

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 9/24 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200710017819.9

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100529071C

[22] 申请日 2007.5.11

[21] 申请号 200710017819.9

[73] 专利权人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央区陕西科技大学

[72] 发明人 杨辉 张娟 王旭

[56] 参考文献

CN1357005A 2002.7.3

Production of pectinases by Polyporus squamosus in aqueous two-phase system. Mirjana G. Antov, et. al. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 28. 2001

Recovery of endo-polygalacturonase using poly-ethyleneglycol-salt aqueous two-phase extraction with polymer recycling. You. Ting Wu, Martinha Pereira, et. al. Bioseparation, Vol. 9 No. 4. 2000
果胶及果胶酶研究进展. 薛长湖, 张永勤, 李兆杰, 李志军. 食品与生物技术学报, 第24卷第6期. 2005

审查员 廖文勇

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限公司

代理人 张震国

权利要求书 3 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

一种双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法

[57] 摘要

一种双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法, 首先将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液, 然后将混合溶液振荡摇匀, 静置分相后再加入果胶酶液, 振荡摇匀, 在室温下萃取分相, 分离上相液聚乙二醇备用; 将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合, 在室温下进行反萃取, 果胶酶大部分集中在下相水相中, 将下相分离出, 采用膜过滤, 过滤出果胶酶。本发明采用的双水相试剂中的聚乙二醇对目标物质的生物活性具有保持和稳定作用, 同时硫酸铵在水溶液中对蛋白质的生物活性具有保护作用, 与反萃取等其他生物分离技术集成, 将优化果胶酶的制备工艺, 缩短操作周期, 提高产品的收率。

1、一种双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法，其特征在于：

1) 首先在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%-30%，硫酸铵的质量百分含量为 10%-30%，其余为水；

2) 将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；

3) 在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%-30%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 10%-30%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，果胶酶大部分集中在下相水相中，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

2、根据权利要求 1 所述的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法，其特征在于：在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，硫酸铵的质量百分含量为 19%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 20%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，经过反萃

取后,果胶酶大部分集中在下相中,将下相分离出,采用膜过滤,过滤出果胶酶。

3、根据权利要求1所述的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法,其特征在于:在20℃下,将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液,其中聚乙二醇的质量百分含量为25%,硫酸铵的质量百分含量为15%,其余为水;将混合溶液振荡摇匀,静置分相后再加入混合溶液10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液,振荡摇匀,在室温下静置5-10分钟后进行萃取分相,果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中,分离上相液聚乙二醇备用;在20℃下,将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合,其中聚乙二醇的质量百分含量为25%,酒石酸钾钠的质量百分含量为20%,余量为水,在室温下静置5-10分钟进行反萃取,果胶酶大部分集中在下相中,将下相分离出,采用膜过滤,过滤出果胶酶。

4、根据权利要求1所述的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法,其特征在于:在20℃下,将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液,其中聚乙二醇的质量百分含量为27%,硫酸铵的质量百分含量为13%,其余为水;将混合溶液振荡摇匀,静置分相后再加入混合溶液10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液,振荡摇匀,在室温下静置5-10分钟后进行萃取分相,果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中,分离上相液聚乙二醇备用;在20℃下,将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合,其中聚乙二醇的质量百分含量为27%,酒石酸钾钠的质量百分含量为20%,余量为水,在室温下静置5-10分钟进行反萃取,经过反萃取后,果胶酶大部分集中在下相中,将下相分离出,采用膜过滤,过滤出果胶酶。

5、根据权利要求 1 所述的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法，其特征在于：在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%，硫酸铵的质量百分含量为 30%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 30%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 10%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

6、根据权利要求 1 所述的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法，其特征在于：在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 30%，硫酸铵的质量百分含量为 10%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 30%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

一种双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法

技术领域

本发明涉及一种蛋白生物活性目标产物的分离纯化技术，特别涉及一种双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法。

背景技术

生物制品，尤其是蛋白质类生物大分子的药理作用与其生理活性是密切相关的。因此，在分离纯化过程中必须根据目标产物的特点，在保持其生物活性的前提下进行提取操作。双水相萃取体系就是考虑到这种现状，基于液-液萃取理论同时考虑保持生物活性所开发的一种新型的分离技术。

双水相萃取技术是分离纯化蛋白质混合物等生物大分子的有效方法。双水相系统通常是由水溶性的两种聚合物组成或一种水溶性聚合物与一种盐组成，与一般分离纯化技术相比，双水相技术具有处理容量大、能耗低、易连续化操作和工程放大等优点；另外，生物大分子如蛋白质、酶、核酸等不与有机溶剂直接接触，因此，在生物大分子的分离纯化等方面受到广泛重视，是一种有发展潜力的易于工业化应用的生物分离技术（P A Albertsson. Partition of cells and Macromolecules 3rd [M]. New York: John Wiley and Sons, 1986.）。

成功利用双水相萃取技术分离提取目标蛋白的关键是选择合适的双水相体系。目前在生化工程中得到广泛应用的双水相体系是聚合物/聚合物体系以及聚合物/无机盐体系，聚乙二醇（PEG）/葡聚糖（dextran）体

系以及聚乙二醇（PEG）/磷酸盐体系或聚乙二醇（PEG）/硫酸盐体系分别是这两者的代表。

果胶酶（Pectinases）是分解果胶质的一类酶的总称，是复合酶。在食品加工、饲料加工、纺织、造纸、环境保护、诱导植物抗病等方面都有重大的应用价值（Kashyap D R, Vohra P K, Chopra S, et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review [J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 215 - 227.）。果胶酶分离纯化的方法有很多，比如硫酸铵盐析、有机溶剂沉淀、层析等等（贾月, 弓爱君, 邱丽娜, 王建森. 果胶酶分离纯化及分析方法的研究进展. 工业微生物. 2005, 35(1): 55 - 58）。

目前酶工业大多数采用盐析法，该法只能得到包含菌体、盐类、杂蛋白及其他固形物的粗酶液，这种酶很难满足食品级的质量要求。另外，目前的果胶酶提取方法在操作过程中有机溶剂与果胶酶直接接触容易导致酶的失活，这也是国产果胶酶活性低的主要原因之一。

发明内容

本发明的目的在于克服上述现有技术的缺点，提供了一种不但稳定，而且能够保持产品的生物活性，简化制备果胶酶产品的工艺路线，降低了生产成本的双水相萃取体系分离纯化果胶酶的方法。

为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：首先在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%-30%，硫酸铵的质量百分含量为 10%-30%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的从黑曲霉产生的含果胶酶的发酵液进行粗制后的果胶酶液，振荡摇匀，分相完全后分别测定上下相中的酶

活力，通过上下相中酶活力的大小可以计算出双水相萃取的分配系数，根据分配系数的大小，可以选择最优的双水相萃取体系，分配系数越大，分配效果越好，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%-30%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 10%-30%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，分相完全后分别测定上下相中的酶活力，计算双水相反萃取的分配系数，根据分配系数的大小，可以选择最优的双水相反萃取体系，分配系数越大，分配效果越好，果胶酶大部分集中在下相水中，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

由于本发明采用的双水相试剂为聚乙二醇/硫酸铵，聚乙二醇对目标物质的生物活性具有保持和稳定作用，同时硫酸铵在水溶液中对蛋白质的生物活性具有保护作用，果胶酶经双水相体系分离纯化后，果胶酶分配系数高于文献中的报道，因此，本双水相体系特别适用于生物活性物质的分离提取；本发明与反萃取等其他生物分离技术集成，将优化果胶酶的制备工艺，缩短操作周期，提高产品的收率。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述，但本发明并不限于以下实施例。

实施例 1，发酵液的预处理：由于黑曲霉产生的果胶酶为胞外酶，首先采用过滤的方法进行粗提；在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，硫酸铵的质量百分含量为 19%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液

10%的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，分相完全后分别测定上下相中的酶活力，此时果胶酶的分配系数 K 可达到最大值 $K=11.42$ ；果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20°C 下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 20%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，反萃取聚乙二醇/酒石酸钾钠双水相体系的分配系数可以达到最大值 $K=5.0$ ，经过反萃取后，果胶酶大部分集中在下相（水相）中，其分配系数为 5.0，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

实施例 2，发酵液的预处理：由于黑曲霉产生的果胶酶为胞外酶，首先采用过滤的方法进行粗提；在 20°C 下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 25%，硫酸铵的质量百分含量为 15%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，分相完全后分别测定上下相中的酶活力，此时果胶酶的分配系数 $K=2.15$ ，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20°C 下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 25%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 20%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，反萃取聚乙二醇/酒石酸钾钠双水相体系的分配系数 $K=3.2$ ，经过反萃取后，果胶酶大部分集中在下相（水相）中，其分配系数为 3.2，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

实施例 3，发酵液的预处理：由于黑曲霉产生的果胶酶为胞外酶，首先采用过滤的方法进行粗提；在 20°C 下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制

成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，硫酸铵的质量百分含量为 13%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，分相完全后分别测定上下相中的酶活力，此时果胶酶的分配系数 $K=6.67$ ，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 27%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 20%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，反萃取聚乙二醇/酒石酸钾钠双水相体系的分配系数 $K=4.9$ ，经过反萃取后，果胶酶大部分集中在下相（水相）中，其分配系数为 4.9，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

实施例 4，发酵液的预处理：由于黑曲霉产生的果胶酶为胞外酶，首先采用过滤的方法进行粗提；在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%，硫酸铵的质量百分含量为 30%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液 10%的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 30%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 10%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

实施例 5，发酵液的预处理：由于黑曲霉产生的果胶酶为胞外酶，首先采用过滤的方法进行粗提；在 20℃下，将聚乙二醇、硫酸铵和水混合制成混合溶液，其中聚乙二醇的质量百分含量为 30%，硫酸铵的质量百分含量为 10%，其余为水；将混合溶液振荡摇匀，静置分相后再加入混合溶液

10%的果胶酶液，振荡摇匀，在室温下静置 5-10 分钟后进行萃取分相，果胶酶大部分进入上相聚乙二醇相中，分离上相液聚乙二醇备用；在 20℃下，将分离的上相液聚乙二醇、酒石酸钾钠和水混合，其中聚乙二醇的质量百分含量为 10%，酒石酸钾钠的质量百分含量为 30%，余量为水，在室温下静置 5-10 分钟进行反萃取，将下相分离出，采用膜过滤，过滤出果胶酶。

本发明双水相萃取果胶酶的主要特点：

- ①由于聚乙二醇具有较好的生物相容性，且没有毒性，酶不易失活；
- ②聚乙二醇在各种高聚物中最为廉价，同时聚乙二醇/盐体系价格便宜，操作成本较低；
- ③操作简单、处理容量大、能耗低、易连续化操作和工程放大。