

产谷氨酸脱羧酶金银花内生菌的鉴定及其转化特性研究

杨胜远^{1,2}, 陆兆新^{1,*}, 孙力军¹, 别小妹¹, 吕凤霞¹, 曾晓雄¹

(1.南京农业大学食品科技学院,江苏 南京 210095;2.广西大学生命科学与技术学院,广西 南宁 530005)

摘 要:从金银花植株茎中分离到了1株具有谷氨酸脱羧酶活性的内生细菌,1g菌体(DW)24h可将241.224 μ mol L-Glu转化生成GABA。通过引物设计,利用PCR扩增出该菌株的16S rDNA序列,大小为1459bp。通过形态特征、生理生化特征和16S rDNA序列分析鉴定EJH-7为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。同时基于16S rDNA构建了系统进化树,并对EJH-7进行了系统发育分析。*Bacillus megaterium* EJH-7细胞转化谷氨酸生成GABA的最适反应温度和pH分别为30℃和5.5;表面活性剂Tween 20和Tween 80对转化反应活性有抑制作用,而Triton 100影响不显著;Ca²⁺、Cu²⁺和Co²⁺对转化反应活性有促进作用,分别提高了20.36%、46.61%和6.77%,而K⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺和Mn²⁺有不同程度的抑制作用。

关键词:谷氨酸脱羧酶;金银花;植物内生菌;巨大芽孢杆菌;16S rDNA;生物转化

Study on Identification of Endophyte with Glutamate Decarboxylase Activity from Honeysuckle and Its Biotransformation Properties

YANG Sheng-yuan^{1,2}, LU Zhao-xin^{1,*}, SUN Li-jun¹, BIE Xiao-mei¹, LÜ Feng-xia¹, ZENG Xiao-xiong¹

(1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2.College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: An endophytic bacterium strain EJH-7 with glutamate decarboxylase activity, transforming 241.224 μ mol L-glutamate to GABA in 24h by 1g cell (DW), was isolated and screened from the stem of *Lonicera japonica* Thunb. Through the morphologic, physiological and biochemical characteristics and the 16S rDNA sequence analysis, EJH-7 has been identified as *Bacillus megaterium*. Also, the phylogenesis was analyzed through the phylogenetic tree base on the 16S rDNA sequences, indicating that strain EJH-7 belonged to Bacteria, Firmicutes, Bacillales, Bacillaceae, *Bacillus*. The properties of the biotransformation (converting L-glutamate to GABA) of *Bacillus megaterium* EJH-7 were also examined. As a result, the optimum temperature and pH value for biotransformation are 30℃ and 5.5 respectively. The biotransformation activities are inhibited by

收稿日期:2006-01-17

*通讯作者

作者简介:杨胜远(1972-),男,高级工程师,博士,主要从事食品微生物和食品生物技术方面的研究。

参考文献:

- [1] VOS P, HONGERS R, BLEEKOK M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [2] 杨友才,周清明,尹晗琪.烟草种质资源AFLP分析中DNA模板的制备[J]. *亚热带科学*, 2005, 34(2): 1-4.
- [3] CHO G U, BLAIR M W, PANAVD O, et al. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms(AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels[J]. *Genome*, 1996, 39(2): 373-378.
- [4] 陈一华.通过AFLP-DNA指纹的计算机分析进行水稻种子鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 222-224.
- [5] 赵宏.棉花AFLP技术体系探索与建立[J]. *河北农业大学学报*, 2002, 25(1): 1-4.
- [6] 田清震,盖钧镒,喻德跃,等.大豆DNA扩增片段长度多态性AFLP研究[J]. *大豆科学*, 2000, 19(3): 210-217.
- [7] 王章奎.普通小麦杂交种与亲本间根系基因表达差异与杂种优势分子机理[D].北京:中国农业大学,2004.
- [8] 雷永,廖伯寿,王圣玉.花生AFLP—银染体系的建立与优化[J]. *花生学报*, 2003, 32(增刊): 301-305.
- [9] 黄建安,黄意欢,罗军武,等.茶树基因组DNA的高效提取方法[J]. *湖南农业大学学报*, 2003, 29(5): 402-407.
- [10] 黄建安,李家贤,黄意欢,等.茶树AFLP分子连锁图谱的构建[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(1): 7-15.

Tween 20 and Tween 80, and hardly affected by Triton 100. The biotransformation activities of *Bacillus megaterium* EJH-7 are significantly increased by 2.5mmol/L of Ca^{2+} , Cu^{2+} and Co^{2+} , and raised by 20.36%, 46.61% and 6.77% respectively in different degree by K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} .

Key words: glutamate decarboxylase; honeysuckle; endophyte; *Bacillus megaterium*; 16s rDNA;

biotransformation

中图分类号 Q939

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2007)02-0196-07

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸,为哺乳动物中枢神经系统中一种主要的抑制性神经递质,具有重要的生理功能,如降低血压、利尿、镇痛安神、改善脑机能、增进脑活力、促进长期记忆、营养神经细胞、改善更年期综合症等^[1-5]。当大脑长期缺乏GABA将会导致癫痫、帕金森等疾病。同时GABA还与脑衰老有关,其缺乏将导致老年人“耳不聪、目不明”^[6]。另外,GABA能促进精子的穿卵能力,提高受精率^[7],以及可以提高饲料利用率和日增重^[8]。因此, γ -氨基丁酸将被广泛用于医药、食品保健、化工及农业等行业。在食品上已经开发出富GABA茶、糙米、米胚芽等。

谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD; EC4.1.1.15)是生物催化L-谷氨酸的 α -羧基脱羧反应,生成GABA的唯一酶,广泛分布于从单细胞生物到哺乳动物的各种有机体活细胞中。微生物具有生长速度快、生长条件较简单、代谢过程特殊和分布广等特点,是生物酶的重要来源。利用微生物中的GAD催化谷氨酸生产GABA,不受资源、环境和空间的限制,具有显著的优点。谷氨酸已经通过发酵法获得大规模生产,价格相对较为便宜。利用微生物谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸脱羧生产GABA,是一条有效途径。

很久以前就已经发现了植物内生菌(Endophyte)的存在^[9-10],但是对植物内生菌的一些生物活性物质和生物酶方面的研究开发主要是在近二十多年,目前仍未见有对植物内生菌的谷氨酸脱羧酶和以其生产GABA的研究报道。本文对金银花的产GAD活性的内生菌进行了分离、筛选和鉴定,并对其转化性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物来源

金银花植物取自安徽科技学院中药园,选择生长旺盛的金银花植株,取一定量的茎,于干净的保鲜袋中,于4℃保存备用。

1.1.2 生化试剂

γ -氨基丁酸(minimum 99.0%) Sigma公司;平衡酚 天津H&Y生物有限公司; dNTP; Taq酶、DNA

Mark 北京清华天为生物技术公司; 色谱纯试剂 美国Tedia和Honeywell International INC公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

Eppendorf 5804R 冷冻离心机、EPS604 水平电泳仪 南京科宝仪器公司; AY120 电子天平($d=0.1\text{mg}$) 日本SHIMADZU公司; PTC-100™PCR仪 MJ Research公司; Nikon 102型光学显微镜 日本Shimadzu LC-10AD/Shimadzu MS-2010; Agilent 1100 Series(G1311A Quat Pump, G1315B DVD)高效液相色谱。

1.1.4 内生菌分离培养基 PDA 平板。

1.1.5 内生菌斜面 PDA 斜面。

1.1.6 马铃薯综合培养基

蛋白胨 5g, 酵母膏 2g, 谷氨酸一钠 5g, NaCl 5g, K_2HPO_4 0.25g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 100g 马铃薯的水提取液 900ml, 加热溶解后双层滤纸抽滤, 加水补足 1000ml, 调节pH为7.0~7.2。分装后于121℃灭菌20min。

1.1.7 混合酸碱指示剂

甲基红+亚甲蓝(红紫5.4绿)。1体积0.2%(W/V)甲基红的乙醇溶液与1体积0.1%(W/V)亚甲蓝的乙醇溶液混合,于棕色瓶中保存。

1.1.8 PCR 引物

参照文献[11]设计通用引物,其中正向引物为fD₁: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(Escherichia coli对应位置8-27),反向引物为rP₁: 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(E.coli对应位置1491-1511)。由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 内生菌分离

分别取金银花的茎用自来水洗净后,75%酒精消毒表面1min,清洗后,再用0.1%升汞表面消毒1min,无菌水冲洗3次。以无菌刀片切成1cm小段,贴于PDA固体培养基表面,28℃培养逐日观察,根据菌落形态、颜色等挑取单菌落,按常规方法纯化后保存。将组织消毒后以无菌水清洗的最后1次清洗液0.1ml涂于培养基表面,检验样品表面消毒是否彻底。

1.2.2 细胞培养和收集

分别接1环金银花内生菌到马铃薯综合培养基中,于30℃、120r/min摇床培养36h。将细胞培养液离心(8000r/min)收集菌体,以生理盐水洗涤两次。

1.2.3 GAD产生菌的筛选

取一定量的菌体于105℃干燥至恒重,测定含水量,其余的菌体按湿重加入10倍的1%谷氨酸溶液,调节到pH4.7,于30℃、120r/min振荡反应24h,离心收集上清液。取上清液2ml,加入1滴混合酸碱指示剂,初步判断溶液变绿的具有GAD活性,进一步对颜色变绿的转化液进行纸层析(展开剂为正丁醇:乙酸:水=12:3:5)和MS对GABA进行定性分析,并通过高效液相色谱对GABA进行定量,按菌体干重换算GABA生成量比较各菌株的GAD活力。

1.2.4 LC/MS测定条件

液相的流动相为乙腈:0.1%甲酸水溶液(50:50)。MS采用电喷雾离子化,正离子扫描模式,质量范围为 m/z 10~1000;典型脱溶剂装置电压为25V,温度为200℃,探针电压为3.5kV, N_2 流量为5L/min,加热块温度为150℃。

1.2.5 高效液相色谱测定

参考文献[12]进行,略有改动。色谱条件为:分离柱采用Agilent: ZORBAX.Eclipse XDB-C₁₈柱(美国),15cm×4.6mm,5μm;流动相A组成为乙酸钠8.205g、三乙胺0.5ml、乙酸0.7ml和5.0ml乙腈溶于水,调节pH5.8,定容至1000ml;流动相B为乙腈:水(60:40);洗脱程序为流动相A:流动相B(80:20)等梯度洗脱;流速为0.6ml/min;柱温25℃;G1315B DVD检测器,检测波长为254nm。

1.2.6 形态结构观察及生理生化实验

参考文献[13]进行。

1.2.7 细菌总DNA的制备

参考文献[11]进行。

1.2.8 PCR扩增

PCR反应体系(50μl)为: 10×PCR缓冲液5μl, dNTP (2.0mmol/L) 4μl, 引物fD₁和rP₁引物各1μl, DNA模板2μl, 1U Taq酶1μl, 超纯水37μl。PCR程序为: 95℃预变性5min, 94℃变性40S, 55℃退火40S, 72℃延伸1min, 30次循环后72℃延伸5min。

1.2.9 16SrDNA的测序

16SrDNA的纯化和测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.10 序列比对

将所测定的EJH-7的16SrDNA序列通过NCBI-NLM中Nucleotide-nucleotide BLAST(blastn)程序与

GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库中核苷酸序列在线进行同源性分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)^[14]。

1.2.11 系统发育分析

选择产芽孢的杆状细菌各个属的模式种、部分报道产GAD的细菌和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的16S rDNA核苷酸序列,采用BioEdit_7.0.0软件进行Clustal W多重比对,利用Clustal X1.8软件采用Neighbour-joining方法以*E.coli* 0157:H7为外群构建系统发育树,并进行bootstrap分析,重复次数为1000次。

1.2.12 细胞转化反应速度的测定

将菌体按1:5(W/V)的比例加入0.2mol/L的MacIlvaine缓冲液制成菌悬液,然后取5ml菌悬液与5ml的20mmol/L L-谷氨酸一钠溶液混匀,在一定温度下反应12h,沸水浴10min终止反应,冰浴冷却后,于4℃离心去除菌体,测定GABA的生成量。试验设定3个平行,取平均值。在上述条件下,每小时生成1μmol GABA所需的酶量定义为1个活力单位。

2 结果与分析

2.1 产GAD金银花内生菌分离、筛选

将组织消毒后以无菌水清洗的最后1次清洗液涂布于PDA平板进行检验,结果未见微生物生长,说明样品表面消毒彻底,金银花的茎在PDA平板培养所生长的微生物为植物内生菌。根据菌落形态、颜色等挑取单菌落,结果分离到了12株菌株(分别编号为EJH-1~12),其中霉菌2株,细菌10株。经过镜检,有5株细菌可产生芽孢。对12株内生菌进行筛选,只有EJH-7的转化液在加入混合指示剂后颜色变绿,经过纸层析分析,存在与GABA标准品R_f一致的茚三酮显色斑点。进一步通过MS对转化液的分子量组成进行分析显示(图1)转化液中存在GABA(m/z 104, [M+H]⁺)和GABA-Na(m/z 127, [M+H]⁺)。由此证明EJH-7具有GAD活性。经过对转化产物GABA定量分析,1g菌体(DW)24h可转化L-Glu生成241.224μmol GABA。

2.2 菌株EJH-7的形态特征

EJH-7在PDA平板上,幼龄时期菌落圆形、突起、表面光滑和有光泽、湿润、半透明、粘稠、易挑取。随着培养时间的延长菌落粘性降低,表面光泽变暗,长时间培养变成浅褐色,易挑取。营养肉汤液体试管培养菌体聚集形成沉淀。采用碱性复红简单染色显微镜下观察,EJH-7菌体两端钝圆,菌体较大,培养18h菌体大小在(2.5~3.2)μm×(1.2~1.6)μm,多以成对出现。美兰染色观察,细胞内有多个不着色的颗粒,革兰氏染色阳性,部分两端着色较重,开始时芽孢近端生、圆形,随着培养时间的延长,芽孢扩大呈椭圆形,芽

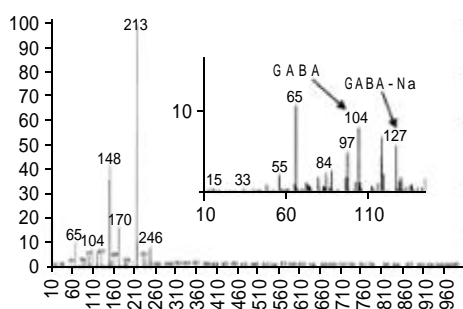


图1 菌株EJH-7转化液MS分析图谱

Fig.1 MS spectrum of the biotransformation solution of strain EJH-7

孢囊不膨大, 无伴孢晶体。根据文献[13]初步判断EJH-7属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2.3 菌株EJH-7的生理生化特性

参照文献[13]对菌株EJH-7进行生理生化试验, 结果见表1。根据最大相似原则, 参照文献[13]初步判定

表1 EJH-7的生理生化试验结果

Table 1 Results of physiological characters for strain EJH-7

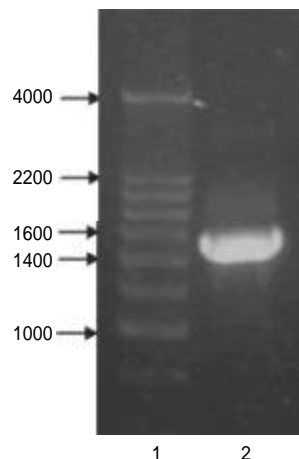
生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
接触酶	+	硝酸盐还原	—
厌氧生长	—	需要NaCl和KCl	—
V-P测定	—	需要尿素	—
V-P培养物终pH	6.01	pH6.8营养肉汤生长	+
利用D-葡萄糖产酸	+	pH6.8营养肉汤生长	+
利用L-阿拉伯糖产酸	+	2% NaCl生长	+
利用D-木糖产酸	+	5% NaCl生长	+
利用D-甘露醇产酸	+	7% NaCl生长	+
葡萄糖产气	—	10% NaCl生长	—
酪蛋白水解	+	5℃生长	—
明胶水解	+	10℃生长	—
淀粉水解	+	30℃生长	+
利用柠檬酸盐	—	40℃生长	+
利用丙酸盐	—	50℃生长	—
酪氨酸水解	+	形成吲哚	—
苯丙氨酸脱氨酶	+	形成二羟基丙酮	—
卵黄磷脂酶	+	革兰氏阳性	+

注: + 阳性; — 阴性。

EJH-7为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.4 菌株EJH-7的16S rDNA序列分析

以EJH-7的总DNA为模版, 利用细菌16S rDNA通用引物fD₁和rP₁进行PCR扩增, 经电泳分析(图2), EJH-7的扩增产物大小在1.5kb左右。16S rDNA扩增产物经上海生工生物工程技术有限公司纯化和测序, 核苷酸序列大小为1459bp。该序列已经在Genbank上进行了登记, 登记号为DQ093582。



1. DNA Ladder; 2. 16SrDNA amplified fragment of EJH-7.

图2 EJH-7的16S rDNA扩增带谱

Fig.2 16S rDNA PCR amplified spectrum of EJH-7

2.5 序列比对结果

将EJH-7的16S rDNA核苷酸序列分别与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库中报道的16S rDNA核苷酸序列进行比对, 结果显示EJH-7的16S rDNA核苷酸序列与数据库报道的5株菌株的16S rDNA核苷酸序列的同源性达到100%, 均为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 其中能明确到种水平的2株菌均为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。与数据库报道的42株菌株的16S rDNA核苷酸序列同源性达到99%, 其中除了6株为尚未明确种

表2 EJH-7的16S rDNA序列与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库比对部分结果

Table 2 16S rDNA sequence producing significant alignments of EJH-7 with GenBank+EMBL+DDBJ+PDB database

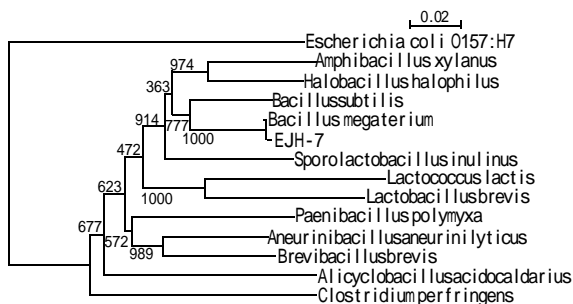
菌株	登记号	序列长度(bp)	间隙	相似性(%)	分值(bits)
芽孢杆菌sp. Fa29	AY131222.1	1509	0	100	2888
巨大芽孢杆菌	AJ717381.1	1539	0	100	2888
巨大芽孢杆菌 M031	AY553118.1	1504	0	100	2888
芽孢杆菌sp. R-16769	AJ748259.1	1520	0	100	2888
芽孢杆菌sp. EC2	AY864632.1	1504	0	100	2888
巨大芽孢杆菌 GSP55	AY505511.1	1507	0	99	2882
芽孢杆菌 sp. NK13	AY654897.1	1514	0	99	2880
芽孢杆菌 sp. LMG20240	AJ316310.1	1504	0	99	2880
芽孢杆菌sp. S/2	AJ784847.1	1506	0	99	2880
巨大芽孢杆菌 M030	AY553117.1	1508	0	99	2876
巨大芽孢杆菌 M029	AY553116.1	1504	0	99	2876
巨大芽孢杆菌 M026	AY553114.1	1506	0	99	2876

属的细菌和未培养微生物外,其余36株均为芽孢杆菌属,而且其中能明确到种水平的菌株都为巨大芽孢杆菌。表2为比对分值较高的12株菌株的比对结果。

根据EJH-7的形态特征、生理生化特征和16S rDNA序列分析,将EJH-7鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.6 系统发育分析

选择产芽孢杆菌状细菌的不同属的模式菌株和部分产GAD的细菌16S rDNA核苷酸序列构建系统发育树,如图3所示,EJH-7与*Bacillus megaterium*位于同一簇群,1000次bootstrap分析完全支持该分歧;与其它的产芽孢杆菌状细菌和产GAD的细菌的发育关系相对较远。EJH-7在系统发育地位上属于Bacteria, Firmicutes, Bacillales, Bacillaceae, *Bacillus*。



分枝结点数值表示1000次bootstrap分析所支持次数;线段(0.02)表示0.02序列差异的分枝长度。

图3 以16S rRNA序列为基础的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic relationship between the GAD-producing strains and other model bacteria belong to the different genus of Bacillaceae based on 16S rRNA gene sequence

2.7 *Bacillus megaterium* EJH-7转化特性研究

2.7.1 温度对转化反应的影响

在不同温度下于pH4.7下进行转化反应,结果如图4。*Bacillus megaterium* EJH-7在30℃转化L-Glu生成GABA的速度最快,活性最强。当温度升高,转化反应活性下降。许建军在研究*Lactococcus lactis*的GAD

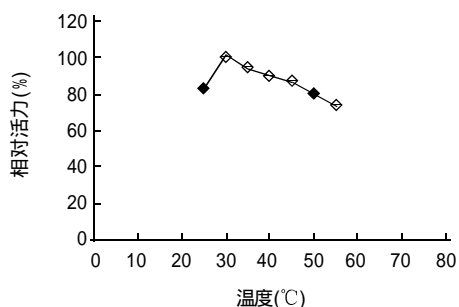


图4 温度对*Bacillus megaterium* EJH-7转化反应的影响

Fig.4 Effects of temperature on the biotransformation of *Bacillus megaterium* EJH-7

粗酶液性质中发现,酶的最适反应温度为30℃,与生长温度一致^[15]。研究表明,*Bacillus megaterium* EJH-7的最适转化反应温度在30℃,也与其生长温度一致。*Bacillus megaterium* EJH-7为植物内生细菌,最适转化反应温度与宿主植物的体内温度相近,可能与*Bacillus megaterium* EJH-7通过GAD的调节其正常的生理功能有一定联系。

2.7.2 pH对转化反应的影响

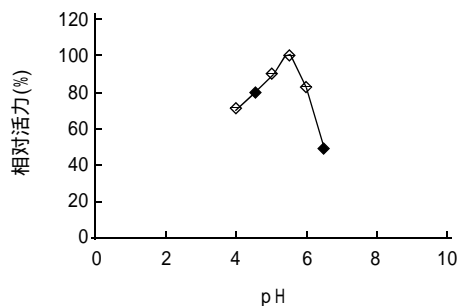


图5 pH对*Bacillus megaterium* EJH-7转化反应的影响

Fig.5 Effects of pH value on on the biotransformation of *Bacillus megaterium* EJH-7

当在不同pH的缓冲液中于30℃进行转化反应,由从图5可见,pH对*Bacillus megaterium* EJH-7的转化活性影响很大,最适反应pH为5.5,当pH高于或低于5.5则转化活性迅速下降,因此在生产中需要对反应pH进行严格控制。

在原核微生物中,目前主要认为GAD与细胞生长的耐酸机制有关^[16-18]。然而Foerster等^[19,21]人发现,在芽孢杆菌孢子的萌发过程中出现大量的L-Glu,同时GAD的活力升高,认为GAD与芽孢的萌发有关。通过pH对*Bacillus megaterium* EJH-7的生长影响情况研究表明,其生长范围在pH5.0~13,低于pH5.0不生长,结合pH对转化反应的影响分析,在*Bacillus megaterium* EJH-7的营养细胞中,可能GAD也与细胞生长的耐酸机制有关,通过GAD催化L-Glu产生GABA,消耗生长微环境中的H⁺,抵御酸性对其生长的影响。由此说明GAD在原核微生物中的生理功能是多重的。

2.7.3 表面活性剂对转化反应的影响

表面活性剂可以使细胞膜的通透性提高,有利于底物和产物进出细胞,但一些表面活性剂也可能造成酶的失活。通过在转化反应中加入0.5%的不同表面活性剂,结果显示Tween 20和Tween 80对*Bacillus megaterium* EJH-7的转化反应活性具有抑制作用,分别抑制了13.63%和7.79%的活力,说明Tween 20和Tween 80对GAD的活性具有抑制作用;而Triton100提高了4.07%的*Bacillus megaterium* EJH-7的转化活性,但不显著(图6)。由于转化反应的底物和产物(L-谷氨酸和GABA)都是小分子,

表3 金属离子对 *Bacillus megaterium* EJH-7 转化反应的影响
Table 3 Effects of metallic ions on the biotransformation of *Bacillus megaterium* EJH-7

金属离子(2.5mmol/L)	K ⁺	Ca ²⁺	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
相对活力(%)	91.94	120.36	89.49	98.42	146.61	106.77	92.31	85.92

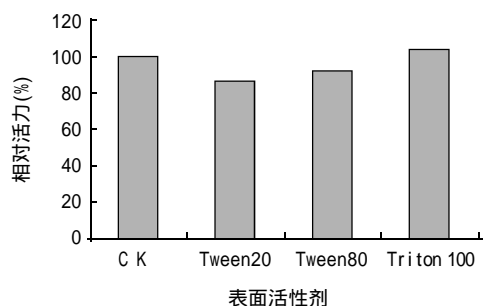


图6 表面活性剂对 *Bacillus megaterium* EJH-7 转化反应的影响
Fig.6 Effects of surfactants on the biotransformation of *Bacillus megaterium* EJH-7

较容易进出细胞,因此虽然 Triton 100 改变了细胞膜的通透性,但是并不能大幅度提高转化反应活性,同时也说明 Triton 100 对 GAD 的活性影响不大。

2.7.4 金属离子对转化反应的影响

在转化反应中加入2.5mmol/L(终浓度)的不同金属离子,结果显示(表3)Ca²⁺、Cu²⁺和Co²⁺对 *Bacillus megaterium* EJH-7 转化反应活性有促进作用,分别提高了20.36%、46.61%和6.77%;而K⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺和Mn²⁺对转化活性有不同程度的抑制作用。

3 讨论

植物内生菌由于长期与植物共生,相互间存在密切的联系,互相影响,一些表型特征可能与同种的非植物内生菌存在较大的差异,因此采用传统的形态学、生理学和生态学特征将难于对其做出较精确的分类。16S rRNA(真核生物为18S rRNA)由于既含有高度保守的序列区域,又有中度保守和高度变化的序列区域,并且其相对分子质量大小适中,便于序列分析,因此已经发展成为微生物分类鉴定的重要依据^[22]。16S rDNA是编码16S rRNA的基因,通过将某未知细菌的16S rDNA的序列与基因库的16S rDNA序列进行同源性比较,可以初步确定细菌的种属地位,有些细菌甚至可以鉴定到种。16S rDNA序列分析法已经被广泛的应用于细菌分子系统发育分类学研究中^[23]。本文根据EJH-7的形态特征、生理生化特征和16S rDNA序列分析及系统发育分析,将EJH-7鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。Foerster等^[21]人通过对孢子采用声波和热激处理,发现处理后的芽孢产生了较高的GAD活性,随着芽孢的萌发,GAD活性迅速下降。然而本文发现金银花内生巨大芽孢杆菌的营养细胞也具有很高的GAD活性。

GABA是微生物的代谢中间产物,在γ-氨基丁酸-α-酮戊二酸转氨酶的作用下与琥珀酸半醛异化为琥珀酸,进一步通过三羧酸循环代谢旁路发生代谢^[24-26]。因此,通过发酵法很难获得较高浓度的GABA,需要进行营养缺陷型的菌种选育。利用细胞转化法,由于只存在L-谷氨酸,而且pH较低,不利于微生物生长,大大降低了GABA的代谢,有利于GABA的积累。而且转化液的组分相对较单一,可大大降低下游提取和纯化工艺的成本,同时由于谷氨酸的价格相对较便宜,因此利用产谷氨酸脱羧酶的微生物细胞转化谷氨酸生产GABA是一条很好的途径。

参考文献:

- [1] STANTON H C. Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system[J]. Arch Int Pharmacodyn, 1963, 143: 195-200.
- [2] OMORI M, YANO T, OKAMOTO J, et al. Effect of anaerobically treated tea (gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1987, 61: 1449-1451.
- [3] OKADA T, SUGISHITA T, MURAKAMI T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 2000, 47(8): 596-603.
- [4] DEFEUDIS F V. γ-aminobutyric acid and cardiovascular function[J]. Experientia, 1983, 39: 845-848.
- [5] 林智, 大森正司. γ-氨基丁酸茶成分对大鼠血管紧张素I转换酶(ACE)活性的影响[J]. 茶叶科学, 2002, 22(1): 43-46.
- [6] LEVENTHAL A G, WANG Y, PU M, et al. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkey[J]. Science, 2003, 300: 812-815.
- [7] 袁玉英, 何春娜, 石其贤. γ-氨基丁酸诱发人精子顶体反应及其受精能力[J]. 生理学报, 1998, 50(3): 326-332.
- [8] 韦习会, 漆兴桂, 夏东, 等. 日粮添加γ-氨基丁酸对育肥猪生长和饲料利用的影响[J]. 家畜生态, 2004, 25(2): 10-12.
- [9] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [10] STROBEL G A. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(4): 315-333.
- [11] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [12] ROSSETTIV V, LOMBARD A. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1996, 681: 63-67.
- [13] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65.
- [14] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 3389-3402.
- [15] 许建军. Lactococcus lactis生物合成γ-氨基丁酸及谷氨酸脱羧酶的性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.

采用 TG 和 DSC 方法研究糖类对谷氨酰胺转氨酶热稳定性的影响

常忠义¹, 荣绍丰¹, 高红亮¹, 包海蓉², 瞿伟菁^{1,*}

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062 2. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要: 谷氨酰胺转氨酶(TGase)是一种催化蛋白质分子间产生共价交联的硫醇酶类,但其热稳定性较差。在 40~60℃之间,通过添加海藻糖、蔗糖和葡萄糖作为 TGase 的保护剂, TGase 酶活残留率均比对照组升高,其中海藻糖的保护最为显著。采用 TG 和 DSC 分析方法,与对照组相比,三种糖中海藻糖提高了 TGase 的相变温度(T_m), ΔT_m 值为 29℃,相变热焓 ΔH 上升 26.4J/g,失重率降低了 2.8%。对应于上述热力学参数,葡萄糖和蔗糖的加入则并未表现与海藻糖相同的趋势。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶; 热稳定性; TG 和 DSC 分析; 糖

Effects Study on Thermal Stabilization of Transglutaminase in Presence of Saccharides by TG/DSC Method

CHANG Zhong-yi¹, RONG Shao-feng¹, GAO Hong-liang¹, BAO Hai-rong², QU Wei-jing^{1,*}

(1. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13) was one of the thiol enzymes that can catalyze protein reticulation, but its enzyme activity was unstable in normal temperature. Thermal stability tests were tested from 40℃ to 60℃, and the results showed that the remained enzyme activity of TGase were increased in protection of glucose, sucrose and trehalose, and the trehalose was highest in all the tests. The samples were studied by TG (thermogravimetry) and DSC (differential scanning calorimetry) analysis whereas, the results showed that the increase of ΔT_m and ΔH of TGase in trehalose were 29℃ and 26.4J/g, respectively. The rate of loss weight of TGase in trehalose reduced 2.8%. However, these thermodynamics parameters (ΔT_m , ΔH and loss weight) did not show the same trend as in trehalose when sucrose and glucose were added.

Key words: transglutaminase (TGase); thermal stability; TG/DSC analysis; saccharides

收稿日期: 2005-12-03

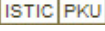
*通讯作者

作者简介: 常忠义(1968-), 男, 博士后, 研究方向为食品生物技术。

- | | |
|---|--|
| [16] UENO H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000(10): 67-79. | [21] FOERSTER H F. Spore pool glutamic acid as a metabolite in germination [J]. J Bacteriol, 1972, 111: 437-442. |
| [17] CHRISTENSEN J E, DUDLEY E G, PEDERSEN J A, et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76(1/4): 217-246. | [22] 陈文新. 细菌系统发育[J]. 微生物学报, 1998, 38: 240-243. |
| [18] DE BIASE D, TRAMONTI A, BOSSA F, et al. The response to stationary-phase stress conditions in Escherichia coli: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(6): 1198-1211. | [23] VANDAMME P, POT B, GILLIS M, et al. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics[J]. Microbiol Review, 1996, 60(2): 407-438. |
| [19] FOERSTER C W, FOERSTER H F. Glutamic acid decarboxylase in spores of Bacillus megaterium and its possible involvement in spore germination[J]. J Bacteriol, 1973, 114: 1090-1098. | [24] KUMAR S, PUNEKAR N S. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi[J]. Mycol Res, 1997, 101: 403-409. |
| [20] FOERSTER H F. γ -Aminobutyric acid as a required germinant for mutant spores of Bacillus megaterium[J]. J Bacteriol, 1971, 108: 817-823. | [25] CHRISTENSEN R L, SCHMIT J C. Regulation and glutamic acid decarboxylase during Neurospora crassa conidial germination[J]. J Bacteriol, 1980, 144: 983-990. |
| | [26] KUMAR S, PUNEKAR N S, SATYANARAYAN V, et al. Metabolic fate of glutamate and the evaluation of flux through the 4-aminobutyrate (GABA) shunt in Aspergillus niger[J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 67: 575-584. |

作者: 杨胜远, 陆兆新, 孙力军, 别小妹, 吕凤霞, 曾晓雄, YANG Sheng-yuan, LU Zhao-xin, SUN Li-jun, BIE Xiao-mei, L(U) Feng-xia, ZENG Xiao-xiong

作者单位: 杨胜远, YANG Sheng-yuan (南京农业大学食品科技学院, 江苏, 南京, 210095; 广西大学生命科学与技术学院, 广西, 南宁, 530005), 陆兆新, 孙力军, 别小妹, 吕凤霞, 曾晓雄, LU Zhao-xin, SUN Li-jun, BIE Xiao-mei, L(U) Feng-xia, ZENG Xiao-xiong (南京农业大学食品科技学院, 江苏, 南京, 210095)

刊名: 食品科学 

英文刊名: FOOD SCIENCE

年, 卷(期): 2007, 28(2)

被引用次数: 1次

参考文献(26条)

1. STROBEL G A Endophytes as sources of bioactive products [外文期刊] 2003(06)
2. 韦习会; 漆兴桂; 夏东 日粮添加 γ -氨基丁酸对育肥猪生长和饲料利用的影响 [期刊论文] - 家畜生态 2004(02)
3. 袁玉英; 何春娜; 石其贤 γ -氨基丁酸诱发人精子顶体反应及其受精能力 [期刊论文] - 生理学报 1998(03)
4. LEVENTHAL A G; WANG Y; PU M GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkey [外文期刊] 2003(5620)
5. 林智; 大森正司 γ -氨基丁酸茶成分对大鼠血管紧张素 I 转换酶(ACE)活性的影响 [期刊论文] - 茶叶科学 2002(01)
6. DEFEUDIS F V γ -aminobutyric acid and cardiovascular function 1983
7. 许建军 Lactococcus lactis 生物合成 γ -氨基丁酸及谷氨酸脱羧酶的性质研究 2005
8. ALTSCHUL S F; MADDEN T L; SCHAFER A A Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [外文期刊] 1997
9. 东秀珠; 蔡妙瑛 常见细菌系统鉴定手册 2001
10. OKADA T; SUGISHITA T; MURAKAMI T Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration [外文期刊] 2000(08)
11. OMORI M; YANO T; OKAMOTO J Effect of anaerobically treated tea (gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats 1987
12. KUMAR S; PUNEKAR N S; SATYANARAYAN V Metabolic fate of glutamate and the evaluation of flux through the 4-aminobutyrate (GABA) shunt in Aspergillus niger [外文期刊] 2000
13. CHRISTENSEN R L; SCHMIT J C Regulation and glutamic acid decarboxylase during Neurospora crassa conidial germination 1980
14. KUMAR S; PUNEKAR N S The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi [外文期刊] 1997(4)
15. VANDAMME P; POT B; GILLIS M Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics 1996(02)
16. 陈文新 细菌系统发育 1998
17. FOERSTER H F Spore pool glutamic acid as a metabolite in germination 1972
18. FOERSTER H F γ -Aminobutyric acid as a required germinant for mutant spores of Bacillus megaterium 1971
19. FOERSTER C W; FOERSTER H F Glutamic acid decarboxylase in spores of Bacillus megaterium and its possible involvement in spore germination 1973
20. DE BIASE D; TRAMONTI A; BOSSA F The response to stationary-phase stress conditions in Escherichia coli: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system [外文期刊] 1999(06)
21. CHRISTENSEN J E; DUDLEY E G; PEDERSEN J A Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria [外文期刊] 1999(1-4)
22. UENO H Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase 2000(10)
23. ROSSETTIV V; LOMBARD A Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography [外文期刊] 1996
24. WEISBURG W G; BARNS S M; PELLETIER D A 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study 1991(02)
25. STROBEL G A Rainforest endophytes and bioactive products [外文期刊] 2002(04)

26. [STANTON H C Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system](#) 1963

引证文献(1条)

1. [李云](#), [杨胜远](#), [陈郁娜](#), [刘祥流](#), [麦真真](#) [屎肠球菌HS3细胞转化法生物合成 \$\gamma\$ -氨基丁酸的研究](#)[期刊论文]-[广东农业科学](#) 2010(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702049.aspx