

一株重组大肠杆菌/pET-28a-*lpgad* 的构建及其高效生产 γ -氨基丁酸转化条件的优化

田灵芝, 徐美娟, 饶志明

江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江南大学应用微生物与代谢工程研究室, 江苏 无锡 214122

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 γ -氨基丁酸转化条件的优化. 生物工程学报, 2012, 28(1): 65-75.

Tian LZ, Xu MJ, Rao ZM. Construction of a recombinant *Escherichia coli* BL21/ pET-28a-*lpgad* and the optimization of transformation conditions for the efficient production of γ -aminobutyric acid. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 65-75.

摘要: 为实现微生物法高效率生产 γ -氨基丁酸 (GABA), 从一株经多次诱变筛选的具有较高谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力植物乳杆菌 GB 01-21 全基因组 DNA 中 PCR 扩增获得 GAD 酶基因 *lpgad*, 构建重组质粒 pET-28a-*lpgad*, 在大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中高效诱导表达。并采用 Ni 柱亲和层析纯化获得重组 GAD, 并对其酶学性质进行初步研究, 为改良转化工艺提高 GABA 产量提供可靠理论依据。结果显示, 重组大肠杆菌中 GAD 酶活显著提高, 可达 8.53 U/mg, 是植物乳杆菌 GB 01-21 中 GAD 酶活的 4.24 倍。将该重组菌应用于转化 L-谷氨酸生产 GABA, 5 L 发酵罐水平转化 24 h 产量可达 143.5 g/L, 摩尔转化率为 97.32%, 是植物乳杆菌 GB 01-21 的 2.19 倍。纯化后酶学性质进行初步研究表明: 其最适 pH 为 4.8; 最适温度为 37 °C; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对其有较强的激活作用, 将上述实验结果用于转化条件的优化, 最终 5 L 发酵罐上进行转化实验, 批次添加底物 L-谷氨酸共 600 g, 转化 24 h, GABA 累计浓度可达 204.5 g/L, 摩尔转化率为 97.92%, 与最初转化条件相比, GABA 浓度提高了 42.5%, 为其工业化应用打下了良好的基础。

关键词: γ -氨基丁酸, 谷氨酸脱羧酶, 重组大肠杆菌, 全细胞转化, 优化

Received: June 24, 2011; **Accepted:** August 29, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB725202), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-10-0459), National Natural Science Foundation of China (No. 30970056), High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z207), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP31001), Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (No. 111-2-06), Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Zhiming Rao. Tel/Fax: +86-510-85910886; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB725202), 教育部新世纪优秀人才计划 (No. NCET-10-0459), 国家自然科学基金 (No. 30970056), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z207), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP31001), 教育部 111 引智计划 (No. 111-2-06), 江苏省优势学科工程项目资助。

Construction of a recombinant *Escherichia coli* BL21/pET-28a-*lpgad* and the optimization of transformation conditions for the efficient production of γ -aminobutyric acid

Lingzhi Tian, Meijuan Xu, and Zhiming Rao

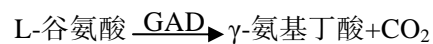
Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Laboratory of Applied Microorganisms and Metabolic Engineering, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: In order to enhance γ -aminobutyric acid production from L-glutamate efficiently, we amplified the key enzyme glutamate decarboxylase (GAD) encoding gene *lpgad* from the strain *Lactobacillus plantarum* GB 01-21 which was obtained by way of multi-mutagenesis and overexpressed it in *E. coli* BL21. Then we purified GAD by Ni-NTA affinity chromatography and characterized the enzyme to optimize the conditions of the whole-cell transformation. The results showed that the recombinant *E. coli* BL21 (pET-28a-*lpgad*) produced 8.53 U/mg GAD, which was increased by 3.24 fold compared with the GAD activity in *L. plantarum*. The optimum pH and temperature of the enzyme were pH 4.8 and 37 °C, respectively. At the same time, we found that Ca^{2+} and Mg^{2+} could increase the activity significantly. Based on this, we investigated γ -aminobutyric acid transformation in 5 L fermentor under the optimum transformation conditions. Accordingly, the yield of γ -aminobutyric acid was 204.5 g/L at 24 h when the 600 g L-glutamate was added and the mole conversion rate had reached 97.92%. The production of γ -aminobutyric acid was improved by 42.5% compared with that under the unoptimized transformation conditions. This paved a way for the γ -aminobutyric acid construction of the industrial applications.

Keywords: γ -aminobutyric acid, glutamate decarboxylase, recombinant *Escherichia coli*, whole cell transformation, optimization

γ -氨基丁酸 (简称 GABA) 是一种在中枢神经系统中有效的抑制性神经递质^[1], 具有许多重要的生理功能, 如降血压、保持神经安定^[2]、增强记忆、调节激素分泌、促进生殖、保肝利肾等^[3]。近年来, GABA 的研究和应用受到了广泛的关注。目前, 国内外主要采用化学合成法^[4]和微生物法^[5]制备 GABA, 化学合成法反应条件剧烈, 污染严重^[6]; 微生物发酵法条件温和、安全、成本较低, 但后处理过程复杂且生产周期长^[7-8]; 而全细胞转化法合成 GABA 可提高底物转化率和产品纯度, 简化后处理工序、缩短生产周期且降低环境污染, 因此受到国内外研究者的广泛重视^[9]。

本实验室前期通过菌种筛选获得一株植物乳杆菌, 此菌株具有较高的谷氨酸脱羧酶活力, 原始菌株摇瓶水平转化 24 h, GABA 的产量可达到 34.66 g/L^[10], 原始菌株经诱变处理后 5 L 发酵罐全细胞转化 24 h, GABA 浓度达到 65.45 g/L, 摩尔转化率为 97.56%, 产量明显高于其他同类菌株。但是, 由于植物乳杆菌是兼性厌氧微生物, 培养条件较难控制且培养条件的变化对 GABA 的生产效率影响比较显著; 同时, GAD 是生物催化 L-谷氨酸脱羧反应生成 γ -氨基丁酸的限速酶, 反应方程式如下:



在植物乳杆菌野生菌株中各酶的表达量受到菌体自身代谢水平的调控^[11], 因而其 GAD 的本底表达量不高导致了全细胞转化效率受限。鉴于此, 本研究拟通过构建 GAD 高表达型重组大肠杆菌, 借助大肠杆菌生长迅速、易于高密度培养和 GAD 表达可以人工调控的优点进行 GABA 高效率生产。另外, 通过对该酶的酶学性质进行研究, 即酶的热稳定性、pH 稳定性及温度、pH 与酶活性的关系, 几种金属离子对酶活的影响, 来确定该酶作用的合适条件指导全细胞转化法合成 GABA, 并为工业化制备 GABA 提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、BL21 (DE3) 由本实验室保藏, 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* GB 01-21 由本实验室筛选并诱变获得, 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, 质粒 pET-28a (+) 购自 Novagen 公司。

1.1.2 培养条件及培养基

培养温度 37 °C, 旋转式摇床转速 200 r/min, 氨苄青霉素浓度为 100 mg/L, 卡那霉素浓度为 50 mg/L 筛选转化子, IPTG 诱导终浓度为 0.5~1 mmol/L。

重组菌摇瓶种子培养基 (g/L): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 3.0, 玉米浆 1.5, NaCl 0.3, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05。在 pH 6.5~7.0、121 °C 下灭菌 10 min。

重组菌发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 5.0, 蛋白胨 10, 玉米浆 7.5, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.1,

MgSO₄·7H₂O 0.05, L-谷氨酸 1.0, 生物素 2×10⁻⁵。pH 6.5~7.0、121 °C 下灭菌 10 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。工具酶、IPTG 购自 TaKaRa 公司。咪唑和抗生素购自上海 Sangon 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (American Promega Corporation)、广范围蛋白质分子量标准购自 Fermentas 公司。PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。其他试剂均为国产试剂纯。5 L 发酵罐购于上海保兴生物工程设备有限公司, 氨基酸自动分析仪为日立 835-50 型, 2619#树脂 (阳离子交换柱 Φ 2.6 mm×150 mm)。

1.2 方法

1.2.1 谷氨酸脱羧酶基因的克隆

根据 NCBI 中植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III (GI: 308044682) 全基因组核酸序列 3 254 376 bp 中的 *lpgad* 基因序列设计谷氨酸脱羧酶编码基因的引物, 上游引物 P1: 5'-GACGGATCCATGGACCAGAAGCTGTTAAC-3'; 下游引物 P2: 5'-GGCGCGGCCCGCCAGGTGTGTTTAAAGCTGTT-3' (下划线分别表示 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点)。提取 *Lactobacillus plantarum* 染色体为模板, 利用已设计好的引物 PCR 扩增获得目的基因片段, PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 57 °C 1 min 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。所得片段经胶回收后与克隆载体 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。提取质粒酶切鉴定, 将重组质粒命名为 T-*Lpgad*, 测序由上海 Sangon 公司完成。

1.2.2 重组质粒 pET-28a-*lpgad* 的构建及 GAD 在大肠杆菌 BL21 中的表达

将 T-*lpgad* 用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切, 胶回收 *lpgad* 片段, 将其与经相同双酶切处理获得的线性化载体 pET-28a (+) 混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 16 °C 过夜连接, 再转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 卡那霉素抗性筛选阳性菌落, 提取质粒, 进行双酶切验证, 将符合预期结果的阳性转化子接种至含卡那霉素 (终浓度为 50 mg/L) 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1% 接种量转接, 37 °C 培养至 OD_{600} 约 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16 °C 过夜诱导表达^[12]。

1.2.3 SDS-PAGE

采用 5% 的浓缩胶及 12% 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^[13]。

1.2.4 谷氨酸脱羧酶的纯化

将过夜诱导表达的菌液于 10 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 收集菌体, 用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 悬浮菌体, 超声波破碎细胞, 然后经 0.45 μ m 滤膜过滤后上柱, 经 Ni-NTA 纯化^[13], 得到纯化后的 GAD。

1.2.5 谷氨酸脱羧酶活力的测定

采用比色法^[14], 首先配制底物溶液 Macllvaine 缓冲体系 (0.2 mol/L, pH 4.8, 含 0.1 mmol/L PLP, 0.4 mol/L 底物 L-谷氨酸钠), 取 200 μ L 底物溶液和 100 μ L 酶液在 30 °C 反应一定时间, 置于冰浴中, 加入 200 μ L 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 9.0) 终止反应; 再加入 1.0 mL 6% 苯酚和 400 μ L 次氯酸钠溶液, 充分振荡后, 沸水浴中反应 10 min, 迅速在冰浴中冷却显色

20 min, 然后测定 630 nm 处吸光值变化。酶反应体系中 GABA 的量以标准曲线确定, 相对活力以单位时间内 A_{630} 的变化表示, 一个酶活力单位 (U) 定义为在测定条件下每分钟产生 1 μ mol GABA 所需的酶量。

1.2.6 蛋白质含量测定

粗酶液蛋白质含量采用 Bradford 法^[15]测定, 以 BSA 为标准蛋白。

1.2.7 谷氨酸脱羧酶的酶学性质研究

最适 pH 及 pH 稳定性: 配制 pH 3.6~6.0 的醋酸-醋酸钠反应缓冲液, 30 °C 下将酶液分别与不同 pH 的反应液混合, 测定 GAD 在不同 pH 反应体系中的酶活, 考察 pH 对酶促反应的影响。再将一定量的酶液加入到以上不同 pH 的反应缓冲液中, 30 °C 下分别保温 2 h, 测定剩余酶活, 考察 GAD 在不同 pH 条件下的稳定性。

最适温度及热稳定性: 采用 pH 4.8 的反应缓冲液, 分别在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C 下测定酶活, 研究温度对酶反应的影响。将酶液置于以上不同温度下保温 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h, 测定剩余酶活, 考察 GAD 在不同温度下的稳定性。

不同金属离子及 EDTA 对酶活的影响: 在反应液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Na^{+} 、 Ag^{+} 、 Al^{3+} 、 Li^{2+} 以及 EDTA, 30 °C 下测定 GAD 酶活, 以不加金属离子的反应液作为对照, 研究不同金属离子对其酶促反应的影响。另外, 对具有明显激活作用的金属离子, 配制不同的浓度进行梯度实验测定。

K_m 值及 V_{max} 的测定: 配制不同浓度的 L-谷

氨酸钠底物溶液, 分别与酶液在 30 °C 下反应, 采用双倒数作图法确定 GAD 的 K_m 及 V_{max} 值。

1.2.8 重组大肠杆菌转化 L-谷氨酸产 GABA

将斜面保藏的菌种接种至 50 mL (装液量为 10 mL) LB 培养基中, 于旋转式摇床中 37 °C、160 r/min 培养 12 h 进行活化, 再以 5% 的接种量接入 500 mL 摇瓶 (装液量为 100 mL) 种子培养基中培养菌体, 按上述条件培养 24 h 得到种子液, 按 10% 的接种量将培养好的种子液接入 5 L 全自动发酵罐 (装液量为 3 L), 先于 37 °C、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6, 再向其中添加乳糖至终浓度为 1 g/L, 同时在线控制 pH 6.8 流加葡萄糖, 30 °C 诱导发酵 14 h 至 OD_{600} 为 13.6, 发酵结束后将培养好的菌体全部离心收集, 双蒸水洗涤 3 次, 用 2 L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.0) 悬浮菌体, 添加底物 L-谷氨酸进行全细胞转化, 5 L 发酵罐转化条件: 30 °C、250 r/min、120 L/h, 转化 24 h 后, 加入 15% 的三氯乙酸终止反应, 取 1 mL 进行适当稀释后, 氨基酸自动分析仪测定转化液中 GABA 的量。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸脱羧酶基因的克隆及分析

提取植物乳杆菌全基因组 DNA, 用设计的引物进行扩增, 得到长度为 1 410 bp、编码 469 个氨基酸的基因片段 (图 1), 连接 pMD18-T 载体测序。Blast 分析结果表明, 扩增获得的基因核苷酸序列与 NCBI 中公布的 *lpgad* 基因序列 (GenBank Accession No. ADO00011.1) 同源性高达 99.36%, 其相差 9 个碱基, 4 个氨基酸。*L. plantarum* GB 01-21 基因 *lpgad* 已提交至 GenBank 数据库 (Accession No. JN248358)。

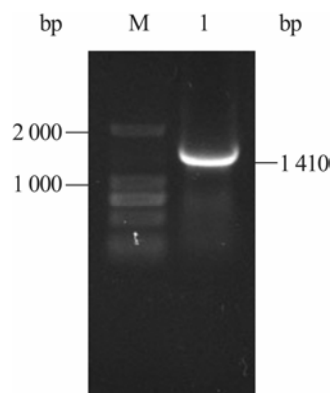


图 1 *lpgad* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *lpgad* gene. 1: DL2 000 marker; 2: PCR products.

2.2 重组大肠杆菌表达载体的构建

将 T-*lpgad* 用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切, 胶回收 *lpgad* 片段, 将其与经相同酶切线性化的 pET-28a (+) 载体连接, 酶切验证, 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切, 释放 5 369 bp 和 1 410 bp 大小的片段 (图 2), 分别对应于 pET-28a (+) 和 *lpgad* 的大小, 结果表明重组质粒构建成功, 将其命名为 pET-28a (+) -*lpgad*。

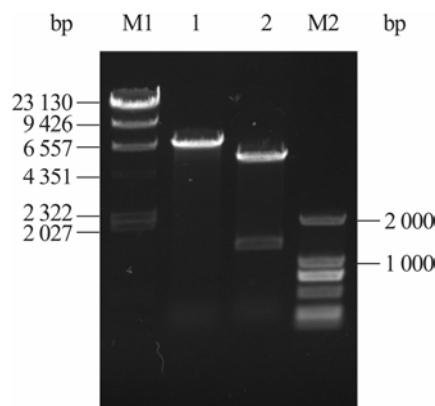


图 2 质粒 pET-28a (+) -*lpgad* 的酶切验证

Fig. 2 Identification of pET-28a (+) -*lpgad* by enzyme digestion. M1: λ DNA/*Hind* III marker; 1: pET-28a (+) -*lpgad* digested with *Bam*H I; 2: pET-28a (+) -*lpgad* digested with *Bam*H I and *Not* I; M2: DL2 000 marker.

2.3 *lpgad* 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达与重组蛋白 GAD 的纯化

将 pET-28a (+)-*lpgad* 转入 BL21 (DE3), 在卡那霉素抗性 LB 平板上挑选阳性转化子, 即 pET-28a (+)-*lpgad*/BL21 (DE3), IPTG 诱导后的菌液经超声波破碎细胞, 上清液 SDS-PAGE 分析, 检测到一条分子量约为 53 kDa 的特异性条带, 与报道的目标蛋白大小一致^[16], 如图 3 所示。上清液测得比酶活为 8.53 U/mg, 是植物乳杆菌破碎细胞后粗酶液酶活的 4.24 倍。本实验选用的表达载体 pET-28a (+) 中含有 6-His-Tag 编码序列, 采用 Ni-NTA 纯化谷氨酸脱羧酶 GAD。纯化后的 GAD 经 SDS-PAGE 分析结果见图 3, 可看出经过纯化后得到相对单一的条带, 基本上可以认为已得到相对较纯的 GAD 酶蛋白。纯化后酶液的比酶活达到 32.45 U/mg, 是纯化前粗酶液酶活的 3.8 倍, 回收率达 53.32%。结果见表 1。

2.4 谷氨酸脱羧酶 GAD 的酶学性质研究

2.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性

GAD 在 pH 3.6~6.0 范围内反应时测定其酶活, 由图 4 可见, 最适 pH 为 4.8, 与已报道的微生物来源的 GAD 反应最适 pH 在 4~5 之间^[17-19] 基本一致。pH 稳定性方面, 将 GAD 在 pH 3.6~6.0 不同 pH 条件下处理 2 h 后测定酶活性, GAD 在 pH 3.6~5.0 范围内保温 2 h 后均能保持 80% 以上

的酶活力, pH 值大于 5.2, 酶活降低较为明显, 说明该 GAD 在酸性环境下相对稳定, 具有较高的酸依赖性。

2.4.2 最适温度及热稳定性

在 20 °C~70 °C 范围内进行 GAD 酶促反应, 测得的酶活结果见图 5, 由图可知该 GAD 在低温度范围内, 随着温度的升高, 酶活呈上升趋势, 37 °C 时酶活性达到最高, 温度再继续升高, 酶活则呈下降趋势。热稳定性试验结果如图 5 所示 GAD 在 20 °C~40 °C 较稳定, 水浴保温 10 h 后相对酶活仍在 85% 以上, 说明该酶在此温度范围内具有较高的稳定性, 随着温度的升高, 酶稳定

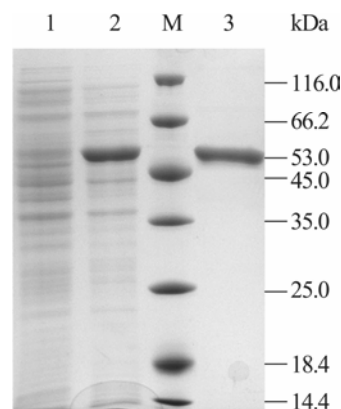


图 3 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed and purified GAD. 1: supernatant of *E. coli* B121; 2: supernatant of *E. coli* B121 with recombinant plasmid pET-28a (+)-*lpgad*; M: protein marker (kDa); 3: purified GAD.

表 1 重组蛋白 GAD 纯化表

Table 1 Purification of recombinant GAD

| GAD | Total protein (g/L) | Total enzyme activity (U/mL) | Specific activity (U/mg) | Recovery percent (%) | Purification ratio |
|--------------|---------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|
| Crude enzyme | 38.87 | 331.56 | 8.53 | 100.00 | 1.00 |
| By Ni-NTA | 5.45 | 176.82 | 32.45 | 53.32 | 3.80 |

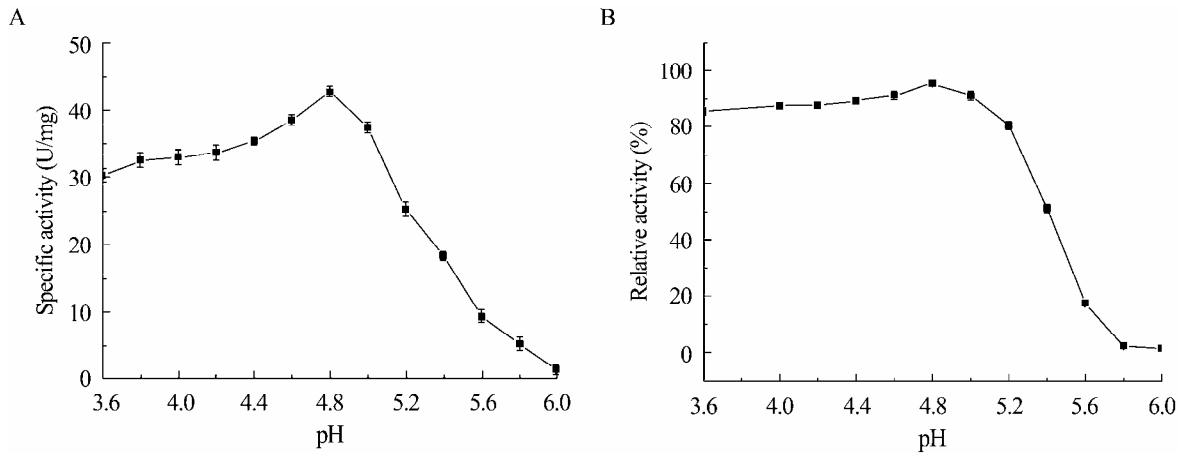


图4 谷氨酸脱羧酶的最适 pH 范围及其 pH 稳定性
Fig. 4 The optimal pH (A) and pH stability (B) of GAD.

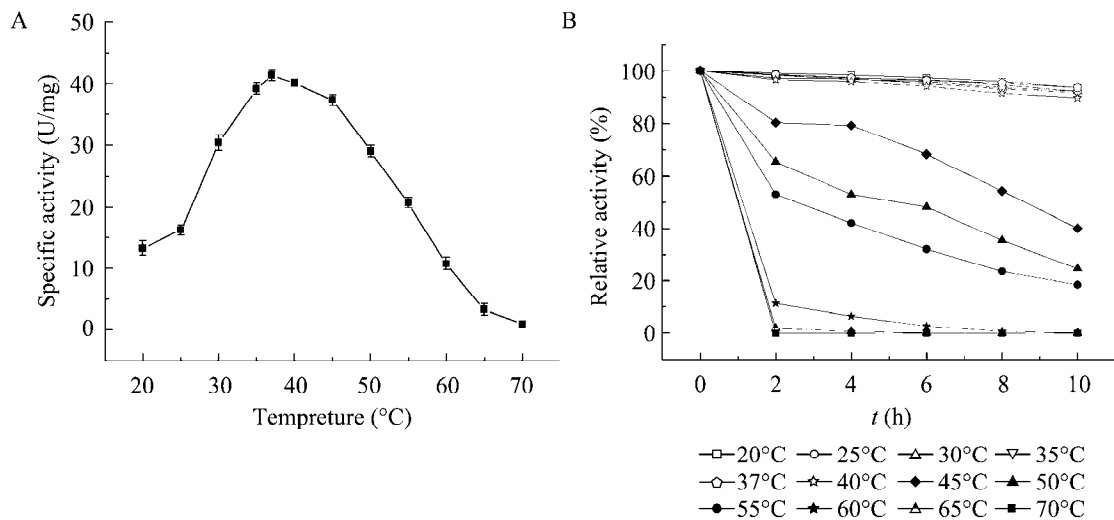


图5 谷氨酸脱羧酶的最适反应温度及其热稳定性
Fig. 5 The optimal temperature (A) and thermal stability (B) of GAD.

性逐渐下降, 到达 60 °C 时水浴保温 2 h, GAD 迅速失活, 几乎检测不到酶活且酶液出现絮状沉淀, 酶可能完全变性失活。

2.4.3 不同金属离子及 EDTA 对酶活性的影响

金属离子经常可以作为酶促反应的辅助因子, 因此在酶促反应中经常添加某些金属离子来促进酶促反应的进行。在 GAD 酶促反应中添加各

种金属离子以及 EDTA, 其中以不加离子时的反应液作为对照, 设其酶活为 100%, 其对 GAD 酶活的影响结果见表 2。可以看出 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ag^+ 、 Cu^{2+} 均对植物乳杆菌 GAD 的活力有较大的抑制作用, Li^+ 、 K^+ 、 Na^+ 等对活性影响不明显, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对该酶有较强的激活作用。为了进一步研究 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对该重组酶 GAD 的影响, 考

察了两种不同浓度金属离子对重组酶 GAD 的影响, 确定最佳激活浓度, 如图 6 所示: 2.5 mmol/L Ca^{2+} 时激活作用最明显, 相对酶活达 154%, 3.5 mmol/L Mg^{2+} 对重组酶 GAD 的激活作用最强,

酶活达 131%, 可以考虑全细胞转化体系中添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 作为 GAD 酶促反应的辅助因子, 以期提高反应体系中 GAD 酶活, 增强其转化 L-谷氨酸产 GABA 能力。

表 2 金属离子及 EDTA 对 GAD 酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ion and EDTA on the activity of GAD

| Ion | Ca^{2+} | Mg^{2+} | Mn^{2+} | Fe^{2+} | Fe^{3+} | Cu^{2+} | Li^{+} | K^{+} | Na^{+} | Ag^{+} | Al^{3+} | EDTA |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|------|
| Relative activity (%) | 121.0 | 109.0 | 35.9 | 16.2 | 30.3 | 16.2 | 96.6 | 92.6 | 96.0 | 32.0 | 92.0 | 90.7 |

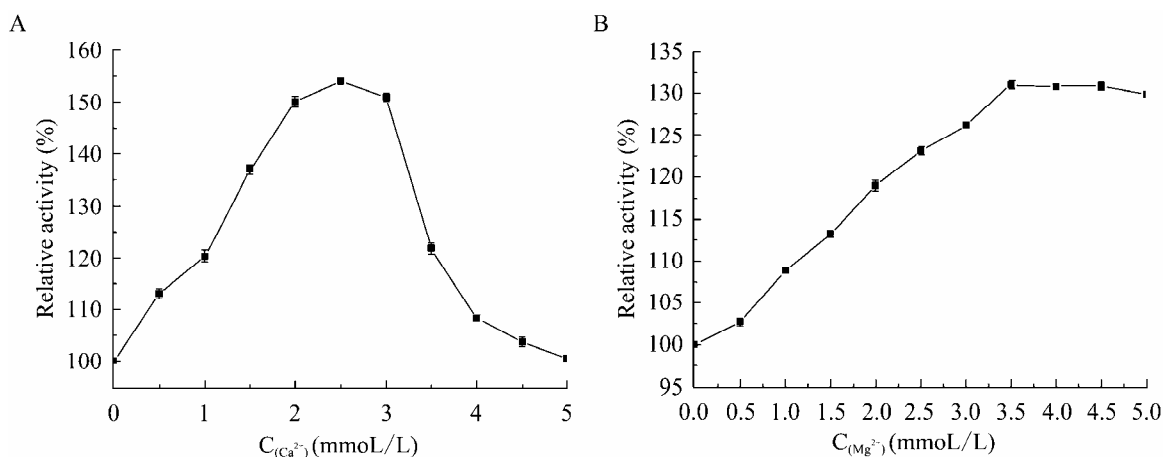


图 6 不同浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对 GAD 酶活的影响

Fig. 6 Effect of different concentration Ca^{2+} (A) and Mg^{2+} (B) on the activity of GAD.

2.4.4 谷氨酸脱羧酶 K_m 值和 V_{\max} 测定

根据不同底物浓度与酶促反应的关系, 按照米氏方程, 采用 Lineweaver-Burk 作图法, 求重组 GAD 的表观米氏常数, 如图 7, 可以得到 K_m 为 9.21 mmol/L, V_{\max} 为 7.58 mmol/(L·min)。

2.5 全细胞转化条件的确定

通过对重组谷氨酸脱羧酶 GAD 酶学性质的初步研究, 确定了其最适作用温度、最适 pH 以及不同金属离子和 EDTA 对重组 GAD 酶活性的影响, 根据酶学性质的研究结果, 将转化体系的

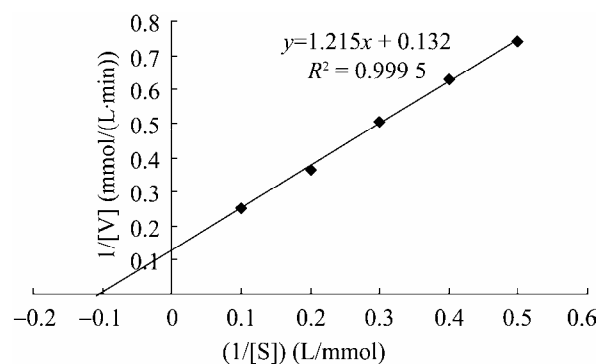


图 7 重组 GAD 的 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of recombinant GAD.

温度、pH 分别调整至最适值，并向其中添加对重组酶 GAD 具有促进作用的金属离子，以此确定最适转化条件为：乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 4.8)、2.5 mmol/L Ca^{2+} 、3.5 mmol/L Mg^{2+} ，转化温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 重组大肠杆菌转化 L-谷氨酸产 GABA 研究

将 5 L 发酵罐中培养至 14 h 的菌体进行离心收集，双蒸水洗涤 3 次后，2 L 乙酸-乙酸钠缓冲液悬浮，菌体浓度达 6.2 g/L，添加底物 L-谷氨酸，分别在原始和优化后的条件下进行全细胞转化，以 50 g/L 的投料量进行分批投料，前期由于酶活水平较高，反应速率较快，投料间隔为每 3 h

投料一次，随着反应的进行，酶活有所下降，反应速度变慢，12 h 后，投料时间间隔延长到 6 h，在转速 250 r/min、通气量 120 L/h 的条件下转化 24 h，反应结束后转化液离心取上清，加入 15% 的三氯乙酸终止反应，取 1 mL 进行适当稀释后，氨基酸自动分析仪测得优化前后反应体系的转化液中产物 GABA 浓度分别为 143.5 g/L 和 204.5 g/L，转化率分别为 97.32% 和 97.92%，与最初转化条件相比，相同转化时间下，优化后反应体系的转化液中 GABA 累计浓度提高了 42.5%。条件优化前后，全细胞转化液氨基酸自动分析仪测定结果如图 8 所示：

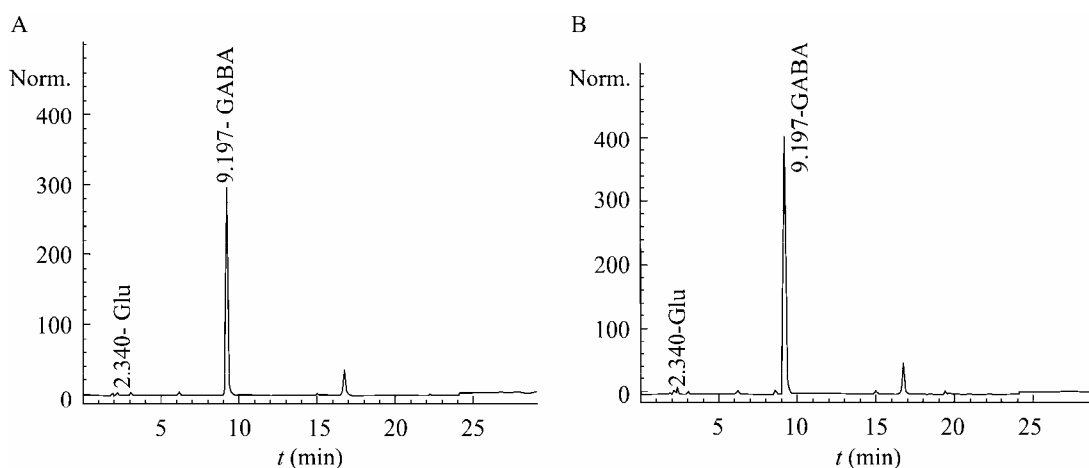


图 8 氨基酸自动分析仪测定条件优化前后全细胞转化液中 L-Glu 与 GABA 的含量图谱

Fig. 8 Map of GABA and L-Glu of whole cell transformation solutions analyzed by auto amino acid analyzer. (A) Original condition. (B) Optimized condition.

3 讨论

本课题组前期研究结果表明：一方面，植物乳杆菌厌氧培养时 GABA 产量高于有氧环境，因此生长速度较好氧微生物慢，影响了菌体的生长；另一方面，植物乳杆菌中的低拷贝 *lpgad* 基

因使得 GAD 的表达量有限，粗酶液酶活仅有 2.01 U/mg，限制了 GABA 的生产效率。而增大酶的表达量及提供其合适的作用条件是提高全细胞转化效率的两个重要策略，本文构建了一株重组大肠杆菌 BL21/pET-28a (+) -*lpgad*，借助其生长迅速、可高密度培养及 pET-28a 表达质粒中

T7 强启动子等优点,在简化培养条件、缩短培养时间的基础上,大幅度提高了 GAD 的表达量,重组菌破细胞后粗酶液酶活为植物乳杆菌中 GAD 酶活的 4.24 倍。另外,利用 6-His-Tag 采用 Ni-NTA 柱亲和层析法将重组菌中 GAD 进行纯化,并对其酶学性质进行初步研究,确定了全细胞转化时所需的酶的最适反应条件:最适 pH 为 4.8,最适温度为 37 °C, Ca²⁺、Mg²⁺作为激活剂。在此条件下,添加底物 L-谷氨酸,5 L 发酵罐转化 24 h, GABA 累计浓度高达 204.5 g/L,摩尔转化率为 97.92%,在国内外处于领先地位^[20],与初始转化条件相比,转化液中 GABA 累计浓度提高了 42.5%,在实验室条件下实现了微生物高效率生产 GABA,为其工业化应用奠定了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Krnjevic K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev*, 1974, 54(2): 418–540.
- [2] Mao YH, Shan Pu YM. Research on physiological function of γ -aminobutyric acid in recent years-the center of brain improvement and hypertension function. *Food Explor*, 2001, 36(6): 9–13.
茅原纮, 杉浦友美. 近年の GABA 生理机能研究-脑机能改善作用、高血压作用を中心に. *食品と开发*, 2001, 36(6): 9–13.
- [3] 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. *Nippon Shokuhin Kashi*, 2000, 47(8): 596–603.
- [4] Abbjasova LE, Tuzov DG. Method of synthesis of γ -aminobutyric acid: RU, 2202538. 2003-04-20.
- [5] Nomum M, Kimoto H, Someya Y, et al. Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J Dairy Sci*, 1998, 81(6): 1486–1491.
- [6] Li LZ, Li MY. Preparation of the Latest Biochemical Medicine. Beijing: China Med Sci Press, 2001: 79–80.
李良铸, 李明晔. 最新生化药物制备技术. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 79–80.
- [7] Choi SI, Lee J W, Park SM, et al. Improvement of γ -aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16(4): 562–568.
- [8] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, et al. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol*, 2005, 22(6): 497–504.
- [9] Huang J, Mei LH, Xia J. Application of artificial neural network coupling particle swarm optimization algorithm to biocatalytic production of gaba. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(5): 924–931.
- [10] Liu TT, Yang TW, Zhang SC, et al. Screening, identification and primary optimizing of a strain producing γ -aminobutyric acid from L-glutamate acid. *J Food Sci Biotechnol*, 2010, 29(5): 742–747.
刘婷婷, 杨套伟, 张术聪, 等. 高效转化 L-谷氨酸为 γ -氨基丁酸菌株的筛选、鉴定及初步优化. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(5): 742–747.
- [11] Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J Korean Soc Biol Chem*, 2010, 53(6): 816–820.
- [12] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, 1989: 20–25.
- [13] Joseph S, David WR. Molecular Cloning. 3rd ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, 2001: 1523–1574.
- [14] Xu JJ, Jiang B, Xu SY. Rapid determination of

- glutamate decarboxylase activity from lactic acid bacteria by spectrometric method and its applications. *Microbiol China*, 2004, 31(2): 66-71.
- 许建军, 江波, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 66-71.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(9): 248-254.
- [16] Nomura M, Nakajima I, Fujita Y. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 1999, 145(6): 1375-1380.
- [17] Hao R, Schmit JC. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa* conidia. *J Biol Chem*, 1991, 266(8): 5135-5139.
- [18] Xu JJ, Jiang B, Xu SY. Purification and partial characterization of glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis*. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2004, 23(3): 79-83.
- 许建军, 江波, 许时婴. *Lactococcus lactis* 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(3): 79-83.
- [19] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(7): 1168-1171.
- [20] Ji LL, Menghe BLG. The Physiological functions and research progress of γ -aminobutyric acid. *Acad Period Farm Prod Processing*, 2007, 6(12): 11-14.
- 冀林立, 孟和毕力格. γ -氨基丁酸的生理功能和研究进展. *农产品加工·学刊*, 2007, 6(12): 11-14.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2011 工业生物技术发展报告

中国科学院生命科学与生物技术局著
开本: 16 开 营销分类: 生物科学 装帧: 平装
978-7-03-032516-7/Q·2789 ¥ 98.00

内容简介

本书是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一, 主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展, 本书设置了规划政策篇、基地进展篇、研发进展篇、产业篇、青年人才篇、文献计量篇。在选题上, 着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感, 本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件, 重点报道了合成生物学、工业蛋白质、化学与生物技术、微藻在工业生物技术领域中的应用、绿色工艺过程、工业微生物基因组与生物信息学等内容。为了扩大本报告的读者范围, 使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况, 我们在形式上增加了英文题名和英文摘要, 以及作者英文简介。此外, 我们通过对 2010 年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾, 与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。

读者对象: 本书可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。

