

Streamline SP 膨胀床纯化溶菌酶

赵雪雁, 佟晓冬, 孙彦

(天津大学化工学院生物化工系, 天津 300072)

摘要:研究了阳离子交换吸附剂 Streamline SP 在膨胀床内的膨胀特性和流体力学性质, 考察了 Streamline SP 对溶菌酶的吸附平衡和动力学特性, 并从卵清蛋白溶液中分离纯化了溶菌酶. 结果表明, 通过 Streamline SP 膨胀床一步分离纯化, 溶菌酶活性收率达到 86.6%, 纯化因子达到 62.6.

关键词: Streamline SP; 膨胀床; 分离纯化; 溶菌酶

中图分类号: TQ935

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2004)02-0103-06

1 前言

膨胀床是通过特殊设计的吸附剂和装置而形成的具有低返混特性的流化床, 是一种新兴的集成分离技术, 它集澄清、浓缩和初步纯化于一体, 可以直接从含有细胞或细胞碎片等固体颗粒的高粘度料液中分离纯化目标产物. 自从 1993 年 Amersham Biosciences 公司推出了 Streamline 系列膨胀床吸附介质和膨胀床装置以来, 膨胀床吸附技术被越来越广泛地应用于蛋白质提纯^[1]、细胞分离^[2]和细胞破碎^[3]等生物下游加工工业中. 由于其在生物分离中具有诱人的开发前景, 已经逐渐成为生物分离技术研究中的新热点, 尤其是如何将膨胀床技术整合于现有的生物分离过程, 发挥膨胀床的集成优势, 推动膨胀床技术产业化, 已经成为当今产业界和学术界的共识.

本文选用阳离子交换剂 Streamline SP 为膨胀床介质, 研究其在膨胀床内的操作特性, 并以卵清溶菌酶为目标蛋白, 将 Streamline SP 膨胀床应用于实际蛋白分离纯化过程, 为 Streamline SP 膨胀床介质在蛋白质分离纯化中的应用和膨胀床技术的推广做出有益的探索.

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

Streamline SP 是 Amersham Biosciences 公司提供的阳离子交换吸附介质, 其核为石英砂, 外包 6% 的琼脂糖, 粒径范围 145~285 μm , 体积平均粒径为 212 μm , 密度为 1.15 g/ml; 溶菌酶购于 Sigma 公司; 新鲜鸡蛋于当地超市购买; 其它试剂均为分析纯试剂.

2.2 实验装置

膨胀床装置包括 ÄKTA Explorer 100 快速分离纯化开拓系统、Frac 900 组份收集系统和

XK16 色谱柱($\phi 16\text{ mm}$, $H=200\text{ mm}$), 均由 Amersham Biosciences 公司提供. 膨胀床吸附装置见图 1.

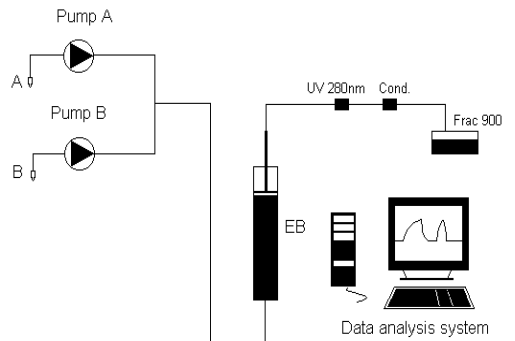


图 1 膨胀床吸附装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of the expanded-bed system

收稿日期: 2003-05-14, 修回日期: 2003-06-23

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20025617)

作者简介: 赵雪雁(1976-), 女, 辽宁省沈阳市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 孙彦, 通讯联系人.

2.3 实验方法

2.3.1 膨胀床流体力学性质的测定

以丙酮为示踪剂,用脉冲法测定膨胀床的流体力学性质.通过计算停留时间分布和方差,得到无因次方差 σ_{θ}^2 .用多釜串联模型和边界条件为闭闭式的一维扩散模型模拟^[4]计算轴向扩散系数:

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{2}{Bo} - \frac{2}{Bo^2}(1 - e^{-Bo}), \quad (1)$$

式中 $Bo=UH/\varepsilon D_{ax}$, 为 Bodenstein 准数,其中 D_{ax} 为轴向扩散系数(m^2/s), U 为流动相的空塔流速(m/s), ε 为膨胀床层空隙率, H 为膨胀床高度(m).

2.3.2 吸附实验

取数个 10 ml 的离心管并编号,分别加入一定量的吸附剂和不同浓度的溶菌酶溶液,在 25°C 水浴摇床中以 140 r/min 转速充分吸附 20 h 后,测定上清液在 280 nm 的吸光度值,利用溶菌酶的标准曲线得到平衡浓度,根据物料衡算求出平衡吸附量.

吸附动力学实验中,取一定量的吸附剂加到 150 ml 的锥形瓶中,加入 0.5 mg/ml 的溶菌酶溶液,在 25°C 水浴摇床 140 r/min 条件下进行吸附实验.每隔一定时间通过取样器吸取 3 ml 溶液,测定 280 nm 下的吸光度值后,迅速注回锥形瓶中.根据溶菌酶的标准曲线计算平衡浓度,绘出吸附动力学曲线.

2.3.3 卵清蛋白溶液的制备

从新鲜鸡蛋中分离得到卵清,用 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液稀释得到 30%(φ)卵清蛋白溶液,调节 pH 到 7.6,在 4°C 下静置过夜.然后用 74 μm 孔径的滤膜过滤除去大块的沉淀,得到用于分离的卵清蛋白溶液.

2.3.4 溶菌酶活性和蛋白质浓度的测定

以微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 为底物在 25°C 下测定溶菌酶的活性^[5].取 1.5 ml 菌体含量为 0.25 mg/ml 的 0.06 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.2)与 50 μL 蛋白质溶液混合,在 450 nm 下,随着溶菌酶对底物的分解,底物溶液的吸光度逐渐下降,测定在 2 min 内每隔 20 s 的吸光度下降量,将一个活性单位定义为每分钟吸光度的下降量是 0.001.利用 Bradford 法^[6]测定蛋白质浓度.

2.3.5 膨胀床对溶菌酶的分选纯化

在 25°C 温度下,取 Streamline SP 装入 XK16 柱内,膨胀床的初始填充高度为(5.0 \pm 0.2) cm.分离过程操作步骤如下:(1)以 230 cm/h 的流速通入 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 平衡缓冲液(pH 7.6),平衡 30 min;(2)将进料迅速切换到蛋白质料液,由于料液的粘度比平衡缓冲液大,为维持膨胀比不变,调节进料流速为 190 cm/h.当出口溶菌酶活性为初始料液中溶菌酶活性的 2.5%时,停止进料;(3)以 190 cm/h 流速通入 8~10 倍柱体积的平衡缓冲液,清洗膨胀床空隙中及结合能力弱的蛋白质,直到吸光度不再变化;(4)采用固定床洗脱方式,以 30 cm/h 的流速通入含 0.1 mol/L NaCl 的平衡缓冲液,洗脱结合能力较弱的蛋白质;(5)以 30 cm/h 的流速通入含 1.0 mol/L NaCl 的平衡缓冲液,洗脱结合能力较强的蛋白质,即目标蛋白质溶菌酶.操作过程中定期在线取样,分析流出组份中的蛋白浓度和溶菌酶活性,对纯化过程进行监控.

3 结果与讨论

3.1 Streamline SP 介质的膨胀床性能

床层膨胀率可以定义为床层膨胀高度 H 与填充高度 H_0 的比值.膨胀率过低会造成原料液中固

体颗粒通过困难,料液中的固体颗粒容易在膨胀床内造成堵塞,影响柱效;过高的膨胀率则会造成吸附介质的动态吸附容量下降.图2为 Streamline SP 的膨胀率与流速之间的关系.由图可见,膨胀率随流速的增加而增加,与流速近似呈线性关系.当膨胀率为 2.0 时,Streamline SP 介质稳定流化所需要的平衡缓冲液流速为 230 cm/h.

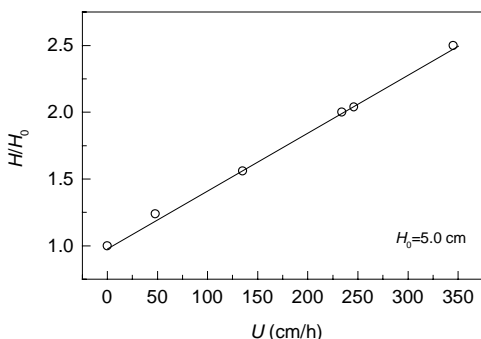


图2 平衡缓冲液流速与膨胀率的关系

Fig.2 Effect of Tris-HCl buffer flow velocity on bed expansion degree

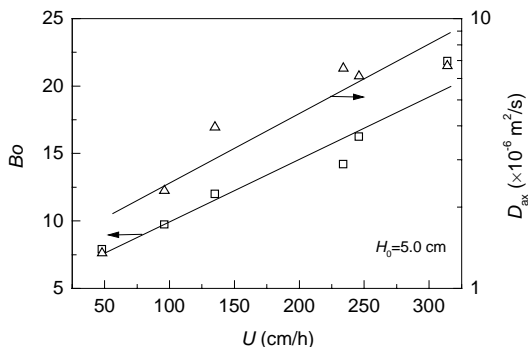


图3 平衡缓冲液流速对 Bo 和 D_{ax} 的影响

Fig.3 Effect of Tris-HCl buffer flow velocity on Bo number and D_{ax}

3.2 Streamline SP 膨胀床中的流体力学性能

Bodenstein 准数(Bo)常被用来表示床内液相混合程度的大小. Bo 值越大,液相混合程度越低^[7].图3反映了流速对液相混合程度的影响.对于膨胀床介质 Streamline SP,随着流速的增加, Bo 值也相应增加,即膨胀床内液相混合程度降低.当流速为 230 cm/h 时, Bo 值为 14.2,与文献^[8]报道的在流速为 205 cm/h 时测定的 XK16 柱中 Streamline 介质的 Bo 值相近.

一般来说,液相混合程度的降低并不一定意味着轴向混合系数(D_{ax})也降低^[9].由图3可见,随流速的增加, D_{ax} 反而增大.当流速为 150 cm/h 时, D_{ax} 为 $2.3 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$;当流速增加到 315 cm/h 时, D_{ax} 也增大到 $6.7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$.但需指出的是,在本实验范围内,虽然 D_{ax} 随流速的增大而增大,但 D_{ax} 依然很小,在 $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ 数量级,表明在本实验中 Streamline SP 膨胀床对蛋白质的吸附是以类似填充床的吸附方式进行的,流动相的流动不会影响蛋白质的吸附^[10].

3.3 Streamline SP 对溶菌酶的吸附

首先考察离子强度对溶菌酶吸附的影响,并用 Langmuir 方程对吸附等温数据进行了拟合:

$$q = q_m C / (K_d + C), \quad (2)$$

其中 q 是吸附密度(mg/ml), q_m 是吸附容量(mg/ml), K_d 是解离常数(mg/ml), C 是溶菌酶液相平衡浓度(mg/ml).如图4所示,Langmuir 平衡模型可以较好地拟合吸附平衡数据,得到的参数列于表1.从图4及表1可以看出,随着离子强度的增加,Streamline SP 的吸附容量下降,解离常数上升.在离子强度大于 0.5 mol/L 时溶菌酶基本不吸附.因此,在分离纯化溶菌酶的实验中,可以通过提高洗脱液的离子强度实现溶菌酶洗脱.

图5是两种离子强度条件下溶菌酶在 Streamline SP 上的吸附动力学曲线.利用孔扩散模型^[11]对溶菌酶吸附动力学数据进行拟合,得到的有效孔扩散系数($D_{p,e}$)列于表1.由图5和表1可知,在不加入 NaCl 时, $D_{p,e}$ 为 $4.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$,这与 Wright 等^[12]报道的溶菌酶在 Streamline SP 中的有效孔扩散系数($3.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)相近.当溶液中 NaCl 浓度为 0.1 mol/L 时,液相蛋白浓度的下降趋势变

缓,并且其有效孔扩散系数增大.这是因为在高盐浓度下蛋白与配基的结合能力下降,吸附在孔道内表面的蛋白质的表面扩散系数增大^[13].

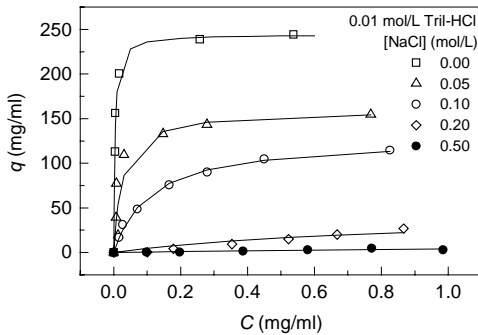


图4 离子强度对溶菌酶吸附平衡的影响
Fig.4 Effect of ionic strength on the lysozyme adsorption equilibrium to Streamline SP

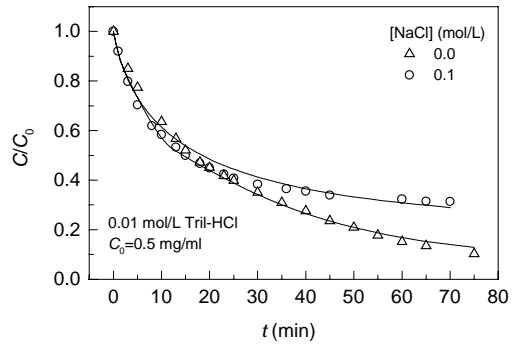


图5 溶菌酶在 Streamline SP 上的吸附动力学曲线
Fig.5 Effect of ionic strength on the uptake curve of lysozyme to Streamline SP

表1 液相中不同 NaCl 浓度条件下 Streamline SP 吸附溶菌酶的吸附参数

Table 1 Parameters for lysozyme adsorption to Streamline SP at different NaCl concentrations

NaCl conc. (mol/L)	q_m (mg/ml)	K_d (mg/ml)	$D_{p,e}$ ($\times 10^{-11}$ m ² /s)
0.00	244.5	0.0035	4.5
0.05	159.4	0.0260	—
0.10	128.3	0.1100	11.5
0.20	45.8	0.9100	—
0.50	10.8	1.8000	—

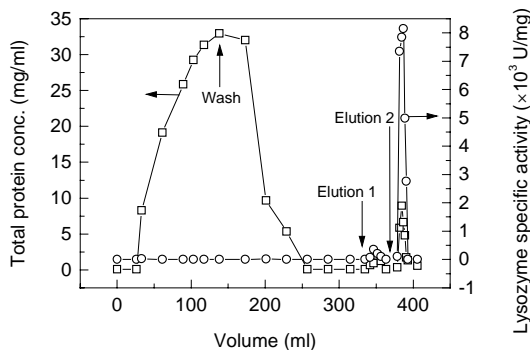


图6 利用 Streamline SP 纯化卵清蛋白溶液中的溶菌酶
Fig.6 Profiles of lysozyme specific activity and total protein concentration during the purification of lysozyme

3.4 溶菌酶的纯化

卵清溶菌酶的工业纯化过程主要包括结晶(沉淀)、离心、吸附等单元操作,步骤较多,生产周期长,产品收率低.本文利用 Streamline SP 膨胀床从卵清蛋白的粘稠溶液中一步分离纯化溶菌酶,色谱分离结果示于图6.由图可见,洗脱液中 NaCl 的浓度为 0.1 mol/L 时,洗脱得到洗脱峰 1(Elution 1);洗脱液中的 NaCl 浓度为 1.0 mol/L 时洗脱得到洗脱峰 2(Elution 2).收集不同操作阶段的组份,测定其总蛋白浓度和溶菌酶的活性,并计算活性收率和纯化因子,结果列于表2.从

表可知,在此操作条件下,穿透和清洗损失的溶菌酶活性仅约 11%,洗脱峰 1 含有 16.9 mg 蛋白质,但溶菌酶活性只有 1.1×10^4 U,表明在此离子强度较低条件下,部分与 Streamline SP 结合能力比较弱的杂蛋白被洗脱下来,而溶菌酶仅洗脱 2.2%.洗脱峰 2 的蛋白质含量为 63.4 mg,溶菌酶活性为 4.3×10^5 U,占总活性的 86.6%,其纯化因子(表示目标产物纯化程度的参数,为分离产物与料液中目标产物的比活之比)达到 62.6.结果证明在此离子强度条件下,绝大部分溶菌酶得到洗脱.另外,物料衡算表明,各步骤的蛋白质和溶菌酶活性之和与进料基本相同.

表 2 利用 Streamline SP 从卵清蛋白溶液中纯化溶菌酶

	Protein conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery yield (%)	Purification factor
Feedstock	33.30	4588.5	5.00×10^3	108.3	—	—
Breakthrough	23.80	3248.4	8.28×10^3	2.5	1.6	—
Wash	6.87	1133.6	4.90×10^4	43.7	9.8	—
Elution 1	0.47	16.9	1.10×10^4	638.3	2.2	5.9
Elution 2	4.88	63.4	4.33×10^5	6780.5	86.6	62.6

Noppe 等^[14]研究了利用 Streamline SP 膨胀床从脱脂马乳中提取溶菌酶的分离纯化过程, 得到溶菌酶活性收率为 88.9%, 纯化因子为 8.3. 与本实验得到的纯化结果相比, 两者活性收率相近, 但本实验得到的纯化因子远高于 Noppe 等得到的结果.

4 结论

在本文研究的范围内, 随着流速增加, B_o 值和轴向扩散系数 D_{ax} 均呈增加的趋势, 但轴向扩散系数较小, 在 $10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ 数量级; Streamline SP 对溶菌酶具有很高的吸附容量和较好的吸附动力学性能; 研究了利用 Streamline SP 膨胀床从卵清蛋白溶液中分离纯化溶菌酶的过程, 经过一步操作, 溶菌酶活性收率达到 86.6%, 纯化倍数高达 62.6, 证明该膨胀床吸附操作在溶菌酶分离纯化中具有良好的应用开发前景.

参考文献:

- [1] Anspach B F, Curbelo D, Hartmann R, et al. Expanded-bed Chromatography in Primary Protein Purification [J]. J. Chromatogr. A, 1999, 865: 129–144.
- [2] Ujam L B, Clemmitt R H, Chase H A. Cell Separation by Expanded Bed Adsorption: Use of Ion Exchange Chromatography for the Separation of *E. coli* and *S. cerevisiae* [J]. Bioprocess Eng., 2000, 23: 245–250.
- [3] Nandakumar M P, Tocaj A, Mattiasson B. Use of a Micro-expanded Bed Containing Immobilised Lysozyme for Cell Disruption in Flow Injection Analysis [J]. Bioseparation, 1999, 8: 247–254.
- [4] Levenspiel O. Chemical Reaction Engineering, 3rd Edition [M]. New York: Wiley, 1999. 300.
- [5] 董晓燕, 史晋辉, 孙彦. 人工伴侣和盐酸胍促进溶菌酶复性的协同效应 [J]. 化学学报, 2002, 53: 590–594.
- [6] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quotation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248–254.
- [7] 佟晓冬, 孙彦. 高密度吸附剂的制备及其膨胀床特性研究 [J]. 过程工程学报, 2002, 2(3): 199–203.
- [8] Thömmes J, Bader A, Halfer M, et al. Isolation of Monoclonal Antibodies from Cell Containing Hybridoma Broth Using a Protein a Coated Adsorbent in Expanded Beds [J]. J. Chromatogr. A, 1996, 752: 111–122.
- [9] Pålsson E, Axelsson A, Larsson P O. Theories of Chromatographic Efficiency Applied to Expanded Beds [J]. J. Chromatogr. A, 2001, 912: 235–248.
- [10] Chang Y K, Chase H A. Development of Operating Conditions for Protein Purification Using Expanded Bed Techniques: The Effect of the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance [J]. Biotechnol. Bioeng., 1996, 49(5): 512–526.
- [11] Xue B, Sun Y. Protein Adsorption Equilibria and Kinetics to a Poly(vinyl alcohol)-based Magnetic Affinity Support [J]. J. Chromatogr. A, 2001, 921: 109–119.
- [12] Wright P R, Muzzio F J, Glasser B J. Batch Uptake of Lysozyme: Effect of Solution Viscosity and Mass Transfer on Adsorption [J]. Biotechnol. Progr., 1998, 14: 913–921.
- [13] Chen W D, Dong X Y, Sun Y. Analysis of Diffusion Models for Protein Adsorption to Porous Anion-exchange Adsorbent [J]. J. Chromatogr. A, 2002, 962: 29–40.
- [14] Noppe W, Hanssens I, De Cuper M. Simple Two-step Procedure for the Preparation of Highly Active Pure Equine Milk Lysozyme [J]. J. Chromatogr. A, 1996, 719: 327–331.

Single-step Purification of Lysozyme by an Expanded Bed with Streamline SP

ZHAO Xue-yan, TONG Xiao-dong, SUN Yan

(Dept. Biochem. Eng., Sch. Chem. Eng. & Technol., Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: This work is concerned with the development of a single-step process for purification of lysozyme from chicken egg white solution by expanded-bed adsorption. The bed expansion behavior and liquid-phase axial dispersion in the expanded bed with Streamline SP in XK16 column were examined. The results indicated that the expanded-bed system was highly efficient for protein purification. Static experiments showed that the cation exchanger gave a high binding capacity for lysozyme and the bound protein could be dissociated by increasing liquid-phase ionic strength. Kinetic studies led to the estimation of the effective pore diffusivity of lysozyme and its dependence on liquid phase ionic strength. Then, the expanded bed was applied to the single-step purification of lysozyme from a chicken egg white solution. As a result, a recovery yield of 86.6% and purification factor as high as 62.6 were reached. The study indicates that the expanded bed with Streamline SP is promising for direct lysozyme isolation and purification from crude feedstocks.

Key words: Streamline SP; expanded bed; purification; lysozyme