

# 米根霉乳酸脱氢酶的特性研究

潘丽军, 余 赟, 郑 志, 姜绍通

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

**摘 要:** 乳酸脱氢酶(LDH)是米根霉发酵生产 L- 乳酸中催化丙酮酸转化成 L- 乳酸过程的关键酶。本研究从米根霉 As3.819 中初步分离出乳酸脱氢酶, 并结合发酵条件对其酶学特性进行了研究。结果表明, 该乳酸脱氢酶的最适反应 pH 为 7.4, 最适催化温度为 30~50℃。Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 对该酶有激活作用, K<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 对该酶有抑制作用。以 NADH 和丙酮酸为底物的米氏常数分别为  $7.22 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  和  $1.24 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

**关键词:** 米根霉; 乳酸脱氢酶; 酶学特性

## Preliminary Study on the Properties of Lactate Dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*

PAN Li-jun, YU Yun, ZHENG Zhi, JIANG Shao-tong

(School of Biotechnology & Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Lactate Dehydrogenase (LDH) is a key enzyme which catalyzes the formation of lactic acid from pyruvic acid during the fermentation with *Rhizopus oryzae*. In this study, the crude LDH extract were obtained from mycelium of *Rhizopus oryzae* As3.819 and its properties were studied. The results show that LDH extract has optimum reaction pH of 7.4 and optimum catalysis temperature of 30~50℃. Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> increase the activity of LDH, but K<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> reduce its activity. The K<sub>m</sub> constants based on the substrates of NADH and pyruvate are  $7.22 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  and  $1.24 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  respectively.

**Key words:** *Rhizopus oryzae* Lactate Dehydrogenase Properties

中图分类号 TQ921.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2003)11-0023-04

乳酸在食品、医药、化学工业、皮革、香料等领域具有广泛的用途。高光学纯度的聚 L- 乳酸是生产 100% 的生物降解包装材料、农用薄膜及生物医学材料的极佳原料<sup>[1]</sup>。米根霉是生产 L- 乳酸的优良菌株, 它具有产乳酸光学纯度高、发酵周期短、菌体生长营养要求简单、能够直接利用淀粉做碳源, 可以使用无机氮源、发酵液含杂质较少且易分离等优点, 因而目前主要用于 L-(+)- 乳酸的发酵生产<sup>[2]</sup>。米根霉发酵属于好氧型发酵, Wright 等人应用 <sup>14</sup>C 放射性同位素标记的方法确定了米根霉体内的代谢网络, 认为葡萄糖通过糖酵解途径生成丙酮酸, 米根霉有两个丙酮酸代谢库, 一个存在于质粒, 其中的丙酮酸进入三羧酸循环, 代谢生成柠檬酸、富马酸; 另一个存在于细胞质内, 可在 LDH 作用下生成 L-(+)- 乳酸。细胞质内丙酮酸也可以代谢生成酒精、苹果酸、富马酸<sup>[3]</sup>。所以, LDH 被诱导的活力大小, 对乳酸发酵过程有很大的影响<sup>[4]</sup>。本文以米根霉发酵甘薯淀粉生产 L-(+)- 乳

酸过程中的菌丝体为对象, 初步提取其 LDH, 研究其酶学特性, 以期为实现对米根霉发酵生产 L- 乳酸的人工调控、菌种选育提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种

米根霉 As3.819, 生物与食品工程学院发酵实验室保藏菌种。

##### 1.1.2 试剂

NADNa<sub>2</sub> (Sigma 产品, 进口分装), 其它试剂均为分析纯或生化试剂。

##### 1.1.3 设备

JY92-II 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; SHY-2A 型水浴恒温振荡器, 江苏金坛市金

收稿日期: 2003-01-30

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(01041302); 安徽省“十五”攻关重点项目(01703003)

作者简介: 潘丽军(1955-), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为食品科学。

城同胜实验仪器厂; YX-450Z 型全自动不锈钢双层立式电热蒸汽压力消毒器 上海三三医疗器械有限公司; 6L-206-II 冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 756MC 紫外分光光度计 上海第三分析仪器厂。

#### 1.1.4 培养基

1.1.4.1 菌种保藏斜面培养基: PDA(马铃薯葡萄糖培养基), 去皮马铃薯 200g, 加 1000ml 蒸馏水煮 30min, 8 层纱布过滤, 取滤液, 加入葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 加热溶化后补足水至 1000ml, 分装后于 121℃ 灭菌 30min。

#### 1.1.4.2 种子培养基

葡萄糖 8g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4g, 甘薯淀粉 2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.044g,  $\text{FeSO}_4$  0.001g, 加 100ml 水, 混匀后装入 100ml 三角瓶, 装液量为 10ml/100ml。32℃, 200r/min, 于水浴摇床内旋转培养。

#### 1.1.4.3 发酵培养基

发酵培养基材料: 甘薯淀粉 150g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.44g。

发酵培养基配制方法: 先将甘薯淀粉放入装有约 800ml 水的容器中, 按 10g:1.5 滴加入淀粉酶, 放在电炉上煮沸 30min, 用纱布过滤后倒入烧杯中, 再加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等, 溶解后, 补足至 1000ml, 分装入 250ml 三角瓶, 装液量为 50ml/250ml。32℃, 200r/min, 于水浴摇床内旋转培养。发酵 24h 后加入单独灭过菌的  $\text{CaCO}_3$  6.5%。

种子培养基和发酵培养基配方及发酵工艺参数均为优化后的数据。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 LDH 的初步提取

取发酵 40h 菌丝体洗涤干净, 压挤水分。称取 6g 湿菌体, 按湿菌体重: 缓冲液体积 = 2:5 加入 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液(pH=7.4), 在超声波细胞破碎仪中冰浴破碎, 然后以 6000r/min 冷冻离心 10min, 取上清液。上清液首先进行硫沉(40% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液, 4℃, 2h), 再将硫沉溶液离心(8000~10000/s, 20min), 得到的沉淀物用 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液(pH=7.4)溶解, 并定容至 10ml 后, 进行透析。透析外液用 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液(pH=7.4), 透析结束即定容至 50ml, 即得到 LDH 的粗酶液。

#### 1.2.2 LDH 活性的测定<sup>[2]</sup>

取 3.5mg 还原型 NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)于试管中, 加 0.1mol/L pH7.5 的磷酸盐缓冲液 1ml 摇匀, 即得 NADH 溶液; 取 2.5mg 丙酮酸钠, 加 0.1mol/L pH7.5 的磷酸盐缓冲液 2.9ml 摇匀, 即为丙酮酸钠溶液。

实验时将丙酮酸钠溶液与 NADH 溶液分别置入 25℃ 水浴中预热。取 2 只光程为 1cm 的石英比色杯, 一只加入 0.1mol/L 的 pH7.5 的磷酸缓冲液 3ml, 放于紫外分光

光度计中, 340nm 处将光吸收值(A)调零; 另一只中加入丙酮酸钠溶液 2.9ml, NADH 溶液 0.1ml, 加盖摇匀后, 测定 340nm 下吸光度值A, 再加入经稀释的酶液 10μl, 摇匀后, 每隔 0.5min 测定 A 值, 连续测定 3min, 以 A 对时间作图, 取反应最初线性部分计算  $\Delta A$  减少值。

$$\text{LDH 活力单位(U/ml 提取液)} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} \times \text{稀释倍数}}{\text{酶液加入量}(\mu\text{l}) \times 10^{-3}}$$

提取液中总 LDH 活力单位 = LDH 活力单位(U/ml) × 总体积

$$\text{酶促反应速度}(\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} \cdot V}{\varepsilon L}$$

V — 酶促反应体积;

$\varepsilon$  — NADH 的毫摩尔消光系数(6.22L/mmol/cm);

L — 比色杯光程;

$\Delta A_{340\text{nm}}$  — 每分钟吸光值的变化值。

#### 1.2.3 LDH 粗酶液的酶学性质研究

研究不同的 pH 值、温度、不同离子浓度条及底物浓度对 LDH 粗酶液活力影响情况。

### 2 结果与分析

#### 2.1 温度对 LDH 活力的影响

温度对酶的催化活力影响很大。LDH 粗酶液在不同温度下保温后测定酶活结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, LDH 粗酶液在 30~50℃ 保温后, 该酶保持有较高的活性, 超过 50℃ 活力迅速降低, 至 80℃ 时丧失活性。这说明米根霉中的 LDH 具有较大的温度适应范围, 其发酵工艺参数中最佳发酵温度为 32℃, 在此温度条件下, 酶活较高, 使得发酵产酸以较高速度进行。

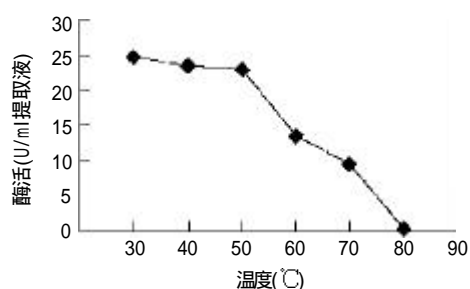


图1 温度对乳酸脱氢酶的活性影响

#### 2.2 体系 pH 值对 LDH 活力的影响

反应介质的 pH 过低或过高对酶的催化不利, 甚至使酶失活。本文测定了 LDH 粗酶液在不同的 pH 磷酸盐缓冲液中酶活力, 实验结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 米根霉 As3.819 含有的 LDH 活性对环境的 pH 值变化较敏感, 在 pH 为 7.4 左右有较高的活性。

#### 2.3 不同离子对活性的影响

在反应体系中加入  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , 考察发酵培养基中的离子对 LDH

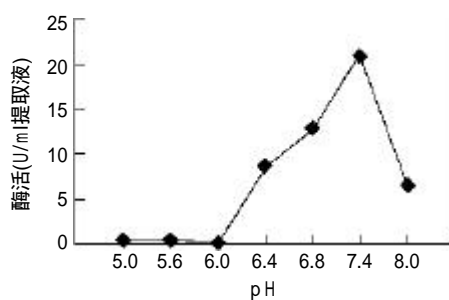


图2 乳酸脱氢酶的最适pH

活性的影响, 及离子浓度变化对酶活性的影响, 其结果如图3所示。由图3可以看出  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对LDH活性有激活作用, 且  $\text{Mg}^{2+}$  激活作用随浓度变化的影响不大。 $\text{Ca}^{2+}$  激活作用随浓度增大而增大。发酵液中加入适量的  $\text{CaCO}_3$  不仅可以调节发酵体系的pH值解除产物的反馈抑制, 而且引入的  $\text{Ca}^{2+}$  从一定程度上激活LDH, 可以加快乳酸的生成速度。

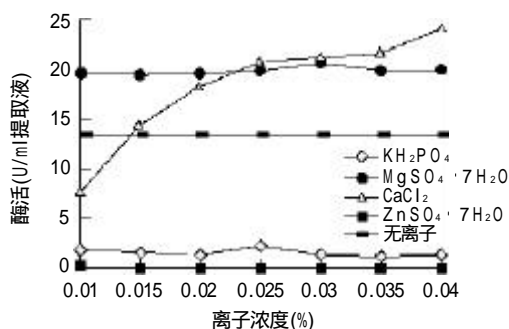


图3 不同离子对LDH活性影响

$\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对LDH有抑制作用, 且这两种离子的抑制作用随离子浓度变化影响不大。培养基中的微量元素是微生物正常生长代谢不可缺少的成分。锌、镁等是某些酶的辅酶或激活剂<sup>[5]</sup>。实验结果表明  $\text{Mg}^{2+}$  对LDH确有激活作用, 但  $\text{Zn}^{2+}$  却抑制了LDH活性, 在发酵体系中它不是LDH的激活剂, 可能是其它关键酶的激活剂。 $\text{K}^+$  影响细胞膜的透性, 实验结果表明  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对LDH有抑制作用, 但在发酵过程中  $\text{K}^+$  是否通过调节细胞的透性激活LDH还要再做进一步的研究。

#### 2.4 底物浓度对酶活性的影响

在不同的NADH浓度下测定酶活力, 结果如图4所示。按Lineweaver-Burk法以  $1/v$  对  $1/[s]$  作图得图5。可求得该酶对NADH的米氏常数  $K_m$  为  $7.22 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

在不同的丙酮酸浓度下测定乳酸脱氢酶的活力, 结果如图6所示。按Lineweaver-Burk法以  $1/v$  对  $1/[s]$  作图得图7。可求得该酶对丙酮酸的米氏常数  $K_m$  为  $1.24 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

由实验所得的米氏常数可以看出, NADH与LDH的亲和力比丙酮酸与LDH亲和力大。因此, 体系中必须有大量的丙酮酸才能使得生成乳酸的速度较快, 所以代谢流应控制朝着生成丙酮酸的方向进行, 以有利于乳酸

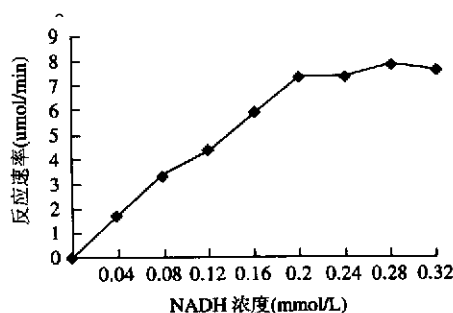


图4 NADH浓度对乳酸脱氢酶活力影响

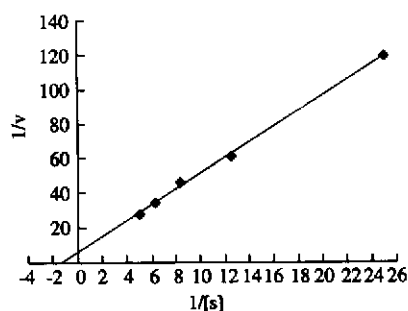


图5 乳酸脱氢酶对NADH的双倒数图

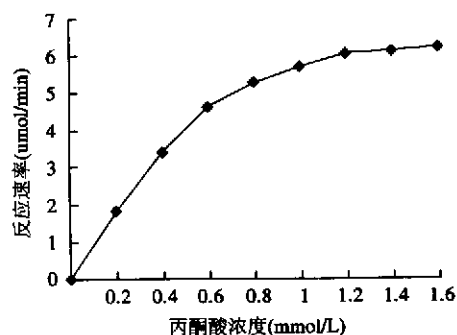


图6 丙酮酸浓度对乳酸脱氢酶活力影响

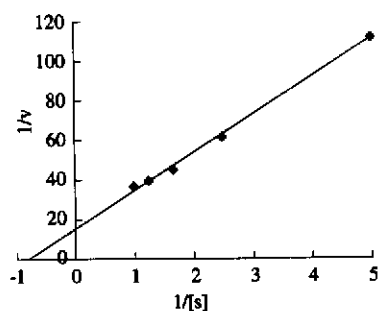


图7 乳酸脱氢酶对丙酮酸得双倒数图

的合成, 这是提高乳酸产量的必要条件。

### 3 结论

从米根霉中得到的LDH粗酶液在  $30 \sim 50^\circ\text{C}$  条件下, 该酶保持较高的活性和稳定性, 但  $50^\circ\text{C}$  后酶活迅速降低。该酶的最适pH为7.4, 且该酶容易被  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  激活, 被  $\text{K}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  抑制。米根霉发酵生成L-(+)-乳酸关

键酶 LDH 的研究有助于阐明这一过程的代谢机理, 为代谢调控提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Mobley D. Plastics from microbes[M]. New York: Hanser/Gardner Publications Inc, 1994. 93-137.
- [2] Christopher D. Skory. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2343-2348.
- [3] Barbara E. Wright, Angelika Longacre and Jacqueline Reimers. Models of Metabolism in *Rhizopus oryzae*[J]. J. theor Biol, 1996, 182: 453-457.
- [4] 江龙法. 米根霉生产 L-乳酸过程中乳酸脱氢酶对发酵产生的影响[J]. 淮海工学院学报. 1999, 8(4): 50-52.
- [5] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001, 69-70.

## 甘薯淀粉 RVA 测定程序初探

黄华宏<sup>1,2</sup>, 陆国权<sup>1\*</sup>, 舒庆尧<sup>1</sup>, 朱玉球<sup>2</sup>

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029 2. 浙江林学院, 临安 311300)

**摘 要** 应用快速粘度仪(Rapid Visco-Analyser, RVA)研究了甘薯淀粉和全粉的糊化在不同测定条件下的表现。发现甘薯样品的 RVA 谱在很大程度上受测定条件的影响, 主要影响因素为: 加热速率、95℃时的保持时间、结束温度保持时间以及剪切效应。另外起始温度保持 0 或 1min 时, 样品最高粘度表现较高。加热时间一般在 4min 或 6min 时, 样品最高粘度能获得最高值。冷却时间和结束温度主要影响最终粘度。冷却时间延长, 样品最终粘度先升高后降低; 而且随着结束温度降低, 最终粘度表现递增。建议甘薯样品的 RVA 分析程序为: 50℃保持 1min, 4min 内加热至 95℃, 95℃保温 5.5min, 同样 4min 内冷却至 50℃, 并最终在 50℃保持 4min。

**关键词:** 甘薯; 淀粉; 全粉; 快速粘度仪; 糊化特性

## Study on Testing Procedure of Rapid Visco Analyser for Sweet Potato Starch

HUANG Hua-hong<sup>1,2</sup>, LU Guo-quan<sup>1</sup>, SHU Qing-yao<sup>1</sup>, ZHU Yu-qiu<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China 2. Zhejiang Forestry College, Linan 311300, China)

**Abstract:** Three sweet potato starches and three sweet potato flours were assayed to a number of different RVA profiles. Significant difference in viscosities was observed with different RVA operating conditions. The most important factors causing these variations were the heating rate, the holding time at 95℃, the final holding time and the shear thinning. In addition, the peak viscosities were kept at high level when initial holding time was zero or one minute. Otherwise the maximum peak viscosity was shown with heating for 4min or 6min. The cooling time and the final temperature were important factors affecting the final viscosity, but the desired conditions for them were dependent on attributes of instrument. A proposal for RVA procedure of sweet potato samples is: to hold at least 1min at 50℃, to heat to 95℃ for 4min, to hold at 95℃ for 5.5min, to cool to 50℃ for 4min, and to hold at 50℃ for 4min.

**Key words:** sweet potato starch; flour; rapid visco-analyser; pasting properties

中图分类号 TS207

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2003)11-0026-05

收稿日期: 2003-03-31 \* 通讯联系人

基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA241181)

作者简介: 黄华宏(1976-), 讲师, 硕士, 研究方向为植物遗传育种。