

# 乳酸片球菌产谷氨酸脱羧酶的相关酶学性质研究

侯远策<sup>1</sup>,李秀凉<sup>1</sup>,贺强<sup>2</sup>

(1. 黑龙江大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150080;2. 黑龙江省农业科学院 玉米研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为研究乳酸片球菌谷氨酸脱羧酶(GAD)的性质,采用比色法测其酶活。结果表明:当底物 L-MSG 的浓度为  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,GAD 的活力达到最大。GAD 的浓度为 3.16%,最适温度为  $37^\circ\text{C}$ ,最适 pH 为 5.0,PLP 浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,GAD 酶活力最大。 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  使 GAD 活力提高 10% 左右,KCl 和 EDTA 对 GAD 的活力稍有抑制,KI、 $\text{Ag}^{2+}$ 、SDS 和  $\text{CH}_3\text{COOH}$  均对乳酸片球菌 GAD 的活力具有较大抑制。乳酸片球菌 GAD 的米氏常数  $K_m=0.3658 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,最大反应速度  $V_{\max}=3.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:**谷氨酸脱羧酶; $\gamma$ -氨基丁酸;乳酸片球菌;酶学性质

中图分类号:TQ922+.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)10-0010-04

谷氨酸脱羧酶(*glutamate decarboxylase*, GAD)是生物内正常合成的一种酶蛋白。其分布很广泛,从单细胞生物到哺乳动物的脑和胰岛组织中都有 GAD 的存在<sup>[1]</sup>。它是催化 L-谷氨酸  $\alpha$ -羧基进行脱羧反应生成  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的关键限速酶和唯一酶<sup>[2]</sup>,而且 GAD 专一作用于 L-谷氨酸<sup>[3]</sup>。GAD 催化谷氨酸脱羧的产物 GABA 在人体中是一种重要的抑制性神经递质<sup>[4]</sup>,具有重要的生理功能:如心血管调节作用、促使精神安定、促进脑部血液循环、增强脑动

力、抗衰老、促进生长激素分泌等<sup>[4-7]</sup>。随着人们对 GABA 生理功能的不断探究,发现开发生产 GABA 类的食品和药物对人类具有深刻的意义<sup>[8]</sup>。

目前,GABA 的制备方法主要有化学合成法和生物合成法。其中化学合成法主要应用于化工和医药领域,不适合在食品中应用。生物合成法主要是采用生物来源的 GAD 转化谷氨酸生成 GABA。该文通过菌种筛选得到一株高产谷氨酸脱羧酶的乳酸片球菌,对其相关酶学性质进行研究,即底物浓度、酶浓度、温度和 pH 对 GAD 酶活力的影响以及酶的热稳定性和 pH 稳定性,同时研究了几种金属离子和化学物质对酶活力的影响,以确定该酶的最佳条件,为今后 GAD 的研究和应用提供参考。

收稿日期:2011-04-13

第一作者简介:侯远策(1985-),男,黑龙江哈尔滨市人,硕士,从事微生物食品开发与制备研究。E-mail:rainhyc@126.com。

## Research on Changes of Sugar Content in Sweet Sorghum Stalks under Dry Condition

YAN Hong-dong, JIAO Shao-jie, WANG Li-ming, JIANG Yan-xi, SU De-feng, SUN Guang-quan  
(Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** Taking 12 sweet sorghum as experiment materials, dry and store up under natural conditions, the sugar content in stem of newly harvest, the semi-dry state and the all-dry state were measured respectively with chemical methods to identify the change of sugar content in different stage. The results showed that the amount of sugar which could be used in sweet sorghum stalks reduced with water reduction. When it came to semi-dry stage or all-dry stage, the sugar amount became merely about 40% of that in newly harvest ones. The sugar content decreased rapidly from the harvest time to semi-dry stage, while the decrease turned slowly from the semi-dry stage to all-dry stage, the sugar contents in the three stages were significant difference.

**Key words:** sweet sorghum; stalks; dry condition; sugar content

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

供试菌株为乳酸片球菌 1.2696;实验室保存。此菌株在 MRS 固体培养基上培养,4℃ 保存,每 14 d 转接 1 次。培养基为 MRS 液体培养基和发酵培养基。试剂有  $\gamma$ -氨基丁酸标准品( $\gamma$ -Aminobutyric acid 色谱纯,99.9%,Sigma 公司);溶菌酶(上海生工)L-谷氨酸、次氯酸钠、苯酚、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠等均为分析纯。

试验所用仪器有 DNP-9082 型电热恒温培养箱,DK-S26 型电热恒温水浴锅,TU-1810 紫外可见分光光度计,离心机,XB-100 制冰机,KQ-100DE 型超声细胞破碎仪,AB104-N 型电子天平,双人超净工作台等。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株活化、扩培、接种与发酵 从保存的乳酸片球菌斜面上挑取 1~2 环菌转接到另一个斜面上,37℃ 培养 24 h 后转接入 MRS 液体培养基中,37℃ 培养 12~14 h。以 4% 的接种量接入到含 L-MSG 的发酵培养基中,37℃ 静止培养 14~16 h。

1.2.2 菌体细胞的培养与收集 将发酵液于  $4\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min 收集菌体,用浓度为  $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH7.2 的磷酸盐缓冲液充分洗涤菌体细胞 3 次后,离心去上清,得菌体细胞备用。将离心得到的菌体细胞分散到 20 mL 含  $0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PLP, $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶菌酶, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇的 PBS 缓冲液中,37℃ 静置反应 1 h。置于冰浴中,超声波破碎 10 min。 $11\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,冷冻离心 20 min,除去细胞碎片,得上清液,加入固体硫酸铵至饱和度为 80%,静置一夜, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 25 min,收集沉淀,溶于少量的磷酸盐缓冲液,放入经过处理的透析袋中透析,透析后得到的即为粗酶液,放入冰箱中保存备用。

1.2.3 GAD 活力测定 利用比色法测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力,通过一定条件下酶反应后溶液所呈现出蓝色的深浅来比较 GABA 含量,进而判断出 GAD 活力的大小。一个酶活力单位定义为:每分钟生成  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GABA 所需的酶量。

比色法:在  $400\text{ }\mu\text{L}$  底物溶液中加入酶样,将两者匀合后 37℃ 反应 30 min,迅速置于冰浴中,加入  $400\text{ }\mu\text{L}\,0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH10.0 的硼酸缓冲液终止反应,混匀后加入 2.0 mL 6% 苯酚和  $800\text{ }\mu\text{L}$  次氯酸钠溶液,充分振荡后,沸水浴反应 10 min,迅速在冰浴中冷却显色 20 min,然后测定  $\text{OD}_{640\text{ nm}}$  值。

1.2.4 酶浓度对 GAD 活力的影响 取 5 组  $400\text{ }\mu\text{L}$  的底物溶液,分别加入 40、80、120、160、 $200\text{ }\mu\text{L}$  的粗酶液(不足  $200\text{ }\mu\text{L}$  的粗酶液用  $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH7.2 磷酸盐缓冲液补齐),其它方法同 1.2.3,测定  $\text{OD}_{640\text{ nm}}$  值。

1.2.5 PLP 浓度对 GAD 活力的影响 取 5 组含 PLP 浓度为 0.01、0.05、0.10、0.15、 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的底物溶液。加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  的粗酶液,其它方法同 1.2.3,测定  $\text{OD}_{640\text{ nm}}$  值。

1.2.6 反应温度对 GAD 活力的影响和其热稳定性的研究 分别取  $400\text{ }\mu\text{L}$  底物溶液和  $200\text{ }\mu\text{L}$  粗酶液充分混合后于 30~65℃ 以梯度的形式反应 30 min,测定其酶活力,以最高酶活为参数对比计算其相对酶活力。GAD 的热稳定性实验,分别取  $400\text{ }\mu\text{L}$  底物溶液和  $200\text{ }\mu\text{L}$  粗酶液充分混合后于 30、40、50、60 和 70℃、反应 2 h,测定其相对酶活力。

1.2.7 pH 对 GAD 活力的影响和其 pH 稳定性的研究 分别取  $400\text{ }\mu\text{L}$  pH2~8 的底物溶液和  $200\text{ }\mu\text{L}$  粗酶液充分混合后 37℃ 反应 30 min,测定其酶活力。GAD 的 pH 稳定性实验,分别取  $400\text{ }\mu\text{L}$  pH 为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的底物溶液和  $200\text{ }\mu\text{L}$  粗酶液充分混合后 37℃ 反应 30 min,测定其相对酶活力。

1.2.8 不同金属离子和化学物质对 GAD 活力的影响 配制浓度为  $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 KCl、KI、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、EDTA、SDS 和  $\text{CH}_3\text{COOH}$  溶液,然后与相同体积的酶液混匀,在 30℃ 反应 30 min,反应结束后测定剩余的酶活力,以未添加金属离子和化学物质的酶活力溶液为 100%,然后用比色法来计算加入金属离子和化学物质后的酶液的相对酶活。

1.2.9 乳酸片球菌 GAD 的动力学常数 取  $200\text{ }\mu\text{L}$  的酶液,分别与  $200\text{ }\mu\text{L}$  的浓度为 20~ $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的底物溶液在最适的温度和 pH 下反应 10 min,测不同底物浓度条件下的酶反应初速度 V,以反应初速度的倒数  $1/V$  与底物浓度的倒数  $1/[S]$  进行 Lineweaver-Burk 双倒数作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶浓度对 GAD 活力的影响

由图 1 可知,当 GAD 的浓度为 3.16% 时,GAD 活力最高。而随着酶浓度的上升,酶活力上升趋势不明显,其原因可能是随着酶浓度的上升,酶与底物的结合趋近饱和,因此酶活力的上升不明显。

### 2.2 PLP 浓度对 GAD 活力的影响

由图 2 可以看出,在反应时加入一定量的

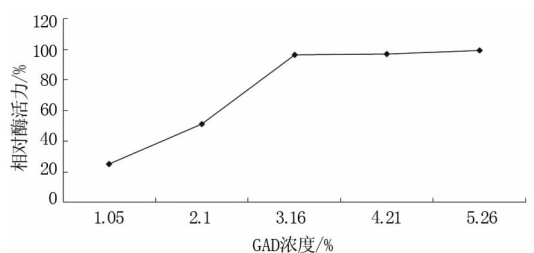


图 1 GAD 浓度对 GAD 活力的影响

PLP 对 GAD 有一定的促进作用。当 PLP 的浓度为  $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, GAD 的活力最大。而当 PLP 的浓度再加大时, 对反应产生抑制作用。

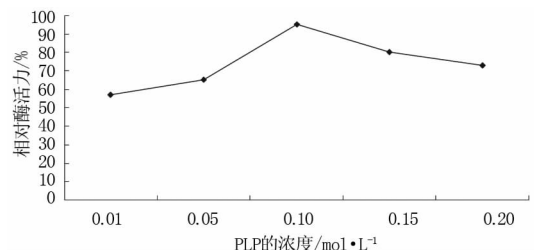


图 2 不同浓度的 PLP 对 GAD 活力的影响

### 2.3 反应温度对 GAD 活力的影响及其热稳定性

由图 3 可以看出, 温度不同对 GAD 活力的影响较大。GAD 在  $35 \sim 40^\circ\text{C}$  活力较高, 相对酶活力也较大, 在  $37^\circ\text{C}$  时酶的活力最大。由图 4 可以看出, 在温度低于  $50^\circ\text{C}$  时, 反应 2 h, GAD 的酶活力下降较明显, 在温度为  $60^\circ\text{C}$  时酶活力降低约 80%。

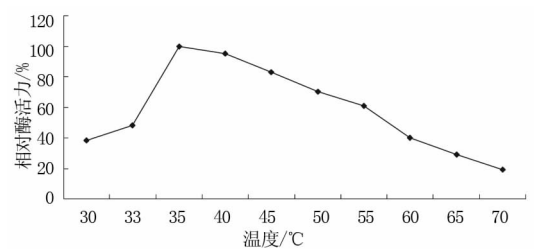


图 3 不同温度对 GAD 活力的影响

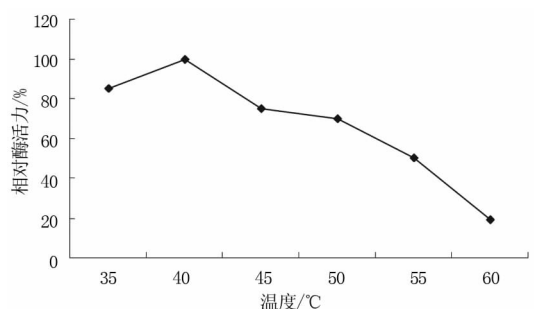


图 4 不同温度对 GAD 热稳定性的影响

### 2.4 pH 对 GAD 活力的影响及其 pH 稳定性

由图 5 可以看出, GAD 在  $\text{pH} 4.0 \sim 6.0$  有较

高的活性, 说明这是它的最适 pH 范围。pH = 5.0 时 GAD 有最大的活性, 说明其最适 pH 为 5.0。然后随着 pH 的增大, GAD 的活力明显受到了抑制, 呈急速下降趋势。由图 6 可以看出, GAD 在  $\text{pH} 4.0 \sim 5.0$  有很高的 pH 稳定性, 并且仍保存有 80% 以上的酶活力。

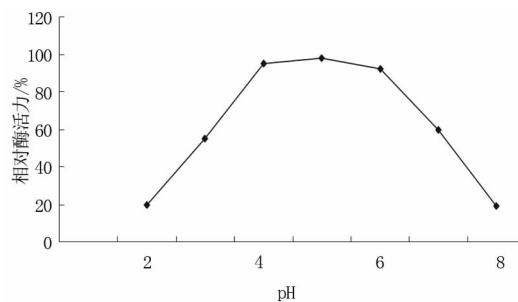


图 5 pH 对 GAD 活力的影响

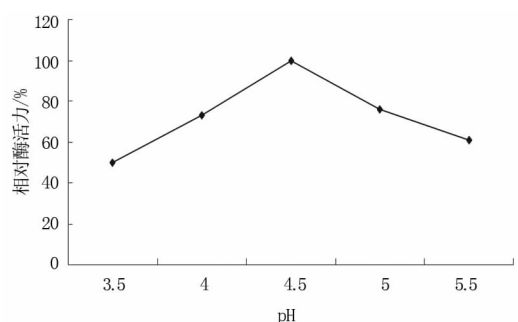


图 6 GAD 的 pH 稳定性

### 2.5 不同金属离子和化学物质对 GAD 活力的影响

在加入了 KCl 等金属离子和化学物质后, GAD 的活性发生了一些变化。由图 7 可以看出, 金属离子  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  对乳酸片球菌 GAD 的活力有微弱的促进作用, 其活力提高 10% 左右, KCl 对乳酸片球菌 GAD 的活力稍微有些抑制。KI 和  $\text{Ag}^{2+}$  对乳酸片球菌 GAD 的活力具有较大的抑制。EDTA (乙二胺四乙酸) 对乳酸片球菌 GAD 的活力影响不是很大。SDS (强蛋白质变性剂) 和  $\text{CH}_3\text{COOH}$  均对乳酸片球菌 GAD 的活力有比较大的抑制作用。

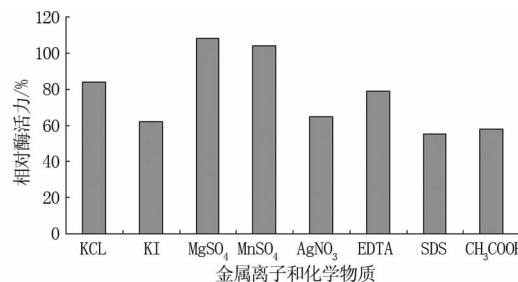


图 7 不同金属离子和其它化学物质对 GAD 活力的影响

## 2.6 GAD 的动力学常数

由图 8 可知,直线的线性良好,符合了酶反应的米氏方程,并且可以确定乳酸片球菌 GAD 在其最适 pH 和温度下的米氏常数  $K_m=0.3658 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,最大反应速度  $V_{\max}=3.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

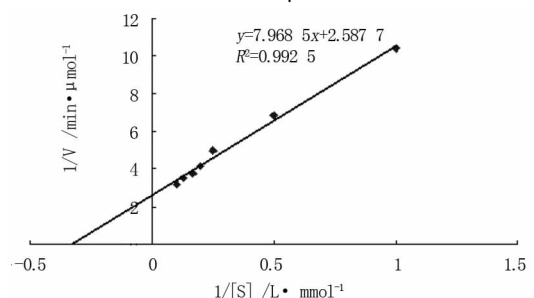


图 8 乳酸片球菌 GAD  $K_m$  的测定

## 3 结论

当 GAD 的浓度为 3.16% 时,乳酸片球菌 GAD 活力最高。而随着酶浓度的上升,酶活力上升趋势不明显。

当 PLP 的浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的时候,乳酸片球菌 GAD 的活力最大。而当 PLP 的浓度再加大时,对反应产生抑制作用。

乳酸片球菌 GAD 在  $35 \sim 40^\circ\text{C}$  的范围内活力较高,在  $37^\circ\text{C}$  时酶的活力最大。在温度低于  $50^\circ\text{C}$  时,反应 2 h, GAD 的酶活力较稳定,在温度为  $60^\circ\text{C}$  时酶活力降低约 80%。

乳酸片球菌 GAD 最适 pH 为 5.0,在 pH4.0~5.0 有很高的 pH 稳定性,并且仍保存有

80% 以上的酶活力。

$\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  使 GAD 活力提高 10% 左右, KCl 和 EDTA 对 GAD 的活力稍有抑制, KI、 $\text{Ag}^{2+}$ 、SDS 和  $\text{CH}_3\text{COOH}$  均对乳酸片球菌 GAD 活力具有较大的抑制性。

测定一定温度下酶反应的动力学常数,米氏常数  $K_m=0.3658 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max}=3.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 参考文献:

- [1] 吕莹果,张辉.米糠谷氨酸脱羧酶的酶学性质研究[J].食品与发酵工业,2008,34(5):24-28.
- [2] 许建军,江波. *Lactococcus lactis* 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质[J].无锡轻工大学学报,2004,23(3):79-84.
- [3] 宋明明.产 GABA 的乳酸菌菌株的选育及最佳发酵条件研究[D].哈尔滨:黑龙江大学,2008.
- [4] Satya Narayan V, Nair P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyric acid [J]. Biochemistry, 1989, 8: 21-25.
- [5] Ki-Bum Park, Suk-Heung oh. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1675-1679.
- [6] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigations of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients with atopic dermatitis [J]. Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1991, 37: 555-565.
- [7] Zeece M G, Beardslee T A, Markwell J P, et al. Identification of an IgE-binding region in soybean acidic glycinin G1 [J]. Food and Agricultural Immunology, 1999 (11): 83-90.
- [8] 张晖,姚惠源.富含  $\gamma$ -氨基丁酸保健食品的研究与开发[J].食品与发酵业,2002,28(9):69-72.

# Studies on Related Properties of Glutamate Decarboxylase from *Pediococcus Acidilactici*

HOU Yuan-ce<sup>1</sup>, LI Xiu-liang<sup>1</sup>, HE Qiang<sup>2</sup>

(1. Life Science College of Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080; 2. Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** This article researched on the property of glutamate decarboxylase, colorimetric method was used to measure the activity of GAD. The result showed that when the concentration of L-MSG was  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GAD had the highest activity, the concentration of GAD was 3.16%, the optimal temperature was about  $37^\circ\text{C}$ , the optimal pH was 5, when the addition amount of PLP was  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GAD had the highest activity.  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  increased the enzyme activity by 10%, KCl, EDTA had decreased the enzyme activity, and KI,  $\text{Ag}^{2+}$ , SDS and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  could decrease more seriously. The Michaelis constant of GAD was  $K_m=0.3658 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max}$  was  $3.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** glutamic acid decarboxylase (GAD);  $\gamma$ -aminobutyric acid; *Lactococcus lactis*; enzyme character