

# Studies on the Extraction of ALDH from Instant Yeast by Ultrasonic Crushing Method and Purification

Baiyong Qian

Guangzhou Kaihong Flavor & Fragrance Co. Ltd., Guangzhou  
Email: ayong200508@126.com

Received: Dec. 11<sup>th</sup>, 2013; revised: Dec. 16<sup>th</sup>, 2013; accepted: Dec. 18<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2013 Baiyong Qian. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** This paper studies the extraction of acetaldehyde dehydrogenase from instant yeast by ultrasonic fragmentation method. And studied the solid-liquid ratio, sample processing, pH, ultrasonic power, the time of ultrasonic influence on the extraction process of instant low sugar yeast through single factor experiment. That gets a set of optimal extraction process: the ratio of material liquid is 1:4, 20 mL capacity, extraction buffer pH 8.0, 300 w ultrasonic power, ultrasonic time of 16 min. Under the optimum process, the enzyme activity of ALDH crude enzyme is up to 3.56 U/mL. The crude enzyme of ALDH liquid used ultrasonic broken method through salting out, dialysis, Sephadex G-75 column chromatography, the ratio of the purified is 2.562, and the specific activity reached 1.24.

**Keywords:** Aldehyde Dehydrogenase; Ultrasonic Broken; Purification

## 超声波破碎法从干酵母中提取乙醛脱氢酶及其分离纯化的研究

钱柏勇

广州市凯虹香精香料有限公司, 广州  
Email: ayong200508@126.com

收稿日期: 2013 年 12 月 11 日; 修回日期: 2013 年 12 月 16 日; 录用日期: 2013 年 12 月 18 日

**摘要:** 本文研究了超声波破碎法从干酵母中提取乙醛脱氢酶的实验, 并通过单因素实验研究了料液比、样品处理量、提取液 pH、超声功率、超声全程时间对低糖型酵母中 ALDH 提取工艺的影响, 得到一组最优的提取工艺: 料液比 1:4、处理量 20 ml、提取缓冲液的 pH 值 8.0、超声功率 300 W、超声全程时间 16 min, 在此最佳工艺下获得的 ALDH 粗酶提取液的酶活力高达 3.56U/mL。超声破碎法得到的 ALDH 粗酶液经过盐析、透析、Sephadex G-75 柱层析后, 其纯化倍数可达 2.562, 比活力达到 1.24。

**关键词:** 乙醛脱氢酶; 超声破碎; 纯化

### 1. 引言

乙醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDH)广泛存在于原核生物和真核生物中, 在辅酶 I 存在的条件下, 它能催化某些醛和酮的脱氢反应<sup>[1]</sup>。在人类和其他许多动物体内, 线粒体乙醛脱氢酶能把对生物体有

害的醛类转化, 因此在细胞解毒研究中, 乙醛脱氢酶受到高度关注<sup>[2]</sup>。人体由肠道吸收摄入的乙醇, 主要在肝脏内代谢。乙醇进入体内后, 首先在乙醇脱氢酶(ADH)的作用下使乙醇脱氢转化为乙醛, 然后在由乙醛脱氢酶(ALDH)的催化作用下, 使乙醛氧化生成

乙酸, 乙酸通过三羧酸循环(TCA)分解为  $\text{CO}_2$  和水, 并释放能量生成  $\text{ATP}^{[3]}$ 。乙醇在人体内的代谢途径有乙醇脱氢酶(ADH)催化的乙醇氧化体系、肝线粒体乙醇氧化体系(MEOS)、乙醛脱氢酶(ALDH)催化的乙醛氧化体系和过氧化氢酶体系、NADPH 氧化酶体系<sup>[4]</sup>。乙醛是毒性很强的物质, 可以共价结合微粒体蛋白形成乙醛蛋白络合物, 抑制肝细胞合成蛋白的排出, 最终造成人体酒精性肝病的发生。而且乙醛还在体内通过黄嘌呤氧化酶转变为超氧化物, 使膜脂质过氧化生成丙二醛和壬烯, 它们可以进一步促进肝细胞释放因子, 破坏细胞膜<sup>[5-7]</sup>。当乙醛在体内累积过多时, 会使人酒后产生脸红、恶心、呕吐、全身出汗、肌肉抽搐等症状, 严重时会导致休克。乙醛在体内是潜在的致癌物质, 能引起体内口腔、肝脏、食道、肠道癌<sup>[8]</sup>。因此, 乙醛在 ALDH 的催化作用下氧化分解至关重要, 例如可以应用 ALDH 来开发解酒药物制品<sup>[9]</sup>, 加快体内乙醛的代谢速度。

本文利用超声破碎法从干酵母中提取 ALDH, 研究了超声破碎法中各因素对提取 ALDH 的影响, 得到一组最佳的反应参数, 并对超声破碎法得到的 ALDH 粗酶液进行了分离纯化, 得到了比较高纯度的 ALDH 酶液。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂与仪器

即发干酵母(乐斯福明光有限公司)、氧化型辅酶 I (广州市齐云生物技术有限公司)、无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、紫外可见光光度计(上海棱光技术有限公司)、台式高速冷冻离心机(EPPENDORF A.G)。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 酵母的处理

取 1.5 g 干酵母, 放入盛有 15 mL 蒸馏水的试管中。混匀, 于 35℃ 水浴中孵育 15 min, 制得菌悬液。将菌悬液于 4℃、5000 r/min、离心 5 min, 弃上清液, 蒸馏水清洗 1 次, 再次离心, 取沉淀并保存于 4℃ 冰箱备用。

#### 2.2.2. 粗酶液的制备

将湿酵母按质量体积比 1:3(w/v) 重悬浮于 0.05

mol/L PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ , pH8.0, 浓度 0.05 mol/L) 中, 于冰水浴中超声波破碎, 条件: 功率 300 W、破碎时间 3 s、间隙时间 1 s、总时间 15 min。将破碎液于 4℃、5000 r/min 条件下离心 15 min, 收集上清液, 即为粗酶液, 按 2.3.1 所述测定酶活。

#### 2.2.3. 酶活的测定方法

酵母 ALDH 酶活检测: 配制 3mL 酶活性测定体系, 体系中含有 1 mol/mL Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol/m LNAD<sup>+</sup>、3 mol/mL KCl、100 mmol/L 乙醛、1 mol/L 巯基乙醇(2-Me) 0.03 mL 和 10% 吡啶 0.02 mL。分别将酶活性测定体系和待测酶液在 25℃ 恒温水浴箱中水浴 5 min; 将待测酶液迅速加入酶活测定体系中。立即放入紫外分光光度计中, 在连续 5 min 内。每隔 1 min 读取 340 nm 处的吸光度值。

#### 2.2.4. 蛋白质含量测定方法

参照 Bradford 法, 0~100  $\mu\text{g/mL}$  标准曲线的制作: 取 6 支 10 mL 干净的具塞试管, 按表 1 取样。盖塞后, 将各试管中溶液用微型涡轮旋转器混合均匀, 放置 2 min 后用 1 cm 光径的比色皿在 595 nm 波长下比色, 记录各管测定的吸光度  $A_{595}$  nm, 并做标准曲线。

#### 2.2.5. 柱层析处理

SephadexG-75 凝胶柱层析: 将经过充分溶胀的 SephadexG-75 装柱, 色谱柱直径 2.4 cm, 柱高 20 cm。0.05 mol/L pH 8.0 的 PBS 液进行平衡。平衡后, 分别取 1 mL 已经过透析处理的酶液和未经过透析处理的酶液上样, 0.05 mol/L pH 8.0 的 PBS 液进行洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 观测洗脱峰, 并进行收集。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 超声波破碎法提取因素的考察结果

试验在其他因素不变的条件下, 对影响 ALDH 提取效果的料液比、提取液 pH、超声功率、超声全程时间等因素分别进行了考察, 对提取的粗酶液进行 ALDH 活性测定, 以确定各影响因素的适宜水平。

### 3.2. 料液比对 ALDH 提取效果的影响

分别按照料液比(w/v)为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的量加入酵母泥和 pH 8.0、0.05 mol/mL 磷酸盐缓冲溶液, 进行超声提取, 超声功率 300 W, 每超声 3 s

Table 1. L9 (33) orthogonal tests  
表 1. L9 (33)正交实验表

序号	pH(A)	超声功率 (B)/W	超声时间 (C)/min	ALDH 酶活力(U/mL)
1	7.5(1)	250(1)	12(1)	2.99
2	7.5(1)	300(2)	16(2)	3.25
3	7.5(1)	350(3)	20(3)	3.11
4	8.0(2)	250(1)	16(2)	3.31
5	8.0(2)	300(2)	20(3)	3.48
6	8.0(2)	350(3)	12(1)	3.08
7	8.5(3)	250(1)	20(3)	2.58
8	8.5(3)	300(2)	12(1)	3.08
9	8.5(3)	350(3)	16(2)	2.84
K1	9.35	8.88	9.14	
K2	9.87	9.80	9.40	
K3	8.49	9.02	9.16	
R	1.38	0.93	0.24	

间歇 1 s, 全程时间 15 min, 所获得 ALDH 活力如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 在使用超声破碎法破碎酵母细胞时, 提取液较少会使细胞破碎不完全, ALDH 活力较低; 而提取液过多又会减少单位体积提取液中所含的酶量, 从而降低 ALDH 活力。当料液比为 1:4 时, 所获得的粗酶提取液的 ALDH 活力最高, 即在此料液比下提取 ALDH, 既可以充分破碎细胞, 又可以获得较高 ALDH 含量的粗酶提取液。

### 3.3. 样品处理量对 ALDH 提取效果的影响

由于超声破碎时所用的是 100 mL 塑料离心管以及所使用的超声变幅杆额定样品处理量范围(20 mL~100 mL), 对所处理的样品量有一定的限制。试验分别取体积 20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL, 按照 1:4 的比例用 pH 为 8.0 的 0.05 mol/mL 磷酸盐缓冲液, 在冰浴条件下, 对 ALDH 进行超声破碎提取, 提取液中 ALDH 活力的测定结果见图 2。

从图 3 可以看出, 在其他相同条件下进行超声破碎提取时, 样品处理量为 20 mL 提取到的 ALDH 活力最高, 因为在此条件下, 酵母细胞破碎较完全, 因此今后实验均采用 20 mL 的样品处理量。

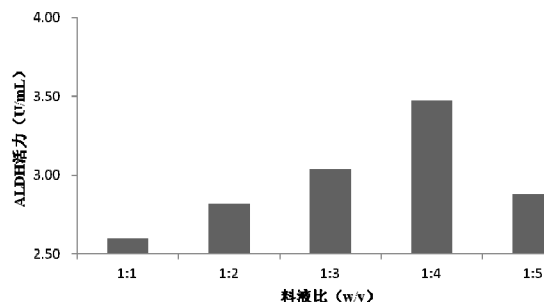


Figure 1. Impact of solid-liquid ratio on the extraction  
图 1. 料液比对提取效果的影响

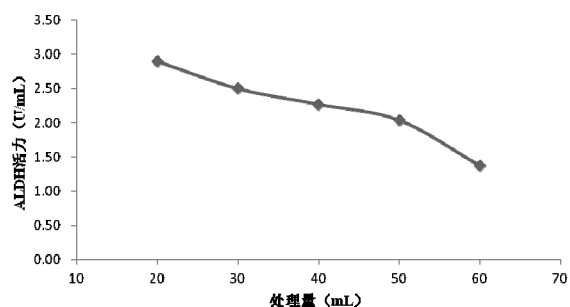


Figure 2. Impact of sample handling capacity on the extraction  
图 2. 样品处理量对提取效果的影响

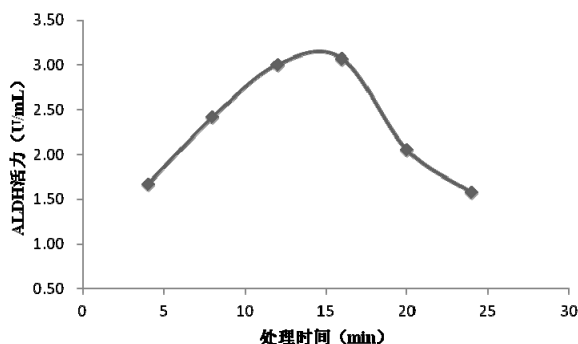


Figure 3. Impact of all ultrasonic time on the extraction  
图 3. 超声全程时间对提取效果的影响

### 3.4. 提取液 pH 对 ALDH 提取效果的影响

在其他条件不变, 配置不同 pH 值磷酸缓冲液, 对湿酵母细胞进行超声破碎, 对提取出来的粗酶液进行 ALDH 活力测定, 结果见图 4。

从图 4 可以看出, 低糖型酵母中 ALDH 提取的适宜缓冲液 pH 范围为 8.0, 此时获得的 ALDH 活力最高, 升高或降低提取缓冲液的 pH 值, 会引起酶结构的变化, 从而导致 ALDH 活力的下降。

### 3.5. 超声功率对 ALDH 提取效果的影响

超声功率太小时无法实现细胞的完全破碎, 但是

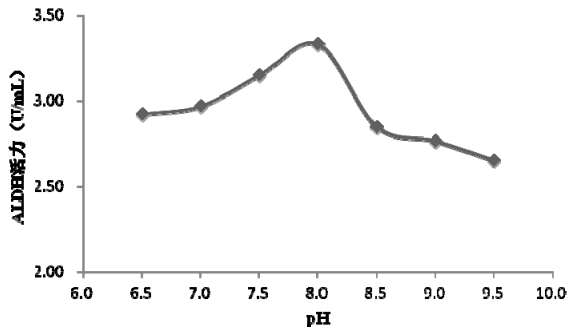


Figure 4. Impact of pH on the extraction  
图 4. pH 对提取效果的影响

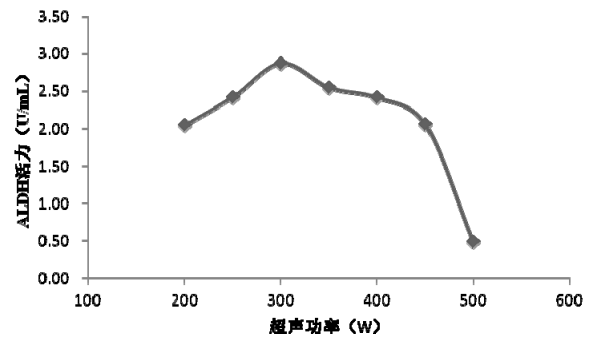


Figure 5. Impact of ultrasonic power on the extraction  
图 5. 超声功率对提取效果的影响

如果功率太大则会由于高温的产生,对酶的活性造成影响。因此,选取合适的超声功率很重要。在其他条件不变,选用不同的超声功率对酵母进行超声破碎,对提取出的粗酶液进行 ALDH 活力测定,结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出,超声功率不同,酵母中 ALDH 的提取结果差异较大。比较适宜于雪峰低糖型酵母中 ALDH 提取的超声功率在 300 W。因此今后的提取实验中,采用在超声功率 300 W 下进行试验。

### 3.6. 超声全程时间对 ALDH 提取效果的影响

在其他条件不变,实验选用不同的超声全程时间,对不同超声全程时间下提取出的粗酶液进行 ALDH 活力测定,测定结果如图 3。

从图 3 可以看出,选取不同的全程时间对雪峰低糖型酵母细胞进行超声处理后,所得提取液的 ALDH 活力有很大差异,其中全程时间为 16 min 时,超声破碎处理得到的 ALDH 粗提液活力最高,实验初步确定的最佳超声破碎全程时间为 16 min。

### 3.7. 雪峰低糖型酵母中 ALDH 提取工艺优化结果

根据单因素考察的结果综合分析后,以超声全程时间、超声功率、溶液 pH 值这三个因素为考察对象,选用 L9 (33)正交表进行 3 因素 3 水平正交设计,以 ADH 活力为指标,优化低糖型酵母中 ALDH 的提取工艺,结果见表 1。

由表 1 极差分析结果可知,各因素对低糖型酵母中乙醇脱氢酶提取结果影响的主次顺序为:提取缓冲液 pH 值的影响>超声功率的影响>超声全程时间的影

响。因此得知,在 ALDH 提取中,影响提取效果的重要因素是提取缓冲液的 pH 值。根据正交试验优化组合选定原则,本试验所得的雪峰低糖型酵母中乙醇脱氢酶的最佳提取工艺为:A2B2C2 组合。即提取缓冲液的 pH 值为 8.0,超声功率 300 W,超声全程时间为 16 min。

该组合在正交试验表中未出现,需要进一步通过试验进行验证。为验证最优组合的正确性,在最优提取工艺条件下,重复三次进行实验,ALDH 活力高达 3.56 U/mL。可见极差分析得到的提取方案可行,可作为低糖型酵母中 ALDH 提取的最优方案。

### 3.8. 硫酸铵分级沉淀

#### 3.8.1. 硫酸铵初步沉淀分离

取九组试管,每组四支(其中一支为空白对照,三支做平行待测样),每支试管中加入 5 mL 粗酶提取液,加入相应质量的固体硫酸铵粉末,分别制成饱和度为 0%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 的硫酸铵溶液,室温下静置 1 h, 10,000 r/min 离心 10 min,收集上清液,检测其中 ALDH 活力,结果见表 2 所示。

从表 2 可以看出,硫酸铵的饱和度在 40%时 ADH 活力开始显著下降,为了有效地对低糖型酵母中的乙醛脱氢酶进行提取,实验确定采用 40%饱和度的硫酸铵浓度进行初步除杂。

#### 3.8.2. 硫酸铵进一步沉淀分离

方法:将已制备好的粗酶液分为六组,每组 5 mL,其中一组为对照,不加硫酸铵,其余 5 组分别加入 1.215 g 粉末状固体硫酸铵,制成 40%饱和度的硫酸铵溶液,室温下静置 1 h, 10,000 r/min 离心 10 min,收

Table 2. Determination of enzyme activity after first precipitation of ammonium sulfate  
表 2. 硫酸铵初步沉淀后 ALDH 活力测定结果

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
硫酸铵饱和度(%)	0	10	20	25	30	35	40	45	50
粗酶液(mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
加入硫酸铵(g)	0	0.280	0.570	0.720	0.880	1.045	1.215	1.385	1.565
ALDH 活力(U/mL)	3.513	3.309	3.197	3.109	3.106	3.135	2.807	2.556	2.363

集上清。在此基础上,加入相应质量的粉末状固体硫酸铵,分别配成饱和度为 40%、70%、75%、80%、90%的硫酸铵溶液。室温下静置 1 h, 10,000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀,于每支试管中加入 5 mL 0.05 mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液,将沉淀溶解,测定 ALDH 活力与蛋白含量。结果如表 3 所示。

从表 3 可以看出,40%饱和度的硫酸铵沉淀中 ALDH 活力很低,证明其中所含 ALDH 的量很少,大部分乙醛脱氢酶分布于上清液中。用饱和度为 75%硫酸铵再沉淀时,其 ALDH 活力大小与粗酶液中的 ALDH 活力相差不大,证明 ALDH 沉淀较完全。因此,采用 75%饱和度的硫酸铵溶液进行沉淀,既可以获得较高的 ALDH 活力,又可以减少杂蛋白的共沉,提高 ALDH 纯化效率。

实验选用 40%饱和度的硫酸铵进行初步沉淀,室温下静置 1 h, 10,000 r/min 离心 10 min, 收集上清,加入相应质量的固体硫酸铵粉末,制成饱和度为 75%硫酸铵溶液,进行二次沉淀,室温下静置 1 h, 10,000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀,加入 5 mL 0.05 mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液进行溶解,得到盐析后的酶液。

### 3.9. 透析

选用分子量为 8000~10,000 的透析袋,装入 1/2 经硫酸铵二次沉淀处理后的酶液,进行透析,选用 50 mmol/L pH8.0 PBS 液做为透析液,透析 24 h,平均每 8h 更换一次透析液。

### 3.10. 柱层析结果

将经过充分溶胀的 SephadexG-75 装柱,色谱柱直径 24 cm,柱高 20 cm, 0.05mol/LpH 8.0 的 PBS 液进行平衡。平衡后,取 1mL 已经过透析处理的酶液上样,0.05 mol/LpH 8.0 的 PBS 液进行洗脱,流速为 0.4 mL/min,观测洗脱峰,并进行收集,结果见图 6。

从图 6 可以看出,ALDH 透析液经过 Sephadex G-75 凝胶柱层析后,280 nm 波长处检出两个明显的蛋白质峰。收集出峰处各管的溶液,检测其酶活性,图 6 中的 15~18 管均检测出有 ALDH 活性,说明 ALDH 大部分集中在第一个蛋白吸收峰。

经过盐析,透析,柱层析分离纯化后,酶液的 ALDH 活力和比活力测定结果如表 4 所示。

从表 4 可以看出,从低糖型酵母中提取 ALDH 后,经过盐析,透析, Sephadex G-75 柱层析和经过盐析,其纯化倍数可达 2.562,以及经过盐析和 Sephadex G-75 柱层析后,其纯化倍数可达 2.576。后者的纯化倍数更高于前者,并且 ALDH 经过透析后比活力有所降低,可能原因是 ALDH 长时间在盐溶液里容易失去活力。

## 4. 结论

通过超声破碎法从酵母细胞中提取 ALDH 并检测所得产物的 ALDH 活力,并采用硫酸铵盐析沉淀法、柱层析法对所得到的乙醇脱氢酶粗酶液分别进行分离纯化,得以下结论:

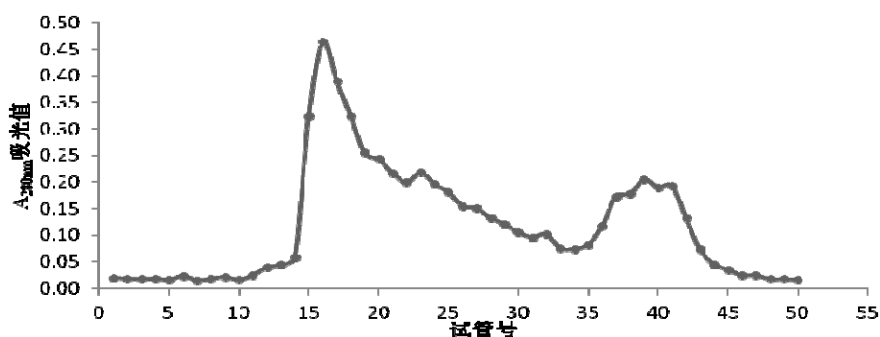
1) 考察了料液比、样品处理量、提取液 pH、超声功率、超声全程时间对低糖型酵母中 ALDH 提取工艺的影响,并就其中的主要影响因素进行了 L9(33)正交试验。

提取低糖型干酵母中 ALDH 的最佳工艺为:料液比 1:4、处理量 20 ml、提取缓冲液的 pH 值 8.0、超声功率 300 W、超声全程时间 16 min,在此最佳工艺下获得的 ALDH 粗酶提取液的 ALDH 活力高达 3.56 U/mL。

2) 低糖型酵母 ALDH 粗酶液采用 40%饱和度的硫酸铵溶液进行初步除杂,75%饱和度的硫酸铵溶液进行二次除杂,选用分子量为 8000~10000 的透析袋进行透析。将盐析液和透析液分别经 Sephadex G-75

**Table 3. Determination of enzyme activity after second precipitation of ammonium sulfate**  
**表 3. 硫酸铵进一步沉淀后 ALDH 活力的测定结果**

管号	1	2	3	4	5	6
硫酸铵饱和度 (%)	0	40	70	75	80	90
粗酶液(mL)	5	5	5	5	5	5
加入硫酸铵(g)	0	1.215	1.145	1.365	1.59	2.095
ALDH 活力(U/mL)	3.762	0.295	2.643	2.740	2.248	2.075
比活力(U/mg)	0.491	0.071	1.005	1.079	0.848	0.737



**Figure 6. Protein absorption peak of dialysis liquid**  
**图 6. 透析液的蛋白吸收峰**

**Table 4. The result of ALDH purification**  
**表 4. ALDH 的纯化结果**

	粗酶液	盐析液	透析液	盐析液过柱后的酶液	透析液过柱后的酶液
ALDH 活力(U/mL)	3.534	2.567	1.061	0.113	0.046
比活力(U/mg)	0.484	1.056	0.727	1.247	1.240
纯化倍数	0	2.182	1.501	2.576	2.562

色谱柱进行柱层析。经过盐析、透析、Sephadex G-75 柱层析后，其纯化倍数可达 2.562，比活力达到 1.24。

### 参考文献 (References)

- [1] Kelson, T.L., McVoy, J.R.S. and Rizzo, W.B. (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1335**, 99-110.
- [2] Moon, K.H., Abdelmegeed, M.A. and Song, B.J. (2007) Inactivation of cytosolic aldehyde dehydrogenase via S-nitrosylation in ethanol-exposed rat liver. *FEBS Letters*, **581**, 3967-3972.
- [3] 姚桢, 吴长君 (2001) 有关酒精性肝损害的最新研究进展. *日本医学介绍*, **22**, 219-223.
- [4] Ishikawa, H., Yamamoto, H., Tian, Y., *et al.* (2003) Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers. *Mutation Research*, **541**, 71-80.
- [5] Luo, H.R. and Zhang, Y.P. (2004) Aldehyde dehydrogenase (ALDH2) polymorphism and drinking behavior. *Yi Chuan*, **26**, 263-266.
- [6] 李业钊, 李航 (2008) 乙醇代谢酶与乙醇性肝损伤. *医学综述*, **14**, 2788-2791.
- [7] 刘清利, 杨图武 (2006) 乙醛脱氢酶高产菌株 Z0-J01 的选育与酶学特性. *西北农学报*, **15**, 251-254.
- [8] Kurkivuori, J., Salaspuro, V., Kaihovaara, P., *et al.* (2007) Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncology*, **43**, 181-186.
- [9] Sripo, T., Phongdara, A., Wanapu, C., *et al.* (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. *Journal of Biotechnology*, **95**, 171-179.