

液-液双水相萃取分离 α -淀粉酶研究

邱树毅 贵州工业大学轻工系 550003

摘 要 研究了 PEG/磷酸盐双水相系统分离纯化 α -淀粉酶的工艺, 对 PEG 分子量、pH、相浓度、NaCl 浓度、酶浓度等影响因素进行了研究。

关键词 液-液双水相 分离 萃取 α -淀粉酶 PEG 磷酸盐

Abstracts The partition behavior of α -amylase in aqueous two-phase systems was investigated. The effects of the weights and concentrations of polyethylene glycol, pH, the concentrations of NaCl and enzyme concentration on the partition coefficient K were studied.

Key words Aqueous two-phase Partition α -amylase PEG Phosphate

双水相萃取技术是分离纯化蛋白质混合物等生物大分子的有效方法。双水相系统通常是由水溶性的两种聚合物组成或一种水溶性聚合物与一种盐组成, 与一般分离纯化技术相比, 双水相技术具有处理容量大、能耗低、易连续化操作和工程放大等优点, 在蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离纯化等方面受到广泛重视, 是一种有发展潜力的易于工业化应用的生物分离技术^[1]。

生物大分子在双水相上相和下相的浓度比被定义为分配系数 ($K=C_1/C_2$)。在双水相系统中有许多因素影响分配系数, 包括系统本身的因素如系统组成、聚合物分子量、聚合物浓度、盐和离子强度、pH 等, 以及目标产物的性质如疏水作用、电荷、分子量等, 尽管目前对聚合物溶液热力学引起的生物大分子在两相间不规则扩散的机理还不清楚, 还没有相应的理论指导设计特定蛋白质和生物大分子的分配系统, 但是利用双水相技术, 通过大量实验研究, 是可以获得特定蛋白质和生物大分子的最适宜分离的相系统和最优分配的^[2]。

α -淀粉酶是广泛应用的生物酶类, B.Subtilis 细菌 α -淀粉酶是研究和应用较多的 α -淀粉酶, 其分子量为 48000 道尔顿, PI 约为 5, 最适 pH5.3~6.4, 在 pH4.8~8.5 之间稳定^[3]。实验研究了 α -淀粉酶在聚乙二醇 (PEG)/磷酸盐双水相系统中的分配, 对 PEG 分子量、PEG 浓度、pH、添加 NaCl 和酶浓度等因素对 α -淀粉酶分配系数的影响进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

PEG: 分子量为 400、1000、4000 和 6000, 进口分装

α -淀粉酶: 贵州啤酒厂提供

其他试剂均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 PEG/磷酸盐双水相系统相图

将不同分子量的 PEG 和无机盐制成一定浓度原液, 准确称量一定量 PEG 原液, 加入试管中, 然后加入无机盐原液, 混合, 直至试管开始出现混浊为止, 称量加入无机盐量, 算出 PEG 和无机盐在系统中的重量百分浓度, 再加入适量水, 使体系变澄清, 计量加入的水, 并继续加入无机盐, 使系统再次变混浊, 如此反复操作, 计算达到混浊时 PRG 和无机盐在系统中的重量百分含量, 得出 PEG 和磷酸盐的双节线相图 (图 1)。

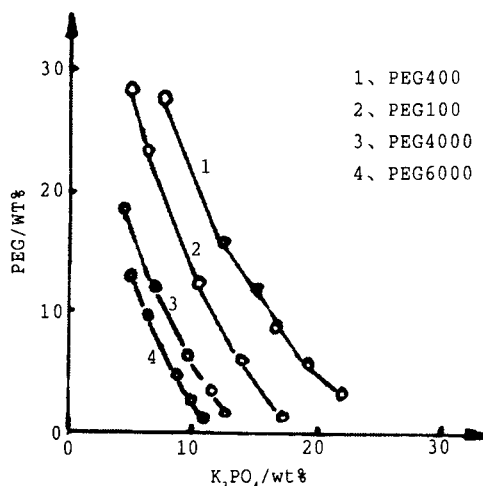


图 1 PEG/ K_3PO_4 双水相相图

1.2.2 双水相萃取分配平衡实验

相系统用原液冰箱放置, 使用时所有原液先在 20℃ 平衡后, 计算相应量后加入, 磷酸盐原液含有 K_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 混合液, 以调节到最适 pH。在系统组成混合好后, 用低速离心机加速相分离, 相体积比 $R=(R=V_t/V_b)$ 用离心刻度试管测定, 上、下相样品中分别分析酶活力, 实验在 20℃ 条件下进行 (室

温)。

1.2.3 α -淀粉酶活性的测定

参照文献[4]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 PEG分子量对 α -淀粉酶分配系数的影响

表1 α -淀粉酶在PEG/磷酸盐系统的分配系数

系统	K
PEG400 (13.2%w/w) 磷酸盐 (16.8%w/w)	20.42
PEG1000 (11.5%w/w) 磷酸盐 (13.4%w/w)	17.62
PEG4000 (10%w/w) 磷酸盐 (11.5%w/w)	1.75
PEG6000 (7.5%w/w) 磷酸盐 (10%w/w)	0.35

表1给出了 α -淀粉酶在PEG/磷酸盐系统的分配系数。

分配系数受PEG分子量影响较大, α -淀粉酶的分配系数随PEG分子量的增加而降低,在低PEG时, α -淀粉酶的分配系数高, α -淀粉酶主要集中在上相,而随着PEG分子量的增加,分配系数K值降低,甚至 α -淀粉酶分配到下相。其主要原因可能是随着PEG分子量的增加,其端基数目减少,疏水性增加,而 α -淀粉酶是疏水蛋白分子,故主要向下相集中。在PEG/葡萄糖系统中其他蛋白的分离纯化亦有类似现象^[5]。由于小分子量的PEG选择性差,杂蛋白质分离能力低^[6],不适合作进一步研究。实验选用PEG4000作为研究对象。

2.2 相浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

相图中的系统长度是由相组成的总浓度决定的,在临界点附近,系线长度趋向于零,上相和下相的组成相同,因此,分配系数应为1,随着PEG和成相盐浓度增大,系线长度增加,上相和下相相对组成的差别就增加,酶在两相中的分配系数会受到极大的影响。

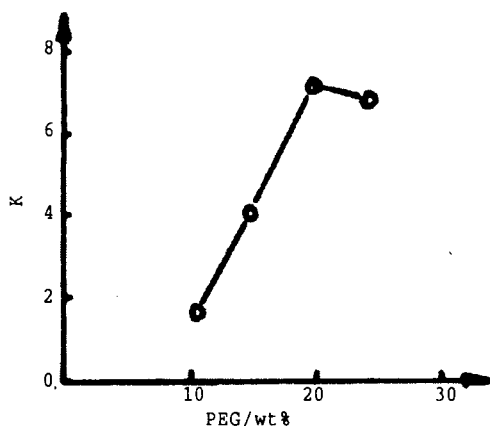


图2 PEG浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

实验研究了PEG浓度变化对 α -淀粉酶分配系数的影响,所得结果见图2。

在磷酸盐浓度固定不变条件下,改变PEG浓度,对 α -淀粉酶的分配系数影响较大。PEG浓度增加,有利于酶在上相的分配,在20%w/wPEG浓度时,分配系数达到最大,继续增加PEG浓度, α -淀粉酶的分配系数略有下降。

实验对磷酸盐浓度对 α -淀粉酶的分配系数亦进行了研究,增加磷酸盐浓度, α -淀粉酶的分配系数增加,这主要是由于磷酸盐的盐析作用影响所致,当盐浓度过高时,酶蛋白因盐析作用过强而沉淀,因此一般取盐浓度在12%w/w左右为宜。

2.3 pH对 α -淀粉酶分配系数的影响

表2 pH对 α -淀粉酶

在PEG/磷酸盐双水相中分配系数的影响

pH**	K
5.3	0.5
5.6	0.7
6.1	1.2
7.1	1.75
7.8	3.65

*: 体系为PEG4000 (10%w/w)/磷酸盐 (11.5%w/w)

** : pH变化通过调节 $H_2PO_4^-$ 和 HPO_4^{2-} 缓冲液实现

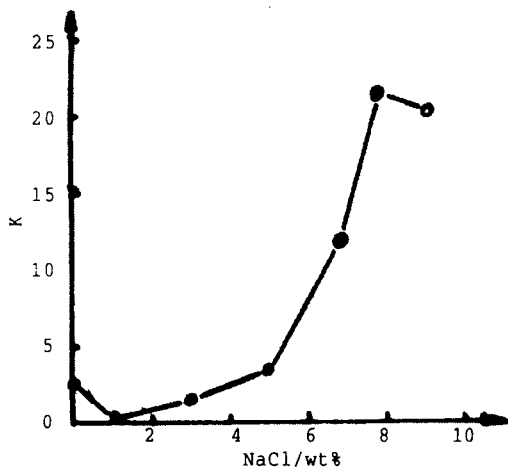
表2给出了pH变化对PEG/磷酸盐双水相中 α -淀粉酶的分配系数的影响。

随着pH值增加, α -淀粉酶的分配系数增加,分配系数随pH增加而增加的现象在双水相萃取技术分离其他蛋白质中亦有观察到^[7]。分配系数的改变是因为目标蛋白质电荷的变化引起,其原因是带负电荷的蛋白质更宁愿选择上相,而带正电荷的蛋白质通常分配到下相^[8], α -淀粉酶的等电点PI约为5,在较高pH时,蛋白质电荷呈负电性, α -淀粉酶和PEG分子之间的作用增强,故 α -淀粉酶的分配系数增加。

2.4 NaCl浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

在双水相体系中离子强度对目标蛋白的分配系数有较大影响。实验研究了在相组成为PEG4000 (15%w/w) 磷酸盐 (10%w/w) 时,改变NaCl浓度,对 α -淀粉酶分配系数的影响,所得结果见图3。

实验表明,在较低NaCl浓度时, α -淀粉酶酶的分配系数随NaCl浓度增加而减小,在1%w/wNaCl时达到最低,继续增加NaCl浓度, α -淀粉酶的分配系数随NaCl浓度增加而增加,在7.8%w/w时达到最大。继续增加NaCl浓度, α -淀粉酶酶的分配系数又趋下降。这是由于 Na^+ 和 Cl^- 在两相分配情况不同,从而引

图3 NaCl浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

3 结论

对 *B. Subtilis* 细菌 α -淀粉酶在 PEG/磷酸盐双水相中的分离纯化进行了研究, 所得结论如下:

α -淀粉酶的分配系数在 PEG/磷酸盐双水相中受 PEG 分子量和 PEG 浓度的影响, 分子量低, 分配系数高, 但低分子量则对目标蛋白的选择性差。PEG 浓度增加有利于酶富集上相。

pH 对 α -淀粉酶的分配有重要影响, 随 pH 增加, α -淀粉酶的分配系数增加。添加 NaCl 可大大影响 α -淀粉酶在 PEG/磷酸盐中的分配系数。

α -淀粉酶的分配系数在低浓度时接近常数, 随酶浓度增加, 分配系数增加。但酶的回收率下降。

起两相电位差的变化所致^[9]。

2.5 酶浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

酶浓度在双水相分配中是一个重要的影响因素。一般来说, 只有在蛋白质浓度较低时, 才可能出现纯粹的分配行为, 随着蛋白质浓度增加, 蛋白质的溶解度限制和出现饱和, 纯的分配行为就出现偏差。因此在研究目标产物的分离纯化时, 不能只考虑分配系数, 还要考虑回收率。回收率定义为酶提纯的质量与总酶

表3 酶浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

酶浓度 ku/ml	K	回收率 (%)
1.05	7.1	99.8
2.5	7.25	99.9
5.5	12.5	89.6
11.2	17.8	72.4

质量之比 Y ($Y = M_{\text{酶}} / M_{\text{总}}$)。

表3给出了 PEG/磷酸盐系统中添加 3%w/w NaCl 时的 α -淀粉酶的分离纯化。在较低酶浓度下, α -淀粉酶的分配系数近似于常数, 但回收率较高, 随着 α -淀粉酶浓度的增加, 分配系数 K 值提高, 但酶的回收率下降。因此, 选择合适的酶浓度在双水相分离纯化生物大分子时是重要的, 这样既可得到较高的分配系数, 又可获得高的回收率。

参考文献

- 1 P.A. Albertsson, Partition of cells and Macromolecules 3rd, John Wiley and Sons, New York, 1986.
- 2 J.N. Baskir, T.A. Hatton, and U.W. Suter. Protein Partitioning in Two phase Aqueous Systems, Biotechnol. Bioeng, 1989, 34: 541~558.
- 3 W.M. Fogarty, Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishes Ltd. New York, 1983.
- 4 天津轻工业学院等四院校和编. 工业发酵分析. 轻工业出版社, 北京: 1980.
- 5 P.A. Albertsson, G. Johansson and F. Tjerneld, Aqueous two-phase separations, in Separation Processes in Biotechnology (J.A. Asenjo ed.) Marcel Dekker New York, 1990.
- 6 O. Casconne, B.A. Andrews and J.A. Asenjo, Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase systems Enzyme Microb. Technol, 1991, 13: 692~635.
- 7 H.L. Chiang and S.S. Wang Extractive partition of L-aspartase and fumarase from *E. coli* aqueous polyethylene glycol-ammonium sulfate systems. Biotechnol. Technol, 1988, 2: 283~288.
- 8 J.G. Huddleston, A.K. Veide et al. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. TIBTECH, 1991, 9: 381~388.
- 9 C-K. Lee and S.I. Sandler, Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: Effect of pH, salt and an affinity ligand. Biotechnol. Bioeng, 1990, 35: 408~416.

食品品质损失动力学模型

田玮 徐尧润 天津轻工业学院机械工程系 天津 300222

摘要 主要讨论了 Arrhenius 模型和 Z 值模型的各自特点及相互关系, 提出了两种模型中活化能 E_a 和 Z 值两者转换的实用关系式, 探讨了描述食品品质损失规律的其它方法。

关键词 Arrhenius 模型 Z 值模型 动力学模型 品质损失

Abstract The Arrhenius model and z-value model have been used independently to describe temperature dependence of