

# 一株高产谷氨酰胺酶菌株的鉴定和酶活特性的研究

韩铭海, 赵娟娟, 华盛龙, 杨 晔, 汤 姣, 姚 婷

(淮阴师范学院生物系, 江苏 淮安 223300)

**摘要:**对筛选得到一株高产谷氨酰胺酶菌株进行了初步鉴定并对酶活特性做了研究。通过生理生化实验并结合菌体形态特性, 结果发现该菌株可以确定该菌属于柠檬酸细菌属(*Citrobacter*)。通过单因素试验, 考察了温度、pH、NaCl 和产物谷氨酸对该菌株产生的谷氨酰胺酶的影响。结果发现菌株产生的谷氨酰胺酶的最佳反应 pH 为 6.2, 酶最适反应温度为 50℃。酶最稳定的 pH 为 6.2, 温度低于 40℃, 酶具有较高的稳定性。高浓度的 NaCl 对谷氨酰胺酶活性基本无影响, 谷氨酸对酶也没有明显的抑制作用。

**关键词:**谷氨酰胺酶; 酱油; 柠檬酸细菌; 鉴定

**中图分类号:** TQ925 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2008)06-1037-04

## Identification of A Strain with High Ability of Producing Glutaminase and Study of Enzymatic Characterization

HAN Ming-hai, ZHAO Juan-juan, HUA Sheng-long, YANG Ye, TANG Jiao, YAO Ting

(Department of Biology, Huaiying Teachers College, Huaian 223300, Jiangsu, China)

**Abstract:** In the paper, a strain with high ability of producing glutaminase was identified and enzymatic characterization of glutaminase was studied. According to morphology, physiological and biochemical characteristics, it can be roughly concluded that the strain belongs to *Citrobacter*. The relationship between pH, temperature, NaCl, glutamic acid and glutaminase was studied. The optimum temperature and pH of glutaminase from the strain was 50℃ and 6.2, respectively. When pH was 6.2 and temperature below 40℃, the enzyme showed high thermal stability. High concentration of NaCl didn't have negative influence on enzyme activity and glutamic acid didn't pose considerable inhibition to glutaminase.

**Key words:** Glutaminase; Soy sauce; *Citrobacter* sp.; Identification

酿造酱油的主要原料大豆蛋白经微生物酶解之后形成各种氨基酸, 是酱油呈鲜味的主要原因, 而各种氨基酸中, 谷氨酸的含量更为重要<sup>[1]</sup>。据日本中台等报道, 原料中所含有的谷氨酸有 46% 左右是作为谷氨酰胺存在的, 后者需经谷氨酰胺酶水解能成为谷氨酸<sup>[2]</sup>。但就目前酱油生产使用的曲霉菌而言, 无论是采用固体制曲还是液体培养, 它们产生的谷氨酰胺的酶活力都很低。这与菌种本身的生理特性有关, 同时还有培养条件有关, 谷氨酰胺酶的产酶条件为 25℃ 培养 30 h 以上, 而这与目前国内的酱油生产工艺是矛盾的。为此, 日本利用枯草杆菌开发了一种适合酱油生产的谷氨酰胺酶来提高酱油的鲜味, 得到了比较好的效果<sup>[3]</sup>。

另外, 脱酰胺化改性作用不仅能增加酿造酱油的原料一大豆蛋白水解产物的可溶性钙结合量, 还

能提高其对胃蛋白酶消化的抑制能力, 以及提高大豆蛋白水解产物对钙与磷酸盐形成不溶性化合物的抑制能力<sup>[4]</sup>。所以开发高效、适合应用于酱油酿造行业的谷氨酰胺酶具有一定的实际意义。就筛选得到的一株高产谷氨酰胺酶菌株做初步的鉴定, 同时做了关于酶活特性研究, 为该酶能应用于酱油酿造和其它相关行业提供有一定参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种 由作者所在实验室筛选得到。

1.1.2 仪器和药品 I<sub>2</sub>、α-萘胺(上海泗联化工厂), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、番红花红、溴甲酚紫、无水对氨基苯磺酸(中国上海试剂三厂)肌酸、对二甲基氨基苯甲醛、丙烯酰胺、谷氨酰胺、氯化汞、锌粉、HgCl<sub>2</sub>、KI(国药

集团化学试剂有限公司),甲酰胺、乙酰胺、丙酰胺、丁酰胺(响水县现代化工有限责任公司)。仪器:PHS-3C型pH计(上海三信仪表厂),722N型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株生理生化鉴定 按相关手册文献进行<sup>[5-6]</sup>。

1.2.2 培养基及培养条件 培养基:谷氨酸1.5%,磷酸二氢钾0.05%,硫酸酶0.01%,蛋白胨1%,牛肉膏0.5%,用氨水调pH至7.5。培养条件:用250 mL的三角瓶装50 mL的培养基,旋转式摇床转速180 r·min<sup>-1</sup>,温度37℃,培养16 h。

1.2.2 谷氨酰胺酶活力测定 酶活力的定义:在37℃,pH为6.0条件下每小时催化谷氨酰胺产生1 μmol NH<sub>3</sub>定义为一个酶活力单位。谷氨酰胺酶活

力测定:取发酵液3 mL,3000 r·min<sup>-1</sup>离心20 h,弃除上清液,加入3 mL生理盐水,充分混合,取出0.5 mL加入pH为6.0的1%谷氨酰胺溶液8 mL,混合使菌体悬浮,再加入pH 6.0磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液2 mL,37℃保温1 h。氨浓度的测定:利用奈氏试剂法测定水解谷氨酰胺生成的氨<sup>[7]</sup>。

2 结果和讨论

2.1 菌株生理生化实验鉴定结果

另外,通过对菌体染色和镜检发现:该菌株在幼龄时期为杆菌,呈直杆形或球杆形,大小约为1.0 μm × (1 ~ 1.5) μm。革兰氏染色阴性,有鞭毛,不形成芽孢。根据表1结果,结合菌体形态特性,参照相关文献<sup>[5-6]</sup>,可以确定该菌株属于柠檬酸细菌属。

表1 菌株生理生化实验结果

Table 1 The results of physiological and biochemical reaction

项目 Characteristics	过氧化氢酶 Catalase activity	葡萄糖的氧化发酵 Glucose utilization	糖类发酵 Saccharide fermentation	甲基红 试验 Methyl red test	V·P 试验 V·P test	明胶水解 Gelatin liquefaction
结果 Results	+	发酵型产酸 Producing acid by fermentation	产酸,不产气 Acid without gas	+	-	-

项目 Characteristics	亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	丙撑二醇 Propylene glycol	产氨 Ammonia production	利用肌醇 Inositol utilization	吡啶 Indole production	硫化氢 H <sub>2</sub> S production	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase
结果 Results	-	+	+	-	-	+	-

项目 Characteristics	DNA 酶 Deoxyribonuclease	脂肪酶 Lipase	硝酸盐还原 Nitrate reduction	三糖铁琼脂 Triple sugar iron agar test	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase
结果 Results	-	-	+	+	+	-

2.2 pH 与谷氨酰胺酶活力关系

利用5% NaOH 溶液调节谷氨酰胺底物溶液至不同pH,并且使用相应pH的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液来控制酶活测定过程的pH,pH对酶活力的影响结果如图1所示。在pH 6.2附近,表现出较好的酶活力。在pH小于5.8或大于6.8时,酶活力明显下降。说明,要使该酶表现出较好的酶活力,控制pH比较重要。

2.3 pH 与谷氨酰胺酶稳定性的关系

取3 mL 发酵液3 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,弃上清液,再向离心管中加入不同pH的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液10 mL,混合后移入带塞试管中,在40℃和50℃的水浴锅中保温24 h后取样检测残余

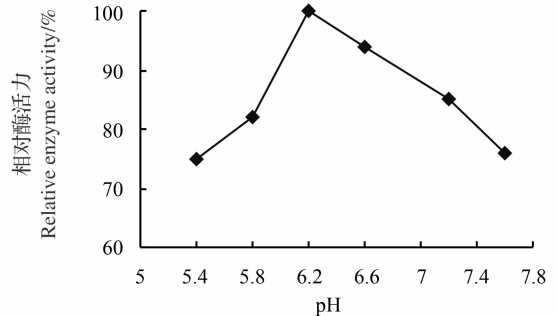


图1 pH 与酶活力的关系

Fig. 1 The relationship between pH and activity of glutaminase

的酶活力。结果如图2所示,在温度低于40℃条件

下,该酶稳定 pH 范围较宽:pH 5.8~6.6。如果催化过程的温度高于 50℃,酶稳定 pH 范围较窄,催化过程的 pH 要严格控制在 6.2,以免酶蛋白失活现象严重。

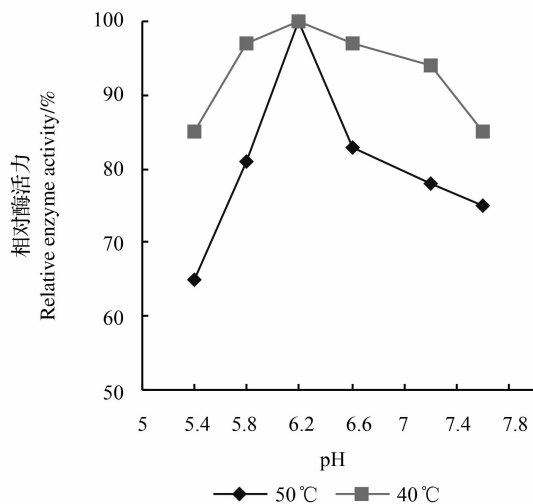


图2 pH 和酶稳定性的关系

Fig. 2 The relationship between pH and stability of glutaminase

## 2.4 温度对谷氨酰胺活力的影响

按照 1.2.3 的操作,反应体系在不同温度下保温 1 h,测定细胞的酶活力,结果如图 3 所示,谷氨酰胺酶在 45~55℃ 范围内,表现出了较高的酶活力。最适反应温度为 50℃。

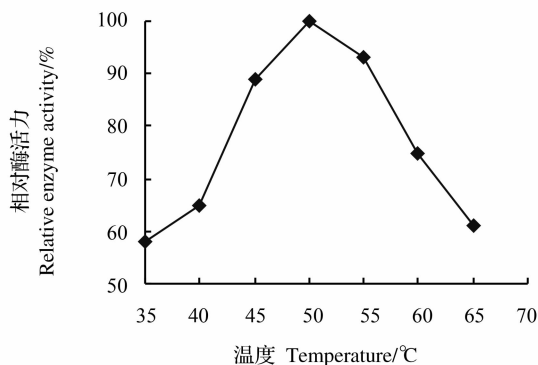


图3 温度与酶活力的关系

Fig. 3 The relationship between temperature and activity of glutaminase

## 2.5 谷氨酰胺酶的热稳定性

取 3 mL 发酵液  $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,弃上清液,再向离心管中加入 pH 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 10 mL,混合后移入带塞试管中,在一定的温度的水浴锅中保温,定时取样检测残余的酶

活力。结果如图 4 所示。当谷氨酰胺酶在温度超过 50℃ 的环境中持续保温 24 h 以上,酶的失活严重。如果酶催化过程持续时间较长,那么催化过程的温度最好控制在 40℃ 以下,否则就要考虑到酶蛋白严重热失活的因素。

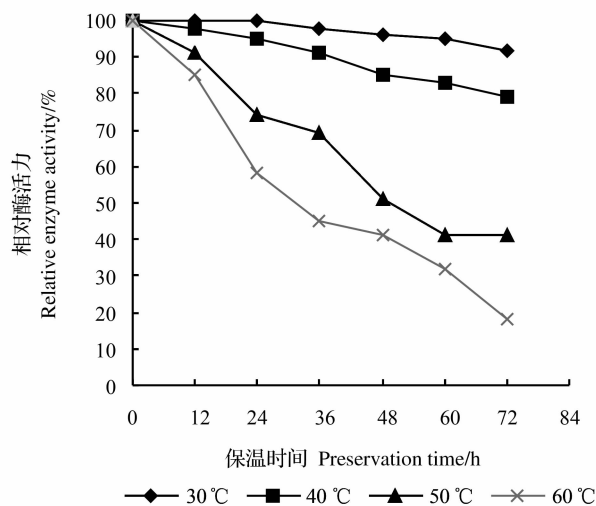


图4 谷氨酰胺酶的热稳定性

Fig. 4 Thermostabilization of glutaminase

## 2.6 NaCl 浓度对谷氨酰胺酶活力的影响

利用含有不同浓度 NaCl 的 1% 谷氨酰胺底物反应溶液,测定谷氨酰胺酶活力,其它条件同 1.2.3,结果如图 5 所示,谷氨酰胺酶对 NaCl 有相当的耐性。NaCl 对谷氨酰胺酶活性基本无影响,这对于应用于酿造来说,是很有必要的。

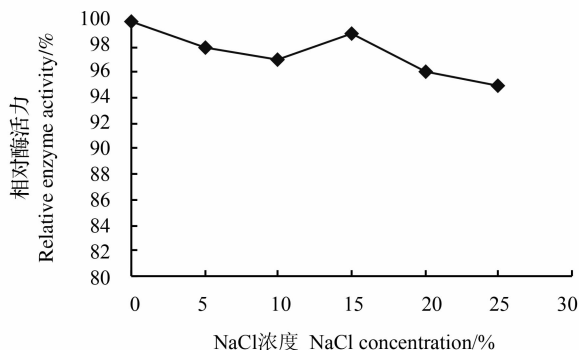


图5 NaCl 浓度与酶活力的关系

Fig. 5 The relationship between NaCl and activity of glutaminase

## 2.7 谷氨酰胺酶的底物专一性

以 1% 的 7 种不同的酰胺类物质作为底物溶液来测定谷氨酰胺酶,其它条件同 1.2.3。结果如表 2,仅谷氨酰胺和天冬酰胺有酶活性。

表2 谷氨酰胺酶的底物专一性  
Table 2 Substrate specificity of glutaminase

底物 Substrate	谷氨酰胺 Glutamine	天冬酰胺 Asparagine	甲酰胺 Formamide	乙酰胺 Acetamide	丙酰胺 Propionamide	丁酰胺 Butyrylamide	丙烯酰胺 Acrylamide
酶活力 Enzyme activity/ $U \cdot mL^{-1}$	356	289	1.5	0	0	0.5	1.1

2.8 谷氨酸对谷氨酰胺酶的抑制作用

大豆蛋白水解产生丰富的氨基酸,谷氨酸的存在是否会抑制谷氨酰胺酶的作用是研究者一个关心的问题。为此,研究谷氨酸对谷氨酰胺酶的抑制作用。配置含1%的谷氨酰胺和不同浓度的谷氨酸钠的反应混合液,用5% NaOH 调节混合液的 pH 值为6.2,其它条件同1.2.3。结果如表3。谷氨酸的浓度小于 $40 g \cdot L^{-1}$ 时,没有明显的抑制谷氨酰胺酶抑制作用。

表3 谷氨酸对谷氨酰胺酶的抑制作用

Table 3 Inhibition of glutamic acid to glutaminase

谷氨酸浓度 Concentration of glutamic acid/ $g \cdot L^{-1}$	0	10	20	30	40
相对酶活力 Relative enzyme activity/%	100	98	98	96	95

3 结论

通过对菌株染色和镜检发现:该菌株在幼龄时期为杆菌,呈直杆形或球杆形,大小约为 $1.0 \mu m \times (1 \sim 1.5) \mu m$ 。革兰氏染色阴性,有鞭毛,不形成芽孢。根据生理生化试验结果,结合菌体形态特性,参照相关文献<sup>[5-6]</sup>,可以确定该菌株属于柠檬酸细菌属。

菌株产生的谷氨酰胺酶的最佳反应 pH 为6.2。在 pH 小于5.8或大于6.8时,酶活力明显下降。在温度低于 $40^{\circ}C$ 条件下,该酶稳定 pH 范围较宽:pH5.8~6.6。如果催化过程的温度高于 $50^{\circ}C$ ,酶稳定 pH 范围较窄。谷氨酰胺酶在 $45 \sim 55^{\circ}C$ 范围内,表现出了较高的酶活力。当谷氨酰胺酶在温度超过 $50^{\circ}C$ 的环境中持续保温24 h以上,酶的失活严重。如果酶催化过程持续时间较长,那么催化过程的温度最好控制在 $40^{\circ}C$ 以下,否则就要考虑到酶蛋白严

重热失活的因素。谷氨酰胺酶对 NaCl 有相当的耐性。在常见的7种酰胺类物质中,谷氨酰胺酶仅对谷氨酰胺和天冬酰胺有酶活性。谷氨酸的浓度小于 $40 g \cdot L^{-1}$ 时,没有明显的抑制谷氨酰胺酶抑制作用。

参考文献

[1] 陈陶声,林祖申. 酱油及酱类的酿造[M]. 北京:化学工业出版社,1991;5-6. (Chen T S, Lin Z S. Brewing of soy sauce and jam [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1991; 5-6.)

[2] 陈红玲. 谷氨酰胺酶高产菌沪酿3.422米曲霉的育种[J]. 中国酿造,1990(3):30-40. (Cheng H L. Breeding of *Aspergillus oryzae* hunian 3.422 with high ability of producing glutaminase [J]. China Brewing, 1990(3):30-40.)

[3] 康维民,刘绍军,常学东,等. 一种新型谷氨酰胺酶在酱油酿造中的作用[J]. 中国调味品,2003(4):33-35. (Kang W M, Liu S J, Chang X D, et al. Application of a new type of glutaminase in bean sauce brewing [J]. China Condiment, 2003(4):33-35.)

[4] 包小兰,郭顺堂,焉华娟,等. 脱酰胺化对大豆蛋白水解物可溶性钙结合量的影响[J]. 农产品加工·学刊,2006(8):63-66. (Bao X L, Guo S T, Yan H J, et al. Effect of deamidation of soybean protein hydrolysates on amount of soluble bound calcium [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2006(8):63-66.)

[5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001;66-92. (Dong X Z, Cai M Y. Manual for identification of common bacterium [M]. Beijing: Science Press, 2001; 66-92.)

[6] R·E·布坎南, N·E·古本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984;382-462. (R·E·Buchanan, N·E·Gibbons. Bergey manual of identification of bacterium [M]. Beijing: Science Press, 1984; 382-462.)

[7] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版)北京:中国环境科学出版社,2002:279-281. (Editorial Committee of Method for Monitoring and Analyzing of Water and Waste Water, Administration of Environmental Protection of the People's Republic of China. Method for monitoring and analyzing of water and waste water [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002; 279-281.)