

# 固定化谷氨酸脱羧酶转化 $\gamma$ -氨基丁酸的研究

刘 萍, 刘鹏丽, 黄 琛, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子医学重点实验室, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 研究卡拉胶制备固定化谷氨酸脱羧酶及转化  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的最适条件. 以本实验室研发的诱导剂对构建的表达谷氨酸脱羧酶(GAD)的基因工程菌进行诱导, 并利用卡拉胶对获得的粗酶液进行包埋制备固定化酶, 对影响 GAD 固定化效果和 GABA 产量的因素进行研究. 最佳固定化条件为卡拉胶浓度 1.5%, 氯化钾浓度 3%, 硬化时间 2 h; 转化 GABA 的最适条件为反应最适 pH 为 3.8~4.3, 最适温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ ~43  $^{\circ}\text{C}$ , 将制得的固定化谷氨酸脱羧酶(IGAD)重复使用 7 次后, 催化活力仍保持在最初值的 75%; IGAD 在最适底物浓度 60 mmol/L 下反应时间 2 h 后谷氨酸转化率达 99%, 利用 IGAD 进行连续催化反应, 最终 GABA 摩尔转化率为 70.98%, 晶体得率为 91.90%, 晶体纯度 94.73%. 该法具有较好的操作稳定性和较高的底物转化率, 为连续化制备  $\gamma$ -氨基丁酸提供参考.

**[关键词]** 卡拉胶, 谷氨酸脱羧酶,  $\gamma$ -氨基丁酸, 固定化酶

**[中图分类号]** TS201.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)01-0107-08

## Immobilized Glutamate Decarboxylase Preparation and Optimum Conditions of Enrich $\gamma$ -Aminobutyric Acid

Liu Ping, Liu Pengli, Huang Chen, Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,  
Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Research on the optimum conditions of immobilized glutamate decarboxylase by carrageenan and enrich  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA). The genetically engineered bacteria expressing glutamate decarboxylase(GAD) were induced by the inducing agent which developed by our laboratory, and the crude enzyme solution obtained by the strain was embedded-immobilized with Carrageenan. Factors which affected the immobilization effect of GAD and the yield of GABA were investigated. The optimum concentration of carrageenan and KCl were 1.5% and 3%, solidifying for 2 h. The optimum pH was 3.8-4.3 and the temperature was 37  $^{\circ}\text{C}$ -43  $^{\circ}\text{C}$ . The immobilized glutamate decarboxylase(IGAD) was repeatedly used after 7 times, the activity was kept as high as 75% of the initial. Continuous conversion of IGAD to prepare GABA, the reaction was carried out at the optimum substrate concentration of 60 mmol/L, the final molar conversion of GABA was 70.98%, the crystal yield was 91.90% and the crystal purity was 94.73%. The method has good stability and high substrate conversion rate which may provide a reference for continuous preparation of GABA.

**Key words:** Carrageenan, glutamate decarboxylase,  $\gamma$ -aminobutyric acid, immobilized enzyme

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是一种天然存在的功能性非蛋白质氨基酸,是哺乳动物中枢神经系统的抑制性神经递质之一<sup>[1]</sup>,在机体调节方面有诸多功能,如促进细胞新陈代谢、增进脑活力、调节血压和心律、镇定安神、抗衰老等,具有广阔的应用前景<sup>[2-3]</sup>. 谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)是普遍存在于自然界生物体内的一种磷酸吡哆醛类酶,是生物合成法中催化 L-谷氨酸脱羧合成 GABA 的重要酶<sup>[4-5]</sup>. 近年来,陆续报道了有关谷氨酸脱羧酶固定化的研究,如乔春楠等<sup>[6]</sup>采用海藻酸钠固定 GAD,姜启兴等<sup>[7]</sup>,林少琴等<sup>[8]</sup>用壳聚糖与戊二醛对 GAD 进行固定化,但在实际操作中,海藻酸胶在含有柠檬酸、乳酸、磷酸根等的缓冲体系中,会因螯和作用导致  $\text{Ca}^{2+}$  的流失,使海藻酸胶颗粒崩解<sup>[9]</sup>;壳聚

收稿日期:2019-03-26.

基金项目:江苏省科技厅产学研联合创新基金前瞻性研究项目(BY2013001-03).

通讯作者:殷志敏,博士,教授,博士生导师,研究方向:生物化学与分子生物学. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

糖没有相应的硬化剂,需要用存在毒性的戊二醛进行交联.而当前制备食品级高安全性的 $\gamma$ -氨基丁酸是最为重要的,同时具有高稳定性的固定化酶会大大降低生产过程中的分离纯化成本以及生产成本.

本研究中,将构建的重组质粒 pET28a-gadB 转化到 *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) 中获得工程菌,利用本实验室殷志敏教授团队研发的诱导剂天达一号进行诱导表达,并利用该菌获得的粗酶液进行固定化酶的催化研究,采用安全性、稳定性更高的卡拉胶作为包埋载体,主要研究了 K-卡拉胶固定化谷氨酸脱羧酶(immobilized glutamate decarboxylase, IGAD) 的最佳条件以及转化  $\gamma$ -氨基丁酸的最适条件,并为大规模连续化制备 GABA 提供参考.

## 1 材料

### 1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* K-12、*E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>)、表达载体 pET28a 均为本实验室保藏.

### 1.2 试剂

TaqDNA 聚合酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*H I、DNA Maker 购自 TaKaRa 公司;蛋白质分子 Maker 购自 MBI 公司;蛋白胨和酵母粉,英国 OXOID 公司;卡那霉素,Amresco 公司;IPTG 购自 Merck 公司;丙烯酰胺(Acr)与甲叉双丙烯酰胺(Bis)购自 Promega 公司;四甲基乙二胺(TEMED)购自 BioRad 公司;考马斯亮蓝 R-250 购自 Sanland 公司;引物合成由南京斯普金公司完成;质粒测序由上海英骏公司完成;天达一号诱导剂为本实验室殷志敏教授团队研发;卡拉胶、L-谷氨酸、5-磷酸吡哆醛、 $\gamma$ -氨基丁酸标准品,国药集团化学试剂有限公司;其余化学试剂均为国产分析纯.

### 1.3 仪器

PCR 扩增仪,美国 MJ Research 公司;凝胶成像系统、紫外透射仪、电热恒温循环水浴槽,美国 Amersham Pharmacia 公司;精密电子天平,德国 Sartorius 公司;多功能酶标仪,美国 BioTek 公司;紫外分光光度计,德国 Eppendorf 公司;pH 测定仪,美国 Mettler Toledo 公司;超声波细胞破碎仪 JY92-2D,中国新芝科器研究所;冷冻离心机,美国 Thermos 公司.

## 2 方法

### 2.1 pET28a-gadB 重组质粒的构建

根据大肠杆菌 *E. coli* K-12 的 *gadB* 的基因序列和 pET28a 的 MCS 位点设计引物,在上下游引物的 5'端分别插入 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点,送往上海英骏生物技术公司合成. F:5'-GGAATTC CATATG ATGGATAAGAAGCAAGTA-3'; R:5'-CG GGATCC TCAGGTATGTTTAAAGCT-3'. 提取细菌 *E. coli* K-12 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增:95 °C 5 min;25×(95 °C 40 s,53 °C 18 s,72 °C 1 min 30 s);4 °C 放置. 将 PCR 获得的的目的基因和 pET28a 载体经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切,经 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接后转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,对重组质粒用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切,筛选阳性克隆,进行 DNA 测序. 将该重组质粒称为 pET28a-gadB.

### 2.2 重组蛋白的诱导表达和鉴定

重组质粒 pET28a-gadB 转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>),工程菌 37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值在 0.7~0.9 之间,加入乳糖至终浓度为 1 g/L,26 °C 180 r/min 诱导 10 h 左右,诱导产物用 10% SDS-PAGE 电泳鉴定,考马斯亮蓝 R250 染色显带后,Gel Doc 2000 成像系统分析.

### 2.3 GAD 粗酶液的制备

将保存的菌种进行活化,加入诱导剂天达一号至终浓度为 1 g/L,28 °C 190 r/min 诱导 7 h 左右后收集菌体,重悬混匀,进行超声破碎,粗酶液于-80 °C 保存.

### 2.4 蛋白浓度的测定

采用 BCA(二喹啉甲酸)法测定蛋白浓度,对 GAD 酶液进行复溶,调整后蛋白含量约为 1.8 mg/mL.

### 2.5 IGAD 的制备

称取一定量的卡拉胶,加水加热至 70 °C 使溶,待胶液成透明易流动溶液状后,降温至 42 °C,加入一定量预先制备好的含 0.15 mmol/L 磷酸吡哆醛的 GAD 溶液,充分混匀,倒入平板中于 4 °C 静置过夜,用一定

浓度的硬化剂 KCl 溶液于 4 ℃ 浸泡硬化一定时间,然后切成约 5 mm×5 mm 的块状,用缓冲液洗涤至滤液无酶活存在为止,4 ℃ 保存备用。

## 2.6 GAD 酶活的测定

基于 Berthelot 反应的比色法<sup>[10]</sup>,采用测定 GABA 生成量的方法计算 GAD 酶活力:配制含底物 L-Glu 30 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 4.5)于 37 ℃ 下预热;加入一定量 IGAD(或等酶量的 GAD),37 ℃ 下振荡反应 10 min;取反应液 0.3 mL 于冰上加 pH 10.0 的硼酸缓冲液 0.2 mL 终止反应,加 6% 苯酚 1 mL 混匀后加次氯酸钠溶液 0.4 mL 混匀,沸水浴 10 min,立即置于冰上 13 min 后加 60% 乙醇固色,混匀测定 630 nm 处的吸光度值(每组反应做 3 个平行,并取洗涤酶块的最后一次滤液进行同样的反应,作为对照)。

根据吸光度值,结合 GABA 标准曲线,在 37 ℃ 下吸光度值每分钟生成 1  $\mu$ mol GABA 定义为 1 个酶活力单位(Enzyme activity/U);在同组实验中活性最高点的值定义为 100%,其余实验点的值与该点的值之比定义为相对酶活力(Relative activity/%)。固定化 GAD 酶活回收率(Enzyme activity recovery/%)按下式计算:

$$\text{固定化 GAD 酶活回收率} = \frac{\text{固定化 GAD 酶活}}{\text{游离酶活}} \times 100\%.$$

## 2.7 $\gamma$ -氨基丁酸的测定

FDNB 法 HPLC 分析检测,具体参照文献[11]。

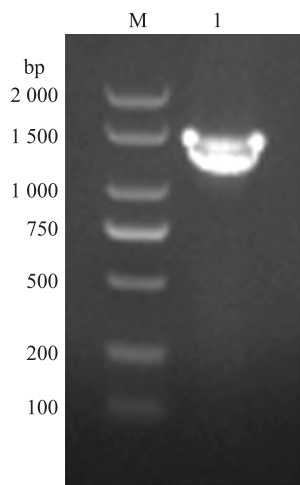
# 3 结果与讨论

## 3.1 *gadB* 基因的 PCR 扩增

以 *E. coli* K-12 基因组为模板合成目的基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。PCR 扩增出的 *gadB* 条带分子量为 1 000 bp~1 500 bp,更加接近 1 500 bp,这与理论值约 1 400 bp 相符。

## 3.2 pET28a-*gadB* 重组质粒的鉴定

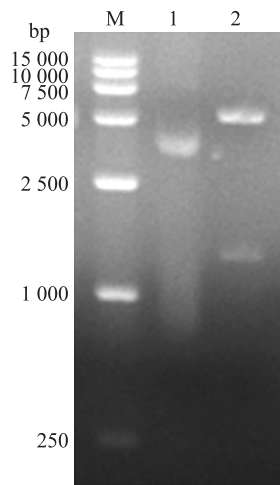
对重组质粒用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切,获得大小约为 5 000 bp 和 1 400 bp 的 2 个条带如图 2,与理论值一致,初步说明重组成功。将阳性克隆质粒送往上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果与 NCBI 上 BLAST 检索结果完全吻合,可以确定 *gadB* 已经克隆到 pET28a 载体中且方向正确。



M: DL2000 DNA Marker; 1: *gadB* PCR 产物

图 1 *gadB* 基因 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 1% Agarose gel electrophoresis analysis the PCR amplification product of *gadB*



M: DL 15 000 DNA Marker; 1: pET28a-*gadB*; 2: pET28a-*gadB* 双酶切产物

图 2 重组质粒双酶切 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 1% Agarose gel electrophoresis analysis recombinant plasmid after digested with restriction enzymes

## 3.3 表达产物 SDS-PAGE 分析

大肠杆菌 *E. coli* K-12 基因组 *gadB* 重组后表达的 GAD 实际分子量大小约为 53 kDa。将转化重组质粒后的大肠杆菌 BL21 按照 2.2 诱导培养,并将诱导产物超声破碎后经 SDS-PAGE 凝胶电泳,染色显带后, Gel Doc 2000 成像系统分析结果如图 3。将转化重组质粒后的大肠杆菌 BL21 分别加入诱导剂 IPTG、乳糖、

天达一号至终浓度为 0.5 mmol/L、1 g/L、1 g/L, 26 ℃ 180 r/min 诱导 11 h 左右, 诱导培养将诱导产物用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 染色显带后, Gel Doc 2000 成像系统分析结果如图 4.

如图 3 所示, 在 53 kDa 处有蛋白表达, 占全菌蛋白总量的比例较大, 且随着时间的延长蛋白量不断增加, 而对照组此处则无明显蛋白条带出现, 且 GadB 主要分布在上清中, 为可溶性蛋白, 表明 GAD 在大肠杆菌中得到成功表达.

如图 4 所示, 相对于普遍使用的诱导剂 IPTG 和乳糖, 复配的诱导效果则更好并且诱导蛋白表达量更多.

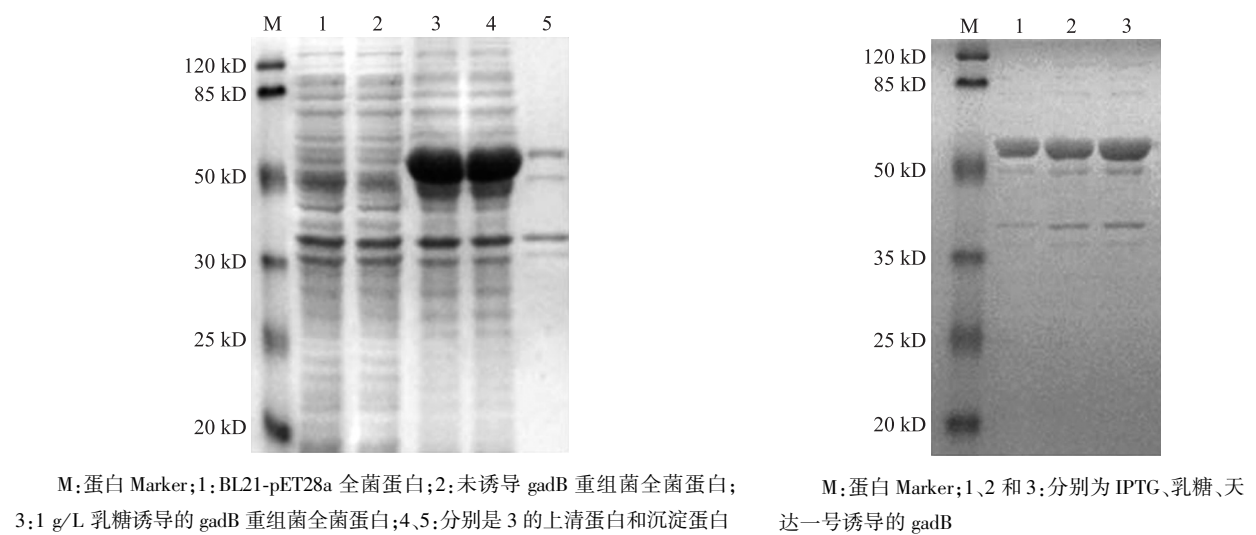


图 3 工程菌 BL21-pET28a-gadB 表达产物 SDS-PAGE 分析

图 4 不同诱导剂的诱导效果分析

3.4 GAD 固定化条件的优化

3.4.1 卡拉胶浓度对 IGAD 酶活的影响

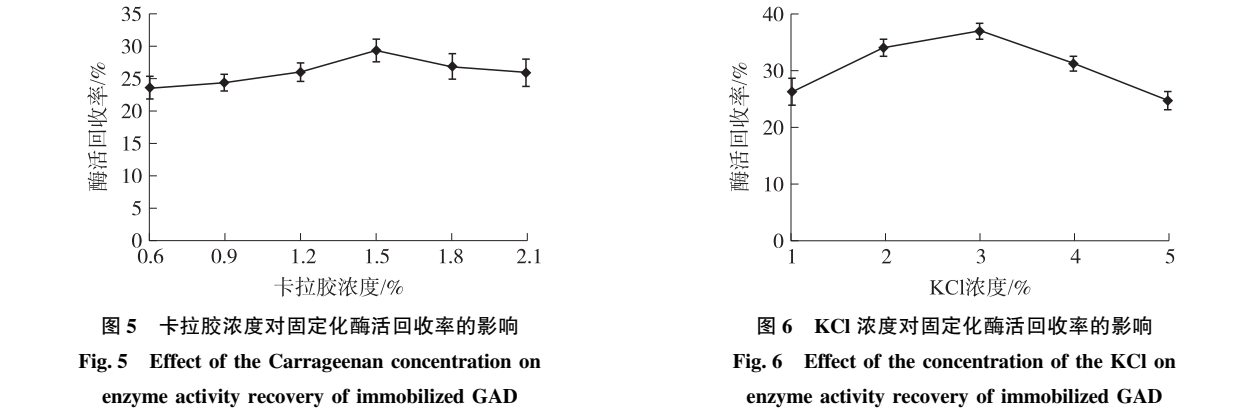
GAD 酶液与卡拉胶液充分混匀(卡拉胶浓度为 0.6%、0.9%、1.2%、1.5%、1.8%、2.1%), 于平板中 4 ℃ 静置过夜, 以浓度为 3% KCl 溶液于 4 ℃ 浸泡硬化 1 h, 制备 IGAD. 酶活测定结果见图 5.

由 5 可以看出, 随着卡拉胶浓度的增加, 酶活回收率逐渐上升, 在载体浓度为 1.5% 时达到最高. 当载体浓度高于 1.5% 时, 一方面混合液过于黏稠, 导致固定化酶操作制备困难, 且不能保证酶液充分分散在混合体系中; 另外载体对酶液的包埋过于致密而使酶空间结构的孔径过小, 使得酶与底物不能充分接触, 接触速率降低, 影响了酶的催化, 导致其催化效率降低<sup>[12-13]</sup>. 因此, 选择浓度 1.5% 作为最适载体浓度.

3.4.2 KCl 浓度对酶活的影响

在卡拉胶浓度为 1.5% 的情况下, 只改变硬化剂浓度( KCl 浓度为 1%、2%、3%、4%、5%), 其余条件不变, 制备 IGAD. 酶活测定结果见图 6.

由图 6 可以看出, 随着 KCl 溶液浓度的上升, 酶活回收率逐渐上升, 在浓度达到 3% 时酶活回收率达到最高. 这是由于钾离子参与了 k-卡拉胶的凝胶过程, 增加 KCl 浓度使卡拉胶内聚性加强, 从而使凝胶强度



提高,酶液被充分包埋,能较稳定地发挥催化作用,催化活力高;当 KCl 浓度过低时,易造成酶液流失;KCl 浓度过高,过量的钾离子加速凝胶老化过程,产生收缩脱液现象,使凝胶强度下降<sup>[14]</sup>. 故 KCl 溶液的最适浓度为 3%.

### 3.4.3 硬化时间对酶活的影响

在 KCl 浓度为 3% 的情况下,只改变硬化时间(硬化时间 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h),其余条件不变,制备 IGAD. 酶活测定结果见图 7.

由图 7 可以看出,硬化时间为 2 h 时,酶活回收率较高. 这是因为超出一定时间范围后,随着时间的延长,固化越来越充分,一方面酶液被载体包埋得更为致密,使底物分子很难接近酶的活性中心,影响了酶分子活性中心的有效性<sup>[15]</sup>;另一方面过量的  $K^+$  对已包埋酶的卡拉胶载体继续作用,降低了其凝胶强度<sup>[16]</sup>,这些都是造成酶活下降的原因. 故最适硬化时间为 2 h.

## 3.5 IGAD 酶学性质的研究

### 3.5.1 IGAD 的最适反应 pH

将等量的 GAD 和 IGAD 分别在 pH 值 3.5~6.0 含 30 mmol/L 谷氨酸的磷酸盐缓冲液中,于 37 °C 下反应. 取转化液测定酶活,结果见图 8.

由图 8 可以看出,GAD 的反应最适初始 pH 为 4.3;IGAD 的反应最适初始 pH 为 3.8. 游离酶经固定化后最适 pH 向酸性方向偏移约 0.5 个 pH 单位.

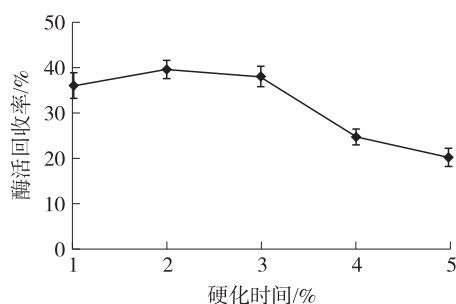


图 7 硬化时间对固定化酶活回收率的影响

Fig. 7 Effect of solidifying time on enzyme activity recovery of immobilized GAD

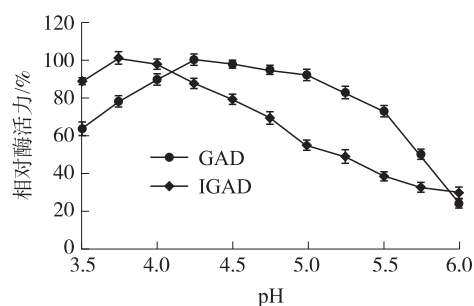


图 8 pH 对 GAD 和 IGAD 酶活的影响

Fig. 8 Effect of pH on activity of GAD and IGAD

### 3.5.2 IGAD 的 pH 稳定性

将等量的 GAD 和 IGAD 分别在 pH 值 3.5~6.0 的缓冲液中于 37 °C 保温处理 3 h,之后取出充分清洗,在含 30 mmol/L 谷氨酸的磷酸盐缓冲液中,于 37 °C 下反应. 取转化液测定酶活,结果见图 9.

由图 9 可以看出,GAD 在 pH 4.5 时稳定性最好;IGAD 在 pH 4.3 时稳定性最好,在 pH 3.8~5.0 的范围内能保持相对较高的酶活. 相较于游离酶,固定化 GAD 耐酸碱能力增强.

### 3.5.3 IGAD 的最适反应温度

在得到 IGAD 最适初始 pH 的条件下,将等量的 GAD 和 IGAD 分别在温度为 30 °C ~ 50 °C 的含 30 mmol/L 谷氨酸的磷酸盐缓冲液中反应. 测定不同温度下的酶活,结果见图 10.

由图 10 可以看出,GAD 的反应最适温度为 40 °C,IGAD 的反应最适温度为 43 °C,游离酶经固定化后

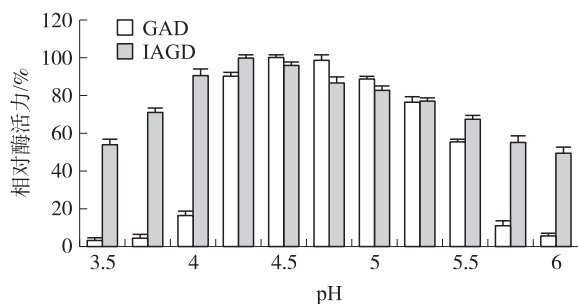


图 9 pH 对 GAD 和 IGAD 酶活稳定性的影响

Fig. 9 Effect of pH on activity stability of GAD and IGAD

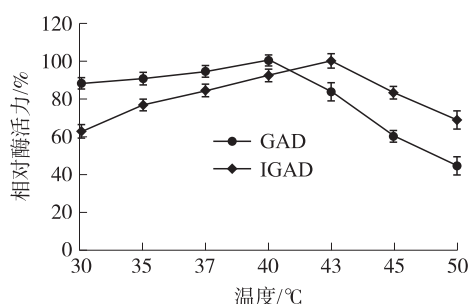


图 10 温度对 GAD 和 IGAD 酶活的影响

Fig. 10 Effect of temperature on activity of GAD and IGAD

反应最适温度提高了 3 个温度单位. 可能的原因是卡拉胶为固定化酶提供有利的微环境, 由于热传输阻力效应导致的 GAD 失活最小化<sup>[17]</sup>.

#### 3.5.4 IGAD 的热稳定性

将等量的 GAD 和 IGAD 分别在温度为 30 ℃~50 ℃的缓冲液中保温处理 3 h, 之后取出充分清洗, 在含 30 mmol/L 谷氨酸的磷酸盐缓冲液中, 于 37 ℃下反应. 测定不同温度下的酶活, 结果见图 11.

由图 11 可以看出, 游离酶和固定化酶均在 37 ℃时热稳定性最好, IGAD 在 35 ℃~45 ℃的温度范围内能保持相对较高的酶活, 相较于游离酶, 固定化 GAD 热稳定性增强.

#### 3.5.5 IGAD 的操作稳定性

取 3 g IGAD 于 25 mL 含 30 mmol/L 谷氨酸的磷酸盐缓冲液中, 在 pH 3.8, 温度 43 ℃条件下反应, 反应结束后充分清洗, 并更换新的底物溶液, 进行 7 批次操作. 测定酶活变化, 结果见图 12.

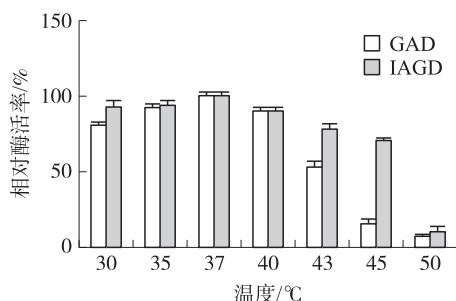


图 11 温度对 GAD 和 IGAD 酶活稳定性的影响

Fig. 11 Effect of temperature on activity stability of GAD and IGAD

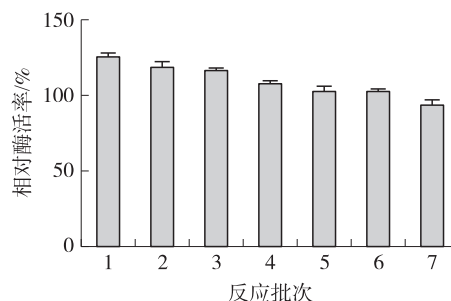


图 12 反应批次对 IGAD 酶活的影响

Fig. 12 Effect of reaction times on activity of immobilized glutamate decarboxylase

由图 12 可以看出, IGAD 在相同反应条件下, 重复使用 3 次后酶活基本不变, 重复使用 7 次后, 催化活力仍保持在最初值的 75%, 随着反应批次的增加, 酶活力有所下降, 原因可能是辅酶 5-磷酸吡哆醛逐渐流失<sup>[18]</sup>. 但总体来说, 固定化酶的凝胶强度状况较好, 酶活力保持较好. 证明本试验制备的固定化酶具有较好的操作稳定性, 具有工厂化大规模生产的可能性.

#### 3.5.6 底物浓度对谷氨酸转化率的影响

取 3 g IGAD 于 25 mL 磷酸盐缓冲液中, 测定 IGAD 在 pH 3.8, 43 ℃, 底物浓度为 20 mmol/L~120 mmol/L 的情况下, 10 min 内的 GABA 生成量, 结果见图 13.

由图 13 可以看出, 随着底物量的增加, GABA 的产量增势趋于平缓. 谷氨酸是 GABA 的唯一来源, 合适的谷氨酸含量可以促进 GAD 的表达, 增加产物的生成量, 但浓度过高一方面会使反应液的酸度过高, 影响酶活, 增加调酸的成本; 另一方面由于谷氨酸在水中溶解度低, 会降低其在反应液中的分散程度, 造成底物的浪费<sup>[19]</sup>. 故选择 60 mmol/L 的底物浓度.

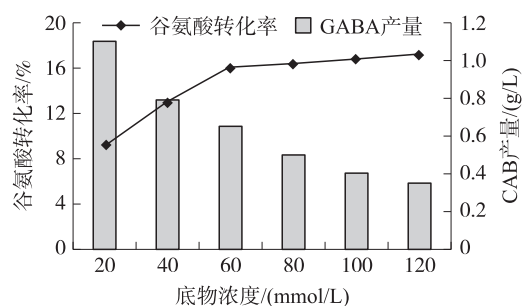


图 13 底物浓度对 GABA 产量的影响

Fig. 13 Effect of the substrate concentration on the yield of GABA

#### 3.5.7 反应时间对谷氨酸转化率的影响

取 21 g IGAD 于 175 mL 磷酸盐缓冲液中, 测定 IGAD 在 pH 3.8, 温度 43 ℃, 底物浓度 60 mmol/L 的情况下, 随着反应时间的延长 GABA 生成量的变化, 结果见图 14.

由图 14 可以看出, 在 60 mmol/L 的最适底物浓度下, 随着反应时间的延长, 谷氨酸转化率增加逐渐趋于平缓, 在 120 min 时转化率达到 99%.

#### 3.5.8 IGAD 的连续转化制备 GABA

取复溶后的 GAD 粗酶液 18 mL, 在酶液与卡拉胶胶液比例为 1:1 以及上述最佳条件下制得 IGAD, 在 1 L 的反应体系中进行催化反应, 调整反应初始 pH 为 3.8, 初始温度 43 ℃, 反应 1 h 后调整并控制反应在 pH 4.3, 温度 37 ℃下进行连续补料反应, 重复进行 3 批次反应, 每次反应 12 h, 最终对 3 L 发酵液的 GABA

含量按照 2.7 HPLC 法进行测定,如图 15.

由图 15 可以看出,经初步分离、浓缩结晶,最终得到的 GABA 成品为 114.32 g, $\gamma$ -氨基丁酸摩尔转化率 70.98%,晶体得率为 91.90%,晶体纯度 94.73%.

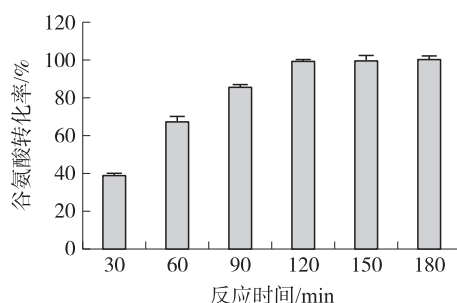


图 14 反应时间对谷氨酸转化率的影响

Fig. 14 Effect of reaction time on the transform rate of Glu

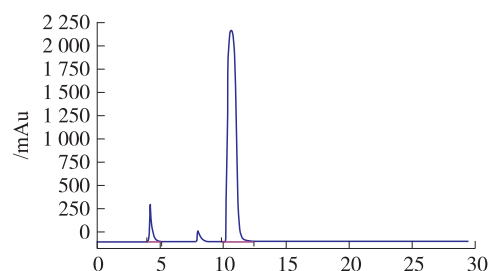


图 15 浓缩结晶后 GABA 晶体的 HPLC 图谱

Fig. 15 HPLC chromatogram of GABA crystal after enrichment of crystallization

## 4 结论

k-卡拉胶具有良好的凝固性、独特的热可逆凝胶化性能、抗蛋白凝结、亲水无毒、低成本等特点,在食品、制药、化工等领域已得到了广泛应用<sup>[20]</sup>. 本研究中,构建了高效表达 GAD 的基因工程菌,使用本实验室殷志敏教授团队研发的诱导剂天达一号对 GAD 诱导使其高效表达,并利用该菌获得的粗酶液进行固定化酶的催化研究,利用高安全性、高稳定性的 k-卡拉胶作为包埋载体对 GAD 进行固定化,通过优化确定最佳固定化条件:卡拉胶浓度 1.5%,氯化钾浓度 3%,硬化时间 2 h;将制得的 IGAD 重复使用 7 次后,催化活力仍保持在最初值的 75%;在最适底物浓度为 60 mmol/L 下反应时间 2 h,谷氨酸转化率达 99%,利用 IGAD 连续进行 3 批次催化反应,3 L 发酵液经浓缩结晶后最终得到 GABA 成品 114.32 g,GABA 摩尔转化率 70.98%,晶体得率为 91.90%,晶体纯度 94.73%.

本实验室研发的天达一号安全性高,用其对构建的表达 GAD 的基因工程菌 *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>)-pET28a-gadB 进行诱导,蛋白表达率高;卡拉胶包埋法制备的 IGAD,成本低,安全,操作方法简单,且用于催化反应转化  $\gamma$ -氨基丁酸操作稳定性好、底物转化率高,具有较好的应用前景. 本研究为利用 IGAD 工业化连续生产制备 GABA 提供了可靠的参考依据.

## [参考文献]

- [1] 叶惟玲.  $\gamma$ -氨基丁酸的发现[J]. 生理科学进展,1986,17(2):187-189.
- [2] 杨藻宸. 药理学和药物治疗学(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [3] 徐叔云. 临床药物指南(修订版)[M]. 合肥:安徽科学出版社,1997.
- [4] UENO H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase[J]. Journal of molecular catalysis B:enzymatic,2000,10(1/3):67-79.
- [5] BATTAGLIOLI G,LIU H,MARTIN D L. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase:implications for the regulation of GABA synthesis[J]. Journal of neurochem,2003,86:879-887.
- [6] 乔春楠,刘萍,孙君社. 海藻酸钠法固定化谷氨酸脱羧酶的研究[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(1):16-22.
- [7] 姜启兴,何莎,张可,等. 影响壳聚糖固定谷氨酸脱羧酶的因素[J]. 食品与机械,2010,26(5):15-18.
- [8] 林少琴,吴若红. 壳聚糖固定谷氨酸脱羧酶的研究[J]. 药物生物技术,2005,12(2):101-105.
- [9] 上海秋之友生物科技有限公司. 卡拉胶固定化微生物细胞球状颗粒的制备方法及其应用:10111762.X[P]. 2006-07-12.
- [10] 许建军,江波,许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用[J]. 微生物学通报,2004(2):66-71.
- [11] 马晓博. 利用米糠谷氨酸脱羧酶富集  $\gamma$ -氨基丁酸及其分离纯化[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [12] 闫红梅. 谷氨酸脱羧酶在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达及固定化酶法生产  $\gamma$ -氨基丁酸[D]. 山东:山东大学,2017.
- [13] 肖安风,游洪燕,倪辉,等. 聚乙烯醇和海藻酸钠固定化柑桔苷酶的制备及其性质[J]. 中国食品学报,2015,15(3):15-22.
- [14] 孟娟,吴广州. 卡拉胶流变学特性及应用研究[J]. 粮食科技与经济,2012,37(6):25-28.

- 
- [15] 张媛媛. 米糠谷氨酸脱羧酶固定化及制备  $\gamma$ -氨基丁酸的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [16] FERNANDEZ L G, PALOMO J M, MATEO C, et al. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of leads to improved performance[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(9):2610–2615.
- [17] HUANG J, MEI L H, WU H, et al. Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*[J]. *World journal of microbiol biotechnol*, 2007, 23:865–871.
- [18] 陈蔚青, 陈虹, 王芳权. 固定化谷氨酸脱羧酶转化  $\gamma$ -氨基丁酸的研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(4):224–227.
- [19] 田东亮, 张露露, 杨平平, 等. 高效利用 L-谷氨酸合成  $\gamma$ -氨基丁酸的红曲霉的筛选与条件优化[J]. *中国调味品*, 2013, 38(5):31–38.
- [20] 孟凡玲, 罗亮, 宁辉, 等. K-卡拉胶研究进展[J]. *高分子通报*, 2013(5):49–56.

[责任编辑:黄 敏]