

文章编号:1009-038X(2004)02-0036-04

# L-乳酸脱氢酶生产菌的选育及产酶条件

汪建军, 王立艳, 杨海麟, 王武\*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 从泡菜汁中筛得一株胞内 L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性较高的植物乳杆菌 RS2-2, 采用亚硝基胍和超声波同时作用进行诱变, 使其比活力由 3.48 U/mg 提高到 7.49 U/mg, 并对突变株的产酶条件进行了研究.

**关键词:** L-乳酸脱氢酶; 植物乳杆菌; 发酵

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

## Screening of a L-Lactate Dehydrogenase Producing Strain and Optimization of the Enzyme Production

WANG Jian-jun, WANG Li-yan, YANG Hai-lin, WANG Wu

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** A strain, *Lactobacillus plantarum* RS2-2, with intracellular L-LDH activity was isolated from pickled vegetable juice. After mutating it by nitrosoguanidine combining with ultrasonic, the specific activity was increased from 3.48 U/mg to 7.49 U/mg. The fermentation conditions were also studied in this paper.

**Key words:** L-Lactate dehydrogenase; *Lactobacillus plantarum*; fermentation

L-乳酸脱氢酶[ EC 1.1.1.27, LDH]是常用的临床诊断用酶,广泛存在于动物组织和各种微生物胞内,可用于医学诊断、生物制药和化工等领域.动物组织中的 L-乳酸脱氢酶及其同工酶的性质已经得到较深入地研究,许多细菌的 L-乳酸脱氢酶已被研究<sup>[1]</sup>,其保守性远不如哺乳动物的 L-乳酸脱氢酶,且许多细菌的 L-乳酸脱氢酶需要 1,6-二磷酸果糖(FDP)激活<sup>[2~4]</sup>.表 1 列出了各种细菌的 LDH 活力,其中以各种乳酸菌的酶活相对较高.作者从泡菜汁中分离出 20 株乳酸菌,并对每株菌进行产酶试验,筛得一株胞内 L-乳酸脱氢酶活性相对较高的菌株 RS2-2,经亚硝基胍结合超声波诱变后,提高了产酶能力,并对其产酶条件进行了研究.

表 1 一些细菌的 LDH 活力

Tab. 1 LDH activity of some bacteria

菌种	粗酶液比活力/ (U/mg)	FDP 激活	参考 文献
栖热菌属	0.003	否	[5]
乳酸杆菌	7.92	否	[6]
枯草芽孢杆菌	0.12	否	[7]
<i>Thermophilic bacterium</i>	0.178	是	[3]
<i>Streptococcus Lactis</i>	13	是	[4]
<i>Streptococcus cremoris</i>	11	是	[8]
<i>Lactobacillus casei</i>	17.8	是	[9]

收稿日期:2003-06-23; 修回日期:2003-09-23.

作者简介:汪建军(1978-),男,湖北黄冈人,发酵工程硕士研究生,\*责任作者.  
万方数据

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 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 高速冷冻离心机:日本日立公司生产;754UV 紫外可见分光光度计:上海分析仪器总厂生产;250 W 超声破碎仪:无锡超声设备有限公司生产。

1.1.2 分离源 泡菜汁。

### 1.1.3 培养基成分

1) BCP 培养基(组分 g/L):酵母膏 2.5,蛋白胨 5,葡萄糖 5,溴甲酚紫 0.04,琼脂 15。

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):酵母膏 5,蛋白胨 5,葡萄糖 10,  $K_2HPO_4$  2。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种筛选 泡菜汁经梯度稀释后,涂布于 BCP 平板培养基上,35 °C 培养,挑出黄色圈较大的单菌落,利用纸层析法对其发酵产物进行乳酸定性。复筛时测定每株乳酸菌胞内酶活力,选出酶活力较高的菌株斜面保藏。

1.2.2 乳酸定性 乳酸定性采用纸层析法,见文献[10]。层析时将乳酸、柠檬酸配成 1% 标准溶液进行上行层析。将培养物离心,取其上清液为样品。

1.2.3 诱变方法 离心收集对数生长后期的细胞,用无菌生理盐水洗涤两次,玻璃珠打散后过滤,制成菌悬液,控制细胞浓度约为  $10^8$  个/mL。将 4 mL 菌悬液加入到装有 2 mg 亚硝基胍塑料袋中,于超声波下作用 45 min(间歇操作)。

1.2.4 细菌的培养及细胞抽提液的制备 将斜面菌株接到种子培养基中活化 12~14 h,再按 10% 接种量接种到发酵培养基中,35 °C 静置培养 22~24 h,8 000 r/min 离心发酵液收集菌体,用 0.05 mol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液洗涤两次,并用同样的缓冲液悬浮。将菌悬液置于冰浴中,200 W 超声破碎 15 min,分 3 次进行,每次 5 min。10 000 r/min 离心 15 min 除去细胞残片,即得到粗酶液。

1.2.5 菌体量测定 取 30 mL 发酵液于 50 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,烘干至恒重。

1.2.6 酶活力测定 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 °C 时每分钟氧化 1  $\mu$ mol 的 NADH 所需的酶量。

混合液的测定为:0.1 mL 35 mmol/L 丙酮酸钠溶液,0.1 mL 6 mmol/L NADH,2.8 mL 100 mmol/L pH 6.8 磷酸钾缓冲液和 0.1 mL 酶液,于 25 °C 监测反应体系在 340 nm 吸光度变化,计算出每分钟吸光度的降低值  $\Delta A$ 。

1.2.7 蛋白质测定 用 Bradford 法测定蛋白含量,以牛血清蛋白为标准样,见文献[11]。

1.2.8 菌种鉴定 根据《一般细菌常用鉴定手册》<sup>[10]</sup>和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[12]</sup>对所筛菌株的形态、碳源利用、生理生化等方面进行初步鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的筛选

初筛从 BCP 平板上挑出 20 个单菌落,纸层析结果表明,20 株菌均能产乳酸。将 20 株菌分别接种到发酵培养基中进行产酶试验,经测定,菌株 RS2-2 产酶相对较高,其细胞抽提液比酶活为 3.84 U/mg。

### 2.2 诱变

诱变采用超声波与亚硝基胍同时作用。超声波具有很强的生物学效应,主要是空化作用<sup>[13]</sup>。在超声波作用下,存在于液体中的微小气泡(气泡或空穴)所发生的一系列动力学过程足以改变细胞的壁膜结构,使细胞内外发生物质交换,促进亚硝基胍进入细胞内,使诱变作用更加充分。

以 RS2-2 为出发菌株,菌悬液经亚硝基胍结合超声波处理后稀释涂布,挑出 39 株变色圈较大的单菌落进行产酶试验,测得其细胞抽提液比酶活最高为 7.49 U/mg。

### 2.3 菌种初步鉴定

个体形态:菌体呈短杆状,有时成对或成链状,革兰氏染色呈阳性,见图 1。

培养特征:在平板培养基于 35 °C 培养 28 h 后,菌落圆形,微小,表面光滑。最适生长温度为 30~35 °C,能在 10 °C 生长,不能在 50 °C 生长,兼性厌氧,可在 pH 值 4.5~9.5 生长,最适 pH 值 6.5 左右。能在 4 g/dL 的 NaCl 下生长,不能在 6.5 g/dL 的 NaCl 下生长。

碳水化合物产酸特性:能利用大多数碳源产酸,如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、L-山梨糖、乳糖、木糖

及蜜二糖。其中肌醇、山梨醇产酸为阴性；菊糖、半乳糖、山梨醇、纤维二糖、棉子糖及甘油产酸呈弱反应。

生理生化反应：利用葡萄糖产酸不产气，接触酶阴性，明胶液化阴性，硫化氢试验阴性，淀粉水解阴性。



图1 菌株 RS2-2 扫描电镜图

Fig. 1 SEM-micrograph of strain RS2-2

根据菌体形态、培养特征及生理生化反应，参照《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[12]</sup>，将所筛菌种初步鉴定为植物乳杆菌。

## 2.4 产酶条件的优化

**2.4.1 碳源对产酶的影响** 采用几种常用的碳源代替发酵培养基中的葡萄糖进行发酵(添加量为 1 g/dL)，以含有 1 g/dL 葡萄糖的培养基为对照，于 35 °C 静置培养 22~24 h，测定比酶活与菌体量。从表 2 可以看出，麦芽糖是产酶较为适宜的碳源。

表 2 碳源对产酶的影响

Tab. 2 Effect of carbon source on LDH production

碳源	比活力/(U/mg)	菌体质量浓度/(g/L)
柠檬酸三钠	5.45	0.28
甘露醇	6.47	0.33
麦芽糖	8.75	0.65
蔗糖	7.33	0.60
山梨醇	5.15	0.23
乳糖	6.23	0.27
果糖	5.86	0.38
对照	7.28	0.63

**2.4.2 氮源对产酶的影响** 在酵母膏含量不变的情况下，用不同的氮源代替蛋白胨进行产酶试验，有机氮源的添加量为 0.5 g/dL，无机氮源添加量为 0.2 g/dL，见表 3。结果表明，乙酸铵为最佳无机氮源。结果还发现培养基中有氮源而无酵母膏时，细

菌几乎不生长，说明该菌株不能自身合成生长因子。

表 3 氮源对产酶的影响

Tab. 3 Effect of nitrogen source on LDH production

氮源	比活力/(U/mg)	菌体质量浓度/(g/L)
氯化铵	6.90	0.40
乙酸铵	7.98	0.60
硝酸钾	6.22	0.23
硫酸铵	6.15	0.33
硝酸钠	6.82	0.37
蛋白胨	7.48	0.63
蛋白胨(不加酵母膏)	0	0

**2.4.3 培养温度对产酶的影响** 取活化菌株接种于优化后的培养基中，分别在 10, 20, 30, 35, 40, 50 °C 下培养 23 h 左右，测定其菌体量和比酶活，结果见图 2，最适产酶温度为 30 °C。

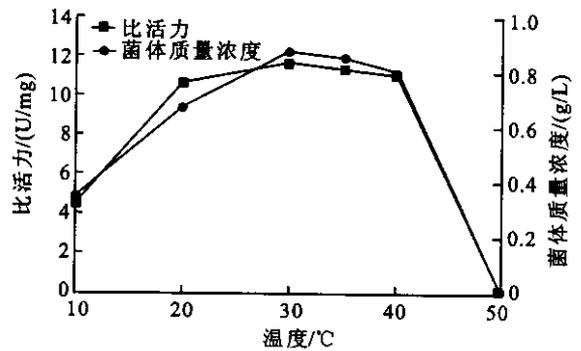


图 2 温度对菌株 RS2-2 产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on LDH production of strain RS2-2

**2.4.4 起始 pH 值对产酶的影响** 用 HCl 和 NaOH 溶液调节培养基的起始 pH 值，接种于优化后的发酵培养基中于 30 °C 培养 23 h 左右，结果见图 3。培养基的起始 pH 值的适宜范围为 6.0~7.0，碱性条件对产酶不利。

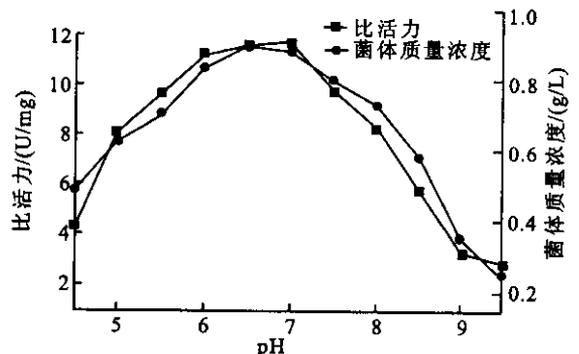


图 3 初始 pH 值对菌株 RS2-2 产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on LDH production of strain RS2-2

2.4.5 优化后菌株 RS2-2 产酶过程曲线 采用最佳培养基和最佳培养条件,即培养温度 30 ℃,起始 pH 值 6.5 的条件下进行产酶试验,每隔 2 h 取样,测定菌体量、比酶活、残糖量及发酵 pH 值,结果见图 4。由图 4 可知,产酶与细胞生长基本同步,说明

细菌产酶与细胞生长是一个相互偶联的过程。当培养时间为 22 h,即对数生长期末时,比酶活为 12 U/mg,菌体质量浓度为 0.9 g/L,两者均达到最大值。22 h 之后,菌体已基本停止生长,产酶能力也有所下降。因此,产酶的最佳时间为 22 h。

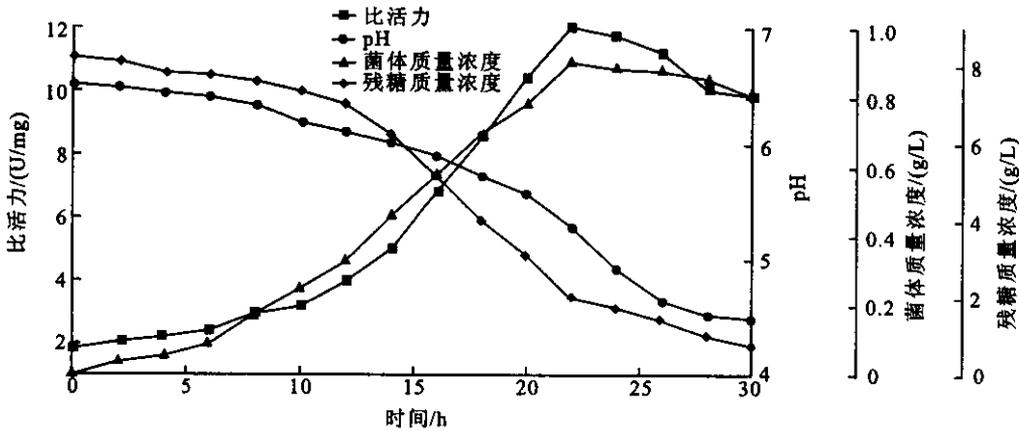


图 4 菌株 RS2-2 发酵的过程曲线

Fig. 4 Fermentation time course of strain RS2-2

### 3 结 论

以泡菜汁为分离源,筛得一株胞内 LDH 活性较高的植物乳杆菌 RS2-2,经亚硝基胍结合超声波诱变后,比活力由 3.84 U/mg 提高到 7.49 U/mg。分批优化结果表明,麦芽糖和乙酸铵是产酶最佳碳源和氮源,酵母膏能为菌体生长提供各种生长因子,是菌体生长所必需的因素。经培养条件的优化后,确定了产酶最适温度为 30 ℃,最适起始 pH 值

为 6.5 左右,最佳发酵时间为 22 h 左右,细菌产酶能力进一步提高到近 12 U/mg,菌体干重也由原来的 0.65 g/L 提高到约 0.9 g/L。

目前国内外生产的乳酸脱氢酶大多从动物组织中提取,而动物细胞酶系复杂,难以提取出纯度较高的乳酸脱氢酶,细菌的 L-乳酸脱氢酶的提取相对简易,且厌氧培养动力消耗低,适合大批量生产。进一步通过改良菌种和提高发酵液中菌体浓度来提高产酶率,可望将其开发成为医学生化用酶制剂。

### 参考文献:

- [1] Garvie I E. Bacterial lactate dehydrogenase[J]. *Microbiol Rev*, 1980, 44:106-139.
- [2] Wlison M J. Fructose-1,6-diphosphate requirement of streptococcal lactate dehydrogenases[J]. *Science*, 1964, 146:775-777.
- [3] Hayao T. Heat-Stable and fructose-1,6-diphosphate-activated L-Lactate dehydrogenase from an extremely *thermophilic bacterium*[J]. *J Biochem*, 1982, 91:1343-1348.
- [4] Crow V L. Fructose 1,6-Diphosphate-activated L-Lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*: kinetic properties and factors affecting activation[J]. *J Bacter*, 1977,131:82-91.
- [5] 杨寿钧.嗜热菌的耐热 L-乳酸脱氢酶的研究[J]. *微生物学报*,1991,319(6):438-442.
- [6] 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.
- [7] 朱文森.枯草芽孢杆菌 BS12 乳酸脱氢酶的分离纯化与部分性质的研究[J]. *生物技术*,1996,6(2):23-25.
- [8] Jago G R. Physicochemical studies on the lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris*US3: the effects of modifiers [J]. *BBA*, 1971,250:271-285.
- [9] Holland R. Regulation of the L-Lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-diphosphate and metal I-ons[J]. *J Bacteriology*,1975,121:777-784.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定手册[M].北京:科学出版社,1978.
- [11] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.
- [12] 凌代文.乳酸细菌分类检定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [13] 袁易至,陈慧振.近代超声原理与应用[M].南京:南京大学出版社,1996.

(责任编辑:李春丽)