

萃取破碎法提取酵母醇脱氢酶的研究

修志龙 苏志国

(大连理工大学生物化学教研室, 大连 116012)

将双水相萃取同细胞破碎结合在一起, 以水平搅拌式珠磨机为设备, 以聚乙二醇和硫酸铵为成相体系, 从酿酒酵母中以边破碎边萃取的方式提取醇脱氢酶。节省了萃取设备和时间, 并利用双水相对蛋白质的保护作用提高了醇脱氢酶的活性。经过萃取破碎的酵母匀浆离心分相后, 细胞碎片滞留在下相, 90%以上的醇脱氢酶分配在上相, 分配系数大于10, 纯化倍数大于2。

关键词 酵母醇脱氢酶; 细胞破碎; 双水相萃取; 水平搅拌式珠磨机

酵母醇脱氢酶(E.C.1.1.1.1)催化伯醇和醛之间的可逆反应。近年来随着有机相酶催化和膜反应器的发展, 该酶得到较多的研究和应用^[1,2]。酵母醇脱氢酶(简称ADH)是胞内酶, 提取时首先要打破细胞壁, 使酶释放出来。然后用微孔膜过滤除去细胞碎片。ADH是一个易失活的含4个亚基的金属酶^[3]。在破碎细胞和用膜过滤除碎片时很易失活。本研究设想采用双水相萃取代替膜过滤, 利用聚乙二醇(PEG)对酶的保护作用减少清除碎片过程中的酶失活。本文用水平搅拌式珠磨机作细胞破碎设备, 以粘度较低的PEG和无机盐为成相系统, 在细胞破碎前加入双水相组分, 使细胞破碎过程伴随着双水相萃取, 成为一种新型的萃取破碎过程, 达到细胞破碎和双水相萃取同步完成的目的。

材料和方法

(一)设备和流程

1. 实验设备: 水平搅拌式珠磨机(Dyno-Mill), 型号KDL, 为瑞士WAB公司制造。本实验采用间歇操作, 搅拌转

速3200 r/min, 破碎室容积0.15 L, 填充有0.5—0.75 mm的玻璃珠0.19 kg, 夹套冷却水温度为0℃。酵母浓度为5%干重(w/v)。破碎时间除特殊说明外皆为2 min。

2. 实验流程: 在萃取破碎的实验中, 将酵母、PEG和无机盐配制的悬浮液加入珠磨机。经过萃取破碎后的匀浆在3500 g下离心5 min分相。在先破碎后萃取的对比实验中, 将双水相组分加入经珠磨机破碎后的匀浆中, 在振荡混合器上混合萃取2 min, 再于3500 g下离心5 min分相。分相后细胞碎片将分配至无机盐富集的下相, ADH被萃取至PEG富集的上相。含产物的上相用亲和吸附做进一步纯化并回收PEG。有关吸附纯化和PEG的回收将另作报道。

(二)材料

实验采用广东梅山-马利酵母有限公司生产的干酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。聚乙二醇600, 1540, 4000, 由上海化学试剂采购供应站提供。所用无机盐均为分析纯。将干酵母与聚乙二醇和

本文于1992年3月18日收到。

本研究得到国家自然科学基金会青年基金的资助。

无机盐配制成的酵母悬浮液于室温下活化 1 h 后, 加入珠磨机进行破碎。

(三) 方法

采用与文献一致的表示法^[4]。以胞内产物在破碎后匀浆中的释放浓度为衡量。在萃取破碎的实验中, 先将匀浆稀释 10 倍, 使其不能成相, 然后测定醇脱氢酶的活性和蛋白质的浓度, 作为匀浆液相中释放的 ADH 和蛋白质的总含量。

1. 醇脱氢酶活性分析: 据 Bergmeyer 等人的方法^[5], 在 340 nm 下测量醇脱氢酶 ADH 转化乙醇为乙醛时吸光度的变化。一个 ADH 活性单位定义为 25℃ 下, pH 9.0 时每秒钟将 1 μ mol 的乙醇转化为乙醛所用的酶量。ADH 的体积活性为每毫升溶液所含的活性单位 (即 u/ml); 比活力为每毫克蛋白质所含的酶活性 (即 u/mg)。

2. 蛋白质浓度的分析: 据 Bradford 法^[6]以考马斯亮蓝 G 250 为染色剂, 在 595 nm 下比色, 用牛血清白蛋白为标准。

结果与讨论

(一) 双水相组分的加入对细胞破碎结果的影响

在珠磨法破碎细胞过程中, 胞内组分的释放量是破碎时间的函数。图 1 表示了胞内蛋白和 ADH 活性随操作时间变化的动力学曲线, 其中曲线 B 是加入了 18% PEG 600 和 17% 硫酸铵时的情况。由图可见, 加入双水相组分使匀浆中的最大酶活性达到约 100 u/ml, 而用去离子水悬浮酵母所得的最大酶活性只有 60 u/ml 左右; 蛋白质释放量则近乎一致, 遵循同一条动力学曲线。

从上图的曲线变化规律上看, 不论有无双水相组分, 细胞组分的释放都经历了

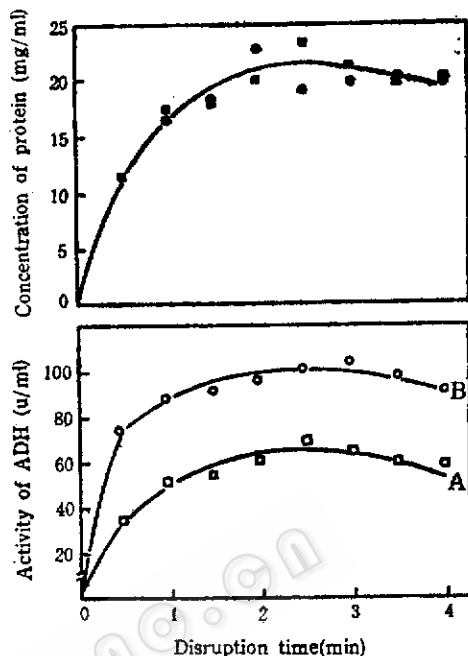


图 1 酵母匀浆中蛋白浓度和 ADH 活性与破碎时间的关系

Fig. 1 Correlation of protein concentration and ADH activity in yeast homogenate to disruption time

A, Without aqueous two-phase composition
B, With aqueous two-phase composition

迅速上升、相对平稳和趋于下降三个阶段, 相对平稳阶段对应的操作时间都为 2—3.5 min。延长时间反而会使酶和蛋白质含量下降。这说明伴随破碎过程存在着产物失活问题。破碎时间越长, 破碎室内珠子摩擦产生的热量越多, 产物活性损失的可能性越大。我们在细胞破碎动力学方面曾做过详细的研究, 有关结果将另外报道。

不同的双水相组成对细胞破碎的结果有不同的影响。图 2 以不加双水相时细胞破碎的蛋白质释放量和 ADH 活性为基准, 比较了三种分子量的 PEG 所组成的双水相组分的加入对蛋白质和酶活性释放量的影响。就蛋白质释放量来说, 三种双水相组分的存在并没有多少增大作用, 但

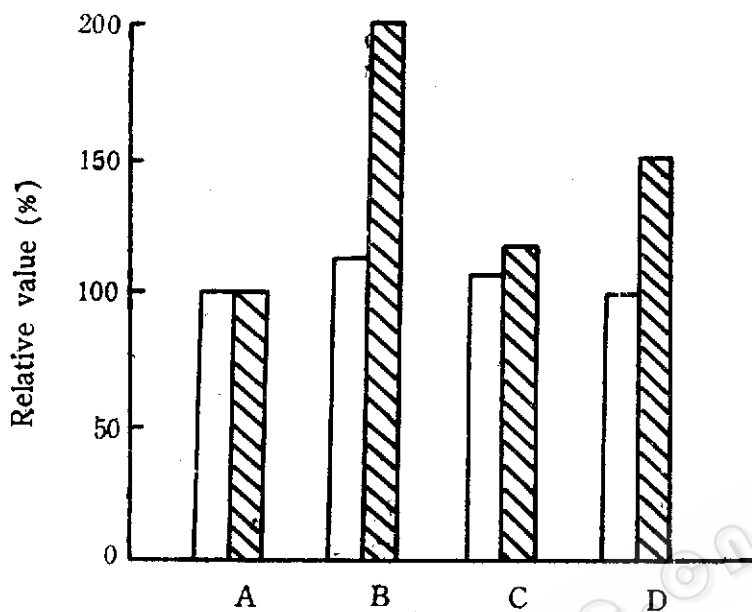


图 2 三种双水相系统的比较

Fig. 2 Comparison of three aqueous two-phase systems

A. 4 mmol/L K_2HPO_4 /150 mmol/L NaCl;B. 18% PEG 600/17% $(NH_4)_2SO_4$ C. 14% PEG 1540/15% K_2HPO_4 ;D. 10% PEG 4000/9% $(NH_4)_2SO_4$

□ Protein;

▨ ADH

对ADH 的活性确有不同程度的提高。其中以 PEG 600-硫酸铵组成的体系的效果最好。

萃取破碎法能否成功的一个关键问题是双水相组分的加入对细胞破碎过程是否有不利影响。图 1 表明双水相组分的加入使目标产物ADH 的酶活性有不同程度的提高,而对蛋白质释放总量的影响不大,说明双水相的加入只是使酶活性得到保护,而细胞的破碎率变化不大。值得指出的是本文所用的双水相系统的粘度都不大,如果采用高粘度的 PEG-葡聚糖或其它双高聚物系统,由于珠子研磨效率下降,细胞的破碎率也可能会下降。

(二)单独加入无机盐及PEG的影响

本文考察了单独加入无机盐和单独加入 PEG 对破碎细胞过程的影响。实验结果表明,无机盐的种类影响较大。就磷酸

盐和硫酸铵而言,磷酸盐的加入在多数情况下都使ADH 活性降低,而硫酸铵常常有利于活性的保持。图 3 是单独加入硫酸铵的影响,在浓度为 8—20% 的范围内,ADH 的活性较高,可达 100 u/ml。进一步增加盐浓度,由于盐析作用的出现而导致ADH在液相中的活性下降。

单独加入 PEG 有较大的影响。由图 4 可见,随着PEG 600浓度的增加,ADH 的活性也增加。在浓度为 15% 左右达到约100 u/ml。此后酶活性开始随PEG 600浓度的增加而下降。PEG 4000对ADH 有较强的沉降作用,其浓度>10%时,ADH 的活性显著降低。相对于ADH来说,PEG 对胞内蛋白的沉降作用更加显著。

考虑到 PEG 单独存在时亦可能具有沉淀蛋白质的作用^[7],本文采用稀释的方法,将PEG 600>15%的匀浆稀释若干

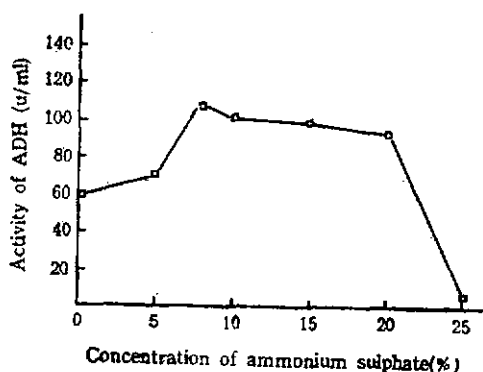


图 3 硫酸铵对ADH活性的影响

Fig. 3 Effect of ammonium sulphate on the activity of ADH

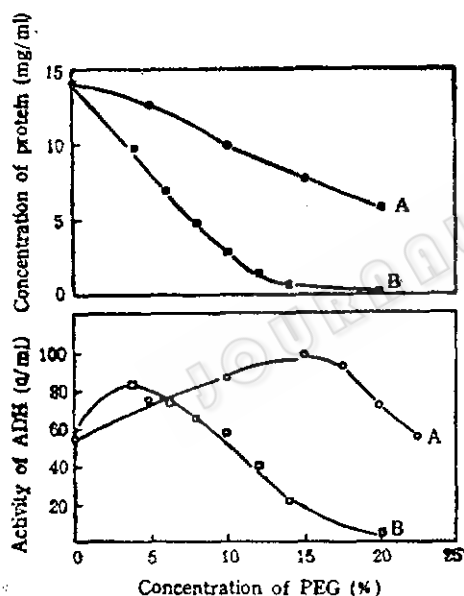


图 4 PEG对酵母细胞破碎的影响

Fig. 4 Effect of PEG on yeast cell disruption

A: PEG 600

B: PEG 4000

倍,再离心取上清液测酶活性,所得的酶活性保持上升,直到PEG 600 > 25%后才开始下降,证实了PEG对ADH确有沉淀作用。PEG 4000的稀释实验也证实了这一点。这说明随着PEG分子量和浓度的增大,对蛋白质的沉淀作用变强。而且这种沉淀作用具有选择性。

PEG对蛋白质有保护作用,文献已有报道。Albertsson曾用实验证明鸡卵白蛋白稍受液相剪切就失活,但加入PEG后即使受到强烈剪切也不变性^[8]。目前工业上的高压匀浆和高速珠磨法破碎细胞都使用强烈的液相剪切,造成某些易失活的蛋白质变性。因此加入含PEG的双水相组分有利于活性的保持。虽然单独加入PEG或硫酸铵都可以提高酶的活性,但却不能形成双水相。从所获得的最大酶活性来看,单独加入或同时加入PEG 600和硫酸铵都可达到100 u/ml,比活力5 u/mg;而不加这些组分只能达到60 u/ml,比活力3 u/mg,差别还是较大的,关于PEG和硫酸铵对蛋白质的保护机理目前尚不清楚,有待进一步考察。

(三) 萃取破碎法的进行时间对萃取平衡的影响

在破碎萃取联合过程中,破碎细胞的时间亦是萃取混合时间。表1是操作时间对18%PEG 600—17%硫酸铵系统破碎萃取各参数的影响。从萃取结果上看,所有参量相差不大,93%—95%的ADH都可以被萃取到上相。将破碎后的匀浆继续振荡萃取,所得结果亦相同,说明已达到萃取平衡。

萃取破碎法能否做到破碎和萃取同时完成,关键还在于破碎操作的时间能否满足萃取平衡的实现。Hustedt等指出:双水相的表面张力很低,容易达到平衡,甚至可用静态混合器做萃取器^[9]。本文所用的水平搅拌式珠磨机具有较强的混合能力。表1的结果说明,在0.5 min以后,萃取就已基本达到平衡。此后虽然ADH的释放量还在增加(见图1),但萃取结果基本不变。ADH的最大活性一般是在2—3 min时达到的。因此将操作时间选择为酶的最大活性所对应的时间,同时也满

表 1 萃取破碎操作时间对萃取结果的影响

Table 1 Influence of operation time on extraction results in the extractive disruption process

Operation time (min)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
Partition coeff. of ADH (K_e)	13.3	13.1	14.2	11.8	13.2	14.6	14.8
Partition coeff. of protein (K_p)	1.83	1.89	2.32	1.65	1.80	1.79	1.90
Phase ratio (R)	1.00	1.18	1.16	1.23	1.27	1.13	1.42
Recovery of ADH in top phase(%) (Y_t)	93.0	94.0	94.0	93.6	94.0	94.0	95.5
Purif. factor (F)	2.50	2.91	2.63	2.31	2.60	2.53	2.09

足了萃取酶的要求, 不需另外延长时间。

(四) 萃取破碎与先破碎后萃取的综合比较

为了从萃取的角度进一步考察新过程的可行性, 本文将萃取破碎同先进行细胞破碎再加入双水相组分萃取的过程进行了比较, 如表 2 所示。在几种双水相组成下, 新过程的 R 、 K 、 Y_t 都与原过程相似, 原过程的 ADH 分配系数 K_e 略高一

些, 新过程的纯化倍数 F 略高一些。总的说来, 新过程与原过程的萃取结果基本相同。但从上相 ADH 的活性看, 新过程明显优于原过程, 这是由于破碎过程中 PEG 对 ADH 活性保护作用的结果。同时也说明代表萃取结果的参数 R 、 K 、 Y 只是相对值, 它们无法反映产物萃取的绝对值量。

自双水相萃取用于胞内蛋白质的提取

表 2 两种过程萃取结果的比较

Table 2 Comparison of extraction results in two processes

Phase composition		18% PEG-17% (NH_4) ₂ SO ₄		20% PEG-18% (NH_4) ₂ SO ₄		18% PEG-18% (NH_4) ₂ SO ₄	
Type of process*		I	I	I	I	I	I
Phase ratio	R	1.08	1.15	1.46	1.65	1.07	1.00
Partition coeff. of ADH	K_e	19.5	16.0	18.3	13.1	10.4	13.9
Partition coeff. of protein	K_p	3.20	2.96	2.83	2.34	3.51	3.57
Recovery of ADH in top phase(%)	Y_t	95.0	94.8	96.4	95.6	91.8	93.3
Activity of ADH in top phase(u/ml)		100	173	80	90	102	153
Purification factor	F	1.46	2.57	2.17	2.20	1.66	2.37

* I: Conventional process (extraction after disruption)

* I: Novel process (simultaneous disruption and extraction)

以来, 所见的工作都是在破碎细胞后加入双水相组分, 利用各种萃取器进行萃取^[9]。本文将破碎和萃取进行综合, 利用破碎细胞过程的液相混合来实现边破碎边萃取, 既节省了额外的设备又缩短了加工时间, 而且双水相还保护了胞内产物的活

性。从萃取结果上看, 以 18% PEG 600 和 17% 硫酸铵为成相体系, 使细胞碎片滞留在下相, 90% 以上的醇脱氢酶分配在上相, 分配系数大于 10, 纯化倍数大于 2, 实现了较好的分离。

参 考 文 献

- [1] Kennedy, C. L. and Domach, M. M., *Biotechnol. Prog.*, 6:41—47, 1990.
[2] Mouillet-Loevenbrunck, D. et. al., *J. Ferment. Bioeng.*, 68(6):404—410, 1989.
[3] Buhner, M. and Sund, H., *European J. Biochem.*, 11:73—79, 1969.
[4] Christ, Y. and Moo-Young, M., *Enzyme Microb. Technol.*, 8:194—204, 1986.
[5] Bergmeyer, H. et. al., *Methods of Enzymatic Analysis*, vol.2, Academic Press, New York, 1974.
[6] Bradford, H., *Anal. Biochem.*, 72:248—254, 1976.
[7] Bell, D. J. et.al., *Adv. Biochem. Eng.*, 26: 1—72, 1983.
[8] Albertsson, P.-A., *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Wiley, New York, 1985.
[9] Hustedt, H. et.al., *Partition in Aqueous Two Phase Systems*, eds. by Walter, H. et. al., Academic Press, Orlando, pp 529—587, 1986.

Simultaneous Cell Disruption and Aqueous Two-phase Extraction for Separation of Alcohol Dehydrogenase from Yeast

Xiu Zhilong Su Zhiguo

(Biochemical Engineering Laboratory, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Aqueous two-phase extraction and cell disruption were combined and performed simultaneously in a horizontal stirred bead mill (Dyno-mill) for the separation of alcohol dehydrogenase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Polyethylene glycol (PEG) 600 and ammonium sulphate were used as the phase forming system. The advantages of the novel process included saving additional extractor and processing time, and increasing the enzyme activity due to the protective effect of the aqueous two-phase during cell disruption. The resulting homogenate was directly centrifuged for phase separation. The cell debris was retained in the bottom phase. More than 90% of alcohol dehydrogenase was partitioned into the top phase with the partition coefficient greater than 10 and the purification factor greater than 2.

Key words Yeast alcohol dehydrogenase; cell disruption; aqueous two-phase extraction; Dyno-mill