

文章编号: 1673-1689(2007)01-0116-04

中压液相色谱快速分离纯化 *Kluyveromyces fragilis* β -D-半乳糖苷酶

刘建福¹, 李素芬², 陈占洲², 陈庆森¹, 王璋³

(1. 天津商学院 天津食品生物技术重点实验室, 天津 300134; 2. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056001; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:应用 AKTA explorer 100 型中压液相色谱快速纯化工艺, 系统分离纯化了脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*) β -D-半乳糖苷酶。 *K. fragilis* 发酵生产的菌体细胞经过破碎、离心后的上清液中含有 *K. fragilis* β -D-半乳糖苷酶。粗酶经过 AKTA explorer 100 中压液相色谱的 Hiper^R 16/10 Source 30Q 强阴离子交换柱和 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱连续两步纯化, 酶的回收率为 27%, 纯化倍数为 42。纯化的 *K. fragilis* β -D-半乳糖苷酶在垂直板十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上, 呈现一条染色带, 表明纯化的酶具有较高的纯度。 *K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶相对分子质量约为 60 000。

关键词: 中压液相色谱; 脆壁克鲁维酵母 β -D-半乳糖苷酶; 分离纯化

中图分类号: O 657.72

文献标识码: A

Purification of *Kluyveromyces fragilis* β -Galactosidase by Medium-Pressure Liquid Chromatography

LIU Jian-fu¹, LI Su-fen², CHEN Zhan-zhou², CHEN Qing-sen¹, WANG Zhang³

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. School of Agriculture, Hebei Engineering University, Handan 056001, China; 3. Food science & Technology school, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The β -D-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* was purified by medium-pressure liquid chromatography. The enzyme was purified about 42 fold with a yield of 27% total activity by successive Hiper^R 16/10 Source30Q and Hioad26/60 Superdex medium-pressure liquid chromatography. When the purified enzyme samples were subjected to sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), single bands were observed for the enzyme samples, this suggested that the enzyme samples were almost pure. The molecular weight estimated for *K. fragilis* LFS-8611 β -D-galactosidase by sodium SDS-PAGE was 60 000.

Key words: medium-pressure liquid chromatography; *Kluyveromyces fragilis*; β -D-galactosidase; purification

β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23) 属于水解酶, 催化 β -D-半乳糖苷类化合物水解, 该酶还具有转苷

收稿日期: 2006-01-16.

作者简介: 刘建福 (1967-) 男, 河北唐山人, 工学博士, 讲师. 主要从事食品生物技术研究. Email: jianfuliu@yahoo.com.cn

活力,以乳糖为底物催化半乳糖基转移反应生成低聚半乳糖^[1]。低聚半乳糖是一种非消化性低聚糖,能够选择性地促进人体肠道内双歧杆菌等有益菌增殖,从而抑制肠道腐败菌生长繁殖和有害代谢产物的产生^[2]。目前低聚半乳糖被公认为是能够增进人体健康的益生菌(Prebiotic),其在保健食品、婴儿食品、中老年食品等领域应用前景广阔^[3]。

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)菌株产生的 β -D-半乳糖苷酶具有较高的转苷活力,具有工业化应用潜力,但长期以来对该酶的酶学性质缺乏了解^[4]。因此有必要对*K. fragilis* β -D-半乳糖苷酶进行纯化,以研究该酶的分子结构、酶学性质和酶反应的动力学参数,为提高酶反应的催化效率提供理论依据。中压液相层析色谱具有省时(柱平衡时间短,洗脱速度快)、样品需要量少、分辨率高等特点,可广泛应用于蛋白质纯化。作者研究的主要目的是,应用AKTA explorer 100中压液相色谱纯化 β -D-半乳糖苷酶。

1 材料与方法

1.1 菌种

脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*),作者所在实验室保藏,编号LFS-8611。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 仪器设备 GUJZ25L在位不锈钢搅拌发酵罐:镇江东方生物工程设备技术公司产品;FRENCH FA-078型高压细胞破碎仪:Thermo Spectronic USA公司产品;AKTA explorer 100型中压液相快速纯化工艺开拓系统,Bio-Rad电泳仪:瑞典安玛西亚公司产品;超滤杯:上海亚东核级树脂有限公司产品。

1.2.2 主要试剂 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)(BR):上海丽珠东风生物技术有限公司产品;N',N'-四甲基乙二胺(TEMED):Fluka公司产品;丙烯酰胺:Merck公司产品;甲叉双丙烯酰胺:Merck公司产品;巯基乙醇:Fluka公司产品;溴酚兰:Merck公司产品;考马斯亮蓝R-250:上海化学试剂公司进口分装产品;标准相对分子质量蛋白质:Pharmacia公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 *K. fragilis* β -D-半乳糖苷酶的发酵生产 25 L的发酵罐生产 β -D-半乳糖苷酶。培养基组成:蛋白胨F403 1 g/dL,酵母膏1 g/dL,乳糖12 g/dL;培养基的起始pH值7.5。培养条件:温度25℃,转速200 r/min,培养时间36 h。

1.3.2 粗酶液的制备 发酵液经离心(2~10℃,

3 000 r/min,10 min)后收集菌体,用pH 7.0的0.01 mol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液将菌体制成菌悬液,然后用高压细胞破碎仪破碎菌体细胞,以释放胞内 β -D-半乳糖苷酶。冷冻离心后,收集的上清液即为粗酶液。

1.3.3 酶活力的测定 向试管中加入2.5 mL pH 7.0的0.01 mol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液,45℃恒温水浴预热后,加入100 μ L 4 mg/mL邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)溶液和100 μ L酶液,45℃恒温反应5 min后,于 $A_{420\text{ nm}}$ 比色。1 mL酶液1 min催化邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)水解生成1 μ mol邻硝基酚定义为一个酶活力单位^[5]。

1.3.4 样品蛋白质质量分数的测定 取2 mL样品溶液加2 mL Bradford溶液,混匀后于 $A_{595\text{ nm}}$ 测定吸光值,根据标准曲线的回归方程推算样品中蛋白质的质量分数^[6]。

1.3.5 中压液相色谱分离纯化*K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶 应用AKTA explorer 100型中压液相色谱快速纯化工艺系统分离纯化*K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷酶时,预先用pH 7.0的0.01 mol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液平衡阴离子交换柱Hiprep^R 16/10 Source 30Q,上2 mL经高压细胞破碎仪制备的粗酶液,用相同的缓冲液洗脱50 mL后,改用0~0.5 mol/L的NaCl线性梯度洗脱。以邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)为底物测定收集液的酶活力,合并具有酶活力的洗脱液,适当浓缩后上预先经pH 7.0的0.01 mol/L磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液平衡的Hioad26/60 Superdex凝胶过滤色谱柱,然后进行层析。

1.3.6 AkTA explorer100快速工艺开发系统 图1所示为AkTA explorer100型快速工艺开发系统。该系统的主要特点为缓冲液自动制备和Scouting功能,方便快速摸索纯化工艺,选好层析柱后相应参数通过精确自动反馈编成程序,真正自动多维纯化。

1.3.7 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 贮液及凝胶溶液的配制、样品的制备和电泳操作步骤参照文献[7]。电泳条件:分离胶和浓缩胶的质量浓度分别为12 g/dL和5 g/dL,样品及标准相对分子质量蛋白质的上样量均为10 μ L,电泳过程恒流10 mA,电泳时间4 h左右。从玻璃板剥离的凝胶用20 g/dL的三氯乙酸溶液固定30 min后,用质量分数0.1%的考马斯亮蓝溶液R-250染色2 h,脱色后拍照。

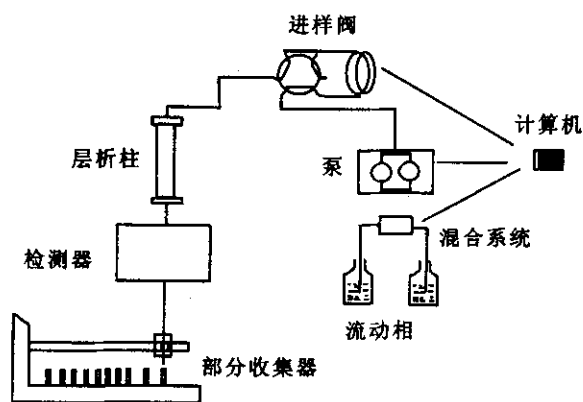


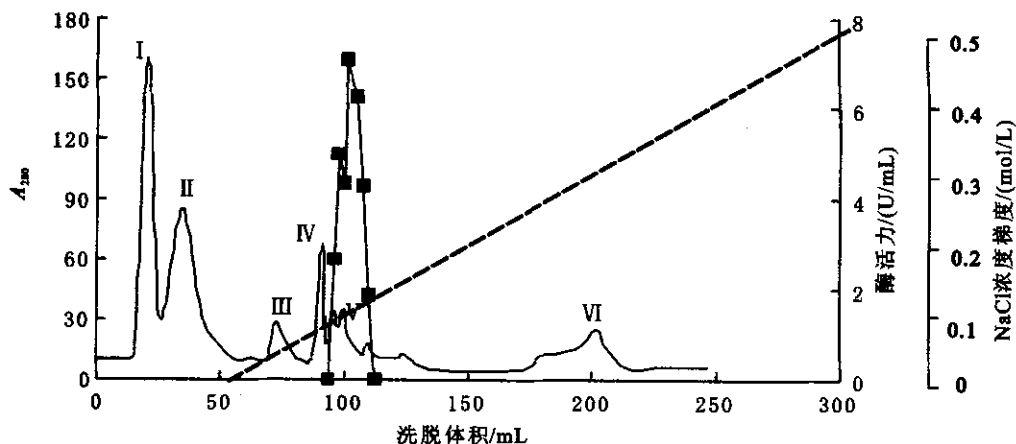
图1 AKTAexplorer100 快速工艺开发系统

Fig.1 Diagram for AkTA explorer100

2 结果与讨论

2.1 强阴离子交换色谱

强阴离子交换剂 Hiprep^R 16/10 SourceTM 30Q

图2 *K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷粗酶在中压液相层析系统 (Q30 强阴离子交换柱) 的分离图谱Fig.2 Hiprep^R 16/10 SourceTM 30Q column chromatogram of the crude enzyme by AKTA explorer 100 quick purification system

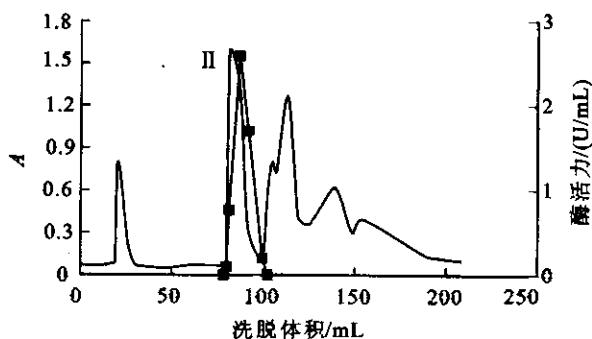
Hiprep^R16/10 SourceTM30Q 为预装柱,柱填料为强阴离子交换剂,该离子交换剂具有耐压性好、交换容量高、流速快等特点,经 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液平衡后带正电荷,从而与 pH 7.0 时带负电荷的 β -D-半乳糖苷酶(该酶的等电点约为 6.0)发生吸附作用。

2.2 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱

将上步收集的洗脱液经浓缩后上预先经 pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液平衡的 Hioad26/60 Superdex 凝胶柱,用相同的缓冲液洗脱,分离效果见图 3。色谱条件:色谱柱: ϕ 2.6 cm $\times$ 60 cm,填充材料为凝胶 Hioad26/60 Superdex;洗脱缓冲液 0.01 mol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH 7.0;洗脱液体积流量:2.5 mL/min;工作压力:0.18 MPa 样品:经 Hiprep^R 16/10 SourceTM30Q 部分纯

分离 *Kluyveromyces fragilis* β -D-半乳糖苷酶的洗脱曲线如图 2 所示。色谱条件:色谱柱: ϕ 1.6 $\times$ 10 cm,填充材料为阴离子交换剂 Hiprep^R16/10 SourceTM30Q;洗脱缓冲液 0.01 mol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾, pH 7.0;洗脱液体积流量 2.5 mL/min;工作压力 0.18 MPa;NaCl 的线性梯度 0~0.5 mol/L;样品:经高压细胞破碎仪制备的粗酶;上样量 2 mL。由图 2 可以看出 *K. fragilis* LFS-8611 β -D-半乳糖苷粗酶液经过强阴离子 Hiprep^R 16/10 SourceTM 30Q 柱后分成 6 个主要组分,其中组分 I 与 II 在改用 NaCl 线性梯度洗脱之前出峰,说明这两个组分与 Hiprep^R 16/10 SourceTM 30Q 不发生吸附。改用 NaCl 线性梯度洗脱后随着缓冲液中离子强度的增加,其它杂蛋白与 β -D-半乳糖苷酶依次被洗脱下来。通过 β -D-半乳糖苷粗酶的洗脱峰与杂蛋白洗脱峰分离较好,但仍有部分重叠。

化后的粗酶;上样量 2 mL。

图3 经 Hiprep^R 16/10 SourceTM30Q 部分纯化后的酶在 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤中压层析系统的分离图谱Fig.3 Hioad26/60 Superdex column chromatogram of the "Hiprep 16/10 SourceTM30Q" by AKTA explorer 100 quick purification system

由图 3 可以看出 ,经过 Hiprep[®] 16/10 Source[™] 30Q 离子交换色谱纯化步骤的酶液中仍含有较多的杂蛋白。该酶液经过 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱分成 5 个主要组分 ,其中组分 II 为酶活峰。β-D-半乳糖苷酶洗脱峰与杂蛋白的洗脱峰分离得较好。合并具有活性的收集液 ,浓缩后用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 β-D-半乳糖苷酶的纯度。

2.3 酶纯化步骤的定量评价

表 1 总结了采用中压液相色谱系统纯化 *K. fragilis* LFS-8611β-D-半乳糖苷酶的试验结果。由表 1 的试验结果可以看出 ,粗酶经过 AKTA explorer 100 型中压液相色谱纯化系统的 30Q 强阴离子交换柱和 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱两步纯化 ,β-D-半乳糖苷粗酶的纯化倍数为 42 倍 ,回收率为 27%。整个纯化过程中原来存在于粗酶中的酶活力损失了 73% ,但纯酶液中剩下的酶蛋白是原来的 0. 6% ,因此酶得到了纯化。

表 1 *K. fragilis* LFS-8611β-D-半乳糖苷酶的中压液相色谱酶纯化小结

Tab. 1 Summary of <i>K. fragilis</i> LFS-8611 β-D-galactosidase purification by medium pressure chromatogram					
纯化步骤	总酶活力/U	蛋白质质量/mg	比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶	335	166. 65	2. 01	100	1. 0
阴离子交换	134	3. 72	36	40	18
凝胶过滤	90	1. 06	84. 50	27	42

2.4 β-D-半乳糖苷酶纯度检测及相对分子质量的测定

经过中压液相色谱纯化后的 β-D-半乳糖苷酶在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-参考文献(References) :

PAGE)上显示为一条单带。表明纯化后的酶基本达到了电泳纯。

图 4 为标准蛋白质的相对分子质量的对数值与相对迁移率关系曲线。由于不同相对分子质量的蛋白质在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳时 ,蛋白质的相对分子质量的对数值与电泳相对迁移率之间呈线性关系^[8] 根据 *K. fragilis* LFS-8611β-D-半乳糖苷酶的相对迁移率为 0. 55 ,从直线回归方程推算出该酶的相对分子质量约为 60 000。

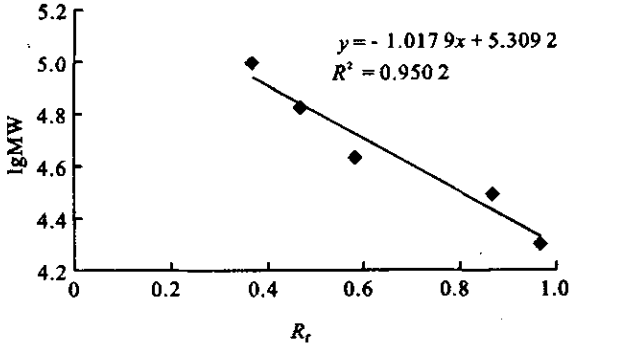


图 4 PAGE 中标准蛋白质相对分子质量与相对迁移率(R_f)的关系

Fig. 4 Relationship between molecular weight and R_f of Native-PAGE

3 结 论

K. fragilis β-D-半乳糖苷酶的粗酶液经过中压液相色谱 30Q 强阴离子交换柱和 Hioad26/60 Superdex 凝胶过滤色谱连续两步纯化 ,酶的回收率为 27% ,纯化倍数为 42。纯化的 *K. fragilis* LFS-8611β-D-半乳糖苷酶在垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)上呈现一条染色谱带 ,该酶的相对分子质量约为 60 000。

[1] Ken-ichi Iwasaki , M Nakajima , S Nakao. Glacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using be-ta-galactosidase[J]. **Process Biochemistry** ,1995 31 69 – 75.

[2] Becerra M E , Cerdan M I , Gonzalez Siso. Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase purification [J]. **Biol Procecd Online** , 1998 (1) 48 – 58.

[3] Shaikh S A. Characterization of a thermostable extracellular beta-galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor sp*[J]. **Bio-chimica Biophysica Acta** , 1999 18 314 – 322.

[4] 刘建福. 脆壁克鲁维酵母(*kluyveromyces fragilis* LFS-8611)β-D-半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖[D]. 无锡 :江南大学 , 2003.

[5] Gunduz Ufuk. Rejaee Ressa Purification and characterization of beta-galactosidase from the *Streptococcus thermophilis* strain RSKK667[J]. **Journal of Biology** , 1997 21 109 – 123.

[6] Petzellbauer I , Nidetzky B. Development an Ultra-High-Tempertature process for the enzymatic hydrolysis of lactose[J]. **Biotech-nology and Bioengineering** , 1999 , 64 322 – 332.

[7] 张龙翔 , 张庭芳 , 李会媛. 生化实验方法和技术(第二版) [M]. 北京 : 高等教育出版社 , 1997.

[8] 赵永芳. 生物数据技术原理及其应用(第二版) [M]. 武汉 : 武汉大学出版社 , 2001. (责任编辑 朱 明)