

# 枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶蛋白酶在双水相系统中的分配行为\*

林哲甫 李玉玲 成吕玲 张维钦

(生物学系)

## 摘 要

观察了枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶、蛋白酶在聚乙二醇/硫酸铵和聚乙二醇/磷酸盐两个双水相系统中的分配行为。设计了借液-液萃取方式分别部分纯化上述两酶粗品的方案。经部分纯化后 $\alpha$ -淀粉酶的比活力(按每毫克制品含活力单位数计算)提高至6倍,活力回收率可达80%;蛋白酶比活力提高至8倍,活力回收率在50~60%间。此法具有简易、快速、有效、并可准确放大缩小操作规模等特点。

**关键词** 双水相系统, 部分纯化, 枯草杆菌,  $\alpha$ -淀粉酶, 蛋白酶

传统液-液萃取涉及使用含有低极性组分的双相系统, 其中的低极性组分对生物大分子高层次化学结构及与此密切关联的生物学活性有损害作用。自本世纪50年代出现了双水相系统以后<sup>[1]</sup>, 液-液萃取技术又重新进入生物高分子研究领域<sup>[1~5]</sup>。

作者观察了国内产量较大、用途较广的枯草杆菌(BF-7658) $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶, 在本文所述两个双水相系统中的分配行为。据此设计了部分纯化酶粗制品的液-液萃取方案, 为工业用酶制品的部分纯化提供了具有简易、快速、有效并可准确放大缩小操作规模等特点的手段。

## 1 材料和方法

所用 $\alpha$ -淀粉酶、蛋白酶粗品, 系枯草杆菌(BF-7658)发酵液经喷雾干燥而成, 蒙无锡酶制剂厂提供。其余均系分析纯、化学纯或BR级试剂。

蛋白酶按Nomoto法<sup>[6]</sup>测定活力, 但须先将反应系统中存在的聚乙二醇(PEG6000, 以下简称PEG)的终浓度稀释至0.25%(W/W, 以下均同)以下; 将磷酸盐的终浓度稀释至1.25%以下, 以免干扰活力测定。以pH6.5, 50℃, 每分钟使底物酪蛋白释放1微摩尔酪氨酸所需酶量为1活力单位。

$\alpha$ -淀粉酶活力测定, 按Bernfeld<sup>[7]</sup>的方法进行。以pH6.0, 50℃每分钟生成1微摩尔葡萄糖所需酶量为1活力单位。

本文1988年8月2日收到

●本课题由国家自然科学(高技术)基金资助。生物学系生物化学专业八七届毕业生何鸣参加部分工作

蛋白质浓度按Bradford法测定<sup>[8]</sup>。以小牛血清白蛋白作标准曲线。

蓝光吸收能力的测定。两种酶粗制品所含色素对蓝光有吸收能力,其相对含量以581-G型光电比色计(使用蓝色滤光片)测得的光密度值表示。

双水相系统的构建和相图的绘制,按文献<sup>[1]</sup>方法进行。向刻度离心管加入一定重量高浓度PEG贮备液(简称组分P)。滴加高浓度无机盐贮备液(简称组分Q)。振荡混和,继续滴加,直至混合物呈现混浊,表示开始形成互不相溶的两个相。记录混合物的重量百分组成。向混合物滴加一定重量的水,振摇后混浊消失重新呈现澄明态。然后再滴加无机盐贮备液,至再度出现混浊为止。如此反复操作,可获得一连串成对的(P,Q)重量百分组成数值。取P对Q作图,即得双水相系统相图。按此方法,作者分别构建了PEG/硫酸铵系统(简称系统I),PEG/磷酸盐系统(简称系统II),PEG/柠檬酸钠系统(简称系统III)(相图略)。

系统I所用硫酸铵贮备液均以盐酸、氢氧化钠溶液调节pH值至6.0,并含 $40\text{m mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸缓冲液(pH6.0)。此系统上相主含PEG,下相主含硫酸铵。

系统II所用磷酸盐贮备液包括50%磷酸氢二钠与50%磷酸二氢钠溶液,按不同比例混合,以调节所需pH值,然后引入系统II。此系统上相主含PEG;下相主含磷酸盐。

考察酶在各系统中的分配行为时,基本方法包括:①固定系统组分P(或Q)的百分组成于定值,令组分Q(或P)的百分组成于一定范围内递变。②调整系统II中磷酸缓冲液的组成,以调节其pH值。然后向各个系统引入总浓度一定的酶粗品悬液。分相平衡后,追踪 $\alpha$ -淀粉酶和蛋白酶的不溶物、黄褐色色素的去向,并观察(R)(Ke)(Kp)(SA)(At%) and (Ab%)诸参量的变化趋势。

比较各系统上下相对酶及总蛋白质溶解(或沉淀)能力的方法:配制一系列百分组成不同的系统I、II。待分相平衡后,分别从各系统中抽取一定量的上相(或下相),分置于离心管内。加入总浓度一定的粗酶悬液。充分振摇后,于3500rpm旋离30分钟。分别取上清液作酶活力及蛋白质回收率测定。

利用系统I、II部分纯化 $\alpha$ -淀粉酶的方法:制备总体积为50ml的系统I,令其中PEG、硫酸铵、粗酶悬液的总浓度分别为20.5%,13.7%,5%。将此系统置于125ml分液漏斗内,充分振摇,静置(约15分钟)。待完全分清上下相后,记录两相体积,分别测定两相中 $\alpha$ -淀粉酶活力、总蛋白质浓度、蓝光吸收能力等指标。分离除去下相和界面混浊层,保留上相。然后向此上相加入pH6.0的磷酸盐贮备液,使其最终总浓度达10.2%。如此即可构成一个系统II。经振摇、静置后,分离上下相,作各项测定如上述。分离所得系统II下相,对蒸馏水充分透析除盐,对高浓度PEG反透析浓缩,冻干,可得部分纯化 $\alpha$ -淀粉酶制剂。

借助两个百分组成不同的系统I作连续萃取,以部分纯化蛋白酶粗品的方法:先构建含PEG13.7%,含硫酸铵20.5%的系统IA。引入总浓度为3.15%的蛋白酶粗品悬液,借FS-1型高速分散器作分散处理,静置分相。分离除去澄明的下相和混浊的界面层。保留上相,此中主含PEG和占总活力86%的蛋白酶。向上相加入适量水和硫酸铵贮备液,令其中PEG、硫酸铵的总浓度分别达到6.8%,13.7%。如此即构成一个系统IB。经分散、静置分相后,分离出下相。此下相主含硫酸铵和占总活力70%左右的蛋白酶。

透析除盐,反透析浓缩,冻干,得部分纯化蛋白酶制品。

借系统 I、II 作连续萃取,以部分纯化蛋白酶的方法:先构建含 PEG20.5%,硫酸铵13.7%的系统 I。引入总浓度为3.15%的粗蛋白酶悬液。经分散、静置分相后,分离除去主含硫酸铵的下相和混浊界面层,保留上相。此上相主含PEG和占总活力 90%的蛋白酶。向上相加入适量水和磷酸盐贮备液(pH7.5),令PEG、磷酸盐的总浓度分别达到13.7%,10.2%。如此即构成一个系统 II。经分散、静置分相后,分离出下相。此下相主含磷酸盐和大部分蛋白酶。经透析除盐,反透析浓缩,冻干,即得部分纯化蛋白酶制品。

考察萃取操作规模对分离效果的影响的方法是维持系统 I、II 的百分组成不变,而仅增大或缩小系统的总体积,然后观察描述分配行为的诸参变量的变化情况。

本文使用的术语定义如下:

相体积比(R) = 上相体积/下相体积,

酶的分配系数(K<sub>e</sub>) = 单位体积上相含酶单位数/单位体积下相含酶单位数,

蛋白质的分配系数(K<sub>p</sub>) = 上相蛋白质浓度/下相蛋白质浓度,

上相酶活力百分数(A<sub>t</sub>%) = 100/(1 + 1/R · 1/K<sub>e</sub>),

下相酶活力百分数(A<sub>b</sub>%) = 100/(1 + R · K<sub>e</sub>),

酶的比活力(SA) = 酶活力单位数/干燥酶制剂毫克数。有时亦表示为每毫克蛋白质含酶单位数。

## 2 结果和讨论

### 2.1 枯草杆菌α-淀粉酶的分配行为与部分纯化

2.1.1 α-淀粉酶在系统 I 中的分配行为 在百分组成不同的系统 I 中,粗酶制品所含不溶物一部分沉积至系统的最底层,另一部分则集结于两相界面,形成一混浊薄层。黄褐色素的分配系数总是接近 1。从图 1 数据可以看到,系统 I 的相体积比(R)随硫酸铵总浓度的增大而下降。酶和总蛋白质的分配系数(K<sub>e</sub>)和(K<sub>p</sub>)均随硫酸铵总浓度的增大而增大。它们的分布曲线相似。图 1 中只给出(K<sub>e</sub>)的分布曲线。(K<sub>e</sub>)分布曲线有一值得注意之处。当系统 I 中PEG总浓度固定于一个比较低的适宜值(如图 1 中的 13.7%),而令硫酸铵总浓度由 6%递增至 20%时,(K<sub>e</sub>)值可由 1.08 跃增至 52。但当系统 I 中PEG的总浓度过高(如图 1 中的 20.5%)时,(K<sub>e</sub>)值的增量显著缩减。说明 PEG 总浓度过高能排挤酶分子,阻碍其进入上相。α-淀粉酶富集于上相的程度(即 A<sub>t</sub>%)以及此酶在上相的纯度(按每毫克蛋白质含酶单位数计算)均随硫酸铵总浓度之增大而上升。在全部受试的系统 I 中,α-淀粉酶分子的大多数都分配于上相。

2.1.2 α-淀粉酶在系统 II 中的分配行为 不溶物、黄褐色素在系统 II 中的分配行为和系统 I 相似。(R)随盐总浓度的增大而下降,随 PEG 总浓度增大而上升。(K<sub>e</sub>),(K<sub>p</sub>)和(A<sub>b</sub>%)诸参变量的变化趋向均显著不同于系统 I(图 2)。图 2 中均取 K<sub>e</sub> 和 K<sub>p</sub> 的倒数作图,可以直观显示酶和总蛋白质主要分布于下相的情形。(1/K<sub>e</sub>)(1/K<sub>p</sub>)和(A<sub>b</sub>%)的分布曲线基本上呈钟罩形走向。它们都在磷酸盐总浓度为 10%处表现其最大值(图 2, B<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>)。(1/K<sub>e</sub>),(A<sub>b</sub>%)亦在 PEG 总浓度为 10%处表现其最大值。唯(1/K<sub>p</sub>)则在 PEG

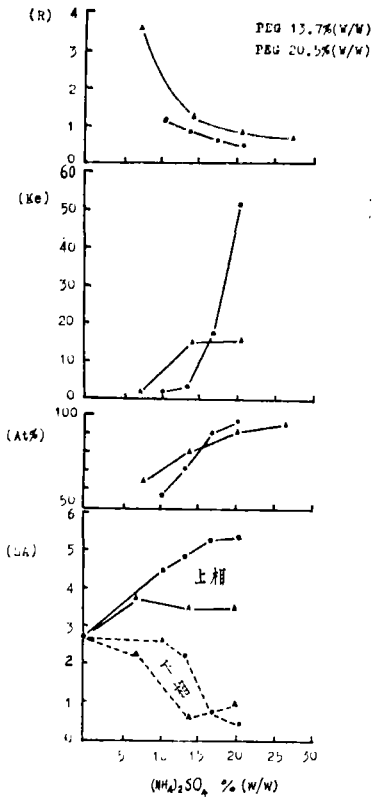


图1 PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 系统百分组成对(R), (Ke), (At%), (SA)诸参数的影响

Fig. 1 Effects of the composition of PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> system on (R), (Ke), (At%) and (SA)

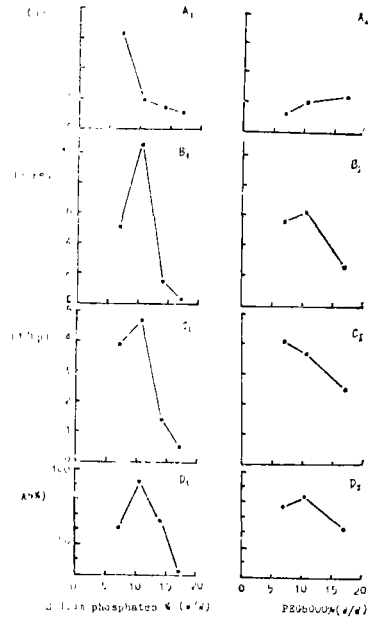


图2 PEG6000/磷酸钠盐(pH6.0)系统百分组成对(R), (Ke), (Kp), (Ab%) 诸参数的影响 (A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>)等系统中 PEG6000的总浓度均为13.7%(W/W), (A<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>)等系统中磷酸钠盐的总浓度均为10.2%(W/W)

Fig. 2 Effects of the composition of PEG6000/sodium phosphates (pH6.0) system on (R), (Ke), (Kp) and (Ab%). In (A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>) column, the total concentrations of PEG6000 were fixed at 13.7%(W/W); while in (A<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>) column, the total concentrations of sodium phosphates were fixed at 10.2%(W/W)

总浓度为7%处表现其最大值。(1/Ke)(1/Kp)峰位不重叠,表现系统Ⅱ对 $\alpha$ -淀粉酶分子与其它蛋白质分子有轻度的分辨能力。

$\alpha$ -淀粉酶分子趋向下相的程度和磷酸盐缓冲对的pH值亦有密切关系。

2.1.3  $\alpha$ -淀粉酶在系统Ⅰ、Ⅱ中分配行为的解释 一种蛋白质分子在一个双水相系统的两相间作不对称分配的行为,可能与其在两相中的溶解度有关。溶质分子总是以较强的趋势进入对其溶解能力较强的一相中去,而逃脱对其沉淀能力较强的一相,以尽量降低溶质分子在系统中的势能。为检验这种可能性,定量比较了系统Ⅰ、Ⅱ游离上、下相对 $\alpha$ -淀粉酶的沉淀能力。结果如表1所示。系统Ⅰ游离上相和系统Ⅱ的游离下相对 $\alpha$ -淀粉酶的溶解能力都分别大于它们各自的配偶相。这些结果支持了上述的解释。

表1 系统 I、II 游离上、下相对 $\alpha$ -淀粉酶及总蛋白质溶解能力的比较Tab. 1 Comparison between solubilities of  $\alpha$ -amylase and total proteins in the isolated top phase and bottom phase of the system I and II

	双水相系统的百分组成(W/W)				游离上相的溶解能力		游离下相的溶解能力	
	PEG6000 (%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	磷酸盐 (%)	粗酶悬液 (%)	酶活力回收率(%)	蛋白质回收率(%)	酶活力回收率(%)	蛋白质回收率(%)
系 统 I	13.7	10.2	—	1.5	100	88	92	69
	20.5	6.83	—	1.5	100	92	86	81
	20.5	13.7	—	1.5	100	89	61	55
	20.5	20.5	—	1.5	98	82	37	46
系 统 II	6.83	—	10.2	1.5	88	87	100	100
	13.7	—	10.2	1.5	86	74	100	100
	13.7	—	13.7	1.5	76	63	98	98
	13.7	—	17.1	1.5	50	40	89	93

2.1.4 利用系统 I、II 部分纯化 $\alpha$ -淀粉酶 连续萃取的结果见表 2。数据说明, 仅两步连续萃取之后, 可将酶的比活力提高至原水平的 6 倍, 活力回收率可达 80%。但有一值得注意之处, 若酶比活力改按每毫克蛋白质含酶单位数计算, 则纯度仅提高至原水平的 1.3 倍。这一事实的物理意义在于表明本萃取过程对蛋白质分子与非蛋白质分子的分辨能力较强, 而对不同蛋白质分子的分辨能力则很有限。

表 2 利用系统 I、II 作连续萃取部分纯化枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶的结果Tab. 2 Results of partially purification of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase by continue extraction using system I and II

提 纯 步 骤	总蛋白质 (mg)	总活力 (U)	比 活 力		提 纯 倍 数		得率 (%)	蓝光吸收值 (OD/10 <sup>3</sup> U)	气味
			A(U/mg 蛋白质)	B(U/mg 制剂)	按A定义计算	按B定义计算			
粗 酶 悬 液	60	159840	2664	94	1	1	100	0.36	+++
PEG/硫酸铵系统 上相	45	153000	3400	—	1.27	—	96	—	+
PEG/磷酸钠系统 下相	36	129000	3583	—	1.34	—	81	0.10	—
PEG/磷酸钠系统 下相冻干品	—	—	—	540	—	6	—	—	—

2.1.5 扩大、缩小操作规模对分离效果的影响 维持系统 I、II 的百分组成不变, 改变系统的总体积, 对萃取过程诸参变量, 包括(R), (K<sub>e</sub>), (K<sub>p</sub>), (A<sub>t</sub>%), (A<sub>b</sub>%)等, 均无明显影响。

2.2 枯草杆菌蛋白酶的分配行为与部分纯化

2.2.1 蛋白酶在系统Ⅲ中的情形 观察此项目时,发现柠檬酸盐对蛋白酶的稳定性有显著损伤效应,因此放弃继续观察。

2.2.2 蛋白酶在系统Ⅰ中的分配行为 系统Ⅰ、Ⅱ中所含PEG能严重干扰Nomoto活力测定法。将反应系统中所含 PEG 的终浓度稀释至0.25%之下,可以消除干扰。

从图3数据可以看到,(R),(Ke),(Kp),(At%)和上相的(SA)值,均随系统Ⅰ中PEG总浓度之增大而逐渐增大。(R)随系统Ⅰ中硫酸铵总浓度的增大而下降。(Ke),(Kp)和(At%)诸量均随硫酸铵总浓度递增而呈钟罩式变化,峰值位于硫酸铵总浓度为17%的系统。说明要使蛋白酶分子和总蛋白质最大限度地分配于系统Ⅰ的上相,需要选择一个最适当的硫酸铵浓度。(SA)则随硫酸铵浓度的增大而上升。

2.2.3 蛋白酶在系统Ⅱ中的分配行为 系统Ⅱ所含磷酸盐能严重干扰Nomoto活力测定法。将反应系统中所含磷酸盐的浓度稀释至1.25%以下,可以消除干扰。

从图4可以看到(R),(1/Ke),(1/Kp)诸量均随系统Ⅱ中PEG总浓度的增大而增大,但随系统中磷酸盐总浓度之增大而下降。但系统Ⅱ百分组成的变化,对(Ab%)值并无显著影响。说明在受试范围内,蛋白酶分子均主要进入下相。

2.2.4 (1/Ke),(1/Kp),(Ab%)和下相的(SA)诸量都是系统Ⅱ中磷酸盐缓冲对pH值的函数 图5数据说明,当pH值为7.5时,对蛋白酶分子及总蛋白质分溶于下相最为有利,比活力最高。

2.2.5 借助两个百分组成不同的系统Ⅰ部分纯化蛋白酶 连续萃取过程及其结果总结于表3。经部分纯化后,蛋白酶的比活力,按每毫克制剂含酶单位数计算,提高至原水平的8倍左右;若按每毫克蛋白质含酶单位数计算,则仅提高至原水平的2.4倍。说明本萃取法对蛋白质分子与非蛋白质分子的分辨能力较强,而对不同蛋白质分子的分辨能力有限。

2.2.6 以系统Ⅰ、Ⅱ部分纯化蛋白酶 连续萃取的过程与结果总结于表4。从两种不同计算方法所得的比活力可以看到本萃取法仍然存在同一种局限性,即此法对分辨不同蛋白质分子的能力仍然有限,分辨蛋白与非蛋白分子的能力较强。

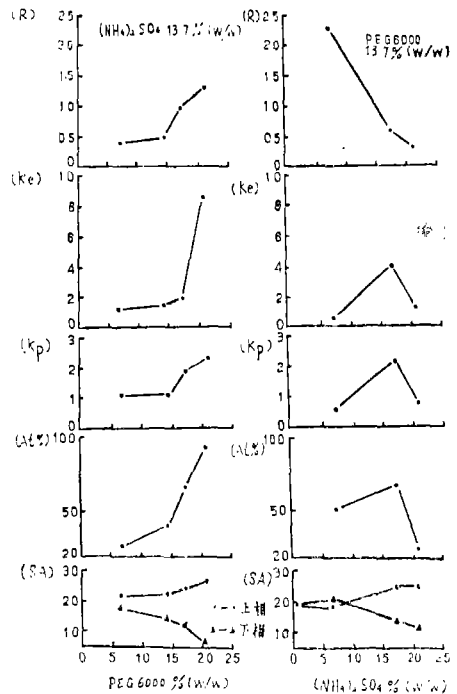


图3 在PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 双水相系统中, R, Ke, Kp, At%和SA诸参变量,是PEG6000、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度的函数

Fig.3 The relationship between the parameters(including R, Ke, Kp, At%, and SA of the PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system) and the concentration of the components of the system

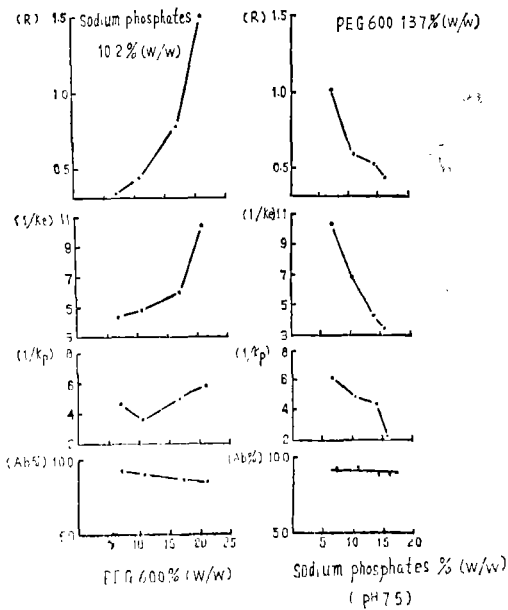


图4 枯草杆菌蛋白酶在PEG6000/磷酸钠(pH7.5)双水相系统中的分配行为

Fig.4 The partitioning behaviour of the *B. subtilis* proteinase in the PEG6000/phosphate(pH7.5) aqueous two-phase system

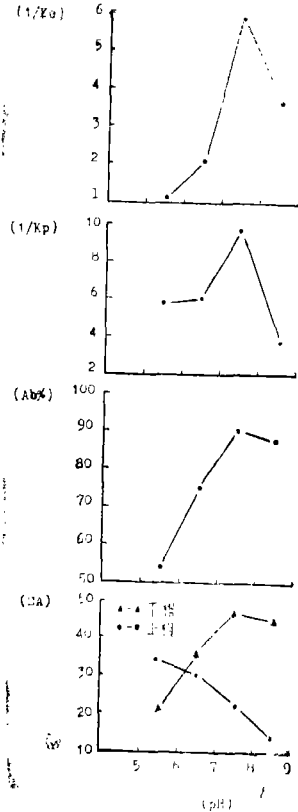


图5 在PEG6000/磷酸钠双水相系统中,磷酸钠缓冲液pH值对枯草杆菌蛋白酶分配行为的影响

Fig.5 Effect of the pH values of the PEG6000/phosphates aqueous two-phase system on the partitioning of the *B. subtilis* proteinase

表3 借百分组成不同的两个PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>双水相系统快速部分纯化枯草杆菌蛋白酶的过程与结果

Tab.3 Partially purification of *B. Subtilis* proteinase by liquid-liquid extraction using PEG6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system I A and I B

提纯步骤	总蛋 白质 (mg)	总活 力 (U)	比 活 力		提 纯 倍 数		活力回 收率 (%)	蓝光值 (O.D/ 10 <sup>3</sup> U)	气味 (+/-)
			A(U/mg 蛋白质)	B(U/mg 制剂)	按A定义 计算	按B定义 计算			
蛋白酶悬液	32.4	446	14	0.23	1	1	100	31	+++
系统 I A 上相	11.7	385	33	—	2.35	—	85	14.4	+
系统 I B 下相	7.4	245	33	—	2.35	—	54	0.18	-
系统 I B 下相, 透析、浓缩、冻干	7.1	238	33.5	1.8	2.4	7.8	52	0.18	-

表4 倍PEG6000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , PEG6000/phosphates(pH7.5)双水相系统作连续萃取, 快速部分纯化枯草杆菌蛋白酶的过程与结果

Tab.4 Rapid partially purification of *B. subtilis* proteinase by successive extraction using aqueous two-phase system I (PEG6000/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) and system II (PEG6000/phosphates(pH7.5))

提纯步骤	总蛋 白质 (mg)	总活 力 (U)	比 活 力		提 纯 倍 数		活力回 收率 (%)	蓝光值 (O.D/ $10^3\text{U}$ )	气味 (+/-)
			A(U/mg 蛋白质)	B(U/mg 制剂)	按A定义 计算	按B定义 计算			
蛋白酶悬液	130	1819	14	0.28	1	1	100	31	+++
系统I, 上相	62.2	1641	26.4	—	—	—	90	15	+
系统II, 下相	38.2	1164	30.5	—	—	—	64	0.09	-
系统II下相,透 析、浓缩、冻干	38	1164	33.3	1.6	2.4	5.7	64	0.09	-

2.2.7 扩大、缩小萃取操作规模的影响 结果表明, 对(R), (Ke), (Kp), (At%), (Ab%), (SA)诸量均无影响, 说明这些方法的规模可以准确放大或缩小。

### 参 考 文 献

- [1] Per-Åke Albertsson, *Partition of Cell Particals and Macromolecules* (Second edition), Wiley Interscience, 1971, 1~323
- [2] Johansson G et al., *Eur. J. Biochem.*, 33 (1973), 379~386
- [3] Johansson G et al., *Proceedings International Solvent Extraction Conference, Society of Chemical Industry, London, Vol. I, 1974, 927~942*
- [4] Shanbhag V P et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61 (1974), 1141~1146.
- [5] Kular M-R et al., *Adv. Biochem. Eng.*, 24 (1982), 73~118
- [6] Masao Nomoto et al., *J. Biochem.*, 46 (1959), 653~667
- [7] Bernfeld P, *Adv. in Enzymol.*, 12 (1951), 379~428
- [8] Bradford M, *Anal. Biochem.*, 72 (1976), 248~254

## Partitioning Behaviour of *Bacillus subtilis*' $\alpha$ -Amylase and Proteinase in Aqueous Two-phase Systems\*

Lin Zhefu\*\* Li Yuling Cheng Luling Zhang Weiqin

### Abstract

The partition characteristics of *B. subtilis*'  $\alpha$ -amylase and proteinase in PEG 6000/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and PEG6000/sodium phosphates(pH7.5) aqueous two-phase systems were observed. The factors that influence the distribution coefficients and stability of the enzymes were investigated. Procedures of liquid-liquid extraction were developed for the partially purification of the crude preparations of *B. subtilis*'  $\alpha$ -amylase and Proteinase. After partially purifying the specific activity (units/mg preparation) of  $\alpha$ -amylase and proteinase preparations raised to 8 times and 6 times respectively, and the recovery of the two enzymes activity were 80% and 60% respectively. These procedures were very easy to operate, high speed, and efficacious, and their operative scale can be amplified or reduced without changing efficiency.

**Keywords** aqueous two-phase systems, partially purification, *Bacillus subtilis*'  $\alpha$ -amylase, proteinase

● This investigation was supported by Grant Awarded by the National High Scientific and Technical Foundation in China

● ♦ Department of Biology