

高压匀浆破碎法提取酵母胞内蛋白质

苏志国

(大连理工大学生化工程研究室, 大连)

用高压匀浆机对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞进行破碎以提取可以做为酶源和食品添加剂的胞内蛋白质。对高压匀浆破碎细胞过程中的物理和化学因素,包括匀浆次数、操作压力、细胞碎片的尺寸分布以及悬浮液性质的影响,做了系统的研究。选择了合适的压力(60MPa)和磷酸盐悬浮液在10℃下经过6次匀浆破碎,获得了胞内蛋白质释放量0.108 kg/(kg鲜酵母)。本文还就破碎细胞过程对后面的细胞碎片分离过程的影响做了探索。

关键词 高压匀浆; 细胞破碎; 酿酒酵母

破碎细胞常常是提取微生物胞内产物不可缺少的步骤。目前工业上大批生产的微生物产品如抗菌素、有机溶剂、酶制剂等几乎都是胞外产物。这类产物由于溶解在培养液中,只需将细胞除去就可以进一步分离提纯了。而细胞内积累的大量的蛋白质(酶)、核酸、多糖和脂类以及某些基因工程的产物,则必须通过细胞的破开才能释放出来^[1]。由于微生物很小,其细胞内压可达20多个大气压,细胞壁非常坚硬,所以很难进行破碎。

生物化学和微生物学实验所用的破碎方法如冷冻后融化、超声波冲击、压力突变以及化学试剂和酶溶等,在工业规模应用时,由于耗能高、收率低,都不理想。Hetherington等^[2]于70年代开发了高压匀浆破碎法。此法应用高压匀浆机(牛奶加工所用)破碎微生物细胞,加工速度快,胞内产物损失小,设备容易放大。但由于设备条件所限,仅对操作压力<55MPa的破碎进行了研究。从80年代起,用高压匀浆法破碎细胞受到生化工程学术界的重视^[1]。但是迄今为止的研究大都围绕高压匀浆的机理和过程动力学,

而缺少从工程的角度对各种物理化学因素影响探讨,特别是缺乏将破碎同下面的分离过程联在一起的研究^[3]。

本研究采用APV Gaulin公司新设计的匀浆阀,在较大的压力范围10—80MPa)下用高压匀浆机破碎酿酒酵母。重点考察了匀浆次数、压力、细胞碎片尺寸分布及悬浮液性质对胞内蛋白质释放量的影响,并就破碎过程对于后面的细胞碎片分离过程的影响做了初步探索。

材料与方 法

(一) 高压匀浆机

所用的高压匀浆机为英国APV Gaulin公司生产的Manton-Gaulin Homogenizer 15M-8TA,匀浆速度57L/h,压力范围10—80MPa(百万帕斯卡)。该设备的关键部件是匀浆阀,其结构见图1。

其中(1)为原来的刀刃型设计,(2)是本研究所采用的APV Gaulin公司新设计的阀,与(1)的区别是阀杆端

本文于1989年1月4日收到。

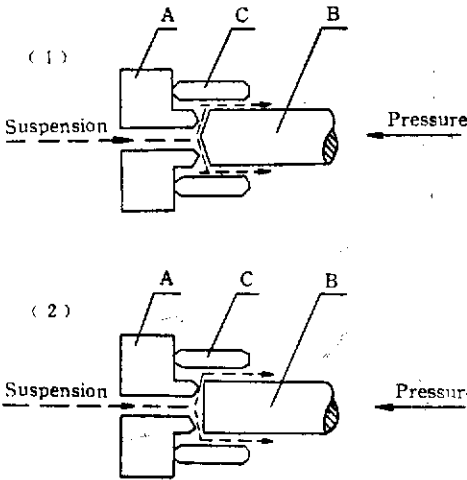


图 1 匀浆阀单元的结构

Fig.1 Homogenization valve unit

(1) 原设计 Original design (2) 新设计 New design

A. 阀座 Valve seat B. 阀杆 Valve rod

C. 碰撞环 Impact ring

面为平面，阀座刀刃的坡口和直径有所加大，材质也可能不同，以增强在高压下工作的寿命。匀浆阀单元由阀座 A、阀杆 B 和碰撞环 C 组成。从高压室（几百个大气压）压出的细胞悬浮液经过阀座 A 的中心孔道从阀座 A 与阀杆 B 中间的小环隙喷出。喷出速度可达每秒 200—300m。这种高速喷出的浆液又射到静止的碰撞环 C 上，被迫改变方向从出口管流出。细胞在这一系列过程中经历了高速造成的剪切、碰撞和由高压到常压的突变，从而造成细胞壁的破坏，细胞膜随之破裂，胞内产物得到释放。

(二) 酵母菌种和悬浮液制备

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 来自荷兰 Gist-Brocades 公司，为面包加工所用之鲜酵母，固体含量（干重）为 26%，比重为 1200kg/m³。将酵母与去离子水或缓冲盐溶液按不同比例混合，即制得不同浓度的酵母悬浮液。将悬浮液在恒温下通入高压匀浆机，于出口处收集匀浆并冷却。

(三) 蛋白质释放量的计算

细胞的破碎程度以胞内蛋白质释放量为衡量。对破碎后的匀浆进行蛋白质含量分析，样品在 Beckman J2-21 高速离心机内于 4℃、48000g 下离心 20min 以除去细胞碎片，取上清液用改进的 Folin-Lowry 法分析蛋白质含量^[4]。

$$\text{蛋白质释放量} = \frac{\text{液相蛋白质总量}}{\text{投入的鲜酵母量}}$$

(单位为 kg/kg)

(四) 细胞碎片大小的测定

匀浆中的细胞碎片尺寸分布由一带微机的 Coulter Counter ZM 激光颗粒测定仪（英国 Coulter Elec. Ltd.）测定。

(五) 匀浆中固体含量的测定

匀浆中的固体含量是以高速离心（48000g，20min）后的固体沉积量占匀浆的重量百分数定义的。离心前将离心管中的匀浆称重，离心后倾去上清液，将固沉积和离心管一起于 60℃ 下干燥 24h，称重求得固沉积的干重，再根据另外测得的湿重与干重的比值算出固体沉积量的百分数。

(六) 细胞碎片过滤阻力的测定

取匀浆 200ml 于室温和 0.1MPa 恒压下过滤。过滤介质为 0.2μm 微孔滤膜（西德 Schleicher Schuell 产品），过滤器是西德 Satorius 公司的薄膜过滤器 SM-165，过滤面积 12.5cm²。过滤中滤液重量随时间的变化用一带有记录仪的 Satorius 电子天平 2200P 记录。测量滤液的粘度、比重和滤饼的干湿比，由 Ruth^[6] 的过滤方程式计算出滤饼的比阻。

结果与讨论

(一) 高压匀浆次数对细胞破碎的影响

用高压匀浆机加工细胞时，一次只能

使悬浮液中的一部分细胞破碎。若使更多的细胞得到破碎，就要进行二次、三次以上的重复破碎。

式⁽²⁾：

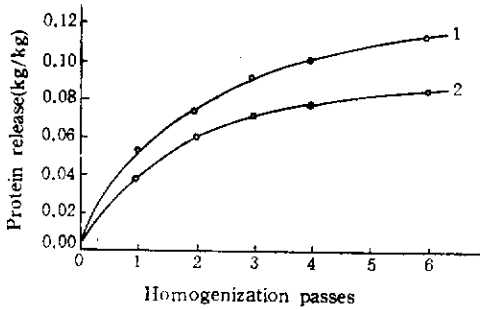


图2 胞内蛋白质释放量与匀浆次数的关系
Fig.2 Relation between the release of intracellular proteins and homogenization passes

鲜酵母 Fresh yeast (30%), 10°C, 60MPa

- 1. 磷酸盐缓冲液悬浮 Suspended in phosphate buffer, pH8.0
- 2. 去离子水悬浮 Suspended in deionized water, pH7.0

图2是胞内蛋白质释放量与匀浆次数的关系。随着匀浆次数的增加，更多的细胞破碎，使蛋白质释放量上升。但是，在相同的匀浆次数下，悬浮在缓冲盐溶液中的酵母在破碎时释放的蛋白质明显地多于悬浮在去离子水中的酵母。为了进一步考察细胞的破碎程度，本文又对破碎后匀浆的固体百分数进行了测量。由于胞内水分和可溶性物质的释放，匀浆的固含量随匀浆次数的增加而下降。由图3的结果表明，对于缓冲盐酵母悬浮液，其固含量随匀浆次数下降的变化明显地快于去离子水酵母悬浮液。这说明，在磷酸盐缓冲溶液中，酵母细胞可能更容易破碎，不同的悬浮液对高压匀浆的效果有不同的影响。

从图2看，虽然蛋白质随匀浆次数而增加，但由于胞内蛋白质含量是有限的，而且细胞的数量也是一定的，所以蛋白质的释放量将趋近一最大值。文献中已提出了高压匀浆法破碎细胞的动力学方程：

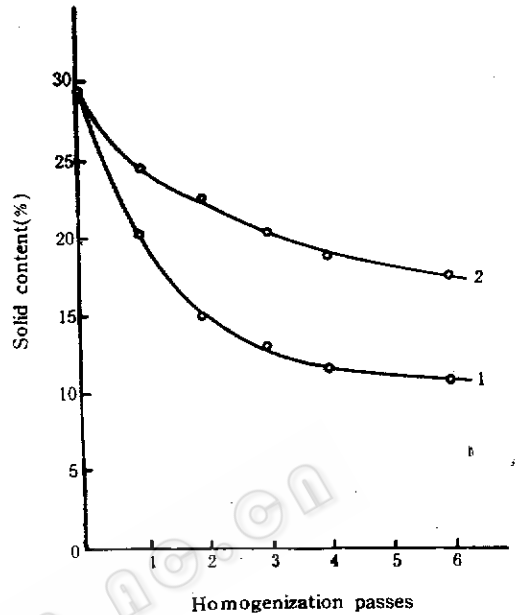


图3 固含量随匀浆次数的变化
Fig.3 The change of solid content with homogenization passes

鲜酵母 Fresh yeast (20.4%), 18°C, 58MPa

- 1. 磷酸盐缓冲液悬浮 Suspended in phosphate buffer, pH8.0
- 2. 去离子水悬浮 Suspended in deionized water, pH7.0

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = K \cdot N \cdot P^n \quad (1)$$

式中R是蛋白质释放量，R_m是最大释放量，N是匀浆次数，P是操作压力，n是一指数，随不同的微生物而定，K是一比例系数，是温度的函数。

根据方程式(1)，可求得对于悬浮在缓冲盐溶液中的酵母，R_m = 0.112kg/kg，而对于悬浮在去离子水中的酵母，R_m = 0.084kg/kg。这两个值相差较大，说明方程式(1)中的R_m值是随实验条件而变的，并不是胞内可溶性蛋白质的实际值。从Harrison⁽⁶⁾得到的数据推算，酵母可溶性总蛋白质含量约为0.120kg/kg。对于这个值，悬浮在缓冲盐溶液中的酵母的R_m是比较接近的，而去离子水中

的酵母 R_m 较低，可能是有一部分酵母不能破碎，或者是部分蛋白质如膜结合蛋白质在去离子水中不能释放出来。

悬浮液对于细胞破碎的影响，文献上还没有报道。本研究对比了几种悬浮液的效果，发现浓度为 35mmol/L 的 K_2HPO_4 ($\text{pH} = 8.0$) 缓冲溶液的效果最好。以它悬浮 30% 酿酒酵母，在 10°C 、 60MPa 下经过 6 次匀浆，得到蛋白质释放量 0.108 kg/kg 。

以蛋白质释放量来衡量细胞的破碎率是一种简便可行的方法。但是此法的缺点是没有考虑各种酶的活性。由于生物工程一般需要提取细胞特定部位的某种酶，所以在进行具体的应用研究时，应以特定的酶为对象来研究如何获得高浓度和高比活性的产物。

(二) 操作压力对细胞破碎的影响

图 4 是蛋白质释放量随高压匀浆机操作压力变化的曲线。当压力低于 30MPa 时，破碎的效果很差，当压力从 $30\text{—}60\text{MPa}$ 时，蛋白质释放量迅速增加，当压力 $>60\text{MPa}$ 后，增加的势头就减弱了。因此，操作压力的选择非常重要。从提高破碎效率的角度说，应当选择尽可能高的压力；从降低能耗和延长设备寿命的角度说，又应避免在很高的压力下操作，因为高压造成设备主要部件过度磨损。

从动力学公式 (1) 可见，压力对破碎的影响取决于压力指数 n 的大小。为求得 (1) 式中的 n 和 K ，将图 4 中的数据以 $\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right)$ 对压力 P 取双对数做图，得图 5。

由图 5 中直线的斜率求得 $n = 2.32$ ，由截距求得系数 $K = 4.29 \times 10^{-5} (\text{MPa})^{-2.32}$ 。由于指数 $n > 2$ ，所以操作压力对破碎酵母细胞的影响要比匀浆次数的影响大

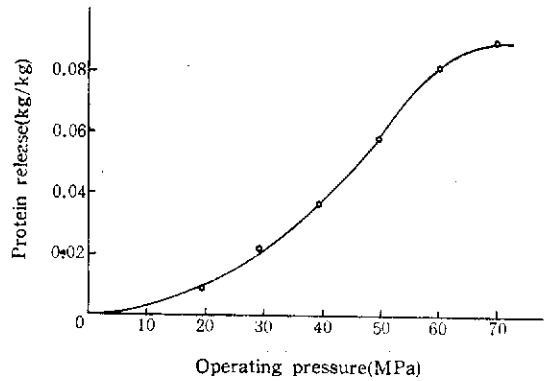


图 4 操作压力对蛋白质释放量的影响

Fig.4 Influence of operating pressure on protein release

鲜酵母 Fresh yeast (30%), 18°C , 2 次匀浆 2 Passes
磷酸盐缓冲溶液悬浮 Suspended in phosphate buffer, $\text{pH} 8.0$

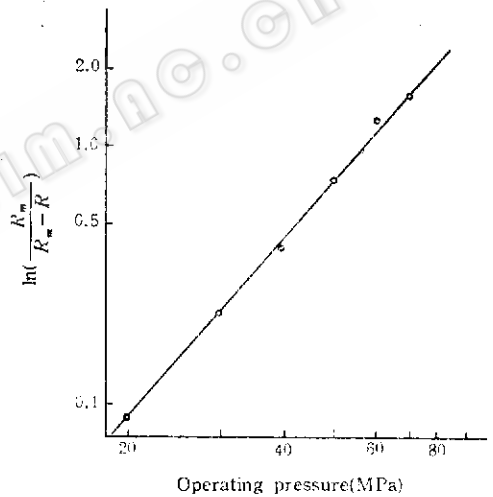


图 5 蛋白质释放量与操作压力的数据关联

Fig.5 Data correlation between protein release and operating pressure

得多。

(三) 细胞浓度对破碎的影响

有的文献^[2]认为，细胞浓度对高压匀浆过程没有影响。本文考察了 $5\% \text{—} 70\%$ 酵母浓度范围内的破碎结果，发现细胞浓度是有影响的。从图 6 的结果看出，蛋白质随细胞浓度的增加而呈下降的趋势，在低浓度范围 ($<20\%$) 内下降比较明显；当浓度 $>30\%$ 以后下降就不多了。

细胞悬浮液是非牛顿型流体，浓度的

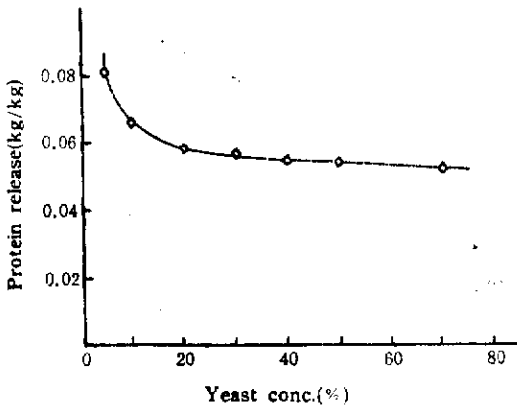


图 6 酵母浓度对蛋白质释放量的影响

Fig.6 Influence of yeast concentration on protein release

18℃, 50MPa, 2次匀浆, 2Passes, 磷酸盐缓冲溶液悬浮Suspended in phosphate buffer, pH8.0 增加使表观粘度增加。而高压匀浆的机理之一就是流体对细胞的剪切^[1], 剪切作用的强弱必然受到粘度的影响, 因此细胞浓度的增加会使高压匀浆的破碎效率下降。本文的实验结果证明了Doulah等^[7]浓度对高压匀浆有影响的理论推断。

虽然低细胞浓度可以获得较高的破碎

率, 但是细胞浓度低会导致产物浓度低, 使后分离过程的费用增加。因此提高破碎时的细胞浓度对后分离有利。

(四) 细胞破碎对后分离的影响

本文作者以前曾报道了用电子显微镜观察细胞匀浆混合物的结果^[8], 证明高压匀浆法产生的细胞碎片是不规则的, 匀浆中还有未破碎的细胞存在。本文又用激光颗粒测量仪测量了匀浆中的固体尺寸分布。

图7显示了破碎前后酵母匀浆的颗粒尺寸分布。未经破碎的酵母(N=0)的尺寸分布很集中, 主分布峰对应的颗粒尺寸为5.2μm。酿酒酵母近似于椭圆形, 这一尺寸可能是其平均直径。经过第一次破碎(N=1)后出现了许多小颗粒, 分布变分散了。经过6次破碎(N=6)后, 主分布峰已经移到2.1μm处, 表明大部分细胞已被破碎了。细胞碎片尺寸分布很广, 图7的最小测量值是0.9μm, 实际上有很多碎片的尺寸比这要小得多。

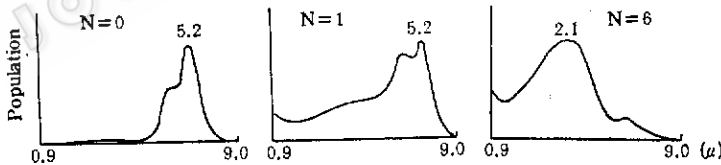


图 7 破碎对匀浆中固体颗粒尺寸分布的影响

Fig.7 Effect of disruption on the size distribution of yeast homogenate
鲜酵母Fresh yeast(30%), 18℃, 56MPa, 去离子水悬浮Suspended in deionized water, pH7.0, 酵母Yeast(N=0), 1次匀浆1Pass(N=1), 6次匀浆6Passes(N=6)

大量细胞碎片的产生, 给匀浆的下步分离造成困难, 因为只有移走这些碎片才能进行盐析或层析分离。本文考察了用微孔膜过滤除去细胞碎片时破碎次数对过滤阻力的影响。在图8中, 虚线表示未破碎的酵母和经过1次匀浆后的破碎了的酵母在过滤阻力上的骤然变化, 破碎1次的阻力相当于破碎前的30多倍。随着破碎次数

的进一步增加, 过滤阻力则以指数形式继续增加, 即阻力的对数与破碎次数呈直线关系。

过滤阻力的迅速增加, 一方面是由于更多的细胞得到破碎而释放出细胞碎片, 另一方面也是因为已经破碎了的细胞碎片在重复进行的破碎操作中尺寸进一步减小, 导致更多的小碎片的生成。因此, 增

加匀浆的次数，虽然可以得到更高的产物释放量，但同时也给后面的碎片分离过程造成更大的困难。减少匀浆次数的一个方法就是提高操作压力。本实验曾将操作压力提高到 80MPa，一次破碎相当于在 50 MPa 下三次破碎的效果，蛋白质释放量为最大释放量的 68%。但是高压造成匀浆阀磨损严重，而且设备负荷过高。因此有待于开发能在较高压力下稳定操作的高压匀浆机。

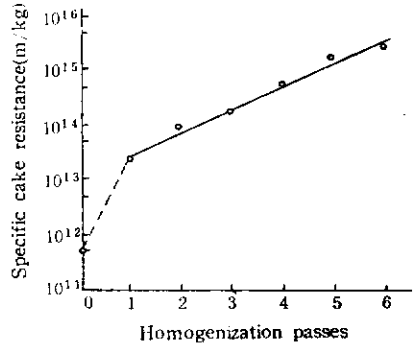


图8 破碎次数对细胞碎片的过滤阻力的影响
Fig.8 Influence of disruption passes on filtration resistance of cell debris
鲜酵母 Fresh yeast (20%), 16°C, 58MPa,
Suspended in phosphate buffer, pH8.0

参 考 文 献

- [1] Chisti, Y. and Moo-Young, M., *Enzyme Microb. Technol.*, 8(April):194, 1986.
- [2] Hetherington, P.J. et al., *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, 49:142, 1971.
- [3] Su, Zhiguo et al., *Proceedings of 4th European Congress on Biotechnology Vol. 2*, Neavel, O.M. et al. ed., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, p. 554, 1987.
- [4] Schacterle, G.R. and Pollack, R.L., *Analytical Biochem.*, 5:654, 1973.
- [5] Ruth, B.F., *Ind. Eng. Chem.*, 27:708, 806, 1935.
- [6] Harrison, J.S., *Process Biochem.*, 2(3):41, 1967.
- [7] Doulah, M.S. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 17:845, 1975.
- [8] Su, Zhiguo and Wesselingh, J.A., *Biotechnol. in Nederland*, 4:170, 1986.

EXTRACTION OF INTRACELLULAR PROTEINS FROM YEAST BY DISRUPTION IN A HIGH PRESSURE HOMOGENIZER

Su Zhiguo

(Biochemical Engineering Laboratory, Dalian University of Technology, Dalian)

The disruption of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells by a high pressure homogenizer was investigated for the extraction of intracellular proteins. A systematic study was carried out on the influence of physical and chemical factors including homogenization passes, operating pressure, size distribution of the cell debris and suspension properties during homogenization processes. By selection of a suitable phosphate buffer suspending the yeast, a protein release of 0.108kg/(kg fresh yeast) was obtained under the experimental condition of 10°C, 60 MPa and 6 passes through the homogenizer. The paper also discussed the influence of cell disruption on the subsequent removal of the cell debris from the homogenate.

Key words

High pressure homogenization; cell disruption; *Saccharomyces cerevisiae*