

猪肝乙醇脱氢酶的分离纯化及部分性质

傅 婷, 王 丹, 万 骥, 唐云明*

(西南大学生命科学学院, 重庆市甘薯工程研究中心, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 新鲜猪肝经匀浆、缓冲液抽提、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose离子交换层析及Superdex-200凝胶过滤层析, 获得电泳纯的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)。纯化结果显示: 该酶比活力为1 622.33 U/mg, 回收率为29.05%, 纯化倍数为34.58; 该酶分子质量约为171.79 kD, 亚基分子质量约为43.68 kD。ADH酶学性质研究显示: 最适反应温度和pH值分别为45 ℃和10.0; 在25~45 ℃及pH 7.5~9.0范围内稳定性较好; 最适条件下测得该酶对乙醇的 K_m 值为19 mmol/L; 正丁醇、氯仿、异丙醇、十二烷基硫酸钠、草酸、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 对该酶的抑制作用最强, Mg^{2+} 对该酶有激活作用, EDTA对该酶有双重作用。

关键词: 猪肝; 乙醇脱氢酶; 分离纯化; 酶学性质

Isolation, Purification and Partial Characterization of Alcohol Dehydrogenase from Pig Liver

FU Ting, WANG Dan, WAN Ji, TANG Yunming*

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Sweetpotato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Electrophoresis-purity alcohol dehydrogenase (ADH) from pig liver was obtained through homogenization, buffer extraction, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography and Superdex-200 gel filtration chromatography. Results showed that the specific activity of the purified ADH was 1 622.33 U/mg with an activity recovery of 29.05% and a purification fold of 34.58. The relative molecular weight of the ADH was approximately 171.79 kD, in which the subunit molecular mass was roughly 43.68 kD. The enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH for the ADH were 45 ℃ and 10.0, respectively. The enzyme was stable at 25–45 ℃ and pH 7.5–9.0, and its apparent K_m towards ethanol was 19 mmol/L. The enzyme activity of ADH could be strongly inhibited by *n*-butanol, chloroform, isopropanol, sodium dodecyl sulfate, oxalic acid, Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Ag^+ , and activated by Mg^{2+} . EDTA had a dual effect on this enzyme.

Key words: pig liver; alcohol dehydrogenase; isolation and purification; enzymatic properties

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 17-0179-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201517034

乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)广泛存在于人和哺乳动物的肝脏、植物组织及微生物中, 是生物体内重要的氧化还原催化剂之一, 作为生物体内主要短链醇代谢的关键酶, 其在很多生理过程中起着重要作用^[1-6]。该酶广泛应用于临床、化工及食品等领域^[7-9]。国内市场上的ADH产品几乎都来源于酿酒酵母, 因其来源单一、且高纯度ADH价格昂贵, 所以寻求来源广泛、纯度高、成本低廉的ADH在理论和实践方面均具有十分重要的意义。目前国内外研究人员已对多种来源的ADH进行了相关研究^[10-12], 但尚未见猪肝ADH的相关报道。本实验以价廉易得的猪肝为原材料提取ADH并对其部分酶学性质进行研究, 旨在为ADH的获得提供一条新途径, 更为以后对ADH的深入研究提供参考。

收稿日期: 2014-09-04

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目(CSTC, 2011AB1027)

作者简介: 傅婷(1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: futing3526@126.com

*通信作者: 唐云明(1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: tbright@swu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肝 重庆市北碚区永辉超市。

考马斯亮蓝R-250、三羟甲基氨基甲烷 美国Bio-Rad公司; DEAE-Sepharose、蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)标准品及Superdex-200凝胶层析分子质量标准品 美国GE Healthcare公司; 甲叉-双丙烯酰胺、丙烯酰胺 瑞士Fluka公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2550型分光光度计、蛋白核酸定量仪 日本

岛津公司; MC4L冷冻干燥机 德国Uni Equip公司; Mill-Q plus超纯水仪 美国Millipore公司; pHs-32W微电路pH计 上海理达仪器厂; 精密电子天平 瑞士Mettler-Toledo公司; GL-21M高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; AKTA prime plus蛋白质纯化系统 美国GE公司; 垂直板电泳槽和电泳仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 猪肝ADH粗酶液的制备

将新鲜猪肝去除结缔组织和脂肪, 称取50 g, 用剪刀剪碎后按1:4的比例加入预冷的Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中, 匀浆后放于4℃冰箱中静置抽提2 h, 离心30 min (12 000 r/min, 4℃)后所得上清液即为粗酶液。

1.3.2 硫酸铵分级沉淀

向粗酶液中加入硫酸铵粉末至30%饱和度, 4℃条件下盐析2 h, 4℃、12 000 r/min离心30 min, 弃沉淀收集上清液; 往上清液中加入硫酸铵粉末至70%饱和度, 4℃盐析1.5 h, 4℃、12 000 r/min离心30 min, 弃上清收集沉淀; 将沉淀用0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)溶解, 再用10 mmol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)作透析液, 于4℃冰箱中透析24 h后, 即得初酶液。

1.3.3 DEAE-Sepharose离子交换层析

DEAE-Sepharose离子交换层析柱用50 mmol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液(含1 mmol/L二硫苏糖醇)平衡好后, 取8 mL初酶液上柱, 用0~0.5 mol/L的NaCl溶液(用50 mmol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液配制)进行线性梯度洗脱, 流速0.5 mL/min, 每管收集5 mL; 测定各管ADH活力和蛋白质含量, 收集活性较高的酶液, 透析并冷冻干燥后保存备用。

1.3.4 Superdex-200凝胶过滤层析

Superdex-200层析柱用50 mmol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液(含1 mmol/L二硫苏糖醇)平衡后, 取在1.3.3节中收集的干燥后的样品, 用双蒸水溶解后取3 mL上柱, 用50 mmol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液(含1 mmol/L二硫苏糖醇)缓冲液洗脱, 流速0.3 mL/min, 每管收集3 mL; 测定各管ADH活力和蛋白含量; 收集活性较高的几管酶液, 4℃超纯水透析脱盐24 h, 冷冻干燥后得到ADH纯品, 并于-20℃冰箱保存备用。

1.3.5 酶活力的测定

参照文献[13]方法(稍作改动)进行测定: ADH在催化乙醇转化为乙醛的同时, 将辅酶NAD⁺还原成NADH, 而NAD⁺和NADH各在260、340 nm波长处有最大吸收峰, 因此以NAD⁺为辅酶的脱氢酶都可以通过测定340 nm吸光度的变化, 定量测定酶的活力。本实验测酶体系包括: 3 mL缓冲液(0.1 mol/L、pH 8.0的Tris-HCl)、0.4 mL 0.2 mol/L的乙醇、0.1 mL 4.5 mmol/L

NAD⁺、80 μL酶液。酶活力单位定义为: 将A_{340 nm}在25℃、1 min内每变化0.001定义为一个活力单位(U)。

1.3.6 猪肝ADH纯度鉴定及分子质量测定

通过SDS-PAGE法对1.3.4节中获得的酶活力较高管ADH进行纯度鉴定及亚基分子质量的测定, 制备质量分数分别为5%的浓缩胶和12%的分离胶, 上样量为10 μL, 经SDS-PAGE法测定ADH亚基分子质量。用凝胶层析法测定ADH全分子质量^[14]。

1.3.7 蛋白质含量的测定

采用紫外分光光度法与考马斯亮蓝(Bradford)法测定^[14]。

1.3.8 猪肝ADH部分酶学性质

1.3.8.1 ADH的最适温度和热稳定性

在pH 8.0条件下、不同温度(25~80℃)下测定ADH的酶活力, 将酶活力最高值记为100%, 计算各温度下的相对酶活力, 以确定其最适反应温度。将酶液分别置于不同温度(25~75℃)下保温不同的时间后, 测定ADH的酶活力, 将不保温时测得的酶活力记为100%, 计算温度不同时间下的相对酶活力, 以研究该酶的热稳定性。

1.3.8.2 ADH的最适pH值和pH值稳定性

在45℃, 不同pH值(4.0~10.6)的缓冲体系中测定ADH的酶活力, 将酶活力最高值记为100%, 计算各pH值条件下的相对酶活力, 以确定其最适反应pH值。将酶液分别置于不同pH值的缓冲液中孵育2 h后分别测定其酶活力, 将酶活力最高值记为100%, 计算各不同pH值缓冲液孵育后酶液的相对活力, 以研究该酶的pH值稳定性。

1.3.8.3 ADH米氏常数(K_m)的测定

采用双倒数作图法^[15](Lineweaver-Burk法), 以不同浓度(10~100 mmol/L)的乙醇作为底物, 在45℃、pH 10.0最适反应条件下测定猪肝ADH的酶活力, 求出猪肝ADH的K_m值。

1.3.8.4 不同有机溶剂对ADH活性的影响

将ADH酶液分别与等体积的不同体积分数的氯仿、甲醇、异丙醇、正丁醇混合并在常温下孵育20 min后, 分别在最适反应条件(45℃、pH 10.0)下测酶活力, 将等体积双蒸水稀释后酶液的活力记为100%, 计算ADH的相对酶活力。

1.3.8.5 不同化合物对ADH活性的影响

将ADH酶液分别与等体积的不同浓度的抗坏血酸、草酸、尿素、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、SDS混合并在常温下孵育20 min后, 分别在最适反应条件(45℃、pH 10.0)下测酶活力, 将等体积双蒸水稀释后酶液的活力记为100%, 计算ADH的相对酶活力。

1.3.8.6 部分金属离子对ADH活性的影响

将ADH酶液分别与等体积不同浓度的金属离子

(Zn^{2+} 、 K^{+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+})混合,在常温下孵育20 min后,分别在最适反应条件(45℃、pH 10.0)下测酶活力,将等体积双蒸水稀释后酶液的活力记为100%,计算ADH的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 猪肝ADH的分离纯化

猪肝ADH初酶液经DEAE-Sepharose离子交换层析后结果如图1所示,该酶活力峰主要集中在10~18管,其中第14管酶活力最高,收集酶活性较高管的酶液,冷冻干燥后用于凝胶过滤层析,经Superdex-200凝胶层析,洗脱图谱如图2所示,酶活性峰主要集中在27~35管,其中第31管为酶活力最高峰,收集第31管酶液,用双蒸水透析24 h后冷冻干燥,通过SDS-PAGE电泳,显示为单一条带(图3),说明该酶经纯化后达到了电泳纯。该酶的整个分离纯化结果如表1所示,最终得到猪肝ADH的回收率为29.05%,纯化倍数为34.58,酶比活力为1 622.33 U/mg。

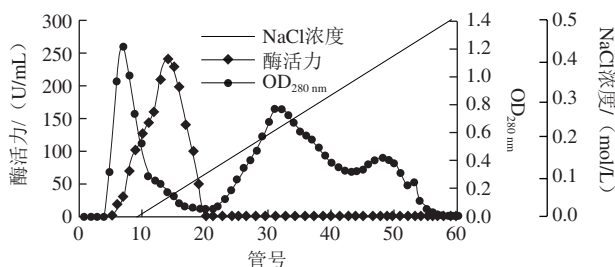


图1 猪肝ADH的DEAE-Sepharose层析图谱

Fig.1 DEAE-Sepharose chromatography of ADH from pig liver

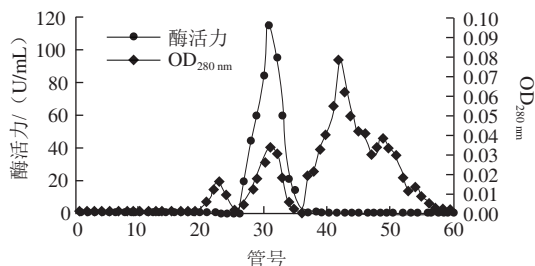


图2 猪肝ADH的Superdex-200层析图谱

Fig.2 Superdex-200 chromatography of ADH from pig liver

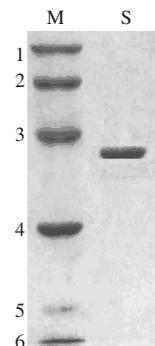
表1 猪肝ADH的纯化结果

Table 1 Purification of ADH from pig liver

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白质量/mg	酶比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
匀浆后离心	159 562.5	3 400.38	46.92	100	1
硫酸铵分级沉淀	121 875	1 266.5	96.23	76.38	2.05
DEAE-Sepharose	54 600	78.29	697.41	34.22	14.86
Superdex-200	46 350	28.57	1 622.33	29.05	34.58

2.2 猪肝ADH的纯度鉴定及分子质量

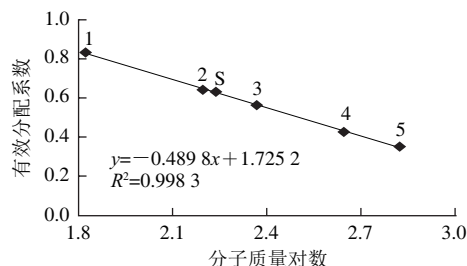
纯化后的ADH经SDS-PAGE电泳显示为单一条带(图3),测得ADH亚基分子质量约为43.68 kD;用Superdex-200凝胶过滤层析测得全酶的分子质量为171.79 kD(图4),由此可以推断该酶由4个相同的亚基组成。



M.分子质量标准品;1.兔磷酸化酶B 97.0 kD;2.牛血清白蛋白 66.0 kD;3.鸡卵清蛋白45.0 kD;4.牛碳酸酐酶30.0 kD;5.胰蛋白酶抑制剂20.1 kD;6.α-牛乳清蛋白14.4 kD;S.猪肝ADH 43.68 kD。

图3 猪肝ADH的SDS-PAGE图谱

Fig.3 SDS-PAGE of ADH from pig liver



1.牛血清白蛋白66.45 kD;2.醛缩酶158 kD;3.过氧化氢酶232 kD;4.铁蛋白440 kD;5.甲状腺球蛋白669 kD。

图4 Superdex-200凝胶过滤层析测得的猪肝ADH分子质量

Fig.4 Molecular weight estimation of ADH from pig liver by Superdex-200 gel filtration chromatography

2.3 猪肝ADH的酶学性质

2.3.1 ADH的最适温度和热稳定性

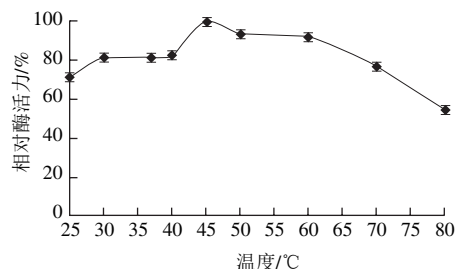


图5 温度对猪肝ADH活力的影响

Fig.5 Effect of temperature on the activity of ADH from pig liver

最适温度的实验结果如图5所示,25~45℃时,酶活力随温度升高而增加,当温度高于45℃酶活力随温度

升高而下降,因此该酶最适温度为45℃,其温度作用范围广,在80℃条件下其相对酶活力仍保持在55.4%。温度稳定性的实验结果如图6所示,ADH在25~45℃范围内热稳定性较好,保温3h后其相对酶活力也分别保持在99.2%、98.2%和86.2%;超过55℃保温后酶活力迅速下降,在65℃保温2h酶活力完全消失,75℃保温1h酶活力完全消失。

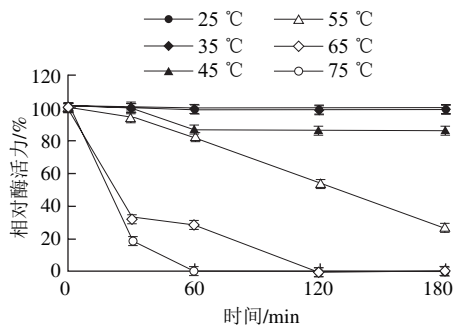


图6 猪肝ADH的热稳定性

Fig.6 Thermal stability of ADH from pig liver

2.3.2 ADH的最适pH值和pH值稳定性

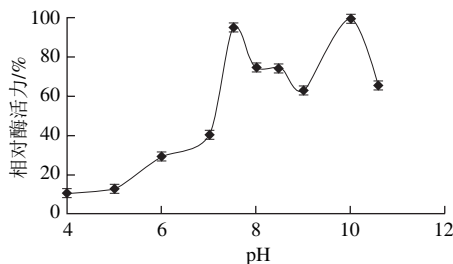


图7 pH值对猪肝ADH活力的影响

Fig.7 Effect of pH on the activity of ADH from pig liver

如图7所示,该酶在pH 10.0时有最大活力,在pH 7.5时其相对酶活力达到95.5%。pH值稳定性实验结果如图8所示,纯化后的酶液在pH 7.5~9.0条件下孵育2h后,酶活力均保持在较高水平(75%以上);pH值小于7.0的酸性条件或pH值大于9.0的碱性条件下保存2h其酶活力迅速下降。

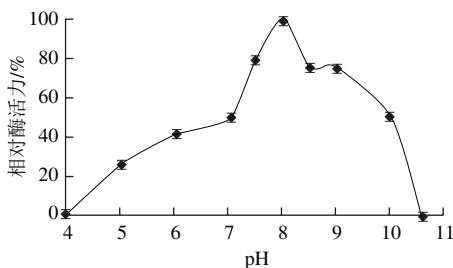


图8 猪肝ADH的pH值稳定性

Fig.8 pH Stability of ADH from pig liver

2.3.3 ADH的米氏常数 (K_m)

在45℃, pH 10.0条件下以不同浓度的乙醇作为底物,测定该酶活力,并采用双倒数作图法求得ADH的米氏常数,结果如图9所示,其 K_m 值为19 mmol/L。

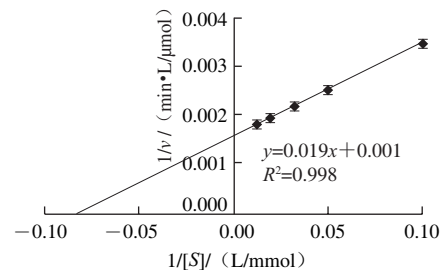


图9 双倒数法测定猪肝ADH的米氏常数图

Fig.9 K_m determination of ADH from pig liver by Lineweaver-Burk plot

2.3.4 不同有机溶剂对ADH活性的影响

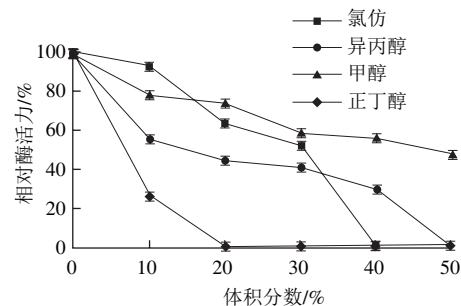


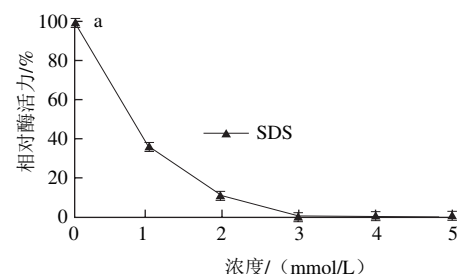
图10 氯仿、异丙醇、甲醇、正丁醇对猪肝ADH活力的影响

Fig.10 Effects of chloroform, isopropyl alcohol, methanol and *n*-butanol on the activity of ADH from pig liver

如图10所示,氯仿、异丙醇、甲醇、正丁醇4种有机溶剂对该酶均有较强的抑制作用,且随着有机溶剂体积分数越大其抑制作用越强,其中正丁醇对该酶抑制作用最为强烈,当体积分数达到20%时该酶活性完全丧失。

2.3.5 不同化合物对ADH活性的影响

由图11a可知,SDS对该酶有很强的抑制作用,当浓度达到3 mmol/L时,酶几乎完全失活;EDTA对该酶活性的影响具有双重作用,低浓度时对该酶有一定的激活作用,当其浓度大于10 mmol/L时对该酶有一定的抑制作用;草酸和尿素对该酶具有抑制作用,且此作用会随着化合物浓度增高而增强;抗坏血酸对该酶的影响最小(图11b)。



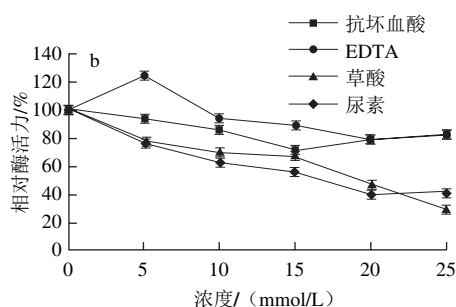


图 11 不同化合物对猪肝ADH活力的影响

Fig.11 Effect of various compounds on the activity of ADH from pig liver

2.3.6 部分金属离子对猪肝ADH活性的影响

通过实验发现, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^{+} (图12a、12c) 对该酶的活力影响不大; Mg^{2+} 对该酶有一定的激活作用 (图12a); Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 对该酶均有不同程度的抑制作用, 其中 Zn^{2+} 抑制作用最强, 当其浓度达到0.4 mmol/L时酶活力已完全丧失, Ag^{+} 和 Cu^{2+} 浓度达到0.5 mmol/L时该酶也彻底失活。

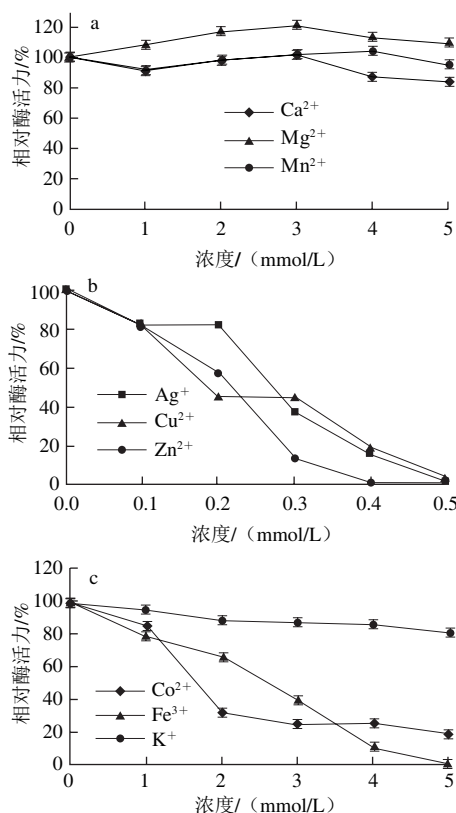


图 12 不同金属离子对猪肝ADH活力的影响

Fig.12 Effect of metal ions on the activity of ADH from pig liver

3 讨论

本实验以猪肝为原材料, 经分离纯化得到了电泳纯的ADH, 利用此方法分离纯化ADH相较于已有研究具有

以下优势: 猪肝廉价易得、一年四季均可取材、纯化步骤简单、实验周期短、其回收率和纯化倍数高。相较于兔肝ADH^[16], 本实验减少了DEAE-纤维素除杂蛋白及超滤步骤, 但仍获得了电泳纯的ADH。

猪肝ADH最适温度为45℃, 与柿果实^[17]和醋酸杆菌^[18]一致, 高于酿酒酵母(37℃)^[19]低于硬质小麦^[20](50℃)。该酶在80℃时相对酶活力为55.4%, 相比于柿果实(60℃, 完全失活)、蚕豆^[21](70℃, 完全失活)、酿酒酵母^[19](45℃, 活性急剧下降), 其温度作用范围广。该酶在25~45℃条件下最为稳定, 较醋酸杆菌(20~30℃)、酿酒酵母(30~40℃), 该酶热稳定性范围较大, 较耐热。

pH 10.0时猪肝ADH活性最高, 这与多数豆类^[21]一致, 与人血清ADH^[22](pH 9.0)接近, 较莲雾^[24](pH 11.0)低, 比蚕豆^[21](pH 8.7)高。该酶在pH 7.5和10.0均出现酶活峰, 这与兔肝(pH 10.8和7.5)、松鼠猴(pH 10.8和8.2)类似。ADH的最适pH值不同可能与材料来源不同相关, 如植物ADH的最适pH值多偏碱性, 很多微生物如草莓中提取的扭脱甲基杆菌、葡萄杆菌^[26]和醋酸杆菌^[27]ADH的最适pH值均出现在酸性区域。

猪肝ADH亚基分子质量约为43.68 kD, 与马肝^[28](44 kD)类似, 高于栖热菌^[29](37.5 kD)、黄杆菌^[30](40 kD)、酒类酒球菌^[31](35 kD)。该酶对底物乙醇的 K_m 值为19 mmol/L, 与柿果实(8.33 mmol/L)、兔肝(3.0 mmol/L)、人血清^[22](3.03 mmol/L)、酿酒酵母(4.5 mmol/L)相比有较大差异, 说明不同材料、不同组织来源的乙醇脱氢酶对底物的亲和力不同, 可能是因为生物体为了更好地适应环境, 满足生长代谢的需求而表现出的生物特异性, 这是生物体基因不断进化并选择性表达的结果^[32]。

氯仿、异丙醇、甲醇、正丁醇均对该酶有抑制作用, 可能原因如下: 酶在有机溶剂环境中受到了扩散限制和立体障碍, 使得酶与底物接触受到限制; 该酶在有机溶剂中的构象发生了变化, 酶只有当其分子本身具有一定构象时才有一定的催化活性, 有机溶剂缺乏提供多种氢键的能力, 而且由于它们的低介电常数往往会导致蛋白质带电基团之间更强的静电作用, 使蛋白质的“刚性”更强, 使其活性降低^[33]。

不同金属离子对ADH活性影响有很大差异, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^{+} 对该酶活力影响不大; Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 对该酶均有不同程度的抑制作用, 这与大多数文献的相关报道结果类似^[23-24], 其中 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 和 Cu^{2+} 在低浓度下即可使酶完全失活, 据悉此3种离子可与硫醇发生反应生成硫醇盐^[34], 可能正是这一结构的变化影响了酶活性中心构象, 导致酶失活; Mg^{2+} 对该酶有一定的激活作用, 这与米根霉^[35]和啤酒废酵母中 Mg^{2+} 对该酶的

抑制作用不同,这说明同种金属离子对不同来源的同一种酶的活性会产生不同的效应。

自1937年首次分离出乙醇脱氢酶以来,国内外对该酶的研究从未间断,对于多种来源的ADH的研究也已深入到分子水平,通过以上对于不同来源的ADH的各个性质进行比较,了解到不同来源的酶具有不同的生化性质,由此决定了其不同的实际用途。因此为了更好的开发和利用猪肝ADH,还有待在分子水平上对其进行深入研究。

参考文献:

- [1] CHROSTEK L, JELSKI W, SZMITKOWSKI M, et al. Alcohol dehydrogenase(ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase(ALDH) activity in the human pancreas[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2003, 48(7): 1230-1233.
- [2] SUN Hongwei, PLAPP B. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family[J]. Journal of Molecular Evolution, 1992, 34(6): 522-535.
- [3] CLEMENS D L, HALGARD C M, MILES R R, et al. Establishment of a recombinant hepatic cell line stably expressing alcohol dehydrogenase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 321(2): 311-318.
- [4] NICULESCU M, ERICHSEN T, SUKHAREV V. Quinohemo protein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 37(463): 39-51.
- [5] 霍丹群, 张云茹, 侯长军. *Acetobacter* Z127乙醇脱氢酶的纯化及酶学性质[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2006, 29(4): 65-68.
- [6] 祁月魁, 安家彦, 陈莉. 醋酸杆菌AS1.41产乙酸发酵条件的优化[J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(1): 23-25.
- [7] 胡建强, 刘凤兰. 血清乙醇脱氢酶活性测定及临床应用[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(1): 110-111.
- [8] 伏建峰, 史清海, 路西春, 等. 乙醇脱氢酶法测定血浆中乙醇[J]. 西北国防医学杂志, 2005, 26(5): 345-347.
- [9] 张海生, 陈锦屏. 柿饼加工中脱涩和反涩机理的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(12): 39-40.
- [10] 隋德新, 张艳华, 吴燕. 酵母乙醇脱氢酶的快速纯化[J]. 江苏农学院学报, 1988, 9(3): 32-33.
- [11] CHENG Fangfang, TAO Hu, YAN An, et al. Purification and enzymatic characterization of alcohol dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 90(2): 74-77.
- [12] 姜萍. 乙醇脱氢酶应用与纯化进展[J]. 上海化工, 2008, 33(12): 31-33.
- [13] 汤甜甜, 周亮, 吉鹏飞, 等. 人乙醇脱氢酶ADH1B2在毕赤酵母中的表达及活性分析[J]. 浙江大学学报, 2012, 39(5): 557-563.
- [14] 李建武, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 171-223.
- [15] 陈钧辉, 陶力, 朱婉华, 等. 生物化学实验[M]. 5版. 北京: 科学出版社, 2004: 204-205.
- [16] HOSHINO T. Rabbit liver alcohol dehydrogenase: purification and properties[J]. Journal of Biochemistry, 1985, 97(4): 1163-1172.
- [17] 梁银娜, 李宝. 柿果实乙醇脱氢酶酶学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(5): 65-70.
- [18] 张晓霞. 乙醇脱氢酶的制备工艺及酶学性质研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2008: 36-48.
- [19] 吴桂英. 酿酒酵母乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2007: 51-56.
- [20] SUSEELAN K N, MITRA R, BHATIA C R. Purification and characterization of variant alcohol dehydrogenase isozymes from durum wheat[J]. Biochemical Genetics, 1987, 25(7/8): 581-590.
- [21] LEBLOVA S, MANCAL P. Characterization of plant alcohol dehydrogenase[J]. Physiologia Plantarum, 1975, 34(3): 246-249.
- [22] 卓孝福, 陈仁奋, 郑靖. 血清乙醇脱氢酶活性测定及临床意义[J]. 上海医学检验杂志, 1998, 13(2): 84-86.
- [23] KOUTSOM POGERAS P, KYRIACOU A, ZABETAKIS I. Characterization of NAD-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberry's achenes (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta) and comparison with respective enzymes from *Methylobacterium extorquens*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(5): 828-835.
- [24] HSU Y M, T SENG M J, LIN C H. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase isozymes in flooded wax-apple (*Syzygium samarangense* Merr. et Perry) roots[J]. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science, 2002, 40(1): 19-27.
- [25] LEBLOVD S. Isolation and partial characterization of alcohol dehydrogenase from broad bean (*Vicia faba*)[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1974, 1(4): 579-582.
- [26] ISLAMI M, SHABANI A, SAIFI-ABOLHASSAN M, et al. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(2): 208-213.
- [27] ABOLHASSAN M S, SEPEHR S, ISLAMI M, et al. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein alcohol dehydrogenase from an ativestrain of *Acetobacter*[J]. Journal of Biological Sciences, 2007, 7(2): 315-320.
- [28] QUAGLIA D, IRWIN J A, PARADISI F. Horse liver alcohol dehydrogenase: new perspectives for an old enzyme[J]. Molecular Biotechnology, 2012, 52(3): 244-250.
- [29] HOLLRIGL V, HOLLMANN F, KLEEB A C, et al. TADH, the thermo stable alcohol dehydrogenase from *Thermus* sp. ATN1: a versatile new biocatalyst for organic synthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(2): 263-273.
- [30] TAKAYUKI K, TADAO O, IKUO M, et al. A cold-active and thermostable ADH of a psychrotolerant from Antarctic seawater, *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1[J]. Extremophiles, 2007, 11(2): 257-267.
- [31] VALLET A, SANTARELLI X, LONVAUD-FUNEL A, et al. Purification of an alcohol dehydrogenase involved in the conversion of methional to methionol in *Oenococcus oeni* IOEB 8406[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(1): 87-94.
- [32] 孙芳, 任美凤, 胡瑞斌, 等. 韭菜酸性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 187-191. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201317040.
- [33] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 297-299.
- [34] JOCELYN P C. Biochemistry of the SH Group[M]. New York: Academic Press, 1972: 63-93.
- [35] 郑志, 姜绍通, 罗水忠, 等. 米根霉乙醇脱氢酶粗酶液的特性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 115-118.