

嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 中乙醛脱氢酶的纯化

彭 惠¹, 毛忠贵¹, 武国干², 邵蔚蓝^{1, 2}

(1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

(2 南京师范大学微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 研究了嗜热厌氧乙醇菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) JW 200 中乙醇代谢途径的关键酶之一乙酰 CoA 依赖型的乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase ALDH, EC 1.2.1.10) 的纯化。结果表明, 经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析、两次为 30% 与 80% 硫酸铵盐析和相应盐浓度的 Butyl-HC 疏水层析、TOYOPEARL HW-55F 分子筛层析等提纯步骤, 可得到电泳纯的 ALDH, 其提纯倍数为 910 倍, 得率为 7%。由 SDS-PAGE 和梯度 PAGE 测得全酶由 4 个亚基组成, 全酶相对分子质量为 360 000, 亚基相对分子质量为 100 000。

[关键词] 乙醛脱氢酶, 嗜热厌氧乙醇菌, 纯化

[中图分类号] Q 556 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2007)01-0078-04

Purification of Acetaldehyde Dehydrogenase From *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200

Peng Hui¹, Mao Zhonggui¹, Wu Guogan², Shao Weilan^{1, 2*}

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

(2 The Key Laboratory of Microbial Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Acetaldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) which is one of the key enzymes of the alcohol metabolic pathway was purified from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200 through following steps: ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose Fast Flow, ammonium sulfate fractionation with saturation 30% and hydrophobic interaction chromatography on Butyl-HC, ammonium sulfate fractionation with saturation 80% and hydrophobic interaction chromatography on Butyl-HC, gel filtration on TOYOPEARL HW-55F. The purified enzyme showed a single band on SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis with a purification of 910 fold and a yield of 7%. The molecular weight of the subunit and the whole enzyme were estimated by SDS-PAGE and gradient PAGE as 100 000 and 360 000 respectively.

Key words acetaldehyde dehydrogenase, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, purification

0 引言

乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase ALDH) 广泛地存在于真核生物和原核生物中, 根据对辅酶的依赖性可以分为 3 类^[1]: (1) CoA 非依赖型, 需要 NAD(P)^+ , 广泛分布于动物、植物、酵母和细菌中; (2) CoA 依赖型, 不需要 NAD(P)^+ , 存在于一些细菌中; (3) 酰化 CoA 依赖型, 需要 NAD(P)^+ , 仅在几种细菌、一种绿藻及一种鱼中发现。

嗜热厌氧乙醇菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) JW 200 是一种革兰氏阳性高温厌氧细菌, 能利用廉价

收稿日期: 2006-07-28 修回日期: 2006-10-09

基金项目: 中国 973 项目子课题基金 (2004CB719600)、国家自然科学基金 (30170511) 资助项目。

作者简介: 彭 惠 (1979-), 女, 博士研究生, 主要从事极端微生物遗传代谢工程的学习与研究。E-mail: pph0259@126.com

通讯联系人: 邵蔚蓝 (1958-), 女, 特聘教授, 博士生导师, 主要从事微生物分子生物学的教学与研究。E-mail: wls@jnu.cn

的淀粉、木聚糖等为底物发酵,产生乙醇和 CO_2 为主的代谢产物^[2]. 由于它具有工业生产乙醇的潜力,国际上对该菌的研究既有利用传统的发酵技术提高乙醇产量,也有通过分析乙醇代谢途径的各种关键酶深入研究其代谢机理^[3-5].

乙酰 CoA 依赖型的 ALDH (EC 1.2.1.10) 是嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 中的乙醇代谢途径的关键酶之一. 它催化以下反应: 乙酰 CoA + NADH → 乙醛 + CoA + NAD^+ + H^+ . 然后,乙醛被乙醇脱氢酶催化生成乙醇. 该菌株中的乙酰 CoA 依赖型的 ALDH 未见报道. 但嗜热厌氧乙醇菌 39E 中的乙酰 CoA 依赖型的 ALDH 在 1994 年 Zeikus 等报道过在厌氧条件下利用特异性亲和柱对其进行了纯化与定性^[5]. 未见报道嗜热厌氧乙醇菌中存在其它类型的 ALDH. 为了深入了解嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 中的乙醇代谢途径,填补国内对此类酶研究的空白,本文首次报道了在非厌氧状态下,主要利用离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析对乙酰 CoA 依赖型的 ALDH 的纯化研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

嗜热厌氧乙醇菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200 (ATCC 31550) 由美国佐治亚大学微生物系 J W iege 实验室惠赠.

1.1.2 化学试剂

乙酰 CoA、NAD、NADH 购自 Roche 公司. DEAE Sepharose Fast Flow 为 Amersham 产品; Butyl-HIC 为 BD-RAD 公司产品; TOYOPEARL HW-55F 为 SOTOHAAS 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件

嗜热厌氧乙醇菌的培养方法见参考文献 [2]. 2% 的接种量培养 30 L 发酵液, 69℃ 培养 15 h

1.2.2 ALDH 的酶活测定方法

1 mL 酶活测定体系中含 50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0, 65℃); 0.5 mmol/L NADH; 5 mmol/L DTT; 0.5 mmol/L 乙酰 CoA 和酶. 加乙酰 CoA 前, 反应体系于 65℃ 预保温 10 min 以排除其它与 NADH 偶联的氧化还原酶的干扰, 再加乙酰 CoA 反应 15 min, 确保 NADH 的氧化是与乙酰 CoA 偶联, 冰浴终止反应. 计算 NADH 在 340 nm 处读数的降低值. 空白对照用等体积的去离子水代替乙酰 CoA. 酶活定义以 1 μmol/min 的速率氧化 NADH 为一个酶活单位.

1.2.3 蛋白浓度的测定和蛋白电泳

用 Bradford 法^[6]测定蛋白质质量浓度. 以小牛血清白蛋白为标准蛋白. SDS-PAGE 和梯度 PAGE 电泳按参考文献 [6] 进行.

1.2.4 ALDH 的纯化

酶的纯化按以下步骤完成, 所有操作在常温空气中进行. 缓冲液 A (20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 10% (v/v) 甘油, 5 mmol/L DTT, 0.02% 叠氮钠) 煮沸排除 O_2 , 充 N_2 的条件下冷却.

(1) 制备粗酶液: 细胞离心收集, 缓冲液重悬后用高压细胞破碎仪在 1.03×10^5 kPa 压力破壁. 40 000 × 重力离心力 1 h 上清为粗酶液.

(2) DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析: 粗酶液上用缓冲液 A 平衡的阴离子柱 (2.5 × 27 cm). 用 0~0.3 mol/L NaCl 浓度梯度洗脱, 流速 6 mL/min, 6 mL/管收集. 检测酶活和蛋白浓度. 收集有酶活的管.

(3) 硫酸铵盐析 与 Butyl-HIC 疏水层析: 对上一步的酶液做 30% 的硫酸铵沉淀, 离心后收集上清. 沉淀中无酶活. 上清液泵入用缓冲液 B (缓冲液 A 中添加 2 mol/L 硫酸铵) 平衡好的疏水柱 (1.5 × 9 cm), 流速 1 mL/min, 收集不能与填料结合的流出蛋白液. ALDH 在该盐离子浓度下不能与疏水柱结合, 存在于流出液中.

(4) 硫酸铵盐析 与 Butyl-HIC 疏水层析: 对上一步的酶液做 80% 的硫酸铵沉淀, 离心后收集上清. 沉淀中仅有少量酶活. 上清液上用缓冲液 C (缓冲液 A 中添加 4.5 mol/L 硫酸铵) 平衡好的疏水柱 (1.5

× 9 cm), 流速 1 mL /m in, 进行 4. 5~ 2 mol/L 硫酸铵梯度洗脱. 2 mL /管收集, 检测每管酶活和蛋白浓度. 收集有酶活的管. 超滤浓缩酶液至终体积约 2 mL

(5) TOYOPEARL HW - 55F 分子筛层析: 酶液上用缓冲液 D (缓冲液 A 中添加 0. 15 mol/L NaCl) 平衡分子筛层析柱 (2. 5×75 cm), 流速 0. 6 mL /m in, 2 mL /管进行收集. 检测酶活性和蛋白浓度, 把每管有酶活的蛋白进行 SDS- PAGE 检测, 经检测后将单一蛋白条带的管合并备用.

2 结果与讨论

2.1 ALDH 的分离纯化

国外已报道的来源于其它物种的酰化 CoA 依赖型的 ALDH 的纯化均是在厌氧环境下利用特异性亲和柱实现纯化的^[5 7 8], 这是由于此类酶的巯基易被 O₂ 氧化而导致酶失活. 本实验受条件限制, 在非厌氧条件下利用常规的柱层析等分离纯化技术从嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 的胞内蛋白中分离纯化得到此类 ALDH, 比活为 18. 2 U /mg 纯化倍数为 910 倍, 高的纯化倍数是由于酶在纯化过程中不断失活, 另外 ALDH 酶量较少. 厌氧条件下利用特异性亲和柱纯化的菌株 39E 中的 ALDH, 其比活为 16 U /mg 纯化倍数为 142 倍. 非厌氧环境中酶的保护主要依靠 DTT. 酶在含 DTT 的缓冲液中冰上可以维持活性 6~ 7 d 已失活的酶在厌氧环境中存放过夜可以部分恢复活性. 这也表明主要是氧化导致酶的失活.

DEAE Sepharose 阴离子交换层析中, ALDH 在盐离子浓度约 90 mmol/L 处洗脱, 但未形成独立的峰. 利用 ALDH 疏水性较弱的特点, 采取了 2 次硫酸铵沉淀结合疏水层析的策略. 第一次 2 mol/L 硫酸铵的浓度下, ALDH 不与疏水柱结合, 去除了大量结合到柱上的杂蛋白. 第二次 4. 5 mol/L 硫酸铵的浓度下, ALDH 与柱结合, 洗脱时, 酶活集中在第一个峰. 超滤浓缩酶液, 超滤中 DTT 浓度小于 5 mmol/L 时, 酶活丧失加剧, 补加 DTT, 可改善酶失活情况. 分子筛层析中, 酶活集中在第一个峰, 用 SDS-PAGE 检验纯度, 得到纯酶. 各步纯化情况见表 1 和图 1 纯酶用来转膜测定蛋白 N 端序列, 已经克隆出其基因, 结果另文发表.

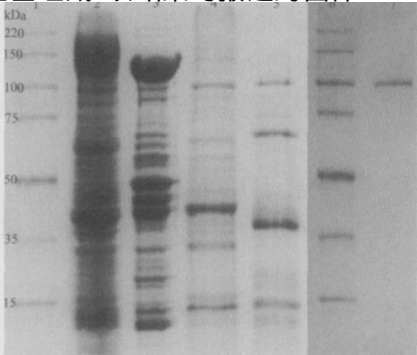
表 1 嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 中乙醛脱氢酶的纯化

Table 1 Purification of the ALDH from *T. ethanolicus* JW 200

纯化步骤	蛋白总量 /mg	活性 /U	比活性 /(U /mg)	纯化倍数	得率 %
粗酶液	2 380	47. 6	0. 02	1	100
DEAE Sepharose FastFlow 阴离子交换层析	47	29. 5	0. 6	30	62
Butyl-HIC 疏水层析	18	16. 8	0. 9	47	35
Butyl-HIC 疏水层析	2. 6	13. 8	5. 3	266	29
TOYOPEARL HW - 55F 分子筛层析	0. 2	3. 6	18. 2	910	7

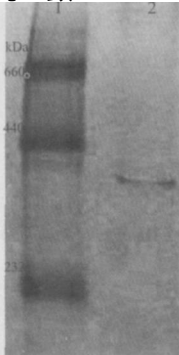
2.2 ALDH 的相对分子质量

纯化的 ALDH 在 SDS-PAGE 上呈现一条带, 亚基相对分子质量约为 100 000 (见图 1, 7 号泳道). 在 3% ~ 30% 的梯度 PAGE 电泳中, 纯化的 ALDH 全酶相对分子质量约为 360 000 (见图 2), 表明 ALDH 全酶可能是由 4 个亚基组成. 该结果与报道的菌株 39E 中的 ALDH 情况一致.



1, 6: 标准蛋白的相对分子质量; 2: 全细胞蛋白; 3: DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析; 4: Butyl-HIC 疏水层析 I; 5: Butyl-HIC 疏水层析 II; 7: 纯化的 ALDH

图 1 SDS-PAGE 电泳图
Fig.1 SDS-PAGE



1: 活性标准蛋白的相对分子质量; 2: 纯化的 ALDH

图 2 3%~30% 梯度 PAGE 电泳图
Fig.2 3%~30% native gradient PAGE

3 结论

本研究纯化的 ALDH 属于 NAD⁺ 酰化 CoA 依赖型的氧化还原酶, 胞内含量少, 易氧化失活, 这给纯化带来了很大的困难. 采用常规柱层析技术等从嗜热厌氧乙醇菌 JW 200 的胞内蛋白中分离纯化得到易氧化失活的 ALDH, 比活为 18.2 U/mg, 纯化倍数为 910 倍. SDS-PAGE 显示酶的亚基相对分子质量约为 100 000, 梯度 PAGE 显示全酶相对分子质量约为 360 000, 可能是由 4 个亚基组成.

[参考文献]

- [1] Y Runtao, Chen J S. Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592[J]. *Appl Environ Microb*, 1990, 56(9): 2 591-2 599.
- [2] W iegel J. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic anaerobic bacterium[J]. *Arch Microbiol*, 1981, 128(5): 343-348.
- [3] H ild H M, Stuckey D C, Leak D J. Effect of nutrient limitation on product formation during continuous fermentation of xylose with *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200 Fe(7)[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60(12): 679-686.
- [4] Burdette D S, Vieille C, Zeikus J G. Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme[J]. *Biochem J*, 1996, 316(1): 115-122.
- [5] Burdette D S, Zeikus J G. Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary alcohol dehydrogenase (2Adh) as a bifunctional alcohol dehydrogenase-acetyl-CoA reductive thioesterase[J]. *Biochem J*, 1994, 302(3): 163-170.
- [6] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 42-122.
- [7] Sanchez L B. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the anaerobic protist *Giardia lamblia*[J]. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 1998, 353(1): 57-64.
- [8] Toth J, Chen J S. The adh gene encoding a coenzyme A-Acylation aldehyde dehydrogenase distinguishes *Clostridium beijerinckii* and two other solvent producing clostridia from *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(11): 4 973-4 980.

[责任编辑: 孙德泉]