

大肠杆菌高效表达屎肠球菌纤维素结合域谷氨酸脱羧酶的条件优化

Optimization of conditions for efficient expression of recombinant cellulose-binding domain-glutamate decarboxylase of *Enterococcus faecium* in *Escherichia coli*

杨胜远¹ 林 谦² 张晓宁¹ 甄嘉仪¹

YANG Sheng-yuan¹ LIN Qian² ZHANG Xiao-ning¹ ZHEN Jia-yi¹

(1. 岭南师范学院化学化工学院, 广东 湛江 524048; 2. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000)

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering of Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; 2. College of Biology and Pharmacy of Yulin Normal University, Yulin, Guangxi 537000, China)

摘要:为了规避大肠杆菌(*Escherichia coli*)自身基因组表达的天然 GAD 的干扰,以再生无定形纤维素(regenerated amorphous cellulose,RAC)特异性吸附纤维素结合结构域谷氨酸脱羧酶(cellulose-binding domain-glutamate decarboxylase,CBD-GAD)制备的 RAC-CBD-GAD 固定化酶作为评价指标,采用单因素和田口试验设计法对 *E. coli* GDMCC60445 高效表达 CBD-GAD 的条件进行了优化。结果表明,*E. coli* GDMCC60445 表达 CBD-GAD 的适宜培养基为改良 LB (Luria-Bertani)培养基,其组成为胰蛋白胨 8 g/L、酵母膏 6 g/L、NaCl 10 g/L、pH 5.5;适宜的培养条件为温度 37 °C、摇床转速 120 r/min、培养时间 24 h。在该适宜条件下,RAC-CBD-GAD 活力为(419.79±10.37) U/g,与田口法预测值一致,较优化前提高了(30.28±3.22)%。

关键词:纤维素结合域;谷氨酸脱羧酶;表达;屎肠球菌;大肠杆菌;培养条件

Abstract: In order to avoid the interference of natural GAD expressed by the own genome of *Escherichia coli*, the recombinant cellulose-binding domain glutamate decarboxylase (CBD-GAD) was firstly immobilized by regenerated amorphous cellulose (RAC), and then the RAC-CBD-GAD immobilized enzyme was isolated and used as an evaluation index to optimize the culture conditions for highly efficient expression of CBD-GAD in *E. coli* GDMCC60445 by one-factor-at-a-time and Taguchi methods. The

results indicated that the optimal medium for *E. coli* GDMCC60445 to express CBD-GAD was modified Luria-Bertani (LB) medium, which was consisted of 8 g/L tryptone, 6 g/L yeast extract, 10 g/L sodium chloride, and pH 5.5. The suitable culture conditions were 37 °C, 120 r/min and 24 h. Under the optimal conditions, the activity of RAC-CBD-GAD prepared from *E. coli* GDMCC60445 was (419.29±10.37) U/g, which was consistent with the predicted value of Taguchi and improved by (30.28±3.22)% as compared to the initial one.

Keywords: cellulose-binding domain; glutamate decarboxylase; expression; *Enterococcus faecium*; *Escherichia coli*; culture condition

谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD, EC4.1.1.15)可专一地催化 L-谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu) α -羧基发生脱羧作用,在 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)生物合成和手性物质 DL-谷氨酸(DL-glutamic acid, DL-Glu)的拆分方面具有重要作用^[1-3]。由于乳酸菌具有较好的安全性,在发酵食品中已广泛应用,乳酸菌 GAD 受到了极大关注,已发现 *Lactobacillus rhamnosus*^[4]、*Lactobacillus paracasei*^[5]、*Lactobacillus sakei*^[6]、*Lactobacillus brevis*^[7]、*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*^[8]、*Pediococcus pentosaceus*^[9]、*Enterococcus faecium*^[10] 和 *Lactobacillus plantarum*^[11] 等微生物均具有 GAD。然而,GAD 通过催化 L-Glu 发生脱羧而消耗质子,改善微生物细胞微环境 pH,从而消除酸对细胞的不利影响,即 GAD 的主要生理功能是提高微生物的耐酸能力^[12-13]。因此,野生株 GAD 通常表达量不高,远不能满足工业用酶需求。同时,游离

基金项目:广东省自然科学基金项目(编号:2014A030307039); 岭南师范学院科研专项项目(编号:ZL1602)

作者简介:杨胜远(1972—),男,岭南师范学院教授,博士。

E-mail: yangsy1972@163.com

收稿日期:2019-03-03

酶易受杂蛋白干扰,不能回收利用,是造成应用成本居高不下的主要原因。固定化酶可克服游离酶的缺点,但固定化酶制备方法的实用性、酶活回收率、稳定性和成本等问题也严重制约着固定化酶的应用。因此,通过基因工程技术构建工程菌高效表达 GAD,特别是在 GAD 中引入对特定载体具有特异吸附的亲亲和标签,实现低成本固定化酶生产,将是解决工业用酶的重要途径。GAD 基因工程菌的构建和 GAD 的固定化已成为研究的焦点^[14-18]。

纤维素在商业上可以以多种不同的形式存在,来源丰富,价格低廉,化学惰性,对大多数蛋白质非特异性亲和力和低,是一种优质的载体。大多数纤维素降解酶包含 3 个结构域:纤维素结合结构域 (cellulose-binding domain, CBD)、柔性连接区域和催化结构域^[19-21],因此可利用 CBD 与纤维素发生特异和不可逆结合的特性,将 CBD 开发为亲和标签,构建融合蛋白,与纤维素亲和吸附制备固定化酶^[21-25]。如能构建并高效表达出纤维素结合域谷氨酸脱羧酶 (cellulose-binding domain-glutamate decarboxylase, CBD-GAD) 融合酶,通过纤维素进行固定化,将对 GAD 的应用推广具有很好的促进作用。

在前期研究中,笔者^[26]已经获得了酶学性质良好的、GAD 活性较高的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 野生菌株,并成功构建了可表达屎肠球菌 CBD-GAD 的工程菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) GDMCC60445。由于宿主菌 *E. coli* 自身存在 *gadB* 基因,可表达自身 GAD,对 CBD-GAD 表达以及 CBD-GAD 活力测定均存在严重干扰。然而,关于如何通过针对性的测定 CBD-GAD 融合酶的酶活而不是 GAD 总酶活,探索出适宜 CBD-GAD 融合酶的高效表达条件,尚鲜见报道。田口试验设计法是日本田口玄一在费歇尔多元配制法试验设计的基础上开发的试验技术,通过对两批次试验结果的均值分析和信噪比分析,能较好地预测和优化工程条件。本试验拟以固定化酶特异性评价 CBD-GAD 酶活的方法,采用田口试验设计法对大肠杆菌高效表达屎肠球菌 CBD-GAD 条件进行探讨,以期对相关酶工程研究提供借鉴和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

E. coli GDMCC60445:本试验自行构建的可表达屎肠球菌 CBD-GAD 融合酶的工程菌株,作为专利菌种保藏于广东省微生物菌种保藏中心;

γ -氨基丁酸(质量分数 $\geq 99\%$)、异硫氰酸苯酯 (phenylisothiocyanate, PITC) 和 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP):美国 Sigma 公司;

乙腈、乙酸、三乙胺:色谱纯,美国 TEDIA 公司;

氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp):钠盐,美国药典级,生工生物工程(上海)有限公司;

其他试剂:生化试剂或分析纯试剂,市售;

再生无定形纤维素 (regenerated amorphous cellulose, RAC):参照文献^[27]制备;

LB 培养基 (Luria-Bertani):参照文献^[28]配制,略有改变,配方为胰蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L、NaCl 10 g/L、L-谷氨酸一钠 (monosodium glutamate, MSG) 10 g/L、Amp 0.1 g/L, pH 7.0;

NB (nutrient broth, 营养肉汤) 培养基:参照文献^[28]配制,略有改变,配方为牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L、MSG 10 g/L、Amp 0.1 g/L, pH 7.0;

TYG (Tryptone-Yeast extract-Glucose) 培养基:参照文献^[29]配制,略有改变,配方为胰蛋白胨 5 g/L、酵母膏 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、MSG 10 g/L、Amp 0.1 g/L, pH 7.0;

PSB (peptone-sucrose-beef extract) 培养基:参照文献^[10]配制,略有改变,配方为蛋白胨 15 g/L、牛肉膏 10 g/L、蔗糖 12.5 g/L、乙酸钠 6 g/L、MSG 10 g/L、吐温 80 1.0 g/L、Amp 0.1 g/L, pH 7.0;

上述培养基按照配方配制,分装于规格 250 mL 三角瓶,每瓶 120 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却并于临用前加入 Amp。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:1200 Series 型,配置 G1354A 四元梯度泵、G1316A 柱温箱、G1314B 可变波长紫外检测器、Chemstation 工作站,美国安捷伦公司;

恒温振荡培养箱:HZQ-F100 型,金坛市精达仪器制造有限公司;

台式高速冷冻离心机:TGL16M 型,盐城市凯特实验仪器有限公司;

冷冻水浴恒温振荡器:SHA-2 型,江苏省金坛市三和仪器有限公司;

电子分析天平:AUX120 型,日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 粗酶液提取与 RAC-CBD-GAD 制备 将 *E. coli* GDMCC60445 发酵液 120 mL 于 4 °C、8 500 r/min 离心 15 min,收集菌体,加入 30 mL 生理盐水,搅拌分散洗涤菌体,再次离心收集菌体,然后加入 pH 8.0、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 10 mL,冰水浴中 400 W 超声波破碎细胞(工作 5 s,冷却 5 s,全程 50 min)。将细胞破碎液于 8 500 r/min、4 °C 离心 15 min,上清液即为粗酶提取液。取 8 mL 粗酶提取液与 0.6 g 湿 RAC 混合,30 °C、50 r/min 振荡 15 min,滤出液体,即可获得 RAC 固定化 CBD-GAD(表示为 RAC-CBD-GAD),然后采用 pH 8.0、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 40 mL 分 5 次洗涤 RAC-CBD-GAD,再采用生理盐水 40 mL 分 5 次洗涤 RAC-CBD-GAD,抽滤去除洗涤液,即为纯 RAC-CBD-GAD。

1.3.2 GAD活力测定 为了减少CBD-GAD制备过程的损失和宿主菌 *E. coli* 自身基因组表达的 GAD 的影响所造成的误差,本试验通过测定 RAC-CBD-GAD 活力评价 CBD-GAD 融合酶的表达情况。

将 RAC-CBD-GAD 0.2 g 与 pH 4.8、0.25 mol/L L-Glu 溶液(溶于 0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液,含 0.2 mmol/L PLP) 10 mL 混合,40 °C、80 r/min 水浴振荡反应 30 min,立即吸取反应液 0.5 mL 与无水乙醇 0.5 mL 混合终止反应,8 500 r/min 离心 15 min,取上清液采用 HPLC 测定 GABA。

GAD 活力单位定义为:在上述测定条件下 1 min 生成 1 μ mol GABA 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。以单位质量 RAC-CBD-GAD 所具有的 GAD 酶活(U/g)或以 GAD 酶活最高的试验组 RAC-CBD-GAD 平均酶活为 100% 计算相对酶活(%)表示。

1.3.3 HPLC 测定 GABA 参照文献[29]进行测定。HPLC 色谱条件为:ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱;检测波长 254 nm;进样量 20 μ L,柱温 25 °C。

1.3.4 种子液的制备 吸取 -25 °C 甘油保藏 *E. coli* GDMCC60445 菌种 1 mL,接入 LB 培养基,37 °C、120 r/min 振荡培养 12 h。

1.3.5 RAC 添加量对 CBD-GAD 固定化的影响 将粗酶提取液 8 mL 分别与 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g RAC 进行固定化制备 RAC-CBD-GAD,并测定其活力。根据 RAC-CBD-GAD 最大总酶活对应的 RAC 用量乘以安全系数 3 确定试验所需 RAC 用量,以保证吸附载体充裕,最大限度吸附回收 CBD-GAD。

1.3.6 不同培养基对 CBD-GAD 表达的影响 分别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 120 mL LB 培养基、NB 培养基、TYG 培养基、PSB 培养基,37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.7 MSG 添加量对 CBD-GAD 表达的影响 分别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 MSG 添加量分别为 0.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 g/L 的 120 mL、pH 5.5 的 LB 培养基,37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.8 Amp 对 CBD-GAD 表达的影响 按种子液制备方法,将 *E. coli* GDMCC60445 在不含 Amp 的 LB 培养基中连续转接 5 批次作为种子液,然后吸取 2 mL 接入 120 mL 不含 Amp 的 LB 培养基,37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。以含 0.1 g/L Amp 的 LB 培养基按照同样操作作为对照。

1.3.9 培养基初始 pH 值对 CBD-GAD 表达的影响 分

别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 120 mL 初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 LB 培养基,37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.10 培养温度对 CBD-GAD 表达的影响 分别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 120 mL LB 培养基,分别于 31、34、37、40、43 °C、120 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.11 转速对 CBD-GAD 表达的影响 分别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 120 mL LB 培养基,在 37 °C 分别于 0、80、100、120、140 r/min 振荡培养 24 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.12 发酵时间对 CBD-GAD 表达的影响 分别取 *E. coli* GDMCC60445 种子液 2 mL 接入 120 mL LB 培养基,37 °C、120 r/min 分别振荡培养 12、24、36、48、60 h。收集细胞,制备 RAC-CBD-GAD 并测定其活力。

1.3.13 田口试验设计 结合单因素试验结果选择 LB 培养基,以 pH、胰蛋白胨和酵母膏为考察因素,采用 Minitab 15 软件选择田口试验设计法进行优化。以两批次重复试验的结果作为响应值,采用田口试验分析的望大法分析均值和信噪比,从而确定各因素的最优水平。根据单因素试验结果,各组试验培养基中均未添加 MSG 和 Amp,NaCl 添加量均为 10 g/L。规格为 250 mL 三角瓶装液量 120 mL,121 °C 灭菌 20 min。

1.3.14 数据处理与分析 利用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件采用单因素方差分析(ANOVA)的最小显著差数法(LSD)进行统计分析。图表中英文字母相同表示两组间差异不显著($P>0.05$),英文字母不同表示两组间差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 RAC 添加量对 CBD-GAD 固定化的影响

当大肠杆菌存在外源酶的同工酶时,由于酶活测定无法区分同工酶的各自活力,对外源酶的高效表达条件研究造成非常大的困扰,无从确定优化的结果是有利于自身的天然酶表达还是有利于外源酶的表达。虽然在理论上,可采用宿主菌作为对照,以工程菌表达的同工酶的总酶活扣除宿主菌表达的天然酶的酶活,作为工程菌表达的外源酶的酶活,但是转化了外源酶的重组质粒后,质粒对宿主菌天然酶基因的表达是否具有影响尚未知,因此以宿主菌作为对照,研究外源酶的表达条件并不可取。由于 RAC 对含有 CBD 的融合酶具有很强的特异性吸附性能,因此本试验先采用 RAC 将 CBD-GAD 与大肠杆菌自身的 GAD 天然酶和其他杂蛋白分离,再通过测定固定化酶 RAC-CBD-GAD 活性,可解决 *E. coli* 的 GAD 天然酶对酶活力测定的干扰。但是,由于表达条件优化中不

同条件下 CBD-GAD 的量存在差异,因此必须具有充足的 RAC 以保证能最大限度地不同批次的粗酶液 CBD-GAD 完全吸附。

从图 1 可见,当 0.2 g RAC 与 8 mL CBD-GAD 粗酶液混合,RAC-CBD-GAD 总酶活已达最大值,继续增加 RAC,RAC-CBD-GAD 总酶活基本恒定,与 0.1 g RAC 试验组差异显著($P < 0.05$),而与其他各组差异不显著($P > 0.05$)。结果说明 0.2 g RAC 已能将 8 mL CBD-GAD 粗酶液的 CBD-GAD 完全吸附。为了能保证 RAC 充足,试验预设安全系数为 3,即选择 0.6 g RAC 用于 8 mL 粗酶液 CBD-GAD 的固定化。

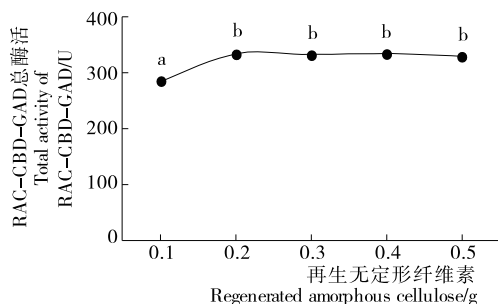


图 1 RAC 添加量对 CBD-GAD 固定化的影响

Figure 1 Effect of amount of RAC on the immobilization of CBD-GAD

2.2 培养基对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

从图 2 可知,以 LB、NB、TYG、PSB 培养基发酵的 *E. coli* GDMCC60445 均可表达 CBD-GAD 融合酶,其中以 LB 培养基发酵表达 CBD-GAD 最高,与其他试验组差异极显著($P < 0.01$);与 LB 培养基相比,NB、TYG、PSB 培养基获得的 RAC-CBD-GAD 相对酶活仅分别为 $(74.14 \pm 2.46)\%$, $(0.95 \pm 0.22)\%$, $(78.04 \pm 6.74)\%$ 。结果表明,LB 培养基更适宜 *E. coli* GDMCC60445 表达 CBD-GAD。

2.3 MSG 添加量对 CBD-GAD 表达的影响

由图 3 可见,MSG 添加量为 0.0~12.5 g/L 时 RAC-CBD-GAD 活力基本一致,无显著性差异($P > 0.05$),说明

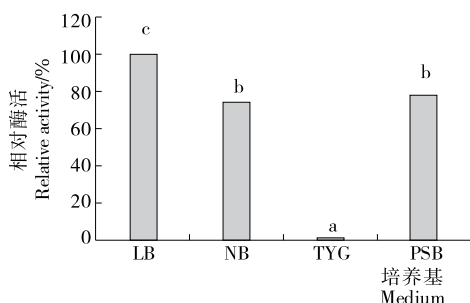


图 2 不同培养基对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 2 Effect of different medium on the expression of fusion CBD-GAD

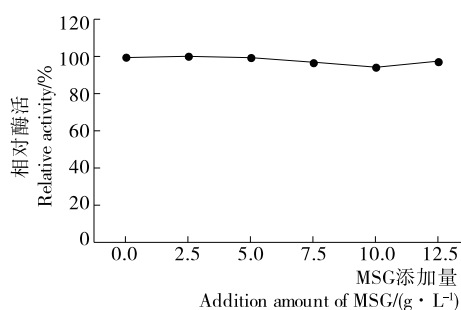


图 3 L-谷氨酸钠对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 3 Effect of addition amount of MSG on the expression of fusion CBD-GAD

MSG 对 *E. coli* GDMCC60445 表达 CBD-GAD 融合酶无影响。因此,选择不添加 MSG。

MSG 是 GAD 催化反应底物,可以在 GAD 催化下发生脱羧作用而减轻质子对细胞的危害,因此为了通过 MSG 的诱导或抗酸作用而提高 GAD 的表达,常在培养基中添加 MSG^[10,30-31]。本试验表明 MSG 对 *E. coli* GDMCC60445 工程菌产 CBD-GAD 无影响,其原因可能是本试验构建的 *E. coli* GDMCC60445 工程菌采用胁迫诱导型启动子 P_{rpoS} ,MSG 对其无诱导作用,同时培养条件为弱酸环境,对 *E. coli* 细胞影响不大,通过 MSG 脱羧抗酸的生理效应不显著。

2.4 Amp 对 CBD-GAD 表达的影响

基因工程菌容易丢失质粒,通常需要在培养基中添加与工程菌抗性标记相对应的抗生素以防止质粒丢失^[25,31-33]。然而抗生素价格昂贵,应用成本高,风险大,不利于工业应用。*E. coli* GDMCC60445 工程菌携带 *Amp^R* 抗性标记,图 4 对 *E. coli* GDMCC60445 工程菌是否需要在培养基中添加 Amp 以确保 CBD-GAD 正常表达进行了考察。结果显示 *E. coli* GDMCC60445 工程菌连续在无 Amp 的种子培养基中连续转接 5 批次,并在无 Amp 的培养基中发酵,其表达 CBD-GAD 的能力与添加 Amp 的对照组一致,无显著性差异($P > 0.05$)。结果表明,*E. coli* DH5 α -LNSF02 工程菌性能稳定,培养基不需添加氨苄青霉素。

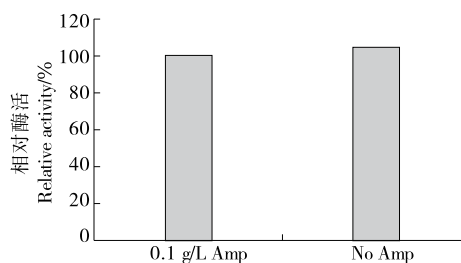


图 4 氨苄青霉素对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 4 Effect of ampicillin on the expression of fusion CBD-GAD

2.5 培养基初始 pH 值对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

图 5 显示,培养基的初始 pH 对 CBD-GAD 的表达影响较大。培养基初始 pH 为 5.5 和 6.0 时,RAC-CBD-GAD 相对酶活较大,随着培养基初始 pH 降低或增高,RAC-CBD-GAD 相对酶活均逐渐下降。虽然统计分析结果表明,pH 5.5 试验组与 pH 6.0 试验组之间无显著性差异($P>0.05$),但 RAC-CBD-GAD 相对酶活的平均值最高,因此选择培养基的初始 pH 为 5.5。

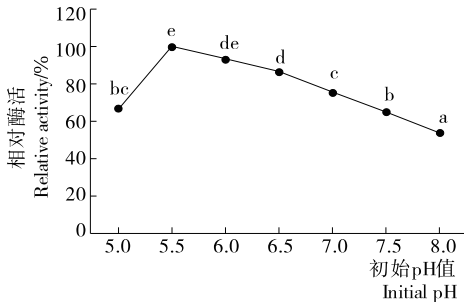


图 5 初始 pH 对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 5 Effect of initial pH value on the expression of fusion CBD-GAD

E. coli 通常在中性环境生长较好,但本试验表明培养基的初始 pH 为 5.5 时更有利于 CBD-GAD 的表达,说明 CBD-GAD 的表达与宿主菌的生长并不协同,在偏酸性条件下更利于胁迫诱导型启动子 P_{rpoS} 发挥作用,启动 CBD-GAD 的表达。

2.6 培养温度对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

由图 6 可见,培养温度低于 37 °C 时,RAC-CBD-GAD 的相对酶活随着温度的升高而增大,当超过 37 °C,活力迅速下降,各试验组间差异极显著($P<0.01$)。结果表明,*E. coli* GDMCC60445 表达 CBD-GAD 融合酶的最适培养温度为 37 °C,与 *E. coli* 适宜生长温度一致。因此,选择培养温度为 37 °C。

2.7 摇床转速对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

从图 7 可见,随着摇床转速的增加,RAC-CBD-GAD 相对酶活逐渐增加,当超过 120 r/min 时,继续提高转速,

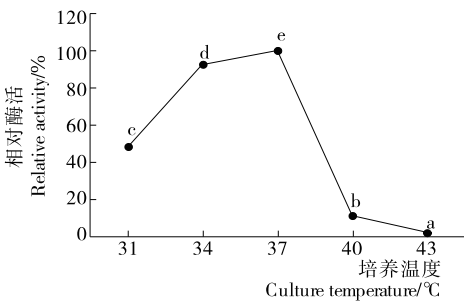


图 6 培养温度对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 6 Effect of culture temperature on the expression of fusion CBD-GAD

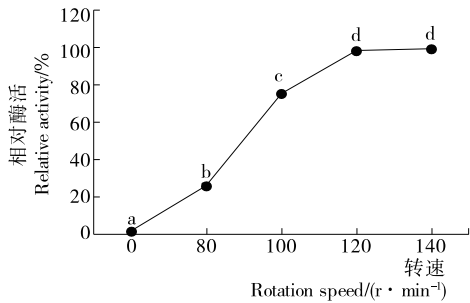


图 7 摇床转速对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 7 Effect of rotation speed on the expression of fusion CBD-GAD

RAC-CBD-GAD 活力趋于平稳,120 r/min 试验组与 140 r/min 试验组差异不显著($P>0.05$)。因此,选择摇床转速为 120 r/min。

2.8 发酵时间对 CBD-GAD 表达的影响

图 8 显示,发酵 24 h,RAC-CBD-GAD 活力最大,继续延长发酵时间,RAC-CBD-GAD 活力略有下降;36 ~ 60 h 内趋于平稳,各试验组差异不显著($P>0.05$)。由于发酵培养不是同步培养,部分菌体因进入衰亡期而自溶,而 CBD-GAD 融合酶为胞内酶,试验中只收集细胞进行提取酶,从而造成细胞自溶释放到发酵液中的 CBD-GAD 未被收集,可能是发酵 24 h 后检测的 RAC-CBD-GAD 活力略有下降的原因。选择发酵时间为 24 h。

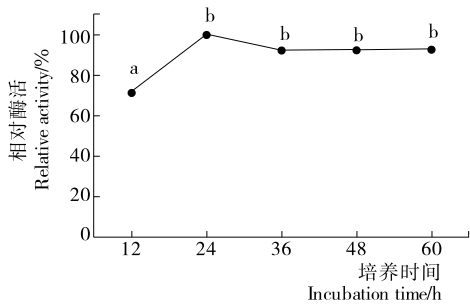


图 8 发酵时间对 CBD-GAD 融合酶表达的影响

Figure 8 Effect of fermentation time on the expression of fusion CBD-GAD

2.9 田口试验结果

因素和水平选择详见表 1,试验设计和试验结果详见表 2。因素水平的均值和信噪比分析结果详见图 9~12 和表 4~6。

表 1 试验因素与水平

Table 1 Factors and levels table

水平	A 初始 pH	B 胰蛋白胨/ (g · L ⁻¹)	C 酵母膏/ (g · L ⁻¹)
1	5.0	8	4
2	5.5	10	5
3	6.0	12	6

表 2 田口试验设计及结果

Table 2 Taguchi design matrix with the experimental values of RAC-CBD-GAD activity

试验号	A	B	C	平均酶活/(U·g ⁻¹)	
				试验 1	试验 2
1	1	1	1	271.43	282.23
2	1	2	2	287.17	291.11
3	1	3	3	298.42	303.63
4	2	1	2	428.19	436.26
5	2	2	3	402.46	417.51
6	2	3	1	394.67	416.18
7	3	1	3	378.38	386.15
8	3	2	1	362.44	377.19
9	3	3	2	347.61	361.73

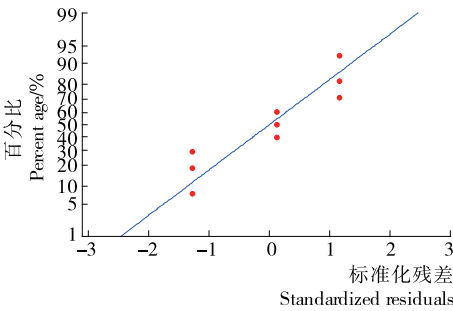


图 9 均值残差正态概率图

Figure 9 Normal probability plots of mean residuals

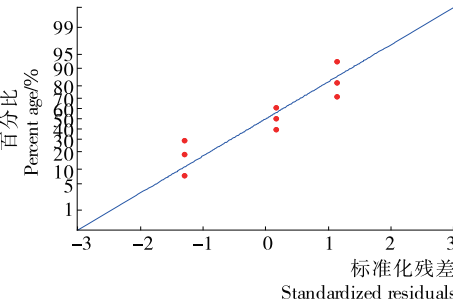


图 10 信噪比残差正态概率图

Figure 10 Normal probability plots of the residuals of signal-to-noise ratio

图 9、10 显示,各因素的均值残差和信噪比残差与模型拟合较好,为正态分布。表 3、4 表明各因素的均值响应情况为 A>C>B,其中 A 为显著因素(P<0.05),B 和 C 为不显著因素(P>0.05)。表 5、6 表明各因素的信噪比响应情况也为 A>C>B,其中 A 为显著因素(P<0.05),B 和 C 为不显著因素(P>0.05)。

根据均值和信噪比分析结果,确定显著性因素(A)为位置因子,不显著因素(B、C)为散度因子。由图 11 选择均值最大的水平作为位置因子水平,即 A₂;由图 12 选择

表 3 因素水平的均值响应分析

Table 3 Mean value response of the selected factor levels

水平	A	B	C
1	289.0	363.8	350.7
2	415.9	356.3	358.7
3	368.9	353.7	364.4
变量增量	126.9	10.1	13.7
排序	1	3	2

表 4 均值方差分析

Table 4 Analysis of variance of mean value

方差来源	自由度	平方和	校正平方和	校正均方差	F	P
A	2	24 690.9	24 690.9	12 345.4	38.78	0.025
B	2	163.8	163.8	81.9	0.26	0.795
C	2	285.5	285.5	142.7	0.45	0.690
残差误差	2	636.6	636.6	318.3		
合计	8	25 776.8				

表 5 因素水平的信噪比响应分析

Table 5 Response of signal-to-noise ratio of the selected factor levels

水平	A	B	C
1	49.21	51.07	50.78
2	52.37	50.94	50.98
3	51.33	50.90	51.16
变量增量	3.16	0.16	0.38
排序	1	3	2

表 6 信噪比方差分析

Table 6 Analysis of variance of signal-to-noise ratio

方差来源	自由度	平方和	校正平方和	校正均方差	F	P
A	2	15.56	15.56	7.78	38.01	0.026
B	2	0.04	0.04	0.02	0.11	0.905
C	2	0.21	0.21	0.11	0.52	0.660
残差误差	2	0.41	0.41	0.20		
合计	8	16.23				

可使散度最小化的水平作为散度因子的水平,即 B₁、C₃。因此,各因素和水平的最优组合为 A₂B₁C₃。

结合非考察的因素 NaCl,即可获得 *E. coli* GDM-CC60445 表达屎肠球菌 CBD-GAD 融合酶的适宜 LB 培养基(称为改良 LB 培养基)组成为:胰蛋白胨 8 g/L、酵母膏 6 g/L、NaCl 10 g/L,pH 5.5。

2.10 验证实验

采用软件“预测田口结果”功能以最优水平 A₂B₁C₃ 进行预测,预测在优化条件下获得的 RAC-CBD-GAD 酶活为(428.21±7.50) U/g。经以改良 LB 培养基作为发酵

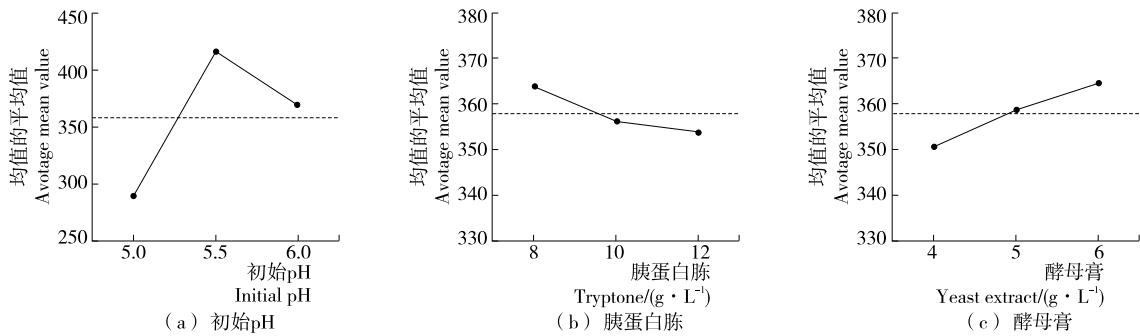


图 11 均值主效应图

Figure 11 The main effects plot of means

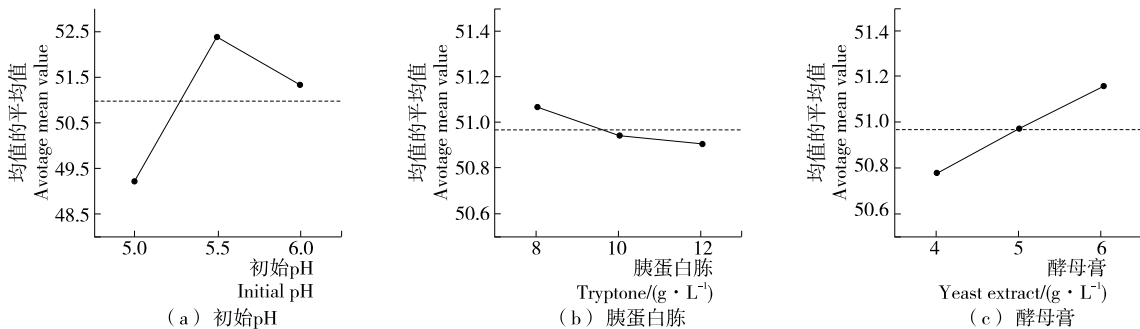


图 12 信噪比主效应图(信噪:望大)

Figure 12 The main effects plot of signal-to-noise ratio (SN; larger-the-better)

培养基进行验证实验,结果 RAC-CBD-GAD 酶活为 (419.79 ± 10.37) U/g,与预测值差异不显著 ($P > 0.05$),即验证试验结果与预测值相符。当以初始 LB 培养基进行发酵时,RAC-CBD-GAD 酶活为 (322.31 ± 13.08) U/g,与改良 LB 培养基试验组差异极显著 ($P < 0.01$)。结果表明,优化后的改良 LB 培养基较初始 LB 培养基发酵产 CBD-GAD 的能力提高了 $(30.28 \pm 3.22)\%$ 。

3 结论

在构建基因工程菌表达外源酶的研究中,当宿主菌也可表达外源酶的同工酶时,由于同工酶的催化反应相同,很难区分各自的酶活力,对外源酶的表达条件研究带来了极大困难。本试验通过利用 RAC 特异性吸附 CBD-GAD,将 CBD-GAD 与宿主菌 *E. coli* 自身基因表达的杂蛋白和天然 GAD 分离,避免了 *E. coli* 天然 GAD 和杂蛋白的影响,试验结果可真实反映 CBD-GAD 表达情况。

E. coli GDMCC60445 表达 CBD-GAD 的适宜培养基为改良 LB 培养基,其组成为胰蛋白胨 8 g/L、酵母膏 6 g/L、NaCl 10 g/L、pH 5.5;适宜的培养条件为温度 37 ℃、摇床转速 120 r/min、培养时间 24 h。培养基组成本少、成本低、配制简便,具有较好工业化应用前景。

参考文献

[1] DHAKAL R, BAJPAI V K, BAEK K H. Production of gaba

- (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(4): 1 230-1 241.
- [2] JORGE J M P, LEGGEWIE C, WENDISCH V F. A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose [J]. Amino Acids, 2016, 48(11): 2 519-2 531.
- [3] 杨成丽, 马子玉, 胡晓丽, 等. 化学—酶催化法制备 D-谷氨酸与 γ -氨基丁酸 [J]. 化学与生物工程, 2013, 30(11): 55-56.
- [4] LIN Qian. Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(1): 183-187.
- [5] KOMATSUZAKI N, SHIMA J, KAWAMOTO S, et al. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods [J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 497-504.
- [6] SA H D, PARK J Y, JEONG S J, et al. Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) from *Lactobacillus sakei* A156 isolated from Jeot-gal [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(5): 696-703.
- [7] VILLEGAS J M, BROWN L, DE GIORI G S, et al. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 67(22): 22-26.

- [8] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 唾液链球菌嗜热亚种 Y-2 细胞转化法制备 γ -氨基丁酸[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 162-167.
- [9] 李云, 杨胜远, 陈郁娜, 等. 戊糖片球菌 HS2 细胞制备 γ -氨基丁酸的研究[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(6): 1 450-1 453.
- [10] 杨胜远, 李云. 双向单因素与田口法优化屎肠球菌产谷氨酸脱羧酶培养基[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 90-98.
- [11] LEE S J, LEE H S, LEE D W. Production of γ -aminobutyric acid using immobilized glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbiology and Biotechnology Letters, 2015, 43(3): 300-305.
- [12] DE B D, TRAMONTI A, BOSSA F, et al. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: Role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(6): 1 198-1 211.
- [13] FOSTER J W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile [J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(11): 898-907.
- [14] YU Kai, LIN Ling, HU Sheng, 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.
- [15] FAN En-yu, HUANG Jun, HU Sheng, et al. Cloning, sequencing and expression of a glutamate decarboxylase gene from the GABA-producing strain *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(2): 689-698.
- [16] 李佳男, 谢滢, 胡升, 等. 羧基化磁性微球固定化谷氨酸脱羧酶[J]. 化工学报, 2017, 68(4): 1 550-1 557.
- [17] YAO Wan-ying, WU Xiao, ZHU Jun, et al. In vitro enzymatic conversion of γ -aminobutyric acid immobilization of glutamate decarboxylase with bacterial cellulose membrane (BCM) and non-linear model establishment[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(4/5): 258-264.
- [18] LEE J Y, JEON S J. Characterization and immobilization on nickel-chelated sepharose of a glutamate decarboxylase A from *Lactobacillus brevis* BH2 and its application for production of GABA[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(10): 1 656-1 661.
- [19] GILKES N R, JERVIS E, HENRISSAT B, et al. The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(10): 6 743-6 749.
- [20] HALL M, BANSAL P, LEE J H, et al. Biological pretreatment of cellulose: Enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases[J]. Biore-source Technology, 2011, 102(3): 2 910-2 915.
- [21] GOLDSTEIN M A, TAKAGI M, HASHIDA S, et al. Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* cellulose-binding protein A [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(13): 5 762-5 768.
- [22] DE LOS ÁNGELES, CALIXTO-ROMO M, SANTIAGO-HERNÁNDEZ J A, et al. Expression, purification and immobilization of the intracellular invertase INVA, from *Zymomonas mobilis* on crystalline cellulose and Nylon-6 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(11): 1 455-1 463.
- [23] ITO S, KUNO A, SUZUKI R, et al. Rational affinity purification of native *Streptomyces* family 10 xylanase[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110(2): 137-142.
- [24] LIU Zhu, BARTLOW P, DILMORE R M, et al. Production, purification, and characterization of a fusion protein of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae* and cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* [J]. Biotechnology Progress, 2009, 25(1): 68-74.
- [25] PARK H, AHN J, LEE J, et al. Expression, immobilization and enzymatic properties of glutamate decarboxylase fused to a cellulose-binding domain [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(1): 358-368.
- [26] 杨胜远, 韦锦, 曾婵, 等. 732 阳离子交换树脂对屎肠球菌谷氨酸脱羧酶活性的促进作用[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 151-157.
- [27] HONG Jiong, YE Xin-hao, WANG Yi-ran, et al. Bioseparation of recombinant cellulose-binding module-proteins by affinity adsorption on an ultra-high-capacity cellulosic adsorbent[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 621(2): 193-199.
- [28] 耿海荣, 张晨曦, 赵月菊, 等. 一株高效降解玉米赤霉烯酮的耐酸耐高温枯草芽孢杆菌的研究[J]. 核农学报, 2019, 33(7): 1 399-1 407.
- [29] NOMURA M, NAKAJIMA I, FUJITA Y, et al. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene[J]. Microbiology, 1999, 145(6): 1 375-1 380.
- [30] 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[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 79-84.
- [31] SHI Xiu-feng, CHANG Chuan-you, MA Shen-xi, 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.
- [32] SHIN S M, KIM H, JOO Y, et al. Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and Its C-terminal function for the pH dependence of activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(50): 12 186-12 193.
- [33] LIN Qian, LI Dong-li, QIN Hui-zhen. Molecular cloning, expression, and immobilization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus fermentum* YS2 [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 27: 8-13.