

林肯链霉菌丙氨酸脱氢酶的纯化和性质*

金 蓍** 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘 要 采用硫酸铵分级沉淀、DEAE-纤维素 52 柱层析、亲和蓝柱层析和琼脂糖凝胶 Sepharose 6B 柱层析的方法, 分离纯化了林肯链霉菌丙氨酸脱氢酶, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一组分。以凝胶过滤和聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳测得该酶的分子量为 170 000, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其亚基分子量为 42 500, 表明林肯链霉菌丙氨酸脱氢酶由四个相同的亚基组成。该酶加氨反应最适 pH 为 9.0, 脱氨反应最适 pH 为 9.5, 加氨反应和脱氨反应的最适温度均为 50℃。加氨反应丙氨酸脱氢酶的表现米氏常数 K_m 值为: 丙酮酸 2.08×10^{-4} mol / L, NH_4^+ 2.00×10^{-2} mol / L, NADH 2.38×10^{-5} mol / L; 脱氨反应的 K_m 为: L-Ala 1.43×10^{-2} mol / L; NAD $^{+}$ 6.67×10^{-5} mol / L。

关键词 林肯链霉菌, 丙氨酸脱氢酶, 纯化和性质

分类号 Q936

微生物氨同化途径的主要酶类是谷氨酸脱氢酶(有时是丙氨酸脱氢酶)、谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合酶。因此, 研究这些酶的性质和调节方式对于探讨微生物氨同化途径的调节是十分必要的。

丙氨酸脱氢酶(L-丙氨酸: NAD $^{+}$ 氧化还原酶, EC 1.4.1.1)简称 ADH, 可逆地催化 L-丙氨酸的脱氨反应: $\text{L-Ala} + \text{NAD}^{+} + \text{H}_2\text{O} = \text{丙酮酸} + \text{NH}_3 + \text{NADH} + \text{H}^{+}$

ADH 在微生物的碳源和氮源代谢中起重要作用^[1]。林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*) Z-512 是林可霉素的高产菌株。Z-512 合成林可霉素的产量与氨的浓度有关。高氨时, ADH 活力高, 林可霉素产量很低, 此时 ADH 是氨同化的主要酶; 相反, 低氨时, GS 活力高, ADH 低, 林可霉素产量则较高。本实验室有关营养因子对林肯链霉菌氨同化途径和林可霉素生物合成的影响, 及其相互关系的研究, 将另文发表。类似的结果在力复霉素的研究中也有发现^[2]。本文主要报道林肯链霉菌丙氨酸脱氢酶的提取、纯化和性质研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*) Z-512, 为华东理工大学惠赠, 经中国科学院

* 国家自然科学基金和“863”计划资助项目。

**现在南京大学生物化学系做博士后, 南京210093。

收稿日期: 1996-09-06

上海植物生理研究所微生物室多次诱变所获得的林可霉素高产菌株。

1.2 培养基

1.2.1 孢子培养基(%): 葡萄糖 2, K_2HPO_4 0.01, $NaNO_3$ 0.2, 黄豆饼粉 0.5, $FeSO_4$ 0.001, $MgSO_4$ 0.05, KCl 0.05, 琼脂 2, pH7.2.

1.2.2 种子培养基(%): 淀粉 2, 葡萄糖 1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.15, 黄豆饼粉 1, 玉米浆 3.5, $CaCO_3$ 0.4, pH7.2.

1.2.3 发酵培养基(%): 葡萄糖 6, NaCl 0.5, KH_2PO_4 0.025, 黄豆饼粉 2, 玉米浆 0.2, $CaCO_3$ 0.8, pH 7.2; 氮源的种类根据实验需要分别使用 $(NH_4)_2SO_4$, L-Ala 和 D-Ala, 用量根据各试验要求增减。

培养基中磷酸盐、铵盐和氨基酸用过滤法除菌, 其它成分 10^5 Pa 灭菌 30 min.

1.3 培养方法

将在孢子培养基斜面上 $28^\circ C$ 培养 7d 的新鲜菌丝体和孢子接种到种子液体培养基中, $28^\circ C$ 摇床(转动半径 2.5 cm, 转速 180r/min)培养 60 h, 按 5% 的接种量转接发酵培养基, $28^\circ C$ 发酵, 不同培养时间取样, 做各种测定。真空抽滤收集菌体, 蒸馏水充分洗涤, 菌体用来提酶和测生长量, 上清液用来测定抗生素效价和 pH 值等。

1.4 仪器与试剂

1.4.1 仪器: 岛津 UV-250 分光光度计, Beckman 高速冷冻离心机, Cole Parmer 超声波破碎器, 恒流泵及自动分部收集器。

1.4.2 试剂: DEAE-Cellulose 52 (Whatman); Affi-Gel Blue (Bio. rad); Sepharose 6B (Pharmacia); Lincomycin (Sigma); Acrylamide (Sigma); N,N' -Methylenebisacrylamide (Fluka); SDS (Serva); 电泳用已知分子量标准蛋白质 (Pharmacia); 凝胶过滤用已知分子量标准蛋白质 (Sigma)。

1.5 生理测定

1.5.1 林可霉素效价的测定: 用杯碟法生物测定^[3]。以藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)为鉴定菌, Lincomycin (Sigma)为标准。

1.5.2 菌体生长的测定: 干重称量法。准确吸取 5ml 发酵液, 用布氏漏斗抽滤, 蒸馏水充分洗涤菌体, 将覆盖菌体的滤纸于 $80^\circ C$ 烘干至恒重(滤纸抽滤前先称重)。

1.6 蛋白质测定

采用 Folin 方法^[4], 和 Coomassie Brilliant Blue G-250 方法^[5,6]测定, 以牛血清白蛋白为蛋白质标准。

1.7 ADH 酶活力测定

参照 Aharonowitz 等方法^[7], 反应温度为 $30^\circ C$, 每分钟氧化 $1\mu mol$ NADH 的酶量为一个酶活力单位, 使用 NADH 的摩尔消光系数(6.23×10^3)计算其浓度, 比活力以 u/mg 蛋白质表示。

1.8 ADH 的分离纯化

所有纯化步骤均在 $0\sim 4^\circ C$ 之间操作, 离心速度为 16 000r/min, 时间 20 min.

1.8.1 无细胞粗提液的制备: 100 g 湿菌体悬浮于 400 ml 缓冲液 A 中 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, pH 7.0), 超声波处理 30 min. 离心,

去除细胞碎片,上清液即为无细胞粗提液。

1.8.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀: 无细胞粗提液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度 40%, 调节 pH 至 7.0, 离心, 弃沉淀。上清液再加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 60% 饱和度, 离心收集沉淀。用缓冲液 B (20 mmol / L Tris-HCl, 1 mmol / L β -巯基乙醇, 1 mmol / L EDTA, pH 8.0) 溶解, 透析过夜, 除去 NH_4^+ 。

1.8.3 DEAE-纤维素 (DE-52) 柱层析: 柱体积为 25×600 mm, 将透析过夜的粗酶液加到柱上, 用缓冲液 B 洗去杂蛋白, 再用含 0.2~0.5 mol / L NaCl 的缓冲液 B 进行线性梯度洗脱, 分部收集。测定洗脱液中蛋白浓度和酶活力。将 ADH 活性部分合并, 浓缩后对缓冲液 A 透析过夜。

1.8.4 亲和蓝柱层析: 柱体积为 25×200 mm, 将上一步透析好的酶液上柱, 静置 20 min, 再用缓冲液 A 充分洗柱, 除去杂蛋白。再用含 0~0.5 mol / L KCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱。分部收集, 合并 ADH 活性部分, 浓缩后对缓冲液 A 透析过夜。

1.8.5 琼脂糖凝胶柱层析: 柱体积为 25×1000 mm, 将上一步透析好的酶液小心上柱, 用缓冲液 A 洗脱, 分部收集。合并 ADH 活性部分, 浓缩后对缓冲液 A 透析过夜。

1.9 电泳方法

蛋白质纯度测定用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)^[8], 分子量测定用浓度梯度 PAGE^[8] 及 SDS-PAGE 方法^[9]。

2 结果和讨论

2.1 林肯链霉菌 ADH 的生物合成

对林肯链霉菌在不同的培养基中 ADH 酶活力水平进行了观察 (表 1)。当林肯链霉菌生长在含有 NH_4^+ 、L-Ala 和 D-Ala 的培养基中, ADH 的比活力显著提高。其中以 L-Ala 为氮源时, ADH 活力最高。可见, L-Ala 对 ADH 有较强的诱导作用。这是因为 ADH 不仅可以用来同化氨, 同时也可催化其逆反应, 即 L-Ala 的氧化脱氨反应。L-Ala 与 D-Ala 的影响相差很大, 此菌在含 1.0% L-Ala 的培养基中菌体 ADH 比活力是在 D-Ala 培养基中的 2 倍。这与已报道的 *S. phaeochromogenes* 十分相似^[10]。

图 1 显示了林肯链霉菌培养基中 NH_4^+ 浓度对林肯链霉菌的 pH、菌体生长、林可霉素的合成、ADH 活力的影响。ADH 在发酵前期 (12 h) 比活力很高, 随着菌体的生长逐渐降

表1 L-Ala和D-Ala对ADH合成的影响

Table 1 Effect of L- and D- alanine on ADH formation

添 加 物 Addition	浓 度 Conc. (%)	菌体ADH比活力 Sp. act. (u/mg)
无 None	—	48
甘油 Glycerol	1.0	40
L-Ala	1.0	1350
D-Ala	1.0	680
DL-Ala	1.0	1260
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	810

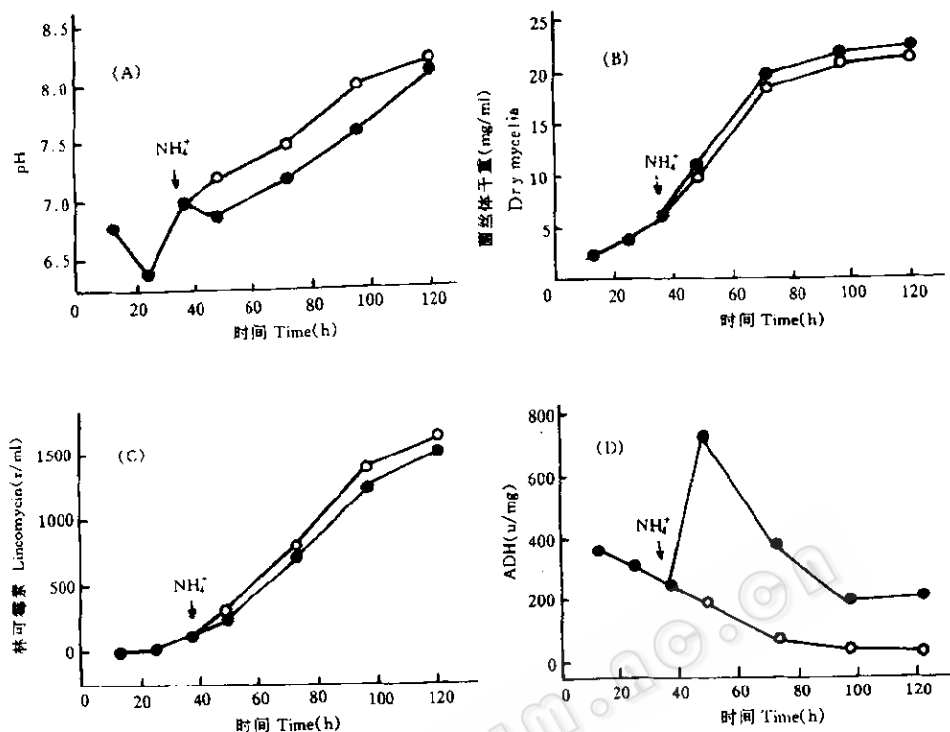


图1 氨对林可霉素菌体生长、林可霉素合成和ADH活力的影响

Fig.1 Effects of NH_4^+ on mycelial growth, lincomycin production and specific activity of ADH
(A) pH; (B) 菌丝体干重 Dry weight of mycelia; (C) 林可霉素 Lincomycin; (D) ADH比活力 Specific activity of ADH

○—○ 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the medium; ●—● After cultivation 36h, add 0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to the culture medium.

低,到发酵后期ADH比活力很低;在菌体生长36h补加0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后,ADH在48h达到最高水平,随后酶活力水平又下降。48h时菌体的生成量已是12h的4倍,以此时的菌体为ADH分离纯化材料。

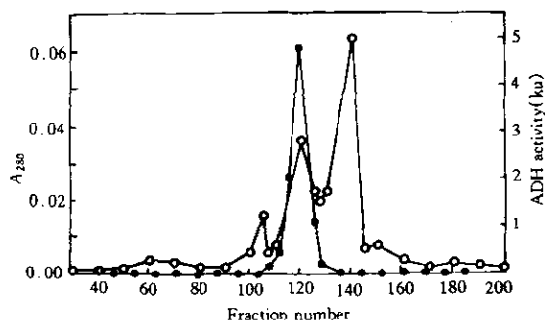


图2 ADH的Sepharose 6B凝胶过滤层析图

Fig.2 Sepharose 6B chromatography of ADH

○—○ 吸光度 Absorbance at 280nm;
●—● 酶活力 Enzyme activity.

当氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2%) 时,发酵36h后补加0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对林可霉素的生物合成无显著影响。这可能是 NH_4^+ 对林可霉素的生物合成的氨阻遏效应主要发生在发酵的前期。因而推测 NH_4^+ 并不是直接抑制抗生素合成酶的活力,而是在早期影响抗生素合成途径中某一个酶的合成。在吸水链霉菌井冈变种合成井冈霉素^[11]和

Streptomyces clavuligerus 合成头孢菌素^[12]以及地中海诺卡氏菌合成力复霉素的过程中也存在此种现象^[13]。

表2 林肯链霉菌Z-512 ADH的分离纯化

Table 2 Purification of ADH from *S. lincolnensis* Z-512

纯化步骤	总活力	蛋白总量	比活力	回收率	提纯倍数
Purification step	Total activity (ku)	Total protein (mg)	Sp. act. (ku/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	585	668.8	0.875	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	486	194.7	2.50	83.1	2.86
DEAE-52 chromatography	370	82.8	4.46	63.2	5.1
Affi-Gel Blue chromatography	292	4.8	60.8	49.9	69.5
Sepharose 6B chromatography	72	0.3	240	12.3	274

2.2 林肯链霉菌 ADH 的分离纯化

采用硫酸铵分部沉淀、DE-52离子交换柱层析和亲和蓝柱层析和 Sepharose 6B 凝胶过滤的方法,分离纯化了林肯链霉菌 ADH 274 倍(图 2),得到纯的 ADH。分离纯化结果见表 2。

从表中可以看出,林肯链霉菌 Z-512 的 ADH 活力非常高,比活力高达 240ku / mg,是迄今为止所有已报道的纯化 ADH 中活力最高的。因而具有很高的应用价值。

2.3 林肯链霉菌丙氨酸脱氢酶(ADH)的性质

2.3.1 酶的纯度:经过 Sepharose 6B 凝胶过滤后得到的酶 ADH 在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)图谱上呈现一条带,达到了电泳纯(图 3)。

2.3.2 酶的分子量和亚基:采用浓度梯度 PAGE(4%~30%)和 Sepharose 6B 分子筛测定林肯链霉菌 ADH 的天然分子量,结果均为 170 000。

ADH 经 SDS-PAGE,电泳图谱上也只有一条蛋白染色带(图 4)。由标准曲线求出 ADH 的亚基分子量为 42 500。

由全酶分子量和亚基分子量可以推算出 ADH 由 4 个相同的亚基组成。在已有的报

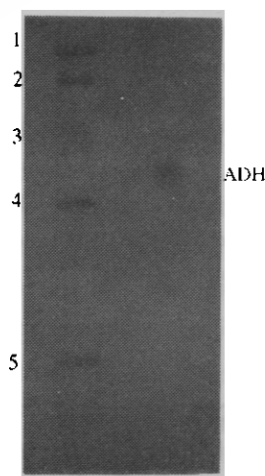


图 3 ADH 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of ADH

Molecular mass standard: 1. Thyroglobulin (669 000); 2. Ferritin (440 000); 3. Catalase (232 000); 4. Lactate Dehydrogenase (140 000); 5. Albumin (67 000).

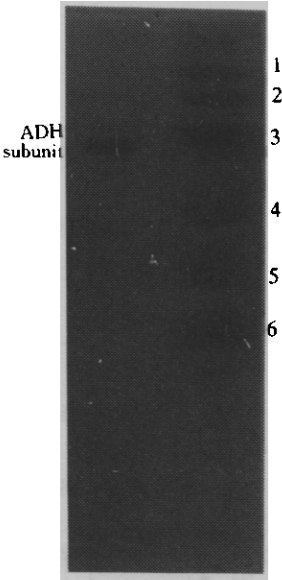


图4 ADH的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.4 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of ADH
Molecular mass standard: 1.Phosphorylase b(94 000); 2. Albumin (67 000); 3. Ovalbumin (43 000); 4. Carbonic Anhydrase (30 000); 5. Trypsin Inhibitor (20 100); 6. α -Lactalbumin(14 400).

表4 林肯链霉菌ADH的稳定性

Table 4 Stability of ADH from *S. lincolnensis*

温度 Temperature (°C)	时间 Time (min)	残留活力 Remaining activity (%)
0	30	100.0
20	30	100.0
28	30	100.0
37	30	98.6
45	30	96.7
50	30	87.7
55	30	69.0
60	30	9.4

的应用前景。

道中,不同来源的 ADH 大多为 6 个亚基,少数为 4 个亚基。

2.3.3 林肯链霉菌 Z-512 ADH 的动力学:ADH 对不同底物的表观米氏常数 K_m ,可根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图计算出来。在还原氨基化反应中 (pH9.0),ADH 对丙酮酸、 NH_4^+ 、NADH 的 K_m 值和 在氧化脱氨基反应中 (pH9.5),ADH 对 L-Ala、 NAD^+ 的 K_m 值见表 3。

表3 林肯链霉菌Z-512的ADH对不同底物的 K_m 值
Table 3 K_m Values for various substrates of ADH

底物 Substrate	pH	米氏常数 K_m (mol/L)
Pyruvate	9.0	2.08×10^{-4}
NH_4^+	9.0	2.00×10^{-2}
NADH	9.0	2.38×10^{-5}
L-Ala	9.5	1.43×10^{-2}
NAD^+	9.5	6.67×10^{-5}

2.3.4 pH 对林肯链霉菌 Z-512 ADH 活力的影响:ADH 催化还原氨基化反应的最大活力在 pH9.0,催化氧化脱氨基反应之最适 pH 为 9.5。在已报道的不同微生物中的 ADH 的最适 pH 均偏碱。

2.3.5 温度对林肯链霉菌 Z-512 ADH 活力的影响:在 20℃ 至 70℃ 之间测定,50℃ 时,ADH 的还原氨基化反应和氧化脱氨基反应活力均最高。

2.3.6 林肯链霉菌 Z-512 ADH 的稳定性:Z-512 的 ADH 在 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.4) 中,在不同的温度下保温 30 min,酶的残留率见表 4。

Z-512 的 ADH 在缓冲液 A 或 B (pH7.0 或 8.0) 中,置 4℃ 冰箱贮存 1 年,残存活力仍可保持在 80% 以上。说明此酶是相当稳定的,因而具有很高的应用价值和广泛

参 考 文 献

- [1] Aharonowitz Y, Demain A L. *Can J Microbiol*, 1979, **25**: 61~67.
[2] 倪楷英, 焦瑞身. 微生物学报, 1984, **24**(3): 217~223.
[3] 范秀容. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1980. 82~87.
[4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 256~275.
[5] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254.
[6] Sedmak J J, Grossberg S E. *Anal Biochem*, 1977, **79**: 544~552.
[7] Aharonowitz Y, Friedrich C G. *Arch Microbiol*, 1980, **125**: 137~142.
[8] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 武汉: 武汉大学出版社, 1988. 326~328.
[9] Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969, **244**: 4406~4412.
[10] Itoh N, Morikawa R. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**: 2511~2519.
[11] 夏天辉, 焦瑞身. 抗生素, 1986, **11**(5): 439~443.
[12] Aharonowitz Y. *Ann Rev Microbiol*, 1980, **34**: 209~233.
[13] 刁 著, 焦瑞身. 微生物学报, 1991, **31**(3): 206~212.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF ALANINE DEHYDROGENASE FROM *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS*

Jin Zhe Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Alanine Dehydrogenase (L-Alanine: NAD⁺ oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.1) was purified from *Streptomyces lincolnensis* through four steps: (NH₄)₂SO₄ precipitation, DEAE-cellulose 52, Affi-Gel Blue and Sepharose 6B. Molecular weight of the enzyme was determined as 170 000 by gel filtration and concentration gradient PAGE. SDS-PAGE showed only one band of 42 500, demonstrating that ADH from *Streptomyces lincolnensis* was consisted of four identical subunits. The optimal pH for amination was 9.0, for deamination 9.5. The optimal temperature for both amination and deamination was 50°C. The *K_m* value for pyruvate, NH₄⁺, NADH, L-Ala and NAD⁺ were 2.08×10^{-4} mol / L, 2.00×10^{-2} mol / L, 2.38×10^{-5} mol / L, 1.43×10^{-2} mol / L and 6.67×10^{-5} mol / L, respectively.

Key words *Streptomyces lincolnensis*, Alanine Dehydrogenase, Purification and properties