

TRPO-AOT 反胶团体系萃取牛血红蛋白的研究

严勇朝 刘会洲 陈家镛

(中国科学院化工冶金研究所分离科学与工程青年实验室 北京 100080)

反胶团是表面活性剂溶解在非极性溶剂中形成的、围绕一个“水核”的纳米级聚集体。液-液反胶团萃取蛋白质技术,因对目标物质选择性好、容量大和能保持其活性而得到广泛研究^[1~9]。在反胶团萃取蛋白质的研究中,多数作者采用单一表面活性剂 AOT^[2]或季胺盐^[3]的反胶团体系。两种体系的共同弱点是:体系受离子强度、pH 值等静电因素的影响大,直接影响萃取率,为了克服它们的不足,有人在 AOT 体系中加入亲试剂增强反胶团对蛋白质的亲和性^[4],加磷酸类阴离子表面活性剂^[5]、天然表面活性剂磷脂^[6]等以增强体系的萃取性能;有人在季胺盐的反胶团体系中加入非离子表面活性剂作助剂提高蛋白质的萃取率^[7],有人则把阴、阳和非离子表面活性剂混合形成反胶团提高某种酶的萃取容量^[8],本文用中性磷氧萃取剂三烷基氧膦(TRPO)与阴离子表面活性剂琥珀酸二辛酯磺酸钠(AOT)混合溶解在异辛烷中形成反胶团萃取牛血红蛋白(BHb),比较 AOT、TRPO 及 AOT 三体系对牛血红蛋白(BHb)的萃取性能。

1 材料及方法

1.1 材料

AOT 为美国 Fluka 产品,纯度>98%。TRPO(R 是 7~8 个碳的烷基)和异辛烷为市售产品。BHb 为市售国产生化试剂。用去离子水配制所有水溶液。

1.2 样品准备

有机相:分别将 AOT 及 AOT 与一定比例的 TRPO 混合溶于异辛烷中,配制不同浓度的反胶团溶液。水相:pH3~8 之间柠檬酸及 pH9~12 之间硼砂离子强度为 30mmol/L 的缓冲溶液,调节水相离子强度用不同浓度 KCl 溶液,配制 0.2mg/ml 的 BHb 的水溶液,3 种溶液等体积混合组成水相。

1.3 萃取与反萃实验

将等体积的有机相和水相在三角烧瓶中接触,电磁搅拌 5min 后,以 3000r/min 离心 5min 后混合物分相。取有机相测量蛋白质和水含量及反胶团的大小,并将 BHb 含量最高的有机相在第二水相中进行反萃实验。

用于反萃的第二水相,用碱调 pH 到碱性范围,盐的浓度为 1mol/L。反萃实验是将上述有机相与第二水相在带塞的三角烧瓶中混合后,置于 15℃ 水浴及转速为 200r/min 的摇床上进行的。

1.4 分析方法

有机相及水相蛋白质含量均在 7542 紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂制造)上用紫外法测定。有机相的含水量(W₀)用 Karl-Fisher 法测定。WA-1A 水分析仪由江苏分析仪器有限公司和中国石化科学研究院制造。用动力光散射(DLS)法测定反胶团的大小。

2 结果及讨论

由图 1 可以看出,TRPO-AOT 反胶团体系对分子量较大的牛血红蛋白(MW = 64 500, pI = 6.7)比

国家自然科学基金资助项目(NO.29290502)

本文于 1996 年 8 月 21 日收到。

AOT 反胶团体系有更好的萃取效果。TRPO-AOT 体系对 BHb 的最大萃取率达到 100%, AOT 体系则只能达到 90%, 且前者在 pH 为 6.0~8.0 的范围内可使萃取率达到 90% 以上。这说明 TRPO-AOT 体系比 AOT 体系在较宽的 pH 范围, 对 BHb 有更高的萃取率。TRPO 体系也能萃取 BHb, 但萃取效果不如这两种体系, 最大萃取率只能达到 70%。与 AOT 体系相同, TRPO-AOT 和 TRPO 两体系对 BHb 的萃取曲线也呈“钟”形, 只是, TRPO-AOT 体系的萃取曲线明显向碱性方向偏移, TRPO 体系的萃取曲线比较扁平。这一结果与 TRPO 本身的特性有关, 它是一种中性磷氧萃取剂, 有较强的耐酸耐碱作用, 因此, 尽管 TRPO 体系萃取 BHb 的效果不是很好, 但是能在比较宽的 pH 值范围内进行萃取。同时, 由于 TRPO 的存在, 增强了 TRPO-AOT 体系的耐碱性。不仅如此, DLS 实验结果证实, TRPO-AOT 反胶团的直径为 3.43nm, 而 AOT 反胶团的直径只有 2.22nm。显然, TRPO 使 AOT 反胶团变大, 从而提高 TRPO-AOT 反胶团的萃取容量。实验中发现, 在相同反萃条件下, 溶解在 TRPO-AOT 反胶团中的 BHb 反萃率可达到 60% 以上, 而溶解在 AOT 反胶团中的 BHb 则只有 20% 甚至完全不能被反萃。AOT 体系萃取 BHb 是在 $\text{pH} < \text{pI}$ 的一定 pH 范围内得到较高的萃取率, 而 TRPO-AOT 体系萃取 BHb 是在 $\text{pH} > \text{pI}$ 的一定 pH 范围内得到比 AOT 体系更高的萃取率。此时, 蛋白质带净负电荷, 与 AOT 的静电作用弱, 在反胶团中不易变性, 且不易被反萃到第二水相中^[9]。

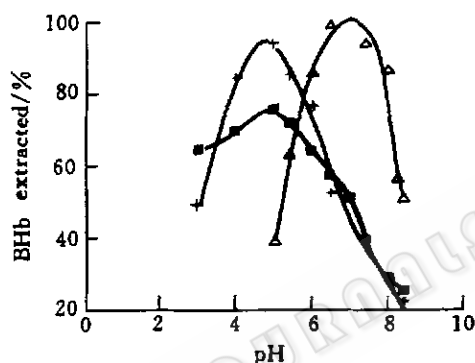


图1 初始水相的 pH 值对 BHb 萃取率的影响

氯化钾浓度/ $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

△ TRPO-AOT, + AOT

■ TRPO

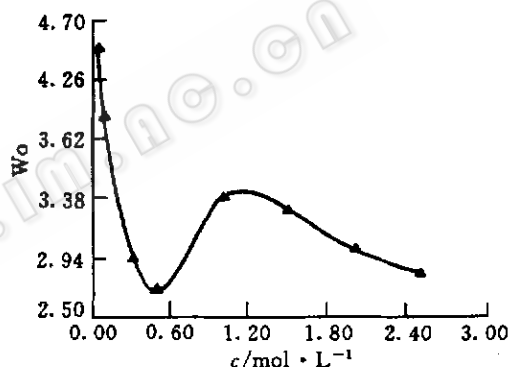


图2 KCl 浓度和含水量的关系

根据静电作用原理, 盐的浓度越小, 蛋白质与离子反胶团间的静电作用力越小, 反胶团体系对蛋白质的萃取率越高, 实际上, 影响液-液反胶团萃取蛋白质萃取率的一个重要因素是有机相的乳化。用 3 种体系萃取 BHb 的实验结果表明, 在低 pH 值范围, 盐的浓度越低, 有机相越易乳化, 离心达到相平衡后, 蛋白质沉淀在第三相, 即有机相-水相的界面处。实验中发现, 在同样低的盐浓度下, AOT 体系比 TRPO-AOT 体系更易乳化, 离心达相平衡后, 紫红色的 BHb 大部分沉淀在两相界面上, 萃取效率极低。

图 2 反映的是含 BHb 的 TRPO-AOT 体系含水量和盐浓度的关系, 从图中可以看出, 在低盐浓度范围内, 含水量随 KCl 浓度的增加而迅速减少, 此后, 随着 KCl 浓度的增加, 含水量逐渐增大, 出现一个最大值后直线下降。在较高盐的浓度范围内, 盐的浓度较大, 盐的离子主要是影响蛋白质和体系中 AOT 的作用, 由于体系中含有亲油性较强的 TRPO, 对反胶团中自由水的影响相对较小, 于是, 在此盐浓度范围出现图 2 所示的水含量随盐浓度先上升后缓慢下降的变化趋势。

此外, 实验中发现, TRPO-AOT 体系萃取 BHb 的最适温度是 15℃。此后, 温度上升, 萃取率下降。当温度升到 20℃ 之后, 温度上升, 物质传质速率加快, 萃取率也上升。当温度升至 30℃ 之后, 萃取率下

降。因为在温度较高时蛋白质易变性,所以难以达到理想的萃取率。

3 结 论

综上所述,在相同的条件下,TRPO-AOT体系对BHb比AOT及TRPO体系有更好的萃取性能,该体系不易乳化,耐碱作用强,TRPO-AOT反胶团比AOT反胶团直径大,其中的BHb易被反萃,是一类有研究前景的反胶团萃取体系。

参 考 文 献

- [1] Goklen K E, Hatton T A. *Sep Sci I Tech*, 1987, **22**: 831~841.
- [2] Sheu E, Goklen K E, Hatton T A *et al.* *Biotechnol Prog*, 1986, **2**: 175~186.
- [3] Dekker M, Van't Riet K, Vander Pol J J *et al.* *Chem Eng J*, 1991, **46**: B69~B74.
- [4] Woll J M, Dillon H S, Rahaman R S *et al.* In: Burgess R (ed) *Protein Purification: Micro to Macro*, Alan R., Inc. N. Y., 1987, pp. 117~130.
- [5] Goto M, Kondo K, Nakashi F. In: Sekine T (ed) *Solvent Extraction*, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 1845~1850.
- [6] 史红勤, 雷 夏, 沈忠耀. *化工学报*, 1990, **41**: 702~708.
- [7] Dekker M, Baltussen J W A, Van't Riet K *et al.* *Biocatalysis in Organic Media. Studies in Organic Chemistry* 29, 1987, pp. 285~288.
- [8] Eryomin A N. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1990, **26**: 764~770.
- [9] Shiomori K, Kawano Y, Kuboi R *et al.* In: Shallcross D C (eds) *Proceedings of ISEC'96*, Melbourne, 1996, pp. 1483~1488.

Extraction of Bovine Hemoglobin with TRPO/AOT-based Reversed Micelles

Yan Yongchao Liu Huizhou Chen Jiayong

(*Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract It was found that solubilities of bovine haemoglobin (BHb) (MW = 64 500, pI = 6.7) in TRPO/AOT reversed micelles (RM) are higher than those in AOT RM and TRPO/isooctane, respectively. The distribution behavior of protein on pH for three systems are all in bell-shape. The addition of neutral extractant trialkyl phosphine oxide (TRPO) to anionic surfactant sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT) RM results in a shift of the pH profile of BHb distribution behavior to high pH values. Especially, the back transfer of BHb from TRPO-AOT RM is easier than that of BHb from AOT RM. The emulsion of the organic phase was found to influence the solubilization of protein unfavorably in RM. The determination of RM sizes by dynamic light scattering shows that the size of TRPO-AOT RM is larger than that of AOT RM.

Key words TRPO, AOT, reversed micelles, extraction, bovine hemoglobin