

文章编号 :1009-038X( 2004 )05-0091-05

# 植物乳杆菌乳酸脱氢酶的抽提与初步纯化

王立艳 , 石轩峰 , 王 武

( 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 ,江苏 无锡 214036 )

摘 要 :研究了从植物乳杆菌 RS2-2 中提取胞内乳酸脱氢酶的工艺过程 ,探讨了超声破碎时菌体质量浓度、处理量及处理时间对破碎效果的影响 ;对酶的提取工艺研究表明  $0.05\text{ mol/L}$  磷酸缓冲液(  $\text{pH } 7.0$  )添加  $0.10 \sim 0.30\text{ mol/L NaCl}$  可达到较好的抽提效果 ;对硫酸铵盐析去杂蛋白质及 DEAE 离子交换层析工艺进行了初步优化 .在优化的工艺条件下 ,酶的总回收率为  $40.2\%$  ,比酶活提高到原来的  $18.9$  倍 .

关键词 :乳酸脱氢酶 ;抽提 ;纯化 ;植物乳杆菌

中图分类号 :Q 554

文献标识码 :A

## Extraction and Preliminary Purification of Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* RS2-2

WANG Li-yan , SHI Xuan-feng , WANG Wu

( Key Laboratory of Industry Biotechnology under Ministry of Education ,Southern Yangtze University ,Wuxi 214036 ,China )

**Abstract :** The disruption , extraction and preliminary purification of Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum* RS2-2 were conducted. The cells were disrupted by ultrasonication , and the disruption effects at different treatment time , cell's concentration and volume were studied. The optimal pH of the extraction medium(  $0.05\text{ mol/L}$  phosphate buffer ) was  $7.0$  , and the extraction result could be further improved when adding  $0.10 \sim 0.30\text{ mol/L NaCl}$  into the medium. The enzyme was purified  $18.9$  folds through  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  salting-out and DEAE-Sepharose chromatography , and the total activity yield was up to  $40.2\%$  .

**Key words :** Lactate Dehydrogenase( LDH ) ;extraction ;purification ;*Lactobacillus plantarum*

乳酸脱氢酶( Lactate Dehydrogenase , LDH , EC 1.1.1.27 )又称 NAD 氧化酶 ,是生物体内糖酵解过程中重要的氧化还原酶<sup>[1]</sup> ,是生产丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒的主要原料 ,应用于生化研究、丙酮酸盐的检定、白血病以及心肌梗死的诊断 ,还

可作为食品添加剂用于发酵奶制品( 如干酪 )、腌渍品、糖果制品和饮料的生产 .

乳酸脱氢酶普遍存在于动物、细菌及植物中<sup>[2]</sup> .动物组织中 LDH 及其同工酶的性质已得到深入研究 ,细菌的 LDH 也有了一定的研究<sup>[3,4]</sup> ,其

收稿日期 2004-02-17 ; 修回日期 2004-03-01 .

作者简介 :王立艳( 1976- ) ,女 ,内蒙古赤峰人 ,生物化学与分子生物学硕士研究生 .  
万方数据

保守性远不如哺乳动物 LDH,且许多细菌 LDH 需要 1  $\beta$ -二磷酸果糖(FDP)激活. 研究发现,大部分受 1  $\beta$ -二磷酸果糖激活的 L-LDH 比活偏高,不受 1  $\beta$ -二磷酸果糖激活的 L-LDH 比活都较低<sup>[5]</sup>. 因动物组织的酶系非常复杂,而且变化较大,故难以制得高纯度的乳酸脱氢酶.

作者所在实验室从泡菜汁中分离并改良了一株乳酸脱氢酶产生菌 RS2-2,经初步分类鉴定为植物乳杆菌,与国内报道的乳酸脱氢酶产生菌不同. 作者对该菌产生乳酸脱氢酶的初步纯化开展了研究,得出了简易、成本低且稳定的提纯工艺,易放大为小型工业化生产,为该酶的进一步纯化和开发应用提供了参考和依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种 植物乳杆菌 RS2-2,作者所在实验室从泡菜汁中分离筛选.

#### 1.1.2 培养基

1) 斜面培养基:组分(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,葡萄糖 5.

2) 种子培养基:组分(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10,葡萄糖 5.

3) 发酵培养基:组分(g/L):麦芽糖 15,酵母膏 15,  $K_2HPO_4$  4,乙酸铵 3.

1.1.3 主要试剂及仪器 NADH:上海生工 Amresco 进口分装产品;丙酮酸钠:上海曹扬第二试剂厂生产;牛血清蛋白:上海丽珠东风生物技术有限公司生产;CF702 型高速冷冻离心机:日本日立公司生产;大容量冷冻离心机:飞鸽离心机厂生产;754 型 UV 紫外可见分光光度计:上海分析仪器总厂生产;250 W 自制超声破碎仪:无锡超声设备有限公司制造.

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌体的培养与收集 斜面菌种接种到种子培养基中培养活化 12 ~ 14 h,再按体积分数 10% 接种量取种子液接种到发酵培养基中,35  $^{\circ}C$  静置培养 22 ~ 24 h,8 000 r/min 离心发酵液 10 min,收集湿菌体.

1.2.2 超声波法破碎细胞 湿菌泥用 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液配制成不同浓度的菌悬液,在冰浴中用超声波破碎菌体,定时取上清液即粗酶液测酶活. 超声波细胞破碎器频率为 20 kHz,功率为 200 W.

1.2.3 植物乳杆菌胞内乳酸脱氢酶的抽提 改

变抽提缓冲液的 pH 值和离子强度,试验不同条件下乳酸脱氢酶的抽提效果.

#### 1.2.4 乳酸脱氢酶的初步纯化

1) 硫酸铵分级盐析:粗酶液在搅拌条件下加入已碾碎的固体硫酸铵粉末至不同饱和度,4  $^{\circ}C$  下静置 1 ~ 2 h 后,12 000 r/min 离心 20 min(4  $^{\circ}C$ ),弃去沉淀,收集上清液备用. 上清液中继续加入固体硫酸铵粉末沉淀 1 ~ 2 h,高速离心收集沉淀,用缓冲液溶解,备用.

2) DEAE 离子交换层析:以不同 pH 值的洗脱缓冲液洗脱柱子,试验 DEAE 离子交换层析对植物乳杆菌乳酸脱氢酶的分离效果.

1.2.5 蛋白质含量测定 用 Bradford<sup>[5]</sup>法测定蛋白质含量,以牛血清蛋白为标准样.

1.2.6 酶活测定 LDH 在催化丙酮酸转化为乳酸的同时不断将 NADH 氧化成 NAD,使得 NADH 在 340 nm 处的吸光度不断降低,因此连续测定酶反应过程中 340 nm 处吸光度的变化即可算出酶活. 酶活单位定义为 25  $^{\circ}C$ 、pH 6.5 时每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  的 NADH 所需的酶量即为一个酶活单位.

测定混合液酶活:0.1 mL 30 mmol/L 丙酮酸钠溶液,0.1 mL 6 mmol/L NADH,2.8 mL 100 mmol/L pH 6.5 磷酸钾缓冲液和 0.1 mL 酶液,于 25  $^{\circ}C$  下测反应体系在 340 nm 处的吸光度变化,计算出每分钟吸光度的降低值  $\Delta A$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌体分离和破碎前的预处理

发酵液于 5 000 r/min 转速下离心,初步收集菌体,用 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤两次,以 10 000 r/min 离心 10 min,沉淀物明显分为两层. 经超声波破碎后测其中乳酸脱氢酶的活力. 上层黑色物中没有酶活,是培养基中的不溶物或杂质;下层有酶活为白色菌体. 收集菌体并用适量缓冲液溶解.

### 2.2 超声波法破碎细胞

超声波作用机理很复杂,主要是空化作用:超声波可在液体介质中引起空化作用,产生大量直径为 10  $\mu\text{m}$  左右的空泡,空泡随后爆裂,在此过程中产生高达几千大气压的冲击波,使细胞破碎、断裂成段或碎块. 超声波破碎效果的影响因素主要有菌悬液的质量浓度、作用时间、菌悬液的量及破碎器功率(超声波强度). 分别研究破碎时间、菌体质量浓度和破碎液体量对菌体破碎效果的影响.

2.2.1 破碎时间对酶的释放和总蛋白质释放的

**影响** 在菌体质量浓度和超声波破碎仪功率一定的情况下,破碎时间对破碎效果有明显的影响。破碎时间在 5 ~ 40 min 范围内,酶活与总蛋白质的释放情况见图 1。由图 1 可知,开始时体系中酶活和总蛋白质质量浓度随时间的增加而升高,随着时间的延长逐渐趋于平衡。从两条曲线的走向可知,酶从菌体中破除与总蛋白质的释放基本是同步的,当破碎时间为 20 min 时,酶活已达最大,为降低生产能耗和设备损耗,选超声处理时间为 20 min。

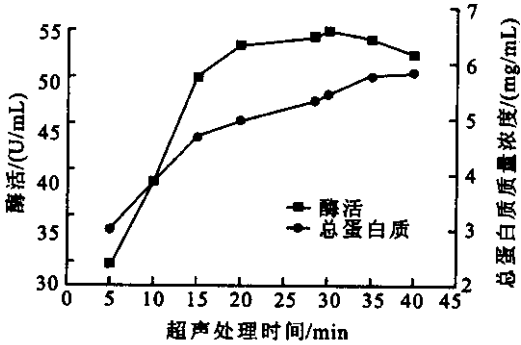


图 1 超声处理时间对酶和总蛋白质释放的影响  
Fig.1 Effect of disruption time on activity and total protein release

**2.2.2 超声波处理时菌悬液质量浓度对乳酸脱氢酶释放的影响** 将湿菌泥用缓冲液配制成不同质量浓度的菌悬液,冰浴中超声波处理 20 min,检测乳酸脱氢酶的酶活和比活力,结果见图 2。超声波破碎的过程较为复杂,从图 2 中单位湿菌体所得的酶活曲线看出,菌悬液质量浓度对超声波破碎影响较大,单位菌体酶活直接反映的是不同菌悬液质量浓度下菌体的破碎率。质量浓度高时作用于单位菌体的冲击波就少,所以破碎率不高,而质量浓度低时则单位超声波对菌体的破碎率差。由图 2 可知,当湿菌体质量浓度为 40 ~ 50 mg/mL 时,单位菌体酶活最高,酶的比活力也最大。

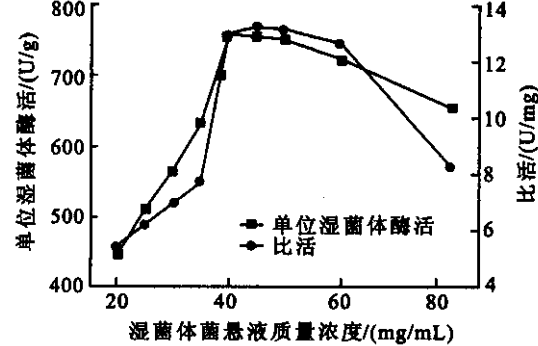


图 2 菌悬液质量浓度对酶释放的影响  
Fig.2 Effect of the cells concentration on LDH release

**2.2.3 菌悬液体积对菌体破碎效果的影响** 超声处理时间和菌悬液质量浓度一定,研究菌悬液体积对菌体破碎效果的影响。选用的破碎体积分别为 5,10,15,20,25 mL,结果见图 3。可知,菌悬液的质量越少,所得总蛋白质质量浓度越大即破碎率越大,但酶活反而降低,其原因可能是体积太小,超声波作用于单位菌体的能量高,菌体的破碎速度快,但同时过量的冲击波会引起酶的失活(超声波产生的化学自由基团能使某些敏感性活性物质变性失活)。体积为 15 mL 时破碎效果最好。

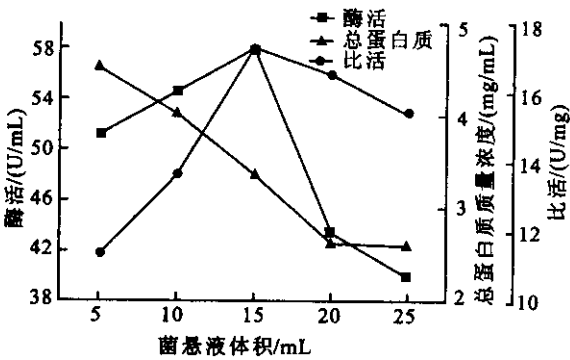


图 3 菌悬液体积对菌体破碎效果的影响  
Fig.3 Effect of cells solution volume on activity and total protein release

2.3 细胞破碎后乳酸脱氢酶的抽提

酶是具有等电点的两性电解质,提取液的 pH 值应选择在偏离等电点两侧的 pH 值范围内。用 pH 5.5 ~ 8.0 的磷酸缓冲液(0.05 mol/L)悬浮细胞后破碎、抽提,并测定其酶活和蛋白质含量,结果见表 1。由表 1 可看出,pH 在 6.0 ~ 7.0 范围内时较为有利,抽提介质的最适 pH 值在 7.0 左右。

表 1 不同 pH 值抽提介质对乳杆菌 LDH 抽提效果的影响  
Tab.1 Extraction of LDH from Bacteria with the medium at different pH value

| 抽提介质 pH 值 | LDH 活性/( U/mL ) | 蛋白质质量 浓度/( mg/mL ) | 比活力/( U/mg ) |
|-----------|-----------------|--------------------|--------------|
| 5.5       | 16.20           | 1.380              | 11.74        |
| 6.0       | 17.00           | 1.390              | 12.23        |
| 6.5       | 17.53           | 1.364              | 12.85        |
| 7.0       | 17.47           | 1.313              | 13.31        |
| 7.5       | 17.40           | 1.613              | 10.79        |
| 8.0       | 17.38           | 1.606              | 10.82        |

因盐溶作用,稀盐溶液可促进蛋白质的溶解,同时稀盐溶液中离子与蛋白质部分结合,保护蛋白质使其不易变性。因此在提取液中加入少量中

性盐如 NaCl 可改善抽提效果.

以 pH 7.0 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液为基本介质,在其中添加 0~0.3 mol/L 的 NaCl 配成不同离子强度的抽提液,结果见表 2. 在 NaCl 浓度为 0.15~0.30 mol/L 时得到较好的抽提效果,最佳浓度为 0.15 mol/L.

表 2 不同离子强度抽提介质对乳杆菌 LDH 抽提效果的影响

Tab. 2 Extraction of LDH from Bacteria with the medium at different ionic strength

| NaCl<br>浓度/( mmol/L ) | LDH 活性/<br>( U/mL ) | 蛋白质质量<br>浓度/( mg/mL ) | 比活力/<br>( U/mg ) |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| 0                     | 28.2                | 1.638                 | 17.21            |
| 0.05                  | 29.7                | 1.586                 | 18.73            |
| 0.10                  | 29.8                | 1.440                 | 20.07            |
| 0.15                  | 33.3                | 1.422                 | 23.42            |
| 0.20                  | 30.6                | 1.518                 | 20.16            |
| 0.30                  | 30.9                | 1.438                 | 21.49            |

2.4 硫酸铵盐析初步纯化乳酸脱氢酶

硫酸铵一步盐析处理粗酶液结果见图 4. 硫酸铵饱和度在 40% 时,沉淀杂蛋白质而保留目的酶的效果较好,此时得到上清液酶的比活最高,酶活收率为 101.0%,比活提高倍数约为 4.5 倍.

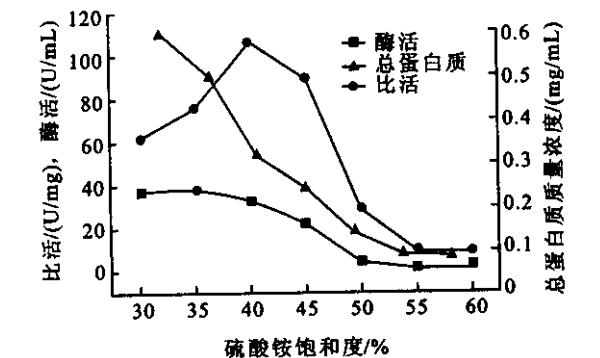


图 4 硫酸铵一步盐析曲线  
Fig. 4 First ammonium sulfate salting-out

经硫酸铵盐析后酶活有所增加,认为这是由于硫酸铵对有些细菌的乳酸脱氢酶有一定的激活作用所致<sup>[6]</sup>.

硫酸铵二次盐析曲线见图 5. 随着硫酸铵饱和度的增加,沉淀物中酶和总蛋白质都在增加,比活却逐渐下降,说明经一次盐析后体系中的组分发生了变化,杂蛋白质和 LDH 的盐析性质十分相似,二次盐析已不能达到分离目的.

2.5 DEAE 离子交换层析

经硫酸铵一步盐析的酶样上 DEAE 离子交换层析柱纯化,分析洗脱缓冲液的 pH 值对分离效果的影响,缓冲液的 pH 值分别为 5.8、7.2 和 7.8. 离子交换层析结果见图 6.

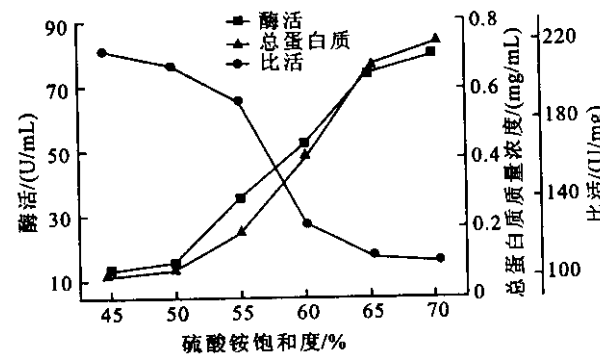


图 5 硫酸铵二次盐析曲线  
Fig. 5 Second ammonium sulfate salting-out

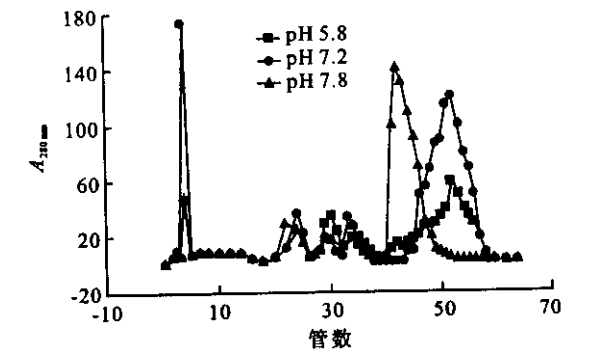


图 6 DEAE 离子交换层析图  
Fig. 6 DEAE chromatography

离子交换层析的原理是:大分子与离子交换剂亲和力不同,以不同牢固程度被吸附于离子交换剂上,通过改变离子强度或(pH)值使大分子从离子交换剂上先后被洗脱下来. 分离的复杂混合物中各种蛋白质的等电点各不相同,改变不同的 pH 值从而改变不同蛋白质与离子交换剂的结合能力,使目的蛋白质的分离效果明显. 从图 6 可知,改变洗脱液的 pH 值能明显地改变离子交换层析柱的分离效果,在 3 种 pH 值条件下,乳酸脱氢酶与 DEAE 均有较强的结合力,但杂蛋白质与 DEAE 的结合力变化较大,在 pH 7.0 时目的酶与其它杂蛋白质的分离效果最好,所以选择 DEAE 离子交换层析洗脱液的 pH 值为 7.0.

3 结 论

对植物乳杆菌胞内乳酸脱氢酶的破碎、抽提条件及初步纯化进行了研究,取得了满意的效果,

得出以下结论：

1 ) 超声波破碎细胞条件的确定 :湿菌体菌悬液质量浓度为 40 ~ 50 mg/mL 时 ,15 mL 菌悬液破碎 20 min. 在此破碎条件下经血球计数板计数破碎前后菌悬液中的细胞质量浓度 ,计算出菌体破碎率为 77. 2% .

2 ) 抽提缓冲液确定为 0. 05 mol/L pH 7. 0 含 0. 15 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液.

3 ) 初步的分离纯化工艺为 :经硫酸铵一步盐析上 DEAE 离子交换层析柱分离( 初步纯化结果见表 3 ).

表 3 植物乳杆菌乳酸脱氢酶的初步纯化结果

Tab. 3 Preliminary purification of LDH from *Brevibacterium lactofermentum*

| 纯化步骤                   | 体积/<br>mL | 酶活力/<br>( U/mL ) | 总蛋白质<br>质量浓度/( mg/mL ) | 比活力/<br>( U/mg ) | 回收<br>率/% | 纯化<br>倍数 |
|------------------------|-----------|------------------|------------------------|------------------|-----------|----------|
| 粗酶液                    | 50        | 33. 97           | 1. 432                 | 23. 72           | 100       | 1        |
| 硫酸铵沉淀( 透析后浓缩 )         | 10        | 171. 55          | 1. 607                 | 106. 74          | 101. 0    | 4. 5     |
| DEAE-Sepharose 柱( 浓缩 ) | 10        | 68. 28           | 0. 152                 | 448. 31          | 40. 2     | 18. 9    |

由表 3 可知 ,经两步初步的分离纯化 ,酶比活提高了 18. 9 倍 ,但收率只有 40. 2% . 分析收率较低的原因是 :上 DEAE 离子交换柱的酶液样品浓度太低造成酶损失大、回收少. 提高酶的收率的措施为 :将硫酸铵盐析的酶液透析后浓缩倍数适当提高 ,从而能增加上柱时酶的回收率. 另外 ,有较

多乳酸菌 LDH 受 1  $\beta$ -二磷酸果糖的激活 ,但本试验中 1  $\beta$ -二磷酸果糖不影响该植物乳杆菌 RS2-2 的 LDH 活力 ,而( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 对酶有较大的激活作用.( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 的作用尚不清楚 ,需进一步研究.

该纯化工艺过程稳定 ,操作简单 ,易放大 ,对细菌乳酸脱氢酶的产业化生产具有指导意义.

参考文献：

[ 1 ] Al-Jassabi S. Purification and kinetic properties of skeletal muscle lactate dehydrogenase from the lizard *Agama stellio stellio* [ J ]. **Biochemistry** ( Moscow ) 2002 67( 7 ) :786 – 789.

[ 2 ] Oluoha U. Purification and kinetic characterisation of lactate dehydrogenase from *Dioscorea cayenensis* tuber[ J ]. **Biologia Plantarum** ,2001 44( 4 ) 535 – 539.

[ 3 ] Ellen I Garvie. Bacterial lactate dehydrogenases[ J ]. **Microbiological Reviews** ,1980 12( 4 ) 25 – 28.

[ 4 ] 郑国爱. 细菌乳酸脱氢酶的纯化及其性质研究[ J ]. **生物技术** ,1999 9 :11 – 15.

[ 5 ] 汪家政 ,范明. 蛋白质技术手册[ M ]. 北京 :科学出版社 ,2000. 39 – 47.

[ 6 ] 杨寿均 ,蔡妙英 ,刘俊凤 ,等. 嗜热菌的耐热 L-乳酸脱氢酶的研究[ J ]. **微生物学报** ,1991 31( 6 ) :438 – 442.

( 责任编辑 杨 萌 ,李春丽 )