

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.2133.033

网络出版时间:2011-10-25 21:33

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.2133.033.html>

2 种阴离子交换柱对 α -葡萄糖苷酶的分离纯化效果

袁亚宏^a, 蔡 瑞^a, 岳田利^a, 侯俊龙^a, 徐长云^a, 郭康权^b

(西北农林科技大学 a 食品科学与工程学院, b 机械与电子工程学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**比较 Q-Sepharose Fast Flow 和 DE-52 2 种阴离子交换柱对 1 株脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus contaminans* 发酵产生的 α -葡萄糖苷酶的分离纯化效果,为 α -葡萄糖苷酶的规模化生产提供技术支持。**【方法】**采用硫酸铵分级沉淀法对发酵液中的蛋白质进行沉淀,以分离纯化后的蛋白质含量和酶活为指标,对 2 种阴离子交换柱的分离纯化效果进行评价。**【结果】**经过 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱分离得到的 α -葡萄糖苷酶有 1 个酶活吸收峰,最大酶活为 6.99×10^3 U,在这个吸收峰内蛋白质的含量稳定在 $26.25 \mu\text{g/mL}$ 左右;经过 DE-52 阴离子交换层析柱分离, α -葡萄糖苷酶的酶活范围较大,最大酶活为 5.56×10^3 U,在酶活吸收峰内,蛋白质含量为 $21.25 \sim 232.5 \mu\text{g/mL}$,变化范围较大。**【结论】**Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱对 α -葡萄糖苷酶的分离效果优于 DE-52 层析柱。

【关键词】 脂环酸芽孢杆菌; α -葡萄糖苷酶; 阴离子交换层析; 分离纯化

【中图分类号】 Q814.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)12-0191-05

Effects of two kinds of anion exchange chromatography in the separation and purification of α -glucosidase

YUAN Ya-hong^a, CAI Rui^a, YUE Tian-li^a, HOU Jun-long^a,

XU Chang-yun^a, GUO Kang-quan^b

(a College of Food Science and Engineering, b College of Mechanical and Electronic Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The research focused on the comparison between Q-Sepharose Fast Flow and DE-52 in the separation and purification of α -glucosidase from *Alicyclobacillus contaminans* which was separated from orchard of Shaanxi Province, in order to provide technical support for industrial-scale production of α -glucosidase. **【Method】** Firstly, ammonium sulfate was used to deposit protein by different saturation levels, then the concentrated solution was treated by the two kinds of anion exchange chromatography. After that, protein content and enzyme activity were used to evaluate the effects of the two kinds of anion exchange chromatography in the separation of α -glucosidase. **【Result】** The results showed one absorption peak of α -glucosidase appeared and the enzyme activity was 6.99×10^3 U after the treatment of Q-Sepharose Fast Flow, and the protein content was steady at about $26.25 \mu\text{g/mL}$ in this absorption peak; the range of absorption peak was large after treated by DE-52 and the highest point enzyme activity was 5.56×10^3

* [收稿日期] 2011-07-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31071550); 农业部“948”项目(2011-G8-3)

[作者简介] 袁亚宏(1971—), 女, 甘肃天水人, 副教授, 博士, 主要从事食品高新技术研究。E-mail: yuan324@msn.com

[通信作者] 郭康权(1955—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品废弃物综合利用研究。

E-mail: jdgkq@nwsuaf.edu.cn

U, but the protein content fluctuated from 21.25 to 232.5 $\mu\text{g/mL}$ in this absorption peak, varying in a large range. 【Conclusion】 Anion exchange chromatography Q-Sepharose Fast Flow is better than DE-52 in the separation of α -glucosidase.

Key words: *Alicyclobacillus contaminans*; α -glucosidase; anion exchange chromatography; purification

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)是一类能够从低聚糖类底物的非还原末端切开 α -1,4 糖苷键的酶类,其水解过程伴随着葡萄糖的释放,或者将游离出的葡萄糖残基转移到麦芽糖、麦芽 3-5 糖、蔗糖等另外的糖类底物上,形成 α -1,6 糖苷键,经过水解后形成非发酵性的低聚异麦芽糖或其相应的糖酯、糖肽等^[1-2]。作为酶制剂中的重要分支, α -葡萄糖苷酶主要参与动物体内的糖代谢、降解植物体中可溶性淀粉形成葡萄糖以及参与微生物糖代谢的非磷酸途径,具有非常重要的生物性功能^[3-4]。

关于 α -葡萄糖苷酶的应用研究,当前主要集中在医学领域^[5-6]、新型低聚异麦芽糖生产^[7-8]、啤酒的口感改善^[9]、淀粉的生产^[10-11]以及麦芽糖检测^[12]等多个方面。同时,由于 α -葡萄糖苷酶在实际应用中需要精分离高纯度,故其分离纯化也是研究的重点之一。目前,对于酶的分离纯化,主要有盐析、有机溶剂沉淀、离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳等多种方法,其中离子交换层析法以其灵敏度高、重复性好、选择性强、分析速度快等优点,在酶和蛋白质分离纯化中得到了广泛应用^[13-14]。有文献报道,脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus contaminans* 中 α -葡萄糖苷酶的活性较高^[15]。为此,本研究采用 2 种不同的阴离子交换柱对脂环酸芽孢杆菌 *A. contaminans* 中的 α -葡萄糖苷酶进行分离纯化,以期得到对其分离纯化效果较好的柱材,为 α -葡萄糖苷酶的进一步分离纯化奠定基础,同时也为 α -葡萄糖苷酶的规模化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

脂环酸芽孢杆菌 *Alicyclobacillus contaminans*, 分离自陕西某果园,实验室保存,发酵培养用 AAM 培养基^[16]。

Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Bioscience 公司;DEAE-纤维素 DE-52,北京瑞达恒辉科技发展有限公司;对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(pNPG),Sigma 公司;对硝基苯酚(PNP),杭州凯佳化工有限公司;牛血清白蛋白,中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250,北京瑞尔欣德科技有限公司。

HJ-3 数显恒温磁力搅拌器,厦门中村光学仪器厂;UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津公司;SBS-160 数控计滴自动部分收集器,上海青浦沪西仪器厂;BJBLAA-1000 微孔滤膜过滤器,北京哲成科技有限公司。

1.2 *A. contaminans* 菌株的发酵

从斜面挑取 *A. contaminans* 菌株接种于 100 mL 的 AAM 液体培养基中,45 $^{\circ}\text{C}$ 摇床(190 r/min)培养 24 h 作为种子培养液,以 5% 接种量接种于 250 mL 三角摇瓶中,摇床培养 120 h,取培养液于 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清。

1.3 粗酶制备

将上清液转移至烧杯,在恒温磁力搅拌器上边搅动边慢慢加入磨碎的硫酸铵粉末沉淀蛋白,当上清液达到 25% 饱和度后再搅拌 30 min,上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜后离心弃去杂蛋白并收集上清液。然后继续加入硫酸铵粉末进行蛋白沉淀,直到溶液饱和度达到 75% 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,离心收集蛋白沉淀,将蛋白溶于少量 pH 5.4 的乙酸缓冲液中,透析过夜,0.45 μm 超滤膜过滤除去蛋白溶液杂质。

1.4 2 种阴离子交换柱的分离纯化

根据 α -葡萄糖苷酶的分子质量大小和对不同层析材料的亲和力,采用 Q-Sepharose Fast Flow 和 DEAE-纤维素 DE-52 进行 α -葡萄糖苷酶的分离纯化。

1.4.1 Q-Sepharose Fast Flow 分离纯化 用 pH 5.4 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换柱,至流出液的电导和 pH 保持恒定不变;将透析得到的蛋白质溶液加到阴离子交换柱上(2.0 cm $\times$ 10 cm),上样量为 2 mL;用 0~0.5 mol/L 的 NaCl(同样缓冲液配制)进行梯度洗脱,流速 2 mL/min;调节收集器的时间间隔为 4 min,用试管收集洗脱液,每管 5 mL;在 280 nm 波长处测定洗脱液中蛋白质的吸光度,并测酶活性。收集酶活性高的各管溶液于透析袋中,用 PEG-20000 浓缩,除去水分及小分子杂质。最后将透析袋放入 0.2 g/L 叠氮钠溶液中透析 1 h,即可得到 Q-Sepharose Fast Flow 纯化的 α -葡萄糖苷酶。

1.4.2 DE-52 分离纯化 将透析浓缩后的酶液加

至预先用 pH 5.4 的 0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液平衡的 DE-52 离子交换柱上(2.0 cm×10 cm),上样量 2 mL,用 0~0.5 mol/L 的 NaCl(同样缓冲液配制)进行梯度洗脱,恒流泵流速 2 mL/min;使用部分收集器收集洗脱液,每管收集 5 mL,在 280 nm 波长处测定每管的蛋白质吸光值,并测定酶活性,收集酶活性高的各管,用 PEG-20000 浓缩。

1.5 α -葡萄糖苷酶活性的测定

1.5.1 标准曲线的绘制 准确称取对硝基苯酚 139.0 mg,用蒸馏水定容至 1 000 mL 容量瓶。再从中吸取 1,2,3,4,5,6 mL 溶液分别至 6 个 100 mL 容量瓶中,用 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液定容后混匀,最终使 1 mL 稀释液中分别含有 0,10,30,50,70,90 mmol 对硝基苯酚。在 405 nm 处测定吸光度值,并绘制标准曲线。

1.5.2 α -葡萄糖苷酶活性的测定 以 pNPG 为底物,取 200 μ L pNPG 溶液(1 mmol/L)、600 μ L 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 5.4,50 mmol/L)和 200 μ L 酶液,于 52 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30 min,以 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应,反应结束后在 405 nm 下测定对硝基苯酚的吸光值。1 个酶活力单位(U)为 52 $^{\circ}$ C、pH 5.4 下,1 min 催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚需要的酶量。

α -葡萄糖苷酶活性的计算公式为:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶活性(U)} = \frac{200 \times 30 \times K}{A_{405} \times 3.5 \times 10^3}。$$

式中:200 为反应过程中加入的酶量(μ L);30 为反

应时间(min); K 为标准曲线系数; A_{405} 为测定的吸光度值;3.5 为反应总体积(mL)。

1.6 蛋白质含量的测定

采用紫外吸收法测定^[17]。在 280 nm 波长处,测定牛血清蛋白质量浓度为 0,20,40,60,80,100 μ g/mL 时标准溶液的吸光度值,绘制标准曲线,计算样品中的蛋白质含量。

样品蛋白质含量的计算公式为:

$$c(\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{280}}{K}。$$

式中: c 为蛋白质含量; K 为标准曲线系数; A_{280} 为测定的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 对硝基苯酚(PNP)标准曲线

以 405 nm 波长处测得的吸光度值为纵坐标,以反应体系中对硝基苯酚的终浓度为横坐标,绘制 PNP 标准曲线如图 1 所示。标准曲线方程为 $y = 0.0018x$,相关系数为 0.998。其中 y 为溶液在 405 nm 波长处的吸光度值(A_{405}), x 为对硝基苯酚浓度。

2.2 蛋白质含量标准曲线

用紫外吸收法测定蛋白质得到的标准曲线如图 2 所示。标准曲线方程为 $y = 0.0057x + 0.0087$,相关系数为 0.9987。其中 y 为溶液在 280 nm 处的吸光度值(A_{280}), x 为牛血清蛋白质含量。

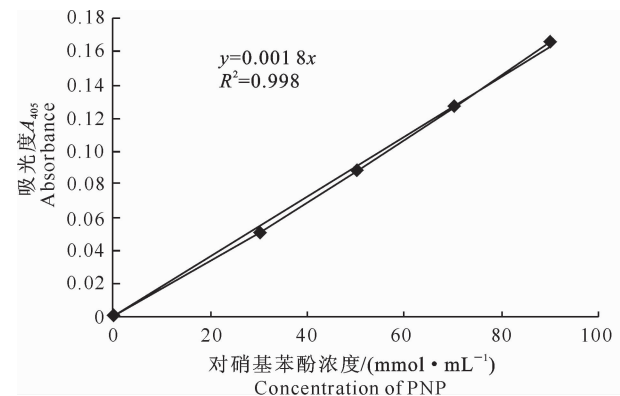


图 1 对硝基苯酚的标准曲线
Fig. 1 PNP standard curve

2.3 Q-Sepharose Fast Flow 分离纯化

取 2 mL 盐析后适度浓缩的样品,缓慢加入到 Q-Sepharose Fast Flow 层析柱中。记录洗脱液在 280 nm 处的光吸收值,并测定 α -葡萄糖苷酶的活性,绘制曲线如图 3 所示。由图 3 可以看出:(1)经过硫酸铵分级沉淀得到的粗酶,能够通过 Q-Sepha-

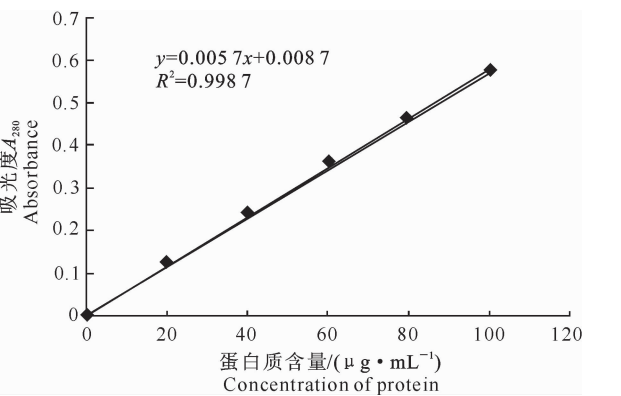


图 2 蛋白质含量测定的标准曲线
Fig. 2 Protein standard curve

rose Fast Flow 进行进一步的分离纯化。经过洗脱,出现 2 个蛋白吸收峰和 1 个酶吸收峰,蛋白吸收峰较低,而酶吸收峰明显,两者间隔分明,没有重叠;(2)经过 Q-Sepharose Fast Flow 层析柱洗脱后,蛋白质在第 1~5 管、第 16~22 管各出现 1 个吸收峰,且在第 3~18 管各出现 1 个峰值,根据标准曲线计

算得此时的蛋白含量分别为 146.25 和 92.5 $\mu\text{g/mL}$,但在这 2 个蛋白峰的管内, α -葡萄糖苷酶的活性均很低,甚至没有;(3)在第 25~35 管出现 1 个

酶活吸收峰,在第 29 管出现酶活的峰值,由公式计算得其最大酶活为 $6.99 \times 10^3 \text{ U}$,而在此范围内,蛋白质的含量约为 26.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

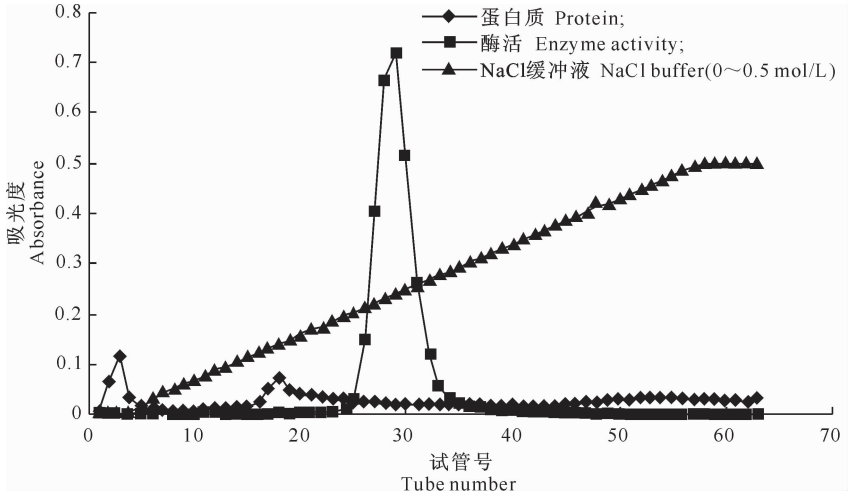


图 3 Q-Sepharose Fast Flow 对 α -葡萄糖苷酶的分离纯化

Fig. 3 Results of separation of α -glucosidase by Q-Sepharose Fast Flow

2.4 DE-52 分离纯化

取 2 mL 盐析后适度浓缩的样品,用 DE-52 层析柱进行分离纯化,记录洗脱液在 280 nm 处的吸光度值,并检测 α -葡萄糖苷酶的活性,绘制曲线如图 4 所示。由图 4 可以看出:(1)经 DE-52 阴离子交换柱分离纯化后,蛋白质在第 3~11 管和第 17~33 管各出现 1 个吸收峰,而 α -葡萄糖苷酶酶活在第 23~

46 管出现 1 个吸收峰,酶活吸收峰与蛋白的第 2 个吸收峰有部分重叠;(2)第 3~11 管之间的吸收峰在第 6 管出现 1 个峰值,其蛋白质含量为 150 $\mu\text{g/mL}$,第 2 个峰值在第 24 管出现,其蛋白质含量为 310 $\mu\text{g/mL}$,酶活性吸收峰值在第 35 管出现,其活性为 $5.56 \times 10^3 \text{ U}$,在酶活吸收峰内,蛋白质含量为 21.25~232.5 $\mu\text{g/mL}$,变化范围较大。

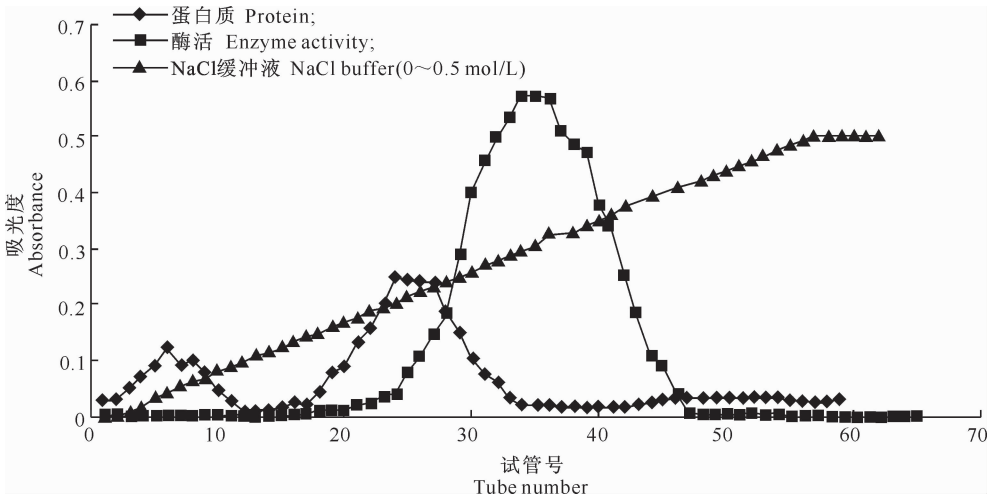


图 4 DE-52 对 α -葡萄糖苷酶的分离纯化

Fig. 4 Results of separation of α -glucosidase by DE-52

3 结 论

本研究以从陕西某果园分离到的 1 株 *Alicyclobacillus contaminans* 为材料,对其发酵液中的 α -葡萄糖苷酶进行了分离,经过硫酸铵分级沉淀之后,

Q-Sepharose Fast Flow 层析柱和 DE-52 层析柱对 α -葡萄糖苷酶均有一定的分离作用,蛋白质洗脱液出现 2 个峰,而酶活均只有 1 个吸收峰,可见 2 种阴离子交换柱对 α -葡萄糖苷酶有相似的分离作用。经过 Q-Sepharose Fast Flow 分离纯化的 α -葡萄糖苷

酶在蛋白质含量为 26.25 $\mu\text{g/mL}$ 左右时有吸收峰值,分离效果良好;而 DE-52 分离纯化后的 α -葡萄糖苷酶活吸收峰的跨度较大,且在这个吸收峰内,蛋白质含量为 21.25~232.5 $\mu\text{g/mL}$,变化范围较大,说明其分离效果较差。

综上所述,分别采用 Q-Sepharose Fast Flow 和 DE-52 2 种阴离子层析柱对脂环酸芽孢杆菌产生的 α -葡萄糖苷酶进行分离纯化时,Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱对 α -葡萄糖苷酶的分离纯化效果优于 DE-52 阴离子交换柱,该研究为以后的 α -葡萄糖苷酶纯化工作奠定了基础,同时也为 *Alicyclobacillus contaminans* 中 α -葡萄糖苷酶的大规模生产提供了技术支持。

[参考文献]

[1] 王志江,魏红福.蜜蜂 α -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质研究[J].食品科学,2007,28(7):304-308.
Wang Z J,Wei H F. Purification and characterization of α -glucosidase extracted from honey bee [J]. Food Science,2007,28(7):304-308. (in Chinese)

[2] Zhou C,Xue Y,Ma Y. Enhancing the thermostability of α -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 by single praline substitution [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2010,110(1):12-17.

[3] 岳振峰,陈小霞,彭志英. α -葡萄糖苷酶研究现状及进展 [J]. 食品与发酵工业,2000,26(3):63-67.
Yue Z F,Chen X X,Peng Z Y. Status quo and advance of research on α -glucosidase [J]. Food and Fermentation Industries,2000,26(3):63-67. (in Chinese)

[4] Fonseca F,Silva J,Samuels R,et al. Purification and partial characterization of a midgut membrane-bound α -glucosidase from *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology,2010,155:20-25.

[5] Amarinthnukrowh P,Tongkobpetch S,Kongpatanayothin A,et al. p. D645E of acid alpha-glucosidase is the most common mutation in thai patients with infantile-onset pompe disease [J]. Genetic Testing and Molecular Biomarkers,2010,14(6):835-837.

[6] Huang J H,Yan C W,Su I J,et al. Hepatitis B virus surface antigen interacts with acid alpha-glucosidase and alters glyco-gen metabolism [J]. Hepatology Research,2010,40(6):633-

640.

[7] Konishi M,Fukuoka T,Shimane Y,et al. Biochemical synthesis of novel,self-assembling glycolipids from ricinoleic acid by a re-combinant α -glucosidase from *Geobacillus* sp [J]. Biotechnology Letters,2011,33:139-145.

[8] Nimpiboon P,Nakapong S,Pichyangkura R,et al. Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I α -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2 [J]. Process Biochemistry,2011,46:448-457.

[9] 马雅娥. 低醇甜味啤酒与低醇奶味啤酒的研制 [J]. 酿酒,2004,31(6):61-62.
Ma Y E. The development of low alcohol sweet and low alcohol milk beer [J]. Liquor Making,2004,31(6):61-62. (in Chinese)

[10] Martino A,Schiraldi C,Fusco S. Properties of the recombinant α -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing [J]. Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic,2001,11:787-794.

[11] Zdziebło A,Synowiecki J. New source of the thermostable α -glucosidase suitable for single step starch processing [J]. Food Chemistry,2002,79:485-491.

[12] Dilek O,Azmi T,Suna T. Maltose biosensing based on co-immobilization of alpha-glucosidase and pyranose oxidase [J]. Bioelectrochemistry,2010,79(1):108-113.

[13] 汪世华. 蛋白质工程 [M]. 北京:科学出版社,2008:209-217.
Wang S H. Protein engineering [M]. Beijing: Science Press,2008:209-217. (in Chinese)

[14] 司波,赵佳. 离子交换层析技术在多糖分离纯化中的应用 [J]. 科技风,2009(18):203.
Si B,Zhao J. The application of ion-exchange chromatography in the separation and purification of polysaccharides [J]. Technology Trend,2009(18):203. (in Chinese)

[15] Wang Y,Yue T L,Yuan Y H,et al. Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in China [J]. Journal of Food Protection,2010,73:390-394.

[16] Goto K,Nishibori A,Wasada Y. Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards [J]. Letters in Applied Microbiology,2008,46:289-294.

[17] 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京:科学出版社,1999:102-208.
Fan M. Protein technical manual [M]. Beijing: Science Press,1999:102-208. (in Chinese)

(上接第 190 页)

[21] Huang J W,Yang J K,Duan Y Q,et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2010,88(2):553-562.

[22] Zhao M Q,Wang B X,Li F X,et al. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA

PCR-DGGE technology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2007,73(6):1435-1440.

[23] Michele D G,Marianna P,Daniele S,et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology,2007,73(3):825-837.