

白地霉 NADP-甘露醇脱氢酶的提纯及其性质*

黎 膏 翔 张 树 政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

白地霉无细胞提取液经热处理, 硫酸铵沉淀, 乙醇分段和 DEAE-纤维素柱层析, 已将 NADP-甘露醇脱氢酶提纯了 200 倍。用免疫电泳法鉴定其为单一组分。该酶只能以 NADP^+ 作为氢受体, 能氧化甘露醇、山梨醇、D-阿拉伯糖醇及木糖醇。对底物的亲和力较小。巯基是其必需基团。受一些金属络合剂所抑制。该酶氧化甘露醇最适 pH 为 7.7, 还原果糖最适 pH 为 6.8。平衡常数为 $6.23 \times 10^{-9} M$ 。

我们曾报道过, 白地霉中有甘露醇及联系 NADP 的甘露醇脱氢酶^[1]。我们还发现, 白地霉中也有其他一些联系 NAD 的多元醇脱氢酶活力, 以及联系 NADP 的戊醛糖还原酶活力^[2,3]。为了查明其酶系以及各个酶对底物的专一性, 我们对一些多元醇脱氢酶进行了提纯及性质的研究^[4]。本文报道在 1965 年我们对白地霉中 NADP-甘露醇脱氢酶的提纯及其性质的研究结果^[5]。

材料与方法

一、菌株及其培养条件

白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) A. S. 2.361。其培养基成分为每 100 毫升中含葡萄糖 1 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 克, KH_2PO_4 0.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克, 酵母汁 0.1 克(为湿重, 含水 80%)。在 500 毫升三角瓶中装上述培养基 100 毫升。15 磅气压灭菌 30 分钟。用在同样培养基中于摇床上培养 24 小时的菌种作为种子, 接种量为 1/10。在 28—30℃, 旋转摇床(120 转/分)培养 15 小时。

二、酶的纯化

1. 丙酮干粉的制备: 培养好的菌体用抽滤法收集, 并用菌体五倍量的蒸馏水洗 3 次, 菌体经冷冻后加到 -10℃ 10 倍于菌体量的丙酮中搅拌 15 分钟, 并重复一次。菌体迅速在室温吹干干燥。

2. 纯化步骤: 白地霉丙酮干粉 20 克, 加入 10 倍量的 0.1M pH 7.5 磷酸缓冲液在 30℃ 提取 30 分钟, 冰箱放置一小时, 在 8,000 转/分钟水冷却离心。上清液为无细胞提取液。将其调节 pH 至 6.4, 在 54℃ 水浴静止加热 8 分钟, 立刻冷却, 在 0℃ 9,000 × g 离心 5 分钟, 弃去沉淀。上清液用 NaOH 调 pH 至 7.2。在 0℃ 加硫酸铵粉至 55% 饱和度, 放置 15 分钟, 0℃ 9,000 × g 再离心, 清液加硫酸铵至 70% 饱和度, 同上放置及离心。沉淀溶于 30 毫升 0.005 M pH 7.4 磷酸缓冲液中。上清液放入冰盐浴中, 慢慢加入 -13℃ 冷乙醇至 60% (V/V) 浓度, 在 -7℃ 以下保持 5 分钟, 在 -10℃ 9,000 × g 离心 5 分钟, 上清液再加入冷乙醇至 71.4% (V/V) 浓度, 同上放置离心, 沉淀溶于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液中。不溶的蛋白离心除去。

DEAE-纤维素 (Diethylaminoethyl Cellulose) 用蒸馏水浮选 45 分钟, 3 次, 弃去不沉部分, 再用 1N NaOH 及 1N HCl 交替处理 2 次, 最后用蒸馏水洗净, 用 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液平衡, 装柱, 柱为 18 × 1.2 厘米。加样后依次用 0.01M, 0.04M, 0.05M 及 0.1M pH 7.4 磷酸缓冲液洗脱。酶活力在 0.05M 洗脱液部分。

三、主要试剂

NAD^+ , NADP^+ , 中国科学院生物化学研究

* 孟广震同志提供抗血清, 关世斌同志参加部分技术工作, 特此致谢。

本文 1973 年 1 月 18 日收到。

所东风试剂厂试剂；甘露醇，BDH 分析试剂；果糖、山梨醇、山梨糖，E. Merck 分析试剂；琼脂、鹿印，关东化学株式会社制品；DEAE-纤维素，Serva 制品；NADPH 由 NADP⁺ 被异柠檬酸脱氢酶催化，用异柠檬酸还原制备^[6]；D-木酮糖、D-核酮糖参照施米特和特雷伯 (Schmidt 和 Treiber)^[7] 的吡啶回流法制备，并经纸层析分离；抗血清用菌体粗提取液配合 Freund 佐剂免疫 4 支家兔制得，选其中抗体谱最完整的 (10 条沉淀弧) 供作免疫电泳用。琼脂糖参照拉塞尔 (Russell) 等^[8] 方法用聚乙二醇处理制备。其他试剂均系商品。

四、分析方法

蛋白质用劳里 (Lowry) 法^[9] 测定。pH 用瑞士出品的 poly metron 42/B 型 pH 计测定。甘露醇脱氢酶活性测定用 Hilger 分光光度计，在 340 毫微米测 NADP⁺ 的还原，以光密度的改变表示。标准反应系统是：D-甘露醇 180 μ moles；Tris-HCl，pH 8.0，100 μ moles；NADP⁺ 0.4 μ mole；酶蛋白适量，加水至总体积 2.8 毫升。以每分钟引起 1 μ mole NADP⁺ 的转化为一个酶单位。免疫电泳参考格雷伯 (Grabar)^[10] 法，用缓冲液配成 0.8% 的 agarose，缓冲液为巴比妥钠-HCl，pH 8.6，离子强度 0.05，电泳用玻片为 14 \times 6 厘米，抗体槽宽 2 毫米，样品原点距抗体槽 7 毫米。样品孔径 3 毫米。电位梯度 12 伏/厘米。电泳 90 分钟。加抗血清后在冰箱放置，并每天观察结果。

试验结果

一、酶的提纯

DEAE-纤维素柱层析分离甘露醇脱氢酶的结果如图 1 所示。通过上述步骤已

将酶提纯约 200 倍 (表 1)。经柱层析纯化的酶电泳后与抗血清仅生成一条沉淀弧，而无细胞提取液则生成很多沉淀弧 (图 2)。看来该酶纯度已经达到免疫电泳条件下的均一组分。

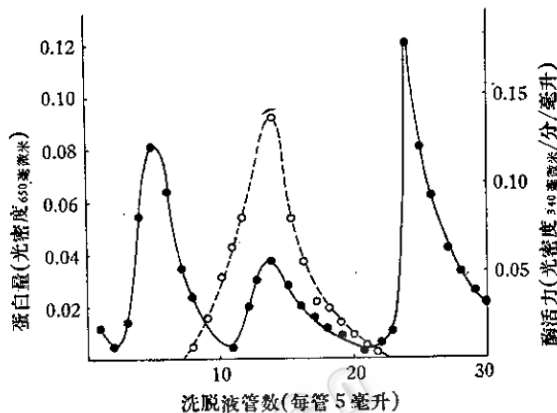


图 1 DEAE-纤维素柱层析分离甘露醇脱氢酶在 2℃ 洗脱，流速 2 分钟 1 毫升

○---○ 酶活力，NADPH 形成的光密度增加；
●——● 洗脱液含蛋白质部分。
1—10 管 0.04M pH 7.4 磷酸缓冲液
11—20 管 0.05M pH 7.4 磷酸缓冲液
21—30 管 0.1 M pH 7.4 磷酸缓冲液

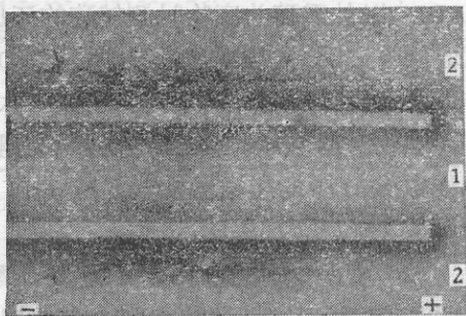


图 2 免疫电泳图

1. 纯酶 2. 粗提取液

表 1 NADP-甘露醇脱氢酶的提纯

提 纯 步 骤	总体积 (毫升)	总活力单位	蛋白质 (毫克)	比 活 力 (单位/毫克蛋白质)	纯化倍数
粗 提 取 液	146.0	4.380	438.0	0.010	—
热 处 理 后	146.0	4.818	321.2	0.015	1.5
55—70%饱和度硫酸铵沉淀	34.0	1.845	59.5	0.031	3.1
60—71.4%(V/V)乙醇沉淀	20.9	1.444	8.7	0.166	16.6
DEAE-纤维素柱层析	5.0	0.250	0.116	2.155	215.5

二、酶的性质

酶的稳定性 柱层析后的酶液在 4—6℃ 保存二星期酶活力丧失 10—20% 左右。

酶量与反应速度 在标准系统反应条件下,酶蛋白量在 11 微克以下与反应速度成直线关系(图 3)。

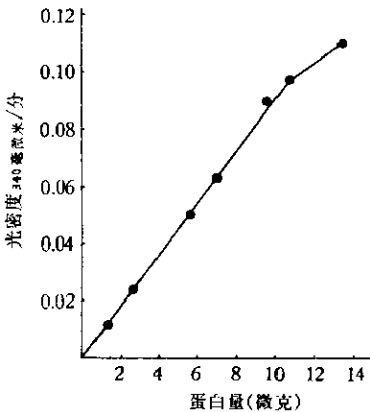


图 3 酶量与反应速度的关系

标准反应系统,酶液比活力 1.5,27℃。

辅酶专一性 分别加入 NAD^+ 或 NADP^+ 以甘露醇为底物时测辅酶的还原。试验结果表明,该酶纯化后只能以 NADP^+ 作为受氢体;以山梨醇、D-阿拉伯醇、木糖醇为底物时 NAD^+ 亦无作用。证明原粗提取液中 NAD^+ 的还原活性(为 NADP^+ 的 30% 左右)已全部去除。

底物专一性 能催化甘露醇、山梨醇、D-阿拉伯糖醇、木糖醇的氧化。其中以甘露醇氧化速度最高,卫矛醇亦有微弱的氧化作用。对 L-阿拉伯糖醇、核糖醇、赤藓糖醇没有作用。能催化果糖、山梨糖、D-木酮糖、D-核酮糖的还原,其中以果糖还原速度最高。对葡萄糖、甘露糖、D-木糖、D-核糖、L-木糖、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖、5-磷酸核糖均没有作用(表 2)。

具有催化各底物的作用是否同属一个酶? 在提纯过程中酶液氧化甘露醇、山梨

醇、山梨醇、木糖醇的反应速度基本上相对恒定(表 3); 加入饱和速度浓度的二个底物对反应速度没有相加性(表 4)。这些都说明是一个酶对这些糖醇的非专一性氧化。

表 2 甘露醇脱氢酶对底物的专一性

多元醇 ⁽¹⁾	活 力 (%)	酮 糖 ⁽²⁾	活 力 (%)
甘 露 醇	100	果 糖	100
山 梨 醇	68	山 梨 糖	68
D-阿拉伯糖醇	34	D-核 酮 糖	58
木 糖 醇	19	D-木 酮 糖	76
卫 矛 醇	6.5	—	—

(1) 标准反应系统,酶液含蛋白质 11 微克,比活力 2.6, 12℃;

(2) 反应系统: 磷酸缓冲液 pH 6.4 100 μmoles , 底物 60 μmoles , NADPH 0.14 μmole , 酶液含蛋白质 18 微克,比活力 2.2, 总体积 2.9 毫升, 28℃。

表 3 提纯过程酶对各底物氧化比例

提 纯 步 骤	甘露醇	山梨醇	D-阿拉伯糖醇	木糖醇
丙 酮 干 粉	100	56.3	35	23
热 处 理	100	57.7	35	20
硫酸铵划分	100	57.7	33	19
乙 醇 划 分	100	57.4	34	20
DEAE-纤维素	100	56.2	35	20

标准反应系统, 28℃。

表 4 底物相加的氧化速度

底 物	反 应 速 度 (光密度 340 毫微米/分)
甘露醇	0.098
山梨醇	0.068
D-阿拉伯糖醇	0.041
木糖醇	0.020
甘露醇 + 山梨醇	0.098
甘露醇 + D-阿拉伯糖醇	0.096
甘露醇 + 木糖醇	0.078
山梨醇 + D-阿拉伯糖醇	0.068
山梨醇 + 木糖醇	0.054
D-阿拉伯糖醇 + 木糖醇	0.038

标准反应系统, 29℃, 酶液含蛋白质 10 微克,比活力 0.5, 各底物最终浓度为 0.4 M。

酶活力的最适 pH 对甘露醇氧化最适 pH 在 7.7 左右。对果糖的还原最适 pH 在 6.8 左右 (图 4)。

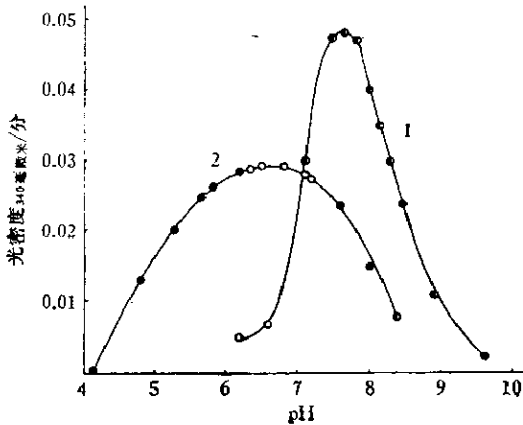


图 4 pH 对甘露醇脱氢酶的影响

- 1. 甘露醇氧化：标准反应系统，酶液含蛋白质 10 微克，比活力 1.08，28℃；
 - 2. 果糖还原：反应系统有缓冲液 100 μ moles，果糖 60 μ moles，NADPH 0.068 μ mole，酶液含蛋白质 8 微克，比活力 1.07，总体积 2.9 毫升，27℃。
- 乙酸缓冲液 ○ 磷酸缓冲液 ● tris 缓冲液

米氏常数 根据莱因威弗和伯克 (Lineweaver 和 Burk) 的双倒数作图法测得米氏常数：甘露醇 $1.66 \times 10^{-1} M$ 、山梨醇 $3.33 \times 10^{-1} M$ 、果糖 $4.76 \times 10^{-2} M$ 、山梨糖 $5.55 \times 10^{-2} M$ 。从这结果看来，该酶的底物米氏常数较大，即这酶对底物的亲和力较小。

平衡常数 $D\text{-甘露醇} + NADP^+ \rightleftharpoons D\text{-果糖} + NADPH + H^+$ 当反应平衡后，用分光光度计测定 NADPH:NADP⁺ 比例的改变 (图 5)，并计算出果糖及甘露醇的浓度。平衡常数大约为 $6.23 \times 10^{-9} M$ 。看来反应有利于甘露醇的形成。

抑制作用 巯基抑制剂对氯汞苯甲酸 (PCMB) 能抑制酶活力，随 PCMB 浓度的增加抑制作用也增加，在 $1.5 \times 10^{-3} M$ 时能抑制酶活力 56.9% 左右。其抑制作用能为半胱氨酸及还原型谷胱甘肽全部或大部分

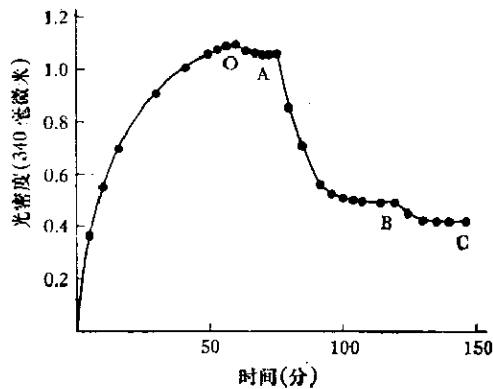


图 5 平衡常数的测定

反应系统：甘露醇 60 μ moles，pH 7.65 Tris 100 μ moles，酶蛋白质 20.8 微克，比活力 1.5，NADP⁺ 0.8 μ mole 总体积 2.8 毫升，27℃。

O 点加 10 μ moles 果糖，总体积 2.9 毫升；
A 点加 30 μ moles 果糖，总体积 3.0 毫升；
B 点加 10 μ moles 果糖，总体积 3.1 毫升；

平衡常数的计算：

$$K_{eq} = \frac{(\text{果糖})(NADPH)(H^+)}{(\text{甘露醇})(NADP)}$$

A = $6.09 \times 10^{-9} M$
B = $6.04 \times 10^{-9} M$
C = $6.58 \times 10^{-9} M$

平均 = $6.23 \times 10^{-9} M$

解除。表 5 表明，该酶反应需要巯基。该酶反应亦受二巯基丙醇 ($5 \times 10^{-3} M$)、苯腈 ($1 \times 10^{-2} M$)、羟胺 ($1 \times 10^{-2} M$)、KCN

表 5 巯基抑制剂对甘露醇脱氢酶活力的影响

抑 制 剂	浓 度 (M)	对 酶 活 的 抑 制 率 (%)
PCMB	5×10^{-4}	29.3
	1×10^{-3}	48.0
	1.5×10^{-3}	56.9
PCMB+半胱氨酸	$5 \times 10^{-4} + 1 \times 10^{-3}$	0
	$1 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-3}$	17.3
	$1 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-3}$	5.2
PCMB+谷胱甘肽 (还原型)	$5 \times 10^{-4} + 1 \times 10^{-3}$	0
	$1 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-3}$	5.2
	$1 \times 10^{-3} + 1 \times 10^{-3}$	5.2

标准反应系统，酶液含蛋白质 2.7 微克，比活力 1.7，28℃，加抑制剂半小时后测定。

($1 \times 10^{-2} M$)、8-羟基喹林($1 \times 10^{-3} M$)等金属络合剂所抑制;碘乙酸、丙二酸、谷胱甘肽在 $10^{-2} M$ 浓度时对酶活力只有微弱的抑制;EDTA、 NaN_3 、邻二氮菲、NaF、抗坏血酸对酶活力没有影响(表6)。

表6 抑制剂对甘露醇脱氢酶的影响

抑 制 剂	浓 度 (M)	对 酶 活 的 抑制率(%)
二 硫 基 丙 醇	5×10^{-3}	75
苯 肼	1×10^{-2}	65.7
羟 胺	1×10^{-2}	54.7
KCN	1×10^{-2}	50.0
8-羟 基 喹 啉	1×10^{-3}	40.6
碘 乙 酸	1×10^{-2}	21.9
丙 二 酸	2×10^{-2}	15.7
谷 胱 甘 肽	1×10^{-2}	15.7
半 胱 氨 酸	1×10^{-2}	12.5
NaN_3	1×10^{-2}	0
邻 二 氮 菲	1×10^{-3}	0
NaF	1×10^{-2}	0
EDTA	1×10^{-2}	0

标准反应系统,酶液含蛋白质5微克,比活力1.3, 28℃,加入抑制剂后半小时开始反应。

表7 金属离子对甘露醇脱氢酶活力的影响

金 属 离 子	浓 度 (M)	酶 活 力 (%)
对 照	—	100
Mg^{++}	1.3×10^{-3}	130
	3.5×10^{-3}	150
	1.3×10^{-3}	135
Co^{++}	1.3×10^{-3}	130
	1.3×10^{-2}	120
	1.3×10^{-2}	125
Ba^{++}	1.3×10^{-3}	119
	1.3×10^{-2}	130
	1.3×10^{-2}	100
Mn^{++}	1.3×10^{-3}	95
	1.3×10^{-3}	75
	1.3×10^{-3}	70
Ca^{++}	1.7×10^{-4}	58
	1.7×10^{-4}	58
	1.3×10^{-3}	58
Na^+	1.3×10^{-3}	100
Cu^{++}	1.3×10^{-3}	95
Cd^{++}	1.3×10^{-3}	75
Fe^{++}	1.7×10^{-4}	70
Fe^{+++}	1.7×10^{-4}	58
Zn^{++}	1.3×10^{-3}	58

标准反应系统,酶液含蛋白质4微克,比活力2.0, 27℃,所用盐均为氯化物。

金属离子的作用 将纯化的酶溶液对重蒸馏水透析20小时,加入适当浓度的 Mg^{++} 、 Co^{++} 、 Ba^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 时对酶活力稍具激活作用。但 Fe^{++} 、 Fe^{+++} 、 Zn^{++} 、 Cd^{++} ,则稍有抑制作用(表7)。

讨 论

在本工作进行初期,埃德蒙道维奇(Edmundowicz)等^[11]报道在野生伞蕈(*Agaricus campestris*)中有NAD-及NADP-甘露醇脱氢酶存在,用硫酸铵分步沉淀(65—75%饱和度)将酶提纯13倍,该酶比活力较低,按光密度变化0.001为1单位计算,0.91毫克具有90单位。如改为本文所用单位则为0.01单位/毫克,仅相当白地霉粗提取液的酶活力水平。堀越(Horikoshi)等^[12]报道米曲霉中有NAD-及NADP-甘露醇脱氢酶活力,并用硫酸铵作了初步纯化(30—70%饱和度)。斯托贝尔(Strobel)等^[13]用 *Diplodia Viticola* Desm 为材料提纯NADP-甘露醇脱氢酶,比活力按本文单位为0.312单位/毫克。我们用白地霉丙酮干粉为材料经过提取、热处理、硫酸铵分段、乙醇沉淀、和DEAE-纤维素柱层析将NADP-甘露醇脱氢酶提纯200倍,并经免疫电泳鉴定为均一物质,可以认为是比较纯的制品,比活力为2.15单位/毫克蛋白。

白地霉菌体中含有甘露醇,并存在NADP-及NAD-甘露醇脱氢酶,而NAD-甘露醇脱氢酶活力较低(为NADP-的30%左右)^[1]。这与米曲霉^[11]及野生伞蕈^[11]中的情况相似。堀越等^[11]用米曲霉粗酶制品证明了NADP-与NAD-甘露醇脱氢酶是二个酶的作用。我们将白地霉NADP-甘露醇脱氢酶进行了纯化,发现纯化后能全部去除NAD的还原活性。即在白地霉中NADP-及NAD-甘露醇脱氢酶也是二个酶的作用。

这酶受 PCMB ($1.5 \times 10^{-3}M$) 所抑制, 但不受 EDTA、 NaN_3 所抑制, 这与米曲霉及野生伞蕈中 NADP-甘露醇脱氢酶性质相似。此酶对底物的亲和力较小, 对底物的专一性不强, 这与 *Diplodia Viticola* Desm^[13] 中 NADP-甘露醇脱氢酶性质相似。

参 考 资 料

- [1] 张树政、黎青翔: 生物化学与生物物理学报, **3**: 247—255, 1963.
- [2] 张树政、黎青翔、王蕙莲: 生物化学与生物物理学报, **2**: 237—247, 1962.
- [3] 张树政、黎青翔: 生物化学与生物物理学报, **3**: 484—489, 1963.
- [4] 王蕙莲、张树政: 生物化学与生物物理学报, **6**: 633—645, 1965.
- [5] 黎青翔、张树政: 北京市微生物学会1965年学术

年会宣读(未发表)。

- [6] Rafter, G. W. and Colowick, S. P.: *Methods in enzymology*, **3**: 887—890. S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds.) Academic Press. 1957.
- [7] Schmidt, O. T. H. & Treiber, R.: *Ber.*, **66**: 1765—1769, 1933.
- [8] Russell, B., Mead, T. H. & Polson, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **86**: 169—174, 1964.
- [9] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [10] Grabar, P. & Williams, C. A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **17**: 67—74, 1955.
- [11] Edmundowicz, J. M. & Wriston, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **238**: 3539—3541, 1963.
- [12] Horikoshi, K., Iide, S. & Ikeda, Y.: *J. Bacteriol.*, **89**: 326—330, 1965.
- [13] Strobel, G. A. & Kosuge, T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**: 622—626, 1965.

THE PURIFICATION AND PROPERTIES OF NADP-MANNITOL DEHYDROGENASE OF *GEOTRICHUM CANDIDUM*

LI KAO-HSIANG AND CHANG SHU-CHENG

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

NADP-mannitol dehydrogenase of *Geotrichum candidum* was purified 200-folds from cell-free extracts by heat treatment, fractionations with ammonium sulfate, ethyl alcohol and DEAE-cellulose column chromatography. It appeared as a single component in immuno-electrophoresis tests. It is specific for $NADP^+$ as hydrogen acceptor and catalyzes the oxidation of D-man-

nitol, D-sorbitol, D-arabitol and xylitol. The affinities between the enzyme and the substrates are low. Sulfhydryl group is necessary for its activity. Some chelating agents were able to inhibit its activity. The optimum pH for the oxidation of D-mannitol is pH 7.7 and for the reduction of D-fructose is pH 6.8. The equilibrium constant was established.