

一种碱性 γ -谷氨酰转肽酶在 *Bacillus subtilis* 168 中的分泌表达与酶学性质分析

Bernard Gitura Kimani^{1,2}, 杨套伟^{1,2}, 饶志明^{*1,2}, 张显^{1,2}, 徐美娟^{1,2}, 和斐^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 将 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)在 *Bacillus subtilis* 168 同源过量表达,发现该酶能够自动分泌到细胞外,且重组菌酶活比原始菌提高了 3 568 倍。通过 SDS-PAGE 分析发酵液上清液发现,该 γ -谷氨酰转肽酶是由一个相对分子质量为 42 000 的大亚基和一个 22 000 的小亚基组成。通过酶学性质分析发现,该 γ -谷氨酰转肽酶是一个耐碱性的酶,最适反应 pH 为 10;同时该酶具有良好的耐热性,最适反应温度达到 50 °C;另外,加入 5.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 La^{3+} 、 Li^{+} 和 NH_4^{+} 对 GGT 转肽活力具有明显的促进作用,其中添加的 NH_4^{+} 对 GGT 活力促进作用最为显著,GGT 活力提高 45% 以上,而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则对其具有抑制作用。

关键词: γ -谷氨酰转肽酶;分泌表达;酶学特征;*Bacillus subtilis* 168

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)02—0149—07

Homologous Cloning and Characterization of *Bacillus subtilis* 168 γ -Glutamyltranspeptidase

Bernard Gitura Kimani^{1,2}, YANG Taowei^{1,2}, RAO Zhiming^{*1,2}, ZHANG Xian^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}, HE Fei^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Gammaglutamyltranspeptidase gene from *Bacillus subtilis* 168 was cloned and overexpressed with pMA5 vector in *Bacillus subtilis* 168 for overproduction of GGT. GGT was secreted in the extracellular space. The overexpressed enzyme was 3568 fold higher in activity than that from the parent strain and exhibited a specific transpeptidase activity of 49.8 U/mg. The molecular mass of two sub-units was estimated to be 42 000 and 22 000 respectively, by SDS-PAGE. The overexpressed GGT was a very versatile enzyme in alkaline pH. Its optimal temperature was 50 °C showing a moderately high thermostability. The effect of ions on purified GGT was also examined. Results showed that NH_4^{+} had the highest activation effect on GGT (>45%), other ions such as Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Li^{+} and La^{3+} had a significant activation effect on the enzyme, whereas Cu^{2+}

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB725202); 国家 863 计划项目(2015AA021004); 国家自然科学基金项目(31400082); 教育部重点项目(113033A); 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, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物育种发酵代谢方面的研究。

E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

引用本文: Bernard Gitura Kimani, 杨套伟, 饶志明, 等. 一种碱性 γ -谷氨酰转肽酶在 *Bacillus subtilis* 168 中的分泌表达与酶学性质分析[J].

食品与生物技术学报, 2017, 36(02): 149-155.

and Zn^{4+} recorded the highest deactivation on GGT activity.

Keywords: γ -Glutamyltranspeptidase, homologous cloning, enzymatic characterization, *Bacillus subtilis* 168

γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyltranspeptidase, GGT, EC:2.3.2.2) 属于 N-端亲和水解酶系, 普遍存在于生物体内^[1], 参与体内谷胱甘肽的代谢, 在抗氧化方面具有非常重要的作用^[2]。GGT 主要催化谷胱甘肽或其他含 γ -谷氨酰的化合物中的 γ -谷氨酰基团转移至其他氨基酸等受体, 形成新的含 γ -谷氨酰基的氨基酸^[3]。哺乳动物体内的 GGT 镶嵌在细胞膜中, 而作用位点位于细胞膜外部^[4], 而细菌体内的 GGT 一般分布于细胞质中或分泌到细胞外, 如芽孢杆菌合成的 GGT 基本全部分泌到胞外^[1,5]。所有的 GGT 均由单个基因编码合成一条多肽链, 然后分裂成含有两个大小亚基的成熟酶, 大亚基相对分子质量约 38 000~72 000, 而小亚基相对分子质量一般 22 000~66 000^[6]。

据报道, GGT 主要用于合成多种食品及医药功能性 γ -谷氨酰基化合物, 例如 L-茶氨酸、谷氨酰基牛磺酸、 γ -L-谷氨酰基-L-多巴、 γ -L-谷氨酰基-L-色氨酸等^[7], 其中研究最广泛的是合成 L-茶氨酸。目前, 大部分来自细菌的 GGT 通常在 *E. coli* 中过量表达和酶学表征, 而在枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 中的研究还比较少。另外, 近年来研究发现, L-茶氨酸具有镇静减压、增强免疫力和预防肿瘤等重要作用, 因此常作为食品添加剂为人类健康服务。目前, 大部分研究是将 GGT 在 *E. coli* 中过量表达和合成 L-茶氨酸^[8-9], 但是, *E. coli* 并不是食品安全菌株, 因此并不符合食品安全生产的要求。而枯草芽孢杆菌是被美国 FDA 认可的安全菌株^[10], 因此, 利用枯草芽孢杆菌构建 L-茶氨酸生产菌更符合食品安全生产的要求。另外, *E. coli* 中的 GGT 一般是周质空间蛋白质, 不利于分离纯化; 而枯草芽孢杆菌的 GGT 是胞外酶, 分离纯化步骤简单、操作成本低。本研究首先将 GGT 克隆到 *B. subtilis* 168 进行分泌表达, 同时对其酶学性质进行分析, 为后续用于合成 L-茶氨酸提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Bacillus subtilis 168 和 *E. coli* JM109 为作者所

在研究室保藏菌株; 基因 *ggt* 来源 *B. subtilis* 168, 同时 *B. subtilis* 168 也是基因 *ggt* 过量表达的宿主菌; 载体 pMD18-T, 购自大连宝公司, 用于 *ggt* 克隆; 质粒 pMA5 为作者所在研究室保藏, 用于 *ggt* 在 *B. subtilis* 168 中的过量表达。

1.2 基因 *ggt* 克隆与表达载体 pMA5-*ggt* 的构建

首先, 根据 NCBI 公布的 *B. subtilis* 168 的 *ggt* 基因设计以下 2 条引物:

P1: 5'-ATCGGATCCATGAAAAGAACGTGGAA
C-3' (*Bam*HI)

P2: 5'-GGCACGCGTTTATTACGTTTAAATT
AA-3' (*Mlu*I)

以上引物由上海生工生物工程有限公司合成并测序验证。然后采用 Ezup 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 获得的 *B. subtilis* 168 基因组 DNA 为模板, 利用引物 P1 和 P2 通过 PCR 扩增获得。

PCR 扩增体系 50 μL ; *B. subtilis* 168 基因组模板 2 μL , 10X buffer 5 μL , dNTP 4 μL , 引物 P1、P2 各 0.5 μL , ExTaq DNA 聚合酶 0.5 μL , ddH₂O 37.5 μL 。

ggt 基因 PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

PCR 反应产物用 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒 (Takara) 回收目的条带, 回收的基因片段与 pMD18-T 连接, 转化 *E. coli* JM109, 经过氨苄青霉素抗性平板筛选, 挑取阳性转化子。提取质粒酶切验证, 重组质粒命名为 T-*ggt*, 扩增获得的 DNA 测序验证由上海生工生物工程有限公司完成。经测序验证正确的重组质粒 T-*ggt*, 用 *Bam*HI 和 *Mlu*I 双酶切后, 与经过相同酶切的 pMA5 质粒连接, 构建表达载体 pMA5-*ggt*。

1.3 在 *B. subtilis* 168 中的表达

首先, 取 1 μL pMA5-*ggt* 通过化学转化法转化至 *B. subtilis* 168 中^[11], 挑取阳性转化子单菌落接种于 10 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 10 h, 然后以 6% 的接种体积分数转接于 50 mL 含有 25 g 蔗糖, 5 g 蛋白胨, 15 g

玉米浆, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.2) 的发酵培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 60 h。

1.4 GGT 纯化与表达分析

将培养 60 h 的菌液在 4 $^\circ\text{C}$ 、10 000 g 离心 30 min, 上清液采用 0.45 μm 滤膜过滤后, 采用 Ni-NTA 蛋白纯化柱纯化目的蛋白质, 经过两次上样, 蛋白质末端的 6 个 His 与 Ni-NTA 的金属离子进行螯合。洗脱过程: 首先用不含有咪唑的缓冲液洗柱, 除去未与 Ni-NTA 结合的细胞体及杂蛋白质, 然后用不同浓度的咪唑 (20~300 mmol/L) 缓冲液进行梯度洗脱, 在一定的咪唑浓度条件下, 可以得到较纯的酶液。利用 SDS-PAGE 分析 GGT 表达及纯化情况, 首先用 5 g/dL 的浓缩胶及 12~15 g/dL 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白质分离, 然后用考马斯亮兰 R-250 染色。总蛋白质质量浓度采用 Bradford 方法, 以牛血清蛋白 (BSA) 作为标准蛋白质^[12]。

1.5 GGT 酶活力测定

GGT 酶活力采用分光光度计法测定^[13]。反应体系 (1 mL): 2.5 mmol/L γ -谷氨酰对硝基苯胺, 60 mmol/L 双甘氨酸, 750 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 硼酸-NaOH (pH 10), 10 μL 适当稀释的酶液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min 后, 加入 2 mL 3.5 mol/L 的醋酸溶液终止反应, 在 410 nm 处测定吸光值。该条件下每分钟生成 1 μmol γ -谷氨酰对硝基苯胺所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.6 酶学性质分析

1.6.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性 将酶液分别置于 pH 8~11 的缓冲液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min 后测定剩余酶活力, 确定其最适反应 pH。另外, 将酶液分别置于 pH 3~12 的缓冲液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 20 h 后, 测定剩余酶活力, 考察其 pH 稳定性。

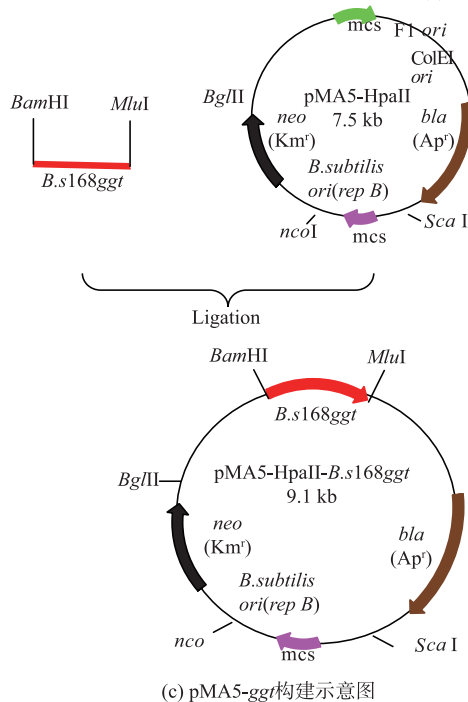
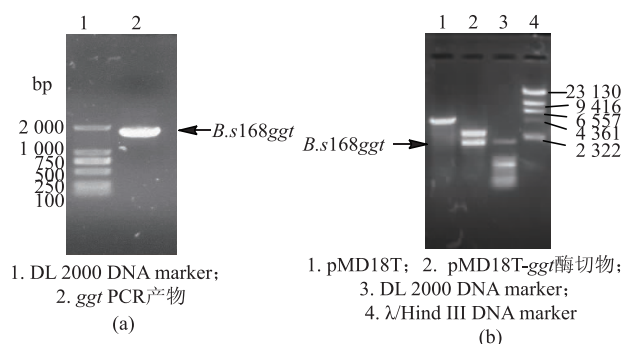
1.6.2 最适反应温度及温度稳定性 确定最适 pH 后, 将酶液分别置于 20~70 $^\circ\text{C}$ 条件测定酶活力, 确定其最适反应温度。另外, 将酶液分别置于 50、60、70 $^\circ\text{C}$ 条件下测定酶活力, 考察其温度稳定性。

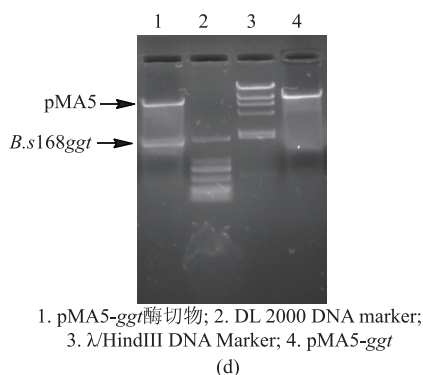
1.6.3 各种阳离子对 GGT 酶活的影响 将酶液分别置于含有 5.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Ba^{2+} 、 La^{3+} 、 Li^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 NH_4^+ 的溶液中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min 后, 测定剩余酶活力, 考察各种阳离子对 GGT 活力的影响。

2 结果与分析

2.1 基因克隆及其表达载体的构建

提取 *B. subtilis* 168 的基因组 DNA 为模板, 以 P1/P2 引物进行 PCR 扩增, 获得包含 18 bp His 的 GGT 基因, 基因大小与 NCBI 报道的一致 (见图 1 (a)), 将该基因克隆到 pMD-18T 载体上, 获得 T-*ggt* 重组质粒。随后将 T-*ggt* 转化至 *E. coli* JM109 中, 提取质粒, 经酶切和基因序列测序验证 (见图 1 (b)), 保证所克隆基因序列及酶切位点的准确性。重组表达载体构建示意图如图 1(c) 所示: 将验证正确的载体 T-*ggt* 经 *Bam*HI 和 *Mlu*I 酶切, 胶回收获得的 *ggt* 基因与经同样酶切的 pMA5 质粒连接, 成功构建重组表达载体 pMA5-*ggt*, 并且转化至 *B. subtilis* 168, 并提取质粒进行酶切验证 (见图 1 (d)), 确保重组菌构建成功。



图1 *ggt* 基因克隆及其表达载体 pMA5-*ggt* 的构建Fig. 1 Amplification of *ggt* gene and construction of pMA5-*ggt* recombinant vector

2.2 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*ggt* 表达

重组表达载体 pMA5-*ggt* 转化 *B. subtilis* 168, 成功获得重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*ggt*, 挑取单菌落接种于 10 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 10 h, 然后以体积分数 6% 的接种量转接于发酵培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 60 h。菌液在 4 $^{\circ}$ C、10 000 g 条件下离心 30 min。由表 1 可知, 重组菌胞外酶活为 26.464 U/mL, 比原始菌(0.007 415 U/mL)提高了 3 568 倍, 且 81% 以上的 GGT 被分泌到胞外, 说明 GGT 在 *B. subtilis* 168 中成功过量分泌表达。然后将上清液进行蛋白质电泳分析, 结果如图 2 所示, 产物在 42 000 和 22 000 处有条带, 与研究报道^[17]的 *B. subtilis* GGT 大小亚基的相对分子质量及序列预测的相对分子质量相似, 总相对分子质量约 64 000。

表 1 GGT 在重组枯草芽孢杆菌过量表达分析

Table 1 GGT production in recombinant *B. subtilis*

菌株	胞外酶活力/(U/mL)	胞内酶活力/(U/mL)
<i>B. subtilis</i> 168/ pMA5- <i>ggt</i>	26.464	6.256
<i>B. subtilis</i> 168	0.007 415	0.039 79

2.3 重组 GGT 分离纯化

由于在重组蛋白质 GGT 的 N 端加入了 6 个组氨酸标签, 因此, 可以采用 Ni-NTA 一步纯化获得目的蛋白质。离心获得的上清液采用 0.45 μ m 滤膜过滤后, 采用 Ni-NTA 蛋白纯化柱纯化获得电泳纯的目的蛋白质。重组酶纯化步骤及结果如表 2 所示, 重组 GGT 纯化倍数为 2.57 倍, 回收率为 21.9%, 重组 GGT 的比酶活为 49.8 U/mg。对纯化的酶进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示, 重组酶在 42 000

和 22 000 处有条带, 总相对分子质量约 64 000, 而基本上没有其它条带, 说明成功获得电泳纯的重组酶。

表 2 重组 GGT 纯化步骤及结果分析

Table 2 Purification summary of GGT

纯化步骤	总蛋白质质量/(mg)	总活力/(U)	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
发酵上清液	32.3	643.37	19.9	100	1
Ni-NTA 纯化	2.84	141	49.8	21.9	2.5

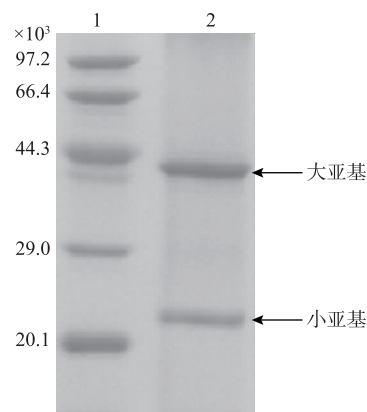


图 2 重组 GGT 纯酶 SDS-PAGE 分析

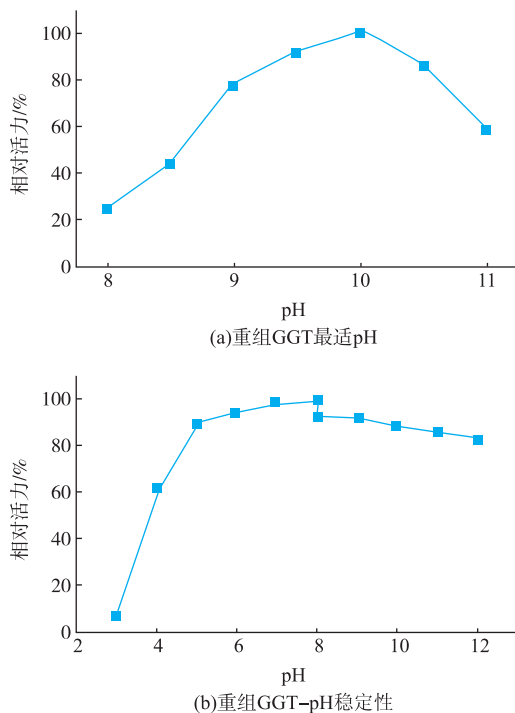
Fig. 2 SDS-PAGE of the purified GGT

2.4 重组 GGT 酶学性质

基于获得的电泳纯重组酶, 对其进行酶学性质研究, 包括最适反应 pH 及 pH 稳定性、最适反应温度及温度稳定性, 以及各种离子对其活力的影响。

2.4.1 最适反应 pH 及 pH 稳定性 环境 pH 对酶的催化活性具有较大的影响, 环境过酸或过碱都有可能酶发生不可逆变性失活, 只有在最适 pH 环境中, 才能保证酶和底物处于最佳解离状态, 最适宜相互作用, 从而达到最佳的催化效果。因此, 首先研究了 GGT 催化的最适反应 pH 及 pH 稳定性。结果如图 3(a)所示。GGT 转肽催化最适 pH 为 10.0, 在 pH 9.0~10.5 范围内, GGT 保持 80% 以上的活力, 而当 pH < 9 或 pH > 10.5, GGT 转肽催化活力迅速下降至 50% 以下, 说明该酶催化范围比较窄。而当 pH 为 8.0 时, GGT 仅保持 25% 的活力, 说明该酶对酸性环境非常敏感。由图 3(b)所示, GGT 在 pH 5~12 范围内保存 20 h 后, 剩余酶活力达到 80% 以上, 说明 GGT 在 pH 5~12 范围内稳定性良好, 同时说明该酶具有较宽泛的 pH 耐受范围; 然而, 当环境 pH 低于 5 时, 保存 20 h 后酶活力迅速下降, 说明该酶在强酸性环境中稳定性较差。综上所述, 该 GGT 在碱性条件下能够充分发挥作用, 而合成茶氨酸过程

中涉及到转肽反应。碱性环境最有利于转肽反应, 因此, 该碱性 GGT 非常适合用于茶氨酸的合成。



注: pH 3~8 为柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液, pH 8~12 为甘氨酸-NaOH 缓冲液。

图 3 重组 GGT 最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 3 Effect of pH on activity and stability of GGT

2.4.2 最适反应温度及温度稳定性 环境温度是影响酶催化效率的另一个重要因素。一般来说, 温度过低时, 酶的活性也较低, 酶的催化效率也随之降低; 适度提高温度可以提高酶催化效率, 而温度过高会使酶发生不可逆的变性失活。因此, 只有保持合适的温度才能保证酶高效的催化作用。温度对 GGT 活力的影响如图 4 所示, GGT 最适作用温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 而当温度低于或高于 50 $^{\circ}\text{C}$, GGT 活力迅速下降, 说明 GGT 对环境温度的变化非常敏感, 而其温度作用范围也较窄, 只是在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右才能保持较高的活力。随后, 考察了 GGT 的热稳定性, 结果如图 5(a) 所示, GGT 在温度低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 表现出良好的热稳定性, 即使在较高温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 (见图 5(b)) 连续保存 6 h, 仍保留 85% 以上的酶活力; 而当环境温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, GGT 的热稳定性迅速下降, 如温度升高至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, GGT 活力的半衰期只有 12 min, 在此条件下保存 30 min, GGT 残留活力已经降至 30% 以下。当继续升高温度至 70 $^{\circ}\text{C}$ 时, GGT 活力在

10 min 内下降至 10% 以下。说明当环境温度高于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时就可以使 GGT 快速变性失活。

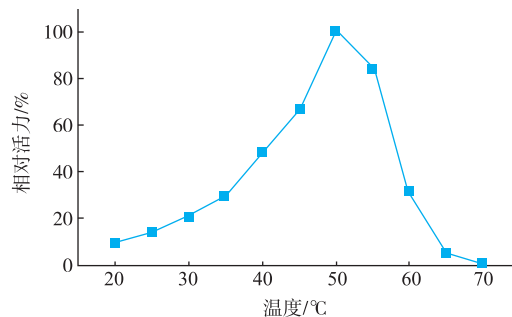


图 4 温度重组 GGT 活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activity and thermostability of GGT

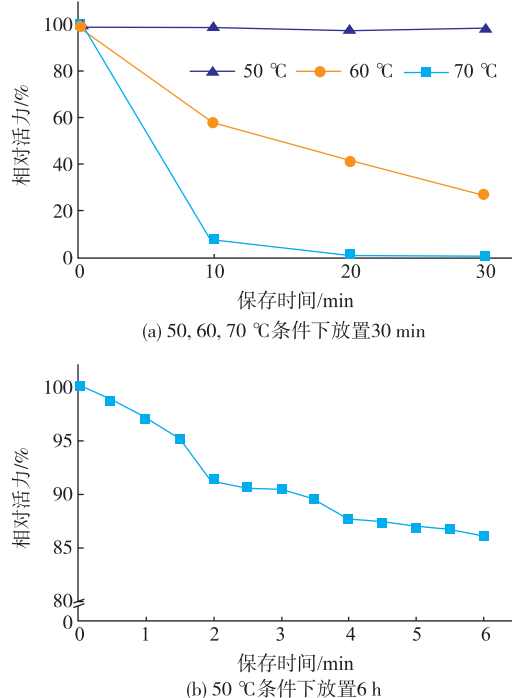


图 5 重组 GGT 热稳定性研究

Fig. 5 Effect of temperature on GGT thermostability

2.4.3 各种阳离子对 GGT 酶活的影响 金属离子对酶活力具有重要的影响, 有的金属离子可以显著提高酶的活力, 而有些离子则会严重抑制酶的催化活力。因此, 考察以下常见离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Ba^{2+} 、 La^{3+} 、 Li^{+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 NH_4^{+} 对 GGT 转肽活力的影响。结果如图 6 所示, 与对照组添加任何不外源离子的相比较, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对 GGT 活力具有明显抑制作用, 加入 5.0 mmol/L 的 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 时, GGT 活力下降了

20%以上;而 5.0 mmol/L 的 Ba^{2+} 对 GGT 转肽活力基本没有影响;而同样质量浓度的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 La^{3+} 、 Li^{+} 和 NH_4^{+} 对 GGT 转肽活力具有明显的促进作用,其中添加 5.0 mmol/L 的 NH_4^{+} 对 GGT 活力促进作用最为显著,GGT 活力提高 45% 以上。Shuai 等(2011)报道发现添加 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 等能够提高 GGT 活力,而添加 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则会抑制 GGT 活力。而作者首次发现添加镧系元素(La^{3+})对 GGT 活力具有促进作用。

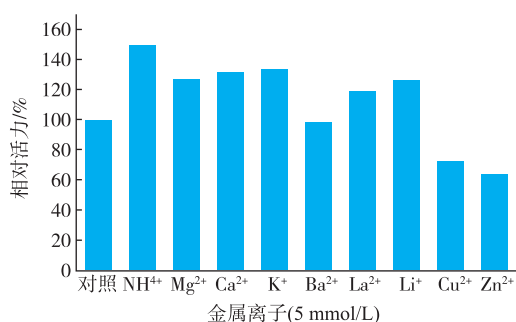


图 6 金属离子对 GGT 活力的影响

Fig. 6 Effect of ions on GGT activity

表 3 不同来源的芽孢杆菌 GGT 酶学性质特征比较

Table 3 Comparison of biochemical properties of GGTs from different *Bacillus* sp.

来源	亚基组成相对分子质量/ $\times 10^3$		最适温度/ $^{\circ}\text{C}$	最适 pH	参考文献
	大亚基	小亚基			
<i>B. subtilis</i> (natto)	45	22	60	8.0-8.5	[3]
<i>B. subtilis</i> TAM-4	40	22	55	8.8	[15]
<i>B. subtilis</i> NX-2	43	32	40	8.0	[16]
<i>B. subtilis</i> SK11.004	40	21	37	10	[17]
<i>B. sp</i> KUN-17	42	22	50	7.0	[17]
<i>B. subtilis</i> 168	42	22	50	10	作者研究课题

3 结 语

本文首次报道将来源于枯草芽孢杆菌的 GGT 在 *B. subtilis* 168 进行同源过量表达,结果发现,该酶大部分都被分泌到细胞外(见表 1),这为后续酶的分离纯化提供了便利,降低了分离纯化的成本。通过对来源于 *B. subtilis* 168 的 GGT 酶学性质的研究,发现该酶最适反应温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$,而在低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中具有良好的热稳定性,有利于后续催化反应操作的连续性,进而提高产物产量。另外,研究发现,该 GGT 是一种碱性酶,在催化 L-谷氨酰胺

2.4.4 来源于芽孢杆菌属 GGT 酶学性质特征比较
目前已报道的 GGT 基本都是来源于枯草芽孢杆菌,而 GGT 来源的菌株不同,酶学性质也会存在差别。本研究中对来源于不同枯草芽孢杆菌的 GGT 酶学性质特征进行比较,结果如表 3 所示。Ogawa 等在 1991 年报道了来源于枯草芽孢杆菌的 GGT 特征,发现该 GGT 由两个不同大小的亚基组成,总相对分子质量约为 62 000,这与本研究及 Shuai 等发现的 GGT 相对分子质量基本一致,而 Wu 等则发现来源于 *B. subtilis* NX-2 的 GGT 具有较大的相对分子质量,约为 75 000。通过考察最适作用 pH 发现,不同芽孢杆菌来源最适作用 pH 存在一定差异,最适 pH 在 7.0~10.0 之间。而本研究中来源于菌株 *B. subtilis* 168 和 Shuai 等发现的来源于 *B. subtilis* SK11.004 的 GGT 均为碱性 GGT,最适 pH 为 10。但是,本研究报道的 GGT 最适作用温度(50 $^{\circ}\text{C}$)高于 Shuai 等^[14]发现的来源于 *B. subtilis* SK11.004 的 GGT 的最适作用温度(37 $^{\circ}\text{C}$),而目前已报道的 GGT 最适作用温度在 37~60 $^{\circ}\text{C}$ 之间。

合成 L-茶氨酸的过程中,需要加入乙胺,从而造成反应体系 pH 升高,为了使催化反应快速有效进行,需要加入大量盐酸调节 pH。而本文报道的 GGT 最适反应 pH 为 10,属于较强碱性环境。因此,用本课题研究的 GGT 催化 L-谷氨酰胺合成 L-茶氨酸时,与最适反应 pH<10 的 GGT 比较,需要添加较少量的盐酸即可进行有效催化反应,从而降低生产成本。因此,本文报道的碱性 GGT 更具有工业应用价值。在后续研究中,作者将对该 GGT 催化 L-谷氨酰胺合成 L-茶氨酸催化条件深入研究,进一步提升其工业化合成 L-茶氨酸的应用价值。

参考文献:

- [1] SUZUKI H, KUMAGAI H. γ -glutamyltranspeptidase: a new member of Ntn-hydrolase superfamily[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2001, 46: 1842-1848.
- [2] MEISTER A, ANDERSON M. Glutathione[J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 711-760.
- [3] OGAWA Y, HOSYOYAMA H, HAMANO M, et al. Purification and properties of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto)[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(12): 2971-2977.
- [4] POMPELLA A, DE T V, PAOLICCHI A, et al. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71: 231-238.
- [5] MINAMI H, SUZUKI H, KUMAGAI H. Salt-tolerant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 431-438.
- [6] CASTELLANO I, MERLINO A. gamma-Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 3381-3394.
- [7] SUZUKI H, KATO K. gamma-Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase [J]. *Amino acids*, 2007, 32: 333-340.
- [8] GUO Liang, SHEN Wei, WANG Zhengxiang, et al. Construction of recombinant *E. coli* for producing theanine [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(2): 41-45. (in Chinese)
- [9] CHEN X, SU L, WU D, et al. Application of recombinant *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase to the production of l-theanine[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(9): 1429-1439.
- [10] DE B A, DIDERICHSEN B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 36(1): 1-4.
- [11] ANAGNOSTOPOULOS C, SPIZIZEN J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. *J Bacteriol*, 1961, 81: 741-746.
- [12] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [13] ORLOWSKI M M. γ -Glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of Land D- γ -glutamyltranspeptidase activities[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1963, 73: 679-681.
- [14] SHUAI Y, ZHANG T, MU W, et al. Purification and characterization of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* SK11.004 [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 6233-6238.
- [15] ABE, ITO Y, OHMACHI T, et al. Purification and properties of two isozymes of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM-4[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(10): 1621-1625.
- [16] WU Q, XU H, ZHANG L J, et al. Production, purification and properties of gamma-glutamyltranspeptidase from a newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43(1-4): 113-117.
- [17] SHUAI Y, ZHANG T, MU W, et al. Purification and characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* SK11.004[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(11): 6233-6238.