



酵母醇脱氢酶提纯教学实验的优化

顾华杰, 缪天, 刘恒蔚, 陈宏伟, 郭伟强, 王桃云

(苏州科技大学 化学与生命科学学院, 苏州 215009)

摘要: 针对酵母醇脱氢酶提纯教学实验中存在的问题, 为了获得高纯度、高活性、高回收率的酵母醇脱氢酶蛋白, 该文应用单因素实验法对热浸提法、热变性沉淀法、有机溶剂沉淀法分离纯化酶蛋白进行优化, 从而提高酵母醇脱氢酶蛋白的提纯效率。结果显示当料液比为 1:6、粗提温度为 25 °C、粗提时间为 1.5 h, 热变性温度为 65 °C、时间为 15 min, 有机溶剂沉淀剂为乙醇、沉淀杂蛋白加入比例为上清液 0.5 倍, 沉淀酶蛋白加入比例为上清液 0.45 倍时, 分离纯化效果最好。通过上述条件的优化, 提高了教学实验效果, 也有助于锻炼学生的实际动手能力、创新思维和科研能力。

关键词: 酵母醇脱氢酶; 提取; 纯化; 实验教学; 优化设计

中图分类号: Q331; Q814.1; G642.423

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20240050

Optimization of Teaching Experiment of Yeast Alcohol Dehydrogenase Extraction and Purification

GU Huajie, MIU Tian, LIU Hengwei, CHEN Hongwei, GUO Weiqiang, WANG Taoyun

(School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China)

Abstract: There are some problems in the teaching experiment of yeast alcohol dehydrogenase (YADH) extraction and purification. In order to obtain YADH with high purity, high activity, and high recovery, a single factor experiment is applied to optimize the separation and purification process of enzyme protein, including hot extraction, thermal denaturation precipitation, and organic solvent precipitation, which will improve the extraction and purification efficiency of YADH. The results show that the best effect of separation and purification is achieved when the solid-liquid ratio is 1:6, the crude extraction temperature is 25 °C, the crude extraction time is 1.5 h, the thermal denaturation temperature is 65 °C, the thermal denaturation time is 15 min, the organic solvent precipitant is ethanol, the adding proportion of precipitated impure protein is 0.5 times of the supernatant, and the adding proportion of precipitated enzyme protein is 0.45 times of the supernatant. Through the optimization of the above conditions, the effect of teaching experiment is improved. It is also helpful to exercise students' practical skills, innovative thinking, and scientific research abilities.

Key words: yeast alcohol dehydrogenase (YADH); extraction; purification; teaching experiment; optimization design

醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)是一类广泛存在于生物体内的酶^[1], 它们参与醇类(如乙醇)和醛类(如乙醛)或酮类之间的氧化还原反应^[2]。ADH 可以催化醇类化合物去除一个氢原子, 转化为相应的醛类或酮类化合物, 同时生成还原型辅酶 NADH^[3-4]。酵母醇脱氢酶(yeast alcohol dehydrogenase, YADH)是一种在酵母中存在的 ADH^[5], 它是一种金属酶, 通常以四聚体形式存在, 每个亚基都包含一个活性位点, 其活性

中心含有锌离子^[6]。在酵母发酵过程中, YADH 主要催化底物, 如乙醇、乙醛以及其他醇醛类化合物的氧化还原反应。由于 YADH 在发酵工艺中的重要性, 它在生物技术和工业生产中有广泛的应用, 如被用于生产酒精饮料、面包和生物燃料等产品^[7]。此外, YADH 也被用作生物传感器, 用于检测食品、饮料和环境样品中的酒精含量^[8]。在科学研究中, YADH 被广泛用作研究模型, 以揭示 ADH 的催化机制、底物特异性和进化关系^[9]。

收稿日期: 2024-02-14

基金项目: 2024 年苏州科技大学校级品牌课程建设项目(2024KCXX-06); 苏州科技大学课程思政示范项目(2021)。

作者简介: 顾华杰, 博士, 高级实验师, 主要从事生物化学实验教学和生物分析检测方面的研究。E-mail:

liongu@usts.edu.cn

在生物化学的教学实验中, YADH 常被用作典型的研究对象, 进行酶蛋白的提取和纯化, 以及定量分析、活性测定、专一性表征、酶反应动力学研究等实验^[10]。如在 YADH 的提纯实验中, 以活性干酵母粉为原料, 采用热浸提法进行粗提, 利用热变性和有机溶剂沉淀杂蛋白、有机溶剂沉淀酶蛋白进行初步纯化, 通过测定蛋白质浓度、酶活力, 计算比活力、回收率等, 考察每一步的提纯效果。然而, 在这一过程中, 常出现测定结果波动大、计算数据的变化趋势与理论预期相差较大等问题, 造成学生对实验结果的分析

存在困惑, 对酶蛋白提纯中相关技术和概念无法很好地理解, 对实验的兴趣降低。为此, 本文对 YADH 的粗提条件(如料液比、提取温度、提取时间)和纯化条件(如热变性温度和时间、有机溶剂种类、加入比例等)进行了优化, 获得了较好的效果, 为该教学实验的改进提供了参考。

1 实验材料和仪器

本实验采用单因素实验法对 YADH 的粗提和纯化步骤进行优化, 以蛋白质总量、总活力、比活力等为指标, 确认优化效果, 如图 1 所示。

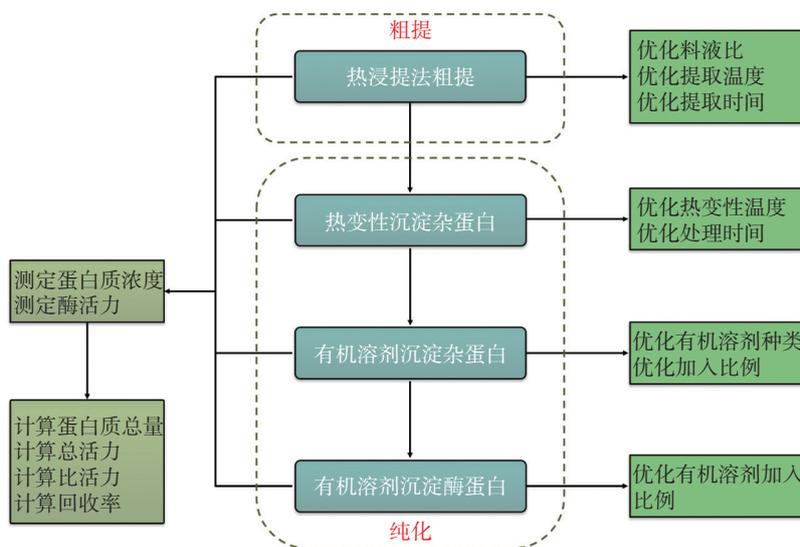


图 1 实验技术路线图

1.1 实验材料

安琪活性干酵母粉购自大润发超市。

1.2 药品试剂

磷酸氢二钠、丙酮、氯化钠、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250、95% 乙醇、磷酸、磷酸氢二钾、焦磷酸钠、无水乙醇、辅酶 I(NAD)。以上试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器设备

电子分析天平(BSA224S, 赛多利斯), 电热恒温水浴锅(DK-S24, 上海精宏有限公司), 台式高速冷冻离心机(TGL-16M, 上海卢湘仪), 制冰机(ZMS-70, 常熟雪花), 可见分光光度计(722 型, 上海欣茂仪器有限公司), 紫外可见分光光度计(T6 新世纪, 北京普析)。

2 实验方法

2.1 YADH 的粗提条件优化

取 15 g 干酵母粉, 按不同的料液比(1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, 1 : 7)加入 0.066 mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液, 将混合物置于不同温度(25、35、45、55、65 °C)的水浴锅中保温一定时间(1.5、2、2.5、3、3.5 h), 不断搅拌。再于室温提取 3 h, 4000 r/min 4 °C 离心 20 min, 取上清液, 测定蛋白质浓度和酶活力。

2.2 YADH 的纯化条件优化

2.2.1 热变性沉淀杂蛋白的条件优化

按最优条件提取 YADH, 取上清液在不同温度(35、45、55、65、75 °C)下处理一定时间(10、15、20、25、30 min)。冷却后, 4000 r/min 4 °C 离心 20 min, 取上清液和沉淀(蒸馏水溶

解),分别测定蛋白质浓度和酶活力。

2.2.2 有机溶剂沉淀杂蛋白的条件优化

按上述最优条件热变性沉淀杂蛋白后,取上清液置于盐冰浴中冷却至 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,按不同比例(30%、40%、50%、60%、70%)加入预冷的不同有机溶剂(丙酮、乙醇、异丙醇),边加边搅拌。然后静置片刻,4000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,取上清液和沉淀(蒸馏水溶解),分别测定蛋白质浓度和酶活力。

2.2.3 有机溶剂沉淀酶蛋白的条件优化

按上述最优条件有机溶剂沉淀杂蛋白后,取上清液,在 $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 盐冰浴中,按不同的比例(35%、45%、55%、65%、75%)逐滴加入预冷的最佳有机溶剂。静置片刻,待沉淀完全后,4000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,取沉淀用少量蒸馏水溶解,测定蛋白质浓度和酶活力。

2.3 数据测定和计算

2.3.1 蛋白质含量的测定

取上述各步骤的样液0.5 mL,用0.9% NaCl溶液稀释100倍,采用考马斯亮蓝结合法测定蛋白质浓度^[10-11]。

2.3.2 酶活力的测定

取上述各步骤的样液,用0.01 mol/L K_2HPO_4 溶液稀释,粗提液稀释5倍,其他均稀释10倍。采用紫外分光光度法测定 A_{340} 的变化,以每分钟 A_{340} 增加0.001作为1个酶活力单位^[10]。

2.3.3 数据计算

$$\text{蛋白质浓度}(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{标准曲线公式计算得到浓度} \times \text{稀释倍数}(100)}{(1)}$$

$$\text{蛋白质总量}(\text{mg}) = \text{蛋白质浓度} \times \text{样液总体积} \quad (2)$$

$$\text{酶活力}(\text{U/mL}) = \frac{\text{吸光度变化差值}}{\text{时间}(\text{分钟}) \times 0.001} \times \text{稀释倍数}(5/10) \quad (3)$$

$$\text{总活力}(\text{U}) = \text{酶活力} \times \text{样液总体积} \quad (4)$$

$$\text{比活力}(\text{U/mg}) = \text{总活力} / \text{蛋白质总量} \quad (5)$$

$$\text{蛋白质回收率}(\%) = \frac{\text{提纯样品中蛋白质总量}}{\text{粗提样品中蛋白质总量}} \times 100\% \quad (6)$$

$$\text{酶活力回收率}(\%) = \frac{\text{提纯样品中酶总活力}}{\text{粗提样品中酶总活力}} \times 100\% \quad (7)$$

采用IBM SPSS Statistics 26进行数据分析,对同一因素不同水平的数据进行单因素方差分析和多重比较(S-N-K法),分析各水平之间是否存在显著差异($P < 0.05$)。采用OriginPro 8.1作图。

3 实验结果

3.1 YADH粗提条件优化结果

粗提取主要是通过物理(如加热、超声、微波、脉冲电场等)、化学(如酸、碱处理、盐溶液、反胶束萃取等)或生物(如纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等)的方法打破酵母细胞壁,释放细胞内的蛋白质^[12]。热浸提法中,影响提取效果的关键参数有料液比、提取温度和时间等^[13]。料液比是指生物材料与提取溶液的比例,它直接影响到生物材料中酶蛋白的浓度和溶解度。过高的料液比可能会导致酶蛋白的稀释,降低提取效果;过低的料液比可能导致溶液粘度过高,从而影响酶蛋白的释放和分离。提取温度对酶蛋白的稳定性和活性有很大影响。一般来说,较低的温度有利于保持酶蛋白的稳定性,但可能降低提取效果;较高的温度可以提高酶蛋白的提取效果,但同时也可能导致酶蛋白的破坏或失活。提取时间也会影响到酶蛋白的分离和纯化效果。过短的提取时间可能导致酶蛋白没有充分地生物材料中释放,从而降低提取效果;过长的提取时间可能导致酶蛋白的降解或失活,影响其功能。因此,选择合适的料液比、提取温度和时间对于提取高纯度和高活性的酶蛋白非常重要。

表1和图2(a)显示,料液比从1:3增大到1:6时,蛋白质总量、总活力和比活力都显著增加;但是当料液比进一步增加到1:7时,虽然蛋白质总量仍显著增加,但总活力已无显著增大,比活力还有所降低。因此,选择1:6作为粗提的最佳料液比。

表2和图2(b)显示,粗提温度对蛋白质总量没有显著影响,但是随着温度升高,总活力逐渐降低,比活力也随之降低。因此,选择室温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为最佳粗提温度。

表 3 和图 2(c) 显示，粗提时间对蛋白质总量、总活力和比活力的影响都不够显著。从节约

时间、提高效率的角度出发，选择 1.5 h 作为最佳粗提时间。

表 1 粗提料液比的优化结果

粗提料液比	蛋白质总量/mg	总活力/U	比活力/(U·mg ⁻¹)
1:3	16.77±1.57 ^a	640.89±272.75 ^a	37.77±15.08 ^a
1:4	38.60±9.31 ^{ab}	2 116.00±81.68 ^b	57.10±14.51 ^{ab}
1:5	48.85±6.10 ^b	4 675.56±600.20 ^c	97.81±25.23 ^{bc}
1:6	79.54±5.40 ^c	10 313.33±1 524.74 ^d	130.03±21.01 ^c
1:7	120.24±24.07 ^d	11 613.33±533.83 ^d	99.68±23.39 ^{bc}

注：同一因素同一测定指标不同水平间进行方差分析和多重比较，同一字母表示各水平间无显著差异，不同字母表示各水平间差异显著(P<0.05)。下同。

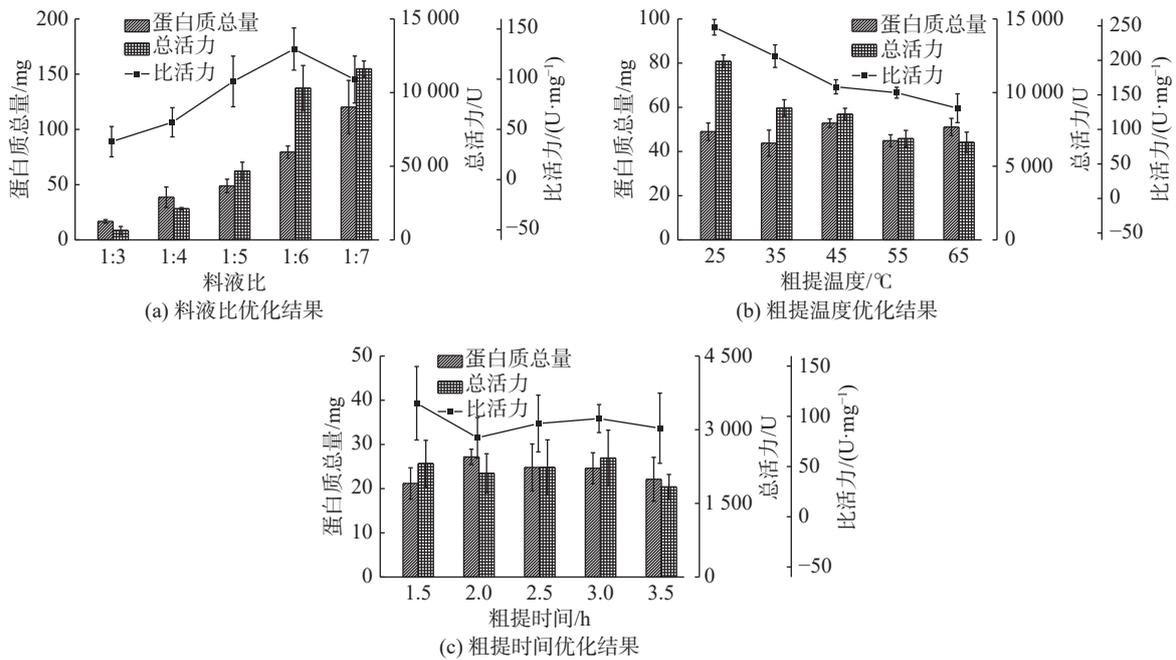


图 2 YADH 粗提条件优化结果

表 2 粗提温度的优化结果

粗提温度/℃	蛋白质总量/mg	总活力/U	比活力/(U·mg ⁻¹)
25	49.00±3.92 ^a	12 120.00±432.67 ^c	247.94±11.30 ^c
35	43.79±5.89 ^a	8 960.00±554.26 ^b	206.09±16.34 ^b
45	52.85±1.92 ^a	8 537.78±398.01 ^b	161.72±10.28 ^a
55	44.88±2.71 ^a	6 875.56±559.06 ^a	153.16±7.91 ^a
65	51.08±3.90 ^a	6 624.44±690.78 ^a	130.63±20.87 ^a

表 3 粗提时间的优化结果

粗提时间/h	蛋白质总量/mg	总活力/U	比活力/(U·mg ⁻¹)
1.5	21.17±3.55 ^a	2 311.11±472.93 ^a	113.04±36.57 ^a
2.0	27.18±1.75 ^a	2 113.33±396.76 ^a	78.62±20.21 ^a
2.5	24.79±5.31 ^a	2 233.33±560.46 ^a	92.84±28.26 ^a
3.0	24.62±3.51 ^a	2 423.11±567.47 ^a	97.76±13.93 ^a
3.5	22.12±4.97 ^a	1 834.67±253.62 ^a	88.18±34.92 ^a

3.2 YADH 纯化条件优化结果

热变性沉淀法是一种基于蛋白质热稳定性差异的分离和纯化蛋白质的技术^[14]。大多数蛋白质在升高温度到一定程度后会发​​生结构改变,也就是所谓的“热变性”,这种结构的改变会使得蛋白质失去其溶解性,从而形成沉淀。温度是热变性沉淀蛋白质的关键因素,不同的蛋白质对热的敏感性不同,有的蛋白质在较低温度就开始变性,有的则需要较高的温度,因此,需要对待提取蛋白质的热稳定性有比较准确的

了解。此外,过高的温度可能导致所有蛋白质都发生热变性,从而无法分离得到待提取的蛋白质。

表4和图3(a)显示,随着热变性温度上升,上清液中蛋白质总量显著减少,沉淀中蛋白质总量显著增加,这符合理论预期,即温度越高,热变性沉淀的蛋白质越多。上清液中的总活力和比活力随温度升高而增大,在65℃时达到最大,温度继续增加到75℃时又显著减小。因此,选择65℃作为最佳热变性温度。

表4 热变性温度的优化结果

热变性温度/℃	上清液蛋白质总量/mg	上清液总活力/U	上清液比活力/(U·mg ⁻¹)	沉淀蛋白质总量/mg	沉淀总活力/U
35	49.97±1.56 ^d	10282.22±210.43 ^b	205.93±8.41 ^a	1.40±0.12 ^a	248.89±342.89 ^a
45	48.56±1.58 ^d	10342.22±1022.10 ^b	213.14±22.35 ^a	1.38±0.15 ^a	497.78±427.78 ^a
55	43.21±3.29 ^e	10735.56±957.32 ^b	248.38±8.85 ^a	5.50±0.08 ^b	355.56±222.04 ^a
65	21.89±0.77 ^b	12535.56±1196.30 ^c	571.74±34.03 ^c	7.77±0.32 ^c	106.67±106.67 ^a
75	12.80±0.92 ^a	6117.78±465.06 ^a	478.15±25.85 ^b	8.06±2.11 ^c	35.56±61.58 ^a

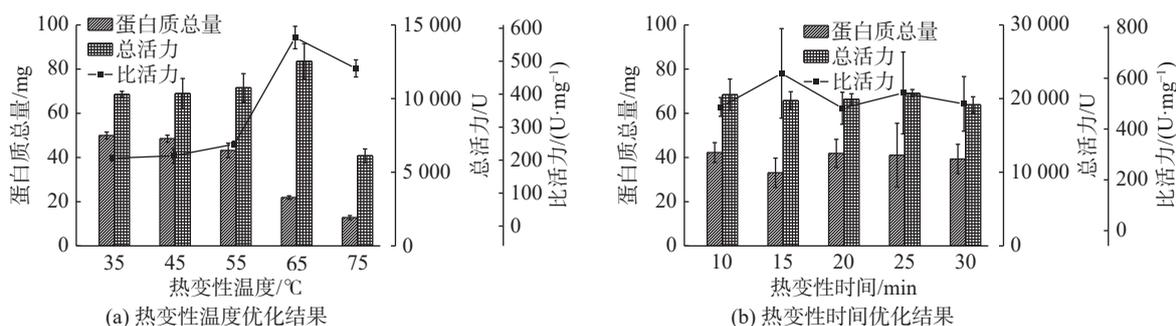


图3 热变性沉淀杂蛋白条件优化结果

表5和图3(b)显示,热变性时间对上清液中蛋白质总量、总活力、比活力和沉淀中的总活力都没有显著影响。但是,沉淀中蛋白质总量随

间从10 min增加到15 min显著增多,此后随时间继续增加不再有显著变化。因此,选择15 min作为最佳热变性时间。

表5 热变性时间的优化结果

热变性时间/min	上清液蛋白质总量/mg	上清液总活力/U	上清液比活力/(U·mg ⁻¹)	沉淀蛋白质总量/mg	沉淀总活力/U
10	42.24±4.49 ^a	20533.33±2120.13 ^a	487.08±36.91 ^a	2.50±0.20 ^a	400.00±230.94 ^a
15	33.11±6.63 ^a	19724.44±1214.53 ^a	619.22±176.15 ^a	3.51±0.11 ^b	222.22±153.96 ^a
20	41.86±6.37 ^a	19920.00±739.01 ^a	482.03±63.07 ^a	3.59±0.18 ^b	266.67±230.94 ^a
25	41.06±14.43 ^a	20720.00±510.69 ^a	542.24±161.16 ^a	3.76±0.06 ^b	844.44±277.56 ^a
30	39.33±6.64 ^a	19160.00±1091.14 ^a	499.15±107.61 ^a	3.72±0.17 ^b	355.56±504.79 ^a

有机溶剂沉淀法也是蛋白质纯化的一种常用技术^[14-15],它是利用有机溶剂破坏蛋白质表面水化膜以及蛋白质在不同极性溶剂中的溶解度差异来实现分离。有机溶剂沉淀法中的关键因素是有机溶剂的种类和加入比例。不同种类的有机溶剂

极性不同,对不同蛋白质的溶解度有差异,破坏蛋白质表面水化膜的能力也不同,需要根据纯化分离的目的,选择一种或多种对目标蛋白或杂蛋白有良好沉淀效果的有机溶剂。有机溶剂的添加量也会影响沉淀的效果,不同的添加量会造成有

机溶剂浓度的差异，从而对不同的蛋白质有选择性沉淀的作用。

表 6 和图 4(a) 显示，3 种有机溶剂对于上清液中蛋白质总量、比活力和沉淀中总活力都没有显著的影响。乙醇沉淀获得的上清液总活力显著

高于丙酮和异丙醇。沉淀蛋白质总量从高到低依次为异丙醇、乙醇、丙酮。综合考虑有机溶剂沉淀蛋白质的效果、试剂成本和毒性(乙醇最低)、购买难易程度和使用资质(丙酮是易制毒化学品)，选择乙醇作为有机溶剂沉淀剂。

表 6 有机溶剂沉淀剂种类的优化结果

有机溶剂种类	上清液蛋白质总量/mg	上清液总活力/U	上清液比活力/(U·mg ⁻¹)	沉淀蛋白质总量/mg	沉淀总活力/U
乙醇	26.51±2.42 ^a	27002.22±2850.16 ^b	1026±166.54 ^a	7.79±0.29 ^b	17.78±30.79 ^a
丙酮	32.77±3.65 ^a	21528.89±1508.81 ^a	661.02±66.82 ^a	6.89±0.21 ^a	17.78±30.79 ^a
异丙醇	26.23±5.71 ^a	21073.33±697.07 ^a	832.36±201.41 ^a	8.30±0.25 ^c	17.78±30.79 ^a

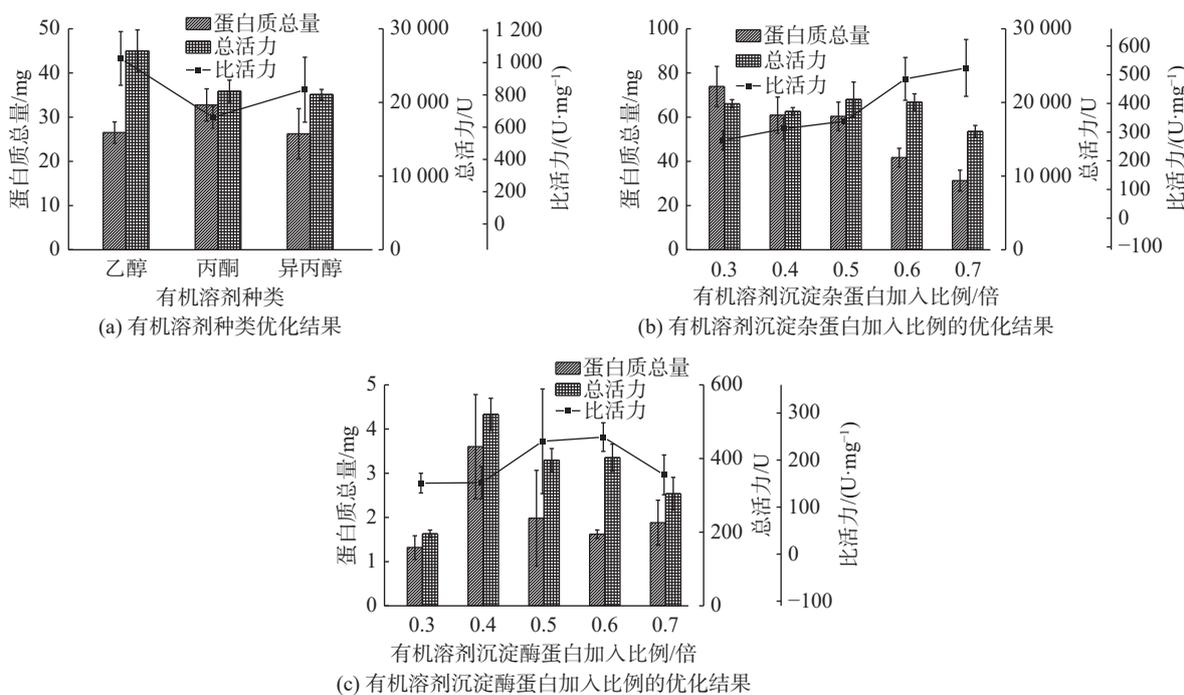


图 4 有机溶剂沉淀蛋白质条件优化结果

表 7 和图 4(b) 显示，随着乙醇加入比例增大 (0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 倍)，其在溶液中的浓度也增大(23.1%、28.6%、33.3%、37.5%、41.2%)，上清液中蛋白质总量逐渐减少，沉淀中蛋白质总量逐渐增多。上清液中总活力变化不显著，当乙醇加入比例达到 0.7 倍时显著下降；当乙醇加入比例达到 0.6 倍以上时，沉淀中总活力则显著增加，这说明有部分 YADH 被沉淀。因此，选择 0.5 倍作为乙醇沉淀杂蛋白的最佳加入比例，此时，上清液中总活力高而沉淀中总活力很低，表明酶蛋白基本都在上清液中，与沉淀的杂蛋白分离比较彻底。

在使用 0.5 倍乙醇沉淀杂蛋白后，继续加入乙醇沉淀酶蛋白。表 8 和图 4(c) 显示，随着乙醇再

次加入的比例增大 (0.35、0.45、0.55、0.65、0.75 倍)，其在溶液中的终浓度也继续增大 (50.6%、54.0%、57.0%、59.6%、61.9%)，但沉淀得到的酶蛋白比活力没有显著差异。加入 0.35 倍乙醇时，上清液中蛋白质总量最大；加入 0.55、0.65、0.75 倍乙醇时，上清液中总活力都较高，与沉淀中总活力接近，说明在这些情况下，乙醇沉淀酶蛋白效果较差，还有很多酶蛋白残留在上清液中。相对而言，加入 0.45 倍乙醇时，沉淀中蛋白质总量和总活力都显著高于其他加入比例，并且上清液中的蛋白质总量和总活力都较低，因此，选择再加入 0.45 倍乙醇作为沉淀酶蛋白的最佳加入比例。

表7 有机溶剂沉淀杂蛋白加入比例的优化结果

有机溶剂沉淀杂蛋白比例/倍	上清液蛋白质总量/mg	上清液总活力/U	上清液比活力/(U·mg ⁻¹)	沉淀蛋白质总量/mg	沉淀总活力/U
0.3	73.89±9.09 ^b	19817.78±557.19 ^b	270.84±32.48 ^a	3.19±0.06 ^a	17.78±30.79 ^a
0.4	60.95±8.17 ^b	18777.78±529.54 ^b	311.34±36.51 ^a	3.02±0.05 ^a	17.78±30.79 ^a
0.5	60.36±6.45 ^b	20408.89±2363.63 ^b	337.88±5.19 ^a	3.62±0.17 ^b	0.00±0.00 ^a
0.6	41.71±4.20 ^a	20042.22±1132.83 ^b	485.42±74.61 ^b	3.97±0.09 ^c	853.33±488.81 ^b
0.7	31.27±4.73 ^a	16071.11±807.67 ^a	523.54±99.02 ^b	5.05±0.32 ^d	2133.33±774.71 ^c

表8 有机溶剂沉淀酶蛋白加入比例的优化结果

有机溶剂沉淀酶蛋白比例/倍	沉淀蛋白质总量/mg	沉淀总活力/U	沉淀比活力/(U·mg ⁻¹)	上清液蛋白质总量/mg	上清液总活力/U
0.35	1.32±0.27 ^a	195.56±10.18 ^a	151.04±20.95 ^a	8.16±1.09 ^b	183.00±6.32 ^a
0.45	3.60±1.18 ^b	520.00±43.72 ^d	151.85±34.63 ^a	5.12±3.29 ^a	196.56±39.83 ^a
0.55	1.98±1.08 ^a	395.56±31.51 ^c	239.93±111.38 ^a	1.56±0.18 ^a	259.02±26.00 ^b
0.65	1.62±0.10 ^a	402.22±36.72 ^c	248.91±30.35 ^a	1.58±0.33 ^a	265.47±21.14 ^b
0.75	1.88±0.51 ^a	304.44±44.39 ^b	168.53±42.35 ^a	1.76±0.59 ^a	250.44±11.51 ^b

3.3 验证实验

采用优化得到的最佳条件进行 YADH 的提纯,结果如表 9 所示。蛋白质总量和回收率不断降低,比活力不断提高,说明杂蛋白被不断去除,酶蛋白被提纯。以上 3 个步骤中酶的总活力

基本保持稳定,说明在有效去除杂蛋白的同时,酶蛋白损耗很少,提纯效果很好。但最后 1 步总活力下降很多,结合表 8 数据,表明乙醇沉淀酶蛋白效果较差,还有不少酶蛋白残留在上清液中未被沉淀。

表9 YADH 的提纯

提纯步骤	总体积/mL	蛋白质浓度/(mg·mL ⁻¹)	蛋白质总量/mg	酶活力/U	总活力/U	比活力/(U·mg ⁻¹)	回收率/%	
							蛋白质	酶活力
粗提	19.00	3.99	75.79	666.67	12666.67	167.12	100.00	100.00
热变性去除杂蛋白	17.50	1.68	29.36	846.67	14816.67	504.71	38.73	116.97
有机溶剂沉淀杂蛋白	24.00	0.73	17.52	613.33	14720.00	840.10	23.12	116.21
有机溶剂沉淀酶蛋白	5.00	0.90	4.52	826.67	4133.33	914.47	5.96	32.63

4 分析讨论

实验教学过程中,经常出现学生数据不符合理论预期,如蛋白质总量并非逐渐减少,总活力不能保持相对稳定,比活力也不是越来越大。这一方面是由于学生操作不规范不熟练,误差较大,另一方面是由于实验条件对结果影响较大。如在实验中,最后一步用有机溶剂沉淀酶蛋白,应取沉淀,但有学生习惯性地取了上清液,结果发现在上清液中也能测出酶活力,且活力不低。说明有机溶剂沉淀蛋白受加入比例和环境影响,并不能将酶蛋白完全沉淀,叠加学生的操作误差和量筒等量器本身的误差,造成结果偏差较大。因此,在本实验中,除了测定上清液(热变性和有机溶剂沉淀杂蛋白)或沉淀(有机溶剂沉淀酶蛋白),还测定了相对应的沉淀或上清液,以便确认

沉淀的效果。表 4~表 7 的数据显示,上清液中的蛋白质总量和总活力明显高于沉淀中的,说明沉淀杂蛋白后,上清液中确实存在大量的酶蛋白,但也显示出沉淀中并非全部是杂蛋白,还存在少量的酶蛋白。表 8 中,虽然沉淀总活力都大于上清液总活力,但没有数量级上的差距,说明乙醇沉淀酶蛋白的效果不好,有较多的酶蛋白留在上清液中。

该优化步骤可能存在以下 3 个问题:

- 1) 有机溶剂沉淀杂蛋白后,为了减少溶液体系中不同有机溶剂的交叉影响,沉淀酶蛋白采用了相同的有机溶剂,并未进行有机溶剂种类的优化;
- 2) 虽然再次加入有机溶剂的比例相差较大(0.35~0.75 倍),但由于溶液体系中已经存在一定浓度的该有机溶剂,实际其最终浓度相差并不大

(50.6%~61.9%), 沉淀酶蛋白所需的最佳浓度可能并不在此范围内;

3) 参照实验指导书的操作步骤, 沉淀的酶蛋白是用少量蒸馏水溶解的, 而蒸馏水缺乏一定的离子强度和 pH 缓冲能力, 不能保障酶处于最佳活力状态。

因此, 还需要对沉淀酶蛋白的有机溶剂种类和加入比例做进一步的优化, 并考虑使用不同有机溶剂沉淀的交互作用。同时, 也可以更换合适的缓冲液来溶解酶蛋白沉淀。

验证实验结果显示, 实验数据基本符合预期, 蛋白质总量逐渐降低, 比活力逐渐增大, 说明 YADH 得到纯化。但总活力变化有一定的波动, 特别是最后一步有机溶剂沉淀酶蛋白后总活力下降较多。一方面, 这与酶活力计算有很大关系, 因为测定 A_{340} 变化后, 选取用于计算酶活力的部分时间段数据存在很大的主观性。另一方面, 有机溶剂沉淀酶蛋白过程中, 部分酶蛋白未被沉淀, 还留在上清液中, 需要作进一步的优化。此外, 也可以考虑使用合适的缓冲液溶解酶蛋白沉淀, 保障酶的活力。

5 结束语

本实验主要对 YADH 的粗提和沉淀纯化步骤进行了优化, 能够为教学实验项目“YADH 的提纯”提供参考, 以便使学生在实验中获得更好的结果和成就感, 增强实验自信心, 提升对实验的兴趣。但蛋白质沉淀只是酶纯化中的一类方法, 要想获得高纯度的酶蛋白, 还可以采用层析、透析、电泳、超滤等纯化步骤^[16-17], 也可以考虑引入其他酶稳定化和蛋白质保护技术, 如添加稳定剂, 降低和防止酶活性的损失^[18]。后期的实验还将对这些步骤进行优化, 以便改进教学实验, 同时也可以将优化实验作为开放实验让学生参与, 增强学生的实验设计和科学研究能力。

参考文献

- [1] 程书兰, 魏森, 许琳, 等. 醇脱氢酶的纯化、酶学性质及其不对称催化[J]. *生物加工过程*, 2016, 14(1): 8-13.
- [2] ZHOU J H, HAN T, AHMAD S, et al. Origin of the enantioselectivity of alcohol dehydrogenase[J]. *Physical*

Chemistry Chemical Physics, 2023, 25(45): 31292-31300.

- [3] MILAGRE C D F, MILAGRE H M S. Alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidation[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2022, 38: 100694.
- [4] 孙泽文. 醇脱氢酶对映互补性的定向改造及分子机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- [5] MADHUSUDHAN M C, RAGHAVARAO K S M S, NENE S. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 38(3): 414-420.
- [6] GUNTUPALLI S R, LI Z, CHANG L F, et al. Cryo-electron microscopy structures of yeast alcohol dehydrogenase[J]. *Biochemistry*, 2021, 60(9): 663-677.
- [7] 谢国银. 啤酒生产中的排放酵母全酶法生产复合氨基酸粉和乙醇脱氢酶的提取[D]. 无锡: 无锡轻工业学院, 1993.
- [8] 覃建军, 卢孜, 吴来燕, 等. 基于醇脱氢酶催化-动力学荧光分析法测定食品中乙醇的含量[J]. *江西化工*, 2023, 39(3): 52-55.
- [9] 羊明, 徐岩, 穆晓清, 等. 近平滑假丝酵母 NAD(H) 依赖型次级醇脱氢酶的分离纯化及酶学性质[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(1): 121-125.
- [10] 李俊, 张冬梅, 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 6 版. 北京: 科学出版社, 2020.
- [11] 蒋大程, 高珊, 高海伦, 等. 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量中的细节问题[J]. *实验科学与技术*, 2018, 16(4): 143-147.
- [12] 李超, 马航, 吴冉, 等. 植物蛋白提取技术研究进展[J]. *现代食品*, 2023, 29(11): 12-19.
- [13] 顾华杰, 孙燕, 李良智, 等. 响应面法优化热水浸提灰树花多糖的工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(19): 234-238.
- [14] 韩召奋. 蛋白质分离纯化实验技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2021.
- [15] 张建社, 褚武英, 陈韬. 蛋白质分离与纯化技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2009.
- [16] 刘箭, 杜希华. 生物化学实验教程[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2022.
- [17] 杨文盛, 张军东, 刘璐, 等. 不同来源蛋白质提取分离技术的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(11): 861-866.
- [18] 王亚军, 曹块. 添加剂提高酶稳定性研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2016, 45(3): 188-192.

编辑 王燕