

阳离子反胶团体系提取蛋白质^{*}

陈少欣 林文奎

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 用阳离子反胶团体系(CTAB/ 正戊醇-正辛烷) 分别对 4 种蛋白质进行反胶团提取的试验和考察, 确定 pH 值、离子强度、表面活性剂浓度和助溶剂等影响提取的主要因素. 实验结果表明, 反胶团的提取过程与蛋白质本身的性质和反胶团体系有关, 且静电作用在提取中起主要作用; 利用阳离子体系提取蛋白质时, 为了获得高的萃取率, 应控制低盐深度和高的 pH- pI 值.

关键词 反胶团, 萃取, 蛋白质

分类号 Q 510. 3

反胶团是溶解在有机溶剂中的表面活性剂, 其自发形成的纳米级的一种聚体. 表面活性剂的极性尾在外与非极性的有机溶剂接触, 而极性头则排列在内形成一个极性核, 此极性核具有溶解极性物质的能力. 极性核溶入水后就形成了“水池”, 当含反胶团的有机溶剂与含蛋白质的水溶液相混合时, 蛋白质就溶于反胶团的“水池”中. 由于水和表面活性剂在蛋白质表面形成一层“水壳”, 使蛋白质避免与有机溶剂直接接触而得到有效的保护. 反胶团内的环境近于细胞内环境^[1, 2], 蛋白质不易变性, 便于分离和纯化. 本文利用阳离子表面活性剂在辛烷中构成了反胶团溶液, 研究各种因素对蛋白质萃取过程的影响.

1 材料与方法

1. 1 材料

CTAB(十六烷基三甲基溴化铵, 分析纯); 辛烷(分析纯); 脂肪酶(pI= 9. 4, 无锡酶制剂厂生产); 中性蛋白酶(pI= 7. 0); BSA(牛血清白蛋白, pI= 4. 9); 淀粉酶(pI= 5. 0), 试剂均为分析纯或化学纯.

1. 2 仪器

HZ-24 型回转振荡器, 离心机, 微水测定仪.

1. 3 方法

(1) 反胶团溶液的配制. 取 CTAB 溶解于辛烷 助溶剂为 4 : 1(V/V) 的混合液剂中, 构成透明澄清的反胶团溶液, 浓度为 $30 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

(2) 萃取实验. 取相同体积的有机相和水相, 置于三角瓶中, 在 $250 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ 的振荡机上

往复混合 10 min. 取出后, 以 $350 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 15 min, 用移液管小心将两相分开, 对两相分别测定蛋白质的萃取率(E)和含水量(W_0)等有关参数:

$$E = \frac{\text{萃入有机相中的蛋白质质量}}{\text{初始水相中的蛋白质质量}}, \quad W_0 = \frac{\text{胶团中水的含量}}{\text{表面活性剂的含量}}.$$

(3) 蛋白质含量的测定. 水相中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色分析^[6], 然后通过物料衡算计算出有机相蛋白质含量.

2 试验内容与结果

2.1 水相 pH 值的影响

水相 pH 值的影响主要表现在改变蛋白质的表面电荷, 因而对萃取率有明显的影响, 如图 1 所示. 从图 1 可看出, 不同蛋白质的最适宜萃取 pH 值是不同的, 因此可利用这个特点把蛋白质分开.

2.2 离子强度的影响

水相 KCl 浓度(C_{KCl})对蛋白质萃取率(E)的影响, 如图 2 所示. 从图 2 可看出, KCl 浓度在 $0.05 \sim 0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较为适宜, 实验中水相 pH 值为 12. 随着 KCl 浓度的增加, 蛋白质的萃取率迅速降低, 这意味着通过调节离子强度可选择最佳的萃取和反萃取率.

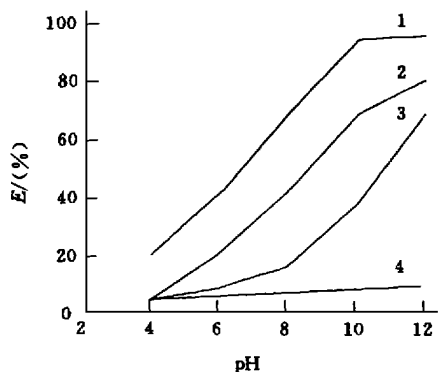


图 1 水相 pH 值对萃取率的影响

1. BSA; 2. 脂肪酶; 3. 淀粉酶; 4. 蛋白酶

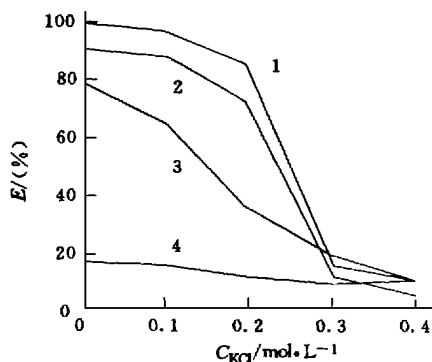


图 2 水相 KCl 浓度对萃取率的影响

1. BSA; 2. 脂肪酶; 3. 淀粉酶; 4. 蛋白酶

2.3 表面活性剂的影响

实验结果见图 3 所示, 选择表面活性剂 CTAB 的量(C_{CTAB})在 $30.0 \sim 40.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间为宜. 增加 CTAB 的量有利于蛋白质的萃取, 但 CTAB 达到一定量后, 萃取率几乎不变, 这是因为存在临界表面活性剂浓度. 实验选择 CTAB 量为 $30.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右.

2.4 不同的助溶剂的影响

根据堆砌几何理论模型, CTAB 必需加入助溶剂才能形成反胶团. 从图 4 看出, 助溶剂种类对萃取的影响不明显. 但考虑到助溶剂的水溶性和实验的可操作性, 本实验采用正戊醇为助溶剂.

2.5 微水对萃取的影响

实验结果见图 5 所示, 其中水相 pH 值为 12.0, KCl 浓度为 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 从图 5 可看

出, 萃取率与微水含量(W_0) 呈同步变化, 微水含量大, 萃取率高.

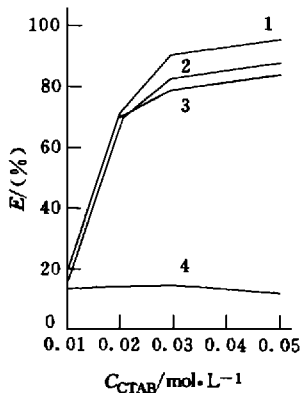


图 3 CTAB 对萃取率的影响

1. BSA; 2. 脂肪酶;
3. 淀粉酶; 4. 蛋白酶

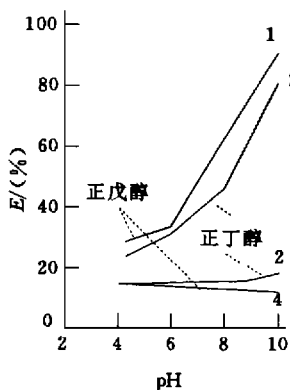


图 4 助溶剂对萃取率的影响

1. BSA; 2. 脂肪酶;
3. 淀粉酶; 4. 蛋白酶

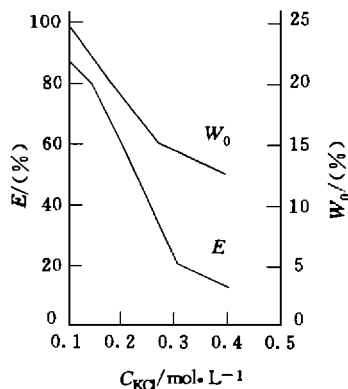


图 5 微水含量对萃取率的影响

3 萃取机理的初步探讨

3.1 水相的 pH

因为萃取物系中的表面活性剂和蛋白质都是带电的分子^[6], 可以从静电方面来考虑它们之间的相互作用. 当 $pH > pI$ 时, 蛋白质带负电荷, 与带正电的阳离子表面活性剂极头产生静电吸引. $pH - pI$ 值越大, 则静电引力也越大, 萃取率越高, 说明静电作用在萃取过程中起主要作用. 与实验结果相吻合(图 6). 中性蛋白酶在 CTAB 反胶团中的萃取率低, 这种现象无法用静电作用来解释, 说明除了静电引力在萃取中起作用外, 还有其它的因素(如蛋白质的疏水性)等也会对萃取率产生影响. 陈家镛等人^[6]在研究 Aliquat 336 反胶团萃取 α -淀粉酶和蛋白酶时, 也发现类似现象, 具体的机理有待于进一步的研究.

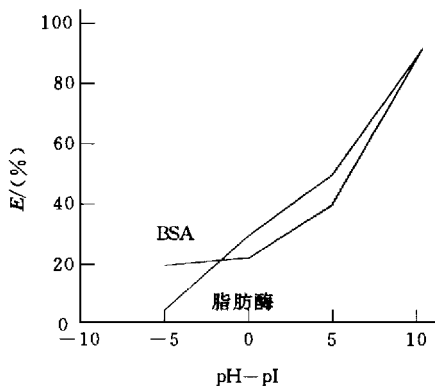


图 6 萃取率与 $pH - pI$ 的关系

在提取过程中, 如果存在对萃取不利的因素(如高盐浓度)时, 可通过调节 pH 值使蛋白质表面所带电荷增多, 则 $pH - pI$ 值增大, 借此增强静电作用力, 就可以补偿萃取率的降低. 但必须注意反胶团提取酶时, 由于最佳萃取率与酶活的最适宜 pH 值并不完全吻合, 在调节 pH 值时, 应使 pH 值在该酶的稳定范围之内.

3.2 水相的离子强度

从实验结果可看出, 4 种蛋白质在 KCl 浓度为 $0.05 \sim 0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萃取率较高, 但高盐浓度的萃取率却下降, 可由双电层理论^[6]来解释并依下式:

式中 k 为扩散双电层厚度的倒数, e 为单位静电, N_a 为 Avagadro's 常数, ϵ 为介电常数, K 为 Boltzmann 常数, T 为绝对温度, I 为离子强度, Ψ 为电势, Ψ_0 为 x 趋于 0 时 Ψ 的值, x 为离开静电表面的距离。

蛋白质解离的反离子在表面活性极性头附近建立了扩散双电层, 如果增加离子强度(I), 则 k^{-1} 值降低, 电解质溶液的电势 Ψ 也降低。因此, 增大 KCl 浓度会减少带负电的蛋白质与阳离子表面之间的静电引力, 使萃取率下降。

3.3 含水量

在离子强度较高时, 反胶团中的含水量与 $I^{-1/2}$ 成正比关系(图 7), 这与文献 [6] 相符。在离子强度较低时, 反胶团内“水池”含水量大, 溶解的蛋白也多, 因此萃取率高; 同时, 含水量大, 反胶团的直径也大, 有利于蛋白质传递到反胶团内部。

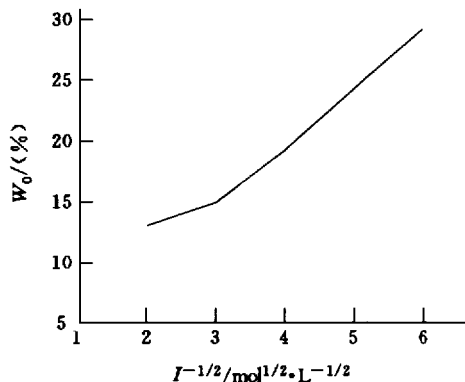


图 7 离子强度与含水量的关系

参 考 文 献

- 1 陆 强, 施亚钧. 反胶束提取与分离蛋白质和酶. 生物工程进展, 1992, 12(6): 12~16
- 2 陆 强, 施亚钧. 反胶束提取蛋白质技术新进展. 化工进展, 1995, 1(1): 25~29
- 3 Marion M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~254
- 4 黄惠莉, 林文奎. 茶多酚的提取技术及抗氧化性能研究. 华侨大学学报(自然科学版), 1996, 17(4): 403~406
- 5 Long Qing, Chen Jiayong. Effect of the type of cosolvent on the extraction process for separation and purification of two enzymes from bacillus subtilis using aliquat 336 reversed micelles. Separation Science and Technology, 1995, 30(13): 2 679~2 693
- 5 戚文彬. 表面活性剂与分析化学. 北京: 中国计量出版社, 1986. 437~441
- 6 Goklen S E, Krei G A. Extraction of enzyme by reverse micelles. Chem. Eng. Sci., 1992, 47(1): 99~111

Protein Extraction by Adopting Cationic Reverse Micelle

Chen Shaoxin Lin Wenluan

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract Four kinds of proteins are extracted respectively by adopting cetane trimethyl ammonia bromide (CTAB)/n-amyl alcohol-octyl alcohol. A study is devoted to the effects of pH value, ionic strength, concentration of surfactant and cosolvent on the extraction. As shown by the results, the extraction by reverse micelle has a bearing on the property of protein and reverse micelle system; electrostatic interaction plays an important part in the extraction; a lower salt concentration and a higher pH-pI often lead to a higher extraction rate.

Keywords reverse micelle, extraction, protein