

谷氨酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中的表达及应用

邱玲, 陈晟*, 吴敬, 黄燕

(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: 为了研究在枯草芽孢杆菌发酵过程中添加相对廉价的辅酶前体对谷氨酸脱羧酶(GAD)酶活力和催化效率的影响,将来源于 *Escherichia coli* 的谷氨酸脱羧酶基因 *gadB*,通过构建重组质粒 pHY300PLK-*gadB*,在枯草芽孢杆菌中重组表达,得到重组菌 *B. subtilis*/pHY300PLK-*gadB*。研究了分别在重组菌发酵过程中添加辅酶磷酸吡哆醛(PLP)、辅酶前体吡哆醛(PL)和吡哆醇(PN)对 GAD 酶活力的影响。当设置摇床转速 200 r/min,发酵温度 33 °C,发酵培养基初始 pH 7.0 时,在发酵过程中分别添加 PLP、PL、PN 至终浓度 0.5 mmol/L,诱导 48 h 后发酵液中总酶活分别达到 25.40、28.14、15.55 U/mL,是对照总酶活的 1.55、1.72、0.95 倍。基于以上结果,进一步研究了发酵过程中 PL 的添加浓度对重组菌生长情况及 GAD 表达的影响。结果表明,发酵液中 GAD 总酶活随着 PL 浓度的增加而增加,当 PL 浓度为 0.1 mmol/L 时,总酶活最高达到 28.28 U/mL。利用重组菌全细胞制备 γ -氨基丁酸(GABA),结果表明,最适转化 pH 为 5.0,最适转化温度为 40 °C,发酵过程中添加 PL 的重组菌(简称“GAD-PL”)和发酵过程中不添加任何辅酶及辅酶前体的重组菌(简称“GAD-0”)的最适加菌量(以酶活力单位计)分别是 40 U/g(以谷氨酸计)和 50 U/g(以谷氨酸计),当谷氨酸最终质量浓度达到 400 g/L 时,得到的 GABA 质量浓度分别为 275.60 g/L 和 273.61 g/L。

关键词: 谷氨酸脱羧酶;枯草芽孢杆菌;重组表达; γ -氨基丁酸

中图分类号:TS 202.3 文章编号:1673-1689(2021)06-0032-10 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.06.005

Expression and Applications of Glutamic Acid Decarboxylase in *Bacillus subtilis*

QIU Ling, CHEN Sheng*, WU Jing, HUANG Yan

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

Abstract: The effects of the addition of relatively inexpensive coenzyme precursors on glutamate decarboxylase (GAD) enzyme activity and catalytic efficiency during the fermentation were studied. The recombinant strain *B. subtilis*/pHY300PLK-*gadB* which contained the *gadB* gene deriving from *Escherichia coli* was constructed. The effects of coenzyme pyridoxal phosphate (PLP), coenzyme precursors pyridoxal(PL) and pyridoxine(PN) on the production of GAD were studied. The rotating speed of shaking flask was 200 r/min. The fermentation temperature was 33 °C. The initial pH of fermentation medium was 7.0, while PLP, PL and PN were added to the final concentration of 0.5 mmol/L. The enzyme activity reached 25.40, 28.14 and 15.55 U/mL after 48 h induction, respectively. Compared with the control group, the enzyme activity was increased by 1.55, 1.72 and

收稿日期: 2019-12-30

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31425020);江苏省重点研发计划项目(BE2017319)。

* 通信作者: 陈 晟(1981—),女,博士,教授,硕士研究生导师,从事基因工程、蛋白质工程研究。E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

0.95 times. Based on the above results, the effects of PL concentration on the growth of recombinant bacteria and the expression of GAD protein were further studied. The results showed that the production of GAD in the fermentation broth increased with the increase of PL concentration. When PL concentration was 0.1 mmol/L, the maximum activity of GAD was 28.28 U/mL. The preparation of γ -aminobutyric acid(GABA) by whole cells of recombinant bacteria showed that the optimum pH was 5.0, the optimum temperature was 40 °C, and the optimum amounts of the recombinant bacteria with PL (GAD-PL) and the recombinant bacteria without coenzyme precursor (GAD-0) were 40 U/g (in glutamic acid) and 50 U/g (in glutamic acid), respectively. With the concentration of 400 g/L glutamic acid, the GABA yield reached 275.60 g/L and 273.61 g/L, respectively.

Keywords: glutamic acid decarboxylase, *Bacillus subtilis*, recombinant expression, γ -aminobutyric acid

γ -氨基丁酸(GABA)是一种四碳非蛋白质氨基酸,是由谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)不可逆、专一地将L-谷氨酸的 α -羧基脱去一分子CO₂得到,是高度溶于水的两性离子,pK值为4.03和10.56^[1],因此表现出与该类氨基酸类似的生理活性,即作为一种抑制性神经递质存在于哺乳动物的中枢神经系统中^[2-3]。目前广泛应用于工业、动物饲料、医药和食品行业^[4-5]。

大量研究表明,GABA有促进睡眠、增强记忆力、抗焦虑、预防和治疗癫痫、延缓脑衰老、舒缓血管、调节激素分泌、提高受精率、解除氨毒、增强肝功能等作用^[6-11]。

目前制备GABA的方法主要有植物富集法、化学合成法^[12-13]、微生物发酵法^[14-15]、酶催化法^[16]。植物富集法生产GABA虽然安全环保,但GABA浓度低,尚无法用作药物、食品添加剂;化学合成法生产GABA安全性较差、有化学残留,也不易达到医药及食品行业的标准;微生物发酵法得到的GABA是一个多相复杂体系,浓度低,下游产物分离成本高,是生产高纯度、高浓度GABA的一个瓶颈问题。所以,目前制备GABA多采用酶催化法,主要是利用微生物细胞内分离得到的谷氨酸脱羧酶或能够生产谷氨酸脱羧酶的微生物细胞专一、不可逆地脱去L-谷氨酸的 α -羧基,从而得到高浓度、高纯度的GABA。此方法的优点是反应条件温和、不需要昂贵的原料、能耗低,并且微生物来源的谷氨酸脱羧酶和能够生产谷氨酸脱羧酶的微生物细胞可通过简单的细胞培养大量获取^[17]。

目前大多研究以大肠杆菌为宿主表达GAD,催

化生产GABA。在重组菌发酵过程中添加一定浓度的辅酶磷酸吡哆醛(PLP)能够促进GAD的折叠,从而提高GAD酶活力^[18-19]。除此之外,酶催化法即利用GAD将谷氨酸脱去一分子CO₂制备GABA过程中,在酶转化体系中添加一定量的PLP可以促进酶液或全细胞的转化^[17]。有研究者^[16]报道了在大肠杆菌发酵过程中直接添加0.02 mmol/L PLP后,GABA产量是对照的2.0~2.5倍。但是PLP价格昂贵,在发酵过程和酶转化体系中直接添加无疑大大增加生产成本。由于大肠杆菌自身具备吡哆醛激酶(PdxK)基因和磷酸吡哆醇氧化酶(PdxH)基因,从而形成PLP补救途径(见图1)。辅酶前体吡哆醇(PN)、吡哆胺(PM)和吡哆醛(PL)上5'羟甲基通过PdxK使其磷酸化,生成对应的辅酶中间体磷酸吡哆醇(PNP)和磷酸吡哆胺(PMP)以及辅酶磷酸吡哆醛(PLP),PdxH进一步催化PNP或PMP的氧化反应,生成辅酶PLP^[20-25],辅酶PLP的增加可促进GAD的折叠,提高GAD酶活力。黄燕等^[18]研究了在大肠杆菌发酵过程中添加PN后,酶活是对照组(不添加PN)的1.8倍。

但是大肠杆菌为非食品安全菌株,在发酵过程中易产生内毒素,并且需要添加价格昂贵且有毒害作用的IPTG作为诱导剂诱导产酶,其生产得到的GAD安全性不高,距离满足食品和医药领域的要求还有一定差距。枯草芽孢杆菌是通过美国食品和药物管理局GARS认证的安全菌株,广泛应用在食品、医药生产中。然而在枯草芽孢杆菌中缺少PdxH,所以无法利用添加辅酶前体PN的方式,通过PLP补救途径将PN转化为PLP,从而提高GAD酶

活力^[27-29]。目前,大量的研究集中在以枯草芽孢杆菌为宿主生产 GAD,在酶转化过程中通过直接添加辅酶 PLP 提高转化效率,如丁伟等^[26]运用安全宿主枯草芽孢杆菌生产 GABA,在其转化过程中直接添加 PLP,全细胞催化 GABA 产量为 239.91 g/L,转化率 54.48%。由于 PLP 价格昂贵,导致生产成本较高,无法适应工业化生产需求。关于在枯草芽孢杆菌为宿

主生产 GAD 发酵过程中,添加价格低廉的辅酶前体以提高 GAD 酶活力的研究未见报道。因此作者以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为宿主,通过基因工程将大肠杆菌来源的谷氨酸脱羧酶基因(*gadB*)在 *B. subtilis* 中异源表达,添加相对廉价的辅酶前体 PL,通过 PdxK 介导的 PLP 补救途径将其转化生成 PLP(见图 2),从而提高酶活和产量,降低生产成本。

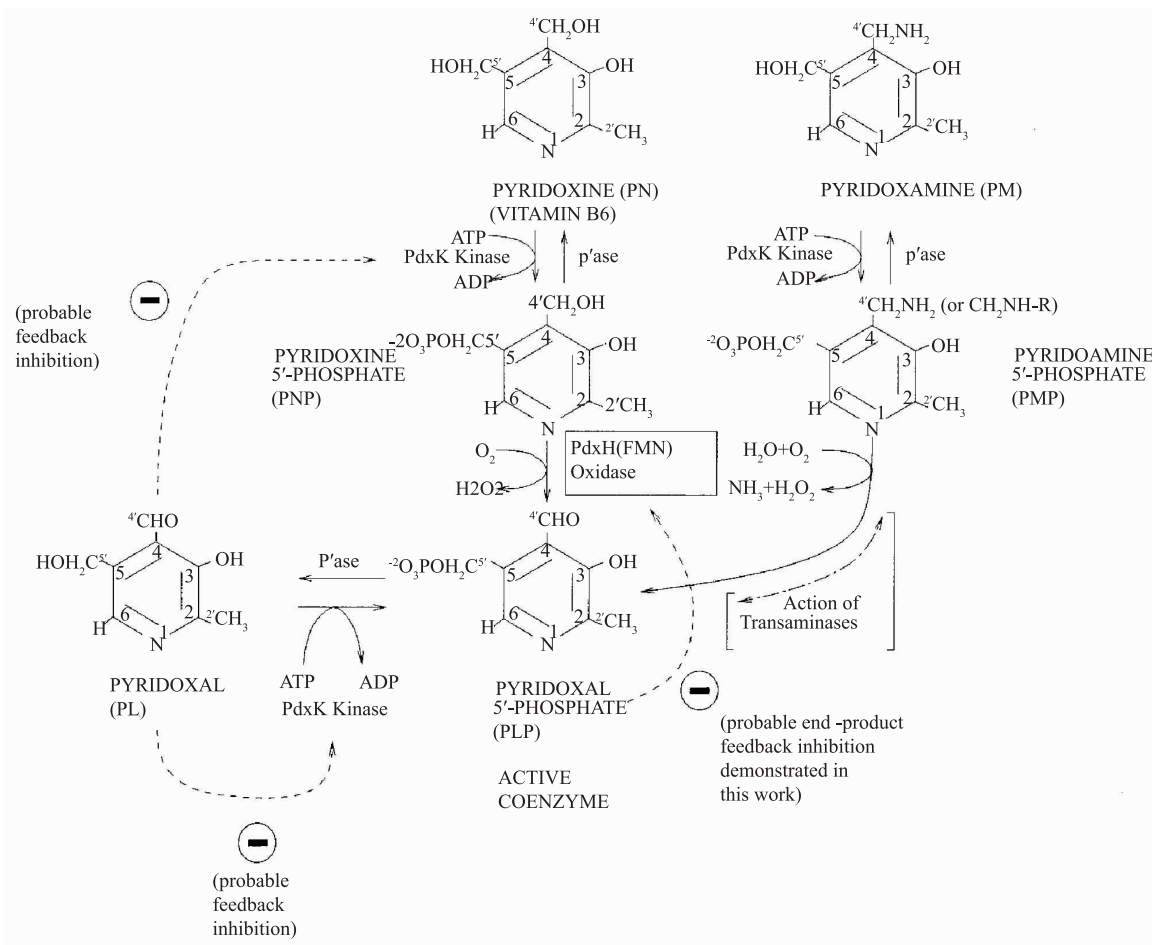


图 1 大肠杆菌中 PLP 的补救途径^[25]

Fig. 1 Salvage pathway of PLP in *E. coli*

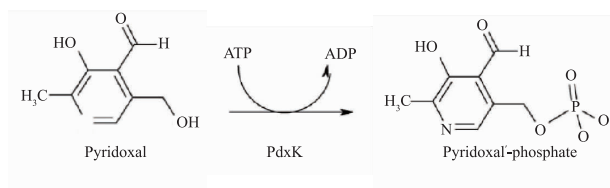


图 2 PdxK 激酶催化 PL 生成 PLP^[27]

Fig. 2 PdxK kinase catalyzes PL to PLP

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 *E. coli* JM109/pET-24a (+)-*gadB* 为作者所在实验室前期构建,菌株 *B. subtilis* 和表达载体 pHY300PLK (含启动子 $P_{Hpa II}$ 和 P_{amyQ} , 不含信号肽) 由作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基(g/L): 分别称取氯化钠 10 g、酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g, 溶于 1 L 去离

子水中,并通过添加 2 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.0。

LB 固体琼脂培养基:LB 液体培养基中添加质量浓度为 20 g/L 的琼脂粉。

高渗液体培养基:LB 液体培养基中添加 0.5 mol/L 山梨醇。

电转培养基:LB 液体培养基中分别添加 0.5 mol/L 山梨醇和甘露醇,质量浓度为 100 g/L 的葡萄糖。

RM 培养基:LB 液体培养基中添加 0.5 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 甘露醇。

TB 培养基(g/L):分别称取酵母粉 24 g、蛋白胨 12 g、甘油 5 g、三水磷酸氢二钾 16.43 g、磷酸二氢钾 2.31 g,溶于 1 L 去离子水中,并添加 2 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.0。

1.1.3 试剂 Quickcut *Hind* III 限制性内切酶:购自 TaKaRa 生物医药技术有限公司;2×phanta Max Master Mix、Exnase II 无缝连接试剂盒:购自诺唯赞(南京)生物科技有限公司;DL-10000DNA Marker、氨苄青霉素、四环素:购自宝生物有限公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒:购自天根生化科技(北京)有限公司;Unstained Protein MW Marker 标准蛋白品、蛋白胶制备试剂盒:购自碧云天生物技术有限公司;分子级的蛋白胨和酵母粉:购自英国 Oxiod 公司;其他常规试剂:购自国药化学试剂有限公司。

1.1.4 主要仪器 PCR 仪:购自美国 Bio-Rad 公司;722 型紫外可见分光光度计:购自上海仪电分析仪器有限公司;冷冻式离心机:购自 Beckman coulter 公司;KQ-250E 型超声波细胞粉碎机:购自宁波新芝生物科技股份有限公司;pH 计:购自瑞士 Mettler-Toledo 公司;高效液相色谱仪:购自安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 以质粒 pET-24a(+)-*gadB* 为模板,根据无缝克隆同源臂设计原则分别设计正、反向引物:

正向引物(F1):5'-GGAGTGTCAAGAATGGAC CAGAAGCTGTAAACGGA-3';反向引物(R1):5'-TTTATTACCAAGCTTTCAGGTGTGTTTAAAGCTGTC-3'。

以质粒载体 pHY300PLK 为模板,根据无缝克

隆同源臂设计原则分别设计正、反向引物:

正向引物(F2):5'-TCAAATAAGGAGTGTCAA GAATG-3';反向引物(R2):5'-GGTGTTTTTTTATT ACCAAGCTT-3'。

将设计好的引物送至苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.2 目的基因和表达载体的获取 以实验室保存的质粒 pET-24a(+)-*gadB* 为模板,F1/R1 为正反向引物扩增 *gadB* 目的基因;PCR 反应体系(50 μL):5×PS Buffer 10 μL、ddH₂O 34 μL、dNTP 4 μL、模板 DNA 0.5 μL,正、反向引物各 0.5 μL,Primer STAR Polymerase 0.5 μL。

PCR 程序:94 °C 预变性 5 min,98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 2 min,变性至延伸过程进行 29 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

以质粒载体 pHY300PLK 为模板,F2/R2 为正反向引物扩增表达载体;PCR 反应体系(50 μL):5×PS Buffer 10 μL、ddH₂O 34 μL、dNTP 4 μL、模板 DNA 0.5 μL,正、反向引物各 0.5 μL,Primer STAR Polymerase 0.5 μL。

PCR 程序:94 °C 预变性 5 min,98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 6 min,变性至延伸过程进行 29 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

目的基因和表达载体 PCR 条带通过琼脂糖核酸电泳进行验证。

1.2.3 目的基因和表达载体的连接与鉴定 将 1.2.2 已验证正确的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收。回收后的 PCR 产物用 Exnase II 连接酶连接,其连接体系如下:ddH₂O 5.3 μL、5×CE Buffer 2 μL、Exnase II 1 μL、表达载体 1.16 μL、目的基因 0.54 μL,置于 PCR 仪 37 °C 反应 30 min 完成连接。

采用大肠杆菌 JM109 热击转化法后,将转化细胞液涂布至含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,在 37 °C 恒温培养箱倒置培养 10~12 h,挑取单菌落至含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 10 mL LB 液体培养基中,置于恒温摇床 37 °C、200 r/min 培养 8~10 h 后收集菌体,并提取质粒以便验证和进行后续实验。将提取的质粒进行 *Hind* III 酶切验证正确后送往苏州金唯智生物科技有限公司测序。将测序正确的质粒通过电击转化法导入表达宿主 *B. subtilis* 中,将转化细胞液涂布至含 20 μg/mL 四

环素的 LB 固体培养基上,在 37 °C 恒温培养箱倒置培养 10~12 h,挑取单菌落至含 20 μg/mL 四环素的 10 mL LB 液体培养基中,置于恒温摇床 37 °C、200 r/min 培养 8~10 h 后收集菌体,并提取质粒进行酶切验证。

1.2.4 摇瓶发酵生产 GAD 及蛋白质检测 将-80 °C 保存的重组菌 *B. subtilis*/pHY300PLK-*gadB* 以体积分数 0.2% 接种至含 20 μg/mL 四环素的 LB 液体培养基中,恒温摇床 37 °C、200 r/min 扩大培养 8~10 h,再以体积分数 5% 转接至含 20 μg/mL 四环素的 TB 发酵培养基中,恒温摇床 37 °C、200 r/min 培养 2~3 h 后分别加入一定浓度的 PLP、PL、PN,于恒温摇床 33 °C、200 r/min 进行重组蛋白质的表达。发酵过程中在不同时间取样,测 OD₆₀₀。12 000 r/min 离心 1 min 得到菌体和发酵上清液。将菌体用 1 mL、50 mmol/L、pH 5.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液重悬,加入 0.6 mg/mL 溶菌酶,在 37 °C 反应 30 min 后置于冰水中超声破碎,12 000 r/min 离心 5 min 得到破壁上清液和破壁沉淀,使用 SDS-PAGE 检测其蛋白质。

1.2.5 重组 GAD 酶活测定 底物溶液配制:0.1 mol/L 一水谷氨酸钠和 0.15 mmol/L PLP 溶于 50 mmol/L、pH 4.5 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液中,置于 4 °C 避光保存。

反应体系:将装有 360 μL 底物溶液的 1.5 mL EP 管于 37 °C 水浴锅预热 10 min 后,加入 40 μL GAD 粗酶液,在 37 °C 下反应 4 min 后,加入 600 μL、0.2 mol/L、pH 10 的硼酸缓冲液终止反应,置于沸水中灭活 10 min。

GABA 生成量测定:采用 HPLC-OPA 氨基酸柱前衍生法检测 GABA 生成量^[30]。

酶活定义:在反应液中,1 min 催化底物转化生成 1 μmol GABA 所需的酶量为一个活力单位(U)。

本文中重组 GAD 均指重组菌所产的 GAD。

1.2.6 重组菌全细胞制备 GABA 工艺流程

1)GABA 的制备 用水配制质量浓度为 127 g/L 的一水谷氨酸钠底物(折算成 100 g/L 谷氨酸,以下均以折算后的谷氨酸质量浓度进行阐述)。在 150 mL 三角锥形瓶中加入 20 mL 底物,加入一定量的湿菌体(在 55 °C 水浴锅预处理 50 min,改善细胞膜的通透性),反应过程中,每隔 2 h 用 0.6 mol/L 的 H₂SO₄ 和 NaOH 调节 pH,使其始终与初始 pH 一致。在一

定温度、pH 下,150 r/min 水浴摇床中反应一段时间,终止反应后进行煮沸处理,12 000 r/min 离心 5 min 得上清液,适当稀释并过 0.22 μm 有机滤膜后用 HPLC-OPA 柱前衍生法进行检测。

2)GABA 生成量的测定 将过滤好的样品通过 HPLC 检测 GABA 生成量^[30-31]。HPLC 色谱条件如下:Agilent 1200 HPLC 色谱仪、Agilent 自动进样器、GL Inertsil ODS-3 液相柱、Agilent 紫外检测器。流动相 A:准确量取 995 mL 纯净水,加入 4.52 g 无水乙酸钠,搅拌使其充分溶解,再加入 5 mL 四氢呋喃和 0.2 mL 三乙胺,之后用冰乙酸调节 pH 至 7.20±0.05,充分混合后用 0.22 μm 无机纤维素滤膜过滤备用;流动相 B:准确量取 200 mL 纯净水,加入 4.52 g 无水乙酸钠,搅拌使其充分溶解,用冰乙酸调节 pH 至 7.20±0.05 后,再依次加入 400 mL 色谱纯的乙腈和甲醇,用冰乙酸调节 pH 至 7.20±0.05,混合后用 0.22 μm 有机尼龙滤膜过滤备用。梯度洗脱,流量为 0.8 mL/min,柱温为 40 °C。根据吸收峰面积和 GABA 标准品峰面积计算 GABA 生成量,计算公式如下:

$$Y = \frac{A}{T} \times 100\%$$

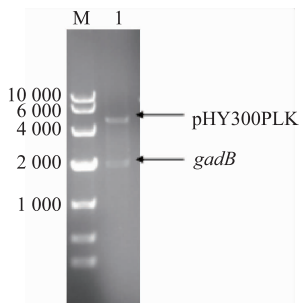
式中:Y 为 GABA 转化率,%;A 为谷氨酸转化生成 GABA 的实际质量浓度,g/L;T 为谷氨酸转化生成 GABA 的理论质量浓度,g/L。

2 结果与讨论

2.1 产谷氨酸脱羧酶重组菌的构建

以实验室保存的质粒 pET-24a (+)-*gadB* 为模板,扩增 *gadB* 目的片段,并以质粒载体 pHY300PLK 为模板,扩增表达载体片段。扩增得到的产物用琼脂糖凝胶电泳检测,目的基因片段 *gadB* 和质粒表达载体 pHY300PLK 长度约为 1 428 bp 和 5 731 bp,与理论碱基大小一致。验证正确后通过 Exnase II 连接酶将两个基因片段连接再转入 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布到 LB 固体培养基(含氨苄青霉素抗性)后挑取单菌落至 LB 液体培养基(含氨苄青霉素抗性)中过夜培养。提取质粒,酶切验证和测序成功后,将重组质粒用电击转化法导入表达宿主 *B. subtilis* 并涂布到 LB 固体培养基(含四环素抗性),之后挑取单菌落至 LB 液体培养基(含四环素抗性)中培养 8~10 h,提取质粒后进行酶切验证分

析。结果见图3,分别在5 130 bp和2 100 bp处有明显的条带,说明重组表达质粒pHY300PLK-gadB在*B. subtilis*中构建成功。



M: 10 000 bp DNA Marker; 1: 质粒双酶切后条带。

图3 酶切验证重组质粒pHY300PLK-gadB

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pHY300PLK-gadB

2.2 分别添加辅酶及辅酶前体对重组菌摇瓶发酵的影响

2.2.1 添加不同种类辅酶及辅酶前体对重组菌产酶情况的影响

重组菌按照1.2.4进行摇瓶发酵产酶,摇瓶发酵温度33℃,在重组菌发酵过程中分别添加辅酶PLP(简称GAD-PLP)、辅酶前体PL(简称GAD-PL)和PN(简称GAD-PN)至终浓度为0.5 mmol/L。发酵结束后12 000 r/min离心1 min获得菌体,用超声波细胞粉碎机进行细胞破碎,12 000 r/min离心5 min得到GAD粗酶液。结果见图4,诱导48 h后,酶活分别达到25.40、28.14 U/mL和15.55 U/mL,是对照GAD-0酶活(16.34 U/mL)的1.55、1.72和0.95倍。由此可知,添加0.5 mmol/L PN时,酶活相较于对照并无明显区别,这是因为枯草芽孢杆菌中缺少PdxH氧化酶,无法通过PLP补救途径将PN转化为PLP,从而提高GAD酶活力。其次随着诱导培养时间的延长,细胞内合成的少量PLP被自身吸收并消耗而无法满足GAD表达水平提高的需要。然而向培养基中添加适量的PLP或PL可以直接间接通过PLP补救途径合成PLP,从而提供能够维持GAD稳定的辅酶PLP,促进GAD的折叠,提高酶活^[9]。鉴于PLP成本高于PL,所以在发酵过程中选择添加PL进行后续实验。

2.2.2 不同吡哆醛浓度对重组菌产酶情况的影响

重组菌按照1.2.4进行摇瓶发酵,在过程中添加不同浓度的PL(0.01、0.03、0.05、0.07、0.1、0.2、0.3 mmol/L)发酵培养48 h后,12 000 r/min离心1 min获得菌

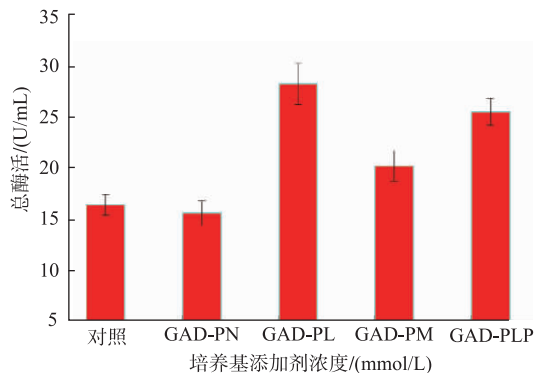


图4 不同培养基添加剂浓度对重组GAD表达的影响

Fig. 4 Effects of different medium additives on the production of the recombinant GAD

体,用超声波细胞破碎机进行细胞破碎,12 000 r/min离心5 min得到GAD粗酶液,结果见图5。随着PL浓度的增加,GAD酶活也随之提高,当PL浓度为0.1 mmol/L时,GAD酶活达到最高为28.28 U/mL。继续增加PL的浓度,酶活并未发生显著变化,故可知PL的最适添加浓度为0.1 mmol/L。图6为发酵过程中添加不同浓度PL后的重组GAD蛋白质电泳图,从图中可见在相对分子质量53 000的条带附近有一条清晰的蛋白质电泳条带,符合GAD理论蛋白质相对分子质量大小。

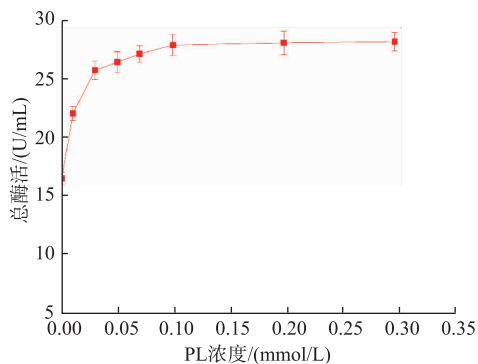
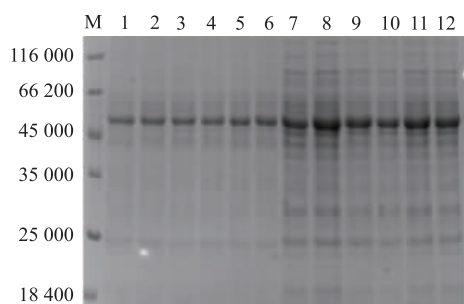


图5 不同PL浓度对重组GAD酶活的影响

Fig. 5 Effects of different concentration of PL on the enzyme activity of the recombinant GAD

2.2.3 添加吡哆醛前后重组菌发酵过程比较

重组菌按照1.2.4进行摇瓶发酵,在过程中添加0.1 mmol/L PL,探究其在不同发酵时间(0、12、24、36、48、60 h)对重组菌生长(见图7)和产GAD情况(见图8)的影响。与GAD-0相比,在发酵时间36 h



M: 标准相对分子质量蛋白质 Maker;1—6:GAD-PL 破壁上清液;7—12:GAD-PL 发酵上清液;PL 浓度分别为 0、0.01、0.03、0.05、0.1、0.2 mmol/L。

图 6 不同 PL 浓度对重组 GAD 表达的影响

Fig. 6 Effects of different concentration of PL on the production of the recombinant GAD

左右,PL 对菌体的生长有一定的促进作用,是因为在蛋白质表达过程中,通过 PLP 补救途径,PdxK 激酶将 PL 磷酸化形成 PLP^[24],促进 GAD 的折叠,一定程度上有利于菌体生长。随着发酵时间的延长,由于 PLP 稳定性差而失去作用,导致菌体的生长有所下降。由图 8 可知,与 GAD-0 相比,GAD-PL 酶活最高达到 28.28 U/mL,添加适量的 PL 可以提供给 GAD 未知浓度的 PLP,从而提高 GAD 酶活。

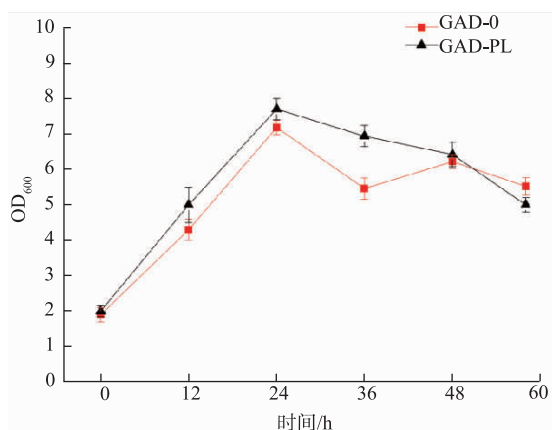


图 7 GAD-0 和 GAD-PL 在发酵培养基中的生长曲线

Fig. 7 Growth curve of GAD-0 and GAD-PL in fermentation medium

2.3 重组菌全细胞转化制备 GABA 的工艺优化

2.3.1 温度对重组菌全细胞转化生产 GABA 的影响 酶法制备 GABA 是一个不可逆反应,适宜的温度可以使 GABA 转化率达到最大,所以通过设置不同的酶转化温度来探究温度对 GABA 转化率的影响。以 100 g/L 的谷氨酸为底物,溶于去离子水中,加

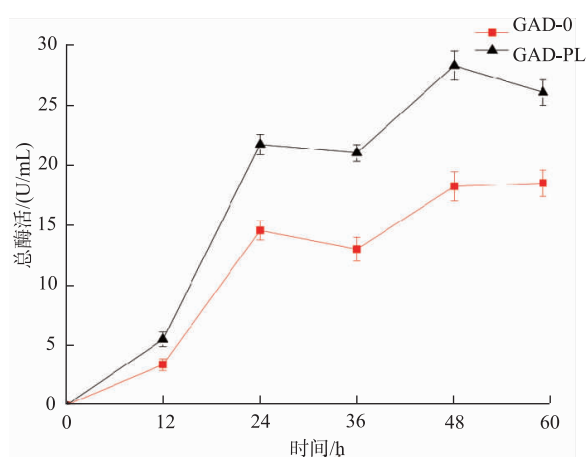


图 8 GAD-0 和 GAD-PL 在发酵培养基中的产酶曲线

Fig. 8 Production of GAD-0 and GAD-PL in fermentation medium

入湿菌体(在 55 °C 水浴锅预处理 50 min,改善细胞膜的通透性)30 U/g,在 150 r/min 的水浴摇床中进行转化,反应过程中,控制 pH 为 5.0。温度梯度设置为 25、30、35、40、45、50 °C,反应 24 h 后终止反应并进行煮沸处理,12 000 r/min 离心 5 min 得上清液,适当稀释并过 0.22 μm 有机滤膜后用 HPLC-OPA 柱前衍生法进行检测,结果见图 9。转化率随温度升高逐渐提高,当转化温度达到 40 °C 时,GAD-0 和 GAD-PL 转化率达到最高,分别为 64.78% 和 82.27%,继续升高温度,转化率反而降低。这是因为枯草芽孢杆菌细胞壁厚,而反应温度过低时,底物与胞内酶无法充分接触使得转化率低;当反应温度过高时,酶与 PLP 稳定性差,从而影响 GABA 的转化率。

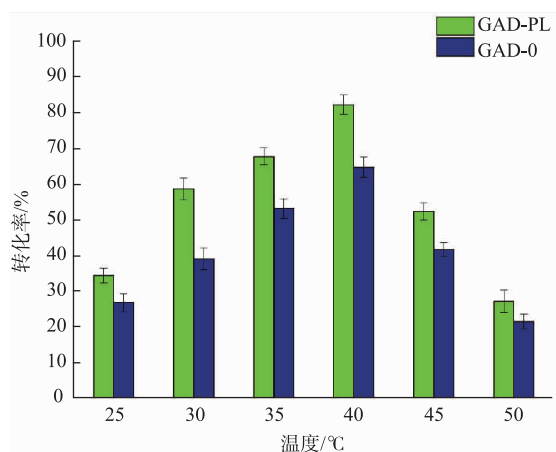


图 9 反应温度对酶转化的影响

Fig. 9 Effect of temperature on enzymatic conversion

2.3.2 pH对重组菌全细胞转化生产GABA的影响

以100 g/L的谷氨酸为底物,溶于去离子水中,加入预处理过的湿菌体30 U/g,在40 ℃、150 r/min的水浴摇床中进行转化,反应过程中,每隔2 h用0.6 mol/L的H₂SO₄或NaOH调节pH,使其始终与初始pH保持一致。pH梯度设置为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,反应24 h后终止反应并进行煮沸处理,12 000 r/min离心5 min得上清液,适当稀释并过0.22 μm有机滤膜后用HPLC-OPA柱前衍生法进行检测。结果见图10,当pH为4.5或5.0时,GABA转化率最高,GAD-0的GABA转化率为75.45%和76.21%,GAD-PL的GABA转化率为84.54%和84.21%。当pH小于4.5时,底物一水谷氨酸钠在酸性条件下容易酸水解生成谷氨酸析出,从而形成乳白色浑浊液体,不利于酶与底物的充分结合;当pH大于5.0时不利于酶活性中心的赖氨酸残基以shift-碱与PLP、底物结合,从而抑制GABA的生成。可见,酶转化法制备GABA的pH耐受范围窄,过酸或过碱都不利于酶促反应进行,考虑在高质量浓度底物下,过低的pH更容易导致底物析出,所以酶转化最适pH为5.0。

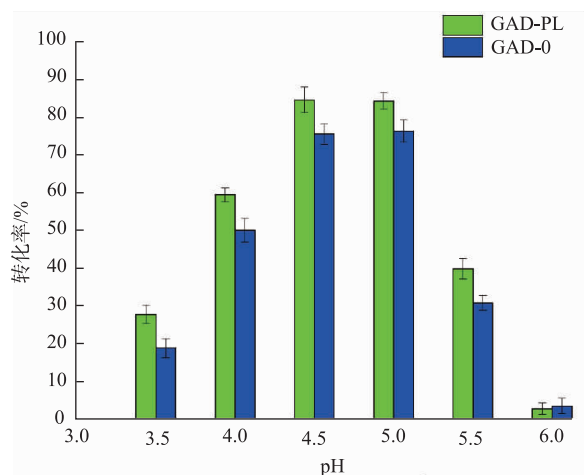


图10 反应pH对酶转化的影响

Fig. 10 Effect of pH on enzymatic conversion

2.3.3 加菌量对重组菌全细胞转化生产GABA的影响

以100 g/L的谷氨酸为底物,溶于去离子水中,加入预处理过的不同湿菌体(20、30、40、50、60 U/g),在40 ℃、150 r/min的水浴摇床中反应24 h,反应过程中,控制pH为5.0。反应结束后进行煮沸处理,12 000 r/min离心5 min得上清液,适当稀释后用氨基酸柱前衍生法进行HPLC检测。结果见图

11,重组菌全细胞转化率随着加菌量的增加而逐渐提高,其中GAD-PL和GAD-0分别在40 U/g和50 U/g时将底物完全转化,转化率达到100%。GAD-PL的加菌量少于GAD-0是因为前者细胞中的PLP含量高于后者,PLP作为辅助因子有利于酶促反应的进行。

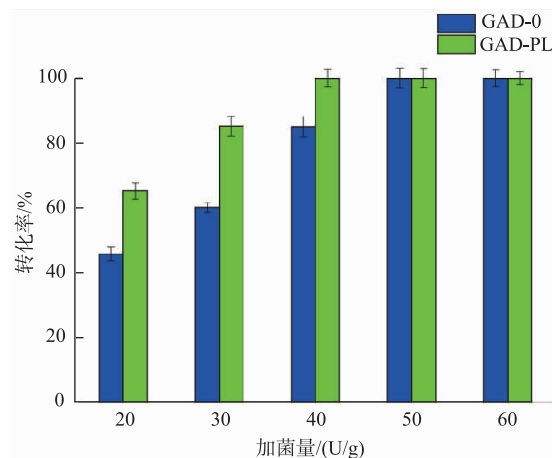


图11 不同加菌量对酶转化的影响

Fig. 11 Effect of wet cell dosage on enzymatic conversion

2.3.4 反应时间对重组菌全细胞转化生产GABA的影响

以100 g/L的谷氨酸为底物,溶于去离子水中,加入预处理过的不同湿菌体,GAD-0和GAD-PL加入量分别为50 U/g和40 U/g,在40 ℃、150 r/min的水浴摇床中反应24 h,反应过程中,控制pH为5.0。反应结束后进行煮沸处理,12 000 r/min离心5 min得上清液,适当稀释后用HPLC-OPA柱前衍生法进行检测,结果见图12。在0~20 h,GAD-0和GAD-PL转化合成GABA的产量随时间延长迅速增加,在20 h时转化率达到100%,之后随着反应进行,转化率不再发生变化。

2.3.5 底物质量浓度对重组菌全细胞转化生产GABA的影响

以200 g/L的谷氨酸为初始底物,溶于去离子水中,加入预处理过的不同湿菌体,GAD-0和GAD-PL加菌量分别为50 U/g和40 U/g,在40 ℃、150 r/min的水浴摇床中反应6 h后,每隔3 h补加1.27 g的谷氨酸固体至底物质量浓度分别为200、250、300、350、400 g/L,反应过程中,控制pH为5.0,反应48 h。反应结束后进行煮沸处理,12 000 r/min离心5 min得上清液,适当稀释并过0.22 μm有机滤膜后用HPLC-OPA柱前衍生法进行检测。结果见图13,当底物质量浓度达到400 g/L

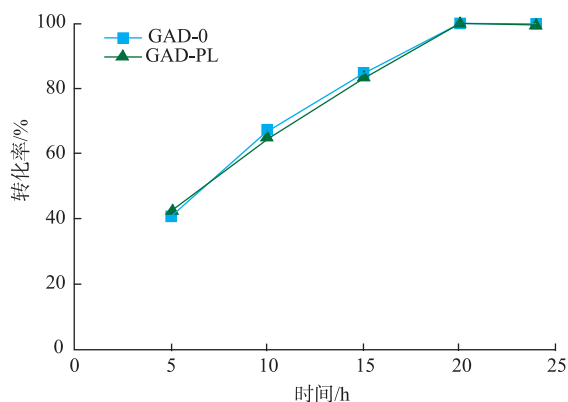


图 12 反应时间对酶转化的影响

Fig. 12 Effect of reaction time on enzymatic conversion

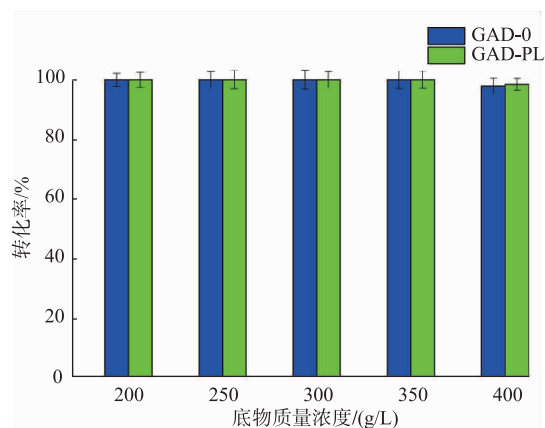


图 13 不同底物质量浓度对酶转化的影响

Fig. 13 Effect substrate concentration on enzymatic conversion

谷氨酸时,GAD-0 和 GAD-PL 转化生产 GABA 的转化率分别从 100%(底物质量浓度 350 g/L 谷氨酸)下降为 97.72%和 98.43%。综合考虑,为提高工业生产效率和节省下游分离纯化成本,选择 350 g/L 作为酶法制备 GABA 的最适底物质量浓度。

3 结语

作者成功构建并重组表达了含有 *Escherichia coli* 来源的 *gadB* 基因的重组菌 *B. subtilis*/pHY300PLK-*gadB*。实验表明在发酵过程中添加 0.5 mmol/L 辅酶前体 PL 的 GAD 总酶活达到 28.14

U/mL,是对照总酶活的 1.72 倍。进一步优化重组菌全细胞酶法生产 GABA 的工艺条件,结果表明,当温度为 40 °C,pH 为 5.0,GAD-0 和 GAD-PL 的最适加菌量分别为 50 U/g 和 40 U/g 时,GABA 转化率达到 100%。当谷氨酸质量浓度为 400 g/L 时,GABA 产量分别为 275.60 g/L 和 273.61 g/L。综上所述,作者考察了菌体发酵培养过程中添加辅酶前体 PL 对重组菌产 GAD 及制备 GABA 的影响,开发了一种不需要在发酵过程和酶转化体系中添加昂贵辅酶 PLP 就能高效生产 GABA 的工艺技术,为 GABA 在食品和医药行业中的广泛应用打下了坚实基础。

参考文献:

- [1] SHELPE B J, BOWN A W, MCLEAN M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid[J]. **Trends in Plant Science**, 1999, 4(11): 446-452.
- [2] KRNJEVIC K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates[J]. **Physiological Reviews**, 1974, 54(2): 418-540.
- [3] 孙斌, 罗毅. 帕金森病的现代药物治疗[J]. **医药导报**, 2005, 24(2): 85-90.
- [4] ROBERTS E, FRANKEL S. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1950, 187(1): 55-63.
- [5] 吴显荣. 非蛋白质氨基酸的结构与功能[J]. **氨基酸杂志**, 1989(3): 25-27.
- [6] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. γ -氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J]. **食品科学**, 2005, 26(9): 546-551.
- [7] WONG C G T, BOTTIGLIERI T, SNEAD O C. GABA, γ -Hydroxybutyric acid, and neurological disease[J]. **Annals of Neurology**, 2003, 54(S6): S3-S12.
- [8] 张新定, 裘明德. γ -氨基丁酸系统与癫痫[J]. **兰州大学学报(医学版)**, 2006, 32(1): 93-96.
- [9] KAZAMI D, OGURA N, FUKUSHI T, et al. Antihypertensive effect of Japanese taste seasoning containing γ -aminobutyric acid on mildly hypertensive and high-normal blood pressure subjects and normal subjects[J]. **Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, 2002, 49(6): 409-415.

- [10] DEFEUDIS F V. Gamma-aminobutyric acid and cardiovascular function[J]. **Experientia**, 1983, 39(8):845-849.
- [11] 包华琼,王新庄. γ -氨基丁酸(GABA)的生殖生理作用[J]. 动物医学进展, 2002, 23(2):39-41.
- [12] 赵健. 中国化学药品大全[M]. 北京:科学出版社, 1992.
- [13] 张聪,应国海. 饲料添加剂 γ -氨基丁酸的合成新方法[J]. 新饲料, 2009(2):43-44.
- [14] BINH T T T, JU W T, JUNG W J, et al. Optimization of γ -aminobutyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis* [J]. **Biotechnology Letters**, 2013, 36(1):93-98.
- [15] SHI X F, ZHENG B, CHANG C Y, et al. Enzymatic bioconversion for γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC No. 3414 resting cells[J]. **Advances in Applied Biotechnology**, 2015(333):609-617.
- [16] PLOKHOV A Y, GUSYATINER M M, YAMPOLSKAYA T A, et al. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E.coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2000, 88(1):257-265.
- [17] WANG Q, XIN Y Q, ZHANG F, et al. Enhanced γ -aminobutyric acid-forming activity of recombinant glutamate decarboxylase (*gadA*) from *Escherichia coli*[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(3):693-700.
- [18] SU L Q, 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(1):63-69.
- [19] 黄燕,宿玲恰,吴敬. 重组谷氨酸脱羧酶制备 γ -氨基丁酸的工艺条件优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6):199-204.
- [20] YANG Y, ZHAO G, WINKLER M E. Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B6) kinase in *Escherichia coli* K-12[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1996, 141(1):89-95.
- [21] DI-SALVO M L, HUNT S, SCHIRCH V. Expression, purification and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinases[J]. **Protein Expression and Purification**, 2004, 36(2):300-306.
- [22] DI SALVO M L, CONTESTABILE R, SAFO M K. Vitamin B6 salvage enzymes:mechanism, structure and regulation [J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)–Proteins and Proteomics**, 2011, 1814(11):1597-1608.
- [23] DI-SALVO M D, YANG E, ZHAO G, et al. Expression, purification and characterization of recombinant *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase[J]. **Protein Expression and Purification**, 1998, 13(3):349-356.
- [24] 石瑞君. 家蚕 VB6 代谢中两个关键酶 cDNA 克隆、原核表达、酶学鉴定及基因结构研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2007.
- [25] ZHAO G, WINKLER M E. Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12[J]. **Journal of Bacteriology**, 1995, 177(4):883-891.
- [26] 丁伟. 谷氨酸脱羧酶重组枯草芽孢杆菌的构建及其发酵优化[D]. 合肥:安徽医科大学, 2015.
- [27] NEWMAN J A, DAS S K, SEDELNIKOVA S E, et al. Cloning, purification and preliminary crystallographic analysis of a putative pyridoxal kinase from *Bacillus subtilis*[J]. **Acta Crystallographica Section F:Structural Biology and Crystallization Communications**, 2006, 62(10):1006-1009.
- [28] RASCHLE T, AMRHEIN N, FITZPATRICK T B. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280(37):32291-32300.
- [29] PARK J H, BURNS K, KINSLAND C, et al. Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*:4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase [J]. **Journal of Bacteriology**, 2004, 186(5):1571-1573.
- [30] 刘铁兵,龚金炎,朱银邦,等. 柱前衍生化法农产品中 γ -氨基丁酸的检测方法研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10):118-121.
- [31] 黄怀生,黄亚辉,郑红发. OPA 柱后衍生高效液相测定金白龙茶中 γ -氨基丁酸[J]. 茶叶通讯, 2007, 34(4):4-5.