

禾本科植物内生固氮菌产 γ -氨基丁酸特性

蔡锦标¹, 彭桂香², 谭志远¹

(1 广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用纸层析法与紫外分光光度法,对来源于禾本科植物的 64 株内生固氮菌产 γ -氨基丁酸的特性进行分析鉴定. 筛选到 3 株 γ -氨基丁酸产量较高的内生固氮菌: Y28 ($0.754 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Y21 ($0.597 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、W3 ($0.539 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). 菌株 Y28 的产量比国内同行研究者初筛选到的产 γ -氨基丁酸菌的产量 ($0.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 都要高, 兼具固氮活性, 具有很高的研究及应用价值.

关键词: γ -氨基丁酸; 内生固氮菌; 纸层析

中图分类号: Q939.113

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0059-04

The Ability of γ -Aminobutyric Acid Produced by Endophytic Diazotrophs from Gramineae

CAI Jin-biao¹, PENG Gui-xiang², TAN Zhi-yuan¹

(1 Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The gamma-aminobutyric acid production ability of sixty-four endophytic diazotrophs from Gramineae were tested by paper chromatography and ultraviolet spectrophotometer. Strains Y28, Y21 and W3 can produce the gamma-aminobutyric acid (0.754 ± 0.004), (0.597 ± 0.001) and (0.539 ± 0.002) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Diazotrophic strain Y28 can produce the highest gamma-aminobutyric acid than that of known description and may be potential application.

Key words: gamma-aminobutyric acid; endophytic diazotrophs; paper chromatography

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)是一种非蛋白质氨基酸,广泛存在于动植物以及人体内^[1]. 在人以及动物生理作用上, γ -氨基丁酸具有降低血压,治疗癫痫,抗衰老,抗心率失常,调节呼吸系统、生殖生理以及血糖与胰岛素,促进睡眠,增强记忆力等作用^[2-5]. 而在植物的生理生化上, γ -氨基丁酸同样具有重要的作用,它能够调节植物体 pH,在逆境条件下回补植物体的相关代谢,进行植物防御,促进植物体内氮储备,调节渗透压,调节生长发育,进

行植物防御,诱导乙烯合成等作用^[6-8]. 这些研究表明,无论是在医疗保健,还是在植物生理作用上, γ -氨基丁酸都发挥着重要的作用. 因此,研究和开发 γ -氨基丁酸在动植物生理生化以及医疗领域都有广泛的应用前景. 目前,获得 γ -氨基丁酸的方式主要有化学合成、大肠杆菌发酵、乳酸菌发酵等方法. 但是化学合成的方法,由于受到苛刻的反应条件及昂贵的天然原料的制约^[9],难以进行大规模工业化生产. 利用微生物发酵获取 γ -氨基丁酸的方法是

收稿日期: 2007-03-26

作者简介: 蔡锦标(1981—),男,硕士研究生; 通讯作者: 谭志远(1968—),男,教授,博士, E-mail: zytan@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30470002)

大有前途的. 有研究者已经在应用大肠杆菌发酵生产 γ -氨基丁酸的发酵工艺上获得很大的进展^[10]; 许建军等^[11]在利用乳酸发酵获得 γ -氨基丁酸的研究上,也取得了突破性的成果. 在开发植物内生固氮菌进行 γ -氨基丁酸的生物合成方面,目前的研究还比较少. 但研究显示,在一些与根瘤菌共生固氮植物的根瘤中, γ -氨基丁酸以结合形式存在,苜蓿中结合形式的 γ -氨基丁酸达干质量的 6.6%^[8]. 鉴于此,本文对来源于禾本科植物的 64 株内生固氮菌产 γ -氨基丁酸的特性进行了研究.

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种来源于华南农业大学农学院分子遗传育种实验室保存的 64 株禾本科植物内生固氮菌,菌株名称及其来源见表 1. 固氮菌的分离和鉴定参考张国霞等^[12]的方法.

生化试剂 γ -氨基丁酸、L-谷氨酸、茚三酮、正丁醇和冰醋酸,均为分析纯.

主要仪器包括 Eppendorf 5417R 冷冻离心机、电子天平、SHZ-300 多用途水浴恒温振荡器、UV-1201 紫外分光光度计、层析缸和生化培养箱.

内生固氮菌活化、增殖培养基参考张国霞^[12]的方法: VM-Ethanol 培养基,成分为 Döbereiner-basic 10.0 mL·L⁻¹; Fe₍₃₎-EDTA ($w = 0.66\%$) 1.0 mL·L⁻¹, Yeast Extract 1.0 g·L⁻¹, Peptone 3.0 g·L⁻¹, NH₄Cl 0.5 g·L⁻¹, NaCl 1.0 g·L⁻¹, K-PO₄-Buffer 3.0 mL·L⁻¹ (分开灭菌), Ethanol 6.0 mL·L⁻¹ (分开灭菌).

1.2 方 法

1.2.1 菌种活化与扩增 将保存在 -80 °C 冰箱的菌株取出,室温放置融化后,用接种环取一环划于 VM-Ethanol 培养基中活化 12 h (温度 34 °C; 湿度 85%); 将活化的菌株转接到 VM-Ethanol 平板中进行扩大繁殖培养 24 h (温度 34 °C; 湿度 85%).

1.2.2 菌体收集并加底物反应 收集 VM-Ethanol 平板培养基上的菌株, $w = 0.9\%$ 的生理盐水洗涤 2 次,离心 (8 000 r/min, 10 min) 收集,称质量. 按菌体湿质量加入 10 倍 10 g/L 的 L-谷氨酸,调节 pH 至 4.7,于 37 °C、160 r/min 振荡反应 12 h.

1.2.3 纸层析鉴定 γ -氨基丁酸产物 参考文献 [13-14], 层析液为 $V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{乙酸}}:V_{\text{水}} = 4:1:3$, 加 $\varphi = 0.1\%$ 茚三酮; 洗脱液为 $\varphi = 0.1\%$ 硫酸铜与 $\varphi = 75\%$ 乙醇按体积比 1:19 混合. 将振荡反应后的菌溶液离

心 (8 000 r/min, 20 min), 取上清液,沸水浴 5 min,离心 (8 000 r/min, 20 min). 取上清液 5 μL 点样,阴干,并于层析纸的两边点上 γ -氨基丁酸标准样,于层析液中进行上行层析 3 h. 3 h 后取出晾干,于烘箱中烘干 (90 °C, 15 min); 测定标准样与待测样品的 R_f , 并将与标准样的 R_f 相同的样点剪下,于 15 mL 离心管中加 3 mL 洗脱液,振荡洗脱 25 min.

1.2.4 γ -氨基丁酸最佳吸收波长的测定 纸层析后,取 γ -氨基丁酸标准样品的洗脱液 1 mL,置于紫外分光光度计中,在波长 190 ~ 850 nm 的范围内进行吸收光谱扫描,并记录结果,确定 γ -氨基丁酸最佳吸收波长.

1.2.5 γ -氨基丁酸标准曲线和待测样品吸光度测定 取 γ -氨基丁酸质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 和 2.5 mg·mL⁻¹ 的 9 个标准样品进行纸层析,用剪刀剪下标准样点,并各用 3 mL 洗脱液振荡洗脱,洗脱液和待测样品洗脱液在紫外分光光度计中,于波长 510 nm (1.2.4 步骤选择的 γ -氨基丁酸最佳吸收波长) 处测定吸光度,每个样点重复测 3 次,并绘制标准曲线.

2 结果与分析

2.1 内生固氮菌产 γ -氨基丁酸的定性分析

选定的 64 株不同类群的植物内生菌,经过活化、增殖,加 10 g/L 的 L-谷氨酸发酵后,发酵液进行纸层析,结果 (表 1) 显示,部分菌株能够产生 γ -氨基丁酸色斑,说明产生了 γ -氨基丁酸.

64 株菌经过产 γ -氨基丁酸能力的初步测定发现,菌株 ZH4、ZH5、ZH7、ZH10、ZH12、ZH13、ZH21、ZH46、ZH59、H041、H057、H068、W2、W3、W58、Y2、Y9、Y21、Y25、Y28 和 Y29 共 21 株菌能够产生与标样 γ -氨基丁酸同一 R_f 的紫色色斑; 其中 W3、Y21、Y28 这 3 株菌的反应液在纸层析上产生的色斑颜色较深、面积较大,初步确定其产量较高,用这 3 株菌进行下一步定量分析测定.

2.2 γ -氨基丁酸最佳吸收波长的测定

纸层析后,剪下 γ -氨基丁酸标准样的斑点,经洗脱液洗脱之后,在 UV-1201 紫外分光光度计上进行光谱扫描. 在波长范围为 190 ~ 850 nm 的条件下,获得 γ -氨基丁酸的光谱变化图 (图 1). 由图 1 可见, γ -氨基丁酸在 190 ~ 850 nm 波长范围内有 4 个光吸收峰,波长分别为 510、460、230 和 204 nm. 其中 510 nm 与 230 nm 处的吸收峰较高、较陡,符合最佳

表1 64株禾本科植物内生固氮菌来源和产 γ -氨基丁酸(GABA)的能力¹⁾

Tab.1 The source and the γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of sixty-four endophytic diazotrophs

菌株	寄主来源	产 GABA	菌株	寄主来源	产 GABA	菌株	寄主来源	产 GABA	菌株	寄主来源	产 GABA
strain	host origin	produce GABA	strain	host origin	produce GABA	strain	host origin	produce GABA	strain	host origin	produce GABA
ZH2	野生稻	-	ZH51	野生稻	-	W51	龟背竹	-	Y14	野生稻	-
ZH4	野生稻	+	ZH59	野生稻	+	W58	龟背竹	-	Y15	野生稻	-
ZH5	野生稻	+	ZH67	野生稻	-	W59	龟背竹	-	Y16	野生稻	-
ZH7	野生稻	+	ZH69	野生稻	-	Y1	野生稻	-	Y17	野生稻	-
ZH8	野生稻	-	H47	刺竹	+	Y2	野生稻	+	Y18	野生稻	-
ZH10	野生稻	+	H47	刺竹	-	Y3	野生稻	-	Y19	野生稻	-
ZH12	野生稻	+	H48	刺竹	-	Y4	野生稻	-	Y20	野生稻	-
ZH13	野生稻	+	H50	刺竹	-	Y5	野生稻	-	Y21	野生稻	++
ZH21	野生稻	+	H56	刺竹	-	Y6	野生稻	-	Y22	野生稻	-
ZH27	野生稻	-	H57	刺竹	+	Y7	野生稻	-	Y23	野生稻	-
ZH33	野生稻	-	H68	刺竹	+	Y8	野生稻	-	Y24	野生稻	-
ZH35	野生稻	-	W2	龟背竹	+	Y9	野生稻	+	Y25	野生稻	+
ZH39	野生稻	-	W3	龟背竹	++	Y10	野生稻	-	Y26	野生稻	-
ZH43	野生稻	-	W33	龟背竹	-	Y11	野生稻	-	Y27	野生稻	-
ZH46	野生稻	+	W38	龟背竹	-	Y12	野生稻	-	Y28	野生稻	++
ZH50	野生稻	-	W43	龟背竹	-	Y13	野生稻	-	Y29	野生稻	+

1) “-”表示没有产 γ -氨基丁酸;“+”表示有产 γ -氨基丁酸;“++”表示 γ -氨基丁酸产量较高

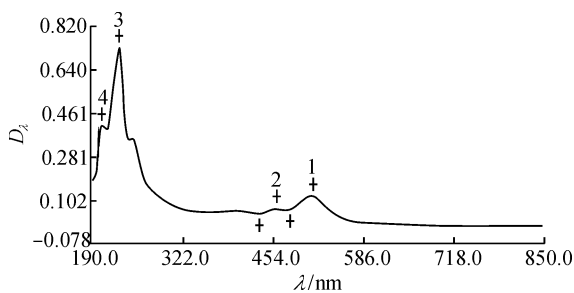


图1 γ -氨基丁酸吸收光谱扫描图

Fig.1 The absorption spectrum of γ -aminobutyric acid

$x + 0.0315$, 决定系数 $R^2 = 0.9829$. 故取 γ -氨基丁酸在质量浓度范围 $0.2 \sim 1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吸光度 (D) 在 $0.02 \sim 0.10$ 时的曲线作为本研究的标准曲线.

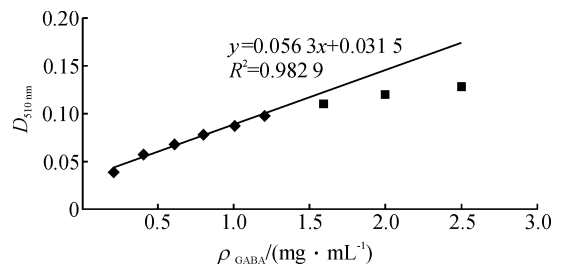


图2 γ -氨基丁酸(GABA)标准曲线图

Fig.2 The standard curve of γ -aminobutyric acid

2.4 γ -氨基丁酸的定量分析

将筛选出来的3株菌(W3、Y21、Y28)加10 g/L的L-谷氨酸进行发酵,发酵液进行纸层析及紫外分光光度法定量分析.在波长510 nm处,这3株菌株纸层析洗脱液的吸光度如表2.将3株菌在紫外分光光度计上测得的吸光度(每株重复3次),于标准曲线方程 $y = 0.0493x + 0.0355$ (图2)中进行返回值计算,获得3株菌株各自产 γ -氨基丁酸的浓度.结果(表2)显示,这3株菌株产 γ -氨基丁酸的能力都达到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上,从高至低分别是 Y28 (0.754 ± 0.004) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Y21 (0.597 ± 0.001) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、W3 (0.539 ± 0.002) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

吸收光波长的要求.同时,通过对不同浓度的 γ -氨基丁酸标准样作进一步的测量,结果显示,在波长510 nm处, γ -氨基丁酸浓度梯度变化呈线性关系,而在波长230 nm处,其线性变化规律不明显.故选择波长510 nm为 γ -氨基丁酸最佳吸收波长并进行标准曲线测定.

2.3 γ -氨基丁酸标准曲线测定

9个不同浓度梯度的 γ -氨基丁酸标准样经过纸层析,洗脱液洗脱后,在波长510 nm处测量它们的吸光度(D),得到线性关系图(图2).由图2可见, γ -氨基丁酸在510 nm处的吸光度,在所测的质量浓度范围内呈线性相关,但总体的相关性不是很好.只有在 $0.2 \sim 1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内,吸光度与测量值的线性关系较好,求得的相关方程为: $y = 0.0563$

表2 3株高产 γ -氨基丁酸(GABA)菌株纸层析洗脱液的吸光度和产 γ -氨基丁酸的质量浓度¹⁾

Tab.2 The eluate's absorbency and the strength of GABA of the 3 highest GABA production bacterium

菌株 strain	$D_{510\text{ nm}}$	$\rho_{\text{GABA}}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
W3	0.062	0.539 ± 0.002
Y21	0.065	0.597 ± 0.001
Y28	0.074	0.754 ± 0.004

1)吸光度($D_{510\text{ nm}}$)为3次重复测定值的平均值; γ -氨基丁酸质量浓度为3次重复测定的 $D_{510\text{ nm}}$ 各自的返回值的平均值 \pm 标准误

3 讨论与结论

64株不同类群的植物内生固氮菌经过纸层析定性分析,鉴定得到ZH4等21株具有产 γ -氨基丁酸活性的菌株;进一步采用紫外分光光度法定量分析显示,W3、Y21、Y28的产量均超过 $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而Y28的产量达到 $(0.754 \pm 0.004)\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.在进行产 γ -氨基丁酸菌的初步筛选上,许建军等^[11]从乳酸菌筛选到的菌株产 γ -氨基丁酸的量最高达 $0.55\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,徐冬云等^[14]从土壤、酸菜、酸奶等分离得到的菌株产量最高的也已达 $0.463\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.而本研究筛选到的菌株产 γ -氨基丁酸的量最高达到了 $(0.754 \pm 0.004)\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,产量明显高出国内同行研究用的菌株.在植物内生菌产 γ -氨基丁酸的同类研究中鲜见相关的报道.故本研究中筛选到的菌株作为进行 γ -氨基丁酸生产的选育菌株,具有更高的研究和利用价值.

本研究的植物内生菌,早期的研究表明其已具有生物固氮功能^[12],现测得其具有高产 γ -氨基丁酸的功能.这类微生物寄生在植物体内,可通过自身的生理生化代谢,分泌代谢物质,不仅可合成植物生长发育所需要的氮源,还可以通过分泌 γ -氨基丁酸调节植物体的生理生化代谢并提高植物体的抗性,故具有更好的植物生理生化辅助功能.同时,这类微生物代谢产生的 γ -氨基丁酸若能够积累在植物体内,将可以提高植物体 γ -氨基丁酸的含量,从而提

高植物体的利用价值及其经济效益.

参考文献:

- [1] 白松,林向阳,阮榕生,等. γ -氨基丁酸的分布和制备[J]. 现代食品科技,2005,21(2):202-205.
- [2] 郑红发,黄亚辉,刘霞林,等. γ -氨基丁酸的药理作用[J]. 茶叶通讯,2004(4):14-17.
- [3] 包华琼,王新庄. γ -氨基丁酸(GABA)的生殖生理作用[J]. 动物医学进展,2002,23(3):39-41.
- [4] 陈恩成,张名位,彭超英,等. γ -氨基丁酸的功能特性及其在食品原料中的富集技术研究进展[J]. 湖北农学院学报,2004,24(4):316-320.
- [5] 杨胜远,陆兆新,吕风霞,等. γ -氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J]. 食品科学,2005,26(9):546-551.
- [6] 谢峥嵘. γ -氨基丁酸在茶树及高等植物体内的代谢和生理作用[J]. 福建茶叶生理生化,2004,4:24-26.
- [7] 田小磊,吴晓岚,张蜀秋,等. γ -氨基丁酸在高等植物逆境反应中的作用[J]. 生命科学,2002,14(4):215-219.
- [8] 蒋振晖,顾振新. 高等植物体内 γ -氨基丁酸合成、代谢及其生理作用[J]. 植物生理学通讯,2003,39(3):249-254.
- [9] 林少琴,吴若红,邹开煌,等. 米胚芽中 γ -氨基丁酸的分离提取及鉴定[J]. 食品科学,2004,25(1):76-78.
- [10] PLOKHOV A Y, GUSYATINERETAL M M. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000,88:257-265.
- [11] 许建军,江波,许时婴. 生物合成 γ -氨基丁酸的乳酸菌的筛选[J]. 食品科技,2002,10:7-10.
- [12] 张国霞,茅庆,何忠义,等. 陵水普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生菌的固氮及溶磷特性[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(4):457-460.
- [13] 张晖,徐永,姚惠源. 纸层析法定量测定米胚芽中的 γ -氨基丁酸[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(2):101-103.
- [14] 徐冬云,周立平,童振宇,等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离及筛选[J]. 中国食品添加剂,2006,2:105-109

【责任编辑 周志红】