3	7 629 422	7 374 114	1.1	0.01	96.39	96.39	45.71
B1	6 626 904	6 344 550	1.0	0.01	96.27	96.27	45.69
B2	7 788 616	7 497 488	1.1	0.01	96.22	96.22	45.45
B3	7 672 904	7 384 312	1.1	0.01	96.32	96.32	45.59

A: 原始发酵; B: 谷氨酸废液发酵。各3个平行。

A: Primary fermentation; B: Glutamate waste liquid fermentation. Each condition includes three biological replicates.

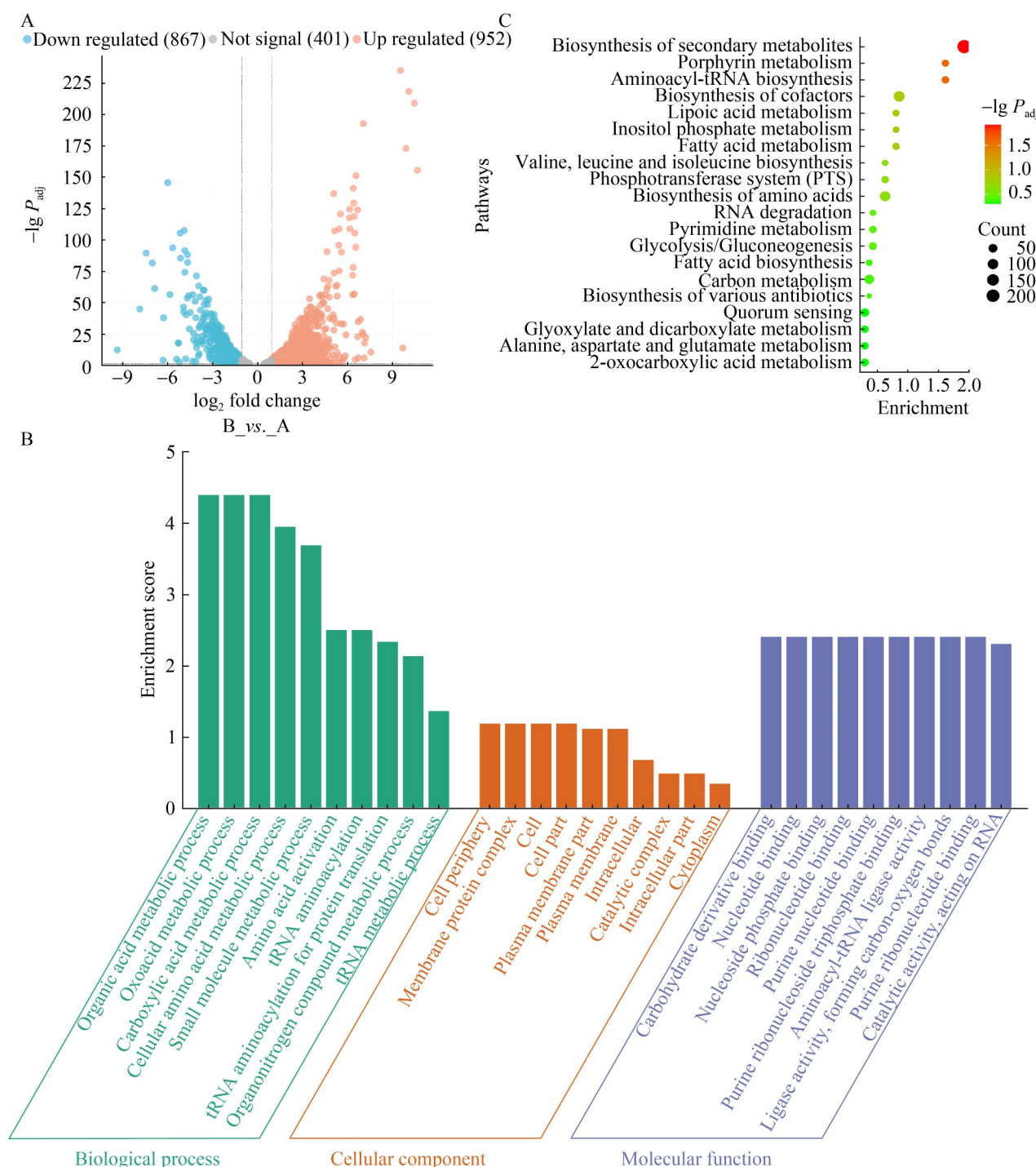


图2 转录组数据分析。A: 差异表达基因的火山图; B: 差异表达基因的GO富集分析; C: 差异表达基因的KEGG富集分析。B_vs._A: 谷氨酸废液发酵 vs. 原始发酵。

Figure 2 Transcriptome data analysis. A: The volcano map of the differentially expressed genes; B: GO enrichment analysis of differentially expressed genes; C: KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes. B_vs._A: Glutamate waste liquid fermentation vs. primary fermentation.

酶基因 *rocG*。以 16S rRNA 为内参基因, RT-qPCR 的结果与转录组测序结果中基因表达趋势相一致, 表明转录组测序结果较为可靠(图 3)。上述 10 个基因的表达量均有不同程度的上调或下调, 说明 γ -PGA 合成过程中受到多个通路的调节。代谢途径如图 4 所示, 其中红色表示基因表达水平的上调, 绿色表示下调。

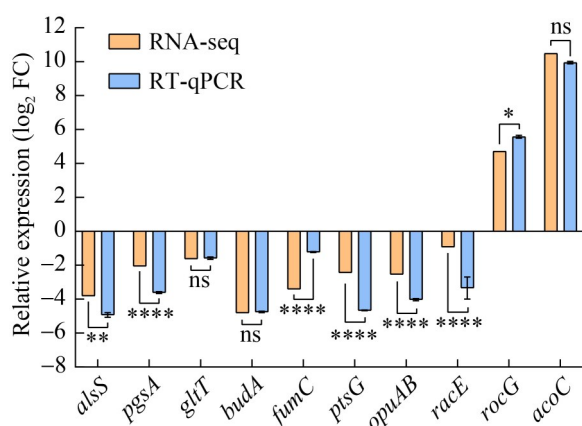


图3 基于RT-qPCR验证转录组关键DEGs的表达水平。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: 无显著差异。基因描述: *alsS*: 乙酰乳酸合成酶; *pgsA*: 聚谷氨酸合成酶亚基; *gltT*: 谷氨酸/质子同向转运蛋白; *budA*: 乙酰乳酸脱羧酶; *fumC*: 延胡索酸酶; *ptsG*: PTS葡萄糖转运蛋白亚基; *racE*: 谷氨酸消旋酶; *opuAB*: 甘氨酸/脯氨酸甜菜碱ABC转运体渗透酶亚基; *rocG*: 谷氨酸脱氢酶; *acoC*: 乙偶姻脱氢酶复合体亚基。

Figure 3 RT-qPCR verification of expression levels of key DEGs in the transcriptome. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference. Gene description: *alsS*: Acetolactate synthase; *pgsA*: Polyglutamate synthetase subunit; *gltT*: Glutamate/proton symporter; *budA*: Acetolactate decarboxylase; *fumC*: Fumarate hydratase; *ptsG*: PTS glucose transporter; *racE*: Glutamate racemase; *opuAB*: Glycine/proline betaine ABC transporter permease subunit; *rocG*: Glutamate dehydrogenase; *acoC*: Acetoin dehydrogenase.

2.3 过表达及敲除菌株的构建及发酵验证

为了探究上述 10 个基因是否是造成谷氨酸废液发酵与原始发酵差异的原因, 本研究将 8 个下调的关键代谢途径基因(*alsS*、*pgsA*、*gltT*、*budA*、*fumC*、*ptsG*、*racE*、*opuAB*)分别以质粒表达的方式构建过表达菌株, 并在谷氨酸废液中进行发酵验证, 以转入空载质粒 pMACm2 的 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* 菌株作为阴性对照。如图 5 所示, 发酵 50 h 后, 阴性对照的 γ -PGA 产量为 5.68 g/L, 而过表达菌株的 γ -PGA 产量分别为 10.86、12.54、13.49、7.75、8.00、11.62、9.41、9.64 g/L (图 5A), 产量分别提升了 91.20%、120.77%、137.50%、36.44%、40.85%、104.58%、65.67%、69.72%。其中 γ -PGA 产量最高的为 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2*/pMACm2-*gltT*, 达到 13.49 g/L。在谷氨酸利用方面, 发酵 50 h 后, 阴性对照 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2*/pMACm2 中谷氨酸的利用率为 28.57%, 各过表达菌株的谷氨酸利用率为 32.00%、40.14%、64.10%、33.55%、24.66%、41.40%、50.00%、43.37% (图 5B)。OD₆₀₀ 和葡萄糖浓度变化如图 5C 和图 5D 所示。其中, 谷氨酸利用率最高的菌株是 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2*/pMACm2-*gltT*, 利用率达到 64.10%, 该菌株对谷氨酸的利用率甚至高于不添加废液的原始发酵条件下的利用率(40.00%)。

本研究构建了 2 株敲除菌株 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *acoC* 和 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *rocG*, 菌落 PCR 验证的正确条带大小分别为 1 995 bp 和 1 842 bp (图 6)。获得敲除菌株后, 在谷氨酸废液中进行发酵测试, 以 *B. subtilis* KH2 和 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* 菌株为对照。发酵 50 h 后, γ -PGA 产量分别为 3.62 g/L 和 13.51 g/L, 而 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *acoC* 和 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *rocG* 的 γ -PGA 产量分别为 13.29 g/L 和 13.21 g/L (图 7A)。与 *B.*

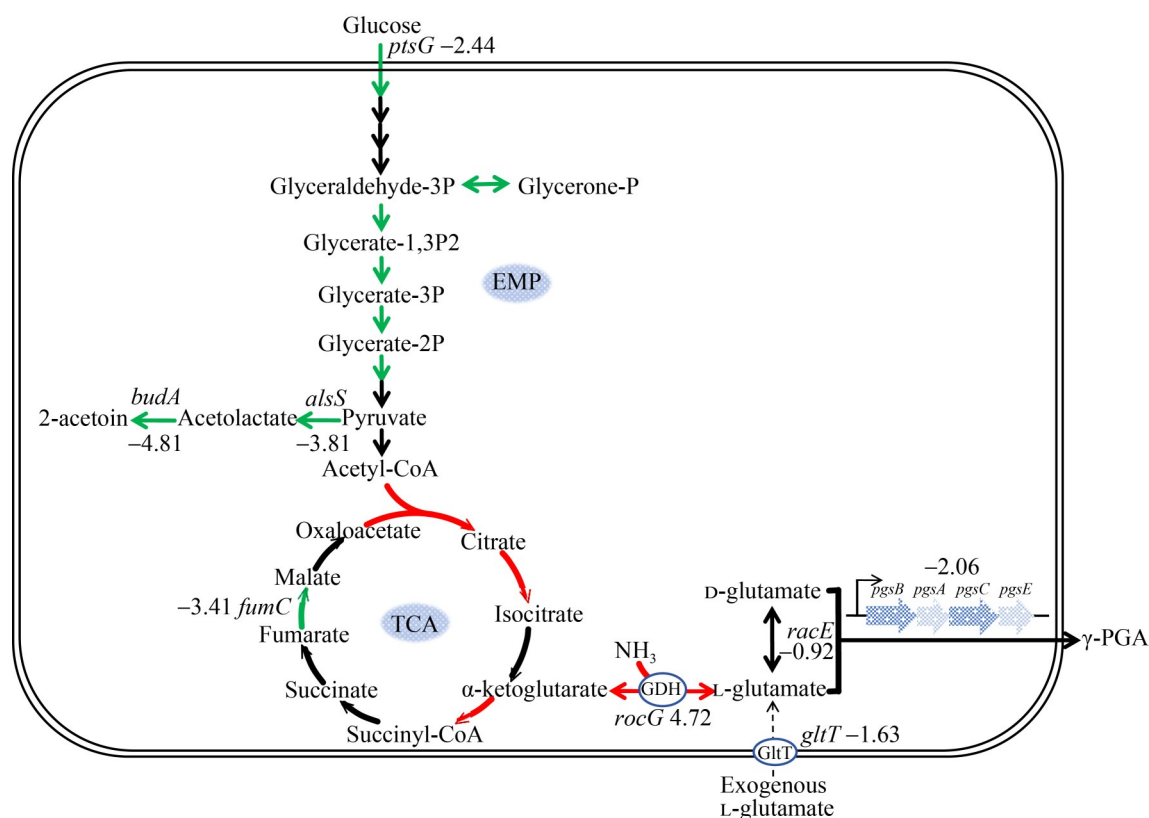


图4 γ -PGA合成相关代谢途径。红线表示基因表达水平的上调，绿色表示下调。基因及对应编码蛋白：*ptsG*：PTS葡萄糖转运蛋白亚基；*alsS*：乙酰乳酸合成酶；*budA*：乙酰乳酸脱羧酶；*fumC*：延胡索酸酶；*rocG*：谷氨酸脱氢酶；*racE*：谷氨酸消旋酶；*gltT*：谷氨酸/质子同向转运蛋白；*pgsB*：聚谷氨酸合成酶亚基；*pgsA*：聚谷氨酸合成酶亚基；*pgsC*：聚谷氨酸合成酶亚基；*pgsE*：聚谷氨酸合成酶亚基；GDH：谷氨酸脱氢酶。

Figure 4 Related metabolic pathways for γ -PGA synthesis. Red lines indicate up-regulated gene expression levels and green indicates down-regulated gene expression levels. Genes and coding proteins: *ptsG*: PTS glucose transporter; *alsS*: Acetolactate synthase; *budA*: Acetolactate decarboxylase; *fumC*: Fumarate hydratase; *rocG*: Glutamate dehydrogenase; *racE*: Glutamate racemase; *gltT*: Glutamate/proton symporter; *pgsB*: Polyglutamate synthetase subunit; *pgsA*: Polyglutamate synthetase subunit; *pgsC*: Polyglutamate synthetase subunit; *pgsE*: Polyglutamate synthetase subunit; GDH: Glutamate dehydrogenase.

subtilis KH2 Δ res1 Δ res2 菌株相比，2 株敲除菌的 γ -PGA 产量并未提升。在谷氨酸利用方面，发酵 50 h 后，*B. subtilis* KH2、*B. subtilis* KH2 Δ res1 Δ res2、*B. subtilis* KH2 Δ res1 Δ res2 Δ acoC 和 *B. subtilis* KH2 Δ res1 Δ res2 Δ rocG 的谷氨酸利用率分别为 17.33%、52.56%、45.57%、50.65% (图 7B)。

3 讨论与结论

谷氨酸废液中含有大量硫酸铵，可满足 γ -PGA 发酵过程中的氮源需求^[18]。以废液替代硫酸铵生产 γ -PGA 不仅有望降低企业的生产成本，还能够减少对环境造成的负担，实现资源的循环利用。然而在实际生产中，废液的处理和再利用需要综合考虑其化学组成、环境影响以及经

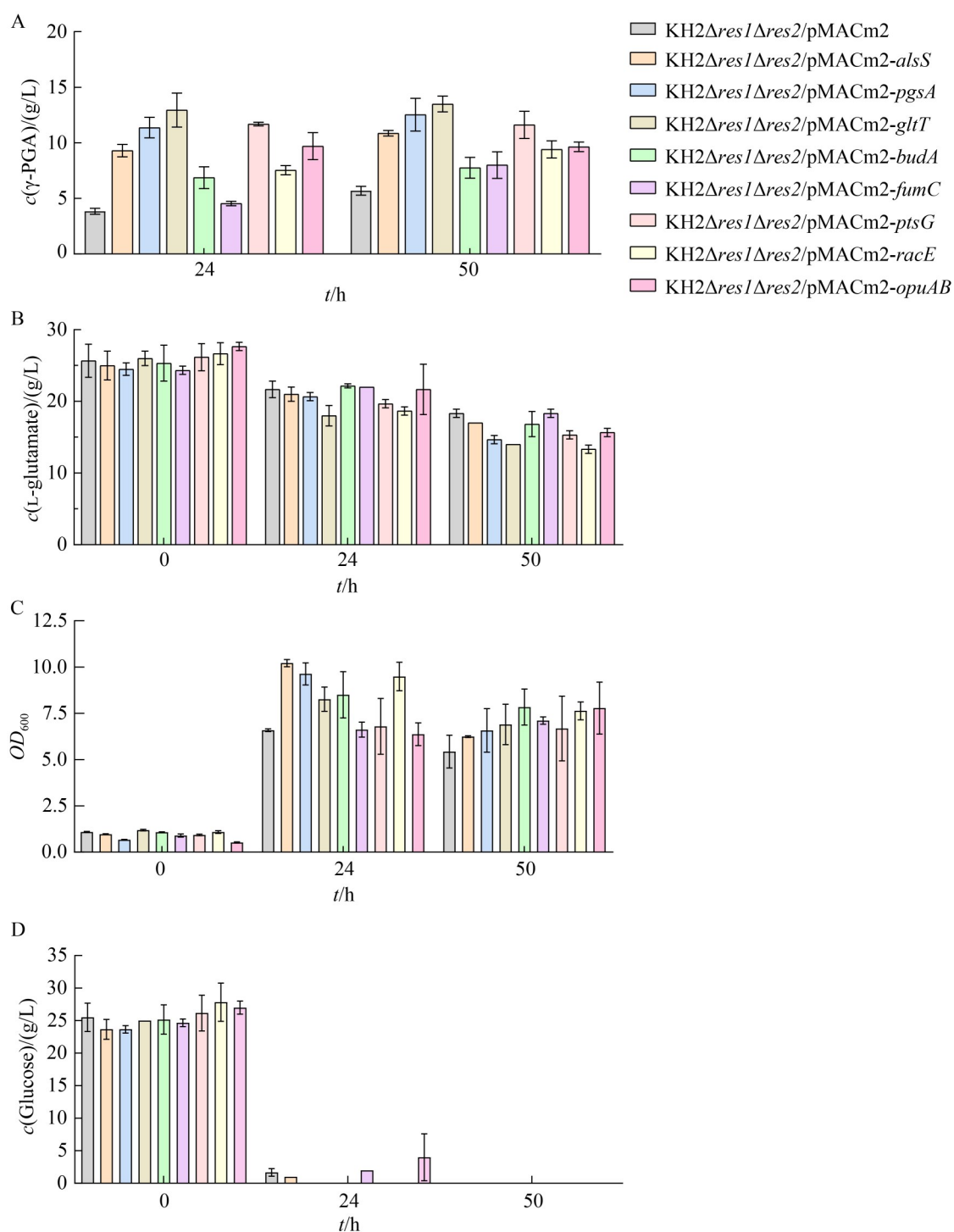


图5 过表达菌株在谷氨酸废液培养基发酵过程中 γ -PGA浓度(A)、谷氨酸浓度(B)、 OD_{600} (C)和葡萄糖浓度(D)的变化

Figure 5 Changes of γ -PGA concentration (A), glutamate concentration (B), OD_{600} (C) and glucose concentration (D) in glutamate waste medium fermentation of overexpressed strains.

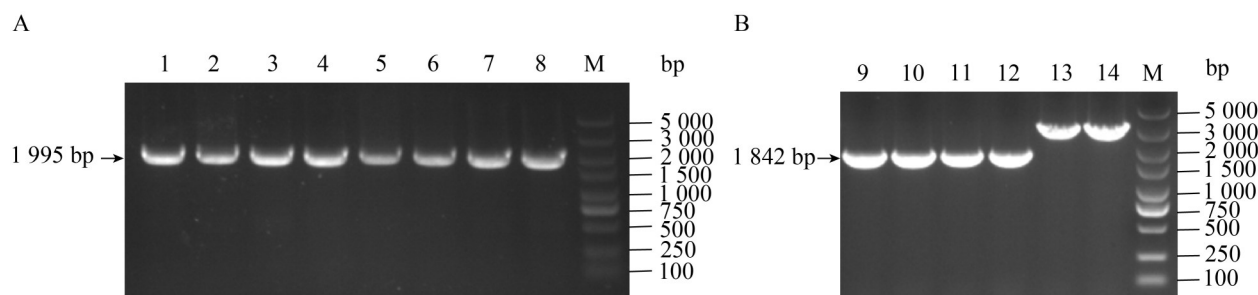


图6 *Bacillus subtilis* KH2Δres1Δres2ΔacoC (A)和*B. subtilis* KH2Δres1Δres2ΔrocG (B)菌落PCR验证

Figure 6 Colony verification of *Bacillus subtilis* KH2Δres1Δres2ΔacoC (A) and *B. subtilis* KH2Δres1Δres2ΔrocG (B) by PCR. Lane M: Marker; Lanes 1–8: *B. subtilis* KH2Δres1Δres2ΔacoC; Lanes 9–12: *B. subtilis* KH2Δres1Δres2ΔrocG; Lanes 13–14: *B. subtilis* KH2Δres1Δres2.

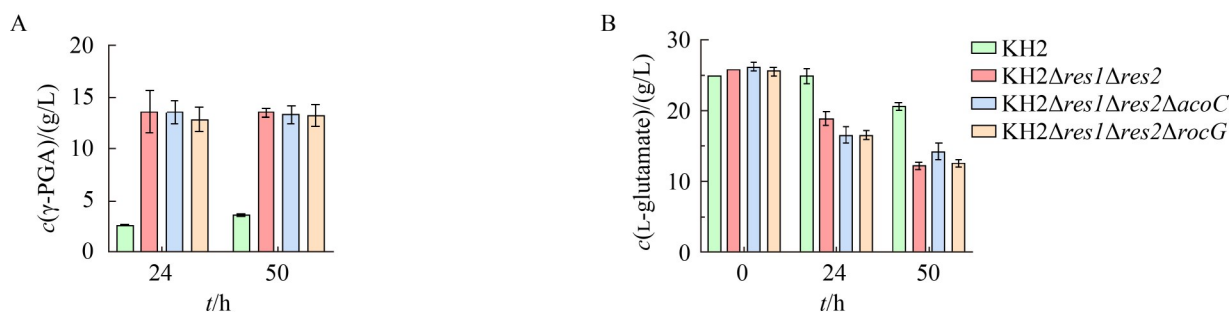


图7 敲除菌株在谷氨酸废液培养基发酵过程中γ-PGA浓度(A)和谷氨酸浓度(B)的变化

Figure 7 Changes of γ-PGA concentration (A) and glutamate concentration (B) in glutamate waste medium fermentation of knockout strains.

济效益。作为高浓度有机废水，废液中含有大量的氨基酸、核苷酸、金属成分、有机酸、无机盐等，导致初始营养物质过多，从而在发酵液与种子液之间形成较大的环境差异。这会延长菌种生长的适应期，使其无法在生产过程中保持最佳状态，不利于菌种的生长代谢和γ-PGA的积累。

在本研究中，废液培养基中菌体对营养物质的吸收主要用于完成自身生长发育，而非用于γ-PGA的合成积累，导致合成γ-PGA的前体物谷氨酸钠大量残留在培养基中，造成不必要的原料浪费。为了进一步探究废液对γ-PGA合成的抑制机制，本研究对发酵36 h的2种发酵液进行了比较转录组分析。2个样本中共有1 819个显著差异基因。基于GO和KEGG数据

库，根据比对结果对基因的属性进行分类，明确了差异基因的功能及其在特定代谢通路中的富集情况。谷氨酸废液的添加影响了*B. subtilis* KH2中参与代谢过程、酶的表达、代谢物转运等进程的基因表达量。参与糖酵解、谷氨酸转运、γ-PGA合成途径的基因显著下调，可能会对该菌合成γ-PGA的水平产生影响。

γ-PGA是在胞内聚谷氨酸合成酶的作用下将外源性或内源性的谷氨酸聚合形成的，其生物合成途径涵盖了底物利用与前体合成、聚合物合成、信号分子调控等过程^[19]。在底物利用与前体合成阶段，γ-PGA的高效合成需要充足的碳源供应，葡萄糖是细胞的主要碳源和能量来源，基因*ptsG*编码的蛋白负责将葡萄糖转运进细胞，进而进入糖酵解途径，过表达*ptsG*后

γ -PGA 产量提升了 104.58%，表明 *ptsG* 的高效表达可以增强葡萄糖的转运及利用效率^[20]，为 γ -PGA 的合成提供更多中间代谢产物和能量，从而促进目标产物 γ -PGA 的合成。糖酵解过程中产生的丙酮酸可转变为乙酰辅酶 A 后进入 TCA 循环，生成的 α -酮戊二酸即为合成 L-谷氨酸的前体物质^[21]。丙酮酸还可以在乙酰乳酸合酶和乙酰乳酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻，进一步生成乙酸、乙酰辅酶 A 和 NADH^[22]。分别对 *alsS* 和 *budA* 基因过表达后，可能有利于代谢流的调控以及还原力的平衡，从而导致 γ -PGA 产量提升。FumC 催化延胡索酸向苹果酸的转化，过表达 *fumC* 基因可以促进 TCA 循环的运转效率，进而促进 γ -PGA 的产生。

在聚合物合成阶段，*gltT* 编码谷氨酸转运蛋白，通过与质子或钠离子的共转运来介导谷氨酸的转运。这种转运过程由质子和钠离子的动力势驱动^[23]。*gltT* 基因表达下调影响了外源谷氨酸钠进入细胞，进而导致谷氨酸的利用效率降低，而谷氨酸是 γ -PGA 聚合的直接底物，因此影响了 γ -PGA 的合成。过表达 *gltT* 基因后，谷氨酸利用效率是阴性对照组的 2.24 倍， γ -PGA 产量是阴性对照组的 2.38 倍。谷氨酸消旋酶 RacE 负责 L-谷氨酸的细胞内异构化，催化 L-型和 D-型谷氨酸之间的构型转换。增强 *racE* 的表达不仅能够调节 γ -PGA 的分子量和构型，而且有利于细胞的生长和 γ -PGA 的合成^[24]。 γ -PGA 的生物合成系统可分为 2 类：以炭疽芽孢杆菌为代表的组成型合成系统和以枯草芽孢杆菌为代表的分泌型合成系统^[25]。二者的 γ -PGA 合成基因分别为 *capB*、*capC*、*capA*、*capD* 和 *pgsB*、*pgsC*、*pgsA*、*pgsE*。Xu 等^[26]证实了谷氨酸棒状菌中 *pgsB*、*pgsC* 和 *pgsA* 均是 γ -PGA 合成所必需的，并通过单独调节每个组分的表达水平，明确了基因的表达对 γ -PGA 合成的影响。作为 γ -PGA 的运输载体，PgsA 参与 γ -PGA 的转运过程，也对链的延长起重要作用。Xu 等^[26]证明了适度增加 *pgsA* 的转录水平有利

于 γ -PGA 产量的增加。过表达基因 *pgsA* 后， γ -PGA 产量是阴性对照组的 2.21 倍，提高了聚合物转运和信号分子调控效率。

OpuA 系统是枯草芽孢杆菌的渗透保护剂甘氨酸甜菜碱的主要转运体^[27]，它由 3 个亚基构成，分别是 ATP 酶 (OpuAA)、跨膜结构域 (OpuAB) 和亲水性多肽 (OpuAC)^[28]。在谷氨酸废液发酵过程中，*B. subtilis* KH2 中 *opuAA*、*opuAB*、*opuAC* 基因的表达均受到了不同程度的抑制。通过过表达 *opuAB* 基因，使 γ -PGA 的产量提升了 69.72%。

编码限制性核酸内切酶的基因 *res1* 和 *res2* 的敲除提高了 γ -PGA 的产量，这可能是由于其促进了菌株的生长。发酵 50 h 后，*B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2*、*B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *acoC* 和 *B. subtilis* KH2 Δ *res1* Δ *res2* Δ *rocG* 的生长状况均好于 *B. subtilis* KH2。

本研究通过转录组测序技术分析了谷氨酸废液对 *B. subtilis* KH2 的抑制机制。在废液发酵中，*ptsG*、*gltT*、*racE*、*pgsA*、*fumC*、*alsS*、*budA* 和 *opuAB* 等基因的下调对 *B. subtilis* KH2 的底物利用、谷氨酸构型转换与聚合、TCA 循环等产生了显著影响，从而降低了 γ -PGA 的合成效率。通过过表达关键基因强化了 *B. subtilis* KH2 的底物转运及利用途径，有效地提高了利用谷氨酸废液发酵合成 γ -PGA 的产量。一方面，本研究为枯草芽孢杆菌生产 γ -PGA 的代谢改造提供了理论指导；另一方面，初步揭示了谷氨酸废液对 γ -PGA 合成的抑制机制，为利用工业废液生产高附加值生物聚合物提供了一种可持续的生物技术方法，且对环境友好。

作者贡献声明

胡瑞鑫：开展实验、数据收集与处理、论文撰写；田缘：数据收集与处理、论文撰写；鞠建松：论文修改；于波：论文修改；王丽敏：研究构思、设计、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] DONG LM, LI YZ, WANG P, FENG ZH, DING N. Cleaner production of monosodium glutamate in China[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 190: 452-461.
- [2] YANG QX, YANG M, ZHANG SJ, LV WZ. Treatment of wastewater from a monosodium glutamate manufacturing plant using successive yeast and activated sludge systems[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(7): 2483-2488.
- [3] 陈旭良, 郑平, 金仁村, 胡宝兰. 味精废水厌氧氨氧化生物脱氮的研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(5): 747-752. CHEN XL, ZHENG P, JIN RC, HU BL. Biological nitrogen removal from monosodium glutamate-containing industrial wastewater with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(5): 747-752 (in Chinese).
- [4] HUO Q, LI RY, CHEN CQ, WANG CQ, LONG TF, LIU X. Study on potential microbial community to the waste water treatment from bauxite desilication process[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(6): 15438-15453.
- [5] SHIH IL, VAN YT. The production of poly- (gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79(3): 207-225.
- [6] KUNIOKA M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2004, 4(3): 324-329.
- [7] ZHANG L, YANG XM, GAO DC, WANG LL, LI J, WEI ZB, SHI YL. Effects of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plant-soil system[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6090.
- [8] 孙先林, 曾驰. γ -聚谷氨酸的微生物合成及应用[J]. *广东化工*, 2012, 39(13): 185-186. SUN XL, ZENG C. Microbial biosynthesis and application of poly- γ -(glutamic acid) [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2012, 39(13): 185-186 (in Chinese).
- [9] BAJAJ I, SINGHAL R. Poly (glutamic acid): an emerging biopolymer of commercial interest[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 5551-5561.
- [10] 张二伟, 刘宁, 吴涛, 朱方剑, 聂光军. γ -PGA 的基本特性、生产方法及相关应用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(16): 318-324. ZHANG EW, LIU N, WU T, ZHU FJ, NIE GJ. Traits, production and application of poly- γ -glutamic acid[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(16): 318-324 (in Chinese).
- [11] SIRISANSANEYAKUL S, CAO MF, KONGKLOM N, CHUENSANGJUN C, SHI ZP, CHISTI Y. Microbial production of poly- γ -glutamic acid[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(9): 173.
- [12] YU FP, ZHAO C, SU L, ZHANG S, SUN X, LI KL, YUE QL, ZHAO L. Treatment and high value utilization of glutamic acid wastewater[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022, 52(10): 1119-1133.
- [13] LI BC, CAI DB, HU SY, ZHU AT, HE ZL, CHEN SW. Enhanced synthesis of poly gamma glutamic acid by increasing the intracellular reactive oxygen species in the *Bacillus licheniformis* Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase gene *ycgN*-deficient strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(23): 10127-10137.
- [14] DONG H, LI XH, CHANG JL, HE X, HOU QL, LONG W. Whole genome sequence determination and analysis of *Bacillus subtilis* strain CGMCC 12426[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2019, 41(3): 307-314.
- [15] CHEN SB, FU JM, YU B, WANG LM. Development of a conjugation-based genome editing system in an undomesticated *Bacillus subtilis* strain for poly- γ -glutamic acid production with diverse molecular masses[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(20): 7734-7743.
- [16] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA 3rd, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
- [17] ASHIUCHI M. Analytical approaches to poly- γ - glutamate: quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(29): 3096-3101.
- [18] 王睿, 王倩, 林樟楠, 杨鹏波, 丛威. 谷氨酸提取技术及其废液资源化清洁生产研究进展[J]. *中国调味品*, 2021, 46(12): 196-200. WANG R, WANG Q, LIN ZN, YANG PB, CONG W. Research progress of glutamate extraction technology and waste liquid recycling clean production[J]. *China Condiment*, 2021, 46(12): 196-200 (in Chinese).
- [19] HAN R, ZHONG Q, YAN YF, WANG J, ZHU YF, LI S, LEI P, WANG R, QIU YB, LUO ZS, XU H. Transcriptomics-guided rational engineering in *Bacillus licheniformis* for enhancing poly- γ -glutamic acid biosynthesis using untreated molasses[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 137514.
- [20] 刘冬冬, 张伟国, 徐建中, 田成福. 不同葡萄糖转运途径相关基因的过表达对菌株葡萄糖代谢及产物合成的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(7): 27-34.
- [21] HSUEH YH, HUANG KY, KUNENE SC, LEE TY. Poly- γ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(12): 2644.
- [22] 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 吴超, 薛正莲, 陈宇, 刘艳. 基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响[J]. *微生物学报*, 2024, 64(7): 2394-2406. HUANG XL, HUANG JB, GAO XL, LUO YN, TAO W, GUO MY, LIU YY, WU J, WU C, XUE ZL, CHEN Y, LIU Y. RNA-seq reveals the effects of *bdhA* knockout on co-production of nattokinase and menaquinone-7 by *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024,

- 64(7): 2394-2406 (in Chinese).
- [23] GAILLARD I, SLOTBOOM DJ, KNOL J, Lolkema JS, KONINGS WN. Purification and reconstitution of the glutamate carrier GltT of the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(19): 6150-6156.
- [24] SHA YY, HUANG YY, ZHU YF, SUN T, LUO ZS, QIU YB, ZHAN YJ, LEI P, LI S, XU H. Efficient biosynthesis of low-molecular-weight poly- γ -glutamic acid based on stereochemistry regulation in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(6): 1395-1405.
- [25] 曹名锋, 金映虹, 解慧, 王淑芳, 宋存江. γ -聚谷氨酸的微生物合成、相关基因及应用展望[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(3): 388-395.
- CAO MF, JIN YH, XIE H, WANG SF, SONG CJ. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid), its related genes and application prospects[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(3): 388-395 (in Chinese).
- [26] XU GQ, WANG JY, SHEN JC, ZHU YX, LIU WJ, CHEN YH, ZHA J, ZHANG XM, ZHANG XJ, SHI JS, KOFFAS MAG, XU ZH. Enhanced poly- γ -glutamic acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* by reconstituting PgsBCA complex and fermentation optimization[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 238-248.
- [27] KAPPES RM, KEMPF B, BREMER E. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(17): 5071-5079.
- [28] KEMPF B, BREMER E. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(28): 16701-16713.