

# 谷氨酸脱羧酶基因的挖掘、表征及全细胞制备 $\gamma$ -氨基丁酸的研究

冯 晓, 池慧兵, 孟凡强, 陆兆新, 朱 萍, 吕凤霞\*

(南京农业大学 食品科学技术学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:**  $\gamma$ -氨基丁酸是一种重要的生物活性因子, 通过谷氨酸脱羧酶(GAD)使 *L*-谷氨酸脱羧而合成。作者首先将酿酒酵母谷氨酸脱羧酶基因进行克隆并实现其在大肠杆菌中表达。通过亲和层析纯化获得了比活力高达 66.55 U/mg 的重组酶 ScGAD。进一步酶学性质分析结果表明, ScGAD 最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 为 4.0, 且在 30~50 °C、pH 4.0~9.0 时表现出优越的稳定性; 其动力学参数  $K_m$  为 14.28 mmol/L, 对 *L*-谷氨酸具有较好的亲和力。最后通过全细胞制备  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的最适条件探究, 得到 GABA 生成效率最高的条件为 60 °C、pH 4.0, 在此条件下, 100 mmol/L 底物 *L*-谷氨酸经全细胞催化可合成 GABA 35.9 g/(g·h)。该研究为 GABA 高效生产提供依据。

**关键词:** 谷氨酸脱羧酶;  $\gamma$ -氨基丁酸; 酶学性质; 全细胞催化

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2022)10-0058-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.005

## Mining and Characterization of Glutamate Decarboxylase Gene for Whole Cell Preparation of $\gamma$ -Aminobutyric Acid

FENG Xiao, CHI Huibing, MENG Fanqiang, LU Zhaoxin, ZHU Ping, LYU Fengxia\*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**  $\gamma$ -Gminobutyric acid is an important biologically active factor, which is synthesized through the decarboxylation of *L*-glutamic acid by glutamate decarboxylase (GAD). The author firstly cloned and expressed the glutamate decarboxylase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli*. The specific activity of the recombinant ScGAD purified by affinity chromatography reached a maximum value of 66.55 U/mg. Further enzymatic property analysis results indicated that ScGAD exhibited an optimum reaction temperature of 60 °C, an optimum reaction pH of 4.0, excellent stability in the range of 30~50 °C and pH 4.0~9.0, and the value of 14.28 mmol/L for kinetic constant  $K_m$  indicating ScGAD of a good affinity to *L*-glutamic acid. Finally, through the investigation of the optimal conditions for GABA preparation by whole-cell catalysis using ScGAD, the highest generation efficiency of GABA was achieved at the conditions of 60 °C and pH 4.0. On this basis, 100 mmol/L of the substrate (sodium *L*-glutamate) could be converted to 35.9 g/(g·h) of GABA through whole-cell catalysis. This study provides a basis for efficient production of GABA.

**Keywords:** glutamate decarboxylase,  $\gamma$ -aminobutyric acid, characterization, whole cell catalysis

收稿日期: 2022-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(1871742)。

\* 通信作者: 吕凤霞(1963—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程方面研究。E-mail: lufengxia@njau.edu.cn

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是一种天然存在的氨基酸,广泛分布在原核与真核生物中。在哺乳动物的神经系统中, GABA 为抑制性神经递质<sup>[1]</sup>,在神经活动中扮演重要的角色。国内外研究表明, GABA 具有调节神经传导,增强记忆力,调节血压心率,促进生长激素分泌,调节肠道微生物区系等多种作用<sup>[2-6]</sup>。GABA 已被添加至许多食品及其加工原料中,包括绿茶、小麦、酒曲<sup>[7-9]</sup>等,具有一定的保健功能。

GABA 的制备方法主要有化学直接合成法<sup>[10]</sup>、植物富集提取法<sup>[11]</sup>、生物酶法<sup>[12]</sup>。化学直接合成法在制备过程中会产生吡咯烷酮、丁内酯、 $\gamma$ -氯丁氰等不安全副产物,且反应条件苛刻;而植物富集提取法存在富集效率低等缺陷。相比之下,生物酶法具有安全性好、生产效率高与生产成本低等优势,为目前较为理想的 GABA 制备方法。研究学者在动物、植物、微生物中均发现谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)。但由于动植物来源的 GAD 分离纯化较为困难,因此,微生物来源的 GAD 研究较为广泛,主要包括短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)等<sup>[13-16]</sup>,然而这些来源的 GAD 存在热稳定性差、pH 稳定性范围较窄、与底物的亲和力不高,以及后期产物的分离纯化工艺烦琐、耗能大、收益低等缺点,难以满足工业应用需求。如大肠杆菌 GAD 在 50 °C 孵育 2 h 残余酶活力仅剩 40%;尿肠球菌 GAD 仅在 pH 5.0~5.2 的窄范围内较稳定<sup>[17]</sup>;短乳杆菌 Lb85GAD 的底物亲和力为 22.9 mmol/L 等<sup>[18-19]</sup>。因此,挖掘性能优良的 GAD 基因,构建高效转化平台对于工业化生产 GABA 具有重要意义。

作者将酿酒酵母 S288C 来源的 GAD 基因进行克隆,实现酿酒酵母谷氨酸脱羧酶在大肠杆菌中高效表达,并对重组 GAD 进行分离纯化及其酶学性质表征,以及全细胞制备 GABA 的最适条件探究,为 GABA 的高效生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** 菌株 *E.coli* BL21(DE3)由南京农业大学酶工程实验室保藏;酿酒酵母谷氨酸脱羧

酶(*Saccharomyces cerevisiae* glutamate decarboxylase)基因(GenBank NO.:GFP66652.1)由金斯瑞公司合成并克隆至质粒 pET-21a(+)中,酶切位点 *Nde* I、*Xho* I。

**1.1.2 主要试剂** 磷酸吡哆醛 (PLP)、GABA 标准品(质量分数 $\geq 99\%$ )、丹磺酰氯:美国 Sigma 公司产品;四氢呋喃(色谱级):永华化学股份有限公司产品;甲醇(色谱级):国药集团化学试剂有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基** LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L。

LB 固体培养基:在 100 mL LB 培养基中加入 1.8~2.5 g 的琼脂糖。

### 1.2 方法

**1.2.1 酿酒酵母 GAD 的转化鉴定** 将重组质粒 pET-21a(+)-GAD 转入表达宿主 *E.coil* BL21(DE3)感受态细胞中,培养后涂布在含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基中,于 37 °C 恒温培养箱中过夜培养 10~12 h,待单菌落长出后于 LB 液体培养基中挑入单菌落并培养 10~12 h,保存至甘油管中(甘油终体积分数为 15%),并收集菌体进行测序,以确定转化宿主成功。

**1.2.2 摇瓶发酵** 从甘油管中以体积分数为 1% 的接种量接种入 LB 液体培养基中(含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素),37 °C、180 r/min 培养 10~12 h。以体积分数为 1% 接种量转接至新的 LB 培养基中,在菌体生长至对数时期时( $\text{OD}_{600}$  为 0.6~0.8)加入 IPTG(终质量浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),16 °C、180 r/min 继续诱导培养 18 h。发酵完毕后 8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,每 100 mL 发酵液用 10 mL 破碎缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl, pH 7.0)重悬菌体,200 W 超声破碎处理 10 min。破碎液在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片,收集上清液。

**1.2.3 ScGAD 酶活力测定** 总反应体系为 500  $\mu\text{L}$ ,其中 490  $\mu\text{L}$  为底物缓冲液(0.2 mmol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液,含 0.04 mmol/L PLP、100 mmol/L L-谷氨酸),10  $\mu\text{L}$  为酶液。在 60 °C 反应 5 min,沸水浴 5 min 终止反应。采用高效液相色谱法测定反应生成的 GABA 的含量。在测定条件下每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  GABA 所需的酶定义为 1 个酶活力单位(U)。

**1.2.4 ScGAD 的纯化及蛋白质质量检测** 表达载体含有组氨酸标签,使用  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析法进行纯化。

加入 8 mL 平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、5 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 进行平衡, 将粗酶液加载入镍离子亲和层析柱, 反复上样 2 次, 加入 8 mL 清洗缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、50 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 清洗层析柱 2 次, 以去除杂蛋白质; 加入 8 mL 洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、250 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 洗柱 1 次, 收集洗脱液。采用 SDS-PAGE (5 g/dL 聚丙烯酰胺浓缩胶、12 g/dL 分离胶) 检测 ScGAD 的纯度, 蛋白质质量采用 Bradford 法测定<sup>[20]</sup>, 牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白质。

### 1.2.5 ScGAD 酶学性质测定

1) 最适反应温度及温度稳定性 将反应体系先在不同温度 (20~70 °C) 中预热。后加入 10  $\mu$ L 酶液 (蛋白质质量浓度 0.2 mg/mL) 反应 5 min, 迅速置于沸水浴中 5 min 终止反应, 以最大酶活力为 100%。将 GAD 在不同温度 (30~60 °C) 水浴不同时间 (0.5~6.0 h), 在 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 进行取样测定酶活力。以 0 h 时的酶活力为 100%, 测定 ScGAD 在不同温度下的残余酶活力。

2) 最适反应 pH 及 pH 稳定性 以最大酶活力为 100%, 在 pH 2.4~7.0 的缓冲液中分别加入酶液测定酶活力。将 GAD 酶液在不同 pH 缓冲液中 (3.0~10.0), 4 °C 条件下孵育 12 h, 调节 pH 至最适条件下测定酶活力, 以孵育 0 h 处理的酶活力为 100%, 分别计算 ScGAD 在不同 pH 孵育后的残余酶活力。

3) 金属离子对酶活力影响 在反应体系中分别加入终浓度 5 mmol/L 的金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  测定酶活力, 以不添加金属离子 (对照组) 的酶活力作为 100%。

4) 酶的动力学参数测定 在最适条件下, 配置不同底物浓度 (2~20 mmol/L) 的缓冲体系, 分别加入 10  $\mu$ L 酶液反应 5 min, 测定不同底物浓度下的酶活力, 使用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图, 计算酶的  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

1.2.6 全细胞制备 GABA 的最适条件 菌悬液制备: 用分光光度计测定发酵液在 600 nm 处的吸光度以确定菌体浑浊程度, 并控制在吸光度为 5.0 后终止发酵。取 10% (体积分数) 发酵液单独离心烘干后称质量以计算菌体质量, 剩余发酵液离心后, 加入 10% 发酵液体积的生理盐水将菌体重悬, 用于

GABA 制备及测定。总反应体系为 30 mL, 其中全细胞添加量为 3 mL 菌悬液 (含酶量为每克底物 100 U, 菌体干质量 0.13 g)。GABA 生成效率计算方法如下式 (1):

$$y_1 = \frac{m_1}{m_2 \times t} \quad (1)$$

式中:  $y_1$  为 GABA 生成效率,  $\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ;  $m_1$  为生成 GABA 的质量,  $\text{g}$ ;  $m_2$  为菌体干质量,  $\text{g}$ ;  $t$  为反应时间,  $\text{h}$ 。

1) PLP 浓度对全细胞制备 GABA 的影响 在添加 100 mmol/L 底物条件下, 反应体系中分别加入不同浓度 (0~0.10 mmol/L) 的 PLP 反应 0.5 h, 以不添加 PLP 的处理为对照组, 测定不同 PLP 浓度对全细胞制备 GABA 的影响。

2) 底物浓度对全细胞制备 GABA 的影响 在添加 0.06 mmol/L PLP 条件下, 反应体系中加入不同浓度 (50~200 mmol/L) 底物进行反应, 测定不同底物浓度下全细胞制备 GABA 的效率。

3) pH 对全细胞制备 GABA 的影响 在添加 0.06 mmol/L PLP、100 mmol/L 底物条件下, 反应体系使用不同 pH (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5) 缓冲液进行反应, 测定不同 pH 下全细胞制备 GABA 的效率。

4) 温度对全细胞制备 GABA 的影响 在最适反应体系与最适 pH 条件下, 将反应体系在不同温度 (35~65 °C) 下预热后反应, 测定不同温度下全细胞制备 GABA 的效率。

5) 全细胞制备 GABA 的转化率 在确定最优条件后, 将反应体系在 0.5~3.0 h 内进行反应, 测定 GABA 的转化率, 计算方法如下式 (2):

$$y_2 = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $y_2$  为 GABA 的转化率;  $M_1$  为生成 GABA 的浓度;  $M_2$  为底物浓度。

1.2.7 GABA 含量的测定 GABA 含量的测定使用改进的高效液相色谱法柱前衍生法<sup>[21-23]</sup>, 液相柱: Agilent HC-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 0.5  $\mu$ m) 使用丹磺酰氯 (1-二甲氨基-萘-5-磺酰氯, DNS-CL) 作为衍生剂。衍生体系 400  $\mu$ L, 其中待测样品 20  $\mu$ L, 碳酸氢钠缓冲液 0.1 mol/L (pH 9.8) 180  $\mu$ L, 丹磺酰氯-丙酮溶液 (4 g/L) 200  $\mu$ L, 于 37 °C 下避光反应 1 h。流动相: A 甲醇, B 四氢呋喃-甲醇-50 mmol/L 乙

酸钠(pH 6.2,体积比 5:75:420);流量:1 mL/min;进样量:20  $\mu$ L;柱温:25  $^{\circ}$ C;检测时间:30 min;紫外检测波长:254 nm。

GABA 标准曲线如图 1 所示,线性回归方程为  $y=8.1067x-3.0304$ ,  $x$  为 GABA 浓度,  $y$  为信号峰面积,相关系数  $R^2=0.9928$ ,大于 0.9900,表明自变量与因变量之间的线性关系良好,可用作标准曲线。

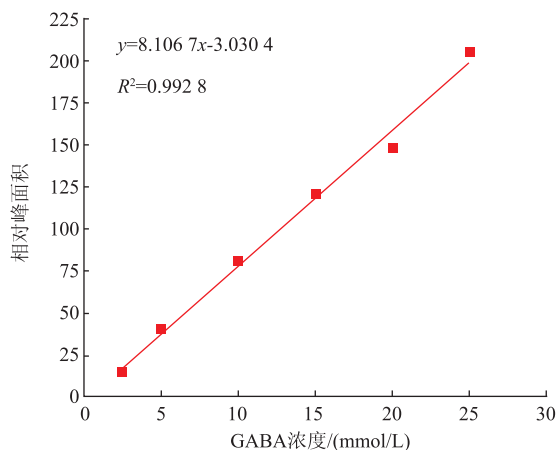


图 1 GABA 标准曲线

Fig. 1 GABA standard curve

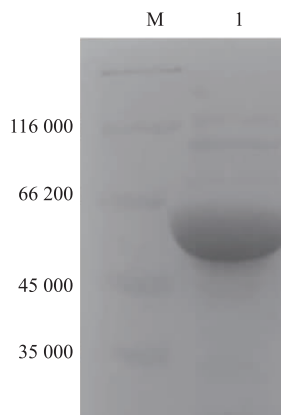
## 2 结果与分析

### 2.1 ScGAD 的纯化及 SDS-PAGE 分析

根据酿酒酵母全基因组序列进行 GAD 基因克隆,编码基因长度为 1 755 bp,无内含子,总计 585 个氨基酸,蛋白质理论相对分子质量约为 65 000。进一步构建重组表达载体 pET-21a(+)-GAD,并在 *E.coli* BL21 (DE3) 中异源表达,其酶活力为 2.06 U/mL。通过  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析纯化单一电泳条带(见图 2),与预测 GAD 相对分子质量大小一致。纯化结果如表 1 所示。经亲和纯化后,纯酶的回收率为 65.3%,提高倍数为 13.80 倍,比活力为 66.55 U/mg。

### 2.2 ScGAD 的酶学性质研究

**2.2.1 ScGAD 的最适反应温度及温度稳定性** 不同温度下检测酶活力发现(见图 3),ScGAD 的最适反应温度为 60  $^{\circ}$ C。在 20~60  $^{\circ}$ C 时,随着温度升高,酶活力逐渐升高;当温度超过 60  $^{\circ}$ C 后,酶活力急剧下降。进一步对酶的温度稳定性进行分析发现,ScGAD 在 30~50  $^{\circ}$ C 条件下,5.0 h 内仍具有约 80% 残余酶活力;而 60  $^{\circ}$ C 条件下,酶活力下降较快,6.0 h 孵育反应后,仅有 20% 的残余酶活力。以上研究结果表明,ScGAD 具有优越的温度稳定性,对工业加



M: 蛋白质 Marker26610; 1: 纯酶。

图 2 pET-21a(+)-ScGAD 纯化产物的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pET-21a(+)-ScGAD purified product

表 1 ScGAD 的分离纯化

Table 1 Separation and purification of ScGAD

纯化步骤	总活力/U	总蛋白质质量/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
无纯化(粗酶液)	1 852.20	384.48	4.82	1.00	100.0
镍离子亲和层析柱纯化	1 209.28	18.17	66.55	13.80	65.3

工的应用前景良好。

**2.2.2 ScGAD 的最适 pH 及 pH 稳定性** 通过测定不同 pH 下的相对酶活力发现,ScGAD 的最适反应 pH 为 4.0(见图 4)。在 pH 2.4~4.0 时,酶活力随着 pH 的升高逐渐升高;在 pH 4.0~5.6 时酶活力随着 pH 的升高缓慢下降。当 pH 接近中性时,相对酶活力从 50% 急剧下降至无活性。该酶的最适 pH 与其他来源的谷氨酸脱羧酶的最适 pH 基本一致<sup>[24-25]</sup>,原因是微生物来源的 GAD 在酸性范围内具有活性,酶促反应过程需要消耗溶液中的  $\text{H}^{+}$  以催化底物脱羧生成 GABA,当溶液接近中性时,反应体系中  $\text{H}^{+}$  变少,无法完成底物催化,而过低的 pH 环境会引起酶变性失去酶活<sup>[26]</sup>。pH 稳定性研究结果表明,GAD 在 pH 4.0~9.0 具有良好的稳定性,经 12 h 孵育反应,仍能保持 70% 以上残余酶活力,其中 pH 为 5.0 时,ScGAD 的酶活性最稳定。

**2.2.3 金属离子对 ScGAD 的影响** 通过测定金属离子对 ScGAD 的影响发现(见表 2), $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  会抑制该酶 10%~15% 的酶活力,而其他金属离子对酶活力的影响较小,几乎没有促进或抑制作用。因此,后续 GAD 的工业应用中不需要额外添加金

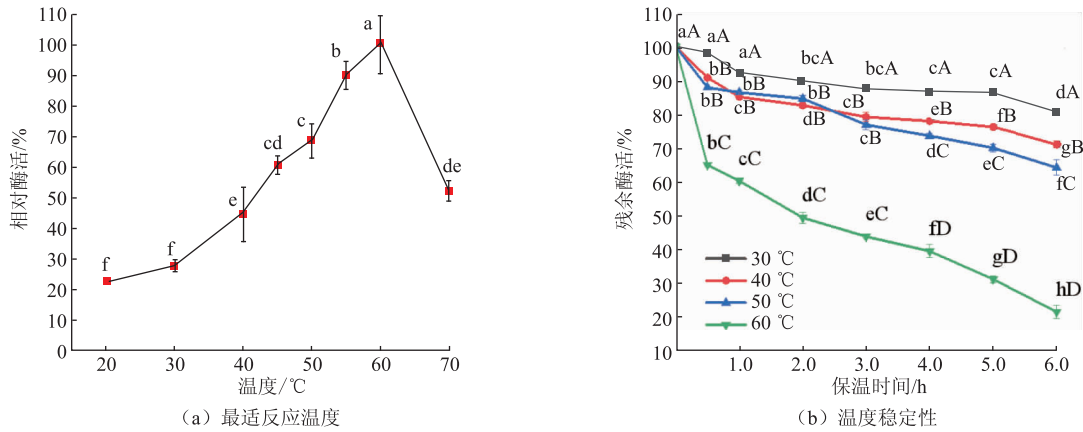


图 3(b)中不同小写字母代表相同温度下不同水浴时间的相对酶活力差异显著( $P<0.05$ );大写字母不同代表相同水浴时间下不同温度的相对酶活力差异显著( $P<0.05$ )。

图 3 ScGAD 的最适反应温度及温度稳定性

Fig. 3 Optimal temperature and thermostability of ScGAD

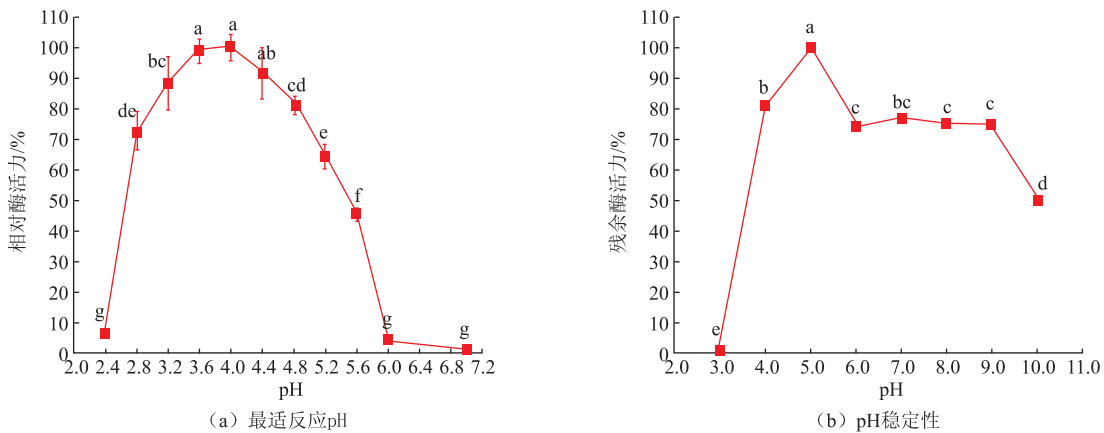


图 4 ScGAD 的最适反应 pH 及 pH 稳定性

Fig. 4 Optimal pH, pH stability of ScGAD

属离子,可节约生产成本。

表 2 金属离子对 ScGAD 相对酶活力的影响

Table 2 Effects of metal ions on the relative activity of ScGAD

金属离子	相对酶活力/%
对照组	100 <sup>ab</sup>
Ca <sup>2+</sup>	99.2±5.6 <sup>a</sup>
Mg <sup>2+</sup>	85.6±5.7 <sup>b</sup>
Fe <sup>2+</sup>	91.4±3.2 <sup>ab</sup>
Mn <sup>2+</sup>	104.5±4.9 <sup>ab</sup>
Ba <sup>2+</sup>	97.8±8.7 <sup>ab</sup>
Na <sup>+</sup>	102±4.1 <sup>a</sup>
K <sup>+</sup>	97.4±0.7 <sup>ab</sup>
Zn <sup>2+</sup>	102.7±1.3 <sup>a</sup>
Cu <sup>2+</sup>	86.5±2.4 <sup>b</sup>

**2.2.4 ScGAD 的动力学参数研究** 进一步对 ScGAD 进行酶促动力学分析,使用Lineweaver-Burk 双倒数作图,计算重组酶对底物 L-谷氨酸的  $K_m$  和  $V_{max}$ ,结果如图 5 所示,米氏常数  $K_m$  为 14.28 mmol/L,最大反应速度  $V_{max}$  为 0.59 mmol/(L·min)。

**2.3 全细胞制备 GABA 的最适条件探究**

**2.3.1 PLP 浓度对全细胞制备 GABA 的影响** PLP 作为辅酶可与底物 L-谷氨酸结合形成 Schiff 碱结构,该结构可以降低谷氨酸脱羧反应的活化能,从而提高酶促反应速率<sup>[27]</sup>。通过考察 PLP 对 GAD 催化反应的影响发现,添加 0.10 mmol/L PLP 对 GABA 生成效率提升最高,是无添加 PLP 对照组的 8 倍,可以达到 16.7 g/(g·h)(见图 6)。而 PLP 添加浓度在 0.06~0.10 mmol/L 时,GABA 的生成效率变化不大,综合考虑 PLP 添加成本,最终选取 PLP 浓度为 0.06

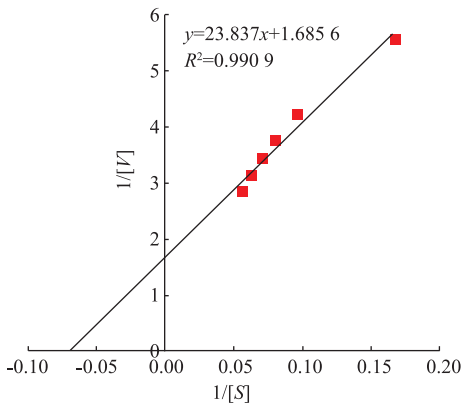


图 5 ScGAD 动力学参数测定曲线

Fig. 5 Kinetic parameters of ScGAD

mmol/L 添加至全细胞反应体系。

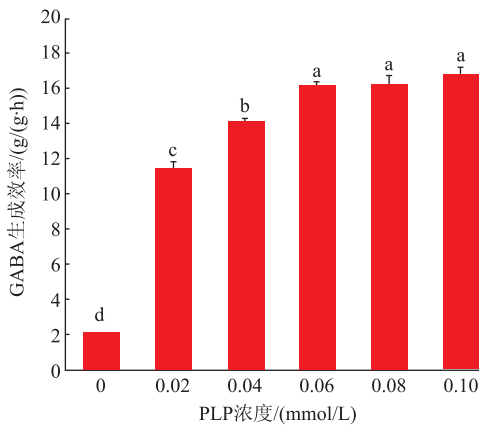


图 6 PLP 浓度对全细胞制备 GABA 的影响

Fig. 6 Effects of PLP concentration on the production of GABA in whole cells by ScGAD

### 2.3.2 底物浓度对全细胞制备 GABA 的影响

GABA 制备过程中底物浓度变化可能会影响细胞膜两侧的渗透压,进而影响 GABA 生成效率,因此需要考察不同底物浓度对 GABA 制备过程的影响。如图 7 所示,当浓度小于 100 mmol/L,随着底物浓度的增大,产物的生成效率逐渐提高,且在浓度为 100 mmol/L,达到最大生成效率 22.2 g/(g·h)。而浓度超过 100 mmol/L,GABA 生成效率呈现逐渐下降趋势,这可能是 ScGAD 的催化反应存在底物抑制或过高的环境渗透压抑制底物转运的原因,因此反应体系中过高的底物浓度会影响细胞对于底物的转运<sup>[28]</sup>。

**2.3.3 pH 对全细胞制备 GABA 的影响** ScGAD 是一种酸性酶,因此考察 pH 对 GAD 制备 GABA 的影响十分必要。如图 8 所示,在 pH 3.0~5.5 时,GABA 生成效率均较高,其中 pH 为 4.0 时生成效率最高,

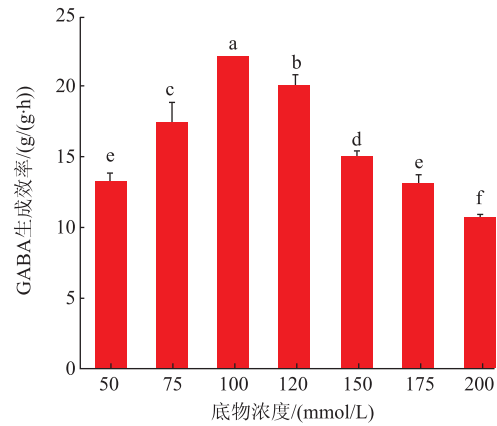


图 7 底物浓度对全细胞制备 GABA 的影响

Fig. 7 Effects of substrate concentration on the production of GABA in whole cells by ScGAD

达到 28.8 g/(g·h)。这说明 GAD 可在宽泛 pH 范围内制备 GABA,满足工业应用中复杂多变的 pH 条件。

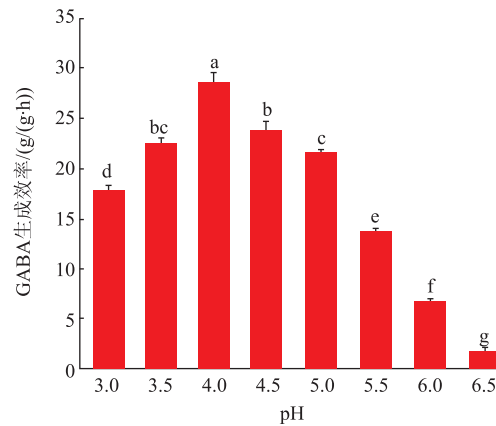


图 8 pH 对全细胞制备 GABA 的影响

Fig. 8 Effects of pH on the production of GABA in whole cells by ScGAD

**2.3.4 温度对全细胞制备 GABA 的影响** 温度是影响 GABA 制备的重要因素之一,通过研究温度对 ScGAD 全细胞制备 GABA 的影响发现,在 35~50 °C 下,GABA 生成效率均较低,最高仅能达到 6.5 g/(g·h),而催化温度在 55~65 °C 时,GABA 生成效率均较高,且在 60 °C 下产物的生成效率最高达到 35.9 g/(g·h)(见图 9)。因此 60 °C 为 GAD 的最适反应温度,反应温度低于 60 °C,GAD 相对酶活力低导致催化效率低,而反应温度高于 60 °C,重组酶的稳定性受到影响。以上研究结果证明重组酶可在高温下高效合成 GABA。

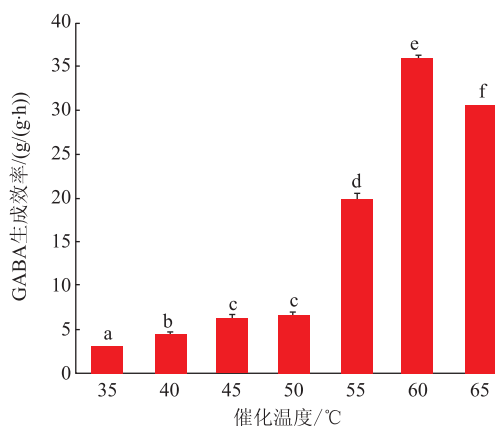


图9 温度对全细胞制备 GABA 的影响

Fig. 9 Effects of temperature on the production of GABA in whole cells by ScGAD

**2.3.5 全细胞制备 GABA 的转化率** 在确定最优条件后,通过研究反应时间对ScGAD全细胞制备GABA的转化率发现,在0.5~2.5 h时,随着反应时间的增加,GABA转化率逐渐提高,但提高幅度逐渐变慢,可能原因是酶在60 °C时稳定性随着时间的延长逐渐下降,当反应时间达到2.5 h时,GABA的转化率达到99%,产量为10.3 g/L,并随着反应时间的延长不再变化(见图10)。以上研究结果说明重组酶可在较短的时间内高效合成GABA。

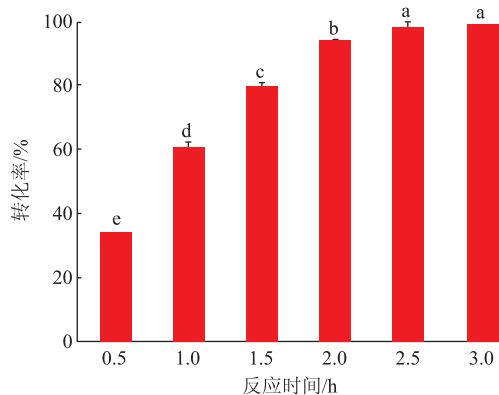


图10 反应时间对全细胞制备 GABA 的影响

Fig. 10 Effects of reaction time on the preparation of GABA in whole cells by ScGAD

### 3 讨论

近年来,谷氨酸脱羧酶因其可应用于功能性物质GABA生产已成为研究热点之一。虽然研究学者们已从多种微生物中挖掘并表征了谷氨酸脱羧酶酶学性质,但这些来源的GAD难以满足工业应用

需求。目前有关酿酒酵母谷氨酸脱羧酶研究较少<sup>[29]</sup>,作者通过对酿酒酵母谷氨酸脱羧酶基因进行挖掘,发现该酶的比活力高达66.55 U/mg,显著高于一些微生物来源的GAD的比活力,如植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*,比活力37.60 U/mg)<sup>[30]</sup>,以及短乳杆菌Lb85(*Lactobacillus brevis*,比活力38.46 U/mg)<sup>[31]</sup>等。

酶学性质研究表明,ScGAD的热稳定较好,在50 °C下孵育2 h的残余酶活力高于大肠杆菌谷氨酸脱羧酶在50 °C下的残余酶活力(60%)<sup>[18]</sup>,且在30~50 °C下孵育5.0 h后残余酶活力仍约为80%。ScGAD的最适反应pH为4.0,这与大部分其他来源的GAD的最适pH为弱酸性相一致<sup>[24-25,32]</sup>。值得关注的是,ScGAD在pH 4.0~9.0反应12 h仍可保留70%以上残余酶活力,比其他来源的GAD的pH稳定范围更宽泛<sup>[17,33]</sup>。因此,本研究中的ScGAD具有良好的热稳定性和宽泛的pH稳定性,有利于其耐受食品加工过程中复杂多变的pH及温度环境,在食品加工领域中具有广阔应用前景。另外,ScGAD的催化反应体系不需要额外加入金属离子,这与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)<sup>[14]</sup>来源的GAD的性质相一致。此外,ScGAD的动力学参数 $K_m$ 为14.28 mmol/L,表明其对底物L-谷氨酸的亲合力显著高于植物来源GAD(米糠GAD, $K_m$ 为37.30 mmol/L)<sup>[34]</sup>、(发芽粟谷GAD, $K_m$ 为22.36 mmol/L)<sup>[35]</sup>以及微生物来源GAD(短乳杆菌CGMCC1306 GAD, $K_m$ 为63.70 mmol/L)<sup>[19]</sup>。总之,ScGAD的优良性质,能够满足食品工业应用的需求,以及对GABA的工业生产具有巨大的应用潜力。

另外,国内外对不同来源的GAD制备GABA也均有研究,李祥从乳酸菌中挖掘到一种谷氨酸脱羧酶LsGAD,其在添加6 g/L的L-谷氨酸后,24 h转化率达到58%<sup>[36]</sup>;田灵芝等对植物乳杆菌来源的谷氨酸脱羧酶IPGAD进行了发酵优化,在5 L发酵体系中,转化24 h,生成GABA 204 g/L,转化率达到97.92%<sup>[37]</sup>。作者通过全细胞制备GABA的最适条件研究发现,ScGAD的最适催化pH为4.0,这与其他研究者挖掘的其他来源的GAD的研究结果一致<sup>[38-39]</sup>;ScGAD最适催化温度为60 °C,而Yang等报道的唾液链球菌来源的酶最适催化温度为55 °C<sup>[40]</sup>,这可能是由于GAD的来源不同其性质大不相同;ScGAD反应体系中添加0.06 mmol/L PLP可有效提

高GABA 生成效率,这与徐林敏的报道研究<sup>[41]</sup>相一致;在最适催化条件下时,GABA 的生成效率可达 35.9 g/(g·h),反应 2.5 h 可将底物催化生成 GABA, 转化率达到了 99%,GABA 质量浓度达到 10.3 g/L。

该产率还有待进一步提升,后续还将进行扩大反应体系以及加入分批补料后的催化研究,同时通过酶分子改造提升其酶催化效率及其工业应用价值。

## 参考文献:

- [ 1 ] SILVA A Q G D,XAVIER C H,CAMPAGNOLE-SANTOS M J,et al. Cardiovascular responses evoked by activation or blockade of GABA<sub>A</sub> receptors in the hypothalamic PVN are attenuated in transgenic rats with low brain angiotensinogen[J]. **Brain Research**,2012,1448:101-110.
- [ 2 ] SCHULLER H M,AL-WADEI A N,MOURAD M. Gamma-aminobutyric acid,a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma[J]. **Carcinogenesis**,2008,29(10):1979-1985.
- [ 3 ] TING W C G,TEODORO B,CARTER S O. GABA,gamma-hydroxybutyric acid,and neurological disease[J]. **Annals of Neurology**,2003,54(Suppl. 6):3-12.
- [ 4 ] DIENEL S J,LEWIS D A. Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia[J]. **Neurobiology of Disease**,2019,131:1-29.
- [ 5 ] PHILIP S,HYUN K K,DARYA T,et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota[J]. **Nature Microbiology**,2019,4(3):396-403.
- [ 6 ] KREUTZMANN J C,MARKUS F. Chronic inhibition of GABA synthesis in the infralimbic cortex facilitates conditioned safety memory and reduces contextual fear[J]. **Translational Psychiatry**,2020,10(1):1-10.
- [ 7 ] ABE Y,UMEMURA S,SUGIMOTO K,et al. Effect of green tea rich in gamma-aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats[J]. **American Journal of Hypertension**,1995,8(1):74-79.
- [ 8 ] NAGAOKA H. Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes[J]. **Biotechnology Progress**,2005,21(2):405-410.
- [ 9 ] KONO I,HIMENO K. Changes in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,2000,64(3):617-619.
- [10] 耿敬章.  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)在食品工业中的应用研究[J]. **饮料工业**,2012,15(1):11-14.
- [11] SAWAI Y,YAMAGUCHI Y,MIYAMA D,et al. Cycling treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the content of gamma-aminobutyric acid in tea shoots[J]. **Amino Acids**,2001,20(3):331-334.
- [12] MOMOKO H,SOTARO F,KOUICHI F,et al. Expression of two glutamate decarboxylase genes in *Lactobacillus brevis* during gamma-aminobutyric acid production with date residue extract[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**,2020,84(5):1069-1072.
- [13] YUAN H N,WANG H B,FIDAN O,et al. Identification of new glutamate decarboxylases from *Streptomyces* for efficient production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in engineered *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biological Engineering**,2019,13(1):1-12.
- [14] QINGDAI L,HAIJIAO C,XIAOQIAN M,et al. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. **Biotechnology Letters**,2016,38(7):1107-1113.
- [15] YU K,LIN L,HU S,et al. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2012,50(4/5):263-269.
- [16] 乌云达来,张博润,郭雪娜,等. 生物合成 $\gamma$ -氨基丁酸酿酒酵母谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达[J]. **食品科学**,2015,36(13):131-136.
- [17] 杨胜远,林谦,刘淑敏,等. 屎肠球菌源谷氨酸脱羧酶的制备及其酶学性质研究[J]. **食品与发酵工业**,2021,47(5):28-34.
- [18] 于平,刘航,朱鹏志,等. 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶 A 的基因克隆与表达及其酶学性质[J]. **中国食品学报**,2021,21(8):35-45.
- [19] 范恩宇. 短乳杆菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆与表达[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72(1/2):248-254.
- [21] 黄俊. 利用短乳杆菌制备  $\gamma$ -氨基丁酸相关过程研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.



- [22] 闫淑莲,赵光,刘永利. 反相高效液相色谱-丹酰氯柱前衍生法的氨基酸分析测定[J]. 首都医科大学学报,2003(3):338-339.
- [23] WEATHERBY R P, ALLAN R D, JOHNSTON G A R. Resolution of the stereoisomers of baclofen by high performance liquid chromatography[J]. **Journal of Neuroscience Methods**, 1984, 10(1):23-28.
- [24] HUANG J, MEI L, WU H, et al. Biosynthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2007, 23(6):865-871.
- [25] ELENA F, ILARIA C, TIZIANA N, et al. Biodiversity and  $\gamma$ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses[J]. **BioMed Research International**, 2015, 2015:1-11.
- [26] CHUNLING W, RONGXIU Z, HAINAN S, et al. Quantum chemistry studies of the catalysis mechanism differences between the two isoforms of glutamic acid decarboxylase[J]. **Journal of Molecular Modeling**, 2013, 19(2):705-714.
- [27] JOHN R A. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1995, 1248(2):81-96.
- [28] 黄燕,宿玲恰,吴敬. 重组谷氨酸脱羧酶制备  $\gamma$ -氨基丁酸的工艺条件优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6):199-204.
- [29] QIANG X, ZHENG X, LU X, et al. Efficient production of  $\gamma$ -GABA using recombinant *E. coli* expressing glutamate decarboxylase (GAD) derived from Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2017, 183(4):1390-1400.
- [30] 栾建军. 植物乳杆菌谷氨酸脱羧酶的克隆表达以及酶性质的初步研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2013.
- [31] 谢一龙. 短乳杆菌 Lb85 谷氨酸脱羧酶的分子改造及其  $\gamma$ -氨基丁酸的生物合成研究[D]. 无锡:江南大学,2014.
- [32] WU C, HSUEH Y, KUO J, et al. Characterization of a potential probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and efficient production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in batch fermentation[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018, 19(1):1-17.
- [33] 李云,杨胜远,陈郁娜,等. 产谷氨酸脱羧酶片球菌的鉴定及其酶学性质[J]. 食品科学, 2010, 31(9):187-191.
- [34] 张媛媛. 米糠谷氨酸脱羧酶固定化及制备  $\gamma$ -氨基丁酸的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [35] 白青云,曾波,顾振新. 发芽粟谷中谷氨酸脱羧酶的主要酶学性质初探[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3):1268-1270.
- [36] 李祥. 谷氨酸脱羧酶的基因挖掘、表达鉴定及应用[D]. 南阳:南阳师范学院,2021.
- [37] 田灵芝,徐美娟,饶志明. 一株重组大肠杆菌 /pET-28a-lpgad 的构建及其高效生产  $\gamma$ -氨基丁酸转化条件的优化[J]. 生物工程学报, 2012, 28(1):65-75.
- [38] 王期,抗晶晶,忻寅强,等. 生物转化法重组谷氨酸脱羧酶合成  $\gamma$ -氨基丁酸[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2010, 33(3):85-90.
- [39] GUIDO C, DE BIASE D, CATERINA A, et al. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase[J]. **The EMBO Journal**, 2003, 22(16):4027-4037.
- [40] YANG S Y, LIN Q, LU Z X, et al. Characterization of a novel glutamate decarboxylase from *Streptococcus salivarius* ssp. thermophilus Y2[J]. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2008, 83(6):855-861.
- [41] 徐林敏. 巨大芽孢杆菌 X-1 谷氨酸脱羧酶及  $\gamma$ -氨基丁酸转化条件的研究[D]. 南京:南京农业大学,2015.