水性二相分配法と PEG 分画沈殿法を組み合わせた β -galactosidase の分離精製プロセス[†]

久保井亮一^{††}・山原克仁

大阪大学大学院基礎工学研究科 化学系専攻, 560 豊中市待兼山町 1-3

タンパク質の表面特性の相違に基づき、水性二相分配法と PEG 分画沈殿法の組み合わせによる、大腸菌 (W3110 株)からの目的細胞質酵素 β -galactosidase のシンプルかつ効率的な分離プロセスを構築した。使用した水性二相分配系において β -galactosidase は PEG 相(上相)に分配する。回収した上相に塩を添加していくことによって β -galactosidase と他の共存全タンパク質の溶解度を制御し、PEG 分画沈殿を行うことで β -galactosidase を選択的かつ高収率で回収することができた。

緒 言

大腸菌等が生産する細胞質酵素、 β -galactosidase は、構造・活性を始めとして、破碎・放出特性 (Garrido *et al.*, 1994; Kuboi *et al.*, 1995a)、生産・分離 (Kuboi *et al.*, 1995b)、変性・安定性 (Nguyen *et al.*, 1989; Pinto *et al.*, 1991; Muga *et al.*, 1993; Yoshioka *et al.*, 1994; Ayling and Baneyx, 1996) 等、物理化学的・生物工学的に数多くの研究がなされている。従来の精製法としては、アルコール沈澱法や硫酸塩析法などの沈澱法と各種クロマトグラフィーを組み合わせた方法等が挙げられるが (Distler and Jourdian, 1978; Berg *et al.*, 1980; Rodriguez-Berrocal *et al.*, 1988)、これらの方法は必ずしも簡便な分離精製法とはいえず、操作が何段階にもおよぶためタンパク質を変性させやすい、大量生産(スケールアップ)が困難である等の問題点も多い。

一方、2 種類の水溶性ポリマー、または水溶性ポリマーと塩によって自発的に形成される水性二相分配系は、経済的であり、また、親水性ポリマーによる酵素の安定化効果や、微生物に穏和な環境で操作できるなどの特徴を持ち、生体高分子の分離場、反応場としての利用のみならずそれらの持つ種々の特性の解析場としても利用されている (Shanbhag and Axelsson, 1975; Yano *et al.*, 1994)。従って、水性二相系を用いてタンパク質の表面特性の解析を行い、それに基づき各種表面特性を合理的に制御することによって目的タンパク質の効率的な分離が可能となる。また、水性二相系で菌体の培養・破碎・目的酵素の分配を複合させることにより、従来のタンパク質分離プロセスにおける固液分離操作を省略でき、プロセスの簡略化をはかることができる (Kuboi *et al.*, 1995b)。さらに、水性二相系抽出培養や遺伝子組み替えによる β -galactosidase の疎水性変化を利用する分離についてもすでに報告されている (Enfors *et al.*, 1990; Kohler *et al.*, 1991; Kuboi *et al.*, 1995b)。

以上いずれの場合にも問題となるのが操作の簡便性であり、後者の場合には使用したポリマーの回収・再利用と精製度の改善である。これらの問題点を考慮して、我々は先にポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (Dex) からなる水性二相分配系 (PEG/Dex 系) における抽出分離と PEG 分画沈殿法における濃縮・精製を組み合わせる複合法によって、大腸菌が生産するヒ-

トショックタンパク質である GroEL と GroES をシンプルかつ効率的に分離・精製するプロセスについて報告した (Kuboi *et al.*, 1995c)。この複合法は、従来の精製法に比べて操作が非常に簡便であり、かつ目的タンパク質を大量に分離、濃縮、精製できることから従来法にはない多くの利点を有していると考えられる。

本研究では、上記の複合法の汎用性を示すため、従来の精製法では操作が複雑で大量生産が困難であった β -galactosidase をモデルタンパク質として用いた。また、水性二相分配法に加えて PEG 分画沈澱挙動を支配する β -galactosidase および他の共存全タンパク質の各種特性評価を行い、その結果に基づきこの二つの方法を組み合わせたシンプルかつ効率的な β -galactosidase の分離プロセスの構築について検討を行った。

1. 実 験

1.1 試 薬

β -galactosidase は大腸菌 w 3110 株を M9 培地で培養し生産させた。この菌種に関する詳細および β -galactosidase の生産方法は前報で述べたとおりである (Kuboi *et al.*, 1995 a)。ポリエチレングリコール (PEG) 1540, 4 K, 6 K (分子量 (*M. W.*) = 1.5 k, 3 k, 7.5 k) およびデキストラン (Dex) 100 K~200 K (*M. W.* = 100 k~200 k) は和光純薬工業 (株) 製のものを用いた。その他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

1.2 操 作

1) タンパク質粗抽出液の調製 大腸菌 W 3110 株を 30°C で 3 l の M9 培地を用いて培養した後 (菌体濃度; 濁度 OD_{600} = 1.2)、遠心分離 (4°C, 6,700×g) して菌体を分離回収した。得られた菌体を 50 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH = 7.5) に再懸濁し (OD_{600} = 120)、超音波破碎 (80 W, 10 min×3 回) により細胞内タンパク質を放出させた後、遠心分離 (4°C, 15,000×g) して上澄みを回収した。目的タンパク質 β -galactosidase および他の共存全タンパク質を含んだこの回収液をタンパク質粗抽出液として以後の分離に用いた。このタンパク質粗抽出液のタンパク質濃度は 41.9 mg/ml であった。

2) タンパク質の分配 水性二相分配系には PEG/Dex 系を用いた。通常の標準分配系を用いて、 β -galactosidase および他の共存全タンパク質の表面特性の解析を行った。タンパク質の表面特性は水性二相分配法により求めた表面全体の疎水性 (*HFS*)、局所的疎水性 (*LH*)、分子量 (*M. W.*)、等電点 (*pI*) を用いて評価した。上記の解析に使用する水性二相分配系の調製法およびタン

[†] 1997 年 5 月 8 日受理

^{††} kuboi@cheng.es.osaka-u.ac.jp

Fig. 1 Process scheme consisting of aqueous two-phase partitioning and PEG fractional precipitation

パク質の表面特性の解析法は前報で述べたとおりである (Yano *et al.*, 1994).

タンパク質の分配実験では、任意の水性二相系 800 g に対して、タンパク質粗抽出液 20 ml を添加し、 β -galactosidase の抽出・分離を行った (method (1)). 一方、一部タンパク質粗抽出液の調製を省略する方法についても検討した。培養した菌体 ($OD_{660}=1.6$) を遠心分離 (4°C , $6,700\times g$) し、50 mM の Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH}=7.5$) に再懸濁した後 ($OD_{660}=100$)、この溶液 20 ml を上記の水性二相系 800 g に直接添加し二相系で破碎・抽出する方法についても検討を行った (method (2)). 使用した水性二相系はすべて 10 mM の Tris-HCl 緩衝液と 2 mM の MgSO_4 を含み (10 mM TM-buf.), pH は 8.0 である。

3) PEG 分画沈澱法 β -galactosidase および他の共存全タンパク質を含んだ水性二相系の上相を PEG 分画沈澱による分離を行う初期溶液 1 (520 g) として用いた。また、PEG 分画沈澱における解析を行うために、タンパク質粗抽出液 (PEG 濃度=0%) を初期溶液 2 として用いた。これらの初期溶液あるいは初期溶液に各種の塩 (NaCl , Na_2SO_4 , KPi) を添加した溶液に PEG 4 K を段階的に添加していくことにより PEG 分画沈澱を行った。初期溶液 1 の PEG 濃度は約 13% であり、分画は PEG 濃度 13%~35% の範囲で行った。また、初期溶液 2 の PEG 濃度は 0% であり、分画は PEG 濃度 0%~35% の範囲で行った。PEG 分画沈澱法の詳細については前報で述べたとおりである (Kuboi *et al.*, 1995 c). 水性二相分画法と PEG 分画沈澱法を組み合わせた分離プロセスのスキームを Fig. 1 に示す。

4) タンパク質の定量 全タンパク質の定量は Bradford 法 (Bradford, 1976) を用いて行った。 β -galactosidase の活性は基質 *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (*o*-NPG) の加水分解反応により紫外可視分光光度計 ((株) 島津製作所, U. V.-160) を用いて 420 nm の吸光度変化から測定した (Kuboi *et al.*, 1995 a). 各条件、各相における β -galactosidase の純度は比活性を用いて評価した。

Fig. 2 Partition behavior of β -galactosidase and total soluble proteins in PEG/Dex system.

Fig. 3 Surface properties of β -galactosidase and total soluble proteins

2. 結果および考察

2.1 タンパク質の表面特性の解析およびそれらを利用した β -galactosidase の分離

まず最初に分離をより効率的に行うために β -galactosidase と共存全タンパク質の分配挙動および表面特性を水性二相分画法を用いて定量的に評価し (Kuboi *et al.*, 1991 a, 1991 b; Yano *et al.*, 1994), 両者の相違について検討した。Fig. 2 に両者の分配挙動を、Fig. 3 に表面特性をそれぞれ示す。図中の共存全タンパク質の特性は、破碎液中に含まれる共存全タンパク質の平均特性を表している。ここで、共存全タンパク質の平均的な等電点は水性二相系を用いた cross partition 法により決定した。大腸菌が生産する β -galactosidase は分子量が 116 kDa のサブユニット 4 つで構成される 4 量体タンパク質であり、分子量 (平均分子量) の小さい共存全タンパク質と比較すると分子量の大きなタンパク質に一般的に見られるように (Yano *et al.*, 1994), 非常に親水的 (HFS が小さい) な表面を持つことがわかる。一方、局所的疎水性 (LH) は β -galactosidase の方が大きく、また等電点はほぼ等しい。これらのことから水性二相系の疎水性 (HF) ないし Triton X との疎水性相互作用を用いた分離の方が静電的相互作用を利用した分離より効果的であると予想される。

水性二相系におけるタンパク質の分配係数 (K_{pr}) は、疎水、静電、塩効果を考慮して式 (1) のように表わされる。

$$\ln K_{pr} = \ln K_{nphob.} + \ln K_{el.} + \ln K_{salt} \quad (1)$$

本実験のような低塩濃度条件下では、式 (1) 中の右辺第 3 項 (塩効果) は無視できるが、 $\text{pH}=8.0$ の条件下で実験を行っているため

右辺第2項, すなわち静電的な効果の項は無視できない(Kuboi *et al.*, 1990, 1991 a, 1991 b). 従って, K_{pr} は二相系の疎水性(HF)とタンパク質の表面疎水性(HFS)の積として式(2)で関連できる(Kuboi *et al.*, 1993).

$$\ln K_{pr} = HFS \times HF + \ln K_{el} \quad (2)$$

よって, β -galactosidase および共存全タンパク質双方の分配系数はそれぞれ次式(3 a), (3 b)のように関連できた.

$$\ln K_{\beta-gal} = -444 \times HF + 6.29 \quad (3 a)$$

$$\ln K_{pr} = -192 \times HF + 0.709 \quad (3 b)$$

これより, β -galactosidase を上相に分配させ, かつ共存全タンパク質は下相分配になるような水性二相系は, HF の値が 0.01 mol/kJ 付近の系と推測される. HFS の測定に使用する標準分配系(系1, $HF=0.0126$)は, Fig. 2 からわかるようにほぼこの条件を満たしており, また, 上下相の体積比も2程度と大きいため収率の面からも妥当と考えられる. そこで以下では, 水性二相系の分離場として系1を選択した.

系1; PEG 4 K(9%)/Dex 100 K~200 K(9%) ($HF=0.0126$, 上下相体積比……PEG相:Dex相=2:1)

また, Triton X との疎水性相互作用を利用した分離を行う系としては, LH の測定に使用する標準分配系(系2)を分離場として選択した.

系2; PEG 4 K(9%)/Dex 100 K~200 K(9%) + 1 mM Triton X-405 ($HF=0.0126$, PEG相:Dex相=2:1)

先ず系1に対して, タンパク質粗抽出液を添加した時(method (1)), β -galactosidase の分配系数は 4.0 であり, 上相における活性収率は約 66%, 比活性は 13.4 U/mg であった. PEG/リン酸塩系等の水性二相系を用いれば菌体粗抽出液から β -galactosidase を高収率(80%以上)で抽出することは可能であるが, 同時に共存全タンパク質も抽出されるため選択性は低下する(Enfors *et al.*, 1990; Kohler *et al.*, 1991). また, 水性二相系で破碎・抽出を行った場合(method (2)), 下相に分配する細胞残渣の影響を受け, β -galactosidase の見かけの分配系数は大きく低下し, 活性収率は約 7%, 比活性は 4.61 U/mg であった.

一方, 系2に関しては β -galactosidase のほとんどを PEG 相に回収することが可能であったが, 同時に共存全タンパク質の分配系数も 50% 程度増加し純度(比活性)は 1/3 程度にまで減少した. そこで以下の PEG 分画沈澱では分配系1を採用し, 相分離によって PEG 相を回収した後(初期溶液1), これを PEG 分画沈澱による分離に用いた.

2.2 PEG 分画沈澱におけるタンパク質の沈澱特性

PEG 分画沈澱を用いて目的タンパク質の分離・濃縮を効率的に行うためには, 目的タンパク質およびその他の不純物の沈澱特性を知り, それを合理的に制御する必要がある. 一般に, 特定の PEG 濃度範囲において, タンパク質の溶解度の対数値と PEG 濃度の間には以下の式(4)のような直線関係が成立する(Ingham, 1978; Thrash *et al.*, 1991).

$$\ln C_{pr} = \beta \times S + C_{pr,0} \quad (4)$$

(C_{pr} : タンパク質の溶解度 [mg/ml], S : 沈澱剤(PEG)濃度 [wt %], $C_{pr,0}$: $S=0$ におけるタンパク質の溶解度)

式(4)から, β -galactosidase および共存全タンパク質の溶解度の差は次式(5)のように表され, これに基づいて分離の最適系の設計が可能であると考えられる.

$$\ln(C_{pr}/C_{\beta-gal}) = (\beta_{pr} - \beta_{\beta-gal})S + C_{pr,0} - C_{\beta-gal,0} \quad (5)$$

共存全タンパク質および β -galactosidase の溶解度曲線の勾配

Fig. 4 Solubility curve for β -galactosidase and total soluble proteins

β_{pr} , $\beta_{\beta-gal}$ の差が大きければ大きいほど, 共存全タンパク質より β -galactosidase の方が早く沈澱してくると思われる.

Fig. 4 に PEG 分画沈澱における β -galactosidase と共存全タンパク質の沈澱特性を示した. β -galactosidase を選択的に沈澱させるためには, 共存全タンパク質に比べて β -galactosidase に対する勾配 β の値が小さくしなければならない. しかし, Fig. 4 から β -galactosidase より共存全タンパク質のほうが勾配 β の値が小さく(沈澱しやすく), この時の両者の勾配 β の差は -0.0540 であった. この結果, このまま分離を行った場合, β -galactosidase の比活性は二相系の上相の段階よりも大きく低下した. 従って, β -galactosidase を効率よく分離・濃縮するためには β -galactosidase と他の共存全タンパク質の勾配 β の相対値を逆転させ, かつ両者の勾配 β の差が最大となるような系を設計する必要がある.

一般に各種の塩の添加は静電的・疎水的な効果によってタンパク質の溶解度を変化させることが知られており(Thrash *et al.*, 1991), これを利用することによってタンパク質の沈澱挙動を制御できると考えられる. また, 水性二相分配系で測定したタンパク質の表面疎水性(HFS)と PEG 沈澱における勾配 β との間には相関関係があること(Kuboi *et al.*, 1995 d), 塩(NaCl)によるタンパク質の表面疎水性(HFS)の増加はタンパク質の分子量の 2/3 乗に比例して大きくなることをすでに報告している(Kuboi *et al.*, 1991 a). 従って, 各種の塩の添加により分子量の大きい β -galactosidase の HFS は平均分子量の小さい共存全タンパク質のそれよりも大きく変化すると予想され, その結果, 両者の勾配 β の相対値を逆転させた分離の最適系を設計できると考えられる. そこで次に水性二相分配系において β -galactosidase の表面疎水性(HFS)および分配挙動を大きく変化させることがわかっている NaCl, Na_2SO_4 , KPi をそれぞれ添加し(Kuboi *et al.*, 1995 b), 勾配 β の値を制御することによる最適系の設計を試みた.

上記の3種の塩に関して, それぞれ濃度を変化させて添加効果を調べた結果, NaCl を除く2種類の塩はいずれも測定した濃度範囲(0.05 M~0.2 M)においては β -galactosidase, 共存全タンパク質双方の溶解度を増加させ, β -galactosidase のみを選択的に沈澱させることはできなかった.

一方, NaCl 添加系に関して, Fig. 5 に β -galactosidase および共存全タンパク質の勾配 β に対する NaCl 濃度の効果を, Fig. 6 に NaCl 1 M 添加時における各 PEG 濃度での両者の溶解度の変化(Fig. 6(a)), および回収した β -galactosidase の比活性(Fig. 6(b))をそれぞれ示す. Fig. 5 に示すように NaCl 添加系においては, NaCl 1 M 添加時に共存全タンパク質と比較して β -

Table 1 The results of the purification of β -galactosidase by using aqueous two-phase partitioning combined with PEG fractional precipitation

		* ¹ Method (1)			* ² Method (2)		
		*C _{pr} [mg/ml]	T.A. [U]	S.A. [U/mg]	*C _{pr} [mg/ml]	T.A. [U]	S.A. [U/mg]
# ATPS	Crude Extract	41.9	3,023	3.61	—	—	—
	PEG Phase	0.414	1,992	13.4	0.113	185.4	4.61
	Dex Phase	2.29	432	0.782	3.98	2,744	3.08
+PEG F. P.	20wt%	19.4	941	24.3	2.87	109.8	27.3
	25wt%	24.7	777.3	26.2	7.87	58.8	7.47
(PEG concentration)							

* C_{pr}=Total Soluble Proteins Concentration [mg/ml] T.A.=Total Activity of β -Galactosidase [U]

S.A.=Specific Activity of β -Galactosidase [U/mg]

* ATPS=Aqueous Two-Phase System.

+ PEG F.P.=PEG Fractional Precipitation.

*¹ Method (1): Crude extract were added to the aqueous two-phase system.

*² Method (2): Harvested cells were directly added to the aqueous two-phase system followed by disruption and extraction.

Fig. 5 Variation of slope β with the addition of NaCl

galactosidaseのみ勾配 β の値が負に大きくなり、両者の勾配 β の値の差は0.132と最大値をとることがわかった。従って、このNaCl 1 M添加系が分離の最適系であると考えられる。また、Fig. 6(b)からNaCl 1 M添加時の回収 β -galactosidaseの純度(比活性)はPEG濃度が20%~25%で極大値をとりその後減少することがわかった。これは、溶解していた β -galactosidaseの90%以上がPEG濃度25%以下の画分で沈殿するのに対して、これ以上の濃度では共存全タンパク質の沈殿が増加するためである。従って、20~25%が最適PEG濃度範囲であることが示された。

一方、測定した濃度範囲において、各塩添加による β -galactosidaseの顕著な活性低下は見られなかった。このような塩の種類によるタンパク質の沈殿挙動の相違の原因は必ずしも明確ではないが、塩がタンパク質の表面特性や安定性に及ぼす効果の相違を反映しているものと思われる(Yoshioka *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994)。

2.3 水性二相分配法とPEG分画沈殿の複合プロセス

以上の結果より、水性二相分配法とPEG分画沈殿法を組み合わせた β -galactosidaseの選択的分離プロセスを以下のように設計した。

(1) 水性二相分配系(系1) PEG 4 K(9%)/Dex 100 K~200 K(9%); $HF=0.0126$, 上下相体積比……PEG相:Dex相=2:1

(2) PEG分画沈殿条件 系1のPEG相+1 M NaCl, PEG濃度13%~35%までを20, 25, 30, 35%の画分に分画する。

実験は、プロセスの初期の段階においてタンパク質粗抽出液を水性二相系に添加する方法(method(1))と菌体を水性二相系で破壊、抽出する方法(method(2))の二つの方法について検討を行っ

Fig. 6 (a) Solubility curve for β -galactosidase and total soluble proteins at the addition of 1 M NaCl (solid line —), without NaCl for β -galactosidase (dashed line ----) and for total soluble proteins (dotted line)
(b) Variation of the specific activity of β -galactosidase in the precipitates with PEG concentration

た。プロセス中の各段階における全タンパク質濃度、 β -galactosidaseの全活性および比活性をTable 1にそれぞれ示す。Method(1)について、Table 1に示したようにこの複合分離プロセスによって β -galactosidaseの純度はタンパク質粗抽出液中の比活性(3.61 U/mg)と比較すると、第一段の水性二相分配系において約4倍(13.4 U/mg)に、第二段のPEG分画沈殿によってさらに約2倍に精製でき、最終比活性は26.2 U/mgとなった。また、 β -galactosidaseの活性収率は、PEG濃度が20%と25%の画分を併せると約60%(初期の3,000 Uに対して1,700 U)であり、同時に初期濃度に対して約4倍(24.7 mg/ml)に濃縮できた。ここで得られた比活性(26.2 U/mg)は、本法と同一の活性測定法で主な市販品と比較した場合、約80%(Sigma社, G 6008, 34 U/mg)から150%((株)和光純薬, 305-50831, 18 U/mg)に相当する。一方、method(2)では最終的にmethod(1)と同程度の比活性(27.3 U/mg)が得られたが、活性収率および濃縮度はmethod(1)と比較すると、それぞれ約10%, 20%程度であった。

結 言

大腸菌が生産する細胞質酵素 β -galactosidaseの選択的分離プロセスの設計について検討し、以下の結論を得た。

1. 水性二相分配法とPEG分画沈殿法を用いて大腸菌 w 3110

株に含まれる目的タンパク質 β -galactosidase および共存全タンパク質の表面特性の差違を明らかにした。

2. 両者の特性の差違に基づき、上記の2つの方法を組み合わせた最適系の設計を行うことで、 β -galactosidase を選択的かつ高収率で回収・濃縮するシンプルで効率的な分離プロセスを構築した。

Nomenclature

C_{pr} = total soluble proteins concentration	[mg/ml]
$C_{pr,0}$ = initial concentration of total soluble proteins	[mg/ml]
$C_{\beta-gal}$ = concentration of β -galactosidase	[mg/ml]
$C_{\beta-gal,0}$ = initial concentration of β -galactosidase	[mg/ml]
HF = hydrophobic factor of two-phase system	[mol/kJ]
HFS = surface net hydrophobicity of protein	[kJ/mol]
K_{pr} = partition coefficient of protein in PEG/Dex system	[-]
$K_{phob.}$ = partition coefficient of protein due to hydrophobic effect	[-]
$K_{el.}$ = partition coefficient of protein due to electrostatic effect	[-]
K_{salt} = partition coefficient of protein due to salt effect	[-]
LH = local hydrophobicity of protein	[-]
$M. W.$ = molecular weight	[Da]
OD_{660} = optical density of <i>E. coli</i> cells at the absorbance of 660 nm	[-]
pI = isoelectric point	[-]
β = the slope of the solubility curve of proteins	[-]

Literature cited

- Ayling, A. and F. Baneyx; "Influence of the GroE Molecular Chaperone Machine on the *in vitro* Refolding of *Escherichia coli* Beta-Galactosidase," *Protein Sci.*, **5**, 478-487 (1996)
- Berg, J.-O., L. Lindqvist and C. E. Nord; "Purification of Glycoside Hydrolases from *Bacteroides fragilis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 40-47 (1980)
- Bradford, M. M.; "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
- Distler, B. J. J. and G. W. Jourdan; " β -Galactosidase from Bovine Testes," *Methods Enzymol.*, **50**, 514-520 (1978)
- Enfors, S., K. Kohler and A. Veide; "Combined Use of Extraction and Genetic Engineering for Protein Purification: Recovery of β -Galactosidase Fused Proteins," *Bioseparation*, **1**, 305-310 (1990)
- Garrido, F., U. C. Banerjee, Y. Chisti and M. Moo-Young; "Disruption of a Recombinant Yeast for the Release of β -Galactosidase," *Bioseparation*, **4**, 319-328 (1994)
- Ingham, K. C.; "Precipitation of Proteins with Polyethylene Glycol: Characterization of Albumin," *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 106-113 (1978)
- Kohler, K., A. Veide and S. Enfors; "Partitioning of β -Galactosidase Fusion Proteins in PEG/Potassium Phosphate Aqueous Two-Phase Systems," *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 204-209 (1991)
- Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasa; "Effect of Salt Addition on the Hydrophobicities of Aqueous Two-Phase Extraction System," *Kagaku Kagaku Ronbunshu*, **16**, 1053-1059 (1990)
- Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasa; "Effect of Salt Addition on the Hydrophobicities of the Systems and Proteins in Aqueous Two-Phase Extraction Systems," *Kagaku Kagaku Ronbunshu*, **17**, 67-74 (1991 a)
- Kuboi, R., H. Tanaka and I. Komasa; "Separation of Proteins by Hydrophobic Salt and/or Electrostatic Effect in Aqueous Two-Phase Extraction Systems," *Kagaku Kagaku Ronbunshu*, **17**, 75-80 (1991 b)
- Kuboi, R., K. Yano, H. Tanaka and I. Komasa; "Evaluation of Surface Hydrophobicities of Proteins Using Hydrophobic Interaction with Non-ionic Surfactants in Aqueous Two-phase Partitioning Systems," *Kagaku Kagaku Ronbunshu*, **19**, 446-454 (1993)
- Kuboi, R., H. Umakoshi, N. Takagi and I. Komasa; "Optimal Disruption Methods for the Selective Recovery of β -Galactosidase from *Escherichia coli*," *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 335-341 (1995 a)
- Kuboi, R., H. Umakoshi and I. Komasa; "Extractive Cultivation of *Escherichia coli* Using Poly (ethylene glycol)/Phosphate Aqueous Two-Phase Systems To Produce Intercellular β -Galactosidase," *Biotechnol. Prog.*, **11**, 202-207 (1995 b)
- Kuboi, R., T. Hasegawa, K. Yano and I. Komasa; "Purification Process for Heat Shock Proteins Using Aqueous Two-Phase System and PEG Fractional Precipitation," *J. Chem. Eng. Japan*, **28**, 797-802 (1995 c)
- Kuboi, R., T. Hasegawa, M. Nomoto, K. Yano and I. Komasa; "Control of Proteins Precipitation Based on their Surface Hydrophobicities," *Chem. Eng. Symp. Ser.*, **49**, 158-161 (1995 d)
- Muga, A., J. L. R. Arrondo, T. Bellon, J. Sancho and C. Bernabeu; "Structural and Functional Studies on the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with β -galactosidase," *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 451-457 (1993)
- Nguyen, V. T., M. Morange and O. Bensaude; "Protein Denaturation during Heat Shock and Related Stress," *J. Biol. Chem.*, **264**, 10487-10492 (1989)
- Pinto, M., M. Morange and O. Bensaude; "Denaturation of Proteins during Heat Shock," *J. Biol. Chem.*, **266**, 13941-13946 (1991)
- Rodriguez-Berrolcal, F. J., M. P. de la Cadena, J. A. Cabezas and N. Perez-Gonzalez; "Purification and Characterization of Acid β -D-Galactosidase from Rabbit Spleen," *J. Biochem.*, **104**, 66-71 (1988)
- Shanbhag, V. P. and C.-G. Axelsson; "Hydrophobic Interaction Determined by Partition in Aqueous Two-phase Systems," *Eur. J. Biochem.*, **60**, 17-22 (1975)
- Thrash, S. L., J. C. Otto, Jr. and T. L. Deits; "Effect of Divalent Ions on Protein Precipitation with Polyethylene Glycol: Mechanism of Action and Applications," *Protein expression and purification*, **2**, 83-89 (1991)
- Yang, S.-T., J. L. Marchio and J.-W. Yen; "A Dynamic Light Scattering Study of β -Galactosidase: Environmental Effects on Protein Conformation and Enzyme Activity," *Biotechnol. Prog.*, **10**, 525-531 (1994)
- Yano, K., T. Hasegawa, R. Kuboi, I. Komasa and T. Tsuchido; "Characterization of Surface Properties of Heat Shock Proteins for the Separation Using Aqueous Two-Phase Systems," *J. Chem. Eng. Japan*, **27**, 808-814 (1994)
- Yoshioka, S., Y. Aso, K. Izutsu and T. Terao; "The Effect of Salts on the Stability of β -Galactosidase in Aqueous Solution, as Related to the Water Mobility," *Pharm. Res.*, **10**, 1484-1487 (1993)
- Yoshioka, S., Y. Aso, K. Izutsu and T. Terao; "Is Stability Prediction Possible for Protein Drugs? Denaturation Kinetics of β -Galactosidase in Solution," *Pharm. Res.*, **11**, 1721-1725 (1994)

Purification Process for β -Galactosidase Using Aqueous Two-Phase Partitioning and PEG Fractional Precipitation

RYOICHI KUBOI and KATSUHITO YAMAHARA

Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka 560

Key words: β -Galactosidase, aqueous two-phase, partitioning, PEG fractional precipitation, purification.

Combining aqueous two-phase partitioning and PEG fractional precipitation, a simple and effective purification process for the target intra-cellular enzyme β -galactosidase (β -gal) from *E. coli* (W 3110) cells was developed based on the evaluated differences between surface properties of β -gal and those of other total soluble proteins. β -gal was partitioned to the PEG rich top phase of the used aqueous two-phase system and finally recovered at high selectivity and yield with the following PEG fractional precipitation mediated by the addition of salt to the separated top phase.

~~~~~