

从微生物细胞提取 ADH 的探讨*

李夏兰 蔡婀娜

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 讨论了从醋酸杆菌发酵中提取 ADH(乙醇脱氢酶)以及从酵母细胞中提取 ADH 的可能性. 在一定的 pH 及酶解时间内, 醋酸杆菌细胞内 ADH 活性很低, 而酵母细胞内 ADH 活性相对较高.

关键词 醋酸杆菌, 酵母菌, 乙醇脱氢酶, 提取

分类号 Q 554.9

ADH 是一种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. 近年来, 随着有机相酶催化和膜反应器的发展, 该酶得到广泛的研究和应用^[1]. 醋酸杆菌在中性或酸性条件下氧化乙醇成乙酸, 乙醇是良好的碳源, 醋酸杆菌好氧, 属化能异养菌. 乙醇脱氢酶主要应用于医学分析、工业生产和科学研究等方面. 目前, ADH 的获得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的工作^[2,3], 国内未见从微生物细胞提取 ADH 新工艺的报道. 本文探讨了从微生物细胞提取 ADH 的可能性.

1 材料与仪器

1.1 试剂

溶菌酶(美国, SIGMA 试剂); 牛血清蛋白(上海长阳生化制药厂, 电泳纯); 辅酶 NAD.

1.2 主要仪器

CPS-1 型超声波破碎器(上海超声波仪器厂); LG-10 型离心机(北京医疗器械厂).

1.3 菌种与培养基

1.3.1 菌种 醋酸杆菌(中科院菌种保藏中心); 酵母细胞(泉州清源啤酒厂).

1.3.2 醋酸杆菌斜面培养基 酒液 100 mL; 葡萄糖 0.3 g; 酵母膏 1 g; 碳酸钙 2 g; 琼脂 2~2.5 g; pH 自然.

1.3.3 醋酸杆菌发酵培养基 葡萄糖 1 g; 碳酸钙 1.5 g; 酵母膏 1 g; 水 100 mL.

2 实验方法

2.1 ADH 的测定

采用瓦勒-霍赫法^[4]进行测定. 在 340 nm 下测量 ADH 转化乙醇为乙醛时吸光度的变化.

* 本文 1996-09-10 收到; 福建省自然科学基金资助项目

一个 ADH 活性单位(u)定义为 25℃, pH 8.8 时, 每 min 还原 1 μmol NAD 所需的酶量.

2.2 蛋白质含量的测定

采用双缩脲法测定.

2.3 酶解法细胞破碎

(1) 发酵液经离心得湿细胞, 蒸馏水洗涤两次, 悬浮于 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山梨醇溶液中, 湿细胞浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

(2) 将悬浮液和已配好的溶菌酶溶液(4 mg 溶菌酶溶于 0.5 mL, pH 8.8 的 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液)按 100 : 1 的比例混合, 加入巯基乙醇使其浓度为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 室温放置.

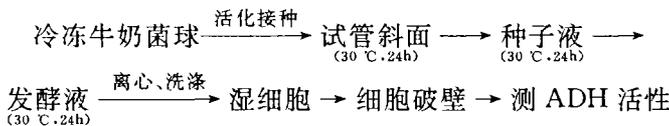
(3) 混合物离心($11\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)15 min.

(4) 将沉淀物溶于 pH 8.8 缓冲液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇).

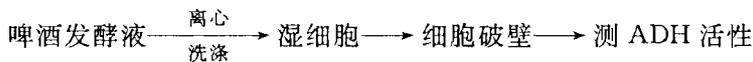
(5) 将上述混合物离心($11\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)30 min 得上清液, 测细胞破碎前后上清液 ADH 单位及总蛋白含量.

2.4 提取 ADH 简易流程图

(1) 醋酸杆菌发酵提取 ADH 流程图



(2) 啤酒酵母细胞提取 ADH 流程图



3 结果与讨论

3.1 醋酸杆菌细胞内 ADH 活性测定

选用中科院菌保藏中心拥有的不同亚种的 12 支醋酸杆菌株进行发酵, 得细胞提取 ADH, 并测定酶解法细胞破碎前后蛋白质的变化, 结果见表 1.

表 1 微生物细胞内 ADH 活性的测定^①

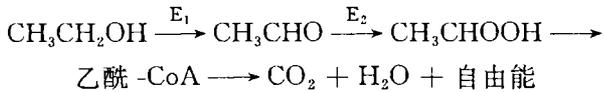
菌 株	AS 1.23	AS 1.41	AS 1.36	AS 1.109	AS 1.54	AS 1.34	
$\Delta P/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2.200	2.800	3.810	2.470	4.560	2.450	
ADH 活性/ $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.017	0.000	0.000	0.025	0.089	0.074	
菌 株	AS 1.30	AS 1.52	AS 1.93	AS 1.61	AS 1.27	AS 1.53	酵母细胞
$\Delta P/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2.100	4.010	1.710	3.540	2.750	1.210	4.571
ADH 活性/ $\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.004	0.000	0.104	0.017	0.017	0.058	4.290

① ΔP 为菌体细胞破壁前后蛋白质的增大值; 酶解法的酶解时间为 1 h, pH 8.8; 菌株代号所示菌株名称参见文[5]

菌体破碎前后溶液中总蛋白增大, 说明菌体细胞已经破碎, 释放出酶、蛋白质和核酸等细胞内含物. 但是, 所有醋酸杆菌菌株发酵所得细胞 ADH 活性极低, 而酵母细胞 ADH 活性相对

较高.

乙醇在醋酸杆菌内的代谢途径如下



式中 E_1 是醇脱氢酶(或是氧化酶); E_2 是醛脱氢酶. 中山竹义从有的醋酸杆菌菌株中成功地分离出了高纯度的氧化酶, 并对其结构以及在物质代谢途径中所起的作用进行了全面详细的研究^[6]. 由于在此实验条件下, 中科院菌种保藏中心拥有的醋酸杆菌发酵所得细胞 ADH 含量极低, 因此, 在上述乙醇的代谢途径中, 催化反应的 E_1 可能是醇氧化酶, 而不是醇脱氢酶.

3.2 pH 对 ADH 活性的影响

不同来源的 ADH 其结构不一, 与醇作用的活性部位不同, 因此, ADH 催化醇脱氢的最适 pH 不同, 即 pH 对 ADH 活性影响也很大. 溶菌酶法破碎细胞(酶解时间 1 h)在不同 pH 下测 ADH 活性, 结果表明在 pH 5.0~8.8 下 12 支醋酸杆菌 ADH 活性很低, 而酵母细胞 ADH 活性相对较高, 最高可达 $4.412 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$. 以 6 支醋酸杆菌为例, 实验结果见表 2 所示.

表 2 pH 对 ADH 活性的影响($\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$)

pH	AS 1.23	AS 1.41	AS 1.36	AS 1.109	AS 1.54	AS 1.34	酵母细胞
5.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.701
6.0	0.000	0.000	0.000	0.032	0.074	0.008	4.091
7.8	0.009	0.000	0.000	0.049	0.089	0.109	4.412
8.8	0.017	0.000	0.000	0.025	0.089	0.074	4.290

3.3 破壁时间对 ADH 活性的影响

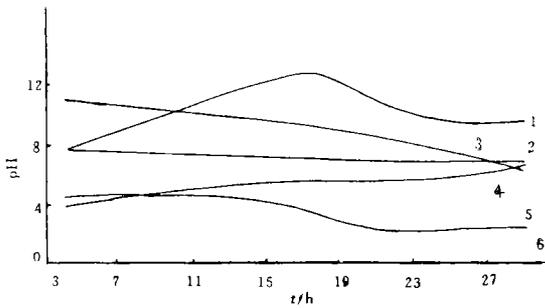
细胞破壁时间(t_1)长短不同, 细胞的破壁程度不同, 同时细胞内含物被破坏的程度也不相同. 溶菌酶法破碎细胞(pH 8.8)每隔 1 h 酶解时间测量 ADH 活性, 结果表明在 8 h 酶解时间内, 12 支醋酸杆菌 ADH 活性很低, 酵母细胞内 ADH 含量较高, 最高可达 $4.574 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$. 以 6 支醋酸杆菌为例, 实验结果见表 3 所示.

表 3 pH 对 ADH 活性的影响($\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$)

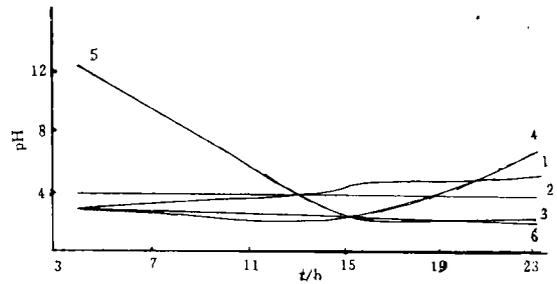
t/h	AS 1.23	AS 1.41	AS 1.36	AS 1.109	AS 1.54	AS 1.34	酵母细胞
1.0	0.017	0.000	0.000	0.025	0.089	0.074	4.291
2.0	0.017	0.000	0.000	0.025	0.087	0.074	4.341
3.0	0.017	0.000	0.000	0.024	0.091	0.089	4.574
4.0	0.010	0.012	0.000	0.031	0.082	0.025	4.202
5.0	0.012	0.014	0.007	0.020	0.078	0.025	4.013
6.0	0.009	0.000	0.000	0.017	0.042	0.024	4.074
7.0	0.000	0.000	0.001	0.009	0.012	0.000	4.054
8.0	0.000	0.000	0.002	0.007	0.004	0.000	4.002

3.4 醋酸杆菌代谢曲线

醋酸杆菌的菌株进行发酵时, 从开始起每隔培养时间(t_2)4 h 测定原糖、氨基氮、总磷、pH 和 ADH 活性, 绘制代谢曲线. 发酵过程有醋酸产生, C、N、P 和 pH 代谢正常, 但发酵过程所得细胞 ADH 活性很低. 以 AS 1.41、AS 1.36 两支菌株为例, 代谢曲线如附图所示



(a) AS 1.41



(b) AS1.36

附图 菌株代谢曲线图

1. P; 2. pH; 3. N; 4. HAc; 5. C; 6. ADH

4 结束语

中科院菌种保藏中心提供的醋酸杆菌无法作为生产乙醇脱氢酶的出发菌株. 从微生物细胞得到 ADH 可以从酵母中提取, 有关详细研究将另文发表.

参 考 文 献

- 1 Godbote S S. Effect of modifying agents on immobilized alcohol dyhydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 26(5):544~545
- 2 Adachi O, Miyagawa E, Shingawa E, et al. Particulate alcohol dehydrogenase of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, 42(12):2 331~2 340
- 3 Tayama K, Fukaya M, Okumnra, et al. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* Sp. nov.. *Appl. Microbio. Biol.*, 1989, 32:181~185
- 4 施特尔马赫. 酶的测定方法. 钱嘉渊译. 上海:上海科学技术出版社, 1991. 14~19
- 5 中国微生物菌种保藏委员会编. 中国菌种目录. 北京:中国轻工业出版社, 1983. 49~50
- 6 有机酸发酵工艺学编写组编. 有机酸发酵工艺学. 北京:中国轻工业出版社, 1988. 421~426

Extracting Alcohol Dehydrogenase from Cells of Microbes

Li Xialan Cai Ana

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract A study is made on the possibility of extracting alcohol dehydrogenase from the fermentation by *Acetobacter* and from yeast cells. Within a fixed pH and zymolysis time, alcohol dehydrogenase from *acetobacter* shows a low activity, while that from yeast cells shows a higher activity.

Keywords *acetobacter*, yeast cells, alcohol hydrogenase, extraction