

# 酿酒酵母胞内无机焦磷酸酶的分离纯化及性质

苟萍\* 杨寿钧

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词** 酿酒酵母, 无机焦磷酸酶, 纯化与性质

**分类号** Q556

无机焦磷酸酶(EC. 3.6.1.1)广泛地存在于自然界, 该酶参与多种代谢途径中的焦磷酸的水解作用。该酶在 DNA 和 RNA 聚合反应、辅酶的合成、氨基酸和脂肪酸活化等反应过程中都起着重要的作用。50 年代 Kunitz 首次从酵母中纯化了该酶<sup>[1]</sup>, 70 年代国外许多学者研究了该酶的性质<sup>[2~4]</sup>。国内对该酶的研究尚未见报道。我们从酿酒酵母中分离纯化了无机焦磷酸酶, 并对其性质进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

AS 2.562 *Saccharomyces cerevisiae* 由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

### 1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽汁培养基。发酵培养基: 酵母培养基。

### 1.3 菌体培养

将保藏菌种接种于斜面培养基上, 28℃ 培养 24h。再将菌接种到种子发酵培养基中(同发酵培养基), 于摇床(200 r/min) 28℃ 培养 24h, 按 10% 接种量接种于液体发酵培养基中, 于摇床(200 r/min) 28℃ 培养 24 h。

### 1.4 蛋白质浓度

按 Lowry 法<sup>[5]</sup>测定。

### 1.5 无机焦磷酸酶活力

按 Negi 和 Irie 报道的方法<sup>[2]</sup>, 适当稀释的酶液于 55℃, pH7.5, 焦磷酸钠浓度为 12 mmol/L, 反应 10 min, 离心。上清液含磷量参照 Fiske 和 Subba Row 法<sup>[6]</sup>适当改进, 加入显色剂后, 室温放置 15 min 测定。在上述条件下, 每分钟释放 1 mg 无机磷所需的酶量为一个酶活力单位。

### 1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用不连续圆盘电泳, 浓缩胶 2.5%, 分离胶 7%, Tris-甘氨酸缓冲液 pH8.3, 考马斯亮兰 G-250 快速染色法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 无机焦磷酸酶的纯化

2.1.1 菌种筛选: 将不同的酵母菌株 AS 2.560、2.561、2.146、2.375、2.240、2.559、2.562、2.558 和 2.630 按

\* 新疆大学生物系 乌鲁木齐 830046

收稿日期: 1996-11-06

上述培养得到菌体发酵液,离心收集菌体。菌体用蒸馏水洗涤三次,用 pH7.5Tris-HCl缓冲液洗涤二次,每次洗涤后均采用离心法除上清液。然后以菌体湿重 5 倍量加 50mmol / L pH7.5 Tris-HCl缓冲液悬浮菌体,冰浴中用 150MSE 超声波破碎仪间歇超破细胞 10 min, 10000 r / min 离心 20 min, 分别测上清液酶活力。AS2.562 菌株酶活力较高,因此选用该菌株。

**2.1.2 粗酶液制备:** AS2.562 菌株按前述方法培养,发酵液在 4℃ 10000 r / min 离心 20 min, 收集菌体。用蒸馏水及 Tris-HCl 缓冲液洗涤,加 5 倍量 50 mmol / L pH7.5Tris-HCl 缓冲液,超声波处理 10 min。10000 r / min 离心 30 min, 收集上清液。分别测试了上清液 10% 硫酸铵饱和度至 80% 饱和度下沉淀物中的酶活力。结果发现,饱和度在 50%~80% 酶活力及酶活力回收较高。收集得到的上清液置冰浴中,加  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  使其饱和度达到 50%, 放置 6 h, 离心除去沉淀,上清液继续加  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  使其饱和度为 80%, 放置过夜,离心得到沉淀,用少量 pH7.5Tris-HCl 溶解,得到粗酶液。

**2.1.3 DEAE-纤维素柱层析:**粗酶液先对水透析,再对 50 mmol / L pH7.5Tris-HCl 透析。上 DEAE-纤维素 (DE-52) 柱 (2 × 45 cm), 上样前预先用 50 mmol / L pH7.5Tris-HCl 平衡,上样后,先用相同缓冲液洗脱两个床体积,再用含 NaCl 10~0.3 mol / L 的 Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液梯度洗脱,流速 10ml / 20 min, 10 ml 收集一管,洗脱曲线见图 1。

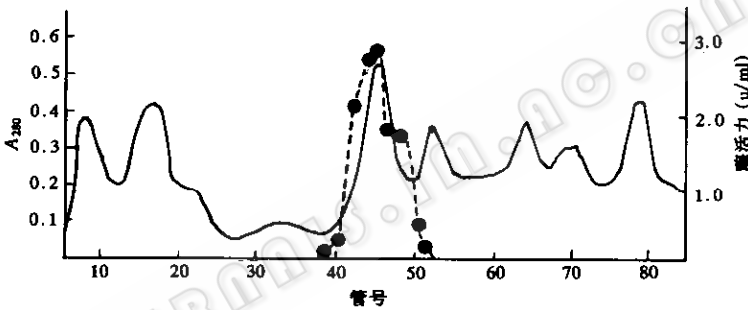


图1 无机焦磷酸酶的DEAE-纤维素柱层析  
—— $A_{280}$ ; ---酶活力。

通过层析图可知,有一个酶活性峰。在活性峰中,44号管做PAGE电泳检验为一条带,45号、46号、47号管为两条带,见图2。无机焦磷酸酶的主要纯化步骤见表1。

表1 无机焦磷酸酶的纯化

步骤	体积 (ml)	总蛋白 (mg)	总活力 (u)	比活力 (u/mg)	纯化倍数	产率 (%)
粗酶液	400	1752.0	1000.0	0.57	1.00	100.0
硫酸铵沉淀	54	581.0	861.8	1.48	2.59	86.0
DEAE-纤维素柱层析	11	4.0	29.7	7.50	13.0	3.0

## 2.2 无机焦磷酸酶的性质

**2.2.1 温度对酶活力及稳定性的影响:**用标准测活方法在不同温度下测酶活力,结果表明,酶的最适温度为 60℃。将酶在不同

温度下保温 30 min,冰浴冷却后,按标准测酶活力方法测定酶的剩余活力,以不经保温的酶活力定为 100%。结果表明,酶在 45℃ 以下比较稳定。

**2.2.2 pH 对酶活力的影响:**酶液和不同 pH 缓冲液在 55℃ 保温 10 min 后,按标准测活方法测定酶活力, (pH3.0~6.6 用 0.1mol / L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH7.0~8.5 用 0.1 mol / L Tris-HCl 缓冲液, pH9~10

用 0.05 mol / L 甘氨酸-NaOH 缓冲液)。该酶的最适 pH 为 7.4~7.8。

**2.2.3 金属离子对酶活性的影响:** 在酶反应液中加入不同金属离子,使其终浓度为 1 mmol / L,按标准方法测酶活力,结果表明,除加  $Mg^{2+}$  的酶活力很高外,加  $Co^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  的酶活力很低。加其它金属离子  $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  均无酶活力。不加任何金属离子的酶也无酶活力。表明该酶需要  $Mg^{2+}$  为辅因子。 $Mg^{2+}$  浓度对酶活力亦有影响,在不同  $Mg^{2+}$  浓度下测定酶活力,酶活力随  $Mg^{2+}$  浓度增加而增加,在  $Mg^{2+}$  达到 10 mmol / L 时,酶活力最高。但高于 10 mmol / L 时,酶活力迅速下降。进一步又测定了在 5 mmol / L 的  $Mg^{2+}$  存在下,加入其它各种金属离子(其它金属离子最终浓度为 1 mmol / L)酶活力变化,以只加入 5 mmol / L  $Mg^{2+}$  的酶活力为 100%。 $Ca^{2+}$  完全抑制酶活力, $Fe^{2+}$  对酶活力无影响, $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  对酶活力有一定抑制。

**2.2.4 酶作用于无机焦磷酸钠的米氏常数和最大反应速度:** 酶液适当稀释,选取一系列底物浓度,标准方法测酶活力,按 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图,该酶的  $K_m$  为 19.3 mmol / L,  $V_{max}$  为 16.8 u / ml。

### 3 讨论

以前报道已对不同来源无机焦磷酸酶的分离纯化方法、性质进行了研究,不同来源的无机焦磷酸酶纯化方法各异,其性质也不相同。我们从 AS.2.562 酿酒酵母提取得到的无机焦磷酸酶对热较稳定,最适温度为 60℃,比链丝菌(*Streptomyces aureofaciens*)的酶要高 20℃<sup>[8]</sup>。酶在 45℃ 保温 30min,酶活力不受影响,该酶最适 pH 为 7.4~7.8,与 Cooperman 的结果<sup>[9]</sup>略有不同(pH7.0)。该酶的辅因子为  $Mg^{2+}$ ,结果与以前报道相同<sup>[3,10]</sup>。在 5 mmol / L 的  $Mg^{2+}$  存在下,再加入其它金属离子, $Fe^{2+}$  对酶活力无影响, $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Co^{2+}$  不同程度抑制酶活力, $Ca^{2+}$  则完全抑制酶活力。

**致 谢** 本实验所用菌种由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心贾建华赠送,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Kunitz M. *J Gen physiol*, 1952, 35: 423~449.
- [2] Negi T, Irie M. *J Biochem*, 1971, 70: 165~168.
- [3] Hachimori A, Takeda A, Kaibuchi M *et al. J Biochem*, 1975, 77: 1177~1183.
- [4] Baykov A A, Artjukov A A, Avaeva S M. *Biochemical at Biophysica Acta*, 1976, 429: 982~992.
- [5] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L *et al. J Biol Chem*, 1951, 193: 265~275.
- [6] Fiske C H, Subba Row Y. *J Biol Chem*, 1925, 66: 375.
- [7] 李成文, 时华富, 邵军石. 生物化学与生物物理进展, 1983, 6: 71~73.
- [8] Curdova E, Jechova V, Hostalek Z. *Folia Microbiol*, 1982, 27: 159~166.
- [9] Cooperman B S. *Methods Enzymol*, 1982, 87: 526~548.
- [10] Krishnan V A, Gnanam A. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 260(1): 277~284.

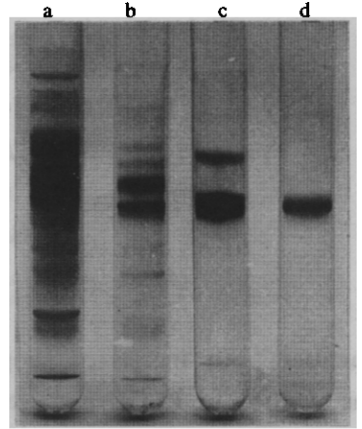


图 2 无机焦磷酸酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳

a. 无细胞提取液; b. 硫酸铵沉淀; c. DEAE 柱层析洗脱 45、46、47 管合并液; d. DEAE 柱层析洗脱 44 号管收集液。

**PURIFICATION AND PROPERTIES OF INTERCELLULAR  
INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Gou Ping\*    Yang Shoujun

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

**Abstract** An inorganic pyrophosphatase (EC3.6.1.1) from *Saccharomyces cerevisiae* was purified to PAGE homogeneity by sonication disruption,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and DEAE-cellulose column chromatography. The optimum pH and temperature of the enzyme were 7.4~7.8 and 60°C, respectively. The  $K_m$  was 19.3 mmol/L. The enzyme required  $\text{Mg}^{2+}$  as a cofactor for hydrolysis of pyrophosphate and was inhibited by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ .

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, Inorganic pyrophosphatase, Purification and properties

\* Department of Biology, Xinjiang University, Urumqi 830046