

# 从反胶束溶液中反萃牛血清白蛋白的研究

陆 强 李宽宏 施亚钧

(华东理工大学化学工程研究所 上海 200237)

**摘 要** 由近红外光谱证实,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)/正己醇-正辛烷反胶束溶液是牛血清白蛋白(BSA)增溶于非极性有机溶剂的较理想中介。研究了反萃液酸度、离子强度和种类等参数对BSA反萃率的影响,过低的溶液酸度导致BSA变性。适宜的反萃液为:1.0~2.0mol/L KBr, pH4.3~4.9。蛋白质的紫外光谱表明,BSA分子在料液,反胶束溶液和反萃液中的构象大致相同。此外,探讨了反胶束溶液循环使用的效率问题。最后,通过采用适当的相比,成功地实现了蛋白质的回收和浓缩。

**关键词** 反胶束溶液,反萃取,牛血清白蛋白

为适应大规模分离生物物质的要求,80年代中期发展了反胶束萃取蛋白质这一新技术<sup>(1)</sup>。应用此技术须解决的一个关键问题是如何从负载有机相中反萃蛋白质。并且不仅要宏观效果指标(如目标物质的回收率)进行评估,还要对分离过程中蛋白质的微观变化进行考察,因为这样将直接影响蛋白质的生物活性。关于这些问题,至今尚未有过系统研究。蛋白质随反萃液特性的改变所显示的溶解度变化是不同的。许多蛋白质甚至不能通过调节反萃液特性实现反萃<sup>(2)</sup>。本文在实现用CTAB/正己醇-正辛烷反胶束溶液萃取水溶液中大分子量蛋白质BSA的基础上<sup>(3)</sup>,研究蛋白质反萃过程的一些基本问题,并探讨通过反胶束萃取浓缩蛋白质。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),北京西中化工厂生产,纯度不低于99%。牛血清白蛋白(BSA)是美国Sigma公司生产。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、正辛烷(oct)、正己醇(hex)、KCl、KBr、NaAc、HAc、HCl等均为市售分析纯或化学纯试剂;脱离子水。

### 1.2 分析方法

水相和有机相中蛋白质含量的测定用紫外光吸收法(岛津UV-3000型双波长双光束分光光度计),测定波长280nm。水相表面张力采用du Noüy环法测定,所用仪器为JzhY1-180界面张力仪。蛋白质的紫外吸收光谱:用岛津UV-365紫外-可见-近红外分光光度计,波长范围240~340nm,波长准确度小于±0.3nm。有机相中水的测定用近红外光谱:所用仪器与蛋白质测定相同,波长范围1800~2100nm,波长准确度小于±0.7nm。

### 1.3 实验方法

萃取与反萃实验均在室温下进行。萃取方法参见前文<sup>(3)</sup>。反萃是将萃取了蛋白质的有

机相，与等体积的一定 pH 值和盐浓度的另一水相，在 10ml 带塞离心试管中混合，直至达到反萃平衡。然后用离心分离器使乳状液分相，分别测定有机相和水相中蛋白质的含量。反萃取率 ( $E'$ )，定义为反萃水相中蛋白质的质量，对应于初始水相料液中蛋白质的质量比值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 影响反萃取率的因素

**2.1.1 反萃水相 pH 值：**根据蛋白质正向萃取的特性，选取正向萃取率最低时的 pH 值、离子强度和种类，来考虑反向萃取的实验条件。对于负载 BSA 的 CTAB/hex : oct (1 : 4) 反胶束相，预测只有在  $\text{pH} < 5$  时，才能有效地进行反向萃取。以两种盐调节离子强度，测定反萃水相 pH 值对  $E'$  的影响，见图 1。在  $\text{pH} > 4.3$  时，pH 值越高，反萃取率越低，这是由于 pH 值影响了蛋白质表面与反胶束内表面间静电排斥力的大小；在  $\text{pH} < 4.3$  时，两相界面上有胶状不溶物 (图中虚线)，分析两相蛋白质浓度，得知蛋白质总量减少，故这些胶状物是蛋白质的变性产物。

尽管  $\text{Br}^-$  的离液序列高于  $\text{Cl}^-$ ，实验发现两种盐反萃时的 BSA 变性量几乎相同，盐的种类似乎不是蛋白质构象发生变化的关键。向只含有 BSA 的水相中滴加 0.1mol/L HCl 以改变 pH 值，观察到当  $\text{pH} < 4.0$  时水相出现混浊，且 pH 值愈低，混浊度愈高。因此，溶液酸度将是导致 BSA 变性的主要原因。Tanford 等<sup>(4)</sup>通过分析 BSA 的酸性水溶液的粘度变化后指出，当  $\text{pH} < 4.2$  时，蛋白质的结构从紧密变得松散，主要是由于解离基团得质子后，生成过多正电荷，使肽链间净斥力增加的结果。

**2.1.2 反萃水相离子种类及强度：**从图 1 还可看出，在实验的 pH 范围内，采用 KCl 溶液作为反萃水相，只能实现 BSA 的部分反萃取；而采用 KBr 溶液时，则得到较高的反萃取率。这两种反萃液的盐浓度对 BSA 反萃取率的影响，见图 2。为达到反萃的目的，采用 KCl 溶液时，反萃液的 pH 值须取为 3.92，且在各实验的盐浓度下两相界面均出现胶状不溶物，即有部分 BSA 变性。与同一盐浓度的 KBr 反萃液相比，KCl 溶液的反萃率都较低。

盐浓度 (离子强度) 对蛋白质反萃取率的影响，主要通过两个途径：改变蛋白质表面和反胶束内表面间的静电力和改变反胶束的大小。对于 CTAB 反胶束体系，当  $\text{pH} < 1$  时，离子强度越低，蛋白质表面和反胶束内表面间的静电排斥力越大，反胶束的尺寸亦越大；静电斥力的增大将使蛋白质的反萃取率提高，而反胶束尺寸增大的影响正好相反。

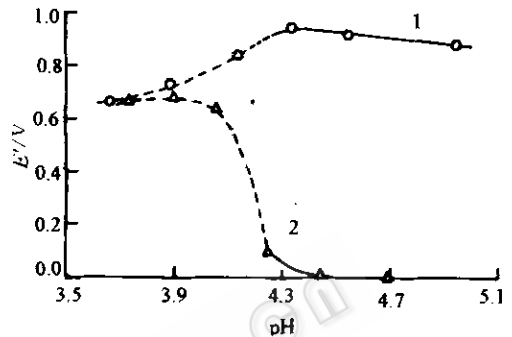


图 1 反萃液 pH 对  $E'$  的影响

Fig. 1 Effect of pH in strip solution on  $E'$   
 Aqueous phase: 0.08mol/L NaAc-HAc (1), 1.5mol/L KBr (2), 1.5mol/L KCl  
 Organic phase: 20mmol/L CTAB/hex : oct (1 : 4) reversed micellar solution that was in equilibrium with aqueous phase (0.1mol/L KCl,  $\text{pH} = 8.19$ , 0.01mol/L Tris-HCl containing 1mg/ml BSA)

由图 2 可见, 盐浓度愈低, BSA 的反萃取率愈低; 这意味着相对于静电作用而言, 反胶束的尺寸排斥影响占有更重要的地位。

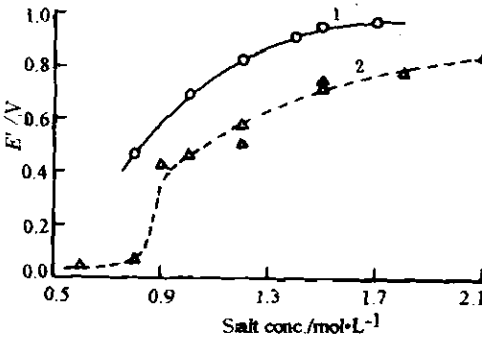


图 2 反萃液离子种类及浓度对 E' 的影响

Fig. 2 Effect of salt type and concentration in strip solution on E'

Aqueous phase: 0.08mol/L NaAc-HAc (1), KCl pH3.92 (2), KBr pH4.30

Organic phase: as the same as in Fig. 1

### 2.2 萃取过程中蛋白质的构象变化

2.2.1 反胶束溶液中水的近红外光谱: 反胶束溶液萃取蛋白质, 是通过将蛋白质分子溶于反胶束内的“水池”来实现的。此“水

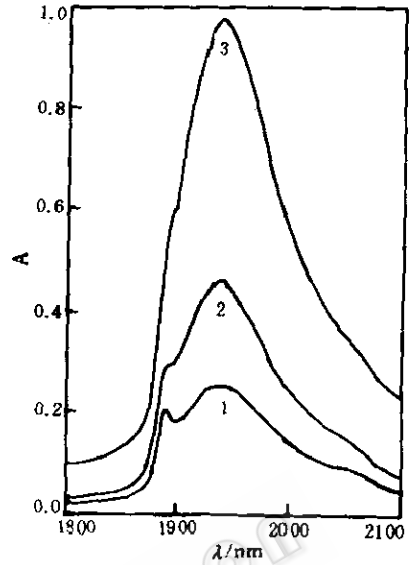


图 3 CTAB/hex:oct (1:4) 反胶束溶液中水的近红外光谱

Fig. 3 The near infrared spectra of water in GAB/hex:oct (1:4) system CTAB (mmol/L): 1. 1.10, 2. 2.20, 3. 4.40

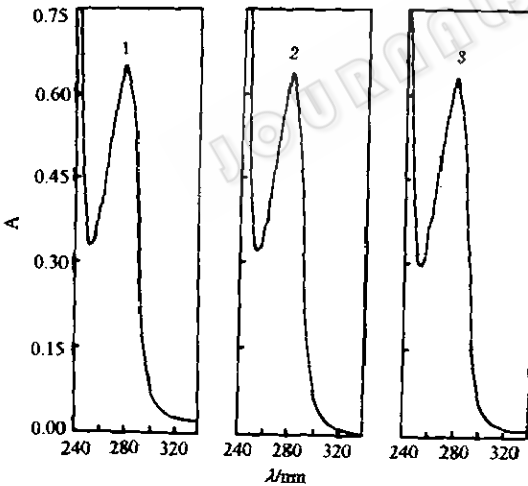


图 4 BSA 的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV absorption spectra of BSA in difference solution

1. Feed (aqueous): 0.1mol/L KCl, 0.01mol/L Tris-HCl (pH8.15)  
2. Organic phase: 20mmol/L CTAB/hex:oct (1:4)  
3. Stripping phase (mmol/L): 1.5KBr, 0.08NaAc-HAc (pH4.32)  
The BSA conc. in initial aqueous phase is 1mg/ml

池”类似于酶中的极性囊, 它为蛋白质的增溶提供了一个独特的微环境, 保护蛋白质不发生变性。因此, 研究反胶束萃取过程中蛋白质的构象变化, 首先要研究溶于反胶束溶液中水的特性。在近红外区域, 由于拉伸和弯曲振动的综合作用, 水在 1800~2000nm 范围内呈现出强烈的吸收带。对于含有反胶束的非极性溶剂中的水, 应有两个吸收带, 一个是由于游离水而出现在 1900nm 左右, 另一个是由于表面活性剂结合水 (“水池”中的水) 而出现在 1900~2020nm 处。3 种浓度 CTAB/hex:oct (1:4) 反胶束溶液与不含蛋白质的 0.1mol/L KCl 水溶液平衡后, 它们的近红外光谱 (见图 3)。从图 3 可知, 有机相中的水绝大部分是溶入“水池”的, 随表面活性剂浓度的提高, “水池”中的水量和它对游离水的比值, 都有大幅度增加。因而这种反胶束是 BSA 增溶于非极性有机溶剂

的较理想中介。

2.2.2 蛋白质的紫外光谱：含 BSA 的料液、反胶束溶液和反萃液的紫外吸收光谱见图 4。从图 4 可知，BSA 的 3 种状况下的最大吸收峰位置皆在 280nm 处，且谱形几乎完全相同。蛋白质在 280nm 附近的吸收峰，主要是由色氨酸残基的吡啶环和酪氨酸残基的酚基所贡献，而吡啶环的吸收光谱与周围环境（例如，极性与非极性环境）有很大关系<sup>(5)</sup>。因此可以推断，BSA 分子在 3 种溶液中的构象大致相同。

一般来说，蛋白质的变性会使  $A_{250}/A_{280}$  增大<sup>(6)</sup>。如图 4 所示，BSA 经过萃取与反萃取后，这一比值未变，这亦充分表明蛋白质未发生变性。BSA 在反萃液中的  $A_{280}$  略低于料液，这是因蛋白质未能完全回收之故。

### 2.3 反胶束溶液的循环使用

为考察反胶束溶液在工艺过程中萃取性能的变化情况，进行了循环试验。有机相作多次萃取与反萃取操作，即选用新鲜料液和新鲜有机相接触，达到平衡后，分离水相，分析组成，求出萃取率，然后用反萃液反萃，分离水相并分析，求出反萃率；经反萃后的有机相，再对新鲜料液进行萃取，再作反萃取，这样重复 5 次。相同两组试验的数据列于表 1。结果表明：在循环过程中，反胶束溶液的萃取性能及反萃取性能没有多少变化。

表 1 反胶束溶液循环使用下的效率

Table 1 Effectiveness of reversed micellar solution after cycling use

	Effectiveness	No. of cycle				
		1	2	3	4	5
1	<i>E</i>	0.986	0.988	0.994	0.996	0.995
	<i>E'</i>	0.920	0.873	0.904	0.986	0.988
2	<i>E</i>	0.988	0.986	0.986	0.997	0.993
	<i>E'</i>	0.867	0.843	0.869	0.964	0.974

Feed: 1mg/ml BSA, 0.1mol/L KCl, 0.05mol/L Tris-HCl (pH9.21), Organic phase: 20mmol/L CTAB/hex:oct (1:4), Stripping phase (mol/L): 1.5KBr, 0.08 NaAc-HAc (pH4.33), Phase ratio:  $V_w/V_o$  and  $V_w'/V_o = 1$

反胶束溶液循环使用中，还需考虑表面活性剂在水相中的溶解损失，这不仅会造成萃取率下降，还会污染所提取的蛋白质。一般认为在较高离子强度下 ( $\geq 0.1\text{mol/L}$ ) 与反胶束溶液平衡的水相中，表面活性剂的浓度与它的临界胶束浓度相当<sup>(7)</sup>。室温下，CTAB 在水中的临界胶束浓度值为 0.92mmol/L，且水中盐份及己醇的存在，都会降低临界胶束浓度值<sup>(8)</sup>。为了估算萃余水相中 CTAB 的最高含量，测定了它的表面张力，见表 2。

表 2 不同萃取液的表面张力值

Table 2 The surface tension of raffinate

Organic phase	CTAB (mmol/L) hex:oct (V/V)	15	20	20	20	40
		1:4	1:4	1:3.5	1:3	1:4
Raffinate	$\sigma$ (dyn/cm)	38.8	39.0	38.6	37.5	39.0

0.1mol/L KCl, 0.01mol/L Tris-HCl (pH8.5), 1mg/ml BSA

CTAB 的水溶液在临界胶束浓度下的表面张力为 38.8dyn/cm，溶液中含有盐及醇时，使表面活性离子在表面上定向排列得更紧密，表面张力大为降低<sup>(8)</sup>。从表 2 的数据来

看,与几种浓度的反胶束溶液接触后的萃余水相的表面张力,均接近于CTAB在纯水中、在临界胶束浓度下的表面张力,因此反胶束溶液(假定为20mmol/L CTAB)每与水相接触一次,表面活性剂的损失量不到5%。

#### 2.4 蛋白质在萃取-反萃过程中的浓缩

应用反胶束溶液萃取蛋白质时,通过优化两相间的体积比,还能够实现蛋白质的浓缩。对于萃取过程,相比( $V_w/V_o$ )应尽量地大,而对反萃过程,则相比( $V_o/V_w'$ )应尽量地大。萃取操作的相比对反胶束相负载的蛋白质容量的影响见图5。在( $V_w/V_o$ )值较低的情况下,几乎所有蛋白质都萃入有机相中,从而使蛋白质在有机相中的浓度,相对于初始水相浓度提高( $V_w/V_o$ )倍;然而当相比比较高时( $>4$ ),部分蛋白质残留在萃余相中。造成这现象的主要原因是由于反胶束溶液的负载能力有一定的限度。萃取操作应采用尽可能高的( $V_w/V_o$ ),这样,流程中所用的反胶束溶液量较少,操作费用亦较低。

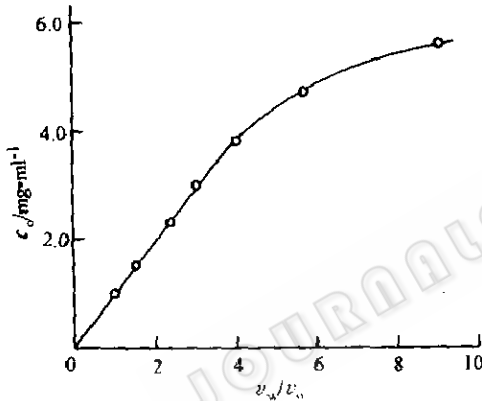


图5 萃取相比对反胶束萃取的影响

Fig. 5 Effect of forward transfer aqueous/organic ratio on reversed micellar extraction

20mmol/L CTAB/hex : oct (1 : 4), 0.1mol/L KCl, 0.01mol/L Tris-HCl (pH9.21), 1mg/ml BSA

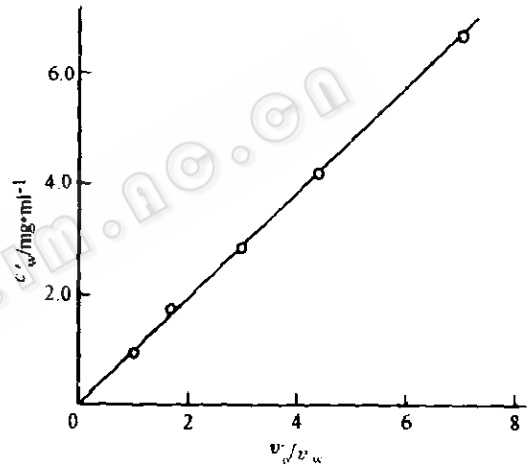


图6 反萃相比对反胶束萃取的影响

Fig. 6 Effect of back transfer organic/aqueous ratio on reversed micellar extraction

Aqueous phase (mol/L): 1.5 KBr, 0.08 NaAc-HAc (pH4.34), Organic phase: the reversed micellar solution obtained from the condition of Fig. 5 ( $V_w/V_o=1$ )

固定萃取相比( $V_w/V_o=1$ ),而改变反萃相比的实验结果见图6。在所研究的相比范围内,反萃液中蛋白质浓度 $c_w'$ 正比于反萃相比( $V_o/V_w'$ ),它表明反萃液的反萃能力不随相比的改变而变化。在一般情况下,由于无法从负载反胶束溶液中完全回收蛋白质;且反萃相比越大,蛋白质的变性与被污染程度越严重<sup>(9)</sup>。因此,在浓缩过程中,反萃相比不宜选得太大。例如,以20mmol/L CTAB/hex : oct(1 : 4)反胶束溶液来浓缩1mg/ml BSA的水溶液,依据图5、6,在萃取相比取为4、反萃相比取为7的情况下,得出BSA可浓缩25倍,即反萃液的BSA浓度达到25mg/ml,实验结果基本相符。

## 参 考 文 献

- (1) 陆 强, 李宽宏, 施亚钧. 生物工程进展, 1992, 12 (6): 12~16.
- (2) Carlson A, Nagarajan R. Biotechnol Prog, 1992, 8 (1): 85~90.
- (3) Lu Q, Li K H, Shi Y J. Chinese J of Chem Eng, 1993, 1 (3): 184~188.
- (4) Tanford C, Buzzell J G, Rands D G *et al.* J Am Chem Soc, 1955, 77 (24): 6421~6428.
- (5) Strickland E H, Billups C, Kay E *et al.* Biochemistry, 1972, 11 (19): 3657.
- (6) Grandi C, Smith R E, Luisi P L *et al.* J Biol Chem, 1981, 256 (2): 837~843.
- (7) Aveyard R, Binks B P, Clark S *et al.* J Chem Soc Faraday Trans p, 1986, 82 (1): 125~142.
- (8) 赵国玺. 表面活性剂物理化学. 北京: 北京大学出版社, 1984, 241~262.
- (9) Rahaman R S, Chee J Y, Cabral J M S *et al.* Biotechnol Prog, 1988, 4 (4): 218~224.

## Study on Bovine Serum Albumin Recovery from Reversed Micellar Solutions

Lu Qiang Li Kuanhong Shi Yajun

(*Chemical Engineering Research Centre, East China*

*University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

**Abstract** From near-infrared spectra, it was confirmed that CTAB/hexanol-octane reversed micellar solution is a suitable medium for bovine serum albumin (BSA) solubilization. The effects of various factors, such as pH, the type and concentration of salt in stripping solution, on BSA back extraction were studied. The suitable conditions for stripping have been ascertained, i. e., 1.0~2.0 mol/L KBr, pH=4.3~4.9. Spectroscopic studies showed that no significant change is observed in the structure of the main chain of BSA after extraction and back extraction. In addition, the problem how long the reversed micellar solution can be recycled have been examined. Finally, the recovery and concentration of protein were successfully obtained with suitable phase ratio.

**Key words** Reversed micellar solution, back extraction, bovine serum albumin