

文章编号:1673-1689(2007)04-0083-05

酵母蔗糖酶的提取方法

李楠, 庄苏星, 丁益

(南京大学 生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 采用甲苯自溶法、冻融法、SDS 抽提法 3 种方法从酵母中提取蔗糖酶, 经质量分数 50% 的乙醇分级沉淀、Mono Q 阴离子交换柱层析纯化后, 制得高纯度的酵母蔗糖酶。比较了上述 3 种提取方法并对该酶的部分性质进行了研究。纯化的酶经等电聚焦测定, 等电点为 5.6, SDS-PAGE 鉴定其相对分子质量为 60 kD。以蔗糖为底物测得酵母蔗糖酶的表现米氏常数 K_m 为 0.013 mol/L。结果显示 3 种提取方法各有优劣, 冻融法和 SDS 抽提法的提取效率远高于传统的甲苯自溶法。其中 SDS 抽提法的效率最高, 加之其操作简便, 更适合于酵母蔗糖酶大规模的制备提取。

关键词: 酵母; 蔗糖酶; 提取; 纯化

中图分类号: Q 556.2; TS 201.25

文献标识码: A

Study on Purification of Invertase from Yeast

LI Nan, ZHUANG Su-xing, DING Yi

(School of Life Sciences, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: This paper used three methods to extract invertase from yeast, which included in this manuscript, three different extraction method breaking cells by adding methylbenzene, frost grinding, and adding SDS for extracting invertase from yeast were investigated. Then the purified invertase was obtained by precipitation with 50% ethyl alcohol and Mono Q chromatography. The molecular weight of the enzyme was 60kD by SDS-PAGE, and the pI was 5.6 by isoelectric focusing. The invertase followed typical Michaelis-Menten Kinetics with apparent K_m of 0.013 mol/L. The results showed all three methods had both advantages and disadvantages. The invertase extracted by adding SDS and frost grinding had much more total activity than that of extracted by adding methylbenzene. A highest total invertase activity was found in the SDS extraction process, and it was a convenient and economical method for commercial production of invertase from yeast.

Key words: yeast; invertase; extraction; purification

蔗糖酶 (Sucrase, EC 3.2.1.26) 又称转化酶 (Invertase)。可作用于 β -1,2 糖苷键, 将蔗糖水解为 D-葡萄糖和 D-果糖。由于果糖甜度高, 约为蔗

糖的 1.36~1.60 倍, 在工业上具有较高的经济价值^[1]。可用以转化蔗糖, 增加甜味, 制造人造蜂蜜, 防止高浓度糖浆中的蔗糖析出, 制造含果糖和巧克

收稿日期: 2006-10-16.

作者简介: 李楠 (1982-), 女, 山西太原人, 生物化学与分子生物学硕士研究生。

通讯作者: 丁益 (1954-), 男, 江苏南京人, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学的研究。Email: yding@nju.edu.cn

力的软心糖,还可为果葡糖浆的工业化生产提供新的方法^[2]。

目前关于酵母中蔗糖酶提取纯化方面的研究较多^[1-8],以甲苯自溶法最为常见。作者采用甲苯自溶法、冻融法、SDS抽提法3种不同的方法从酵母中提取蔗糖酶,将冻融法和SDS法提取的蔗糖酶进一步纯化,并对其基本性质进行了研究。通过不同提取方法的比较,为酵母蔗糖酶在食品工业中的应用和蔗糖酶基因工程产品的下游技术开发,提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母,安琪酵母股份有限公司提供;MonoQ(10/10)阴离子交换层析柱、Phast Gel IEF 3-9 胶,Amersham 公司提供。

1.2 主要化学试剂和仪器

十二烷基硫酸钠(SDS),Serva 公司提供;等电点标准品,Amersham 公司提供;其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

UV-2201 型紫外可见分光光度计,Shimadzu 公司制造;Waters 650 型高级蛋白纯化系统,Waters 公司制造;Phast System 全自动快速水平电泳仪,Amersham 公司制造;高速冷冻离心机,Hitachi 公司制造;冷冻干燥器,Labconco 公司制造;电泳仪,Bio-Rad 公司制造;精密酸度计,Orion 公司制造。

1.3 酶活性测定

详见文献[9]。适当稀释的酶液 0.5 mL,加入 0.3 mL pH 4.6、0.1 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液,0.2 mL 0.1 mol/L 的蔗糖,37 °C 准确反应 15 min,后加 0.125 mL 1 mol/L 的 NaOH 中止反应。用 DNS 法^[10]在 540 nm 波长下测定形成的还原糖量。在测定条件下以每分钟内能水解蔗糖成还原糖,经 DNS 测定光吸收读数为 1 mA 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[11]。

1.4 蛋白质含量的测定

按 Lowry 氏法^[10]测定蛋白质的浓度,以牛血清白蛋白为标准,绘制标准曲线。

1.5 SDS-PAGE

具体步骤参照文献[12],分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 5%。

1.6 等电聚焦

用 Phast System 全自动快速水平电泳仪进行等电聚焦电泳。电泳程序的设置参照 Amersham 公司使用手册。

1.7 粗酶制备

1.7.1 甲苯自溶法 称取酵母 10 g,加入 20 mL 双蒸水使其溶解,加入 2.4 g NaAc 和 4.5 mL 甲苯,摇床振荡 10 min,37 °C 恒温水浴 69 h。再加入 4.8 mL 4 mol/L 的 HAc 和 15 mL 双蒸水,调 pH 至 4.5,于 4 °C、3 000 r/min 离心 30 min,离心后将中层清液移出即为粗制酶液,4 °C 保存。

1.7.2 冻融法 称取酵母 10 g,加入 20 mL 双蒸水,置于预先冷却的研钵中,研磨 25 min,冰箱中冷冻约 15 min(以研磨内液面上刚出现冻结为宜),取出再研磨 25 min,重复以上步骤两次。后置于冰箱中冷冻 3 h 取出,温浴融化,用 1 mol/L 的 HAc 调 pH 至 5.0,40 °C 水浴 30 min,冷却后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液即为粗制酶液,4 °C 保存。

1.7.3 SDS 抽提法 称取酵母 10 g,加入 60 mL 0.3 mmol/L 的 SDS 溶解,40 °C 水浴 12 h 后取出,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液即为粗制酶液,4 °C 保存。

1.8 乙醇分级纯化

在冻融法和 SDS 抽提法提取的粗制酶液中加入乙醇使其质量分数达 30%,4 °C 放置过夜,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,再追加乙醇使其终质量分数达 50%。4 °C 放置 1 h,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀用双蒸水溶解,4 °C 保存。

经 SDS 抽提法提取,质量分数 50% 的乙醇沉淀所得的酶液对透析液(pH 7.3、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液)充分透析,所得透析液 4 °C 保存。

详见文献[13]。

1.9 MonoQ 阴离子交换柱层析

冻融法和 SDS 抽提法提取的酵母蔗糖酶经上步纯化后,上 MonoQ(10/10)阴离子交换柱(用 pH 7.3、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液充分平衡过),然后用 0~1 mol/L、60 min 线性梯度的 NaCl 溶液(内含 pH 7.3、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液)洗脱。体积流量为 0.5 mL/min,每管收集 3 mL,紫外检测波长为 280 nm。测定各管洗脱液的蔗糖酶活性与蛋白质含量,合并蔗糖酶活力高的若干管洗脱液,经过对水透析脱盐,冷冻干燥后即为纯化的酵母蔗糖酶。

2 结果

2.1 提取方法对酵母蔗糖酶活性的影响

采用 3 种方法从酵母中提取蔗糖酶,其活性比

较结果见表 1。从表中可看出,SDS 抽提法的酶活性最高,冻融法次之,常规的甲苯自溶法酶活性最低。

表 1 3 种提取方法所得酵母蔗糖酶活性比较
Tab.1 Comparing the total activities of invertase from yeast with three different extraction methods

提取方法	总活力/U
甲苯自溶法	28.5×10^3
冻融法	$15\,221\times10^3$
SDS 抽提法	$31\,906\times10^3$

2.2 不同 SDS 浓度提取酵母蔗糖酶效果的比较

从表 2 可以看出,分别用浓度为 0.3 mmol/L、0.9 mmol/L、1.5 mmol/L 和 30 mmol/L 的 SDS 提取酵母中的蔗糖酶,当加入 0.3 mmol/L SDS 时,该酶的总活力最大,蛋白量最少,抽提效率最高。

表 2 不同 SDS 浓度提取酵母蔗糖酶的比较
Tab.2 Comparing the extraction efficiency of invertase at different SDS concentration

SDS 浓度/ (mmol/L)	总蛋白量/ mg	总活 力/U	比活力/ (U/mg)
0.3	1 680	$14\,496\times10^3$	8 629
0.9	1 788	$15\,442\times10^3$	8 636
1.5	2 318	$14\,238\times10^3$	6 142
30	6 110	$17\,610\times10^3$	2 882

2.3 冻融法和 SDS 抽提法提取出的酵母蔗糖酶的进一步纯化

将冻融法和 SDS 抽提法提取出的蔗糖酶活性高的粗制酶液经质量分数 50% 的乙醇沉淀,溶解透析后,过 MonoQ 阴离子交换柱,结果均出现两个峰(见图 1、图 2)。依洗脱出现的先后顺序分别称为峰 I 和峰 II。经酶活性检测和蛋白质含量测定,表明只有峰 I 具有蔗糖酶活性,而且蔗糖酶活性和酶液的蛋白质含量成正比,为蔗糖酶活性峰。收集 MonoQ 阴离子交换柱层析后具有较高蔗糖酶活性的峰 I 的各管洗脱液,冷冻干燥浓缩,得到纯化的酵母蔗糖酶。

冻融法与 SDS 抽提法分别提取纯化出的酵母蔗糖酶的比较结果如表 3 所示。SDS 抽提法提取的蔗糖酶具有较高的酶活性,经质量分数 50% 的乙醇沉淀后回收率为 86.5%。

经过 MonoQ 阴离子交换柱层析后,冻融法和 SDS 抽提法所得蔗糖酶的纯化倍数分别是相应粗酶液的 273 倍和 150 倍,具体结果见表 4。

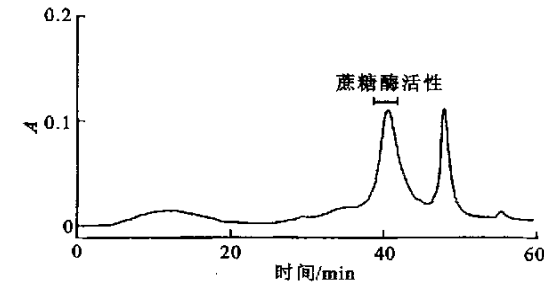


图 1 MonoQ 阴离子交换柱层析对冻融法提取的酵母蔗糖酶的纯化

Fig.1 MonoQ chromatography of invertase extracted by frost grinding

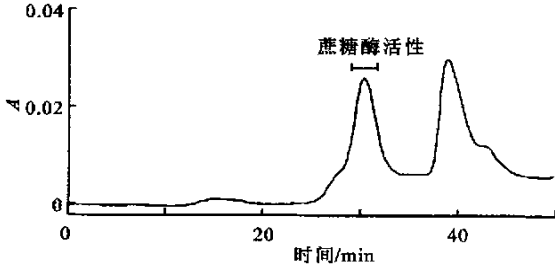


图 2 MonoQ 阴离子交换柱层析对 SDS 抽提法提取的酵母蔗糖酶的纯化

Fig.2 MonoQ chromatography of invertase isolated by SDS extraction method

表 3 冻融法和 SDS 抽提法提取纯化的酵母蔗糖酶的比较
Tab.3 A summary of purification of invertase isolated by frost grinding and SDS extraction method

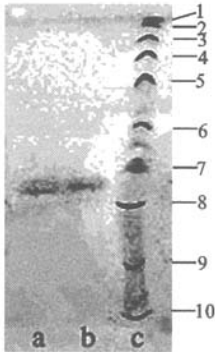
比较 项目	冻融法		SDS 抽提法	
	粗酶液	乙醇沉淀	粗酶液	乙醇沉淀
总蛋白量/ mg	1 100	163.5	3 220	2 574
总活力/ U	$15\,221\times10^3$	$6\,576\times10^3$	$31\,906\times10^3$	$27\,600\times10^3$
比活力/ (U/mg)	13 837	40 220	9 909	10 722
纯化倍数	1	2.9	1	1.1
回收率/%	100	43.2	100	86.5

表 4 MonoQ 阴离子交换柱层析对冻融法和 SDS 抽提法提取的酵母蔗糖酶的纯化结果

Tab.4 Purification results of MonoQ chromatography of invertase extracted by frost grinding and SDS extractoin method

提取 方法	总蛋白 量/mg	总活力/ U	比活力/ (U/mg)	纯化 倍数
冻融法	0.105	396 900	3 780 000	273
SDS 抽提法	0.246	365 040	1 483 902	150

纯化的酵母蔗糖酶经等电聚焦分析(见图 3),显示为单一条带,由此证明纯化的酵母蔗糖酶是均一的。



a:冻融法提取的酵母蔗糖酶;b:SDS 抽提法提取的酵母蔗糖酶;c:等电点标准品,由上至下分别为:1. 碱性小扁豆凝集素(pH 8.65);2. 中性小扁豆凝集素(pH 8.45);3. 酸性小扁豆凝集素(pH 8.15);4. 碱性肌红蛋白(pH 7.35);5. 酸性肌红蛋白(pH 6.85);6. 人碳酸酐酶 B(pH 6.55);7. 牛碳酸酐酶 B(pH 5.85);8. β -乳球蛋白 A(pH 5.2);9. 大豆胰蛋白酶抑制剂(pH 4.55);10. 淀粉葡萄糖苷酶(pH 3.5)。

图 3 酵母蔗糖酶的等电点测定

Fig. 3 Isoelectric point determination of invertase from yeast on PhastGel (pH3-9)

2.4 米氏常数 K_m 的测定

用 5~20 mmol/L 的蔗糖在 pH 4.6、37℃条件下与蔗糖酶作用 15 min。用双倒数作图法测得酵母蔗糖酶的表观 K_m 值为 0.013 mol/L(见图 4)。

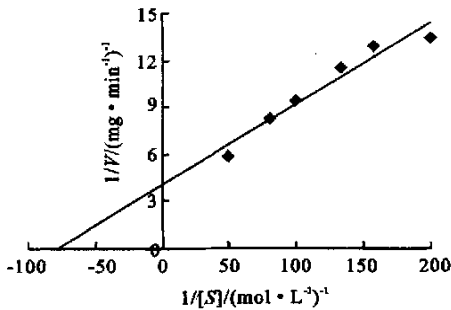


图 4 酵母蔗糖酶的 Lineweaver-Burk

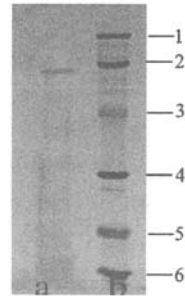
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of the invertase

2.5 酵母蔗糖酶等电点和相对分子质量测定

经等电聚焦测得酵母蔗糖酶的等电点为 5.6(见图 3),SDS-PAGE 测得其相对分子质量为 60 kD(见图 5)。

3 讨论

酵母蔗糖酶的提取较常使用甲苯自溶法的,冻融法和 SDS 抽提法报道较少。本实验中比较了上述 3 种酵母蔗糖酶的提取方法(见表 1),可以看出



a. SDS 抽提法提取的酵母蔗糖酶;b:低相对分子质量蛋白质标准,由上至下分别为:1. 兔磷酸化酶-B(97 400);2. 牛血清白蛋白(67 000);3. 兔肌动蛋白(43 000);4. 牛碳酸酐酶(31 000);5. 胰蛋白酶抑制剂(20 100);6. 鸡蛋清溶菌酶(14 400)。

图 5 酵母蔗糖酶的 SDS-PAGE 相对分子质量测定

Fig. 5 Molecule Weight determination of invertase from yeast by SDS-PAGE

SDS 抽提法和冻融法的酶活性远高于甲苯自溶法的,分别是甲苯自溶法的 1 120 倍和 534 倍。尽管甲苯自溶法所用试剂简单、价格低廉,但由于其耗时、重复性差、酶活性低等缺陷,提取效率远不如其它两种方法。

通过对不同 SDS 浓度提取酵母蔗糖酶效果的比较,可以看出(见表 2),随着 SDS 浓度的增加,总蛋白量增大,但酶的总活力增幅较小,比活力也随着 SDS 浓度的增加逐渐下降。故 SDS 浓度为 0.3 mmol/L 最适合提取酵母蔗糖酶,可以在保持酶的总活力较高的情况下尽量减少引入杂蛋白,更有利于下一步的纯化。

从表 3 可以看出,SDS 抽提法对酵母蔗糖酶的提取效率比较高,是冻融法的 2 倍,但其中总蛋白量提取也较高,是冻融法的 3 倍,因此在采用 SDS 抽提法后,对酵母蔗糖酶的纯化需要去除较多的杂蛋白。

分别测定冻融法和 SDS 抽提法纯化出的酵母蔗糖酶的米氏常数 K_m ,结果基本相同,均为 0.013 mol/L(见图 2)。这一结果与柑叶片、甘薯叶片蔗糖酶相似^[7-8]。测定上述两种方法提取纯化出的酵母蔗糖酶的等电点均为 5.6,相比较文献[5]中的结果略高,这可能与酵母的来源和种属有关。从 SDS-PAGE 实验结果可知,酵母蔗糖酶的相对分子质量为 60 kD,与文献[5-6]中报道的相对分子质量相近。

4 结 语

综上所述,研究中所用 3 种提取酵母蔗糖酶的方法都存在优缺点,但从提取效率来看,SDS 抽提

法最高,还具有操作简便易行、生产成本低、回收率高等特点,更适合酵母蔗糖酶的工业化大规模生

产。鉴于酵母蔗糖酶在食品工业等方面的巨大应用潜力,目前的各种提取方法仍需进一步改进。

参考文献(References):

- [1] 陈冰,林轩.蔗糖酶水解蔗糖的研究[J].湛江师范学院学报,1997,18(2):57—60.
CHEN Bing, LIN Xuan. Studies on hydrolysis of sucrose by sucrase[J]. *Journal of Zhanjiang Normal College*, 1997, 18(2): 57—60. (in Chinese)
- [2] 孙国志,冯惠勇,徐亲民.蔗糖酶提取方法的研究[J].工艺技术,2002,1(23):54—55.
SUN Guo-zhi, FENG Hui-yong, XU Qin-min. Studies on extracting method of invertase from yeast[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2002, 1(23): 54—55 (in Chinese).
- [3] 范业鹏,杜鹏.抗坏血酸对酵母蔗糖酶的激活动力学研究[J].中国生物化学与分子生物学报,1999,15(1):98—101.
FAN Ye-peng, DU Peng. The kinetics of activation of yeast invertase by ascorbic acid[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15(1): 98—101. (in Chinese)
- [4] 许培雅,邱乐泉.离子交换层析纯化蔗糖酶实验方法改进研究[J].实验室研究与探索,2002,21(3):82—84.
XU Pei-ya, QIU Le-quan. Studies on method development of invertase Ion exchange chromatogram purification[J]. *Laboratory Research and Exploration*, 2002, 21(3): 82—84. (in Chinese)
- [5] Belcarz A, Ginalska G, Lobarzewski J, et al. The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1594:40—53.
- [6] Francisco P Chávez, Luis Rodriguez, Joaquín Díaz, et al. Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997:67—74.
- [7] 唐云明,黎南,陈定福.甘薯叶片蔗糖酶的分纯化及其部分性质[J].植物生理学报,1996,22(1):45—50.
TANG Yun-ming, LI Nan, CHEN Ding-fu. Isolation, purification, and some properties of invertase from sweet[J]. *Palato Acta Phytophysiologica Sinica*, 1996, 22(1): 45—50. (in Chinese)
- [8] 唐云明.柑叶片蔗糖酶的分纯化及其部分性质研究[J].植物学报,1995,37(8):594—600.
TANG Yun-ming. Isolation, purification, and some properties of invertase from leaves of mandarin orange[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1995, 37(8): 594—600. (in Chinese)
- [9] 徐桦,陆珊华,孙爱民.酵母蔗糖酶 K_m 值的测定[J].南京医科大学学报,1999,17(4):329—330.
XU Hua, LU Shan-hua, SUN Ai-min. Determination of K_m of invertase from yeast[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing*, 1999, 17(4): 329—330.
- [10] 北京大学生物系生物化学教研室.生物化学实验指导[M].北京:人民教育出版社,1980:22—24,73—74.
- [11] 管斌,丁友昉.还原糖测定方法的规范[J].无锡轻工大学学报,1999,18(3):74—79.
GUAN Bin, DING You-fang. The modification of the DNS method for the determination of reducing sugar[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999, 18(3): 74—79. (in Chinese)
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680—685.
- [13] 郑学玲,李利民,姚惠源.小麦麸皮水溶性戊聚糖的分离及分级纯化[J].无锡轻工大学学报:食品与生物技术,2004,23(2):1—4.
ZHENG Xue-ling, LI Li-min, YAO Hui-yuan. The preparation, fractionation, purification and composition analysis of wheat bran water-soluble pentosans[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(2): 1—4. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平,朱明)