

# L-赖氨酸脱羧酶活力测定方法的研究

乔长晟<sup>1</sup>, 林青<sup>1</sup>, 张娟琨<sup>1</sup>, 白云宗<sup>2</sup>, 卢进军<sup>2</sup>

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457)

**摘要:**以蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)为基础,进行L-赖氨酸脱羧酶活力的研究。对酶活测定过程中影响酶活力的三个主要因素:生物量,转化时间和初始底物浓度进行了选择和优化。最终确定了一种较为简便的L-赖氨酸脱羧酶活力的测定方法,即:调整发酵液的初始OD<sub>620</sub>=6(稀释10倍),补加200 g/L的L-赖氨酸母液至20 g/L,35℃静置转化3 h,测定L-赖氨酸的消耗量。酶活定义为:在35℃下,在1 min内能转化1 μg L-赖氨酸的酶量为1个活力单位。本方法操作简单,无污染,且检测结果准确可靠(r=0.9901),稳定性良好(RSD=5.07%)。

**关键词:**蜂房哈夫尼菌;L-赖氨酸脱羧酶;尸胺;酶活

文章编号:1673-9078(2013)1-189-192

## A Method for Assay of the Activity of L-lysine Decarboxylase

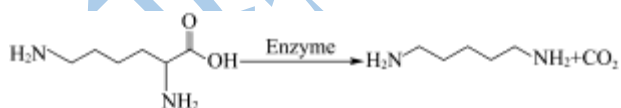
QIAO Chang-sheng<sup>1</sup>, LIN Qing<sup>1</sup>, ZHANG Juan-kun<sup>1</sup>, BAI Yun-zong<sup>2</sup>, LU Jin-jun<sup>2</sup>

(1.Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of science and technology, Tianjin 300457, China) (2.Tianjin Peiyang Biotrans Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The activity of L-lysine decarboxylase was investigated based on *Hafnia alvei*. Three primary factors that affect the enzyme activity during the assay, i.e. biomass, catalysis time and initial substrate concentration, were chosen and optimized. At last a relatively convenient assay method was determined to assess the activity of L-lysine decarboxylase: adjusting the Optical Density (OD<sub>620</sub>) of the initial fermentation as 6(diluted 10-fold), and then adding 200 g/L L-lysine to it until its final concentration reached 20 g/L. After incubation at 35℃ for 3 hours without shaking, the consumption of the substrate was monitored. One enzyme activity unit is defined as the enzyme amount needed to catalyze 1 μg L-Lysine in 1 min at 35℃. This method was simple and non-polluting. Test results was accurate and reliable (r=0.9901), good stability (RSD=5.07%).

**Key words:** *Hafnia alvei*; L-lysine decarboxylase; cadaverine; activity

L-赖氨酸脱羧酶(L-lysine decarboxylase EC 4.1.1.18)是生物体内高度专一性的诱导性胞内酶,需要磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate)作为辅酶促进脱羧反应<sup>[1]</sup>,催化L-赖氨酸脱羧生成尸胺(1,5-戊二胺)和二氧化碳,其反应式如下:



该酶主要存在于大肠杆菌<sup>[2]</sup>、尸杆菌<sup>[3]</sup>、蜂房哈夫尼菌<sup>[4]</sup>等大多数微生物中。近年来,因其在化工行业,医药行业和生物基化学品行业等方面有较大的开发价值而引起科研工作者的广泛关注,并对其进行了相关研究<sup>[5-7]</sup>。

目前,该酶的检测方法有微量检压法、分光光度

收稿日期:2012-08-30

作者简介:乔长晟(1969-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向:生物化工

法和纸层析法<sup>[5]</sup>等。其中最常用的方法为微量检压法和分光光度法。微量检压法<sup>[6]</sup>使用的主要仪器为华勃氏呼吸仪,又称瓦氏呼吸计,基本原理是在一个密闭的、定温定体积的系统中进行气体变化的测定。当气体被吸收时,气体分子减少,则压力降低。相反,当产生气体时,则压力上升。此压力的变化可以在测压计上表现出来。由此,可计算产生气体的数量,即脱羧产生的CO<sub>2</sub>的量。该方法需要精确控制,操作复杂,实验误差较大。分光光度法<sup>[9]</sup>是根据尸胺与2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)反应的产物溶于甲苯,而赖氨酸所形成的化合物不溶于甲苯的原理设计的。用甲苯将尸胺与TNBS反应的产物萃取出来,在340 nm下测定吸收值。然后和标准曲线对照,求出尸胺的浓度。该方法费时费力,且需要有机溶剂的萃取,毒性较大,不利于安全。

本文以蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)为基础,考察了测定酶活的条件及参数,确定了一种新的较为简

便、准确的测定方法。该方法以特定条件下 L-赖氨酸的消耗量来表征酶活,既避免了华勃氏呼吸仪繁琐的操作,减小了实验误差,又避免了有机溶剂萃取等毒性较大的步骤,有利于实验环境及人员的安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌种

蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei* AS 1.1009), 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供。

#### 1.1.2 仪器

SBA-40C 型生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; 752 型紫外可见分光光度计, 天津市拓普仪器有限公司。

#### 1.1.3 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉浸膏 5, NaCl 5, 玉米浆 5, pH=7.2。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 玉米浆 20, 酵母膏 5, 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 硫酸铵 2, 维生素 B<sub>6</sub> 1, pH=7.0。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌体培养

在斜面取 1 环菌接入装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 35 °C, 170 r/min 震荡培养 12 h。以 5% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 菌体生长阶段: 35 °C, 旋转式摇床 170 rpm 振荡培养 12 h; 诱导阶段: pH 调至 5.5<sup>[10]</sup>, 35 °C 静置培养 7 h。

#### 1.2.2 生物量的测定方法

采用比浊法测定菌液的 OD<sub>620</sub> 值。由于分光光度计线性范围的限制, 将待测样品用蒸馏水稀释一定倍数, 以提高结果的准确性。

#### 1.2.3 转化的方法

为使实验简便, 采用直接转化的方法。菌体培养

12 h 后, 用 6 M 的 HCl 调节 pH 至 5.5, 加入一定体积准备好的 L-Lys 母液, 35 °C 静置。

#### 1.2.4 酶活测定过程及关键参数的选择

收集待测菌液, 调整菌液的吸光度值 (稀释 10 倍), 使其在 620 nm 下的吸光度为一定值。吸取该调整后的菌液 20 mL 至一个 100 mL 的三角瓶中, 加入 L-赖氨酸母液, 使反应体系中 L-赖氨酸的终浓度为一定值, 35 °C 静置转化一段时间。取 5 mL 反应后的转化液, 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清。吸取 1 mL 该上清稀释至适宜倍数。用生物传感分析仪测定 L-赖氨酸的浓度。

#### 1.2.5 Lys 母液的配制方法

称取 200 g L-赖氨酸, 用容量瓶定容至 1 L, 调节 pH 至 5.5, 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

#### 1.2.6 HPLC 检测尸胺的方法

取 1 mL 待测样品溶液于 5 mL 容量瓶中, 依次加入 100 μL 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 300 μL 饱和碳酸氢钠溶液和 2 mL 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液, 盖塞, 于 40 °C 避光反应 45 min。反应完毕后, 加入 100 μL 氨水, 静置 30 min, 用乙腈定容至刻度, 振荡混匀, 取适量的溶液通过滤膜后, HPLC 测定<sup>[11-15]</sup>。

色谱柱: C<sub>18</sub> 反相色谱柱 (250×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 乙腈: 0.1 mol/L 乙酸铵=80:20 (V/V), 流速: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同浓度 L-赖氨酸对转化的影响

L-赖氨酸作为酶促反应的底物, 其浓度直接影响反应的速率。当 L-赖氨酸浓度较低时, 反应速率随 L-赖氨酸浓度的增加而增加, 继续增加 L-赖氨酸的浓度, 反应速率增加的幅度会不断减小, 直至酶被底物饱和。酶活测定过程中应选择最适的底物浓度, 以保证酶促反应速率的恒定。

表 1 不同浓度 L-赖氨酸对转化的影响

Table 1 The influences of different concentrations of L-lysine on catalysis

编号	pH	残余 L-Lys/(g/L)	残糖/(g/L)	L-Lys 实际添加量/(g/L)	理论尸胺产量/(g/L)	实际尸胺产量/(g/L)	产率/%	RSD/%
5	6.93	0.1	0.2	4.5625	3.19	3.11	97.49	1.34
10	7.55	0.2	0.2	9.1250	6.38	6.09	95.45	1.59
15	7.86	0.75	0.25	13.6875	9.57	9.10	95.09	2.88
20	7.97	1.5	0.25	18.2500	12.75	11.12	87.22	1.19
25	8.00	3.25	0.25	22.8125	15.94	13.27	83.25	2.33
30	8.02	5.25	0.25	27.3750	19.31	15.15	78.46	2.05

实验中把培养 12 h 后的种子, 接入 6 瓶发酵培养基中, 继续培养 12 h 后, 依次添加 L-赖氨酸母液至

L-赖氨酸的终浓度为 5、10、15、20、25、30 g/L, 35 °C 静置培养 7 h, 诱导转化结束时各瓶指标如下表 1。

由表 1 得到, 5~30 g/L 浓度梯度下, L-赖氨酸消耗越多, pH 越大, 且产量逐渐增大, 产率逐渐降低。在 20, 25, 30 g/L 浓度下有部分 L-赖氨酸残留, 而且初始浓度越大残留越多。由此可知, 在不控制 pH 的情况下, 20~30 g/L 的 L-赖氨酸足够保证脱羧反应的进行。

## 2.2 酶活测定过程中关键参数的选择

### 2.2.1 生物量对酶活测定的影响

L-赖氨酸脱羧酶是胞内酶, 因此酶量和生物量直接相关, 生物量越大, 则脱羧反应进行的越快。考虑到实际检测中待测样品所能达到的生物量, 本文选取  $OD_{620}=2\sim7$  进行研究。取 35 °C, 170 rpm 培养 12 h 的发酵液, 混合到 500 mL 的三角瓶中, 分成 5 份, 分别加入灭菌后的蒸馏水 (pH=5.5), 调整  $OD_{620}$  到 2、3、4、5、6 (稀释 10 倍)。各吸取调整后的发酵液 20 mL, 加入 L-赖氨酸母液至终浓度 30 g/L。35 °C 静置 7 h, 结果如下图 1。

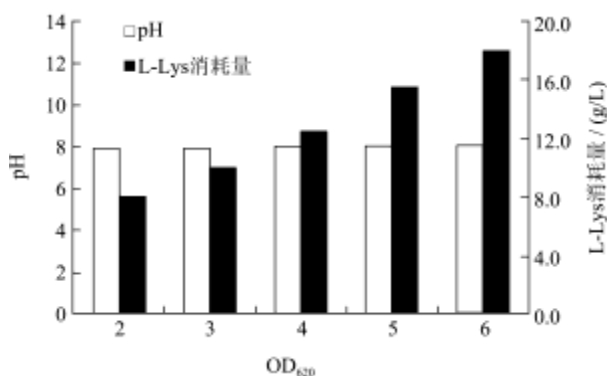


图 1 生物量对酶活测定的影响

Fig.1 The influence of biomass on the enzyme activity assay

由图 1 可以看出, 随着生物量的增加, 转化液的 pH 稍有升高, 但 L-赖氨酸的消耗量显著增加。为减小实验误差, 提高结果的准确性, 选定  $OD=6.0$  作为测定酶活力时的生物量。

### 2.2.2 反应时间对酶活测定的影响

反应时间是酶活测定过程中的关键因素, 随着反应时间的延长, 底物的浓度逐渐降低, 酶的活力也会出现变化。本实验跟踪了整个酶促反应的进程, 以确定最佳的反应时间。按上述方法培养菌体, 取培养好的菌液, 加入灭菌后的蒸馏水 (pH=5.5) 调整  $OD_{620}=6$  (稀释 10 倍), 吸取调整后的发酵液 20 mL, 加入 L-赖氨酸母液至终浓度 30 g/L。35 °C 静置 7 h。从第 0 小时开始, 每间隔 1 h 取一次样, 测定反应液的 pH 和 L-赖氨酸浓度, 结果如下图 2。

由图 2 可以看出, 反应时间越长, 底物的消耗量越多。在 0~7 h 范围内, 反应液的 pH 稍有升高, 残余 L-赖氨酸逐渐减少。从第 3 小时开始, 赖氨酸的消

耗速率逐渐减小, 说明脱羧的速率逐渐较小, 酶活开始下降或底物浓度不能饱和酶促反应。因此酶活测定过程中, 选定 3 h 为反应时间。

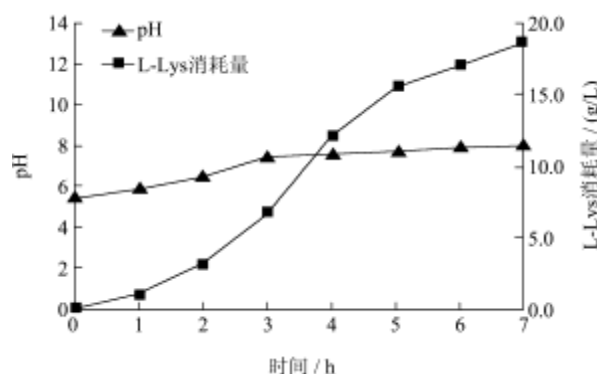


图 2 反应时间对酶活测定的影响

Fig.2 The influence of catalysis time on the enzyme activity assay

### 2.2.3 底物浓度对酶活测定的影响

本实验进一步确定了酶促反应的底物浓度。按上述方法培养菌体, 取培养好的菌液, 加入灭菌后的蒸馏水 (pH=5.5) 调整  $OD_{620}=6$  (稀释 10 倍), 分别吸取调整后的发酵液 20 mL, 加入 L-赖氨酸母液至终浓度 20 g/L、25 g/L 和 30 g/L, 35 °C 静置 3 h 后, 结果如下图 3。

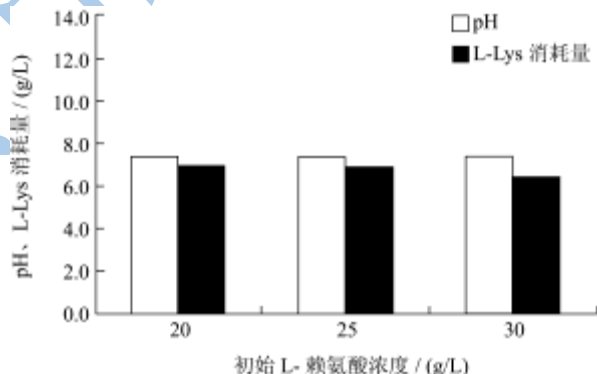


图 3 底物浓度对酶活测定的影响

Fig.3 The influence of substrate concentration on the enzyme activity assay

由图 3 可以看出, 在 20、25、30 g/L 三个底物浓度下, 反应体系的 pH 和 L-赖氨酸的消耗量没有明显的差别。20 g/L 的底物浓度即可保证酶活测定过程中反应速率的恒定。因此, 在测定酶活时选用 20 g/L 最为初始底物浓度。

## 2.3 准确性研究

为了考察本方法的准确性, 把本方法的实验结果与另一种相对准确的 HPLC 检测尸胺测定酶活的方法进行比较。按 1.2.6 的方法, 以 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 g/L 的尸胺绘制标准曲线, 如下图 4。



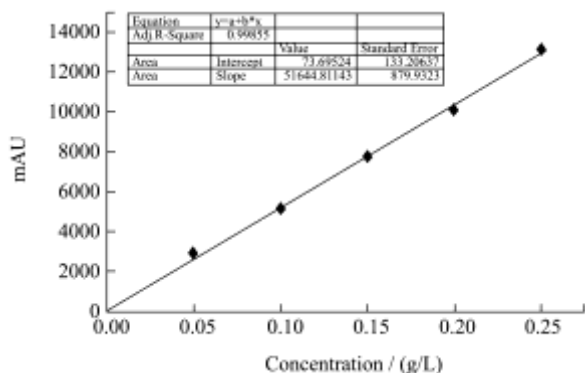


图4 尸胺的标准曲线

Fig.4 Standard curve of cadaverine

对实验中所得的样品,按上述优化后的方法,即:调整发酵液的初始 $OD_{620}=6$ (稀释10倍),补加L-赖

氨酸母液至20 g/L, 35 °C静置转化3 h。用生物传感分析仪测定L-赖氨酸的消耗量,同时用高效液相色谱法(HPLC)测定生成尸胺的量,两种方法都换算成L-赖氨酸的消耗量来计算酶活。进行6次平行实验,结果如下表2。

由表2可知,两种方法检测酶活的结果基本相同。生物传感仪测得的L-Lys消耗量与HPLC测得的尸胺产量两组数据之间的相关系数 $r=0.9901$ ,相关性很好。说明用本方法与HPLC检测尸胺来表征酶活的方法结果一致,准确性良好。

2.4 稳定性研究

由表2,本方法测得的6次平行数据之间的相对标准偏差为5.07%,说明本方法可行,稳定性良好。

表2 平行实验结果

Table 2 The results of control experiments

编号	1	2	3	4	5	6	RSD	相关系数
L-Lys/(g/L)	7	7.5	7	7.5	7.5	8	5.07%	0.9901
酶活/U	129.63	138.89	129.63	138.89	138.89	148.15		
尸胺/(g/L)	4.75	5.08	4.82	5.14	5.16	5.44	4.95%	
酶活/U	125.86	134.60	127.71	136.19	136.72	144.14		

3 结论

本文以蜂房哈夫尼菌为基础,进行L-赖氨酸脱羧酶活力的研究。对测定过程中影响酶活的三个主要因素:生物量,转化时间和初始底物浓度进行了选择和优化。最终确定了一种较为简便的L-赖氨酸脱羧酶活力的测定方法,即:调整发酵液的初始 $OD=6$ ,补加200 g/L的L-赖氨酸母液至20 g/L,35 °C静置转化3 h,通过测定赖氨酸的残余量来表征酶活。该方法操作简单,无毒无害,且结果准确,稳定性良好。

参考文献

[1] Khilnani V, Chandalia SB. Selective Hydrogenation. II. *m*-Dinitrobenzene To *m*-Nitroaniline Using Palladium on Carbon As Catalyst [J]. *Org Process Res.*, 2001, 5: 263-266

[2] Sabo DL, Boeler EA, Byers E, et al. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase [J]. *Biochemistry*, 1974, 13(4): 662-670

[3] Meng SY, Bennett GN. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH [J]. *Bacteriol*, 1992, 174: 2659-2669

[4] Fecker LF, Beier H, Berlin J. Cloning and characterization of a lysine decarboxylase gene from *Hafnia alvei* [J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 203: 177-184

[5] 蒋丽丽,吴晓燕,刘毅,等.赖氨酸脱羧酶发酵工艺及其酶学

性质[J].*精细化工*,2006,23(11):1060-1067

[6] 朱婧,杜连祥,路福平,等.诱导蜂房哈夫尼菌产L-赖氨酸脱羧酶条件的研究[J].*工业微生物*,2009,39(3):1-5

[7] 朱婧.微生物转化L-赖氨酸为尸胺的研究[D].天津:天津科技大学,2009

[8] Gale EF. The bacterial amino acid decarboxylases [J]. *Adv in Enzymol.*, 1946, 6: 1-32

[9] Phan APH, Ngo TT, et al. Spectrophotometric assay for lysine decarboxylase [J].*Analytical Biochemistry*, 1982, 120: 193-197

[10] Kikuchi Y, Kojima H, Tanaka T, et al. Characterization of a Second Lysine Decarboxylase Isolated from *Escherichia coli* [J]. *Bacteriol*, 1997, 179: 4486-4492

[11] 董伟峰,李宪臻,林维宣.丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生试剂衍生化条件的研究[J].*大连轻工业学院学报*,2005,24(2): 115-118

[12] 邢丽红,冷凯亮,等.高效液相色谱-紫外检测法测定水产品中组胺的含量[J].*安徽农业科学*,2011,39(13):7832-7834

[13] 丁卓平,刘辰麒,等.高效液相色谱法同时测定水产品中10种生物胺的研究[J].*分析测试学报*,2006,25(4):59-62

[14] 赵中辉,林洪,徐杰.高效液相色谱法检测牙鲆体内的生物胺[J].*现代食品科技*,2011,27(2):228-231

[15] 邹阳,赵谋明,赵海峰.高效液相色谱法同时测定酱油中的8种生物胺[J].*现代食品科技*,2012,28(5):570-573