

用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 两水相从全繆液萃取糖化酶^{*}

李夏兰 王丽娜

(华侨大学化工学院, 泉州 362011)

摘要 PEG(聚乙二醇) 600/(NH₄)₂SO₄ 两水相系统, 能有效地从全繆液直接萃取糖化酶. 在研究 PEG/(NH₄)₂SO₄ 相图的基础上, 探讨了影响糖化酶萃取效果的因素, 确定了萃取糖化酶的最佳工艺条件.

关键词 糖化酶, 全繆液, 双水相, 萃取

分类号 Q 556. 03

目前糖化酶工业产品大多数采用硫酸铵盐析法. 该法只能得到包含菌体、盐类、杂蛋白及其他固形物的粗酶液. 这种酶不能满足食品级酶的质量要求. 本文在从粗酶液萃取糖化酶研究^[1]的基础上, 报道了用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 两水相系统从未经过滤的全繆液直接萃取糖化酶的研究结果.

1 材料和方法

1.1 材料

PEG, 上海市化学试剂一厂出品; 糖化酶全繆液(10 000 u · mL⁻¹), 福建泉州达强酶制剂厂提供. 其它试剂为市售, 纯度均为化学纯.

1.2 实验方法

(1) 糖化酶活性的测定, 参照碘量法改良. (2) 总蛋白的测定采用 Folin-酚法, 以结晶牛血清蛋白为标准品. (3) 两水相相图的制作^[1]. (4) 两水相系统萃取糖化酶全繆液实验: 实验过程均采用重量法配制溶液. 相中所有成分的浓度均以质量分数计算. 按相系统的组成将 PEG, (NH₄)₂SO₄, 蒸馏水加入离心试管中, 加入 1 mL 全繆液, 最后用水调节使系统的总量为 10.00 g. 混合物在旋涡混合器上混合 2 min, 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 静置片刻, 读出上下相体积, 测上下相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 $K_e = \text{上相酶活 } C_t / \text{下相酶活 } C_b$, 总蛋白分配系数 $K_p = \text{上相总蛋白含量} / \text{下相总蛋白含量}$, 糖化酶回收率 $\eta = 1 / (1 + 1 / R K_e)$, 相比 $R = \text{上相体积 } V_t / \text{下相体积 } V_b$.

2 结果和讨论

2.1 两水相相图的绘图

7 种平均分子量 PEG 和 (NH₄)₂SO₄ 组成的两水相系统, 其相图见图 1. 图中 w_{PEG} 为 PEG 的质量分数, $w_{\text{硫酸铵}}$ 为 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数. 由图可见, PEG 的平均分子量不同, 相图中双节线位置与形状也不同. PEG 的分子量愈大, 双节线愈趋向原点且愈不对称, 成相的临界浓度愈低. 同时, 实验观察到 PEG 分子量愈大, 系统的粘度增大, 相分离时间延长.

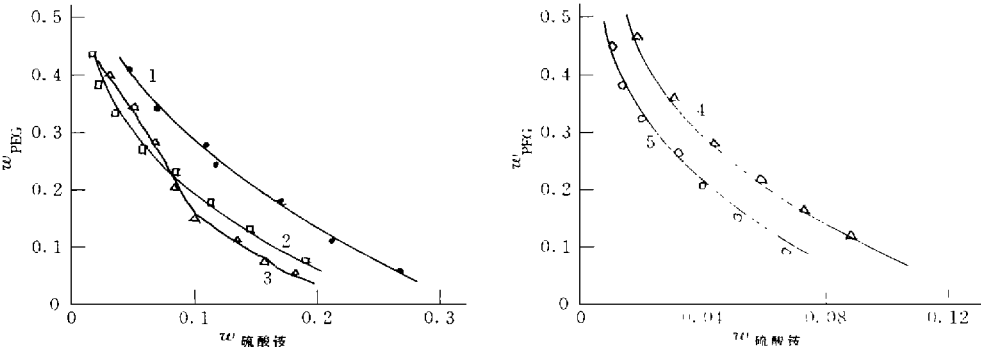


图 1 PEG/(NH₄)₂SO₄ 体系相图

1. PEG 400; 2. PEG 600; 3. PEG 1 000; 4. PEG 2 000; 5. PEG 6 000

2.2 两水相体系的确定

2.2.1 PEG 平均分子量的确定 根据相图, 选择 PEG 400, 600, 1 000, 1 540, 2 000 进行实验. 在 PEG 的质量分数 (w_{PEG}) 为 0.26, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数 ($w_{\text{硫酸铵}}$) 为 0.16, pH 为 4.4, NaCl 的质量分数 (w_{NaCl}) 为 0.10, 全繇液为 1 mL 时进行实验, 结果见表 1 (n 为分子量). 从表可知, PEG 400, PEG 600 其 $K_e > 1$, 即 PEG 平均分子量愈小, 糖化酶趋向于上相分配. PEG 1 000, PEG 1 540 其 $K_e < 1$, 即 PEG 平均分子量增大, 糖化酶趋向于下相分配. 对此结果, 现根据 Albertsson 等人提出的理论进行解释^[1]. Albertsson 根据热力学推导认为, 当不考虑酶或蛋白质电性时, 分配系数 K_0 为

$$K_0 = \frac{C_t}{C_b} = e^{\lambda \frac{M}{RT}}$$

(1)

式中 M 为酶或蛋白质等分子的分子量, λ 为酶或蛋白质等分子与相组分相互作用的参数. λ 取决于相的理化性质和被分配溶质的表面性质, 即

$$\lambda = - \left(\gamma_{\text{Pt}} - \gamma_{\text{Pb}} \right),$$

(2)

式中 γ_{Pt} , γ_{Pb} 表示溶质在上、下相的表面张力. 当考虑酶或蛋白质电性时, 分配系数 K_e 为

$$\ln K_e = \ln K_0 + \frac{Z_i F}{RT} (U_2 - U_1),$$

(3)

式中 $(U_2 - U_1)$ 为下相与上相的电位差, Z_i 为生物大分子的离子价.

从以上公式可知, K_e 与 λ , M , $(U_2 - U_1)$, Z_i 有关. 因此当 PEG 分子量增大时, 单位质量 PEG 其羟基数目减少, 疏水性增加, 则糖化酶在上相的 γ_{Pt} 增大. 根据公式(2), $\lambda < 0$, 在其他条

件固定不变时 $K_e < 0$. 即糖化酶随着 PEG 平均分子量的增大, 糖化酶趋向下相分配. 考虑到相分离时间, 确定 PEG 600 为研究对象.

2.2.2 PEG 600 质量分数的确定 PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数浓度的确定, 必须综合考虑几个方面. (1) PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数必须在相图中双节线的上方, 因为只有在双节线的上方才能形成双水相. (2) 考虑成相的难易. 靠近临界点的系统, 两相形成较难, 但远离临界点系统, 由于高聚物的质量分数增大, 粘度大, 两相分离的时间长. 因此 PEG 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数应适中, 使相分离时间尽可能短. 相分离时间直接影响分离的效果, 同时也是相设备设计和选择的重要因素. (3) 必须考虑 K_e, K_p, η 的情况. 在 K_e, η 尽可能大的前提下, K_p 尽可能小. 这样糖化酶大多分配至上相而杂蛋白分配至下相. (4) 必须使糖化酶分配至上相而菌体分配至下相, 以便液固离心分离.

在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数为 0.16, NaCl 的质量分数为 0, pH 为 4.4 时, 全缣液 1 mL 时进行实验, 结果如图 2 所示.

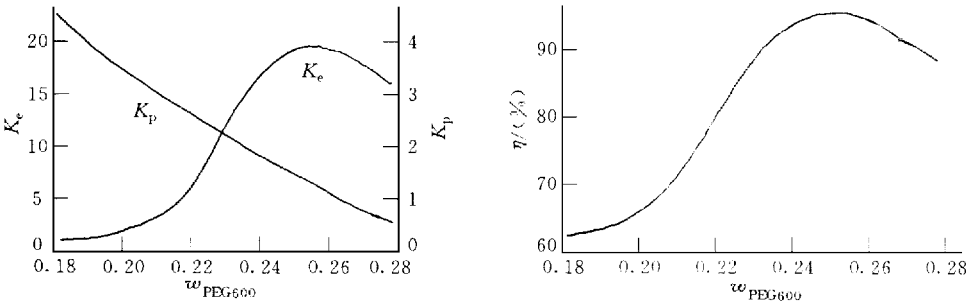


图 2 PEG 600 的质量分数与 K_e, K_p, η 的关系

从图可知, 在实验条件下, 随着 PEG 600 的质量分数的增大, K_e 在 PEG 600 的质量分数为 0.26 有最大值, 此时 η 较高而 K_p 值较小. 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数固定时, PEG 600 的质量分数较低, 接近于临界点, 不易形成两水相; 随着 PEG 600 的质量分数增大, 易形成两水相; 当达到一定的质量分数时, PEG 的空间位阻占主导地位, 糖化酶排斥至下相, K_e 下降, 但相比 R 增大, η 仍有 94.1%.

2.2.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数的确定 在 PEG 600 的质量分数为 0.26, NaCl 的质量分数为 0, pH 为 4.4, 全缣液 1 mL 时进行实验, 结果如图 3. 从图可知, 当 PEG 600 的质量分数固定时,

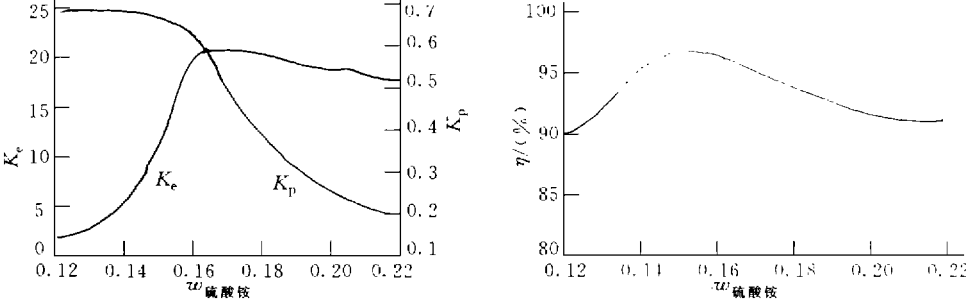


图 3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数与 K_e, K_p, η 的关系

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数对 η 的影响不大, 主要影响 K_e, K_p . 但关键在于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数

小于 0.17, 菌细胞分配于下相, 而 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数大于 0.17, 菌体细胞分配于双水相两界面及上相. 因此, 确定 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数为 0.16 为佳. (NH₄)₂SO₄ 的质量分数不同, 上下相电位差 ($U_2 - U_1$) 不同, 由公式 (3) 可知, K_e 必定不同. 另一方面, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数愈高, 会破坏糖化酶表面的水化层, 则糖化酶发生盐析, 且 K_e 下降.

2.3 影响糖化酶萃取的因素

2.3.1 pH 的影响 在 PEG 的质量分数为 0.26, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数为 0.16, NaCl 的质量分数为 0, 全繇液为 1 mL 进行实验. 结果见图 4. 从图可知, 当 pH = 5.0 时, K_e 最大, K_p 最小, η 最大. 因此 pH = 5.0 最有利于萃取. 因为 pH 影响了糖化酶离解基团的离解, 同时也影响

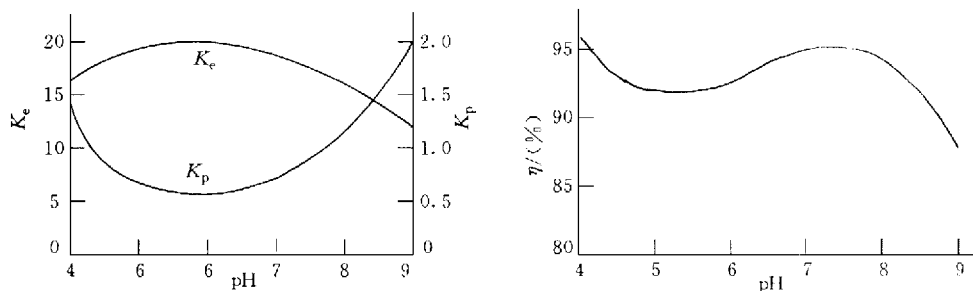


图 4 pH 与 K_e , K_p , η 关系

了 (NH₄)₂SO₄ 的离解. 即影响了公式 (3) 中的 Z_i 及 ($U_2 - U_1$). 另外, pH 影响了糖化酶的稳定性, pH 偏高或偏低, 糖化酶易失活从而影响 K_e .

2.3.2 NaCl 质量分数的影响 在 PEG600 的质量分数为 0.26, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数为 0.16, 全繇液为 1 mL, pH 为 4.4 时进行实验, 结果见图 5. 由图可知, 在 NaCl 的质量分数较低时, NaCl 的加入量对 K_p , η 的影响较小, 主要是影响 K_e . 当 NaCl 加入量 (质量分数) 为 0.006 时, K_e 较大, 同时在实验中观察到此时两相分离时间最短 3.2 min. 因此, 选择 NaCl 质量分数

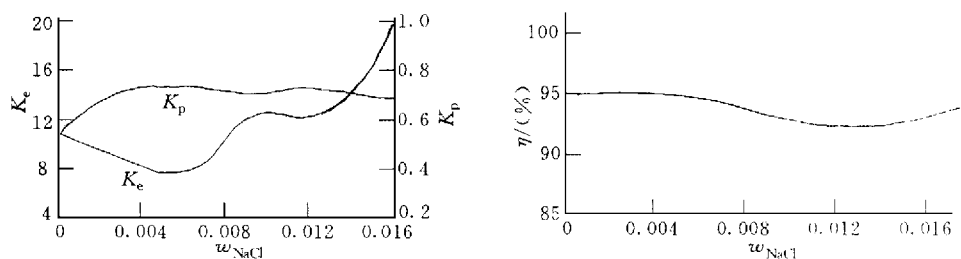


图 5 NaCl 的质量分数与 K_e , K_p , η 关系

为 0.006 的加入量为最佳. NaCl 的加入量与 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数变化对 K_e 的影响其本质是一致的, 即改变了公式 (3) 中的 ($U_2 - U_1$), 从而影响 K_e .

2.3.3 全繇液体积的影响 在 PEG600 的质量分数为 0.26, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数为 0.16, pH 为 4.4, NaCl 加入量 (质量分数) 为 0 时进行实验, 结果见图 6. 双水相萃取时, 单位质量相系统中全繇液的加入量 (V) 是一个重要的参数, 从经济上考虑希望加入量多一些. 从 Alberts-son 理论可知, 全繇液的体积并不影响 K_e , 但从图 6 可见全繇液的体积 (V) 超过 1.5 mL 时, K_e , η 都下降. 因此从萃取时的成本核算考虑, 确定全繇液体积最佳值为 1.5 mL.

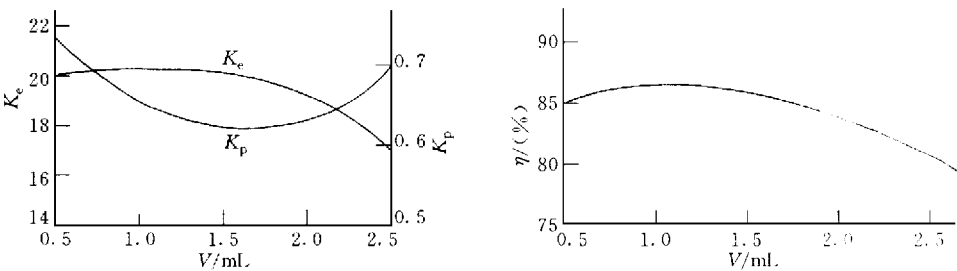


图 6 全繆液体积与 K_e , K_p , η 关系

2.4 用 PEG/ (NH₄)₂SO₄ 两水相萃取糖化酶全繆液

根据本实验确定的最佳操作条件(PEG 600 的质量分数为 0. 26, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数为 0. 16, pH 为 4. 4, NaCl 的质量分数为 0. 006, 全繆液体积为 1. 5 mL), 进行 3 批实验, 结果如表 2 所示. 从表中可看出, 在本实验确定最佳条件下, K_e 为 18. 45 ~ 20. 08, 糖化酶回收率为 96% 以上, 分相时间为 3. 2 ~ 3. 9 min; 同时, 糖化酶主要分配于上相, 而菌体等固形物分配于下相.

表 2 萃取全繆液的结果

批号	K_e	K_p	η (%)
1	19. 17	2. 57	97. 0
2	20. 08	2. 87	96. 4
3	18. 45	2. 43	97. 6

3 结论

本实验采用 PEG 600/ (NH₄)₂SO₄ 双水相系统纯化糖化酶是可行的. 它具有糖化酶回收率高, 操作安全方便, 系统价格低廉, 能直接运用于全繆液等优点. 同时, 它也为两水相萃取糖化酶等生化大分子物质提供理论基础.

参 考 文 献

1 李夏兰,王丽娜. 用 PEG/ (NH₄)₂SO₄ 两水相萃取糖化酶粗酶液. 华侨大学学报(自然科学版), 1996, 17 (4): 407 ~ 410
2 Albertsson P A. Partition of cell particles and macromolecules(2nd). New York: Wiley, 1971. 58 ~ 71

Extracting Glucoamylase from Fermentation Broth by Aqueous Polyethylene Glycol/ Ammonium Sulfate Biphasic System

Li Xialan Wang Lina

(College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract Glucoamylase can be effectively extracted from fermentation broth by aqueous polyethylene glycol/ ammonium sulfate biphasic system. Based on phase diagram of polyethylene glycol/ ammonium sulfate, the authors inquire into factors influencing the effect of glucoamylase extraction; and determine its optimal technological conditions.

Keywords glucoamylase, fermentation broth, aqueous biphasic, extraction