

产谷氨酸脱羧酶重组枯草芽孢杆菌的构建与食品级表达

丁汪洋, 江波*, 沐万孟, 张涛

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡, 214122)

摘要: 谷氨酸脱羧酶(GAD)是生物合成 γ -氨基丁酸(GABA)的关键酶。本研究构建了4株无抗标记的重组枯草芽孢杆菌,首次实现了乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403)来源的谷氨酸脱羧酶基因在枯草芽孢杆菌中的食品级表达。通过比较4株重组枯草芽孢杆菌的生长曲线和发酵酶活曲线,筛选出产酶效率最高的重组菌株*B.subtilis* WB600/pUB-P43-gadB(opt)-dal,该重组菌在初始发酵培养基中发酵42 h后发酵酶活可达4.1 U/mL。通过调整培养基成分,重组菌*B.subtilis* WB600/pUB-P43-gadB(opt)-dal的发酵酶活最高达到7.4 U/mL,与初始相比酶活提高了79%,是目前已报道重组枯草芽孢杆菌产谷氨酸脱羧酶酶活的最高水平。

关键词: 谷氨酸脱羧酶; γ -氨基丁酸;食品级表达

中图分类号: Q 78

文章编号:1673-1689(2020)02-0024-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.004

Construction of A Recombinant *Bacillus subtilis* and Food-Grade Expression of Glutamate Decarboxylase

DING Wangyang, JIANG Bo*, MU Wanmeng, ZHANG Tao

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Glutamate decarboxylase (GAD) is a key enzyme that can be used to biosynthesize γ -aminobutyric acid (GABA). In our study, four antibiotic-free marker recombinant *Bacillus subtilis* strains were constructed and glutamate decarboxylase derived from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403 was expressed in those strains. By comparing growth curves and GAD production curves of the four recombinant strains, the recombinant strain *B.subtilis* WB600/ pUB-P43-gadB (opt)-dal with highest enzyme activity was selected. After fermentation of the *B.subtilis* WB600/ pUB-P43-gadB (opt)-dal for 42 h in primary fermentation medium, the volumetric activity of the fermented broth reached 4.1 U/mL. By modifying of the composition of fermentation medium, volumetric activity of the fermented broth was increased by 79% and reached 7.4 U/mL, which was the highest activity of GAD for the reported recombinant *Bacillus subtilis* strains.

Keywords: glutamate decarboxylase, γ -aminobutyric acid, food-grade expression

收稿日期: 2017-12-22

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102, 2014AA020543)。

* 通信作者: 江波(1962—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品化学和应用酶技术方面的研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种含有 4 个碳原子的非蛋白质氨基酸,作为一种抑制性神经递质广泛存在于哺乳动物中枢神经系统中^[1]。大量的研究表明,GABA 具有许多重要的生理功能,如利尿、调节血压、缓解精神焦虑、促进胰岛素的分泌等^[2-5]。因此,GABA 可以做为一种功能性的成分应用于食品和药品领域^[6]。

GABA 的制备方法有很多,如化学合成法、植物富集法、生物转化法。其中由于生物转化法具有反应条件温和,对环境友好,生产成本低而具有很好的应用前景^[7]。对于生物转化法制备 GABA 主要是利用微生物表达的谷氨酸脱羧酶来催化底物谷氨酸或谷氨酸盐脱羧来实现,其中应用最广泛的是利用乳酸菌发酵生产 GABA,但利用乳酸菌发酵有菌体量少、培养条件苛刻、谷氨酸脱羧酶表达量少等缺点,使得 GABA 的生产成本较高。近年来,有研究者利用基因工程的手段使得谷氨酸脱羧酶在大肠杆菌中得到大量表达,但大肠杆菌是革兰氏阴性菌,其在发酵后期会产生内毒素,限制了其在食品工业上的应用^[8]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种国际上公认(generally recognized as safe,GRAS)的安全微生物^[9]。有少量报道用枯草芽孢杆菌作为宿主,实现了外源谷氨酸脱羧酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达^[10-12],但重组枯草芽孢杆菌在这些已有报道中表达的谷氨酸脱羧酶的酶活普遍不高。此外,在重组菌培养的过程中需要添加抗生素筛选重组子和维

持重组质粒的稳定性,无疑增加了生产成本和下游产物分离纯化难度,难以实现工业的要求。

本研究从实验室前期构建的无抗生素基因多拷贝表达载体和 D-丙氨酸消旋酶(*dal*)缺陷型枯草芽孢杆菌^[12]出发,将密码子优化前后的 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 谷氨酸脱羧酶基因与无抗生素抗性多拷贝表达载体相连,然后将重组质粒转入两种丙氨酸缺陷型的枯草芽孢杆菌感受态细胞中,构建了 4 株无抗标记的重组枯草芽孢杆菌,首次实现了谷氨酸脱羧酶基因在枯草芽孢杆菌中的无抗高效表达。通过筛选发酵酶活最高的重组菌株,并对初始发酵培养基成分进行调整,重组枯草芽孢杆菌在调整后的发酵培养基中发酵,发酵酶活最高可达 7.4 U/mL,远远高于之前的有关报道,具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株和质粒 本研究用到的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂、培养基和培养条件 GABA、谷氨酸标品:美国 Sigma 公司;OPA 衍生化试剂、硼酸盐缓冲液(pH 10.0):美国 Agilent 公司;引物合成、DNA 测序、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒:上海生工生物工程公司;DNA Mark、PrimeSTAR 酶、标准相对分子质量蛋白质 Mark:Takara 公司;丙烯酰胺、甲叉

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒	特征	来源
枯草芽孢杆菌		
1A751(<i>dal</i> ⁻)	D-丙氨酸缺陷型	作者所在实验室保藏
1A751/pUB-P43-gadB(<i>ori</i>)- <i>dal</i>	含有重组质粒 pUB-P43-gadB(<i>ori</i>)- <i>dal</i>	本研究构建
1A751/pUB-P43-gadB(<i>opt</i>)- <i>dal</i>	含有重组质粒 pUB-P43-gadB(<i>opt</i>)- <i>dal</i>	本研究构建
WB600(<i>dal</i> ⁻)	D-丙氨酸缺陷型	作者所在实验室保藏
WB600/pUB-P43-gadB(<i>ori</i>)- <i>dal</i>	含有重组质粒 pUB-P43-gadB(<i>ori</i>)- <i>dal</i>	本研究构建
WB600/pUB-P43-gadB(<i>opt</i>)- <i>dal</i>	含有重组质粒 pUB-P43-gadB(<i>opt</i>)- <i>dal</i>	本研究构建
质粒		
pET-22b-gadB(<i>ori</i>)	氨苄抗性,含有 <i>gadB</i> (<i>ori</i>)序列,6 × histidine-tag	作者所在实验室保藏
pET-22b-gadB(<i>opt</i>)	氨苄抗性,含有 <i>gadB</i> (<i>opt</i>)序列,6 × histidine-tag	上海生工合成
pUB-P43-DPE- <i>dal</i>	枯草表达质粒;表达 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶;抗性基因被 D-丙氨酸消旋酶基因代替	作者所在实验室保藏

双丙烯酰胺;Bio-Rad 产品;其它试剂;购自国药集团。

液体 LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10;pH 7.0。

固体 LB 培养基: 液体 LB 培养基中加入 2.0 g/dL 的琼脂粉。

原始发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,大豆蛋白胨20, $K_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 0.3;pH 7.0。菌株 *B.subtilis* WB600 (*dal*⁻)、*B.subtilis* 1A751 (*dal*⁻)培养时需在培养基中加入终质量浓度为 200 μ g/mL D-丙氨酸。摇瓶发酵过程中发酵培养基的装液体积分数为 20%,接种体积分数为 1%,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的条件下培养。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪、高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;Agilent 1200 高效液相色谱

谱仪;美国 Agilent 公司产品;凝胶成像分析系统、垂直电泳仪;上海天能公司产品;恒温振荡培养箱:上海精宏公司产品;紫外-可见分光光度计:上海 UNICO 仪器公司产品;超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 在 NCBI 数据库查找来源于 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 的 *gadB* 基因序列 (GeneBank NO:1114939),根据枯草芽孢杆菌的密码子偏好性委托上海捷瑞生物工程公司对 *GAD* 基因做密码子优化。本实验所用到的引物由上海生工合成,引物序列见表 2。

分别以 pET-22b-*gadB* (ori)、pET-22b-*gadB*

表 2 引物列表

Table 2 List of primers

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段
P1	TTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGTTATACGGAAGAAAATCGCG	<i>gadB</i> (ori)
P2	CGTCTGTACGTTCTTAAGGAATTCCTTTCTGGGCTTTGTTAGCAGCCGGA	
P3	TTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGTTGTATGGCAAAGAAAATAGAG	<i>gadB</i> (opt)
P4	CGTCTGTACGTTCTTAAGGAATTCCTTTCTGGGCTTTGTTAGCAGCCGGA	
P5	TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAATTCCTTAAGGAACGTACAGACG	pUB-P43- <i>dal</i> (ori)
P6	CGCGATTTTCTTTTCCGTATAACATGTGTACATTCTCTCTTACCTATAA	
P7	TCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAATTCCTTAAGGAACGTACAGACG	pUB-P43- <i>dal</i> (opt)
P8	CTCTATTTTCTTTGCCATACAACATGTGTACATTCTCTCTTACCTATAA	

(opt) 为模板,P1/P2、P3/P4 为引物,PCR 扩增分别得到 *gadB*(ori)、*gadB*(opt) 基因片段。扩增条件为:98 $^{\circ}$ C变性 10 s,55 $^{\circ}$ C退火 5 s,72 $^{\circ}$ C延伸 30 s,30 个循环。以pUB-P43-DPE-*dal* 为模板,以 P5/P6、P7/P8 为引物,PCR 分别扩增出对应于 *gadB* (ori)、*gadB* (opt)基因的 PUB-P43-*dal* (ori)、PUB-P43-*dal* (opt)表达载体片段,扩增条件为:98 $^{\circ}$ C变性 10 s,55 $^{\circ}$ C退火 5 s,72 $^{\circ}$ C延伸 1 min 20 s,30 个循环。对 4 种 PCR 产物胶回收,然后参照文献[14]的方法用重叠延伸 PCR 扩增得到两种 PCR 多聚物,重叠延伸 PCR 条件为:98 $^{\circ}$ C变性 10 s,60 $^{\circ}$ C退火 5 s,72 $^{\circ}$ C延伸 1 min 45 s,30 个循环。将两种 PCR 多聚物分别转入枯草芽孢杆菌感受态细胞中,PCR 多聚物在枯草芽孢杆菌内源酶系统下进行重组得到重组表达质粒 pUB-P43-*gadB*(ori)-*dal*、pUB-P43-*gadB*(opt)-*dal*。

1.2.2 重组枯草芽孢杆菌的构建 采用两步(GM I、GM II)法^[15]制作 *B.subtilis* WB600 (*dal*⁻)、*B.subtilis*

1A751 (*dal*⁻)感受态细胞,然后将两种 PCR 多聚物分别转入 *B.subtilis* WB600 (*dal*⁻)、*B.subtilis* 1A751 (*dal*⁻)感受态细胞中,在不添加 D-丙氨酸的固体 LB 平板上分别筛选得到 4 种重组菌 *B.subtilis* WB600/ pUB-P43-*gadB* (ori)-*dal*、*B.subtilis* WB600/ pUB-P43-*gadB*(opt)-*dal*、*B.subtilis* 1A751/ pUB-P43-*gadB* (ori)-*dal*、*B.subtilis* 1A751/ pUB-P43-*gadB*(opt)-*dal*。

1.2.3 目的蛋白质的纯化及 SDS-PAGE 检测 目的基因在设计引物的时候添加了 6 个组氨酸标签,重组蛋白质可以通过镍柱纯化出来。重组菌超声破碎前先用终质量浓度为 50 mg/mL 溶菌酶在 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,具体纯化步骤参照文献[16]描述的方法进行。利用粗酶液和纯化后的酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,经考马斯亮蓝染色,脱色液脱色后在凝胶成像系统分析。

1.2.4 菌悬液的制备 将发酵液在 4 $^{\circ}$ C 于 8 000 r/min 离心 10 min,弃清液,得到湿菌体。用 0.1 mol/L、pH 4.5

的醋酸盐缓冲液洗涤菌体两次,按照相同发酵液体积加入 0.1 mol/L、pH 4.5 的醋酸盐缓冲液,反复吹打均匀制得菌悬液。

1.2.5 谷氨酸脱羧酶发酵酶活测定 1 mL 转化反应体系中含有 800 μ L 浓度为 0.1 mol/L 的谷氨酸钠(溶解在 0.1 mol/L 的醋酸钠缓冲溶液中,pH 4.5)、200 μ L 菌悬液。转化体系在 50 $^{\circ}$ C 的恒温水浴锅中反应 10 min 后立即放入沸水中煮沸 5 min,终止其反应。转化体系经过灭酶后于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,通过高效液相色谱计算转化液中 GABA 含量。

酶活力单位定义:反应液中,每分钟催化底物生产 1 μ mol GABA 所需要酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6 高效液相色谱检测 GABA 的检测采用 OPA 在线衍生的方法:取灭酶后的转化液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,上清液用 5 g/dL TCA 稀释适当倍数后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,取离心后的上清液过 0.45 μ m 的滤膜,通过安捷伦 1200 高效液相色谱仪检测转化液的 GABA 浓度。色谱条件参照文献[17]的方法设定:色谱柱为 Hypersil ODS 分析柱(Agilent,4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);流动相 A (4.5 g/L 醋酸钠,200 μ L/L 三乙胺,5 mL/L 四氢呋喃,pH 7.2)、流动相 B (22.6 g/L 醋酸钠,pH 7.2,甲醇:乙腈以体积比 1:2 混合);流速 1 mL/min;进样体积 1 μ L;柱温 40 $^{\circ}$ C;DAD 紫外检测器,检测波长 338 nm。

1.2.7 菌体生物量的测定 利用紫外-可见分光光度计检测经适当稀释的菌液在 600 nm 波长处的吸光度值,即 OD₆₀₀。

1.2.8 碳源对重组菌的生长和发酵酶活的影响 在原始发酵培养基其他成分不变的情况下研究不同碳源对生物量和发酵酶活的影响,确定最佳碳源后研究最佳碳源的质量浓度对重组菌生物量和发酵酶活的影响。

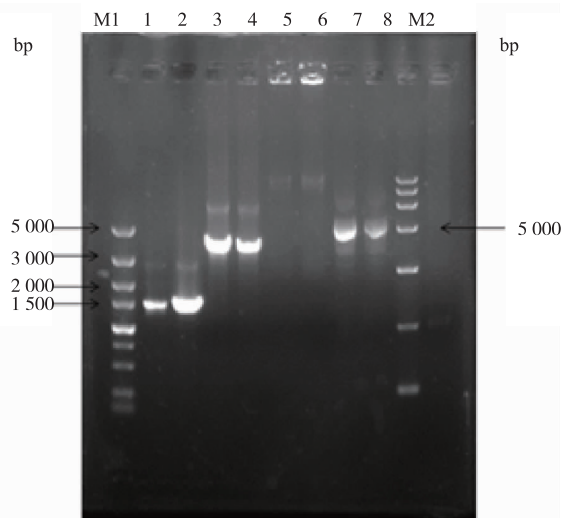
1.2.9 氮源对重组菌生长和发酵酶活的影响 在优化好碳源的基础上研究不同氮源对生物量和发酵酶活的影响,确定最佳氮源后研究最佳氮源的质量浓度对重组菌生物量和发酵酶活的影响。

1.2.10 无机盐对重组菌生长和发酵酶活的影响 在优化好碳氮源的基础上分别添加终质量浓度为 100 mg/L 的 MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·FeCl₃·6H₂O、MnSO₄·H₂O、ZnSO₄·7H₂O,研究不同种类的无机盐对重组菌生物量和发酵酶活的影响。

2 结果与分析

2.1 4 种重组枯草芽孢杆菌的构建

PCR 扩增出的片段经琼脂糖电泳检测,结果见图 1。密码子优化前后 *gadB* 基因片段大小为 1 401 bp、无抗表达载体 pUB-P43-dal(抗性基因被 D-丙氨酸消旋酶基因代替^[13])片段大小为 3 847 bp、密码子优化前后的 *gadB* 基因与无抗表达载体通过重叠延伸 PCR 形成的 PCR 多聚物(相对分子质量很大,在泳道里)。将两种多聚物分别转入两种丙氨酸缺陷型枯草芽孢杆菌 WB600、1A751 中,多聚物在枯草杆菌细胞中重组形成重组质粒 pUB-P43-*gadB* (ori)-dal、pUB-P43-*gadB*(opt)-dal,大小为 5 247 bp,得到 4 株重组菌 *B.subtilis* WB600/pUB-P43-*gadB* (ori)-dal、*B.subtilis* WB600/pUB-P43-*gadB* (opt)-dal、*B.subtilis* 1A751/pUB-P43-*gadB* (ori)-dal、*B.subtilis* 1A751/pUB-P43-*gadB*(opt)-dal。由于重组质粒上含有 D-丙氨酸消旋酶基因,含有重组质粒的 D-丙氨酸缺陷型枯草芽孢杆菌可以在不加 D-丙氨酸的培养基上生长,以此筛选出重组子。



M1:5 000 DNA Marker;M2:15 000 DNA Marker;1,2:分别为 *gadB*(ori)、*gadB*(opt) 片段;3,4:分别为 PUB-P43-dal(ori)、PUB-P43-dal(opt) 表达载体片段;5,6:分别为对应 *gadB*(ori)、*gadB*(opt) 基因的多聚体片段;7,8:分别为重组质粒 pUB-P43-*gadB*(ori)-dal、pUB-P43-*gadB*(opt)-dal。

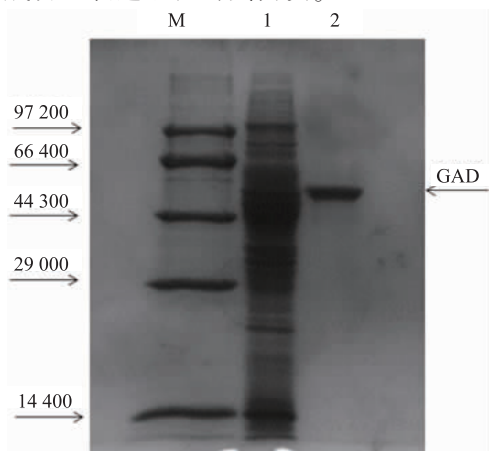
图 1 基因片段 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of different genes

2.2 SDS-PAGE 分析

重组菌 *B.subtilis* 1A751/pUB-P43-*gadB*(ori)-dal 在原始发酵培养基中培养 30 h 后离心,收集湿

菌体,经超声破碎、离心后,得到上清液即为粗酶,上清液经镍柱纯化后得到纯化后的 GAD。粗酶和纯酶经 SDS-PAGE 检测见图 2,大约在 54 000 处有明显的蛋白质条带,与张天萌等^[18]报道的一致,表明重组菌成功地表达了目的蛋白质。



M: 标准相对分子质量蛋白质 Marker; 1: 粗酶; 2: 纯酶。

图 2 谷氨酸脱羧酶的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of GAD

2.3 4 种重组菌在原始发酵培养基中的发酵情况比较

从 LB 平板上挑单菌落接种到 LB 液体培养基中,培养 12 h 后按 1% 的接种体积分数接种到原始发酵培养基中,隔一定时间取样测发酵液的 OD_{600} 和发酵酶活,得到 4 株重组菌的生长曲线和产酶曲线,见图 3~4。由图 3 可知,4 株重组菌的生长量相差不大,重组菌 *B.subtilis* WB600/pUB-P43-gadB (ori)-dal、*B.subtilis* WB600/pUB-P43-gadB (opt)-dal 的生物量略高于 *B.subtilis* 1A751/pUB-P43-gadB (ori)-dal、*B.subtilis* 1A751/pUB-P43-gadB (opt)-dal。4 株重组菌的发酵酶活相差较大,说明 GAD 的发酵酶活不仅跟宿主的类型有关,还跟目的基因密码子

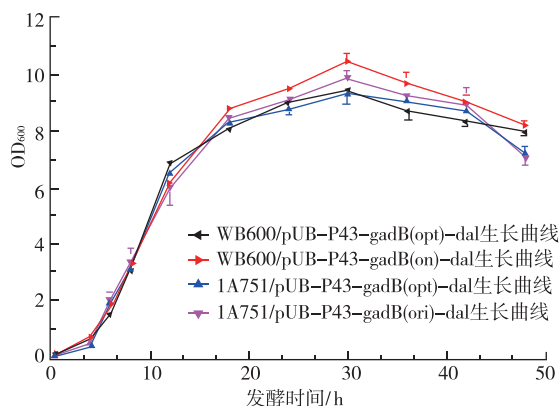


图 3 4 株重组菌的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of four recombinant strains

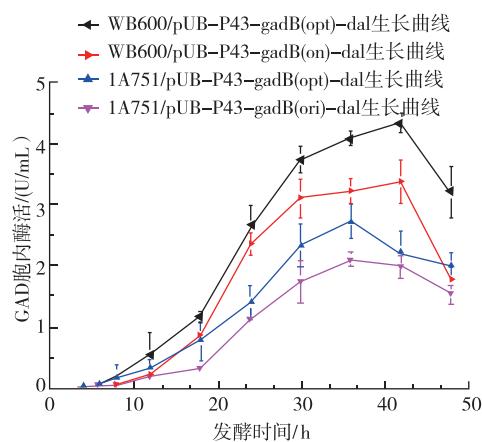


图 4 4 株重组菌的发酵酶活曲线

Fig. 4 GAD production curves of four recombinant strains

优化情况有关。对于同种类型的宿主,GAD 基因通过密码子优化后重组菌的发酵酶活都得到了较大幅度的提升,对于同种类型的重组质粒,谷氨酸脱羧酶在宿主 *B.subtilis* WB600 中表达比在宿主 *B.subtilis* 1A751 中表达更加高效。原因可能是 *B.subtilis* WB600 与 *B.subtilis* 1A751 相比,其敲除的蛋白质基因更多,可能会促使宿主将更多的能量用于表达外源基因。最后选取酶活最高的 *B.subtilis* WB600/pUB-P43-gadB (opt)-dal 做后续优化研究。

2.4 碳源对重组菌生长和发酵酶活的影响

在原始发酵培养基的其他成分不变的情况下,分别以 10.0 g/L 的葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、玉米糊精、可溶性淀粉作为碳源,在 37 °C、200 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 42 h 后,取样测定不同碳源对发酵酶活和生物量的影响,见图 5。由图 5 可

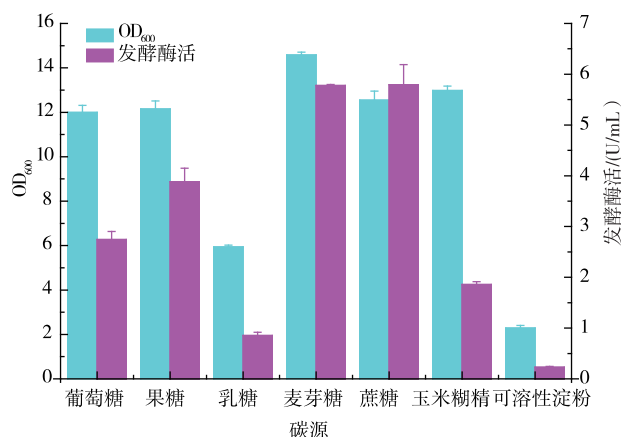


图 5 不同碳源对发酵酶活和生物量的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on GAD production and biomass

知,重组菌对麦芽糖的利用效果最好, OD_{600} 达到 8.69,以蔗糖做为碳源,重组菌的发酵酶活最高,可达 5.79 U/mL。以蔗糖做为碳源,选取质量浓度 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 g/L 的蔗糖,研究不同蔗糖质量浓度对重组菌发酵酶活和生物量的影响,见图 6。结果表明,重组菌的生物量随蔗糖质量浓度的增加会有小幅度的提升。当蔗糖的质量浓度为 10.0 g/L 时,重组菌的发酵酶活最大,达到 4.0 U/mL。蔗糖质量浓度超过 10.0 g/L 时,重组菌的发酵酶活会逐渐降低。

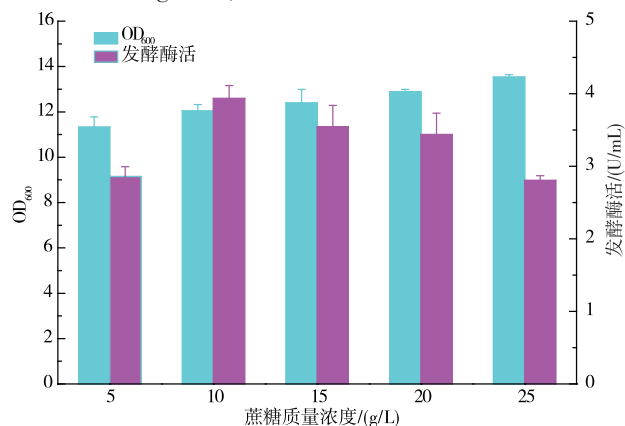


图 6 蔗糖添加量对发酵酶活和生物量的影响

Fig. 6 Effect of sucrose concentration on GAD production and biomass

2.5 氮源对重组菌生长和发酵酶活的影响

以 10.0 g/L 的蔗糖作为碳源,分别以 20.0 g/L 的胰蛋白胨、鱼粉蛋白胨、酵母膏、大豆蛋白胨、牛肉膏作为氮源,在 37 ℃,200 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 42 h 后离心收集菌体,测定不同氮源对发酵酶活和生物量的影响,见图 7。结果表明,重组菌对酵母膏的利用效果最好, OD_{600} 可达到 13.8,以大

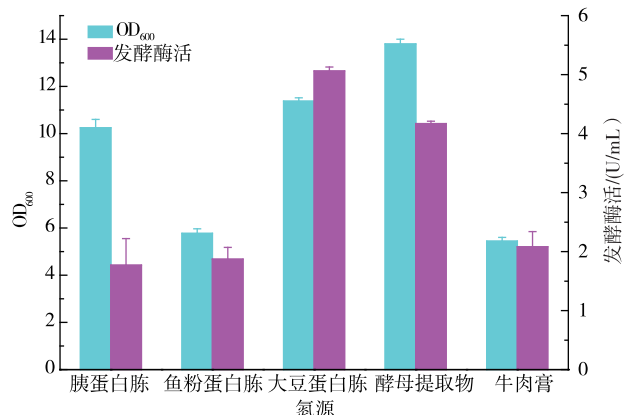


图 7 不同氮源对发酵酶活和生物量的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen source on GAD production and biomass

豆蛋白胨做为氮源时重组菌产酶最多,发酵酶活可达 5.06 U/mL。以大豆蛋白胨作为氮源,选取质量浓度 10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35 g/L 的大豆蛋白胨,研究不同大豆蛋白胨浓度对发酵酶活和菌体浓度的影响,见图 8。结果表明,当大豆蛋白胨质量的质量浓度为 30.0 g/L 时,重组菌的发酵酶活最高,达到 7.02 U/mL。

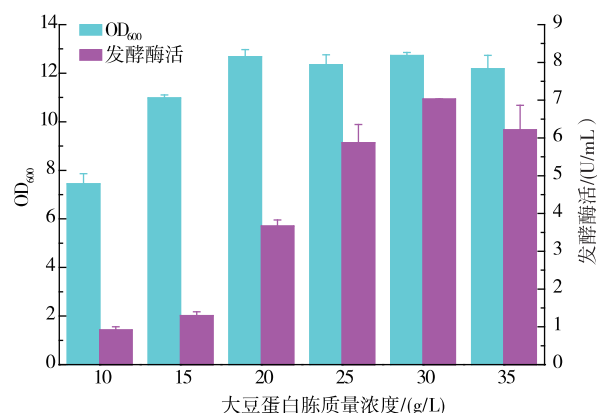


图 8 大豆蛋白胨质量浓度对发酵酶活和生物量的影响

Fig. 8 Effect of soy peptone concentration on GAD production and biomass

2.6 无机盐对重组菌生长和发酵酶活的影响

无机盐对重组菌的生长繁殖与外源蛋白质的表达也有很大的联系。在优化好的碳氮源的基础上,分别添加终质量浓度为 100 mg/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,在 37 ℃,200 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 42 h 后离心收集菌体,测定 5 种无机盐对发酵酶活和生物量的影响,见图 9。对照组不加无机盐,其他条件

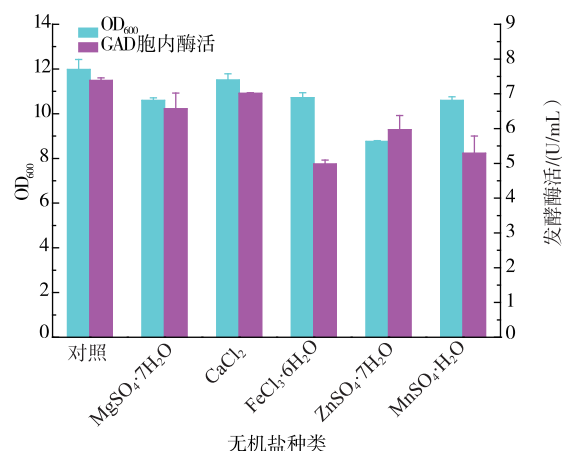


图 9 无机盐种类对发酵酶活和生物量的影响

Fig. 9 Effect of inorganic salt on GAD production and biomass

保持一样。结果发现对照组的 OD_{600} 达到 11.98, 酶活达到 7.4 U/mL, 与对照组相比, 无机盐的添加使重组菌的生物量和发酵酶都有一定程度的降低。

3 结 语

根据枯草芽孢杆菌密码子偏好性优化了来源于 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 的谷氨酸脱羧酶基因, 将优化前后的目的基因与无抗表达载体相连, 分别转入 D-丙氨酸缺陷型的 *B.subtilis* WB600(*dal*⁻)、*B.subtilis* 1A751(*dal*⁻)感受态细胞中, 得到 4 种无抗标记的重组枯草芽孢杆菌, 通过测定 4 株重组枯草芽孢杆菌进行生长曲线和发酵酶活曲

线, 发现重组枯草芽孢杆菌中的发酵酶活不仅与目的基因密码子优化情况有关, 还有宿主类型有关, 目的基因经过密码子优化后在同一类型的宿主中的表达效率要大大高于优化前, 同一基因在 *B.subtilis* WB600 中的表达效率要高于 *B.subtilis* 1A751。选择产酶效率最高的重组菌 *B.subtilis* WB600/ pUB-P43-gadB(opt)-*dal*, 并调整了初始发酵培养基的成分, 最终重组菌的发酵酶活可达 7.4 U/mL, 大大高于已报道谷氨酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中表达的最高酶活, 具有很大的工业化全细胞生产食品级 γ -氨基丁酸的潜力, 有望解决在微生物法生产 γ -氨基丁酸的工艺中大肠杆菌安全性的问题以及乳酸菌成本过高、产量低的问题。

参考文献:

- [1] WONG C G, BOTTIGLIERI T. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease[J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(Supplement S6): S3-S12.
- [2] STANTON H C. Mode of action of gamma amino butyric acid on the cardiovascular system[J]. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 1963, 143(143): 195-204.
- [3] HAGIWARA H, SEKI T, ARIGA T. The effect of pre-germinated brown rice intake on blood glucose and PAI-1 levels in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2004, 68(2): 444-447.
- [4] OKADA T, SUGISHITA T, MURAKAMI T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2000, 47(8): 596-603.
- [5] HAYAKAWA K, KIMURA M, KASAHARA K, et al. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. *British Journal of Nutrition*, 2004, 92(3): 411-417.
- [6] KAWASAKI N, NAKAYAMA A, YAMANO N, et al. Synthesis, thermal and mechanical properties and biodegradation of branched polyamide 4[J]. *Polymer*, 2005, 46(23): 9987-9993.
- [7] SHI X, CHANG C, MA S, et al. Efficient bioconversion of L-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(4-5): 697-704.
- [8] ZHANG C, LU J, CHEN L, et al. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid by a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing the glutamate decarboxylase gene derived from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Y2[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1851-1857.
- [9] JIA Min, MU Wanmeng, ZHANG Tao, et al. Expression of D-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(11): 1129-1135. (in Chinese)
- [10] MO Zhengjie, FENG Fengqin, YE Hui. Construction of a recombinant *Bacillus subtilis* WB600/pMA5-lapgad and its application in the synthesis of γ -aminobutyric acid[J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(09): 26-31. (in Chinese)
- [11] DING Wei, ZHANG Mingli, SHI Jiping, et al. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* expressing glutamate decarboxylase and the optimization of fermentation conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(23): 194-198. (in Chinese)
- [12] PARK K B, OH S H. Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*[J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(18): 1459-1463.
- [13] HE W, MU W, JIANG B, et al. Construction of a food grade recombinant *Bacillus subtilis* based on replicative plasmids with an auxotrophic marker for biotransformation of D-fructose to D-allulose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(16): 3243-3250.

- [14] YOU C,ZHANG X Z,ZHANG Y H. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2012,78(5):1593-1595.
- [15] JULKOWSKA D,OBUCHOWSKI M,HOLLAND I B,et al. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium[J]. **Journal of Bacteriology**,2005,187(1):65-76.
- [16] LIU Q,YU S H,ZHANG T,et al. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii* [J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,157:1732-1740.
- [17] SU L,HUANG Y,WU J. Enhanced production of recombinant *Escherichia coli* glutamate decarboxylase through optimization of induction strategy and addition of pyridoxine[J]. **Bioresource Technology**,2015,198:63-69.
- [18] ZHANG Tianmeng,MU Wanmeng,JIANG Bo,et al. Cloning,expression,purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis subsp.lactis* IL1403.[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(3):84-88. (in Chinese).

会 议 消 息

会议名称:中国化学会第四届全国高分子结晶理论、应用及表征技术研讨会

会议时间:2020 年 4 月 24-26 日

会议地点:浙江省杭州市

主 办 方:中国化学会高分子学科委员会

共同主办:浙江大学

承 办 方:浙江大学化学工程与生物工程学院

会议主题:邀请国内高分子物理、高分子加工等领域的专家学者,对高分子结晶理论、应用及表征技术等方面的前沿问题进行深入研讨,会议包括口头报告和墙报两部分。

大会主席:胡文兵、李良彬、门永锋

预计规模:150

会议网站:<http://www.chemsoc.org.cn/meeting/2020PCCT/>

联 系 人:岳冲冲

电子邮箱:yuechongchong@zju.edu.cn

电 话:17826855901

会议内容:1. 高分子结晶的计算机模拟及新方法;2. 高分子结晶的新现象理论;3. 功能高分子的结晶行为;4. 天然和生物可降解高分子的结晶行为;5. 加工过程的高分子结晶行为;6. 高分子结晶与产业的关联。