

溶菌酶的反胶束提取条件优化

刘瑞, 张弘弛, 周凤*, 韦琮智, 孔悦, 王腾龙
(山西大同大学 生命科学学院, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的:优化反胶束法分离和提取溶菌酶的条件,为溶菌酶的工业提取提供参考。方法:以溶菌酶质量浓度为评价指标,通过单因素试验和正交试验考察反胶束团中溴化十六烷基三甲铵(CTAB)浓度、正辛烷与正己醇的配比、氯化钾溶液浓度、被萃取液与萃取液比例对溶菌酶提取工艺的影响。结果:溶菌酶的最优提取条件为 CTAB 浓度 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,正辛烷-正己醇(4:1),KCl 浓度 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,被萃取液-萃取液(1:2)。在该条件下,溶菌酶质量浓度 $1.330 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:反胶束溶液提取溶菌酶的方法具有液液萃取的优点,溶菌酶不容易变性失活且溶解度较高,值得进一步推广与开发。

[关键词] 溶菌酶;反胶束溶液;单因素试验;萃取工艺

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0034-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150826.1525.006.html>

[网络出版时间] 2015-08-26 15:25

Optimization of Reverse Micelles Extraction Conditions of Lysozyme LIU Rui, ZHANG Hong-chi, ZHOU Feng*, WEI Cong-zhi, KONG Yue, WANG Teng-long (School of Life Sciences, Datong University, Datong 037009, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and extraction method of lysozyme by reversed micellar solution. **Method:** Taking the content of lysozyme as index, orthogonal test and single factor tests were adopted to optimize extraction process with CTAB concentration in reversed micellar clusters solution, ratio of *N*-octane and *n*-hexanol, KCl solution concentration and extract liquid to being extract liquid ratio as factors. **Result:** Optimum extraction conditions of lysozyme were as follows: CTAB concentration of $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, ratio of *N*-octane and *n*-hexanol of 4:1, KCl concentration of $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, extract liquid-being extracted liquid (1:2). The content of lysozyme was $1.330 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** Extracting lysozyme by reversed micellar solution has advantages of liquid-liquid extraction, while lysozyme is not deactivated and its solubility is higher, this technology is worthy further development.

[Key words] lysozyme; reversed micellar solution; single factor test; extraction process

反胶束萃取技术在分离提取工业生产中需求量较大的生物大分子物质方面具有独特优势^[1]。在传统的分离方法中,待分离的蛋白质等大分子物质会与有机溶剂直接接触,这容易引起待分离物质的失活,甚至变性,同时也存在蛋白质等大分子物质在有机溶剂中溶解性较弱的问题。而利用反胶束萃取法进行提取分离时,在反胶束溶液内部会形成大量

的中间包含有微型“水池”的反胶团物质^[2],这些反胶团物质会在溶液中形成亲水微环境,可充分避免待分离的蛋白质等生物大分子物质与有机溶剂的直接接触,使物质可以直接溶解进入胶团中的微型“水池”,防止了生物大分子的变性失活,同时解决了生物大分子物质在有机溶剂中的溶解性问题。反胶束提取技术作为一种适合生物大分子分离纯化的

[收稿日期] 20150422(010)

[基金项目] 山西省科技攻关项目(20100311092-1);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310120001);山西省大学生创新创业训练计划项目(2013259)

[第一作者] 刘瑞,博士,讲师,从事微生物代谢和调控研究,Tel:0352-7158938,E-mail:zhanghclw@163.com

[通讯作者] *周凤,教授,从事应用微生物研究,Tel:0352-7158810,E-mail:linzhoufeng@163.com

新型分离技术,在食品工业、医药工业中得到了广泛研究和应用^[3]。

溶菌酶有很好的抗菌作用,同时对缺乏细胞壁的人体细胞却无影响,已被广泛应用于食品防腐,特别用作婴儿食品的天然添加剂和天然防腐剂。随着溶菌酶的应用不断扩大,对其生产技术的要求越来越高。伴随生物技术与工程技术的迅速发展,急需研究和开发出一种能够高效的应用于工业化生产中的溶菌酶分离提取技术。本实验选择反胶束萃取法提取鸡蛋清中的溶菌酶,通过单因素试验和正交试验优选提取工艺条件,为该技术在中药材资源开发与利用方面提供参考。

1 材料

XW-80A 型旋涡振荡混合器(北京精密科学仪器厂),SP-754 型紫外-可见分光光度计(江苏博迅有限公司),FA-1004 型精密电子分析天平(南京精密科学有限公司),ST16R 型台式大容量离心机(江苏金坛仪器厂),PHS-3C 型实验室 pH 计(上海科学仪器厂)。溶菌酶(上海尚善生物科技公司,批号 F20140921),反胶束萃取液[自制,由溴化十六烷基三甲铵(CTAB)与正辛烷-正己醇(4:1)混合而成的反胶束溶液^[4]], $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(pH 9.0)等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶菌酶的提取 鸡蛋清中溶菌酶的等电点 11.1,相对分子质量 14 300,质量分数约占鸡蛋清总量的 3%~4%。在鸡蛋清中,溶菌酶与其他蛋白质的等电点差别较大,所以在提取缓冲液 pH 9.0 的条件下,只有包括溶菌酶在内的个别蛋白质带有正性电荷,很容易将其与大量带负性电荷的蛋白质分开。利用 pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液抽提鸡蛋清,通过离心法除去不溶物,获得溶菌酶的粗提液。小心破碎鸡蛋有气室的一头,使蛋清缓慢流出并收集到一个干净的 250 mL 烧杯中,用双层纱布过滤鸡蛋清,收集滤液,每 10 mL 滤液中加入 pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液 20 mL,轻轻摇晃混合均匀,在冰箱冷藏室中静置 20 min,转入离心管中,在转速 $4 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 15 min,得到的上层清澈溶液即为溶菌酶粗提取液。

2.2 标准曲线制作及粗酶液的含量测定 将溶菌酶晶体用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液(pH 11)配制成 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,以稀释液为空白对照,经全波长扫描可知溶菌酶在 280 nm 处

有最大吸收峰,确定在该波长测量吸光度 A 。以 A 为纵坐标,溶菌酶质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.6767X + 0.0155 (r = 0.9829)$ 。将溶菌酶粗提取液稀释 100 倍,测定其在 280 nm 处的 A 0.266,根据回归方程计算溶菌酶质量浓度 $0.370 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据溶菌酶粗提取液中溶菌酶的含量,将溶菌酶粗提取液用不同质量分数 KCl 稀释液稀释 37 倍,即得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶菌酶溶液。

2.3 溶菌酶的提取 将溶菌酶粗提取液与不同配比的反胶束溶液以一定体积比例进行混匀,在旋涡振荡混合器上充分混合 5 min,使萃取过程达到平衡,将乳浊液倒入离心管中,于 $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min,取下相液,测定其在 280 nm 处的 A ,根据回归方程计算溶菌酶的含量。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 CTAB 浓度对提取效果的影响 取适量 CTAB,分别加正辛烷-正己醇(4:1)混合液配成 10,15,20,25,30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的反胶束相溶液;用 pH 11 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液稀释酶液得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶菌酶溶液。将溶菌酶溶液和上述不同的反胶束相溶液以 1:1 比例混合,振荡混匀 5 min,使萃取过程达到平衡,将乳浊液倒入离心管,于 $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min,取下相液,于 280 nm 处测定 A 。结果显示随着 CTAB 浓度的增高,下相液中溶菌酶含量随之升高,当 CTAB 浓度增加到 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,下相液中溶菌酶含量逐渐稳定。出现这种现象的原因是当 CTAB 浓度处于较低水平时,随着 CTAB 浓度的逐渐上升,反胶束溶液中形成的胶团个数逐渐增多,所以下相液中溶菌酶的含量会逐渐上升;而当 CTAB 浓度增加到一定水平后,反胶束溶液中形成的胶团个数逐渐趋于稳定,其溶解酶的能力不再增强,故当 CTAB 浓度达一定高度后,溶菌酶含量的增加会逐渐趋于平缓^[5]。故选择 CTAB 浓度 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.2 有机溶剂配比对提取效果的影响 取适量 CTAB,分别用不同比例(3:1,3.5:1,4:1,4.5:1,5:1)的正辛烷-正己醇混合液配成 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 反胶束相溶液;用 pH 11 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾溶液稀释酶液得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶菌酶溶液。按 2.4.1 项下方法处理。结果发现萃取平衡后,下相液中溶菌酶含量随着有机溶剂配比的升高而逐渐降低。因为当反胶束溶液中正辛烷的比例处于较低水平时,形成的胶团个数较多,也相对比较稳定^[6];随着反胶束溶液中正辛烷比例的升高,胶团的个体大小逐渐减小,会导致溶菌酶难以进入胶团中,故酶含量处于较低

水平。故选择正辛烷-正己醇(3:1)。

2.4.3 KCl 溶液浓度对提取效果的影响 取适量 CTAB,用正辛烷-正己醇(4:1)混合液配成 20 mmol·L⁻¹反胶束相溶液;分别用浓度为 0.05,0.075,0.10,0.125,0.15 mol·L⁻¹的 KCl 溶液(pH 11)稀释酶液得 1.0 g·L⁻¹溶菌酶溶液。按 2.4.1 项下方法处理。结果显示随着 KCl 浓度的增高,萃取平衡后下相液中溶菌酶的含量降低。原因可能是因为随着 KCl 浓度的增大,胶团内部的电子层逐渐变薄,胶团内部和酶分子间的吸引力会逐渐减小,故溶菌酶含量会逐渐减小;胶团内部的电子层逐渐变薄,也会导致 CTAB 分子极性基团之间相互影响逐渐减弱,从而使胶团分子的个体大小逐渐减小,酶分子难以进入胶团之中;KCl 浓度水平的增高,还会使反胶束溶液中“微水体”的运动效应增强^[7],从而影响酶分子的溶解,甚至会导致酶分子从中析出。故 KCl 溶液浓度取 0.1 mol·L⁻¹较为合理。

2.4.4 溶菌酶粗提取液和反胶团萃取液混合比对提取效果的影响 取适量 CTAB,用正辛烷-正己醇(4:1)混合液配成 20 mmol·L⁻¹反胶束相溶液;用 pH 11 的 0.1 mol·L⁻¹氯化钾溶液稀释酶液得 1.0 g·L⁻¹溶菌酶溶液。将溶菌酶溶液和反胶束相溶液分别以 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3 的比例混合,按 2.4.1 项下方法处理。结果发现随着混合液中溶菌酶粗提取液和反胶团萃取液的比例逐渐减小,反胶束溶液中溶菌酶的含量逐渐减小^[8]。当混合液的体积一定时,随着比例逐渐减小,混合液中反胶束溶液所占的比例逐渐增大;虽然反胶束溶液中溶菌酶含量有一定程度的降低,但由于反胶束溶液所占的比例逐渐增大,其含有的溶菌酶绝对量也在逐渐增大,故萃取效果逐渐增强。考虑到反胶束溶液的有效利用率和综合利用价值,选择溶菌酶粗提取液和反胶团萃取液(1:2)。

2.5 提取条件的正交试验优选 在单因素试验基础上,选择 CTAB 浓度、有机溶剂配比、KCl 稀释液浓度、溶菌酶粗提取液和反胶团萃取液混合比例为考察因素,以溶菌酶质量浓度为评价指标,准确称取溶菌酶粗提液 10 mL,共 9 份,采用 L₉(3⁴)正交试验优化提取工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对反胶束提取工艺的影响顺序为 C>D>A>B。以极差最小的因素 B 为误差项进行方差分析,结果显示因素 C、D 对溶菌酶的提取均具有显著性影响,因素 A 则无显著性影响,确定反胶束溶液提取溶菌酶的最佳条件为

A₃B₂C₃D₃,即 CTAB 浓度 30 mmol·L⁻¹,正辛烷-正己醇(4:1),KCl 浓度 0.15 mol·L⁻¹,溶菌酶粗提取液-反胶团萃取液(1:2)。

表 1 溶菌酶反胶束提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction conditions of lysozyme with reverse micelle

No.	A CTAB 浓度 /mmol·L ⁻¹	B 正辛烷-正己醇	C KCl 浓度 /mol·L ⁻¹	D 溶菌酶粗提取液-反胶团萃取液	溶菌酶 /g·L ⁻¹
1	10	3:1	0.05	2:1	0.760
2	10	4:1	0.10	1:1	1.118
3	10	5:1	0.15	1:2	1.078
4	20	3:1	0.15	1:1	1.103
5	20	4:1	0.05	1:2	1.010
6	20	5:1	0.10	2:1	0.867
7	30	3:1	0.10	1:2	1.267
8	30	4:1	0.15	2:1	1.016
9	30	5:1	0.05	1:1	0.896

表 2 溶菌酶提取工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of extraction conditions of lysozyme

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.075	0.037	4.777	>0.05
B(误差)	0.176	0.088	3.423	
C	0.234	0.117	72.698	<0.05
D	0.37	0.185	54.878	<0.05

注:F_{0.05}(2,2)=19。

2.6 验证试验 准确量取溶菌酶粗提液 20 mL,共 3 份,按最优提取条件进行验证试验,于 280 nm 处测得吸光度分别为 0.911,0.920,0.915,通过标准曲线求得溶菌酶质量浓度分别为 1.323,1.337,1.329 g·L⁻¹,说明优选的反胶束提取工艺稳定可行。

3 讨论

溶菌酶又称为细胞壁质酶,是一种高效的抑菌、杀菌、抗病毒蛋白质,在鸟类蛋清中的含量较丰富。溶菌酶作为一种杀菌和营养添加剂,在医药、食品及生物化学领域应用广泛,提示提取溶菌酶具有重要意义^[9]。目前,溶菌酶的主要研究生产方式都是先从蛋清中获得溶菌酶的粗酶溶液,然后通过传统的沉淀法、结晶法,新技术的离子交换吸附法、亲和层析法、膜分离法进行处理。传统的沉淀法和结晶法,虽然工艺简单,但溶菌酶成品中盐浓度很高,容易使部分溶菌酶变性失活;而新技术的离子交换吸附法、

亲和层析法、膜分离法都具有分离专一性强、分离率高、纯度高特点,同时溶菌酶也不易发生变性,因而研究就多,但其工艺成本较高。因而本文从寻找一种提取率和溶菌酶纯度较高且工艺成本较低的角度出发,筛选出使用反胶束提取溶菌酶的工艺条件。本文使用的反胶束溶液提取溶菌酶的方法具有液液萃取的优点,反胶束溶液内部的条件接近细胞内的结构条件,溶菌酶不容易变性失活,而且溶解度也较高,这为工业化生产中溶菌酶高效、高产的提取与分离提供了新路径。

[参考文献]

[1] 余江,刘会洲,陈家镛. 微乳相萃取技术的研究进展[J]. 化工学报,2006,57(8):1746-1755.
[2] 高亚辉,陈复生,赵俊廷. 反胶束萃取蛋白质的动力学研究进展[J]. 食品科技,2007,32(2):8-12.
[3] 段金友,方积年. 反胶束萃取分离生物分子及相关领

域的研究进展[J]. 分析化学,2002,30(3):365-371.
[4] 王金枝,曹学君. 反胶束萃取技术分离胰激肽原酶[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(3):93-99.
[5] Lang J, Lalem N, Zana R. Quaternary water in oil microemulsion. 1. Effect of alcohol chain length and concentration on droplet size and exchange of material between droplet [J]. J Phys Chem, 1991, 95 (23): 9533-9541.
[6] 徐宝财,王媛,肖阳,等. 反胶团萃取分离技术研究进展[J]. 日用化学工业,2004,34(6):390-393.
[7] Golen K E, Hatten T A. Liquid-liquid extraction of low molecular weight proteins by selective solubilization in reversed micelles[J]. Sep Sci Technol, 1987, 22(2/3): 831-841.
[8] 赵金荣,杨效登,柴金岭. 微乳液在溶剂萃取分离中的应用研究进展[J]. 山西化工,2007,27(1):21-24.
[9] 贾向志,李元,马文煜. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物技术通讯,2002,13(5):374-377.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名,其他域名均非本刊。

②本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③投稿成功后,为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。