

# PEG/磷酸盐双水相体系萃取青霉TS67胞外活性蛋白的研究

张志娟 王素英\*, 林媛 (天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津300134)

**摘要** [目的] 研究用PEG/磷酸盐双水相体系萃取青霉TS67胞外活性蛋白, 为活性蛋白的进一步提纯及工业化生产提供依据。[方法] 以分配系数、下相分配率及抑菌圈直径为指标, 分别研究了PEG的浓度、磷酸盐的浓度、氯化钠的浓度对青霉TS67胞外活性蛋白在PEG 2000/磷酸盐和PEG 6000/磷酸盐双水相系统中分配特性的影响。[结果] 在24% PEG 2000/12%磷酸盐的双水相体系中下相抑菌圈直径最大, 达到2.50 cm, 此时下相分配率为87.77%; 在28% PEG 6000/12%磷酸盐双水相体系中, 下相分配率最大, 达到94.85%, 此时下相抑菌圈直径为2.45 cm。[结论] PEG的浓度、磷酸盐的浓度对蛋白的分配特性有显著影响, 氯化钠的浓度对其影响并不明显。从成本及结果来说, PEG 2000 优于PEG 6000。

**关键词** PEG/磷酸盐双水相系统; 青霉TS67; 活性蛋白

中图分类号 Q946.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-07841-03

**Research on the Extraction of the Active Protein of Extracellular Penicillium TS67 with PEG/Phosphate Aqueous Two-phase System**

ZHANG Zhi-juan et al (College of Biotechnology and Food Science, Tianjin Commerce University, Key Laboratory of Food Biotechnology of Tianjin City, Tianjin 300134)

**Abstract** [Objective] The reference for the purification and industrialization of active protein was provided through the research on the technique of PEG/phosphate aqueous two-phase system in the extraction of the active protein of extracellular Penicillium TS67. [Method] The distribution coefficient, the rate of phase distribution and the diameter of inhibition zone be used as the indicators to study the effect of the concentration of PEG, phosphate and sodium chloride on the distribution characteristics of the active protein of extracellular Penicillium TS67 in two-phase distribution system of PEG 2000/phosphate and PEG 6000/phosphate aqueous. [Results] In 24% PEG 2000/12% polyethylene glycol phosphate aqueous two-phase system phase inhibition zone diameter of the largest, reaching 2.50 cm, phase distribution rate at this time for 87.77%; in 28% PEG 6000/12% glycol phosphate aqueous two-phase system, the largest phase distribution rate to 94.85%, when the phase inhibition zone diameter of 2.45 cm. [Conclusion] There was the significant influence of the concentration of PEG and phosphate on the distribution characteristics of protein, but the concentration of sodium chloride is not obvious. From the cost and experimental result, the PEG 2000 was better than PEG 6000.

**Key words** PEG/phosphate aqueous two-phase system; Penicillium TS67; Active protein

双水相萃取(Aqueous two-phase extraction, ATPE)具有条件温和、产品活性损失小、操作简单、易于工程放大和连续操作等优点<sup>[1]</sup>, 已被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域<sup>[2]</sup>, 涉及到细胞、膜、病毒、蛋白质、核酸以及其他天然药物有效成分的分离及提纯<sup>[3]</sup>。双水相体系多为PEG/葡萄糖和PEG/无机盐2种<sup>[4]</sup>, 笔者选用价廉、低毒、较易挥发的PEG/磷酸盐双水相体系, 探讨了能抑制多种植物病原真菌的青霉TS67(Penicillium sp.)菌株的胞外活性蛋白的萃取条件, 为该菌株生物防治效果和机理的深入研究奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 青霉TS67菌株。**天津商业大学微生物实验室保存, 该菌株分离自渤海近岸海水。

**1.1.2 指示菌。**植物病原菌 *F. oxysporum* 购自中国科学院微生物研究所菌保中心。

**1.1.3 培养基。**海洋真菌培养基用于培养青霉TS67<sup>[5]</sup>, PDA培养基用于培养指示菌<sup>[6]</sup>。

**1.1.4 试剂和溶液。**试验中使用分析纯化学试剂, 并配制体积比为30%的PEG 6000和PEG 2000贮备液,  $PO_4^{3-}$ 含量为20%的磷酸盐贮备液( $K_2HPO_4$ 与 $KH_2PO_4$ 的摩尔比为1.0.703, pH值为中性)。

## 1.2 方 法

**1.2.1 抑菌活性测定。**采用杯碟法<sup>[7]</sup>测定青霉TS67菌株胞外蛋白的抑菌活性, 并以抑菌圈直径表示。

**1.2.2 蛋白质含量测定。**用Bradford染料结合法测定, 以牛血清白蛋白为标准<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 双水相体系的制备。**根据试验设计, 依次将一定体积的磷酸盐、PEG贮备液加入刻度试管, 再按需要加入一定量的发酵液和NaCl晶体, 最后加蒸馏水至预定系统质量, 充分振荡, 混合均匀。在室温下静置, 直至上下相完全分离。

**1.2.4 活性蛋白在PEG/磷酸盐双水相系统中分离特性测定。**按“1.2.3”方法配制双水相系统, 分相后记录上、下相体积( $V_a$ 、 $V_b$ ), 测定上、下相中蛋白浓度( $G_a$ 、 $G_b$ ), 用以下公式计算蛋白质在两相间的分配系数K和在下相的分配率Y:

$$K = G_a / G_b \quad (1)$$

$$Y = 1 / (1 + V_a / V_b \cdot K) \quad (2)$$

## 2 结果与分析

**2.1 PEG浓度对活性蛋白分配特性的影响** 在室温条件下, 保持磷酸盐浓度12%不变, 移取青霉TS67原发酵液2g, 改变PEG 2000和PEG 6000的浓度, 加入蒸馏水至固定双水相系统10g。待相分离后, 测定蛋白质的浓度及抑菌圈直径, 结果见表1和图1。从表1和图1中可以看出, 不论是采用PEG 2000/磷酸盐还是PEG 6000/磷酸盐双水相体系萃取青霉TS67菌株发酵液中抗菌活性蛋白时, 两相的分配系数K值都小于1, 下相的抑菌圈直径也远大于上相的抑菌圈直径, 说明该活性蛋白主要分配在富含磷酸盐的下相。在PEG的试验浓度范围内, 当PEG 2000浓度为24%时, 活性蛋白的下相分配率最高, 达到87.77%, 此时下相抑菌圈直径亦达到2.50 cm; 而PEG 6000浓度为28%时, 下相分配率最大, 达到94.85%, 此时下相抑菌圈直径也达到最大值2.45 cm。

在试验过程中发现, 萃取溶液的粘度随着PEG浓度的增加而增加, 进而导致相分离时间变长。到目前为止还没能完

基金项目 天津市高等学校科技发展基金重点项目(2004zdz20)。

作者简介 张志娟(1983-), 女, 山西怀仁人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源开发。\* 通讯作者, E-mail: wsying@tjcu.edu.cn。

收稿日期 2009-03-12

全清楚地从理论上解释双水相体系的分相以及预分离物质在其中的分配机理<sup>[9]</sup>。笔者认为出现上述变化的可能解释是:开始因为PEG的吸水作用,蛋白质的电荷暴露,此时容易与带电荷的磷酸盐相互吸引,下相分配率开始上升。随着大量的水分子往PEG相聚集,亲水性的蛋白质跟着往上相分配。当PEG的浓度增大到一定程度时,成相物质分子间的作用增大,相界面张力亦增大,系统黏度也会增大,活性蛋白在相间的传递和在相内的扩散阻力大大增加,反而不利于目标蛋白分子进入PEG相<sup>[10]</sup>。在PEG 6000中的下相分配率最后下降可能是由于出现了沉淀的缘故。

表1 PEG浓度的变化对抑菌圈直径的影响

Table 1 The effects of the changes of PEG concentration on the antibacterial circle diameter

处理 Treat- ment	C <sub>PEG</sub> %	PEG2000 cm		PEG 6000 cm	
		上相抑菌 圈直径 D <sub>t</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase	上相抑菌 圈直径 D <sub>t</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase
A1	12	0	1.75	1.20	1.90
A2	16	1.10	1.75	1.60	2.25
A3	20	1.20	1.65	1.90	2.05
A4	24	1.00	2.50	1.85	2.00
A5	28	1.30	2.00	1.10	2.45
A6	32	2.10	2.30	2.00	2.00

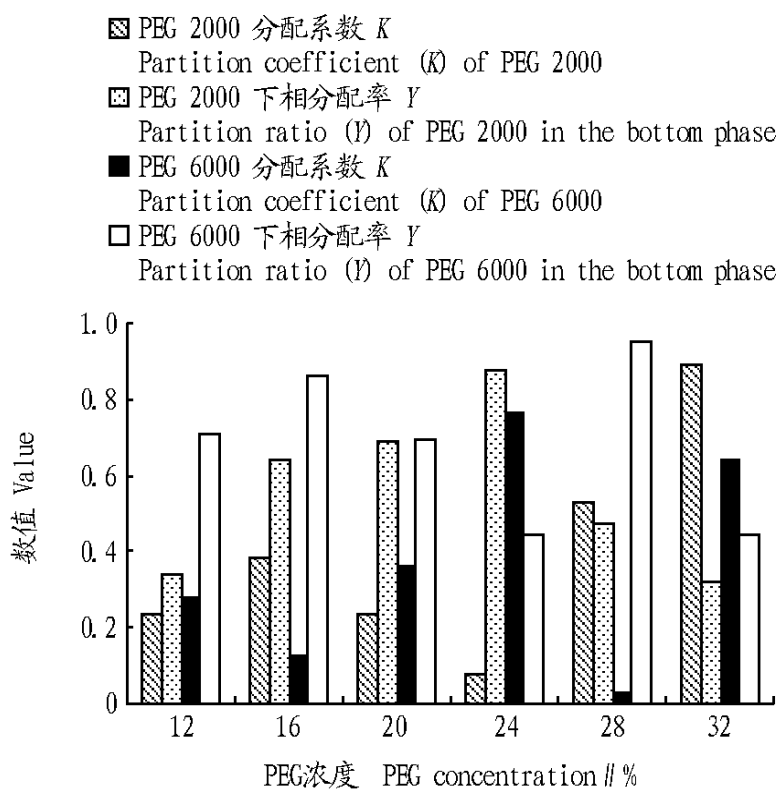


图1 PEG浓度的变化对分配系数和下相分配率的影响

Fig.1 The effects of the changes of PEG concentration on the partition coefficient and partition ratio in the bottom phase

2.2 磷酸盐浓度对活性蛋白分配特性的影响 在室温条件下,保持PEG 2000的浓度24%不变、PEG 6000的浓度28%不变,改变磷酸盐的浓度。待相分离后,测定上、下相中蛋白质的浓度及抑菌圈直径。从表2和图2可以看出,活性蛋白在两相中的分配系数均是呈先下降后上升的趋势,即先随磷酸盐浓度的增加而降低,达到一定浓度时,分配系数则随着磷酸盐浓度的增加而增加,而与双水相体系中PEG分子量的大小无关。这种现象完全符合盐溶和盐析原理。在所选的PEG 2000/磷酸盐和PEG 6000/磷酸盐2个双水相系统成相浓度范围内,综合考虑胞外活性蛋白在双水相系统中上下相间

的分配系数及下相分配率,上下相抑菌圈直径等因素,决定采用24% PEG 2000/12%磷酸盐和28% PEG 6000/12%磷酸盐这2个双水相体系。

表2 磷酸盐浓度的变化对抑菌圈直径的影响

Table 2 Effects of the changes of phosphate concentration on the antibacterial circle diameter

处理 Treat- ment	C <sub>磷酸盐</sub> %	PEG2000 cm		PEG 6000 cm	
		上相抑菌 圈直径 D <sub>t</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase	上相抑菌 圈直径 D <sub>t</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase
A1	6	1.30	2.00	1.95	2.10
A2	8	1.80	2.30	1.80	2.15
A3	10	1.75	2.20	1.55	2.20
A4	12	1.35	2.55	1.35	2.40
A5	14	1.60	2.15	1.75	2.30
A6	16	1.90	2.25	1.85	2.25

图2 磷酸盐浓度的变化对分配系数和下相分配率的影响

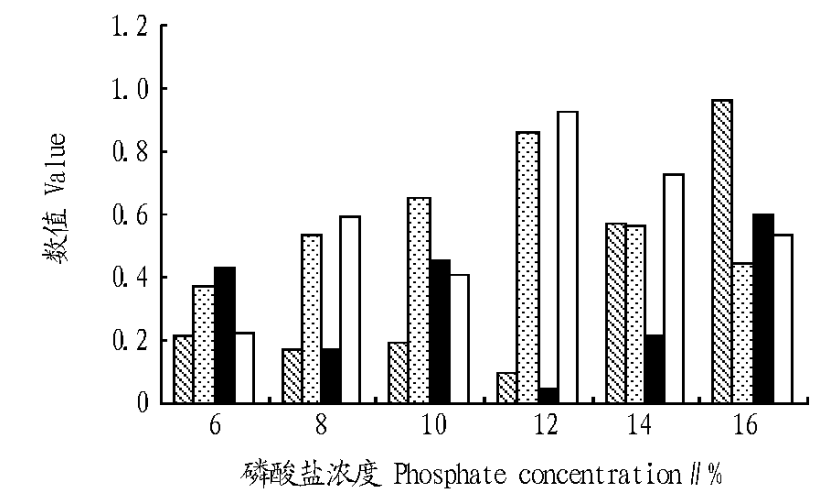


图2 磷酸盐浓度的变化对分配系数和下相分配率的影响

Fig.2 The effects of the changes of phosphate concentration on the partition coefficient and partition ratio in the bottom phase

2.3 NaCl浓度对分配特性的影响 盐的种类对分配系数的影响主要反映在对相间电位的影响上<sup>[11]</sup>。NaCl是最常用的研究盐效应影响双水相系统中分配特性的一种试剂。根据前述研究结果,在室温下采用已选定的2个双水相体系,以加入晶体NaCl的方式改变系统中的盐浓度。从表3和图3可以看出,不论是PEG 2000还是PEG 6000,随着NaCl浓度的变大,分配系数和下相萃取率基本保持直线不变。下相抑菌圈的直径略有变化,但是变化很小,可见外加不同浓度的NaCl对相比分配系数及下相分配率的影响不大,磷酸盐与NaCl的组合对活性蛋白几乎不产生盐析作用。因此,外加NaCl对活性蛋白在PEG/磷酸盐双水相系统的分配特性影响不显著。

### 3 结论

通过研究PEG/磷酸盐双水相体系对青霉TS67胞外活性蛋白萃取的影响,发现不同分子量的PEG形成了不同特点的双水相体系,PEG 2000分相稳定,没有沉淀现象,分相时间短,价格便宜;PEG 6000分相不稳定,有沉淀现象,分相时间

表3 NaCl 浓度的变化对抑菌圈直径的影响

Table 3 The effects of the changes of NaCl concentration on the antibacterial circle diameter

处理 Treat- ment	NaCl 浓度 %	PEG2000 cm		PEG 6000 cm	
		上相抑菌 圈直径 D <sub>a</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase	上相抑菌 圈直径 D <sub>a</sub> Diameter of antibacterial circle in top phase	下相抑菌 圈直径 D <sub>b</sub> Diameter of antibacterial circle in bottom phase
A1	1	1.35	2.45	1.65	2.25
A2	2	1.40	2.35	1.60	2.35
A3	3	1.40	2.20	1.50	2.20
A4	4	1.45	2.40	1.45	2.45
A5	5	1.60	2.60	1.50	2.50

- ▨ PEG 2000 分配系数  $K$   
Partition coefficient ( $K$ ) of PEG 2000
- ▤ PEG 2000 下相分配率  $Y$   
Partition ratio ( $Y$ ) of PEG 2000 in the bottom phase
- PEG 6000 分配系数  $K$   
Partition coefficient ( $K$ ) of PEG 6000
- PEG 6000 下相分配率  $Y$   
Partition ratio ( $Y$ ) of PEG 6000 in the bottom phase

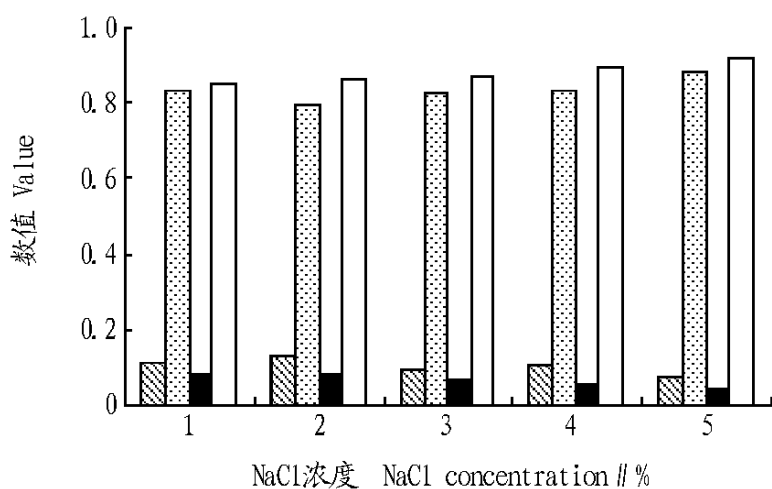


图3 NaCl 浓度的变化对分配系数和下相分配率的影响

Fig.3 The effects of the changes of NaCl concentration on partition coefficient and partition ratio in the bottom phase

(上接第7840 页)

效应的一个重要指标<sup>[10-11]</sup>。当蚕豆根尖细胞受到有害理化因子攻击时,其染色体受干扰甚至发生断裂,产生的染色体片段和滞留染色体可能发生畸变,并在主核的周围形成微核。微核率的高低可反映湖水对蚕豆根尖的危害程度。

(4) 当前水环境污染监测主要采用物理和化学方法,这些方法的优点在于可以反映不同污染物质的种类和数量,但不能综合反映环境质量状况和阐明多种污染物并存对生物体的危害和损伤机制。蚕豆根尖细胞微核监测技术不仅具有灵敏度高、可靠性强、取材简单、条件易控制、试验周期短、监测费用低等优点,还可直接反映多种污染物对生物遗传物质的综合影响,且反映出的遗传毒性是根据真核细胞DNA 分子损伤试验得出的,是一种值得推广的环境监测方法。该试验既以蚕豆根尖细胞微核率为指标,又结合其他环境监测指标,则能更全面、更准确地反映水体的水质状况,并将作好长期监测和研究。

(5) 治理太湖污染的建议。在湖州太湖南岸围建示范区,示范区内种植一些吸附N、P 的植物,定期检测,条件成熟时再推广到整个太湖。调整流域的农业生产方式,

长,价格昂贵,但是在萃取过程中下相萃取率比PEG 2000 高7.08%。综合考虑各种因素,可以认为24%PEG 2000/12%磷酸盐双水相体系因成本低,且下相分配率和下相抑菌圈直径均比较理想,适合应用于工业规模提取青霉TS67 菌株胞外活性蛋白。而32%PEG 2000/12%磷酸盐双水相体系的下相分配率虽然仅为32.12%,是最大值的36.60%,但是下相抑菌圈直径为2.30 cm,是最大值2.50 cm 的92%,说明此时杂蛋白在下相比较少,适合于青霉TS67 菌株胞外活性蛋白的进一步提纯的前期处理。试验还发现NaCl 的添加基本不对萃取效果产生影响,反而提高萃取成本,加大蛋白提取难度,因此,在利用PEG/磷酸盐双水相萃取青霉TS67 菌株胞外活性蛋白时不需要采取外加盐措施。

#### 参考文献

- [1] 朱茂电. 双水相萃取技术进展及其应用概况[J]. 江苏化工,2007,35(6):5-8.
- [2] 林强,霍清. 双水相体系萃取甘草酸盐的研究[J]. 中草药,2002,33(8):702-704.
- [3] HATTI K R. Aqueous two-phase systems: a general overview[J]. Molecular Biotechnol, 2001,19(3):269-277.
- [4] 梅乐和,朱自强. 酶的双水相体系萃取分离技术[J]. 现代化工,1991,11(6):15-19.
- [5] 张士瑾,马军英,范晓. 海洋生物技术原理和运用[M]. 北京:海洋出版社,1997:7-13.
- [6] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社,2004:217.
- [7] 李海峰,王素英. 生防菌青霉TS67 发酵条件优化研究[J]. 河南农业科学,2007(6):70-73.
- [8] BRADFORD MMA rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976,72:248-254.
- [9] 谢海. 双水相萃取技术研究现状[J]. 化学工业与工程,2006(5):463-466.
- [10] 冯菁,夏杰,陆兵,等. 人溶菌酶的双水相萃取法分离[J]. 华东理工大学学报:自然科学版,2006(12):1409-1439.
- [11] 孙彦. 生物分离工程[M]. 北京:化学工业出版社,1998:64.

较大程度地保留在陆地生态系统物质循环之中,可以减缓水体的富营养化进程。控制污染源。禁止居民生活用水、生活垃圾、化工厂废水随意排放。

#### 参考文献

- [1] 国家环境保护局. 环境监测技术规范 水环境 部分[M]. 北京:中国环境科学出版社,1991.
- [2] 陈光荣,李明,金波,等. 利用蚕豆根尖微核技术监测青山湖污染的研究[J]. 中国环境科学,1985,5(4):3-7.
- [3] 杨辉,嵇庆,张锡然. 微核试验法监测奎河徐州市区段水质污染[J]. 南京大学学报:自然科学版,1996,19(4):56-59.
- [4] 胡振东,王怀志. 淮北煤矿塌陷区水质的微核技术监测[J]. 淮北煤师院学报:自然科学版,1997,18(4):47-50.
- [5] 艾尔肯·热合曼,木合塔尔·阿布都克里木,依米提·热合曼,等. 用蚕豆根尖细胞微核技术检测乌鲁木齐河水水质[J]. 干旱环境监测,2000,14(1):6-11.
- [6] 王永兴,吴庆龙,孔志明. 应用蚕豆根尖细胞微核技术监测太湖水质的研究[J]. 中国环境科学,1997,17(3):252-255.
- [7] 林宗伟,伍剑玲,侯治文. 利用蚕豆根尖细胞微核技术监测广州污水[J]. 广东药学院学报,1998,14(3):239-240.
- [8] 王兆慧. 蚕豆根尖细胞微核技术检测水体污染的研究[J]. 中国科技信息,2006(21):38-40.
- [9] 朱季文,季子修,蒋自巽,等. 太湖湖滨带的生态建设[J]. 湖泊环境,2002,14(1):77-81.
- [10] 嵇庆,张锡然. 三价镉对蚕豆根尖细胞的遗传毒性研究[J]. 环境科学学报,1995,15(4):454-460.
- [11] 张小冰,张义贤,刘桂兰. 化工厂、化肥厂废水对蚕豆微核的影响[J]. 山西农业大学学报,1999,19(1):65-66.