

# 利用重组枯草芽孢杆菌产 *Bacillus pumilus* 来源的 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶及其在 L-茶氨酸合成中的应用

KOMERA Irene, 杨套伟, 张显, 饶志明\*, 徐美娟

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** L-茶氨酸作为一种非天然氨基酸对人体健康具有多方面的功效,其作为食品饮料添加剂和制药原料的需求量日益增加。本文以安全菌株 *Bacillus subtilis* 168 作为宿主菌,表达生产 *B. pumilus* 来源的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)。结果显示,该来源 GGT 成功在 *B. subtilis* 168 中实现了胞外分泌表达。最后,通过关键转化条件优化,并结合批次流加策略,该重组 GGT 能够在 16 h 催化合成 50.8 g/L 的 L-茶氨酸,该结果可以和已报道的以大肠杆菌作为宿主菌表达 GGT 并催化合成 L-茶氨酸的产量相媲美。

**关键词:**  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶;L-茶氨酸;枯草芽孢杆菌

中图分类号:Q 814 文章编号:1673-1689(2019)10-0067-05 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2019.10.010

## Efficient Production of *Bacillus pumilus* $\gamma$ -Glutamyl Transferase in *B. subtilis* and Its Application of Biosynthesis of L-Theanine

KOMERA Irene, YANG Taowei, ZHANG Xian, RAO Zhiming\*, XU Meijuan

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** L-theanine, is a nonproteic amino acid which recently has an increasing demand as it is applied in food and pharmaceutical industries. In this study, a GRAS (Generally Recognized As Safe) strain *Bacillus subtilis* 168 was used as the host to produce a novel  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) from *B. pumilus* ML413. The enzyme produced was applied to L-theanine synthesis. Subsequently, glutamine conversion efficiency with the GGT was optimized. Finally, for the improved L-theanine production, a fed-batch strategy was introduced and the maximum titer of L-theanine reached 50.8 g/L at 16 h. This titer could be comparable to the efficient but toxic GGT producer recombinant *E. coli*.

**Keywords:**  $\gamma$ -glutamyl transferase, L-theanine, *Bacillus subtilis*

收稿日期: 2017-02-07

基金项目: 国家 863 计划项目 (2015AA021004); 江苏省杰出青年科学基金项目 (BK20150002); 中国博士后科学基金项目 (2015M570407); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51708A); 111 引智计划 (111-2-06) 和江苏省现代发酵工业协同创新中心项目。

\* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 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: KOMERA Irene, 杨套伟, 张显, 等. 利用重组枯草芽孢杆菌产 *Bacillus pumilus* 来源的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶及其在 L-茶氨酸合成中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 67-71.

茶具有强身健体、治疗疾病等之药物疗效。现代医学研究证实,这些功效与茶叶含有的功能氨基酸 L-茶氨酸有密切的关系<sup>[1]</sup>。L-茶氨酸是由日本学者 Sakato 首次从玉露绿茶中分离提取得到并因此而命名<sup>[2]</sup>。L-茶氨酸是存在于茶类植物中的一种天然氨基酸,对茶叶的品质和风味具有重要影响。L-茶氨酸作为茶叶三大天然提取物之一,其安全性已经得到众多国家的共同认可。对人体具有多方面的健康功效,其作为一种“天然镇静剂”添加在多种食品、饮品及保健品,需求量日益增加<sup>[1]</sup>。

目前,L-茶氨酸的生产方法主要有茶叶提取法,化学合成法和酶转化法 3 种。L-茶氨酸一般占干茶叶比重达 1%~3%<sup>[3]</sup>,因此,通过茶叶提取 L-茶氨酸具有提取率低、周期长、成本高等缺点。化学法合成茶氨酸的缺点为反应条件剧烈,反应过程中难以避免有机试剂的使用,同时产物多为 D-型和 L-型茶氨酸异构体混合物<sup>[4]</sup>。酶催化法因其反应条件温和、专一性高、催化效率高等优点而备受关注,据报道,主要有四种酶类能够催化合成 L-茶氨酸:L-谷氨酰胺合成酶,L-谷氨酰胺酶, $\gamma$ -谷氨酰甲胺合成酶和  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶,而  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶催化反应因不需要 ATP 的参与而广受青睐<sup>[5]</sup>。

本研究克隆了一种来源于 *Bacillus pumilus* ML413 的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 (GGT),并在安全菌株 *Bacillus subtilis* 168 中进行了表达,并研究了该重组 GGT 催化合成 L-茶氨酸中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

**1.1.1 菌株** 本研究采用模式菌株 *Escherichia coli* 109 作为克隆宿主,模式菌株 *Bacillus subtilis* 168 作为表达宿主。以本研究室前期筛选并保藏的 *B. pumilus* ML413 全基因组为模板,利用引物对 ggt-F/ggt-his tag-R 通过 PCR 扩增获得 ggt 基因,随后用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I 分别处理 ggt 基因和表达载体 pMA5-HpaII,最后将纯化后基因和载体进行连接,获得重组载体 pMA5-ggt,采用化学方法将其转化至 *B. subtilis* 168 中<sup>[6]</sup>,获得重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-ggt,并将其命名为 BsG。

**1.1.2 引物** 本研究所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物命名          | 引物序列(5'-3')  |
|---------------|--|
| ggt-F         | AGCGGGATCCATGAAACGCATTTCTCTAAC<br>T ( <i>Bam</i> H I)          |
| ggt-his tag-R | ACCGACGCGTCTAGTGGTGGTGGTGGTGT<br>GATCTGCAGCTAC ( <i>Mlu</i> I) |

### 1.2 培养基与培养条件

菌株活化、种子培养主要采用 LB 液体培养基 (g/L):氯化钠 10,Tryptone 10,Yeast Extract 5。旋转式摇床培养,摇床转速 160 r/min,培养温度 37 °C。

转化子筛选采用 LB 固体培养基,根据需要加入氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL 或卡那霉素 50  $\mu$ g/mL。

产酶发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,yeast extract 20,玉米浆 15,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2,pH 7.2。摇床转速 160 r/min,培养温度 37 °C。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 重组菌 GGT 粗酶液的制备** 重组菌培养结束后,离心(10 000 r/min,30 min),上清液即为胞外 GGT 粗酶液。离心获得的细胞用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)洗涤 2~3 次,细胞悬浮液采用超声波破碎,离心(10 000 r/min,30 min)获得胞内 GGT 粗酶液。上述 GGT 粗酶液均置于 4 °C 保存,用于后续实验。

**1.3.2 GGT 酶活力的测定** 酶活反应体系参照文献 [7],1 mL 反应体系中包含:50 mmol/L 硼酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0),2.5 mmol/L  $\gamma$ -GpNA,60 mmol/L 双甘二肽,20  $\mu$ L 适当稀释的酶液。37 °C 反应 10 min 后,添加 125  $\mu$ L 浓度为 3.5 mol/L 的醋酸终止反应。以不添加双甘二肽受体的反应液作为对照,采用分光光度计在 410 nm 处测定吸光度差值。酶活单位定义为:1 min 内经由转肽反应催化生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯胺(p-Nitrophenylamine)所需酶量即为一个酶活单位(U)。

**1.3.3 重组酶纯化** 将上述所得的粗酶液先经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后,利用 Ni-NTA 蛋白纯化柱进行纯化,先用不含咪唑的缓冲液洗脱杂蛋白,再用不同浓度的咪唑缓冲液进行梯度洗脱,依据酶分子的大小与金属离子的结合牢固程度,在一定的咪唑浓度条件下,可以得到较纯的酶液。

**1.3.4 酶法合成 L-茶氨酸体系** 转化体系主要包含:L-谷氨酰胺,乙胺,GGT 蛋白酶,50 mmol/L 硼酸-NaOH 缓冲液 (pH 10.0),37 °C 反应结束后,添加

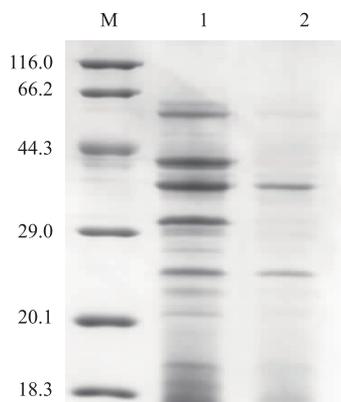
10%的 TCA 终止反应。

**1.3.5 L-茶氨酸分析方法** 采用高效液相色谱 (HPLC) 来测定 L-茶氨酸的含量<sup>[7]</sup>。转化液离心后先用 0.24  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后处理。利用 OPA 柱前进行衍生。HPLC 条件: Angilent 1260; 色谱柱: Hypersil ODS C18 (4.0 mm $\times$ 125 mm)。流动相 A (8 g/L 醋酸钠, 225  $\mu\text{L/L}$  三乙胺, 5 mL/L 四氢呋喃, pH 7.2) 和流动相 B (30 g/L 醋酸钠, pH 7.2/乙腈/甲醇 (1:2:2, V/V)) 的梯度洗脱程序为: 保留时间为 0、27.5、31.5、34、35、40 min 时, A/B 分别为 92:8、40:60、0:100、0:100、92:8、92:8; 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测器; 检测波长: 338 nm; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *B. pumilus* 来源的 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶在 *B. subtilis* 168 中的表达分析

将重组 *B. subtilis* 接种至发酵培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 24 h, 培养结束后离心收集上清液, 获得 GGT 粗酶液。随后用 AKATA purifier 对 GGT 粗酶液进行纯化, 获得 GGT 纯酶液。对 GGT 粗酶液和纯酶液进行 SDS-PAGE 分析发现 (图 1), *B. pumilus* 来源的  $\gamma$ -谷氨酰转氨酶成功在 *B. subtilis* 168 中进行了表达, 该 GGT 蛋白是由大小分别为 38、23 kDa 的两个大小亚基组成的二聚体蛋白。



M: 标准分子量蛋白样品; 1: 重组 *B. subtilis* 胞外酶液; 2: 重组 GGT 酶纯化液

图 1 重组 *B. subtilis* 发酵上清和纯化液 SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 SDS-PAGE of crude and purified enzyme of recombinant *B. subtilis*

同时, 按照 1.3.2 节所述的 GGT 活力测定方法, 对的重组 *B. subtilis* 胞内外 GGT 活力进行了检测, 结果表明, 发酵培养 24 h, 重组 *B. subtilis* 胞外 GGT

活力达到 3 U/mL, 而胞内 GGT 酶活只有 0.2 U/mL, 说明重组 *B. subtilis* 产的 GGT 为胞外分泌表达。

### 2.3 重组 *B. subtilis* 发酵上清液中 GGT 催化生产 L-茶氨酸能力分析

考察了重组 *B. subtilis* 胞外 GGT 蛋白催化合成 L-茶氨酸的能力, 酶催化反应体系如下: 20 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 40 mmol/L 的乙胺, GGT 酶液浓度为 0.04 U/mL, 反应体系 pH 10, 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 5 h 后, 添加三氯乙酸 (TCA) 至终浓度为 10% 终止反应。反应液适当稀释过滤后进行 HPLC-MASS 分析, 结果如图 2 所示, 说明该酶具备催化生成 L-茶氨酸的能力。

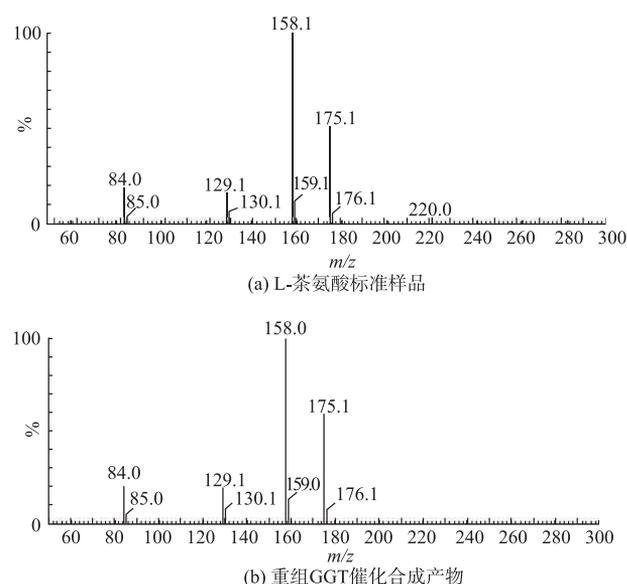


图 2 重组 GGT 催化合成 L-茶氨酸能力分析  
Fig. 2 Identification of L-theanine synthesized by the recombinant GGT

### 2.4 重组 GGT 催化特征分析

GGT 催化  $\gamma$ -谷氨酰类化合物的  $\gamma$ -谷氨酰分子转移到其他氨基酸、短肽等受体分子上 (转肽反应) 或水分子上 (水解反应), 因此, 要抑制水解等副反应的发生。据研究报道, GGT 催化反应特性与反应 pH 密切相关, 同时还主要受酶添加量、乙胺浓度等因素影响<sup>[8]</sup>。

首先, 考察了 GGT 在不同 pH (4~12) 条件下的催化特征, 结果如图 3 所示, 在 pH 7~9 范围内, GGT 水解活力和转肽活力都比较大, 说明在此环境中, 产物除了茶氨酸外, 还会有大量副产物 L-谷氨酸的积累。而当控制 pH=10 时, GGT 水解活力和转

肽活力都显著下降,但是 GGT 水解活力下降更为明显,而转肽活力仍保持较高水平,因此,选用 pH 10 作为 L-茶氨酸合成的最适 pH。

为了降低水分子与底物 L-谷氨酰胺对受体乙胺的竞争能力,反应过程中需要保证受体乙胺的用量大于供体 L-谷氨酰胺用量,因此,考察了乙胺浓度(20~240 mmol/L)对茶氨酸合成的影响。结果如图 4 所示,随着乙胺添加量的增加,L-茶氨酸产量逐渐提高,当乙胺浓度为 200 mmol/L,即谷氨酰胺:乙胺=1:10 时,茶氨酸产量最大。

酶的添加量对酶催化反应具有重要影响,因此,考察了 GGT 添加量对 L-谷氨酰胺转化率的影响。结果如图 5 所示,随着 GGT 添加量的增加,底物 L-谷氨酰胺转化率逐渐提高,当 GGT 添加量为 1 U/mL 时,底物转化率最高达到 87.2%,继续增加酶量,转化率略有下降,因此,确定 GGT 的最适添加量为 1 U/mL。

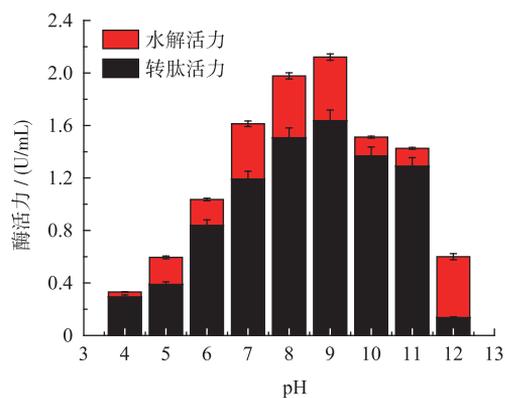


图 3 pH 对 GGT 转肽和水解活力的影响

Fig. 3 Effects of pH to GGT activity

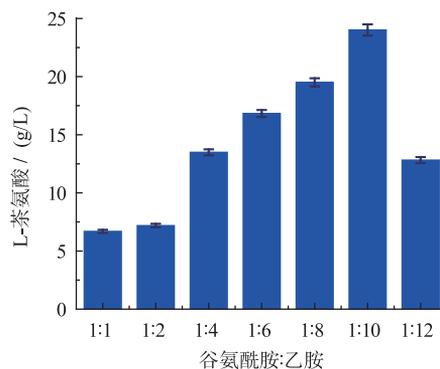


图 4 谷氨酰胺与乙胺添加比对茶氨酸合成的影响

Fig. 4 Substrate ratio optimization

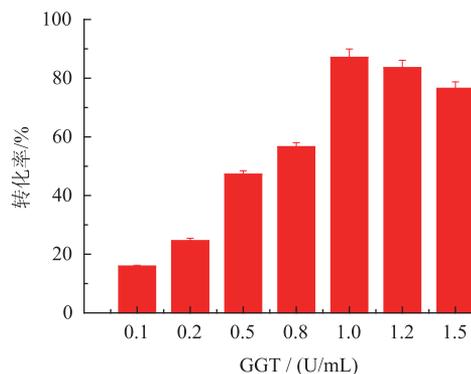


图 5 GGT 添加量对茶氨酸合成的影响

Fig. 5 Effects of GGT dosage on theanine production

## 2.5 流加转化

为了进一步提高茶氨酸产量,需要添加高浓度的底物,然而,高浓度的乙胺对 GGT 具有抑制作用, L-谷氨酰胺溶解度较低,同时,L-谷氨酰胺和乙胺的添加比例和用量对茶氨酸合成具有较大的影响。批次流加底物是解决上述不利因素的有效策略。初始转化体积为 1 L,L-谷氨酰胺和乙胺初始添加量分别为 20 mmol/L 和 60 mmol/L,转化体系中添加 1.0 U/mL 的 GGT,每隔 3 h 补加同样浓度的 L-谷氨酰胺和乙胺,转化条件一直维持在 pH 10,37 °C;直至茶氨酸产量几乎不增加时停止反应,转化 16 h,茶氨酸产量达到 50.8 g/L(图 6)。

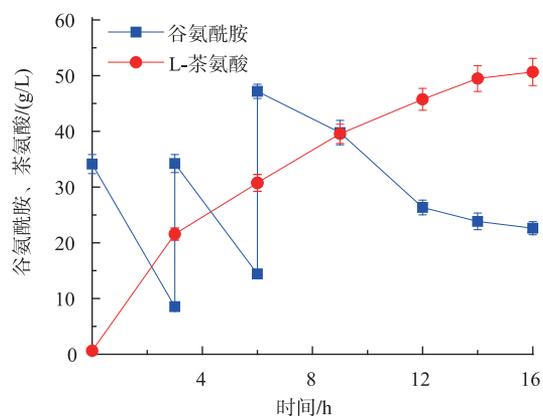


图 6 批次流加合成 L-茶氨酸

Fig. 6 Fed-batch production of L-theanine

## 2.6 利用发酵液催化合成 L-茶氨酸

由于重组 *B. subtilis* 生产的 GGT 为胞外表达,且胞外 GGT 酶活达到 3 U/mL,因此,从未来生产应用的角度,考虑在重组枯草芽孢杆菌发酵产酶结束后,直接在发酵液中加入底物进行 L-茶氨酸的生物合成,设计了带细胞的发酵液和除细胞的发酵液上

两个实验清。结果如图 7 所示,两种情况下最终的 L-茶氨酸浓度基本一致,但是利用发酵液进行催化时,底物消耗和产物合成速度较利用上清作为催化剂时效率略高,同时副产物 L-谷氨酸初始积累量也偏好,但副产物 L-谷氨酸最终积累量基本没有差别,可能原因是发酵液中除了上清液中的 GGT 外,还包括细胞内的 GGT,因此其 GGT 总活力较高。另外,在发酵液中 L-茶氨酸合成效率与在硼酸-NaOH 缓冲液体系中的效率相差不大,因此,从未来生产应用的角度考虑,直接在重组 *B. subtilis* 发酵液中加入底物进行 L-茶氨酸的催化合成具有较好的前景。

### 3 结语

前期已报道的研究中,多采用大肠杆菌作为 GGT 的表达宿主<sup>[9]</sup>,这在食品安全上存在一定的安全隐患。选用安全菌株 *B. subtilis* 168 作为宿主菌,克隆表达 *B. pumilus* 来源的  $\gamma$ -谷氨酰转氨酶,并对该酶的催化特征以及催化合成 L-茶氨酸的催化条件进行了优化,通过补料分批流加催化 16 h,L-茶

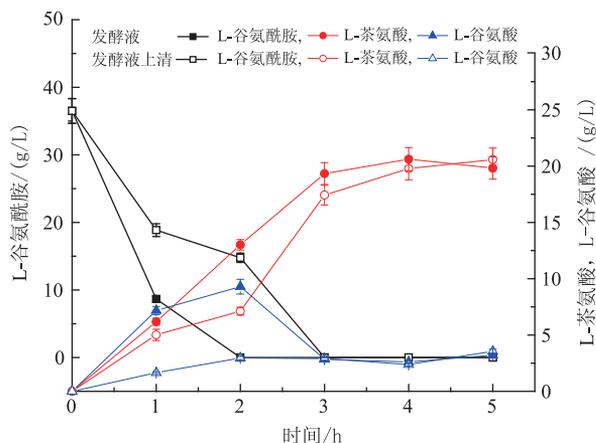


图 7 利用发酵液催化合成 L-茶氨酸

Fig. 7 Biosynthesis of L-theanine with fermentation broth

氨酸产量达到 50.8 g/L,该结果与文献[8]以大肠杆菌作为宿主菌表达 GGT 并催化合成 L-茶氨酸的产量相媲美。另外,直接在重组 *B. subtilis* 发酵液中加入底物进行 L-茶氨酸的催化合成具有较好的前景。选用 FDA 认可的 *B. subtilis* 168 作为宿主菌更符合工业化安全生产的要求。

### 参考文献:

- [1] GUANTING L. Exploitable food additives (VIII): L-theanine and its functional activity [J]. *Journal of Cereals & Oils*, 2003, 5: 21.
- [2] SAKATO Y. The chemical constituents of tea: III. A new amide theanine [J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1949, 23: 262-267.
- [3] VUONG Q V, GOLDING J B, NGUYEN M, et al. Extraction and isolation of catechins from tea [J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(21): 3415-3428.
- [4] GU H, JIANG Y, WANG J. A practical synthesis of ethyl L-glutamine (L-theanine) [J]. *Organic Preparations and Procedures International*, 2004, 36(2): 182-185.
- [5] MU W, ZHANG T, JIANG B. An overview of biological production of L-theanine [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33: 335-342.
- [6] VOJCIC L, DESPOTOVIC D, MARTINEZ R, et al. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(2): 487-493.
- [7] HE Fei, YANG Taowei, XU Meijuan, et al. Efficient synthesis of L-theanine by recombinant strain *Corynebacterium glutamicum* SYPAS-5 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56: 1595-1605. (in Chinese)
- [8] CHEN X, SU L, WU D, et al. Application of recombinant *Bacillus subtilis*  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase to the production of L-theanine [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49: 1429-1439.
- [9] CHEN Xingyi, SU Lingqia, WU Jing. Fermentation optimization of recombinant  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 in *E. coli* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2015, 34: 799-805. (in Chinese)