

邓培渊,郭红玲,袁 伟,等. 不同沉淀方法对外源表达凝乳酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):50-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.016

不同沉淀方法对外源表达凝乳酶活性的影响

邓培渊¹, 郭红玲², 袁 伟², 李玉华¹

(1. 郑州师范学院/郑州市生物物种资源研究重点实验室, 河南郑州 450044; 2. 华北水利水电大学环境与市政工程学院, 河南郑州 450045)

摘要:从粗提重组凝乳酶的得率、保存活性 2 个方面比较了乙醇沉淀法和硫酸铵沉淀法的差别。结果表明,相对于硫酸铵沉淀法,乙醇沉淀法获得蛋白的量相差不是很大,但是乙醇沉淀法所获得蛋白的单位效价是硫酸铵沉淀法的 1.27 倍,且乙醇沉淀法所得产物的比活性提高了 16.78%。综合考虑重组凝乳酶的得率与活性,用乙醇沉淀的效果较好。

关键词:重组凝乳酶;活性;乙醇沉淀法;硫酸铵;盐析

中图分类号: Q814.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0050-03

凝乳酶原一般存在于反刍动物的第 4 胃中,在酸性条件下经自我剪切形成有活性的凝乳酶。凝乳酶属于酸性蛋白酶,主要功能是水解 *K*-酪蛋白的 Phe 105-Met 106 键,在室温以上并有 Ca^{2+} 存在时,可使蛋白质凝聚成乳块,因而在奶酪生产和改良中有重要的应用价值^[1]。目前,凝乳酶的替代品主要来源于动物凝乳酶、植物凝乳酶、微生物凝乳酶以及重组凝乳酶。常见的动物胃蛋白酶主要存在于幼猪^[2]、小鸡、金枪鱼以及鲨鱼中^[3-5],但是这些动物的胃蛋白酶与小牛凝乳酶仍有所不同。在多种植物的不同部位中可以分离到使乳凝固的蛋白酶,即植物凝乳酶^[6]。在合欢树、无花果、新鲜木瓜中提取出的蛋白酶以及姜汁、柠檬汁等植物非蛋白酶均有

较好的凝乳作用,因此具有广阔的商业价值^[7-10]。

微生物凝乳酶主要来源于细菌、放线菌和真菌,由于微生物凝乳酶具有耐热性强、不易失活的特点,在实际生产中需要进一步调整工艺促使凝乳酶失活。研究发现,基因工程凝乳酶同天然凝乳酶的性质基本相同,利用基因工程生产的凝乳酶不仅纯度高、产出的奶酪品质好,而且易于工业化生产,因此重组凝乳酶具有重要的实际应用价值^[11]。

要对外源表达的凝乳酶进行分离纯化,获取有活性的目的产物,纯化的第 1 步就是对发酵液进行浓缩,在去除杂质的同时,可以获取高活性的凝乳酶。目前粗提外源表达凝乳酶常用硫酸铵沉淀法或乙醇沉淀法,不同的粗提方法直接影响凝乳酶的活性和纯化效果。本研究对外源表达重组凝乳酶的初步浓缩方法进行比较分析,以期工业化生产提供一定的理论基础。

收稿日期:2014-05-08

基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划(编号:102300410146)。

作者简介:邓培渊(1981—),男,河南登封人,博士,讲师,主要从事动物分子生物学研究。E-mail:zhzd201@hotmail.com。

[4] Kou T C, Fan L, Zhou Y, et al. Increasing the productivity of TNFR - Fc in GS - CHO cells at reduced culture temperatures[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(1):136-143.

[5] Gawlitze M, Estacio M, Furch T, et al. Identification of cell culture conditions to control *N*-glycosylation site - occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(6):1164-1175.

[6] 范 里, 赵 亮, 孙亚婷, 等. 表达 TNFR - Fc 融合蛋白的 GS - CHO 细胞动态流加培养过程的设计[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2):216-222.

[7] Yang J D, Lu C H, Stasny B, et al. Fed - batch bioreactor process scale - up from 3 L to 2 500 L scale for monoclonal antibody production from cell culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(1):141-154.

[8] Tan Q Q, Guo Q C, Fang C, et al. Characterization and comparison of commercially available TNF receptor 2 - Fc fusion protein products[J]. *mAbs*, 2013, 4(6):761-774.

[9] Gomez N, Subramanian J, Ouyang J, et al. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(1):125-136.

[10] 刘国庆, 陈 飞, 赵 亮, 等. 表达单克隆抗体的 CHO 细胞无蛋白培养基的优化[J]. *高校化学工程学报*, 2013, 27(1):96-101.

[11] Newland M, Kamal M N, Greenfield P F, et al. Ammonia inhibition hybridomas propagated in batch, fed - batch, and continuous - culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43(5):434-438.

[12] Li J C, Wong C L, Vijayasankaran N A, et al. Feeding lactate for CHO cell culture processes: Impact on culture metabolism and performance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(5):1173-1186.

[13] Weiss P, Ashwell G. The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand[J]. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1989, 300:169-184.

[14] Gawlitze M, Ryll T, Lofgren J, et al. Ammonium alters *N*-glycan structures of recombinant TNFR - IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(6):637-646.

[15] Rosenberg S A. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective[J]. *AAPS Journal*, 2006, 8(3):501-507.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为重组菌株 km2,由笔者所在实验室构建并保存。

1.2 培养基

100 mL YEPD 培养基配方:1 g 酵母提取物,2 g 葡萄糖,2 g 蛋白胨,加去离子水至 100 mL,于 120 ℃ 灭菌 30 min(固体培养基在此基础上添加 1.5%~2.0% 琼脂)。

1.3 试验方法

1.3.1 粗酶液制备 挑取单菌落转接于 YEPD 固体培养基上,于 28 ℃ 培养 28 h 后,挑取单菌落接种于 50mL 种子培养基中,于 28 ℃、250 r/min 条件下培养 20 h,以 5% 的接种量接种于 95 mL 发酵培养基中,再于 28 ℃、180 r/min 条件下培养约 96 h,冷冻离心(4 ℃、8 000 r/min、15 min)后取上清,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 硫酸铵沉淀法 取 6 组 500 mL 粗酶液,分别加入硫酸铵至饱和度分别为 10%、20%、40%、60%、80%、100%,混匀后于 4 ℃ 过夜,4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min,弃上清,将沉淀溶于 0.05 mol/L、pH 值为 6.2 的磷酸盐缓冲液中,即得粗酶液。测定重组凝乳酶活力及蛋白含量,计算回收率。

1.3.3 乙醇沉淀法 取 500 mL 粗酶液,按不同体积比分别缓慢加入预冷乙醇中,4 ℃ 沉淀过夜,8 000 r/min 离心 15 min,弃上清,将沉淀溶于 0.05 mol/L、pH 值为 6.2 的磷酸盐缓冲液中,得到粗酶液;4 ℃ 沉淀 2 h,8 000 r/min 离心 15 min,弃上清,将沉淀溶于 0.05 mol/L、pH 值为 6.2 的磷酸盐缓冲液中,得到粗酶液。测定重组凝乳酶活力及蛋白含量,计算回收率。

1.3.4 重组凝乳酶原十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分析表达产物 以发酵培养基作为参照物,将硫酸铵沉淀、乙醇沉淀所得的粗酶液通过 SDS-PAGE(12%)电泳检测表达产物^[12]。

1.3.5 凝乳酶活性测定方法 用 1 mol/L H₂SO₄ 将粗酶液的 pH 值调整至 2.0,室温条件下放置 2 h,然后用 2 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)调上清液的 pH 值至 6.0。采用 Arima 等方法^[12]进行凝乳酶活力的测定,用 0.01 mol/L CaCl₂ 液配制 10% 脱脂乳,该溶液配制后在室温放置 40 min 后使用,取 2 mL 10% 脱脂奶粉液于 35 ℃ 保温 10 min。加 1 mL 稀释

的酶液(酶液于 35 ℃ 保温),摇匀并计时,观察到管壁上开始出现凝乳颗粒为终点,记录凝乳时间。在上述条件下,40 min 凝结 1 mL 10% 脱脂奶粉的酶量定义为 1 个 Soxhlet 单位(SU)。

酶活力 = 供试乳数量 ÷ 凝乳酶量 × D × 2 400 ÷ T。
式中:D 为酶液稀释倍数;T 为反应时间,s。

凝乳酶回收率 = 沉淀液凝乳酶活性/粗酶液凝乳酶活性 × 100%。

1.3.6 凝乳酶蛋白含量测定方法 运用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定目的蛋白质浓度。在碱性条件下,蛋白质将 Cu²⁺ 还原为 Cu⁺,Cu⁺ 与 BCA 试剂形成紫色的络合物,测定其在 562 nm 处的吸光度值 D_{562 nm},并与标准曲线对比,即可计算待测蛋白的浓度。具体操作按照 TaKaRa BCA Protein Assay Kit 说明书进行。

2 结果与分析

确定合适的沉淀方法是提高外源表达凝乳酶得率的关键步骤,为此本研究比较了乙醇和硫酸铵沉淀法对重组菌株外源表达凝乳酶的粗提效果。

2.1 硫酸铵沉淀和乙醇沉淀所得粗产物的比较

由表 1 可以看出,乙醇沉淀法与硫酸铵沉淀法相比,获得的蛋白总量相差不是很大,乙醇沉淀法的得率为 40.31%,高于硫酸铵沉淀法的得率 36.93%,是 1 种更加有效的沉淀方法。

表 1 2 种沉淀法所得重组凝乳酶中的蛋白含量

方法	样品	蛋白浓度 (mg/mL)	总体积 (mL)	蛋白总量 (mg)
硫酸铵沉淀	上清液(处理前)	0.87	450	391.5
	沉淀物	4.82	30	144.6
乙醇沉淀	上清液	0.87	450	391.5
	沉淀物(处理前)	5.26	30	157.8

注:蛋白得率 = 沉淀物中蛋白总量/上清液蛋白总量 × 100%。

2.2 硫酸铵沉淀法和乙醇沉淀法粗产物活性的比较

活性评价是纯化方法的 1 个重要评价指标。采用 Arima 等方法进行凝乳酶活的测定,重复 3 次并取 3 次重复的平均值,结果如表 2 所示。

表 2 2 种沉淀方法的重组凝乳酶活性比较

样品	蛋白浓度 (mg/mL)	蛋白总量 (mg)	酶活性 (AU)	比活性 (AU/mg)	效价 (AU/mL)
硫酸铵沉淀物	4.82	144.6	523.6	108.630 705 4	523.6
乙醇沉淀物	5.26	157.8	667.3	126.863 117 9	667.3

表 2 结果表明,乙醇沉淀法所得粗产物的单位效价是硫酸铵沉淀法的 1.27 倍,且乙醇沉淀法所得产物的比活性提高了 16.78%。可以看出,利用乙醇沉淀法可以避免硫酸铵沉淀法所带来的盐离子浓度高的影响,减少后续的纯化工艺,是 1 种针对外源表达凝乳酶较理想的沉淀方法。

2.3 不同饱和度和硫酸铵及乙醇对重组凝乳酶分离效果的影响

重组凝乳酶在胞外分泌表达中有许多蛋白分泌到胞外。去除杂蛋白是确定酶活性稳定的要素。选用不同饱和度硫酸铵盐析或乙醇沉淀发酵液,考察它们对重组凝乳酶回收率的影响,结果如图 1 所示。

图 1 表明,不同饱和度硫酸铵对重组凝乳酶回收率影响较大。硫酸铵饱和度在 20%~30% 范围内时,回收率变化不大;随着硫酸铵饱和度增加,酶活回收率呈增大趋势,在 80%

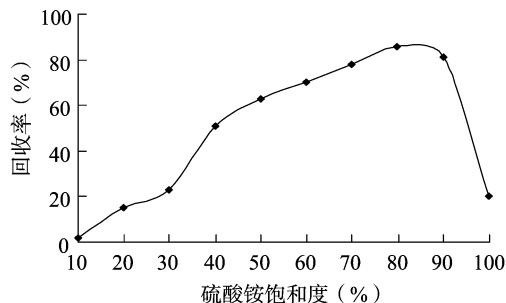


图1 不同饱和度硫酸铵对重组酶回收率的影响

时重组凝乳酶活性回收率最高,达到 86%;饱和度大于 80% 时,酶活回收率迅速降低。

由图 2 可知,在发酵液中乙醇含量在 20% 以内时,回收率变化不大;在 20% ~ 50% 范围内,随着乙醇含量增加,回收率逐渐提高;在 50% 时,回收率约为 84%;超过 50% 时,酶活回收率下降。

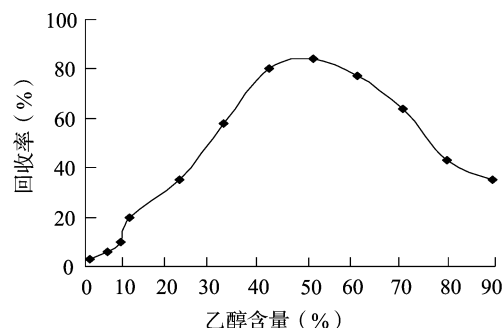
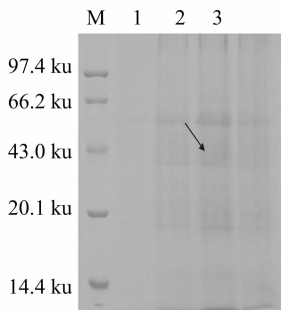


图2 乙醇含量对重组凝乳酶回收率的影响

2.4 SDS-PAGE 电泳分析比较硫酸铵和乙醇沉淀法

将重组菌株 km2 在发酵培养基中培养 96 h 后所得上清液用硫酸铵和乙醇沉淀并稀释后,得到蛋白质溶液,用 pH 值为 2.0 的 HCl 进行酸化处理,通过 SDS-PAGE 电泳检测,结果如图 3 所示。



M—蛋白分子量标准;1—发酵上清液;2—硫酸铵沉淀物;3—乙醇沉淀物;箭头指目的蛋白位置

图3 发酵液和沉淀后所得蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

图 3 表明,经过酸化处理后,重组凝乳酶的蛋白分子量约 36 ku。与发酵上清液相比,乙醇法沉淀物和硫酸铵法沉淀物均得到一定的浓缩,乙醇法沉淀后所得的蛋白含量略高于硫酸铵法沉淀。

3 结论

硫酸铵沉淀法是利用在高离子强度的溶液中,通过增加蛋白质的疏水作用,使得蛋白质趋于聚集,达到溶解极限使蛋白沉淀析出的目的。硫酸铵的性质比较温和,不容易引起蛋白的失活,能够较大幅度地保持蛋白的活性,是运用最广泛的沉淀方法^[13]。利用基因重组法获得总蛋白沉淀后需要经纯化才能得到目的蛋白,硫酸铵法沉淀过程中引入盐离子,盐析次数多^[14],导致后续蛋白纯化时增加了去盐步骤,从而加大了目的蛋白的损失率,因此,乙醇沉淀法更适合基因工程产物的沉淀。

本研究利用乙醇沉淀法提取重组凝乳酶胞外表达产物,相对于硫酸铵沉淀法能够更加有效地从发酵液中沉淀蛋白。以 500 mL 发酵液为例,利用乙醇沉淀法比硫酸铵沉淀法的得率提高了 3.38 百分点,得到的重组凝乳酶粗产物的比活性提高了 16.78%。可见乙醇沉淀法简便高效,是 1 种针对重组凝乳酶粗提的合适、有效的沉淀方法。

参考文献:

- [1] Visser S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview [J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76 (1): 329-350.
- [2] 刘文宗,蒋敏,何晓霞,等. 干酪凝乳酶代用品研究[J]. *四川畜牧兽医学院学报*, 2001, 15 (2): 23-27.
- [3] Tavares J F, Baptista J A, Marcone M F. Milk-coagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1997, 48 (3): 169-176.
- [4] 苑艳辉. 水产品下脚料综合利用研究之进展 [J]. *水产科技情报*, 2004, 31 (1): 44-48.
- [5] Haard N F. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1992, 1 (1): 17-35.
- [6] 顾瑞霞,申戈. 凝乳酶及其代用品 [J]. *中国乳品工业*, 1991 (1): 20-23.
- [7] 薛彦斌. 树木凝乳酶的研究与应用 [J]. *中国乳品工业*, 1990 (3): 130-132.
- [8] 张富新,杨宝进. 植物凝乳酶凝乳特性的研究 [J]. *黄牛杂志*, 1997 (1): 27-29.
- [9] 宋云,李立钊,崔雅洁,等. 不同因素对凝乳酶活性的影响 [J]. *中国乳品工业*, 1995, 23 (3): 124-128.
- [10] 张富新,田呈瑞. 木瓜蛋白酶凝乳特性的研究 [J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25 (2): 111-114.
- [11] 高维东,甘伯中,丁福军,等. 微生物凝乳酶的研究进展 [J]. *中国乳品工业*, 2009, 37 (5): 34-36, 47.
- [12] Arima K, Yu J, Iwasaki S. *Methods in enzymology* [M]. New York and London: Academic Press, 1970: 446-459.
- [13] Saavedra L, Castellano P, Sesma F. Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 268: 331-336.
- [14] Siegelman H W, Kycia J H. *Algal lipoproteins: handbook of phycollogical method* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978: 71-79.