



毕赤酵母表达风味强化肽的分离与纯化

田 雪, 张宝持, 白小佳, 王艳萍

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要: 为了开发新型风味强化剂, 采用硫酸铵分段盐析法、中空纤维超滤、阴离子交换树脂分离等方法, 对构建的工程菌 *P. pastoris* GS115-16B2 发酵表达的 16 拷贝风味强化肽的分离纯化效果进行研究. 实验结果表明, 分离纯化最佳方法为: 首先使用中空纤维进行超滤浓缩, 经过两次稀释过滤浓缩后的浓缩液再采用离子交换树脂 DEAE-52 进一步分离纯化. 经 SDS-PAGE 检测, 纯化后 16 拷贝风味强化肽的平均纯度可达 93.19%.

关键词: 毕赤酵母; 风味强化肽; 盐析; 中空纤维超滤; 离子交换树脂; 分离纯化

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2011)04-0014-04

Separation and Purification of Flavor Enhancing Peptide from *Pichia Pastoris*

TIAN Xue, ZHANG Bao-chi, BAI Xiao-jia, WANG Yan-ping

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The separation and purification method of 16 copies flavor enhancing peptide from *Pichia Pastoris* fermentation broth was studied by fractional salting out, hollow fiber ultra filtration and anion exchange resin. The results showed the best separation and purification method. The broth was first ultra filtration enriched twice by hollow fiber column, and then further purified by ion-exchange resin DEAE-52. After the purification, the average purity of 16 copies flavor enhancing peptide was 93.19% detected by SDS-PAGE.

Keywords: *Pichia pastoris*; flavor enhancing peptide; salting-out; hollow fiber ultra filtration; ion exchange resin; separation and purification

风味强化肽最初是从牛肉的木瓜蛋白酶水解物中分离得到的一种八肽, 它与食盐、味精有较好的协同呈味作用, 并且具有很好的热稳定性, 适合于食品工业生产中的热处理要求. 因此, 风味强化肽有望代替味精成为新一代风味强化剂, 具有广阔的市场前景.

随着分子生物学的发展和应用, 数百种外源蛋白实现了在毕赤酵母、酿酒酵母等表达体系中的成功表达^[1-2], 然而发酵液中目的蛋白难以分离纯化已成为影响其应用的主要问题. 尤其是各种肽, 由于其分子质量小, 表达出来的产物难于分离^[3].

本实验室构建出带有 16 拷贝风味强化肽的高效表达载体, 并将其整合到毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)

进行诱导表达^[4]. 本文在前期工作的基础上, 对构建的工程菌 *P. pastoris* GS115-16B2 发酵表达的 16 拷贝风味强化肽的分离纯化方法作了探索性尝试, 即分别运用硫酸铵分段盐析法、中空纤维超滤、阴离子交换树脂分离方法和两步分离法进行分离纯化, 寻出较好的分离纯化工艺.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

Pichia pastoris GS115-16B2, 毕赤酵母基因组整

收稿日期: 2011-02-18; 修回日期: 2011-03-15

基金项目: 天津市东丽区科技创新专项资金项目 (20101306); 天津市科技发展计划 (05YFGHHZ00200)

作者简介: 田 雪 (1985—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, 博士生导师, ypwang@tust.edu.cn.

含有 16 拷贝风味强化肽基因,由本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器

外源蛋白发酵样品由本实验室制备;DEAE-52 阴离子交换树脂,南开大学化工厂;硫酸铵(分析纯),天津市天大化工实验厂。

中空纤维超滤膜(截留相对分子质量为 6 000、60 000),天津膜天膜公司;Power PAC 3000 电泳仪和全自动凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 发酵液预处理

将收集到的发酵液在 6 000 r/min 离心 20 min,除去大部分菌体,然后加热到 100 °C 煮沸 5 min,使大部分蛋白酶失活,迅速降温,于 -20 °C 储存备用。

1.2.2 硫酸铵分段盐析

一级盐析:取发酵上清液适量分装,每瓶 200 mL。将硫酸铵烘干研细,按质量分数为 30%、35%、40%、45%、50%和 55%向发酵上清液中缓慢加入硫酸铵,不断搅拌至完全溶解,4 °C 静置 2 h,6 000 r/min、4 °C 离心 20 min,沉淀溶于蒸馏水中,透析,SDS-PAGE 检测,找到目标蛋白 16 拷贝风味强化肽沉淀较少而杂蛋白沉淀最多时的硫酸铵质量分数。

二级盐析:取发酵上清液适量,按照一级盐析的最适硫酸铵质量分数盐析,然后将离心得到的上清液分装,每瓶 200 mL。向上清液中缓慢加入硫酸铵粉末,不断搅拌至完全溶解,使硫酸铵质量分数分别为 60%、70%、80%和 90%。4 °C 静置 2 h,6 000 r/min、4 °C 离心 20 min,弃上清液,将沉淀溶于蒸馏水中,透析,并取相对应的上清液进行透析,SDS-PAGE 检测。

1.2.3 发酵上清液的中空纤维超滤

将预处理过的发酵液通过截留相对分子质量为 60 000 的中空纤维超滤膜,将小于 60 000 的超滤液再通过截留相对分子质量为 6 000 超滤膜,收集相对分子质量大于 6 000 的浓缩液,保存于 -20 °C 冰箱中。

1.2.4 阴离子交换层析分离

采用 DEAE-52 层析柱(1.0 cm × 40 cm),流量为 0.5 mL/min,用 4~5 个柱体积的缓冲液平衡层析柱,含 NaCl 浓度分别为 0、0.10、0.15、0.20、0.25 mol/L 的 Tris-HCl(pH 7.0)缓冲液进行梯度洗脱。

回收率 = (洗脱液中蛋白质量浓度 × 体积) / (原液蛋白质量浓度 × 体积) × 100%

1.2.5 蛋白质量浓度与蛋白含量的测定方法

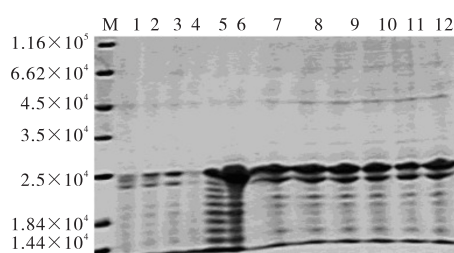
应用 Bradford 法^[5]测定发酵液总蛋白质量浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白含量^[6]。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵分段盐析

2.1.1 一级盐析的确定

将预处理后的发酵液用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至等电点 3.94。以硫酸铵作为盐析剂,在不同盐析质量分数下对 16 拷贝风味强化肽进行分段盐析沉淀实验,结果如图 1 所示。



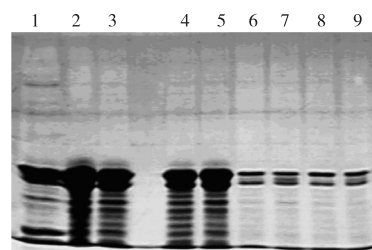
M. marker; 1—6. 质量分数 30%、35%、40%、45%、50%、55%沉淀蛋白电泳; 7—12. 质量分数 30%、35%、40%、45%、50%、55%上清蛋白电泳

图 1 硫酸铵盐析 16 拷贝风味强化肽沉淀 SDS-PAGE 电泳图
Fig.1 SDS-PAGE of 16 copies flavor enhancing peptide precipitation by ammonium sulfate salting

目的蛋白相对分子质量为 2.5×10^4 ,从图 1 可知,当硫酸铵质量分数为 45%以下时,蛋白沉淀较少,当达到 50%时,开始出现较多的沉淀。因此,本研究选择一级盐析时硫酸铵质量分数为 45%。

2.1.2 二级盐析

选择硫酸铵质量分数 45%进行一级盐析,通过 SDS-PAGE 检测,结果如图 2 所示。



1. 发酵原液; 2—5. 硫酸铵质量分数分别为 60%、70%、80%、90%时盐析沉淀电泳; 6—9. 硫酸铵质量分数分别为 60%、70%、80%、90%上清电泳

图 2 硫酸铵二级盐析 16 拷贝风味强化肽沉淀 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of 16 copies flavor enhancing peptide precipitation by ammonium sulfate salting

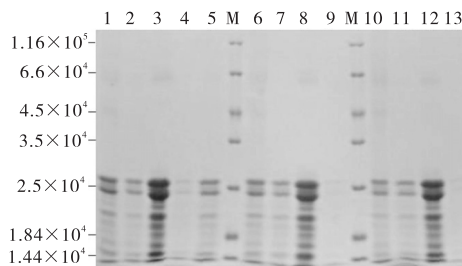
结合图 1 和图 2 可知,当硫酸铵质量分数为 45%~60%时,蛋白质的溶解度随溶液质量分数的增加而降低,沉淀蛋白电泳条带越来越浓,当在 70%~

90%时, 硫酸铵溶液质量分数增加而沉淀蛋白电泳条带相对变稀. 为了得到更多的沉淀蛋白, 本研究选择二级盐析时硫酸铵质量分数为 60%.

采用硫酸铵盐析的方法在粗提阶段提高所需蛋白纯度, 这在很多相关文献中都有提及, 如罗磊等^[6]的“一步沉淀法”, Siegelman 等^[7]的“分步沉淀法”, 胡一兵等^[8]的“分段梯度盐析法”, 但这些方法或产物纯度低, 或重复性差, 或盐析次数多, 或盐析段过于狭窄等. 本实验首先进行 0%~45%的硫酸铵盐析, 这段沉淀物可以抛弃(去除大多数杂质); 然后进行 45%~60%的硫酸铵盐析, 可以得到较好的盐析效果. 但是从图 1 和图 2 可以看出, 当硫酸铵饱和度为 60%~90%时, 上清液中仍然含有大量纯度较高的目标蛋白, 回收率太低, 因此放弃使用硫酸铵盐析的方法进行粗分, 并且尝试使用中空纤维方法分离、浓缩目标风味肽.

2.2 发酵上清液的中空纤维超滤

稀释过滤即是在膜分离过程中向料液中加入渗透溶剂(一般是水), 使小分子和渗透溶剂一起去除, 直到达到所需要的分离要求. 显然, 如果产品是大分子, 稀释过滤类似于洗涤; 而当产品是小分子时, 产品液体将被稀释. 因 16 拷贝风味强化肽相对分子质量小于 60 000, 当通过截留相对分子质量 60 000 的超滤膜时, 是将溶液中的大分子杂质去除. 为了提高 16 拷贝风味强化肽的回收率, 必须采用稀释过滤. 图 3 为中空纤维超滤膜浓缩后发酵液的 SDS-PAGE 凝胶电泳图.



1, 6, 10. 加水稀释前、稀释 1 次、稀释 2 次大于 60 000 浓缩液电泳; 2, 7, 11. 加水稀释前、稀释 1 次、稀释 2 次小于 60 000 透过液电泳; 4, 9, 13. 加水稀释前、稀释 1 次、稀释 2 次小于 6 000 透过液电泳; 3, 8, 12. 相对分子质量在 6 000~60 000 时浓缩液电泳; M. marker; 5. 原液对照.

图 3 中空纤维分离液 SDS-PAGE 电泳图
Fig.3 SDS-PAGE of hollow fiber separation

3、8 和 12 泳道为浓缩后相对分子质量在 6 000~60 000 样品, 其蛋白浓度明显比 5 号对照泳道深, 说明经过中空纤维超滤膜浓缩后, 16 拷贝风味强化肽

目的蛋白被高效浓缩; 4、9 和 13 泳道蛋白条带很淡甚至没有条带, 说明 6 000 滤出液只含有少量的蛋白, 达到很好的超滤浓缩效果.

2.3 离子交换树脂 DEAE-52 纯化 16 拷贝风味强化肽浓缩液

通过预备实验, 选择缓冲液 pH 为 7.0, 检测洗脱液在 220 nm 下的吸收峰, 得到洗脱曲线如图 4 所示.

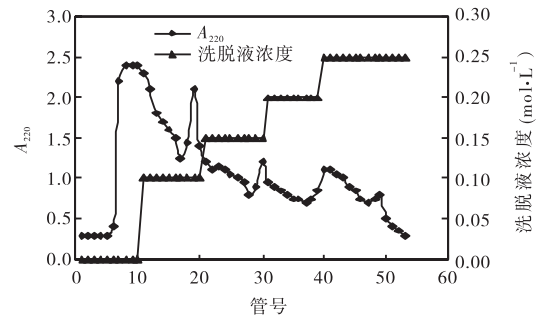


图 4 洗脱液盐浓度对 DEAE-52 分离 16 拷贝风味强化肽影响

Fig.4 Effect of eluent salt concentration on the separation of 16 copies flavor enhancing peptide by DEAE-52

图 4 结果显示, Tris-HCl-NaCl 梯度洗脱曲线在 8、19、30、40 和 49 号管分别出现较高吸收峰, 选择这些吸收峰以及其附近的洗脱液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 5 所示.

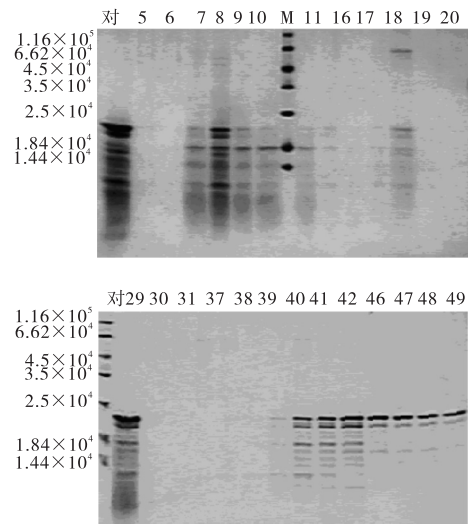
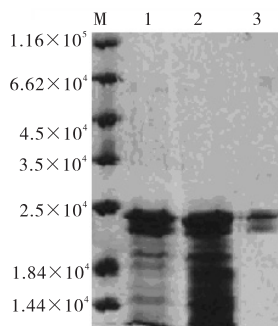


图 5 16 拷贝风味强化肽洗脱峰 SDS-PAGE 电泳结果
Fig.5 SDS-PAGE of 16 copies flavor enhancing peptide elution peak

根据图 5 可知, 目标蛋白在第 40~49 管洗脱液中析出, 此时 NaCl 浓度为 0.25 mol/L, 其中 46~49 管洗脱液样品纯度较高.

2.4 两步分离纯化

首先使用中空纤维进行超滤浓缩,浓缩分别经过两次超滤,得到相对分子质量在 6 000 ~ 60 000 的蛋白质,考马斯亮蓝结果显示其蛋白质量浓度为 6.34 g/L,回收率达到 59%;采用 DEAE-52 进行进一步分离纯化,经 SDS-PAGE 检测,纯化后 16 拷贝风味强化肽平均纯度可达 93.19%。将得到最佳的结果进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 6 所示。



M. marker; 1. 发酵液原液; 2. 中空纤维超滤浓缩液;
3. DEAE-52 纯化液

图 6 两步分离纯化结果的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE of the separation and purification results

3 结 语

蛋白质分离纯化很难用单一方法实现,往往要综合几种方法才能提纯出一种蛋白质^[9]。理想的蛋白质分离提纯方法要求产品纯度和总回收率越高越好,但实际上两者难以兼顾,因此,考虑分离提纯的条件和方法时,不得不在两者之间作适当的选择;一般情况下,科研上更多地选择前者,工业生产上更多地选择后者。因此,每当需要提纯某种蛋白质时,首先要明确分离纯化的目的和蛋白质的性质,以便选择最佳的分离纯化方法,从而得到理想的效果^[10]。

本研究将预处理过的发酵液进行分离纯化。分别采用了硫酸铵盐析法、中空纤维超滤法和 DEAE-52 进行纯化。经过实验确定最佳方法为:首先使用中空纤维进行超滤浓缩,浓缩分别经过两次超滤,通过截留相对分子质量分别为 60 000 和 6 000 的膜,得到相对分子质量范围在 6 000 ~ 60 000 之间的蛋白质,

回收率达到 59%;采用 DEAE-52 进一步分离纯化,经 SDS-PAGE 检测,纯化后 16 拷贝风味强化肽平均纯度可达 93.19%。

参考文献:

- [1] Shi X, Karkut T, Chamankhah M, et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 28 (2) : 321-330.
- [2] 官孝群,王跃祥,吴良成,等. 血管生成抑制因子 K4K5 cDNA 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. *生物工程学报*, 2001, 17 (2) : 126-130.
- [3] 朱家文,武斌,陈葵,等. 离子交换层析分离纯化重组人血清白蛋白[J]. *华东理工大学学报:自然科学版*, 2002, 28 (4) : 341-345.
- [4] 王艳萍,高文,侯建华,等. 牛肉风味强化肽(BMP)表达载体的构建[J]. *天津科技大学学报*. 2008, 23 (3) : 16-20.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 72: 248-254.
- [6] Guo Y J. Protein electrophoretic technique[M]. Beijing: Science Press, 1998: 54-58.
- [7] 罗磊,丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究硫酸铵盐析分离猪血清 IgG[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27 (1) : 82-88.
- [8] Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins; Handbook of phycollogical method[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978: 71-79.
- [9] 胡一兵,胡鸿钧,李夜光,等. 从一种富含藻胆蛋白的螺旋藻中大量提取和纯化藻蓝蛋白的研究[J]. *武汉植物学研究*, 2002, 20 (4) : 299-302.
- [10] Wang H X, Ng T B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 32 (1) : 44-51.
- [11] Wang H X, Ng T B. Alocasin, an anti-fungal protein from rhizomes of the giant taro *Alocasia macrorrhiza* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 28 (1) : 9-14.