

用双水相萃取分离纯化磷酸甘油酸激酶 和磷酸甘油醛脱氢酶

谭天伟 沈忠耀

(清华大学化学工程系 北京 100084)

摘要 用聚乙二醇(PEG)/羟丙基淀粉(Reppal PES)双水相体系两步法从黄豆中分离磷酸甘油酸激酶(PGK)和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)。PGK在上相收率及GAPDH在下相收率均在80%以上。放大采用离心倾析机(decanters)连续处理匀浆液,用离心萃取器(separator)完成双水相体系的萃取两相分离。整个工艺具有处理量大、接触时间短、酶收率高的优点。

关键词 双水相萃取,磷酸甘油酸激酶,磷酸甘油醛脱氢酶,分离纯化

目前常用的双水相体系有高聚物(PEG)/高聚物(dextran)体系和PEG/盐体系,PEG/盐体系已成功地应用于酶大规模纯化^[1]。高聚物/高聚物体系比PEG/盐体系具有更广泛的应用前景,但主要问题是PEG/dextran体系成本太高。谭天伟等人系统地研究了十几种水溶性高聚物的相图^[2],结果表明,PEG/Reppal PES体系成本较低,只有PEG/dextran体系成本的1/8,因而有可能取代PEG/dextran体系。本文报道研究用PEG/Reppal PES体系从黄豆中分离纯化磷酸甘油酸激酶(PGK),磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

PEG4000为德国Serva公司产品,Reppal PES200从瑞典Reppe Glykos AB公司购得。PGK和GAPDH标准酶(兔子肌肉)为Serva公司产品。黄豆从德国当地超级市场购买,其他化学试剂均为分析纯。

1.2 酶活性与蛋白含量测定

蛋白含量测定采用Bradford法⁽³⁾,以牛血清蛋白为标准蛋白。PGK活性采用Bergmeyer⁽⁴⁾法测定,分析液;0.1mol/L三乙醇胺-HCl缓冲液(pH7.6),5mmol/LMgSO₄,0.5mmol/L EDTA,1.1mmol/L ATP,6mmol/L磷酸甘油酸PGA,0.2mmol/L NADH,4u/ml GAPDH。GAPDH活性分析液组成除PGA浓度为3mmol/L和GAPDH用7u/ml PGK替代外,其他成份和PGK分析液相同。

1.3 黄豆匀浆液制备

联系地址:北京化工大学化工学院生物化工研究室。

本文于1995年3月22日收到。

10g 黄豆粉碎后,加入 40ml 含 1.5mmol/L 2-巯基乙醇的 25mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.6)。在 0~4℃ 下搅拌 2h,制成黄豆粉匀浆液。

1.4 PEG4000 絮凝细胞碎片

在匀浆液中加入 9% 的 PEG4000(50% 溶液),用 2mol/L HCl 调节 pH 到 6.1,搅拌 2~5min,即可离心。在小规模处理匀浆液时,用 Sorvall. RC. 5B 离心机在 5000r/min 离心 10min,大规模分离时,固液分离用 decanter(Westfalia, Germany),进料速率 106L/h,转鼓转速 6704r/min,转鼓和螺旋传送器的转速差 15r/min。

1.5 双水相萃取分离 PGK 和 GAPDH

在第一步上清液中加入 12% (W/W)PEG4000, Reppal PES4% (W/W),上清液体积占总体积 60%,用 1mmol/L NaOH 调到 pH7.0,搅拌 5min。在小试两相分离时,采用 Sorvall. RC. 5B 离心机在 5000r/min 下离心 10min。在大规模分离(40g)时,采用 Separator (α -Laval, Sweden),转鼓转速 12500r/min,进料量 20L/h。

2 试验结果与讨论

2.1 PEG4000 絮凝细胞碎片

从豆类中提取酶是先将匀浆液离心除去碎片,收集上清液进行盐析、透析及层析处理^[5]。试验结果表明,匀浆液经 5000r/min 离心 20min,上清液仍不透明,而且酶收率只有 70% (如表 1)。若在匀浆液中加入 PEG,发现碎片很快絮凝沉降,在 3000r/min 下离心 5min 便可达到分离菌体碎片目的。当 PEG4000 浓度为 9% 时,可沉淀 80% 的杂蛋白。

表 1 不同方法从匀浆液中回收酶的比较

Table 1 Comparison of different methods to recovery enzymes

| | | Homogenate | Without flocculation | With flocculation |
|-------|----------------------|------------|----------------------|-------------------|
| PGK | Specific activity | 0.29 | 0.30 | 1.72 |
| | /u. mg ⁻¹ | | | |
| | Recovery/% | 100 | 68 | 80 |
| GAPDH | Specific activity | 0.31 | 0.33 | 1.6 |
| | /u. mg ⁻¹ | | | |
| | Recovery/% | 100 | 71 | 76 |

pH 对蛋白沉淀也有影响,pH 越低,杂蛋白沉淀越多,但 pH<5.5 时,PGK 不稳定,因而 pH 选为 6.0 左右。

2.2 PEG4000/Reppal PES 体系分离 PGK 和 GAPDH

在第一步上清液中加入 PEG4000 和 Reppal PES,可形成 PEG4000/Reppal PES 双水相体系。Reppal PES 浓度对酶分配系数影响不大,选用 4% Reppal PES。

PEG4000 浓度对 PGK 和 GAPDH 分离影响很大,如图 1 所示。当 PEG4000 浓度为 12% 时,PG 在上相收率,GAPDH 在下相的收率都可达到 85%,这表明 PGK 和 GAPDH 可以用双水相体系分离。用离子交换层析分离 PGK 和 GAPDH 比较困难,由于二者的电荷性质比较接近。

2.3 PEG4000 絮凝细胞碎片的放大

在大规模絮凝除去细胞碎片时,选用倾析机(decanter)。Decanter 由高旋转的转鼓和转速相近的内螺旋传送器组成。转鼓又分为分离区(锥型)和澄清区。澄清区内的固体被离心力摔到转鼓壁上,然后由螺旋传送器不断排入分离区内。Decanter 分离效果如表 2 所示。

当操作参数选为:清液压力(表压)为 0,匀浆液进料量 107L/h,转鼓转速 6724r/min,转鼓和螺旋传送器差 15r/min。PGK 和 GAPDH 收率分别为 78% 和 81%,比让试结查(PGK 收率 75%,GAPDH 收率 74%)好。

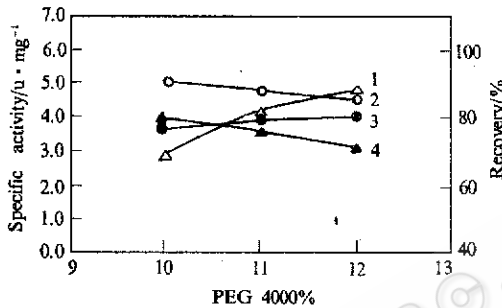


图 1 PEG4000 浓度对酶分配的影响

Fig. 1 Effect of PEG 4000 concentration on partition of enzymes

- 1. Recovery of GAPDH in bottom phase, 2. Recovery of PGK in top phase,
- 3. Specific activity of PGK in top phase, 4. Specific activity of GAPDH in bottom phase

表 2 Decanter 处理匀浆液结果

Table 2 Precipitation with decanter

| Pressure /MPa | Feed rate /L·h ⁻¹ | Bowl speed /r·min ⁻¹ | Rotation difference /r·min ⁻¹ | Temperature /°C | PGK activity /u·ml ⁻¹ | GAPDH activity /u·ml ⁻¹ |
|---------------|------------------------------|---------------------------------|--|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 0.5 | 108 | 6704 | 15.2 | 42.3 | 1.62 | 6.1 |
| 0.0 | 107 | 6724 | 15.1 | 28.9 | 9.7 | 8.9 |
| 0.0 | 107 | 6721 | 10.7 | 27.7 | 9.8 | 8.7 |

表 3 Separator 分离的效率

Table 3 Efficiency of separator

| Regulation screw / mm | Feed rate / L·h | Efficiency / % |
|-----------------------|-----------------|----------------|
| 14.5 | 20 | 98 |
| 13.5 | 30 | 99 |
| 13.5 | 30 | 99.5 |

2.4 双水相萃取过程放大

采用离心萃取器 Separator 分离双水相体系。离心萃取器的分离效率主可由下式给出^[1]:

$$Se = P_T - ((1 - P_B / (1 + V_f)) \times 100\%)$$

P_T 为轻相流出液中,轻相的体

积百分数。若没有夹带重相, $P_T = 100\%$ 。 P_B 为重相流出液中,重相的体积百分数。若不夹带轻相, $P_B = 100\%$ 。 V_f 为进料中轻重两相的料际相比。Separator 分离效果如表 3 所示。

当选择重相出口调节螺纹长度 13.5mm 时,分离效率 99% 以上,此时 PGK 在上相收

率 83%。从而达到 PGK 和 GAPDH 分离的目的。

3 结论

利用 PEG4000/Reppal PES 双水相体系分离纯化 PGK 和 GAPDH 是可行的。可在黄豆匀浆液中直接加入 PEG4000 絮凝细胞碎片及沉淀大部分杂蛋白。在第一步上清液中加入 PEG4000 和 Reppal PES 可形成双水相体系。当加入 PEG4000 浓度为 12%, Reppal PES, Reppal PES 浓度为 4% 时, PGK 在上相收率, GAPDH 在下相收率均在 80% 以上, 达到了二者分离的目的。整个工艺具有处理量大、接触时间短和酶收率高的优点。

致谢 本文工作是在德国生物技术研究(GBF)及瑞典伦德大学完成的。在此期间, 曾得到 H. Hustedt 博士和 G. Johansson 博士的热情帮助和悉心指导, 作者在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] Kula N R, Krone K H, Hustedt H. In: Fichter A, *Advances in Biochemical in Biochemical Engineering*, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1982, Vol 24: 73~118.
- [2] Tan T W, Shen Z Y. In: *International Symposium on Thermodynamics In Chemical Engineering and Industry*, Chemical Industry Press, 1994: 171~175.
- [3] Bradford M M. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248~255.
- [4] Bergmeyer H U. *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Weinheim Bergstrasse, Chemie Verlag, 1970, Vol. 1: 425~463.
- [5] Ronald G D, David T D. *J Biological Chemistry*, 1974, 249(1): 162~166.

Isolation of Phosphoglycerate Kinase and Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase by PEG4000/Reppal PES Aqueous Two Phase System

Tan Tianwei Shen Zhongyao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract A process to extract and to purify phosphoglycerate kinase (PGK) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) from soy bean was studied. The PEG4000 was added into the homogenate to flocculate cell debris and to precipitate most of the inactive proteins. The PGK and GAPDH could be purified 5 times in this step with the recoveries of more than 75%. The PGK was isolated from GAPDH with PEG4000/Reppal PES aqueous two phase system. The recovery of PGK in the top phase and that of GAPDH in the bottom phase were up to 85%. The scale up of the process was carried out by a decanter and a separator.

Key words Phosphoglycerate kinase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, aqueous two phase, purification