

文章编号:1009-038X(2004)06-0033-05

## (R)-1-苯基-1,2-乙二醇脱氢酶的纯化及酶学性质

徐小琳, 穆晓清, 徐岩\*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 高压匀浆破碎近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCCM203011)得酶粗提液, 经乙醇沉淀、DEAE-Sephacel 离子交换层析、SuperdexG-75 凝胶层析及亲和(Cibacron Blue 3GA)层析纯化得到以  $\text{NADP}^+$  为辅酶的醇脱氢酶, SDS-PAGE 电泳鉴定为单一条带, 纯化后比活力提高 20 倍。HPLC 凝胶柱层析法检测相对分子质量为 45 000, SDS-PAGE 电泳测得相对分子质量为 43 000, 表明该酶为单亚基结构。以 (RS)-1-苯基-1,2-乙二醇(简称苯乙二醇)为底物, 该酶最适反应温度为 45℃, 最适反应 pH 值为 8.0。金属离子中  $\text{Mg}^{2+}$  对酶活的有一定激活作用。以纯酶催化转化消旋体苯乙二醇, 该酶优先选择(R)型对映体为底物。

**关键词:** 近平滑假丝酵母; 醇脱氢酶; 纯化; 苯乙二醇

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

### Purification and Characterization of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol Alcohol Dehydrogenase

XU Xiao-lin, MU Xiao-qing, XU Yan\*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Alcohol dehydrogenase (ADH) from *Candida parapsilosis* CCTCCM203011 was purified to homogeneity within four steps, including DEAE-Sephacel, SuperdexG-75 and Cibacron Blue 3GA chromatography. The molecular weight and subunit weight estimated by HPLC and SDS-PAGE were 45 000 and 43 000 respectively, indicating that the ADH was a monomer. The maximal activity was obtained at 45 °C and pH 8.0. With the existence of  $\text{Mg}^{2+}$ , the enzyme activity was increased. In the resolution reaction, the enzyme showed the high selectivity of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from racemate.

**Key words:** *Candida parapsilosis*; alcohol dehydrogenase; purification; phenyl ethanediol

$\text{NADP}^+$  依赖型(R)-苯乙二醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase 简称 ADH), 可逆催化醇的氧化脱氢反应生成醛或酮, 催化过程中以辅酶  $\text{NADP}^+$  为氢载体( $\text{RCH}_2\text{OH} + \text{NADP}^+ = \text{RCHO} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ ). ADH 多为胞内酶, 存在于胞液和线粒

体上, 在微生物代谢中起重要作用<sup>[1]</sup>. 同时 ADH 还是生物合成手性物质重要催化剂, 特别是微生物来源的氧化还原酶, 催化不对称转化反应, 具有高度底物、区域、位点和立体选择性, 用来合成手性物质前景广阔<sup>[2]</sup>. 从啤酒酵母、*Nocardia fusca* 及

收稿日期: 2004-02-16; 修回日期: 2004-05-13.

基金项目: 江苏省高技术研究计划(BG2002320)资助课题.

作者简介: 徐小琳(1976-), 女, 山东即墨市人, 讲师, 发酵工程硕士研究生; \* 通讯联系人.

Rhodococcus sp. 等微生物中已经分离纯化出醇脱氢酶, 它们的酶学性质如底物特异性、所需辅酶等方面都不尽相同<sup>[3~5]</sup>. 因此针对目标产物需要选择相应催化特性的脱氢酶.

高光学纯的苯乙二醇对映异构体是医药合成的重要手性中间体, 并且可作为液晶材料的重要手性添加剂<sup>[6]</sup>. 本实验室已报道近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCCM203011)具有催化外消旋体苯乙二醇去消旋的能力, 产品中(S)-苯乙二醇光学纯度(e. e. 值)大于99%, 产率在90%以上. 以全细胞催化转化消旋体苯乙二醇时, 产物中(S)-苯乙二醇一半来自原消旋体, 另一半经(R)-苯乙二醇转化得到, 转化过程中有中间体羟基苯乙酮生成<sup>[7]</sup>.

为了解催化转化此过程的酶, 作者在上述工作的基础上, 主要对近平滑假丝酵母中醇脱氢酶的提取、纯化及其部分酶学性质进行了研究. 通过纯化, 得到NADP<sup>+</sup>依赖型醇脱氢酶, 该酶仅选择性催化(R)-苯乙二醇的氧化. 因此在转化过程中还需要另一个氧化还原酶催化酮基的还原.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌种、培养基及试剂** 菌种: 近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCCM203011); 本实验室专利菌种; 培养基成分: 组分(g/L) 葡萄糖 40.0, 酵母膏 5.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8, NaCl 0.1, pH 7.0; 主要试剂: (R), (S)-苯乙二醇: 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; (RS)-苯乙二醇: 购于北京化学试剂公司; 辅酶: 购于北京经科宏达生物技术有限公司; 牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250、丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)等购自中国医药集团上海化学试剂公司; 层析介质: Pharmacia 公司产品.

**1.1.2 主要仪器** Akata Explore-100 蛋白层析系统: 瑞典安发玛西亚公司生产; UV2102 紫外可见光分光光度计: 上海尤尼科公司生产; 冷冻干燥机: 英国 Labconco 公司生产; 高压细胞破碎仪: FA-078-E1, 美国热电公司生产; 低温高速离心机: 日本日立公司生产; 电泳仪: 英国 Bio-Rad 生产; 高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司生产.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞的培养** 挑取近平滑假丝酵母接种到装液量为体积分数 10% 的 250 mL 摇瓶中, 30 ℃ 150 r/min 振荡培养 24 h 后接种到 3 L 培养基中,

30 ℃ 150 r/min 培养 48 h. 收集培养液离心(8 000 r/min, 10 min), 所得菌体用生理盐水洗涤两次. -20 ℃ 冷冻保藏.

#### 1.2.2 分离纯化

1) 酶粗提液的制备 冷冻保藏的菌体解冻, 以预冷的 20 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液(下同)稀释成菌悬液, 高压匀浆(15 000~20 000 r/min)破碎两次, 破碎后的细胞碎片悬浊液在 4 ℃, 10 000 r/min 离心 1 h, 得酶粗提液.

2) 乙醇沉淀 酶粗提液中逐滴加入等体积的乙醇(-20 ℃ 预冷), 冰水浴中持续搅拌 30 min, 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清, 用缓冲液将沉淀复溶后离心(条件同上), 弃去沉淀, 所得上清液用作下步分离.

3) DEAE-Sephacel 离子交换柱层析 所得粗酶上 DEAE 柱(1 cm×20 cm), 以磷酸盐缓冲液平衡柱, 体积流量为 2 mL/min, 0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 将活性分部收集, 透析后冻干浓缩, 用于下步分离.

4) SuperdexG-75 凝胶柱层析 冻干的酶粉于缓冲液中复溶, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 10 min 去除不溶物质, 上 SuperdexG-75 凝胶柱(1.6 cm×60 cm)分离, 磷酸盐缓冲液(加入 0.2 mol/L NaCl)洗脱, 体积流量为 0.4 mL/min. 活性分部收集, 透析后冻干浓缩, 用于下步分离.

5) 亲和(Cibacron Blue 3GA)柱层析 将冻干的酶粉于缓冲液中复溶, 离心(条件同上)去除不溶物质, 上亲和柱(1 cm×5 cm), 磷酸盐缓冲液体积流量 0.3 mL/min 洗去未吸附组分后, 加入 5 mmol/L 辅酶 NADP 的缓冲液洗脱, 将活性分部收集, 透析浓缩后, 用电泳法检测酶的纯度.

**1.2.3 蛋白质质量浓度的测定** 蛋白质的质量浓度由 Bradford 检测法确定. 以牛血清蛋白为标准蛋白, 于 595 nm 处测定吸收度值, 得蛋白质质量浓度与吸收度之间的关系, 获得样品蛋白质质量浓度对照标准曲线<sup>[8]</sup>.

**1.2.4 氧化还原酶酶活的测定** 酶活测定依据 Vallee&Hoch 法<sup>[9]</sup>. 取 1 cm 的比色皿, 加入 0.2 mol/L pH 8.0 的 Tris/HCl 缓冲液, 3 mmol NADP<sup>+</sup>, 适量的酶液, 45 ℃ 保温 2 min, 加入 0.1 mol/L 苯乙二醇, 在 340 nm 下测定吸光度的变化.

酶活定义: 在上述条件下, 每分钟催化还原 1 μmol NADP<sup>+</sup> 的酶活力为 1 个酶活单位(U).

**1.2.5 SDS-PAGE 电泳** 以考马斯亮蓝 R-250 染色液, 相对分子质量标准为: 兔磷酸化酶 97 400, 牛

血清白蛋白 66 400, 兔肌动蛋白 43 000, 牛碳酸酐酶 31 000, 胰蛋白酶抑制剂 21 100, 鸡蛋清溶菌酶 14 400<sup>[10]</sup>.

**1.2.6 HPLC 凝胶分离** 凝胶柱 Kw-803(德国 E-MERCK Science, Shodex 凝胶填料, 8 mm×300 mm), 分析条件: pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(25 mmol/L), 体积流量 0.72 mL/min, 室温下 280 nm 检测. 相对分子质量标准为: 谷氨酸脱氢酶 290 000, 乳酸脱氢酶 142 000, 烯醇酶 67 000, 腺苷酸激酶 32 000, 细胞色素 C124 000.

**1.2.7 酶促转化反应** 0.5 mL pH 8.0 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L)反应体系中, 加入 3.5 mmol 苯乙二醇, 辅酶 2.5 mmol 的 NADP<sup>+</sup> 和纯酶适量, 在 30 ℃ 振荡反应 6 h, 由乙酸乙酯萃取后 0.45 μm 滤膜(Milli-pore, 美国)过滤. 在一定色谱条件下取 10 μL 进样测定, 高效液相色谱条件见参考文献[7].

**1.2.8 最适 pH 和最适反应温度的测定** 分别在 pH 为 6.5 至 10.0 的反应体系中, 在 35 ℃ 测定不同 pH 条件下氧化反应的酶活力; 在最适 pH 条件下, 测定氧化反应在 20~60 ℃ 的酶活力.

**1.2.9 热稳定性及不同 pH 下稳定性的研究** 将未加底物的反应体系在不同温度(30~60 ℃)保温 30 min 后, 测定酶活力的变化情况, 测定方法同上; 将酶贮存缓冲液调整为不同 pH 3~12, 在 4 ℃ 贮存 120 h 后测定酶活力的变化, 测定方法同上.

**1.2.10 金属离子对酶活的影响** 分别配制含有金属离子的 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 金属离子浓度为 2 mmol/L. 以该含有不同金属离子的缓冲液作为反应缓冲液, 测定酶活力(方法同上), 考察不同金属离子对酶活的影响.

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化结果

细胞破碎后, 不同种类的酶蛋白、核酸等杂质也混杂在酶粗提液中, 干扰分离纯化. 实验中粗酶经过乙醇沉淀、离子交换、凝胶层析和亲和层析 4 步纯化过程, 酶活提高 20 倍, 电泳得到单一区带. 经各步纯化的结果见表 1.

2.2 纯化酶的部分生化性质

**2.2.1 酶催化反应的最适 pH 和温度** 在不同的 pH 值下测定酶催化氧化苯乙二醇的活力, 酶催化反应的最适 pH 值为 8.0, 在 pH 7.5~8.5 该酶可保持 75% 以上的酶活力(见图 1). 酶促反应的最适温度为 45 ℃, 随着温度的升高, 酶活力也逐渐升高, 但是当温度高于 50 ℃ 后, 酶活力显著下降(见图 2).

表 1 近平滑假丝酵母脱氢酶的纯化  
Tab. 1 Purification of alcohol dehydrogenase from *Candida parapsilosis* CCTCCM203011

| 步骤                        | 总蛋白<br>质量/mg | 总活力/<br>U | 比活力/<br>(U/mg) | 产率/<br>% |
|---------------------------|--------------|-----------|----------------|----------|
| 粗酶                        | 2887.64      | 346.51    | 0.12           | 100      |
| 乙醇沉淀                      | 962.31       | 269.45    | 0.28           | 77.76    |
| 阴离子交换层析<br>DEAE-Sephacel  | 269.84       | 83.65     | 0.30           | 24.14    |
| 凝胶层析<br>SuperdexG-75      | 55.64        | 25.03     | 0.45           | 7.22     |
| 亲和层析<br>Cibacron Blue 3GA | 0.33         | 0.78      | 2.35           | 0.23     |

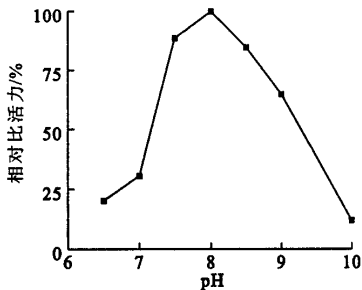


图 1 酶反应的最适 pH

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity

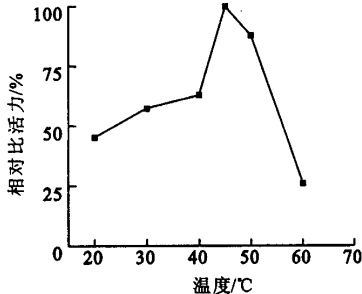


图 2 酶反应的最适温度

Fig. 2 Effect of temperature on enzyme activity

**2.2.2 热稳定性及不同 pH 条件下的稳定性** 由图 3, 4 可以看出, 经过 30 min 保温后测定的酶活力与原有酶活力比较, 在 50 ℃ 以下保温的酶活损失不大, 可保持原有活力的 70% 以上, 说明该酶能耐受一定的温度变化, 但是与嗜热微生物 (*Bacillus stearothermophilus*) 来源的醇脱氢酶比较, 该酶的热稳定性并不高<sup>[11]</sup>. 在不同 pH 下贮存一段时间测定结果发现, 该酶在 pH 6~9 的缓冲液中储存都较为稳定, 120 h 后可以保存原有酶活力的 80% 以上, 但是当 pH 大于 10 时, 酶活力显著下降.

**2.2.3 酶的相对分子质量** 亲和层析后收集的酶活性分部进行 SDS-PAGE 电泳(见图 5 所示), 电泳

结果聚丙烯酰胺凝胶上显示一条蛋白质带。根据标准相对分子质量与迁移率作图,该酶亚基相对分子质量为 43 000。酶活性分部经过 HPLC 凝胶柱分离检测,对照标准相对分子质量,估计样品相对分子质量在 45 000,确定该酶为单一亚基。与其它微生物来源脱氢酶比较,大小有所差异,如细菌(*Bacillus stearothermophilus*, *Nocardia fusca*, *Saccharomyces cerevisiae*)及面包酵母离纯化所得脱氢酶为 120 000~150 000 的四聚体<sup>[4,9,11,12]</sup>。

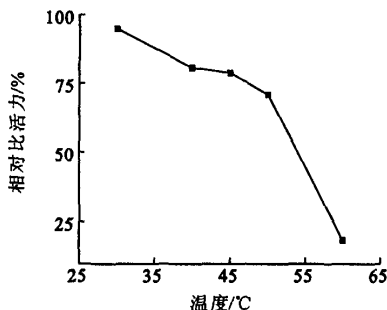


图 3 酶的热稳定性

Fig. 3 Stability of enzyme activity in different temperatures

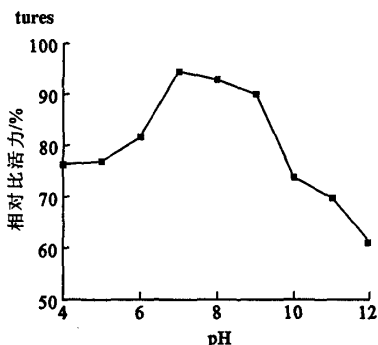


图 4 酶在不同 pH 值下的稳定性

Fig. 4 Stability of enzyme activity in different pH

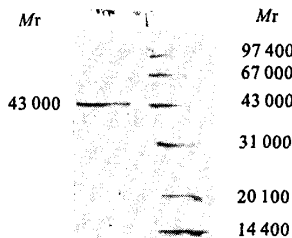


图 5 SDS-PAGE 电泳测定 ADH 的亚基相对分子质量

Fig. 5 Subunit molecular weight of alcohol dehydrogenase by SDS-PAGE electrophoresis

2.2.4 酶催化转化能力 以外消旋苯乙二醇为底物,经纯酶催化氧化后,产物高效液相图谱如图 6 所示,该酶优先选择(R)对映体作为底物。谢学胜等从 *Nocardia* 中分离纯化所得醇脱氢酶,以苯乙二

醇为底物时,选择性催化外消旋体中(S)对映体的氧化<sup>[4]</sup>。而从 *Candida* 属的酵母中纯化得到的多种 NAD(P)H 羰基还原酶,可将各种酮、醛和酯类物质作为底物,选择性还原羰基生成手性醇<sup>[13~15]</sup>。

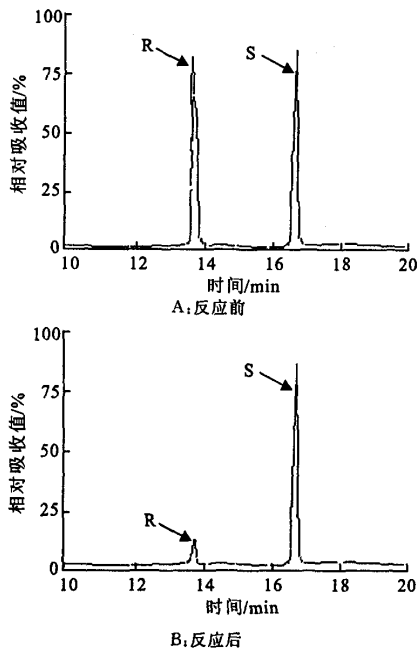


图 6 转化反应产物分析

Fig. 6 Analysis of resolution production by HPLC

2.2.5 金属离子对酶活的影响 醇脱氢酶为金属酶,金属离子对于酶活的高低都会产生一定的影响。在反应中醇脱氢酶多需要  $Zn^{2+}$  参与,如表 2 所示,金属离子  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $AgNO_3$ ,  $HgSO_4$  等对酶活的影响都有一定的影响。在金属离子中,添加  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  等离子,其酶活明显高于其他金属离子。而重金属离子,如  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$  等在添加后引起酶蛋白的变性失活,致使酶活明显下降。 $Zn^{2+}$  的添加并没有使得酶活显著提高,原因可能是酶已经结合有一定的  $Zn^{2+}$ ,重新加入后离子浓度增加,在一定浓度下,对酶活反而有抑制作用<sup>[7,12]</sup>。添加金属螯合剂 EDTA,酶活有一定下降,说明该酶需要某些金属离子作为激活剂才能有较高的催化活力。

2.2.6 脱氢酶辅酶依赖性 反应中加入辅酶  $NAD^+$  时酶活未检测出,而  $NADP^+$  可作为催化反应的辅酶,因此该脱氢酶催化苯乙二醇氧化反应所依赖的辅酶为  $NADP^+$ 。该酶以(R)-苯乙二醇作为反应的底物时,其酶活力明显高于反应底物为(S)对映体时的酶活力,说明该酶在立体选择性氧化外消旋苯乙二醇的反应中优先催化氧化(R)-苯乙二醇(见表 3)。

表 2 金属离子对酶活的影响

Tab. 2 Effects of various metal ions on crude enzyme activity

| 添加化合物             | 酶相对比活力/% | 添加化合物             | 酶相对比活力/% |
|-------------------|----------|-------------------|----------|
| —                 | 100      | MnSO <sub>4</sub> | 133.8    |
| EDTA              | 88.21    | CoCl <sub>2</sub> | 79.55    |
| ZnSO <sub>4</sub> | 58.71    | AgNO <sub>3</sub> | 25.98    |
| CuSO <sub>4</sub> | 76.2     | HgSO <sub>4</sub> | 14.44    |
| MgSO <sub>4</sub> | 173.7    |                   |          |

注:—为不加金属离子或整合剂。

表 3 *C. parapsilosis* CCTCCM203011 醇脱氢酶催化氧化的辅酶依赖性及立体选择性Tab. 3 Cofactor requirement and stereospecificity in the oxidation catalyzed by Alcohol dehydrogenase from *C. parapsilosis* CCTCCM203011

| 辅酶                | 比活力/(U/mg)                  |                             |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                   | (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol | (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol |
| NAD <sup>+</sup>  | —                           | —                           |
| NADP <sup>+</sup> | 2.350                       | 0.049                       |

注:—为未检出。

### 3 结 论

1)通过 4 步纯化过程,从 *Candida parapsilosis* CCTCCM203011 中分离纯化得电泳纯的醇脱氢酶,相对分子质量为 43 000~45 000,为单亚基结构。该酶催化所需的辅酶为 NADP<sup>+</sup>。所得到的纯酶进行转化实验,通过高效液相色谱测定产物,该酶选择性催化氧化外消旋苯基乙二醇中的 (R)-苯乙二醇,反应后 (S) 对映体的量并没有变化,说明该酶无法完成两步转化反应,在该转化过程中还需要另一种酶的催化。

2)*Candida parapsilosis* 来源醇脱氢酶催化苯乙二醇氧化反应的最适 pH 值为 8.0,最适温度为 45℃。该酶在 pH 6~9 范围内较为稳定,在 50℃ 以下的温度相对较为稳定。金属整合剂及重金属离子会对该酶的活力产生抑制作用,但 Mg 离子对酶有一定的激活作用。

### 参考文献:

- [1] Uttaro A D, Oppendoerfer F R. Purification and characterisation of a novel iso-propanol dehydrogenase from *Phytomonas* sp [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997,85: 213-219.
- [2] Devaux-basseguy R, Bergel A, Comtat M. Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey[J]. *Enzyme and Microb. Technol.*, 1997,20(3):248-258.
- [3] 廉德君,李林,许根俊. 酵母醇脱氢酶 ADH1 的纯化及动力学研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1996,4(28):396-403.
- [4] Xie S X, Ogawa J, Shimizu S. NAD<sup>+</sup>-dependent (S)-specific secondary alcohol dehydrogenase involved in stereoinversion of 3-pentyn-2-ol catalyzed by *Nocardia fusca* AKU2123[J]. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 1999,63(10):1721-1729.
- [5] Kreit J, Elalami A. Substrate characterization of a NAD-dependent secondary alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. GK1(CIP105335) [J]. *J Molec Catal B:Enzymatic*, 2002, (19-20):253-259.
- [6] Hasegawa J, Masahiro O, Satoru T, et al. High-yield production of optically active 1,2-diols from the corresponding racemates by microbial stereoinversion[J]. *Agric Biol Chem*, 1990,54(7):1819-1827.
- [7] 聂尧,徐岩. 全细胞近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) SYB-1 不对称转化苯基乙二醇[J]. *过程工程学报*, 2003, 3 (1):80-85.
- [8] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. 42-47.
- [9] Stellamach B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊(译). 北京:中国轻工业出版社,1992. 14-19.
- [10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2000. 132-146.
- [11] Guagliardi A, Martino M, Iaccarino I, et al. Purification and characterization of the alcohol dehydrogenase from a Novel Strain of *Bacillus stearothermophilus* growing at 70℃ [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999,28 (2): 239-246.
- [12] Cabrera N, Rangel P, Hernandez M R, et al. Purification of alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica* and *Saccharomyces cerevisiae* using zinc-affinity chromatography[J]. *Protein Expression and Purification*, 1997,10:340-344.
- [13] Peters J, Minuth T, Kul M R. A Novel NADH-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from *Candida. Pariposilosis*[J]. *Enzyme Microb Technol.*, 1993,15:950-958.
- [14] Kataka M, Yukiko D, Sim T S, et al. A Novel NADPH-dependent carbonyl reductase of *Candida macedoniesis*: purification and characterization[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992,294(1):469-474.
- [15] Wada M, Kawabata H, Kataka M, et al. Purification and characterization of an aldehyde reductase from *Candida magnoliae*[J]. *J Molec Catal B:Enzymatic*, 1999,6:333-339.

(责任编辑:杨 萌)