

爱德华氏菌产乳酸氧化酶的条件研究

许 平 马翠卿 祁庆生 沈亚领 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

提 要 在以前工作的基础上,对已获得的产乳酸氧化酶的 5 株菌进行复筛,对产酶量大的一株菌进行了分类鉴定,确定该菌株属迟钝爱德华氏菌生物群(*Edwardsiella tarda* Biogroup I)。这与曾报道的产乳酸氧化酶分枝杆菌(*Mycobacterium*)和片球菌(*Pediococcus*)是不同的菌。分别研究了培养基中的培养初始 pH、核黄素、乳酸钠以及硫酸铵对发酵产乳酸氧化酶的影响。这一酶源在酶法生产丙酮酸及医疗诊断和酶电极应用上有意义。

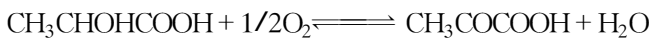
关键词 爱德华氏菌,乳酸氧化酶,产酶条件,丙酮酸

分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0137-40

丙酮酸是许多重要酶促反应的起始物质,如在酚基裂解酶(Tyrosine phenol-lyase)作用下由丙酮酸生成 L-3,4-二羟苯丙氨酸。通过生物催化生产丙酮酸的最佳底物是乳酸^[1]。常规设想通过乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase)催化乳酸变为丙酮酸,但乳酸脱氢酶需要 NAD⁺/NADP⁺ 作为电子受体,NAD⁺/NADP⁺ 不仅价格昂贵,且不易固定,又不易重复使用,使乳酸脱氢酶不能广泛和规模化应用^[2]。曾有人报道在酵母和变形菌(*Proteus*)中发现的乳酸脱氢酶需要高铁细胞色素 C(Ferriocytochrome C)作为电子受体而不要 NAD⁺/NADP⁺,但该酶并不理想^[3-4]。本世纪 50~60 年代,报道了从鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)和草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)中发现两种乳酸氧化酶(Lactate oxidase),它们无需辅助因子即可氧化乳酸^[5-6]。它们催化的反应如下:



Lactate oxidase I



Lactate oxidase II

无疑,乳酸氧化酶 II 是催化乳酸制备丙酮酸理想的酶。在临床医学上乳酸氧化酶 II 也有广泛的应用。1978 年美崎提出乳酸氧化酶系统测定法,1985 年浅沼和子又对其进行改进,协和公司据此配制了商品试剂盒^[7]。1994 年 Berger 等报道了把乳酸氧化酶和辣根过氧化物酶共固定化,用于 L-乳酸的流动注射分析(Flow injection analysis, FIA)^[8]。不论酶法测丙酮酸,还是酶法检测乳酸,均需大量乳酸氧化酶。本实验从筛选到的一株产乳酸氧化酶细菌着手,对该菌进行分类学鉴定,并对该酶发酵产酶条件作了初步探索。

1 材料和方法

1.1 培养基(%)

DL-乳酸钠 1 (NH₄)₂SO₄ 0.5 KH₂PO₄ 0.03 K₂HPO₄ 0.03 MgSO₄·7H₂O 0.01 NaCl

0.5 微量 VB₂ pH7.0。

1.2 细菌培养

把一环经复壮的斜面培养物接种于盛有 50mL 培养基的 300mL 三角瓶中(每菌株接种 2 个摇瓶)在 30℃ 下,摇床转速 200r/min,培养 36h,收集菌体。

1.3 无细菌抽提液的制备

100mL 培养液经 4000r/min、20min 离心弃上清液得菌体,再经 20mL 10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.0)洗涤,再离心把所得到的菌体用 pH7.0 的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液定容至 20mL。摇匀后取 250 μ L 用于浊度测定,用超声波破碎仪(最小功率为 100W,探头振幅 50%)对剩余的菌悬液于冰浴中进行 10s 的破碎。菌悬液经 10000r/min、20min 离心得清液。再经透析(10mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.0, 24h)用于酶活测定。

1.4 菌体浊度测定

将菌悬液 250 μ L 于 3mL 磷酸钾缓冲液中,摇匀后于 660nm 比色,以 10mmol/L 磷酸钾缓冲液作对照。

1.5 酶活测定方法

2,4-二硝基苯肼法(DNP 法)^[9]:取试管依次加入 pH7.0 20mmol/L 磷酸钾缓冲液 1mL, 20mmol/L 乳酸钠溶液 1mL 和酶液 0.2mL,在 37℃ 下精确保温 20min,紧接着加入 1mL 10% HPO₃, 1mL 0.1% DNP,再经 37℃ 保温 10min,加入 1mL 4mmol/L NaOH,冰浴后 510nm 比色。取干净试管加入 1mL pH7.0 20mmol/L 磷酸钾缓冲液, 0.2mL 酶液, 1mL 10% HPO₃,然后 37℃ 保温 20min,紧接着加入 1mL 20mmol/L 乳酸钠溶液, 1mL 0.1% DNP,在 37℃ 保温 10min,加入 1mL 4mmol/L NaOH,冰浴后作对照用。

活力单位规定:1min 催化乳酸生成 1nmol 丙酮酸的酶量为 1 个酶活力单位。

2 结果和讨论

2.1 菌种复筛

对 5 株本室保存的细菌进行复筛,摇瓶培养 36h,菌株 L1 的酶活和比酶活最高,分别达到 91.5 U/mL-broth 和 72.6 U/mg-protein。我们用菌株 L1 作为酶源作以下研究。

2.2 菌种的鉴定

L1 菌株为革兰氏阴性短杆菌。电镜观察该菌大小为 0.8~1.1 μ m \times 0.6 μ m,单个存在,无芽孢。半固体琼脂穿刺培养以及在血球计数器上作菌悬液观察均表明该菌运动,鞭毛染色表明有周身鞭毛,荚膜染色表明该菌无荚膜。在普通细菌培养基上生长良好。兼性厌氧菌。最适生长温度为 37℃。在乳酸盐合成培养基上生长迅速,培养 24h 菌落达到 1mm 左右,菌落圆形,边缘整齐,表面光滑呈乳白色。该菌株的生理特征为:过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性,甲基红阳性,V.P. 阴性,脲酶阴性,硝酸盐还原阳性,利用糖产酸:葡萄糖阳性,木糖阴性,麦芽糖阳性,蔗糖阳性,肌醇阴性,甘露醇阳性,山梨糖醇阴性,乳糖阴性,其它碳源利用:柠檬酸阴性,丙二酸阴性,蛋白反应:产吡啶阳性,液化明胶阴性,苯丙氨酸阳性,产过氧化氢阳性,G+C 含量为 56.6%。根据伯杰氏细菌鉴定手册第八版,同爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)的部分菌株进行了比较,确定 L1 菌株属迟钝爱德华氏菌生物群(*Edwardsiella tarda* Biogroup I)。L1 菌株是产乳酸氧化酶活力较高的一株菌。这

与国外曾报道的分枝杆菌(*Mycobacterium*)和片球菌(*Pediococcus*)产乳酸氧化酶是不一样的菌。L1 菌株产生的乳酸氧化酶不需要辅助因子能发挥催化活性,使乳酸转化为丙酮酸,且产物无过氧化氢产生。这为酶法生产丙酮酸开辟了一条新途径^[10-12],并在医疗诊断和酶电极的应用上有良好的前景。

2.3 培养初始 pH 对菌生长和酶产生的影响

培养初始 pH 在 6.5 到 8.5 之间对菌生长影响不是很大,而对乳酸氧化酶产量的影响较大。生长和产酶均以 pH7.5 时为最好,见图 1。

2.4 核黄素对菌生长和酶产生的影响

核黄素是 NAD^+ 或 NADP^+ 合成的必要成分。在前言中已经指出乳酸氧化酶是一种不需要辅助因子的酶,本实验所得的实验数据更进一步证实了这一点。而且核黄素的存在一定程度上影响着乳酸氧化酶的产量,但影响程度不随核黄素浓度的提高而加重(图 2)。

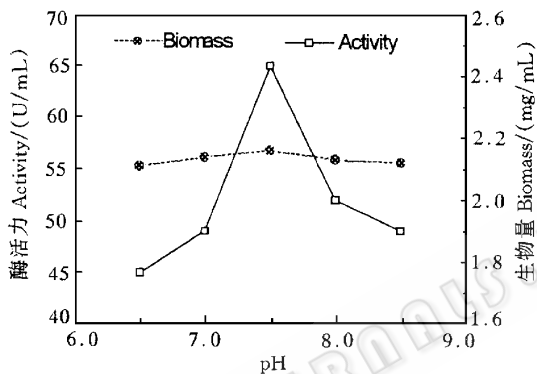


图 1 pH 对乳酸氧化酶产量和菌生长的影响曲线

Fig. 1 Effects of pH on growth and lactate oxidase production of *E. tarda* L1

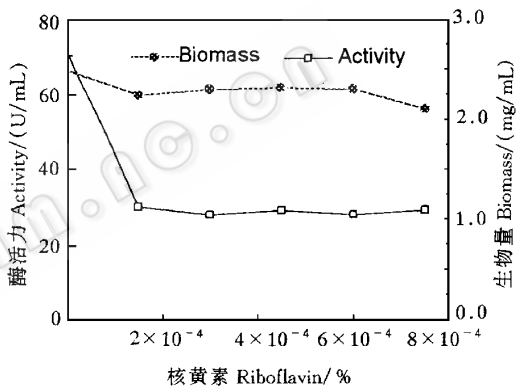


图 2 核黄素对乳酸氧化酶产量的影响

Fig. 2 Effects of riboflavin on growth and lactate oxidase production of *E. tarda* L1

2.5 乳酸钠对菌生长和酶产生的影响

乳酸是菌株的碳源,同时也是菌株产生乳酸氧化酶的诱导物。本实验采用乳酸钠作为实验菌株的碳源。通过实验发现乳酸钠浓度超过 3.5% 以后就影响了菌体生长量。乳酸钠浓度的高低影响乳酸氧化酶的产量。乳酸钠浓度在 4.5% 以下时,乳酸氧化酶的产量随乳酸钠的浓度的提高而提高,当乳酸钠的浓度超过 4.5% 以后,乳酸氧化酶的产量则逐渐下降。具体结果见图 3。

2.6 硫酸铵对菌生长和酶产生的影响

以硫酸铵作为氮源研究了对乳酸氧化酶产量的影响(图 4)。与乳酸钠对乳酸氧化酶产量的影响相似,合适的硫酸铵浓度(0.1%)

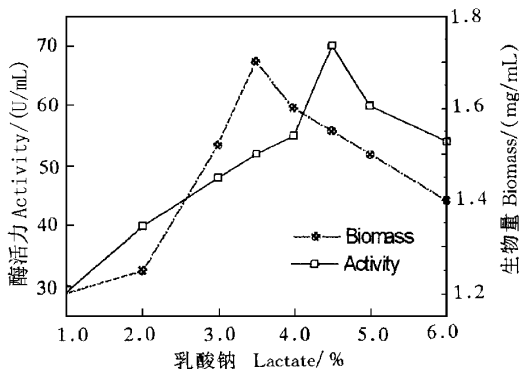


图 3 乳酸钠浓度对乳酸氧化酶产生的影响

Fig. 3 Effects of lactate concentration on growth and lactate oxidase production of *E. tarda* L1

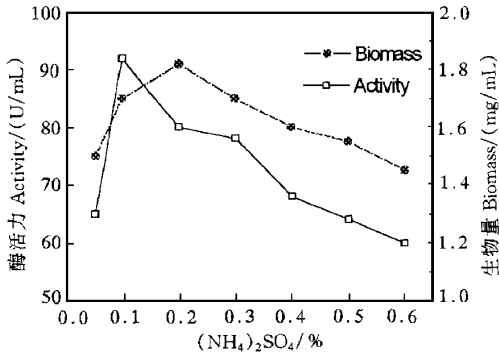


图4 硫酸铵对乳酸氧化酶产生的影响

Fig. 4 Effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on growth and lactate oxidase production of *E. tarda* L1

能使菌株最大限度的产生乳酸氧化酶,高浓度的硫酸铵不利于乳酸氧化酶的产生,在一定程度上抑制乳酸氧化酶的产量。为了最大限度的获得乳酸氧化酶,硫酸铵的浓度不宜过高。

参 考 文 献

- [1] Nagasawa T, Utagawa T, Goto J *et al.* *Eur Biochem*, 1981, **117**: 33~40.
- [2] 陈陶声. 固定化酶理论与应用. 北京: 轻工业出版社, 1987. 143.
- [3] Stolzenbach F. *Methods in Enzymol*, 1966, **9**: 278~288.
- [4] Terry E M, Kaplan N O. *J Biol Chem*, 1986, **243**: 2579~2586.
- [5] Yamamura Y, Kusunose M, Kusunose E. *Nature*, 1952, **170**: 207~208.
- [6] Sutton W B. *J Biol Chem*, 1954, **210**: 309~320.
- [7] 倪星忠. 临床生化酶试剂方法. 上海: 华东师范大学出版社, 1993. 212.
- [8] Berger A, Blum L J. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**: 979~984.
- [9] Tokushige M, Sizer I W. *J Biochem*, 1976, **62**: 719~725.
- [10] Xu P, Yano T, Yamamoto K *et al.* *Annual Reports of ICBiotech* (Osaka Univ Japan), 1993, **16**: 201~214.
- [11] Xu P, Yano T, Yamamoto K *et al.* *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **56**: 277~288.
- [12] Xu P, Yano T, Yamamoto K *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1996, **81**(4): 357~359.

STUDIES ON THE LACTATE OXIDASE PRODUCING CONDITIONS BY *EDWARDSIELLA TARDA*

Xu Ping Ma Cuiqing Qi Qingsheng Shen Yaling Qu Yinbo

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University Jinan 250100)

Abstract A bacterium producing lactate oxidase was re-screened from five strains based on previous researches. The lactate oxidase activity was the highest in strain L1 and this strain was chosen as the enzyme source. Morphological and physiological studies revealed that the bacterial strain L1 belongs to the *Edwardsiella tarda* Biogroup I. This strain is different from the reported strains *Mycobacterium* and *Pedioxoccus*, which produce lactate oxidase. The enzyme producing conditions were studied in shaking cultures and the effects of initial pH, riboflavin, lactate and ammonia sulphate concentrations on the production were carried out respectively. The bacteria resource of enzyme is significant to pyruvate production by enzymatic method and to the enzyme assay of lactate for medical diagnosis and the application of enzyme electronic probe.

Key words *Edwardsiella tarda*, Lactate oxidase, Enzyme producing condition, Pyruvate