

嗜热菌的耐热 L-乳酸脱氢酶的研究*

杨寿钧 蔡妙英 刘俊凤 顾雅君** 王政一 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从广东各地的热温泉(55—95℃)水样中,分离到 200 余株最适生长温度高于 70℃ 的极端嗜热菌。其中一株编号为 HG25, 具有耐热胞内 L-乳酸脱氢酶(L-Lactate dehydrogenase EC. 1.1.1. 27., 简称 LDH), 有栖热菌属(*Thermus*) 的特征, 革兰氏阴性, 无芽孢, 好氧, 不运动, 产黄色素, 最适生长温度为 65—75℃, 最高生长温度为 85℃, 最低为 40℃, 不水解淀粉, 不产葡萄糖酸, DNA 的 G + C 百分含量为 65mol%, L-乳酸脱氢酶经硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素柱层析作了初步提纯, 比活提高 7 倍, LDH 还原丙酮酸反应的最适温度为 60℃, 最适 pH 为 8.0, 酶在 70℃ 稳定, 保温 10 分钟后, 仍保留 85% 的原始酶活力。失活半寿期($t_{1/2}$) 为 85℃ 10 分钟。

关键词 栖热菌属; 耐热 L-乳酸脱氢酶

早在 1969 年 Brock^[1] 从黄石公园的热温泉中分离到最适生长温度高于 70℃ 的水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*), 随后 Oshima 等^[2] 报道了嗜热栖热菌 HB 8 (*Thermus thermophilus* HB8), Zillig 等^[3] 报道了嗜热酸极端厌氧菌嗜热变形菌 (*Thermoproteus*)。近年来对嗜热菌的生理生化、细胞结构、遗传特性等进行了广泛深入的研究^[4]。从嗜热菌中分离提纯了各类不同的酶, 结果表明从嗜热菌中分离的酶比相应的常温菌的酶有更好的热稳定性, 对酸、碱、高温、有机溶剂、蛋白质变性剂等有更好的抗性, 具有极大的应用前景。嗜热菌和耐热酶的研究引起了人们极大的兴趣。

为了开发有应用价值的耐热酶, 我们从广东各地的热温泉水样(55—95℃)中, 分离到 200 余株最适生长温度高于 70℃ 的极端嗜热菌, 通过筛选, 其中一株编号为 HG25, 具有耐热 L-乳酸脱氢酶(L-Lactate dehydrogenase EC. 1.1.1. 27, 简称 LDH) 的活力, 经鉴定为栖热菌属 (*Thermus*)。

本文报道嗜热菌的分离鉴定, 耐热 L-乳酸脱氢酶的初步提纯和性质。

材料和方法

(一) 培养基

1. 基础培养基: (%) 蛋白胨 (pepton) 0.8; 酵母粉 (yeast extract) 0.4; NaCl 0.4, pH 7.0—7.2。

2. 斜面培养基: 在基础培养基中加琼脂粉 2%。

3. 发酵培养基: 蛋白胨 0.3%; 酵母粉 0.3%; 麦芽糖 0.3%; 微量元素溶液 10ml/L, pH 7.0—7.2。微量元素溶液成分(g/L): FeCl₃·6H₂O 19.0, MnCl₂·4H₂O 1.8, Na₂B₄O₇·10H₂O 4.4, ZnSO₄·7H₂O 0.22, CuCl₂·H₂O 0.05, Na₂MoO₄·2H₂O 0.03。

(二) 菌株的来源、分离和鉴定

菌株 HG25 分离自广东热温泉水样中。将新采集的温泉水样 0.5ml 加入到装

本文于 1990 年 8 月 22 日收到。

* 本课题得到国家自然科学基金资助。

** 河北省微生物研究所。

有已灭菌的 3.0ml 基础培养基的试管中,于 70℃ 静止培养 48 小时,稀释涂平板,于 60℃ 培养 72 小时,挑取单菌落作进一步的平板划线分离,通过菌落形态及显微镜检查,得纯化的菌株。菌种鉴定按常规方法^[2],DNA 中 G + C 克分子百分含量测定采用 T_m 法。

(三) 菌的培养

将 HG 25 接种于发酵培养基中,于 65℃ 200 r/min 摇床(NBS 公司)培养 24 小时,4℃ 8000 r/min 离心收集菌体,蒸馏水洗二次,0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 内含 10 mmol/L 2-巯基乙醇溶液洗二次,于 -20℃ 保存,备用。

(四) 酶活力测定

按 Reeves 等人^[4]的方法在岛津 UV-120-02 型自记分光光度计上于 25℃ 测定 NADH 在 340nm 吸光度的降低,取 0.5ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4),0.05ml 0.006mol/L NADH,0.05ml 0.0227mol/L 丙酮酸钠溶液和 0.3ml 蒸馏水,在 25℃ 水浴中保温 10 分钟,加入 0.1ml 酶液,立即记时,并同时测定 340nm 的吸光度,连续测定 3 分钟,以蒸馏水代替酶溶液作空白对照。在上述条件下,每分钟氧化 1μmol 的 NADH 所需的酶量定为一个酶活力单位。

(五) 蛋白质测定

用 Lowry 法^[5],以牛血清白蛋白作标准。

结果和讨论

(一) 菌种鉴定

1. 形态特征:个体形态为革兰氏阴性规则的长杆菌,一般为 0.3—0.5 × 2.0—4.5 μm(干染片)(图 1),无芽孢,无荚膜,无鞭毛,不运动。菌落形态:菌落圆形,表面光滑,凸起,边缘整齐,菌落为黄色,于

60℃ 培养 48 小时后,菌落直径为 1.0 mm 左右。

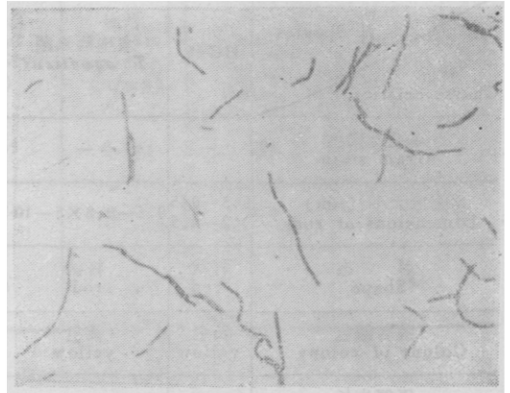


图 1 HG25 的菌体形态 × 1000

Fig. 1 Morphology of strain HG25

2. 生理生化特性:氧化酶阳性,接触酶阳性,不水解淀粉,不液化明胶,不能从葡萄糖产酸,最适生长温度 65—75℃,最高生长温度 85℃,最低 40℃,传代时间为 80 分钟左右。

营养需要:使用 Degryse 的 162 号培养基^[6],以氯化铵作氮源,未见生长。在其中加入葡萄糖;葡萄糖和维生素溶液(包括生物素、对-氨基苯甲酸、菸酸、泛酸钙、维生素 B₆ 和硫胺素);葡萄糖、维生素溶液和谷氨酸。均未见生长。

DNA 的 G + C 含量为 63mol%。

HG25 从形态到生理生化特性和 *Thermus* 属的模式种、水生栖热菌 *T. aquaticus* 和嗜热栖热菌 HB8 *T. thermophilus* HB 8 相似(表 1),但唯一的区别是 HG25 菌株不能在葡萄糖为唯一碳源的培养基上生长和产酸,虽然 *Thermomicrobium* 也不能利用葡萄糖产酸,但 *Thermomicrobium* 产桔红色素,因此 HG25 应归属于 *Thermus* 属。

(二) 酶的部分提纯

取 56g 湿细胞悬浮于 100ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) (内含 10mmol/L 2-

表 1 HG 25 菌株与其近似种的鉴别特征

Table 1 Differential characteristics of HG25 strain and related species

种 Species 特征 Characteristics	HG25	水生栖热菌 <i>T. aquaticus</i>	嗜热栖热菌 <i>T. thermophilus</i> HB8	嗜热微杆菌 <i>Thermomicrobium</i>
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—	—
菌体大小 (μm) Dimensions of rods	0.5—0.5 ×2—4.5	0.5—0.8×5—10	0.5×3.0	1.3—1.8×3—6
形态 Shape	杆状 rod	杆状 rod	杆状 rod	长杆状 long rod
菌落颜色 Colour of colony	黄色 yellow	黄色 yellow	黄色 yellow	桔红色 tangerine
厌氧生长 Anaerobic growth	—	—	—	—
最适生长温度 Optimum temperature	65—75°C	70—75°C	65—72°C	80°C
传代时间 Generation time	80min	50min	18—20min	5—6h
葡萄糖产酸 Produce acid from glucose	—	+	+	—
G+C mol%	63	61—71	69	64

巯基乙醇的溶液)中, 4°C 超声破碎 10 分钟, 超声破碎液在 4°C 15000 r/min 离心 30 分钟, 取上清液作为无细胞粗酶液, 加入固体硫酸铵到终饱和度为 50%, 冰箱放置过夜后, 4°C 15000 r/min 离心 30 分钟, 沉淀用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4 内含 10mmol/L 2-巯基乙醇) 溶解, 并对相同的缓冲液充分透析直到无 NH_4^+ 为止。

透析后的溶液施于预先用上述缓冲液平衡的 DEAE-纤维素 DE32 柱 (1.8 × 49 cm) 进行柱层析, 以 500ml 相同缓冲溶液和 500ml 缓冲溶液含 0.5mol/L NaCl 进行直线浓度梯度洗脱, 流速为 20ml/h, 10 ml 收集一管, 层析在 4°C 条件下进行 (图 2)。粗酶经过上述初步提纯, 比活提高 6.7 倍, 结果列于表 2。用此部分提纯的酶作为样品, 测定了酶的一些基本性质。

(三) 酶的性质

1. 酶作用最适温度: 在不同温度下测

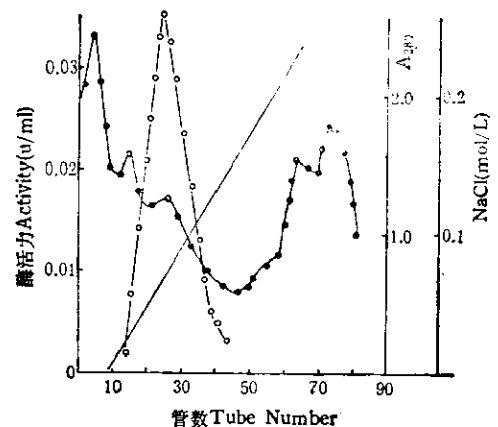


图 2 L-乳酸脱氢酶的 DEAE-纤维素柱层析 ($\phi 1.5 \times 50 \text{cm}$)

○—0.5mol/L NaCl 直线浓度梯度洗脱, 流速 20ml/h, 10ml 收集一管。

Fig 2 DEAE-cellulose DE-32 column chromatography of LDH

●—● A_{280} ; ○—○ 酶活力 Activity;
— 氯化钠浓度 Concentration of NaCl

表 2 LDH 的部分提纯

Table 2 Partial purification of L-lactate dehydrogenase

提纯步骤 Step	体积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	回收率(%) Recovery	
					蛋白 Protein	酶活 Activity
无细胞提取液 Cell-free extract	167	870	5.85	0.003	100	100
50% 硫酸铵沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	34	106	3.74	0.012	16.4	64
DEAE-纤维素层析 DEAE-cellulose chromatography	100	99	2.0	0.020	5.3	54

定 LDH 酶活力,结果见图 3。酶还原丙酮酸反应的最适温度为 60℃。

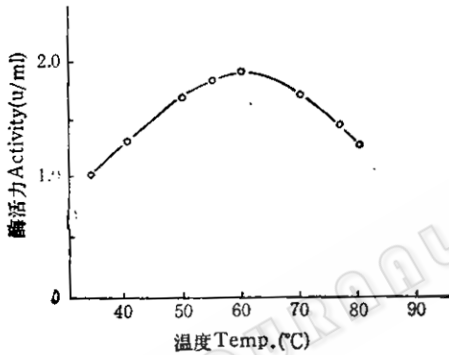


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the LDH activity

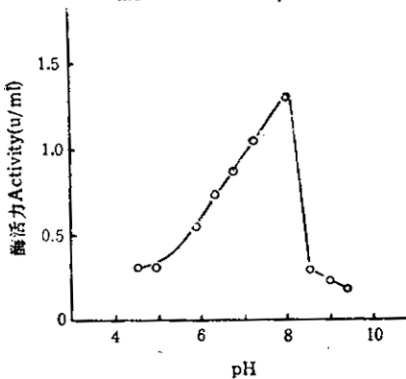


图 4 pH 对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on the LDH activity

2. 酶作用最适 pH: 在不同 pH 值的缓冲液中测定 LDH 活力,结果见图 4。酶作

用的最适 pH 为 8.0。

3. 酶的热稳定性: LDH 与 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 于不同温度下保温 10 分钟, 立即在冰浴中冷却, 在 25℃ 测定剩余酶活力, 以不经保温的酶活力为 100%, 结果见图 5。LDH 有较好的热稳定性, 70℃ 保温 10 分钟仍保留原始酶活力的 85%。失活半寿期 ($t_{1/2}$) 为 55℃10 分钟。

不少作者报道 1,6-果糖二磷酸不仅能激活 LDH 的活力, 而且增强酶的热稳定性^[9-12]。在我们的试验中, 1,6-果糖二磷酸不影响 HG25 的 LDH 活力, 而 NH₄⁺

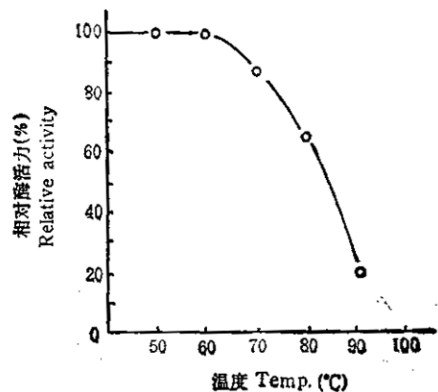


图 5 L-乳酸脱氢酶的热稳定性

Fig. 5 Thermostability of the L-lactate dehydrogenase

在 0.01mol/L 的浓度下对酶有较大的激活作用。NH₄⁺ 的作用尚不清楚, 须进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brock, T. D. et al.: *J. Bacteriol.*, 98: 289--297, 1969.
- [2] Oshima, T. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 102--112, 1974.
- [3] Zillig, W. et al.: *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe C* 2, 205--227, 1981.
- [4] Brock, T. D.: *Thermophiles, General, Molecular and Applied Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1986.
- [5] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978。
- [6] Reeves, W. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 238: 3853, 1963.
- [7] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265--275, 1951.
- [8] Brock, T. D.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. by Krieg, N. R. and Holt, J. G., 1: 533--537, Williams & Wilkins, Baltimore, U. S. A., 1984.
- [9] Weerkamp, A. et al.: *Arch. Microbiol.*, 35: 113--122, 1972.
- [10] Lamed, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 141: 1251--1257, 1980.
- [11] Taguchi, H. et al.: *J. Biochem.*, 91: 1343--1348, 1982.
- [12] Machida, M. et al.: *J. Biochem.*, 97: 899--909, 1985.

STUDIES ON THE THERMOSTABLE L-LACTATE DEHYDROGENASE FROM THERMOPHILIC BACTERIA

Yang Shoujun Cai Miaoying Liu Junfeng Gu Yajun

Wang Zhengyi Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

About 200 strains of extreme thermophilic bacteria were isolated from hot springs in Guandong province. A strain, HG25, was found to produce thermostable intracellular L-lactate dehydrogenase (EC. 1.1.1.27). It has the characteristic of *Thermus* sp.. The cells were gram-negative, nonsporulating, nonmotile, aerobic rods containing yellow pigment. The optimum temperature for growth was between 65°C to 75°C, the maximum 85°C, and minimum 40°C. The generation time at the optimum was about 80 min. Starch was not hydrolyzed. Acid was not produced from glucose. The G+C content in DNA was 62--65mol% (T_m). As the properties of strain HG25 is similar to those of *Thermus aquaticus* and *T. thermophilus* HB 8 belonging to the genus

Thermus.

The thermostable L-lactate dehydrogenase was partially purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE-cellulose column chromatography. For pyruvate reduction, the optimum temperature of the enzyme was 60°C and pH 8.0. After incubation in 0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.4 at 70°C for 10 min, the enzyme retained about 85% of its original activity. The half-life time (t_{1/2}) at 85°C was 10 min.

Key words

Thermus sp.; Thermostable L-lactate dehydrogenase