

文章编号:1673-1689(2008)04-0107-05

谷氨酸脱羧酶发酵工艺的优化

杨帆, 李江华*, 徐岩, 房峻

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 用大肠杆菌 AS1.505 进行液态发酵生产谷氨酸脱羧酶并优化培养基, 考察了碳源、氮源、复合营养物质、起始 pH 及发酵时间对酶活的影响, 确定最佳产酶培养基组成为: 葡萄糖 1.0 g/dL, 蛋白胨 3.0 g/dL, 氯化钠 0.3 g/dL, 磷酸氢二钾 0.1 g/dL, 硫酸镁 0.02 g/dL, L-谷氨酸 0.01 g/dL, 玉米浆 1.5 g/dL, 生物素 30 μ g/L, 麸皮 4 g/dL; pH 6.5。在此基础上, 设计发酵条件的优化实验。实验结果表明: 250 mL 的三角瓶装液量 25 mL, 37 $^{\circ}$ C, 起始 pH 6.5, 培养 18 h 达到产酶高峰, 产酶活力可达 1 290 U/mL。

关键词: 谷氨酸脱羧酶; 优化; 发酵

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Optimizing of Fermentation Condition for High-production Glutamic Acid Decarboxylase(GAD)

YANG Fan, LI Jiang-Hua*, XU Yan, FANG Jun

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Compositions of culture medium and fermentation conditions were studied to improve quantity of Glutamic acid decarboxylase (GAD) production by AS 1.505 liquid fermentation. The optimized medium and conditions were as follows: glucose 1.0%, tryptone 3.0%, NaCl 0.3%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, L-Glutamic acid 0.01%, corn steep liquor 1.5%, biotin 20 μ g/L, bran 4%, initial pH 6.5, 37 $^{\circ}$ C, liquid volume 25 mL/250 mL baffled flask, 200 r/min, for 18 hours. Under these conditions, the activity of GAD was achieved at 1 290 U/mL.

Key words: Glutamic acid decarboxylase (GAD); Optimization; Fermentation

谷氨酸脱羧酶(GAD, EC4.1.1.15)是一种催化 L-谷氨酸脱掉一个羧基形成 γ -氨基丁酸(GABA)的酶^[1-2]。GAD 广泛分布于从单细胞有机体到哺乳动物等生物中, 在哺乳动物神经系统中起作用已为人们所了解, 其机理研究仍在不断进展。

GAD 在生物体中的其它可能作用目前也是科学家的关注点^[3], 富含 GABA 的食品开发也受到重视^[4]。GAD 则是生物技术富集生产 GABA 的关键酶。另外, GAD 还有望作为诊断酶用于甄别和预测糖尿病, 以及作为极具潜力的诊疗型酶制剂。了解

收稿日期: 2007-09-21.

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0532).

作者简介: 杨帆(1983-), 男, 江苏无锡人, 生物化工硕士研究生.

* 通讯作者: 李江华(1966-), 男, 江西九江人, 工学硕士, 副教授, 主要从事生物化工与发酵工程研究. Email: lijiahua@sohu.com

它的分布和特性对于它的应用具有指导意义^[5]。

在微生物中,曲霉、酵母、乳酸菌、大肠杆菌、变形杆菌属(*Proteus vulgaris*, *P. morganii*),以及梭状芽胞杆菌属等都存在谷氨酸脱羧酶。大肠杆菌具有较高的谷氨酸脱羧酶活力,其中的谷氨酸脱羧酶相对分子质量为30万,具有2个分子的磷酸吡哆醛(PLP)。本质上反应是非可逆的,仅对L-谷氨酸有特异性,可被羟胺、氨基脲等(醛试剂)抑制^[6]。至今为止,细菌GAD中研究最多最深入的就是*E. coli* GAD,获取比较方便,是所考查的GAD中最有代表性的酶。GAD可被培养基中的谷氨酸诱导生成,产量可达10 mL/L,纯酶由6个相同的53 000 Da亚基组成,每个亚基有一分子磷酸吡哆醛共价结合到赖氨酸残基,酶在低温、低蛋白质浓度、高于pH 6.0时易发生离解,最适底物是L-谷氨酸,pH 4.0~4.5之间酶活最高^[7]。

作者通过对谷氨酸脱羧酶液态发酵培养基及发酵条件进行优化,使得大肠杆菌在摇瓶水平产出具有较高酶活力的谷氨酸脱羧酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 大肠杆菌 AS1.505,购自中科院微生物研究所。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基:营养琼脂 4.5 g/dL, pH 自然。

2) 发酵培养基:葡萄糖 1.0 g/dL,蛋白胨 3.0 g/dL,氯化钠 0.3 g/dL,磷酸氢二钾 0.1 g/dL,硫酸镁 0.02 g/dL, L-谷氨酸 0.01 g/dL,玉米浆 1.5 g/dL,生物素 20 μ g/L; pH 6.5。

1.2 培养方法

配制发酵培养基,分装 25 mL 培养基于 250 mL 的三角瓶中,121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min;将在斜面培养基中培养好的菌种接种到发酵培养液中,37 $^{\circ}$ C 恒温振荡,培养 18 h(200 r/min)。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定 将干燥的离心管称重并记录,取 10 mL 发酵液,4 000 r/min 离心 10 min,去上清液,称重并记录,计算湿菌体重。

1.3.2 酶活测定 取 0.5 mL 发酵液,4 000 r/min 离心 10 min,去上清液,加 0.2 mol/L 的谷氨酸溶液(pH 4.6)10 mL,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡 10 min(200 r/min),立即沸水浴 10 min 终止反应,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液;量取 1 mL 上清液于三角瓶中,加入 39 mL 蒸馏水,混匀,吸取 1.0 mL 于带

塞试管中,加入 1 mL 质量分数 6% 的苯酚和 0.4 mL 次氯酸钠(活性氯质量分数 $\geq 5.2\%$),充分混匀,沸水浴 10 min 后冰水浴 20 min,再加入 3.1 mL 蒸馏水,然后在 630 nm 处测 D 值^[8];制作 γ -氨基丁酸含量与吸光度关系的标准曲线,根据标准曲线和所测 D 值,计算出酶活。酶活力单位定义:在反应液中,每分钟催化底物生成 1 μ mol γ -氨基丁酸所需的酶量为 1 个活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌生长曲线和产酶曲线

对大肠杆菌进行摇瓶振荡培养,测定 GAD 酶活力和菌体湿重培养随时间的变化情况。结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,大肠杆菌在 0~4 h 为延滞期,4~16 h 为该菌对数生长期,生长到 16 h 时菌体生长达到最高,而 GAD 酶活力在 20 h 左右时最高,随着时间的延长,GAD 酶活力逐渐下降,生物量也有所降低,可能是菌体细胞开始自溶,胞质外流,其中可能产生的蛋白酶会造成 GAD 酶部分分解。因此确定培养 18 h 为培养最适宜时间。

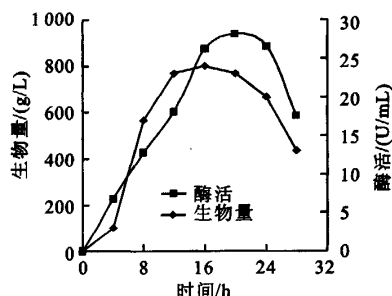


图1 大肠杆菌生长曲线和产酶曲线

Fig. 1 Effect of culture time on growth of *E. coli* and GAD's production

2.2 不同碳源对产酶的影响

碳是微生物的基本营养元素,是细胞内储藏物和各种代谢产物(包括酶)的骨架,也是微生物生长的主要能量来源。不同的微生物种类能够利用的碳水化合物差别很大。添加 1 g/dL 的可溶性淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖作为碳源;培养基中其它组分为:蛋白胨 3.0 g/dL,氯化钠 0.3 g/dL,磷酸氢二钾 0.1 g/dL,硫酸镁 0.02 g/dL, L-谷氨酸 0.01 g/dL,玉米浆 1.5 g/dL,生物素 20 μ g/L; pH 6.5。发酵培养 18 h 测酶活,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出,不同碳源对产酶影响很大,以葡萄糖为碳源产酶最高,发酵 18 h 达产酶高峰 1 119 U/mL,所以选择用葡萄糖作为培养基的碳源。

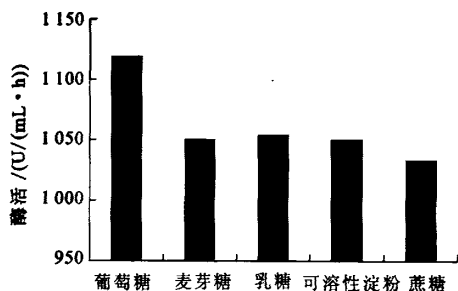


图2 碳源对酶活的影响

Fig. 2 Effect of different carbon sources on the enzyme production

2.3 葡萄糖质量浓度对酶活的影响

不同葡萄糖质量浓度对产酶的影响如图3所示。在培养基中加入不同质量浓度的葡萄糖,分别为0.2 g/dL、0.6 g/dL、1.0 g/dL、1.4 g/dL、1.8 g/dL,其它组分不变。由图3可知,当培养基中葡萄糖质量浓度为1.0 g/dL时,谷氨酸脱羧酶活力最高,发酵18 h达产酶高峰1119 U/mL,所以选择1.0 g/dL作为葡萄糖的添加量。

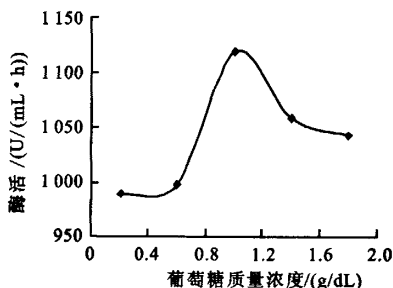


图3 葡萄糖质量浓度对酶活的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of glucose on the enzyme production

2.4 不同氮源对产酶的影响

发酵培养基的氮源可以用有机氮源、无机氮源或者两者混合使用。实验中各选取2 g/dL 硝酸钠、尿素、硫酸铵、酵母膏、蛋白胨为氮源,其它组分为:葡萄糖1.0 g/dL、氯化钠0.3 g/dL、磷酸氢二钾0.1 g/dL、硫酸镁0.02 g/dL、L-谷氨酸0.01 g/dL、玉米浆1.5 g/dL、生物素20 μg/L; pH 6.5。考察不同氮源对产酶的影响,结果如图4所示。由图4可知,无机氮源不利于大肠杆菌产酶,有机氮源则能较好地促进大肠杆菌分泌谷氨酸脱羧酶,其中蛋白胨的效果又优于酵母膏。一方面可能因为无机盐对培养基pH的影响导致对产酶的抑制。一方面可能因为有机氮源中含有微生物正常生长繁殖的所必需的各种生长素,而这些生长素大多是辅酶或辅基的组分。以蛋白胨为氮源产酶最高,发酵18 h

达产酶高峰1050 U/mL,所以选择用蛋白胨作为培养基的氮源。

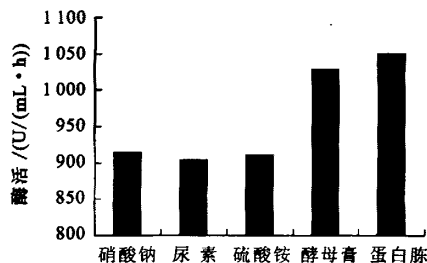


图4 氮源对酶活的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on the enzyme production

2.5 蛋白胨质量浓度对酶活的影响

配制蛋白胨不同质量浓度的培养基,分别为1.0 g/dL、2.0 g/dL、3.0 g/dL、4.0 g/dL、5.0 g/dL,考察不同蛋白胨质量浓度对产酶的影响。其它组分为葡萄糖1.0 g/dL、氯化钠0.3 g/dL、磷酸氢二钾0.1 g/dL、硫酸镁0.02 g/dL、L-谷氨酸0.01 g/dL、玉米浆1.5 g/dL、生物素20 μg/L; pH 6.5。所得结果如图5所示。

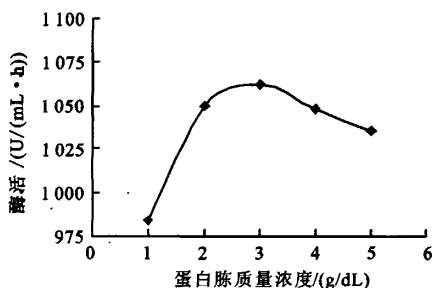


图5 蛋白胨质量浓度对酶活的影响

Fig. 5 Effect of the concentration of tryptone on the enzyme production

由图5可知,蛋白胨质量浓度在2~4 g/dL之间时,酶活相差不大。考虑到经济因素,确定培养基中蛋白胨质量浓度为3 g/dL。

2.6 生物素质量浓度对酶活的影响

大肠杆菌虽然能合成自身生长所需的全部生长因子,在只含有碳素、氮素、矿质元素和微量元素的培养基上也能生长,但通过添加额外的生长因子往往能促进其生长。在培养基中添加不同量的生物素,分别为10、20、30、40、50、60 μg/L,并以空白为对照,考察不同生物素质量浓度对产酶的影响,培养基其它组分为蛋白胨3.0 g/dL、葡萄糖1 g/dL、氯化钠0.3 g/dL、磷酸氢二钾0.1 g/dL、硫酸镁0.02 g/dL、L-谷氨酸0.01 g/dL、玉米浆1.5 g/dL; pH 6.5。结果如图6所示。

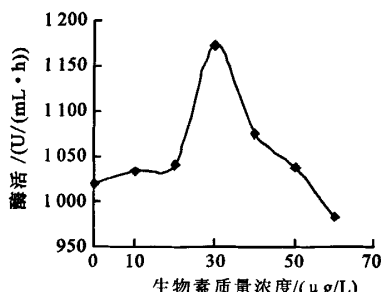


图6 生物素质量浓度对酶活的影响

Fig. 6 Effect of the concentration of biotin on the enzyme production

图6显示,额外添加一定量的生物素可以促进大肠杆菌分泌谷氨酸脱羧酶,当添加量在30 μg/L发酵18 h达产酶高峰,但生物素质量浓度过高时也会抑制酶活。所以选择30 μg/L作为生物素的添加量。

2.7 玉米浆质量浓度对酶活的影响

玉米浆是发酵中的一个重要因素。玉米浆中含有丰富的生物素和其它氨基酸和维生素。在工业生产中通过添加玉米浆可达到添加生长因子的目的。在发酵培养基中加入不同量的玉米浆,分别为0.5 g/dL、1 g/dL、1.5 g/dL、2 g/dL、2.5 g/dL、3 g/dL,以空白为对照,其它成分为蛋白胨3.0 g/dL、葡萄糖1 g/dL、氯化钠0.3 g/dL、磷酸氢二钾0.1 g/dL、硫酸镁0.02 g/dL、L-谷氨酸0.01 g/dL、生物素30 μg/L; pH 6.5。考察不同玉米浆质量浓度对产酶的影响,所得结果如图7所示。

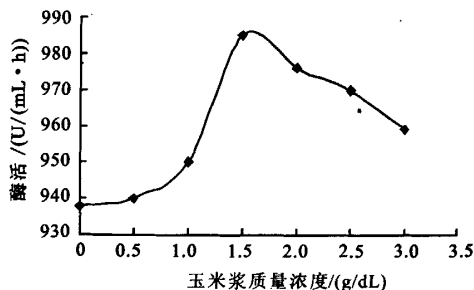


图7 玉米浆质量浓度对酶活的影响

Fig. 7 Effect of the concentration of corn steep liquor on the enzyme production

图7显示,添加玉米浆可以提高酶活,当玉米浆质量浓度为1.5 g/dL时发酵18 h达产酶高峰,所以选择1.5 g/dL作为玉米浆的添加量。

2.8 麸皮添加量对酶活的影响

在发酵工业中,生产成本是必须考虑的一个问题。谷氨酸脱羧酶的辅酶是磷酸吡哆醛,据文献报道,磷酸吡哆醛的添加量对于谷氨酸脱羧酶的酶活有着明显的影响^[9]。磷酸吡哆醛是谷氨酸脱羧酶的必需辅酶,它的添加势必会对谷氨酸脱羧酶的酶

活造成影响,然而磷酸吡哆醛价格很高,添加磷酸吡哆醛使得生产成本提高。实验发现,添加廉价的麸皮对于谷氨酸脱羧酶的酶活提高有明显帮助。麸皮含有多种氨基酸和维生素,氨基酸是酶蛋白的基本结构单元,对于酶蛋白活力也有影响。实验中考察了麸皮添加量分别为1 g/dL、2 g/dL、4 g/dL、6 g/dL、8 g/dL对于酶活的影响。以空白为对照,其它组分为蛋白胨3 g/dL、葡萄糖1 g/dL、氯化钠0.3 g/dL、磷酸氢二钾0.1 g/dL、硫酸镁0.02 g/dL、L-谷氨酸0.01 g/dL; pH 6.5。配制培养基进行发酵实验,测酶活,结果见图8。

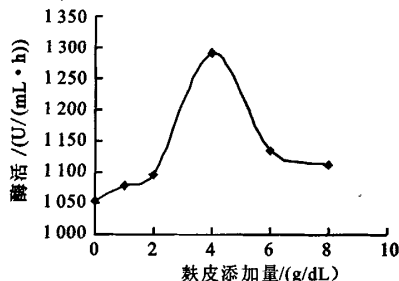


图8 麸皮添加量对酶活的影响

Fig. 8 Effect of the concentration of bran on the enzyme production

由图8可知,麸皮可以代替玉米浆和生物素起到添加生长因子的作用。当添加量为4 g/dL时,谷氨酸脱羧酶活性最高。

2.9 培养基初始 pH 的确定

环境的酸碱度对细菌的生命活动有很大的影响,不同的细菌有不同的最适 pH。调节培养基不同的初始 pH 值,进行发酵实验,测酶活,结果见图9。由图9可知,培养基初始 pH 值为5.5~7.5时适宜大肠杆菌生长,过酸和过碱都不利于大肠杆菌的生长和提高谷氨酸脱羧酶的活力。

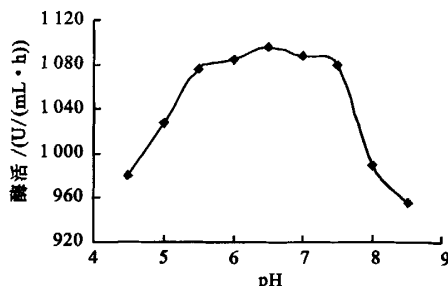


图9 培养基初始 pH 对酶活的影响

Fig. 9 Effect of initial pH on the enzyme production

2.10 温度对酶活的影响

适宜的温度对控制酶催化反应是很重要的。温度的变化不仅影响酶的稳定性,改变酶对底物的亲和性而影响酶的活力,还可能影响副反应的发生及

其反应速率。为了了解谷氨酸脱羧酶的最适催化温度,分别考察了在 32、34、36、38、40 °C 时酶的对活性,结果如图 10 所示。

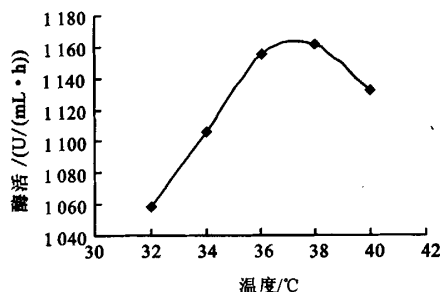


图 10 温度对酶活的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the enzyme production

2.11 装液量对酶活的影响

在 250 mL 的三角瓶中,分别加入 15、20、25、30、35 mL 的培养基,接种后培养 18 h,测定酶活力和生长量,结果如图 11 所示。

随着装液量的增加,菌株的生长量相应减少。装液量对菌株产酶的影响可以分成两部分。当装液量相对高时减少装液量对菌株产酶的影响相当明显;而当装液量相对低时,它的影响几乎可以忽略。考虑到实际生产时的规模,选用 25 mL 装液量。

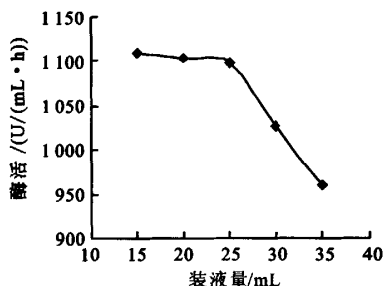


图 11 培养基装液量对酶活的影响

Fig. 11 Effect of liquid volume on the enzyme production

3 结 语

综上所述,实验中通过谷氨酸脱羧酶液态发酵条件的优化,大肠杆菌 AS1.505 产 GAD 的最佳培养基组成为:葡萄糖 1.0 g/dL,蛋白胨 3.0 g/dL,氯化钠 0.3 g/dL,磷酸氢二钾 0.1 g/dL,硫酸镁 0.02 g/dL,L-谷氨酸 0.01 g/dL,玉米浆 1.5 g/dL,生物素 30 μg/L,麸皮 4 g/dL; pH 6.5。培养条件为:250 mL 的三角瓶装液量 25 mL,37 °C,起始 pH 6.5,培养 18 h。在此优化条件下培养,酶活达 1 290 U/mL。在培养基中添加了廉价的麸皮大大提高了谷氨酸脱羧酶的酶活。

参考文献(References):

- [1] Zhang Guijin, Alan W Bown. The rapid determination of γ -Aminobutyric acid [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44: 1007—1009.
- [2] Park Ki-Bum, Ji Geun-Eog, Park Myeong-Soo, et al. Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ -aminobutyric acid production[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 1681—1684.
- [3] Taylor Johanna C, Rapport Lisa, Lockwood G Brian. Octacosanol in human health[J]. *Nutrition*, 2003, 19(2): 192—195.
- [4] 顾振新,蒋振晖. 食品原料中 γ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集技术[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10): 65—69.
GU Zhen-xin, JIANG Zhen-hui. Formation mechanism and accumulation technique of γ -Aminobutyric acid of food raw materials[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(10): 65—69. (in Chinese)
- [5] 袁仕善,周智广. 谷氨酸脱羧酶若干研究进展[J]. 生理科学进展, 2003, 32(2): 77—80.
YUAN Shi-shan, ZHOU Zhi-guang. Research progress on GAD[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2003, 32(2): 77—80. (in Chinese)
- [6] 许建军,江波. 谷氨酸脱羧酶研究进展[J]. 食品工业科技, 2004, 32(7): 131—133.
XU Jian-jun, JIANG Bo. Advances in the research on GAD[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2004, 32(7): 131—133. (in Chinese)
- [7] 许建军,江波,许时婴. *Lactococcus lactis* 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2004, 23(3): 79—84.
XU Jian-jun, JIANG Bo, XU Shi-yin. Purification and partial characterization of glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2004, 23(3): 79—84. (in Chinese)
- [8] 王芳权,陈蔚青,陈虹. 比色法快速测定酶转化反应中 γ -氨基丁酸质量分数[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 78—81.
WANG Fang-quan, CHEN Wei-qing, CHEN Hong. Rapid determination of γ -Aminobutyric acid in enzymatic reaction by spectrometric method[J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2006, 28(2): 78—81. (in Chinese)
- [9] Noriko Komatsuzakia, Jun Shima. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Microbiology*, 2005, 22(1): 497—504.

(责任编辑:秦和平,李春丽)