

【文章编号】 1004-1540(2007)02-0095-04

# 反胶团萃取嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中胞外蛋白酶研究

黄光荣<sup>1</sup>, 活泼<sup>1</sup>, 戴德慧<sup>1</sup>, 蒋家新<sup>2</sup>

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023;

2. 中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

**【摘要】** 讨论了影响 AOT/异辛烷反胶团体系萃取嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中耐高温中性蛋白酶的因素. 实验结果表明, AOT/异辛烷反胶团在很短的时间内能达到萃取平衡, 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 的离子强度有助于蛋白酶的反胶团萃取. 在 50 mmol · L<sup>-1</sup> AOT、pH4.5、100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl、油水相体积比为 1 的条件下萃取 5 min 能达到 80% 以上的酶活力回收率.

**【关键词】** 反胶团; 耐高温中性蛋白酶; 液液萃取

**【中图分类号】** TQ925.6

**【文献标识码】** A

## Reversed micellar extraction of an extracellular protease from *Thermophillic bacillus* strain HS08 fermentation broth

HUANG Guang-rong<sup>1</sup>, HUO Po<sup>1</sup>, DAI De-hui<sup>1</sup>, JIANG Jia-xin<sup>2</sup>

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China;

2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The liquid-liquid extraction using reversed micelles has been one of the research hotspots for biological products separation in recent years. The effects of some factors on AOT in isooctane liquid-liquid extraction of thermostable neutral protease from *Thermophillic bacillus* strain HS08 fermentation broth were investigated. The results show that the equilibrium can be established in a short time and the ionic strength of 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl helps the reversed micellar extraction of the protease. By using reversed micellar extraction at conditions of 50 mmol · L<sup>-1</sup> AOT, pH 4.5, 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, the ratio of organic to aqueous volume at 1 to 1, and for 5 minutes, it is found that about 80% of the total activity of the protease in the fermentation broth can be recovered.

**Key words:** reversed micelles; thermophillic neutral protease; purification; liquid-liquid extraction

**【收稿日期】** 2007-04-12

**【基金项目】** 浙江省自然科学基金资助项目(No. Y405083)

**【作者简介】** 黄光荣(1974-),男,湖南祁阳人,副教授.主要研究方向为生化分离.

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<sup>[1]</sup>.反胶团液液萃取技术因具有选择性较好、易于放大、能较好地保持活性等优点,因而被认为是蛋白质、酶等生物分子下游处理的一种极具潜力的分离技术.近年来,国内外已有较多报道应用于微生物发酵液中酶的分离中<sup>[2-4]</sup>.蛋白酶是一种重要的工业化应用酶制剂,几乎占酶制剂市场的65%以上,已大量应用于食品、洗涤、纺织、皮革、医药、化工等行业,而细菌来源的蛋白酶又是蛋白酶的重要来源之一,如在洗涤行业中细菌蛋白酶占总微生物蛋白酶产量的35%<sup>[5]</sup>.近年发现,来自于耐热的微生物所产生的蛋白酶具有较高的耐热性与热稳定性,因而引起了众多研究者的关注,其中研究最多的是耐高温碱性蛋白酶<sup>[6-7]</sup>.本实验室分离纯化得到一株嗜热芽孢杆菌菌株,以硫酸铵沉淀、离子交换层析和凝胶过滤层析等方法纯化该菌所产胞外蛋白酶,并研究了该酶的部分酶学特性<sup>[8-9]</sup>,结果表明,该蛋白酶为一种新的丝氨酸属耐高温中性蛋白酶.本研究将探讨AOT/异辛烷反胶团体系应用于嗜热芽孢杆菌HS08产耐高温蛋白酶的初分离纯化中,分析影响反胶团液液萃取该蛋白酶的因素,以便为该蛋白酶的开发应用提供前期研究基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 蛋白酶发酵液的准备

由本实验室保存的嗜热芽孢杆菌(*Thermophilic bacillus*)菌株HS08按文献[8]方法发酵,得到蛋白酶发酵液,4℃下离心(10 000×g,30 min),取上清液冷冻干燥后贮藏于-25℃,备用.使用时准确称取1.000 g酶粉,溶解到所需的pH缓冲体系中,以缓冲液定容到100 ml.

### 1.2 蛋白酶的反胶团液液萃取

按不同浓度配成琥珀酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠(AOT)/异辛烷溶液.取等量的发酵液与反胶团有机相混和,于恒温(25℃)摇床中以150 r/min混和5 min,立即离心分相(2 000×g,5 min),读取上下层体积;取上层萃取相,加入等量反萃取剂(pH6.5,1.0 mol·L<sup>-1</sup> KCl,50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl缓冲液)混匀,于恒温(25℃)摇床中以150 r/min混

和5 min,立即离心分相(2 000×g,5 min),读取上下层体积,取下层萃取相,测定蛋白质含量和酶活力.

### 1.3 蛋白质和酪氨酸含量测定

分别以牛血清白蛋白、酪氨酸为标准品,用紫外分光光度法测定其含量<sup>[10]</sup>.

### 1.4 蛋白酶活力测定

取100 μl酶液于2 ml离心管中,加入400 μl已在65℃水浴保温5 min的2%酪蛋白,于65℃水浴中准确反应10 min后,加入1 ml 10%三氯乙酸(TCA)终止酶反应.同时以加入酶后直接用10% TCA沉淀酶并使酶失活,然后再加2%酪蛋白为空白对照.冷却后离心(14 000×g,20 min),取0.2 ml上清液测定酪氨酸含量.以每ml酶液每分钟水解产生1 μg酪氨酸的量为一个酶活力单位(U).

## 2 结果与分析

### 2.1 萃取时间的影响

水相(酶液)与有机相(AOT/异辛烷)混和后,并于恒温(25℃)摇床中以150 r/min混和,考查萃取时间对嗜热芽孢杆菌HS08发酵液中蛋白酶萃取的影响,结果如图1.由图1知,水相与有机相很快能达到平衡.当萃取时间在5~30 min内,萃取时间对萃取影响不大,酶活力回收率在75%~80%之间,蛋白质回收率在32%~34%之间.这与文献报道AOT/异辛烷萃取其它酶达到相平衡时间短相似<sup>[3,11,12]</sup>.因此,选择萃取时间为5 min.

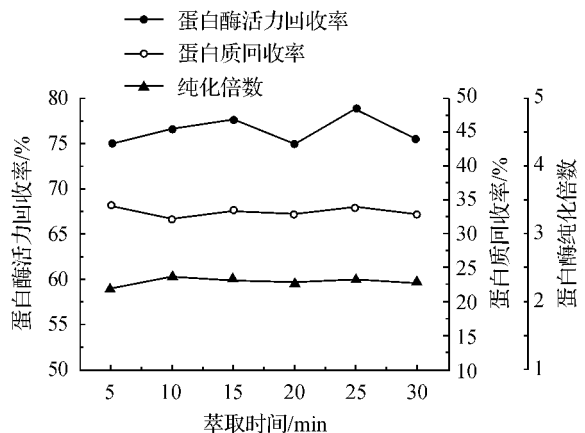


图1 萃取时间对嗜热芽孢杆菌HS08发酵液中蛋白酶萃取的影响

## 2.2 离子强度的影响

离子强度(盐)对蛋白质萃取的影响主要有两方面:一是离子增大时,反胶团内表层的双电层变薄,使蛋白质表面与反胶团内表面的静电引力下降;二是反胶团内表层双电层变薄后,也减少了表面活性剂极性基团间的斥力,从而使反胶团变小.一般说来,加入一些盐可以使萃取过程中两相界面变得清晰,浓度过大则会降低萃取率.由图2知,在 $0.1\sim 0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 范围内浓度对酶活力回收率影响不大,但随 NaCl 浓度增加,蛋白质萃取率增加,酶的纯化倍数降低,因此随盐浓度增加杂蛋白萃取增加.另外,实验发现,如 NaCl 浓度更小或不加 NaCl,则萃取后分相困难,且有明显的酶失活现象,说明离子强度对酶的稳定性有影响.因此,选择 NaCl 的浓度为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,此时酶活力的回收率为72%,纯化倍数为2.8.

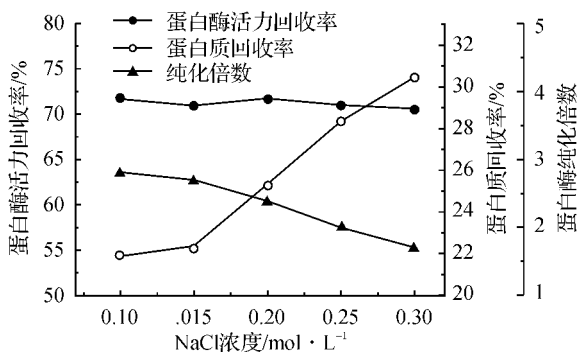


图2 离子强度对嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中蛋白酶萃取的影响

## 2.3 pH 的影响

反胶团体系能否溶解蛋白质,一般与蛋白质间的静电作用力有关.反胶团是表面活性剂在有机相中形成的,其大小和极性与极性基团的静电大小有关.蛋白质分子一般表面都带有电荷,带电的多少和电性取决于溶液 pH 的大小,因此改变水相的 pH 值则会改变萃取结果<sup>[13]</sup>.由图3知,当 pH 大于6.5时,酶活力回收率较低,这可能与该蛋白酶为中性蛋白酶有关,在 pH 高于6.5的溶液中净正电荷越来越少,因而酶活力回收率低.但随 pH 增加,蛋白质回收率增加可能与萃取杂蛋白有关.在 pH4.5 时酶活力回收率和纯化倍数均较高,分别达80%和2.6,因此选择萃取水相的 pH 为4.5.

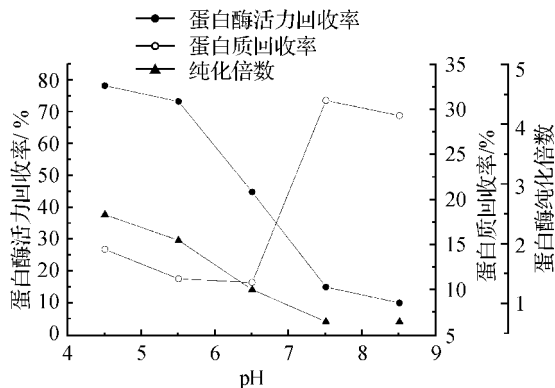


图3 pH对嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中蛋白酶萃取的影响

## 2.4 AOT 浓度的影响

增大 AOT 的浓度可增加反胶团的数量,从而增大对蛋白质的溶解能力.但 AOT 浓度过高时,有可能在溶液中形成比较复杂的聚集体,同时会增加萃取过程的难度.由图4知,在 AOT 浓度为 $25\sim 250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内其浓度对酶活力的回收率影响不大,而蛋白质回收率随着 AOT 浓度的增大而略微增大,因此,纯化倍数也略有下降.故选择 AOT 浓度为 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

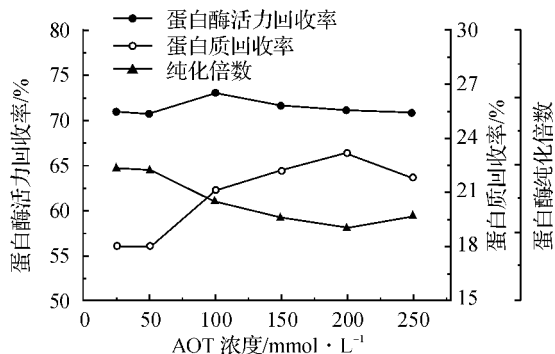


图4 AOT 浓度对嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中蛋白酶萃取的影响

## 2.5 相体积比的影响

对于确定体积的油相,其中所含反胶团的数量是一定的,它所能增溶酶的能力是有限的,同时,蛋白酶的分子量较大,它只能为反胶团中占一定比例的较大胶团所“溶解”,故增大油水相比有利于萃取,但油水相比过大不经济,会造成很大的浪费.由图5知,随着水相体积在两相中的比例的增大,蛋白质和酶活力萃取率呈下降趋势,纯化倍

数变化不大。综合两者,选择油水相等体积萃取,在等体积油水相下萃取,酶活力回收率为72%。

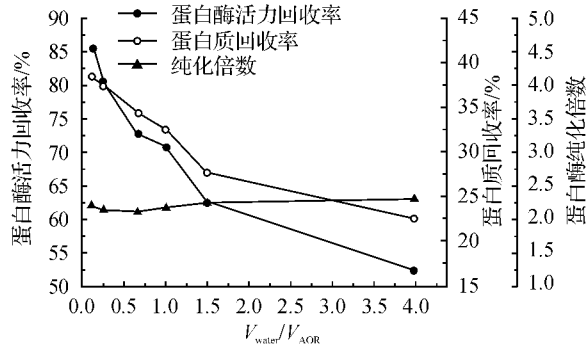


图5 相体积比对嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中蛋白酶萃取的影响

### 3 结语

因反胶团萃取具有成本低、溶剂可以反复使用、萃取率较高等突出的优点,近年来对其应用于生物分子分离中的研究报道越来越多。本实验研究发现,采用 AOT/异辛烷反胶团初步分离纯化嗜热芽孢杆菌 HS08 发酵液中耐高温中性蛋白酶是可行的,同时试验了影响 AOT/异辛烷反胶团体系萃取该蛋白酶的影响因素,当萃取时间为 5 min,水相 pH 为 4.5, AOT 浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaCl 浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,水相与有机相体积比为 1:1 时,蛋白酶回收率和纯化倍数达到较高值,酶活力回收率达 80% 以上。

#### 【参 考 文 献】

[1] FAEDER J, LADANYI B M. Molecular dynamics simulations of the interior of aqueous reverse micelles[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2000,104(5):1033-1046.  
 [2] NASCIMENTO C, COELHO L, CORREIAL M, et al. Liquid-liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds

using reversed micelles[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24:905-907.

- [3] LIU J G, XING J M, SHEN R, et al. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004,21:273-278.  
 [4] MONTEIRO T I, PORTO T S, CARNEIRO L A. Reversed micellar extraction of an extracellular protease from *Nocardopsis* sp. fermentation broth[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005,24:87-90.  
 [5] FERRERO M A, CADTRO G R, ABATE C M, et al. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996,45:327-332.  
 [6] 李玲,刘祖同. 高温碱性蛋白酶(TAP)菌株的分离及筛选(I)[J]. 清华大学学报(自然科学版),1994,34(3):83-87.  
 [7] JOHNVESLY B, MANJUNATH B R, NAIK G R. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99[J]. Bioresource Technology, 2002, 82(1):61-64.  
 [8] 黄光荣,活泼,蒋家新. 嗜热芽孢杆菌 HS08 耐热中性蛋白酶的分离纯化及部分特性研究[J]. 中国食品学报,2006, 6(6):30-35.  
 [9] HUANG G R, YING T J, HUO P, et al. Purification and characterization of a protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 24(5):2433-2438.  
 [10] 陈钧辉,陶力. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社, 2004:59-61.  
 [11] YU Y C, CHU Y, JI J Y. Study of the factors affecting the forward and back extraction of yeast-lipase and its activity by reverse micelles[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2003,267:60-64.  
 [12] ALVES J R, FONSECA L P, RAMALHO M T, et al. Optimisation of penicillin acylase extraction by AOT/isooctane reversed micellar systems[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003,15:81-86.  
 [13] 龚福忠,黄小凤,罗良荣. 反胶团提取大豆中的蛋白质和豆油[J]. 食品科学,2002,23(9):154-156.