

文章编号: 1000 5013(2010)05-0548-04

# 短乳杆菌产 NADH 氧化酶的发酵及纯化

陈巍, 林锡煌, 戴丹凤, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 有氧环境下, 利用优化后的发酵培养基, 研究短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)产 NADH 氧化酶(NOX)的发酵条件. 采用8层纱布, 在温度为30℃, pH=7.0, 转速为150 r·min<sup>-1</sup>的条件下发酵培养23 h, 用pH值为5.8的0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸钾缓冲液对细胞进行洗涤悬浮, 超声波破碎(功率为400 W, 超声2 s, 间歇2 s, 破碎12 min)后, 测得其比活力可达2.317 mkat·g<sup>-1</sup>. 通过DEAE Sepharose Fast Flow, Macro-Prep High Q和Hydroxyapatite-I三步纯化后, 其纯化倍数为3.11, 回收率为8.50%.

**关键词:** NADH 氧化酶; 短乳杆菌; 发酵; 纯化

**中图分类号:** Q 554<sup>+</sup>.5

**文献标识码:** A

NADH 氧化酶(NADH Oxidase, EC 1.6.99.3, 简写成 NOX)在微生物中广泛存在, 在氧气存在下, 它可以直接将 NADH 氧化为 NAD<sup>+</sup>, 产物为 H<sub>2</sub>O(称为 NOX-1)或者 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(称为 NOX-2)<sup>[1]</sup>. Cordon<sup>[2]</sup>早在1987年就提出了乳酸细菌中广泛存在 NOX, 在乳酸链球菌中, NOX 可能是首要的有氧代谢酶. 这是因为, 乳酸链球菌里氧气的消耗伴随着 NADH 的减少; NOX 是在有氧条件下诱导产生的. Park 等<sup>[3]</sup>, Yoshitaka 等<sup>[4]</sup>在嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)和菊糖芽孢乳杆菌(*Sporolactobacillus inulinus*)中发现了 NOX-1 活力; 而 Parsonage 等<sup>[5]</sup>, Sakamoto 等<sup>[6]</sup>在乳酸细菌中发现了 NOX-2 活力. NOX 可用于辅酶再生体系. 其中, NOX-1 由于催化反应会生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 易使脱氢酶失活, 若用于再生 NAD<sup>+</sup>, 则需加入过氧化氢酶. 与其他用于辅酶再生的氧化还原酶相比, NOX-2 具有以下3个优点. (1) NADH 以 O<sub>2</sub> 为底物, 所以不需要添加新的底物. (2) 没有副产物产生, 且终产物水不会对与之偶联的酶产生抑制. (3) 产物容易分离. 短乳杆菌属兼性厌氧菌, 是生产 NOX-2 的重要菌株<sup>[7]</sup>, 目前国内尚未见关于该菌种产 NOX 报道. 本文利用优化后的发酵培养基探索 NOX-2 发酵条件, 并进行了纯化.

## 1 实验部分

### 1.1 菌种

短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*), 由中国科学院微生物所提供.

### 1.2 培养基

(1) 种子培养基(1 L): 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 5 g, 醋酸钠 5 g, 牛肉膏 10 g, 磷酸氢二钾 2 g, 硫酸镁 0.2 g, 硫酸锰 0.05 g, 柠檬酸二铵 2 g, 吐温 80 1 g; pH 值自然.

(2) 发酵培养基(1 L)<sup>[8]</sup>: 葡萄糖 30.6 g, 酵母粉 11.9 g, 氯化铵 12 g, 硫酸镁 0.05 g, 磷酸氢二钾 0.3 g; pH=7.0.

### 1.3 主要试剂和仪器

NADH、二硫苏糖醇(DTT)、牛血清白蛋白等(美国 Amresco 公司); DEAE Sepharose Fast Flow(瑞典 Amersham 公司); Macro-Prep High Q, Hydroxyapatite-I(美国 Bio-Rad 公司); JY92-II 型超声波细胞粉碎机(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司); SIGMA-3K30 型高速冷冻离心机(德国 Sigma

收稿日期: 2009 03 12

通信作者: 方柏山(1957), 男, 教授, 主要从事生物化工的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划项目(2006AA020103); 国家自然科学基金资助项目(20676048)

公司); UV-2401(PC) S 型紫外可见分光光度计, TB-85 型恒温水浴装置(日本岛津公司); AKTA Purifier 制备型全自动液相色谱系统(瑞典 Amersham 公司)。

## 1.4 测定方法

1.4.1 酶活力 酶活力的测定参考 Werner 等<sup>[7]</sup>提出的方法并做适当修改。NOX-2 使  $O_2$  氧化生成  $H_2O$ , 同时 NADH 被氧化为  $NAD^+$ 。NADH 在 340 nm 的紫外光下有最大吸收, 根据吸光度的减少情况, 用初速度法可测定 NOX-2 的活力。反应体系中含有  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸钾缓冲液( $\text{pH} = 7.0$ ),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DTT,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NADH。在  $37^\circ\text{C}$  条件下, 加入适量的酶液启动反应, 用紫外可见分光光度计, 测定波长为 340 nm 的吸光度  $D$ , 连续测 1 min, 每隔 6 s 读取数据, 根据酶活力单位计算式计算酶活( $z$ )。有

$$z = \frac{V_t \times \Delta A \times k}{\varepsilon \times V_s} \quad (1)$$

式(1)中,  $V_t$  为反应液总体积;  $V_s$  为酶液体积;  $\Delta A$  为每分钟吸光度变化值;  $k$  为样品稀释倍数;  $\varepsilon$  为摩尔吸光系数( $\varepsilon = 6.3 \text{ L} \cdot (\text{mmol} \cdot \text{cm})^{-1}$ )。酶活力定义: 在上述条件下, 每分钟氧化  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NADH 的酶量为 1 个单位; 酶的比活力的定义: 每毫克蛋白所含酶的单位数。

1.4.2 蛋白质质量浓度 采用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度, 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 绘制标准曲线。

1.4.3 纯化步骤 (1) 按 3 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钾缓冲液( $\text{pH} = 5.8$ )加入 1 g 培养好的 *Lactobacillus brevis* 细胞的比例制备悬浮液, 并加入  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT。经过超声细胞破碎(功率为 400 W, 破碎全程时间为 12 min, 超声 2 s, 间歇 2 s), 并在冷冻离心机( $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )上离心 30 min, 弃沉淀, 得到上清液即为粗酶液。

(2) 将粗酶液上样到已被含  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的 TEA 缓冲液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ , 含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT)平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 填料柱, 再用含  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的 TEA 缓冲液阶跃洗脱, 收集酶活性高的洗脱峰。

(3) 合并经上步洗脱具有较高酶活力的洗脱液, 上样到已被含  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的 TEA 缓冲液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ , 含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT)平衡的 Macro-Prep High Q 填料柱; 然后, 用含  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的 TEA 缓冲液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ , 含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT)阶跃洗脱, 收集酶活性高的洗脱峰。

(4) 合并经离子交换洗脱具有较高酶活力的洗脱液, 上样到已被含  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的磷酸钠缓冲液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 6.7$ , 含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT)平衡的 Hydroxyapatite-I 的填料柱; 然后, 用含  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的磷酸钠缓冲液( $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 6.7$ , 含  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT)阶跃洗脱, 收集酶活性高的洗脱峰。

1.4.4 电泳分析 酶的纯度及相对分子质量测定为不连续十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)法, 采用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵条件对产 NADH 氧化酶的影响

2.1.1 装液量对产酶的影响 采用棉塞, 在温度为  $30^\circ\text{C}$ , 转速为  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下连续发酵 12 h 后, 考察 25, 50, 100 mL 发酵培养基对产 NADH 氧化酶的影响。结果表明, 当装液量为 25 mL 时酶活力最高, 说明溶解氧的提高有利于产酶。

2.1.2 通气条件对产酶的影响 短乳杆菌在好氧条件下产酶酶活较高。在其余条件均相同条件下, 分别用棉塞、6 层纱布、8 层纱布、10 层纱布进行摇瓶发酵培养, 结果如图 1 所示。

由图 1 中可见, 采用 8 层纱布培养菌时产酶活力较高。这可能是由于短乳杆菌作为兼性厌氧菌, 本身对氧气的耐受性有限, 过度的氧通量会对菌体造成毒害作用, 以致对诱导产 NADH 氧化酶也会造成影响。这也预示着在发酵罐培养细胞过程中, 溶氧控制是关键因素。

2.1.3 发酵时间对产酶的影响 采用 8 层纱布, 在温度为  $30^\circ\text{C}$ , 转速为  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 装液量为 50

mL 的条件下进行发酵, 考察发酵时间对产酶量的影响, 结果如图 2 所示. 从图 2 可以看出, 当发酵时间为 23 h 时, 酶活最高, 其值为  $2.317 \text{ mkat} \cdot \text{g}^{-1}$ .

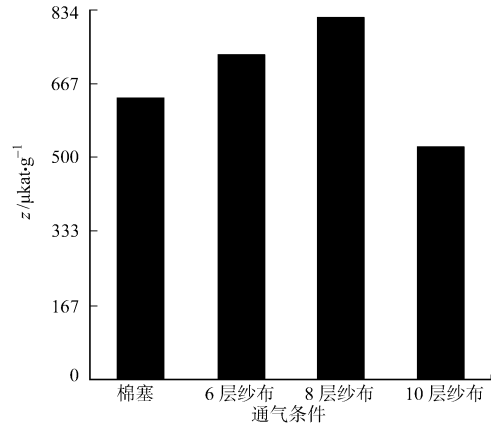


图 1 通气条件对产酶的影响

Fig. 1 Effect of aeration condition on enzyme production

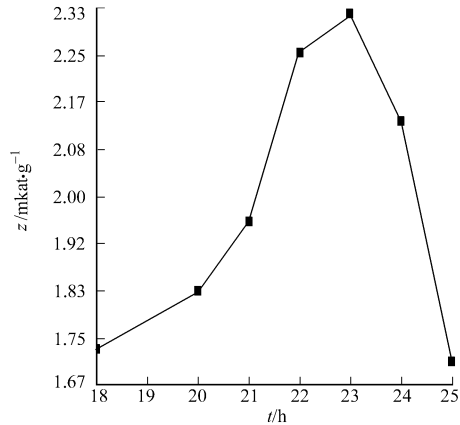


图 2 发酵时间对产酶的影响

Fig. 2 Effect of fermentation time on enzyme production

2.2 NADH 氧化酶的纯化

NADH 氧化酶的纯化过程, 如表 1 所示. 表 1 中,  $z$  为酶活力,  $z_t$  为酶总活力,  $\rho$  为蛋白质质量浓度,  $\sigma$  为比活力,  $\eta$  为回收率,  $n$  为纯化倍数.

表 1 NADH 氧化酶的纯化

Tab. 1 Purification of NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*

项目	$z / \text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$	$z_t / \mu\text{kat}$	$\rho / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\sigma / \text{mkat} \cdot \text{g}^{-1}$	$\eta / \%$	$n$
粗提液	1.085	4.344	1.930	0.562	100.0	1.00
DEAE Sepharose Fast Flow	0.185	2.217	0.170	1.090	51.2	1.94
Macro-Prep High Q	0.090	0.717	0.110	0.813	16.5	1.45
Hydroxyapatite-I	0.035	0.368	0.020	1.750	8.5	3.11

实验中发现, 洗涤和悬浮细胞的缓冲液的 pH 值对粗酶液的酶活测定影响较大. 在其他条件都相同的情况下, 分别用 pH 值为 4.5 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸钠缓冲液, pH 值为 5.8, 7.0 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钾缓冲液对同一批的细胞进行洗涤和悬浮, 然后破碎, 测其酶活. 结果显示, 缓冲液 pH 值为 4.5, 5.8 对酶活的影响相差不大, 而缓冲液 pH 值为 7.0 时, 比活力约为对照组的 1/2.

另外, 在平衡缓冲液和洗脱缓冲液里加入适量的 DTT, 能够减缓纯化过程中酶失活的半衰期. 这可能与酶活性中心存在对  $\text{O}_2$  敏感的基团有关.

收集经 Hydroxyapatite-I 层析所得的活性峰酶液进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示为单一电泳条带, 相对分子质量约为 48 ku, 如图 3 所示. 图 3 中, M 为 Marker, 1~4 分别为粗酶液条带、DEAE Sepharose Fast Flow 层析蛋白质条带、Macro-Prep High Q 层析蛋白质条带、Hydroxyapatite-I 层析蛋白质条带.

3 结束语

短乳杆菌在有氧条件下诱导生产的 NADH 氧化酶(NOX-2), 对于构建辅酶再生体系方面极具潜力. 目前, 国外已经有一些课题组将之用于酶偶联, 并取得了良好的效果<sup>[9-10]</sup>. 通过对一些发酵产 NADH 氧化酶的条件进行优化, 采用 8 层纱布, 在温度为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH= 7.0, 转速为  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下发酵培养 23 h, 测得其比活为  $2.317 \text{ mkat} \cdot \text{g}^{-1}$ . 通过 DEAE Sepharose Fast Flow, Macro-Prep High Q 和

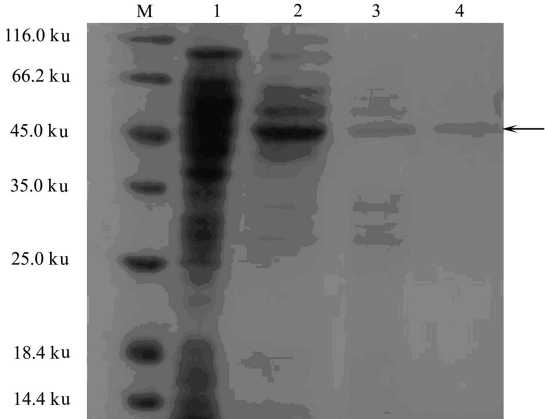


图 3 NADH 氧化酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram weight of NADH oxidase by SDS-PAGE

Hydroxyapatite-I 三步纯化后, 其回收率为 8.50%, 纯化倍数为 3.11. 研究的结果可以为今后构建辅酶再生体系工作奠定基础.

#### 参考文献:

- [1] RONGRONG J, ANDREAS S B. Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (NOX-1) from *Lactococcus lactis* [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15(18): 2939-2944.
- [2] CONDON S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen[J]. FEMS Microbiology Letters, 1987, 46(3): 269-280.
- [3] PARK H J, KREUTZER R, REISER C O A, et al. Purification and characterization of NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 205(3): 881-885.
- [4] NISHIYAMA Y, MASSEY V, ANZAI Y, et al. Purification and characterization of *Sporolactobacillus inulinus* NADH oxidase and its physiological role in aerobic metabolism of the bacterium[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(1): 22-27.
- [5] PARSONAGE D, CLAIBORNE A. Analysis of the kinetic and redox properties of NADH peroxidase c42s and c42a mutants lacking the cysteine-sulfenic acid redox center[J]. Biochemistry, 1995, 34(2): 435-441.
- [6] SAKAMOTO M, KOMAGATA K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(3): 210-216.
- [7] WERNER H, BETTINA R. Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(1): 51-54.
- [8] 林锡煌. NADH 氧化酶的制备与应用初探[D]. 泉州: 华侨大学, 2006.
- [9] FINDRIK Z, ANA V P, VASIC R D. Mathematical modelling of NADH oxidation catalyzed by new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in continuously operated enzyme membrane reactor[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(4): 275-280.
- [10] FINDRIK Z, SIMUNOVIC I, VASIC R D. Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in the reaction of L-amino acid oxidation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39(2): 319-327.

## Fermentation and Purification of NADH Oxidase from *Lactobacillus brevis*

CHEN Wei, LIN Xi-huang,  
DAI Dan-feng, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Researches on fermentation conditions of NADH oxidase (NOX) from *Lactobacillus brevis* were studied in aerobic environment using optimal fermentation medium. Eight layer gauze was used and the *Lactobacillus brevis* was cultured under 30 °C for 23 h, with pH 7.0 and rotation speed 150 r · min<sup>-1</sup>. Then the cells were washed and suspended with 0.1 mol · L<sup>-1</sup> K-PBS and disintegrated for 12 min using an ultrasonic cell disintegrator under 400 W (pulse 2 s, interval 2 s). The final enzymatic activity obtained was 2.371 mkat · g<sup>-1</sup>. In the end, the NOX was purified by DEAE Sepharose Fast Flow, Macro-Prep High Q and Hydroxyapatite-I, a 3.11 purification fold was obtained with the recovery enzymatic activity of 8.5%.

**Keywords:** NADH oxidase; *Lactobacillus brevis*; fermentation; purification

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)