



利用重组钝齿棒杆菌高效合成L-茶氨酸

和斐, 杨套伟, 徐美娟, 张显, 饶志明*, 唐蕾*

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】构建*Bacillus subtilis*来源的 γ -谷氨酰转肽酶蛋白(GGT)的*Corynebacterium glutamicum* SYPA5-5表达系统, 验证该蛋白信号肽片段在宿主表达体系中的作用, 并将该体系应用于高效合成茶氨酸的研究。【方法】将该*ggt*基因和切除信号肽的片段基因(Δ *sp ggt*)在*C. glutamicum* SYPA5-5中克隆表达。以*C. glutamicum* SYPA5-5高产L-精氨酸培养基为基础进行重组菌产酶优化。最优转化条件为: L-谷氨酰胺: 乙胺为1: 3, 酶量为0.06 U/mL。采用底物流加策略高产L-茶氨酸, 40 mL的转化体系包含: 终浓度为0.9 U/mL的GGT, pH 10, 37 °C, 从0 h开始每隔2 h补加20 mmol/L的L-谷氨酰胺, 60 mmol/L的乙胺。【结果】*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-*ggt*发酵上清液中GGT酶活达到(4.69 \pm 0.34) U/mL, *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ *sp ggt*只检测到胞内酶活(0.99 \pm 0.17) U/mL, 说明利用*B. subtilis*来源的信号肽可以实现GGT在*C. glutamicum*体系中分泌表达。最适产酶培养基条件为: 葡萄糖浓度为10%; IPTG最适添加时间为0 h。批次流加在12 h时达到最大茶氨酸产量104.36 mmol/L, 转化率为86.9%。【讨论】本文首次实现*B. subtilis*来源的 γ -谷氨酰转肽酶基因(*ggt*)在*C. glutamicum* SYPA5-5中分泌表达, 通过分批流加底物获得目前报道的利用重组*C. glutamicum*合成L-茶氨酸的最高产量。

关键词: L-茶氨酸, γ -谷氨酰转肽酶, 钝齿棒杆菌, 信号肽, 批次流加

L-茶氨酸, 化学名称为N-乙基- γ -L-谷氨酰胺, 是1种几乎只存在于茶类植物中的游离氨基酸^[1], 决定茶叶的风味和品质。茶氨酸具有多种重要的生理功能: 放松减压作用^[2]; 降血压作用^[3]; 抑制咖啡因引起的兴奋反应^[4]; 提高学习能力^[5]; 抗肿瘤^[6]; 控制体重^[7]等。早在1985年美国食品和药物

管理局 (FDA)已经认证L-茶氨酸为一般公认安全的物质 (GRAS), 在食品中的使用有特定用量限制。鉴于茶氨酸上述诸多生理功效及其绝对安全性, 其作为一种食品组分及饮品添加剂的需求量日益增加。进入21世纪, 酶法转化合成以其优越性日益受到青睐, 因此研究人员重心也集中于酶

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2015AA021004); 江苏省杰出青年科学基金(BK20150002); 教育部重点研究项目(113033A); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51306A)

*通信作者。饶志明, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn; 唐蕾, E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-12-29; 修回日期: 2016-03-01; 网络出版日期: 2016-03-02

法合成L-茶氨酸,可用于合成茶氨酸的酶包括谷氨酰胺合成酶,谷氨酰胺酶和 γ -谷氨酰转肽酶。谷氨酰胺合成酶受ATP供应限制^[8],谷氨酰胺酶产物对底物的转化率低^[9], γ -谷氨酰转肽酶脱颖而出。

γ -谷氨酰转肽酶分布广泛,负责催化谷胱甘肽及其类似物的 γ -谷氨酰键的断裂,并将生成的 γ -谷氨酰基团转移给水(此时即为水解反应)或者其他氨基酸(转肽反应)。利用GGT的转肽功能,选定L-谷氨酰胺和乙胺作为供体和受体时,即可实现酶法生成L-茶氨酸。

目前关于 γ -谷氨酰转肽酶异源表达的研究很广泛:李勤^[10]、胥俊峰^[11]通过扩增*Escherichia coli*的 γ -谷氨酰转肽酶基因,利用PET系列载体在*E. coli* BL21中实现表达。Chen^[12]、Ishiyee^[13]、Bindal^[14]等分别克隆枯草芽孢杆菌、假单胞菌和地衣芽孢杆菌来源的 γ -谷氨酰转肽酶基因,构建大肠杆菌重组表达体系。综上所述,国内外学者在异源表达 γ -谷氨酰转肽酶蛋白时,虽然所选用基因的菌株来源多有不同,但是宿主菌均为大肠杆菌,然而该大肠杆菌重组表达体系仍存在一定的安全隐患。本课题组前期成功在*B. subtilis*中实现了该蛋白的过量表达,胞外获得可观的蛋白酶含量。我们希望尝试另外一种全新的宿主菌表达体系。目前国内外均尚未有利用重组钝齿棒杆菌生产茶氨酸的报导,因此本论文中选用pXMJ19质粒实现*B. subtilis*来源的 γ -谷氨酰转肽酶基因在钝齿棒杆菌SYPA5-5中的克隆表达。另外,有学者发现*B. subtilis*的胞外蛋白能利用自身的信号肽在芽孢杆菌宿主系统中有效分泌表达,因此本论文在克隆枯草芽孢杆菌 γ -谷氨酰转肽酶基因时,选择性的保留该基因的信号肽片段,研究该信号肽片段是否可在钝齿棒杆菌中引导GGT的分泌表达,并考察了该重组菌的目的蛋白表达情况及重组蛋白转化合成L-茶氨酸的能力。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

B. subtilis 168、*C. glutamicum* SYPA5-5由本实验室保藏,表达载体pXMJ19由本实验室保藏。*B. subtilis* 168是1株模式菌株。宿主菌*C. glutamicum* SYPA5-5是本实验室筛选并经过多级诱变获得的1株高产L-精氨酸生产用菌株^[15]。除了适用于L-精氨酸的代谢改造外,*C. glutamicum* SYPA5-5也被用于L-精氨酸合成途径的中间代谢物L-瓜氨酸和L-鸟氨酸的积累^[16]。表达质粒pXMJ19(GenBank序列号AJ133195.1)是德国学者于1999年成功构建的谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌穿梭质粒^[17],质粒含有氯霉素抗性基因(*cat*)和*lacIq*基因(*lacI*的变异基因),是钝齿棒杆菌中最常用的一种胞内表达质粒。

1.2 主要试剂与培养基

工具酶购自TaKaRa公司;质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、抗生素购自上海Sangon公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自Ferments公司; γ -谷氨酰对硝基苯胺、双甘二肽购自上海Sangon公司;PCR引物由上海Sangon公司合成;其他试剂均为国产试剂。

基础培养基(g/L):葡萄糖5,蛋白胨10,酵母粉5,氯化钠10,自然pH值。

钝齿高产精氨酸培养基(g/L):葡萄糖160,酵母粉8,(NH₄)₂SO₄ 40,KCl 1,KH₂PO₄ 1.5,MgSO₄·7H₂O 0.5,MnSO₄·H₂O 0.02,FeSO₄·7H₂O 0.02,CaCO₃ 30。

优化培养基(g/L):葡萄糖100,酵母粉8,(NH₄)₂SO₄ 40,KCl 1,KH₂PO₄ 1.5,MgSO₄·7H₂O 0.5,MnSO₄·H₂O 0.02,FeSO₄·7H₂O 0.02,CaCO₃ 30。

1.3 主要试剂配制

50 mmol/L硼酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0):称取3.09 g硼酸溶于水中,NaOH调节pH至10.0,定容至1 L。

50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0): 称取6.06 g Tris溶于水, HCl调节pH至10.0, 定容至1 L。

HPLC流动相A (8 g/LCH₃COONa·3H₂O, 包含225 μL/L三乙胺, pH 7.2; 5 mL/L四氢呋喃); HPLC流动相B (30 g/L CH₃COONa·3H₂O, pH 7.2/乙腈/甲醇(1 : 2 : 2, V/V))。

1.4 γ -谷氨酰转肽酶基因的克隆及其表达载体的构建

根据NCBI公布的枯草芽孢杆菌的全基因组核酸序列中 ggt 的基因序列设计引物见表1, 并在上游和下游引物的5'端分别加上*Bam*H I、*Eco*R I酶切位点(下划线斜体部分)。

提取*B. subtilis* 168的基因组作为模板, 以 ggt -F(F1)/ ggt -R引物进行PCR扩增, 获得目的基因片段 ggt 、 $\Delta sp ggt$ 。PCR总反应体系为50 μL, 包含1 ng的质粒模板, 200 μmol/L dNTPs, 20 μmol/L引物和1 μL的*Ex Taq* DNA聚合酶。PCR程序设定为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 105 s, 35个循环; 72 °C 10 min。PCR反应产物用0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离, 目的条带切割后, 用胶回收试剂盒(TaKaRa)回收, 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 , T- $\Delta sp ggt$, DNA测序由上海生工生物有限公司完成。经测序验证正确的重组质粒T- ggt , T- $\Delta sp ggt$, 用*Bam*H I和*Eco*R I双酶切后连接到经过相同酶切处理的pXMJ19上, 构建表达载体pXMJ19- ggt 、pXMJ19- $\Delta sp ggt$ 。

1.5 GGT在钝齿棒杆菌SYPA5-5中的表达

将构建好的表达载体pXMJ19- ggt 、pXMJ19- $\Delta sp ggt$ 电转化法转化至*C. glutamicum* SYPA5-5感受态中, 在氯霉素抗性平板上筛选阳性重组子, 提取质粒进行酶切验证, 验证正确即为构建成功的重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- ggt 和*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- $\Delta sp ggt$ 。上述2株菌分别接种至含有10 μg/mL氯霉素的LBG液体培养基中30 °C培养过夜, 次日以10%的接种量转接至25 mL的钝齿发酵培养基中培养, 对数中期添加IPTG终浓度为0.8 mmol/L进行诱导表达, 完整培养周期为96 h。培养结束后8000 r/min离心20 min, 收集上清液即为胞外酶液, 4 °C保存。细胞沉淀用pH 8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次, 重悬浮于该缓冲液中, 超声波破碎仪破碎细胞。10000 r/min离心30 min去除沉淀细胞碎片, 上清即为胞内蛋白液, 置于4 °C保存。均用于后续SDS-PAGE实验和GGT的酶活测定。

利用SDS-PAGE分析重组菌的胞外蛋白和胞内全细胞蛋白, 用5%的浓缩胶及12%–15%分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白分离, 考马斯亮兰R-250染色; 总蛋白质浓度采用Brandford方法测定, 以牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白。

1.6 GGT酶活力的测定

GGT转肽酶活的测定原理是利用酶的转肽功能, 催化底物 γ -L-谷氨酰对硝基苯胺(γ -GpNA)的 γ -谷氨酰基团转移到受体双甘二肽, 随之生成的

表1. 文中所用引物

Table 1. Primers used in this study

Names	Sequences (5'→3')
ggt -F	CGCGGATCCAAAGGAGGGAAATCATGAAAAGAACGTGGAACGT CT
ggt -F1	CGCGGATCCAAAGGAGGGAAATCATGAAAAAACGCCCAAAGCTACGA
ggt -R	CCGGAATTCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTTACGTTTTAAATTAATGCCG

Restriction sites were shown in italicize and underline. ggt -F1 was the forward primer for the ggt gene without signal peptide segment.

对硝基苯胺在410 nm处有特殊吸收, 通过测定该反应生成的对硝基苯胺的浓度来衡量GGT酶活力。

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 γ -GpNA, 60 mmol/L双甘二肽, 20 μ L适当稀释的酶液。37 $^{\circ}$ C反应10 min后, 添加125 μ 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, 其他处理均和实验组相同, 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 μ mol对硝基苯胺(p-Nitrophenylamine)所需酶量即为一个酶活单位(U)。

1.7 L-茶氨酸的酶法生产

L-茶氨酸的转化体系: 供体L-谷氨酰胺, 受体乙胺, GGT蛋白酶; 反应条件为pH 10, 37 $^{\circ}$ C下反应一定时间, 添加10%的TCA终止反应。

1.8 L-茶氨酸含量的测定方法

采用高效液相色谱(HPLC)来测定 L-茶氨酸的含量。反应液离心, 经0.24 μ m滤膜过滤后上样。

OPA柱前自动衍生。HPLC条件: Angilent 1260; 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ (4.0 mm \times 125.0 mm)。流动相 A, 流动相 B; 流动相梯度程序: 保留时间为 0、27.5、31.5、34.0、35.0、40.0 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; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 338 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

2 结果和讨论

2.1 重组*C. glutamicum*SYPA5-5表达体系的构建及GGT信号肽功能验证

2.1.1 γ -谷氨酰转肽酶基因的克隆及其表达载体的构建: 提取*B. subtilis* 168的基因组为模板, *ggt*-F1、*ggt*-F/*ggt*-R为引物进行PCR扩增, 扩增出目的基因片段 Δ *sp ggt*(切除信号肽的片段基因, 大小为1680 bp)和*ggt*(完整基因, 大小为1764 bp)。PCR产物连接T载体, 转化至*E. coli* JM109感受

态, 获得的T连载体分别经*Bam*H I和*Eco*R I双酶切验证(图1): pMD18-T- Δ *sp ggt*质粒酶切(泳道2)得到 Δ *sp ggt*基因片段, 大小为1698 bp (其中包含18 bp His编码序列)及线性化的pMD18-T质粒, 大小为2692 bp; pMD18-T-*ggt*(泳道3)得到大小为1782 bp的*ggt*基因片段(亦包含His编码序列)和线性化的pMD18-T质粒, 理论值和实际值相符。

重组T连载体上切下来目的基因片段, 连接经相同酶切处理的pXMJ19载体, 转化至*E. coli* BL21感受态中, 得到重组表达载体pXMJ19- Δ *sp ggt*、pXMJ19-*ggt*, 单、双酶切验证(图2)。两重组质粒双切后得到约6601 bp线性化的pXMJ19片段和大小分别为1698 bp(泳道2)、1782 bp(泳道3)的目的基因片段, 实际值与理论值相符, 表明外源基因 Δ *sp ggt*、*ggt*已经正确连接到表达载体pXMJ19上。

2.1.2 *C. glutamicum* SYPA5-5重组菌的构建及GGT蛋白表达情况分析: 将重组质粒pXMJ19- Δ *sp ggt*, pXMJ19-*ggt*分别转化至*C. glutamicum* SYPA5-5中, 获得重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ *sp ggt*和*C. glutamicum* SYPA5-5/

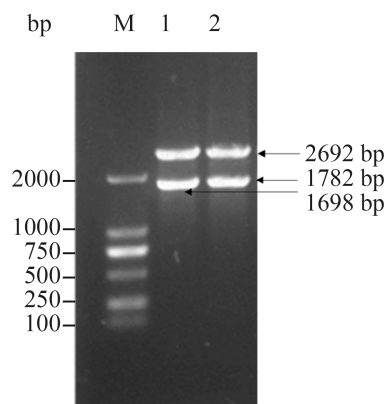


图1. 重组质粒pMD-18T- Δ *sp ggt*, pMD18-T-*ggt*的酶切验证

Figure 1. Identification of the recombinant plasmids pMD18-T- Δ *sp ggt*/pMD18-T-*ggt* by enzyme digestion. M: DL 2000 marker; lane 1, 2: pMD18-T- Δ *sp ggt*, pMD18-T-*ggt*/*Bam*H I+*Eco*R I.

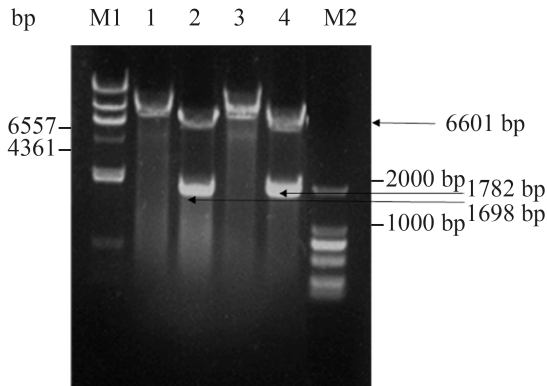


图 2. 重组质粒pXMJ19- Δ sp ggt, pXMJ19-ggt的酶切验证

Figure 2. Identification of the recombinant plasmids pXMJ19- Δ sp ggt, pXMJ19-ggt by enzyme digestion. M1: *Hind* III marker; M2: DL 2000 marker; lane 1, 3: pXMJ19- Δ sp ggt, pXMJ19-ggt/*Bam* H I; lane 2, 4: pXMJ19- Δ sp ggt, pXMJ19-ggt/*Bam* H I+*Eco* R I.

pXMJ19-ggt。将其接种于基础培养基中, 30 °C条件下培养过夜, 随后以10%的接种量转接至发酵培养基中, 培养至对数中期时添加0.8 mmol/L IPTG进行诱导表达, 完整培养周期为96 h。SDS-PAGE结果表明: 重组菌*C. glutamicum*SYPA5-5/pXMJ19- Δ sp ggt GGT蛋白基本分布在胞内, *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt胞内、外均观察到明显条带(图3, 4, 5)。可得出结论: 该信号肽可以使GGT在*C. glutamicum* SYPA5-5中分泌表达。该现象与有关报道称在芽孢杆菌宿主系统中, 革兰氏阳性菌的胞外蛋白一般都能利用自身的启动子和信号肽有效分泌表达一致^[18]。

2.1.3 重组菌株GGT酶活力测定: 重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ sp ggt、*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt GGT酶活力如表2所示, 重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt中, 胞外GGT酶活水平为胞内水平的20倍左右, 说明该蛋白绝大多数都分泌到了胞外。同时该重组菌的总酶活约为*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ sp ggt的5倍。这说明蛋白的胞外分泌可以避免蛋白酶在胞内累积对细胞自身生长造成压力、提高酶表达水平^[19]。

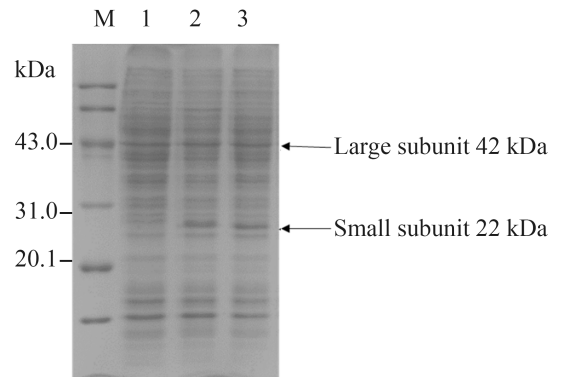


图 3. 重组菌胞内蛋白对照分析

Figure 3. SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. M: marker; lane 1: *C. glutamicum* SYPA5-5; lane 2: *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ sp ggt; lane 3: *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt.

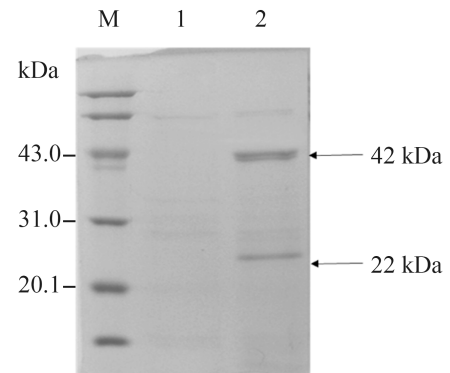


图 4. 重组菌胞外蛋白分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. M: marker; lane 1: *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ sp ggt; lane 2: *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt.

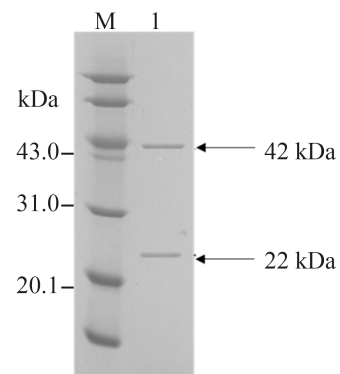


图 5. 纯化后GGT的SDS-PAGE胶验证

Figure 5. SDS-PAGE of the purified GGT. M: marker; 1: purified GGT protein.

表2. 重组菌GGT酶活测定
Table 2. GGT activities in recombinant strains

Recombinant strains	Intracellular GGT activity/(U/mL)	Extracellular GGT activity/(U/mL)
<i>C. glutamicum</i> SYPA5-5/pXMJ19-Δsp ggt	0.99±0.17	—
<i>C. glutamicum</i> SYPA5-5/pXMJ19-ggt	0.27±0.11	4.69±0.34

2.2 *C. glutamicum*SYPA5-5/pXMJ19-ggt产酶培养基优化

2.2.1 葡萄糖浓度对重组菌产GGT的影响: 碳源为菌体提供组成所需的C元素, 同时也充当重要的能量来源。研究室前期利用*C. glutamicum* SYPA 5-5高产L-精氨酸培养基培养结果显示, 宿主菌在C源选择上对葡萄糖有特别的偏好性, 而葡萄糖浓度对菌株的生长和产物的合成影响显著^[20], 因此, 本研究以高产L-精氨酸的发酵培养基为基础, 优化适合*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt产GGT的葡萄糖浓度。设置变量梯度为8%、10%、12%、14%、16%(W/V), 控制其他条件不变。结果如图6所示: 葡萄糖浓度为10%时, 菌体生长、产酶效果最佳; 较高或者较低的葡萄糖浓度都会使菌体生长和产酶能力下降。因此确定葡萄糖浓度10%是该重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt 摇瓶水平发酵产酶的最佳C源浓度。

2.2.2 IPTG浓度对重组菌生长及产GGT的影响: pXMJ19中tac启动子属于IPTG诱导型, 在钝齿棒杆菌中存在一定的本底表达, 但是同时IPTG对细胞存在毒害作用, 因此摸索合适的IPTG添加浓度对目的蛋白的表达至关重要。因此本实验采用最优葡萄糖浓度10%, 其他条件不变培养重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt, 对数中期

添加IPTG诱导时设置系列浓度梯度, 发酵结束后对重组菌生长及产酶进行分析, 结果如表3所示。当IPTG用量小于0.6 mmol/L时, 重组菌与不添加IPTG的重组菌相比时, 菌体浓度差异甚小, 但是此时产酶能力较低; 当IPTG浓度大于1.0 mmol/L时, 重组菌和对照组相比时, 菌体浓度下降明显, 这可能是因为IPTG浓度较大时会对菌体存在一定的毒副作用; 当IPTG浓度为0.8 mmol/L时重组菌虽然生长受到一定程度的抑制但是产酶能力最高。因此我们确定IPTG添加量为0.8 mmol/L。

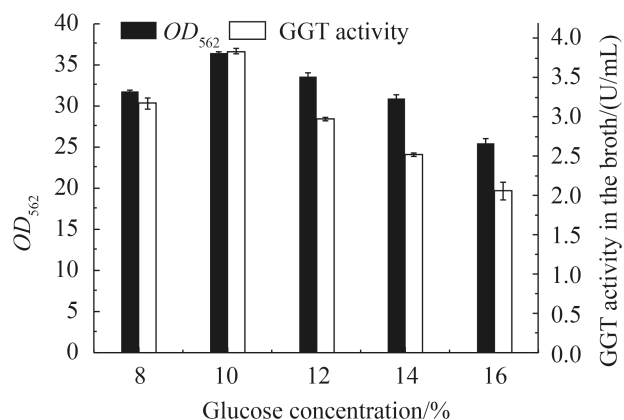


图6. 葡萄糖浓度对*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt生长及发酵产酶的影响

Figure 6. Effect of glucose concentration on the cell growth and GGT activity of recombinant strain.

表3. IPTG浓度对重组菌生长产酶的影响

Table 3. Effect of IPTG concentration on GGT-producing ability of the recombinant strain

Items detected	IPTG concentration/(mmol/L)					
	0	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
OD ₅₆₂	35.23±0.25	34.78±0.23	34.14±0.13	31.23±0.29	29.32±0.45	27.56±0.17
GGT activity/(U/mL)	0.68±0.32	2.15±0.12	2.98±0.54	3.54±0.43	3.01±0.41	2.68±0.11

2.2.3 IPTG添加时间对重组菌生长及产酶的影响

影响: 选用已经得到的葡萄糖最佳浓度及IPTG添加量0.8 mmol/L, 其他条件保持不变, 研究IPTG添加时间对重组菌产酶的影响。选择在接种初期0 h及12、18、24 h分别添加。由图7可以看出, 0 h添加IPTG发酵结束后, 上清液中检测到最高的GGT酶活, 12 h时酶活水平仅为前者的1/2, 18 h及其后的酶活水平更低。

2.2.4 重组菌发酵过程菌体生产及产酶情况分析

分析: 在上述优化的基础上, 对重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt进行发酵培养, 定时取样监测发酵过程中菌体生长和产酶情况。由图8可知, 该菌体生长特征分为3个阶段, 0–6 h为延滞期, 随后重组菌迅速进入到对数生长期(6–36 h), 36 h后进入稳定期。产酶曲线则显示, 菌体对数中后期(36 h)开始快速大量产酶, 96 h胞外酶活可以达到4 U/mL。该现象说明该菌体产酶稍滞后于菌体生长。这和其他以高产精氨酸为目的改造得到的*C. glutamicum* SYPA5-5重组菌的生长产酶情况^[21–22]略有不同, 原因可能是: (1) 表达的外源蛋白酶并不参与菌体自身的代谢循环途径, 对菌体生长的影响也与菌体自身蛋白存在差别; (2) 该目

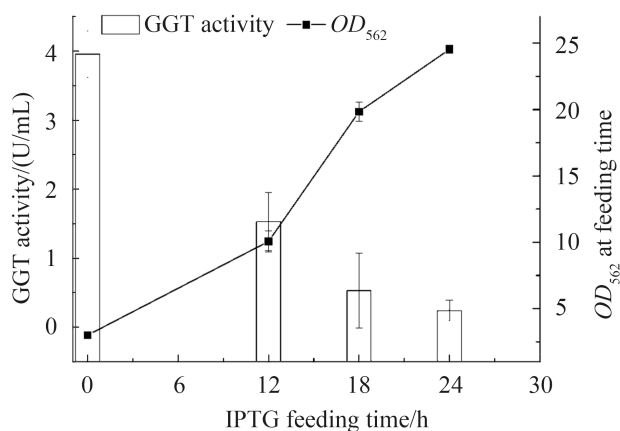


图 7. IPTG添加时间对*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-ggt发酵产酶能力的影响

Figure 7. Effect of IPTG feeding time on GGT-producing ability of the recombinant strain.

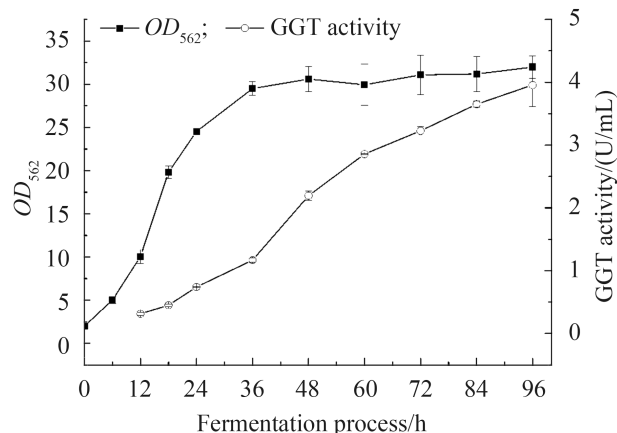


图 8. 重组菌发酵培养过程中生长产酶情况分析

Figure 8. Time profiles of cell growth and GGT production of the recombinant strain.

的蛋白成熟要经过胞外分泌进程及信号肽的切割, 比胞内蛋白的表达要更繁琐、耗时。

2.3 GGT催化生产L-茶氨酸条件优化

2.3.1 发酵液上清中GGT催化生产L-茶氨酸: 考察该胞外GGT蛋白转化合成L-茶氨酸的能力, 具体反应体系如下: 0.04 U/mL GGT, 20 mmol/L的L-谷氨酰胺, 20 mmol/L的乙胺; 控制体系pH 10, 37 °C条件下反应5 h。根据HPLC分析可知, 反应液中主要物质包括水解副产物L-谷氨酸, 底物L-谷氨酰胺和产物L-茶氨酸(图9), 说明该酶具备催化谷氨酰胺和乙胺发生转肽反应生成L-茶氨酸的能力。

2.3.2 乙胺浓度对GGT合成茶氨酸的影响: 在该转肽酶的催化过程中, 除了主转肽反应生成目的产物L-茶氨酸外, 还存在副产物L-谷氨酰-谷氨酰胺, 其合成量受乙胺添加量的影响, 因此, 反应过程中要保证受体量大于供体, 因此考察了乙胺用量(从40 mmol/L到120 mmol/L)对茶氨酸及其副产物合成的影响。反应体系中其他条件为: 20 mmol/L的L-谷氨酰胺, pH 10, 37 °C, 反应时间5 h不变。实验结果如图10所示, 乙胺浓度较低时, 酶对L-谷氨酰胺的利用率处于较高水平(底物残留少),

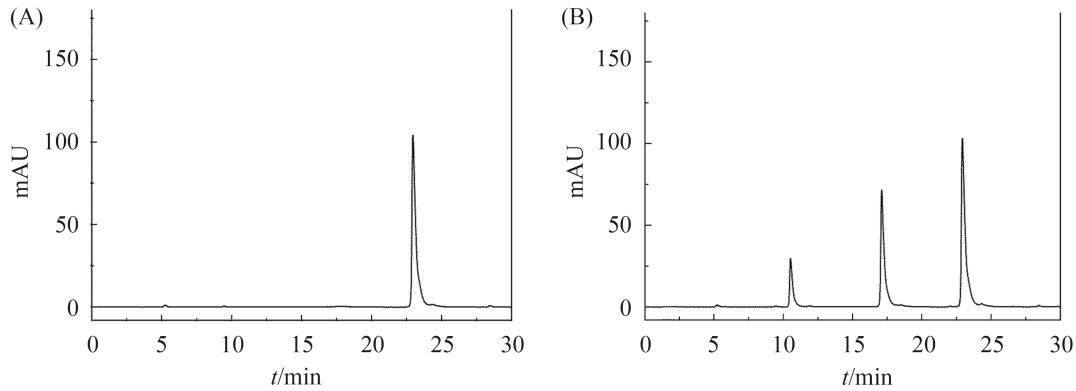


图 9. GGT酶转化液中的标准物质洗脱曲线

Figure 9. HPLC elution profile of the standards used in enzymatic synthesis of theanine by GGT. A: the elution profile of L-theanine; B: the elution profile of L-glutamate, L-glutamine and L-theanine, ranked by elution time.

但是L-茶氨酸和L-谷氨酰胺残留量之和小,说明此时副产物生成多,水分子的竞争优势使得水解副产物L-谷氨酸合成处于优势。随着乙胺浓度的增加,谷氨酰胺残留开始显著增加。因为受体乙胺的竞争优势,副产物的量并未增加。乙胺添加量为60 mmol/L时获得最高的茶氨酸产量和转化率。

2.3.3 酶添加量对GGT合成茶氨酸的影响:酶的添加量对反应具有重要影响,但同样由于多种副反应的存在,单纯的提高酶量可能会催生更多的副产物的生成。因此研究酶的最适添加量,选用

乙胺浓度60 mmol/L,其他条件如上保持不变。由下图11可以看出,酶量较少(0.02 U/mL)时,酶对底物的利用率有限,底物L-谷氨酰胺残留量多,产物L-茶氨酸量和副产物量均较少。随着酶量的增加,对底物的利用率逐渐增强,而L-谷氨酰胺残留量和L-茶氨酸生成量之和却在逐渐减少,说明此时副产物的生成量呈增加趋势。酶最适添加量为0.06 U/mL,此时茶氨酸产量、转化率均最高。

2.3.4 双底物流加的批次转化方法高产L-茶氨酸:在上面条件优化过程中可以看出,反应过程中必须严格控制供体、受体比例及酶的添加量。

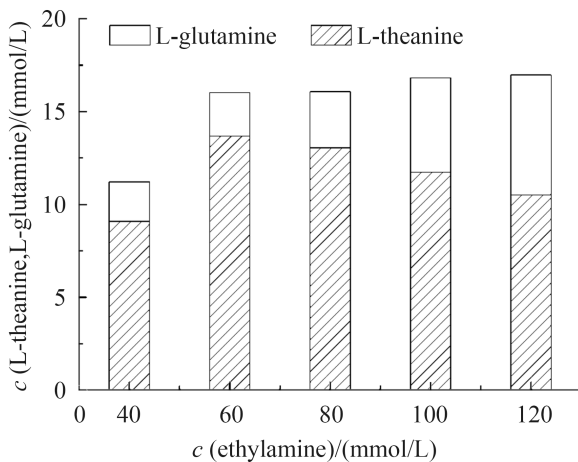


图 10. 乙胺浓度对茶氨酸产量的影响

Figure 10. The effect of ethylamine concentration on the L-theanine production.

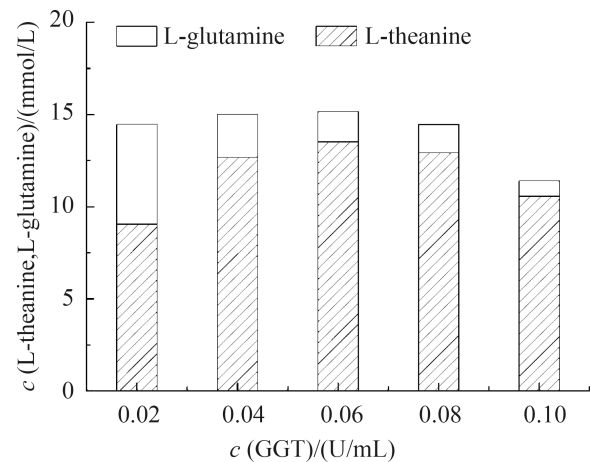


图 11. GGT添加量对茶氨酸产量的影响

Figure 11. The effect of GGT concentration on the L-theanine production.

高浓度的乙胺并不利于酶的转化生产, 供体谷氨酰胺又存在溶解度的限制, 因此可以通过同时流加2个底物的补料策略来降低上述不利因素影响。初始转化体系体积为40 mL, 包含20 mmol/L的L-谷氨酰胺, 60 mmol/L的乙胺, 终浓度为0.9 U/mL的GGT; 转化条件pH 10, 37 °C; 每隔2 h补加20 mmol/L的L-谷氨酰胺, 60 mmol/L的乙胺; 补料前取样, 补料后调节pH至10.0, 茶氨酸产量不再增加时停止反应。在反应进行到12 h时获得最大的茶氨酸产量104.36 mmol/L, 此时谷氨酰胺的转化率为86.9%。该L-茶氨酸产量及底物转化率相较一次性添加具有明显优势。

3 结论

本研究以安全菌株*B. subtilis* 168为出发菌, 克隆 γ -谷氨酰转肽酶基因的完整片段*ggt*及不含自身信号肽的基因片段 Δ sp *ggt*, 构建*C. glutamicum* SYPA5-5重组菌表达体系, 对重组菌中目的蛋白的胞内、外分布情况分析, 证明*B. subtilis*来源的GGT蛋白自身信号肽片段能够在*C. glutamicum* SYPA5-5中发挥作用。

同时以*C. glutamicum* SYPA5-5高产L-精氨酸发酵培养基为基础, 对重组菌*C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-*ggt*发酵产酶培养基进行葡萄糖浓度、IPTG诱导浓度及IPTG添加时间的优化, 结果显示: 最佳葡萄糖浓度为10% (g/L), 在0 h添加0.8 mol/L IPTG最有利于重组菌产酶, 分析原因是IPTG的正向诱导作用和负面毒害作用相抗衡的结果。

C. glutamicum SYPA5-5是一株适合于氨基酸生产的安全菌株, 其细胞培养可以达到的高密度水平也使其具备作为宿主菌表达外源蛋白的潜能, 因此该表达系统不但可以满足工业生产的安全性, 而且可以满足工业生产的强度。同时发现*B. subtilis* 168来源的GGT蛋白的信号肽片段可以在钝齿棒杆菌中被识别, 从而引导该目的蛋白分

泌到胞外, 该分泌作用使得酶活提高4倍, 这就为钝齿棒杆菌中外源蛋白的分泌提供一条可选用的信号肽序列。

利用该胞外蛋白酶液转化L-谷氨酰胺和乙胺生成茶氨酸, 并对受体、供体的添加比例及最适添加酶量进行了优化, 在上述基础上进行双底物流加实验, 在12 h获得最大的茶氨酸产量104.36 mmol/L, 谷氨酰胺转化率为86.9%。这是目前报道的利用重组*C. glutamicum* 合成L-茶氨酸的最高产量。

参考文献

- [1] Li J, Li P, Liu F. Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41(5): 883–889.
- [2] Kimura K, Ozeki M, Juneja LR, Ohira H. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses. *Biological Psychology*, 2007, 74(1): 39–45.
- [3] Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Matsuura T, Kakuda T, Takeuchi N. Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 59(4): 615–618.
- [4] Kakuda T, Nozawa A, Unno T, Okamura N, Okai O. Inhibiting effects of theanine on caffeine stimulation evaluated by EEG in the rat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(2): 287–293.
- [5] Juneja LR, Chu DC, Okubo T, Nagato Y, Yokogoshi H. L-theanine—a unique amino acid of green tea and its relaxation effect on humans. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10(6/7): 199–204.
- [6] Sadzuka Y, Sugiyama T, Sonobe T. Improvement of idarubicin induced antitumor activity and bone marrow suppression by theanine, a component of tea. *Cancer Letters*, 2000, 158(2): 119–124.
- [7] Zheng GD, Sayama K, Okubo T, Juneja LR, Oguni I. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo*, 2004, 18(1): 55–62.
- [8] Tachiki T, Suzuki H, Wakisaka S, Yano T, Tochikura T. Production of γ -glutamylmethylamide and γ -

- glutamylethylamide by coupling of baker's yeast preparations and bacterial glutamine synthetase. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1986, 32(6): 545–548.
- [9] Itoh T, Hoshikawa Y, Matsuura SI, Mizuguchi J, Arafune H, Hanaoka TA, Mizukami F, Hayashi A, Nishihara H, Kyotani T. Production of L-theanine using glutaminase encapsulated in carbon-coated mesoporous silica with high pH stability. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 68: 207–214.
- [10] Li Q, Huang JA, Li J, Liu ZH. Construction of genetically engineered *Escherichia Coli* strain for the biosynthesis of theanine. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2011, 37(3): 267–270. (in Chinese)
李勤, 黄建安, 李娟, 刘仲华. 茶氨酸生物合成基因工程菌的构建及重组酶的表达. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(3): 267–270.
- [11] Xu JF, Jia XH, Zhang ZP, Yin ZM. Comparison expressions of γ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* from two pET plasmids using lactose as inducer. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(1): 80–83. (in Chinese)
胥俊峰, 贾晓鹤, 张正平, 殷志敏. 重组大肠杆菌 γ -谷氨酰转肽酶的pET载体的选择及乳糖诱导作用的初步研究. 食品工业科技, 2008, 29(1): 80–83.
- [12] Chen XY, Su LQ, Wu D, Wu J. Application of recombinant *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase to the production of L-theanine. *Process Biochemistry*, 2014, 49(9): 1429–1439.
- [13] Ishiye M, Yamashita M, Niwa M. Molecular cloning of the γ -glutamyltranspeptidase gene from a *Pseudomonas* strain. *Biotechnology Progress*, 1993, 9(3): 323–331.
- [14] Bindal S, Gupta R. L-theanine synthesis using γ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* ER-15. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(37): 9151–9159.
- [15] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, Xia HF, Dou WF, Jin J, Xu ZH. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic *argC~H* cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(3): 495–502.
- [16] Zhao QQ, Luo YC, Dou WF, Zhang XM, Geng Y, Xu ZH. Engineering *Corynebacterium crenatum* for construction of L-ornithine and L-citrulline producers. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 1941–1947. (in Chinese)
赵芹芹, 罗玉常, 窦文芳, 张晓梅, 耿燕, 许正宏. 钝齿棒杆菌的代谢改造: L-鸟氨酸与L-瓜氨酸合成菌株的构建. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1941–1947.
- [17] Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13(6): 437–441.
- [18] Deng BB, Xiong LS. Advances in the studies of secretion expressing of foreign proteins in *Bacillus species*. *Progress in Biotechnology*, 2000, 20(5): 62–66. (in Chinese)
邓兵兵, 熊凌霜. 外源蛋白在芽孢杆菌中分泌表达的研究进展. 生物工程进展, 2000, 20(5): 62–66.
- [19] Liu RH, Zuo ZQ, Xu YM, Song CJ, Jiang H, Qiao CL, Xu P, Zhou QX, Yang C. Twin-arginine signal peptide of *Bacillus subtilis* YwbN can direct tat-dependent secretion of methyl parathion hydrolase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(13): 2913–2918.
- [20] Xu H, Dou WF, Xu HY, Zhang XM, Rao ZM, Shi ZP, Xu ZH. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(1): 41–51.
- [21] Dou WF, Xu MJ, Cai DM, Zhang XM, Rao ZM, Xu ZH. Improvement of L-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(3/4): 845–855.
- [22] Rahman MM, Qin ZQ, Dou WF, Rao ZM, Xu ZH. Overexpression of NAD kinase in *Corynebacterium crenatum* and its impact on L-arginine biosynthesis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2012, 11(6): 909–916.

Efficient synthesis of L-theanine by recombinant strain *Corynebacterium glutamicum* SYPA5-5

Fei He, Taowei Yang, Meijuan Xu, Xian Zhang, Zhiming Rao*, Lei Tang*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To construct a *Corynebacterium glutamicum* strain system for L-theanine production by the secretion expression of γ -glutamyltranspeptidase. [Methods] Two genes *ggt* and Δ *sp ggt* (without signal peptide fragment) from *Bacillus subtilis* were cloned and expressed in *C. glutamicum*. Then the recombinant GGT was used for L-theanine production under the optimal conditions: GGT enzyme 0.9 U/mL, pH 10, 37 °C, and 20 mmol/L L-glutamine and 60 mmol/L ethylamine were fed every two hours. Supplementation was ceased after 12 h to minimize the substrates residue in the final broth. [Results] Firstly, two different recombinant *C. glutamicum* strains *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ *sp ggt* (without signal peptide), *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-*ggt* (with signal peptide) were successfully constructed. In comparison to *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19- Δ *sp ggt*, *C. glutamicum* SYPA5-5/pXMJ19-*ggt* showed the ability to secrete GGT into the medium and 5-fold higher enzyme activity than that in the former strain. This finding suggested that the signal peptide of GGT was responsible for the secretion and could work in *C. glutamicum* strain system. Furthermore, the glucose concentration and the adding time of inducer IPTG on GGT production were optimized in shake-flask. The batch transformation conditions were also investigated. The optimal ratio of L-glutamine to ethylamine was 1:3, and optimal enzyme amount was 0.06 U/mL. The highest L-theanine production reached at 104.36 mmol/L at 12 h with the conversion rate of 86.9%. [Conclusion] This is the first time to use the *C. glutamicum* system for the efficient synthesis of L-theanine. Furthermore, the signal peptide of GGT is identified to function well in *C. glutamicum*, providing a possible strategy for constructing a secretion expression system in *C. glutamicum*.

Keywords: L-theanine, γ -glutamyltranspeptidase, *Corynebacterium glutamicum* SYPA5-5, signal peptide, fed-batch transformation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (863 Program) (2015AA021004), by the Jiangsu Province Science Fund for Distinguished Young Scholars (BK20150002), by the Key Project of Chinese Ministry of Education (113033A), and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51306A)

*Corresponding author. E-mail: Zhiming Rao, raozhm@jiangnan.edu.cn; Lei Tang, ltang@jiangnan.edu.cn

Received: 29 December 2015; Revised: 1 March 2016; Published online: 2 March 2016