

反胶团萃取蛋白质的研究

史红勤 雷夏 郭荣 沈忠耀

(清华大学化学工程系, 北京)

本文以溶菌酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶为对象, 研究了水相 pH 值, 离子强度、阳离子种类和蛋白质分子量等因素对反胶团萃取蛋白质的影响。结果表明, 反胶团萃取的单级萃取率高, 调节 pH 值和离子强度等工艺条件, 就可以实现不同种类蛋白质的有效分离, 可望成为一种生物产品分离的新方法。

关键词 反胶团萃取; 蛋白质分离

反胶团是表面活性剂在有机溶剂中形成的一种聚集集体, 如图 1 所示。表面活性剂的非极性尾与有机溶剂接触, 而极性头则在内部, 形成极性核, 此核具有溶解极性物质的能力。当极性核内溶有水时, 就形成了“水池”。含有此种反胶团的有机溶剂与含有蛋白质的水溶液接触时, 由于反胶团的内表面与蛋白质表面间的相互作用, 蛋白质就会从水相进入有机相中的反胶团, 从而实现了蛋白质的萃取。因蛋白

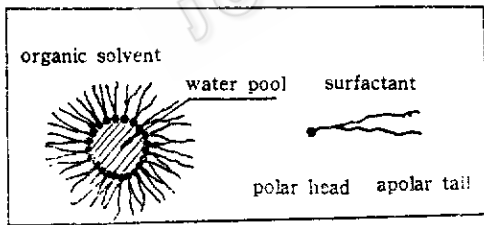


图 1 反胶团的结构

Fig.1 The structure of reverse micelle

质是在反胶团的“水池”中, 在蛋白质的外表面有一层“水壳”和一层极性头的保护, 而使蛋白质不与有机溶剂直接接触, 所以蛋白质不会变性。改变水相的 pH 值和盐浓度等条件, 又可以使蛋白质由有机相重新回到水相, 从而实现反萃过程^[1]。

对反胶团萃取蛋白质的研究是荷兰的 Van't Riet 和 Dekker^[2]、美国的 Göklen

和 Halton^[3] 在 1984 年首先进行的。但在此以前已有人进行了反胶团中酶的催化动力学研究, 并且在 1979 年瑞士的 Luisi^[4] 已进行了将蛋白质从水相传入有机相, 再从有机相传入另一水相的研究。近年来, 这些研究小组都对反胶团萃取进行了深入的研究^[5-8]。

从这些研究结果看, 反胶团萃取具有成本低, 溶剂可反复使用, 萃取率和反萃率都很高等突出的优点。反胶团萃取还有可能解决外源蛋白的降解问题, 即蛋白质(胞内酶)在非细胞环境中迅速失活的问题, 这是因为反胶团内的环境接近细胞内的环境。构成反胶团的表面活性剂往往具有溶解细胞的能力, 现已有人用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 和正己醇构成的反胶团直接从整细胞中提取酶^[9]。

本文在 Göklen 和 Luisi 的研究基础上, 研究了 pH 值、离子强度、蛋白质的分子量和阳离子的种类对萃取的影响, 考察了反萃取和酶的失活情况。

材料和 方法

(一) 材料

本研究为国家自然科学基金资助项目。
本文于 1988 年 7 月 14 日收到。

1. 表面活性剂：实验所用表面活性剂为气溶胶-OT, 简称为AOT, 学名为丁二酸-二-2-己基-己基脂磺酸钠。市售商品为浅黄色的蜡状物, 含有杂质, 直接用于萃取时, 分相情况不好, 必须先提纯。按文献(10)的方法提纯后, 达到了所规定的标准。

2. 蛋白质：实验所用的蛋白质为三种酶：溶菌酶（中国科学院生物物理所生产）、胰蛋白酶（中国科学院东方仪器公司生化部产品）和胃蛋白酶（中国科学院生物物理所生产）。

实验所用的其他试剂均为市售, 纯度为分析纯, 水为去离子水。

(二) 实验方法

本文实验综合了Göklen^[6]和Luisi^[8]方法的优点, 克服了Göklen法在烧杯中操作、溶剂易于挥发和 Luisi 法中萃取平衡时间长的不足。萃取实验是在 10ml 带塞的离心试管中进行的。配制好浓度为 1mg/ml 的蛋白质水溶液, 并使溶液的盐浓度和 pH 值为一定值。配制好 50mmol/L 的 AOT/异辛烷溶液, 作为萃取剂。将 5ml 蛋白质水溶液和 5ml 有机相加入试管中, 在液体快速混合器上振荡 2min。实验表明, 此时已达萃取平衡。然后在 3500r/min 下离心 15min, 使液体分相。两相分别取样, 用紫外分光光度计测定有机相和水相在 280nm 处的吸光度 A_o 和 A_w , 按下式计算蛋白质的萃取率 R%:

$$R\% = \frac{A_o V_o}{A_o V_o + A_w V_w} \quad (1)$$

其中 V_o 和 V_w 分别为有机相和水相的体积, 在本文实验中 $V_o/V_w = 1$ 。

反萃实验是将萃取了蛋白质的有机相 4ml 与 4ml 一定 pH 值和盐浓度的另一水相在 10ml 带塞离心试管中混合, 再在液体快速混合器上振荡 6min, 其余步骤同

萃取实验。

实验还用 Karl-Fisher 滴定法测定了有机相的含水量, 滴定在 CA-05 型库仑仪（日本三菱化成公司）上进行, 含水量以

$$W_o = [H_2O]/[AOT] \quad (2)$$

表示。式中 $[H_2O]$ 和 $[AOT]$ 分别表示有机相中水和 AOT 的摩尔浓度。

结果与讨论

(一) 水相 pH 值对蛋白质萃取率的影响

水相的 pH 值对蛋白质的萃取率影响甚大。溶菌酶, 胰蛋白酶和胃蛋白酶的萃取率与 pH 的关系见图 2。图中的 pH 值为达到萃取平衡后的水相的 pH 值, 其值与料液的 pH 值有所不同。

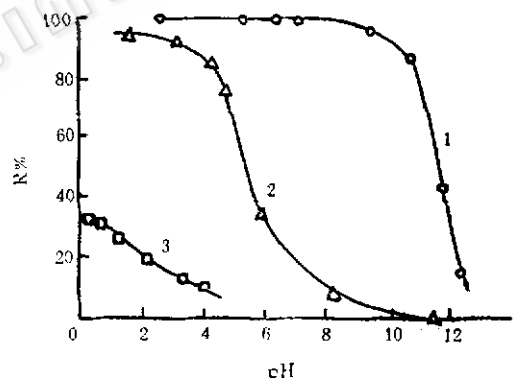


图 2 水相 pH 值对蛋白质萃取率的影响
Fig.2 The effect of pH value on the recovery of protein

1. 溶菌酶 lysozyme (KCl) = 0.1mol/L
2. 胰蛋白酶 trypsin (KCl) = 0.2mol/L
3. 胃蛋白酶 pepsin (KCl) = 0.1mol/L

由图 2 可知, 在 $pH < 9$ 时, 溶菌酶的萃取率接近 100%, 随着 pH 值的增大, 萃取率减小, 并在其等电点 ($pI = 11.1$) 附近急剧下降, 直至萃取率接近于零。这种变化趋势与 Göklen 等的研究结果一致^[6,7], 但他们的结果表明, 在 $pH < 7$ 时, 溶菌酶的萃取率亦下降, 并解释这是

因为酶在此低 pH 值下开始失活。在本文实验中, 无此现象。文献[11]也认为溶菌酶在 pH=2 时, 仍能保持活性。因此本文的萃取率不下降是合理的。这种数据上的不完全一致可能是由于实验方法及酶的生产厂家不完全相同所致。

pH 对萃取率的影响主要体现在改变蛋白质的表面电荷上^[6,7]。当 pH>pI 时, 蛋白质表面的净电荷为负值, 而 AOT 是一种阴离子表面活性剂, 它所形成的反胶团的内表面带负电荷, 蛋白质表面电荷与反胶团内表面电荷之间的排斥作用使蛋白质的萃取率几乎为零。在 pH<pI 时, 蛋白质表面带正电荷, 这时蛋白质表面与反胶团内表面之间的吸引力, 使蛋白质的萃取率几乎为 100%。

胰蛋白酶的萃取率随 pH 值的变化趋势与溶菌酶类似, 但其萃取率急剧变化的 pH 值在 5 附近, 与它的等电点 (pI=10.5) 不相符合。本文认为这可能是因胰蛋白酶在其活性最高区间 (pH=7—8) 时, 不稳定的缘故^[12]。

从图 2 还可以看到, 虽然胃蛋白酶的萃取率也随着 pH 值的增大而减小, 但变化比较平缓。而且一次萃取的最大萃取率只能达到 30% 左右。其原因尚不很清楚, 可能是蛋白质的大小在这里起着重要作用, 由于胃蛋白酶分子量大, 只能为反胶团中占一定比例的较大胶团所溶解。

(二) 盐浓度对蛋白质萃取的影响

水相中 KCl 浓度对三种酶的萃取率的影响见图 3。图中的 pH 值都固定在低于其萃取率下降时的 pH 值, 从而排除了 pH 值的影响。三种酶的萃取率都随 KCl 浓度的增大而逐渐减小, 但是萃取率开始明显下降的 KCl 的浓度不同。由此可见除了利用控制 pH 外, 还可以通过控制盐浓度实现各种蛋白质的分离。蛋白质萃取率开始下

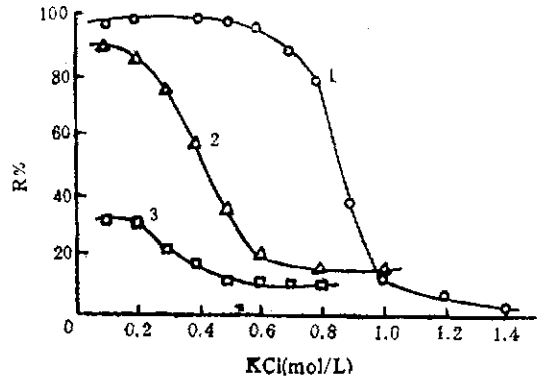


图 3 水相盐浓度对蛋白质萃取率的影响
Fig.3 The effect of salt concentration on the recovery of protein

1. 溶菌酶 lysozyme pH=7.0
2. 胰蛋白酶 trypsin pH=2.5
3. 胃蛋白酶 pepsin pH=0.5

降时的 KCl 浓度取决于蛋白质的大小、表面电荷分布及密度以及反胶团的大小及电性质。

盐浓度 (离子强度) 对蛋白质萃取率的影响来自两方面。一是离子强度增大时, 反胶团内表面的双电层变薄, 使蛋白质表面与反胶团内表面间的静电引力下降; 二是反胶团内表面的双电层变薄后, 也减小了表面活性剂极性头之间的斥力, 从而使反胶团变小。反胶团的大小正比于

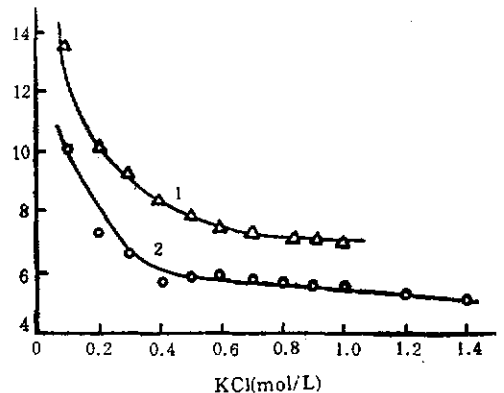


图 4 水相 KCl 浓度对反胶团含水量的影响
Fig.4 The effect of KCl concentration on Wo of reverse micelle

1. 含有溶菌酶的反胶团 The micelle containing lysozyme
2. 空反胶团 The unfilled reverse micelle

含水量 W 。^[6]。由图 4 可以看出 W 确实随 KCl 浓度的增大而减小。比较图 3 和图 4 中溶菌酶的曲线，可以发现在图 4 中，KCl 浓度大于 0.4 mol/L 后， W 变化很小，而在图 3 中，溶菌酶萃取率急剧下降的 KCl 浓度为 0.8 mol/L。因此，在上述的二种盐浓度的影响中，前者更为重要。

实验还发现，KCl 浓度 ≤ 0.05 mol/L 时，两相变得混浊。在 KCl 浓度较小，而蛋白质分子量又较大时，在两相的界面上有一层白色絮状沉淀，估计是 AOT 与蛋白质形成了絮凝物。所用的酶本身失活愈严重，界面上的白色絮凝物愈多。在 Van't Riet 的实验中^[6]，也有类似的现象出现。这是反胶团萃取中有待解决的问题。

(三) 蛋白质分子量对萃取率的影响

蛋白质的分子量对最大萃取率的影响见图 5。由图可知，蛋白质的分子量大于 30000 时，最大萃取率小于 50%，难以用反胶团进行有效的萃取分离。因此如何使反胶团变得足够大，使它能包住蛋白质，是反胶团萃取中有待解决的另一个重要课题。

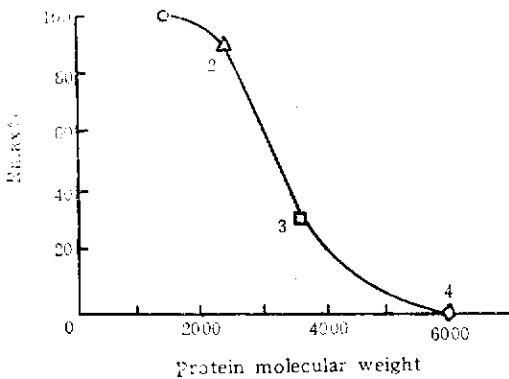


图 5 蛋白质分子量对萃取率的影响

Fig.5 The effect of protein molecular weight on the recovery of protein

- 1. 溶菌酶 lysozyme
- 2. 胰蛋白酶 trypsin
- 3. 胃蛋白酶 pepsin
- 4. 牛血清白蛋白 BSA [6]

(四) 阳离子种类对萃取率的影响

本文考察了 Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ 这四种阳离子对溶菌酶萃取的影响。

水相为 $MgCl_2$ 溶液时，在 0.1~1.0 mol/L 的浓度范围内，两相接触并离心分相后的水相混浊、粘稠，无法实现正常的萃取操作。水相为 NaCl 溶液时，分相也不好，界面上有不少悬浮物。水相为 KCl 或 $CaCl_2$ 溶液时，分相效果较好。

K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 这三种阳离子对溶菌酶萃取率的影响见图 6。由图可见，在 0.1—1.0 mol/L 的浓度范围内，溶菌酶的萃取率几乎不随 NaCl 和 $CaCl_2$ 的浓度而变，一直保持在 100%，即使在 $[NaCl] = 2.0$ mol/L 时， $R = 95.6\%$ ，但对 $CaCl_2$,

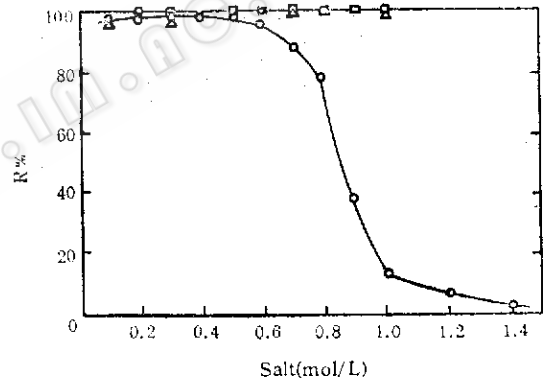


图 6 阳离子种类对溶菌酶萃取率的影响

Fig.6 The effect of cation type on the recovery of lysozyme

- KCl
- NaCl
- △ $CaCl_2$ pH = 7.0

在 $[CaCl_2] = 2.0$ mol/L 时， $R = 64.3\%$ 。

阳离子种类对萃取率的影响主要体现在改变反胶团内表面的电荷密度上。通常反胶团中表面活性剂的极性头不是完全电离的，有很大一部分阳离子仍在胶团的内表面上（即所谓的 ion binding 或 counterion association）^[18]。极性头的电离程度愈大，反胶团内表面的电荷密度愈大，产生的反胶团也愈大。表面活性剂电离的程度与离子种类有关。表 1 为同一离子强度

表 1 阳离子种类对 W_0 的影响Table 1 The effect of cation type on the value of W_0 .

离子种类 Cation type	K^+	Ca^{2+}	Na^+	Mg^{2+}
离子强度 Ion strength	0.3	0.3	0.3	0.3
W_0	9.2	15.4	20.0	43.6

下的四种离子对反胶团的 W_0 的影响。由此可知, 极性头的电荷密度按 K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} 的顺序逐渐增大, 电离程度也相应地逐渐增大。

水相为 $MgCl_2$ 溶液时, 水相混浊, 不能很好地分相, 这可能是因为极性头的电荷密度太大, 以致有些 AOT 溶于水相, 形成乳状液。水相为 $NaCl$ 或 $CaCl_2$ 溶液时, 萃取率基本上不随盐浓度而变是因为 Na^+ 和 Ca^{2+} 存在时, 反胶团内表面的电荷密度较大, 以致在盐浓度较高时, 胶团的大小及胶团表面与蛋白质表面间的静电引力仍足够大, 足以使蛋白质仍能溶于反胶团中。

实验中观察到, 反胶团内表面的电荷密度愈大, 在相界面上形成的絮凝物愈多。

(五) 反萃以及蛋白质的变性

溶菌酶的反萃实验表明, 反萃速率比萃取速率慢。在萃取时, 两相接触混合

1.5min, 即可达到分配平衡, 而在反萃时, 需 5min 以上。在反萃实验中, 水相 pH = 12.0, $[KCl] = 1.0 \text{ mol/L}$, 接触混合时间为 6min 时, 反萃率达 99.6%。这说明只要反萃条件合适, 是能够达到定量回收蛋白质这一目的的。

为考察已萃入有机相和反萃回水相的蛋白质的变性情况, 本文用圆二色性仪测定了溶菌酶在萃取和反萃前后的圆二色性 (CD) 图谱, 并由此计算了 α -螺旋分率^[14]。四种样品的 α -螺旋分率见表 2。由表 2 可知, 料液中, 有机相中及反萃水相中的溶菌酶的 α -螺旋分率变化很小。

从以上的结果可以看到, 反胶团萃取蛋白质具有单级萃取率高, 调节工艺条件易于实现各种蛋白质分离的特点, 可望发展成为一种生物产品分离的新方法。但反胶团萃取的机理比较复杂, 尚不很清楚, 有待进一步深入研究。

表 2 溶菌酶萃取前后的 α -螺旋分率Table 2 The fraction of α -helix before and after extraction

样品序号 Sample number	1	2	3	4
水相 pH pH value of aqueous phase	7.0	7.0	12.0	12.0
水相 $[KCl]$ mol/L (KCl) in aqueous phase	0.1	0.1	2.0	2.0
样品性质 Sample property	料液 (水相) feed (aqueous)	萃取相 (油相) extract phase (organic)	料液 feed (aqueous)	反萃相 (水相) stripping phase (aqueous)
α -螺旋分率 Fraction of α -helix	27.3	26.7	26.2	29.1

参 考 文 献

- [1] 史红勤等, 化工进展, (3):28, 1988.
- [2] Van't Riet, K. and Dekker, M.: Proc. 3rd European Congress on Biotechnology VCH, Weinheim, 1984, Vol. III, PP.541-544.
- [3] Göklen, K.E. and Hatton, T. A.: AICHE 1984 Annual Meeting, San Francisco, CA. Nov. 1984.
- [4] Luisi, P.L. et al.: *Helv. Chim. Acta*, 62:740, 1979.
- [5] Dekker, M. et al.: *Chem Eng. J.*, 33:B27, 1986.
- [6] Göklen, K. E. and Hatton, T.A.: Proc. ISEC'86, Munch, Sept. 1986.
- [7] Göklen, K. E. and Hatton, T. A.: *Sep. Sci. Tech.*, 22:831, 1987.
- [8] Leser, M. E. et al.: *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 135:629, 1986.
- [9] Giovenco, S. et al.: *Enzym, Microb. Technol.*, 8:470, 1987.
- [10] Luisi, P.L. et al.: *Reverse Micelles—Technological and Biological Relevance*, Plenum, New York, 1984.
- [11] 陶慰孙主编, 蛋白质分子基础, 高等教育出版社, P.242, 1981.
- [12] Colowick, S.P. and Kaplan, N. O.: *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, New York, P.32, 1955.
- [13] Akoum, F. and Parodi, O.: *J. Physique*, 46:1675, 1985.
- [14] 鲁子贤编, 蛋白质化学, 科学出版社, p.92, 1981.

THE EXTRACTION OF PROTEINS USING REVERSE MICELLE

Shi Hongqin Xia Lei Guo Rong Shen Zhongyao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing)

The liquid-liquid extraction of proteins using reversed micelle is a new method for protein separation. The effects of pH, ionic strength, cationic type and the molecular weight of protein on the extraction performances of lysozyme, trypsin and pepsin have been studied using AOT/isooctane reversed micelle system. It is shown that the extraction is very efficient for low molecular weight proteins.

Key words

Extraction; reverse micelle; protein separation