

文章编号: 1009-038X(2004)04-0046-04

从乳化体系中分离纯化短杆菌产胆固醇氧化酶

王龙刚, 梁爽, 杨海麟, 汪建军, 王武
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘要: 添加剂 W 对酶的分离纯化造成很大困难, 用异丙醇沉淀发酵液的同时加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 能够有效地破除乳化体系, 去除添加剂 W, 酶收率达到 90%。在 pH 值为 8.0 的条件下用 Sepharose DEAE Fast Flow 离子交换透析酶液, 比酶活从 3.21 U/mg 提高到 29.21 U/mg, 酶收率达 70.1%。

关键词: 胆固醇氧化酶; 破乳化; 分离纯化

中图分类号: Q 814.1

文献标识码: A

Purification of a Cholesterol Oxidase from *Brevibacterium* sp. in Emulsified System

WANG Long-gang, LIANG Shuang, YANG Hai-lin, WANG Jian-jun, WANG Wu
(School of Biotechnology, Southern Yangtse University; Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036)

Abstract: Extraction of COD from the supernatant broth was difficult, because the addition of additive W emulsified with COD. The addition of 2-propanol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to supernatant broth could effectively break microemulsion and remove additive W, the recovery yield of COD activity could reach 90%. DEAE-Sepharose column was used to dialyze the enzyme in pH 8.0 buffer. Dialyzed enzyme specific activity was increased from 3.21U/mg to 29.21U/mg through DEAE-Sepharose, and recovery yield of activity reached 70.1%.

Key words: cholesterol oxidase; break microemulsion; purification

胆固醇氧化酶(COD, EC 1.1.3.6)是用量仅次于葡萄糖氧化酶的第二大检测用酶类^[1]。它不但能用于血浆中胆固醇的检测和甾醇类药物的转化生产^[2], 还可应用于水污染的控制, 追踪测定水体中的锌或其它重金属离子, 且方便有效^[3]。因此, 胆固醇氧化酶的开发利用有其重要的商业意义。

本课题的研究人员对胆固醇氧化酶的培养基进行了优化, 优化后的培养基中添加了表面活性剂和添加剂 W。但是添加剂 W 为非极性有机物分子,

在界面吸附层中与乳化剂分子发生作用, 形成如图 1 的复合物^[4], 使界面膜强度增高, 形成了相当稳定的乳化体系。由于酶和胆固醇的亲合作用, 所以 COD 和这乳状液滴相互结合。采用发酵离心后的清液盐析, 无法使酶蛋白与胆固醇和添加剂分离, 悬浮于清液表面。收集悬浮的酶蛋白用缓冲溶液溶解后离心得到的酶液为乳浊液, 无法通过 0.45 μm 的醋酸纤维膜, 达不到上离子交换柱的要求。

收稿日期 2003-10-27; 修回日期 2003-11-27。

作者简介: 王龙刚(1976-), 男, 陕西宝鸡人, 发酵工程硕士研究生。

万方数据

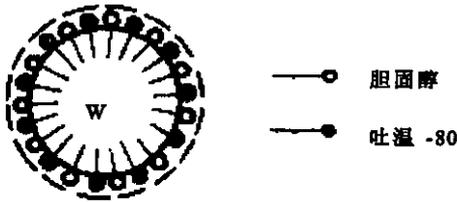


图1 培养基中乳状液滴假象图

Fig.1 Image of imulsified drop in the medium

作者利用异丙醇对含有表面活性剂和添加剂 W 的发酵液进行有机溶剂沉淀,有效地分离了酶蛋白和添加剂 W,达到上离子交换柱的要求;同时对 Sepharose-DEAE fast flow 的上柱条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *Brevibacterium sp.* 作者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基

1)种子培养基(g/dL):牛肉浸膏 0.3,蛋白胨 1,NaCl 0.5。

2)发酵培养基(g/dL):胆固醇 0.3,葡萄糖 2,酵母膏 0.75,NaCl 0.1,CH₃COONH₄0.4,K₂HPO₄0.02,MgSO₄0.005,FeSO₄0.001,CaCl₂0.01,添加剂 W 体积分数 0.3%,Tween-80 体积分数 0.3%。以上培养基 pH 值调至 7.5 左右,然后于 0.1 MPa 压力下灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 斜面培养基活化 48 h,菌种在 30 °C 220 r/min 振荡培养 14~16 h。发酵条件 500 mL 三角瓶装液量为 100 mL,接种量为体积分数 5%,温度 30 °C 220 r/min。

1.2.2 胆固醇氧化酶活力的测定 3 mL 溶液 A (4-氨基-安替比林 1 mmol/L,苯酚 6 mmol/L,叠氮钠 0.2 g/L,过氧化物酶 5 000 U/L,磷酸钾缓冲液 25 mmol/L,pH 7.5),150 μL 溶液 B(胆固醇:8.26 mg/mL;Triton X-100:体积分数 4.26%;异丙醇为溶剂)50 μL 酶液,37 °C,反应 5 min,沸水浴 3 min,于 500 nm 测吸光度。酶活(U/mL)=1.683 2 × A₅₀₀。

1.2.3 蛋白质质量浓度的测定 Bradford 检测法和紫外吸收法,以牛血清蛋白为标样,见参考文献[5]。

1.2.4 中空纤维膜微滤 选用膜面积为 0.025 m²、孔径为 0.45 μm 中空纤维微滤膜进行膜过滤,操作压力为 0.1 MPa。

1.2.5 丙酮沉淀 将丙酮预冷至 -20 °C 左右,在 0 °C 的条件下将丙酮以酶液一倍体积的量缓慢加入离心后的发酵上清液中,同时快速搅拌;离心分离沉淀,沉淀用 50 mmol/L,pH 7.5 的磷酸钾缓冲液溶解。

1.2.6 异丙醇沉淀 将异丙醇预冷至 -15 °C,以酶液 3 倍体积的量在搅拌的同时缓慢倒入离心后的酶液中,继续搅拌。向溶液中缓慢加入研磨过的 (NH₄)₂SO₄,边加边搅拌。将混合物离心(6 000 r/min,15 °C,10 min)。取出中间絮凝的酶蛋白,用 50 mmol/L,pH 7.5 的缓冲溶液溶解后测定酶活和酶蛋白质量浓度。

1.2.7 离子交换柱操作条件 分别用 pH 值 7.0,7.5,8.0 的 10 mmol/L 的 Tris 缓冲溶液平衡离子交换层析柱。用线性梯度的 Tris 缓冲液(NaCl 浓度为 0~2 mol/L 缓冲液 pH 值分别为 7.0,7.5,8.0)梯度洗脱。平衡和进样体积流量为 2 mL/min,洗脱体积流量为 3 mL/min,每管收集 6 mL,将活性部分收集。

2 结果与讨论

2.1 盐析

在 4 °C 下,将 (NH₄)₂SO₄ 粉末缓慢加入 10 000 r/min 离心后的发酵上清液中盐析,结果见表 1。

表1 不同(NH₄)₂SO₄饱和度的盐析收率

Tab.1 Recovery of precipitation with ammonium sulphate at different saturation

饱和度/ %	目的酶的 收率/%	饱和度/ %	目的酶的 收率/%
10	0	50	61
20	13	60	65
30	19	70	66
40	25	100	70

通过实验,在排除了发生不均匀沉淀的情况下,发现酶活性弥漫在不同的 (NH₄)₂SO₄ 饱和度范围内而不是集中于某一个分立的沉淀点,所以不适合用硫酸铵分级盐析,盐析选择 (NH₄)₂SO₄ 饱和度为 70%。

2.2 膜过滤

将盐析后的酶液按 1.2.4 的方法过滤,分别测定滤出的清液和截留酶液中的酶活,结果见表 2。

0.45 μm 醋酸纤维膜的截留相对分子质量在 100 000 以上,因此游离的单分子胆固醇氧化酶(相对分子质量 55 000)是不会被截留的。实验中由于

发酵液中有残留的胆固醇和亲油性物质——添加剂 W 及水溶性表面活性剂 Tween-80, 形成了较稳定的水包油型乳浊液。另外由于胆固醇氧化酶和胆固醇的亲合作用, 酶和乳状液滴结合, 形成了较大粒径的液滴, 因此被 $0.45 \mu\text{m}$ 醋酸纤维膜部分截留。从图 2 可以看出, 被截留的胆固醇越多酶蛋白损失也越多, 说明微滤中酶活的损失和胆固醇的损失有一定的偶联关系(见图 2), 这可以用酶和附在乳状液滴上的胆固醇结合的假设解释。

表 2 中空纤维膜微滤操作结果

Tab. 2 Result of microfiltration through hollow fiber membrane

中空纤维膜孔径/ μm	体积流量/ mL/min	滤过清液酶活/ U/L	截留酶液酶活/ U/L	收率/%	浓缩倍数
0.45	10	310	3 534	35	10

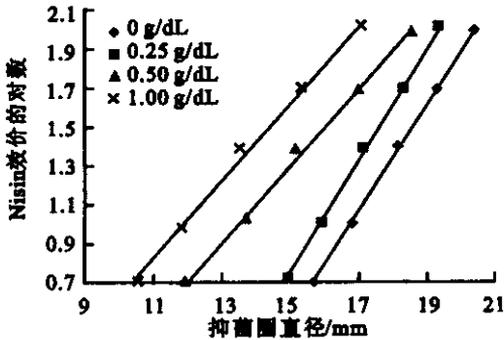


图 2 胆固醇减少量与酶活的损失关系

Fig. 2 Relationship between cholesterol decrease and lost enzyme

2.3 乳化体系的破除

破乳化的目的是为了能够进一步分离纯化。添加剂 W 和 Tween-80 形成的乳化体系无法通过 $0.45 \mu\text{m}$ 的微滤膜主要是因为添加剂 W 是一种非极性有机物大分子, 为了达到上离子交换柱的要求, 必需将 W 与酶蛋白分离。W 不溶于水但易溶于有机溶剂, 而酶蛋白正好相反, 因此采用有机溶剂沉淀的方法来分离胆固醇和酶蛋白的亲合吸附。

2.3.1 丙酮沉淀 按 1.2.5 的方法用丙酮沉淀发酵上清液, 结果见表 3。

表 3 丙酮沉淀收率表

Tab. 3 Recovery of COD from precipitation with acetone

原酶液总酶活/ U	丙酮清液中酶活/ U	缓冲溶液中酶活/ U	收率/%
280	53.5	64.1	22.9

丙酮沉淀后的酶液可以顺利通过微滤膜, 由此可见在离心和有机溶剂的共同作用下, 用丙酮沉淀

胆固醇氧化酶乳化体系可被破除, 但收率比较低。

2.3.2 异丙醇沉淀 在异丙醇和水的混合溶液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不但可以使异丙醇和水分相, 还可以减少异丙醇的用量, 这可能是因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在破坏了双电层。在该体系中可以明显的看到乳黄色的添加剂 W 溶解在上相, 而酶蛋白形成稳定的絮凝物在两相之间。

由于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对于乳化体系的消除和酶蛋白的收集很重要, 因此按 1.2.6 的方法用异丙醇处理酶液, 收率结果见图 3。从图中可以看出, 在有机溶剂和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的共同作用下酶的收率明显提高。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度为 70% 时收率达到 90%。所得酶溶液可顺利通过 $0.45 \mu\text{m}$ 醋酸纤维膜, 过膜后酶活无损失。这说明脂溶性添加剂 W 已经去除, 用该方法既保证了收率又破除了乳化体系。

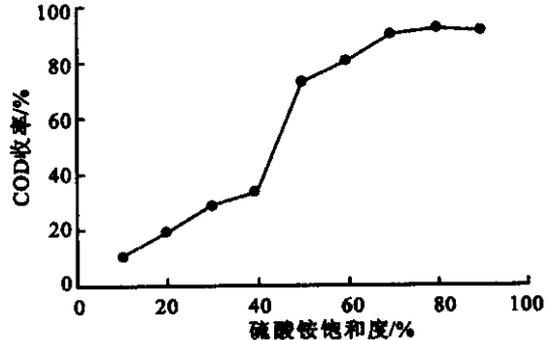


图 3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度对收率的影响

Fig. 3 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation on recovery of COD

2.4 离子交换柱条件的优化

破乳化后的透析酶液按 1.2.7 的方法上离子交换柱, 结果见图 4~6 及其表 4。

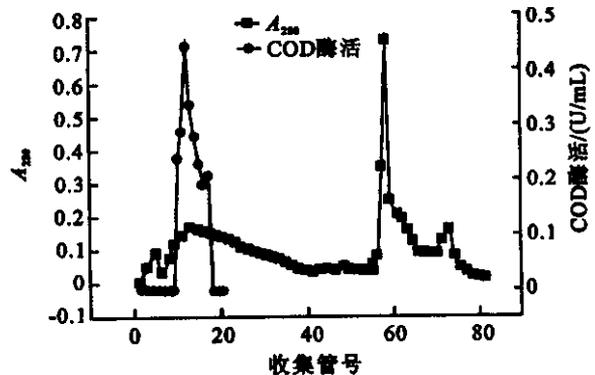


图 4 pH 7.0 条件下离子交换层析图

Fig. 4 Ion-exchange chromatography with pH 7.0

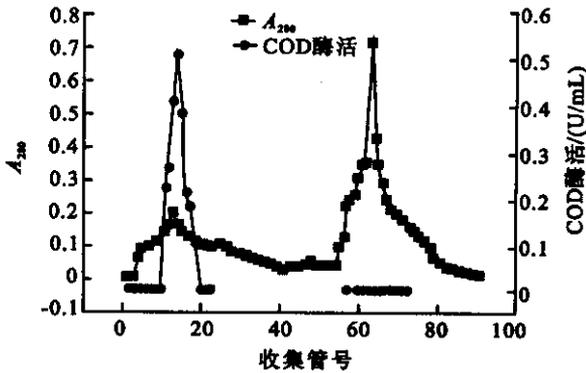


图5 pH 值为 7.5 条件下离子交换层析图

Fig. 5 Ion-exchange chromatography with pH 7.5

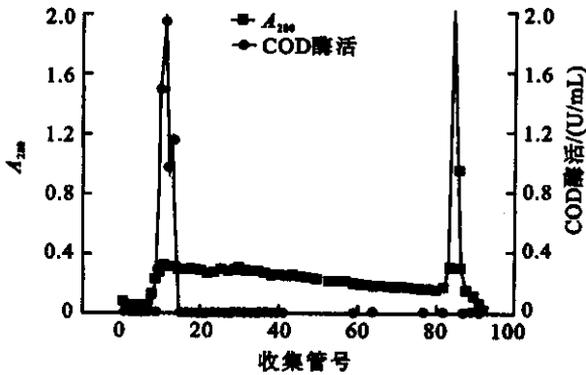


图6 pH 值为 8.0 条件下离子交换层析图

Fig. 6 Ion-exchange chromatography with pH 8.0

表4 不同 pH 值条件下离子交换层析的结果比较

Tab. 4 Result of Ion-exchange chromatography with different pH

离子交换 (pH 值)	透析酶液 总酶活/ U	透析酶液 比酶活/ U/mg	离子交换 总酶活/ U	离子交换 比酶活/ (U/mg)	酶活 得率/ %
7.0	26.42	3.09	12.01	28.2	45.4
7.5	35.18	3.15	18.54	27.72	52.7
8.0	68.8	3.21	48.23	29.21	70.1

从以上的离子交换层析图及表4可以看出,峰型相似,胆固醇氧化酶在最初就被洗脱下来,也就是说,短杆菌产生的胆固醇氧化酶在 DEAE 阴离子交换柱上不能吸附.选择 pH 值为 8.0 的条件下离子交换,酶活得率和纯化效果都较好.

3 结 论

1) 在发酵上清液中加入 3 倍体积的异丙醇和饱和度为 70% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,既能有效地破除乳化体系,去除脂溶性添加剂 W,又保证了酶蛋白的收率.

2) 用 DEAE 阴离子交换柱在 pH 值为 8.0 的条件下纯化酶蛋白,比酶活为 29.21 U/mg,收率达 70.1%.

3) 提取过程中需要大量的异丙醇,如能将异丙醇重复使用或回收则可以降低纯化成本.

参考文献:

- [1] Laura Motteran, Mirella S Piloni. Cholesterol oxidase from *brevibacterium sterolicum* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18024 - 18030.
- [2] 杨春生, 宋乃国. 临床检验学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1998.
- [3] Anon. Cholesterol oxidase and pollution [J], *Biofutur*, 1994, 138: 11.
- [4] 吕陈峰. 胆固醇氧化酶发酵小试及其转化应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2002.
- [5] D. R. 马歇克. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.

(责任编辑 杨 萌)