

# 破碎酵母释放乙醛脱氢酶的研究

吴桂英, 吴元欣, 赵玉凤, 王存文, 朱圣东, 池汝安  
(武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430073)

**摘要:** 乙醛脱氢酶(ALDH)是一种胞内酶,在从酵母中分离提取 ALDH 的过程中,破碎细胞是其中的关键步骤之一。本文着重考察了自溶、反复冻融、超声波和高压破碎仪的细胞破碎方法对释放 ALDH 的影响。结果表明,用高压破碎仪破碎,酵母细胞破碎率可达到 95%以上,而且有效地防止了 ALDH 的分解及降解,是一种较为理想的破碎方法。

**关键词:** 微生物; 酵母细胞; 乙醛脱氢酶; 破碎方法

中图分类号: TS261.1; Q93- 3 文献标识码: A 文章编号 :1001- 9286(2006)11- 0021- 03

## Study on Aldehyde Dehydrogenase Release by Breaking Yeast Cells

WU Gui-ying, WU Yuan-xin and ZHAO Yu-feng, et al.

(Chemical Engineering & Pharmacy College of Wuhan Engineering University, Wuhan, Hubei 430073, China)

**Abstract:** Aldehyde dehydrogenase (ALDH) is a kind of endoenzyme and cell-breaking is one of the key procedures in the extraction of ALDH from *S.cerevisiae*. The effects of different cell-breaking methods including self-dissolving, repetitive freezing and thawing and ultrasonication and high pressure cracker on ALDH release were studied and compared in this paper. The results showed that cell-breaking by high press cracker was the best method with its breaking rate above 95% and it could effectively prevent ALDH decomposition and degradation.

**Key words:** microbe; yeast cells; aldehyde dehydrogenase; breaking methods

乙醇在人体内的代谢主要靠体内的两种酶<sup>[1]</sup>,一种是乙醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase, ADH),另一种是乙醛脱氢酶(Aldehyde Dehydrogenase, ALDH)。前者使乙醇转化为乙醛,后者使乙醛进一步转化为乙酸,最终分解为二氧化碳和水。人体中,一般都存在前一种酶,而且数量基本是相等的。但缺少后一种酶的人就比较多,ALDH 的缺少,使乙醇不能被完全分解为水和二氧化碳,而是以乙醛的形式继续留在体内。有资料表明<sup>[2]</sup>,乙醛在人体内的过渡堆积是醉酒的主要原因。目前,ALDH 主要是从动物的肝脏、胰腺或肝细胞线粒体中分离提取,但其资源有限且价格昂贵,因此很难大规模生产。为了拓展 ALDH 的来源,国内外科学工作者开始探索从微生物细胞中提取 ALDH,国外在此方面已做了大量的工作,并得到活性较高的 ALDH。国内还没有见到从微生物细胞中提取 ALDH 的报道。因此,通过微生物的发酵、分离纯化 ALDH,具有很大的市场前景。

从酵母中分离提纯 ALDH 是一个较为复杂的过程,ALDH 为胞内产物<sup>[3]</sup>,大部分存在于线粒体中,其他存在于胞液中,首先必须将细胞破壁,使产物得以释放,才能进一步提取。成熟的酵母菌细胞壁较厚,不易被破碎,而且 ALDH 对温度及酸碱度很敏感,容易失活。因此寻找一种既能高效破碎酵母细胞,又能有效维持 ALDH 稳定性的方法是非常必要的。本文对自溶、反复冻融、超声波和高压破碎仪破碎酵母细胞释放 ALDH 进行了较为系统的研究,为从酵母中分离提取 ALDH 作准备。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株和培养基

菌种: 酿酒酵母 AY92022(*Saccharomyces cerevisiae* AY92022)。

斜面培养基: 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, pH6.0。

基金项目: 湖北省新世纪高层次人才工程入选人员科研项目择优资助; 新世纪百千万人才工程国家级入选科研项目资助; 湖北省国际科技合作重点项目计划。

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 吴桂英(1981-),女,湖北红安人,在读硕士研究生,研究方向:生物化工。

通讯作者: 吴元欣,教授,博导。

液体培养基: 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.3%, 麦芽汁 0.3%, pH5.5。

### 1.2 破碎酵母释放 ALDH 的工艺

将酵母菌种接种于斜面培养基中, 在 30℃ 恒温箱中培养 12 h, 再将菌种接种于液体培养基中, 于 30℃ 恒温摇床中培养 17 h。取细胞培养液离心 (6000 r/min, 5 min), 弃去上清液得到沉淀, 用蒸馏水洗涤 2~3 次。取菌体细胞, 加入 0.066 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液, 用 4 种不同的方法进行细胞破碎, 离心后取上清液测蛋白质含量和乙醛脱氢酶(ALDH) 的活力。

### 1.3 细胞破碎方法

自溶法: 在 45℃ 的恒温水浴锅中自溶 32 h。

冻融法: 在 -80℃ 下每次冷冻 4 h, 室温下融解 30 min, 反复冻融 8 次。

超声波法: 在不同时间段、不同功率的实验条件下进行细胞破碎。

高压破碎仪: 功率为 0.75 kW, 压力为 40 kPa(2700 巴), 经 25 s 一次性破碎。

### 1.4 蛋白质含量的测定<sup>[4]</sup>

采用紫外分光光度计通过比色来测定蛋白质的含量。

### 1.5 乙醛脱氢酶 ALDH) 活性的测定<sup>[5]</sup>

在 340 nm 处测定 ALDH 催化乙醛脱氢生成乙酸所用的酶量。定义每分钟  $A_{340nm}$  增加 0.001 为 1 个活力单位(u)。

## 2 结果与分析

### 2.1 自溶法对酵母细胞破碎上清液中蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

酵母细胞自溶是酵母细胞水解酶类在一定条件下被活化, 而将自身生物大分子降解成基本生物分子的过程。酵母自溶型<sup>[6]</sup>主要是原生质的降解外溢, 细胞壁通常只被部分水解。自溶结束后, 细胞仍保持完整的轮廓<sup>[7]</sup>。

图 1 为自溶对蛋白质含量及 ALDH 活性的影响。从图 1 可知, 在 0~24 h 之间, 蛋白质含量和 ALDH 活力都随时间的增加而增大; 在 24~32 h 之间, 蛋白质含量和 ALDH 活力随时间的增加而降低, 自溶 24 h 时蛋白质含量和酶活力最大。ALDH 大部分存在于酵母细胞的线粒体中, 自溶时不能充分释放到胞外, 从而酶的活力很低。

### 2.2 冻融法对酵母细胞破碎上清液中蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

酵母细胞在 -80℃ 下冻融 4 h, 再在室温下融解 30 min, 反复冻融 8 次, 利用细胞内冰粒的形成和细胞液浓度增高引起溶胀<sup>[8]</sup>, 使细胞结构破碎, 其结果见图 2。由图 2 可以看出, 破碎离心后上清液中蛋白质含量随时间

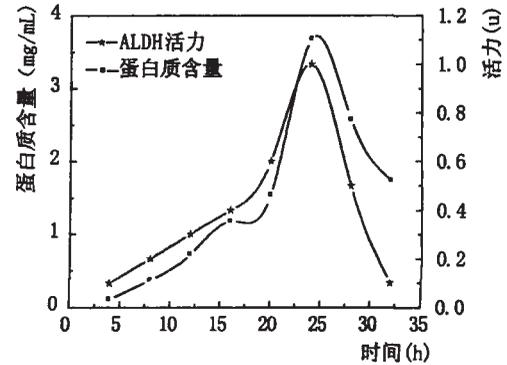


图 1 自溶对蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

的增加而增大, 冻融到 31.5 h 时, 蛋白质含量的增加不再明显。因此, 结果为 ALDH 活力随冻融时间先是增大后是减小, 在 31.5 h 时达到最大。

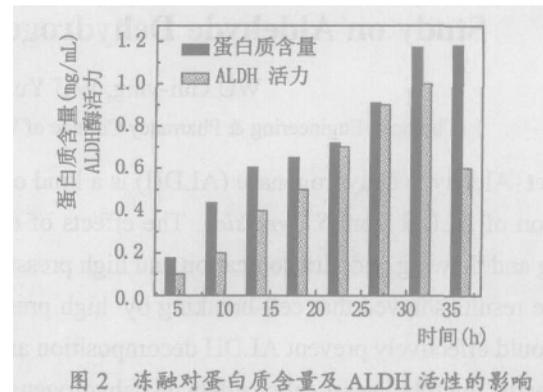


图 2 冻融对蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

### 2.3 超声波对酵母细胞破碎上清液中蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

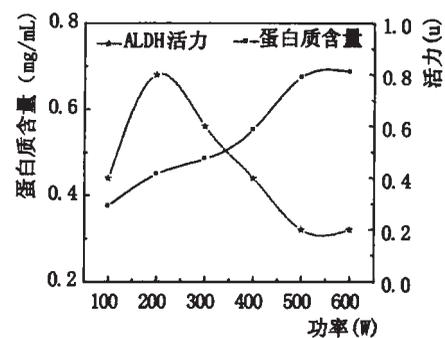


图 3 超声波破碎功率对蛋白质含量及 ALDH 活性的影响

在固定时间为 10 min 时, 考察不同功率下的破碎情况, 结果见图 3。从图 3 可知, 超声波的输出功率对破碎效果有很大的影响, 输出功率的增大, 有利于液体中空穴<sup>[9]</sup>的形成, 产生更多的空化泡, 使破碎作用增强, 但功率提高至 500 W 时, 蛋白质含量增加已不太明显。在 0~200 W 时酶的活力随功率的增加而增大, 在 200 W~600 W 时, 酶的活力有下降趋势, 说明酶的活性有损失。从图 3 可以看出, 功率为 200 W 时酶活力最高。

在固定功率为 400 W 时, 考察不同时间下的破碎情

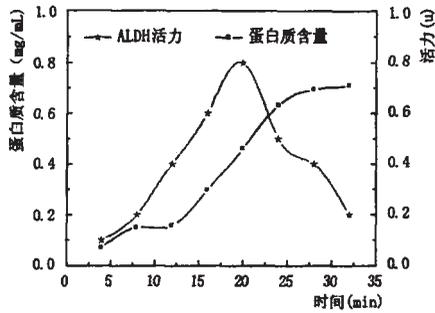


图4 超声波破碎时间对蛋白质含量及ALDH活性的影响

况,结果见图4。由图4可知,蛋白质含量随时间的增大而增大,但破碎至24 min时,蛋白质含量增加已不明显。在0~20 min之间,ALDH活力随时间的增加而增大;在20~32 min之间,ALDH的活力随时间的增大而下降,说明超声波使部分酶失活。因此,可以得出破碎时间为20 min时酶活力最高。

在现有的实验条件下,ALDH的活力很低,其原因是超声波振荡容易引起温度的剧烈上升,小试管外套冰的降温效果较差,ALDH的高级结构遭到破坏,因此ALDH的活性很低。

#### 2.4 高压破碎仪破碎对酵母细胞上清液中蛋白质含量及ALDH活性的影响

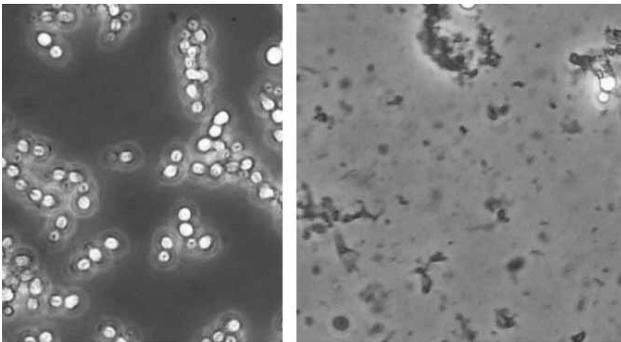


图5 酵母细胞破碎前后的对照

采用Constant Systems公司生产的one shot高压破碎仪破碎酵母细胞。One shot型号是一种用于研究用途的破碎仪,被广泛用于处理小量样品。能够处理流动、粘性不能流动的样品。每个循环处理时间是25 s,每个循环的处理量与最大的压力有关。本实验采用功率为0.75 kW、压力为40 kPa(2700巴),经25 s一次性破碎,结果见图5。由图5可以看出,破碎率能达到95%以上。破碎后的蛋白质含量为2.892 mg/mL,ALDH的活力为27.4 u。

#### 2.5 4种细胞破碎方法的比较 图6

由图6可以看出,超声波破碎和反复冻融破碎后的蛋白质含量及酶的活力均较低,而自溶尽管蛋白质的含量较高,但酶的活力仍然较低。采用高压破碎仪进行破碎,蛋白质的含量较高,而酶的活力大大高于其他的破碎方法,该方法是一种较为理想的破碎方法。

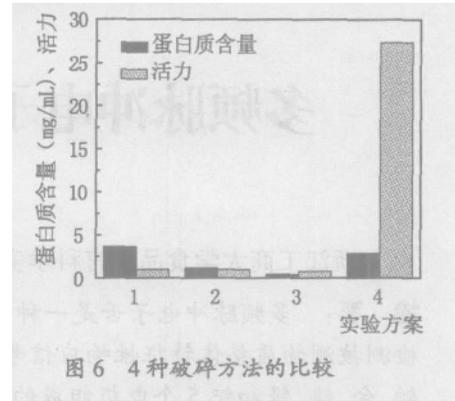


图6 4种破碎方法的比较

### 3 结论

3.1 自溶法破碎酵母细胞,表面上看很经济,但操作需要保温设备而且作用时间长,条件要求高,很难与生产同步。

3.2 超声波破碎在实验室规模上应用较普遍,处理少量样品时操作简便,液量损失少,但是超声波产生的化学自由基团能使某些敏感性活性物质失活。而且大容量装置的声能传递、散热均有困难。

3.3 冻融法在反复冷冻融化的过程中,一些生物活性物质容易失活,而且耗时长,冰柜的要求高,成本比较高。

3.4 高压破碎仪能够破碎微生物、动物细胞、植物细胞及组织,只需经一次性破碎,能达到非常好的破碎效果,并且操作简便,时间短,产生热量少,可最大限度地保持细胞溢出物的生物活性。

#### 参考文献:

- [1] 梅启明,朱英国. ADH在光敏感核不育水稻中反应特征研究[J].遗传学报,1991,18(3):277-281.
- [2] 陈维莉. 酒与化学[J].化学教学,1999,(12):38-39.
- [3] Samira Boubekeur, Nadine Camougrand, Odile Bunoust, Michel Rigoulet and Bernard Guerin. Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eur.J.Biochem,2001,268:5057-5065.
- [4] 陈钧辉,陶力,李俊,等.生物化学实验(第3版)[M].北京:科学出版社,2003.
- [5] Keith A. Bostian and Graham F. Betts. Rapid purification and properties of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Journal, 1978, 173:773-786.
- [6] 宁正祥. 酵母的自溶作用[J]. 食品科学,1991,12:16-19.
- [7] 江慧修. 酵母细胞自溶过程的生物学研究[J].微生物学报,1989,29(1):33-38.
- [8] 吴克刚,杨连生. 超声波破碎 *Thraustochytrium* 提取脂质的研究[J].郑州工程学院学报,2001,22(4):31-34.
- [9] 王丽娜,李夏兰.从废弃啤酒酵母细胞提取ADH的研究:其细胞破碎的研究[J].福建化工,1999,(2):9-11.