

文章编号: 1000-5013(2013)02-0182-04

反胶束萃取阿魏酸酯酶

王镇发, 陈培钦, 邓秩韬, 谢晨, 李夏兰

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 利用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)/正己醇/异辛烷反胶束萃取阿魏酸酯酶, 考察 pH 值、离子强度、CTAB 浓度对阿魏酸酯酶的 CTAB/正己醇/异辛烷反胶束萃取及其反萃取的影响. 结果表明: 萃取的最佳条件为酶液透析 24 h, pH 值为 12, 萃取液为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 的正己醇/异辛烷溶液(体积比为 1:5), 萃取率接近 100%; 反萃取的最佳条件为 pH 值为 7 的 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液, 反萃取率可达 79%. 纯化后比活为 $356.7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$, 纯化倍数为 6.9, SDS-PAGE 电泳显示两条带.

关键词: 阿魏酸酯酶; 反胶束; 萃取; 十六烷基三甲基溴化铵

中图分类号: Q 556.1

文献标志码: A

阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)是羧酸酯水解酶的一个亚类, 属胞外酶, 其主要生物功能是水解多糖与阿魏酸连结的酯键^[1]. 1987 年, Mackenzie 等^[2]首次在橄榄色链霉菌中发现了阿魏酸酯酶; 1991 年, Faulds 等^[3]成功分离纯化了阿魏酸酯酶. 到目前, 已从真菌和细菌中得到超过 40 种阿魏酸酯酶^[4-6], 各种微生物分泌的阿魏酸酯酶在氨基酸序列、肽链的结构、物化性质和催化特性上有所不同^[4-7]. 阿魏酸酯酶的分离纯化是其应用的基础, 所以阿魏酸酯酶的分离纯化一直都是研究的一个重点. 相比于层析法, 反胶束萃取蛋白质具有成本低、回收率高、操作时间短和处理量大等优点. 本实验室已从腐烂的木质纤维中筛选到 1 株产阿魏酸酯酶的菌株, 并对其进行了鉴定^[8]. 本文研究反胶束萃取法分离纯化该菌种发酵所产的阿魏酸酯酶, 为阿魏酸酯酶的应用提供前期的基础.

1 实验材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

反式阿魏酸标准品, 美国 Sigma 公司; 阿魏酸甲酯, 华侨大学化工学院曾庆友老师合成; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 分析纯, 北京佰利申科贸有限公司; 异辛烷, 正己醇, 甲醇, 氯化钾等均为市售, 分析纯.

DYY-8C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Thermo EC120 小型垂直电泳系统, 美国 Thermo 公司; ODS-C18 型色谱柱($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 美国 Thermo 公司; MW3500 型透析袋, 上海绿鸟科技发展有限公司; XW-80A 型漩涡混合仪, 上海精科实业有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液的制备 菌种及发酵液的制备, 参见文献^[9].

1.2.2 阿魏酸及阿魏酸酯酶酶活的测定 阿魏酸的测定采用 HPLC 法^[8]. 阿魏酸酯酶活测定方法参见文献^[9].

收稿日期: 2012-04-18

通信作者: 李夏兰(1965-), 女, 教授, 主要从事生物化工的研究. E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技计划重点基金资助项目(2011N0020); 华侨大学科研基金资助项目(09X0289); 华侨大学高层次人才启动基金资助项目(11BS221)

1.2.3 蛋白质浓度测定 蛋白质浓度的测定采用考马斯亮蓝法^[10].

1.2.4 反胶束萃取阿魏酸酯酶 1) 萃取. 用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液、 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节酶液 pH 值, 用 KCl 调节酶液的离子强度. 称取一定质量的 CTAB 加入小试管中, 再加入 2 mL 体积比为 1:5 的正己醇/异辛烷溶液, 振荡片刻, 加入等体积的酶液, 漩涡振荡 2 min, 室温静置; 待分层后测定下层水相的酶活力和蛋白浓度, 计算萃取率(E)和纯化倍数(D). 2) 反萃取. 在另一只小试管中加入 1.5 mL 萃取相, 再加入等体积一定 pH 值和浓度的 KCl 溶液, 漩涡振荡 2 min, 室温静置; 待油水分层后测定下层水相中的酶活力和蛋白浓度, 计算总萃取率(E_t)和纯化倍数.

1.2.5 电泳 将经反胶束萃取和反萃取的的酶液进行 SDS-PAGE 电泳.

2 结果与讨论

2.1 pH 值对萃取率的影响

在 KCl 浓度为 $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萃取阿魏酸酯酶, 结果如图 1 所示. 从图 1 可知: 萃取液 pH 值为 12 时, 萃取率最高, 达到 94.5%. pH 值主要决定蛋白质所带的静电荷, 进而改变蛋白质表面电荷和反胶束内表面电荷间的静电作用^[11]. CTAB 是阳离子表面活性剂, 极性头带正电. 因此, 只有在水相 pH 值大于蛋白质等电点时, 蛋白质带负电荷, 才能被包裹进反胶束中. 该菌分泌的阿魏酸酯酶的 pI 值还未测定, 但据报道, 不同菌株来源的阿魏酸酯酶的 pI 值在 3~10 之间^[12]. 所以 pH 值越大, 水相 pH 值和蛋白质等电点的差值越大, 静电作用就越强, 萃取率就越高.

2.2 KCl 浓度对萃取率的影响

在 pH 值为 12 时萃取阿魏酸酯酶, 结果如图 2 所示. 从图 2 可知: 随着离子浓度的增高, 萃取率迅速降低, KCl 浓度为 $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 萃取率只有 15%. 这可用双电子层理论^[11]解释, 即离子强度的增加减弱了表面活性剂极性头之间的斥力, 反胶束体积变小, 蛋白质甚至无法进入反胶束.

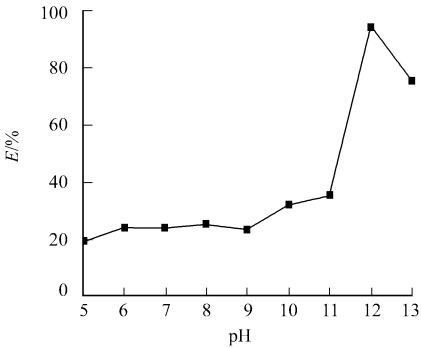


图 1 pH 值对萃取率的影响
Fig. 1 Effect of pH value on extraction efficiency

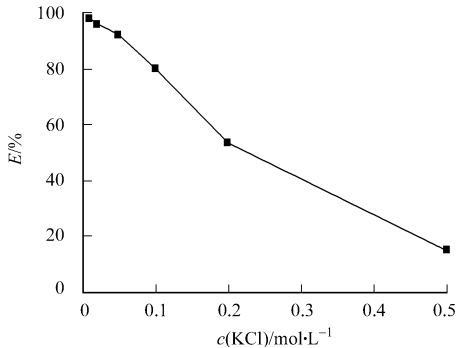


图 2 KCl 浓度对萃取率的影响
Fig. 2 Effect of concentration of KCl on extraction efficiency

2.3 CTAB 浓度对萃取率的影响

在 pH 值为 12, KCl 浓度为 0 时萃取阿魏酸酯酶, 结果如图 3 所示. 从图 3 可知: 当 CTAB 浓度小于 $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 萃取率随着 CTAB 浓度的增加而提高. 这是因为表面活性剂浓度的增加使反胶束的数量增加, 萃取率提高. 当 CTAB 浓度达到 $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 水相中的阿魏酸酯酶全部进入反胶束中, 萃取率接近 100%.

2.4 反萃取时水相 pH 值对反萃取的影响

优化条件下 (pH 值为 12, CTAB 浓度为 $25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl 浓度为 0) 对阿魏酸酯酶进行萃取后, 在 0 和 $0.15\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液中进行反萃取阿魏酸酯酶, 结果如图 4 所示. 从图 4 可知: 当 KCl 浓度为 $0.15\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值

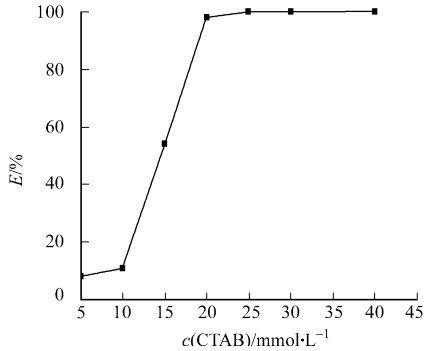


图 3 CTAB 浓度对萃取率的影响
Fig. 3 Effect of concentration of CTAB on extraction efficiency

为 5~10 时,其反萃取率为 70%左右;而当 pH>8 时,反萃取率下降.若 KCl 浓度为 0 时,改变水相的 pH 值,即使当水相 pH 值低于阿魏酸酯酶的 pI 值时,阿魏酸酯酶带正电荷与 CTAB 的极性头所带的正电荷排斥,也无法实现阿魏酸酯酶从反胶束中的反萃取.这说明在萃取中起作用的不只是静电作用,还有其他的因素,如疏水相互作用^[11]、立体相互作用和特异性相互作用^[12].

2.5 反萃取时水相的 KCl 浓度对反萃取的影响

用 pH 值为 7 的不同浓度 KCl 溶液进行反萃取阿魏酸酯酶,结果如图 5 所示.从图 5 可知:随着 KCl 浓度的升高,反萃取率逐渐增大,当 KCl 浓度为 0.20 mol·L⁻¹时,反萃取率最高为 79%.当离子强度增大时,反胶束表面双电层变薄^[13],阿魏酸酯酶与反胶束表面之间的静电吸引减弱,酶在反胶束中的溶解度降低,从而使反萃取率提高.但进一步提高 KCl 浓度,反萃取率开始下降,当 KCl 浓度为 0.25 mol·L⁻¹时,萃取率仅为 56%.这可能是较高的 KCl 浓度会导致酶的盐析,从而使反萃取率降低.

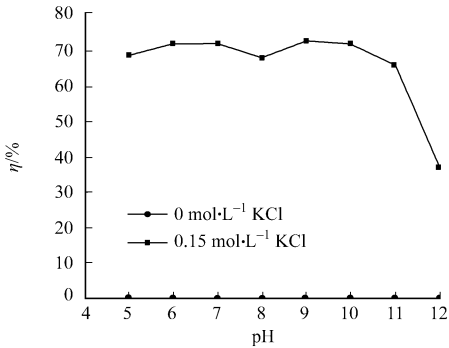


图 4 反萃取水相的 pH 值对总萃取率的影响
Fig. 4 Effect of pH in backward aqueous phase on the total extraction efficiency

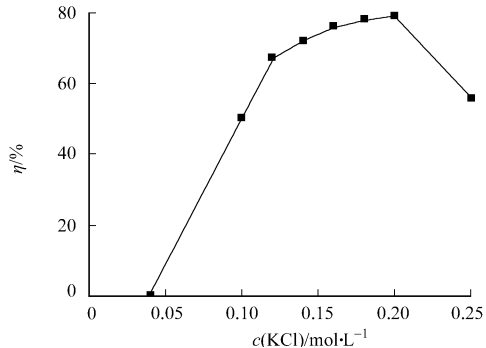


图 5 反萃取水相 KCl 浓度对总萃取率的影响
Fig. 5 Effect of concentration of KCl in backward aqueous phase on the total extraction efficiency

透析后粗酶液在 pH 值为 12,CTAB 浓度为 25 mmol·mL⁻¹,KCl 浓度为 0 下萃取,在 0.2 mol·L⁻¹ KCl 下反萃取,酶活力(α)和蛋白浓度(c (蛋白质))的变化如表 1 所示.通过萃取和反萃取,阿魏酸酯酶回收率(E_i)为 79.0%,比活($\Delta\alpha$)从 51.7 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到 356.7 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$,纯化倍数(D)为 6.9.

表 1 阿魏酸酯酶纯化的各参数

Tab. 1 Summary of the purification of feruloyl esterases

溶液	$\alpha/\mu\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$	$c(\text{蛋白质})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\Delta\alpha/\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$	D	$E_i/\%$
粗酶液	11.0	211.0	51.7	—	—
萃取液	11.9	102.1	116.2	2.24	99.8
反萃液	8.6	24.1	356.7	6.90	79.0

2.6 反胶束纯化结果电泳

图 6 为不同透析时间的阿魏酸酯酶液反胶束萃取纯化后的 SDS-PAGE 电泳图.其中:1 为 Marker;2 为发酵液;3 为经反胶束萃取及反萃取的纯化结果.从图 6 中可知:在条带 35 ku 左右有一条带,与本实验室报导的相近^[9],为阿魏酸酯酶的条带.同时还可以看出:CTAB 反胶束纯化阿魏酸酯酶有较好的效果,尤其是对除去分子量大于阿魏酸酯酶的蛋白质.

3 结论

研究结果表明:萃取时,透析后的粗酶液的 pH 值为 12 时,与等体积的 25 mmol·L⁻¹ CTAB 反胶束溶液混合,阿魏酸酯酶萃取率最高,接近 100%;反萃取时,将反胶束与等体积 pH 值为 7 的 0.20 mol·L⁻¹ KCl 溶液混合,漩涡振荡 3 min,阿魏酸酯酶总得率最高为 79%,比活从粗酶液的 51.7 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到 356.7 $\mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$,纯

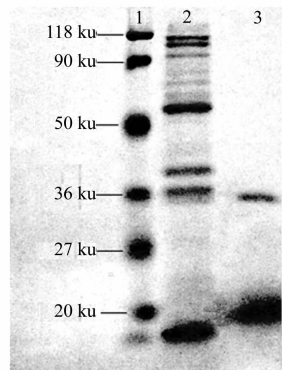


图 6 阿魏酸酯酶液反胶束萃取后的电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of feruloyl esterase after reverse micelles extraction

化倍数为6.9.阿魏酸酯酶酶液经反胶束萃取后,SDS-PAGE电泳只显示两条带,说明CTAB/正己醇/异辛烷反胶束体系能有效地分离纯化阿魏酸酯酶.此方法与层析法相比,具有提取时间短、成本低、易于放大等优点.

参考文献:

- [1] CREPIN V, FAULDS C, CONNERTON I. Functional classification of the microbial feruloyl esterases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 647-652.
- [2] MACKENZIE C R, BILOUS D, SCHNEIDER H, et al. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(12): 2835-2839.
- [3] FAULDS C B, WILLIAMSON G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes* [J]. Microbiology, 1991, 137(10): 2339-2345.
- [4] TOPAKAS E, VAFIADI C, CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 497-509.
- [5] BENOIT I, DANCHIN E G J, BLEICHRODT R J, et al. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(3): 387-396.
- [6] KOSEKI T, FUSHINOBU S, SHIRAKAWA H, et al. Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(5): 803-810.
- [7] FAZARY A E, JU Y H. Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(11): 811-828.
- [8] 李夏兰, 胡雪松, 范韵敏, 等. 一株产阿魏酸酯酶青霉菌株的筛选、鉴定及生长特征[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1588-1593.
- [9] 李夏兰, 范韵敏, 方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1058-1064.
- [10] 汪家正, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 42-47.
- [11] 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.
- [12] KOSEKI T, FUSHINOBU S, SHIRAKAWA H, et al. Occurrence, properties and applications of feruloyl esterases [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(5): 803-810.
- [13] 李凯, 李成付, 李加友, 等. 反胶束萃取精氨酸脱亚胺酶[J]. 精细化工, 2008, 25(2): 163-166.

Purification of Feruloyl Esterase Using Reverse Micelles Extraction

WANG Zhen-fa, CHEN Pei-qin, DENG Yi-tao,
XIE Chen, LI Xia-lan

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The cetrimonium bromide/hexanol/isooctane reverse micelles extraction and backward extraction were used to purify feruloyl esterase. The effects of pH, ionic strength and cetrimonium bromide (CTAB) concentration on the cetrimonium bromide/hexanol/isooctane reverse micelles extraction and backward extraction were studied. The results showed that the extraction efficiency was nearly 100% when the optimal extraction conditions were used as followed: enzyme dialysis time 24 h, pH 12 and CTAB concentration in hexanol/isooctane solution (volume ratio 1 : 5) 25 mmol · L⁻¹. The optimal condition of backward extraction was 0.20 mol · L⁻¹ KCl with pH 7, and the efficiency of backward extraction was 79%. After extraction and backward extraction of the enzyme, specific activity was 356.7 μkat · g⁻¹, purification fold was 6.9, and SDS-PAGE electrophoresis showed two bands.

Keywords: feruloyl esterase; reverse micelles; extraction; cetrimonium bromide