

用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取糖化酶*

李夏兰 王丽娜

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 用 PEG(聚乙二醇)/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系从黑曲霉粗酶液中萃取糖化酶. 探讨了对糖化酶分配系数、总蛋白分配系数及糖化酶回收率的影响因素. 确定萃取糖化酶的最佳操作条件.

关键词 糖化酶, 聚乙二醇, 双水相体系, 萃取

分类号 TQ 925

糖化酶是我国酶制剂行业用途最广、产量最大的一种酶, 约占酶制剂工业产量的 70%. 目前产品大部份为工业级粗酶, 不能满足日益增长的需求和愈来愈高的质量要求. 连云港市酶制剂厂及黑龙江省轻工业所在此方面做了一定的工作^[1], 但他们采用的有机溶剂沉淀法或超滤方法, 存在有机溶剂耗量多、操作复杂、成本高等缺点, 所以工业应用受到一定的限制. 双水相萃取法, 是近年开发用于大规模分离纯化生物活性物质的新型分离方法. 双水相体系含水量高达 70%~90%, 组成体系的高聚物如 PEG, 葡聚糖和盐如 (NH₄)₂SO₄ 对生物活性物质不仅没有毒害, 而且有稳定和保护作用, 因而使工业化大规模分离生物活性物质成为可能.

1 材料和方法

1.1 主要原材料

PEG(上海市化学试剂一厂产品); 糖化酶粗液(每 mL 含 10 000 酶活单位, 福建省泉州市清源啤酒厂); 其它试剂均为市售, 纯度为化学纯.

1.2 实验方法

(1) 糖化酶活性的测定. 参照碘量法改良.

(2) 总蛋白的测定. 用 Folin-酚法, 结晶牛血清蛋白为标准品.

(3) 双水相体系的制备. 在一小烧杯中按实验要求加入一定比例的 PEG(聚乙二醇)溶液、(NH₄)₂SO₄ 溶液和一定量的糖化酶粗液, 双水相系统总体积为 25 mL. 磁力搅拌, 调节 pH 值, 在 2 000 r·min⁻¹ 的转速离心 10 min. 分别测定上下相体积、双水相的糖化酶活性及总蛋白含量. 有关计算公式为: 糖化酶分配系数 $K_e = \text{下相酶活 } C_b / \text{上相酶活 } C_t$; 总蛋白分配系数 $K_p = \text{下相总蛋白含量} / \text{上相总蛋白含量}$; 糖化酶回收率 $\eta = 1 / (1 + 1 / RK_e)$; 相比 $R = \text{下相体积 } V_b / \text{上相体积 } V_t$.

* 本文 1996-02-27 收到

2 结果与讨论

2.1 单一因素对糖化酶萃取的影响

2.1.1 PEG 平均分子量 \bar{M} 的影响 在 PEG 的质量分数 w_{PEG} 为 0.20, pH 为 6.0, 粗酶液体积分数 v 为 0.08, 搅拌时间 t 为 10 min, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为饱和溶液, NaCl 质量分数 w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 1 所示. 当随着 \bar{M} 的增大, K_e 增大, K_p 减少; 当 \bar{M} 为 6 000 时, K_e 最大, K_p 最小, η 为 96.2%. 在 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相系统中, PEG 在上相含量较高. \bar{M} 愈低, 其亲水性愈强. 对亲水性较强的糖化酶而言, 易分配于富含该聚合物的相, 则 K_e 愈小. 随着 \bar{M} 的增大, 其空间位阻相应增大, 疏水性增大, 使更多的糖化酶排斥到含 PEG 少的下相中, 则 K_e 逐渐增大. 但 \bar{M} 不能过大, 若大于 8 000 时, 则由于 PEG 在水中溶解度太小而无法形成双水相.

2.1.2 PEG 质量分数 w_{PEG} 的影响 在 pH 为 6.0, v 为 0.08, t 为 10 min, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为饱和溶液, w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 2 所示. 随着 w_{PEG} 增大时, K_e 先增大后减少, K_p 与之相反; 在 w_{PEG} 为 0.30 处, K_e 最大, K_p 接近于最小, η 最大为 97.5%. 此时, 有利于萃取.

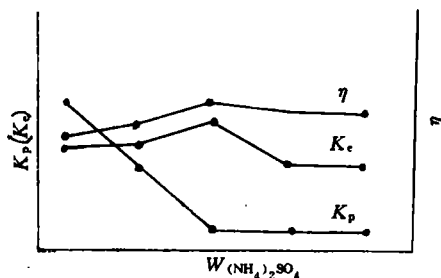


图 1 \bar{M} 与 K_e , K_p , η 的关系曲线

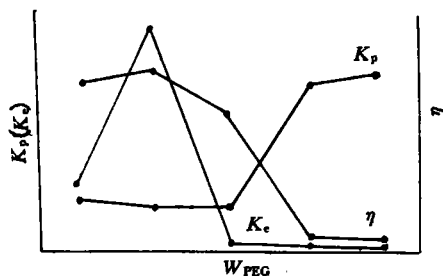


图 2 w_{PEG} 与 K_e , K_p , η 的关系曲线

在一定 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下, w_{PEG} 低时, 接近临界点, 不易形成双水相. 随着 w_{PEG} 的增大, 系统远离临界点, 两相差别增大, 易于形成两相. 但同时空间位阻增加, 富含 PEG 相的疏水性增加, 使亲水性较强的糖化酶趋向于含 PEG 少的下相, 则 K_e 增大. 但 w_{PEG} 过大, 系统粘度增大, 影响传质, 则 K_e 下降.

2.1.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 $w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 的影响 在 w_{PEG} 为 0.30, pH 为 6.0, v 为 0.06, t 为 10 min, w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 3 所示. $w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 的变化对 K_e , η 影响不大, 主要是影响 K_p . 当 $w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 在 0.28~0.38 之间. 随盐浓度的增大, K_e 下降至 0.01 附近趋稳, 而 η 也稳定在 92.0% 左右. 考虑 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 成本核算, 选择 $w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 为 0.38 为佳.

各种无机离子对 K_e , K_p 的影响较为复杂. 因为各种无机离子在两种中分配情况不同, 而影响无机离子分配的因素较多(如系统高聚物种类, pH, 无机离子种类等). 当两水相平衡时, 双水相必须保持电中性, 因此在两相间会形成电位差, 而电位差的大小直接影响到 K_e , K_p ^[2]. 但盐浓度不能过高. 否则, 会破坏糖化酶表面的水化层, 糖化酶在下相发生盐析, 使 K_e 下降.

2.1.4 pH 值的影响 在 w_{PEG} 为 0.30, v 为 0.08, t 为 10 min, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为饱和溶液, w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 4 所示. 当 pH 6.0 时, K_e 最大, K_p 最小, η 为 92.2%. 因为 pH 影响糖化酶可以离解基团的离解度. pH 的变化改变了糖化酶的电性和表面性质, 同时也改变了无机离子的分配情况, 从而影响两相之间的电位差, 最终影响 K_e , K_p . 就 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 系统而言,

上相电位为正,下相电位为负.糖化酶的 $PI=3.5\sim 6.0$.当 $pH>6.0$ 时,糖化酶带负电,随着 pH 的增大,糖化酶更宜分配到电位为正的上相,则 K_e 下降;当 $pH<6.0$ 时,情况恰好与之相反.

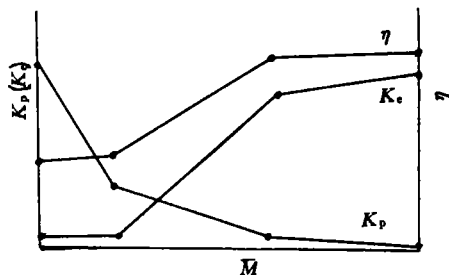


图3 $w_{(NH_4)_2SO_4}$ 与 K_e, K_p, η 的关系曲线

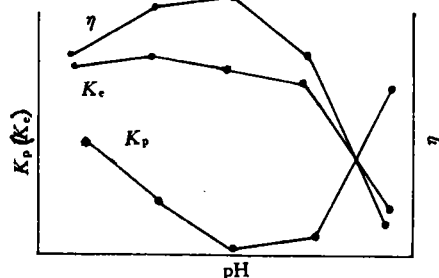


图4 pH 值与 K_e, K_p, η 的影响

2.1.5 NaCl 质量分数 w_{NaCl} 的影响 在 w_{PEG} 为 0.30, pH 为 6.0, v 为 0.08, t 为 10 min, $(NH_4)_2SO_4$ 为饱和溶液的条件下,结果如图 5 所示. w_{NaCl} 为 0.04 时, K_e 最大, K_p 最小, η 为 95.1%. NaCl 加入量与 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度化对 K_e, K_p 的影响其本质是一致的.即改变了两相间的电位差,从而影响 K_e, K_p . 值得重视的是, NaCl 的加入大大缩短了分相的时间. 不加 NaCl, 分相时间为 15~20 min; 加入 NaCl, 自然分相时间为 3~5 min. 自然分相时间直接影响分离的效果, 并且是进行分相设备设计和选择的重要因素. 因此, 选择加入 w_{NaCl} 为 0.04 时, 既能保证萃到效果, 又能缩短分相时间.

2.1.6 搅拌时间 t 的影响 在 w_{PEG} 为 0.30, pH 为 6.0, v 为 0.08, $(NH_4)_2SO_4$ 为饱和溶液, w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 6 所示. t 对 K_e, K_p 有影响, 对 η 几乎没有影响. 当 t 为 10 min 时, K_e, K_p 最小, η 为 95.0%. 这是因为搅拌时间影响了酶的活性, 从而影响 K_e, K_p .

2.1.7 粗酶液加量 v 在 w_{PEG} 为 0.30, pH 为 6.0, t 为 10 min, $(NH_4)_2SO_4$ 为饱和溶液, w_{NaCl} 为 0 的条件下, 结果如图 7 所示. 理论上, K_e, K_p 应与 v 无关, 但实际结果表明 K_e, K_p 随粗酶

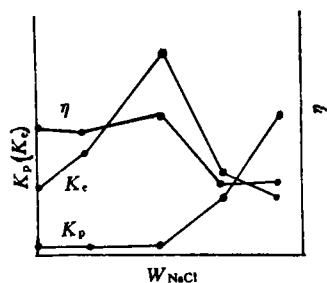


图5 w_{NaCl} 与 K_e, K_p, η 的关系曲线

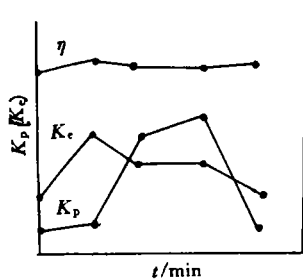


图6 t 与 K_e, K_p, η 的影响

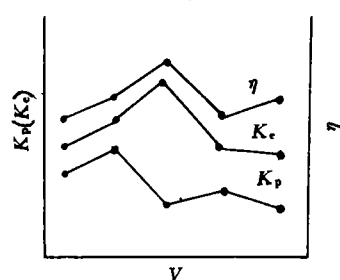


图7 v 与 K_e, K_p, η 的影响

液加量变化而变化. 在 v 为 0.08 时, K_e 最大, K_p 最小, η 为 94.7%.

以上主要是糖化酶 K_e 的变化趋势, 从理论上进行了定性的初步的分析. 随着高分子聚合物溶液理论的深入研究, 必定会为双水相萃取提供完整的理论基础.

2.2 通过正交实验确定萃取糖化酶的最佳操作条件

在单因素实验的基础上, 选择四因素三水平进行正交实验, 实验结果见附表. 利用所得数

据,进行趋势图分析(图略). 得出萃取糖化酶的最佳操作条件:PEG 质量分数 w_{PEG} 为 0.30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 $w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 为 0.33, pH6.0, NaCl 质量分数 w_{NaCl} 为 0.04.

通过极差 R 分析,可发现影响萃取糖化酶因素的排列顺序是:PEG 浓度 > NaCl 浓度 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 > pH 值. 即 PEG 是影响糖化酶 K_e 的最主要因素(附表).

附表 正交试验结果分析表 $L_9(3^4)$

因素	w_{PEG}	$w_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$	pH	w_{NaCl}	K_e
1	0.20	0.28	0.50	0.005	39.1
2	0.20	0.38	0.60	0.010	59.2
3	0.20	0.33	0.70	0.015	54.5
4	0.30	0.28	0.60	0.015	72.1
5	0.30	0.38	0.70	0.005	28.5
6	0.30	0.33	5.00	0.010	87.5
7	0.40	0.28	7.0	0.010	10.5
8	0.40	0.38	5.0	0.015	10.5
9	0.40	0.33	6.0	0.005	11.4
K_1	152.5	121.5	132.5	78.0	
K_2	183.0	0.975	142.5	78.0	
K_3	32.0	1.485	93.0	137.0	
\bar{K}_1	50.8	0.405	44.2	26.0	
\bar{K}_2	61.0	0.495	47.3	50.8	
\bar{K}_3	10.7	0.495	31.0	45.7	
R	50.3	0.170	16.3	24.8	

3 结果

本实验选用 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相具有成本低、操作简单、系统粘度小的优点. 同时, 糖化酶在此双水相系统中分配在下相. 这样就减少了下游加工过程的步骤和反萃取的步骤, 提高了糖化酶的总收率.

参 考 文 献

- 1 孙波, 刘复军. 食品级液体浓缩糖化酶制剂的研究. 生物技术, 1993, 3(2): 10~14
- 2 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学. 上海: 华东化工学院出版社, 1991. 326~329

Extracting Glucoamylase by PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Aqueous Bi-Phase System

Li Xialan Wang Lina

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract Glucoamylase is extracted from aspergillus niger liquid by polyethylene glycol/ ammonium sulfate aqueous bi-phase system. An inquiry is made about the effects of influencing factors on glucoamylase distribution coefficient and total protein distribution coefficient and recovery ratio of glucoamylase. The optimal operational conditions are determined.

Keywords glucoamylase, polyethylene glycol, aqueous bi-phase system, extraction