

温度诱导双水相分离纯化细菌素工艺条件的选取与优化

李 孱^{1,2}, 蔡昭铃¹, 丛 威¹, 白景华², 欧阳藩¹

(1. 中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 湖北大学生命科学院, 湖北 武汉 430062)

摘 要:利用 TritonX-114 可萃取疏水性蛋白质的性质,研究了温度诱导双水相分离纯化细菌素乳链菌肽,用响应面法对成相成份 TritonX-114 和离子强度进行了优化,最佳浓度分别为 3.27% TritonX-114, 0.85 mol/L 氯化钠. 优化过程中, pH 固定为 2.0, 温度固定为 30°C, 在此条件下乳链菌肽的萃取率为 92%, 纯化系数为 9.05.

关键词:温度诱导双水相系统; 萃取; 细菌素; 响应面法; 优化

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)04-0412-04

1 前 言

细菌素是由乳酸细菌产生的天然抗菌的蛋白质物质,在食品工业中作为天然防腐剂有广泛的用途. 目前细菌素分离纯化主要围绕细菌素具疏水性、带正电及能吸附在菌体上的特性展开工作.

根据细菌素在不同 pH 条件下吸附与解吸附的特性,前人^[1]提出了一种基于吸附和解吸附回收和纯化细菌素的方法,细菌素在 pH 6.0~6.5 的条件下能吸附在产生菌的细胞上,离心收集菌体,再在 pH=2 条件下使细菌素从菌体上解离下来. 但实验中发现^[2],高浓度的乳链菌肽不能完全被菌体吸附,而且离心收集菌体时,会使松散吸附的乳链菌肽脱落下来. 多孔硅胶化合物也可以用来从发酵液中吸附细菌素,吸附后用 0.1% SDS 解吸附,但是,SDS 不能从产物中完全去除^[3].

通过改变温度使去污剂 TritonX-114 水溶液形成两相的现象称为温度诱导双水相. TritonX-114 水溶液在凝固点与浊点(22°C)的温度范围内形成均相的胶团溶液,当温度高于浊点时,胶团聚集而形成悬浊液,静止或离心可使聚集的胶团沉降于管底而形成高密度的富含去污剂的下相(称为去污剂相)和低密度的去污剂含量少的上相(称为水相). 当蛋白质溶于 TritonX-114 溶液中时,在分相的过程中能将溶液中的蛋白质分配到两个不同的相中,疏水性蛋白质进入去污剂相,亲水性蛋白质进入水相^[4]. 此方法自 Bordier^[5]于 1981 年创建以来,在分离疏水性蛋白质及膜蛋白质上已有广泛的应用.

细菌素乳链菌肽为疏水性多肽. 本研究利用 TritonX-114 可萃取疏水性蛋白质的特点,将乳链菌肽直接从发酵液中快速分离纯化,利用响应面法进行优化以寻求最佳工艺条件.

2 实验材料与方法

2.1 试剂

乳链菌肽, TritonX-114(Sigma 公司), 酵母粉(Oxoid 公司).

2.2 菌株及培养基

菌株为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis*) ATCC11454 和浅黄色微球菌(*Micrococcus flavus*) NCIB 8166, 均为中科院微生物所还连栋研究员惠赠. 在实验中 ATCC 11454 和 NCIB 8166 分别用作乳链菌肽产生菌和乳链菌肽效价检测指示菌. *L. lactis* ATCC 11454 用 CM

培养基培养^[6], *M. flavus* NCIB 8166 用 SI 培养基培养^[7].

2.3 乳链菌肽样品的制备

ATCC 11454 经活化后,以 1%(φ)的接种量接入 100 ml 带橡皮塞的血清瓶中,内装 50 ml 无菌 CM 培养基,于 30°C 及 180 r/min 下振荡培养 6 h. 发酵液用 6 mol/L 盐酸调至 pH=2.0 作为待分离样品. 发酵液调至 pH 2.0 是因为此时乳链菌肽稳定,且乳链菌肽能充分从菌体细胞上解离下来^[1].

2.4 温度诱导双水相系统及相分配过程

基本按照文献[8]的方法进行. 样品、成相成份及 NaCl 加入 5 ml 刻度试管中,经振荡混合后,于 0°C 下萃取 2 h,再于 4°C 下以 4000 r/min 离心 20 min,除去菌体. 取上清液测定分配前乳链菌肽的效价及总蛋白含量,其余上清液于 30°C 下保温 10 min,再于 25°C 下以 4000 r/min 离心分相 5 min,读出上下相体积并取上下相分析乳链菌肽效价及蛋白质浓度.

2.5 乳链菌肽效价及蛋白质含量的测定

乳链菌肽的效价用琼脂扩散法^[6]测定,蛋白质浓度用改进的 Lowry 法^[9]测定. 萃取率 $R(\%) = \text{萃取相的体积} \times \text{萃取相乳链菌肽的效价} / (\text{萃取前发酵液的体积} \times \text{发酵液的效价})$. 纯化系数 f (Purification factor) = 萃取相乳链菌肽比活性 / 萃取前发酵液的乳链菌肽比活性.

2.6 实验设计

采用二因素三水平因子设计以确定因子的主效和最陡爬坡方向;用中心组合设计(CCD)寻求最佳操作工艺条件. 为兼顾纯化效果和萃取率,定义响应量 $Y = 5 \times \text{纯化系数} + \text{萃取率}$. 用统计软件 SAS/Statistic Version 6.12 对实验数据进行回归分析,用学生 t 检验测试回归系数的显著性.

3 结果与分析

5 ml 发酵液、TritonX-114 和氯化钠加入 5 ml 刻度试管中,经 4°C 萃取、30°C 保温及离心分相后,乳链菌肽被萃取到去污剂相. 虽然成相成份、离子强度、温度和 pH 等因素影响蛋白质在双水相中的分配,但由于乳链菌肽在高 pH 条件下不稳定,且易被菌体细胞吸附^[1],高温能使乳链菌肽失去活性,低温(<22°C)不能使体系分相,所以优化过程中 pH 和温度分别固定为 2.0 和 30°C.

由预实验可知,成相成份及离子强度对乳链菌肽的分离及纯化有较大影响,所以 TritonX-114 和氯化钠浓度为影响乳链菌肽分离纯化的主要因素,其起始浓度分别选定为 3%(φ)和 0.5 mol/L.

3.1 二因素三水平实验

二因素三水平实验设计与结果列于表 1,表中第 4~7 列分别为萃取相体积(V_e)、萃取相乳链菌肽效价(C_n)、萃取相蛋白浓度(C_p)及萃取相乳链菌肽比活性(N), Y 为响应量.

表 1 二因素三水平因子设计及实验结果

Table 1 Experimental design and results of two variables at three levels.

No.	x_1	x_2	V_e (ml)	C_n (IU/ml)	C_p (mg/ml)	N (IU/mg)	R (%)	$5f$	Y	
									Observed	Predicted
1	-1	-1	1.13	2448	2.35	1042.88	51.52	28.89	80.41	77.55
2	1	-1	1.75	2011	2.15	936.36	65.52	25.94	91.46	88.69
3	-1	1	0.72	4762	2.75	1734.06	63.84	48.03	111.88	109.09
4	1	1	1.18	3722	2.50	1491.76	81.79	41.32	123.11	120.23
5	0	0	1.22	2838	2.36	1203.22	64.47	33.33	97.80	98.89
6	0	0	1.15	3083	2.83	1090.58	66.03	30.21	96.24	98.89
7	0	0	1.25	3038	3.04	1000.33	70.71	27.71	98.42	98.89
8	0	0	1.20	2835	2.44	1162.55	63.35	32.20	95.55	98.89
9	0	0	1.20	2835	2.47	1147.00	63.35	31.77	95.12	98.89
Broth				1074	5.95	180.50				

Note: $x_1 = (X_1 - 3)/0.5$, $x_2 = (X_2 - 0.5)/0.25$, X_1 and X_2 stand for concentrations of TritonX-114 (% φ) and NaCl (mol/L) respectively.

根据表 1 的实验数据, 拟合出一次回归方程为

$$Y=98.887+5.57x_1+15.77x_2. \quad (1)$$

回归分析可知, 在 $\alpha=0.05$ 水平上, TritonX-114 和 NaCl 浓度均差异显著, 对乳链菌肽的纯化系数和收率均有积极的影响, 且离子强度比 TritonX-114 对乳链菌肽分离纯化的影响更大. 该模型的确定系数为 0.95 表明 95% 的实验数据的可变性可用此模型解释. F 检验表明 $F = 51.124 > F_{2, 6, 0.01} = 10.9$, 证明该模型在概率为 0.01 水平上足够地拟合了实验数据.

3.2 最陡爬坡路径

以上述一阶模型为基础, 可以确定最陡爬坡方向, 表 2 列出了 TritonX-114 和氯化钠增加的方向. TritonX-114 每次增加 0.07%, 氯化钠每次增加 0.1 mol/L. 从表中可以清楚地看出, No.12 对应的响应量 Y 达到最大, 根据 No.12 的结果可对 TritonX-114 及氯化钠浓度安排下面的实验.

表 2 最陡爬坡实验设计及实验结果

No.	X_1 (% , φ)	X_2 (mol/L)	V_e (ml)	C_n (IU/ml)	C_p (mg/ml)	N (IU/mg)	R (%)	$5f$	Y
10	3.07	0.6	1.10	3351	2.27	1476.14	68.65	40.89	109.54
11	3.14	0.7	1.15	3280	1.87	1758.43	70.25	48.71	118.96
12	3.21	0.8	1.08	4429	2.60	1702.12	89.07	47.15	136.22
13	3.28	0.9	1.03	4457	2.50	1781.17	85.48	49.34	134.82
14	3.35	1.0	0.98	4578	2.83	1619.56	83.55	44.86	128.41
Broth				1074	5.95	180.50			

3.3 中心组合实验设计

从上述最速爬坡实验可以看出, 响应变量 Y 值接近最大响应值区域. 用中心组合设计可以确定 TritonX-114 和氯化钠的最佳浓度, 使得 Y 值达到最大, 实验设计及实验结果列于表 3. 根据此实验数据, 对萃取率和纯化系数进行拟合的方程为

$$Y=134.932+3.265x_1+4.526x_2+0.303x_1x_2-1.985x_1^2-5.138x_2^2. \quad (2)$$

表 3 中心组合设计及实验结果

No.	x_1	x_2	V_e (ml)	C_n (IU/ml)	C_p (mg/ml)	N (IU/mg)	R (%)	$5f$	Y	
									Observed	Predicted
15	-1	-1	1.10	3398	1.83	1854.10	69.60	51.36	120.95	120.32
16	1	-1	1.25	3155	1.71	1843.27	73.45	51.06	124.50	126.25
17	-1	1	1.05	3871	1.96	1975.77	75.70	54.73	130.43	128.77
18	1	1	1.01	4439	2.38	1866.55	83.48	51.70	135.19	135.90
19	-1.414	0	0.90	4675	2.79	1673.24	78.35	46.35	124.71	126.35
20	1.414	0	1.00	4932	3.01	1640.75	91.85	45.45	137.30	135.58
21	0	-1.414	1.20	3534	2.44	1446.17	78.98	40.06	119.03	118.26
22	0	1.414	1.00	4476	2.64	1697.42	83.36	47.02	130.37	131.06
23	0	0	1.08	4429	2.60	1702.12	89.07	47.15	136.22	134.93
24	0	0	1.10	4282	2.61	1638.94	87.72	45.40	133.13	134.93
25	0	0	1.05	4439	2.60	1707.46	86.79	47.30	134.09	134.93
26	0	0	1.03	4496	2.54	1766.53	86.23	48.93	135.16	134.93
27	0	0	1.05	4512	2.61	1727.10	88.21	47.84	136.06	134.93
Broth				1074	5.95	180.50				

Note : $x_1=(X_1-3.21)/0.07$, $x_2=(X_2-0.8)/0.1$, X_1 and X_2 stand for concentrations of TritonX-114 (% , φ) and NaCl (mol/L) respectively.

模型的完备性可从如下两方面考察. 首先, 模型在统计学上的意义由 F 检验判断, $F_{\text{回归}} = MS_R/MS_e = 89.02586/2.9107 = 30.586 > F_{5,7,0.01} = 7.46$, $F_{\text{失失}} = MS_{LF}/MS_{pe} = 4.4765/1.7363 = 2.578 < F_{3,4,0.1} = 4.19$. 所以, 模型在 $\alpha=0.01$ 水平上回归显著, 在 $\alpha=0.1$ 水平上欠失不显著, 因而模型是充分的.

其次,多项式的拟合优度由确定系数(R^2)表示,该值计算为 0.95,这表明响应变量 95%的可变性可由此模型解释。因此,式(2)为乳链菌肽分离纯化实验响应面提供了一个合适的模型。

对式(2)求导,可以得到模型的极值点, TritonX-114 为 3.27%, 氯化钠为 0.85 mol/L, 此时模型预测的最大响应为 137.38。为了证实预测结果,在上述两因素的点处进行重复萃取实验,得出响应量为 137.25 ± 1.4 , 此时的萃取率为 92%, 纯化系数为 9.05。预测值与实验值之间的良好相关性证实了模型的有效性及存在着极大值点。

4 结论

(1) 温度诱导 TritonX-114 双水相系统分离纯化细菌素方法简便快速,能将细菌素有效地富集到疏水相中。成相成份是影响细菌素分离纯化的主要因素。

(2) 应用统计学上的响应面法,经实验确认,温度诱导双水相萃取乳链菌肽成相成份 TritonX-114 和氯化钠的最佳浓度分别为 3.27%和 0.85 mol/L,在此条件下乳链菌肽萃取率为 92%,纯化系数为 9.05。

参考文献:

- [1] Yang R, Johnson M C, Ray B. Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58: 3355-3359.
- [2] Van't Hul J S, Gibbons W R. Concentration and Recovery of the Bacteriocins Nisin from *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* [J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 1996, 24: 251-256.
- [3] Coventry M J, Gordon J B, Alexander M, et al. A Food Grade Process for Isolation and Partial Purification of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria that Uses Diatomite Calcium Silicate [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 1764-1769.
- [4] Bordier C. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton-114 Solution [J]. J. Biol. Chem., 1981, 256: 1604-1607.
- [5] Hinze W L, Pramauro E. A Critical Review of Surfactant-mediated Phase Separations (Cloud-point Extractions): Theory and Application [J]. Crit. Rev. Anal. Chem., 1993, 24: 133-177.
- [6] Vuyst L D, Vzdandamme E J. Influence of the Carbon Source on Nisin Production in *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* Batch Fermentation [J]. J. General Microbiol., 1992, 138: 571-578.
- [7] Tramer J, Fowler G G. Estimation of Nisin in Foods [J]. J. Sci. Food Agric., 1964, 15: 522-528.
- [8] Brusca J S, Radolf J D. Isolation of Integral Membrane Proteins by Phase Partitioning with TritonX-114 [J]. Method Enzymol., 1994, 228: 182-193.
- [9] Markwell M A K, Haas S M, Bieber L L, et al. A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples [J]. Anal. Biochem., 1978, 87: 206-210.

Optimizing Conditions for Bacteriocin Isolation and Purification in Temperature-induced Aqueous Two-phase Systems

LI Chan^{1,2}, CAI Zhao-ling¹, CONG Wei¹, BAI Jing-hua², OUYANG Fan¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. College of Life Science, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062, China)

Abstract: Bacteriocin nisin was isolated and purified in temperature-induced aqueous two-phase systems using the capacity of extracting hydrophobic proteins of TritonX-114. The concentrations of sodium chloride and TritonX-114 which can form the aqueous two-phase systems were optimized by the response surface method. The full-factorial design was used to assess the main effects of factors and determine the path of steepest ascent to the optimal region of the aqueous two-phase system composition. The optimum concentrations of TritonX-114 and sodium chloride were then easily determined by using a central composite design and were found to be 3.27% of TritonX-114 and 0.85 mol/L sodium chloride. The recovery and purification factor were 92% and 9.05 respectively under the optimum conditions.

Key words: temperature-induced aqueous two-phase systems; extraction; bacteriocin; response surface methods; optimization