

# 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用

许建军 江波\* 许时婴

(江南大学食品学院 无锡 214036)

**摘要:** 基于 Berthelot 显色测定  $\omega$ -氨基酸的反应, 探讨了比色法快速测定谷氨酸脱羧酶活力的测定条件。结果表明, 该方法灵敏度较高, 重现性好, 成本低, 快捷, 可替代氨基酸分析仪分析法。对乳酸菌谷氨酸脱羧酶提取液的适宜反应底物体系为 0.2 mol/L MacIlvaine, pH4.7, 内含 0.1 mmol/L PLP (5'-磷酸吡哆醛), 10 mmol/L 底物 L-MSG (L-谷氨酸钠)。200  $\mu$ L 底物溶液和 1 ~ 100  $\mu$ L 酶液在 30℃ 反应, 然后冰浴中加入 200  $\mu$ L 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH9.0) 终止反应, 再加入 1 mL 6% 苯酚和 400  $\mu$ L 次氯酸钠, 沸水浴加热 10 min 后, 迅速冷却 20 min, 在 630 nm 测定吸光值, 酶反应产物  $\gamma$ -氨基丁酸的定量以标准曲线确定, 同时探讨了该方法的应用。

**关键词:** 乳酸菌, 谷氨酸脱羧酶 (GAD),  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA), 比色法

**中图分类号:** Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0066-06

## RAPID DETERMINATION OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE ACTIVITY FROM LACTIC ACID BACTERIA BY SPECTROMETRIC METHOD AND ITS APPLICATIONS

XU Jian-Jun JIANG Bo\* XU Shi-Ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract:** In this paper, a colorimetric method with high sensitivity, reproducibility and low cost for determining glutamate decarboxylase (GAD) activity was developed based on Berthelot reaction. The optimum substrate system is 0.2 mol/L MacIlvaine buffer pH4.7, containing 0.1 mmol/L pyridoxal phosphate (PLP) and 10 mmol/L L-monosodium glutamate (L-MSG). The reaction mixture consisted of 200  $\mu$ L substrate solution and 1 ~ 100  $\mu$ L enzyme preparation from lactic acid bacteria and was incubated at 30℃. The enzymatic reaction was terminated by immersion in ice-water and addition of 200  $\mu$ L 0.2 mol/L sodium borate buffer, pH9.0, then 1 mL 6% phenol solution and 400  $\mu$ L sodium hypochloride were added. Color development was carried out in boiling water for 10 min then immediately put in ice-water bath for 20 min. The optical density is read at 630 nm.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) produced was calculated using the standard curve. Applications of the method in GAD studies were discussed.

**Key words:** Lactic acid bacteria, Glutamate decarboxylase (GAD),  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA), Spectrophotometry

谷氨酸脱羧酶 (GAD, EC4.1.1.15) 是一种吡哆醛类裂解酶, 能专一的催化 L-谷氨酸裂解成为  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 和  $\text{CO}_2$ 。GABA 是哺乳动物体内一种重要的抑制性神经递质<sup>[1]</sup>。近来, 富含 GABA 的食品的开发受到重视, 成为研究的热点<sup>[2]</sup>。已经报导有高产 GABA 的乳酸菌, 表明其有较高的 GAD 活性。GAD 作为生物技术富集生产 GABA 的关键酶, 其活性测定对深入研究生物代谢活动有重要意义, 同时, GAD 在植物中也广泛分布, 它的活性高低可指示种子发芽能力和出苗率等<sup>[3]</sup>。人体内, 研究表明 GAD 是 I 型糖尿病人体内主要的自抗原, 作为诊断酶来区分预测糖尿病以及作为极具潜力的

\* 联系人 Tel: 0510-5863566

收稿日期: 2003-04-10, 修回日期: 2003-09-21

诊疗型酶制剂<sup>[4]</sup>，它的生产和纯化逐渐成为一种产业，有很好的市场前景。Wu 和 Fonda 等<sup>[5]</sup>报道了用放射定量法测定鼠脑和大肠杆菌来源 GAD 的活力，原理是标记 L-<sup>[1-<sup>14</sup>C]</sup>谷氨酸定量释放<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>，该法准确度高，但设备气密性要求高，成本高。凌达仁等<sup>[6]</sup>利用 CO<sub>2</sub> 气敏电极结合微机化离子分析仪测定大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活力，十分方便，但是酶用量高，设备投资大。另外，采用氨基酸分析仪定量测定酶反应产物 GABA 也是一种常用且准确度很高的方法，但缺点是成本高，费时。因此有必要寻找一种简便、低成本的酶活测定方法。

Berthelot 反应利用苯酚和次氯酸钠与游离氨反应，具有极高灵敏度，常用来测定不同体系中的微量氨及其盐类。 $\omega$ -氨基酸的反应灵敏度很高，而  $\alpha$ -氨基酸响应低，对于谷氨酸和 GABA 来讲，它们在 Berthelot 反应中响应差别悬殊，即酶反应产物 GABA 有很高响应而底物谷氨酸没有，因此可以利用 Berthelot 反应的原理进行酶活测定。Johnson 等<sup>[7]</sup>报道过利用比色法测定豇豆来源的谷氨酸脱羧酶的活力，重现性好，样品用量少，而微生物来源 GAD 活力的比色测定方法未有报道。基于 Berthelot 反应的基本原理，对乳酸菌谷氨酸脱羧酶提取液的酶活测定条件进行研究，确定了快捷有效的酶活测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

$\gamma$ -氨基丁酸（纯度 99.9%）和 5'-磷酸吡哆醛（PLP）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%），考马斯亮兰 G250，牛血清白蛋白均购自中国医药集团上海试剂公司，Sephadex G100 为 Pharmacia 公司产品，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。

### 1.2 主要仪器

Agilent 1100 液相色谱仪（安捷公司），C<sub>18</sub> 柱（ $\Phi 4.0 \times 100\text{mm}$ ），OPA（邻苯二甲醛）柱前衍生测定氨基酸。高速分散仪（Jankle & Kunkel Ultra-Turrax T25），GL-20B 型冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂），混合纤维树酯微孔滤膜-0.22  $\mu\text{m}$ （上海新亚净化仪器厂），722 型分光光度计（上海第三分析仪器厂）等。

### 1.3 菌种

江南大学食品科学教研室保藏乳酸菌种 *Lactococcus lactis* SYFS1.009。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 菌体培养收集<sup>[8]</sup>：**在 MRS 液体培养基中经 2 次充分活化的 SYFS1.009 以 1.0% 的接种量接入 8.0L PYG 培养基（含 1% L-MSG）中，培养 24 h 后离心（1,800  $\times g$ ）收集菌体，用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.2）充分洗涤。

**1.4.2 粗酶提取液的制备：**收集到的湿菌体（约 27g）分散到 500 mL 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.2）中，内含 0.1 mmol/L PLP，0.2 mg/mL 溶菌酶，然后在 37℃ 反应 1 h，反应结束后置于冰浴中，利用高速分散仪在 24,000 r/min 分散 2.0 min 充分破壁以释放胞内酶。离心（11,000  $\times g$ ）除去细胞碎片，得到清澈上清液，在冰浴中加入固体硫酸铵到 80% 饱和度，静置过夜，离心（8,000  $\times g$ ）收集沉淀，重新分散于少量 PBS（pH 7.4）后，再离心（8,000  $\times g$ ），上清液对 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.2）透析，彻

底除去硫酸铵, 透析液作为粗酶提取液, 内含有谷氨酸脱羧酶, 冰箱短时间保存备用。

**1.4.3 粗酶提取液中蛋白质浓度测定:** 考马斯亮兰染色法, 以牛血清蛋白为标样。

**1.4.4 反应溶液:** 新鲜配制不同类型、浓度的缓冲液, 内含 10 mmol/L L-MSG 和 0.1mmol/L PLP 作为底物溶液。次氯酸钠 (含活性氯 5.25%), 新鲜配制的 6% 苯酚溶液和 20 mmol/L GABA 溶液, 冰箱保存备用。

**1.4.5 标准测定方法:** 200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 酶液在 30 $^{\circ}$ C 反应一定时间 (根据活力大小确定 0.5~20 h), 然后置于冰浴中, 加入 200  $\mu$ L 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH9.0) 终止反应, 再加入 1.0 mL 6% 苯酚和 400  $\mu$ L 次氯酸钠溶液, 充分振荡后, 在沸水浴中反应 10 min, 迅速在冰浴中冷却 20 min, 在 630 nm 测定吸光值, 酶反应产物 GABA 的定量以标准曲线确定, 相对酶活力以单位时间内  $A_{630}$  值的变化表示, 每组测定同时做 3 个重复, 求平均值。

**1.4.6 氨基酸分析仪分析:** 采用 MacIlvaine 缓冲体系, 0.2mol/L, pH4.7, 含 0.1mmol/L PLP, 10 mmol/L 底物 L-MSG, 200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 酶液在 30 $^{\circ}$ C 反应后, 稀释 10 倍, 经 0.22  $\mu$ m 混合纤维树酯微孔滤膜过滤, 用 Agilent 1100 液相色谱仪定量测定其他氨基酸和生成的 GABA, 一个酶活力单位 (U) 定义为在测定条件下, 每分钟产生 1  $\mu$ mol GABA 所需的酶量, 比色法进行同样的测定作比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗酶液总蛋白测定

用 PBS (pH7.4) 缓冲液溶解牛血清蛋白配制成 1.5 mg/mL 溶液, 分别吸取 15~150  $\mu$ g/100  $\mu$ L, 加入 1.0 mL 考马斯亮兰溶液, 作标准曲线得  $y = 0.0089x + 0.0471$  ( $R^2 = 0.998$ ), 样品测定后计算的粗酶提取液的蛋白质浓度为 3.5 mg/mL, 总蛋白为 245 mg。

### 2.2 不同缓冲体系对粗酶液相对活性的影响

**2.2.1 pH 值对粗酶相对活性的影响:** 采用 0.2 mol/L 的 MacIlvaine 缓冲液, pH 值变化在 3.1~7.0 之间, 图 1 显示了不同 pH 条件下酶液的相对活性, 可以看出, 酶液在 pH4.4~4.8 之间相对活性较高, 在 pH 4.7 时相对活性最高。

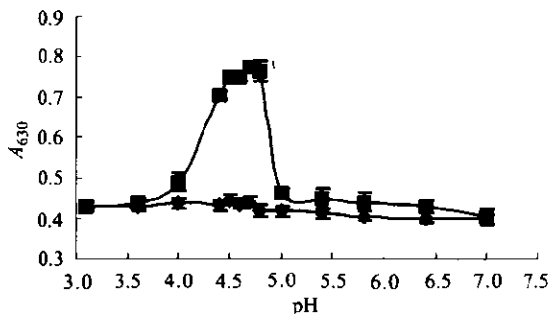


图 1 pH 值对乳酸菌谷氨酸粗酶液活力影响

200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 粗酶液在 30 $^{\circ}$ C 反应 20h, 然后显色测定, 3 组求平均值

■ 反应液, ◆ 参比液

Nomura 等<sup>[9]</sup>报道的乳酪发酵剂 *Lactococcus lactis* 01-7 的 GAD 的最适 pH 也在 4.7, Ueno 等<sup>[10]</sup>报道的 *Lactobacillus brevis* IF012005 的 GAD 最适 pH 为 4.2, 大肠杆菌 GAD 为 pH4.6, 而植物来源的 GAD 的在 pH5.8 活性最高<sup>[7]</sup>, 这说明了不同来源 GAD 性质的差别, 本文确定测定乳酸菌 SYFS1.009 来源谷氨酸脱羧酶活力的 pH 为 4.7。

**2.2.2 不同类型的生化缓冲体系与不同浓度的 MacIlvaine 对粗酶相对活性的影响:** 比较粗酶在 0.2 mol/L、pH 4.7 的 MacIlvaine、醋酸-醋酸钠、柠檬酸-柠檬酸钠、吡啶-醋酸 4 种缓冲体系中相对反应活性如图 2 所示, 0.2 mol/L 的 MacIlvaine 缓冲体系中酶活性最高, 在吡啶-醋酸缓冲体系中

的活性最低。

这一结果说明，排除缓冲液对 Berthelot 显色反应的影响（实际测定表明缓冲液种类对显色几乎没有影响），缓冲液离子可能对酶活力有抑制作用。早期 Shukuya 发现醋酸盐离子对大肠杆菌 GAD 活性有依赖浓度的抑制作用，就研究测定方法而论，这里对酶的抑制作用不作深入探讨。图 3 中，比较 MacIlvaine 缓冲体系在不同浓度时粗酶的相对活性，发现 0.2 mol/L 缓冲体系响应最高，低浓度时响应低，这可能与缓冲能力和离子强度都有关，高浓度的缓冲液有助于维持酶反应时所需的 pH 值。因而在标准测定过程中采用 0.2 mol/L、pH4.7 的 MacIlvaine 缓冲体系。

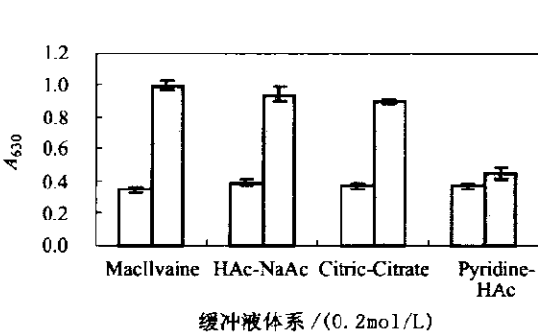


图2 不同类型缓冲体系对乳酸菌粗酶液活力的影响  
(200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 粗酶液在 30℃ 反应 10h)  
□ 参比液, ■ 反应液

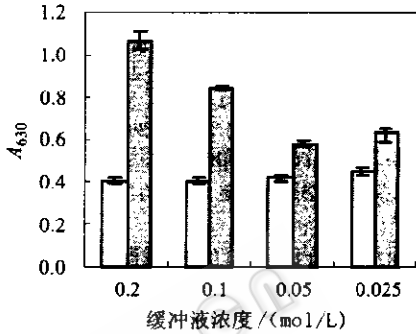


图3 不同浓度 MacIlvaine 缓冲体系  
(pH4.7) 对乳酸菌粗酶液活力的影响  
□ 参比液, ■ 反应液  
(200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 粗酶液  
在 30℃ 反应 10h)

2.3 GABA 在测定体系中的响应

为确定反应体系中 GABA 含量与吸光值变化的相关性，在 200 $\mu$ L 底物溶液（MacIlvaine 缓冲体系，0.2mol/L，pH4.7，含 0.1mmol/L PLP，10mmol/L 底物 L-MSG）中加入 0.2~2.0 $\mu$ mol/100 $\mu$ L 的 GABA，以标准方法测定在 630 nm 的吸光度，得到响应曲线  $Y = 0.3747X + 0.2389$ （Y 代表  $A_{630}$ ；X 代表 GABA 的量， $\mu$ mol）， $R^2 = 0.9984$ 。由此可知体系中 GABA 含量与吸光值变化的相关性很好，据此可计算出相同的反应体系中，一个单位  $A_{630}$  的变化代表 2.03 $\mu$ mol GABA 的生成，通过体系  $A_{630}$  的变化可以表示测定条件下脱羧酶相对活力高低。如表 1 所示，一些组分在 Berthelot 反应中有响应，特别是铵盐  $\epsilon_{630nm}$  很大，体系中的氨及铵盐会产生严重干扰，会将  $\gamma$ -氨基丁酸产生的响应掩盖掉，赖氨酸也有不可忽视响应值，必须经参比扣除。本文中溶液配制采用超纯水，粗酶提取液经充分透析至无铵盐，参比样的吸光值很稳定，反应终止液的氨基酸分析显示，谷氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸是反应体系中占 97% 以上的游离氨基酸（数据未列出），表明杂组分的干扰已降到很低。

2.4 比色法的可靠性及乳酸菌 GAD 酶反应的时间特性

图 4 显示了 GAD 粗酶酶促反应的时间进程，反应在前 3h 内线性良好，有利于酶活测定。同时

表 1 部分组分在 Berthelot 反应体系中的摩尔消光系数<sup>[11]</sup>

组分	$\epsilon_{630nm} (\times 10^{-3})$
$\gamma$ -氨基丁酸	5.38
$\alpha$ -氨基丁酸	<0.1
L-谷氨酸	<0.1
L-赖氨酸	3.16
L-硫酸铵	11.69
L-丝氨酸	0.14
L-组氨酸	0.36
其他常见氨基酸	<0.1

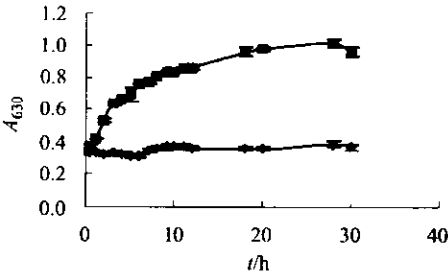


图 4 乳酸菌 GAD 粗酶在 MacIlvaine 缓冲体系中反应的时间曲线

◆ 参比液, ■ 反应液

200  $\mu$ L 底物溶液 (MacIlvaine 缓冲体系, 0.2mol/L, pH4.7, 含 0.1mmol/L PLP, 10mmol/L 底物 L-MSG) 和 100  $\mu$ L 酶液在 30℃ 反应, 不同时间终止反应测定吸光值变化, 参比液同时测定, 以水为空白, 测定 3 组求均值

该图也表明, 在酶活较低或较为稀释的情况下, 可以通过延长酶反应时间来检测脱羧酶的存在, 适宜的时间可选择 2~20h, 这一结果与 Nomura 等研究乳酸菌脱羧酶时采用 20h 测定的方法相似<sup>[9]</sup>。采用比色法计算得到的乳酸菌 GAD 粗酶活力为  $0.030 \pm 0.006$  U/mL, 采用氨基酸分析仪分析酶反应产物得到的粗酶活力 0.034 U/mL, 表 2 同时比较了两种方法测定大肠杆菌 GAD 和乳酸菌 GAD 活力的差异, 酶活较低时误差偏大, 但总体结果显示两种测定方法结果接近, 比色法可替代氨基酸分析, 缺点是测定前必须对酶体系充分了解, 排除可能对显色造成影响的不利因素。发酵研究和谷氨酸脱羧酶的分离纯化研究中, 有大量酶活分析工作, 比色法可

快速测定分级组分的相对酶活分布, 使用样品量少、成本低, 是一种很有效的方法。

表 2 比色法和氨基酸分析法 GAD 活性测定结果比较

测试酶样	酶活力	
	氨基酸分析仪法	比色法
大肠杆菌 GAD 酶提取液*	0.81U/mL	$0.74 \pm 0.02$ U/mL
细胞破碎悬液	0.15U/mL	$0.11 \pm 0.03$ U/mL
乳酸菌 GAD**	0.034U/mL	$0.030 \pm 0.006$ U/mL
粗酶液		
纯化酶样	59U/mL	$50.8 \pm 2.8$ U/mL

\*上海天厨味精厂提供大肠杆菌谷氨酸脱羧酶丙酮粉, 酶粉 10% 分散于 pH7.2 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液后, 离心 2 min (24,000 r/min) 得上清液含 GAD 活性, 蛋白浓度 3.2mg/mL, 同样底物溶液, 在 37℃ 测定酶活力, \*\*粗酶样和纯化酶样 (经过 DEAE-Sephadex CL-6B 层析, 浓缩) 蛋白浓度分别为 3.5mg/mL 和 22mg/mL

2.5 粗酶提液在凝胶过滤色谱中分级分析实践

为检验比色法测定酶活在酶分离纯化过程中的可行性, 将粗酶提液在 Sephadex G100 进行分级, 收集并测定, 以  $A_{630}$  表示相对脱羧酶活力, 结果如图 5 所示。

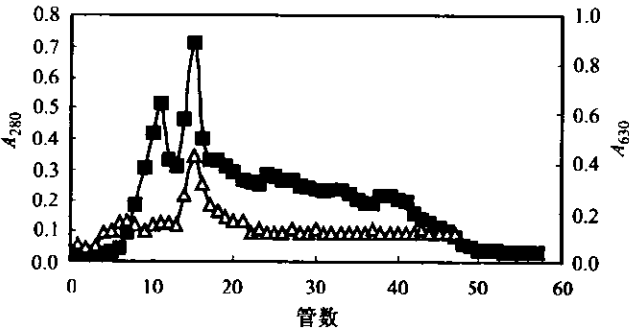


图 5 乳酸菌 GAD 粗酶在 sephadex G100 柱的分级

■ A280, ▲ A630

由图 5 可见, 柱色谱后含有酶活的分级组分通过比色法被快速检出, 除去酶反应时间, 总检测时间不到 2h, 如采用氨基酸分析仪分析, 操作烦琐, 成本高, 检测时间

每个酶活点要近 1.5h。抽取酶活峰管,测定酶活,对比两种测定方法,结果与表 2 所得结论一致。这充分显示了比色法测定相对酶活在酶分离纯化过程中的优势及可行性。

### 3 结语

利用 Berthelot 反应的基本原理,改进植物来源谷氨酸脱羧酶比色法测定酶活力的方法,本文经过探讨乳酸菌 GAD 粗酶活力测定体系的反应条件,建立了一种方便、快捷、低成本、重现性好的比色测定 GAD 酶活的方法。目前,对于乳酸菌 GAD 的认识还较为有限,因而在进一步纯化该酶以及在酶学性质研究中,利用比色测定法和氨基酸分析仪法结合测定酶活力,会大大提高工作效率,降低成本。同时,利用比色法测定其他来源谷氨酸脱羧酶应该同样具有优势和可行性,是一种值得推广的实验测定方法。

### 参考文献

- [1] 万选才,杨天祝,徐承焘.现代神经生物学.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999. 158~162.
- [2] 张 晖,姚惠源,姜元荣.食品与发酵工业,2002, 2 (9): 69~72.
- [3] Narayan V S, Nair P M. Phytochemistry, 1990, 29 (2): 367~375.
- [4] 袁仕善,周智广.生理科学进展,1998, 29 (1): 77~80.
- [5] Fonda M L. Methods in Enzymology, 1985, 113: 11~16.
- [6] Ling D, Wu G, Wang C, et al. Enzym Microb Technol, 2000, 27 (7): 516~521.
- [7] Johnson B S, Singh N K, Cherry J H, et al. Phytochemistry, 1997, 46 (1): 39~44.
- [8] 江 波,许时婴,许建军.专利 02113146.6
- [9] Nomura M, Kimoto H, Someya Y, et al. J Dairy Sci, 1998, 81: 1486~1491.
- [10] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, et al. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61 (7): 1168~1171.
- [11] Kitaoka S, Nakano Y. J Biochem, 1969, 66 (1): 87~94.