

用聚乙二醇 (PEG) /无机盐双水相体系从 枯草杆菌发酵液中提取 α -淀粉酶的研究

杨基础 沈忠耀 汪家鼎

(清华大学化学工程系, 北京)

本文报道分别用聚乙二醇(PEG)/磷酸盐和PEG/(NH₄)₂SO₄双水相体系从枯草杆菌发酵液中提取 α -淀粉酶。研究了PEG的平均分子量、PEG浓度,成相的盐的浓度和NaCl的浓度对 α -淀粉酶和蛋白质的分配系数以及相比的影响,确定了最佳的操作条件。实验表明在18%PEG 1500/10%磷酸盐/0.05M NaCl的体系中, α -淀粉酶的分配系数为6.62,蛋白质分配系数为1.14,相比为2.5, α -淀粉酶总收率为94.3%,在16%PEG 1500/12%(NH₄)₂SO₄/0.05M NaCl体系中, α -淀粉酶分配系数为82,蛋白质分配系数为5.2,相比为0.92,酶收率为99%,结果表明用PEG/无机盐双水相体系直接从含有菌体的发酵液中提取 α -淀粉酶是可行的。

关键词 α -淀粉酶; 聚乙二醇; 双相体系; 萃取

在工业规模生产中,常常要求分离技术高效率、低成本、易放大。可是由于生物物质大多数具有生理活性,致使目前化学工业中常用的精馏和有机溶剂萃取等技术难以在生物分离中发挥其效能,因而开发新型的适合于生物物质大规模分离的方法就十分必要和迫切了。双水相体系萃取就是这样一种十分引人注目的新型分离技术^[1]。大多数亲水性高聚物的水溶液,由于高聚物的“不相溶性”(Incompatibility),在互相混合时会形成互不相溶的两相,即所谓的双水相体系,有时一种高聚物和一种盐也能形成双水相体系。在这一体系中,不同物质有不同的分配系数,从而实现不同物质间的分离。双水相体系含水量高达70—90%,组成体系的高聚物,如PEG, Dextran或盐如磷酸盐和(NH₄)₂SO₄对生物活性物质不仅无毒害,而且有稳定和保护作用,因而特别适用于大规模分离生物活性物质^[2-3]。

α -淀粉酶是我国主要酶制剂之一,广泛用于食品、纺织、制革和医药工业。但是生产的是粗制酶,不能满足日益增长的需要,其主要问题是酶的提取分离技术不过关。

本文报道用两种PEG/无机盐体系从枯草杆菌发酵液中提取 α -淀粉酶的研究结果。

材料和 方法

(一) 材料

酶的来源: 枯草杆菌 BF2658 α -淀粉酶制剂粉末和新鲜酶液均由无锡酶制剂厂提供。实验所用酶液有两种,一种是将酶粉溶解,过滤所得滤液;另一种是将新鲜酶液离心后所得清液。这两种酶液均可视为

本文于1986年9月24日收到。

参加实验工作的还有张苏春同志; 本研究所用酶液和酶制剂均由无锡酶制剂厂无偿提供, 特此表示深切的谢意。

不含菌体,另一种是未除去菌体的新鲜酶液。

实验中所用其它试剂均为市售,纯度为分析纯。

(二) 分析方法

1. α -淀粉酶活力测定^[4]:取4.5ml约0.5%可溶性淀粉溶液在40℃水浴中预热5min,然后取0.5ml预热后的稀酶液加入淀粉液中,立即记录时间,反应5min,然后在100℃沸水浴中煮沸10min,冷却后取0.2ml加到5ml 0.002%稀碘液中显色。同时以不加淀粉(加入相同体积缓冲液)的试剂为对照,均在700nm下测1cm光径时的吸光度。调整酶液稀释倍数,使吸光度在0.1—0.7之间。在上述条件下,以光密度下降10%的酶量为一个酶活力单位,计算公式如下:

$$2n \times \frac{a-b}{0.1a}$$

= 酶活力单位 (u/ml酶液)

式中a、b分别表示对照和样品的吸光度值。

n为酶液稀释倍数。

2. 蛋白质的测定——Folin-Lowry法^[5]:Folin-Lowry法是测定蛋白质浓度应用最广泛的方法之一。但是PEG对该法有干扰,因为PEG和Folin试剂产生沉淀,因此测定蛋白质时必须除去PEG,由于PEG不被三氯乙酸沉淀,因而先采用沉淀法进行处理。即加入三氯乙酸后使蛋白质沉淀,而PEG不被沉淀,然后蛋白质再与Folin试剂作用。

Folin-Lowry法的可测范围是25—250 μ g蛋白质,即在这一范围内,吸光度与蛋白量成正比。本实验以牛血清白蛋白为标准。

(三) 实验步骤及计算

实验均在室温下进行,实验中所用的

量以克为单位。体系总重量为5.00g,酶液量占一定比例。按计算取一定量50%(W/W)PEG溶液和一定量成相的盐溶液,根据需要加入NaCl溶液,最后用蒸馏水冲稀到总重量为5.00g,装入10ml带刻度的试管中,在液体快速混合器上振荡2min,再在离心机上离心5min,分相后根据刻度读出上下相体积,用吸管分别吸出一定量的上相和下相,按上述方法分析上、下相酶的活力和总蛋白的量。

分配系数定义为: $K = C_1/C_2$ (1)

C_1, C_2 分别表示被萃取组分在上相和下相的浓度。由于生物物质的浓度不高,所以分配系数几乎与浓度无关,这对设计计算无疑是有利的。相比R是:

$$R = V_1/V_2 \quad (2)$$

V_1, V_2 分别表示上、下相的体积。则物质在上相的提取率很容易计算。

$$Y_1 = \frac{\text{上相中被提取物质的量}}{\text{体系被提取物质的总量}}$$

$$= \frac{V_1 C_1}{V_1 C_1 + V_2 C_2} = \frac{RK}{1 + RK} \quad (3)$$

其中K若分别用酶的分配系数 K_e 或总蛋白的分配系数 K_p 代替,则可分别求得酶和蛋白的提取率。

结果与讨论

(一) PEG/无机盐体系成相情况

实验选择了PEG/磷酸钾盐和PEG/(NH₄)₂SO₄两个体系,在PEG/(NH₄)₂SO₄体系中,为控制pH=7.0加入少量Na₂HPO₄,总浓度为0.79%。实验结果表明,PEG平均分子量越大,PEG浓度越高,与盐溶液混合后,自然分相的速度越快,一般为10min左右。如果体系中加入适量NaCl,自然分相时间可大为缩短,约为2—3min。自然分相的时间将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。 α -淀粉酶主要分布在含PEG的上相,在PEG/磷酸盐体系中,菌体和固形物分布在含盐的下相。在PEG/(NH₄)₂SO₄体系中,菌体和其他固形物则主要悬浮于上相表面,但一经离心分离后即沉积到试管底部。可见,利用这两个PEG/盐体系,均能将 α -淀粉酶和菌体有效地分离。

(二) α -淀粉酶的分配平衡及其影响因素

影响双水相萃取平衡的因素很多,主要有聚合物的种类、聚合物的平均分子量、聚合物的浓度、成相盐的种类及浓度、其它盐的种类及离子强度、pH值、温度及菌体含量。

本文主要研究了PEG平均分子量和浓度,成相盐的浓度和种类,NaCl的浓度等对酶和总蛋白的分配系数以及相比的影响,以确定 α -淀粉酶提取的最佳工艺条件。

1. PEG平均分子量对分配平衡的影响

PEG平均分子量对酶和蛋白的分配影响是很大的。首先它们与盐溶液组成两相的临界浓度有很大差别,PEG平均分子量越低,成相的临界浓度越高,那么组成体系的成本就相应地增高;其次平均分子量太高,PEG的溶解度会下降,我们比较了4种分子量的影响,分子量分别为400、1500、4000、10000。从表1所示结果可看出,PEG平均分子量增大, α -淀粉酶的分配系数减小。当PEG的平均分子量大于4000,酶的分配系数小于1,即酶主要分配在下相(盐相)。平均分子量 <4000 ,酶的分配系数大于1,酶主要分布于上相(PEG相)。对总蛋白分配的影响也有相类似的趋势,但是比对酶的影响小些。同时考虑到分相的临界浓度,分相的速度等因素,决定采用PEG1500。

2. PEG浓度对分配平衡的影响:聚合物浓度是影响物质分配的重要因素之一。对于PEG/无机盐体系,实验结果如图1和图2所示。由图可以看出,对两个

表1 PEG平均分子量对分配系数的影响

Table 1 Influence of the average molecular weight on the partition coefficient

体系 System	分配系数 Partition coefficient		相比 Volume ratio	提取率(%) Yields %
	α -淀粉酶 α -amylase	蛋白质 Protein		
32.3% PEG400	2.92	3.59		
20% PEG1500	7.13	1.20	3.5	96.1
19.9% PEG4000	0.99	1.05	2.1	67.5
15% PEG10000	0.26	0.73	1.5	28.1

10%磷酸盐 potassium phosphate, pH=6.5, T=25°C

体系, α -淀粉酶的分配系数随PEG浓度的增加有类似的变化规律。在PEG浓度比较低时,分配系数随PEG浓度增加而增大。对PEG/磷酸盐体系,PEG浓度为20—22%左右,酶的分配系数有最大值;而对PEG/(NH₄)₂SO₄体系,大约在14—16%

范围内,酶的分配系数有最大值。在所实验的PEG浓度范围内,对磷酸盐体系,总蛋白分配系数随PEG浓度增加而增加;对硫酸盐体系,总蛋白的分配系数有最大值。从图中可以看出,为了提高酶的萃取率和酶与其它蛋白的分离,PEG浓度不宜过

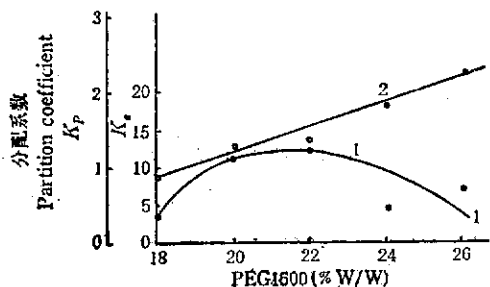


图 1 在PEG/磷酸盐体系中PEG浓度对 α -淀粉酶和蛋白质分配系数的影响

Fig.1 Influence of the concentration of PEG on the partition coefficient of α -amylase and protein in PEG/potassium phosphate system

1. α -淀粉酶 α -amylase

2. 蛋白质 protein

10% 磷酸钾盐 potassium phosphate, pH=6.5, T=25 $^{\circ}$ C

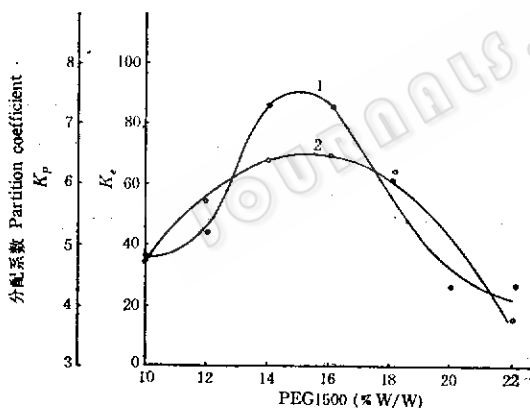


图 2 在PEG/(NH₄)₂SO₄体系中PEG浓度对 α -淀粉酶和蛋白质分配系数的影响

Fig.2 Influence of the concentration of PEG on the partition coefficient of α -amylase and protein in PEG/(NH₄)₂SO₄ system

1. α -淀粉酶 amylase

2. 蛋白质 protein

14% (NH₄)₂SO₄, pH=7.0, T=23 $^{\circ}$ C

高，这对降低成本也是有益的。

3. 成相盐的浓度对分配平衡的影响：实验结果示于图 3 和图 4。与PEG浓

度的影响类似。酶分配系数随盐浓度的增加有一最大值。对 PEG/磷酸盐体系，盐浓度为11—13%范围内有最大值。在上述盐浓度范围内。对两个体系总蛋白的分配系数都比较小，所以将盐浓度选取在此范围内，不仅酶的提取率高，而且与杂蛋白的分离也是有利的。

4. NaCl 浓度对分配平衡的影响：

在 PEG/盐双水相萃取体系中，加入适量的NaCl可以加快分相速度，但加 NaCl 对酶的分配系数有较大影响，结果示于图 5。在较低的浓度下，分配系数随 NaCl 浓度增加而减小，而在较高的NaCl浓度下，分配系数是增大的。综合考虑 NaCl 对分配系数和分相时间的影响，可以选择NaCl 浓度在 0.05—0.1M 的范围内，分配系数并未有太多减小，而分相时间却大大缩短，约为不加盐的1/3左右。

5. 对分配平衡实验结果的初步分析：大分子和颗粒在双水相体系中的分配

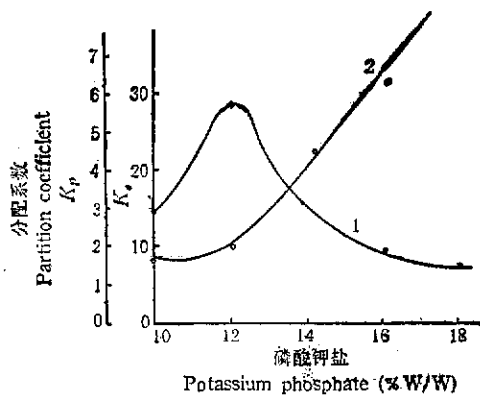


图 3 磷酸钾盐浓度对 α -淀粉酶和蛋白质分配系数的影响

Fig.3 Influence of the concentration of potassium phosphate on the partition coefficient of α -amylase and protein

1. α -淀粉酶 α -amylase,

2. 蛋白质 protein

20% PEG1500, pH=6.5, T=27 $^{\circ}$ C

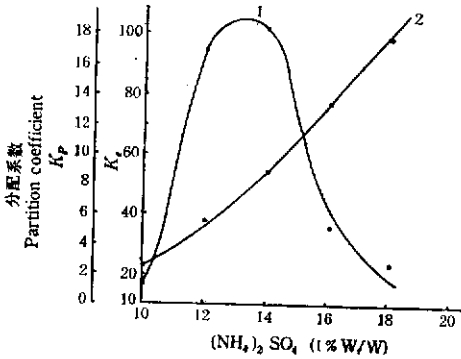


图4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对 α -淀粉酶和蛋白质分配系数的影响

Fig.4 Influence of the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the partition coefficient of α -amylase and protein

- 1. α -淀粉酶 α -amylase
- 2. 蛋白质 protein

16% PEG1500, pH=7.0, T=25℃

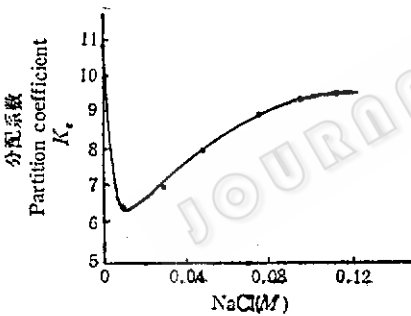


图5 NaCl浓度对 α -淀粉酶分配系数的影响

Fig.5 Influence of the concentration of NaCl on the partition coefficient of α -amylase

20% PEG1500, 10% potassium phosphate
pH=6.5, T=27℃

平衡的机理目前尚不清楚。当大分子或颗粒悬浮在某一相内，它们便与周围的分子相互作用，这种作用可能涉及到氢键、离子键、疏水键，还有其他一些弱作用力。定量地描述这些作用力是困难的，但可从热力学的基础观点出发，作些定性的说明。若物质从下相转移到上相的克分子自

由能为 ΔE ，那么其分配系数可表示为：

$$K = \frac{C_t}{C_b} = e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \quad (6)$$

其中： R 是玻尔兹曼常数， T 是绝对温度 K ，自由能变化 ΔE 主要包含物质与两相之间的界面能的变化和两相的电位差，可具体表示为：

$$K = \frac{C_t}{C_b} = e^{-\frac{A(\gamma_t - \gamma_b)}{RT} - \frac{Z(U_t - U_b)}{RT}} \quad (7)$$

其中： γ_t, γ_b 表示物质在上、下相的界面张力。 A 表示大分子或粒子的克分子表面积。 U_t, U_b 表示物质在上、下相中电位。 Z 表示物质所带电荷数。

从(7)式可看出，物质的表面电荷和表面积、物质在两相的界面特性和电位差，是影响物质分配平衡的主要因素。

α -淀粉酶的等电点为pI=4.2—4.5，稳定的最适pH为6—7，所以我们在实验中都将pH控制在pH=6.5左右。当pH=6.5时， α -淀粉酶带负电荷。又因为在PEG/磷酸盐体系中， HPO_4^- 的分配系数小于 H_2PO_4^- 的分配系数，所以上相(PEG相)的电位比下相(无机盐相)高，因而 α -淀粉酶主要分布于上相。

从实验结果可以知道，随着PEG或磷酸盐浓度增大，两相差别增大，因此两相物质之间界面张力的差别也增大^[6]，这样将引起分配系数的下降。但同时磷酸盐浓度的增加，下相对酶蛋白的盐析作用也将加强，酶蛋白在下相活度减小，分配系数增大。在低浓度时，可能盐析起主要作用，因而分配系数下降。

当然以上的分析是定性的，也是初步的。对于高分子聚合物溶液理论的深入研究，一定会为双水相萃取提供更为坚实的理论基础。

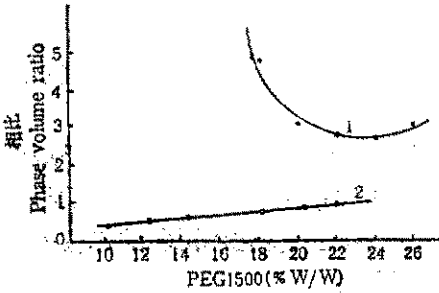


图 6 PEG浓度对相比的影响

Fig. 6 Influence of the concentration of PEG on the phase volume ratio

1. PEG1500/10% potassium phosphate, pH=6.5, T=25°C 2. PEG1500/14% (NH₄)₂SO₄, pH=7.0, T=23°C

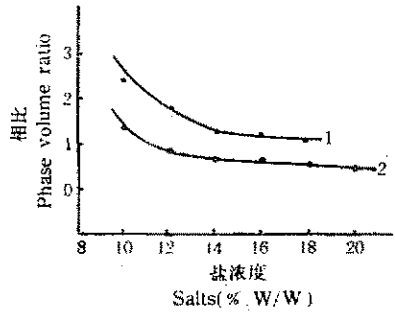


图 7 盐浓度对相比的影响

Fig. 7 Influence of the concentration of salts on the phase volume ratio

1. 20% PEG1500/phosphate, pH=6.5, T=27°C 2. 16% PEG1500/(NH₄)₂SO₄, pH=7.0, T=25°C

(三) 对相比的影响因素

对双水相体系来说, 相比不是一个自变数, 而是一个因变数。它受相的组成及浓度、粒子浓度以及盐离子强度等许多操作条件的影响。这与一般溶剂萃取不同。选择合适的条件, 提高相比, 对提高有用组分的萃取率是十分有利的。本文研究了 PEG 浓度、成相盐的浓度以及 NaCl 浓度等的影响, 结果示于图6—8。从图可看出, PEG 浓度增大, 相比下降; 成相盐浓度增大, 相比下降; NaCl 浓度增大, 相比也下降。

为了提高萃取率(P), 需要同时考虑分配系数和相比这两个参数。

(四) 用 PEG/无机盐体系直接从含菌体的发酵液中提取α-淀粉酶

在上述条件实验基础上, 用 PEG/磷酸钾盐和PEG/(NH₄)₂SO₄两种体系, 分别进行了从含菌体发酵液中提取 α-淀粉酶的实验, 实验所用条件示于表 2, 实验结果示于表 3。

从实验结果看出, 用这两种体系可以

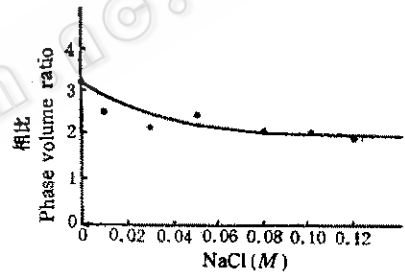


图 8 NaCl 浓度对相比的影响

Fig. 8 Influence of the concentration of NaCl on the phase volume ratio 20% PEG1500/10% potassium phosphate, pH=6.5, T=27°C

表 2 实验条件

Table 2 Experiment conditions

体系 System	条件 Condition	PEG1500 (%)	盐浓度 Salts (%)	NaCl (M)	pH
PEG/磷酸钾盐 PEG/phosphate		18	10	0.05	6.5
PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄		16	12	0.05	7.0

直接从含菌体的发酵液提取α-淀粉酶, 且效果都相当好, 一次接触平衡的萃取率可达95%左右。

表 3 实验结果
Table 3 Experiment results

体 系 System	PEG/磷酸钾盐 PEG/phosphate		PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
	未加 NaCl Without NaCl	加 NaCl With NaCl	未加 NaCl Without NaCl	加 NaCl With NaCl
K_c	8.58	6.62	90.1	81.5
K_p	0.89	1.14	4.67	5.18
R	3.86	2.5	0.92	0.92
P(%)	97.1	94.3	98.8	98.7

参 考 文 献

- [1] Albertsson, P.A., Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, 1971.
- [2] Kroner, K.H. et al., *Biotech. Bioeng.*, 20:1989, 1978.
- [3] Kroner, K.H. et al., *Biotech Bioeng.*, 20: 1967, 1978.
- [4] D.T. 普卢默: 实用生物化学导论, 科学出版社, 1985.
- [5] 蔡武城, 袁厚积主编: 生物物质常用化学分析法, 科学出版社, 1982.
- [6] Kroner, K.H. et al., Separation of Aqueous Two-Phase by Gravity Settling, Proc. ISEC'86 Vol. III, p703-711, Munich, 1986.

EXTRACTION OF α -AMYLASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* BY MEANS OF PEG/SALT AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

Yang Jichu Shen Zhongyao Wang Jiading

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing)

The procedure that the extraction of α -amylase from *Bacillus subtilis* by means of PEG/salt aqueous twophase systems, PEG/potassium phosphate and PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, was reported. In the paper the dependence of the partition coefficients of α -amylase and the total protein and the volume ratio of the top phase to the bottle phase on the average molecular weight of PEG, the concentration of PEG, the type and concentration of salts included in the system was studied in detail, and the optimal separation conditions were determined. It was shown that a partition coefficient of 6.62 for α -amylase and 1.14 for the total protein, a phase volume ratio of 2.5 and a yeild of α -amylase of 94.3% in 18% PEG1500/10% potassium phosphate/0.05 M NaCl, pH=6.5 and a partition coefficient of 82 for α -amylase and 5.2 for total protein, a phase volume ratio of 0.92 and a yeild of 99% can be obtained in 16%PEG/12% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /0.05 M NaCl, pH=7.0. The results demonstrated that the isolation of α -amylase from broth containing bacteria cell by liquid-liquid extraction was feasible.

Key words

α -Amylase; polyethylene glycol; two-phase system; extraction