文章编号:1009-038X(2004)03-0079-06

Lactococcus lactis 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质

许建军, 江 波*, 许时婴
(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要: 采用溶菌酶处理、超声破碎、硫酸铵分级、3 次 DEAE-Sepharose CL-6B 层析、Sephacryl S-200 凝胶过滤等手段,从乳酸菌细胞中分离纯化得到谷氨酸脱羧酶(GAD; EC4.1.1.15). 纯化酶的比活力为 14.4 U/mg,纯化倍数 31,回收率 3.8%,SDS-PAGE 得到亚基的相对分子质量为 65 000. L-谷氨酸是测试的 18 种氨基酸中的惟一作用底物,表明乳酸菌 GAD 具有高度的底物专一性. 酶在 pH 值 3.6～5.4 时具有活性,pH 值 4.7 时活性最高,pH 值 6.0 以上时没有活力. 耐热性实验表明,pH 值 4.7 条件下处理 5 h 后,60 ℃时该酶仍能保持 80%以上的活性,80 ℃以上迅速失活,由 Lineweaver-Burk 作图得到的 GAD 的 K_m值为 1.9 mmol/L.

关键词: *Lactococcus lactis*; 谷氨酸脱羧酶(GAD); 纯化; γ-氨基丁酸(GABA)
中图分类号:Q 55 **文献标识码**: A

Purification and Partial Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactococcus lactis*

XU Jian-jun, JIANG Bo*, XU Shi-ying
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Glutamate Decarboxylase (GAD; EC4.1.1.15) was purified from *Lactococcus lactis* SYFS1.009 with lysozymic treatment, sonication, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose CL-6B chromatography and Sephacryl S-200 gel filtration. The specific activity of the purified enzyme, concentrated about 31-fold, is 14.4 U/mL with a yield of 3.8%. Single band obtained by SDS-PAGE showed subunit Mw is 65 000. L-glutamate is the unique decarboxylation substrate among 18 amino acids tested, suggesting the enzyme be highly specific. The enzyme shows is activity at acidic pH (3.6～5.4) range and the optimal pH is 4.7. No activity was detected above pH6.0. The enzyme keeps more than 80% of its activity below 60 ℃ during 5-hour storage and was inactivated rapidly at 80 ℃. The apparent K_m of the enzyme obtained from Lineweaver-Burk plot was 1.9 mmol/L.

Key words: *Lactococcus lactis*; glutamate decarboxylase (GAD); purification; γ-Aminobutyric acid(GABA)

收稿日期:2003-07-04; **修回日期**:2003-11-03.
作者简介: 许建军(1974-),男,河南郑州人,食品科学与工程专业博士研究生; * 责任作者.

万方数据

谷氨酸脱羧酶(Glutamate Decarboxylase, GAD; EC4.1.1.15)催化L-谷氨酸的α位脱羧反应,生成重要的抑制性神经递质γ-氨基丁酸(GABA). GAD存在广泛,从南瓜[1]、茶叶[2]、黑麦、马铃薯块茎[3]、豇豆[4]、小麦[5]、鼠脑[6]、兔脑[7]等中已发现或纯化得到GAD, *E. coli*[8]、Koji[9]、*Lactobacillus brevis*[10]、*Lactococcus*[11]等微生物细胞中也有GAD的存在. GAD对生物在逆境中生存有重要意义[12],但有关其分离、纯化及特性研究很少. GAD的反应产物GABA是一种新型食品活性因子,在功能食品中的应用已成为研究热点[13~18]. GAD是微生物细胞内控制GABA生物合成的关键酶,其特性的研究对掌握GABA的代谢合成具有重要意义. 虽然已经筛选到高产的GABA的乳酸菌[17],证明其具有GAD活力,但目前还没有对乳酸菌GAD进行专门研究的报道. 作者采用层析法分离纯化乳酸菌GAD,并对其部分酶学特性进行了研究.

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

菌种:江南大学食品科学研究室保藏的乳酸菌种 *Lactococcus lactis* SYFS1.009(下称 *Lc. lactis*).

γ-氨基丁酸(纯度99.9%以上),5′-磷酸吡哆醛(PLP),考马斯亮兰R250,丙烯酰胺,巯基乙醇,相对分子质量标准皆购自Sigma公司;L-谷氨酸钠(L-MSG)购自上海冠生园;分析纯苯酚、次氯酸钠(活性氯5.25%)、牛血清白蛋白均购自中国医药集团上海试剂公司; DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200为Pharmacia产品;溶菌酶(活力20 000 U/mg)购自上海宝丰生化公司. 硫酸铵等其他试剂均为分析纯,测试用溶液全部用超纯水配制.

主要设备有25 L发酵罐,超声波细胞破碎仪,GL-20B型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂制造),层析柜,截流相对分子质量10 000的超滤膜(上海亚东核级树酯有限公司生产)等.

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养收集 在GYP培养基(葡萄糖1.0 g/dL,酵母膏1.0 g/dL,胰蛋白胨0.5 g/dL, pH 6.8)中2次活化 *Lc. lactis* SYFS1.009,以1%的接种量接入20 L(25 L发酵罐内)含1.0% L-MSG的GYP培养基中,起始pH 6.8,30 ℃培养24 h,培养过程中不通气,轻微搅拌(30 r/min). 发酵结束后离心(2 000 g)收集菌体,用20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.2)充分洗涤,收集得到的细胞作为GAD提取原料.

1.2.2 GAD酶的提取 将收集到的湿菌体(约60 g)分散到800 mL 20 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,内含0.01 mmol/L PLP,1 mmol/L巯基乙醇,0.2 mg/mL溶菌酶,37 ℃反应1 h. 反应结束后置于冰浴中,加入5 g研细的石英砂,超声波进一步破碎40 min. 细胞碎片用冷冻离心(11 000 g)除去,得到清澈的上清液,即GAD粗酶液. 酶的分离纯化在4 ℃层析柜中进行.

1.2.3 粗酶液浓缩 采用截流相对分子质量为10 000的超滤膜,浓缩后的粗酶液在冰浴中加入固体硫酸铵至饱和度为80%,静置过夜; 离心(8 000 g)收集沉淀,重新分散于少量PBS缓冲液(内含0.01 mmol/L PLP,1 mmol/L巯基乙醇, pH 7.4)后,再离心(8 000 g); 弃去沉淀,上清液在20 mmol/L磷酸盐缓冲液(内含0.01 mmol/L PLP,1 mmol/L巯基乙醇, pH 7.2)充分透析,除去硫酸铵,所得透析液含有谷氨酸脱羧酶活性,4 ℃保存.

1.2.4 DEAE-Sepharose CL-6B(3.5 cm×30 cm)层析 20 mmol/L磷酸盐缓冲液(内含0.01 mmol/L PLP,1 mmol/L巯基乙醇, pH 7.2)平衡柱子,透析酶液上柱后,待未吸附组分流出,采用阶段梯度NaCl洗脱,洗脱体积流量2.5 mL/min. 酶活组分收集后,用截流相对分子质量10 000的超滤膜浓缩、脱盐.

1.2.5 两次DEAE-Sepharose CL-6B(2.6 cm×20 cm)层析 改变梯度洗脱条件,使得酶活组分进一步得到分离,两次层析的洗脱体积流量为0.75 mL/min. 第3次层析后,酶活级分用截流相对分子质量为10 000的超滤膜浓缩、脱盐.

1.2.6 Sephacryl S-200凝胶过滤(1.6 cm×150 cm) PBS缓冲液(内含0.01 mmol/L PLP, 1 mmol/L巯基乙醇, pH 7.4)平衡柱子,将部分纯化的GAD活性级分进一步分级.

1.2.7 粗酶提取液中蛋白质浓度测定 采用Lowry法[19],以牛血清蛋白为标样.

1.2.8 酶活力测定方法 采用比色法[20]. 底物溶液MacIlvaine缓冲体系(0.2 mol/L,pH 4.7,含0.1 mmol/L PLP,10 mmol/L底物L-MSG). 200 μL底物溶液和100 μL酶液在30 ℃反应一定时间,置于冰浴中,加入200 μL 0.2 mol/L硼酸缓冲液(pH 9.0)终止反应;再加入1.0 mL 6%苯酚和400 μL次氯酸钠溶液,充分振荡后,沸水浴中反应10 min,迅速在冰浴中冷却显色20 min,然后测定630 nm处吸光值变化. 酶反应体系中GABA的量以标准

万方数据

曲线确定，得出 GABA 量与 A_{630} 变化关系. 酶相对活力以单位时间内 A_{630} 的变化表示.

氨基酸分析仪法测定酶活：按上述条件进行酶反应，沸水浴终止反应，稀释，测定氨基酸变化（以 0 时刻反应液为参比）. 一个酶活力国际单位定义为：在测定条件下，每分钟产生 1 μmol γ-氨基丁酸所需的酶量.

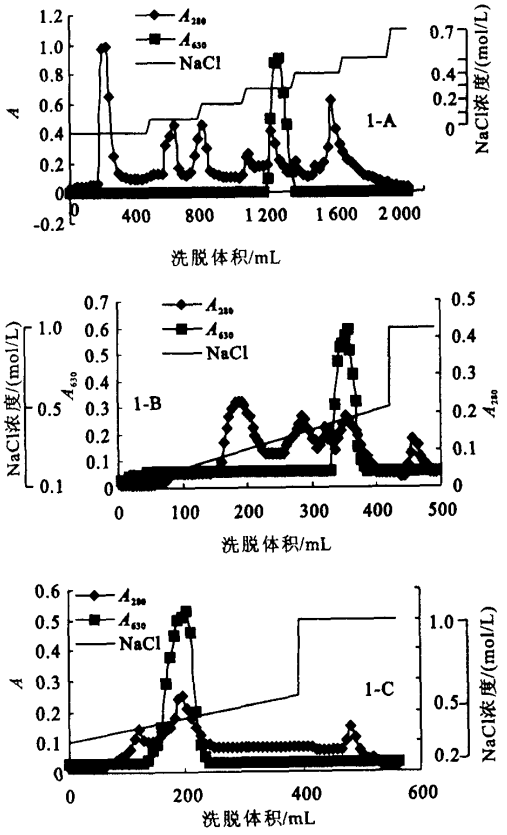
底物专一性测定：在 0.2 mol/L 醋酸缓冲液（pH 值 4.7）中复配 18 种氨基酸，所有氨基酸浓度都为 10 mmol/L，内含 0.1 mmol/L PLP，加酶液于 30 ℃反应 1 h，沸水浴 5 min 终止反应，稀释并经 0.22 μm 膜过滤后，Agilent 氨基酸分析仪测定氨基酸变化. 以底物变化表示酶活性.

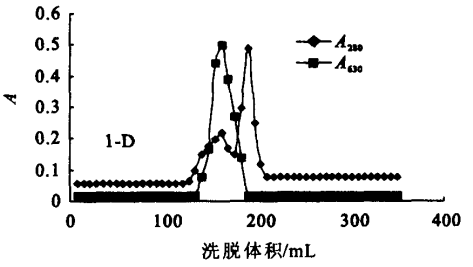
1.2.9 PAGE 方法　采用 Laemmli 建立的体系[21]，4 g/dL 浓缩胶，12 g/dL 分离胶，0.1% Coomassie Brilliant R250 染色，甲醇：乙酸：水（体积比为 1∶1∶8）混合液进行脱色.

2　结果与讨论

2.1　*Lc. lactis* SYFS 1.009 谷氨酸脱羧酶的分离纯化

GAD 在 DEAE-Sepharose CL-6B 上的吸附和分离以及在 Sephacryl-S200 上的分离见图 1.





其中 1-A，1-B，1-C 为 DEAE-Sepharose CL-6B 层析；1-D 为 Sephacryl S-200 凝胶过滤. 1-A 为 3.5 cm×30 cm 层析柱，体积流量 2.5 mL/min，阶段梯度洗脱 0～0.7 mol/L NaCl，pH 7.2；1-B，1-C 为 2.6 cm×20 cm 层析柱，体积流量 0.75 mL/min，线性梯度洗脱，pH 7.2；1-D 为 1.6 cm×150 cm 层析柱，体积流量 14 mL/h，PBS 洗脱，pH 7.4.

图 1　*Lc. lactis* GAD 在 DEAE-Sepharose CL-6B 和 Sephacryl S-200 的色谱行为

Fig. 1　DEAE-Sepharose CL-6B and Sephacryl S-200 chromatography of GAD from *Lc. lactis*

Lc. lactis SYFS 1.009 是一种革兰氏阳性细菌，细胞壁较坚固，GAD 是胞内酶[12]. 经溶菌酶处理后，加入石英砂，经超声波处理进一步击碎细胞壁，同时核酸等大分子也被降解，大大减少了对后期纯化的影响. 首先采用离子交换层析纯化 GAD，DEAE-Sepharose CL-6B 是一种弱阴离子交换剂，在利用电荷分离的同时，兼具有一定的分子筛作用. 初次制备后除去杂蛋白，降低流速以减缓梯度洗脱时离子强度变化，充分利用其分离能力. 经过不同条件的 3 次离子交换层析和凝胶过滤，GAD 的比酶活力升高了 31.8 倍，达到 14.4 U/mg，回收率为 3.8%，分离纯化结果见表 1. Native-PAGE 和 SDS-PAGE 分析表明，经上述步骤，GAD 的纯度达到单一组分，SDS-PAGE 单带的相对分子质量约为 65 000（见图 2），重复制备过程发现重现性良好.

Nomura 等[22]报道的 *Lc. lactis* 01-7 来源的 GAD 是一种成熟的单体形式，相对分子质量约为 54 000. 其他微生物来源的 GAD 的分子形式有较大的差别，如 *Lactobacillus brevis* IFO12005 的 GAD 分子有两个亚基，亚基相对分子质量为 60 000[11]. *E. coli* ATCC11246 的 GAD 分子有 6 个亚基，亚基相对分子质量约为 50 000[8]. 细菌中 GAD 的存在与细胞生长的耐酸机制有关[12]，脱羧作用不可逆地消耗了 H^+，从而对维持细胞的生理 pH 有利.

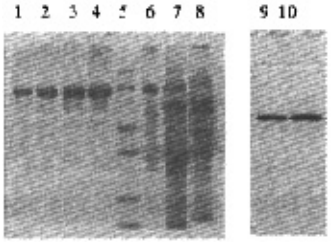
万方数据

表 1 *Lactococcus lactis* GAD 纯化小结

Tab. 1 Summary of GAD purification from *Lactococcus lactis* SYFS 1.009

纯化步骤	体积/mL	总酶活力*/U	总蛋白质量/mg	比酶活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶提取液	850	1 286	2 842	0.5	100.0	1.0
超滤浓缩(截流相对分子质量 10 000)	400	1 065	2 378	0.4	82.8	1.0
80%硫酸铵分级(离心、复溶、透析脱盐)	163	934	1 792	0.5	72.6	1.2
DEAE-Sepharose CL-6B 色谱 (3.5 cm×30 cm)	8	406	268	1.5	31.6	3.3
DEAE-Sepharose CL-6B 色谱 (2.6 cm×20 cm)	7.8	141	43	3.3	11.0	7.2
DEAE-Sepharose CL-6B 色谱 (2.6 cm×20 cm)	14	92	18	5.1	7.2	11.3
Sephacryl S-200 凝胶色谱 (1.6 cm×150 cm)	4	49	3.4	14.4	3.8	31.8

注：* 酶活测定采用氨基酸分析仪法.



泳道 1:2 μg;泳道 2:4 μg;泳道 3:6 μg;泳道 4:10 μg;泳道 5:相对分子质量标准(94 000,67 000,43 000,30 000,20 100,14 400,Pharmacia);泳道 6:2 次 DEAE-Sepharose CL-6B 后酶液;泳道 7:1 次 DEAE-Sepharose CL-6B 后酶液;泳道 8:粗酶液;泳道 9:纯化酶液 3 μg;泳道 10:纯化酶液 5 μg.

图 2 不同纯化阶段酶活组分 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE and Native-PAGE of the purified enzyme

2.2 *Lc. lactis* SYFS 1.009 GAD 活性的 pH 依赖性和热稳定性

Lc. lactis 的 GAD 在酸性环境中(pH 3.6～5.4)具有较高的活力,pH 4.7 时谷氨酸脱羧反应能力最高,见图 3. pH 6.0 以上没有酶活力,这与 GAD 酶的诱导产生机制是紧密相关的. 发酵实验表明,*Lc. lactis* 在受控制的中性培养基中生长时,既没有 γ-氨基丁酸的产生也不能检测到 GAD 活力.纯化 GAD 的热稳定性良好,60 ℃以下于 pH 4.7处理 5 h 仍能保持 80%以上活力,但到 80 ℃时,保温 0.5 h 后已经检测不到酶活力.由于 GAD 的来源十分广泛,不同物种的 GAD 的特性差别很大,仅就已报道的微生物 GAD 而言,*Lc. Lactis* GAD 的热稳定性相当好.

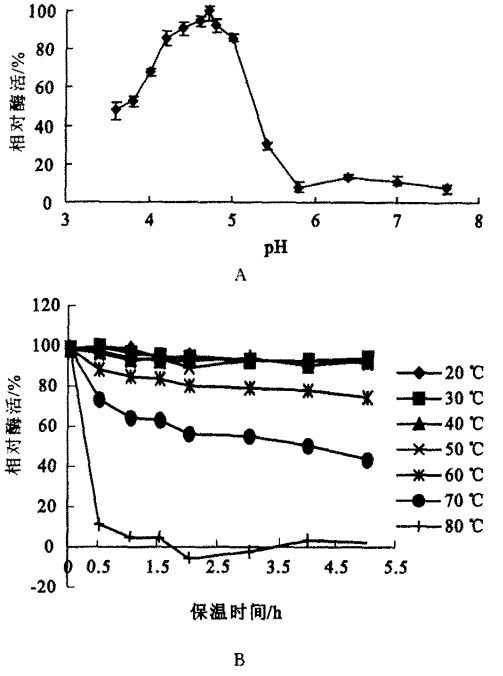


图 3 *Lactococcus lactis* SYFS 1.009 GAD 的 pH 依赖性(A)和热稳定性(B)

Fig. 3 pH-dependence and thermal stability of GAD activity from *Lactococcus lactis* SYFS 1.009

2.3 *Lactococcus lactis* SYFS 1.009 GAD 的底物专一性

测试 *Lc. lactis* GAD 对 18 种常见氨基酸(L-天冬氨酸,L-谷氨酸,L-丝氨酸,L-组氨酸,甘氨酸,L-苏氨酸,L-丙氨酸,L-精氨酸,L-酪氨酸,L-半胱氨酸,L-缬氨酸,L-蛋氨酸,L-色氨酸,L-苯丙氨酸,L-

万方数据

异亮氨酸，L-亮氨酸，L-赖氨酸，脯氨酸）的脱羧作用，结果表明，只有 L-谷氨酸可作为其脱羧底物，说明 *Lc. lactis* GAD 具有很强的底物专一性，这与酶结构的特殊构象是相关的. 其他来源的 GAD，不论是在植物中，还是在动物和微生物中，虽然分子结构有较大差别，但同样都具有很强的底物专一性[12].

2.4 Lineweaver-Burk 作图

利用 Lineweaver-Burk 作图（见图 4）求取 *Lc. lactis* GAD 的表观米氏常数，得到测定条件下 GAD 的 K_m 为 1.9 mmol/L，V_m 为 4.606 mmol/(L·min).

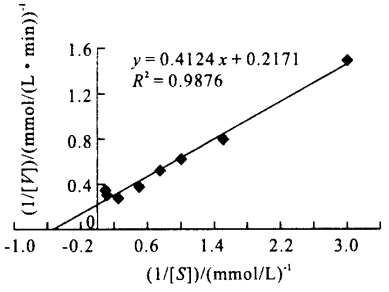


图 4　*Lactococcus lactis* SYFS 1.009 GAD 的 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 4　Lineweaver-Burk plot of GAD from *Lactococcus lactis* SYFS 1.009

酶的 K_m 值是酶的重要特性常数，反映酶与底物结合能力的强弱，表 2 仅就不同微生物来源 GAD 的一些性质进行比较.

表 2　细菌 GAD 的性质比较

Tab. 2　Properties of some bacterial GAD

来源	最适温度/℃和 pH	相对分子质量（亚基数目）	K_m/(mmol/L)
E. Coli[8]	37 ℃，pH 4.4	310 000 (6)	1.0
Lactococcus lactis 01-7[22]	30 ℃，pH 4.7	54 000 (1)	0.51
Lactobacillus brevis IFO 12005[11]	30 ℃，pH 4.2	130 000 (2)	9.3
Lactococcus lactis SYFS 1.009	50 ℃，pH 4.7	65 000 (1)	1.9

不同菌种 GAD 之间有差别，*Lactococcus lactis* 和 *E. coli* 产出的 GAD 是细菌 GAD 的典型代表，相对分子质量不同，但酶学特性有相似之处. 首次发现乳酸菌中也存在相对分子质量约为 65 000 的 GAD，人体 GAD_{65} 在糖尿病检测和免疫治疗中具有特殊意义，因此进一步揭示乳酸菌 GAD_{65} 与人体 GAD_{65} 之间的分子结构上的异同，对拓展研究乳酸菌的免疫研究提供依据. 目前，在采用乳酸菌生产 GABA 的研究中，揭示乳酸菌 GAD 的特性，对设计改善发酵工艺有指导意义. 可以根据 GAD 良好的热稳定性提高后处理工艺中的温度，使目标产物产量增加.

参考文献：

[1] Matsumoto T, Yamaura I, Funatsu M. Purification and properties of glutamate decarboxylase from squash[J]. **Agri Biol Chem**, 1986, 50(6): 1413－1417.

[2] Tsushida T, Murai T. Conversion of glutamic acid to γ-aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions[J]. **Agric Biol Chem**, 1987, 51(11): 2865－2871.

[3] Satyanarayan V, Nair P M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*[J]. **Eur J Biochem**, 1985, 150: 53－60.

[4] Johnson B S, Singh N K, Cherry J H, *et al*. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea [J]. **Phytochemistry**, 1997, 46(1): 39－44.

[5] 范军，李纯，朱苏文，等. 小麦谷氨酸脱羧酶的纯化及部分性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报，1998，14(5)：641－644.

[6] Wu J Y, Matsuda T, Roberts E. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain[J]. **J Biol Chem**, 1973, 248(9): 3029－3034.

[7] WU J Y, Denner L. L-glutamate decarboxylase from brain[J]. **Methods Enzymol**, 1985, 113: 1－10.

[8] Fonda M L. L-glutamate decarboxylase from bacteria[J]. **Methods Enzymol**, 1985, 113: 11－16.

[9] Kono I, Himeno K. Changes in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 2000, 64(3): 617－619.

万方数据

[10] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, *et al*. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *lactobacillus brevis* IFO12005[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1997,61(7):1168－1171.

[11] Nomura M, Kimoto H, Someya Y, *et al*. Production of γ－aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening [J]. **J Dairy Sci**, 1998,81:1486－1491.

[12] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase[J]. **J Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 2000,10:67－79.

[13] 编辑部. 注目されるGABA富化素材の开发[J]. 食品と开发,2001,36(6):8－10.

[14] 张晖,姚惠源,姜元荣. 富含γ－氨基丁酸保健食品的研究与开发[J]. 食品与发酵工业,2002,28(9):69－72.

[15] 顾振新,蒋振晖. 食品原料中γ－氨基丁酸形成机理及富集技术[J]. 食品与发酵工业,2002,28(10):65－69.

[16] 许建军,江波,许时婴. γ-氨基丁酸(GABA)—— 一种新型的功能食品因子[J]. 食品工业科技,2003,(1):109－110.

[17] 江波,许时婴,许建军. 一种食品功能因子γ－氨基丁酸的制备方法[P]. 中国专利:CN1392262A,2003-08-02.

[18] 许建军,江波,许时婴. 生物合成γ－氨基丁酸的乳酸菌的筛选[J]. 食品科技,2002,(10):7－10.

[19] Lowry O W, Rosebrough, N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. **J Biol Chem**, 1951,193:265－275.

[20] 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):71－76.

[21] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**, 1970,227(8): 680－685.

[22] Nomura M, Nakajima I, Aso H. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene[J]. **Microbiology**, 1999, 145(6):1375－1380.

(责任编辑:李春丽)

(上接第78页)

[3] Fengxie Jin, Xiaomei Cheng, Yifeng Shi, *et al*. Isolation of new thermophilicaerobiobacteria which produce thermostable α-amylase[J]. **J Gen Appl Microbial**, 1990,36:415－424.

[4] 中山大学. 生物化学导论[M]. 北京:人民教育出版社,1978. 53－54.

[5] 井口信义,海老根英雄,大森邦英,等. 酱油实验法[M]. 东京:三雄舍印刷株式会社,1985. 294－298.

[6] MacGregor A W. α-Amylase, limit dextrinase and α-glucosidase enzymes in barley and malt[J]. **CRC Crit Rev Biotechnol**, 1987,5,117－128.

[7] CWB加拿大小麦局. 加拿大小麦:麦芽制作及酿酒技术指南[M]. CIGI,1997. 3－9.

[8] Dewar J Orovan. Effect of alkaline steeping on water uptake and malt quality in sorghum[J]. **J Inst Brew**, 1997,103:283－285.

(责任编辑:杨 勇)

万方数据