

毕赤酵母工程菌原果胶酶的分离纯化^{*}

刘战民, 陆兆新, 吕凤霞, 别小妹, 赵海珍

(南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 采用硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤和离子交换层析等方法, 对毕赤酵母工程菌发酵液中的原果胶酶进行了分离纯化, 测定了其分子质量, 并确定了离子交换层析法的最佳离子交换条件。结果表明, 硫酸铵的饱和度为70%时, 可以使原果胶酶的回收率达到71.9%, 比活力为1 096.35 U/mg; 经Sephadex G75凝胶过滤, 原果胶酶回收率达到57.6%, 酶的比活力提高到3 762.40 U/mg; 最佳离子交换条件为: 0~0.5 mol/L NaCl(缓冲体系为NaAc-HAc, pH 5.8)溶液线性洗脱, Sepharose Fast Flow离子交换层析分离, 在该条件下酶的比活力提高到9 743.20 U/mg, 纯度为粗酶液的18.91倍, 达到了电泳级; SDS-PAGE电泳结果表明, 其分子质量为43.17 ku。

[关键词] 毕赤酵母; 原果胶酶; 分离纯化

[中图分类号] TS201.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)01-0079-05

原果胶酶能够水解不溶性的原果胶为水溶性的果胶物质, 这一特性使其在纺织^[1]、食品^[2]、造纸和环保^[3]等领域有着广阔的应用空间。原果胶酶的分离纯化是有效利用原果胶酶, 最大限度地发挥其活性的先决条件和基础。在用毕赤酵母原果胶酶工程菌发酵生产原果胶酶时, 发酵液中除了含有原果胶酶外, 同时还存在酵母自身产生的蛋白质和残留的培养基组分, 这些物质严重地影响着原果胶酶的分离纯化, 进而也影响着对原果胶酶的进一步深入研究。本试验研究了从毕赤酵母工程菌发酵液中分离纯化原果胶酶的方法, 以期为进一步研究原果胶酶的酶学性质、结构及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

毕赤酵母原果胶酶工程菌 X-33/PPN 为南京农业大学酶工程研究室构建; 培养基 BMGY 和 mBMMY 按照 Invitrogen 公司的酵母表达手册制备; 原果胶参照 Sakai 等^[4]的方法制备; 牛血清蛋白 BSA 购自北京天为时代公司; 分子量标准蛋白、丙烯酰胺、双甲基丙烯酰胺、过硫酸铵、十二烷基苯磺酸钠(SDS)、Sephadex G75 和 Sepharose Fast Flow 均为上海生物工程公司进口分装的 Pharmacia 产品; 考马斯亮蓝 R-250 购于中国医药集团上海化学试剂公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 原果胶酶粗酶液的制备

挑取毕赤酵母工程菌 X-33/PPN 单菌落, 接种于装有 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30℃、250 r/min 条件下培养约 18 h, 然后室温下 6 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 mBMMY 诱导培养基(约 200 mL)重新悬浮菌体, 使 OD₆₀₀ 约为 1.0; 将上述菌液置于 1 L 的摇瓶中, 用双层纱布封口, 置于 30℃、250 r/min 的摇床上继续培养, 每 24 h 向培养基中添加甲醇至其体积分数为 1%, 诱导培养 96 h, 4℃、6 000 r/min 离心 20 min。收集上清液, 即为原果胶酶粗酶液, 于 4℃保存备用。

1.3 原果胶酶的分离纯化

1.3.1 原果胶酶粗酶液的浓缩 将盛放原果胶酶粗酶液的透析袋放入培养皿中, 加入聚乙二醇 6000 固体覆盖透析袋, 使透析袋中的水分析出, 从而使原果胶酶粗酶液浓缩^[5]。

1.3.2 原果胶酶粗酶液的硫酸铵沉淀 吸取 4 份下保存的浓缩后的原果胶酶粗酶液 9 份, 每份 50 mL 分别装于 9 个 80 mL 带塞离心管中, 分别加入一定量的粉状硫酸铵, 使离心管中硫酸铵的饱和度分别为 0, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 和 90%, 4℃静置过夜, 10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 4℃保存, 沉淀用 10 mL 醋酸缓冲液(pH 5.8)溶解, 然后在同种缓冲液中充分透析, 检测上清液和透析处理液中原果胶酶的活性。

^{*} [收稿日期] 2005-05-11

[基金项目] 江苏省高技术项目(BG2002319)

[作者简介] 刘战民(1972-), 男, 陕西户县人, 在读博士, 主要从事食品生物技术研究。

[通讯作者] 陆兆新(1957-), 男, 江苏无锡人, 教授, 主要从事食品微生物与生物技术研究。

1.3.3 Sephadex G75 凝胶柱洗脱 Sephadex G75 层析柱的制备参照文献[6]的方法进行。取经硫酸铵沉淀、透析和浓缩后终体积为 2 mL 的原果胶酶液加入到充分平衡的凝胶中,然后用醋酸缓冲液(pH 5.8)洗脱,洗脱速度为 0.3 mL/min,每 3 min 收集一管,测定每管中的蛋白质含量和原果胶酶活性,当检测不到原果胶酶活性时,终止洗脱,并用测得的蛋白质含量和酶活数据绘制凝胶过滤曲线。

1.3.4 离子交换层析 (1) 离子交换条件的确定。在 6 支试管中各吸入 1 mL 供选择的阳离子交换剂,分别用不同 pH 梯度的缓冲液润洗 10 次,待离子交换树脂装平稳后,向其中加缓冲液 1 mL,向各试管中加入 100 μ L 经 Sephadex G75 凝胶过滤纯化的原果胶酶溶液,混匀,放置 10 min,检测上清液中的酶活性,判断是否存在目的蛋白。供选择的 pH 梯度缓冲液系列有: 20 mmol/L NaAc-HAc(pH 5.5, 5.8), 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 6.5, 7.0)和 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5, 8.0)。供选择的 3 种阳离子交换剂为: Sepharose Fast Flow, D151 和 D152。(2) 原果胶酶的纯化。将经 Sephadex G75 凝胶过滤的样品加入到预先用醋酸缓冲液(pH 5.8)平衡好的 Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱中,首先用醋酸缓冲液(pH 5.8)洗脱,洗脱速度为 0.5 mL/min,然后用 0~0.5 mol/L NaCl 进行线性梯度洗脱,洗脱速度为 0.5 mL/min,部分收集,每管收集 200 滴。

1.4 测定项目及方法

1.4.1 原果胶酶活性测定 取 10 mg 原果胶,加

入 0.95 mL pH 5.8 的 NaAc-HAc 缓冲液和 50 μ L 适当稀释的原果胶酶提纯液,在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 h,冰浴以终止反应,10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液,用吡啶-硫酸比色法^[7]在 530 nm 波长下测定上清液中的果胶物质。在上述酶反应体系中,每小时催化原果胶生成相当于 1 μ mol 半乳糖醛酸的果胶物质的量,定义为一个酶活单位(U)。

1.4.2 蛋白质含量测定 Sephadex G75 凝胶过滤液和离子交换层析洗脱液中的蛋白质检测均采用 280 nm 紫外分光光度计法^[7],蛋白质含量以 280 nm 吸光值(A_{280})来表示。蛋白质浓度测定采用 Bradford^[8]的方法。

1.4.3 原果胶酶 SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳 将上述各步分离纯化的原果胶酶液各取 1 μ g,参照文献[8]的方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,鉴定酶的纯度并测定酶的分子质量(m)。

2 结果与分析

2.1 原果胶酶粗酶液的硫酸铵沉淀试验结果

图 1 表明,随着硫酸铵饱和度的增加,上清液中酶的相对活性不断降低,在饱和度为 30%~50%时,上清液中酶活性下降最快,表明原果胶酶沉淀量在相应增大;当硫酸铵饱和度超过 70%时,上清液中原果胶酶活性下降呈现出减缓趋势,表明原果胶酶已经基本沉淀完毕。与之相应,在硫酸铵饱和度达到 70%时,原果胶酶回收率达到了 71.9%,继续提高饱和度,原果胶酶的回收率基本不变。

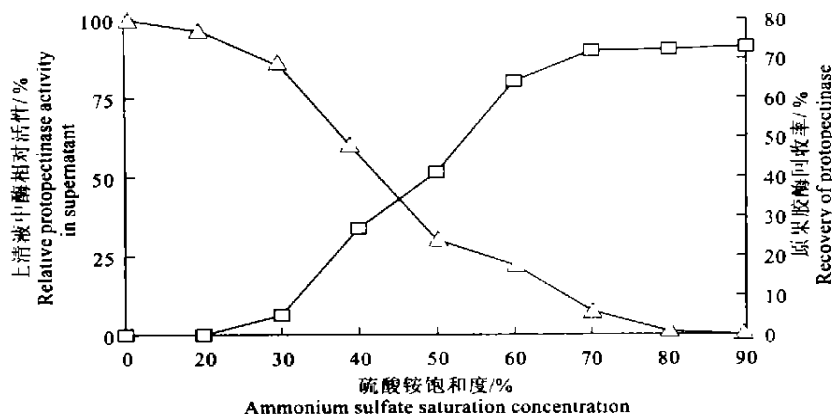


图 1 粗酶液中原果胶酶硫酸铵沉淀曲线

- □ - . 原果胶酶相对活性; - - . 原果胶酶回收率

Fig. 1 Ammonium sulfate precipitation of protopectinase

- □ - . Relative protopectinase activity; - - . Recovery of protopectinase

综合分析硫酸铵沉淀过程中原果胶酶回收率和上清液中原果胶酶活性变化规律可知, 选取 30% 和 70% 分别作为原果胶酶沉淀起始和终止时的硫酸铵饱和度较为合适。

2 2 Sephadex G75 凝胶柱洗脱结果

由图 2 可知, 蛋白质含量的洗脱曲线和酶活性的洗脱曲线比较吻合, 说明滤液中的蛋白质确实是要分离的原果胶酶。从收集的第 17 管开始, 洗脱蛋白含量增大, 同时, 洗脱液中原果胶酶的活性升高;

到第 25 管时, 洗脱液中蛋白含量和酶活性都达到了最高; 到第 31 管时, 洗脱液中的蛋白含量和酶活降到较低水平; 继续洗脱, 发现在第 41 管和第 45 管间出现了第 2 个活性峰, 峰形很小, 可能是分泌表达的原果胶酶被酵母细胞产生的蛋白酶降解后的产物形成的, 因为含量很低, 未作进一步研究。由以上结果可知, 酶液经 Sephadex G75 柱洗脱时, 收集第 17~31 管洗脱液, 基本可以完全收集到原果胶酶。

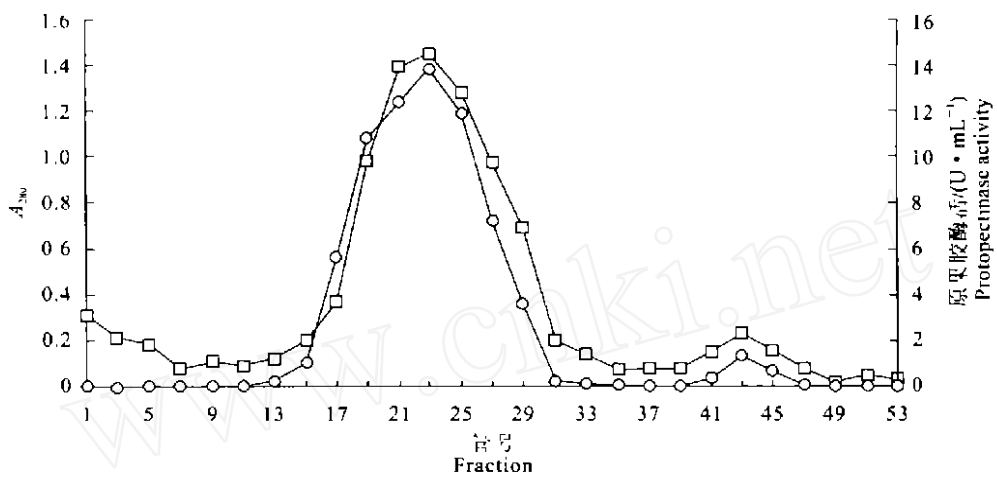


图 2 原果胶酶 Sephadex G75 凝胶过滤洗脱图谱

- ○ - . 原果胶酶活性; - □ - . 蛋白质含量

Fig 2 Elution profile of protopectinase by Sephadex G75 gel filtration

- ○ - . Protopectinase activity; - □ - . Protein content

2 3 离子交换层析结果

2 3 1 离子交换条件的确定 离子交换层析法是利用不同蛋白质表面电荷的性质不同, 来达到分离、纯化蛋白质的目的。进行离子交换层析的最佳溶液 pH 一般与蛋白质的等电点相差一个单位, 这样可使蛋白质的电荷量既能保证将其结合在离子交换树脂上, 又不需要在洗脱时采用高离子强度的洗脱液或与原溶液 pH 相差甚远的 pH^[8]。根据原果胶酶基因预测原果胶酶的氨基酸组成, 可推知原果胶酶的等电点^[9], 同时考虑到原果胶酶活性测量时反应环境为 pH 5 8 的 NaAc-HAc 缓冲体系, 本试验选用阳离子交换树脂。

以 D151 和 D152 2 种阳离子交换树脂为离子交换剂时, 在 3 种缓冲液体系 (pH 为 5 5~ 8 0) 下, 上清液中原果胶酶的相对活性基本达到了 97. 8%, 表明这 2 种阳离子交换剂均不适合原果胶酶的吸附分离。

在 3 种缓冲液体系 (pH 为 5 5~ 8 0) 下, Sepharose Fast Flow 阳离子交换剂上清液中的原

果胶酶相对活性见表 1。

表 1 不同缓冲体系下 Sepharose Fast Flow 阳离子交换剂上清液中原果胶酶的相对活性

Table 1 Enzyme activity of filtrate of Sepharose Fast Flow in different buffers

缓冲体系 Buffer solution	pH	原果胶酶相对活性/% Reserved rate of protopectinase
醋酸缓冲液 Acetic sodium buffer	5 5	45
	5 8	49
磷酸缓冲液 Sulphate buffer	6 5	73
	7 0	86
Tris-HCl 缓冲液 Tris-HCl buffer	7 5	93
	8 0	98

由表 1 可知, 在磷酸和 Tris-HCl 2 种缓冲体系中, 上清液中原果胶酶相对活性均较高, 表明在这 2 种缓冲体系中, Sepharose Fast Flow 对原果胶酶的吸附效果均较差, 不适合作为离子交换缓冲液。而在醋酸缓冲体系中, 上清液中原果胶酶相对活性较低, 表明该阳离子交换剂对原果胶酶的吸附量较大。由

表 1 还可知,在醋酸缓冲液的 2 种 pH 条件下,上清液中原果胶酶活性差异不大,但考虑到原果胶酶活性测定的方便性,本试验选用 pH 为 5.8 的醋酸缓冲液作为离子交换缓冲体系。

2.3.2 原果胶酶的纯化 从图 3 可以看出,蛋白质经 Sepharose Fast Flow 离子交换柱被 NaCl 线性洗脱后,洗脱液中出现了 4 个蛋白峰和 1 个活性峰,其

中有一个蛋白峰最大,与原果胶酶活性峰一致,表明形成该最大峰的蛋白质为原果胶酶,其他峰则为杂质蛋白。试验结果说明利用 0~0.5 mol/L NaCl(缓冲体系为 NaAc-HAc, pH 5.8)溶液线性洗脱离子交换柱,可将原果胶酶和其他杂质蛋白很好地分离开来,从第 21~29 管洗脱液中可以得到原果胶酶。

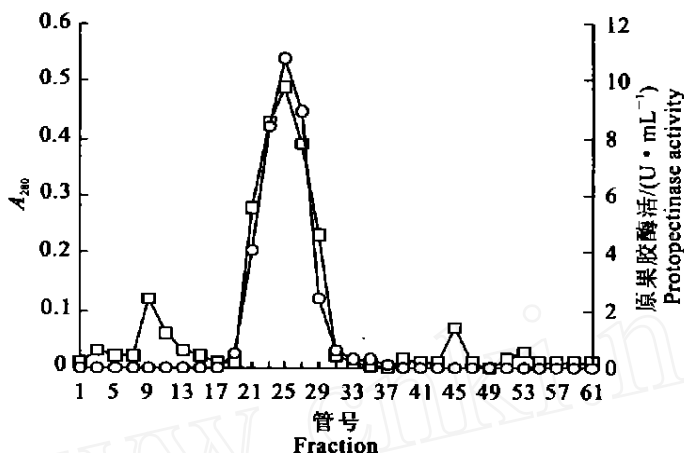


图 3 Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析洗脱图谱

- □ - . 蛋白质含量; - ○ - . 原果胶酶活性

Fig. 3 Elution profile of protopectinase by Sepharose Fast Flow chromatography

- □ - . The amount of protein; - ○ - . Protopectinase activity

2.4 原果胶酶纯度的电泳鉴定及分子质量测定

由图 4 可知,本试验获得了纯度很高的电泳级原果胶酶。

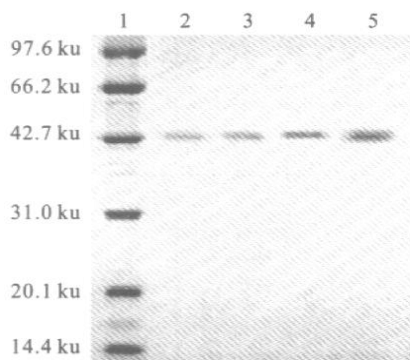


图 4 原果胶酶 SDS-PAGE 电泳结果

- 1 标准分子质量蛋白; 2 原果胶酶粗酶液; 3 硫酸铵沉淀后的原果胶酶液; 4 Sephadex G75 纯化后的原果胶酶液;
- 5 Sepharose Fast Flow 纯化后的原果胶酶液

Fig. 4 SDS-PAGE of the purified protopectinase

- 1 Standard protein maker; 2 Crude enzyme solution;
- 3 Enzyme solution after ammonium sulfate precipitation;
- 4 Enzyme solution after Sephadex G75 gel filtration;
- 5 Enzyme solution after Sepharose Fast Flow chromatography

将本试验测得的原果胶酶的迁移率(0.420 93)带入由标准分子质量蛋白电泳所得的分子质量(m)与相对迁移率的回归方程: $\lg m = -1.027 4 \times R_f + 5.058 8$ (图 5), 计算可得原果胶酶分子质量为 43.17 ku, 与文献[10]报道的结果相一致。

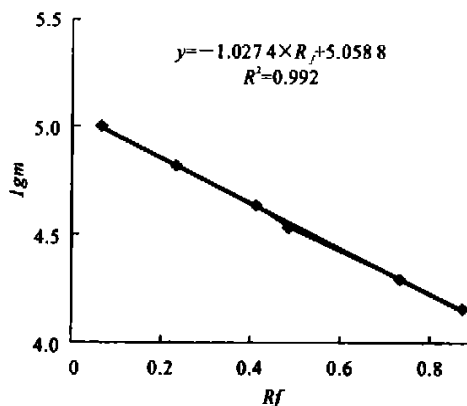


图 5 标准蛋白与纯化蛋白在 SDS-PAGE 条件下分子质量与相对迁移率的关系

Fig. 5 Molecular weight determination of protopectinase by SDS-PAGE

2.5 提纯各步原果胶酶的比活力、纯度和回收率

原果胶酶粗酶液依次经过硫酸铵沉淀、

Sephadex G75 凝胶过滤和 Sepharose Fast Flow 层析, 酶的纯度和比活力均有了显著的提高。表 2 为 1 L 原果胶酶粗酶液各步分离纯化的结果, 由表 2 可知, 硫酸铵沉淀适合原果胶酶的粗纯, 经过硫酸铵沉淀, 酶的比活力提高到 1 096 35 U /mg; Sephadex

G75 凝胶过滤能大幅度地提高原果胶酶纯度, 纯化后酶的比活力提高到 3 762 40 U /mg; 阳离子交换方法可显著地提高原果胶酶纯度, 纯化后酶的比活力为 9 743 20 U /mg, 纯度为粗酶液的 18 91 倍。

表 2 毕赤酵母 X-33/PPN 原果胶酶的分离纯化
Table 2 Summary of purification of protopectinase from *P. pastoris* X-33/PPN

纯化方式 Purification step	蛋白量/mg Total protein	总活力/U Protopectinase activity	比活力/(U · mg ⁻¹) Specific activity	纯化倍数 Purification	回收率/% Recovery
无细胞发酵液 Free cell culture	216 80	22 339 3	515 20	1	100
硫酸铵 Ammonium sulfate precipitation	73 25	16 061 85	1 096 35	2 13	71 9
Sephadex G75	17 10	12 867 45	3 762 40	7 30	57 6
Sepharose Fast Flow	4 15	8 086 85	9 743 20	18 91	36 2

3 讨 论

国外报道的细菌、霉菌和酵母产生的原果胶酶的纯化方法各不相同, 多采用的是将超滤、离子交换树脂 Butyl-Toyopearl、Toyopearl 和硫酸铵分级沉淀等方法相结合的组合方法^[11], 也有采用一步纯化获得较好结果的报道^[12], 这些方法均为从毕赤酵母工程菌发酵液中分离纯化原果胶酶提供了有益的借鉴。尽管毕赤酵母表达的蛋白可以采用镍柱进行亲

和层析纯化, 但这种方法的成本太高, 而且经过亲和层析纯化的蛋白还需去除表达蛋白带有的 HIS 亲和标签, 这无疑增加了纯化过程的复杂程度。本试验借鉴前人纯化微生物原果胶酶的方法, 将硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换层析 3 种常规分离方法进行组合, 建立了一种成本低廉、纯化效果良好的原果胶酶分离纯化方法, 这将有助于进一步研究原果胶酶的酶学性质和高级结构, 为原果胶酶的大规模开发利用奠定了基础。

[参考文献]

[1] Narendra Reddy, Yiqi Yang Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 22-27.

[2] Yu R W, Lencki Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during micro filtration[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 63: 413-423

[3] Kas yap D R, Vohra P K, Chopra S Applications of pectinases in the commercial sector[J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 215-227.

[4] Sakai T, Okushima M. Protopectin-solubilizing enzyme from *Tichiosporon penicillatum* [J]. Agric Biol Chem, 1978, 42: 2427-2429

[5] Di Pietro A, Roncero M. Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* produced on tomato vascular tissue[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 49: 177-185

[6] Sakai T, Sakamoto T. Purification and some protopectinases of protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54: 879-889

[7] 汪家政, 范 明 蛋白质技术手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 2000

[8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254

[9] Kobayashi T, Koike K, Yoshimatsu T, et al Purification and properties of a low molecular weight high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63: 65-72

[10] Sakai T, Takao M, Nagai M. Research on protopectinase: a new aspect of pectolytic enzymes[J]. Mem Eac Agr Kinki Uni, 1999, 32: 1-18

[11] Sakamoto T, Hours R A, Sakai T. Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58: 353-358

[12] Takeshi M, Daisuke K, Akihiko K. Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification[J]. Biochemical Engineering, 2002, 12: 175-179

(下转第 92 页)

- [9] Shan L X, Hardy D O, Catterall J F, et al Effects of luteinizing hormone and androgen on steady state levels of mRNA for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors *in vivo*[J]. Endocrinology, 1995, 136: 1686-1693
- [10] Tsim T Y, Wong E Y, Leung M S, et al Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats[J]. Neuroscience, 2004, 123(4): 951-965
- [11] Arsenijevic Y, Tribollet E. Region-specific effect of testosterone on oxytocin receptor binding in the brain of the aged rat[J]. Brain Res, 1998, 785(1): 167-170
- [12] 李义召, 刘吉良. 神经生长因子[J]. 脑与神经疾病杂志, 1997, 5(4): 254

Effects of testosterone on AR and NGF of olfactory bulb in rat

TIAN Guang-ming, FAN Guang-li, TIAN Hai-xia, Ayimuguli, ZHANG Yong-de,
ZHANG Yan, HE Yu-long, NIE Cong, WANG Guan-kui, LI Ding-qiang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The method of immunohistochemistry SP was used to study the AR and NGF positive expression of rats to investigate the effects of androgen replacement on olfactory bulb. As a result, in castration group, the positive expression of AR and NGF were decreased. After being treated with testosterone, the immunoreactive production of AR and NGF were increased and immunoreactive production of AR and NGF almost returned to the normal level. All the results illustrated that the expression of AR and NGF were decreased after castration, and the testosterone could prevent this by down regulating the expression of AR and NGF.

Key words: testosterone; olfactory bulb; castration; AR; NGF

(上接第 83 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)01-0079-EA

Purification of protopectinase from *Pichia pastoris* engineering strain

LIU Zhan-min, LU Zhao-xin, LU Feng-xia, BIE Xiao-mei, ZHAO Hai-zhen

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: The electrophoresis level protopectinase was purified by ammonium sulfate, Sephadex G75 gel filter and ion exchange chromatography from *Pichia pastoris* engineering strain. The experiment showed that the recovery of protopectinase could reach 71.9% and specific activity was 1 096.35 U/mg when saturation 70% ammonium sulfate precipitated protopectinase. The recovery of protopectinase was 57.6% and specific activity reached 3 762.40 U/mg by Sephadex G75 gel filter. Finally, with the ion exchange chromatography the protopectinase was purified 18.91 times than the crude protopectinase and its specific activity increased to 9 743.20 U/mg, SDS-PAGE electrophoresis showed its molecular weight was 43.17 ku.

Key words: *Pichia pastoris*; protopectinase; purification