

酿酒酵母中乙醇脱氢酶双水相萃取与 DEAE-32 层析纯化方法的比较

吴晓婷¹, 高秀峰¹, 周百灵¹, 赵绪光¹, 李永生², 龚莹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: 比较了双水相萃取和 DEAE-离子交换层析对纯化酿酒酵母中的乙醇脱氢酶的效果。实验结果表明, 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀和 DEAE-32 阴离子交换层析后, ADH 的纯化倍率为 4.47 倍, 回收率为 32.15%。经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀和双水相萃取的酶液, ADH 的纯化倍率为 10.69 倍, 回收率为 53.36%。双水相萃取方法简单, 纯化倍率和回收率优于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀和 DEAE-32 阴离子交换层析, 可用于乙醇脱氢酶的纯化。

关键词: 分析方法; 酿酒酵母; 乙醇脱氢酶; 纯化; 双水相

中图分类号: TS261.1; TQ028

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)06-0037-03

Comparing Aqueous two-phase Extraction with DEAE-32 Chromatography on Purified Process of Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*

WU Xiao-ting¹, GAO Xiu-feng¹, ZHOU Bai-ling¹, ZHAO Xu-guang¹, LI Yong-Sheng² and GONG Ying²

(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: Effectiveness of two processes was compared with aqueous two-phase extraction and ion exchange chromatography on DEAE-32 on purification of alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed: By ion exchange chromatography on DEAE-32 and aqueous two-phase extraction, the ADH was purified 4.47 fold with a final yield of 32.15 % and 10 fold with a final yield of 53.36 % respectively. The aqueous two-phase extraction has a simple process, at the same time, purification factor and activity recovery are higher than ion exchange chromatography on DEAE-32. It is a good process on purification of alcohol dehydrogenase.

Key words: analysis method; *Saccharomyces cerevisiae*; alcohol dehydrogenase; purification; aqueous two-phase extraction

乙醇脱氢酶 (ADH) 广泛存在于人和哺乳动物的肝脏、植物组织及微生物细胞中, 是广泛专一性的含锌金属酶, 以 NAD^+ 为辅酶, 催化伯醇和醛之间的可逆反应^[1]。乙醇脱氢酶可以作为化工生产中的优良生物催化剂, 也广泛应用于生物传感器领域^[2]。

目前乙醇脱氢酶的分离和纯化多采用盐析法、色谱法、有机溶剂沉淀等方法, 但是, 大部分方法都包含很多的步骤, 复杂、耗时, 很难在大范围内应用。盐析法沉淀蛋白, 是一种传统方法^[3], 其方法简单, 操作简便, 成本很低。但是盐析后蛋白质的纯化倍率很低, 所以常常要结合离子交换层析进一步纯化。离子交换层析上样量大, 纯化倍率高, 但是再生复杂、耗时, 会导致样品稀释。双水相萃取 (ATPE) 根据蛋白质在两相中的分配系数不同, 可以选

择性地分离所需要的酶或者蛋白质, 具有回收率高、易于操作、蛋白质不容易失活的特点^[4], 不仅能够用于实验室纯化蛋白质, 也可以用于进行大规模生产, 因此, 正越来越被重视。为纯化酿酒酵母中乙醇脱氢酶, 笔者比较了双水相萃取和 DEAE-32 阴离子交换层析法的纯化效果。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

TY96- 超声波细胞破碎仪 (上海比朗仪器有限公司); HH-S 恒温水浴锅 (金坛市恒丰仪器厂); Model J2-21 Centrifuge (BECKMAN); THZ-C 恒温振荡器 (江苏太仓市实验设备厂); SPX-150- 生化培养箱 (上海贺德实验设备有限公司)。

辅酶 I (NAD^+) (厦门星隆达试剂公司); 牛血清白蛋

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

收稿日期: 2009-03-04

作者简介: 吴晓婷 (1983-), 女, 山东临沂人, 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, 博士生导师, xiufengg@163.com。

白(厦门星隆达试剂公司);DEAE-32(Whatman)。

1.2 方法

1.2.1 菌株、培养基和培养条件

菌株:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) SIC2.48(购自四川省工业微生物菌种保藏中心)。

YPD复合培养基:酵母提取物10g、胰蛋白胨20g、葡萄糖20g,加入1L蒸馏水中,于0.056MPa、30min湿热灭菌。

酿酒酵母用YPD液体培养基培养,置于180r/min、30℃恒温振荡培养19h后,到达对数期。将菌悬液于6000r/min离心,沉淀用蒸馏水清洗2遍后得到酵母菌。

1.2.2 粗酶液的制备

将酵母用0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)重新悬浮,充分混匀。用超声波(150W,5s×180次,每次间隔8s)破碎,于10000r/min、离心20min。上清液即为粗酶液。

1.2.3 蛋白质浓度的测定

采用考马斯亮蓝G-250法^[5],以牛血清白蛋白为标准制作标准曲线。

1.2.4 乙醇脱氢酶(ADH)活性的测定

采用瓦勒霍赫法^[6]。测定体系为:焦磷酸钠缓冲液1.5mL,乙醇溶液0.50mL和NAD⁺溶液1.0mL,25℃恒温水浴20min,加入同条件预热的酶溶液0.10mL,在连续5min内,每隔1min读取340nm处的吸光度,直至每分钟吸光度增大值达到稳定为止。

酶的活性单位定义:一个乙醇脱氢酶活性单位相当于在25℃、pH8.8条件下,每分钟还原1molNAD⁺时所需的量。

乙醇脱氢酶的活性用下面的公式计算:

$$\text{ADH(U/mL)} = \frac{(A_{340}/\text{min})(3)(\Delta F)}{(6.22)(0.1)}$$

式中:3是反应总体积;F是稀释倍数;6.22是NADH摩尔消光系数;0.1是酶体积。

1.2.5 双水相萃取

采取PEG20000/K₂HPO₄系统,先制作PEG20000/K₂HPO₄系统的相图。然后根据相图,称取PEG20000和K₂HPO₄加入到粗酶提取液中,充分混合15min后,于3000r/min,离心10min,分层后,量取上相的体积,分别做蛋白含量和酶的活性测定。

1.2.6 DEAE-32离子交换层析

柱长24cm,内径1.0cm;起始缓冲液为0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0);极限缓冲液为含有1mol/LNaCl的0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0);流速为1.6mL/min,收集各蛋白组分,测定蛋白含量及ADH活性。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵饱和度的优选

将9g(湿重)酿酒酵母按照体积重量比(1:3)加入0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0),进行超声破碎,离心得粗酶,用1N盐酸调pH值为5.6,静置30min后,再以12000r/min、离心20min,沉淀溶解后测酶活及蛋白含量,上清液逐级加入不同饱和度的硫酸铵,调pH为5.6,静置30min,以12000r/min离心20min,沉淀用0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)溶解后测酶活及蛋白含量,结果见表1。

表1 不同硫酸铵饱和度对ADH活性的影响

硫酸铵饱和度 (%)	总活性 (U)	总蛋白 (mg)	比活性 (U/mg)
0	13.30	89.20	0.15
10	2.20	4.62	0.48
20	3.79	6.36	0.60
30	8.83	20.65	0.43
40	17.08	60.70	0.28
50	104.97	55.79	1.88
60	74.80	37.11	2.02
70	46.89	17.49	2.68
80	13.53	20.98	0.64
90	8.94	35.40	0.25

从表1中可以看出,ADH总活性和比活性在40%硫酸铵饱和度之前很低,而在80%硫酸铵饱和度时总活性和比活性也下降,因此将粗酶液先进行40%硫酸铵沉淀后,弃去沉淀,上清液用80%硫酸铵进行沉淀,沉淀用0.01mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)重新溶解。

2.2 DEAE-32阴离子交换层析

将1g酿酒酵母菌超声破碎后得到3mL粗酶液,按上述优选的盐析方法进行硫酸铵分级沉淀,沉淀透析后的ADH酶液加入DEAE-32阴离子交换柱中进行层析,收集有活性的蛋白峰,透析后测量ADH活性和蛋白含量。以上纯化步骤结果见表2。

表2 离子交换层析纯化酿酒酵母中的乙醇脱氢酶

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	纯化 倍数	回收率 (%)
粗酶	34.97	48.34	1.38	1.00	100.00
硫酸铵分级沉淀	13.06	41.39	3.17	2.29	85.62
DEAE层析	2.52	15.54	6.17	4.47	32.15

根据表2可以看出,经(NH₄)₂SO₄分级沉淀和DEAE-32阴离子交换层析后,ADH的纯化倍率为4.47倍,回收率为32.15%。

2.3 PEG20000/K₂HPO₄体系中PEG20000浓度的优选

在总量为10g的双水相体系中固定17%(w/w)的K₂HPO₄、10%(w/w)粗酶液,然后分别和4%(w/w)、8%(w/w)、12%(w/w)、16%(w/w)、20%(w/w)的

PEG20000 混合,离心后,测量每个 PEG 浓度下,上相中的蛋白含量和乙醇脱氢酶的活性,并计算比活性,结果见图 1。

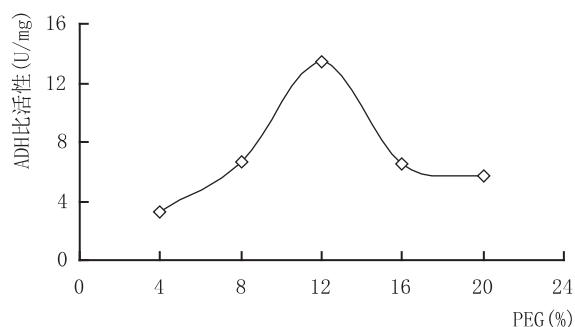


图1 PEG 浓度的优选

从图 1 中可以看出,随着 PEG20000 浓度的增高,ADH 比活性在逐渐升高,在 12 %PEG 浓度时达到最大,然后开始下降,所以双水相体系中 PEG20000 的浓度选择 12 % (w/w)。

2.4 PEG20000/K₂HPO₄ 体系中 K₂HPO₄ 浓度的优选

在总量为 10 g 的双水相体系中固定 12 % (w/w) PEG、10 % (w/w) 粗酶液,分别与 12 %、16 %、20 %、24 % 和 26 % 的 K₂HPO₄ (w/w) 混合,离心后,测量每个 K₂HPO₄ 浓度时的上相中的蛋白含量和乙醇脱氢酶的活性,并计算比活性,结果见图 2。

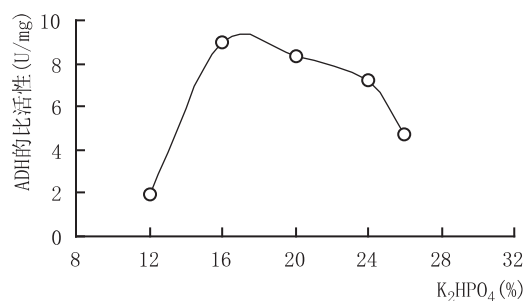


图2 K₂HPO₄ 浓度的优选

从图 2 中可以看出,当 K₂HPO₄ 浓度小于 16 % 时,随着 K₂HPO₄ 浓度的增高,上相中 ADH 比活性在逐渐升高,当 K₂HPO₄ 浓度大于 16 % 时,随着 K₂HPO₄ 浓度的增高,上相中 ADH 比活性在逐渐降低,所以双水相体系中 K₂HPO₄ 的浓度选择 16 % (w/w)。

2.5 双水相萃取乙醇脱氢酶

将粗酶液用 40 % 硫酸铵分级沉淀后,上清液用优选的双水相萃取条件:12 % PEG20000、16 % K₂HPO₄ 配制双水相体系,混匀后以 3000 r/min 离心 10 min,测定上相中的蛋白含量和酶活性,结果见表 3。

表 3 酿酒酵母中乙醇脱氢酶的双水相纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	纯化 倍数	回收率 (%)
粗酶	4.38	5.51	1.26	1.00	100.00
40 %硫酸铵沉淀	2.05	5.36	2.61	2.09	97.28
双水相	0.22	2.94	13.36	10.69	53.36

根据表 3 可以看出,经过 40 % (NH₄)₂SO₄ 沉淀和双水相萃取后,ADH 的纯化倍率为 10.69 倍,回收率为 53.36 %。

3 结论

传统的离子交换层析步骤费时,操作比较复杂,而且要在低温下进行,需要一定的仪器,而双水相具有操作简单、可以在室温下进行等优点,可以减少纯化过程中酶的失活。本研究通过两种不同纯化方法的比较,发现双水相纯化方法的纯化倍数(10.69 倍)和回收率(53.36 %)比传统的离子交换层析纯化方法高。并且双水相萃取方法简单,更适合乙醇脱氢酶的纯化。

参考文献:

- [1] Chen Dong H. Wang, Liao Min-Hung. Preparation and Characterization of YADH-bound Magnetic Nanoparticles [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 16: 283-291.
- [2] M. Gonchar, M. Maiden, Y. Korpan, et al. Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor recognition elements[J]. FEMS Yeast Res. 2002, 2: 307-314.
- [3] P.R. Foster, P. Dunnill, M.D. Lilly. Salting out of enzymes with ammonium sulphate[J]. Biotechnol. Bioeng. 1971, 13: 713.
- [4] Zhi Guo-Su, X.L-Feng. Process integration of cell disruption and aqueous two phase extractions[J]. Chem. Technol. Biotechnol. 1999, 74: 284-288.
- [5] Bradford h[J]. Anal. Biochem. 1976, 72(2):248-254.
- [6] B·施特尔马赫. 图书馆目录[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1992.
- [7] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社, 1999.

洋河首季销售同比增长 34.7 %

本刊讯 江苏洋河酒厂股份有限公司干部职工面对宏观经济形势变化和白酒市场新的竞争环境,切实贯彻理清思路、转变方式、忠实执行的销售工作要求,全方位加大工作力度,提高营销水平,实现了今年首季销售开门红。一季度,该公司销售收入在上年度高基数基础上同比增长 34.7 %。

2009 年 1~3 月,蓝色经典实现销售同比增长 50 %,在销售总额中所占比例达 65.4 %,同比提升 6.54 %,公司吨酒售价同比增加了 1.23 万元。(小小)