谷氨酰胺酶基因的克隆、表达和酶学性质研究

张美丹， 饶志明*， 张 显， 杨套伟， 徐美娟
（江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 以枯草芽孢杆菌基因组为模板通过 PCR 扩增获得谷氨酰胺酶基因 *ylaM*，构建重组质粒 pMA5-*ylaM*，将其转化到枯草芽孢杆菌 168 中获得重组菌 BS168/pMA5-ylaM，并在宿主菌成功得到表达，纯化后的谷氨酰胺酶比酶活大小为 939.48 U/mg。谷氨酰胺酶的反应最适 pH 为 7.5，反应最适温度为 55 ℃，La^{3+}、Zn^{2+}、Fe^{3+}和 Al^{3+}对谷氨酰胺酶活力具有一定的抑制作用，在 NaCl 浓度为 15%~17.5%的条件下，该酶酶活力可以保留 50%以上。在 5 L 罐中，通过分批补料发酵，其最高酶活力产量为 215.06 U/mL。

关键词： 枯草芽孢杆菌；谷氨酰胺酶；酶学性质
中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689(2019)10-0060-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.009

Cloning, Expression and Characterization of *Bacillus Subtilis* Glutaminase

ZHANG Meidan， *RAO Zhiming**， *ZHANG Xian*， *YANG Taowei*， *XU Meijuan*
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The glutaminase gene (*ylaM*) was amplified from *Bacillus subtilis* by PCR. Construction of pMA5-*ylaM* and expressed in Bacillus subtilis 168. The specific activity of purified glutaminase was 939.48 U/mg. The optimization activity of recombinant enzyme was at pH 7.5 and 55 ℃. La^{3+}、Zn^{2+}、Fe^{3+} and Al^{3+} inhibited the glutaminase activity. More than 50% of the maximum activity was retained in the presence of 15% ~17.5% NaCl. The highest production of glutaminase of fed-batch fermentation was 215.06 U/mL in the 5 L fermentation.

Keywords: *Bacillus subtilis*, glutaminase, enzymatic properties

谷氨酰胺酶(EC 3.5.1.2)能够催化 L-谷氨酰胺水解形成 L-谷氨酸和氨。谷氨酰胺酶主要分布在微生物和哺乳动物细胞中。哺乳细胞谷氨酰胺酶在能源和氮源代谢中起关键作用，因此，传统意义上被认为是一种线粒体酶[1]。哺乳动物谷氨酰胺酶通常被分为两个类型：肝型和肾型，肝型谷氨酰胺酶和肾型谷氨酰胺酶均能够被一定浓度的磷酸盐激活[1-3]。谷氨酰胺酶在微生物中分布很广，已经被报道过的菌体有：大肠杆菌（*Escherichia coli*）[4]、芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*，*Bacillus* sp. LKG-01）[5-6]、乳

收稿日期： 2017-02-12
基金项目： 国家 863 计划项目(2015AA021004)；国家自然科学基金项目(21276110，31500065，31400082)；江苏省青年自然科学基金项目(BK20150142)；中国博士后科学基金资助项目(2015M570407，2016T90421)；江苏高校优势学科建设工程资助项目。
* **通信作者：** 饶志明(1975—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事应用微生物与代谢工程方面的研究。
E-mail：raozhm@jiangnan.edu.cn
引用本文： 张美丹，饶志明，张显，等. 谷氨酰胺酶基因的克隆、表达和酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(10)：60-66.

杆菌(*Lactobacillus reuteri* KCTC3594)[7]、青霉菌(*penicillium politans* NRC510)[8]、米曲霉(*Aspergillus oryzae* RIB40)[9]和酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL-Y 2547)[10-11]等。自然界中不同来源的谷氨酰胺酶的酶学性质具有很大的差距,因此谷氨酰胺酶的应用相应的也有所不同。目前,谷氨酰胺酶的研究主要集中在制药和食品工业中。在药物方面,谷氨酰胺酶被用于抗癌制剂研究,癌细胞没有L-谷氨酰胺合成机制,通过谷氨酰胺酶消耗体内环境中的谷氨酰胺,从而使得癌细胞因缺乏谷氨酰胺而被"饿死"[12-13]。在食品行业(尤其是酱油发酵)中,耐盐性谷氨酰胺酶一直是研究的热点[14-21]。酱油在发酵过程中,会有很大部分的谷氨酰胺因遇高温转变成焦谷氨酸,这很大的程度上影响了酱油的风味和营养。因此,在发酵过程中额外添加谷氨酰胺酶,从而增加谷氨酸、减少焦谷氨酸的生成从而提高了酱油的风味和营养[17-22]。也有研究者们将谷氨酰胺酶用于茶氨酸的合成[23-24]。

本研究通过将实验室保藏的一株枯草芽孢杆菌作为谷氨酰胺酶基因的来源,将其在枯草芽孢杆菌168(*Bacillus subtilis* 168,BS168)中进行克隆、表达,并对其酶学性质进行了研究,随后对重组菌在5 L发酵罐进行了分批补料发酵研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

枯草芽孢杆菌是本实验室的一株保藏菌;大肠杆菌JM109(*Escherichia coli*,*E.coli* JM109)、枯草芽孢杆菌168、表达载体pMA5均为实验室所有;连接载体pMD-18T、PCR酶相关试剂、T4 DNA连接酶以及所有的限制性内切酶*Bam*H I和*Nde* I等都在TaKaRa公司上购买;细菌全基因组快速提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒、胶回收试剂盒和引物合成等都来自上海生工生物工程股份有限公司;其他试剂均为国产;SBA-40E谷氨酸-葡萄糖分析仪买自山东科学院生物研究所;AKTA蛋白纯化层析系统在GE Healthcare公司购买。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组提取,*ylaM*基因的克隆 枯草芽孢杆菌基因组提取的方法参考细菌基因组DNA快速提取试剂盒说明书。引物设计序列:*ylaM*-F:5`-ACCGCATATGATGGTATGCCAGCATAATGAT -3`,下划线为*Nde* I;*ylaM*-R:5`-ACCGGGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAAAATACTCAGCCTGT -3`,下划线分别为*Bam*H I和组氨酸标签。PCR扩增体系中包括0.5 μL全基因组DNA;5 μL 10×Buffer;4 μL dNTP Mixture;0.5 μL上下引物;1 μL *E Taq* DNA聚合酶;ddH_2O补至50 μL。PCR反应条件为:95 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,58 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,30个循环;最后72 ℃延伸10 min。PCR产物进行胶回收纯化后与pMD18-T载体进行连接,接着连接产物转化到*E.coli* JM109感受态细胞中,在含有100 μg/mL氨苄青霉素(Amp)的LB平板上进行筛选获得阳性转化子,提取质粒进行单双酶切验证并进行测序。

1.2.2 重组质粒的构建和转化 将pMD18T-*ylaM*和pMA5分别用*Bam*H I和*Nde* I进行双酶切,将所切的目的片段和载体进行回收纯化,将纯化后的目的基因*ylaM*和载体pMA5片段并使用T4 DNA连接酶进行连接,然后放置16 ℃连接过夜。连接产物通过化学转化法转入*E.coli* JM109感受态中,通过带有100 μg/mL Amp的LB平板筛选阳性重组菌体*E.coli* JM109/pMA5-*ylaM*,提质粒通过相应的酶切位点验证重组载体。将重组子pMA5-*ylaM*再通过文献[25]所使用的化学转化法转入枯草芽孢杆菌168中,通过带有50 μg/mL卡那霉素的LB平板筛选阳性重组菌BS168/pMA5-*ylaM*,提质粒通过单双酶切验证是否有重组子转进去。

1.2.3 重组菌的谷氨酰胺酶表达和纯化 将重组菌体BS168/pMA5-*ylaM*先接入10 mL LB培养基中,在37 ℃,180 r/min下培养8~12 h,之后转入发酵培养基(g/L):葡萄糖25、酵母粉21、蛋白胨14、谷氨酸2、K_2HPO_4 1.25、KH_2PO_4 0.75、$MgCl_2$ 1、pH 6.9~7.0,在30 ℃、180 r/min的条件下发酵培养20 h。使用4 ℃低温离心机离心收集菌体(4 ℃,10 000 *g*,10 min),将离心所得的重组菌体使用50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液悬洗2~3次,之后根据生物量使用50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液将菌体定容至相应的体积进行悬浮。细胞悬液中加入20 μL 200 g/mL溶菌酶(lysozyme),放置冰盒或者4 ℃冰箱作用2~3 h左右,待菌体呈蛋清状之后将处理液放入超声波破碎仪中超声10 min左右,将细胞破碎液离心(4 ℃,10 000 *g*,20 min),取上清。获得的细胞上清过膜处理之后使用Ni-NTA亲和色谱法纯化N-末端加入

His-tag 的谷氨酰胺酶,清洗、上样和洗脱过程根据公司所提供的仪器操作步骤来进行。将细胞上清液和纯化后的谷氨酰胺酶用于酶活测定和 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 谷氨酰胺酶的酶活测定 谷氨酰胺酶酶活通过 L-谷氨酸的生成量来测定。酶活测定方法:将 440 μL 100 mmol/L 谷氨酰胺溶液和 440 μL 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液进行混合,接着放入 37 ℃的水浴锅中 5 min,加入 20 μL 的酶液在水浴锅中发应 5 min 后,迅速加入 100 μL 的反应终止液(15%的三氯乙酸)上下震荡混匀,之后将反应物放入离心机中离心(10 000 *g*,15 min)[26]。取反应物的上清液 25 μL 打进谷氨酸-葡萄糖分析仪中进行谷氨酸测定。谷氨酰胺酶的酶活单位定义为,在 37 ℃、pH 7.5 的条件下,每分钟生成 1 μmol 的谷氨酸所需要的谷氨酰胺酶的量。

1.2.5 酶学性质研究 反应最适 pH 和 pH 稳定性研究:使用不同 pH 的反应体系(缓冲液:pH 5.0~6.0,0.1 mol 醋酸-醋酸钠;pH 6.0~7.0,0.1 mol 磷酸盐;pH 7.0~8.0,0.1 mol Tris-HCl;pH 8.0~9.5,0.1 mol 甘氨酸-NaOH)进行酶活测定,最大酶活定义为 100%。在 4 ℃条件下,将储存在不同 pH 缓冲液的酶液放置一段时间,每隔 2 h 后进行一次酶活测定,将最初谷氨酰胺酶的酶活定义为 100%。

反应最适温度和热稳定研究:将谷氨酰胺酶反应体系放置在不同温度(20~65 ℃)的水浴锅中先预热 10 min,之后加入 20 μL 的酶液反应 5 min,迅速加入 100 μL 的反应终止液(15%的三氯乙酸),最大酶活定义为 100%。在 4、20、25 ℃和 30 ℃保温 12 h,每隔 2 h 取样并进行酶活测定,将未加热的谷氨酰胺酶酶活定义为 100%。

金属离子和 EDTA 对酶活的影响:在谷氨酰胺酶反应体系中分别加入 1 mmol/L 的金属离子 EDTA、K^+、Fe^{3+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、La^{3+}、Ba^{2+}等金属离子,接着进行谷氨酰胺酶的酶活测定,未加入金属离子的谷氨酰胺酶活定义为 100%。

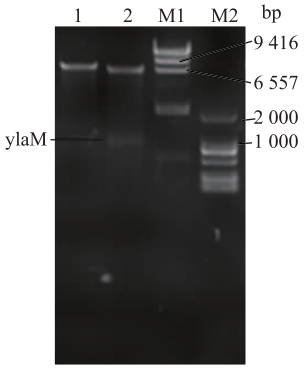
耐盐性测定和高盐条件对酶稳定性的影响:谷氨酰胺酶反应体系中分别加入不同浓度的 NaCl(0~20%),之后进行酶活反应并分析谷氨酸的生成,未加入 NaCl 反应的谷氨酰胺酶酶活定为 100%。在 4 ℃条件下,将储存在不同盐浓度下的酶液放置一段时间,每隔 0.5 h 后进行一次酶活测定,将最初在不同盐浓度下的谷氨酰胺酶的酶活定义为 100%。

1.2.6 5 L 罐发酵培养 取冻管中的菌液进行划平板,挑取单菌落至 10 mL 的 LB 培养基中进行培养 10~12 h(37 ℃,180 r/min),接取 10%的菌液转入 150 mL 的 LB 种子培养基培养 10~12 h(37 ℃,180 r/min)。将上述培养液接入含有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中进行培养,在温度 30 ℃,转速 600 r/min,pH 7.0(pH 由 30%的氨水和 10%的磷酸进行酸碱调控)的条件下进行培养。补料措施为:碳源为 50%的葡萄糖,氮源为 50%的酵母粉,前 18 h 发酵条件同前面,18 h 后进行自动补料,每个小时补充 3 g/L 的碳源和 2 g/L 的氮源。每隔一段时间进行取样,进行生物量和酶活测定。

2 结果与讨论

2.1 重组载体的构建和表达

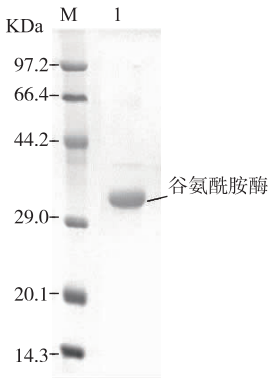
以枯草芽孢杆菌全基因组作为模板进行 PCR,通过电泳得到的目的基因大小为 0.93 kb,将纯化后的目的基因与 pMD18T 连接转入 *E.coli* JM109 感受态细胞中,在抗性平板中挑取阳性转化子,酶切验证并进行测序。接着使用 *Bam*H Ⅰ和 *Nde* Ⅰ将目的基因与载体 pMA5 切下并进行连接转入枯草芽孢杆菌 168 中,在抗性平板中挑选阳性转化子验证。重组质粒 pMA5-*ylaM* 经 *Bam*H Ⅰ单切大小为 8.4 kb,*Bam*H Ⅰ和 *Nde* Ⅰ双切的大小分别为 7.5 kb 和 0.93 kb(图 1)。将构建好的重组菌 *B.subtilis*/pMA5-*ylaM* 进行发酵表达,获得的粗酶过镍柱纯化,将纯化后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析,纯化后的蛋白大小为 32 kDa 左右(图 2)。



1:pMA5-*Bglu* 经 *Bam*H Ⅰ酶切;2:pMA5-*Bglu* 经 *Bam*H Ⅰ和 *Nde* Ⅰ酶切;M1:λ/*Hind* Ⅲ DNA Marker;M2:DL2000

图 1 重组质粒的酶切验证

Fig. 1 Enzyme digestion of recombinant plasmid



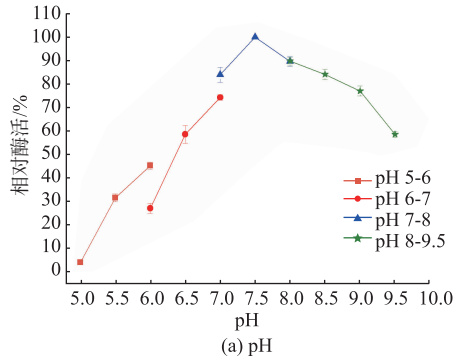
M:蛋白 Marker;1:纯化后的谷氨酰胺酶

图 2 重组蛋白酶的 SDS-PAGE 电泳分析

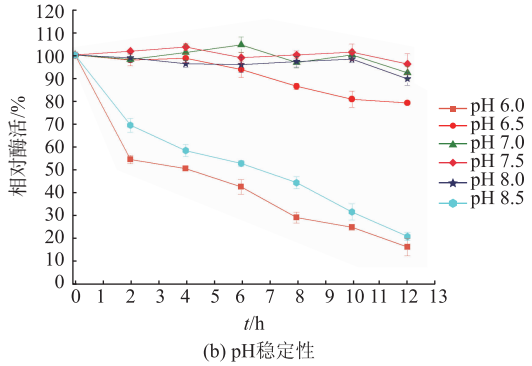
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified glutaminase form recombinant

2.2 谷氨酰胺酶的酶学性质研究

2.2.1 *反应最适 pH 和 pH 稳定性研究* 在不同 pH 下测得的谷氨酰胺酶活并获得一条曲线,从图 3(a)获知,在 pH 7.5 的缓冲液下,谷氨酰胺酶酶活最适。在 4 ℃条件下,每隔 2 h,在不同 pH 取样测酶活获得 pH 的稳定曲线,如图 3(b)所示,该谷氨酰胺酶在 pH 6.5~8 之间稳定性很好,而低于 pH 6.0 或高于 8.5 时,酶活力有所下降。



(a) pH

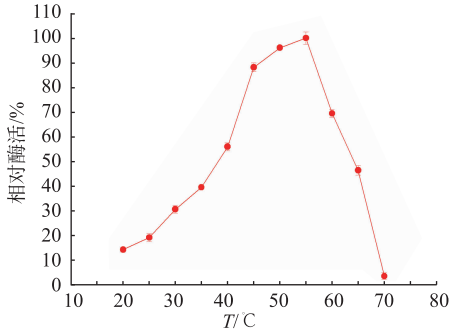


(b) pH稳定性

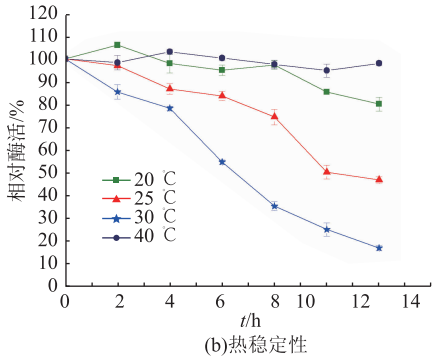
图 3 谷氨酰胺重组酶的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 3 Optimal pH and pH stability of the recombinant glutaminase

2.2.2 *反应最适温度和热稳定性研究* 在不同的反应温度下,测谷氨酰胺酶活。从图 4(a)可知,谷氨酰胺酶的最适温度是 55 ℃。随着温度升高,酶活力有所上升;当温度超过 55 ℃时,酶活力下降。由图 4(b)所示,在低温条件下保存对酶活力影响不大,当温度为大于 30 ℃时,酶活力下降就明显了。



(a)最适温度



(b)热稳定性

图 4 谷氨酰胺酶最适温度和热稳定性

Fig. 4 Optimal temperature and thermal stability of the recombinant glutaminase

2.2.3 *金属离子和 EDTA 的影响* 从图 5 分析金属离子对谷氨酰胺酶活的影响得知,La^{3+}、Zn^{2+}、Fe^{3+}和 Al^{3+}对谷氨酰胺酶活力具有一定程度上的抑制作用,部分金属离子对其有促进作用,但是效果不是很明显。

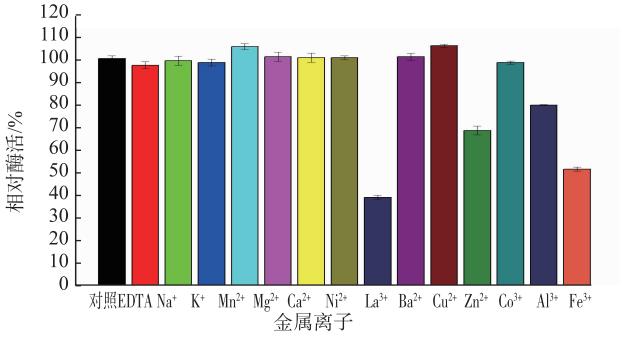


图 5 金属离子和 EDTA(1 mmol/L)对酶活的影响

Fig. 5 Effect of metal ion(1 mmol/L) on glutaminase activity

2.2.4 谷氨酰胺酶的耐盐性研究 反应体系中不同浓度的 NaCl 条件下所测得的谷氨酰胺酶酶活曲线如图 6 所示，随着反应体系中 NaCl 的浓度的不断升高，相对酶活相应的下降。但是，在 15%~17.5% 的 NaCl 条件下，残余酶活力依然有 50%以上，说明该谷氨酰胺酶具有一定的耐盐性。在 4 ℃条件下，每隔 0.5 h，在不同盐浓度下取样测酶活获得高盐条件下谷氨酰胺酶的稳定曲线，如图 7 所示，该谷氨酰胺酶在 12.5%~17.5%NaCl 之间稳定性很好，当盐浓度为 20%时，3 h 后，谷氨酰胺酶的相对酶活力仅下降了 34.76%左右。

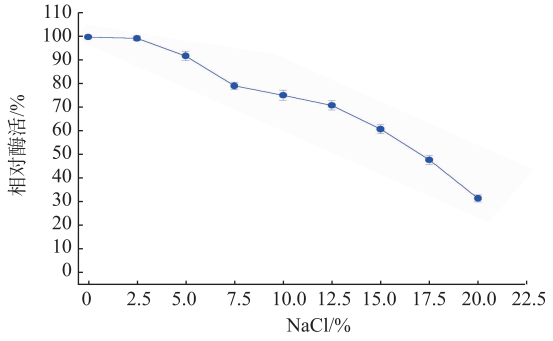


图 6 不同浓度的 NaCl 对酶活的影响

Fig. 6 Salt to lerance of recombinant glutaminase

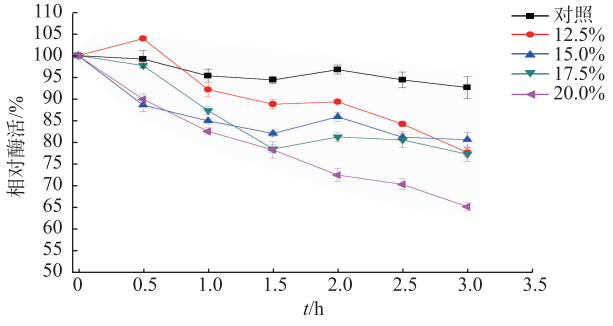
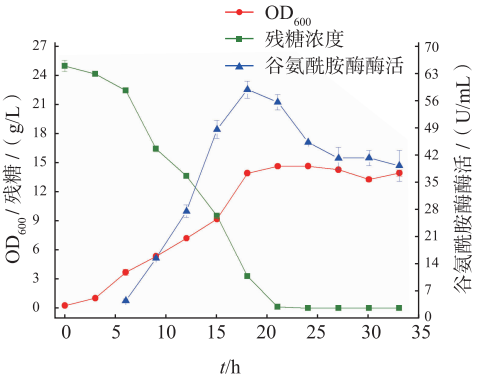


图 7 高盐对谷氨酰胺酶稳定性的影响

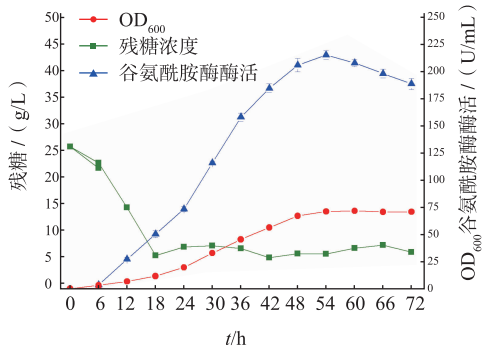
Fig. 7 Effects on stability of glutaminase in the high concentration of salt

2.3 5 L 罐发酵结果

5 L 罐的分批发酵结果如图 8(a)所示，随着重组菌体的生长酶活产量也有所增长，当葡萄糖消耗的差不多时菌体也不再增长。重组菌发酵 18 h，重组菌细胞干重(CDW)和谷氨酰胺酶比酶活最高分别达到了 4.51 g/L 和 58.61 U/mL，24 h 后菌体不再生长而谷氨酰胺酶酶活有稍微的下降。在此基础上，进一步的补料发酵结果如图 8(b)所示，发酵 18 h 后在残糖为 4~5 g/L 时进行补料，每小时添加 3 g/L 的碳源和 2 g/L 的氮源，重组菌体和酶活产量也有所增加，细胞干重最高将近有 23.36 g/L，发酵 54 h 时谷氨酰胺酶最高酶活产量达到了 215.06 U/mL。相比较分批发酵结果，分批补料发酵的谷氨酰胺酶酶活产量提高了 3.67 倍，细胞干重增加了 5.18 倍。



(a)分批发酵



(b)补料发酵

图 8 5 L 罐发酵和补料发酵结果

Fig. 8 Fermentation and fed –batch fermentation of glutaminase in 5 L fermenter

3 结 语

本研究枯草芽孢杆菌来源的谷氨酰胺酶在枯草芽孢杆菌 168 中得到了有效的表达，纯化后比酶活达到了 939.47 U/mg。谷氨酰胺酶在 15%~17.5% 的高盐浓度下相对酶活高于 50%，表明了该谷氨酰胺酶具有比较好的耐盐性。食品业中，酱油的含盐量通常为 14%~18%[15]，这很大程度上限制了一般的谷氨酰胺酶应用。本研究获得的重组谷氨酰胺酶克服了在高盐浓度下易失活的缺点，为下一步在食品工业中的应用研究奠定了基础。本研究直接采用了葡萄糖-谷氨酸分析仪对酶活产物进行测定分析，

该方法相比较谷氨酰胺酶测定试剂盒和高效液相色谱法对酶活测定更加的简单、快速和稳定，这为之后的发酵控制研究提供了便利和可操作性。发酵18 h后，通过每个小时添加3 g/L的碳源和2 g/L的氮源进行补料发酵，谷氨酰胺酶的酶活产量在54 h能达到215.06 U/mL。

参考文献：

[1] ZHOU J X，ZHOU J，YANG H M，et al. Characterization of two glutaminases from the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120[J]. **FEMS Microbiol Lett**，2008，289(2)：241-249.

[2] MARQUEZ J，LOPEZ DE LA OLIVA A R，MATES J M，et al. Glutaminase：a multifaceted protein not only involved in generating glutamate[J]. **Neurochemistry International**，2006，48(6/7)：465-471.

[3] PEREZ-GOMEZ C，CAMPOS-SANDOVAL J A，ALONSO F J，et al. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells[J]. **Biochemical Society**，2005，386：535-542.

[4] PRUSINER S，DAVIS J N，STANDTMAN E R. Regulation of glutaminase B in *Escherichia coli* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**，1976，251(11)：3447-3456.

[5] KUMAR L，SINGH B，ADHIKARI D K，et al. A temperature and salt-tolerant L-glutaminase from Gangotri region of Uttarakhand Himalaya：enzyme purification and characterization[J]. **Appl Biochem Biotechnol**，2012，166(7)：1723-1735.

[6] SINSUWAN S，YONGSAWATDIGUL J，CHUMSENG S，et al. Efficient expression and purification of recombinant glutaminase from *Bacillus licheniformis*(GlsA) in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression and Purification**，2012，83(1)：52-58.

[7] ALI T H，ALI N H，MOHAMED L A. Glutamine amidohydrolase from penicillium politans NRC510[J]. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**，2009，59(3)：211-217.

[8] JEON J M，LEE H I，HAN S H，et al. Partial purification and characterization of glutaminase from *Lactobacillus reuteri* KCTC3594[J]. **Appl Biochem Biotechnol**，2010，162(1)：146-154.

[9] MASUO N，YOSHIMUNE K，ITO K，et al. Micrococcus luteus K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40 is salt-tolerant[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**，2005，100(5)：576-578.

[10] IYER P，SINGHAL R S. Production of glutaminase (E.C.3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii*：Statistical optimization using response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**，2008，99(10)：4300-4307.

[11] IYER P V，SINGHAL R S. Glutaminase production using *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL-Y 2547：effect of aeration，agitation regimes and feeding strategies[J]. **Chem Eng Technol**，2010，33(1) 52-62.

[12] SINGH P，BANIK R M. Biochemical characterization and antitumor study of L-glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305[J]. **Appl Biochem Biotechnol**，2013，171(2)：522-531.

[13] SINGH P，SHERA S S，BANIK J，et al. Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of L-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 [J]. **Bioresource Technology**，2013，137 ：261-269.

[14] NANDAKUMAR R，WAKAYAMA M，NAGANO Y，et al. Overexpression of salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3 in *Escherichia coli* and its purification[J]. **Protein Expression and Purification**，1999，15(2)：155-161.

[15] MASUO N，ITO K，YOSHIMUNE K，et al. Molecular cloning，overexpression，and purification of *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40[J]. **Protein Expression and Purification**，2004，38(2)：272-278.

[16] ASHRAF S A. EL-SAYED. L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid state fermentation [J]. **Indian J Microbiol**，2009，49(3)：243-250.

[17] SABU A，KEERTHI T R，RAJEEV KUMAR S，et al. L-Glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid state fermentation[J]. **Process Biochemistry**，2000，35(7)：705-710.

[18] WAKAYAMA M，YAMAGATA T，KAMEMURA A，et al. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**，2005，32(9)：383-390.

[19] YUZUKI M，MATSUSHIMA K，KOYAMA Y. Expression of key hydrolases for soy sauce fermentation in *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**，2015，119(1)：92-94.

[20] ARYUMAN P, LERTSIRI S, VISESSANGUAN W, et al. Glutaminase-producing *Meyerozyma* (*Pichia*) *guilliermondii* isolated from Thai soy sauce fermentation[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2015, 192: 7-12.

[21] ITO K, KOYAMA Y, HANYA Y. Identification of the glutaminase genes of *Aspergillus sojae* involved in glutamate production during soy sauce fermentation[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2013, 77(9): 1832-1840.

[22] SATHISH T, LAKSHMI G S, RAO C S, et al. Mixture design as first step for improved glutaminase production in solid-state fermentation by isolated *Bacillus* sp. RSP-GLU[J]. **The Society for Applied Microbiology**, 2008, 47(4): 256-262.

[23] 孙帅. 谷氨酰胺酶和 γ- 谷氨酰胺转肽酶酶法合成 L- 茶氨酸的研究[D]. 南京: 南京大学, 2013.

[24] PU H F, WANG Q, ZHU F F, et al. Cloning, expression of glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* and application to theanine synthesis[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2013, 31(1): 1-7.

[25] ANAGNOSTOPOULOS C, SPIZIZEN J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1961, 81(5): 741-746.

[26] ZHANG Xian, LONG Shuiqing, RAO Zhiming, et al. Improving the activity and stability of L-Asparaginase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis[J]. **Journal of Food Science And Biotechnology**, 2015, 34(11): 1128-1134. (in Chinese)

会　议　消　息

会议名称: 第五届生物化学与分子生物学国际研讨会(CABMB 2019)

大会时间: 2019 年 12 月 6–8 日

大会地点: 中国三亚

主办单位: Wuhan Irvine Culture & Communication Co. Ltd.

会议简介: 第五届生物化学与分子生物学国际研讨会(CABMB 2019)将于 2019 年 12 月 6–8 日在三亚举行。本届大会将继续遵循学术性、国际性的原则, 特邀国内外生物化学与分子生物学领域内的学者专家前来参会, 并做出精彩的报告。CABMB 研讨会是领域内享受盛名的国际学术研讨会之一, 大会旨在为行业内专家和学者分享技术进步和业务经验, 聚焦生物化学与分子生物学领域的前沿研究, 提供一个交流的平台。

联系人: 张老师

电话: 15071343477

Email: subconf@126.com

官方网址: http://www.deconf.org/conference/CABMB2019/

在线投稿: hhttp://www.deconf.org/RegistrationSubmission/default.aspx?ConferenceID=1166

邮箱投稿: workshop12@163.com