

# 生物酶法合成 *L*-茶氨酸和聚谷氨酸的 高效同步分离纯化

忻寅强, 鲁昌燕, 王 期, 浦荷芳, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 利用  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GGT, EC 2.3.2.2) 催化, 以谷氨酰胺和乙胺为底物进行酶反应. 反应后主要成分为 *L*-茶氨酸和聚谷氨酸 (poly  $\gamma$ -glutamic acid, PGA), 杂质有氯离子、乙胺以及少量谷氨酰胺和谷氨酸. 通过弱酸性阳离子树脂和弱碱性阴离子树脂双柱交换层析, 使 *L*-茶氨酸与聚谷氨酸、乙胺和氯离子分离, 得到进一步纯化, 同时可以得到极有经济价值的副产品聚谷氨酸. 本研究结果为重组大肠杆菌  $\gamma$ -GGT 应用于工业化生产茶氨酸提供了一定的参考依据.

[关键词] *L*-茶氨酸, 聚谷氨酸,  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶, 离子交换

[中图分类号] Q 789 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011) 02-0090-04

## Effective Simultaneous Separation and Purification of *L*-theanine and Poly- $\gamma$ -glutamic Acid From Enzyme-Catalyzed Synthesis

Xin Yinqiang Lu Changyan Wang Qi Pu Hefang Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** In enzymatic reaction which was catalyzed by  $\gamma$ -GGT, glutamine and ethylamine were used as substrates. The resultant consists of considerable *L*-theanine and PGA, mixed with multiple impurities include chloride, ethylamine, glutamine and glutamate. Through cation/anion tandem exchange chromatography with respective types of resin, *L*-theanine was effectively separated for further purification, accompanied with acquisition of valuable byproduct PGA. This study provides the evidence for large scale production of *L*-theanine with recombinant  $\gamma$ -GGT.

**Key words** *L*-theanine, PGA,  $\gamma$ -GGT, ion exchange

*L*-茶氨酸是仅存于茶树和少数真菌中的一类特殊天然氨基酸, 是茶叶中的重要风味物质, 常作为添加剂广泛应用于各种食品中. 茶氨酸还有降血压、增强抗癌药物的疗效、提高免疫力、松弛神经紧张等作用, 有广泛的应用价值和较好的实用前景<sup>[1]</sup>.  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GGT, EC 2.3.2.2) 广泛存在于微生物中, 可以将谷氨酰胺上的  $\gamma$ -谷氨酰基转移到乙胺上合成茶氨酸<sup>[2]</sup>. 为了提高微生物中  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶的表达量, 本实验室从大肠杆菌 *k*-12 中克隆出  $\gamma$ -gg<sub>t</sub> 基因片段, 构建了重组质粒 pGEX-4T-1/ $\gamma$ -gg<sub>t</sub> 并将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 以乳糖作为诱导剂表达  $\gamma$ -GGT 酶<sup>[3]</sup>. 本研究利用此 GGT 酶催化, 以谷氨酰胺和乙胺为底物, 进行酶促反应. 完全反应后, 主要成分为 *L*-茶氨酸和副产物聚谷氨酸 (PGA), 杂质有氯离子、乙胺以及少量谷氨酰胺和谷氨酸.

聚谷氨酸是一种可由微生物大量合成的氨基酸聚合物, 由 *D*-或 *L*-型的谷氨酸通过  $\gamma$ -酰胺键连接而成, 具有水溶性和可生物降解性. 聚谷氨酸及其衍生物可广泛用作药物缓释材料, 土壤、沙地的蓄水保水剂, 食品的水凝胶以及高强度纤维等<sup>[4]</sup>. 本研究通过弱酸性阳离子树脂和弱碱性阴离子树脂串联双柱离子交换层析处理 GGT 酶反应液, 使 *L*-茶氨酸与聚谷氨酸、乙胺和氯离子分离, 得到进一步纯化, 同时得到极有经济价值的聚谷氨酸.

收稿日期: 2009-08-12

通讯联系人: 殷志敏, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物化学及细胞生物学. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

# 1 材料和方法

## 1.1 实验材料

大肠杆菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶原核表达载体 pGEX-4T-1/ $\gamma$ -ggt 由本实验室构建并保存.

GGT测定试剂盒购自南京建成生物研究所;弱酸型阳离子交换树脂 D113 弱碱型阴离子交换树脂 D301、D318、331 购自安徽皖东化工厂; L-谷氨酰胺、乙胺购自上海生工生物公司; L-茶氨酸、聚谷氨酸标准品购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 粗酶液的制备

取 40  $\mu$ L 冻存菌,接入 4 mL 含氨苄青霉素 (30  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜,取 1 mL 接入 50 mL 含氨苄青霉素 (30  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 3 h 全部接入 1 L 含氨苄青霉素 (30  $\mu$ g/mL) 的 M9 培养基中,加入 1 g 乳糖,于 20℃ 诱导表达 10 h, 10 000 r/min 离心收集菌体,用灭菌水洗涤菌体,再次离心收集菌体,用 200 mL PBS 重悬菌体.超声破碎菌体,12 000 r/min 离心 20 min 取上清,制得粗酶液.

### 1.2.2 GGT 转肽酶活的测定

用南京建成生物公司的 GGT 试剂盒测定 GGT 粗酶液的转肽活性.具体操作参照南京建成生物公司的 GGT 试剂盒操作说明.其原理是  $\gamma$ -谷氨酰- $\alpha$  萘胺在  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶作用下,发生转肽作用释放出  $\alpha$  萘胺与重氮试剂作用,生成红色 N- $\alpha$  萘胺偶氮苯磺酸,其色度深浅与酶活力成正比.

### 1.2.3 L-茶氨酸和聚谷氨酸的酶法合成

建立 1 L 标准反应体系:取 40 g L-谷氨酰胺,200 mL 65% 乙胺水溶液,1 500 U 的粗酶液,盐酸调节 pH 至 10.0 (由预实验得反应条件,结果未列出),加纯水至 1 L,于 180 r/min,37℃ 的恒温摇床反应 12 h 沸水浴 15 min 终止反应.

### 1.2.4 阳离子交换层析处理酶反应液减少乙胺含量

称取 50 g 弱酸型阳离子交换树脂,纯水浸泡 18 h 到 20 h 充分膨胀,倾泻杂质,漂洗干净;0.5 mol/L 乙酸浸泡 6 h 后,用纯水洗去酸液至中性;0.5 mol/L NaOH 浸泡 6 h 后,用纯水洗去碱液至中性.

将酶反应液混合活性炭,抽滤后通过阳离子交换树脂,至流出液 pH 升至 8 后停止加样.

### 1.2.5 阴离子交换层析处理酶反应液分离 L-茶氨酸和聚谷氨酸并去除氯离子杂质

称取 50 g 弱碱型阴离子交换树脂,纯水浸泡 18 h 到 20 h 充分膨胀,倾泻杂质,漂洗干净;0.5 mol/L NaOH 浸泡 6 h 后,用纯水洗去碱液至中性;0.5 mol/L 乙酸浸泡 6 h 后,用纯水洗去酸液至中性;用乙酸将 pH 调至 4

取阳离子交换柱流出液,乙酸调 pH 至 4 后过阴离子交换柱;收集流出液;加样结束后用乙酸 (pH = 4) 过柱洗脱 L-茶氨酸,在此过程收集流出液做纸层析检测 L-茶氨酸含量;L-茶氨酸全部过柱后,换用乙酸 (pH = 2) 洗脱聚谷氨酸.

取茶氨酸洗脱液,使用硝酸银滴定法检测氯离子,比较不同树脂的去氯效果.

### 1.2.6 L-茶氨酸和聚谷氨酸的浓缩和结晶

采用旋转蒸发仪浓缩已由离子交换柱纯化的茶氨酸液至结晶开始出现,加入 4 倍体积乙醇,磁力搅拌 12 h 抽滤,烘干.

浓缩已洗脱纯化的聚谷氨酸液至结晶出现,加入 6 倍体积乙醇,轻度搅拌后低温静置 12 h 过滤后溶于蒸馏水制成水溶液保存.

### 1.2.7 L-茶氨酸和聚谷氨酸的检测

酶产物液中茶氨酸含量采用纸层析检测:反应液取样 100  $\mu$ L,离心后取上清,上清点样 0.5  $\mu$ L,进行氨基酸纸层析.展层液为正丁醇:乙酸:乙醇:水 = 4:1:1:2 茚三酮显色.结晶后的茶氨酸纯品采用 DNFB 法 HPLC 检测.

聚谷氨酸采用紫外分光光度法扫描  $A_{200} \sim A_{300}$  测定 (Jenway 6320D) 与纸层析辅助测定:聚谷氨酸纸层析后茚三酮作用下不显色;再将聚谷氨酸溶液 pH 调至 3 120℃ 裂解 1 h 可见裂解产物 (谷氨酸) 纸层析

显色.

## 2 结果与分析

### 2.1 粗酶液酶活的测定

依照已确定的制备方法获得粗酶液后,酶活测定采用南京建成生物公司的 GGT 试剂盒.测得工程菌粗酶液的酶活为 7.5U /mL 左右.

### 2.2 酶法同步合成 L-茶氨酸和聚谷氨酸

在 1 L 体系中,按照 1.2.3 所示方法进行反应.期间每隔 3 h 取样,以谷氨酰胺、谷氨酸、茶氨酸标准品做对照做纸层析(图 1),如图所示反应生成大量茶氨酸.此外,聚谷氨酸的性质是纸层析不可显色.

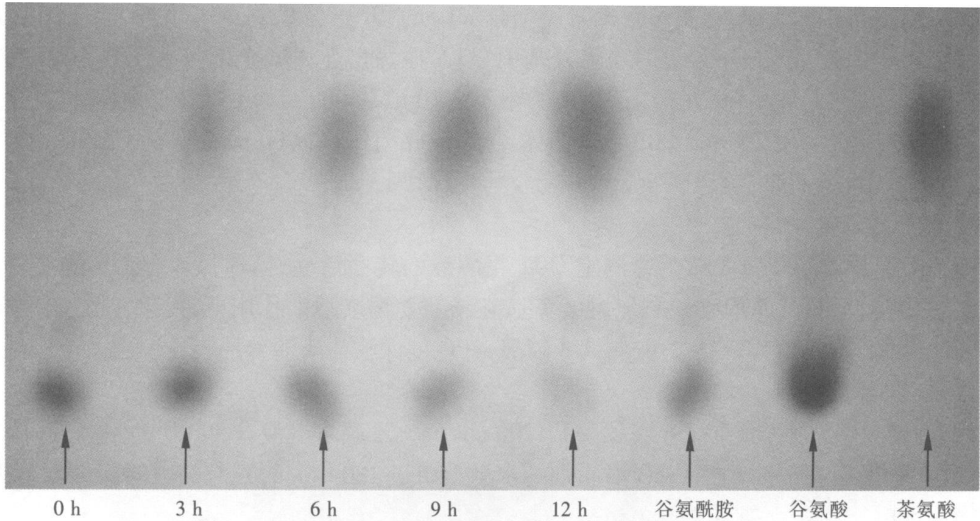


图 1 酶法同步合成 L-茶氨酸和聚谷氨酸的纸层析分析

Fig.1 Paper chromatography analysis of L-theanine and PGA synthesis

### 2.3 阳离子交换层析脱氯与阴离子交换层析分离反应

经活性炭脱色和 1.2.4 所示的阳离子交换方法脱氯的酶反应液中,除了大量茶氨酸也含有一定量的聚谷氨酸,其中还有氯离子杂质,会影响茶氨酸产品的品质.利用弱碱型阴离子交换树脂处理可以巧妙分开茶氨酸和聚谷氨酸及氯离子,使下游纯化分开进行.实验中选用 D301, D318, 331 三种树脂进行效果比较.如图 2 所示, D318 树脂对此反应体系效果较好.

### 2.4 结晶和检测

按 1.2.6 的方法浓缩、结晶、抽滤、烘干后即得到茶氨酸纯品, HPLC 检测其纯度约为 98 % (图 3).

同时,可按 1.2.6 的方法制得聚谷氨酸纯品水溶液.取此聚谷氨酸水溶液进行紫外波长扫描  $A_{200} \sim A_{300}$ , 测定显示在 204 nm 有吸收峰(图 4), 与已有报道聚谷氨酸的特异性吸收峰一致<sup>[5]</sup>.再将溶液 pH 调至 3, 120 °C 裂解 1 h, 可见聚谷氨酸不能显色, 而其裂解产物(谷氨酸)纸层析显色(图 5).

## 3 讨论

近年来 L-茶氨酸目前已被报道有如下生理功能: 抗抑郁、抗肿瘤、降血压、松弛镇静、改善睡眠(不导致嗜睡)、促进大脑学习记忆、增强免疫, 以及防治老年痴呆症、儿童多动症、妇女经前期综合症等.但在我国尚没有主要以 L-茶氨酸为原料的保健产品面世, 作为有着悠久饮茶传统的大国, 这一步我们已落后于欧美与亚洲近邻日本, 主要原因就在于无法进行稳定可靠的进行 L-茶氨酸规模化生产而造成原料缺失.

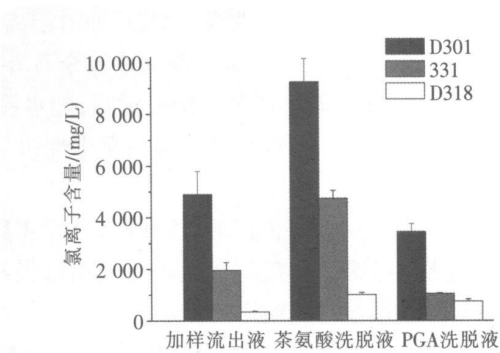


图 2 不同弱碱型阴离子树脂的去氯效果

Fig.2 Dechlorination effects of anion exchange resins

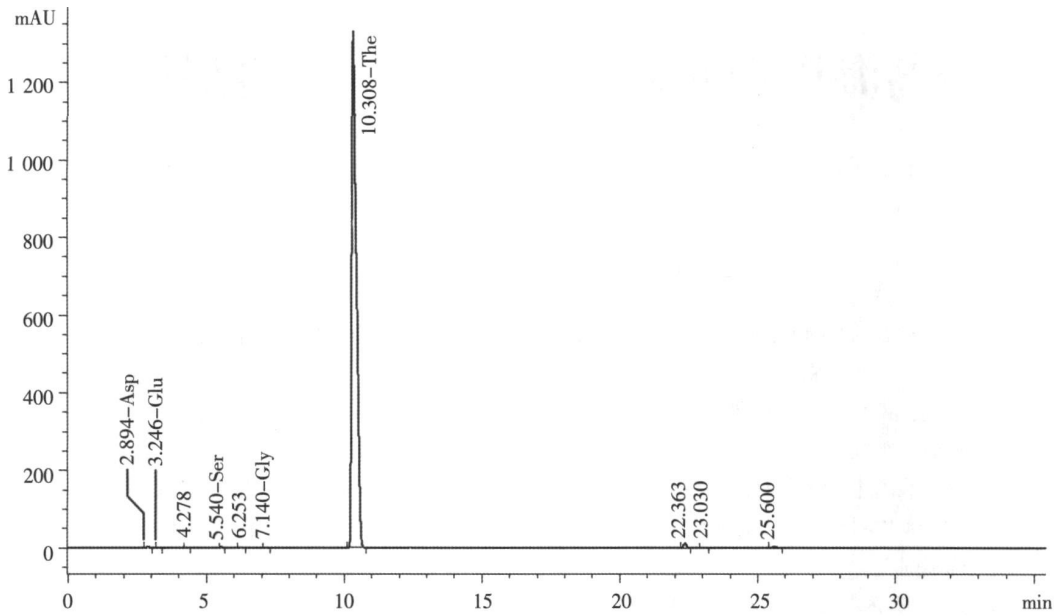


图 3 茶氨酸成品的 HPLC 检测

Fig.3 HPLC analysis of finished product *L*-theanine

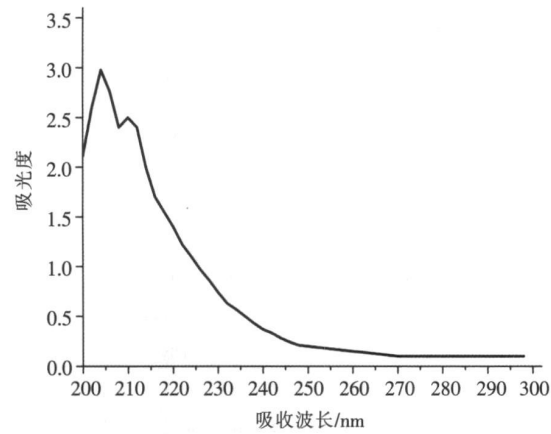
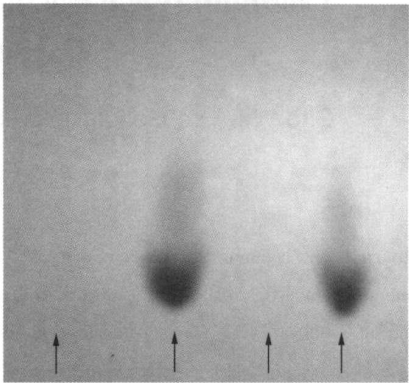


图 4 聚谷氨酸的紫外吸收峰检测

Fig.4 Detection of ultraviolet absorption peak of PGA



PGA液 PGA液(裂解) PGA 谷氨酸

图 5 聚谷氨酸裂解产物纸层析检测

Fig.5 Paper analysis of PGA split product

天然存在的茶氨酸均为 *L* 型, 故 *L* 茶氨酸可由植物提取获得, 但操作繁琐, 产量小, 成本高. 化工合成方法也可生产茶氨酸, 但无法避免 *D* 茶氨酸的产生, 会产生消旋现象, 也较易混杂有毒物质, 不宜用于食品行业. 在此背景下, 运用生物酶法生产茶氨酸, 相当于模拟天然酶反应, 不但产物均为 *L*-型, 而且产量高、工艺简单, 是理想的 *L* 茶氨酸规模化生产方法.

本实验室已通过构建重组质粒, 获得多种高表达重组酶类的菌株<sup>[3 6 7]</sup>. 其中的 GGT 高表达菌株, 即可用于大规模培养而获得粗酶液进行 *L*-茶氨酸的合成, 但反应后杂质较多, 尤以聚谷氨酸难以去除<sup>[3 6]</sup>. 在此基础上本研究探索了这种通过双柱离子交换高效同步分离纯化茶氨酸和聚谷氨酸的方法, 为 *L* 茶氨酸规模化生产奠定了基础(图 6).

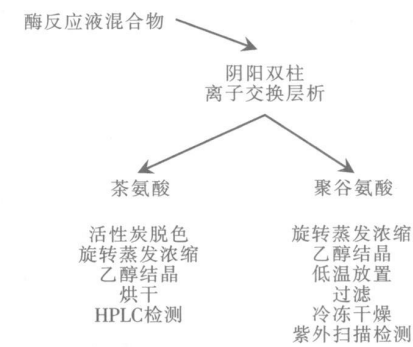


图 6 高效同步分离纯化茶氨酸和聚谷氨酸的技术路线

Fig.6 Technology pathway of separation and purification of *L*-theanine and PGA

(下转第 99 页)

- [ 5 ] 赵凌泉,肖立国,王立刚,等. 防护林科学研究动态及发展趋势 [ J]. 防护林科技, 2000, 2(4): 85-87
- [ 6 ] 叶功富. 滨海沙地湿地松与木麻黄混交林构建和调控技术研究 [ J]. 林业科学研究, 2002, 15(4): 463-468
- [ 7 ] 徐俊森,叶维忠,曾国强,等. 沙质海岸后沿木麻黄混交林造林效果的试验研究 [ J]. 防护林科技, 2000, 8(专刊 1): 116-122
- [ 8 ] 田长城,周守标,蒋学龙. 黑长臂猿栖息地旱冬瓜和潺槁木姜子种群分布格局和动态 [ J]. 应用生态学报, 2006, 17(2): 167-170
- [ 9 ] 游水生,叶功富,徐俊森,等. 福建东山岛海岸带潺槁树种群生命表分析 [ J]. 广西植物, 2009, 29(1): 96-102
- [ 10 ] 王伯荪,张志权,蓝崇钰,等. 南亚热带常绿阔叶林取样技术研究 [ J]. 植物生态学与地植物丛刊, 1982, 6(1): 51-60
- [ 11 ] 游水生,王小明,王海为. 中亚热带常绿阔叶林最小面积的确定 [ J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(6): 438-442
- [ 12 ] 曲仲湘,吴玉树,王焕校. 植物生态学 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1983
- [ 13 ] 杨逢建,赵则海,付玉杰,等. 封山育林后天然次生林群落结构特征 [ J]. 植物研究, 2002, 22(4): 503-507
- [ 14 ] 中国植被编委会. 中国植被 [ M ]. 北京: 科学出版社, 1980, 18-200
- [ 15 ] 林鹏. 福建植被 [ M ]. 福州: 福建科技出版社, 1990, 53-76
- [ 16 ] 吴征镒. 中国种子植物属的分布区类型 [ J]. 云南植物研究, 1991, 增刊 IV: 1-139
- [ 17 ] 叶万辉,曹洪麟,黄忠良,等. 鼎湖山南亚热带常绿阔叶林 20公顷样地群落特征研究 [ J]. 植物生态学报, 2008, 32(2): 274-286
- [ 18 ] 郭其强,张文辉,何景峰,等. 黄龙山不同白桦林群落结构特征研究 [ J]. 西北植物学报, 2007, 27(1): 132-138

[ 责任编辑: 顾晓天 ]

( 上接第 93页 )

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Eschenauer G, Sweet B V. Pharmacology and therapeutic uses of theanine[ J]. Am J Health Syst Pharm, 2006, 63(1): 26-30
- [ 2 ] Suzuki H. Enzymatic production of theanine, an “ umami ” component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase[ J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 884-889
- [ 3 ] 胥俊峰,单建华,赵宁伟,等. 大肠杆菌  $\gamma$ -ggf 原核表达载体 pGEX-4T-1/ $\gamma$ -ggf 的构建及其蛋白表达 [ J]. 安徽农业科学, 2007, 35(30): 9467-9469
- [ 4 ] 游庆红,张新民,陈国广,等.  $\gamma$ -聚谷氨酸的生物合成及应用 [ J]. 现代化工, 2002, 22: 56-59
- [ 5 ] 邵丽,刘建军,赵祥颖. 一株产聚  $\gamma$ -谷氨酸菌株的筛选 [ J]. 山东食品发酵, 2007, 4: 5-7
- [ 6 ] 贾晓鹤,陈莉,赵宁伟,等. 生物转化法应用重组谷氨酰转肽酶合成 L-茶氨酸 [ J]. 食品工业科技, 2008, 29: 166-169
- [ 7 ] 刘俊红,刘顺谊,殷志敏. 乳糖诱导大肠杆菌中重组谷氨酰胺合成酶的表达 [ J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2006, 29(3): 66-70

[ 责任编辑: 孙德泉 ]