

柿果实乙醇脱氢酶酶学特性研究

梁银娜 李宝*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 以磨盘柿(*Diospyros kaki* Thunb.)果皮为试材,提取乙醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase)并进行纯化。经过30%~70%硫酸铵沉淀分离、Sephadex G-25 脱盐柱脱盐、DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析纯化后,研究温度、pH、金属离子、底物对乙醇脱氢酶活性的影响。结果表明,纯化后乙醇脱氢酶纯化倍数为41.80倍,活性回收率为44.73%。将乙醇脱氢酶液分别置于20、30、40、45、50、55和60℃温育后测定,其最适反应温度为45℃;在pH 5.0、7.0、8.0、9.0、10.0和11.0下乙醇脱氢酶的最适pH为10.0;在甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和戊醇为反应底物时,最适底物为丁醇;金属离子中, K^+ 和 Na^+ 对活性略有增强的作用,二价金属离子除 Mg^{2+} 几乎没有影响之外, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活性有一定的抑制作用, Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 则完全抑制了酶的活性。在25℃,pH 10.0的条件下ADH氧化乙醇的米氏动力学参数 K_m 值为8.33 mmol/L,最大反应速度 V_{max} 为0.021 μ mol/min。乙醇脱氢酶的活性受温度、pH、金属离子、底物的影响较大,并且只有在合适的条件下,酶活性才能达到最大值。

关键词 柿;乙醇脱氢酶;纯化;最适pH;金属离子

中图分类号 S 665.2

文章编号 1007-4333(2011)05-0065-06

文献标志码 A

Enzymatic characterizations of alcohol dehydrogenase of persimmon fruit

LIANG Yin-na, LI Bao*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Alcohol dehydrogenase (ADH, EC. 1. 1. 1. 1) was extracted from the pericarp tissues of ‘Mopanshi’ persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). The ADH crude extracts was precipitated and isolated with 30% - 70% $(NH_4)_2SO_4$ solution, then desalted by Sephadex G-25 Desalting columns, and finally purified by DEAE Sepharose Fast flow ion-exchange columns. The enzyme was subjected to different temperatures (20, 30, 40, 45, 50, 55 and 60 °C), different pHs (pH 5.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 and 11.0), metals (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+}) and substrates (methanol, ethanol, propyl alcohol, butyl alcohol and amyl alcohol). The results showed that the purification rate was up to 41.80 times. The active recovery rate was about 44.73%. The enzyme had highest activity for butyl alcohol oxidation at 45 °C and pH10.0, K_m 8.33 mmol/L and V_{max} 0.021 μ mol/min. The enzyme activity was increased at the presence of K^+ and Na^+ , but partially inhibited by Zn^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} , fully inhibited by Cu^{2+} and Fe^{3+} . Mg^{2+} has no effect on the enzyme. It is evident that ADH is largely influenced by temperature, acidity, metals and substrates. And high activity can only be obtained under proper conditions.

Key words Mopanshi persimmon; alcohol dehydrogenase (ADH); purification; characterization

乙醇脱氢酶(ADH, EC. 1. 1. 1. 1)在 NAD^+ 和 $NADH$ 的存在下,相应地催化乙醇的氧化和乙醛的还原。它广泛分布于各植物种类的各种植物器官

组织中,并有着重要作用。它参与芽休眠的解除过程^[1];在涝害发生时ADH出现数量^[2]及种类^[3]的增加,与植物的耐涝机制有一定联系;由于ADH

收稿日期:2011-03-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671713,30972395)

第一作者:梁银娜,硕士研究生, E-mail: liang_yinna@hotmail.com

通讯作者:李宝,副教授,从事柿果实发育及品种改良方面的研究, E-mail: libao@cau.edu.cn

同工酶在组织、器官间存在差异,可以辅助鉴别植物来源及品种^[4];它还与果实风味和芳香物质的合成相关^[5]。在蚕豆种子的发育过程中,幼胚的ADH活性最高,随着胚发育进程,ADH活性下降,并基本维持稳定^[6]。Yeung等^[7]发现,菜豆的种子在发育至子叶期之前,其种皮中ADH的活性很高,为胚胎在缺氧条件下的代谢提供必要的能量,而在低氧条件下,乙烯的存在对诱导拟南芥*Adh*基因表达是必需的^[8]。有研究认为在果实发育过程中,*Adh*基因的转录主要在成熟的果实中进行^[9-10]。

在对柿子的研究过程中,认为乙醛可直接与涩柿中的可溶性单宁起缩合反应,使柿果脱涩^[11-12]。许多研究者在柿果采后脱涩处理过程中也都发现乙醛和乙醇的积累现象,认为乙醛对脱涩有直接作用^[11,13]。柿子‘平核无’中ADH活性在果皮和果心中比较高,而在果肉中比较低,ADH活性随着果实成熟过程逐渐增加,特别是在果心中^[9]。ADH在果实采后成熟过程中也有着重要作用,将果实置于不同的处理环境中,ADH活性会出现不同的变化^[14-15]。Shiesh等则发现柿子脱涩之后,乙醇、乙醛的浓度和ADH的活性都有所增加^[16]。然而到目前为止,柿子ADH的研究主要集中在柿子脱涩过程中ADH的变化,关于酶学特性方面的研究少有报道。

本试验以磨盘柿果皮为试材,研究柿果皮乙醇脱氢酶酶学特性,希望能更好的了解乙醇脱氢酶在柿子生长发育过程中所起的作用,同时通过研究温度、pH、金属离子及底物等影响因素,了解造成乙醇脱氢酶活性变化的可能原因,以进一步了解乙醇脱氢酶酶学特性与柿果实脱涩之间的关系,并为酶特性的深入研究及柿果实采后管理措施的改进提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2009年进行,磨盘柿(*Diospyros kaki* Thunb.)于2008年9月份采自北京市房山区半壁店村果园,常规管理。低温状态下带回实验室后削取果皮,液氮研磨后置于-80℃低温冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液提取

粗酶液的提取方法参照Boskovic和Tobutt的

方法^[17]。提取液为0.1 mol/L Tris-HCl(50 mL 0.1 mol/L Tris-HCl, 50 mg DTT, 500 mg PEG 6000, 500 mg PVPP, 50 μL β-巯基乙醇, 3 g 蔗糖, pH 8.0), 1 g 样品加入4 mL 预冷提取液研磨成匀浆。4℃, 12 000 g 离心20 min, 上清液即为所需粗酶液。

1.2.2 酶的纯化

整个过程均需冰浴进行。在粗酶液中边搅拌边加入硫酸铵粉末至30%饱和度,静置30 min, 0℃, 12 000 g 离心20 min, 除去部分杂蛋白。取上清液, 加入(NH₄)₂SO₄直至达到70%的饱和度,静置1 h, 0℃, 12 000 g 离心20 min, 小心弃去下层溶液, 保留上层悬浮层, 加入等体积缓冲液A(150 mL 0.02 M Tris-HCl, 300 mg DTT, 300 mg PEG6000, 300 mg PVPP, 75 μL β-巯基乙醇, 1.8 g 蔗糖, pH 8.0)溶解。所得溶液用0.45 μm 滤器过滤后, 用Sephadex G-25 脱盐柱脱盐, 平衡缓冲液和洗脱缓冲液均为缓冲液A, 洗脱流速为5 mL/min。脱盐产物用DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱进一步纯化, 平衡缓冲液为缓冲液A, 洗脱缓冲液为缓冲液A加入0.1 mol/L NaCl, 洗脱流速为1 mL/min, 收集活性组分。

1.2.3 酶活测定方法

参照刘存德等方法^[18], 反应温度为25℃, 反应体系为3 mL, 其中含有0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0) 2.7 mL, 0.1 mL NAD⁺(5 mg/mL), 0.1 mL 无水乙醇, 对照用0.1 mL 去离子水代替乙醇, 反应用0.1 mL 酶液起。在340 nm下, 每30 s 记录一次数据, 测定4 min 内的光密度变化。以每分钟产生1 μmol NADH 为酶活力单位, U。

1.2.4 乙醇脱氢酶酶学特性测定

温度对酶活的影响: 将纯化后的酶液分别于不同的温度(20、30、40、45、50、55 和 60℃)下温育20 min, 按照1.2.3 方法测定ADH活性, 绘制相对活性-温度曲线, 确定酶促反应的最适温度。

pH对酶活的影响: 配制pH为5.0的乙酸-乙酸钠缓冲液, pH为7.0的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液, pH为8.0~11.0的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 按照1.2.3 方法测定酶活, 绘制相对活性-pH曲线, 确定ADH的最适pH。

金属离子对酶活的影响: 配制终浓度为5.0 mmol/L的不同金属盐化合物, 其中金属离子包括

Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺ 和 Fe³⁺。按照 1.2.3 方法测定不同金属离子对 ADH 酶活力的影响,以不加金属离子的反应液作为对照。

底物对酶活性的影响:分别以甲醇、丙醇、丁醇和戊醇代替乙醇,按照 1.2.3 的方法测定不同底物对酶活的影响,以乙醇为底物作为对照。

K_m 值的计算:在 25 °C, pH 10.0 的条件下配置不同乙醇浓度的反应液,按照 1.2.3 的方法测定酶活,调增记录时间为每 10 s 一次,测定 2 min,以

反应初速度和底物浓度作双倒数曲线,计算最大反应速度和 K_m 值。

2 结果与分析

2.1 ADH 的分离纯化效率

粗提液经 (NH₄)₂SO₄ 沉淀,HiTrap Desalting 脱盐,HiTrap DEAE FF 离子交换层析柱层析后,ADH 比活力增加了 41.74 倍,其得率为 44.73%,纯化倍数达到 41.8 倍(表 1)。

表 1 磨盘柿乙醇脱氢酶纯化结果

Table 1 Purification protocol of alcohol dehydrogenase from ‘mopanshi’

步骤	总蛋白/mg	酶活性/U	比活性/(U/mg)	蛋白回收率/%	活性回收率/%	纯化倍数
粗提液	109.00	9.39	0.086	100.00	100.00	1.00
30%~70%硫酸铵沉淀	13.00	7.46	0.574	11.93	79.45	6.65
脱盐	4.76	6.37	1.338	4.37	67.83	15.52
离子交换	1.17	4.20	3.590	1.07	44.73	41.80

2.2 ADH 的最适反应温度

测定纯化后的 ADH 酶液在不同的温度下温育 20 min 后的活性。磨盘柿 ADH 最适反应温度为 45 °C,在 20~40 °C 内随着温度的升高 ADH 活性逐渐增强,40~50 °C 时维持较高的活性,但随着温度的继续升高,酶活性下降,到 60 °C 时降至最低(图 1)。

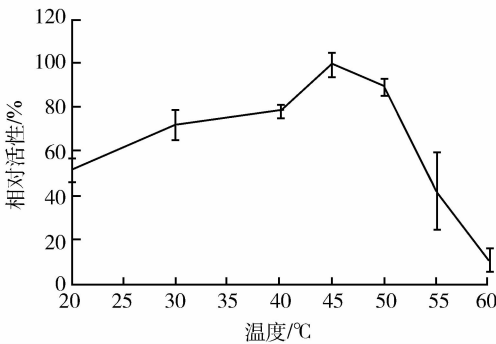


图 1 温度对 ADH 活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on ADH activity

2.3 ADH 的最适 pH

研究了磨盘柿 ADH 在 pH 为 5.0~11.0 的反应缓冲液中的活性,ADH 的最适反应缓冲液为 pH 10.0 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,在 pH 为酸性(5.0)及中性(7.0)时,ADH 几乎没有活性,在碱性环境中,酶活力逐渐上升直至 pH 10.0 到达最高值,在

pH 为 11.0 时,迅速降低至几乎为零(图 2)。

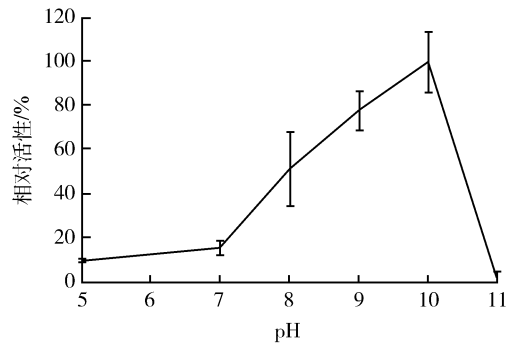


图 2 pH 对 ADH 活性的影响

Fig.2 Effect of pH on ADH activity

2.4 金属离子对 ADH 活性的影响

在研究的 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 共计 9 种金属离子中,一价金属离子 K⁺ 和 Na⁺ 对 ADH 活性略有增强的作用,而二价金属离子除 Mg²⁺ 对酶活性几乎没有影响外,Zn²⁺、Mn²⁺ 和 Ca²⁺ 对酶活性有一定的抑制作用,Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 则完全抑制了酶的活性(图 3)。

2.5 底物对酶活的影响

以甲醇、丙醇、丁醇和戊醇代替乙醇作为反应底物测定 ADH 的酶活性,其中甲醇完全抑制了 ADH 的酶活,丙醇、丁醇和戊醇均提高了酶活,而在丁醇中活性最高,是乙醇为底物时的 1.85 倍(图 4)。

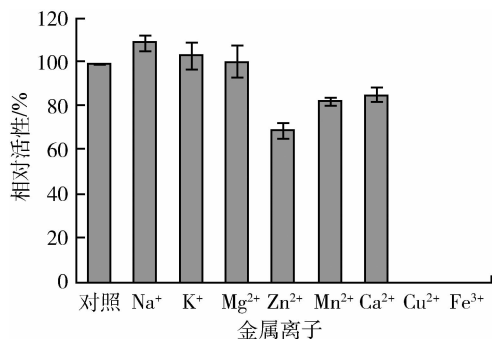


图3 金属离子对酶活性的影响

Fig. 3 Effect of mental ions on ADH activity

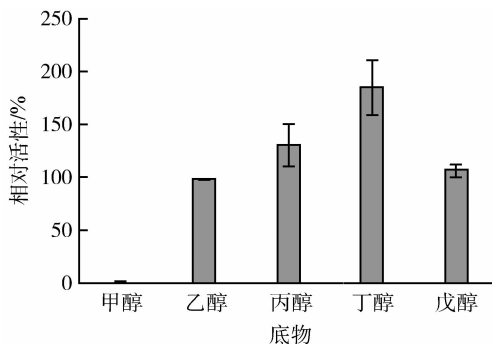


图4 反应底物对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of substance on ADH activity

2.6 乙醇脱氢酶的动力学特性

在 25 °C, pH10.0 的条件下配置不同乙醇浓度的反应液,乙醇浓度在 1~8 μL 的范围内,以底物浓度和反应速度作双倒数,得到 ADH 的 K_m 值如图所示,最大反应速度为 0.021 μmol/min, K_m 值为 8.33 mmol/L(图 5)。

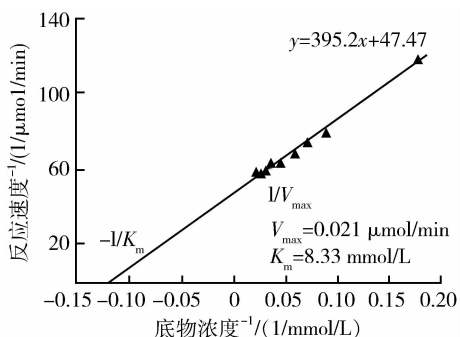


图5 乙醇脱氢酶动力学特性

Fig. 5 The kinetic behavior of ADH

3 讨论

乙醇脱氢酶(ADH)的活性主要受温度, pH, 金

属离子,底物等因素的影响。

本试验发现纯化后磨盘柿果皮 ADH 的最适反应温度为 45 °C,与硬质小麦^[19]中测定的最适温度 50 °C 接近,到 60 °C 则完全失去活性。Leblova 在研究蚕豆等的乙醇脱氢酶特性时也发现加热到 55 °C 时,该酶失去了 55% 的活性,当温度达到 70 °C 时酶完全失活^[20]。而这些达到 60 °C 就表现出热不稳定的酶,随着乙醇的增加,他们的稳定性缓慢增强^[21]。酶在达到最大活性前,反应速度随着温度的升高而加快,当温度达到最适温度 45 °C 后,随着温度的升高,酶蛋白变性,以至有活性的酶量减少,到 60 °C 时,几乎所有的酶都失活,反应速度降到最低值。

磨盘柿果皮 ADH 的适宜 pH 出现在碱性区域,这与与很多豆类^[21]一致,最适 pH 为 10.0,与草莓瘦果^[22]中测定的最适 pH 相同,在 11.0 时几乎没有活性,较莲雾中的最适 pH11.0 低^[23],而比蚕豆中的最适 pH8.7 高^[20]。ADH 的最适 pH 可能与试材种类相关,如植物的最适 pH 多偏碱性,而很多微生物如草莓中提取的扭脱甲基杆菌(methylobacterium extorquens)^[22]、葡萄杆菌^[24]和醋酸杆菌^[25] ADH 的最适 pH 均出现在酸性区域。究其原因,可能是因为过酸或过碱的条件下酶蛋白的构象会受到影响,甚至导致酶变性失活,同时, pH 也影响酶分子的解离状态,酶只有在一种解离状态下最有利于与底物结合,即在 pH 10.0 下磨盘柿乙醇脱氢酶的解离状态最有利于其与乙醇结合,酶活力最高。

不同金属离子对酶活性的影响差别较大。K⁺、Na⁺ 和 Mg²⁺ 对 ADH 活性影响都不大; Zn²⁺ 虽然被认为是酶的组成成分,但仍然对酶活性有所抑制^[20,22],并且影响较大(为对照的 70%); 与草莓中的研究一致^[22] Ca²⁺ 抑制 ADH 活性,但作用不是很大(为对照的 86%),也有研究认为 Ca²⁺ 对酶活性有促进作用^[24-25],原因是 Ca²⁺ 与酶活性抑制剂 EDTA 螯合,降低了 EDTA 的抑制作用; Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 完全抑制了酶的活性^[20,26],他们在反应液中生成了絮状物质,可能是在碱性反应液中离子浓度大于溶度积,而使得反应无法进行。Mackenzie 等^[27]在研究铁和锌离子对运动发酵单胞耐酸菌乙醇脱氢酶水平的调节时发现,在缺铁培养基中培养的细胞,与铁离子相关的乙醇脱氢酶(ADH2)活性降低,但对 ADH2 蛋白的合成过程没有影响,该酶在没有活性状态下非常稳定,不能通过添加铁离子来使其恢复活性,增

加铁离子可使 ADH2 活性加强,但需要在培养集中添加抗生素并重新合成酶。同时由于离子浓度不同,对酶的作用也不同,有时对同一种酶低浓度起激活作用,而高浓度起抑制作用。还有研究认为当 Cu^{2+} 离子浓度为 0.1 mmol/L 时就完全抑制了酶活性,认为 Cu^{2+} 与 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 在蛋白中有相同的结合部位^[26]。

ADH 能利用多种底物,而最适底物根据试材的不同有所差异。本试验发现磨盘柿 ADH 能利用除甲醇外的其余四种醇类,与乙醇相比磨盘柿 ADH 在以丙醇、戊醇为底物时,活性分别提高了 30% 和 7%,最适底物为丁醇,活性提高了 85%,与橄榄^[28]最适底物己醇及紫草^[29]最适底物乙不同,也不同于扭脱甲基杆菌 (*methylobacterium extorquens*) 中 ADH 最适底物甲醇和丙二醇及草莓中 ADH 的最适底物为 1-丙醇和乙醇^[22]。Wendel 等^[30]认为当乙醇浓度过高时,会抑制乙醇脱氢酶活性,本试验在测定乙醇为底物时的 K_m 时也发现当乙醇较低时,酶活性逐渐增加,而当反应缓冲液中乙醇浓度达到 8 μL 之后,随着浓度逐渐增加,酶活性相应的下降。

乙醇脱氢酶与柿果实脱涩存在着一定的联系,而温度、pH、金属离子和底物等因素又影响了乙醇脱氢酶的活性,使之间接的影响到了脱涩过程。因而,如何合理有效的利用这些影响因素,找到最佳的脱涩方式和脱涩条件,并最大程度的在脱涩过程中保持果实的营养价值或降低营养物质的损失,应该进行有针对性地进行研究,以期有效利用于柿果实脱涩过程。

4 结 论

本试验表明磨盘柿果皮乙醇脱氢酶进行纯化后纯化倍数为 41.80 倍,活性回收率为 44.73%。它的最适反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$;最适 pH 为 10.0;它的最适底物为丁醇,而完全不能利用甲醇; K^{+} 和 Na^{+} 对活性略有增强的作用,但作用不是很明显,二价金属离子除 Mg^{2+} 几乎没有影响, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活性有一定的抑制作用, Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 则完全抑制了酶的活性。在 25 $^{\circ}\text{C}$,pH 10.0 的条件下 ADH 氧化乙醇的米氏动力学参数 K_m 值为 8.33 mmol/L,最大反应速度 V_{\max} 为 0.021 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

参 考 文 献

- [1] Halaly T, Pang X Q, Batikoff T, et al. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds[J]. *Planta*, 2008, 228(1): 79-88
- [2] Lin C H. Physiological adaptation of waxapple to waterlogging [J]. *Plant, Cell and Environment*, 1992, 15(3): 321-328
- [3] Tamura F, Tanabe K, Katayama M, et al. Effects of flooding on ethanol and ethylene production by pear rootstocks[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1996, 65(2): 261-266
- [4] Walker M A, Liu L. The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp.) [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995, 46(3): 299-305
- [5] Bellincontro A, Morganti F, DeSantis D, et al. Inhibition of ethylene via different ways affects LOX and ADH activities, and related volatile compounds in peach (cv. 'Royal Gem') [J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 682: 445-452
- [6] Rolletschek H, Weber H, Borisjuk L. Energy status and its control on embryogenesis of legumes. Embryo photosynthesis contributes to oxygen supply and is coupled to biosynthetic fluxes[J]. *Plant physiology*, 2003, 132(3): 1196-1206
- [7] Yeung E C, Blackman S J. Histochemical localization of alcohol dehydrogenase in developing bean seeds[J]. *American journal of botany*, 1987, 74(10): 1461-1465
- [8] Peng H P, Chan C S, Shih M C, et al. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis* [J]. *Journal of the Plant Physiology*, 2001, 126: 742-749
- [9] Araki C, Furuta M, Kaneko K, et al. Studies on the removal of astringency in Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) I. Changes of alcohol dehydrogenase, peroxidase activities and some chemical constituents during the artificial removal of astringency in kaki fruits [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1975, 44(2): 183-191
- [10] Sarni-Manchado P, Verries C, Tesniere C. Molecular characterization and structural analysis of one alcohol dehydrogenase gene (*GV-Adh 1*) expressed during ripening of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry [J]. *Plant Science (Limerick)*, 1997, 125(2): 177-187
- [11] Pesis E, Ben-Arie R. Involvement of acetaldehyde and ethanol accumulation during induced de-astringency of persimmon fruits [J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49(3): 896-899
- [12] Taira S, Satoh I, Watanabe S. Relationship between differences in the ease of removal of astringency among fruits of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and their ability to accumulate ethanol and acetaldehyde [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1992, 60(4): 1003-1009
- [13] Matsuo T, Ito S. On mechanisms of removing astringency in

- persimmon fruits by carbon dioxide treatment I. Some properties of the two processes in the de-astringency[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1977, 18(1):17-25
- [14] Tamura F, Tanabe K, Itai A, et al. Characteristics of acetaldehyde accumulation and removal of astringency with ethanol and carbon dioxide treatments in 'Saijo' persimmon fruit[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1999, 68(6):1178-1183
- [15] Imahon Y, Kishioka I, Uemura K, et al. Physiological responses and quality attributes of Japanese pear 'Kosui' fruit kept in low oxygen atmospheres[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2002, 77(6):677-682
- [16] Shiesh C C, Liu H L, Lin H L. Studies on the possible mechanism of ripening process induced de-astringency in 'Syh Jou' persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit[J]. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 2000, 46(4):399-416
- [17] Bošković R, Tobutt K R, Nicoll F J. Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies[J]. *Euphytica*, 1997, 93(2):129-143
- [18] 刘存德, 沈全光, 张国铮, 等. 小麦种子萌发时乙醇脱氢酶的变化及其同工酶的诱导形成[J]. *植物生理学报*, 1980, 6:361-366
- [19] 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
- [20] Leblond S. Isolation and partial characterization of alcohol dehydrogenase from broad bean (*Vicia faba*) [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1974, 1:579-582
- [21] Leblova S, Mancal P. Characterization of plant alcohol dehydrogenase[J]. *Physiol Plant*, 1975, 34:246-249
- [22] Koutsompogeras 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]. *Food Science and Technology*, 2010, 43(5):828-835
- [23] Hsu Y M, Tseng 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
- [24] Islami M, Shabani A, Saifi-Abolhassan, et al. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008, 11(2):208-213
- [25] Abolhassan M S, Sepehr S, Islami M, et al. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein alcohol dehydrogenase from a native strain of *Acetobacter* [J]. *Journal of Biological Sciences*, 2007, 7(2):315-320
- [26] Jernejc K, Legisa M. The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger* [J]. *FEMS Microbiology*, 2002, 217:185-190
- [27] Mackenzie K F, Eddy C K, Ingram L O. Modulation of alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in *Zygomonas mobilis* by iron and zinc [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(2):1063-1067
- [28] Salas J J, Sanchez J. Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(1):35-40
- [29] Li S M, Wang Z X, Heide L. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15:786-790
- [30] Wendel J F, Weeden N F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.), *Isozymes in Plant Biology* [M]. Dioscorides Press, Portland, OR, 1989:5-45

(责任编辑:王燕华)