

酿酒酵母胞浆中乙醛脱氢酶的提取和研究

周百灵¹,高秀峰¹,吴晓婷¹,赵绪光¹,李永生²,王健²

(1.四川大学华西基础医学与法医学院,四川 成都 610041;2.四川大学化学工程学院,四川 成都 610065)

摘要: 利用超声波破碎、硫酸铵分级盐析以及 DEAE-32 阴离子交换层析等方法提取了酿酒酵母胞浆内的乙醛脱氢酶(ALDH),并对其酶学性质进行了研究。结果表明,经过 DEAE-32 交换层析后得到的 ALDH 酶液,纯化倍数为 11,产率为 17%,酶的最适反应温度为 25℃,最适 pH 在 7.0~7.5 之间。

关键词: 微生物;酿酒酵母;乙醛脱氢酶;纯化

中图分类号:Q93-3;TS261.1;Q55 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)06-0028-03

Extraction of and Research on Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*

ZHOU Bai-ling¹, GAO Xiu-feng¹, WU Xiao-ting¹, ZHAO Xu-guang¹, LI Yong-Sheng² and WANG Jian²

(1. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041;

2. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: Cytosolic Aldehyde dehydrogenase (ALDH) was extracted from *Saccharomyces cerevisiae* by using ultrasonication, ammonium sulfate fractionation and ion exchange chromatography on DEAE-32, and the properties of ALDH were studied. The results showed that the yield of 11-fold purified ALDH by DEAE-32 exchange chromatography is 17%, the optimum reaction temperature of ALDH is at 25℃, and the optimum pH value is between 7~7.5.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; aldehyde dehydrogenase; purification

在人体中,乙醛脱氢酶(ALDH)能够将乙醛转化为乙酸,将乙醛及时代谢出体外,从而减少乙醛对人体的伤害。研究发现,50%的亚洲人携带无活性的乙醛脱氢酶,大量饮酒后肝脏内大量累积的乙醛可能会引起酒精引导性肝损伤^[1]、食管癌、口咽喉癌等多种疾病^[2]。因此,利用乙醛脱氢酶作为解酒药,是较好的解酒方法。自然界中乙醛脱氢酶的含量很少,从动植物体内提取成本很高,而微生物具有易于培养、培养周期快等优点,因而从微生物中提取乙醛脱氢酶具有很大的市场前景,在国外已有对此酶的提取纯化研究,但在国内却极少有报道^[3]。

酿酒酵母中 ALDH 有两种存在方式。一种存在于线粒体中,另一种则在胞质中。其主要有两种激活方式,一种是 Mg²⁺ 激活的, NADP⁺ 依赖的胞质酶,另一种是葡萄糖抑制的, NAD(P)⁺ 依赖的, K⁺ 激活的线粒体酶。胞质内的 ALDHs 包括 ALDH6, ALDH2 以及 ALDH3 3 种同工酶^[4]。由于在葡萄糖生长条件下,酵母中乙酸的产生主要由胞质内 ALDH6 将乙醛氧化形成,其次由于胞浆的破碎易于线粒体的破碎,因而本文主要利用超声波破碎、硫

酸铵分级盐析以及 DEAE-32 阴离子交换层析对胞浆内的 ALDH 进行初步提取及其酶学性质研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (SICC 2.48) 购自四川省工业微生物菌种保藏管理中心。NADP⁺ 购自厦门星隆达试剂公司。DEAE-32 为 Whatman 产品;蛋白 Marker 为 TransGen Biotech 产品。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件

将酿酒酵母培养至酵母蛋白胨葡萄糖培养基(YPD)中,其培养基组成含有 2%葡萄糖、2%蛋白胨、1%酵母提取物。在 28℃ 孵育箱中培养 19 h。

1.2.2 ALDH 的酶活性测定方法

参照文献[5,6]的测定方法:2.5 mL 酶活性测定体系中含 0.1 mol/L Tris-HCl (pH7.5); 5×10⁻⁴ mol/L NADP⁺; 0.1 mol/L MgCl₂; 2×10⁻³ mol/L 乙醛和酶。加入酶之前先

基金项目:四川大学振兴计划科研启动基金(No.0082204127092)。

收稿日期:2009-03-03

作者简介:周百灵(1984-),女,云南威信人,在读硕士研究生,研究方向:酶的提取与纯化。

通讯作者:高秀峰,教授,博导,xiufengg@163.com。

将反应体系于 25 °C 水浴箱中温浴 20 min, 然后加入同条件温浴的酶液 0.1 mL, 立即计时, 在连续 5 min 内, 每隔 1 min 读取 340 nm 处的吸光度值, 直至每分钟吸光度增大值达到稳定为止。将 25 °C、pH7.5 时每分钟产生 1 μ mol NADPH 所需的酶量作为一个酶活性单位。

1.2.3 蛋白浓度的测定和蛋白质电泳

用 Bradford 法测定蛋白质质量浓度, 以牛血清白蛋白为标准制作标准曲线。ALDH 的分子量以及纯度的鉴定采用 SDS-PAGE 电泳^[7]。

1.2.4 ALDH 的纯化

酶的纯化按以下步骤完成:

①粗酶液的制备: 酵母细胞离心收集, 按质量体积比(细胞/缓冲液)1:3 加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)后, 将样品置于冰浴中, 使用超声波细胞破碎仪进行破碎, 超声功率 150 W, 超声时间 5 s, 间隙 8 s, 破碎总时间为 39 min, 将其于 4 °C、10000 r/min 条件下离心 15 min, 收集上清液, 作为粗酶液测定 ALDH 酶活力及蛋白含量。

②硫酸铵分级沉淀: 将粗酶液先用 40 % 饱和度的硫酸铵沉淀, 留取上清液, 再将其上清液用 90 % 饱和度的硫酸铵沉淀, 去掉上清液, 将沉淀物用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)溶解, 透析后测定 ALDH 酶活力和酶的得率。

③DEAE-32 交换层析: 将获得的 ALDH 酶透析液上样置于用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)平衡的 DEAE-32 柱中(2.6 cm×26 cm), 先用相同缓冲液洗涤杂蛋白, 再用 0.25 mol/L NaCl 和 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 为 7.0)进行梯度洗脱, 流速为 1.6 mL/min, 用紫外监测仪在线监测 280 nm 处的紫外吸收, 收集蛋白峰部分, 测定其酶活性及蛋白含量。将酶活部分用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)进行透析。

2 结果与分析

2.1 纯化条件

2.1.1 超声破碎时间的确定

超声波细胞破碎仪在功率为 150 W, 超声时间 5 s, 间隙时间 8 s 作为一个循环, 连续破碎 13 min、26 min、39 min、52 min 和 65 min, 然后分别在 4 °C、10000 r/min 条件下离心 15 min, 收集上清液, 测定不同破碎时间的 ALDH 酶活力和蛋白质含量。其结果见图 1。

从图 1 可看出, 当超声破碎时间为 39 min 时, ALDH 的活性达到一定, 进一步破碎蛋白含量会逐渐增高, 但是活性比会逐渐下降。因此, 超声破碎时间选择为 39 min。

2.1.2 硫酸铵饱和度的确定

将 12 g 酿酒酵母制成 48 mL 粗酶液, 分成 8 管, 分

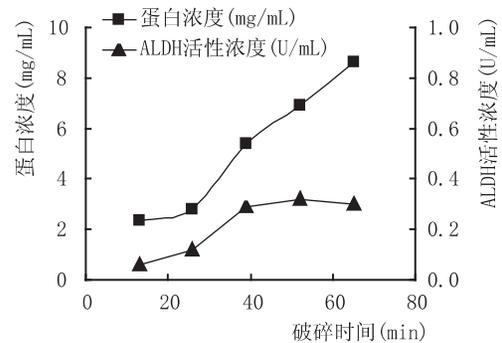


图 1 超声波破碎时间的优选

别用不同饱和度的硫酸铵沉淀, 留取沉淀, 用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)溶解, 透析后测定 ALDH 酶活力和蛋白含量。

不同硫酸铵饱和度下, 透析得到的 ALDH 酶液, 测定酶活力, 其结果见表 1。

表 1 不同硫酸铵饱和度对蛋白含量与酶活性的影响

硫酸铵饱和度 (%)	总蛋白含量 (mg)	总酶活性 (U)	比活性 (U/mg)
20	0.040	0	0.0000
30	0.064	0	0.0000
40	0.590	0	0.0000
50	1.520	0.14	0.0030
60	2.434	0.1	0.0040
70	3.245	0.18	0.0055
80	4.223	0.26	0.0060
90	4.700	0.34	0.0065

从表 1 可看出, 在硫酸铵饱和度为 90 % 时, 其比活性最高, 而在饱和度为 40 % 以下时, 没有酶活性, 其比活性为 0。为尽量减少杂蛋白含量, 提高 ALDH 纯度, 因而本研究对粗酶液首先用 40 % 饱和度的硫酸铵沉淀, 留取上清液, 除掉部分杂蛋白后, 再将其上清液用 90 % 饱和度的硫酸铵沉淀, 弃上清液, 沉淀用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)溶解, 透析备用。

2.1.3 DEAE-32 交换层析

取 10 g 酿酒酵母菌, 按上述优选的条件超声裂解后, 将粗酶液进行分级沉淀, 沉淀透析后的 ALDH 酶液加入 DEAE-32 阴离子交换柱中进行层析, 检测酶活和蛋白浓度, 收集有酶活的试管。ALDH 分离纯化结果见表 2。

表 2 不同阶段 ALDH 分离纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	产率 (%)	纯化倍数
粗酶	208.00	4.50	0.02	100.00	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	138.00	3.40	0.02	75.50	1.14
DEAE-32	3.47	0.75	0.22	17.00	11.00

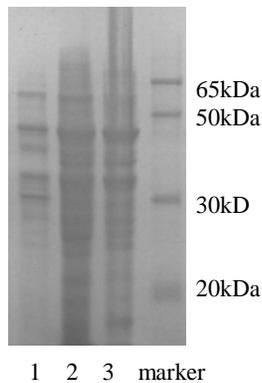
根据表 2 可知, 经(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀和 DEAE-32

阴离子交换层析后,ADLH的纯化倍率提高了11倍,酶得率为17%。

2.2 酶的理化性质

2.2.1 酶的纯度及分子量测定

分别取ALDH粗酶液、硫酸铵分级沉淀透析后的ALDH酶液、DEAE-32柱层析洗脱酶液透析浓缩后进行SDS-PAGE电泳,电泳结果见图2。



1. DEAE-32 阴离子交换层析; 2. 40%硫酸铵沉淀后上清液再90%沉淀; 3. 超声波破碎后的粗酶液

图2 ALDH的SDS-PAGE电泳

层析后的ALDH酶液电泳后,在58kDa左右都有一条共有的条带,而在50kDa~30kDa仍有一些杂带,但是较粗酶液和硫酸铵分级沉淀后的电泳区带明显减少。

2.2.2 酶的最适反应温度

将纯化的酶液,在15℃、25℃、35℃、45℃、55℃和65℃下测定酶活性,以标准温度(25℃)下测得的酶活为100%,测定不同温度下的相对酶活,确定酶反应的最适温度。测定结果见图3。酶的最适反应温度为25℃。

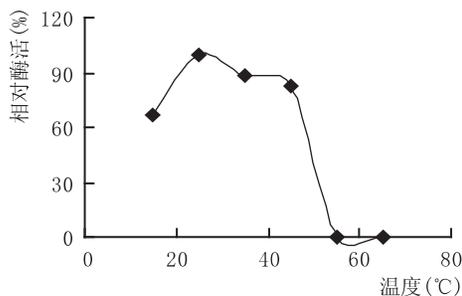


图3 温度对ALDH活性的影响

2.2.3 酶的最适反应pH

将纯化的酶液,分别在pH为5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液中,25℃测定酶活性,以标准条件下(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5)测得的酶活为100%,计算其相对酶活,确定酶反应的最适pH。测定结果见图4。酶反应的最适pH在7.0~7.5之间。

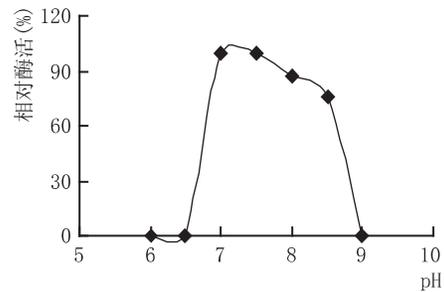


图4 pH对ALDH活性的影响

3 结论

3.1 通过超声波破碎、硫酸铵分级盐析以及阴离子交换层析得到了纯化倍数11的ALDH酶液,得率17%,利用该方法得到的酶液,是依赖NADP⁺的胞浆酶,其最适反应温度为25℃,最适pH在7.0~7.5之间。

3.2 层析后的ALDH酶液电泳后,在58kDa左右都有一条共有的条带,而在50kDa~30kDa仍有一些杂带,但是较粗酶液和硫酸铵分级沉淀后的电泳区带明显减少。

3.3 乙醛脱氢酶广泛分布于自然界中,但是其含量却很低,利用微生物大量发酵来提取ALDH,可减少提取成本,并且能较快得到ALDH粗酶。但是,要获得ALDH电泳的单一纯化区带还需要进一步纯化研究。

参考文献:

- [1] Li T. K., Yin S. J., Crabb D. W., O'Connor S., et al. Genetic and environmental influence on alcohol metabolism in human[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, 25(1): 136-144.
- [2] Yokoyama A., Muramatsu T. T., et al. Multiple primary esophageal and concurrent upper aerodigestive tract cancer and the aldehyde dehydrogenase-2 genotype of Japanese alcoholics [J]. *Cancer*, 1996, 77: 1986-1990.
- [3] 刘清利,杨国武,郭谠光,等.乙醛脱氢酶高产菌株Z07-J01的选育与酶学特性[J]. *西北农业学报*, 2006, 15(5): 251-254.
- [4] Florence Saint-Prix, Linda Bonquist, Sylvie Dequin. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation[J]. *Microbiology*. 2004, 150: 2209-2220.
- [5] Francis M. Dickinson. The purification and some properties of the Mg²⁺-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochem. J.* 1996, 315: 393-399.
- [6] Keith A. Bostian, Graham F. Betts. Rapid purification and properties of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochem. J.* 1978, 173: 773-786.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 42-122.