

# 胶质芽孢杆菌葡萄糖磷酸变位酶基因的克隆、表达与酶学性质研究

唐家毅<sup>1</sup>, 蓝东明<sup>2</sup>, 王永华<sup>2</sup>, 杨博<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)(2. 华南理工大学轻工与食品学院 广东广州 510641)

**摘要:** 胶质芽孢杆菌所产胞外多糖作为絮凝剂在食品工业废水处理方面比传统的工业絮凝剂具有更好应用效果而引起了广泛的关注。葡萄糖磷酸变位酶(PGM, EC 5.4.2.2)能将葡萄糖-6-磷酸转变成葡萄糖-1-磷酸而被认为是多糖合成路径上的关键酶之一。本研究克隆获得来源于自胶质芽孢杆菌 GIM1.16 编码 PGM 的基因 *pgm*。序列分析表明, 该基因包含一个 1710 bp 的读码框。在大肠杆菌中表达了 *pgm* 基因并纯化了重组蛋白, SDS-PAGE 电泳结果显示重组的 PGM 分子量约为 63 kDa。重组的 PGM 最适反应温度为 40 °C, 但当反应温度超过 55 °C 时, PGM 基本丧失活性, PGM 在酸性 (pH 4~6) 及碱性溶液 (pH 8.5~10) 中均表现出低活性, 其最适合反应 pH 值为 7.5。PGM 对底物葡萄糖-1-磷酸的  $K_{cat}$  和  $K_m$  值分别为  $684 \text{ min}^{-1}$  和  $0.24 \text{ mM}^{-1}$ 。本研究为胶质芽孢杆菌菌株的基因工程改造和代谢工程研究奠定了坚实基础。

**关键词:** 胞外多糖; 胶质芽孢杆菌; 葡萄糖磷酸变位酶

文章编号: 1673-9078(2015)3-38-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.007

## Cloning, Expression, and Characterization of a Phosphoglucomutase from *Paenibacillus mucilaginosus*

TANG Jia-yi<sup>1</sup>, LAN Dong-ming<sup>2</sup>, WANG Yong-hua<sup>2</sup>, YANG Bo<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 51006, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** Exopolysaccharides produced by *Paenibacillus mucilaginosus* as flocculants have attracted much attention from wastewater treatment in the food industry because of their better performance over traditional industrial flocculants. Phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2), which is responsible for the transformation of glucose 6-phosphate (G6P) into glucose 1-phosphate (G1P), was considered to be the key enzyme involved in the biosynthesis of polysaccharides. In this article, a *pgm* gene encoding PGM from *P. mucilaginosus* GIM1.16 was cloned. Sequence analysis showed that the *pgm* contained a 1710 bp open reading frame (ORF). Subsequently, the *pgm* gene was expressed in *Escherichia coli*, and SDS-PAGE analysis demonstrated that the molecular weight of the recombinant protein was 63 kDa. The optimum temperature for the recombinant PGM activity was 40 °C, but the enzyme became inactive once the incubation temperature exceeded 55 °C. The recombinant PGM showed low activity in acidic conditions (pH 4.0~6.0) and alkaline conditions (pH 8.5~10.0), and the optimum pH for the activity of this enzyme was 7.5. The  $K_{cat}$  and  $K_m$  values of PGM were  $684 \text{ min}^{-1}$  and  $0.24 \text{ mM}^{-1}$  on G1P, respectively. This work lays a solid foundation for the construction of genetically engineered strains and metabolic engineering research.

**Key words:** exopolysaccharide; *Paenibacillus mucilaginosus*; phosphoglucomutase

微生物絮凝剂是一类由细菌、真菌和放线菌等微生物在生长过程中代谢产生的、具有可降解特性的无

收稿日期: 2014-07-29

基金项目: 广东省自然科学基金 (S2012040007734); 中央高校基金 (2014ZM0062)

作者简介: 唐家毅 (1982-), 男, 博士研究生, 研究方向: 主要从事发酵工程研究

通讯作者: 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 工业酶与脂质生物转化及食品安全

毒水处理剂<sup>[1]</sup>, 其主要成分为多糖、蛋白、脂类以及核酸分子。因其具有安全、绿色环保等优良特性而广泛应用于食品行业中, 如食品工业废水除浊脱色、废水中油水分离以及饮料澄清等方面<sup>[1~3]</sup>。胶质芽孢杆菌所产的多糖型絮凝剂在处理淀粉废水和重金属吸附等方面比传统的工业絮凝剂具有更好应用效果而引起了广泛的关注<sup>[4,5]</sup>。但胶质芽孢杆菌产多糖的效率偏低是其工业化应用的一个瓶颈, 通过基因工程技术改造控制胶质芽孢杆菌合成多糖的关键酶基因, 从而提高多

糖的产量是未来大规模生产该絮凝剂的一个可行性方案。

葡萄糖磷酸变位酶 (PGM, EC 5.4.2.2) 是碳代谢中的一个关键酶, 它可通过葡萄糖 1, 6-二磷酸将磷酸基团从葡萄糖 C-1 位转化到 C-6 位或从葡萄糖 C-6 位转换至 C-1 位<sup>[6]</sup>。PGM 是连接糖酵解和糖异生路径的枢纽, 一方面, 磷酸化的糖可进入不同的分解代谢路径, 产生能量 (ATP) 或者还原力 (NADPH); 另一方面, 磷酸化的糖可进入合成代谢路径, 合成 UDP-葡萄糖, 为多糖的合成提供前体物质<sup>[6]</sup>。因此, PGM 是微生物多糖代谢的关键酶, 因此 PGM 可作为构建高产多糖微生物的基因工程菌的理想靶标<sup>[7-9]</sup>。如在 *Sphingomonas sanxanigenens* 中过表达 *pgmG* 基因使鞘氨醇胶产量提高 17%, 达到了 12.5 g/L 的产量<sup>[9]</sup>。

本研究分析了胶质芽孢杆菌 KNP414 的全基因组序列 (GenBank Accession No. NC\_015690.1) 信息, 获得了一个序列为 1710 bp 的假定 *pgm* 基因。通过设计特异引物, 扩增获得 *pgm* 基因序列, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行重组表达。并从温度、pH 以及动力学等方面对重组的 PGM 酶进行酶学性质研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

实验用的胶质芽孢杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) GIM1.16 购买于广东省微生物研究所, 现由实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

表达宿主菌为 BL21 (DE3), 克隆载体为 pET23a-CBD, 由实验室保存; Primer Star HS、Mark、DNA 连接酶、限制性内切酶 *KpnI* 和 *XhoI* 购买于 Takara 生物工程有限公司; 胶回收试剂盒 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit、质粒提取试剂盒 E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit, 购买于广州飞扬生物工程有限公司; 葡萄糖-1-磷酸、葡萄糖-1,6-二磷酸、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、NADP, 为 sigma 产品; BCA 蛋白试剂盒, 购自于南京凯基生物; 其他化学试剂或药品均为分析纯, 购自于广州围谷润玻璃仪器有限公司。

#### 1.1.3 培养基

(1) LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L。

(2) 有氮培养基: 蔗糖 10 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3$  5 mg/L。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌种培养和基因组提取

将菌种接入有氮培养基培养后, 37 °C 培养至对数期, 采用离心分离的方法收集菌体, 按照吴琦等人<sup>[10]</sup>的方法提取基因组。

### 1.2.2 *pgm* 基因克隆

根据胶质芽孢杆菌 KNP414 (GenBank Accession No. NC\_015690.1) 中发现一组预测的葡萄糖磷酸变位酶基因序列 (GenBank Accession No. YP\_004638602.1), 设计引物 *pgm1F1/B1* (表 1) 对目的片段进行扩增。

PCR 扩增的反应体系为 50  $\mu\text{L}$ : Primer Star HS 25  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 基因组 2  $\mu\text{L}$ , 无菌水 22  $\mu\text{L}$ , 混合均匀后进行 PCR 扩增。*pgm* 片段 PCR 反应程序: 98 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 10 s, 45 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 100 s, 30 个循环; 72 °C 最后延伸 8 min。将扩增得到的片段用胶回收试剂盒 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行回收和纯化, 操作方法参照说明书。最后将回收到的目的片段送华大基因进行测序。随后将证实的 *pgm* 核酸序列 (1710 bp) 上传至 GenBank, 序列号为 KF528922。

表 1 引物设计

Table 1 Primers used in this study (5'-3')

Primer	Primer sequence(5'→3')
<i>pgm1F1</i>	ATGAACACACAAACACGGGT
<i>pgm1B1</i>	TTATTTCTTATCTACACGG
PGM1F1	TAC <u>GGTACC</u> ATGAACACACAAACACGGGT
PGM1B1	CGA <u>CTCGAG</u> TTTCTTATCTACACGGCTC

注: 引物 PGM1F1 下划线为 *KpnI* 酶切位点; PGM1B1 下划线为 *XhoI* 酶切位点。

### 1.2.3 生物信息学分析

序列分析采用 Blast Software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。分离鉴定的 PGM 的物理化学性质采用 ProParam 工具 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行分析。序列多重比对采用 Clustal X2.0 软件。

### 1.2.4 *pgm* 基因表达载体构建

根据载体序列和目的基因序列特征, 设计一对带酶切位点的引物 PGM1F1/B1 (表 1) 将上述已扩增的 *pgm* 目的片段克隆于 pET23a-CBD 载体上。采用 *KpnI* 和 *XhoI* 同时酶切载体和 *pgm* 片段。在双酶切的体系中, 载体或 *pgm* 片段为 15  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ M buffer 4  $\mu\text{L}$ , *KpnI* 和 *XhoI* 各 2  $\mu\text{L}$ , 将水补足 40  $\mu\text{L}$ , 37 °C 酶切 12 h。酶切产物回收和纯化后, 将目的片段与载体相连, 并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态, 涂布于含有氨

芑青霉素的 LB 平板上, 挑选单菌落进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆进行进一步的测序, 验证序列的正确性。PGM 表达载体图请见图一。

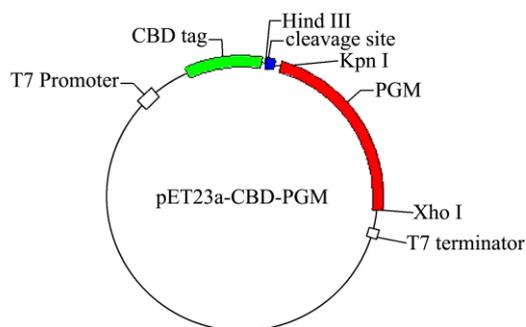


图 1 重组质粒 pET23a-CBD-PGM

Fig.1 The map of the recombinant plasmid pET23a-CBD-PGM

### 1.2.5 蛋白表达和纯化

将含有质粒 pET23a-CBD-PGM 的大肠杆菌 BL21(DE3)接种至含有氨苄青霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 按照 2%的接种量接入含有相同浓度氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行扩培, 37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养直至  $\text{OD}_{600}$  达到 0.6 后, 加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 在 20  $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导 20 h。离心收集菌体, 并将菌体悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)中。将菌体放置超声破碎仪中进行破碎, 收集上清液用于下一步的蛋白纯化。

制备具有高活性再生纤维素按照 Zhang 等人<sup>[11]</sup>的方法进行, 3C 蛋白酶按照 Lan 等人<sup>[12]</sup>的方法获得。蛋白纯化具体操作: 将 1 L 的发酵液上清与 1 g 再生纤维素充分混合, 在室温条件下孵育 30 min, 含有 CBD 标签的融合蛋白吸附在纤维素上, 并通过离心进行收集。再用 PBS 缓冲溶液冲洗 2 次以去除其它杂质。为了将目的蛋白从纤维素上洗脱下来, 将先前准备的 3C 蛋白酶按照 1:100 (酶:底物) 的量加入至吸附融合蛋白的纤维素溶浆中, 并加入二硫苏糖醇(1 mM), 放置 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中酶切过夜。离心收集上清后放置 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于检测目的蛋白的分子量、纯度以及酶活性。

### 1.2.6 葡萄糖磷酸变位酶活性测定

葡萄糖磷酸变位酶活性测定体系: 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$  葡萄糖-1,6-二磷酸, 0.48 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 0.2 mM NADP 和收集的上清液, 将上述混合液 0.2 ml 加入至 96 孔板中, 酶活性测定以添加葡萄糖-1-磷酸开始, 测定 340 nm 处吸光值增加速率。蛋白浓度测定采用 BCA 蛋白试剂盒。一个酶活单位定义为每分钟还原 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  NADP 所需的葡萄糖磷酸变位酶的酶量。

### 1.2.7 酶学性质研究

最适温度: 在 50 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中测定不同温度下(20、25、30、35、40、45、50、55、60、70  $^{\circ}\text{C}$ )葡萄糖磷酸变位酶酶活。将 40  $^{\circ}\text{C}$ 条件下所测定的 PGM 酶活设定为 100%, 其他温度条件下的 PGM 酶活与其相比较计算相对酶活。

最适 pH 值: 37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别测定酶在 50 mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0 和 pH 5.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0 和 pH 7.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5、pH 8.0 和 pH 8.5)、glycine-NaOH (pH 9.0 和 pH 10.0)中的活性。将 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 条件下测定的酶活设定为 100%, 其他 pH 条件下的 PGM 酶活与其相比较计算相对酶活。

动力学常数  $K_m$  和  $V_{\text{max}}$  测定: 测定含有不同浓度(1~2000  $\mu\text{M}$ )葡萄糖-1-磷酸的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中重组 PGM 酶活性, 然后再用米氏方程计算得到。

### 1.2.8 数据分析

重组蛋白酶学性质研究实验中, 每个实验做三个平行, 采用 Excel 软件计算实验结果的平均值和 SD 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胶质芽孢杆菌 *pgm* 基因克隆

通过序列比对发现胶质芽孢杆菌一个假定 *pgm* 基因序列, 按照序列特点设计引物克隆出一条长度为 1710 bp 片段(图 2), 测序结果表明, 该基因为目的 *pgm* 片段。

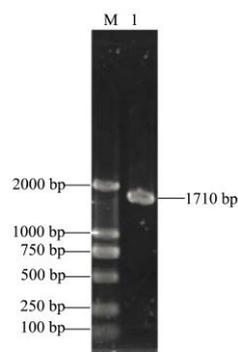


图 2 胶质芽孢杆菌 *pgm* 基因 PCR 产物

Fig.2 Hypothetic *pgm* gene fragments of *P. mucilaginosus* GIM1.16

注: M: DNA 标记 DL2000; 1: *pgm* (1710 bp)。

### 2.2 胶质芽孢杆菌 *pgm1* 的生物信息学分析

通过软件分析, *pgm* 片段编码 569 个氨基酸, 蛋

白理论分子量为 63 kDa, 理论等电点为 4.89。采用 Clustal X2 软件进行多重序列比对, 克隆获得的 PGM 氨基酸序列和已公开报道物种的 PGM 氨基酸序列具有较大的差异(图 3)。胶质芽孢杆菌 PGM 的氨基酸序列与 *Clostridium thermocellum*(55%)(gi: 489613052) 和 *Saccharomyces cerevisiae* (50%)(gi: 397624)对应的氨基酸序列相似度最高, 而与 *Xanthomonas campestris*(24%)(gi: 155395) 和 *SuLfolobus tokodaii* (24%)(gi: 15621207)对应的氨基酸序列相似度最低。尽管如此, 对蛋白保守区进行预测时发现活性位点、金属离子结合位点以及糖结合位点在 PGM 蛋白结构中仍是高度保守的。来源于胶质芽孢杆菌 PGM 活性部位位于 143 至 152 位氨基酸序列之间, 即符合 GVVITASHNP 序列特征, 这与 *C. thermocellum* 中 PGM 蛋白的活性位点是一致的<sup>[13]</sup>。149 位丝氨酸可能是参与底物催化的关键位点。同时发现 DIIIGTDPDCDR 为金属离子结合部位的序列特征。位于 406 至 411 位的氨基酸序列可能参与与底物结合。尽管国内外已报道很多物种的 PGM 序列, 但本研究所鉴定胶质芽孢杆菌的 PGM 序列尚属首次, 进一步丰富了 PGM 的种类。

Species	Active site	Metal-binding site	Sugar-binding site
<i>p. mucilaginosus</i> (142)	GVVITASHNP	DIIIGTDPDCDR	GYEESY
<i>Cl. thermocellum</i> (138)	GVVITASHNP	DLIIGTDPDCDR	GFEEESY
<i>A. xylinum</i> (142)	GVVITASHNP	DLAFANDTADR	GEESAG
<i>E. coli</i> (140)	GIVITPASHNP	DLAFANDPFDNR	GEESAG
<i>Ps. aeruginosa</i> (102)	GVMLTASHNP	DLGLAFDGDGR	GEESGH
<i>N. gonorrhoeae</i> (97)	GVMLTASHNP	ELGLAFDGDAR	GEESGH
<i>S. paucimobilis</i> (98)	GVQITASHNP	DFGLAFDGDGR	GEESGH
<i>P. horikoshii</i> (95)	GAVITASHNP	DFGVAQDGDAR	GEENGG
<i>T. kodakarensis</i> (95)	GAVITASHNP	DFGVAQDGDAR	GEENGG
<i>S. tokodaii</i> (91)	GVVITASHNP	DLGVAHDGDAR	FEENGG
<i>S. cerevisiae</i> (114)	GIILTASHNP	AFGAASDGDGR	GEESFG
<i>X. campestris</i> (95)	GVVITASHNP	DFGIAWDGDGR	GEESAH
<i>H. sapiens</i> (112)	-IILTASHNP	DFGAAFDGDGR	GEESFG
<i>O. cuniculus</i> (112)	-IILTASHNP	DFGAAFDGDGR	GEESFG
<i>V. furnissii</i> (95)	SACITASHNP	DIGIGTDPDADR	GESEGG

图3 胶质芽孢杆菌 GIM1.16 中 PGM 蛋白与其他种 PGM 蛋白在保守区域的氨基酸序列的比对。

Fig. 3 Alignment of the obtained PGM with those from other species in the conserved amino acid sequences

注: 这些 PGM 蛋白来源于: *Clostridium thermocellum* (GI 489613052), *Acetobacter xylinum* (GI 438427), *Escherichia coli* (GI 473888), *Pseudomonas aeruginosa* (GI 12230879), *Neisseria gonorrhoeae* (GI 730309), *Sphingomonas paucimobilis* (GI 6103618), *Pyrococcus horikoshii* (GI 14590777), *Thermococcus kodakarensis* (GI 51870681), *SuLfolobus tokodaii* (GI 15621207), *Saccharomyces cerevisiae* (GI 397624), *Xanthomonas campestris* (GI 155395), *Homo sapiens* (GI 585670), *Oryctolagus cuniculus* (GI 548497), *Vibrio furnissii* (GI 503970483)。

### 2.3 重组蛋白酶活性分析

将 *pgm* 基因片段克隆至 pET23a-CBD 表达载体上获得重组表达的载体。通过 IPTG 诱导表达, 并利用

纤维素纯化和蛋白酶切, 获得纯化的无标签重组蛋白, SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 重组的 PGM 大小为 63 kDa (图 4), 这与预测的理论值是一致的。纯化的 PGM 比酶活为 1990 U/mg。

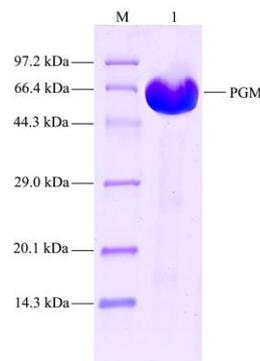


图4 胶质芽孢杆菌 GIM1.16 纯化的 PGM 蛋白的 SDS-PAGE 分析。

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the purified PGM protein from *P. mucilaginosus* GIM1.16

注: Lane M: 蛋白 maker; Lane 1: 纯化的 PGM。

## 2.4 重组 PGM 酶学性质研究

### 2.4.1 温度对酶活性的影响

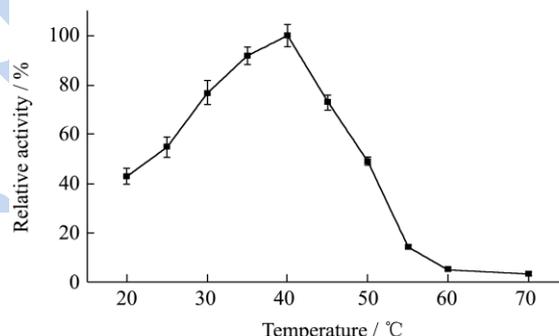


图5 温度对 PGM 活性的影响

Fig.5 Effect of temperature on PGM activity

在 20~70 °C 范围内研究了温度对 PGM 酶活性的影响。如图 5 所示, PGM 在 40 °C 时, 活性达到最大值。而后随着温度的逐渐升高, 活性随之降低, 当超过 55 °C 时, PGM 的活性基本丧失。不同微生物的 PGM 的最适温度是有差异的, 如来源于 *A. xylinum*、*F. oxysporum* 和 *S. sanxanigenens* 等嗜温微生物 PGM 最适温度范围为 30~40 °C<sup>[6, 9, 14]</sup>, 而来源于 *C. thermocellum* 和 *P. horikoshii* 等嗜热微生物的 PGM 的最适温度在 70~90 °C 之间<sup>[8, 13]</sup>。因此, PGM 的最适温度可能与菌种本身的一些生理特性有关。

本研究中重组的胶质芽孢杆菌 PGM 的相对酶活在 30~40 °C 保持在 78% 以上, 与来源于嗜温微生物的 PGM 的最适温度范围相同。这与胶质芽孢杆菌的最适生长温度为 30 °C 左右的报道是相符合的<sup>[4]</sup>。

### 2.4.2 pH 值对酶活性影响

在不同 pH 值缓冲溶液中测定 PGM 酶活来确定 pH 值对其活性的影响 (图 6)。PGM 在 pH 值为 7.5 时 (Tris-HCl 缓冲液), PGM 获得最大酶活, 在酸性及碱性溶液中均表现出低活性。已报道的大部分的 PGM 的最适 pH 集中在中性条件, 如来源于 *C. thermocellum*、*A. xylinum*、*F. oxysporum* 和 *S. sanxanigenens* 的 PGM 最适 pH 值在 7.0~7.5 之间<sup>[6,9,13,14]</sup>, 而来源于 *P. horikoshii* 的 PGM 最适 pH 略高, 其最适 pH 值为 9<sup>[8]</sup>。本研究得到胶质芽孢杆菌 PGM 酶活的最适 pH 范围是 pH 7~8 之间, 这与报道的大部分 PGM 的最适 pH 值性质是相近的。

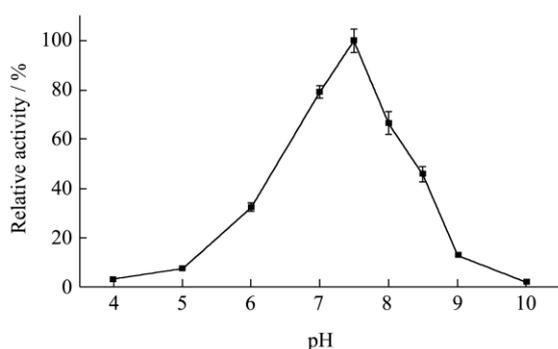


图 6 pH 对 PGM 酶活的影响

Fig.6 Effect of pH on PGM activity

### 2.4.3 PGM 的动力学分析

PGM 对葡萄糖-1-磷酸底物的  $K_{cat}$  和  $K_m$  值分别为  $684 \text{ min}^{-1}$  和  $0.24 \text{ mM}$ 。就  $K_m$  值来说, 其值越小, 酶对底物的亲和力也越大。不同来源的 PGM 的  $K_m$  值差异是很大的, 本研究中重组 PGM 对葡萄糖-1-磷酸的  $K_m$  值比来源于 *C. thermocellum* ( $0.41 \text{ mM}$ ) 和 *A. xylinum* ( $2.6 \text{ mM}$ ) 的要低<sup>[6, 13]</sup>, 与来源于 *S. sanxanigenens* ( $0.21 \text{ mM}$ ) 属于同一范围<sup>[9]</sup>, 但略高于来源于 *F. oxysporum* ( $0.1 \text{ mM}$ ) 和 *P. horikoshii* ( $0.09 \text{ mM}$ )<sup>[8,14]</sup>。本研究得到胶质芽孢杆菌的 PGM 表现出特异的底物选择性, 只能催化葡萄糖-1-磷酸, 而来源于 *S. sanxanigenens* 及 *C. thermocellum* 的 PGM 能同时作用于葡萄糖-1-磷酸和甘露糖-1-磷酸<sup>[9,13]</sup>。

表 2 胶质芽孢杆菌 GIM1.16 PGM 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of PGM from *P. mucilaginosus*

GIM1.16			
底物	$K_{cat}/\text{min}^{-1}$	$K_m/\text{mM}$	$K_{cat}/K_m/(\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1})$
葡萄糖-1-磷酸	$684 \pm 28$	$0.24 \pm 0.02$	2850

## 3 结论

分离和鉴定了一个编码胶质芽孢杆菌葡萄糖磷酸变位酶的基因 *pgm*。经测序分析, 该序列编码 569 个

氨基酸, 蛋白的分子量为 63 kDa, 理论等电点为 4.89。多重序列分析发现, 该基因的催化活性位点、金属离子结合域以及底物结合域均高度保守。酶学性质研究表明, PGM 酶活性的最适温度和 pH 值分别为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  和 pH 7.5。本研究得到的编码 PGM 的基因序列以及对 PGM 酶活性的研究, 为构造基因工程菌以及代谢工程相关研究奠定坚实的理论基础。

## 参考文献

- [1] 叶永丽, 扈晓鹏, 高旭东等. 微生物絮凝剂在食品工业中的应用进展[J]. 中国酿造, 2014, 266: 1-4.  
YE Yong-li, HU Xiao-peng, GAO Xudong et al. Application Progress of Microbial Flocculant in Food Industry [J]. China Brewing, 2014, 266: 1-4.
- [2] Gao Q, Zhu XH, Mu J et al. Using *Ruditapes philippinarum* conglutination mud to produce bioflocculant and its applications in wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 496-500
- [3] Li O, Lu C, Liu A et al. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 2013, 134: 87-93
- [4] Deng SB, Bai RB, Hu XM et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60: 588-593
- [5] Lian B, Chen Y, Yuan S et al. Study on the flocculability of metal ions by *Bacillus mucilaginosus* GY03 strain [J]. Chinese Journal of Geochemistry, 2004, 23: 380-386
- [6] Kvam C, Olsvik ES. Studies on recombinant *Acetobacter xylinum*  $\alpha$ -phosphoglucomutase [J]. Biochemical Journal, 1997, 326: 197-203
- [7] Degeest B, Vuyst LD. Correlation of activities of the enzymes  $\alpha$ -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03 [J]. Applied and Environment Microbiology, 2000, 66: 3519-3527
- [8] Akutsu JI, Zhang ZL, Tsujimura M et al. Characterization of a thermostable enzyme with phosphomannomutase/phosphoglucomutase activities from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3 [J]. Journal of Biochemistry, 2005, 138(2): 159-166
- [9] Huang HD, Li XY, Wu MM, et al. Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase phosphomannomutase from *Sphingomonas sanxanigenens*

- [J]. *Biotechnology Letter*, 2013, 35: 1265-1270
- [10] 吴琦,王红宁,刘世贵.三种黑曲霉细胞基因组DNA提取方法的比较[J].*生物技术*,2003,13(6):30-31
- WU Qi, WANG Hong-ning, LIU Shi-gui. Comparison of three methods of genomic dna extraction from *aspergillus niger* [J]. *Biotechnology*, 2003, 13(6): 30-31
- [11] Zhang YHP, Cui JB, Lynd LR, et al. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 644-648
- [12] Lan DM, Tai Y, Wang FH, et al. Efficient purification of native recombinant proteins using proteases immobilized on cellulose [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 113: 542-544
- [13] Wang Y, Zhang YHP. A highly active phosphoglucomutase from *Clostridium thermocellum*: cloning, purification, characterization and enhanced thermostability [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(1): 39-46
- [14] Kourtoglou E, Anasontzis GE, Mamma D, et al. Constitutive expression, purification and characterization of a phosphoglucomutase from *Fusarium oxysporum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 48(3): 217-224

现代食品科技