

# 超声波破碎法与高压匀浆破碎法所得酶液的酶活差异

王超彪 何连顺 张玉锋 田佳 李斌水 米造吉  
精晶药业股份有限公司 河北邢台 055550

**摘要:**在对生物制造行业细胞破碎的所有的方法中,应用最广泛的是超声波破碎法和高压匀浆破碎法,本文主要研究论述了超声波破碎法与高压匀浆破碎法所得酶液的酶活差异,以B-羟基丙氨酸的转化中羟甲基转移酶为例,控制其它条件不变,只改变酶液的破碎方法,验证两种破碎方法所得酶液的酶活差异性,最终得出在实验室B-羟基丙氨酸的转化探索阶段,超声波破碎法优于高压匀浆破碎法。

**关键词:**超声波破碎法、高压匀浆破碎法、B-羟基丙氨酸、酶活

在基因工程菌细胞中,胞内包含物与环境被细胞膜分开,保证了细胞个体的完整性。细胞膜的良好弹性可以使细胞能够适应外界环境渗透压的急剧变化。在生命科学研究中,通常要研究细胞内的大分子物质,如酶、核酸、蛋白质等,首先就要设法释放出胞内的物质,这个过程叫细胞裂解或者破碎。破碎方法的优劣会影响到目标产物的产率以及正确功能状态。破碎方法选择不正确还可能使目的产物发生降解、破坏,无法获得想要的蛋白。因此,细胞破碎是提取胞内包含物的关键性步骤,破碎技术的研究更加引起生化工程学者和基因工程专家的关注。

破碎细胞是制备胞内蛋白的必经之路,利用外力破坏细胞膜和细胞壁,使细胞内含物包括目的产物成分释放出来的技术,是分离纯化细胞内合成的非分泌性生物物质的基础。目前在工业生产中应用物理方式进行细胞破碎的方法最广泛的是超声波破碎法和高压匀浆破碎法,但迄今为止这两种破碎方法对目标蛋白的影响并没有一个明确的结论。

已有报道对两种破碎方法的差别进行探讨。在制备氯霉素乙酰基转移酶和 $\beta$ -内酰胺酶时高压匀浆破碎要优于超声波破碎。而在制备核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶时,超声波破碎却要优于高压匀浆破碎。这可能与处理的环境、方法与技术条件有很大关系,为了更好的说明两种方法对工业生产的影响,对B-羟基丙氨酸转化过程中含有羟甲基转移酶细胞的两种破碎方法进行了研究。

B-羟基丙氨酸转化过程中所需的羟甲基转移酶在细胞培养过程中不能分泌到胞外,而保留在胞内,属于胞内包含物。破碎细胞的目的就是使细胞壁和细胞膜受到不同程度的破坏和破碎,释放出生物酶,选择合适的转化条件,在B-羟基丙氨酸转化过程起到酶催化作用[3],现在对其中应用最广泛的两种破碎方法:超声波破碎

法和高压匀浆破碎法进行研究。

## 1 超声波破碎法和高压匀浆破碎法

### 1.1 超声波破碎法

超声波破碎法常用于对动植物组织、细胞、细菌、芽孢菌种的破碎,也可用来乳化、分离、分散、匀化、提取、脱气、清洗及加速化学反应等。其原理是利用超声波在液体中的分散效应,使液体产生空化的作用,从而使液体中的固体颗粒或细胞组织破碎。

超声波破碎仪又叫超声波细胞粉碎仪是一种利用强超声在液体中产生空化效应,对物质进行超声处理的多功能、多用途的仪器。能用于多种动植物细胞、病毒细胞的破碎。超声波细胞破碎仪原理就是将电能通过换能器转换为声能,这种能量通过液体介质而变成一个密集的小气泡,这些小气泡迅速炸裂,产生的象小炸弹一样的能量,从而起到破碎细胞等物质的作用;超声波破碎仪可分为槽式和探头直接插入介质两种型式,一般破碎效果后者比前者好,本次实验使用后者。

### 1.2 高压匀浆破碎法

高压匀浆破碎法是大规模破碎细胞的常用方法,作用机理是液体剪切作用,利用高压使细胞悬浮液通过针型阀,由于突然减压和高速冲击撞击环使细胞破碎,细胞悬浮液自高压室针型阀喷出时,每秒速度高达几百米,高速喷出的浆液又射到静止的撞击环上,被迫改变方向从出口管流出。细胞在这一系列高速运动过程中经历剪切、碰撞及由高压到常压的变化,从而造成细胞破碎。

高压匀浆器是常用的设备,在操作方式上,可以采用单次通过匀浆器或多次循环通过等方式,也可连续操作。为了控制温度的升高,可在进口处用干冰、冰块或者液氮调节温度,使出口温度调节在20℃左右。在工业规模的细胞破碎中,对于酵母等难破碎的及韧度高或处于生长静止期的细胞,常采用多次循环的操作方法。

## 2 单因素实验设计

### 2.1 实验方案

在 B-羟基丙氨酸转化过程中, 其他条件保持一致, 仅改变羟甲基转移酶酶液的破碎方法, 分别为超声波破碎法和高压匀浆破碎法, 所得酶液对应为超声波破碎酶液和高压匀浆破碎酶液, 两种破碎酶液进行对比实验, 验证两种破碎酶液在 B-羟基丙氨酸转化过程中酶活的差异。

为了排除单一批次菌体对实验准确性的影响, 现选择四个批次发酵的菌体, 每批次的菌体分别进行超声波破碎和高压匀浆破碎处理, 每批次菌体破碎后得到的破碎酶液进行对比实验, 以此来排除不同批次发酵的菌体差异对两种破碎方法差异的影响。(各批次的菌体发酵工艺参数一致, 各批次超声波破碎酶液过程参数均一致, 各批次高压匀浆破碎酶液过程参数均一致)

### 2.2 转化过程

向四口反应瓶中依次加入水、甘氨酸并控制适宜的温度和 PH; 再依次加入辅酶以及羟甲基转移酶酶液等, 控制适宜的温度和 PH; 搅拌均匀后, 缓慢滴加甲醛溶液, 过程控制适宜的温度和 PH, 加完甲醛溶液后取样检测料液中甲醛含量, 称量料液体积, 计算甲醛的转化率, 甲醛的转化率越高说明羟甲基转移酶的酶活越强, 也就说明对应的破碎方法更优。

### 3 转化数据

根据以上条件, 在保持破碎前温度、Ph、浓度、缓冲盐用量等处理方式一致的前提下, 对比的试验数据如下表:

对比批次	破碎酶液	甲醛的转化率	甲醛的物恒
第一组	超声波破碎酶液 1	93.97%	99.68%
	高压匀浆破碎酶液 1	90.10%	99.05%
第二组	超声波破碎酶液 2	92.90%	99.08%
	高压匀浆破碎酶液 2	88.69%	99.16%
第三组	超声波破碎酶液 3	96.17%	99.57%
	高压匀浆破碎酶液 3	92.72%	99.34%
第四组	超声波破碎酶液 4	97.61%	99.93%

高压匀浆破碎酶液 4	91.51%	99.88%
------------	--------	--------

备注: 四组对比实验分别使用四批发酵菌体, 且每组对比实验使用的菌体为同批次。

## 4 分析与讨论

通过以上四组对比实验超声波破碎酶液和高压匀浆破碎酶液的转化数据可以分析出, 仅改变所使用羟甲基转移酶酶液的破碎方法的条件下, 超声波破碎酶液转化的甲醛平均转化率为 95.16%, 高压匀浆破碎酶液转化的甲醛平均转化率为 90.75%, 超声波破碎酶液甲醛转化率比高压匀浆破碎酶液甲醛转化率高 4.41%。

由此可以得出, 在破碎前处理方式一致的前提下, 超声波破碎酶液比高压匀浆破碎酶液的酶活要高; 可能的因素在于最终得出在小试探索阶段为了找到酶的最高酶活, 在 B-羟基丙氨酸的转化中所使用羟甲基转移酶酶液的破碎方法, 超声波破碎法优于高压匀浆破碎法。

## 5 展望

在实验室条件下, 对于杆菌发酵所得 B-羟基丙氨酸羟甲基转移酶超声波破碎优于高压均质破碎。超声波破碎具有操作简便, 用时短, 效率高, 生物酶损失率少, 均匀度高的特点, 适用于实验室规模的研究; 但存在温度波动大, 声能传递强度高和散热困难的问题, 对于大规模生产, 产生的化学自有基团容易使生物酶失活, 因此还需要进一步细化研究, 以便寻找最佳的产业化方案。

### 参考文献:

- [1]俞俊棠, 唐孝宣等, 新编生物工艺学。北京: 化学工业出版社, 2003.6
- [2]刘国诠等编, 生物工程下游技术。北京: 化学工业出版社, 1993.7
- [3]郑桂花, 酶促高效转化 B-羟基丙氨酸过程优化及其生命周期评价。武汉: 华中科技大学, 2016.1

### 作者简介:

王超彪 (1992-), 男, 河北邢台人, 精品药业股份有限公司研发技术人员, 主要从事于化学合成及生物酶转化技术研究。