

PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系提取和纯化糖化酶

黄淑霞 吴晓莉 尹卓容

(山东轻工业学院, 山东 济南 250100)

摘要: 用PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系提取、纯化糖化酶, 研究了影响体系分配系数、回收率和纯化因子的因素, 从而确定了萃取糖化酶的最佳条件。在 W_{PEG} 为0.24, $W_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 为0.08条件下, 分配系数最小, 达0.022, 回收率为95.6%。

关键词: 糖化酶; PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 双水相体系; 提取; 纯化

中图分类号: TQ925.2; Q814.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2003)02-0024-02

Extraction and Purification of Saccharifying Enzymes by PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Double Aqueous Phases System

HUANG Shu-xia, WU Xiao-li and YIN Zhuo-rong

(Shandong Light Industry College, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: The saccharifying enzymes were extracted and purified by PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ double aqueous phases system. The factors affecting system distribution coefficients, recycling rate and purifying agents were studied and the optimal conditions of saccharifying enzymes extraction were then confirmed. Under the conditions of W_{PEG} as 0.24 and $W_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ as 0.08, the smallest distribution coefficient obtained as 0.022 and the recycling rate was 95.6%. (Tran. by YUE Yang)

Key words: saccharifying enzymes; PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; double aqueous phases system; extraction; purification

双水相萃取是利用双水相体系如聚乙二醇(PEG)/葡聚糖(Dex)体系、PEG/无机盐等体系的水溶液形成互不相溶的两相, 通过选择合适的成相与分配条件, 使酶、蛋白质及菌体等生物大分子在两相中有不同比例的分配, 从而实现其纯化。由于葡聚糖价格较高, 所以PEG/无机盐系统应用更为广泛。

近年来, 双水相萃取已经发展成为一种适合于大规模生产、经济简便、快速高效的分离纯化技术, 现已被广泛应用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域的产品分离和提取, 在蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离纯化方面更是受到广泛重视。相对于传统溶剂萃取来说, 双水相萃取最大的优势在于双水相体系可为生物活性物质提供一个温和的活性环境, 因而可在萃取过程中保持生物物质的活性及构象, 而且双水相萃取还有收率高、成本低、可连续化操作等优点^[1-2]。

双水相在分离细胞碎片和胞内酶方面显示了取代高速离心和膜分离的潜力。细胞悬浮液经过破碎机后, 与PEG和无机盐在萃取器中混合, 随后分相。通过选择合适的萃取组成和条件, 可以使细胞碎片先分布到下相, 目标蛋白富集到上相, 离心除去细胞碎片, 然后调节组成和条件, 再使目标蛋白富集于下相, 与无机盐分离。

有文献报道, 糖化酶在PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系中的分配, 讨论了PEG分子量、质量分数、pH、酶浓度等对糖化酶分配系数和回收率的影响^[3-4]。本实验在此基础上, 讨论了在PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的不同浓度下糖化酶在两相间的转移, 进一步分析了PEG质量分数、自然分相时间对分配系数和回收率的影响, 并分析评价了纯化因子和物料衡算。

1 材料和方法

1.1 材料

糖化酶: 无锡杰能科生物工程有限公司提供 (酶活约100000 u/g)。

PEG4000, NaOH为市售化学纯, 其他试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 双水相体系的制备: 用干燥的刻度试管准确称取一定量的40% PEG4000水溶液和40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液, 在混合器上混匀, 再加入一定量酶液, 混匀调pH至定值, 在混合器上混合2 min, 静置15 min, 离心10 min (2000 r/min)。读取上下相体积及总体积。分别测上下相及原酶液酶活力。

有关计算公式为:

分配系数 $K = C_u / C_b$

相比 $R = V_u / V_b$

回收率(%)

$$Y = \frac{\text{下相总酶活力}}{\text{上下相酶活力}} = \frac{C_b V_b}{C_b V_b + C_u V_u}$$

式中 C_u 、 C_b ——分别代表上、下相酶活力;

V_u 、 V_b ——分别代表上、下相体积。

纯化因子

$F = \text{纯化后比活} / \text{纯化前比活}$

(比活为每克或每毫升总蛋白或总重量中所含的产品蛋白质的重量或单位)

物料衡算

加入的原液总酶活力

= 上相酶活力 × 上相体积 + 下相酶活力 × 下相体积

1.2.2 糖化酶活性的测定: 次碘酸盐法^[4]。

收稿日期: 2002-11-11

作者简介: 黄淑霞(1979-), 女, 山东菏泽人, 在读研究生, 主要研究生物产品分离分析技术。

2 结果与讨论

2.1 PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度对分配系数和回收率的影响

当体系中只有PEG,没有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,体系不形成双水相;当盐浓度增加到一定量后双水相形成。酶液最初分布在下相,随着盐浓度的增加,酶液逐渐向上移动,先进入两相之间,最后完全进入上相^[5]。分配系数和回收率与PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的关系如图1所示。

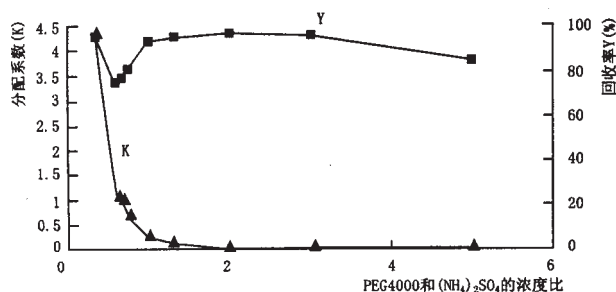


图1 分配系数和回收率与PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度关系

本实验对酶液分布在下相进行了详细研究,从图1可以看出,当PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度比例逐渐增加,分配系数逐渐减小,说明酶液向下相移动的幅度越来越大。回收率先减小又增加。当PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度比例大于3时,分配系数增加(比例为3时 K 为0.022,比例为5时 K 为0.027),回收率下降,虽然回收率在比例等于3时不是最大值,但考虑到此时回收率95.6%已不低,再加上分配系数较小,故选取PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的比例为3。

2.2 PEG质量分数的确定

PEG质量分数的影响如图2所示。随着 W_{PEG} 的增加,分配系数 K 逐渐减小,但当 W_{PEG} 大于一定值时 K 增大(W_{PEG} 为0.24时 K 为0.022, W_{PEG} 为0.286时 K 为0.027);回收率 Y 有一定幅度的变化。要使酶液分配在下相,综合考虑,本实验选择 W_{PEG} 为0.24。

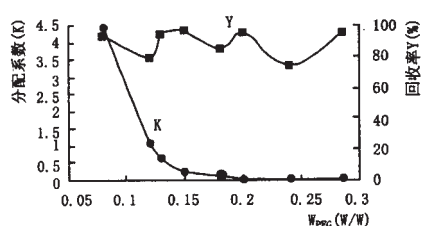


图2 分配系数和回收率与 W_{PEG} 的关系

究其原因,PEG浓度较低时,接近临界点,不易形成双水相;当PEG含量增大时,体系远离临界点,空间位阻增加,PEG上相的疏水性增加,因而亲水性较强的糖化酶趋于下相分布,但当PEG含量过大时,体系粘度增大, K 值增加^[5]。

2.3 自然分相时间的确定

聚合物/盐系统分相时间短,自然分相时间一般为5~20 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^[2-3]。分配系数和回收率与自然分相时间的关系如图3所示。从图3可知,最佳自然分相时间为15 min。

2.4 纯化因子 F

纯化因子 F 反映了纯化糖化酶的最终结果,其具体数据如图4,最大值为2.72,在所选条件下为2.60,综合考虑,以所选条件为最适条件。

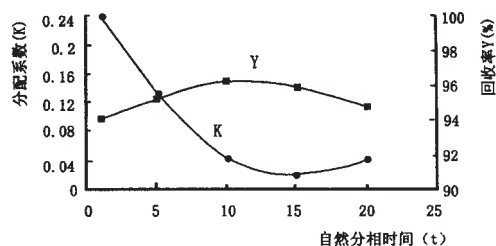


图3 分配系数和回收率与自然分相时间的关系

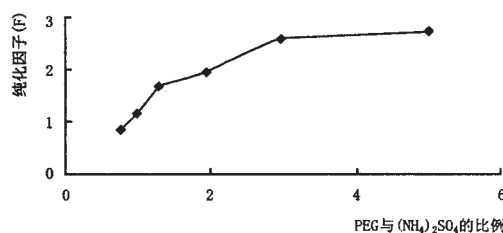


图4 纯化因子和PEG与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的比例关系

2.5 物料衡算的作用

酶活力易受外界环境的影响,如反应温度、时间等,而造成所测酶活力有偏差;或者底物不够大,也会造成所测酶活力偏小等等。由于以上多种潜在原因,这里就需要用物料衡算来评定结果,把实验数据和物料衡算结合起来,作为指导下一步实验的依据。分析双水相体系所得总酶活力和所测原酶活力,如图5。

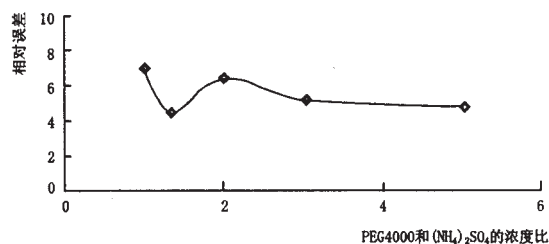


图5 总酶活力相对误差与PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度比例

3 结论

糖化酶的分配系数、回收率在PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的双水相体系中,受多种因素的影响,如PEG4000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度比例关系、自然分相时间等。在其他因素不变的情况下,调整其比例,可以实现酶液从上相到下相的转移。要使酶液分布于下相,通过一系列的实验,确定出适宜的条件:在 W_{PEG} 为0.24, $W_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ 为0.08条件下,分配系数最小达到0.022,回收率为95.6%。

参考文献:

- [1] 邱树毅.液-液双水相萃取分离 α -淀粉酶研究[J].食品科学,2000,21(9):12-14.
- [2] 李伟,等.双水相萃取技术在药物分离和提取中的应用[J].化工进展,1998,(1):26-29.
- [3] 李夏兰,王丽娜.用PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系萃取糖化酶[J].华侨大学学报(自然科学版),1996,17(4):407-410.
- [4] 天津轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [5] 李夏兰,王丽娜.用PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 两水相从全醪液萃取糖化酶[J].华侨大学学报(自然科学版),1999,20(1):84-88.