

研究报告

宏基因组来源重组谷氨酸脱羧酶的酶学特性及全细胞合成 γ -氨基丁酸陈红¹, 王艺霖¹, 唐湘华^{1,2,3}, 黄遵锡^{1,2,3}, 许波^{*1,2,3}

1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南 昆明 650500

陈红, 王艺霖, 唐湘华, 黄遵锡, 许波. 宏基因组来源重组谷氨酸脱羧酶的酶学特性及全细胞合成 γ -氨基丁酸[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1522-1535.

CHEN Hong, WANG Yilin, TANG Xianghua, HUANG Zunxi, XU Bo. A recombinant glutamate decarboxylase from metagenome: enzymatic properties and whole-cell catalytic synthesis of γ -aminobutyric acid[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1522-1535.

摘要:【背景】谷氨酸脱羧酶广泛存在于生物体内, 其催化产物 γ -氨基丁酸是哺乳动物重要的抑制性神经递质。目前, 微生物来源的谷氨酸脱羧酶在热和酸碱条件下仍不够稳定。【目的】挖掘肠道微生物的谷氨酸脱羧酶基因, 异源表达并研究其酶学性质, 为 γ -氨基丁酸的生物合成提供酶原。

【方法】从倭蜂猴粪便微生物宏基因组扩增谷氨酸脱羧酶基因, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行异源表达、酶学性质研究及全细胞合成 γ -氨基丁酸的应用。【结果】获得谷氨酸脱羧酶基因 *XbyI_8*, 重组酶 *XbyI_8* 分子量为 54.46 kDa, 最适作用条件为 pH 5.0、55 °C, K_m 和 V_{max} 分别为 (10.2 ± 1.5) mmol/L 和 $(3\ 574.0 \pm 198.3)$ μ mol/(min·mg), 较其他微生物来源的谷氨酸脱羧酶具有最高比活 3 106.2 U/mg。XbyI_8 具有较好的 pH 和温度稳定性, pH 4.0–8.0 或 30–50 °C 处理 1 h, 剩余酶活仍高于 100%。在 L-谷氨酸浓度 260 mmol/L, 反应温度 55 °C, 细胞浓度 OD_{600} 为 3.5 条件下反应 2.5 h, 重组菌 *E. coli/XbyI_8* 全细胞催化制备 γ -氨基丁酸的转化率为 100%。【结论】从粪便微生物宏基因组中获得谷氨酸脱羧酶基因 *XbyI_8*, 并成功在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。重组酶 *XbyI_8* 的 pH 和温度稳定性较好, 重组菌 *E. coli/XbyI_8* 全细胞催化制备 γ -氨基丁酸具有较高的转化率, 在食品、工业等领域具有潜在的应用价值。

关键词: 宏基因组; 粪便微生物; 谷氨酸脱羧酶; γ -氨基丁酸; 全细胞催化

资助项目: 国家自然科学基金(32360034, 31860299)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360034, 31860299).

*Corresponding author. E-mail: xubo128028@163.com

Received: 2023-08-22; Accepted: 2023-11-30; Published online: 2024-01-23

A recombinant glutamate decarboxylase from metagenome: enzymatic properties and whole-cell catalytic synthesis of γ -aminobutyric acid

CHEN Hong¹, WANG Yilin¹, TANG Xianghua^{1,2,3}, HUANG Zunxi^{1,2,3}, XU Bo^{*1,2,3}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500, Yunnan, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Background] Glutamate decarboxylase is widely present in organisms. γ -aminobutyric acid, the catalytic product of glutamate decarboxylase, is an inhibitory neurotransmitter in mammals. At present, many glutamate decarboxylases from microorganisms have poor thermal stability and acid-base stability. [Objective] To heterologously express a glutamate decarboxylase gene mined from gut microbiota and study the enzymatic properties of the recombinant protein, so as to provide an enzyme source for the biosynthesis of γ -aminobutyric acid. [Methods] The glutamate decarboxylase gene was amplified from the fecal microbial metagenome of *Pygmy loris* and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The enzymatic properties of the recombinant enzyme were characterized, and the enzyme was then used for the whole-cell synthesis of γ -aminobutyric acid. [Results] The glutamate decarboxylase gene *Xbyl_8* was obtained, and the molecular weight of the recombinant enzyme Xbyl_8 was 54.46 kDa. Under optimal reaction conditions of pH 5.0 and 55 °C, the K_m and V_{max} values of the enzyme were (10.2 ± 1.5) mmol/L and $(3\ 574.0 \pm 198.3)$ μ mol/(min·mg), respectively. Xbyl_8 had the highest specific activity of 3 106.2 U/mg compared with other glutamate decarboxylases from microbial sources. Xbyl_8 had good pH and thermal stability. The residual activity of Xbyl_8 was still more than 100% after incubation at pH 4.0–8.0 or 30–50 °C for 1 h. The whole-cell recombinant *E. coli*/Xbyl_8 (OD_{600} of 3.5) reacted with 260 mmol/L L-glutamic acid at 55 °C for 2.5 h showed the conversion rate of 100% for the production of γ -aminobutyric acid. [Conclusion] The glutamate decarboxylase gene *Xbyl_8* was obtained from the fecal microbial metagenome and successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). This enzyme has good pH and thermal stability. The whole cell preparation of γ -aminobutyric acid from recombinant *E. coli*/Xbyl_8 has a high conversion rate, thereby demonstrating promising potential for application in food and industrial fields.

Keywords: metagenome; fecal microorganism; glutamate decarboxylase; γ -aminobutyric acid; whole-cell catalysis

谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD, EC 4.1.1.15) 是催化 L-谷氨酸脱羧生成 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA) 的关键酶, 属于磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP) 依赖性酶^[1]。研究证实, GABA 是哺乳动物中枢神经系统的主要抑制性神经递质^[2], 与调节突触传递、抗氧化、镇静止痛等有关, 能促进生物机体健康^[3], 被广泛应用于医疗、食品和农业等行业。

目前, GABA 主要通过植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)^[4]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[5]、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[6] 等细菌及酵母和霉菌^[4] 催化合成。生产方法包括直接发酵^[4]、生物酶法^[7] 和全细胞催化^[8], 全细胞催化通过诱导微生物胞内表达 GAD, 经胞内 GAD 催化底物生成 GABA。

研究表明, 肠道微生物产生的 GABA 与宿主的健康和疾病息息相关, 是调节肠-脑轴通讯的重要神经递质^[9], 调节宿主的焦虑情绪、抑郁行为、癫痫症状等^[10]。此外, GABA 还存在于肠神经和黏膜内分泌样细胞中, 是影响胃肠道功能的内分泌介质^[11]。然而, 肠道微生物不易培养, 限制了该环境中 GABA 产生菌及其 GAD 的研究。宏基因组学技术避开了肠道菌群的分离培养, 是获取新基因的有效方法^[12]。目前, 研究者已从污染湖泊宏基因组中获得植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 来源的谷氨酸脱羧酶 *gad3*, 并成功进行了异源表达^[13]。

研究发现, 倭蜂猴 (*Pygmy loris*) 粪便微生物宏基因组中存在氨基酸代谢有关的多种酶类基因^[14]。因此, 本研究从中筛选、扩增 GAD 基因, 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中进行异源表达和性质表征, 并研究全细胞合成 GABA 的发酵条件, 为 GABA 的生物合成挖掘新型微生物基因资源。

1 材料与方法

1.1 样品

载体 pEASY-E2、倭蜂猴粪便微生物宏基因组 DNA, 本实验室保藏; 大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 (*Nde* I 和 *Xho* I) 和 PrimeSTAR Max DNA Polymerase, TaKaRa 公司; 氨苄青霉素钠, 北京索莱宝科技有限公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒, Omega 公司; L-谷氨酸和 γ -氨基丁酸, 上海源叶生物科技有限公司; Ni-NTA Agarose, Qiagen 公司; L-谷氨酸钠盐(水合物), 上海易恩化学技术有限公司。全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 冷冻高速离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪和蛋白胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 谷氨酸脱羧酶的基因克隆、序列分析及结构预测

1.3.1 基因克隆

根据谷氨酸脱羧酶基因 *Xby1_8* 的全长序列设计引物, 由北京擎科生物科技股份有限公司合成引物 *Xby1_8 NdeF* (5'-TAAGAAGGAGATATACATATGGAATTG ATGAAAGACTCAAATTTTCAGAAAT-3') 和 *Xby1_8 XhoR* (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTTC TTAGCGTTGCTCATTG-3'), 引物中的下划线代表限制性内切酶的识别位点, 分别为 *Nde* I (CATATG) 和 *Xho* I (CTCGAG)。以间接提取法获得的倭蜂猴粪便微生物宏基因组 DNA 为模板 PCR 扩增谷氨酸脱羧酶基因 *Xby1_8*。PCR 反应体系: DNA (1 μ mol/L) 1.0 μ L, *Xby1_8 NdeF* 和 *Xby1_8 XhoR* 引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25.0 μ L, 无菌双蒸水 22.0 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C

15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 4 °C 15 min。将用 DNA 胶回收纯化试剂盒回收的目的基因与双酶切的质粒 pEASY-E2 进行连接, 转入感受态大肠杆菌 BL21(DE3), 得到 *E. coli/Xby1_8* 重组菌株, 经菌液 PCR 阳性克隆验证, 保存菌种并测序。

1.3.2 序列分析

核苷酸和氨基酸序列比对使用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 信号肽预测使用 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>); 蛋白质的理论分子量大小预测用 Bio-xm 2.7; 多序列比对分析使用在线网站 Clustalw (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>); 多序列比对的结果美化使用在线网站 ESPript 3.0; 系统发育树使用软件 MEGA 7.0 中 neighbor-joining (NJ) 方法构建。

1.3.3 谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 结构预测

应用 SWISS-MODEL 在线工具进行同源建模。为了得到真实可信的蛋白质三维模型, 需要将该蛋白质的二级序列提交至 SWISS-MODEL 服务器, 以便在 PDB 数据库(Protein Data Bank)搜索与该蛋白结构相似的模型, 作为三维建模的参考, 预测谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的蛋白结构。

1.4 蛋白的表达与纯化

将菌株 *E. coli/Xby1_8* 以 0.1% 的量接种于 5 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)的 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养过夜后以 1% 的量接种于 500 mL LB 培养基(含 100 mg/L Amp), 37 °C 扩大培养 2–3 h (OD_{600} 约为 0.6–0.8), 加入终浓度 0.7 mmol/L 的 IPTG, 于 16 °C、150 r/min 诱导 20 h, 经 150 W 超声破碎细胞 5 min 后得到粗酶, 用 Ni-NTA Agarose 纯化, 得到纯酶 Xby1_8 并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白分析。

1.5 酶活性的测定

酶活性的测定参照李祥^[15]的方法, 略有改动。酶活测定反应总体积为 500 μ L, 将磷酸吡哆醛(0.06 mmol/L)和 L-谷氨酸(20 mmol/L)溶于

100 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 5.0)中, 37 °C 预热 2 min、加入 40 μ L 稀释后的纯酶, 反应 5 min, 沸水浴灭活, 取 400 μ L 至 10 mL 离心管, 加入 400 μ L 硼酸缓冲液(200 mmol/L、pH 9.0), 依次加入 1 mL 苯酚溶液(体积分数为 6%)和 1 mL 次氯酸钠(有效氯气大于 7.5), 沸水浴 10 min 后置于冰水混合物中显色 20 min, 加入 2 mL 乙醇溶液(体积分数为 60%); 测量反应液在 643 nm 的吸光值, 以加入 40 μ L 灭活的酶液作为空白对照。用这种方法快速测出反应生成 GABA 的量。

酶活单位定义为: 一个酶活单位(U)即在酶的最适反应条件下, 每分钟催化合成 1 μ mol/L GABA 所需的酶量。

1.6 重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 酶学性质研究

1.6.1 底物特异性的测定

分别配制浓度 20 mmol/L 的 L-谷氨酸、D-谷氨酸、L-谷氨酸钠、L-天冬氨酸、D-天冬氨酸为底物, 根据酶活测定的方法, 在最适条件下进行特异性活力测定分析。

1.6.2 最适 pH 和 pH 稳定性测定

在 37 °C 测定 pH 3.5–7.0 的酶活力并计算相对酶活, 以确定最适 pH。将稀释的纯酶在 37 °C 不同 pH 中耐受 1 h, 最适反应条件下测定其残存酶活力及未耐受酶液的酶活力(空白对照设为 100%)。缓冲液体系: 100 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0–7.0), 100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.0–10.0)。

1.6.3 最适温度和温度稳定性测定

测定 30、40、50、55、60、65、70、80 和 90 °C 的酶活力并计算相对酶活, 以确定最适温度。将稀释的纯酶于 30–60 °C (以 5 °C 为间隔) 分别放置 10–60 min (以 10 min 为间隔), 在最适条件下测定其残存酶活力及未耐受酶液的酶活力(空白对照设为 100%)。

1.6.4 金属离子和化学试剂对重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的影响

在反应体系中加入终浓度 1 mmol/L 的金属

离子(K^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 Ag^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+})和 1% 的化学试剂(SDS、EDTA、Tween-80)。测定最适反应条件下重组酶在各体系中的酶活力,未加金属离子和化学试剂的酶活力设为 100%。

1.6.5 动力学参数的测定

以 8–26 mmol/L 的 L-谷氨酸为底物,在酶的最适温度及最适 pH 条件下测定,并利用米氏方程非线性拟合计算米氏常数 K_m 和 V_{max} 值。

1.6.6 重组菌 *Escherichia coli*/Xby1_8 全细胞制备 GABA 的条件优化

将发酵完成的菌液 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min,用双蒸水悬浮菌体,紫外分光光度计测定反应体系在 600 nm 的吸光度以确定细胞浓度。总反应体系 15 mL,转速 150 r/min,在不同反应条件下测定 GABA 的转化率,计算公式为:

$$Y(\%) = M_1/M_2 \times 100$$

式中: Y 为 GABA 的转化率; M_1 为产物 GABA 浓度; M_2 为底物 L-谷氨酸浓度。

1) pH 对全细胞制备 GABA 的影响

底物 L-谷氨酸浓度为 260 mmol/L、反应 2.5 h,使用不同 pH 缓冲液(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5)及纯水溶解底物后进行反应,测定不同 pH 下 GABA 的转化率。缓冲液体系: 100 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。

2) 温度对全细胞制备 GABA 的影响

底物 L-谷氨酸浓度为 260 mmol/L、反应 2.5 h,在不同温度(30、37、45、50、55 和 60 °C)进行反应,测定不同温度下 GABA 的转化率。

3) PLP 浓度对全细胞制备 GABA 的影响

底物 L-谷氨酸浓度为 260 mmol/L、55 °C 反应 2.5 h,反应体系使用不同 PLP 浓度(0、0.005、0.02、0.06、0.1 和 0.2 mmol/L),测定不同 PLP 浓度下 GABA 的转化率。

4) 底物 L-谷氨酸浓度对全细胞制备 GABA 的影响

55 °C 反应 2.5 h,在不同 L-谷氨酸浓度(160、260、360、560、760 和 960 mmol/L)下进行反应,测定不同 L-谷氨酸浓度下 GABA 的转化率。

5) 细胞浓度对全细胞制备 GABA 的影响

底物 L-谷氨酸浓度为 260 mmol/L、55 °C 反应 2.5 h,反应体系使用不同细胞浓度(OD_{600} 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0)进行反应,测定不同细胞浓度下 GABA 的转化率。

6) 反应时间对全细胞制备 GABA 的影响

在最适反应体系和反应条件下转化 GABA,测定不同反应时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 h) GABA 的转化率。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的基因克隆、序列分析和结构预测结果

克隆获得 GAD 基因 *Xby1_8* (OQ877082)全长 1 440 bp,编码 479 个氨基酸,理论分子量 54.46 kDa,无信号肽序列。*Xby1_8* 与狄氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*)来源的 GAD 氨基酸序列(WP_154394881.1)相似性为 99.79%,多序列比对发现(图 1),不同微生物来源的 GAD 存在多个保守区域,其中,位于保守区的 Lys295 可能是通用酸/碱催化剂残基和催化亲核试剂残基^[16]。系统进化分析表明(图 2),*Xby1_8* 与狄氏副拟杆菌(*P. distasonis*)来源的 GAD 聚为一支,与短乳杆菌(*L. brevis*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、鸟肠球菌(*Enterococcus* sp.)等来源的 GAD 亲缘性较远。结构预测结果得出 pdb|7X52|A 蛋白模型与 *Xby1_8* 一致性最高(87.69%),GMQE 为 0.96, QSQE 为 0.73,符合同源建模条件,预测得到 *Xby1_8* 三维结构由 6 个相同的蛋白单体组成同聚物(图 3A)。蛋白单体结构见图 3B, Lys274 是酶催化的活性位点,由多个 α 螺旋包围,活性位点位于立体结构的柔性区域内,形成稳定的催化位点。

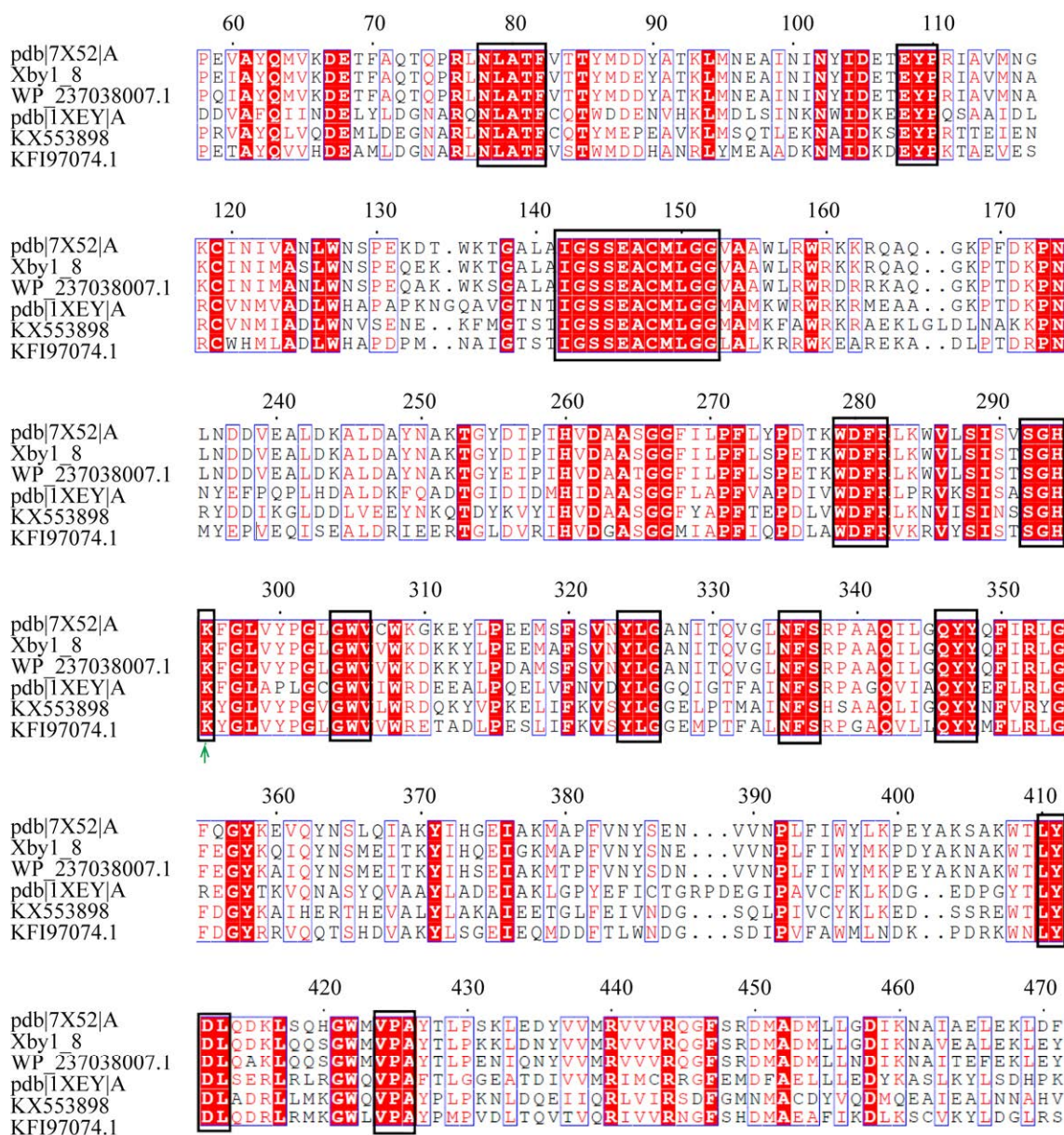


图1 重组酶 Xby1_8 与不同微生物来源谷氨酸脱羧酶氨基酸序列比对分析 *Phocaeicola faecalis* 来源的 WP_237038007.1、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 来源的 pdf|1XEY|A、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 来源的 KFI97074.1 和鸟肠球菌 (*Enterococcus avium*) 来源的 KX553898, 人肠道来源的多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) pdf|7X52|A 作为二级结构模板。黑色方框表示保守性氨基酸残基, 蓝色方框表示跨组的相似性, 红色字体表示组内的相似性, 绿色箭头表示通用酸/碱催化剂残基 Lys295

Figure 1 Alignment analysis of the amino acid sequence of recombinant enzyme Xby1_8 with other glutamate decarboxylase amino acid sequences from different microbial sources. WP_237038007.1 from *Phocaeicola faecalis*, pdf|1XEY|A from *Escherichia coli*, KFI97074.1 from *Bifidobacterium adolescentis* and KX553898 from *Enterococcus avium*. Human gut-derived *Bacteroides thetaiotaomicron* pdf|7X52|A was used as a secondary structure template. Black boxes indicate conserved amino acid residues, the blue boxes represent similarities across groups, red fonts indicate imilarity in a group, and green arrows indicate the universal acid/base catalyst residue Lys295.

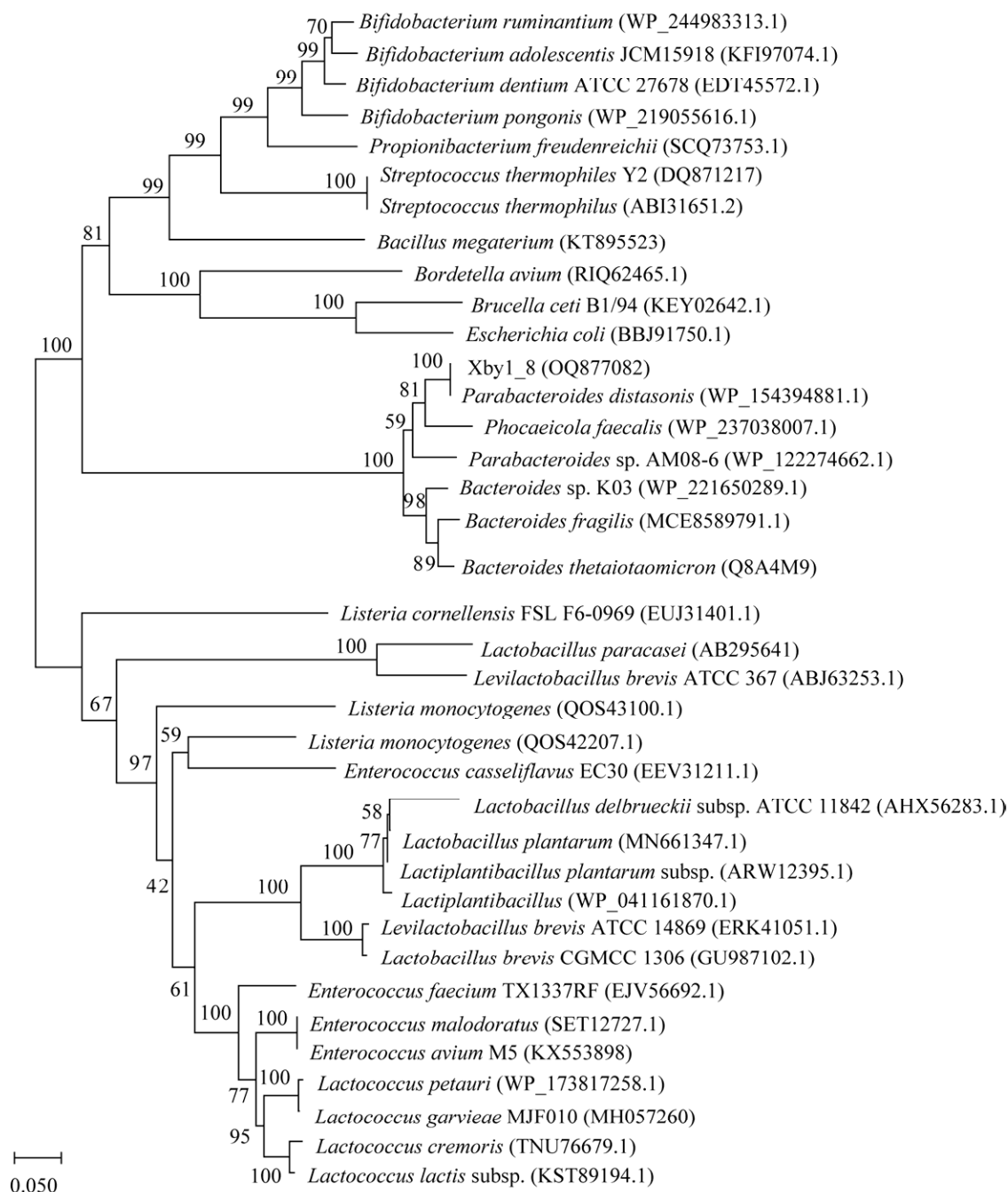


图 2 重组酶 Xby1_8 与不同微生物来源谷氨酸脱羧酶氨基酸序列的系统进化分析 括号内的数字为 GenBank 登录号; 分支线附近的数字表示测试中分支的可靠性百分比; 比例尺表示每个分支的 0.050 个替换核苷酸位置

Figure 2 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of recombinant enzyme Xby1_8 and glutamate decarboxylase from different microbial sources. The number in brackets is the GenBank accession number. The number near the branch line indicates the percentage reliability of the branch in the test; The scale represents 0.050 replacement nucleotide positions for each branch.

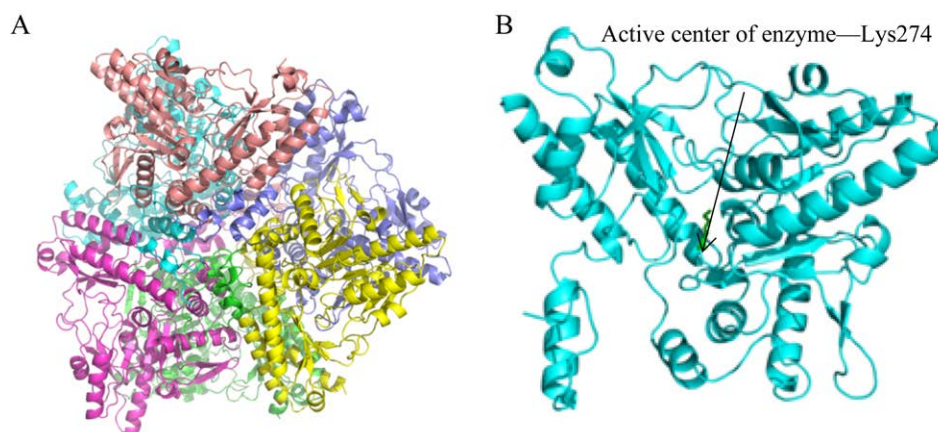


图3 重组酶 Xby1_8 的同源六聚体三维结构模型(A)和单体结构(B)

Figure 3 Three-dimensional structure model of homohexamer (A) and monomer structure (B) of recombinant enzyme Xby1_8.

2.2 谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的异源表达与纯化

重组菌诱导表达 Xby1_8，经纯化和 SDS-PAGE 检测，在 44.3 kDa 和 66.4 kDa 之间有明显条带，约为 54.46 kDa，蛋白分子量与理论分子量基本相符(图 4)。

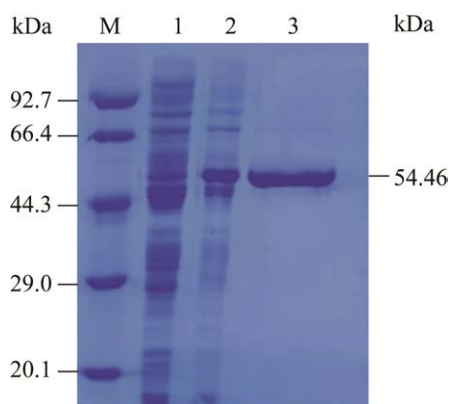


图4 重组酶 Xby1_8 的 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白分子量标准; 1: 含空载质粒 pEASY-E2 的大肠杆菌细胞裂解液; 2: Xby1_8 粗酶; 3: Xby1_8 纯酶
Figure 4 SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme Xby1_8. M: Protein molecular weight standard; 1: *Escherichia coli* cell lysate containing empty plasmid pEASY-E2; 2: Xby1_8 crude enzyme; 3: Xby1_8 pure enzyme.

2.3 重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的酶学性质

2.3.1 底物特异性

重组酶 Xby1_8 对 L-谷氨酸有专一的底物特异性，酶活性 690.2 U/mL，比活性为 3 106.2 U/mg，对 D-谷氨酸、L-谷氨酸钠、L-天冬氨酸、D-天冬氨酸均无活性。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

不同 pH 条件下检测 Xby1_8 酶活(图 5A)，重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 在 pH 5.0 时相对酶活力最高，pH 4.5–5.5 具有 50%以上活性。pH 稳定性如图 5B 所示，Xby1_8 经 pH 3.0–10.0 处理 1 h，在 pH 5.0 表现出最高活性；pH 4.0–8.0 条件下重组酶稳定性较好，残存酶活性高于 100%。

2.3.3 最适温度和温度稳定性

重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8 的最适温度为 55 °C，50–65 °C 范围内保持 60%以上酶活(图 6A)。温度稳定性如图 6B，重组酶 Xby1_8 经 30–60 °C 分别处理 1 h，在 30–50 °C 条件下残存酶活性仍保持 100%以上，55、60 °C 条件下耐受 10 min 后剩余酶活分别下降至 60%、15%。

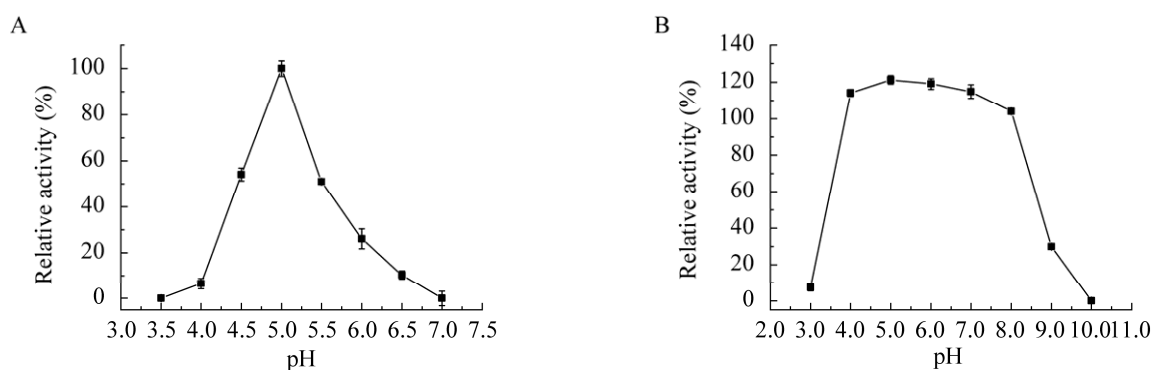


图5 重组酶 Xby1_8 最适反应 pH (A)及其稳定性(B)

Figure 5 Optimum pH (A) and stability (B) of recombinant enzyme Xby1_8.

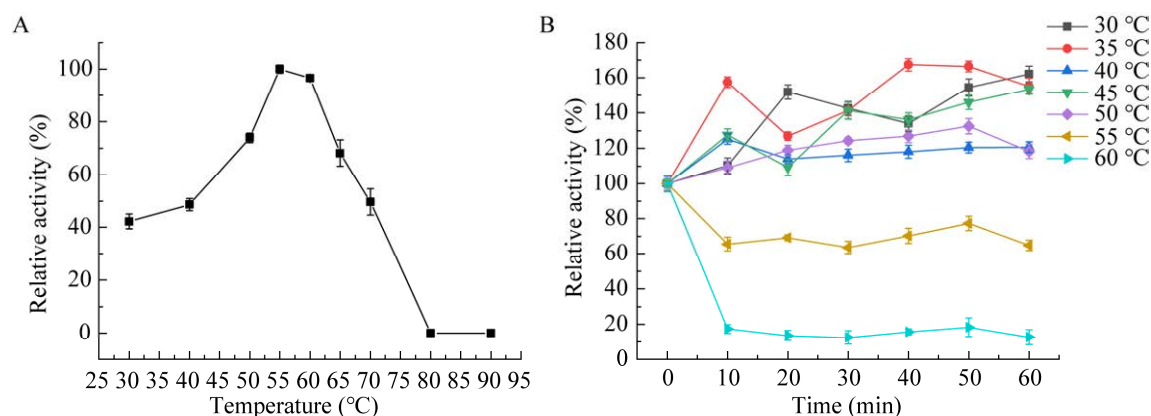


图6 重组酶 Xby1_8 的最适反应温度(A)及其温度稳定性(B)

Figure 6 The optimal reaction temperature (A) and temperature stability (B) of recombinant enzyme Xby1_8.

2.3.4 金属离子和化学试剂对重组酶活力的影响

研究表明, Xby1_8 对金属离子的作用敏感(图 7), K^+ 对重组酶具有激活作用, 其他金属离子对重组酶有不同程度的抑制作用。1 mmol/L Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Ag^+ 完全抑制 Xby1_8 活性, Al^{3+} 、 Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 也有较强的抑制作用, 残存酶活性均低于 30%。SDS 完全抑制 Xby1_8 的酶活性, EDTA、Tween-80 对 Xby1_8 活性无明显影响。

2.3.5 动力学参数的测定结果

以 L-谷氨酸为底物时, 重组酶 Xby1_8 的 K_m 值和 V_{max} 分别为 (10.2 ± 1.5) mmol/L 和 $(3\,574.0 \pm 198.3)$ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

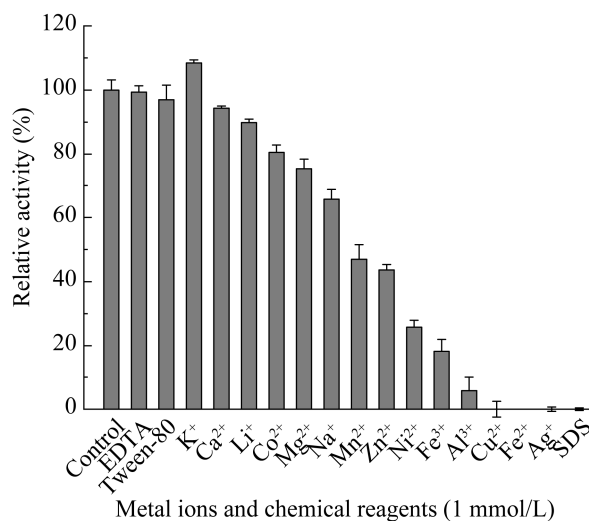


图7 金属离子和化学试剂对重组酶 Xby1_8 活性的影响

Figure 7 Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of recombinant enzyme Xby1_8.

2.3.6 重组菌 *Escherichia coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 条件优化的结果

pH 2.5–5.0 的缓冲液中 GABA 转化率高于

50%，其中 pH 5.0 时转化率达到最高 86.8% (图 8A)。当底物 L-谷氨酸溶于纯水(pH 3.5)时，转化率为 89.1%，较底物溶于 pH 5.0 缓冲液略高，可能

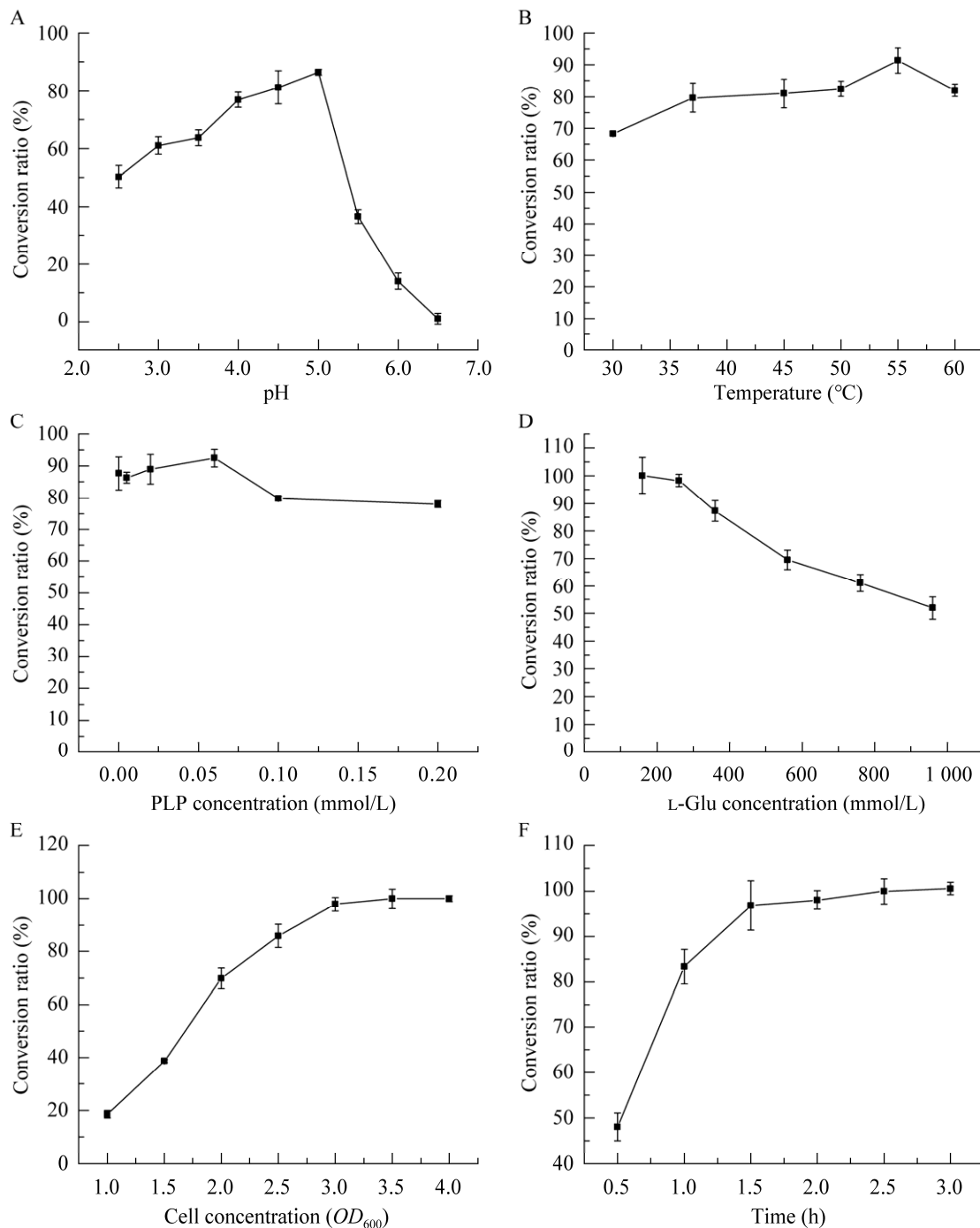


图 8 重组菌 *Escherichia coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 的条件优化 A: pH. B: 温度. C: PLP 浓度. D: L-谷氨酸浓度. E: 细胞浓度. F: 反应时间

Figure 8 Optimization of conditions for whole-cell synthesis of GABA in recombinant *Escherichia coli/Xby1_8*. A: pH. B: Temperature. C: PLP concentration. D: L-glu concentration. E: Cell concentration. F: Reaction time.

是全细胞合成 GABA 时缓冲液^[17](磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)对底物和产物进出细胞膜有一定的影响,因此,后续重组菌 *E. coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 实验中将底物 L-谷氨酸溶于纯水(pH 3.5)。在 30–60 °C 条件下测定 GABA 转化率,55 °C 时转化率最高为 91.4% (图 8B)。

当 PLP 浓度为 0 时,全细胞合成 GABA 的转化率可达 87.6%; PLP 浓度为 0.06 mmol/L 时, GABA 转化率最高达到 92.9%; 之后随 PLP 浓度升高 GABA 转化率降低(图 8C)。由于大肠杆菌表达时自身能合成 PLP 且 PLP 价格昂贵,重组菌 *E. coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 时不添加 PLP。

随着底物 L-谷氨酸浓度增加,重组菌 *E. coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 的转化率逐渐下降,在底物浓度为 160–260 mmol/L 时,转化率超过 98%,底物基本完全转化。当底物浓度高于 260 mmol/L 时,转化率大幅度下降,因此,选择底物浓度 260 mmol/L 进行重组菌 *E. coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA (图 8D)。在底物浓度 260 mmol/L 时,随着细胞浓度的增大, GABA 转化率逐渐提高,当细胞浓度 OD_{600} 分别为 3.5、4.0 时, GABA 转化率均达 100%,因此, OD_{600} 为 3.5 是最佳的细胞浓度(图 8E)。

在底物 L-谷氨酸浓度 260 mmol/L (溶于纯水)、温度 55 °C、细胞浓度 OD_{600} 为 3.5 的最适条件下,重组菌 *E. coli/Xby1_8* 在不同时间全细胞合成 GABA 的结果见图 8F。GABA 转化率随反应时间增加而提高,1.5 h 后转化率增幅变缓,并在反应 2.5 h 和 3.0 h 后,转化率均达 100%,因此,2.5 h 为最佳反应时间。

3 讨论与结论

本研究从倭蜂猴粪便微生物宏基因组中筛选、克隆和异源表达获得狄氏副拟杆菌(*P. distasonis*)来源的重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8。酶学性质比较表明(表 1): 重组酶 Xby1_8 比活力(3 106.2 U/mg)高于其他微生物来源 GAD,具有

较好的温度和 pH 稳定范围,能高效催化合成 GABA; Xby1_8 最适温度为 55 °C,高于大部分 GAD,与粪肠球菌^[18](*E. faecium*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius* ssp.)^[19]来源 GAD 一致; 重组酶热稳定性较好,30–50 °C 处理 1 h 酶活均有提高; Xby1_8 最适 pH 值为 5.0, pH 4.0–8.0 耐受 1 h 剩余酶活仍高于 100%。

研究表明, Xby1_8 对金属离子和化学试剂敏感,大部分为抑制作用,仅 K^+ 对其有一定促进作用。其中, Ag^+ 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 不同程度抑制大部分微生物来源的 GAD^[19,21,23],并使 Xby1_8 失活,可能是 Ag^+ 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 与活性中心的赖氨酸(图 3B)形成稳定的氨基酸金属离子螯合物^[26]。 Co^{2+} 对戊糖片球菌^[27](*Pediococcus pentosaceus*)来源的 GAD 有促进作用,却抑制了 Xby1_8 活性,猜测 Co^{2+} 与活性位点的赖氨酸中-NH₂ 形成配合物^[28]。

全细胞制备 GABA 研究表明,最适反应条件下 GABA 转化率为 100%,可在较短时间内高效合成 GABA。Ke 等^[29]对乳酸乳球菌(*L. lactis*)来源的 GadB 进行研究, L-谷氨酸浓度为 3 mol/L,细胞浓度 OD_{600} 为 15.0, 12 h 转化率达到 99.9%; 冯晓等^[8]从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)挖掘到 ScGAD,添加 100 mmol/L 的 L-谷氨酸后转化 2.5 h,转化率达到 99%。酶在全细胞中能更稳定催化合成 GABA,大肠杆菌(*E. coli*)能通过从头合成和补救途径合成 PLP^[30],所以大肠杆菌(*E. coli*)全细胞培养时可不添加昂贵的 PLP,发酵周期短、易提纯。

微生物谷氨酸脱羧酶催化合成的 GABA 在肠道菌群及宿主生命活动中具有重要作用,动物胃肠道微生物组中存在新型谷氨酸脱羧酶。本研究从倭蜂猴粪便微生物宏基因组中获得狄氏副拟杆菌(*P. distasonis*)来源的重组谷氨酸脱羧酶 Xby1_8,该酶比活力比其他微生物来源的 GAD 高,酸碱和热稳定性较好,重组菌 *E. coli/Xby1_8* 全细胞合成 GABA 转化率高,在食品、工业等领域具有广泛的应用前景。

表 1 重组酶与其他来源的谷氨酸脱羧酶酶学性质比较

Table 1 Comparison of enzymological properties of recombinant enzyme and glutamate decarboxylase from other sources

Source	Enzyme	Optimum temperature (°C)	Temperature stability	Optimum pH	pH stability	Specific activity (U/mg)	References
<i>Nycticebus pygmaeus</i> fecal metagenome	Xby1_8	55	30–50 °C for 1 h has more than 100% activities; 55 °C for 1 h has less than 55% activities	5.0	4.0–8.0 for 1 h (37 °C) has more than 100% activities	3 106.2	This study
<i>Enterococcus faecium</i>	EfGAD	55	30–60 °C for 3 h has more than 60% activities; 65–70 °C for 3 h has less than 10% activities	5.0	3.6–5.8 for 5 h (40 °C) has more than 60% activities	–	[18]
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp.	GAD-Y2	55	35–55 °C for 1 h has more than 80% activities; 65 °C for 1 h has less than 40% activities	4.5	3.5–5.5 for 5 h (40 °C) has more than 80% activities	163.4	[19]
<i>Enterococcus avium</i>	EaGAD	60	–	5.0	–	–	[20]
<i>Lactobacillus</i> sp.	LGAD	60	–	4.5	–	–	[21]
<i>Lactococcus garvieae</i> MJF ₀₁₀	LgGAD	35	30–40 °C for 1 h has more than 80% activities; 50 °C for 1 h has less than 20% activities	5.0	–	–	[22]
<i>Bacillus megaterium</i>	BmGAD	50	30–40 °C for 1 h has more than 70% activities; 45–55 °C for 1 h has more than 40% activities	5.0	4.0–7.0 for 1 h (50 °C) has more than 95% activities; 8.0 for 1 h (50 °C) has less than 85% activities	148.2	[23]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LpGAD	50	20–50 °C for 1 h has more than 60% activities; 50–60 °C for 1 h has less than 50% activities	5.0	4.5–5.0 for 1 h (4 °C) has more than 50% activities; 3.5–4.0, 5.5–7.0 for 1 h (4 °C) has less than 40% activities	16.7	[24]
<i>Lactobacillus plantarum</i> QL-14	GAD QL-14	40	20–50 °C for 2 h has more than 80% activities; 55–60 °C for 2 h has less than 50% activities	4.6	5.2–6.0 for 2 h (37 °C) has more than 50% activities; 4.2–5.0 for 2 h (37 °C) has less than 10% activities	9.9	[25]

–: 无或文献中未提及

–: None or not mentioned in the literature.

REFERENCES

- [1] 孙磊, 王苑, 柏映国, 罗会颖, 姚斌, 涂涛. 谷氨酸脱羧酶结构及催化机制的研究概述[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2236-2244.
- SUN L, WANG Y, BAI YG, LUO HY, YAO B, TU T. Structure and catalytic mechanism of glutamate decarboxylase: a review[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2236-2244 (in Chinese).
- [2] TING WONG CG, BOTTIGLIERI T, SNEAD OC. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease[J]. Annals of Neurology, 2003, 54(S6): S3-S12.
- [3] LI HX, CAO YS. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid[J]. Amino Acids, 2010, 39(5): 1107-1116.
- [4] 宁亚维, 马梦戈, 杨正, 侯琳琳, 赵忠情, 陈艺, 王志新, 贾英民. γ -氨基丁酸的制备方法及其功能食品研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 238-247.
- NING YW, MA MG, YANG Z, HOU LL, ZHAO ZQ, CHEN Y, WANG ZX, JIA YM. Research progress in the enrichment process and functional foods of γ -aminobutyric acid[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 238-247 (in Chinese).
- [5] 杨帆. 微生物转化法产 γ -氨基丁酸[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008.
- YANG F. γ -aminobutyric acid produced by microbial transformation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
- [6] 王一然, 张俊帅, 李家龙, 刘素华, 刘清岱, 刘君, 张泽生. 巨大芽孢杆菌谷氨酸脱羧酶的表达及其酶活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(8): 63-68.
- WANG YR, ZHANG JS, LI JL, LIU SH, LIU QD, LIU J, ZHANG ZS. The expression of glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium* and its enzymatic activity[J]. China Food Additives, 2017(8): 63-68 (in Chinese).
- [7] 曾文超. 高效转化谷氨酸生产 γ -氨基丁酸工程菌的构建[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2017.
- ZENG WC. Construction of the engineered strain for effective bioconversion of glutamic acid to gamma-aminobutyric acid[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2017 (in Chinese).
- [8] 冯骁, 池慧兵, 孟凡强, 陆兆新, 朱萍, 吕凤霞. 谷氨酸脱羧酶基因的挖掘、表征及全细胞制备 γ -氨基丁酸的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(10): 58-66.
- FENG X, CHI HB, MENG FQ, LU ZX, ZHU P, LYU FX. Mining and characterization of glutamate decarboxylase gene for whole cell preparation of γ -aminobutyric acid[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(10): 58-66 (in Chinese).
- [9] LAROUTE V, BEAUFRAND C, GOMES P, NOUAILLE S, TONDEREAU V, DAVERAN-MINGOT ML, THEODOROU V, EUTAMENE H, MERCIER-BONIN M, COCAIGN-BOUSQUET M. *Lactococcus lactis* NCDO2118 exerts visceral antinociceptive properties in rat via GABA production in the gastro-intestinal tract[J]. eLife, 2022, 11: e77100.
- [10] HAN JR, ZHAO XL, ZHAO X, WANG Q, LI P, GU Q. Microbial-derived γ -aminobutyric acid: synthesis, purification, physiological function, and applications[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(41): 14931-14946.
- [11] CHEN MJ, RUAN GC, CHEN L, YING SH, LI GH, XU FH, XIAO ZF, TIAN YT, LV LL, PING Y, CHENG Y, WEI YL. Neurotransmitter and intestinal interactions: focus on the microbiota-gut-brain axis in irritable bowel syndrome[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 817100.
- [12] WANG WL, XU SY, REN ZG, TAO L, JIANG JW, ZHENG SS. Application of metagenomics in the human gut microbiome[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(3): 803-814.
- [13] 唐铭泽. 污染湖泊宏基因组文库中谷氨酸脱羧酶基因的克隆及功能研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2015.
- TANG MZ. Gene cloning and functional characterization of a L-glutamic acid decarboxylase *gad3* from contaminated lake metagenome[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2015 (in Chinese).
- [14] XU B, XU WJ, YANG FY, LI JJ, YANG YJ, TANG XH, MU YL, ZHOU JP, HUANG ZX. Metagenomic analysis of the *Pygmy loris* fecal microbiome reveals unique functional capacity related to metabolism of aromatic compounds[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56565.
- [15] 李祥. 谷氨酸脱羧酶的基因挖掘、表达鉴定及应用[D]. 南阳: 南阳师范学院硕士学位论文, 2021.
- LI X. Gene mining, expression identification and application of glutamate decarboxylase[D]. Nanyang: Master's Thesis of Nanyang Normal University, 2021 (in Chinese).
- [16] LIU SJ, WEN BT, DU GM, WANG YL, MA XC, YU HY, ZHANG JJ, FAN SL, ZHOU H, XIN FJ. Coordinated regulation of *Bacteroides thetaiotaomicron* glutamate decarboxylase activity by multiple elements under different pH[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134436.
- [17] 孙磊. 谷氨酸脱羧酶基因挖掘及全细胞转化产 γ -氨基丁酸工艺研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.

- SUN L. Gene resource mining of glutamate decarboxylase and whole-cell biocatalyst production of γ -aminobutyric acid[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [18] 杨胜远, 林谦, 刘淑敏, 苏巧云, 黄慧玲. 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.
- YANG SY, LIN Q, LIU SM, SU QY, HUANG HL. Preparation and characterization of glutamate decarboxylase from *Enterococcus faecium*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 28-34 (in Chinese).
- [19] ZHANG C, LU J, CHEN L, LU FX, LU ZX. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid by a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing the glutamate decarboxylase gene derived from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Y2[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(11): 1851-1857.
- [20] GU XY, ZHAO JC, ZHANG RL, YU RH, GUO TT, KONG J. Molecular analysis of glutamate decarboxylases in *Enterococcus avium*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 691968.
- [21] PARK JY, JEONG SJ, KIM JH. Characterization of a glutamate decarboxylase (*GAD*) gene from *Lactobacillus zymae*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(9): 1791-1799.
- [22] LIM HJ, JUNG DH, CHO ES, SEO MJ. Expression, purification, and characterization of glutamate decarboxylase from human gut-originated *Lactococcus garvieae* MJF₀₁₀[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(4): 69.
- [23] LIU QD, CHENG HJ, MA XQ, XU N, LIU J, MA YH. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1107-1113.
- [24] KOMATSUZAKI N, NAKAMURA T, KIMURA T, JUN SM. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(2): 278-285.
- [25] 时桢, 刘昭明, 黎娅, 易弋, 伍时华. 重组谷氨酸脱羧酶的分离纯化与酶学性质研究[J]. 食品工业, 2016, 37(2): 184-188.
- SHI C, LIU ZM, LI Y, YI Y, WU SH. Purification and characterization of recombined glutamate decarboxylase[J]. The Food Industry, 2016, 37(2): 184-188 (in Chinese).
- [26] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, de LOURDES BASTOS M, CHRISTENSEN H, DUSEMUND B, KOS DURJAVA M, KOUBA M, LÓPEZ-ALONSO M, LÓPEZ PUENTE S, MARCON F, MAYO B, PECHOVÁ A, PETKOVA M, RAMOS F, SANZ Y, VILLA RE, WOUTERSEN R, LÓPEZ-GÁLVEZ G. Efficacy of iron chelates of lysine and glutamic acid as feed additive for all animal species[J]. EFSA Journal, 2020, 18(6): e06164.
- [27] 李云, 杨胜远, 陈郁娜, 刘祥流, 麦真真, 陈燕. 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.
- LI Y, YANG SY, CHEN YN, LIU XL, MAI ZZ, CHEN Y. Identification and enzymological characterization of glutamate carboxylase-producing *Pediococcus*[J]. Food Science, 2010, 31(9): 187-191 (in Chinese).
- [28] 袁瑾, 钟惠民, 杨靖华, 汪云松. Co^{2+} -L-赖氨酸的合成及其 X 射线光谱研究[J]. 光谱实验室, 1999, 16(5): 558-560.
- YUAN J, ZHONG HM, YANG JH, WANG YS. Study on Co^{2+} -L-lysine complex by X-ray powder diffraction spectra[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 1999, 16(5): 558-560 (in Chinese).
- [29] KE CR, YANG XW, RAO HX, ZENG WC, HU MR, TAO Y, HUANG JZ. Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. SpringerPlus, 2016, 5: 591.
- [30] GHATGE MS, CONTESTABILE R, Di SALVO ML, DESAI JV, GANDHI AK, CAMARA CM, FLORIO R, GONZÁLEZ IN, PARRONI A, SCHIRCH V, SAFO MK. Pyridoxal 5'-phosphate is a slow tight binding inhibitor of *E. coli* pyridoxal kinase[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41680.