

文章编号:1673-1689(2005)05-0030-03

粗纤溶酶液的离子交换树脂脱色

刘晓兰^{1,2}, 郑喜群², 杜连祥¹, 王文侠², 于阿娜²

(1. 天津科技大学 天津 300222; 2. 齐齐哈尔大学 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 根霉固体发酵产生的粗纤溶酶液中含有许多的色素物质,这些色素物质在酶的分离提纯中会污染色谱分离填料,严重影响填料的分离度和使用寿命.选择 D301 和 D296 离子交换树脂、活性炭和高岭土作为脱色介质,对粗纤溶酶液进行脱色实验研究.实验结果表明,当树脂的反离子采用 Cl^- 型时,D301 和 D296 离子交换树脂可以用于粗纤溶酶液的脱色,脱色过程对目标纤溶酶还有一定的提纯作用.

关键词: 粗纤溶酶液; 离子交换; 脱色

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Decolour of Crude Enzyme Produced from Microbes Fermentation by Ion Exchange Resin

LIU Xiao-Lan^{1,2}, ZHENG Xi-Qun², DU Lian-Xiang¹, WANG Wen-Xia², YU A-Na²

(1. Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China; 2. Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Many coloring substances generally exist in crude enzyme produced by microbes fermentation. These substances contaminate chromatography separation medium and lead severe decreases in resolution and life of the medium. A decolor procedure for the crude fibrinolytic enzyme fermented from *Rhizopus chinensis* 12 # was developed established by using anion exchange resin. The result showed that when Cl^- was used as counter ion of anion exchange resin, D301 and D296 could be applied to remove color substances from the crude fibrinolytic enzyme, and decolor process also had certain purification effect on the targeted enzyme.

Key words: enzyme fermentation decolor; ion exchange; resin

为了阐明某种酶的性质、结构与功能,必须获得该种酶的纯品.因此,酶的分离和纯化是广大化学、生物学和医学工作者长期研究开拓的课题.

微生物可以产生多种有价值的酶.在微生物发酵液中常常存在一些色素物质.色素的存在给酶的分

离纯化增加了难度.

液相色谱常作为酶的提纯方法.分离酶的液

相色谱填料价格相对较高,而色素物质结构和电荷性质复杂,常常污染色谱填料,减少色谱填料分离的载量,使填料很难彻底再生,严重影响色谱填料分离度和使用寿命.因此,酶在进行色谱法的精提纯之前,必须先除去伴有的色素物质.

多数离子交换树脂不适用于分离蛋白质等大分子生物物质,主要原因是交联度较大,因而空隙

收稿日期:2004-10-09; 修回日期:2005-01-10

基金项目:黑龙江省普通高校骨干教师创新能力计划项目;天津市自然科学基金项目(No. 023803411)资助课题.

作者简介:刘晓兰(1962-),女,辽宁昌图人,教授,工学博士,主要研究方向为生物工程.

较小,不能允许大分子进入^[1]。离子交换树脂的这一特点恰好可以用来除去相对分子质量较小的色素物质。本课题组在根霉产生的纤溶酶的分离提取方面进行了比较细致的工作,在采用离子交换树脂除去粗纤溶酶液色素方法上亦进行了一些研究探索,成功地除去了酶液中的大量色素物质。研究结果在其它微生物发酵粗酶液的去除色素方面具有一定的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 材料

D301 和 D296 型离子交换树脂购自南开大学化工厂;Sephacryl S-100HR 购自瑞典 Pharmacia 公司;粗纤溶酶液由作者所在课题组制备。

1.2 脱色方法

1.2.1 用 D301 和 D296 阴离子交换树脂进行纤溶酶液的脱色方法

1) 树脂的处理及转型:用水浸泡树脂,使其充分膨胀并除去细小颗粒(倾斜或浮选法)。用 0.5 mol/L NaOH 浸泡一定时间后,用水洗去碱液至近中性。用 0.5 mol/L 盐酸浸泡一定时间后,用水洗去酸液至近中性。转型,在转型方法上有改进,即用 1 mol/L NaCl 处理,然后用无离子水洗至近中性,用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液平衡^[2,3]。

2) 酶液的脱色:

将已离心去除菌体和固形物的澄清粗酶液通过离子交换树脂柱(1.5 cm×30 cm),控制线速度小于 0.5 cm/min,当树脂对色素吸附接近饱和,停止加酶液,将酶液用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液替换出来,进行树脂的再生操作。计算脱色前后纤溶酶的比活力和脱色过程中酶活力回收情况。

3) 树脂的再生:先用 NaOH 处理,然后同(1)的转型操作。

1.2.2 用活性炭和高岭土进行纤溶酶液的脱色方法 取离心后的发酵上清液 100 mL,按质量分数 3%的加量加入活性炭或高岭土,在冰浴中搅拌 30 min 后,5 000 r/min 4 ℃下离心 20 min,取上清液,观察色素去除情况,计算脱色前后纤溶酶的比活力和脱色过程中酶活力回收情况。

1.3 分析方法

1.3.1 纤溶酶活力的测定 根霉产生的纤溶酶没有标准品,采用折算成尿激酶单位的方法计算酶活力。参考 Astrup 和 Mullertz 方法^[4],采用血纤维蛋白平板法^[5]。

1.3.2 蛋白浓度的测定 用酸度计测量。

1.3.3 蛋白质浓度的测定 Lorry 法^[6]。

1.3.4 色素含量的测定 分光光度计法。

2 结果与讨论

2.1 根霉发酵粗纤溶酶液中色素的相对分子质量分布和带电荷性质

用超滤方法粗略考察了粗纤溶酶液中色素物质的相对分子质量,发现当采用截断相对分子质量为 10 000 的中空纤维超滤膜浓缩酶液时,大部分色素物质在超滤外液中,说明该粗纤溶酶液中的多数色素物质相对分子质量在 10 000 以下。

又采用分离范围为 1 000~100 000 的 Sephacryl S-100HR(1.6×60 cm)考察粗纤溶酶液中的色素相对分子质量分布情况,以 100%硫酸铵饱和度盐析去除蛋白的酶液的稀释液为样品,结果见图 1。由图 1 可知,粗纤溶酶液中的大多数色素相对分子质量分布在 16 000~3 000 之间。

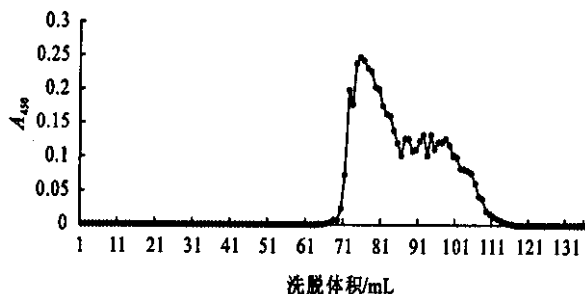


图 1 用 Sephacryl S-100HR 测定的粗纤溶酶液中色素相对分子质量分布

Fig. 1 Molecular weight distribution of coloring materials of the crude enzyme determined on Sephacryl S-100HR

在根霉纤溶酶的分离提纯工作中,当采用 DE-AE Sepharose FF 分离纤溶酶的时候,纤溶酶在 pH 7.6 条件下未被层析介质吸附,而酶液中的多数色素被吸附,说明酶液中大部分色素物质带负电荷,而纤溶酶在 pH 7.6 条件不带负电荷^[5]。

2.2 离子交换树脂种类、交换功能基和反离子形式的选择

粗纤溶酶液中的色素物质带负电荷,纤溶酶在 pH 7.6 条件不带负电荷,选择阴离子交换树脂去除色素;纤溶酶液中的多数色素相对分子质量在 16 000~3 000 之间,从树脂比表面、平均孔径、交换速度方面考虑^[7],选用大孔阴离子交换树脂去除色素。

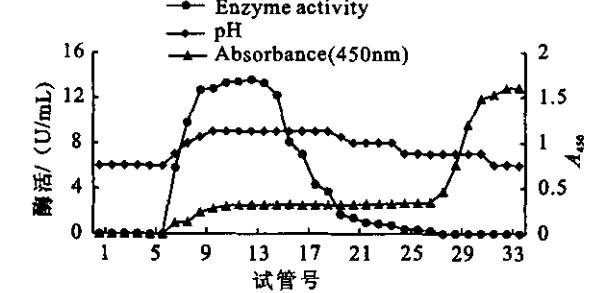
色素物质的交换能力不强,但也不很弱,考虑洗脱和再生的难易程度,选择大孔苯乙烯系弱碱性树脂 D301 和大孔苯乙烯系强碱性树脂 D296 进行

脱色实验.

树脂反离子的形式选择盐型,主要是考虑到脱色过程中粗纤溶酶液 pH 值的变化应尽量小,这样可避免纤溶酶的变性失活,另一方面盐型的离子交换树脂交换容量大,树脂体积胀缩小,使用寿命长^[7].

2.3 粗纤溶酶液的离子交换树脂脱色实验结果

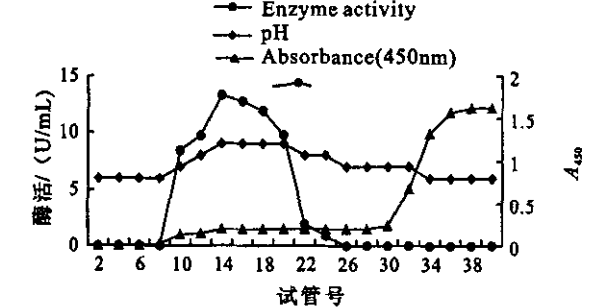
树脂的反离子采用 Cl⁻ 型. 图 2 和图 3 为用 D301 和 D296 树脂对粗纤溶酶液脱色时的纤溶酶和色素的洗脱曲线及洗脱液的 pH 变化情况. 脱色效果、酶液脱色前后纤溶酶比活力和脱色过程中的纤溶酶活性回收情况见表 1.



柱床 1.6 cm×40 cm, 体积流量 3.4 mL/min

图 2 D301 弱阴离子交换树脂对粗酶液脱色曲线

Fig. 2 Decolor curve of the crude enzyme by D301 anion exchange resin



柱床 1.6 cm×40 cm, 体积流量 3.4 mL/min

图 3 D296 强阴离子交换树脂对粗酶液脱色曲线

Fig. 3 Decolor curve of the crude enzyme by D296 anion exchange resin

在 pH 7.6 的条件下, D301 和 D296 树脂均不吸附纤溶酶而吸附大部分色素物质, 达到了从酶液中去除色素的目的. 同时离子交换过程中酶液 pH 变化不超过 9, 避免了纤溶酶的变性; 吸附到树脂上的色素用 2 mol/L 的 NaOH 和 NaCl 均可洗脱下来, 树脂容易再生.

实验结果还表明, D296 强阴离子交换树脂对粗酶液中色素的去除效果稍好于 D301 弱阴离子交换树脂; 单位体积 D296 树脂吸附的色素量也大于 D301 树脂. 从纤溶酶比活力提高的情况来看, 这两种树脂在脱色过程中均能去除一部分在 pH7.6 条件下带负电荷的杂蛋白, 而且 D296 树脂因碱性强于 D301 树脂, 因此吸附带负电荷杂蛋白的能力也强于 D301 树脂, 经 D296 树脂脱色的纤溶酶比活力提高幅度大于 D301 树脂脱色的纤溶酶的比活力.

在纤溶酶液的脱色过程中, 有一定量的 Cl⁻ 进入酶液, 使酶液的碱性增加. 因纤溶酶的后续提纯采用脱盐操作, 会除去酶液中的 Cl⁻, 因此 Cl⁻ 的进入不影响纤溶酶的色谱纯化操作.

2.4 粗纤溶酶液的活性炭和高岭土脱色实验结果

活性炭具有多孔结构, 对很多色素物质有很强的吸附能力, 在发酵工业经常用于发酵液的脱色. 用活性炭对粗纤溶酶液脱色试验结果如表 1 所示. 结果表明, 在离心除去活性炭后, 发酵液颜色仍然很深, 总酶活力下降 45%, 总蛋白降低 50%, 说明在该条件下, 活性炭对色素物质吸附程度小, 对蛋白质的吸附没有选择性, 脱色效果不好. 工业上用活性炭对发酵液脱色时, 常常采用 70~80℃ 的温度范围^[8], 在这样的温度下, 活性炭对很多色素物质有吸附作用.

用高岭土对粗纤溶酶液脱色处理后, 酶液颜色仍然很深, 且比活力没有提高, 活力回收率和纯化情况见表 1, 脱色效果不好.

表 1 D296、D3 01、活性炭和高岭土脱色效果及纤溶酶的纯化效果

Tab. 1 Effects of decolor and purification of the crude enzyme by D296, D301, activated charcoal and kaolin

脱色 介质	样品 体积/ mL	纤溶酶 活力/ U/mL	总活力/ U	蛋白 质量浓度/ mg/mL	总蛋白 含量/ mg	纤溶酶比 活力/ U/mg	酶纯化 倍数	脱色 酶液/ OD ₄₅₀	酶活力 回收/ %
D296	154	34.19	5265.26	2.21	340.34	15.47	3.11	0.179	70.26
D301	159	31.02	4932.18	2.55	405.45	12.16	2.45	0.301	65.82
活性炭	100	41.58	4157.74	7.52	751.97	5.53	1.11	1.792	55.48
高岭土	100	52.70	5270.17	10.59	1059.13	4.98	1.00	1.804	70.33

注: 脱色前样品体积 100 mL, OD₄₅₀ 1.973, 酶活力 74.94 U/mL, 蛋白质量浓度 15.09 mg/mL, 比活力 4.97 U/mg, 总活力 7493.64, 总蛋白 1509.03 mg.

具有良好的处理效果,为该工艺的工业化提供了 依据.

参考文献:

[1] 谢冰,徐亚同. 含 PVA 退浆废水的处理实践[J]. 环境工程, 2002, 20(5): 7—9.

[2] 郑广宏,顾国维,沈阳. 缺氧反硝化-好氧串联系统对难降解 PVA 退浆废水的试验研究[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(6): 326—328.

[3] Sheng H Lin, Cho C Lo. Fenton process for treatment of desizing wastewater[J]. Wat Res, 1997, 31(8): 2050—2056.

[4] Leyrini O, Oliveros E, Braun A M. Photochemical processes for water treatment[J]. Chem Rev, 1993, 93: 671—698.

[5] 陆雪梅,邹家庆. D-HPG 废水的预处理[J]. 南京工业大学学报, 2002, 24(4): 94—97.

[6] 国家环保局编. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002. 211—212.

[7] 王罗春,沈丽蓉,丁桓如,等. Fenton 试剂处理电厂离子交换树脂再生废水[J]. 环境污染与防治, 2001, 23(5): 238—240.

[8] 陈传好,谢波,任源,等. Fenton 试剂处理废水中各影响因素的作用机制[J]. 环境科学, 2000, 21(3): 93—96.

[9] 王罗春,闻人勤,丁桓如,等. Fenton 试剂处理难降解有机废水及其应用[J]. 环境保护科学, 2001, 105(27): 11—14.

[10] Chen R, Pignatello J J. Role of quinone intermediates as electron shuttle in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of anomatic compounds[J]. Environ Sci Technol, 1997, 31(8): 2399—2406.

[11] 肖羽堂,陈拥军,张晶晶,等. Fenton 试剂预处理 H 酸废水的影响因素及其可生化性[J]. 环境化学, 2001, 20(3): 281—285.

[12] 颜智勇,杨仁斌,方至,等. 果绿废水预处理试验研究[J]. 工业用水与废水, 2002, 37(6): 38—41.

[13] 张国卿,王罗春,徐高田,等. Fenton 试剂在处理难降解有机废水中的应用[J]. 工业安全与环保, 2004, 30(3): 17—20.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 32 页)

3 结 论

离子交换树脂在酶的分离提纯中可以用于微生物发酵粗酶液的脱色.选择吸附大多数色素而不吸附目标酶的交换树脂作为脱色介质;选择目标酶

稳定且不带电荷的 pH 值作为脱色时的起始 pH 值,或选择目标酶带有与离子交换树脂功能基团相同电荷的 pH 值作为脱色时的起始 pH 值;选择盐型离子交换功能基反离子进行脱色操作.

参考文献:

[1] 张承圭,王传怀,袁玉荪,等. 生物化学仪器分析及技术[M]. 北京:高等教育出版社,1990. 172—173.

[2] 天津轻工业学院. 发酵工业分析[M]. 北京:轻工业出版社,1980. 234—236.

[3] 李建武,萧能虔,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994. 38—43.

[4] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952. 40: 346—351.

[5] 刘晓兰,杜连祥,路福平,等. Rhizopus chinensis 12 # 发酵产生纤溶酶的分离提纯[J]. 无锡轻工大学学报,2003, 23(3): 26—31.

[6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.*. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 264—275.

[7] 钱庭宝. 离子交换剂应用技术[M]. 天津:天津科学技术出版社,1984. 128—166.

[8] 王博彦,金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000. 163—166.

(责任编辑:杨 萌)