



产 γ -氨基丁酸基因工程重组大肠杆菌的构建及其发酵特性

管付瑶, 陆佳杰, 朱志文, 王配泽, 鄢楚洋, 于平*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

管付瑶, 陆佳杰, 朱志文, 王配泽, 鄢楚洋, 于平. 产 γ -氨基丁酸基因工程重组大肠杆菌的构建及其发酵特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 489-501.

GUAN Fuyao, LU Jiajie, ZHU Zhiwen, WANG Peize, YAN Chuyang, YU Ping. Construction and fermentation characterization of γ -aminobutyrate-producing recombinant strains of *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 489-501.

摘要: 【目的】构建高产 γ -氨基丁酸的基因工程重组大肠杆菌(*E. coli*), 并研究其发酵特性。【方法】首先通过分子生物学方法构建重组质粒 pTrc99a-*gadB* 和 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1*, 然后分别将它们转入基因敲除菌株 *E. coli* K12/ Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*。通过对重组菌进行培养, 研究其产 γ -氨基丁酸的发酵过程并进行优化。【结果】构建的重组质粒转入大肠杆菌后, 筛选的重组菌经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明目的蛋白均得到高效表达。重组菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 在含 10 g/L 底物 L-谷氨酸钠的发酵液中产 γ -氨基丁酸的最高浓度为 4.6 g/L。与原始菌相比, 提高了 21.9 倍。该菌株在含不同底物浓度(5、10、20、30、40 g/L)的发酵液中的发酵过程表明, 在 20 g/L 的底物浓度下, 底物的转化率达到最高值, 此时 γ -氨基丁酸的产量为 8.4 g/L。当 2 个外源基因 *SNO1* 和 *SNZ1* 同时引入重组菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 时, 由于能量的过度消耗, 重组菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 产 γ -氨基丁酸的能力略有下降。重组菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 在含 20 g/L 底物 L-谷氨酸钠的 1 L 发酵液中的扩大培养结果表明, 重组菌培养 24 h 时, 其发酵液中 γ -氨基丁酸的含量达到最高值 9.4 g/L。【结论】经基因工程构建的重组大肠杆菌产 γ -氨基丁酸的能力明显提高, 该研究结果为 γ -氨基丁酸的产业化生产提供了良好基础。

关键词: 重组大肠杆菌; γ -氨基丁酸; 生物转化; 发酵特性

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY21C200006)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY21C200006).

*Corresponding author. E-mail: yup9202@hotmail.com

Received: 2023-06-26; Accepted: 2023-09-22; Published online: 2023-10-16

Construction and fermentation characterization of γ -aminobutyrate-producing recombinant strains of *Escherichia coli*

GUAN Fuyao, LU Jiajie, ZHU Zhiwen, WANG Peize, YAN Chuyang, YU Ping*

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To construct the γ -aminobutyrate-producing recombinant strains of *Escherichia coli* and investigate their fermentation characteristics. [Methods] We constructed two recombinant plasmids pTrc99a-*gabB* and pTrc99a-*gabB-SNO1-SNZ1* and then respectively transformed them into the gene-knockout strain *E. coli* K12/ Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*. We investigated and optimized the fermentation process of the recombinant strains for producing γ -aminobutyrate. [Results] The target proteins were highly expressed in the recombinant strains harboring the constructed plasmids. The highest concentration of γ -aminobutyrate was 4.6 g/L in the fermentation broth of *E. coli* K12/ Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gabB* cultured in the medium containing 10 g/L L-monosodium glutamate and was 21.9 times higher than that in the fermentation broth of the wild type strain. At the L-monosodium glutamate concentration of 20 g/L, the conversion rate of substrate was the highest and the concentration of γ -aminobutyrate reached 8.4 g/L. The concentration of γ -aminobutyrate was slightly lower in the fermentation broth of the recombinant strain *E. coli* K12/ Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gabB-SNO1-SNZ1*, probably due to the excessive consumption of energy. The highest concentration of γ -aminobutyrate was 9.4 g/L when *E. coli* K12/ Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gabB* was cultured in 1 L fermentation medium containing 20 g/L L-monosodium glutamate. [Conclusion] We obviously increased the yield of γ -aminobutyrate produced by the recombinant strain. This finding lays a foundation for the industrial production of γ -aminobutyrate.

Keywords: recombinant *Escherichia coli*; γ -aminobutyrate; bioconversion; fermentation characteristics

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyrate, GABA)是一种四碳非蛋白氨基酸,它在抑制脑神经传导方面起着重要作用,是人体大脑皮层主要的抑制神经递质。摄入 γ -氨基丁酸有助于维持大脑的神经传递稳定性,从而帮助高血压患者降低血压。此外,由于其具有降低血压、减轻焦虑和抑制糖尿病等

功能,因此被用作食品添加剂或膳食补充剂^[1]。 γ -氨基丁酸在大脑皮层神经元间是一种抑制性氨基酸的神经递质^[2-4]。在疾病治疗方面,它和5-羟色胺对肝病及由此产生的神经系统损伤有治疗作用^[5-9]。 γ -氨基丁酸还可促进人的胰岛 β 细胞上升^[10-12],从而降低血糖、减轻糖尿病症状,

并为治愈由缺乏胰岛 β 细胞引发的I型糖尿病提供可能。 γ -氨基丁酸还能为多种化工产品的生产提供一种不依赖石油资源、安全环保和节能高效的底物,具有重要的经济价值。如 γ -氨基丁酸可以通过简单的化学反应转化为对环境友好的塑料溶剂*N*-吡咯烷酮和生物可降解材料聚酰胺-4^[13]。因此, γ -氨基丁酸的制备已成为当前国内外研究的热点之一。

目前 γ -氨基丁酸的制备方法主要有化学合成法、植物富集法和微生物合成法。化学合成法反应条件苛刻,对环境污染大,制备的 γ -氨基丁酸不能用于食品领域。植物富集法产量低,无法大规模生产。利用微生物法制备 γ -氨基丁酸具有安全和高效的优点,展现出广阔的应用前景。该方法以L-谷氨酸(L-glutamate)作为前体物质,在微生物细胞的内源性谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)催化下发生特异性的脱羧反应合成 γ -氨基丁酸。与植物富集提取法和化学合成法相比,微生物发酵法具有反应条件温和、副产物少和对环境友好等优点。目前,通过微生物发酵法制备 γ -氨基丁酸的主要菌株是乳酸菌,主要包括短乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌等^[14-15]。然而来源于野生型的菌株的内源性L-谷氨酸脱羧酶的活力均较低,成为其催化L-谷氨酸高效制备 γ -氨基丁酸主要限制因素。近年来,随着基因工程和代谢工程的发展,通过在大肠杆菌、酵母菌和谷氨酸棒状杆菌中过量表达L-谷氨酸脱羧酶基因,实现 γ -氨基丁酸的高效制备,已成为其生产的主要方法。

L-谷氨酸脱羧酶在生物界中分布非常广泛,无论是单细胞生物,还是哺乳动物体内都存在^[16]。它能催化谷氨酸进行新陈代谢,不同细菌中的L-谷氨酸脱羧酶的性质具有相同点^[17],同时也有区别。乳酸乳球菌中的L-谷氨酸脱羧酶,其亚基的相对分子质量为65 kDa,且具有

高度的专一性^[18]。在18种氨基酸中,L-谷氨酸是唯一的作用底物。当pH值超过6.0时,L-谷氨酸脱羧酶会失去活力。L-谷氨酸脱羧酶包含2个亚基单位GadA和GadB。GadB催化L-谷氨酸脱羧是生物体合成 γ -氨基丁酸的重要途径之一。绝大多数生物合成 γ -氨基丁酸的研究都基于该途径^[19-20]。除了L-谷氨酸外,L-谷氨酸钠(L-monosodium glutamate, L-MSG)也可作为L-谷氨酸脱羧酶GadB的底物。L-谷氨酸和L-谷氨酸钠都没有毒性,经济上L-谷氨酸钠价格更便宜,且L-谷氨酸脱羧酶GadB对Na⁺具有一定的耐受性,因此不少研究将L-谷氨酸钠作为发酵底物,直接添加以促进 γ -氨基丁酸生物合成^[21-22]。

磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)是L-谷氨酸脱羧酶的辅基^[23]。在生物体内,磷酸吡哆醛与脱辅基酶蛋白能够发生解离和聚合作用,从而调节L-谷氨酸脱羧酶的活性。磷酸吡哆醛合酶基因*SNO1*和*SNZ1*来源于酿酒酵母,具有催化3-磷酸甘油醛和L-谷氨酰胺转化为磷酸吡哆醛的能力。当2个基因*SNO1*和*SNZ1*在大肠杆菌中同时异源表达时,2种蛋白产物能够形成复合物,并能够提高L-谷氨酸脱羧酶的活性,单独表达时不能形成相应的复合物。

在大肠杆菌(*E. coli*)中^[24],*gab*操纵子是 γ -氨基丁酸分解代谢支路的重要组成部分。*gab*操纵子的结构基因主要包括*gabT*和*gabP*,*gabT*编码的酶GABA-T的同工酶为PuuE(由基因*puuE*编码)。GABA-T能够催化 γ -氨基丁酸生成琥珀酸半醛。*gabP*编码的 γ -氨基丁酸通透酶能够使 γ -氨基丁酸进入细胞内,因此*gabT*、*gabP*和*puuE*三个基因在大肠杆菌中的敲除可使 γ -氨基丁酸积累。在前期研究中,本实验室已成功构建这3个基因敲除的重组菌株*E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*^[25]。

鉴于此,本研究通过加强L-谷氨酸脱羧酶

GadB 的过表达和引入辅酶因子磷酸吡哆醛高效再生的 2 个关键基因 *SNO1* 和 *SNZI*, 实现 γ -氨基丁酸的高效生产。为此, 首先构建了 pTrc99a-*gadB* 和 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZI* 两个重组质粒, 然后将它们分别导入基因敲除菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE* 中, 并利用不同底物浓度的 L-谷氨酸钠对重组菌株进行发酵培养, 再通过高效液相色谱法检测 γ -氨基丁酸的产量, 以期得到重组菌产 γ -氨基丁酸的最佳发酵条件。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Escherichia coli K12 (MG1655) 和 *E. coli* DH5 α 均购自杭州宝赛生物工程有限公司, *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE* 由本实验室自行构建^[25], 酿酒酵母菌株 S288C 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 质粒 pTrc99a 购自 Novagen 有限公司。

1.1.2 培养基和试剂

LB 液体培养基: 0.5%酵母提取物, 1.0%蛋白胨和 1.0%氯化钠。用 1 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 至 7.0, 然后于 121 °C 灭菌 20 min。

LB 固体培养基: 1.5%的琼脂粉加入至 LB 液体培养基中, 121 °C 灭菌 20 min, 灭菌后冷却至合适温度, 然后倒入平板中。

氨基青霉素溶液: 称取 1.0 g 氨基青霉素, 用无菌水配制成 10 mL 溶液, 然后用 0.22 μ m 的滤膜过滤, -20 °C 保存。

发酵培养基: 0.5%酵母提取物, 1.0%蛋白胨和 1.0%氯化钠, 适量浓度的 L-谷氨酸钠(5、10、20、30、40 g/L)。用 1 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 至 7.0, 然后于 121 °C 灭菌 20 min。

磷酸缓冲液(pH 7.4): 称取 KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 1.42 g, 氯化钠 8 g, 氯化钾 0.2 g, 定

容到 1 L, 然后用浓盐酸调节 pH 值至 7.4, 灭菌后 4 °C 冰箱放置。

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-galactothioglycoside, IPTG)母液配制: 称取 1.19 g 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 加入至 5 mL 灭菌的双蒸水中, 溶解均匀后, 置于-80 °C 的冰箱中保存。

甘氨酸、考马斯亮蓝 R-250、L-谷氨酸钠、核酸染料 4S Red Plus 染色剂(10 000 \times 水溶液)、琼脂糖 M、蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉和氨基青霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。 γ -氨基丁酸标准品购自 Sigma 公司。

细菌基因组提取试剂盒、细菌感受态制备试剂盒、酵母细胞提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、割胶回收试剂盒、高保真 *rTaq* 酶、限制性内切酶 *Nco* I、*Kpn* I、*Bam*HI 和 *Xba* I 均购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 仪器

恒温金属浴, 上海一恒科技有限公司; 高速冷冻离心机, Sigma 公司; Mastercycler 梯度 PCR 仪, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计, Mapada 公司; 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 岛津高效液相色谱仪, 岛津公司; 恒温摇床, 上海苏坤实业有限公司; 恒温水槽, 杭州博日科技有限公司; 酶标仪, Tecan 公司。

1.2 *gadB*、*SNO1* 和 *SNZI* 基因的克隆

从 NCBI 上分别找出大肠杆菌 K12 和酿酒酵母中 *gadB* (GenBank 登录号: NC-000913, 1 401 bp)、*SNO1* (GenBank 登录号: NC-001145, 675 bp) 和 *SNZI* (GenBank 登录号: NC-001145, 3 894 bp) 的基因序列, 并设计相应的引物来扩增这 3 个基因序列。设计的引物序列如表 1 所示, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 扩增目的基因片段 *gadB*、*SNO1* 和 *SNZI*, 反应体系: 上下游引物各 1 μ L, 模板 1 μ L,

表 1 基因扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for gene amplification

Primers	Sequences (5'→3')	Digestion sites
<i>gadB</i> -F	TCG <u>CC</u> ATGGCCATGGATAAGAAGCAAGTAACGG	<i>Nco</i> I
<i>gadB</i> -R	CTTCGGTACCTTAGGTATGTTTAAAGCTGTTCT	<i>Kpn</i> I
<i>SNO1</i> -F	TCGCGGTACCAAGGAGATATACCATGCAC AAAACCCACAGTACAATGT	<i>Kpn</i> I
<i>SNO1</i> -R	CTTCGGATCCTTAATTAGAAACAACTGTCTGATA	<i>Bam</i> H I
<i>SNZI</i> -F	CTAAGGATCCGAAGGAGATATACCATGA CTGGAGAAGACTTTAAGATCA	<i>Bam</i> H I
<i>SNZI</i> -R	CCTTCTCTAGATTACCACCCAATTTTCGGAAAGTCTT	<i>Xba</i> I

Underlined letters indicate the restriction endonucleases-digested sites.

Primer STAR Premix 25 μ L, 补水至 50 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 进一步延伸 10 min。取 2.0 μ L 的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。采用大连宝生物工程有限公司的凝胶回收试剂盒进行纯化回收, 得到单一条带的目的片段。

1.3 双酶切与连接

将纯化后的 *gadB* 和 pTrc99a 质粒分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 温度 37 $^{\circ}$ C, 时间 6 h。将酶切好的片段用纯化试剂盒进行纯化回收, 回收产物按照片段:载体=7:1 的比例混合, 混合后使用 T₄ DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h。使用细菌感受态制备试剂盒制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。将转化后的细胞涂布于含有氨苄青霉素的抗性平板上, 培养得到阳性转化菌落。挑取克隆菌落, 采用质粒提取试剂盒提取转化菌株质粒, 进行双酶切验证得到重组质粒 pTrc99a-*gadB*。在此基础上, 对重组质粒 pTrc99a-*gadB* 和 *SNO1* 分别用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行双酶切, 然后用 T₄ DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h 后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 得到重组质粒 pTrc99a-*gadB*-*SNO1*。提取重组质粒 pTrc99a-*gadB*-*SNO1*, 再按照同样的步骤克隆得

到质粒 pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZI*。

1.4 重组质粒的转化与表达

将得到的 2 个重组质粒分别转化至 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE* 中。再将 *E. coli* K12、*E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*、*E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 和 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZI* 分别于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 12 h, 然后按 1.0% (体积比) 的接种量转接至装有 50 mL/250 mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 值为 0.6 时, 向培养基中加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度为 1 mol/L, 然后调温至 30 $^{\circ}$ C 进行诱导培养 12 h。取菌液 50 mL 离心去上清, 加入 10 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液重悬菌体沉淀, 超声破碎机破碎菌体。

1.5 四个菌株产 γ -氨基丁酸能力的比较

将上述 4 个菌株分别接种于含 10 g/L L-谷氨酸钠的发酵培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 3 h 后, 用盐酸调节发酵液的 pH 至 4.2, 继续发酵 18 h。取 1 mL 发酵液, 采用高效液相色谱法测定生成的 γ -氨基丁酸的含量。

1.6 γ -氨基丁酸摇瓶水平发酵优化

将重组菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 和 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZI* 分别接种于含 5、10、

20、30 和 40 g/L L-谷氨酸钠的发酵培养基中, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养 48 h。取 1 mL 发酵液, 采用高效液相色谱法测定生成的 γ -氨基丁酸的含量。

1.7 1 L 摇瓶体系扩大发酵培养

将重组菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 接种于含 20 g/L L-谷氨酸钠的 1 L 发酵培养基中, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养, 每隔 6 h 进行取样, 采用高效液相色谱法测定生成的 γ -氨基丁酸的含量。

1.8 琼脂糖凝胶电泳和 SDS-PAGE

琼脂糖凝胶电泳和 SDS-PAGE 参照参考文献[26]的方法。

1.9 发酵液中 L-谷氨酸钠和 γ -氨基丁酸含量的测定

发酵液样品首先进行衍生化处理: 将发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 然后取 100 μ L 上清液加入到离心管中, 分别加入 200 μ L pH 为 10.0 的 1 mol/L 的碳酸氢钠缓冲液、100 μ L 40 g/L 的丹磺酰氯的丙酮溶液以及 600 μ L 双蒸水, 制成 1 mL 反应混合物。将混合物在 80 °C 下避光反应 40 min, 随后加入 100 μ L 10%乙酸终止反应。将混合物 12 000 r/min 离心 5 min 后, 将上清液通过 0.22 μ m Millipore 过滤器过滤, 然后通过高效液相色谱法检测样品中的 L-谷氨酸钠和 γ -氨基丁酸含量。高效液相色谱法检测条件如下: 洗脱液 A 为甲醇, 洗脱液 B 为四氢呋喃/甲醇/50 mmol/L 乙酸钠(pH 为 6.2, 体积比为 5:75:420)。柱温设定为 30 °C, 洗脱条件如下: 平衡(6 min, 20% A), 梯度(20 min, 20%–80% B)和清洗(3 min, 100% A)。流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm^[27]。

1.10 数据处理和统计分析

试验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。数据分析采用 SPSS 17.0 软件, 数据绘图采用 Origin 8.5 软件。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建及鉴定

重组质粒的构建过程如图 1 所示。分别以大肠杆菌 K12 和酿酒酵母的基因组为模板, 采用 PCR 技术克隆出编码 L-谷氨酸脱羧酶的基因 *gadB* 和编码磷酸吡哆醛合酶的基因 *SNO1* 和 *SNZ1*, 将这 3 个基因分别克隆至质粒 pTrc99a 中, 构建 2 个重组质粒 pTrc99a-*gadB* 和 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1*。

构建的重组质粒 pTrc99a-*gadB* 和 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 通过双酶切鉴定, 结果如图 2 所示。图 2A 中泳道 1、2 和 3 分别是用限制性内切酶 *Kpn* I 酶切质粒 pTrc99a、pTrc99a-*gadB* 和 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 的结果, 可以看出三者的酶切条带大小分别为 4 176、5 576 和 7 320 bp, 与预期大小符合, 可以初步判断为阳性质粒。图 2B 中泳道 1 的条带大小约为 4 176 bp, 是限制性内切酶 *Kpn* I 单酶切质粒 pTrc99a 所得。泳道 2 获得了大小分别为 4 176 bp 和 1 401 bp 的 2 条带, 是用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Kpn* I 双酶切重组质粒 pTrc99a-*gadB* 所得。酶切获得的 2 条条带的大小与线性质粒 pTrc99a 和 *gadB* 基因大小相符, 说明载体 pTrc99a 整合了外源基因片段 *gadB*。泳道 3 为限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切重组质粒 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 的结果, 泳道 4 为限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 的结果。泳道 3 和 4 的第 2 条带大小分别为 894 bp 和 675 bp, 说明载体 pTrc99a 整合了外源基因片段 *SNZ1* 和 *SNO1*, 因此可以确定重组质粒 pTrc99a-*gadB-SNO1-SNZ1* 构建成功。

2.2 重组蛋白电泳分析

重组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果如图 3 所示。泳道 1、2、3 和 4 分别表示 *E. coli*

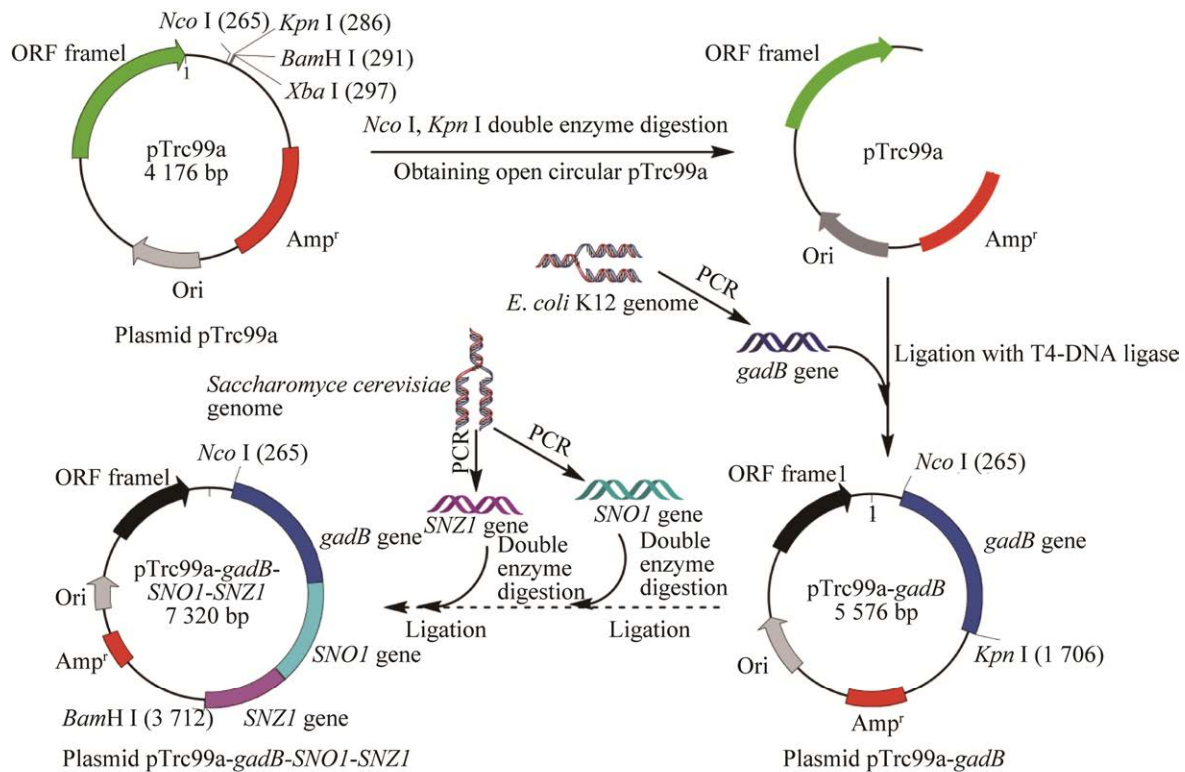


图 1 重组质粒构建流程图

Figure 1 Flow chart of the recombinant plasmid construction.

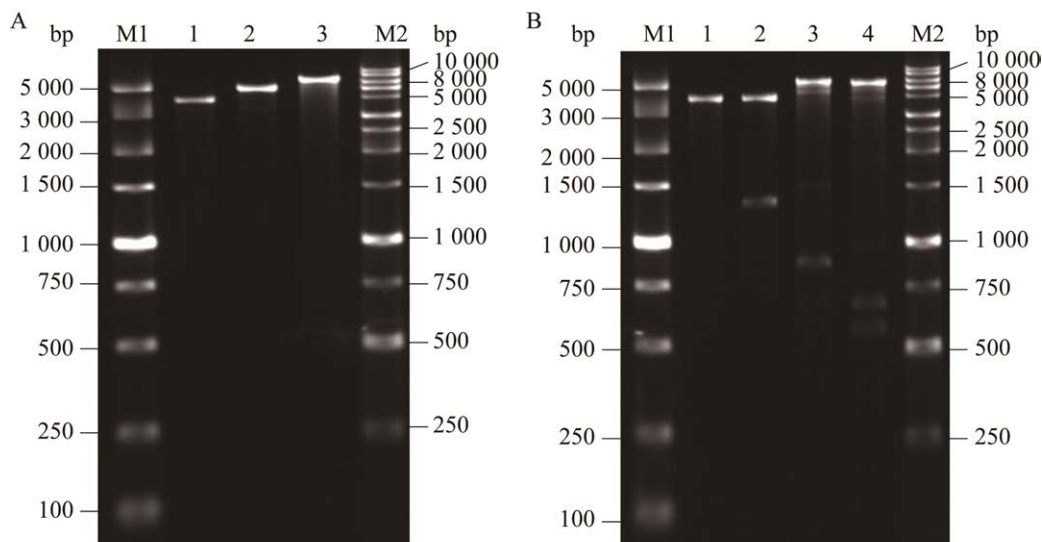


图 2 重组质粒的单酶切验证(A)和双酶切验证(B)

Figure 2 Single (A) and double (B) restriction digestion analysis of recombinant plasmids. A, Lane M1 and M2: Marker; Lane 1: Linearized pTrc99a by *Kpn*I (4 176 bp); Lane 2: Linearized pTrc99a-*gadB* by *Kpn*I (5 576 bp); Lane 3: Linearized pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNO1* by *Kpn*I (7 320 bp). B, Lane M1 and M2: Marker; Lane 1: pTrc99a digested by *Kpn*I (4 176 bp); Lane 2: pTrc99a-*gadB* digested by *Nco*I and *Kpn*I (4 176 bp+1 401 bp); Lane 3: pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNO1* digested by *Bam*HI and *Xba*I (6 426 bp+894 bp); Lane 4: pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNO1* digested by *Bam*HI and *Kpn*I (6 645 bp+675 bp).

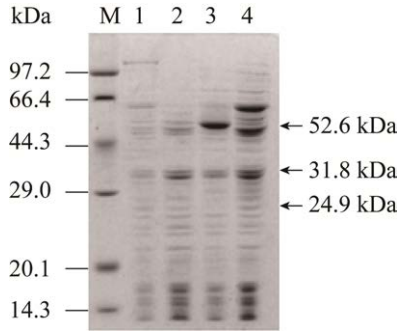


图3 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 3 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. Lane M: Protein molecular weight marker; Lane 1: Culture lysate from *E. coli* K12; Lane 2: Culture lysate from *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*; Lane 3: Culture lysate from *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*; Lane 4: Culture lysate from *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZ1*.

K12、*E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*、*E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 和 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZ1* 诱导表达后产生的蛋白条带。L-谷氨酸脱羧酶 GadB 包含 466 个氨基酸, 分子量为 52.6 kDa。磷酸吡哆醛合酶 SNO1 包含 224 个氨基酸, 分子量为 24.9 kDa; 磷酸吡哆醛合酶 SNZ1 包含 297 个氨基酸, 分子量为 31.8 kDa。从电泳图可以看出, 重组菌株表达的 3 个蛋白分子量与预期分子量大小一致, 说明 3 个蛋白在重组菌株中均表达成功。

2.3 L-谷氨酸钠和 γ -氨基丁酸标准曲线

底物 L-谷氨酸钠的线性回归方程为 $y = 1\ 925\ 820x + 93\ 191$, 相关系数 R^2 为 0.999 1。产物 γ -氨基丁酸的线性回归方程为 $y = 4\ 687\ 190x + 386\ 944$, 相关系数 R^2 为 0.999 3。2 个回归方程的线性相关系数均超过 0.99, 表明线性关系良好, 可用作标准曲线。

2.4 四个菌株发酵产 γ -氨基丁酸能力的比较

通过高效液相色谱法检测 4 个重组菌发酵液中 γ -氨基丁酸含量, 结果如图 4 所示。从图 4

可以看出, 重组菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* (R3) 发酵液中的 γ -氨基丁酸浓度达到 4.6 g/L, 是 4 个菌株中产 γ -氨基丁酸能力最强的一个菌株。出发菌株 *E. coli* K12 (R1) 发酵液中 γ -氨基丁酸浓度为 0.05 g/L, 相对较低。基因敲除菌 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE* (R2) 的发酵液中 γ -氨基丁酸的含量为 0.21 g/L。相对于原始菌株, 提高了 4.2 倍。该结果表明, 基因敲除之后代谢流朝着有利于 γ -氨基丁酸的方向生成。在基因敲除菌株的基础上, 构建了 2 个重组菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* (R3) 和 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZ1* (R4)。从图 4 可知, 重组菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZ1* 的发酵液中 γ -氨基丁酸的含量为 4.2 g/L (R4), 低于重组菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* (R3), 可能的原因是虽然 2 个基因 *SNO1* 和 *SNZ1* 的表达能够提高辅酶因子磷酸吡哆醛的含量, 进而提高 L-谷氨酸脱羧酶 GadB 的活性, 但却消耗了大量的能量, 从而使菌体的代谢负担加重, 最终导致 γ -氨基丁酸的生产能力下降。

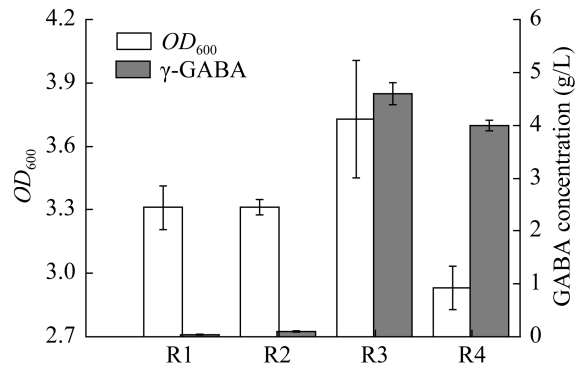


图4 四个菌株发酵产 γ -氨基丁酸能力的比较

Figure 4 Comparison of the GABA content in fermentation broth of four strains. The error bar represents the standard deviation of three replications. R1: *E. coli* K12; R2: *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*; R3: *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*; R4: *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*-*SNO1*-*SNZ1*.

2.5 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 的发酵特性

菌株 *E. coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-

gadB 在含 5 g/L 底物 L-谷氨酸钠的发酵培养基中的发酵特性如图 5A 所示。由图 5 可以看出, 该菌株的 OD_{600} 在初始的 6 h 内达到 4.0, 这时

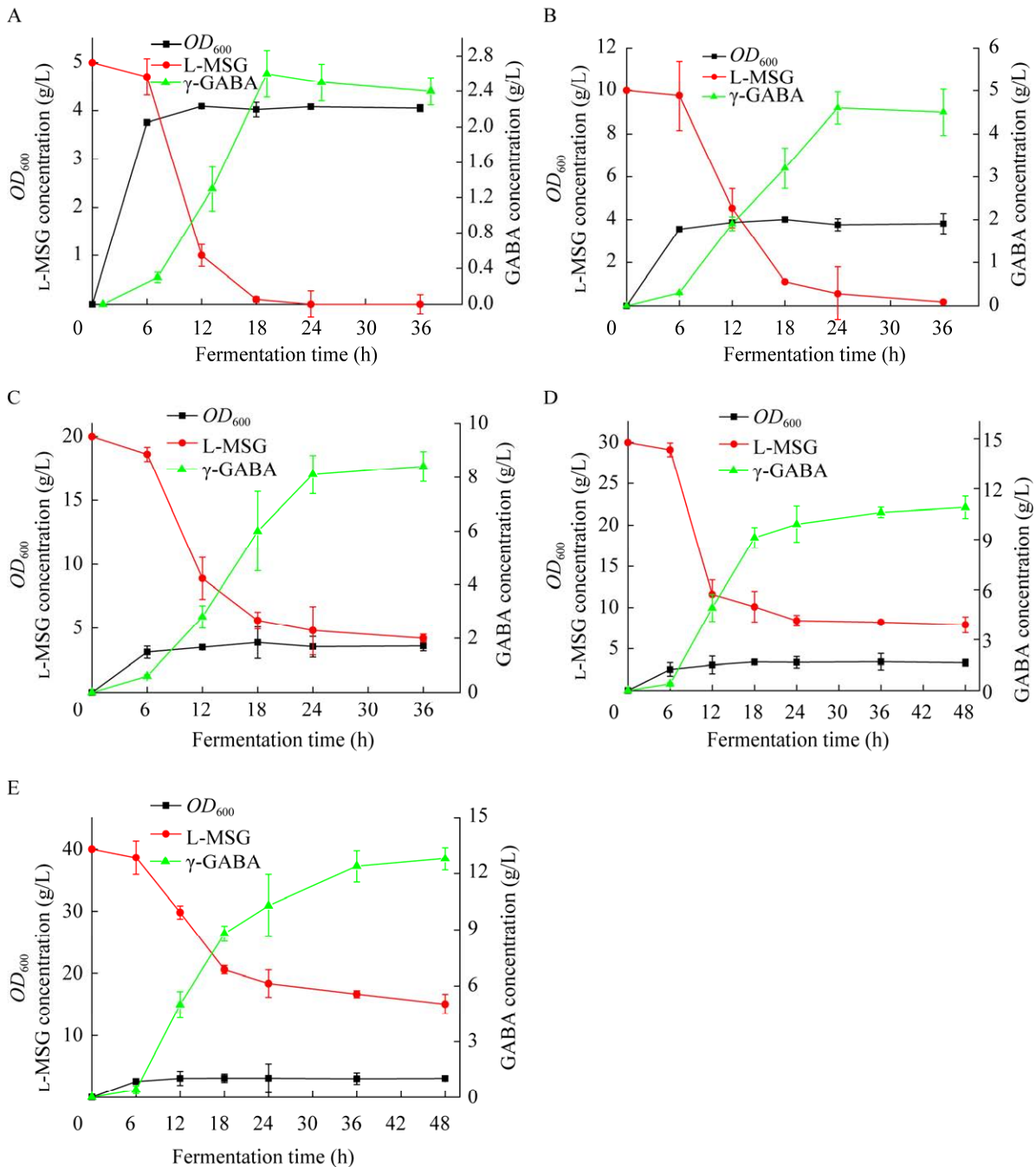


图 5 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB* 的发酵特性

Figure 5 Fermentation characteristics of the strain *Escherichia coli* K12 Δ *gabT* Δ *gabP* Δ *puuE*/pTrc99a-*gadB*. The error bar represents the standard deviation of three replications. A: 5 g/L L-MSG. B: 10 g/L L-MSG. C: 20 g/L L-MSG. D: 30 g/L L-MSG. E: 40 g/L L-MSG.

调整发酵液的 pH 至 4.2, 随着培养时间的增加, 菌体的光密度值有微小的增长。底物 L-谷氨酸钠在 18 h 内就消耗殆尽, 相应的发酵液中 γ -氨基丁酸的含量快速积累, 也是在 18 h 达到了峰值, 为 2.6 g/L, 之后略有下降。可能的原因是发酵培养基中菌体所需的营养物质不多, 且 18 h 底物已消耗完全。在 γ -氨基丁酸合成之后, 后续的菌体可能部分利用了 γ -氨基丁酸作为一种能源物质, 以供菌体后续的生长。由图 5B 可以看出, 10 g/L 的底物 L-谷氨酸钠在 24 h 时基本耗尽, γ -氨基丁酸含量在 6–24 h 内有显著的提高, 峰值达到了 4.6 g/L, 之后的 12 h 内, 其含量变化较小。由图 5C 可知, OD_{600} 在开始之后的 12 h 已经达到最大值, 之后变化平稳。底物 L-谷氨酸钠在 6–18 h 快速消耗, 之后保持平稳, 最终底物并没有完全被菌体消耗。产物 γ -氨基丁酸的浓度在 30 h 时达到最大值, 为 8.4 g/L。由图 5D 可知, 30 g/L 的底物 L-谷氨酸钠在培养基中并没有消耗完全。在摇瓶发酵过程中, 菌体的光密度值 OD_{600} 也比较低, 说明由于底物浓度增大, 菌体的代谢受到了一定的影响, 进而影响到菌体的光密度值。产物 γ -氨基丁酸的最高浓度为 10.6 g/L。由图 5E 可知, 随着底物 L-谷氨酸钠浓度的进一步增大, 菌体的光密度值 OD_{600} 进一步减小, 且发酵液中还残留较高浓度的 L-谷氨酸钠。产物 γ -氨基丁酸的产量在 36 h 达到最大值, 之后变化平稳。

2.6 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB-SNO1-SNZ1 的发酵特性

从重组菌株 *E. coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB-SNO1-SNZ1 的蛋白电泳图可以看出, L-谷氨酸脱羧酶基因 *gadB* 和磷酸吡哆醛合酶基因 *SNO1* 和 *SNZ1* 均得到了表达。每隔 6 h 对该菌株发酵液中的光密度值 OD_{600} 以及 γ -氨基

丁酸和 L-谷氨酸钠的含量进行测定, 结果如图 6 所示。由图 6A 可知, 5 g/L 的底物 L-谷氨酸钠

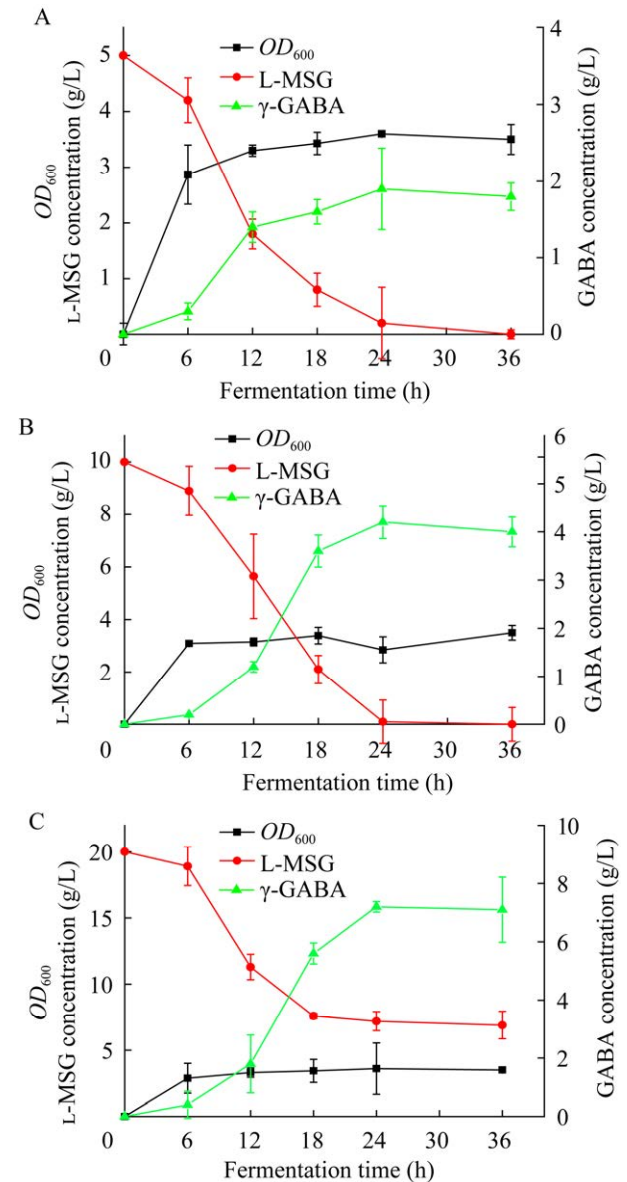


图 6 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB-SNO1-SNZ1 的发酵特性

Figure 6 Fermentation characteristics of the strain *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB-SNO1-SNZ1. The error bar represents the standard deviation of three replications. A: 5 g/L L-MSG. B: 10 g/L L-MSG. C: 20 g/L L-MSG.

在发酵 24 h 就被基本耗尽, 菌株的 OD_{600} 值在发酵 24 h 达到最高值, 此时产物 γ -氨基丁酸的浓度达到 2.0 g/L。由图 6B 可以看出, 10 g/L 的底物 L-谷氨酸钠在发酵 24 h 后被完全耗尽, 此时 γ -氨基丁酸的产量达到 4.1 g/L。从图 6C 可以看出, 20 g/L 的底物 L-谷氨酸钠在发酵前 20 h 内逐渐被消耗, 之后变化较小, 而产物 γ -氨基丁酸的产量达到了 6.8 g/L。

2.7 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB 在 1 L 摇瓶体系中的发酵特性

菌株 *E. coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB 在含有 20 g/L 底物 L-谷氨酸钠的 1 L 发酵培养基(300 mL/1 000 mL)中进行扩大培养, 每隔 6 h 对发酵液的光密度值 OD_{600} 、L-谷氨酸钠浓度和 γ -氨基丁酸的浓度进行测定, 结果如图 7 所示。从图 7 可以看出, 菌体的光密度值 OD_{600} 在初始的 6 h 增长较快, 在第 6 小时达到最大值 3.9。随着培养时间的增加, 菌体的光密度值基本保持稳定。底物 L-谷氨酸钠的浓度在培养的

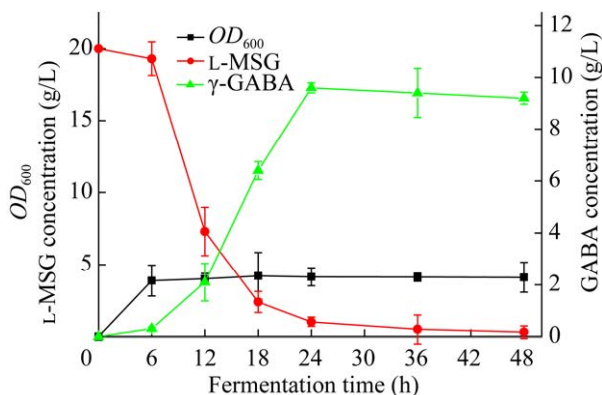


图 7 菌株 *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB 的发酵时间曲线

Figure 7 Time-course analysis of the fermentation of the strain *Escherichia coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB. The error bar represents the standard deviation of three replications.

前 24 h 迅速下降, 在第 36 小时基本耗尽。发酵液中 γ -氨基丁酸的含量在培养的第 24 小时达到了峰值, 为 9.4 g/L。之后, 随着培养时间的增加, γ -氨基丁酸的含量略有下降。

3 讨论与结论

本研究通过构建重组大肠杆菌来提高其合成 γ -氨基丁酸的能力。将编码 L-谷氨酸脱羧酶的基因 *gadB* 和磷酸吡哆醛合酶的基因 *SNO1* 和 *SNZ1* 引入大肠杆菌, 得到重组菌 *E. coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB 和 *E. coli* K12 Δ gabT Δ gabP Δ puuE/pTrc99a-gadB-SNO1-SNZ1。前者发酵生产 γ -氨基丁酸的最高含量为 9.4 g/L。与原始菌(0.429 g/L)相比, 提高了 21.9 倍。当 *SNO1* 和 *SNZ1* 同时引入时, 由于能量的过度消耗, 重组菌合成 γ -氨基丁酸的能力略有下降。

鉴于 γ -氨基丁酸具有重要的生理功能, 许多研究组也开展了相关研究工作。将来自植物乳杆菌的谷氨酸脱羧酶基因引入清酒乳杆菌后, 重组菌合成 γ -氨基丁酸的能力提高了 1.35 倍, 产量最高达 265.3 mmol/L^[28]。将来自水稻的谷氨酸脱羧酶基因引入长双歧杆菌, 重组菌在含 30 g/L L-谷氨酸钠的培养基中发酵生产了 0.1 g/L 的 γ -氨基丁酸^[29]。当大肠杆菌 XL1 的谷氨酸脱羧酶基因在大肠杆菌 XB 中表达时, 重组菌发酵生产了 5.09 g/L 的 γ -氨基丁酸^[30]。当大肠杆菌 XI-1 的谷氨酸脱羧酶 B 和 C 的基因同时在大肠杆菌 XBT 中表达时, 重组菌发酵生产 γ -氨基丁酸的产量为 5.46 g/L^[31]。将谷氨酸脱羧酶 A 和 C 的基因同时引入大肠杆菌, 重组菌发酵生产了 5.65 g/L 的 γ -氨基丁酸^[32]。与这些研究相比, 本研究构建的重组菌在 1 L 摇瓶中产生了 9.4 g/L γ -氨基丁酸。该研究结果为 γ -氨基丁酸的产业化生产和应用奠定了良好基础。

参考文献

- [1] PHAM VD, SOMASUNDARAM S, PARK SJ, LEE SH, HONG SH. Co-localization of GABA shunt enzymes for the efficient production of gamma-aminobutyric acid via GABA shunt pathway in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(4): 710-716.
- [2] KRNJEVIĆ K, SCHWARTZ S. Is γ -aminobutyric acid an inhibitory transmitter?[J]. *Nature*, 1966, 211(5056): 1372-1374.
- [3] PETROFF OAC. Book review: GABA and glutamate in the human brain[J]. *The Neuroscientist*, 2002, 8(6): 562-573.
- [4] OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 1984, 229(3): 374-392.
- [5] 姚城镇. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产 γ -氨基丁酸[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2022.
YAO CZ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for γ -aminobutyric acid production[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [6] ADEGHATE E, PONERY AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats[J]. *Tissue and Cell*, 2002, 34(1): 1-6.
- [7] TING WONG CG, BOTTIGLIERI T, SNEAD OC. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease[J]. *Annals of Neurology*, 2003, 54(S6): S3-S12.
- [8] OKADA T, SUGISHITA T, MURAKAMI T, MURAI H, SAIKUSA T, HORINO T, ONODA A, KAJIMOTO O, TAKAHASHI R, TAKAHASHI T. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2000, 47(8): 596-603.
- [9] WANG QP, JAMMOUL F, DUBOC A, GONG J, SIMONUTTI M, DUBUS E, CRAFT CM, YE W, SAHEL JA, PICAUD S. Treatment of epilepsy: the GABA-transaminase inhibitor, vigabatrin, induces neuronal plasticity in the mouse retina[J]. *The European Journal of Neuroscience*, 2008, 27(8): 2177-2187.
- [10] SASAKI S, YOKOZAWA T, CHO EJ, OOWADA S, KIM M. Protective role of γ -aminobutyric acid against chronic renal failure in rats[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, 58(11): 1515-1525.
- [11] PURWANA I, ZHENG J, LI XM, DEURLOO M, SON DO, ZHANG ZY, LIANG C, SHEN E, TADKASE A, FENG ZP, LI YM, HASILO C, PARASKEVAS S, BORTELL R, GREINER DL, ATKINSON M, PRUD'HOMME GJ, WANG QH. GABA promotes human β -cell proliferation and modulates glucose homeostasis[J]. *Diabetes*, 2014, 63(12): 4197-4205.
- [12] BOONSTRA E, de KLEIJN R, COLZATO LS, ALKEMADE A, FORSTMANN BU, NIEUWENHUIS S. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior[J]. *Frontiers in Psychology*, 2015, 6: 1520.
- [13] PARK SJ, KIM EY, NOH W, OH YH, KIM HY, SONG BK, CHO KM, HONG SH, LEE SH, JEGAL J. Synthesis of nylon 4 from gamma-aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(7): 885-892.
- [14] SIRAGUSA S, de ANGELIS M, di CAGNO R, RIZZELLO CG, CODA R, GOBBETTI M. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7283-7290.
- [15] LI HX, QIU T, HUANG GD, CAO YS. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 85.
- [16] YOUNGS TL, TUNNICLIFF G. Substrate analogues and divalent cations as inhibitors of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry International*, 1991, 23(5): 915-922.
- [17] UENO Y, HAYAKAWA K, TAKAHASHI S, ODA K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(7): 1168-1171.
- [18] STRAUSBAUCH PH, FISCHER EH. Structure of the binding site of pyridoxal 5'-phosphate to *Escherichia coli* glutamate decarboxylase[J]. *Biochemistry*, 1970, 9(2): 233-238.
- [19] MARTEL A, BOUTHIER dela TOUR C, le GOFFIC F. Pyridoxal 5'-phosphate binding site of *Escherichia coli* beta cystathionase and cystathionine gamma synthase comparison of their sequences[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987, 147(2): 565-571.

- [20] ANAI M, FUJIYOSHI T, NAKAYAMA J, TAKAGI Y. Inhibition of the recBC enzyme of *Escherichia coli* by specific binding of pyridoxal 5'-phosphate to DNA binding site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(21): 10853-10856.
- [21] BERTOLDI M, CELLINI B, LAURENTS DV, BORRI VOLTATTORNI C. Folding pathway of the pyridoxal 5'-phosphate C-S lyase MalY from *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 2005, 389(3): 885-898.
- [22] UPPULURI P, SARMAH B, LAJEAN CHAFFIN W. *Candida albicans* SNO1 and SNZ1 expressed in stationary-phase planktonic yeast cells and base of biofilm[J]. *Microbiology*, 2006, 152(7): 2031-2038.
- [23] STREETER JG, THOMPSON JF. Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1972, 49(4): 572-578.
- [24] WALLACE W, SECOR J, SCHRADER LE. Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation[J]. *Plant Physiology*, 1984, 75(1): 170-175.
- [25] YU P, REN Q, WANG XX, HUANG XX. Enhanced biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) in *Escherichia coli* by pathway engineering[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 141: 252-258.
- [26] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [27] 刘铁兵, 龚金炎, 朱银邦, 李博斌, 赵振, 郭小青, 黄俊. 柱前衍生化法农产品中 γ -氨基丁酸的检测方法研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(10): 118-121, 128.
- [28] LIU TB, GONG JY, ZHU YB, LI BB, ZHAO Z, GUO XQ, HUANG J. The determination of aminobutyric acid after pre-column derivatization in farm products[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, 29(10): 118-121, 128 (in Chinese).
- [29] KOOK MC, SEO MJ, CHEIGH CI, LEE SJ, PYUN YR, PARK H. Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2010, 53(6): 816-820.
- [30] PARK KB, JI GE, PARK MS, OH SH. Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ -aminobutyric acid production[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(21): 1681-1684.
- [31] PARK KB, OH SH. Enhancement of γ -aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(18): 1459-1463.
- [32] DINH le VO T, KIM TW, HONG SH. Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(4): 645-650.
- [33] DINH le VO T, KO JS, PARK SJ, LEE SH, HONG SH. Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by employing synthetic complex between glutamate decarboxylase and glutamate/GABA antiporter in engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(8): 927-933.