

果胶酶亲和吸附剂的制备及其性能比较*

贾月² 白志辉¹ 弓爱君² 张洪勋^{1**}

(1 中国科学院生态环境研究中心 北京 100085 2 北京科技大学 北京 100083)

摘要 以甜菜渣、果胶、海藻酸钠为原料,与表氯醇在碱性条件下交联,制备了果胶酶亲和吸附剂并应用这几种亲和吸附剂对草酸青霉果胶酶和黑曲霉果胶酶进行亲和层析实验。结果表明:用小于60目的甜菜渣粉末和海藻酸钠制备的果胶酶亲和吸附剂(分别简称为SBP吸附剂和SA吸附剂)具有较好的纯化果胶酶性能,其中SBP吸附剂性能稳定,而SA吸附剂膨胀系数较大,在流动相改变时引起流速不稳。

关键词 甜菜渣 海藻酸钠 亲和吸附剂 果胶酶

果胶酶主要以微生物发酵法生产。由于微生物发酵过程中代谢产物比较复杂,因此自微生物发酵液中提取果胶酶具有一定难度。果胶酶的提取、纯化方法主要有:有机溶剂沉淀^[1]、盐析^[2]、离子交换柱层析^[3]、凝胶过滤柱层析^[4]、亲和层析^[5]、凝胶电泳^[6]等。其中,以亲和层析效率最高。文献报道的果胶酶亲和吸附剂的制备方法是以高分子量的果胶酸钠或海藻酸钠为配基,用表氯醇将其交联制得^[7],作者通过重复文献的制备方法认为,高分子量的果胶酸钠价格比较昂贵,并且在分离过程中易被果胶酶降解,不易重复使用;海藻酸钠制备的亲和吸附剂容易在流动相条件改变时大幅度地膨胀或收缩,造成流速不稳定,难于控制。为了降低亲和吸附剂的成本,本论文以富含果胶质的廉价生物物质——甜菜渣作为配基和载体制备果胶酶亲和吸附剂,对其分离效果进行了研究,并与其他几种果胶酶亲和吸附剂进行了比较。

1 材料与方法

1.1 果胶酶来源

1.1.1 草酸青霉果胶酶^[8] 培养基组成:甜菜渣24%,硫酸铵2%,自来水73%,少量磷酸盐。将配制好的培养基分装于500ml的三角瓶中,每瓶30g,

接种果胶酶高产菌株草酸青霉 BZH-2002,于30℃、环境相对湿度75%、接触空气条件下,静置培养72h,发酵后熟物用水浸提,即得果胶酶水溶液。

1.1.2 黑曲霉果胶酶^[9] 培养基组成:甜菜渣43%,硫酸铵8.6%,自来水47%,少量磷酸盐。将配制好的培养基分装于500ml的三角瓶中,每瓶20g,接种果胶酶高产菌株黑曲霉 PE1650,于31℃、环境相对湿度75%、接触空气条件下,固态发酵84h,发酵后熟物用水浸提,即获得果胶酶水溶液。

1.2 亲和吸附剂制备

1.2.1 用甜菜渣制备亲和吸附剂^[10] 原料准备:将甜菜渣在65℃烘干、粉碎、筛分,将粒径40目~60目和粒径<60目的粉末分别收集,备用。

降酯:分别取粒径40目~60目和粒径<60目的甜菜渣粉末各10g,用水浸泡、清洗,再用95%乙醇清洗。于4℃下加入100ml 95%乙醇水(3:1)溶液,搅拌过程中,每隔1h分3次加入共50ml 2mol/L NaOH的乙醇水(3:1)溶液,第一次加入20ml,后两次加入15ml,最后一次加入后搅拌3h。用G3砂芯漏斗过滤,然后再溶于200ml 0.5mol/L NaOH的乙醇水(3:1)溶液,于4℃下搅拌过夜。用乙醇水(3:1)洗至中性,再用95%乙醇洗,空气中干燥。

交联:降酯后产物(粒径40目~60目和粒径<60目的降酯甜菜渣)分别溶于3.75ml表氯醇和60ml 95%乙醇混和液,加10ml 5mol/L NaOH,悬浊液倒入250ml有盖锥形瓶中,摇床上摇6h,45℃。从摇床取出,用1mol/L乙酸中和至pH7,中止反应。G3砂芯漏斗抽滤,60ml乙醇水(3:1)洗涤,再用

收稿日期:2003-08-22 修回日期:2003-11-17

* 国家“863”计划资助项目(2001AA246014)

科学院知识创新工程项目(KZCX1-SW-19)

** 通讯作者,电子信箱:hxzhang@mail:cees.ac.cn

40ml 95% 乙醇洗。空气中干燥恒重。产物悬浊于 150ml 蒸馏水中, 搅拌, 静置 1min。倾去上清液, G3 砂芯漏斗过滤, 60ml 95% 乙醇洗涤。空气中干燥, 得到比较均匀的粉末。

1.2.2 用果胶、海藻酸钠制备亲和吸附剂 选用试剂: 果胶(pectin from citrus peel, Mr30000-100000, Fluka 公司产品); 海藻酸钠(sodium alginate, 化学纯, 北京市旭东化工厂)。按 Romhous 的方法^[7] 制备这两种亲和吸附剂。

1.3 果胶酶亲和层析

1.3.1 粗酶液预处理 用 0.2μm 孔径的微滤膜将粗酶液过滤后, 在减压旋转蒸发仪上进行浓缩, 然后于透析袋中透析 36h, 取出后置于冰箱中冷藏。

1.3.2 亲和层析 将制备的 4 种亲和吸附剂分别装填色谱柱, 柱直径 $\phi = 16\text{mm}$, 柱长 $L = 180\text{mm}$ 。取适量浓缩透析后的酶液, 分别加入 4 个亲和色谱柱中, 进行分离实验。先用 pH 4.2 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液洗脱, 出第一峰后, 改用 pH5.6 的含有 1mol/L NaCl 的乙酸-乙酸钠缓冲液洗脱。流速 30ml/h。用波长为 280nm 的紫外检测器在线检测洗脱液的蛋白浓度, 记录仪记录紫外吸收曲线。用自动部分收集器收集洗脱液(洗脱液中加入 0.02% 的防腐剂叠氮化钠)。

1.4 果胶酶活性测定

1.4.1 内切果胶酶活性测定-AJDA 法^[11] 1 个酶活力单位定义为: 在测定反应条件下, 半小时使 1mg 果胶完全脱胶所需的酶的量。

1.4.2 果胶裂解酶活性测定^[12] 将果胶(SIGMA 公司产品)溶解于 0.05mol/L pH6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶液中, 配制成 0.25% 的果胶溶液。取 2.5ml 于石英比色皿中, 加入适当稀释的酶液 0.1ml, 搅匀, 以纯底物溶液为空白比色, 于室温 25℃, 235nm 下每 30s 测一次吸光度。测至 3min。以每分钟吸光度值变化 0.01A 为 1 个酶活力单位。

1.4.3 聚半乳糖醛酸酶活性测定-DNS 法^[13] 1 个酶活力单位定义为: 在测定反应条件下, 每分钟分解底物(聚半乳糖醛酸)产生 1μmol 半乳糖醛酸所需的酶的量。

1.5 蛋白质含量的测定(Folin 酚法)^[14]

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[15]

2 结果与讨论

果胶酶是一类能够降解果胶质的酶的总称, 它

既有内切酶和外切酶之分, 又有水解酶和裂解酶之分, 还有果胶酯酶等; 而不同微生物发酵所得到的果胶酶所含的果胶酶种类又有所差异; 因此, 我们在分离纯化果胶酶时分别采用了 3 种测定方法同时测定内切果胶酶、果胶裂解酶和聚半乳糖醛酸酶的活性, 以便得到较详细的比较数据。

2.1 草酸青霉果胶酶亲和层析

本实验制备了 4 种亲和吸附剂, 首先分别对草酸青霉果胶酶进行了亲和层析分离, 其中用果胶酸钠制备的亲和吸附剂在进行一次分离后被较大程度降解, 难以重复使用; 粒径为 40 目~60 目的 SBP 吸附剂粒径较大, 有效表面积小, 柱容量很小, 进一步研究的意义不大。所以我们只对粒径 < 60 目的 SBP 吸附剂和 SA 吸附剂做了更深入的研究, 对这两种亲和吸附剂的性能进行了比较。

草酸青霉果胶酶粗酶液的酶活测定结果表明, 其中含有内切果胶酶和聚半乳糖醛酸酶活性, 而没有果胶裂解酶活性。分别用 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目)和 SA 吸附剂对草酸青霉果胶酶进行亲和层析纯化, 并作出内切果胶酶洗脱曲线, 见图 1 和图 2。

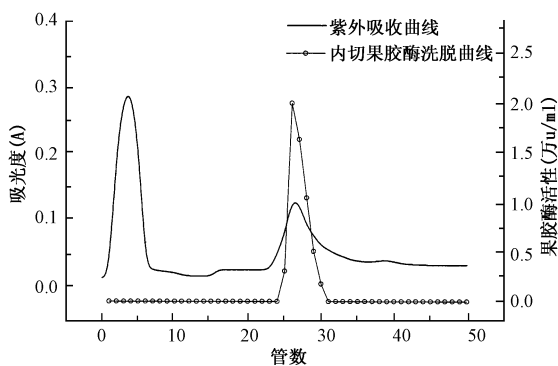


图 1 SA 吸附剂分离草酸青霉果胶酶洗脱曲线

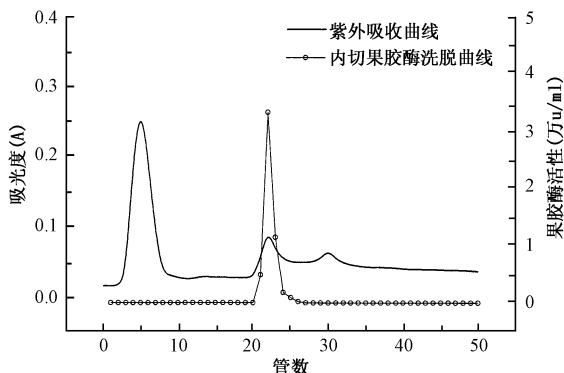


图 2 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目)分离草酸青霉

果胶酶洗脱曲线

两种吸附剂分离草酸青霉果胶酶的色谱图比较相似, 只有第 3 个紫外吸收峰 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 的较明显。分别对各吸收峰进行酶活测定, 结果表明: 内切果胶酶和聚半乳糖醛酸酶的活性都集中在第二个吸收峰, 其它吸收峰没有检测到果胶酶活性, 为杂质吸收峰。收集第二个吸收峰的洗脱液, 测定其蛋白含量和酶活性, 计算出比酶活、收率和纯化倍数, 如表 1 所示。结果表明, SBP 吸附剂对聚半乳糖醛酸酶和内切果胶酶的纯化倍数都比 SA 吸附剂的高。

本实验还对这两种亲和吸附剂的柱容量进行

了测试。将多次浓缩透析后的高浓度草酸青霉果胶酶粗酶液(内切果胶酶活力为 8.0×10^4 u/ml) 加样到色谱柱内进行亲和层析实验。调整加样量, 直到第一个吸收峰能检测到部分内切果胶酶活性, 即说明亲和吸附柱已饱和。此时, 测定第二个吸收峰的内切酶活性。饱和吸附峰的酶活性与亲和吸附剂质量之比即为柱容量。结果表明, SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 的柱容量为 4.20×10^4 u/g, SA 吸附剂的柱容量为 7.82×10^4 u/g。由于甜菜渣中果胶的含量只有 20%~ 30%, 即 SBP 吸附剂的亲和配基含量较少, 因此柱容量较小。

表 1 草酸青霉果胶酶分离结果

分离步骤	聚半乳糖醛酸酶			内切果胶酶		
	比酶活($\times 10^2$ u/mg)	收率(%)	纯化倍数	比酶活($\times 10^3$ u/mg)	收率(%)	纯化倍数
粗酶液	1. 55	100	1	3. 82	100	1
亲和层析						
SA 吸附剂	3. 29	100	2. 13	7. 59	84. 6	1. 99
SBP 吸附剂	3. 73	88. 7	2. 41	9. 49	91. 3	2. 49
(粒径 < 60 目)						

2.2 黑曲霉果胶酶亲和层析

黑曲霉果胶酶粗酶液的酶活测定结果表明, 其中含有内切果胶酶、聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶活性。分别用 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 和 SA 吸附剂对黑曲霉果胶酶进行亲和层析纯化, 并作出内切果胶酶活性的洗脱曲线, 见图 3 和图 4。

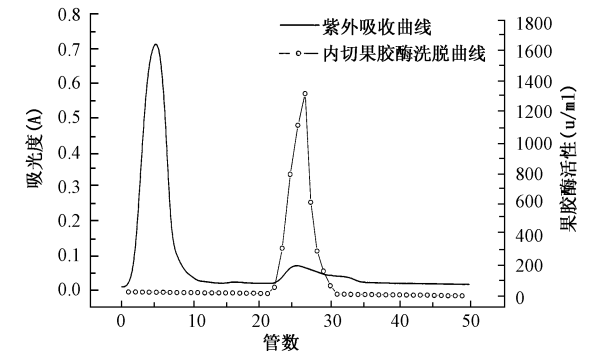


图 3 SA 吸附剂分离黑曲霉果胶酶洗脱曲线

两种吸附剂分离黑曲霉果胶酶的色谱图差异较明显, SA 吸附剂的第 3 个吸收峰不明显而 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 的第 3 个紫外吸收峰较大。分别对各吸收峰进行酶活测定, 结果如表 2 所示。

由表 2 可以看出, SA 吸附剂吸附了一部分果胶裂解酶(第二个吸收峰); 而另一部分裂解酶在低

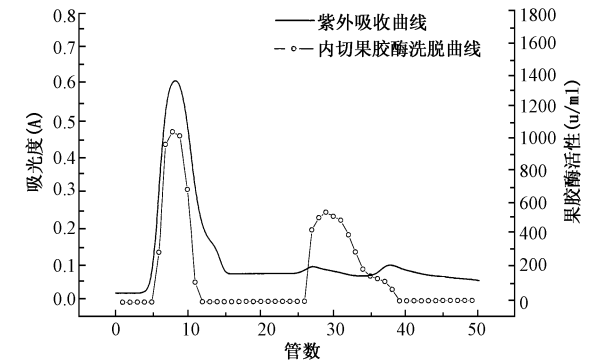


图 4 SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 分离黑曲霉果胶酶洗脱曲线

盐缓冲液淋洗下随其它杂蛋白及色素流出(第一个吸收峰), 但这部分裂解酶量很少。由于第一个峰没有内切果胶酶活性, 所以推测为外切果胶裂解酶。SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 在分离过程中不吸附果胶裂解酶, 这是因为吸附部分(第二个吸收峰) 检测不到果胶裂解酶的活性。由表 2 还可看出, SBP 吸附剂(粒径 < 60 目) 比 SA 吸附剂对黑曲霉内切果胶酶的提纯倍数要高, 但收率低, 这可能是由于 SA 吸附剂所吸附的果胶裂解酶是内切酶, 而 SBP 吸附剂对这部分不吸附。

上述实验过程中, 当洗脱液由低离子强度(不

表 2 黑曲霉果胶酶分离结果

分离步骤 step	聚半乳糖醛酸酶			内切果胶酶			果胶裂解酶		
	比酶活(u/mg)	收率(%)	纯化倍数	比酶活(u/ mg)	收率(%)	纯化倍数	比酶活(u/ mg)	收率(%)	纯化倍数
粗酶液	20. 8	100	1	118	100	1	7. 55	100	1
SA 吸附剂									
第二峰	293	79. 6	14. 1	1816	87. 8	15. 3	98. 0	1. 36	13. 0
第一峰	0	0	0	0	0	0	18. 0	72. 9	2. 4
SBP 吸附剂									
第二峰	309	47. 0	14. 8	2174	58. 2	18. 4	0	0	0
第一峰	12. 2	30. 1	0. 58	79. 7	34. 7	0. 67	12. 1	82. 8	1. 6

加 NaCl 的缓冲液) 改变为高离子强度(添加 1mol/L NaCl 的缓冲液) 时, SA 吸附剂大幅度收缩, 柱长缩短 25% 左右, 洗脱液的流速也明显降低; 当洗脱液再改回低离子强度后, SA 吸附剂又大幅度膨胀; 因此在色谱分离过程中, 洗脱液的流速很难控制, 影响分高效果。SBP 吸附剂的伸缩性很小, 实验过程中洗脱液的流速稳定, 平行实验结果的重复性好。

综上所述, SBP 吸附剂(粒径< 60 目) 与其它几种果胶酶亲和吸附剂相比具有原料廉价易得, 分高效果明显, 无降解现象, 性能稳定, 可重复使用等优点, 是一种新型、实用的果胶酶亲和吸附剂。

参考文献

[1] Abel Schejter, Lionel Marcus. Isozymes of Pectinesterase and Polygalacturonase from *Botrytic cinerea* Pers. Methods in Enzymology, 1988, (161) : 366~ 373

[2] Pitt D. Pectin Lyase from *Phoma medicaginis* var *pinodella*. Methods in Enzymology, 1988, (161) : 350~ 354

[3] Helga Forster. Pectinesterase from *Phytophthora infestans*. Methods in Enzymology, 1988, (161) : 355~ 361

[4] 巫华美, 周建. 禾黑芽枝霉诱变体果胶酶的分离纯化和理化特性. 贵州科学, 1997, 15(3) : 163~ 170

[5] Lubomira Rexova Benkova, Vladimir Tibensiky. Selective

purification of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase by affinity chromatography on cross lined pectic acid. Biochim Biophys Acta, 1972, (268) : 187~ 193

[6] Hanyoshi Konno. Galacturan. 1, 4- α -Galactuanidase from Carrot *Daucus carota* and Liverwort *Marchantia polymorpha*. Methods in Enzymology, 1988, (161) : 373~ 380

[7] Rombouts F M, Wisenburg A K, Pilnik W. Chromatographic separation of orange pectinesterase isoenzymes on pectates with different degrees of crosslinking. Journal of Chromatography, 1979, (168) : 151~ 161

[8] 张洪勋, 白志辉. 草酸青霉固态发酵生产果胶酶. 中国, 专利申请号 NO. 03120793. 6, 2003. 3. 20

[9] 张洪勋, 齐鸿雁. 固态发酵果渣菜渣制备果胶酶. 中国, 专利公开号 NO. 1271774, 2000. 11. 01

[10] 张洪勋, 白志辉, 贾月. 一种果胶酶亲和吸附剂的制备方法. 中国, 专利申请号 NO. 03149599. 0, 2003. 7. 18

[11] 顾红燕, 齐鸿雁, 张洪勋. 高大毛霉制取果胶酶发酵条件实验. 过程工程学报, 2002, 2(3) : 252~ 256

[12] Collmer A, Ried J L, Mount M S. Assay methods for pectic enzymes. Methods in Enzymology, 1988(161) : 329~ 335

[13] 江洁, 李彩芹. 果胶酶活性分光光度测定方法的研究. 齐齐哈尔大学学报, 1998, 14(1) : 62~ 66

[14] 李建武, 萧能, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 168

[15] 李建武, 萧能, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. 189

Preparation of Affinity Chromatographic Adsorbents for Pectinases Purification

JIA Yue² BAI Zhi-hui¹ GONG Ai-jun² ZHANG Hong-xun¹
(1 Research center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085, China)
(2 Beijing University of Sciences and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract Sugar beet pulp (SBP) powder, pectin and sodium alginate (SA) were cross-linked with epichlorohydrin respectively in an alkaline condition. Such preparations were used as the affinity chromatographic adsorbents for the separation and purification of pectinase from *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. The results showed that the affinity chromatographic adsorbent prepared by SBP powder with less than 60 sieve mesh has better character than others for pectinase purification. SBP adsorbent was stable, while SA adsorbent resulted in unstable flow of mobile phase because its larger dilatability.

Key words Sugar beet pulp Sodium alginate Affinity chromatographic adsorbent Pectinase