

中性盐对谷氨酸脱羧酶活性的影响机制

杨胜远^{1,2}, 陆兆新¹, 吕凤霞¹, 别小妹¹, 焦 阳¹, 孙力军¹

(1. 南京农业大学 食品科学技术学院, 江苏 南京 210095; 2. 韩山师范学院 生物系, 广东 潮州 521041)

摘 要: 通过不同阳离子和不同阴离子对唾液链球菌嗜热亚种 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) 谷氨酸脱羧酶活性的影响以及 NaNO_3 对不同蛋白质浓度的谷氨酸脱羧酶活性的影响进行考察, 结果表明: 中性盐对谷氨酸脱羧酶活性的影响不是由于增加蛋白质亚基间的疏水作用引起的, 而可能是由中性盐对谷氨酸脱羧酶活性的弱抑制作用与中性盐增加了谷氨酸脱羧酶的胶体体系稳定性共同作用所致, 同时还可能与中性盐降低了反应体系 CO_2 的溶解度有关。

关 键 词: 谷氨酸脱羧酶; 唾液链球菌嗜热亚种; 盐; 机制; 疏水作用

中图分类号: O643.3

文献标识码: A

氨基酸脱羧反应是由丙酮酰 (pyruvoyl) 或磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 作为辅酶的两类酶所催化的, 其中依赖于 PLP 的脱羧酶可分为 4 群, 目前研究最多的是第 2 群中的谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD, EC. 4. 1. 1. 15)^[1]. GAD 是生物体催化 L-谷氨酸发生不可逆 α -脱羧生成 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 和 CO_2 的唯一酶. 由于 GABA 具有降血压、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重要生理功能^[2], 因此 GAD 的研究开发已成为新的研究热点. D-氨基酸是生产医药、食品添加剂和农用化学品等的重要原料^[3], 目前报道的不同来源的 GAD 均具有很高的底物特异性, 只对 L-谷氨酸具有催化作用, 而对 D-谷氨酸没有催化作用^[4], 因此 GAD 还可以用于 D-谷氨酸生产中对 DL-谷氨酸的拆分. 研究表明, GAD 与芽孢杆菌的孢子萌发和原核微生物的抗酸机制有关^[5~9], 可见 GAD 在微生物生理中具有重要作用. 因此进行 GAD 研究, 在理论上和应用上均具有重要意义.

在前期研究中, 唾液链球菌嗜热亚种 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) GAD 经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、等电点沉淀、DEAE-Sephadex A - 50 离子交换层析、HiPrep16/10 Phen-

yl FF 疏水层析和 Sephadex G - 100 凝胶层析, 获得了电泳纯 GAD^[10]. 作者在研究化学物质对 GAD 的影响中发现, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 、 KCl 和 LiCl 等中性盐对 GAD 活性有轻微的抑制作用或没有影响, 但在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时却对 GAD 活性呈现促进作用. Fond^[11] 也发现 NaCl 可以促进 *Escherichia coli* GAD 的活力, 但是 Ueno 等^[12] 却发现 NaCl 对 *Lactobacillus brevis* GAD 的活性没有影响, 而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 和 MgSO_4 对 *Lb. brevis* GAD 活性有促进作用, 且 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4$. Ueno 等人认为由于中性盐增加了酶蛋白亚基间的疏水作用, 从而促进 GAD 的活性. 然而中性盐对 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* GAD 活性的影响并不符合疏水作用规律. 本文对中性盐对 GAD 活性的影响机制进行了报道.

1 材料与方法

1.1 GAD 来源

来自 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y-2. 经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、等电点沉淀、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、HiPrep16/10 Phenyl FF 疏水层析和 Sephadex G-100 凝胶层析共 5 步纯化, GAD 酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现单一条带, 达到了电泳纯.

收稿日期: 2007-02-05; 修回日期: 2007-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30671460).

作者简介: 杨胜远 (1972-), 男, 高级工程师, 博士.

1) 通讯联系人: Tel: +86 - 025 - 84396583, E-mail: fmb@njau.edu.cn.

1.2 主要仪器和试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱(XDB-C₁₈柱, 15 cm × 4.6 mm, 5 μm). γ-氨基丁酸(minimum 99.0%)为Sigma产品; 色谱纯试剂为美国Tedia和Honeywell International INC公司产品; 其他试剂为国产分析纯或生化试剂.

1.3 溶液配制

流动相A的组成为: 乙酸钠10.254 g/L、三乙胺0.5 mL/L和乙酸0.7 mL/L, pH 5.8; 流动相B为: 乙腈; 流动相C为: 水.

1.4 GAD活力测定

参照文献[13]进行测定, 略作改进. 取0.1 mL GAD酶液(GAD酶液蛋白质浓度详见图表标注)、0.1 mL L-Glu溶液(40 mmol · L⁻¹, 溶于pH 4.0的0.2 mol · L⁻¹乙酸-乙酸钠缓冲液, 其中含0.02 mmol · L⁻¹ PLP)与0.2 mL pH 4.0的0.2 mol · L⁻¹乙酸-乙酸钠缓冲液(分别含不同浓度的中性盐)混合, 于55 ℃反应1 h, 加入1.6 mL冷冻的无水乙醇终止反应, 然后在4 ℃于8 000 × g离心15 min, 取100 μL上清液注入1.5 mL的锥形离心管中, 离心状态下真空干燥, 加入30 μL乙醇-水-三乙胺(2: 2: 1)溶解干燥物, 再次离心状态下真空干燥, 然后加入50 μL乙醇-水-三乙胺-PITC(7: 1: 1: 1), 室温反应30 min, 于离心状态下真空干燥去除过量试剂. 加入200 μL流动相A-流动相B-流动相C(60: 12: 28)混合液, 超声溶解, 膜过滤后采用高效液相色谱进行测定. 高效液相色谱测定条件为: 洗脱程序见表1, 检测波长为254 nm, 测定温度为27 ℃, 进样量为20 μL.

在测定条件下1 h生成1 μmol GABA所需酶量定义为1个酶活力单位(U), 以不含中性盐的反应体系为100%, 计算相对酶活.

表1 高效液相色谱洗脱程序表

Table1 Elution programs of high-performance liquid chromatography

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)	Solution C (%)	Flow (mL · min ⁻¹)
0.00	60.00	12.00	28.00	0.60
6.00	60.00	12.00	28.00	0.60
6.10	20.00	13.50	66.50	0.40
22.00	20.00	13.50	66.50	0.40

1.5 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定参照文献[14]采用考马斯亮蓝染色法测定. 以牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)为标准品.

1.6 统计方法

利用SPSS 12.0软件, 采用Duncan法进行检验.

2 结果和讨论

2.1 NaCl、KCl和LiCl对GAD的影响

表2为NaCl、KCl和LiCl对GAD(蛋白浓度为1.49 mg · mL⁻¹)活性影响的考察结果, 5 mmol · L⁻¹的NaCl对GAD活性没有影响, 50 mmol · L⁻¹的NaCl对GAD活性却有促进作用(P < 0.01); 5 mmol · L⁻¹的KCl对GAD活性有抑制作用(P < 0.05), 50 mmol · L⁻¹的KCl对GAD活性却没有显著影响; 5 mmol · L⁻¹的LiCl对GAD活性有抑制作用(P < 0.05), 而50 mmol · L⁻¹的LiCl对GAD活性却有促进作用(P < 0.01). 结果表明Na⁺和Cl⁻不是GAD的激活剂和抑制剂, 而K⁺和Li⁺对GAD活性有轻微的抑制作用.

虽然KCl和LiCl在低浓度(5 mmol · L⁻¹)时对GAD活性有抑制作用, 然而当盐浓度提高(50 mmol · L⁻¹), GAD活性却又回升, 说明除了K⁺和Li⁺对GAD活性的轻微抑制作用外, 还存在其他影响机制, 其对GAD活性的促进作用抵消了因K⁺和Li⁺对GAD活性的弱抑制作用而降低的GAD活力, 当这种促进机制大于抑制作用时, 则表现为对GAD活力有促进作用(如LiCl). 由于Na⁺对GAD活性没有抑制作用, 无需消除负面的影响, 因此低浓度(5 mmol · L⁻¹)的NaCl并没有显著改变GAD活性, 高浓度(50 mmol · L⁻¹)时表现对GAD活性有显著的促进作用. 因此NaCl的实验结果也表明存在与KCl和LiCl一样的促进机制.

Fond^[11]在研究化学物质对*E. coli* GAD的影响中, 也发现NaCl可以促进GAD的活力, 但是Ueno等^[12]却发现NaCl对*Lb. brevis* GAD的活性没有影响, 而(NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄和MgSO₄对*Lb. brevis* GAD活性有促进作用, 且(NH₄)₂SO₄ > Na₂SO₄ > MgSO₄. Ueno等人认为由于中性盐增加了酶蛋白亚基间的疏水作用, 从而促进GAD的活性.

表 2 金属盐对 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Y-2 GAD 活性的影响

Table 2 Effects of various salts on the activity of GAD from *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Y-2

Salts	Concentration of salts (mmol · L ⁻¹)	Activity (U · mL ⁻¹)	Relative activity (%)
C. K.	/	17.40 ± 0.64	100
NaCl	5	17.67 ± 0.65	101.55 ± 3.74
	50	18.58 ± 0.69 [*]	106.78 ± 3.97
KCl	5	16.39 ± 0.61 [*]	94.20 ± 3.51
	50	18.01 ± 0.67	103.51 ± 3.85
LiCl	5	16.33 ± 0.60 [*]	93.85 ± 3.45
	50	18.50 ± 0.68 ^{**}	106.32 ± 3.91

Note: The concentration of GAD protein was 1.49 mg mL⁻¹. ^{*}, P < 0.05; ^{**}, P < 0.01.

2.2 不同阳离子对 GAD 活性的影响

为了验证 Ueno 等人的观点, 图 1 对不同浓度的 Na⁺、K⁺、Li⁺ 和 NH₄⁺ 对 GAD 活性的影响进行了考察. 结果显示: 随着 NaCl、KCl、LiCl 和 NH₄Cl 的浓度增加, GAD 的活性也增强, 当盐浓度达到一定程度时, GAD 的活性则又开始下降. 特别是 KCl 和 LiCl 在 5 mmol · L⁻¹ 时, 对 GAD 有轻微的抑制作用, 而随着浓度增加, GAD 的活性反而增强.

根据阳离子对蛋白质疏水作用的影响的强弱顺序为 NH₄⁺ > K⁺ > Na⁺ > Li⁺ [15], 因此要使同一蛋白质的疏水基团暴露到相同程度所需离子浓度应为 NH₄⁺ < K⁺ < Na⁺ < Li⁺, 然而 NaCl、KCl、LiCl 和 NH₄Cl 促进 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Y-2 GAD 活性的最大阳离子浓度的顺序为 NH₄⁺ = K⁺ > Na⁺ > Li⁺ (图 1), 可见 NH₄⁺、K⁺、Na⁺ 和 Li⁺ 对 GAD 的影响并不符合疏水作用的规律.

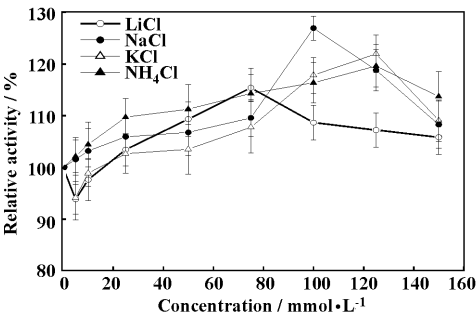


图 1 不同阳离子对 GAD 活性的影响

Fig.1 Effect of various cations on the GAD activity

The concentration of GAD protein was 1.49 mg · mL⁻¹.

2.3 不同阴离子对 GAD 活性的影响

图 2 考察了不同浓度的 SO₄²⁻、Cl⁻ 和 NO₃⁻ 对

GAD 活性的影响, 结果显示 GAD 的活性随着 NaCl 的浓度增加而增强, 当盐浓度达到一定程度时, GAD 的活性则又开始下降; 而 Na₂SO₄ 和 NaNO₃ 在低浓度时对 GAD 活性有轻微的抑制作用, 然后随着盐的浓度增加, GAD 的活性也逐渐增强, 当盐浓度达到一定程度时, GAD 的活性则又开始下降. 由于 Na₂SO₄、NaCl 和 NaNO₃ 均是钠盐, 而低浓度 NaCl 并没有表现对 GAD 活力有抑制作用, 因此说明 SO₄²⁻ 和 NO₃⁻ 对 GAD 有弱的抑制作用.

在低盐浓度的条件下, 该结果与 Fond [11] 的研究结果一致, 但是与 Ueno 等 [12] 的研究结果不同. 随着 Na₂SO₄ 浓度的提高, Na₂SO₄ 逐渐表现对 GAD 活力起促进作用. 说明中性盐对酶的活性影响与其浓度密切相关.

从图 2 可见, Na₂SO₄ 和 NaNO₃ 对 GAD 的催化活性的促进效果明显低于 NaCl, 可能是由于 Na₂SO₄ 和 NaNO₃ 作为中性盐对 GAD 活性的部分促进作用被 SO₄²⁻ 和 NO₃⁻ 对 GAD 活性的抑制作用抵消所致.

根据阴离子对蛋白质的疏水作用影响的强弱为 SO₄²⁻ > Cl⁻ > NO₃⁻ [15], 要使同一蛋白质的疏水基团暴露到相同程度, 理论上所需阴离子浓度应为 NO₃⁻ > Cl⁻ > SO₄²⁻. 实验结果表明, 如果要使 Na₂SO₄、NaCl 和 NaNO₃ 对 GAD 活性的促进作用达到各自的峰值, 所需最大浓度顺序为 NaNO₃ > NaCl > Na₂SO₄ (图 2), 该结果与疏水作用的规律相符. 但是, 当溶液中 NO₃⁻、Cl⁻ 和 SO₄²⁻ 的摩尔浓度相等时, Na₂SO₄ 溶液的 Na⁺ 浓度是 NaCl 和 NaNO₃ 溶液中的 Na⁺ 浓度的 2 倍, 因此实验结果并不能充分判定各

化合物对 GAD 活性的影响是否是由于疏水作用使 GAD 部分基团暴露所造成.

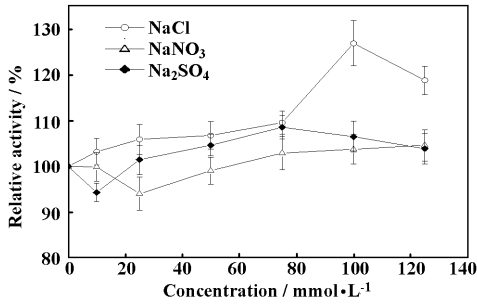


图2 不同阴离子对 GAD 活性的影响

Fig. 2 Effect of various anions on the GAD activity

The concentration of GAD protein was 1.49 mg · mL⁻¹.

2.4 NaNO₃对不同蛋白浓度 GAD 活性的影响

图3 考察了 NaNO₃对不同蛋白浓度 GAD 活性的影响, 结果显示: 当 GAD 蛋白浓度为 0.31 mg · mL⁻¹时, 随着 NaNO₃浓度增加, 对 GAD 活性的抑制作用加强; 当 GAD 蛋白浓度为 1.49 mg · mL⁻¹时, 低浓度的 NaNO₃对 GAD 有轻微的抑制作用, 但随着 NaNO₃浓度增加则对 GAD 活性起促进作用; 当 GAD 蛋白浓度为 6.38 mg · mL⁻¹时, NaNO₃在低浓度和高浓度条件下, 对 GAD 活性都呈现显著的促进作用.

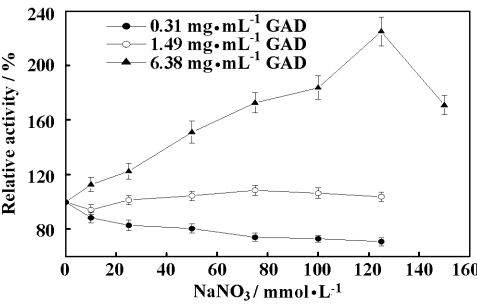


图3 NaNO₃对不同蛋白质浓度的 GAD 活性的影响

Fig. 3 Effect of NaNO₃ on the activity of GAD at various protein concentrations

从图3可见, NaNO₃对不同蛋白浓度的 GAD 的活性影响是不一致的, NaNO₃对低浓度的 GAD 的活性具有抑制作用, 然而随着 GAD 蛋白质浓度的增加, 却对 GAD 活性具有显著的促进作用, 其总的趋势是: 在相同盐浓度下, 随着蛋白质浓度的增加, NaNO₃对 GAD 活性的促进作用越显著.

蛋白质在水溶液中的分散系统是一种胶体系统, 胶体系统稳定的主要条件之一就是: 分散相(酶蛋白)带有同种电荷, 互相排斥, 不易聚集成大

颗粒而沉淀^[16]. 研究表明, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Y-2 GAD 的最适反应 pH 为 4.0, 与 GAD 的等电点 pH 4.2 相近^[10]. 因此当 GAD 在等电点附近, 酶蛋白由于所带电荷减少, 分子容易互相吸引而发生聚集. 随着蛋白质浓度的增高, 酶分子的聚集现象会加剧, 同时反应体系的粘度也会增加, 不利于酶促反应. 当反应体系存在适当浓度的中性盐时, 盐离子可以破坏这些吸引力, 使酶分子散开, 即通过盐溶作用增加 GAD 的溶解性, 同时降低反应体系粘度, 有利于的酶促反应的进行. 因而中性盐对 GAD 活性表现出显著的促进作用.

当 GAD 酶蛋白浓度较低时, 由于蛋白质分子之间因相互吸引发生聚集的作用不显著, 反应体系的粘度也较小, 中性盐对降低酶分子的聚集和体系粘度的影响不大, 因而盐离子对 GAD 活力的影响主要取决于在盐离子是否具有抑制作用. 随着 GAD 酶蛋白浓度的增高, 蛋白质分子之间因相互吸引发生聚集的现象越来越显著, 此时中性盐对降低酶分子的聚集和体系粘度的作用也越来越显著, 即通过盐溶作用对 GAD 反应活性的影响也愈来愈显著. 当通过盐溶作用促进 GAD 酶活力的作用大于盐离子对 GAD 活性的抑制作用时, 则表现为中性盐对 GAD 活性具有促进作用.

此外, 由于 GAD 催化 L-Glu 脱羧生成 γ -氨基丁酸和 CO₂, 盐浓度提高则气体在水中的溶解度降低^[17], CO₂的快速溢出有利于反应体系的传质或减小反应产物的反馈抑制. 随着反应体系酶蛋白浓度的增加, 体系反应加剧, CO₂生成速度加快, CO₂对 GAD 催化反应影响也越来越显著, 盐浓度提高则 CO₂在水中的溶解度降低, CO₂的快速溢出将有利于酶促反应的进行. 因此中性盐对 GAD 活性的影响, 还可能与盐降低了气体的溶解性有关.

综上所述, 中性盐可以通过盐溶作用提高反应体系酶蛋白的胶体系统稳定性, 促进 GAD 活力, 同时一些盐离子对 GAD 活性可能还具有弱抑制作用, 中性盐对 GAD 活性的影响可能是通过这两种途径共同作用和平衡的结果, 同时还可能与中性盐降低了反应体系中 CO₂的溶解度有关.

参考文献:

[1] Sandmeier E, Hale TI, Christen P. *Eur. J. Biochem.* [J], 1994, **221**:997 ~ 1 002
[2] Yang Sheng-yuan (杨胜远), Lu Zhao-xin (陆兆新),

- Lü Feng-xia (吕凤霞), *et al. Food Science* (食品科学) [J], 2005, **26**(9): 546 ~ 551
- [3] Chen Jian-bo (陈建波), Xu Yi (徐毅). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(3): 284 ~ 288
- [4] Yang Sheng-yuan (杨胜远), Lu Zhao-xin (陆兆新), Lü Feng-xia (吕凤霞), *et al. Food Science* (食品科学) [J], 2007, **28**(1): 354 ~ 360
- [5] Foerster C W, Foerster H F. *J. Bacteriol* [J], 1973, **114**: 1 090 ~ 1 098
- [6] Strigáčová J, Chovanec P, Liptaj T, *et al. Arch. Microbiol* [J], 2001, **175**: 32 ~ 40
- [7] Castanie-Cornet M P, Penfound T A, Smith D, *et al. J. Bacteriol* [J], 1999, **181**: 3 525 ~ 3 535
- [8] Sanders J W, Leehouts K, Burghoorn J, *et al. Mol. Microbiol* [J]. 1998, **27**: 299 ~ 310
- [9] Warnecke T, Gill Y T. *Microb. Cell Factories* [J], 2005, **4**(25): 1 ~ 8
- [10] Yang Sheng-yuan (杨胜远). [D], Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2006: 67 ~ 90
- [11] Fonda M L. *Methods Enzymol* [J], 1985, **113**: 11 ~ 16
- [12] Ueno Y, Hayakawa K, Takahash S, *et al. Biosci Biotechnol Biochem* [J], 1997, **61**: 1 168 ~ 1 171
- [13] Rossetti V, Lombard A. *J. Chromatogr. B* [J], 1996, **681**: 63 ~ 67
- [14] Li Jian-wu (李建武), Xiao Neng-geng (萧能庚), Yu Rui-yuan (余瑞元). Beijing: Beijing University Press (北京大学出版社) [M], 2000. 174 ~ 176
- [15] HiPreP 16/10 Phenyl F F (high sub), HiPreP 16/10 Phenyl FF (low sub), HiPreP 16/10 Butyl FF and HiPreP 16/10 Octyl FF instruction [R]. Amersham Biosciences
- [16] Shen Tong (沈同), Wang Jing-yan (王镜岩). Beijing: Higher Education Press, 2nd Edition (北京: 高等教育出版社, 第二版) [M], 2002. 207 ~ 208
- [17] Fu Xiao-tai (付晓泰), Wang Zhen-ping (王振平), Lu Shuang-Fang (卢双舫). *Science in China (Series B)* (中国科学 < B 辑 >) [J], 1996, **26**(2): 124 ~ 130

Mechanism of the Effects of Neutral Salts on Glutamate Decarboxylase Activity

YANG Sheng-yuan^{1,2}, LU Zhao-xin¹, LÜ Feng-xia¹, BIE Xiao-mei¹, JIAO Yang¹, SUN Li-jun¹

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

2. Biology Department, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

Abstract: The mechanism of the effects of neutral salts on the activity of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* glutamate decarboxylase (GAD) was discussed. Through the investigations of various cations and anions on GAD activity, and the effects of NaNO₃ on GAD activity at various protein concentrations respectively, it was found that the activation of neutral salts on GAD activity was the results of co-actions of weak inhibition and increasing the colloidal system's stability of GAD rather than the increase of hydrophobic interaction between subunits of GAD. Besides, the activation of neutral salts on GAD activity, to a degree, might be owed to the reduction of CO₂ solubility by salts.

Key words: Glutamate decarboxylase; *Streptococcus salivarius* subsp; *Thermophilus*; Salt; Mechanism; Hydrophobic interaction