

新型混合反胶团萃取溶菌酶的平衡行为

刘杨, 史清洪, 赵黎明, 孙彦

(天津大学化工学院生物化工系, 天津 300072)

摘要: 研究了由阴离子表面活性剂二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)和非离子表面活性剂聚氧乙烯基(聚合度为4)壬基酚醚(OPE4)组成的一种新型混合反胶团体系及其萃取溶菌酶的平衡行为。结果表明, 该反胶团体系具有较大的含水量, 且其含水量在较大的表面活性剂配比(0~0.8)范围内维持恒定, 是由静电作用和胶束形态改变共同作用的结果。无机盐种类和离子强度对上述混合反胶团的含水量有着显著的影响, 继而影响到溶菌酶的萃取率。它可归结为盐离子对扩散双电层和水化膜斥力的因素所致。降低 pH 和提高总表面活性剂浓度均有利于溶菌酶的萃取。

关键词: 混合反胶团; 非离子表面活性剂; 含水量; 无机盐; 溶菌酶溶解性

中图分类号: TQ028.3; TQ013.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2005)03-0269-04

1 前言

20世纪80年代以来, 利用反胶团萃取蛋白质成为生物产品分离的一个新兴研究领域。反胶团是表面活性剂在有机溶剂中形成的一种自聚集集体, 其极性内核中包含水溶液、可溶解蛋白质等生物大分子, 因此可用含有反胶团的有机溶剂有效地萃取溶于水相的蛋白质。

反胶团萃取中常用的表面活性剂是二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)和三辛基甲基氯化铵(TOMAC)等离子型表面活性剂, 它们有易于形成较大反胶团和易于相分离等优点。然而, 上述离子型表面活性剂与蛋白质之间强烈的静电相互作用往往导致蛋白质变性失活^[1], 以致于出现两相界面处存在不溶性的膜状物等问题。研究表明, 采用含磷酸基团的弱离子表面活性剂(DOLPA, DTDPA, 卵磷脂等)^[2-4], 或利用混合反胶团(即在离子表面活性剂中引入非离子表面活性剂)^[5-7]体系萃取蛋白质, 可以克服上述问题并在一定程度上改善反胶团的萃取性能。而由聚氧乙烯基(聚合度为4)壬基酚醚(OPE4)参与形成的反胶团体系的含水量较小^[5]。有关由OPE4与离子型表面活性剂组成的反胶团性能和萃取行为的研究一直很少。本工作以阴离子表面活性剂AOT和非离子表面活性剂OPE4组成了一种含水量较高的新型混合反胶团体系, 并在对其性能进行深入研究的基础上, 用此混合反胶团以溶菌酶为模型蛋白, 研究了混合反胶团的萃取平衡行为, 并考察了各种平衡因素对溶菌酶萃取的影响。

2 实验

2.1 实验试剂

AOT[二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠]购自日本

Wako公司; OPE4[聚氧乙烯基(4)壬基酚醚]购自天津市助剂厂; 溶菌酶和微球菌购自美国Sigma公司; 考马斯亮蓝G-250购自北京华美生物工程公司; 其他药品均为国产分析纯试剂, 水为去离子水。

2.2 萃取实验

分别配制 0.02 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH=6~8)和 0.02 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液(pH=8~12), 并用 NaCl 或 KCl 调节缓冲液的离子强度至 0.1~1.5 mol/L。溶菌酶溶液亦采用此缓冲液配制, 浓度为 0.5 mg/mL。

将 AOT 和 OPE4 以一定比例溶于正己烷中, 并用含 0.1 mol/L KCl 的 0.02 mol/L 缓冲液洗涤 2~3 次, 得到透明澄清的反胶团溶液。在 10 mL 带塞的离心试管中加入等体积的蛋白质水溶液和反胶团溶液(均为 2 mL), 在恒温 25℃以 60 次/min 的频率上下颠倒离心管 10 min, 使两相充分混合, 蛋白质达到分配平衡。然后在 3500 r/min 转速下离心 10 min, 将油水两相分离。

2.3 分析方法

反胶团相含水量用 Karl-Fischer 法测定(WA-1C 型水分测定仪, 江苏电分析仪器厂), 含水量定义为水的摩尔浓度与表面活性剂摩尔浓度的比值。水相溶菌酶浓度用 Bradford^[8]法测定。溶菌酶活性用微球菌为底物测定, 在 4℃下, 向 1.5 mL 含有微球菌(0.25 mg/mL)的磷酸盐缓冲溶液(pH=6.2)中加入含 3 μg 溶菌酶的溶液, 定容至 1.6 mL, 测定反应液在 450 nm 波长下吸光度的变化, 用 2 min 内吸光度的降低速率与标准曲线对比, 计算得到溶菌酶的活度。

3 结果与讨论

3.1 表面活性剂配比对反胶团含水量的影响

图1反映了反胶团含水量随表面活性剂配比X的变

化情况. 从图中可以看出, 单纯 AOT 反胶团的含水量 W_0 较大($X=0.0$); 而非离子型表面活性剂 OPE4 反胶团的含水量 W_0 则较小($X=1.0$). 这是由于形成反胶团的 AOT 极性头之间存在强烈的静电排斥作用^[1,6], 而 OPE4 则缺乏这种作用; 同时, 较小的 OPE4 极性头部 ($A_{OPE4}=0.55 \text{ nm}^2$, $A_{AOT}=1.06 \text{ nm}^2$)^[9]也是 OPE4 反胶团含水量低的原因之一. 表面活性剂配比 X 对反胶团含水量影响的研究表明, 在 AOT 和 OPE4 构成的混合反胶团体系中, 随着非离子型表面活性剂 OPE4 含量的增加, W_0 基本维持恒定; 只有当配比 $X>0.8$ 后, W_0 才呈现一种逐渐降低的趋势, W_0 由 30 降至 14 左右.

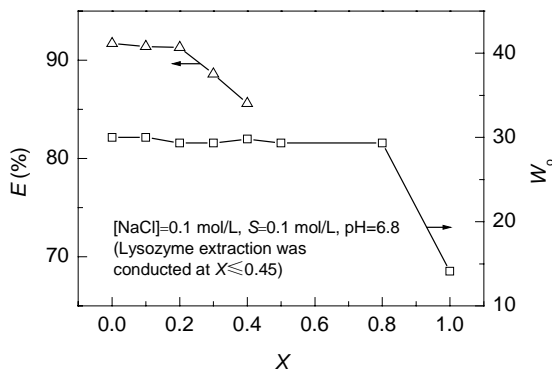


图1 表面活性剂配比(X)对含水量和溶菌酶萃取率的影响
Fig.1 Effect of surfactant composition(X) on water content (W_0) and lysozyme extraction rate (E)

由于具有较小的极性头部, OPE4 较易于插入 AOT 分子之间并形成两种分子间隔排列的混合反胶团. 在总表面活性剂浓度 S 不变的条件下, 混合反胶团体系中加入具有较小组装系数的 OPE4 会引起反胶团胶束形态由球形向棒状过渡^[10,11], 并导致胶束旋转半径和含水量的升高; 而另一方面, 混合反胶团的平均电荷密度将随着 OPE4 的加入而下降, 从而减弱 AOT 极性头之间的静电排斥作用, 引起“微水池”含水量的降低. 当上述两方面的影响相互抵消时, “微水池”的含水量可在一定程度上保持不变(图1). 这与其他 AOT-卵磷脂^[3]、AOT-聚氧乙烯烷基醚^[6]等混合反胶团体系有明显不同. 与含水量不随配比 X 而变化相比, 当配比 X 由 0 增至 0.4 时, 溶菌酶的萃取率降低 6% 左右(由 91.7% 降至 85.6%). 这可能是由 OPE4 插入后胶束形态改变引起的空间位阻作用和反胶团电荷密度降低等因素共同作用所引起的.

值得注意的是, OPE4 是一种乳化剂, 当 $X>0.45$ 时, 离心分离后两相界面处存在乳化现象, 因此本实验选用配比 $X\leq 0.45$.

3.2 盐种类及离子强度对蛋白质萃取的影响

图2 分别给出了 pH 为 6.8 条件下溶菌酶萃取率和

反胶团含水量随 NaCl 及 KCl 浓度的变化情况. 可以看出, 随着离子强度的增加, 反胶团的含水量快速下降. 由于反胶团 AOT 极性头带有大量的负电荷, 它会吸引部分“微水池”中的无机盐离子形成双电层, 随着离子强度的增加, “微水池”中双电层的厚度降低, 表面活性剂极性头之间的静电排斥作用减弱, 从而导致反胶团含水量的下降. 另一方面, “微水池”界面所吸附的离子(如 K^+ , Na^+)都是溶剂化的. 随着无机盐离子被吸附, 在“微水池”界面处将形成一水化膜. 水化膜中水分子处于相对有序排列, 并且比“自由水”具有更高的粘度^[12]. 当“微水池”发生改变时(如含水量降低等), 水化膜中水分子将通过引力作用恢复原有水分子的定向排列, 阻止“微水池”发生变化, 这可视作“水化膜斥力”. 相对于 Na^+ 而言, 具有较大离子半径的 K^+ (离子半径为 0.133 nm)^[13]的水化作用相对较弱, 因此“水化膜斥力”比较小, 反胶团更易发生改变. 因此 K^+ 对反胶团含水量的影响程度明显高于 Na^+ 的影响.

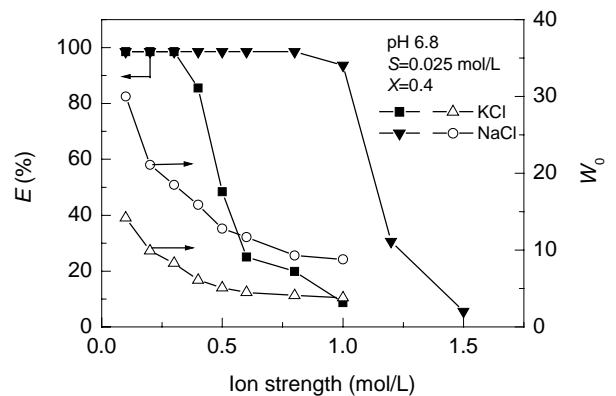


图2 离子强度及盐种类对含水量和溶菌酶萃取率的影响
Fig.2 Effects of ionic strength and salt type on lysozyme extraction rate (E) and water content (W_0)

图2 还反映出了在 pH 为 6.8 条件下溶菌酶的萃取率随无机盐浓度的变化趋势. 不难发现, 当盐浓度小于 1.0 mol/L 时, K^+ 对溶菌酶的萃取率有显著影响; 同时溶菌酶的萃取率几乎不随 Na^+ 浓度的变化而改变, 此趋势与 Zhang 等^[7]的研究相吻合. 根据 Debye-Huckel 双电层理论, 反胶团内壁双电层厚度 k^{-1} 随离子强度(无机盐浓度)的增大而降低, 导致蛋白质和反胶团之间的静电作用减弱以及 AOT 极性头间静电斥力下降和反胶团含水量的降低. 这两方面影响的直接结果就是蛋白质进入反胶团的阻力增大, 导致蛋白质萃取率下降. 此外, 由于离子水化作用的差异, 不同的无机盐离子对反胶团含水量的影响程度是不同的, 从而导致不同程度的空间排阻作用. 因此, K^+ 形成的反胶团含水量较小, 即反胶团体积较小, 蛋白质萃取的空间排阻作用较大; 而 Na^+ 形成

的反胶团含水率较大, 即反胶团体积较大, 因此萃取率也较大。

3.3 pH 值对蛋白质萃取的影响

图 3 表示了水相 pH 值对溶菌酶萃取率的影响。已知溶菌酶的等电点 pI 为 11.2。由图可知, pH < pI 时, 溶菌酶带正电荷, 而反胶团中 AOT 的极性头带负电荷, 二者之间存在静电吸引作用, 因此萃取率较大。这种静电作用随着 pH 减小而增大, 此趋势在 KCl 浓度为 0.6 mol/L 时尤为显著。当 pH 超过 pI 时, 溶菌酶表面带负电荷, 与反胶团产生静电排斥作用, 导致萃取率下降。在等电点附近, 由于溶菌酶表面存在特性电荷, 以及反胶团的疏水作用, 此处仍有较大的萃取率。这种变化趋势与其他混合反胶团体系中蛋白质萃取率随 pH 变化而呈现钟形曲线有所不同^[3,7], 而与 AOT 反胶团体系中蛋白质萃取率随 pH 变化趋势相似^[14]。这些现象表明静电相互作用在此混合反胶团体系的萃取过程中是主要推动力^[15,16]。

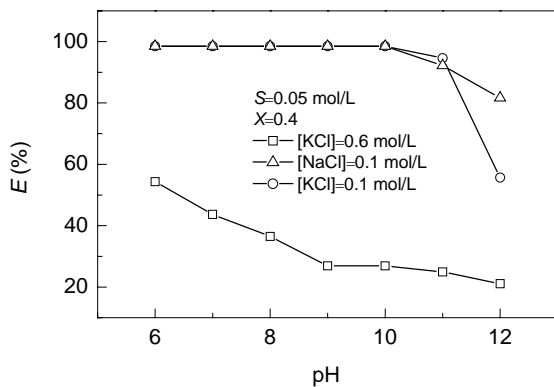


图 3 pH 对溶菌酶萃取率的影响
Fig.3 Effect of pH on lysozyme extraction rate

3.4 表面活性剂浓度对蛋白质萃取的影响

溶菌酶的初始浓度一定, 通过改变相比(有机相体积/水相体积), 测定了不同条件下, 萃取达到平衡时, 两相中蛋白质的浓度, 结果如图 4 所示。水相蛋白质浓度 C_w 较低时, 有机相蛋白质浓度 C_0 与 C_w 的关系为直线, 其斜率为平衡时的分配系数。如图 4 所示, 当总表面活性剂浓度增大时, 直线斜率增大, 即分配系数增大。反胶团相的表面活性剂浓度对反胶团的大小和结构没有影响, 只是使反胶团的数目发生变化。增大表面活性剂浓度, 则反胶团数目增多, 有效容量增大, 可使更多的蛋白质分子进入反胶团相, 所以分配系数也随之增大。

3.5 溶菌酶的反萃及活性收率

考察 AOT/OPE4(X=0.4)和 AOT 分别在正己烷中形成的两种反胶团体系对溶菌酶的反萃及溶菌酶活性收率的情况。两种反胶团体系的反萃实验均是在平行的实

验条件下进行的。萃取条件为含有 0.1 mol/L KCl 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.0), 蛋白质萃取率均为 98.5%左右。反萃过程中磷酸缓冲液中 KCl 浓度为 0.8 mol/L, 反萃时间为 2 h。实验结果如表 1 所示。

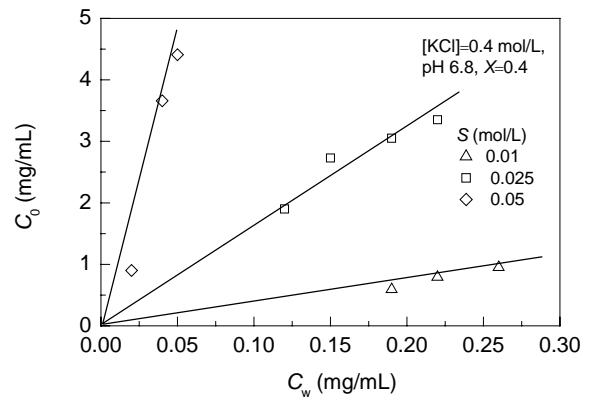


图 4 表面活性剂浓度对溶菌酶分配平衡的影响
Fig.4 Effect of surfactant concentration on lysozyme distribution

表 1 溶菌酶总萃取率及活性收率

Table 1 Total extraction yield and activity of lysozyme		
Reverse micelle	Total mass yield (%)	Activity yield (%)
AOT/OPE4	93.8	99.3
AOT	80.2	89.6

Note: Stripping phase 0.8 mol/L KCl, stripping time 2 h.

由表 1 中所显示的两种反胶团体系对溶菌酶的反萃率及溶菌酶活性收率的结果可知, 混合反胶团体系 AOT/OPE4(X=0.4)总萃取率和活性收率均优于单纯 AOT 反胶团体系。这是由于在混合反胶团体系中, OPE4 的加入削弱了 AOT 极性头与溶菌酶之间强烈的静电作用, 可在较低的盐浓度(0.8 mol/L KCl)下取得较高的反萃率及活性收率。

4 结论

对由阴离子表面活性剂二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)和非离子表面活性剂聚氧乙烯基(聚合度为 4)壬基酚醚(OPE4)构成的新型混合反胶团体系萃取溶菌酶的平衡行为进行了研究, 结果表明:

- (1) 在 AOT/OPE4 混合反胶团体系中, 在表面活性剂配比为 0~0.8 的范围内含水量基本保持恒定。
- (2) 无机盐种类和离子强度对混合反胶团体系的含水量有显著影响, 进而影响到蛋白质的萃取率。
- (3) 在 AOT/OPE4 混合反胶团萃取溶菌酶过程中, 降低 pH 和提高总表面活性剂浓度均有利于溶菌酶的萃取, 在离子强度较高时这种影响更为明显。
- (4) AOT/OPE4 混合反胶团体系对溶菌酶的反萃率及活性收率均优于 AOT 反胶团体系。

符号表:

A	表面活性剂分子截面积 (nm^2)	S	表面活性剂浓度 (mol/L)
C_0	有机相蛋白质浓度 (mg/mL)	W_0	反胶团含水量
C_w	水相蛋白质浓度 (mg/mL)	X	表面活性剂配比
E	蛋白质萃取率 (%)	pI	蛋白质等电点
I	离子强度 (mol/L)	k^{-1}	离子氛半径 (m)

参考文献:

- [1] Dekker M, Van't Riet K, Bijsterbosch B H, et al. Modeling and Optimization of the Reversed Micelles Extraction of α -Amylase [J]. *AIChE J.*, 1989, 35(2): 321–324.
- [2] Goto M, Ono T, Nakashio F, et al. Design of Surfactants Suitable for Protein Extraction by Reversed Micelles [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 51(1): 26–32.
- [3] 史红勤, 雷夏, 沈忠耀. AOT-磷脂反胶团体系萃取蛋白质的研究 [J]. *化工学报*, 1990, 6: 702–708.
- [4] Sun Y, Bai S, Gu L, et al. Effect of Hexanol as a Cosolvent on Partitioning and Mass Transfer Rate of Protein Extraction Using Reversed Micelles of CB-modified Lecithin [J]. *Biochem. Eng. J.*, 1999, 3: 9–16.
- [5] Hihorst R, Sergeeva M, Heering D, et al. Protein Extraction from an Aqueous Phase into a Reversed Micellar Phase: Effect of Water Content and Reversed Micellar Composition [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 46: 375–387.
- [6] Shioi A, Harada M, Takahashi H, et al. Protein Extraction in a Tailored Reversed Micellar System Containing Nonionic Surfactants [J]. *Langmuir*, 1997, 13: 609–616.
- [7] Zhang T X, Liu H Z, Chen J Y. Affinity Extraction of BSA by Mixed Reversed Micellar System with Unbound Triazine Dye [J]. *Biochem. Eng. J.*, 1999, 4: 17–21.
- [8] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248–254.
- [9] Rosen M J. *Surfactants and Interfacial Phenomena* [M]. New York: John Wiley and Sons, 1989. 74.
- [10] Wabel C. Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions [D]. Frankfurt: University of Erlangen. 1998. 5–20.
- [11] Simmons B A, Li S C, John V T, et al. Morphology of CdS Nanocrystals Synthesized in a Mixed Surfactant System [J]. *Nano Lett.*, 2004, 2(4): 263–268.
- [12] 沈钟, 王果庭. *胶体与表面化学*, 第二版 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 80.
- [13] 天津大学无机化学教研室. *无机化学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 273.
- [14] 史红勤, 雷雪, 郭荣, 等. 反胶团萃取蛋白质的研究 [J]. *生物工程学报*, 1989, 5(3): 246–251.
- [15] Goklen K E, Hatton T A. Liquid-Liquid Extraction of Low Molecular-weight Proteins by Selective Solubilization in Reverse Micelles [J]. *Sep. Sci. Technol.*, 1987, 22: 831–841.
- [16] 陆强, 李宽宏, 施亚钧. 反胶团萃取牛血清白蛋白 [J]. *高校化学工程学报*, 1995, 9(2): 139–141.

Lysozyme Solubilization Using the New Mixed Reversed Micellar System

LIU Yang, SHI Qing-hong, ZHAO Li-ming, SUN Yan

(Dept. Biochem. Eng., Sch. Chem. Eng. & Technol., Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A new mixed reversed micellar system composed of the anionic surfactant sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate(AOT) and nonionic surfactant poly(oxyethylene) nonylether(OPE4 with polymerization degree of 4) was prepared and the solubilization of lysozyme in the mixed reversed micelles was investigated under different conditions. The results exhibited that this reversed micelle system had more water content, and the water content was kept to be constant at a wider concentration ratio of AOT to OPE4, which could be ascribed to the change of micellar conformation and electrostatic interaction. The ion species and ionic strength had significant influence on water content in the organic phase, and further changed the solubility of lysozyme in the organic phase. These were caused by the influence of salt ions on double diffuse-layer and repulsion of hydration membrane. Both reducing pH value and increasing surfactant concentration were all beneficial to solubility of lysozyme in the organic phase.

Key words: mixed reversed micelle; nonionic surfactant; water content; salt; lysozyme solubility