

文章编号:1000-582X(2006)04-0065-04

Acetobacter Z127 乙醇脱氢酶的纯化及酶学性质*

霍丹群¹,张云茹²,侯长军³

(1.重庆大学生物工程学院 教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400030;

2.重庆工学院生物工程学院,重庆 400050; 3.重庆大学化学化工学院,重庆 400030)

摘要:利用自行筛选、鉴定的 *Acetobacter* Z127, 纯化出高活性的乙醇脱氢酶, 并对该酶的生化特性进行了初步研究. 试验表明: 粗酶液通过硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、Sephadex G-100 层析分离, 纯化出一种以 NAD⁺ 为辅酶的 ADH, 经 SDS-PAGE 电泳检测其分子量为 28KDa; ADH 反应的最适 pH 值为 7.0, 最适温度为 60℃, K⁺ 离子对其酶活有促进作用, 二价金属离子对其活性有抑制作用, Fe³⁺ 极易使 ADH 产生沉淀. 研究为 ADH 的应用及其新用途的探索提供了理论基础和可靠的工艺参数.

关键词:乙醇脱氢酶; 醋酸杆菌; 纯化

中图分类号: Q556

文献标识码: A

乙醇脱氢酶(ADH)是广泛专一性的含锌金属酶, 以 NAD 为辅酶, 催化伯醇和醛之间的可逆反应^[1]. 此酶广泛存在于人和哺乳动物的肝脏、植物组织及微生物细胞. 近年来, 随着有机相催化和膜反应器的发展, 该酶的应用研究主要包括以下几个方面: 1) ADH 生物电极和乙醇生物传感器, 用于工业分析乙醇浓度^[2]. 2) 利用 ADH 催化特性, 应用于化工中生产许多原材料及中间反应物. 3) 伴随生物技术和酶工业的发展, ADH 被作为新的实验材料, 开展各种新的研究. 比如: 酶固定化研究、新型微生态解酒剂的开发等. 总之, ADH 的研究已经成为研究热点之一, 正被广泛应用于医学分析、工业生产和科学研究等方面.

目前, 天然的 ADH 难以获得, 大多是从动物的肝脏中提取, 其资源有限, 价格昂贵且不适合于大规模生产. 为了拓展 ADH 的来源, 国内外科学工作者探索从微生物细胞中提取 ADH. 国外在此方面做了大量工作. 国内李夏兰等^[3]报道了酵母细胞中提取 ADH 新工艺. 廉德君等^[4]从酵母中纯化出 ADH, 并进行了较深入的研究. 但从醋酸杆菌中纯化 ADH 在国内目前还没有报道.

实验从自行分离、鉴定的 *Acetobacter* Z127 中提取、纯化得到大量的高活性 ADH, 并对其生化特性进行了初步研究. 这就为探讨从微生物中分离纯化 ADH 新工艺和研制 ADH 新产品提供了基础材料和理论

依据.

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 重庆大学生物工程学院微生物实验室筛选鉴定 (*Acetobacter* Z127).

主要试剂: 丙稀酰胺溶液、N, N-甲叉双丙稀酰胺、SDS、过硫酸胺、TEMED(四甲基乙二胺)、Tris 碱、溶菌酶、苯甲基磺酰氟(PMSF)、辅酶 I 等购自北京鼎国生物公司. Sephadex G-100 为华美生物工程公司产品. 蛋白 Marker 购自 MBI 生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备

将菌种接种于牛肉膏培养基^[5], 37℃、160 r/min 振荡培养 12 h, 转接至同成分培养基中, 同条件培养至对数期, 取发酵液 4℃、5 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 用蒸馏水冲洗 2 次, 按体积比(细胞/裂解液)1:3 加入细菌裂解液, 37℃温育 1 h, 将样品置于冰上 10 min, 4℃下 10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清即 ADH 粗提液.

1.2.2 硫酸铵分级沉淀

在粗酶液中边搅拌边加入硫酸铵粉末达到 40% 饱

* 收稿日期: 2005-11-28

作者简介: 霍丹群(1965-), 女, 重庆市人, 重庆大学副教授, 博士, 主要从事微生物工程与生化工程研究.

和度,室温静置 30 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 去除部分杂蛋白沉淀. 然后, 将上清液分成 6 份, 分别加进固体硫酸铵, 至溶液中不再出现絮状沉淀. 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 即得到盐析粗酶.

1.2.3 透析浓缩

盐析粗酶以固液比 1:3 溶于 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, 并用蒸馏水透析 48 h, 至透析液中无沉淀为止. 用 BaCl_2 检查有无 SO_4^{2-} . 同时, 计算不同硫酸铵饱和度下的 ADH 酶活力和回收率.

1.2.4 葡聚糖凝胶过滤层析

将透析后的 ADH 酶液加入经生理盐水平衡过的 Sephadex G-100 凝胶柱上, 进行凝胶过滤层析. 用 pH 8.0、20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 测定酶活力峰的酶活.

1.2.5 总蛋白含量的测定

根据凯氏定氮法原理, 利用自动蛋白分析仪 SYNCHRON(CX5 DELTA 型)测定菌体中总蛋白含量. 方法为: 1) 在消化管中分别加入 5 mL 样品和 0.5 g 催化剂, 70 °C 加热 2 h 并缓慢加入浓硫酸, 直至消化液变为淡绿色; 2) 消化液在自动蛋白分析仪上进行蒸馏、盐酸滴定; 3) 计算总蛋白含量.

1.2.6 酶活性测定和分子量测定

1) ADH 活性测定——瓦勒-霍赫法^[6]

将 1.5 mL 焦磷酸钠缓冲液, 0.50 mL 底物溶液和 1.0 mL 辅酶 I 溶液加入试管, 于 37 °C 恒温水浴 20 min. 加入同条件浴热的酶液 0.10 mL, 立即记时. 在连续 5 min 内, 每隔 1 min 读取 340 nm 处的吸光度, 直至每分钟吸光度增大值达到稳定为止.

2) ADH 分子量测定——SDS-PAGE^[7]

配制分离胶 T=15%, 浓缩胶 T=4%. 染色液: 考马斯亮蓝 R250 0.25 g, 溶于 45 mL 蒸馏水, 加甲醇 45 mL, 冰乙酸 10 mL. 脱色液: 冰乙酸 7.5 mL, 甲醇 10 mL, 蒸馏水 82.5 mL. 取 25 μL 酶液进行 SDS-PAGE 电泳.

1.2.7 ADH 的酶学性质

1) 温度对 ADH 活性的影响

将纯化后的酶液分别于不同的温度 (20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C) 下测定 ADH 活性, 绘制酶活力-温度曲线, 确定酶促反应的最适温度.

2) pH 对 ADH 活性的影响

配制 pH 为 3.6~5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液, pH 为 6.0~8.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液, pH 为 9.0~10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 将酶液与不同 pH 值的缓冲液在已确定的最佳温度下保温 20

min, 绘制酶活力-pH 值曲线, 确定 ADH 的最适 pH 值.

3) 金属离子对酶活性的影响.

配制终浓度为 5.0 mmol/L 的不同金属盐化合物, 将含不同金属离子的缓冲体系分别与 ADH 酶液在最适温度下保温 20 min 后, 测定不同金属离子对 ADH 酶活力的影响, 以不加金属离子的酶液作为对照.

2 结果与分析

2.1 纯化结果

2.1.1 硫酸铵分级沉淀

不同硫酸铵饱和度下, 透析得到 ADH 酶液, 测定酶活力, 结果如表 1.

表 1 不同硫酸铵饱和度(A)时的 ADH 酶活

A/%	50	60	65	70	75	80
酶活/U · mL ⁻¹	75	163	285	1 395	1 302	1 023

从表 1 中可以看出: 硫酸铵饱和度为 70% 时, ADH 活性最高, 表明 ADH 在 70% 以上饱和度时沉淀才较充分. 为使 ADH 尽量完全沉淀, 又减少杂蛋白含量, 选择 70% 的硫酸铵饱和度为 ADH 的最适沉淀点.

2.1.2 Sephadex-G100 过滤层析

将 70% 硫酸铵沉淀后透析 ADH 酶液加入 Sephadex-G100 层析柱过滤, 洗脱时在 280 nm 波长检测洗脱液的吸光度, 洗脱液呈现 1 个显著的蛋白峰, 收集蛋白峰处第 45 管到 60 管的洗脱酶液, 合并后测定其酶活力高达 1 118 U, 蛋白含量为 0.83 mg, ADH 比活力较纯化前大大增加. 结果如图 1 所示.

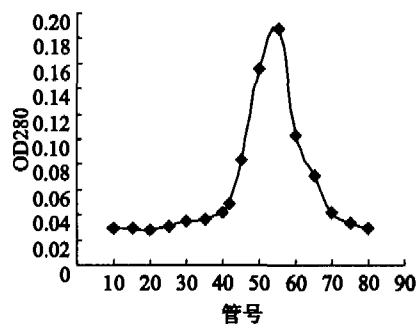


图 1 透析酶液 ADH Sephadex-G100 凝胶过滤结果

以上各步 ADH 分离提纯的结果见表 2.

表 2 不同阶段 ADH 分离纯化结果

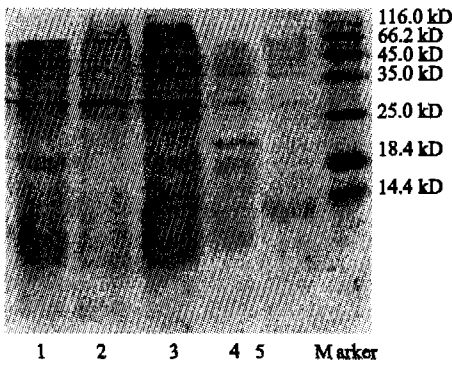
阶段	蛋白含量 /mg	总活力 /U	比活 /U · mg ⁻¹	纯化倍数	收率/%
ADH					
粗提液	6.94	2 325	335.01	1	100
硫酸铵盐析	3.43	1 891	551.31	1.65	81.33
凝胶过滤层析	0.83	1 118	1 346.99	5.49	48.09

由图 1 和表 2 可看出:ADH 粗酶液经硫酸铵分级分离、SephadexG - 100 层析柱过滤,ADH 比活力从 335.01 U/mg 提高到 1 346.99 U/mg,纯化倍数为 5.49 倍,回收率达 48.09%.

2.2 酶的部分性质

2.2.1 分子量测定

分别取 ADH 粗提液、硫酸铵分级沉淀透析后的 ADH 酶液、SephadexG - 100 柱层析洗脱酶液进行 SDS - PAGE 电泳.电泳结果如图 2 所示.



1. 70% 硫酸铵沉淀透析后的酶液; 2. 凝胶过滤层析洗脱酶液; 3. ADH 粗酶液; 4. 65% 饱和度硫酸铵沉淀透后酶液; 5. 60% 饱和度硫酸铵沉淀透析后酶液

图 2 纯化过程中 ADH 的 SDS - PAGE 电泳

从图 2 可以看出:纯化前后的 ADH 酶液电泳后都有一条共同的特异蛋白带,其分子量为 28 KDa 左右.因此确定 *Acetobacter* Z127 的 ADH 主要是胞内酶,分子量约为 28 KDa.与现有报道 ADH 分子量 30 KDa 比较接近.

2.2.2 pH 对酶活性的影响

将测定 ADH 活性的缓冲液换成不同 pH 的缓冲液,测定不同 pH 对 ADH 活性影响,绘制酶活力—pH 曲线,结果如图 3 所示.

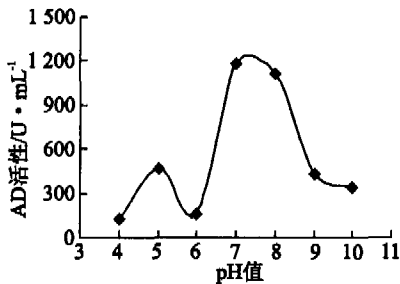


图 3 pH 对 ADH 活力的影响

从图 3 可以看出:*Acetobacter* Z127 中的 ADH 的最适 pH 为 7.0,不同于已经报道的马肝 ADH、酵母 ADH (最适 pH 为 8.6 ~ 9.0);pH = 6.0 时,ADH 的活性有一个拐点,可能因为该 pH 接近其等电点、ADH 变性所致;pH = 5.0 时,出现一个酶活性峰,证明该 ADH 可以在酸性环境中催化乙醇代谢,为缓解醉酒者胃中过量

乙醇引起肝损伤提供了新思路.

2.2.3 温度对酶活性的影响

将 ADH 酶液分别于不同温度下保温 20 min,用 0.01 mol/L pH = 7.0 的缓冲液配制测定 ADH 活性的反应体系,测定 ADH 活力,绘制酶活力—温度曲线(如图 4 所示).

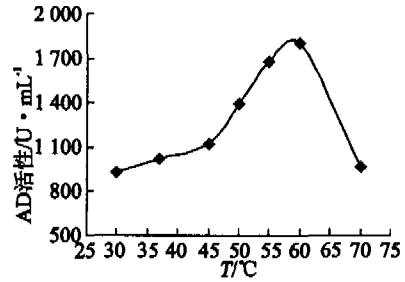


图 4 温度对 ADH 酶活力的影响

从图 4 可知,温度从 30 °C 升高到 60 °C,ADH 活力在增加,70 °C 时,ADH 活力迅速下降,表明 *Acetobacter* Z127 中的 ADH 促进乙醇氧化的最适温度为 60 °C.同时也表明此微生物来源的 ADH 可以耐高温.与已经报道的马肝和酵母 ADH 最适反应温度(分别为 20 °C 和 25 °C)也不相同.其分子量、最适 pH 和最适温度分析,可推测该 ADH 可能为一种新的乙醇脱氢酶同工酶.有待进一步验证.

2.2.4 金属离子对酶活性的影响

由于金属离子带有不同的电荷,因而可以改变酶的活性中心位点,从而影响酶的活力.分别配制含有不同金属化合物的缓冲体系,测定对应体系的 ADH 酶活.比较各种金属离子对 ADH 活性的影响.结果如表 3 所示.

表 3 各种金属离子对 ADH 活力的影响

蒸馏水	酶活/U · mL ⁻¹	影响程度
	682	对照
K ⁺	713	+
Cu ²⁺	558	—
Ca ²⁺	651	—
Zn ²⁺	682	无
Mg ²⁺	310	---
Mn ²⁺	217	---
Fe ³⁺	—	---

注: + 为促进;—为抑制;---为严重抑制

由表 3 可看出:一价的 K⁺ 对 ADH 酶活性有促进作用;二价金属离子对 ADH 均有不同程度的抑制作用,其中尤以 Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 的抑制作用较严重,分析可能是严重影响酶的构象造成活性降低. ADH 在 Fe³⁺ 溶液中极不稳定,产生沉淀,ADH 受抑制.作为含 Zn²⁺ 的金属酶——ADH,Zn²⁺ 对 ADH 活性没有显著的影响,可能因为它与 ADH 结合,对酶的最佳活力构象起稳定

作用.原因还有待进一步证实.

3 讨论

随着我国工业化程度的提高和人们对健康的重视,乙醇脱氢酶的用途和催化降解乙醇的特性正不断被人们认识,并大量应用于工业、农业、医学等领域.

笔者在自行分离选育具有 ADH 活性的醋酸杆菌——*Acetobacter* Z127 基础上,成功提取到高活性的 ADH,避免了从动物肝脏提取 ADH 的复杂操作和受资源短缺的限制.提取的 ADH 经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀分离、Sephadex - G100 过滤层析,得到电泳纯的 ADH. 经过 SDS - PAGE 分析得到 ADH 单体蛋白,分子量约为 28 KDa. 同时,还进行了 ADH 部分酶特性探索,得到其最适 pH 为 7.0 左右,最适温度为 60 °C, K^+ 离子对其酶活有促进作用,二价金属离子对其均有不同程度的抑制作用.结果表明:该酶是一种耐酸、耐高温胞内金属酶,具有潜在的应用价值.

对醋酸杆菌 ADH 的研究,拓展了微生物 ADH 的来源,为大量工业化提取 ADH 提供了基础材料和科学

依据.同时,为开发微生物解酒药,提供了新的思路和方法.

参考文献:

- [1] CHEN DONG-HWANG, LIAO MIN-HUNG. Preparation and Characterization of YADH-bound Magnetic Nanoparticles [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 16: 283 - 291.
- [2] 吕跃刚,王际彰. 酵母乙醇脱氢酶电极研究[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(4): 218 - 219.
- [3] 李夏兰,蔡婀娜. 温和化学渗透法破碎酵母细胞的研究[J]. *药物生物技术*, 2000, 7(1): 23 - 27.
- [4] 廉德君,李林. 酵母醇脱氢酶 ADHI 的纯化及动力学研究[J]. *生物化学及生物物理学报*, 1996, 28(4): 396 - 403.
- [5] 黄秀梨. *微生物实验指导* [M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [6] B·施特尔马赫. *图书馆目录* [M]. 北京:中国轻工业出版社,1992.
- [7] 郭尧君. *蛋白质电泳实验技术* [M]. 北京:科学出版社,1999.

Purification of Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter* Z127 and Parts of Its enzymatic property

HUO Dan-qun¹, ZHANG Yun-ru², HOU Chang-jun³

- (1. College of Bioengineering, Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering of Under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China;
2. Bioengineering Institute of Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China;
3. College of Chemistry and Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Using the *Acetobacter* Z127 which is separated and selected by ourselves, we obtained the purified and High ADH activity *Acetobacter* alcohol dehydrogenase (ADH). Especially, we studied its bio-chemical property. The results showed: By using Sephadex G - 100 filtration chromatography and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, we got the purified 28KDa homogeneous ADH strap; Its optimum pH value and temperature is 7.0 and 60 °C, Respectively K^+ has a stimulative effect and divalent metal ion has a restrain effect on ADH. It is highly unstable in Fe^{3+} solution. In a Result, this research provided credible gists for the application and the new using exploration of the alcohol dehydrogenase.

Key words: alcohol dehydrogenase; acetobacter; purification