

# 超滤离心在双水相萃取 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶中的应用

李海鑫, 孙波\*, 赵晓, 樊庆, 孙盛, 孔庆敏

(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**建立聚乙二醇(PEG)/磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )双水相体系,通过对大肠杆菌(*Escherichia coli* AS1.505)细胞进行超声波破碎制得谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)酶液,并利用双水相萃取对GAD进行分离纯化,然后,采用超滤离心对双水相上相中的GAD与PEG进行分离并分别回收。实验结果表明,大部分GAD分配于上相,其纯化倍数为55.60,酶活率为97.78%。通过响应面分析,对超滤离心工艺参数进行优化,确定了超滤离心转速为10 000 r/min,离心时间为20 min,混合液的稀释倍数为5倍,此条件下GAD的回收率为81.52%,PEG的回收率为84.41%。

**关键词:**谷氨酸脱羧酶;双水相萃取;超滤;离心;分离;回收

中图分类号:TS252.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)04-0074-04

## Application of ultrafiltration on aqueous two phase extraction for purification of GAD from *E. coli*

LI Hai-xin, SUN Bo\*, ZHAO Xiao, FAN Qing, SUN Sheng, KONG Qing-min

(College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** An aqueous two-phase system composed of PEG and  $K_2HPO_4$  is established for the purification of glutamate decarboxylase (GAD) from the cell disruption of *Escherichia coli* (*E. coli*). Then, GAD and PEG in the top phase are fully separated by ultrafiltration with centrifugal ultrafiltration units. The results show that the system is capable to partition most GAD to the top phase and a 55.60 fold purification of GAD is achieved with an average of 97.78% GAD recovery. Response surface methodology is utilized to optimize the process parameters of ultrafiltration. The optimal conditions are as follows: 10 000 r/min for 20 minutes and 5 multiples dilution of the mixture. The recovery of GAD and PEG can reach 81.52% and 84.41%, respectively.

**Key words:** glutamate decarboxylase (GAD); aqueous two-phase system extraction; ultrafiltration; centrifugation; separate; recovery

GAD是生物体内广泛存在的一种酶,可专一地催化L-谷氨酸脱羧生成 $\gamma$ -氨基丁酸<sup>[1]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸是中枢神经系统主要的抑制性神经递质,具有多种保健功效<sup>[2-5]</sup>。因此,近年来 $\gamma$ -氨基丁酸在食品工业中得到广泛的应用,对其需求量也不断增加<sup>[6-9]</sup>。为了满足这种需求,获取大量高纯度的GAD成为亟待解决的问题。目前分离GAD的技术有很多,如盐析法<sup>[10]</sup>、有机溶剂法<sup>[11]</sup>、层析法<sup>[12]</sup>等,但这些方法存在提取酶的酶活性较低,有机溶剂残留,专一性不强,操作复杂,成本高等缺点。利用大肠杆菌细胞获取GAD是一种比较常见的方法,但该方法要获取高纯度的GAD尚存在一定的问题。

双水相萃取技术(Aqueous two-phase system, ATPS)可用于分离生物分子及细胞内的一些组分,利

用蛋白质、酶等物质在双水相间分配的差异性从而得到分离提纯<sup>[13-14]</sup>。GAD经双水相萃取后,需进一步与成相物质PEG分离,在回收产物GAD的同时回收PEG,以减少试剂的消耗,降低成本及减小环境污染。然而,目前GAD与PEG的分离及回收存在着一定的技术限制,这也是制约双水相萃取技术在工业化分离纯化蛋白质及酶等领域应用的主要原因之一。

超滤离心是根据物质相对分子质量的不同进行分离的一种手段,其在以蛋白质为主要成分的分相方面应用较多,而关于蛋白质与高聚物混合物的分离报道较少。因此,将超滤离心用于双水相萃取后的GAD与PEG分离与回收中,可以使工业上提取GAD更加便捷。笔者采用PEG/ $K_2HPO_4$ 双水相对GAD酶液进行萃取,并利用超滤离心使GAD与PEG分离及回收。

收稿日期:2013-12-01

作者简介:李海鑫(1989-),女,硕士生,lihaixin614@sina.cn;孙波(1962-),男,硕士,副教授,硕士生导师,研究方向是食品微生物与发酵工程,通讯联系人,bosun1962@163.com。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 菌种与培养基

菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli* AS1.505),中国(北京)普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)生产。

斜面种子培养基:牛肉膏(3.0 g/L)、蛋白胨(10.0 g/L)、氯化钠(5.0 g/L)、琼脂(20.0 g/L), pH 7.0, 121℃, 灭菌 20 min。

发酵培养基:葡萄糖(5.0 g/L)、蛋白胨(10.0 g/L)、氯化钠(5.0 g/L), pH 7.0, 121℃, 灭菌 20 min。

#### 1.1.2 主要试剂

PEG、磷酸氢二钾、考马斯亮蓝 G-250 等生化试剂。

#### 1.1.3 主要仪器

JY92-2D 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司生产; Allegra 64R 台式高速离心机,德国 BECKMAN 公司生产;超滤管(截留分子量 30 kD),德国 millipore 公司生产;Waters2695 高效液相色谱,美国 waters 科技有限公司生产;722 可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产。

## 1.2 方法

### 1.2.1 GAD 酶液的制备

大肠杆菌经斜面种子培养基培养后,转入液体种子培养基,将液体种子培养基中的菌液以 2.0% 的接种量接入液体培养基中,37℃ 恒温振荡培养 18 h。转速 5 000 r/min 下离心 20 min,收集菌体,配制成质量浓度为 0.25 g/mL 的菌悬液,在冰浴中进行超声破碎,超声时间为 30 min,超声功率为 90 W。

### 1.2.2 建立 PEG1500/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相萃取 GAD

分别将成相物质 PEG1500 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 按质量分数为 24% 和 28% 加入带刻度的离心管中,加蒸馏水,使体系总质量为 10 g,成相物质溶解后即形成双相体系。然后向该体系中加入一定量的 GAD 酶液,混匀,经 2 000 r/min 离心 20 min,室温下静置 1 h 左右以达到平衡状态。分别测定上下相的体积,然后分别收集上下相,以用于检测分析。分别计算纯化倍数和酶活率:

$$P_f = (E_f/P_f)/(E_i/P_i) \quad (1)$$

$$Y_i = E_i V_i / E_i V_i \quad (2)$$

式中, $P_f$  为纯化倍数; $Y_i$  为酶活率; $K_o$  为双水相中

GAD 酶活力的分配系数; $E_f$  和  $E_i$  分别为上相酶活力和原酶液酶活力,U/mL; $P_f$  和  $P_i$  分别为上相蛋白质质量浓度和粗酶液蛋白质质量浓度,mg/mL; $V_f$  和  $V_i$  分别为上相体积和原酶液体积。

### 1.2.3 超滤离心对 GAD 与 PEG 进行分离回收

取一定量双水相萃取 GAD 后的上相(GAD 与 PEG 的混合液)加入到超滤离心管中,在不同稀释倍数、离心转速、离心时间的条件下进行超滤离心。分别取超滤后的浓缩液和超滤液进行各项指标的测定,并分别计算 GAD 和 PEG 的回收率:

$$\text{GAD 回收率} = (E_c/E_{\text{总}}) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{PEG 回收率} = (M_c/M_{\text{总}}) \times 100\% \quad (4)$$

式中: $E_c$  和  $E_{\text{总}}$  分别为浓缩液中 GAD 酶活力和上相混合液中总酶活力,U/mL; $M_c$  和  $M_{\text{总}}$  分别为超滤液中 PEG 的质量浓度和双水相上相混合液中 PEG 质量浓度,g/L。

### 1.2.4 蛋白质含量的测定

参照 Bradford 法测定蛋白质含量<sup>[15]</sup>。

### 1.2.5 酶活测定

参照 W. Y. Yao 法测定酶活<sup>[1]</sup>。

### 1.2.6 PEG 含量测定

利用 BaCl<sub>2</sub> - I<sub>2</sub> 双试剂法测定聚乙二醇浓度<sup>[16-17]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEG1500/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相萃取 GAD

取 3.0 g GAD 酶液按 1.2.2 方法进行双水相萃取,然后对上下相中蛋白质质量浓度、酶活进行测定,结果见表 1。

表 1 PEG1500/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相萃取 GAD 效果

样品	蛋白质质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	酶活/ (U·mL <sup>-1</sup> )	纯化倍数	酶活率/%
原酶液	26.67	10761	—	—
上相	0.89	19512	55.60	97.78
下相	0.12	387	—	—

由表 1 可以看出,GAD 酶液经 PEG1500/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 双水相萃取后,其纯化倍数为 55.60,酶活率为 97.78%,GAD 与杂蛋白、细胞碎片得到充分的分离。

### 2.2 超滤离心分离 GAD 与 PEG 的响应面试验

取双水相萃取后的上相稀释液 3.5 mL,加入超滤离心管中,按照 1.2.3 的方法进行超滤离心,测定浓缩液中 GAD 酶活及超滤液中 PEG 的质量浓度。

2.2.1 响应面试验设计及结果

选取影响超滤离心效果的 3 个因素:超滤离心转速(r/min)、超滤离心时间(min)、混合液稀释倍数为自变量,分别用 A、B、C 表示,以 GAD 回收率为响应值,采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件中的 Box- Behnken 响应面设计原理设计响应面分析试验,其因素与水平编码见表 2,结果见表 3。

表 2 响应面设计因素及水平表

因素	水平		
	-1	0	+1
离心速率(A)/(r·min <sup>-1</sup> )	5000	10000	15000
离心时间(B)/min	10	20	30
混合液稀释倍数(C)	2	4	6

表 3 响应面分析试验设计及结果

试验号	A	B	C	GAD 回收率/%
1	1	0	1	81.06
2	-1	0	-1	79.24
3	-1	-1	0	80.89
4	1	1	0	80.37
5	-1	1	0	80.57
6	0	1	1	81.16
7	0	-1	1	80.65
8	1	0	-1	79.53
9	-1	0	1	80.97
10	0	-1	-1	79.56
11	1	-1	0	81.03
12	0	1	-1	78.54
13	0	0	0	81.64
14	0	0	0	81.74
15	0	0	0	81.51
16	0	0	0	81.74
17	0	0	0	81.69

2.2.2 响应面试验结果分析

通过统计分析软件 Design-Expert 8.0.6.1 对试验各组的 GAD 回收率进行二次多项式回归拟合,得二元回归方程为:

$$Y = 81.69 + 0.093A - 0.16B + 0.87C - 0.19AB - 0.050AC + 0.38BC - 0.40A^2 - 0.62B^2 - 1.09C^2$$

式中,Y 为 GAD 回收率;A、B、C 为上述 3 个自变量的编码值。

对模型进行方差分析,结果见表 4。

表 4 响应面回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	15.05	9	1.67	205.34	<0.0001	显著
A	0.068	1	0.068	8.41	0.0230	
B	0.21	1	0.21	26.35	0.0013	
C	6.07	1	6.07	745.82	<0.0001	
AB	0.14	1	0.14	17.73	0.0040	
AC	0.010	1	0.01	1.23	0.3044	
BC	0.59	1	0.59	71.88	<0.0001	
A <sup>2</sup>	0.66	1	0.66	81.40	<0.0001	
B <sup>2</sup>	1.61	1	1.61	198.30	<0.0001	
C <sup>2</sup>	5.00	1	5.00	613.55	<0.0001	
残差	0.057	7	8.142E-003			
失拟	0.036	3	0.012	2.26	0.2230	不显著
纯误差	0.021	4	5.280E-003			
总差	15.10	16				

由表 4 可知,方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型极度显著( $p < 0.0001$ ),失拟项不显著( $p > 0.05$ ),且该模型相关系数  $R^2 = 0.9962$ ,校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9914$ ,表明该模型与试验拟合良好,自变量与响应值之间线性关系显著,可用于该反应的理论推测。根据显著性分析可知,模型方程的一次项 A、B、C ( $p < 0.05$ ) 影响均显著;二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) 影响均极显著;交互项 AB ( $p < 0.05$ ) 影响显著,交互项 BC ( $p < 0.0001$ ) 影响极显著,交互项 AC ( $p > 0.05$ ) 影响不显著。具体如图 1~图 3 所示。

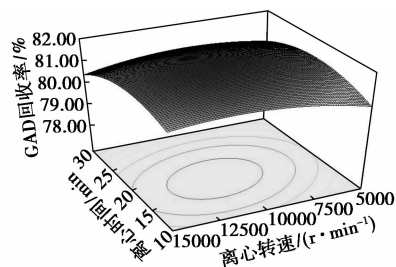


图 1 离心转速与离心时间对 GAD 回收率交互作用的响应面图

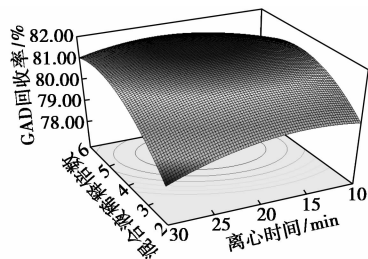


图 2 离心时间与混合液稀释倍数对 GAD 回收率交互作用的响应面图

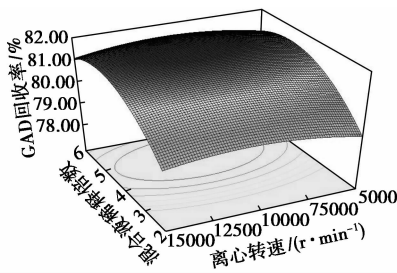


图3 离心转速与混合液稀释倍数对GAD回收率交互作用的响应面图

### 2.2.3 响应面优化与验证

应用响应面法对回归模型进行分析,确定超滤离心的最佳条件:超滤离心转速为9 835.80 r/min,超滤离心时间为19.51 min,混合液稀释倍数为4.92,此时GAD的回收率可达到81.85%。考虑到实际操作的可行性,将最佳超滤离心条件修正为离心转速为10 000 r/min,离心时间为20 min,混合液稀释倍数为5倍。在此条件下对响应面法优化的结果进行验证,3次平行试验的GAD回收率平均值为81.52%,接近且略低于Design Expert 8.0.6软件得到的预测值81.85%,由此证明该响应面法参数准确,试验模式合理。

## 3 结论

将超滤离心应用于双水相萃取中上相混合液GAD与PEG有效分离及分别回收的方法体系。经PEG/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>双水相萃取使GAD从细胞碎片及杂蛋白中分离出来,其纯化倍数为55.60,酶活率可达97.78%。超滤离心分离GAD与PEG的工艺参数得到优化,确定了超滤离心转速为10 000 r/min,离心时间为20 min,GAD与PEG混合液稀释倍数为5倍,此时GAD的回收率达到81.52%,PEG的回收率达到84.41%。这表明超滤离心方法在一定程度上可将GAD与PEG有效分离,从而为解决GAD易于双水相萃取,却难于与成相物质分离的问题提供一定思路。另外,该方法可扩大到蛋白质分离领域,为双水相萃取蛋白开辟新道路。

### 参考文献

[1] Yao W Y, Wu X, Zhu J, *et al.* System establishment of ATPS for one-step purification of glutamate decarboxylase from *E. coli* after cell disruption[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 164: 1339 - 1349.

[2] Okada T, Sugishita T, Murakami T. Effect of defatted rice germ en-

riched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kashi*, 2000, 47(8): 596 - 603.

[3] Leventhal A G, Wang Y C, Pu M L, *et al.* GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 812 - 815.

[4] 孙波,梁海文,迟玉杰,等. 比色法快速测定酶转化反应中 $\gamma$ -氨基丁酸含量的研究[J]. *食品科技*, 2008, (5): 210 - 212.

[5] Fitsanakis V A, Aschner M. The importance of glutamate, glycine, and  $\gamma$ -aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 204: 343 - 354.

[6] 门马豪,早川喜郎. 富含 $\gamma$ -氨基丁酸的饮食品的制造方法以及富含 $\gamma$ -氨基丁酸的饮食品[Z]. CN1923059: 2007. <http://dbpub.cnki.net/Grid2008/dbpub/detail.aspx?dbcode=SCPD&filename=CN1923059&dbname=SCPD0009&v=MDAwN-DEmI7oXsbseI MXA/kZl7HsFCEu8EBfjPnpLfo2uEjR6s5VEv55n5WgULw==>.

[7] 谭俊峰,林智,彭群华,等.  $\gamma$ -氨基丁酸超微绿茶粉辅助降血压功能研究[J]. *茶叶科学*, 2012, 32(5): 461 - 464.

[8] 柴美清,徐倩,杨庭,等. 富含 $\gamma$ -氨基丁酸的麦胚饮料的研制[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(11): 126 - 129.

[9] 韩基明,田志芳,卢健鸣,等. 富含 $\gamma$ -氨基丁酸杂粮营养强化米的研制[J]. *农产品加工·学刊*, 2012, (10): 49 - 50.

[10] Huang J, Mei L H, Sheng Q, *et al.* Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007, 15(2): 157 - 161.

[11] 穆小民,沈黎明,吴显荣. 林生山蚕豆谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质的研究[J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(2): 181 - 185.

[12] 许建军,江波,许时婴. *Lactococcus lactis* 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质[J]. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(3): 79 - 84.

[13] Vázquez-Villegas P, Aguilar O, Rito-Palomares M. Study of biomolecules partition coefficients on a novel continuous separator using polymer-salt aqueous two-phase systems[J]. *Separation and Purification Technology*, 2011, 78(1): 69 - 75.

[14] 黄瑛,尹利,闫云君. 双水相萃取法分离纯化洋葱假单胞菌G-63脂肪酶[J]. *现代化工*, 2007, 27(S2): 300 - 303.

[15] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254.

[16] 刘海霞,张浩勤,刘金盾,等. 分光光度法测定不同分子量聚乙二醇浓度[J]. *河南化工*, 2004, (5): 36 - 37.

[17] 冯超群,杨峰,陈天缘,等. 分光光度法测定聚乙二醇水溶液浓度[J]. *科技资讯*, 2013, (5): 126 - 127. ■